

乳鼠感染肾综合征出血热病毒形态的电镜观察

陈德薰 杨惠彬 王国华 张贺秋

(中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

倪大石 何 浩 李永珍 周 宁

(安徽省医学科学研究所, 合肥)

应用常规超薄切片技术, 对新生乳鼠脑内接种 ALC96 株肾综合征出血热 (HFRS, 又称流行性出血热) 病毒后不同时期的脑组织进行电镜观察。感染早期 (4 天), 大脑海马回神经细胞显示核周胞浆内高尔基膜囊堆增生, 小泡密布。感染晚期 (8 天、10 天), 在显著增生、扩大的高尔基囊泡池内找到为数不多的直径在 70—110 nm 的圆形、卵圆形或杆状病毒颗粒。成熟病毒具有双层脂质包膜及表面穗状微突, 核心含少量细管丝或微细颗粒。病毒成熟的方式是从高尔基囊泡膜内壁上发芽进入池内。在感染细胞高尔基区及其邻近可见到由中等致密的细管丝或细颗粒样结构所组成的胞浆包涵体。根据感染乳鼠大脑神经细胞内病毒的形态学和形态发生学特征, 可以证实 HFRS 病毒属于布尼亚病毒科 (Family Bunyaviridae) 的成员。

关键词 肾综合征出血热病毒; 布尼亚病毒科

自 1978 年李镐汪等^[1]从黑线姬鼠肺组织中分离到朝鲜出血热的病原因子以来, 国内也相继从啮齿动物 (黑线姬鼠、褐家鼠和棕背鼯等) 的肺组织以及急性期病人血液中分离到多株肾综合征 (HFRS) 病毒^[2-5]。1982 年 McCormick 等和 White 等^[6,7]同时应用电镜负染技术, 在提纯的 Hantaan 病毒 (76-118 株) 悬液中看到布尼亚病毒样颗粒。其后, 洪涛等和余澄之等^[8,9]又先后应用免疫酶和免疫铁蛋白电子显微术, 在用不同来源的 HFRS 病毒株感染的培养细胞超薄切片中, 也观察到类似布尼亚病毒科的病毒颗粒。最近, 倪大石等^[10]在实验动物模型研究中证明, 多株 HFRS 病毒经脑内接种均可使新生乳鼠不同程度感染。其中从疫区黑线姬鼠肺内分离的 ALC96 株病毒经乳鼠脑内传代 3 次后, 再用 Vero E-6 细胞测定其感染滴度 (TCID₅₀) 较原滴度明显增高。这为 HFRS

病毒的形态学和形态发生学的研究提供了实验动物模型。

我们应用常规电镜超薄切片技术, 在 HFRS 病毒感染的新生乳鼠大脑神经细胞内发现有病毒繁殖, 并根据其形态学和形态发生学特征证实, HFRS 病毒为布尼亚病毒科 (Bunyaviridae Family) 的成员, 现报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 实验动物

新生乳小白鼠 (2—3 日龄)。

(二) 病毒接种

HFRS 病毒 ALC96 株^[11] (从疫区黑线姬鼠肺中分离, 适应于 A-549 细胞, 经乳鼠脑内传代毒力加强) 为第 9 代鼠脑毒种^[10]。脑内接种病毒悬液 0.02—0.03 ml。每天观察发病和死亡情况。

(三) 电镜样品制备

本文于 1985 年 2 月 15 日收到。

取接种后 4、8 和 10 天乳鼠的大脑海马回部位组织切成 1 mm^3 小块,按常规固定,脱水, Epon 812 包埋和半薄切片准确定位。超薄切片经铅-铀盐液染色后,在 Philips EM-400T 电镜下观察。

结 果

新生乳鼠脑内接种 HFRS 病毒后 7 天发病,出现茸毛、蜷缩、尾强直和后肢麻痹,10 天左右死亡。

在电镜下观察,感染乳鼠大脑海马回神经细胞的超微结构改变主要有:(1)核周胞浆内高尔基体增生、扩张;(2)扩大的高尔基囊泡池内含病毒颗粒,并具有芽生成熟的图象;(3)感染后期出现较多胞浆包涵体。

接种病毒后 4 天:在部分感染神经细胞核周可见到明显的高尔基体增生,膜囊堆数目增多,小泡密集。少数神经细胞轴突内有增生的高尔基膜囊池和小泡伸入,与神经微管伴行。胞浆内其他细胞器尚属正常,在高尔基囊泡内未找到病毒颗粒。

接种病毒后 8 天:感染神经细胞内的高尔基体增生更为突出,常呈球形或半球形,膜囊堆可多达 5—6 组,小泡密集,分布在膜囊周边和中央部位,不少膜囊池和囊泡扩张,形成大空泡或囊腔。在少数周边扩大的高尔基囊泡内能找到单个或偶见 2—3 个聚在一起的病毒颗粒(图版 I-1)。病毒颗粒呈圆形或卵圆形或短杆状,直径多数在 $70-110\text{ nm}$,有包膜。病毒包膜的双层脂质膜在高倍放大时可分辨,其外表面有穗状微突缘。在中心剖开的病毒核心内,可见含有一个致密的空心细丝结构,直径约为 10 nm ,核心外周为附着在包膜内壁的细丝。病毒从高尔基囊泡壁上芽生成熟进入囊泡池内的过程可见(图版 I-2)。此外,在有的扩大的高尔基囊泡内还见到一种长杆状病毒,它的直径常小于圆形病毒颗粒,

约为 65 nm ,纵剖面可见含细丝样轴心(图版 I-1,3)。

在感染神经细胞胞浆内还可以观察到一种数目不等、无明确界限的包涵体(图版 I-1)。它是由中等致密,直径约为 10 nm 的细管丝样或颗粒样结构组成,分布在增生的高尔基体邻近。

接种病毒后 10 天:感染神经细胞核周高尔基膜囊堆和囊泡的增生仍很活跃,囊池扩大,小泡密集。在不少膨大的高尔基囊泡腔内找到正在发芽成熟的或游离在囊泡腔内的病毒颗粒(图版 I-4—6)。成熟病毒的形态特征同 8 天者。个别极度扩张的高尔基囊泡中见到一种比较细长的丝状病毒,其长径仅 60 nm 左右,而长度可超过其直径的 5 倍,并显示具有周期性横纹(图版 I-4)。在核周和高尔基体邻近也有由细管丝样或颗粒样结构组成的包涵体(图版 I-5)。有时在一个感染神经细胞胞浆内最多可见到 6—7 个包涵体,还可以见到包涵体与高尔基囊泡池外壁贴近的图象。

各实验组乳鼠感染神经细胞的表面和细胞间隙内均未见到病毒颗粒。

对照组新生乳鼠大脑海马回神经细胞核周高尔基体结构正常,未查见病毒颗粒和包涵体。

讨 论

在感染细胞高尔基体及其邻近的光面囊泡中芽生成熟是布尼亚病毒科(Family Bunyaviridae)区别于其他 RNA 病毒科独特的形态发生学特征^[2]。我们曾根据这一特征,确定新疆出血热(XHF)病毒为该科的成员^[3]。肾综合征出血热(HFRS,又称流行性出血热 EHF 或朝鲜出血热 KHF)的病原,虽然在四十年代初已被认为可能是一种滤过性病毒,但直到 1982 年 McCormick 等和 White 等^[6,7]才在浓缩提

纯的病毒悬液负染样品中见到类似布尼安病毒科的病毒。国内洪涛等和余澄之等^[8,9]应用免疫标记电镜技术,在不同来源的 HFRS 病毒感染细胞培养物的超薄切片中也见到与布尼安病毒科相类似的病毒颗粒。但均未观察到病毒在高尔基区或其邻近光面囊泡内发芽成熟的繁殖特点,颗粒大小变动范围也较大(细胞内病毒直径在 116—167 nm 或 50—156 nm 之间)。我们曾在电镜下检查过几株 HFRS 病毒感染的 Vero E-6 和 A-549 细胞,均因发现其中有支原体污染而未获得预期结果。倪大石等^[10]复制 HFRS 动物模型研究的成功,使病毒得以在感染乳鼠大脑神经细胞内增殖。选择此材料进行常规超薄切片电镜观察是我们能在感染海马回神经细胞核周增生、扩大的高尔基囊泡池内找到典型病毒颗粒的关键。该病毒在大小(直径为 70—110nm)、形状(圆形、卵圆形或杆状)、具有双层脂质包膜和表面穗状微突以及在高尔基囊泡壁上发芽成熟的方式等方面均符合布尼安病毒科的形态特征^[12]。

在 HFRS 病毒感染晚期,神经细胞内所见到的胞浆包涵体,与我们在 XHF 病毒感染细胞中所见到的包涵体有所不同^[13]。它是由中等致密的细管丝和细颗粒组成,与成熟病毒颗粒核心内的细管丝样核衣壳丝相似。因而这种包涵体很可能是病毒浆或者是在胞浆内复制组装的病毒核衣壳。

在个别高尔基囊泡内所见到的一种比较细长的杆状或丝状病毒颗粒,它的直径往往小于圆形病毒颗粒。这与 Murphy 等(1968)^[14]描述 Bunyamwera 属 Tensan 和

Maguari 长形病毒的形态十分相似。这种长形颗粒也许是发育尚未完善的病毒。

最近,国外对 Hantaan 病毒(76-118 株)的分子生物学研究证明:该病毒的单链 RNA 分子有大、中、小三个基因片段,符合布尼安病毒科的核酸特性。但 RNA 末端氨基酸序列分析结果不同于已知的 4 个属的代表种,表明 KHF 病毒可能是布尼安病毒科的一个新属^[15]。有关国内所分离获得的多株 HFRS 病毒核酸的分子结构及其生物学特性尚待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Lee, H. W. et al.: *J. Infect. Dis.*, **137**: 298—308, 1978.
- [2] 宋 干等: 中国医学科学院学报, **4**: 73—77, 1982.
- [3] 严玉辰等: 同上, **4**: 67—71, 1982.
- [4] 倪大石等: 中华医学杂志, **63**: 65—68, 1983.
- [5] 李钟铎等: 中华流行病学杂志, **4**: 198—201, 1983.
- [6] McCormick, J. B. et al.: *Lancet*, **1** (8275): 765—768, 1982.
- [7] White, J. D. et al.: *Lancet*, **1**(8275): 768—771, 1982.
- [8] 洪 涛等: 中华微生物学和免疫学杂志, **3**: 69—72, 1983.
- [9] 余澄之等: 电子显微学报, **3**: 42, 1984.
- [10] 倪大石等: 安徽医学, **6**: 7—10, 1985.
- [11] 河 浩等: 中华流行病学杂志, **4**: 148—152, 1983.
- [12] Bishop, D. H. L. and R. E. Shope: Bunyaviridae. In "Comprehensive Virology" H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, eds., Vol. 14, Plenum, New York, pp. 1—156, 1979.
- [13] 陈德惠等: 中华病理学杂志, **12**: 202—204, 1983.
- [14] Murphy, F. A. et al.: *J. Virol.*, **2**: 1315—1325, 1968.
- [15] Schmaljohn, C. S. et al.: *Virology*, **131**: 482—491, 1983.

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE MORPHOLOGY OF VIRUS OF HAEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN SUCKLING MICE

Chen Dehui Yang Huibin Wang Guohua Chang Hequi

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

Ni Dashi He Hao Lee Younzheng Zhou Lin

(Institute of Medical Sciences of Anhui Province, Hefei)

Two-three-day old mice were inoculated with ALC96 strain HFRS virus. Routine ultrathin sections of infected mouse brain tissues were examined in electron microscope.

Four days after inoculation an increase in the amount and complexity of membranes and vacuoles of the Golgi apparatus in infected nerve cells occurred predominately. Later (8 and 10 days after inoculation) a small number of matured virions were found within the distended Golgi sacculus and vesiculae of infected neurons. Most of viral particles observed in ultrathin sections were round or oval in shape and 70—110 nm in diameter. A lipid bilayered viral envelope with an external

fringe of surface projections could be resolved at high magnification. The mode of maturation of the virus involved budding from cytoplasmic membrane into Golgi vesiculae.

The known morphological and morphogenetic findings of virus particles observed in mouse brain tissue gave the further evidence for taxonomic identification of HFRS virus as a member of the family Bunyaviridae.

Key words

Virus of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRSV); Family Bunyaviridae

图 版 说 明

1. 感染乳鼠大脑海马回神经细胞胞浆内增生的高尔基体膜囊堆 (G)、包涵体 (A) 和扩大的高尔基囊泡池中的肾综合征出血热病毒颗粒 (V) ($\times 46,000$); 2,3. 扩大的高尔基囊泡池内芽生成熟的病毒颗粒 (V) ($\times 114,000$, $\times 126,000$); 4. 高尔基囊泡池中的长杆状病毒颗粒 (V) ($\times 64,800$); 5. 显著增生呈环状的高尔基区 (G) 及囊泡池中正在发芽 (Vb, 插入图) 和成熟的病毒颗粒 (V) ($\times 32,300$) (插入图 $\times 64,800$); 6. 高尔基体 (G) 囊泡池内单个病毒颗粒 (V), 具有双层脂质膜及表面微突 ($\times 72,000$).

1. Hyperplastic Golgi zone (G) and inclusion body (A) in the cytoplasm of suckling mouse brain neuron infected with HFRS virus, the virus particles (V) are seen in the dilated Golgi sacculus and vesiculae; 2,3. The budding-off process of matured virus particles (V) in the dilated Golgi sacculus; 4. Elongated virus particle (V) in the dilated Golgi sacculus; 5. Markedly hyperplastic Golgi apparatus (G) and a few virus particles (V) in its dilated sacculus (Inset: a budding-off virus particle (Vb)); 6. A matured HFRS virus (V) with lipid bilayered viral envelope and external fringe of surface projections in a dilated vesicle of Golgi apparatus (G).