

## Ⅱ型单纯疱疹病毒感染细胞的扫描与透射电镜对比观察

陈敏海 姚学军 吴建国 梁浩麟 陈保平 方萍 雷森林

(湖北医学院病毒研究所细胞生物室, 武汉)

王其旺 肖同浩

(武汉部队总医院电镜室, 武汉)

### 提 要

以感染复数为3的HSV-Ⅰ(333株)感染兔肾单层细胞。不同间隔时间取材作扫描(SEM)及透射电镜(TEM)观察。感染1小时后, SEM下显示细胞表面有大量病毒颗粒吸附, 颗粒均匀分布或积聚成簇, 多数病毒颗粒有囊膜, 少数无囊膜。感染2小时后, 变化与上基本类似, 但有少数细胞变圆。感染4小时后, 变圆的细胞数量增多, 在此种细胞的核周区及边缘区积聚有大量病毒颗粒, 而核上区则仅见少量散在的病毒颗粒, 感染16小时后, 部分细胞表面出现大小及形状不规则的孔洞; 部分细胞解体成碎片, 在孔洞边缘及细胞碎片中, 可见有囊膜及无囊膜的病毒颗粒。

病毒感染1—2小时后, TEM下可见有囊膜及无囊膜的病毒颗粒吸附于细胞表面, 随后在细胞表面的凹陷及胞浆小泡中, 亦可见到类似的病毒颗粒。感染4小时以内的细胞超微结构变化主要有: 髓膜的形成, 线粒体肿胀, 粗面内质网腔扩张及染色质边聚。感染16小时后, 细胞呈现严重的变性及解体, 在细胞碎片中, 亦可见到有囊膜及无囊膜的病毒颗粒。

对病毒的吸附, 穿入, 释放等问题进行了讨论。

单纯疱疹病毒(HSV)感染细胞的形态学改变及病毒在细胞内的发育在过去的30年间已有大量的报道<sup>[1,2]</sup>, 这些资料的获得主要是根据透射电镜的观察。近几年来, 运用扫描电镜对该病毒感染的细胞表面的研究也有少量的报道<sup>[3,4]</sup>。

由于HSV引起多种人类疾病, 尤其是怀疑Ⅱ型单纯疱疹病毒(HSV-Ⅱ)与人类宫颈癌的发生有密切关系, 所以, 近十余年来对HSV与细胞相互作用的研究愈来愈多。本实验运用扫描与透射电镜对HSV-Ⅱ感染的培养细胞进行对比观察, 旨在为病毒—细胞间相互作用的研究提供一些形态学依据。

本文1985年8月21日收到

# 材料与方 法

## 一、病毒与细胞

HSV—II (333株), 来自美国宾夕法尼亚大学F. Rapp教授实验室。接种时病毒滴度为 $10^7$  PFU/ml, 感染复数为3PFU/细胞。

兔肾细胞的制备按常规方法进行。细胞生长液为199加10%小牛血清与双抗组成(各500单位/ml)。维持液中小牛血清浓度为1%, 其余与生长液同, 为使吸附同步化, 将病毒在4°C吸附1小时, 然后37°C条件下孵育1, 3, 15小时。将每一时间病毒感染及未感染的、贴壁在盖玻片上的细胞标本各两片取出, 供作扫描电镜(SEM)观察用, 同时将各时间的剩余细胞轻轻刮下, 低速离心(1500转/分)半小时, 弃上清取沉淀, 供作透射电镜(TEM)观察用。

## 二、SEM样品的制备

1. 将附有细胞的盖片以0.1M磷酸缓冲液(pH7.4)充分洗涤。

2. 多聚甲醛混合液(0.1M的磷酸缓冲液配制, 多聚甲醛的最终浓度为2%, 戊二醛的最终浓度为2.5%)中固定30分钟。

3. 0.1M的磷酸缓冲液中洗3次, 每次5分钟。

4. 1%的四氧化钨中1小时。

5. 0.1M的磷酸缓冲液中洗3次, 每次5分钟。

6. 常规各级酒精脱水。

7. 醋酸异戊酯置换。

8. 临界点干燥似干燥。

9. 真空镀膜仪旋转喷金。

10. 扫描电镜(日立S—450型)下观察。

## 三、TEM样品的制备

1. 将沉淀物按常规方法戊二醛及四氧化钨双重固定。

2. 各级酒精脱水。

3. 琼脂预包埋。

4. 环氧树脂包埋, 超薄切片。

5. 醋酸双氧铀及枸橼酸铅双重染色。

6. 透射电镜(上海产, D×B<sub>2</sub>—12)观察。

## 四、病毒悬液的TEM观察

将HSV—II感染24小时后的BRK细胞冻融3次, 低速离心(1500转/分)半小时, 取上清, 常规方法负染, 透射电镜下观察, 以判明接种病毒的形态结构。

# 观察结果

## 一、接种液中病毒颗粒的形态:

多数病毒颗粒有囊膜,少数病毒颗粒无囊膜(图7)。

#### 二、未经病毒感染的兔肾(BRK)细胞:

生长良好的兔肾单层细胞为不规则分枝的长梭形细胞。在SEM图像中可分为核上区,核周区及边缘区。细胞表面有少量细小的微绒毛突出,绒毛长短不等,终端有时膨大成小球状。此外,偶可见直径约200~500nm的小孔及形状不规则、大小不等的凹陷(图1)。透射电镜下,所见细胞内部结构与结缔组织中的成纤维细胞相似。在细胞膜外面可见少量的微绒毛,不规则的凹陷,胞浆内可见少量吞饮小泡。

#### 三、病毒感染1小时后的BRK细胞:

在4°C吸附1小时的标本中,用SEM可发现有些细胞表面吸附有较多的病毒颗粒,散在分布或积聚成簇;有些细胞表面仅有少数病毒颗粒;有些则未见病毒颗粒。细胞外形均无明显改变。在TEM下,除见细胞表面有病毒吸附外,细胞内部未见明显改变。在吸附处,病毒的囊膜与细胞膜之间有絮状物质连接。

#### 四、病毒感染2小时后的BRK细胞:

在SEM低倍镜下,多数细胞外形未变,表面光滑,偶见少许柱状堆积物。但有少数细胞变圆,其表面有较多的柱状堆积物存在。高倍镜下见,细胞表面的堆积为病毒颗粒。在变形较剧的细胞表面,堆积物更为明显,主要分布在核周区及边缘区(图2、3、4),呈单层排列,有时成复层(图4)。而在核上区仅见少量散在的颗粒(图3)。在TEM下,亦可见病毒颗粒呈复层围绕在细胞膜的外面(图9),并可见细胞以吞饮的方式摄入病毒颗粒(图8)。

#### 五、病毒感染4小时后的BRK细胞:

变圆的细胞愈来愈多,由圆形细胞组成斑块状区域,呈散在性分布。在SEM下,细胞表面仍可见病毒颗粒积聚而成的柱状堆积物,其分布于核周区及边缘区,核上区仅见少量散在的病毒颗粒(2—4)。在TEM下,可见胞浆内髓膜形成,部分线粒体肿胀,粗面内质网扩张,核染色质边聚等现象,细胞膜未见明显改变。

#### 六、病毒感染16小时后的BRK细胞:

细胞呈解体状态,形成大小不等的残片(图5、6)。在这些残片中,可见有囊膜及无囊膜的病毒颗粒。此外,尚可见到大小不等、近于圆形的致密小体(图6)。在TEM的图像中证明这些小体是膨胀及变性的线粒体。同时在TEM的图像中可见细胞器变性、解体(图10),胞核液化及核膜破裂(图11)。此外,尚可见大量未成熟的病毒颗粒(核衣壳)出现在破碎的核区(图11)。

## 讨 论

关于HSV的吸附,HSV吸附于细胞表面的扫描电镜观察,目前尚未见详尽的报道。Nii<sup>[4]</sup>及Bschlgöfer<sup>[3]</sup>均在感染的晚期见到吸附于细胞表面的颗粒,将其视为病毒的释放。本实验用SEM观察了HSV—II(333株)早期感染的兔肾细胞表面,发现感染后的1—4小时内,均有大量病毒颗粒吸附于细胞表面,其中尚有少数无囊膜的病毒颗粒。特别是感染后第4小时,在变圆细胞的核周区,可见大量病毒颗粒积聚呈簇状,而核上区则较少且分散。构成这种现象的原因尚不清楚。可能是1.核上区的病毒已进入细胞;2.核周区存在特异的HSV受

体。

关于HSV的穿入：根据文献报道，HSV的穿入依赖于适当的温度。在37°C，90%以上的吸附病毒在10分钟内即进入细胞内。这些资料是根据未穿入病毒被酸灭活或被抗体中和的特性而获得的〔1, 2〕。但本实验发现，在4°C吸附1小时之后（为使病毒吸附同步化），再经37°C孵育3小时，仍见细胞表面吸附有大量病毒颗粒。

关于穿入的方式：Morgan等认为通过病毒囊膜与细胞膜融合〔5〕；Dales等认为通过吞饮方式〔6〕；Hummeler等认为两种方式均存在〔7〕。本实验TEM下见到由胞膜凹陷并增厚形成吞饮小泡，病毒由吞饮小泡进入细胞内。此结果与Dales等的观察一致。SEM对病毒穿入方式未能提供更多的证据。

关于HSV的释放：Morgan等认为由含病毒颗粒的内质网形成空泡，再由后者以胞吐形式将病毒转运到细胞外〔5〕。Schwarty等认为由连接核周间隙与细胞膜的内质网将病毒颗粒运到胞外〔8〕。本实验通过SEM的观察，发现在HSV感染后第16小时，细胞表面即出现形状及大小均不规则的孔洞，随后细胞解体，形成不规则的碎片，孔洞的边缘及碎片之间均可见有囊膜及无囊膜的病毒颗粒。说明病毒是从孔洞排出及以细胞解体的方式而被排出的。在未解体及未出现孔洞时，未见病毒颗粒离开细胞的现象。在TEM下也可见到，在解体的细胞碎片内存在大量病毒颗粒。通过此观察，我们可以解释，在我们运用的病毒悬液中，为什么总是同时存在两种病毒颗粒—有囊膜的及无囊膜的。但本实验也不排除在病毒制备过程中，由于反复冻融而使病毒丧失囊膜的可能。

关于HSV感染的细胞的形态学变化：显微镜下早已发现，HSV感染后，细胞可出现变大变圆，融合，多核细胞及核内包涵体形成等病理改变。本实验亦见到这类变化，并发现感染细胞尚有线粒体肿胀，内质网扩张，髓膜形成，胞核液化，胞膜上出现大的孔洞等超微结构的改变。以上退变过程不取决于病毒的成熟过程，当病毒尚未发育成熟时，细胞可能已经解体。

### 参 考 文 献

- 〔1〕 Watson, D.H., 1973. Replication of the viruses—Morphological aspects. In "The Herpesviruses" .Ed. by A.S.Kaplan, P.133.
- 〔2〕 Tooze, J., 1973. The Molecular Biology of Tumor Viruses, P.470.
- 〔3〕 Schlehofer, J. R., H. Hampl and K.O.Habermehl, 1979. Differences in the morphology of herpes simplex virus infected cells: I. Comparative scanning and transmission electron microscopic studies on HSV-1 infected HEP-2 and chick embryo fibroblast cells. J.Gen.Virol.44: 433.
- 〔4〕 Nii, S., 1982. Transmission and scanning electron microscopic studies of herpes viruses. In "Herpesvirus" .Ed. by H.Shiota, Y.-C.Chen, and W.H.Prusoff, P.3.
- 〔5〕 Morgan, C., H.M.Rose and B.Mednis, 1968. Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. J.Virol., 2: 507.
- 〔6〕 Dales, S. and H.Silverberg, 1969. Viropexis of herpes simplex virus by Hela cells. Virology, 37: 475.
- 〔7〕 Hummeler, K., N.Tomassian and B.Zajac, 1969. Early events in herpes simplex virus infection: A radioautographic study. J.Virol., 4: 67.

[ 8 ] Schwartz, J. and B. Roizman, 1969. Concerning the egress of herpes simplex virus from infected cells. Electron microscope observation. *Virology*, 38 : 42.

## SCANNING AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON HSV-2 INFECTED CELLS

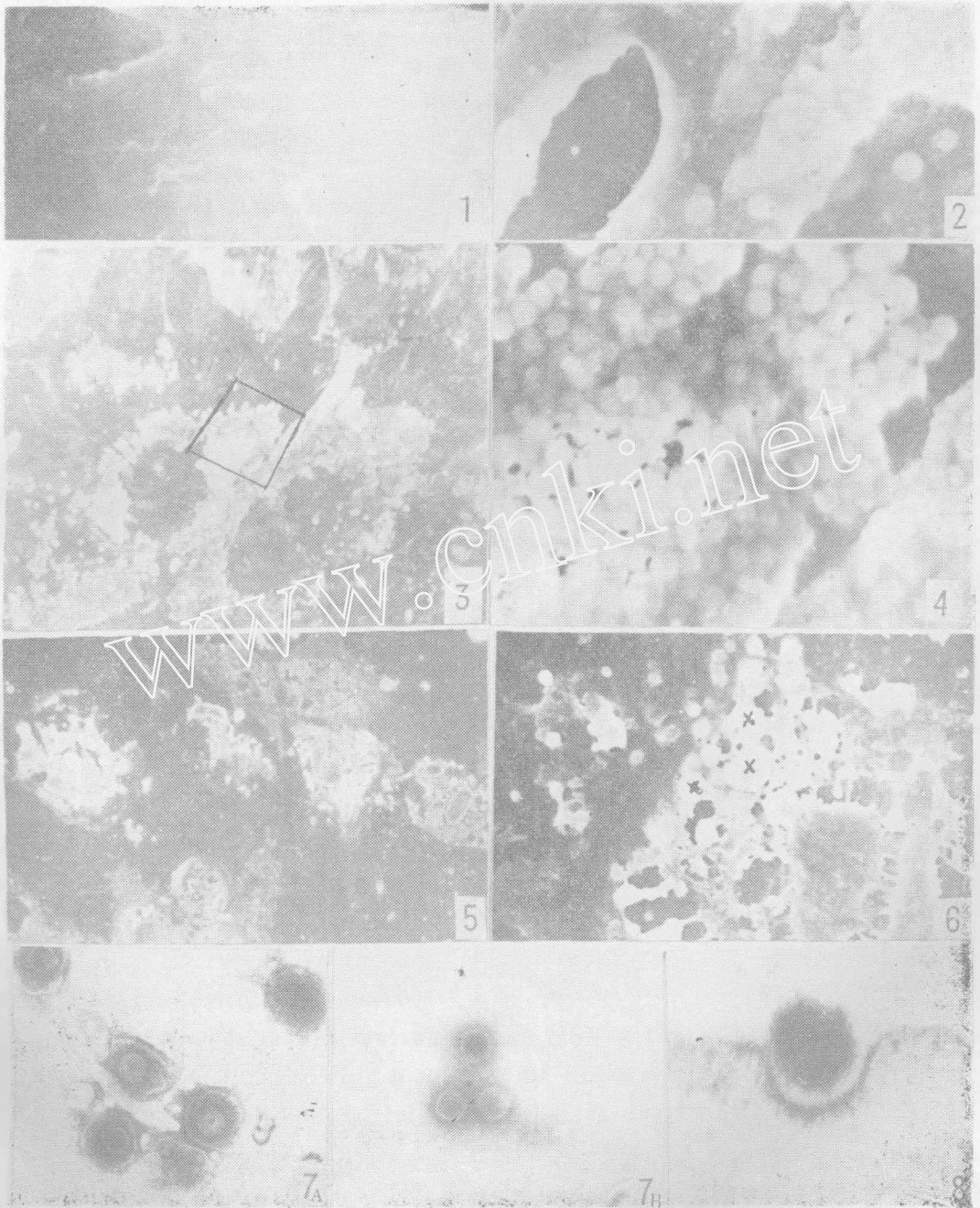
Chen Min-hui You Xue-jun Wu Jian-guo Liang Hau-ling  
(*Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan*)

Wang Qi-wang  
(*Huang Shan Hospital Wuhan*)

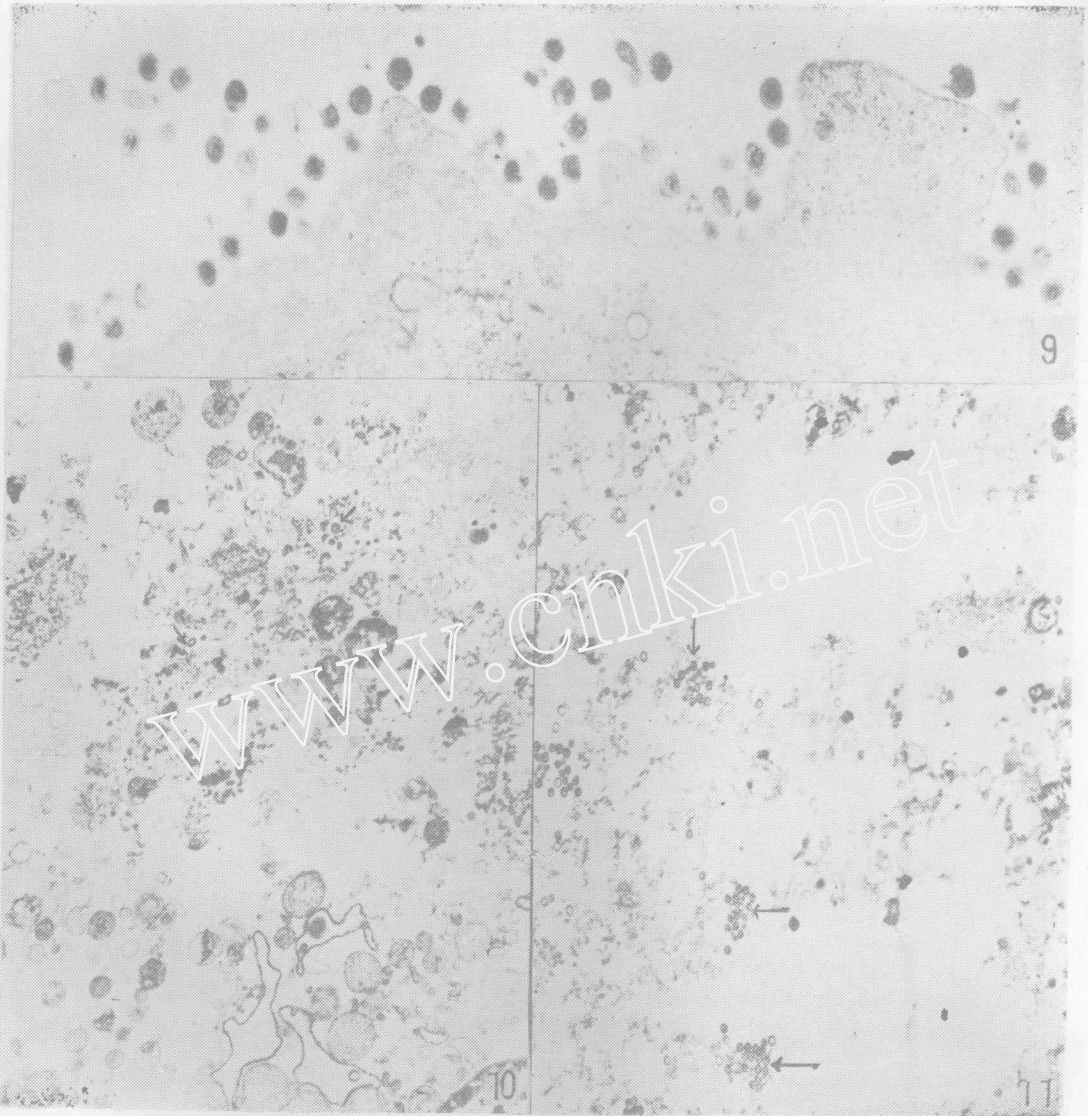
Baby rabbit kidney cells infected with 333 strain of HSV-2 at an MOI of approximately 3 pfu/cell were fixed at sequential intervals. SEM revealed that large amounts of particles, of which a majority and a minority roughly measured 200 nm (enveloped) and 100 nm (naked) respectively, appeared freely or in cluster on the whole or on a part of cell surface membrane 1 hr post infection (p.i.). The feature of particle distribution remained in the surface of cells 2 hrs p.i. and 4 hrs p.i. However, in the central region of rounding cells 4 hrs p.i., only less particles could be found whereas lots of them were connected with the peripheral area of cells. Sixteen hrs p.i. the surface membrane revealed a number of holes with different sizes and forms indicating cell destruction. Some cells including their nuclei even disintegrated into debris. There were some particles both enveloped and naked could be found free near the debris or adhering on the broken cell membrane

TEM revealed the absorbed viruses both enveloped and naked on the surface membrane of cells 1 hr p.i.. Thereafter, some of them could be found in indentations of cell surface and in cytoplasmic vesicles near the latter. The early changes of ultrastructures of infected cells, formation of myelin sheets, swollen mitochondria, dilatation of granular endoplasmic reticulum and margination of nuclear chromatin appeared within 4 hrs p.i.. A severe degeneration and disintegration of infected cells were found 16 hrs p.i.. In the debris of cytoplasm and nuclei there were many enveloped and naked viruses.

图版 I



## 图版 I



### 图版说明

图版 I:

图1: 未经病毒感染的兔婴肾 (BRK) 细胞的扫描电镜图像: 细胞表面较光滑, 有少量微绒毛及一些凹陷。×20,000

图2: HSV-1 (333株) 感染2小时后的BRK细胞的扫描电镜图像: 细胞表面有散在分布或堆积成簇的病毒颗粒, 颗粒大小不一, 大者 (有囊膜) 约为200nm, 小者 (无囊膜) 约为100nm。×20,000。

图3: HSV-Ⅰ (333株) 感染4小时后的BRK细胞的扫描电镜图像: 细胞变圆, 在核周及边缘区有病毒颗粒积聚, 而核上区则很少。×1000。

图4: 图3的放大: 示积聚的病毒颗粒。×20,000。

图5: HSV-Ⅰ (333株) 感染16小时后的BRK细胞的扫描电镜图像: 细胞表面出现许多大小不等、形状不规则的孔洞及细胞解体产生的碎片。×1000。

图6: 图5的放大: 细胞解体为碎片, 在碎片附近或表面, 可见有囊膜及无囊膜病毒颗粒。×5000。

图7: 接种物中的病毒颗粒的透射电镜图像: A: 有囊膜病毒颗粒; B: 无囊膜病毒颗粒。×90,000。

图8: HSV-Ⅰ (333株) 感染2小时后的BRK细胞的透射电镜图像: 细膜下陷呈半环形, 一病毒颗粒位于此陷窝中。与病毒接触处的细胞膜增厚, 电子密度增大。×100,000。

图版 I:

图9: HSV-Ⅰ (333株) 感染4小时后的BRK细胞的透射电镜图像: 在细胞表面, 散在分布着许多有囊膜与无囊膜的病毒颗粒。×25,000。

图10: HSV-Ⅰ (333株) 感染16小时后的BRK细胞膜的透射电镜图像: 细胞解体成碎片, 其中可见病毒颗粒(↑), 线粒体变性, 内质网扩张。×150,000。

图11: 标本同上; 在解体的细胞核区域, 可见核衣壳积聚成团(↑)。核膜破碎×15,000。

## EXPLANATION OF FIGURES

### PLATE I

Fig. 1. A part of uninfected baby rabbit kidney cell (BRK cell), showing the smooth cell surface with a few microvilli and some indentations. SEM, X 20,000

Fig. 2. A part of BRK cell infected with HSV-2 (333), 2 hrs post infection (p.i.), showing particles which measured approximately 200 nm (enveloped) or 100 nm (naked) appearing individually or in cluster on the cell surface. SEM, X 20,000

Fig. 3. Low-power magnification of BRK cells infected with HSV-2(333), 4 hrs p.i., showing cell rounding and aggregations of virus particles on cell surface. SEM, X 1,000

Fig. 4. Partial magnification of Fig.3 showing the aggregation of virus particles. SEM, X 20,000

Fig. 5. Low-power magnification of the HSV-2 (333) infected BRK cells, 16 hrs p.i., showing a number of holes with different sizes and forms on the cell surface and debris due to cell lysis. SEM, X 1,000

Fig. 6. Partial magnification of Fig.5 showing that the cell disintegrated into debris and some particles both enveloped and naked appeared near the debris or adhering on the broken cell membrane. Many dense granules corresponding to degenerating mitochondria were



seen in the debris. Compare with Fig.10. SEM, X 5,000

Fig.7. Herpesvirus particles in inocula extracted from culture cells infected with HSV-2 (333) for 24 hrs by freezing and thawing. Showing enveloped (A) and naked (B) virus particles. TEM, Negative stain, X 90,000

Fig.8. A part of BRK cell infected with HSV-2 (333) for 2 hrs showing absorbing particles in indentation of cell surface membrane with thickness and increasing in electron density. TEM, X 100,000

### PLATE I

Fig.9. A part of BRK cells infected with HSV-2, 21 hrs p. i., showing residual virus particles which absorbed on cell surface membrane individually or in cluster. TEM, X 25,000

Fig.10. Destruction of cells infected with HSV-2 (333), 16 hrs p. i., showing degeneration of mitochondria with a sequence through swelling to dense granule and dilatation of endoplasmic reticulum. Note many virus particles in the debris of cells. TEM, X 15,000

Fig.11. A part of BRK cell infected with HSV-2, 16 hrs p. i., showing aggregations of capsids in the destructive nucleus. Note nuclear membrane was broken and thickened at the point of contact with naked particles. TEM, X 15,000