

肾综合征出血热 (HFRS) 病毒和 新疆出血热 (XHF) 病毒形态比较

李德荣 何锦芳 宋光昌 李钟铎

王宏霞 李予川 朱关福

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

提 要

用超薄切片电镜技术比较了包括 KHF 在内的 7 株 HFRS 病毒, 并与分类地位已明确的 XHF 病毒作了形态学比较, 结果说明 HFRS 病毒具有多样形态、多部位成熟、多方式释放等形态学特点, 可能是布尼科病毒新属成员。

由于 HFRS 病毒形态发生过程复杂, 在 1984 年以前多着重用提纯浓缩病毒进行免疫电镜方法^[1-2], 以及免疫酶、免疫铁蛋白标记电镜技术^[3-4]来证实细胞内外病毒与 HFRS 的病原学关系, 随着研究的深入, 现已能用普通超薄切片技术来观察该病毒。本实验室用包括朝鲜出血热 (KHF) 汉坦病毒 76-118 株在内的 7 株 HFRS 病毒, 感染传代细胞及乳鼠, 并与分类地位已明确的 XHF 病毒进行比较, 为 HFRS 病毒的分类提供形态学证据, 现报告结果如下。

材料与方 法

病毒株来源及宿主系统 HFRS 病毒 H8205 株为本实验室分离自黑龙江省病人血, 分别适应于 Vero E₆、LLc-MK₂ 细胞、乳小白鼠; A₁、R₅ 株病毒为南京军区军事医学研究所提供, 分别分离自黑线姬鼠 (A₁) 及大白鼠 (R₅), 适应于 LLc-MK₂ 细胞; A₉、76-118、云 C₃₅、云 C₅₉ 4 株 HFRS 病毒均为安徽省医学研究所倪大石主任提供, 分别为接种病毒感染发病的乳鼠脑 (A₉、76-118 株) 及培养细胞 (云 C₃₅、云 C₅₉ 株); XHF 病毒毒种及感染发病鼠脑为本院基础医学研究所陈德惠副研究员提供。

超薄切片样品制备及镜检 上述病毒株接种细胞传代适应后, 经免疫荧光检查

承蒙南京军区军事医学研究所、安徽省医学研究所倪大石主任、本院基础医学研究所陈德惠副研究员等惠赠毒种和标本, 在此一并致谢

本稿 1985 年 12 月 4 日收到

(IFA)证实感染细胞数达70%以上时,于接种病毒后不同时间刮取细胞离心制成细胞团块,乳鼠接种病毒后,于濒死取鼠脑海马回,切为小组织块,先经IFA检查证实鼠脑皮层、海马回存在严重感染,鼠脑小组织块与培养细胞团块,经戊二醛-锇酸双固定,乙醇-丙酮系列脱水,Epon812浸透、包埋、聚合,定位后切薄片,枸橼酸铅-醋酸铀双染,Philips EM 400T镜检。

结 果

一、HFRS 病毒的形态:细胞外病毒颗粒(图1)呈单个或聚集态随意分散于细胞间隙,有的紧附于细胞表面,有的夹杂于破碎细胞之间。毒粒为圆形、椭圆形、不规则形,不规则形态呈现多种多样如鞋底形、哑铃形(图1插图)、葫芦形、蝌蚪形(图6上部插图)等异常形态。形态规整的毒粒直径80--120nm 平均 103.0±9.5nm(计数33个),异常形态颗粒大小差别较大。不论何种形态,毒粒的结构组成均相似,外表为双层脂蛋白单位膜结构组成的囊膜,表面不光滑不规整,个别毒粒囊膜上的刺突较清晰,内核为丝网结构间有电子致密度较深的颗粒,此种成分在毒粒内部均匀分布,有的毒粒内尚可见螺旋状微管样结构。感染细胞胞浆内的病毒颗粒多见于粗面内质网、高尔基氏器、包涵体等部位(图2—5)。高尔基氏器囊泡内的毒粒多为杆形,直径40—70nm,长100—300nm,最长达700nm,有囊泡内(图3)有多个毒粒,彼此间或并行或重叠或交叉等多种排列方式,毒粒的一端垂直于囊泡壁,另一端因切面关系或直达对边或游离于囊泡腔内(图2—3),这些杆形毒粒均有清晰囊膜,芯核内有横纹丝或横行微管样结构(图2及图4插图)。高尔基氏器内特别是感染鼠脑内高尔基氏器囊泡内也有圆形、椭圆形或不规则形病毒颗粒,毒粒的囊膜电子致密度加深显示出清晰的多层次结构,芯核内也有为数不多的颗粒,与细胞外毒粒内的结构相类似(图4)。细胞内外均可见到不成熟的病毒颗粒,这些毒粒或者仅有大而空的囊膜,或者仅含芯核等成分不完全的圆形或杆形毒粒(图1,5),此外,与病毒堆积在一起的还有中等电子致密度的无定形成分,多呈片段样结构紧附于细胞表膜外(图1,6),它们的性质及与病毒发生的关系尚需进一步研究。

二、HFRS 病毒的成熟与释放:HFRS 病毒是多部位成熟的,包括粗面内质网(图5)、高尔基氏器、包涵体及核膜(图4及插图)。在感染的传代培养细胞内,病毒多在粗面内质网内成熟,高尔基氏器内的毒粒多为不成熟的杆形颗粒,在感染发病的鼠脑内,病毒多在高尔基氏器内成熟,脑神经原细胞胞浆内的粗面内质网增生扩张,池内含管样结构,但未查见成熟病毒颗粒。在包涵体内成熟的病毒,或者位于包涵体中心的空泡内,或者出现于包涵体的近旁,伴随有膜结构、空泡或副结晶等(图4下部插图)。HFRS 病毒成熟的方式为芽生,如图4、5所示,高尔基氏器囊泡或粗面内质网池膜的电子致密度加深,膜隆起包裹着毒粒的芯核成分突向池内或囊泡腔内,有的仅以细柄样结构与囊泡壁相联结(图4上部插图),有的毒粒突向囊泡外呈外向性芽生图象,有的毒粒沿细胞表膜芽生,细胞表膜与毒粒囊膜相延续(图6插图)。病毒不论成熟与否均见于细胞外,病毒释放于细胞外的方式有多种,如随细胞破碎而释放,病毒或处于已破

碎但尚未完全解体的细胞残片中,或以一部分囊膜连结在残破的细胞表膜上;病毒通过细胞排粒作用而释放也很明显,含有病毒的粗面内质网池或空泡囊腔高度扩张,既有处于胞核附近的,也有处于细胞表膜附近的,细胞表膜与细胞器内膜均有增厚,电子质密度增深,两膜互相接近融合,细胞表膜内陷形成外向性开口,其中含的病毒颗粒及无定形成分排出于细胞外(图6)。通过细胞表膜芽生成熟的病毒,自然在成熟后就脱离细胞而进入细胞培养液内,有的毒粒尚紧连结在细胞突起处,有的恰连结在细胞突起的顶端,有的连结在细胞突起中间部,有的大部分毒粒已脱离细胞,但仍有细长尾状突起连结在胞浆内(图6上部插图)。

三、HFRS病毒与XHF病毒的形态学比较: XHF病毒的包涵体不论在感染细胞内(图7)还是在发病鼠脑内(图9)均由核糖体样颗粒组成,定位于核旁高尔基氏器区,包涵体可占据细胞胞浆的一部或大部,而HFRS病毒的包涵体在感染细胞内(图3插图)与XHF病毒一样,多由核糖体样颗粒聚集而成,部位不限于核旁,大小不定,无明确界限,感染鼠脑内神经原细胞胞浆的包涵体(图4插图)多由纤维丝、均质性细颗粒组成,定位于高尔基氏器区,大小类似于线粒体。XHF病毒的成熟仅限于高尔基氏器(图8、10),未见其它细胞器参与,病毒也有杆形,芯核有横纹丝或微管,成熟毒粒囊膜外层电子致密度较深,表面刺突较清晰,芯核内也含有电致密较深的颗粒,与HFRS病毒相比较, XHF病毒较单一而少变化。

讨 论

近年已确定XHF病毒为布尼病毒科内罗病毒属的成员^[5-6],其形态及形态发生过程相对单一,表现了布尼科病毒的明显特点^[7],HFRS病毒的毒粒结构和XHF病毒相同,但还有以下特点①HFRS病毒形态多样,大小多变,毒粒内有横纹丝结构,说明其为有囊膜、螺旋对称的多形态病毒②HFRS病毒的成熟是在胞浆内以高尔基氏器为主的多部位进行,属RNA病毒③HFRS病毒在感染细胞内能形成形态、大小、组成不同的胞浆内包涵体④HFRS病毒通过细胞破碎、细胞排粒、细胞表膜芽生等多种方式释放入细胞间隙,说明它与目前已确定的布尼病毒科4个属不同,可能为布尼病毒科新属成员,值得进一步研究。

宿主系统对HFRS病毒的形态发生过程有明显影响, H8205株病毒接种Vero E₆、LLc-MK₂细胞及乳小白鼠,经IFA检查证实感染细胞达到70%以上,但电镜下Vero E₆细胞制备的样品很难查见病毒感染的迹象,尽管先后采取不同代次、不同培养时间、温度、方式(静止培养、旋转培养、微量培养)以及培养液里加入不同药物(氯化镁、疱疹净、二甲亚砷、胰酶等),历时近一年,未能有明显进展。但其后,却在LLc-MK₂细胞及乳鼠脑内查见病毒感染的微结构改变、胞浆内包涵体以及成熟病毒^[8]。KHF汉坦病毒76-118株与A₀、H8205株病毒来源、传代经过、病毒毒力均有不同^[9],而感染鼠脑的微结构改变却相类似。在传代细胞培养中, H8205、A₁、R₆、云C₉₅、云C₉₉等5株病毒感染LLc-MK₂细胞、MA104细胞引起的微结构改变,在包涵体组成、病毒成熟的主要部位等方面与感染鼠脑有明显区别。

从 HFRS 病毒的形态学观察中发现不成熟病毒数量较多,因此在形态鉴别上存在一定困难。我们曾将 HFRS 病毒与包括 XHF 病毒在内的分属 5 个科的 7 种病毒以相同条件接种 LLC-MK₂ 细胞,用 IFA 进行追踪观察,在感染细胞达到 70% 以上时制样进行电镜检查,其它 7 种病毒(XHF、森林脑炎、乙型脑炎、登革病毒、轮状病毒、流感病毒、仙台病毒等)电镜下均易查见较多成熟病毒及有些病毒所形成的包涵体,而 HFRS 病毒则困难得多,说明它的形态发生过程复杂,需要从多方面加以研究。

参 考 文 献

- [1] McCormick J.B. et al., 1982, Lancet, 1:765.
- [2] White J.D. et al., 1982, Lancet, 1:768.
- [3] 洪涛等, 1983, 中华微生物和免疫学杂志, 3(2):69.
- [4] 余澄之等, 1985, 中华流行病学杂志, 6(2):110.
- [5] 严玉辰等, 1983, 中华流行病学杂志, 4(3):123.
- [6] 陈德惠等, 1982, 中华病理学杂志, 12(3):202.
- [7] Ellis D.S. et al., 1981, Arch. Virol, 70(3):189.
- [8] 朱关富等, 1984, Physico-chemical and biological properties of the viruses isolated from patients with HFRS Abstract, 6th International congress of virology p.271.
- [9] 倪大石等, 1985, 安徽医学, 6(3):7.

MORPHOLOGICAL COMPARISON OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME (HFRS) AND XINJIANG HEMORRHAGIC FEVER (XHF) VIRUSES

Li De-rong He Jin-fang Sang Guang-chang Li Zhong-duo
Wang Hong-xia Li Yi-chuan Zhu Guan-fu

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

Seven strains of HFRS virus were studied by means of thin-section electron microscopy. The XHF virus defined as a member of Bunyaviridae was compared. The results showed that HFRS viruses including Hantaan virus strain 76-118 were different in morphology and maturity from the XHF virus. The HFRS viruses may be classified as a member of the new genus of Bunyaviridae.

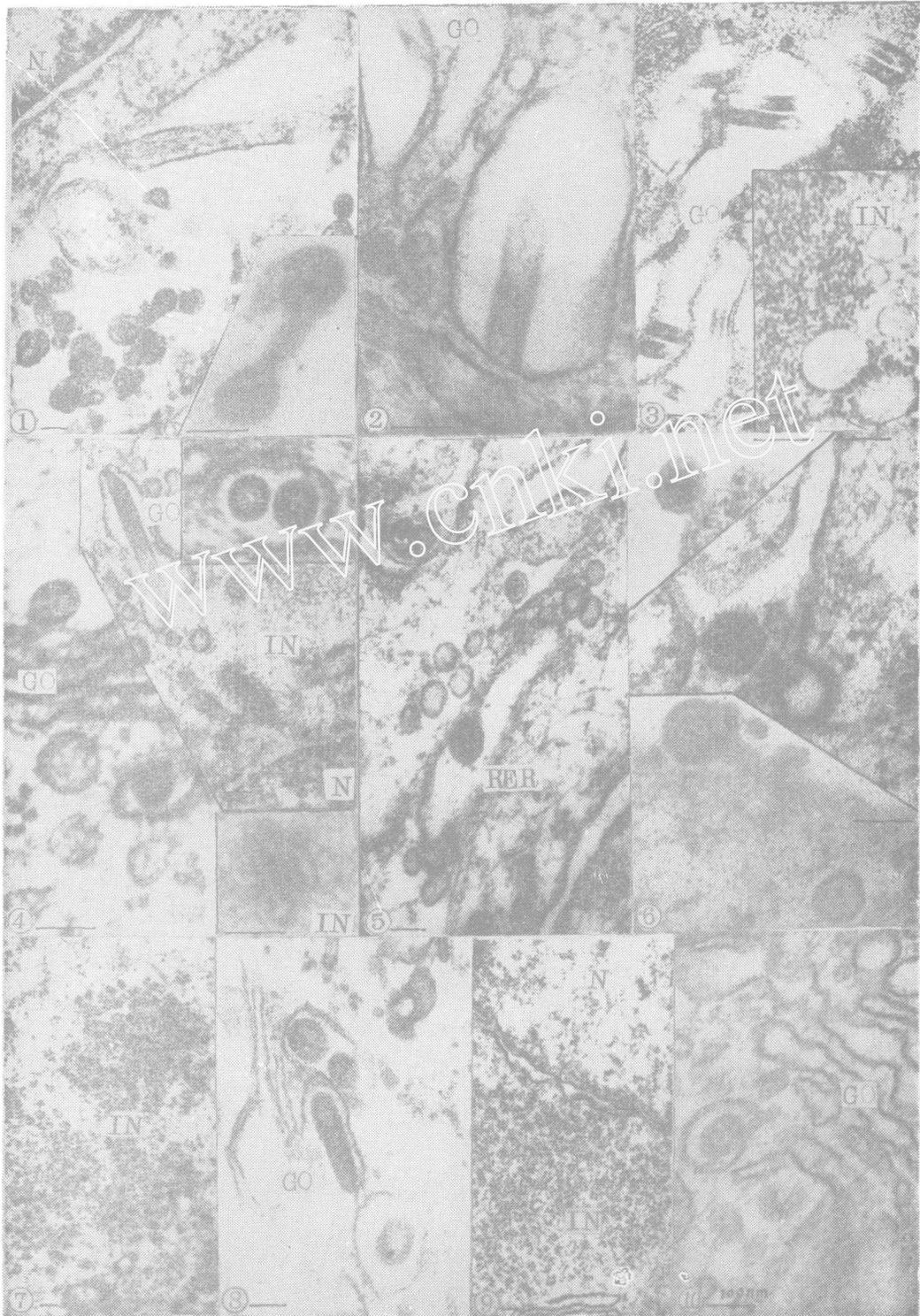


图 HFRS 与 XHF 病毒形态比较

图 1 HFRS 病毒的形态

图 2—6 HFRS 病毒的成熟与释放

图 7—10 XHF 病毒的胞浆内包涵体及高尔基氏器内的病毒(标尺均 100nm)

Fig. Morphological comparison of HFRS and XHF viruses HFRS virus Fig. 1-6: 1. Thin section showing viral particles in intercellular space (strain Yun C₃₉, LLC-MK₂ cell), the inset shows aberrant virions. 2-3. Rod-shaped particles found in Golgi (GO) vesicles (strains A₁, H8205, LLC-MK₂ cell), the inset shows inclusion (IN) body composed of ribosome-like electron-dense granules. 4-5. Two thin sections show budding features respectively within GO vesicles and rough endoplasmic reticulum (RER) (strain 76-118, suckling mouse brain; Yun C₃₉, MA-104 cell). The insets show rod-like or round particles found in GO, nucleus membrane and IN. 6. Thin section showing virions released from vesicles and plasmic membrane (strain Yun C₃₉, MA-104 cell). XHF virus Fig. 7-10: Virus particles and viral IN in or near GO (fig 7-8 LLC-MK₂ cell; fig 9-10 suckling mouse brain). (bar 100nm)

中华医学病毒学会第一次全国学术会议 THE FIRST NATIONAL ACADEMIC MEETING ON MEDICAL VIROLOGY

全国医学病毒学第一次学术会议, 于 1986 年 9 月 17 日至 20 日在山东省烟台市召开, 出席会议代表有来自全国高等院校, 科研、医院等单位的专家, 也有来自美、英、加拿大等国的著名学者。到会代表共 436 名, 包括从事病原学、分子生物学、临床、防疫及教学等专业的病毒学工作者。

会议收到论文 400 余篇, 选定 127 篇进行学术交流, 内容有 1. 病毒性肝炎, 2. 流行性出血热, 3. 肿瘤病毒, 4. 轮状病毒和肠道病毒、5. 虫媒病毒等。其中对病毒病的起因、检测、诊断、治疗等方面都做了大量的研究工作, 将医学病毒学从细胞生物学, 免疫学阶段深入到分子生物学阶段, 做出了许多有先进水平的工作。这次学术会议, 内容广泛, 人才辈出, 既有应用方面的成就, 也有基础方面的研究, 既有老一辈病毒学家的精辟报告, 也有中青年病毒学者的研究成果, 充分的体现了我国医学病毒学的科研事业正在迅速的发展。大会在热烈的学术交流中圆满结束。

张吕先 供稿 吴章琦 摘