

家蚕浓核症病毒感染昆虫细胞系的电镜观察

邹帅洲 谢天恩

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

本实验首次用中国株家蚕浓核症病毒感染三株昆虫细胞系: 油桐尺蠖卵巢细胞系 (BS-484)、甘兰夜蛾卵巢细胞系 (NIAS-MB-19) 和秋粘虫卵巢细胞系 (IPLB-SF-21)。结果仅在 BS-484 细胞中观察到病毒感染引起的细胞病变效应。电镜观察发现在感染的 BS-484 中, 细胞核明显膨大, 其中核仁活性化, 数目增多, 同时还观察到核仁膨大和分裂现象。感染 5—6 天, 可看到成熟病毒粒子于核内形成。在感染的细胞质中, 线粒体肥大且失去脊, 粗面内质网变成小泡体, 其内积累大量核糖核蛋白体。许多细胞器空泡化或退化, 细胞质中出现一些包含退化细胞器的大型自身吞噬体。

关键词: 家蚕浓核症病毒 昆虫细胞系 细胞病变 超微结构

家蚕浓核症病毒的研究, 主要是在病毒纯化、形态结构、宿主范围、血清学和理化性质等方面做了许多工作。对于病毒的入侵与复制研究仅在虫体水平进行。在体外培养的细胞水平上研究家蚕浓核病毒的感染和增殖, 目前国内外未见正式报道。为此, 本试验试图用家蚕浓核病毒感染昆虫细胞系, 并初步探讨家蚕浓核病毒体外感染的最适条件及增殖机制。现将实验结果报道如下。

材料与方 法

一、材料 三种昆虫细胞系: 油桐尺蠖卵巢细胞系 (BS-484), 由本所昆虫病毒室提供, 已传代 88 次; 美国引进的秋粘虫卵巢细胞系 (IPLB-SF-21), 已传代 21 次; 日本引进的甘兰夜蛾卵巢细胞系 (NIAS-MB-19), 已传代 82 次。

家蚕浓核症病毒由中国农科院镇江蚕研所提供。

二、方 法

1、细胞培养: 培养基是略加改进的 Grace^[1] 或 M-M 培养基^[2]。在 Grace 基础液中补加了 0.5 克/升甘露醇和 2 克/升 MES (2-morpholino-ethan-sulfonsaure); 在 M-M 基础液中添加了 0.5 克/升谷氨酰胺和 1 克/升 MES。培养基的 pH 值为 6.2—6.5, 青霉素、链霉素含量均为 100 单位/毫升。培养 BS-484 细胞的血清含量为 10% 小牛血清 + 5% 蓖麻蚕血淋巴, 培养 NIAS-MB-19 细胞的血清含量为 5% 小牛血清 + 5% 蓖麻蚕血淋巴, 培养 IPLB-SF-21 细胞的血清含量为 10% 胎牛血清 + 5% 蓖麻蚕血淋巴。

BS-484 细胞, 每隔 3—4 天传代一次。NIAS-MB-19 细胞, 每隔 2 天传代一次。

本文于 1988 年 11 月 23 日收到。

IPLB-SF-21细胞,每隔3天传代一次。

2、感染:参照钱元骏等使用的方法^[3],从病蚕中肠组织提纯DNV(见图1),提纯后的家蚕DNV接种BS-484细胞,培养6天后,收集细胞悬浮液,用反复冻融方法处理三次,然后,经3000转/分离心20分钟,去掉沉淀的细胞碎片,上清液用滤器过滤除菌,4℃保存,待下次感染用作毒源。

选择对数生长期的BS-484悬浮细胞,1000转/分离心5分钟,去掉细胞上清液,然后用适量病毒液接种细胞,吸附1小时后,不去掉病毒液,加适量培养基于培养瓶内,置28℃培养。第2天补加0.5毫升新鲜培养基,第4天再用1.5毫升新鲜培养基替换旧液1毫升。同时设立对照。

贴壁生长的BS-484细胞、NIAS-MB-19细胞和IPLB-SF-21细胞,传代2天后,去掉上层培养液,用适量病毒液接种单层细胞,吸附1小时左右,不去掉病毒液,补加新鲜培养基于单层细胞上。同时设立对照。

3、电镜样品的制备 收集培养12小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天的感染细胞和对照正常细胞,用3000转/分离心30分钟,去掉上清液,沉淀细胞经过固定、脱水、包埋、切片和染色后,即可置电镜下观察细胞超微结构。

结 果

家蚕浓核症病毒感染三个细胞系后,只有BS-484细胞感染后产生明显的细胞病变效应,现将电镜观察结果报道如下。

一、未感染的BS-484对照细胞超微结构

电镜观察培养不同时间的对照正常细胞,发现细胞的超微结构都很相似,在细胞质中,由双层膜构成的线粒体呈卵圆形,粗面内质网的切面呈管状,其上分布着许多核糖体,也有的核糖体以单体或多核糖体形式存在于细胞质中。细胞中有一个卵圆形的核,核的双层膜平整,核中有一个高电子密度的核仁,核仁物质呈致密均匀的一片(见图2)。

二、BS-484感染细胞的超微结构变化

最早发生细胞超微结构变化是在感染后24小时,这时细胞核开始膨大,比正常细胞核大一倍以上。同时,在细胞核中,出现核仁拉长分裂现象(见图3)。感染48小时,细胞核中出现多个核仁(见图4),而正常细胞核中通常仅含一个核仁。这种核仁增多现象,在家蚕DNV感染幼虫时,于细胞核中也观察过^[4,5]。随着感染的继续,到72小时,核仁开始膨大,呈疏松网状(见图5)。120小时以后,细胞核中出现病毒发生基质,这时有两种类型的细胞核,一种是核内分散存在许多球状的病毒发生基质,病毒粒子于其中产生并呈点阵晶格排列(见图6);另一种是核内充满连续一片的病毒发生基质,病毒粒子于其中形成(见图7)。感染7天,即可见病毒粒子冲破核膜,释放到细胞质中(见图8)。

在感染细胞的细胞质中,粗面内质网变成小泡体,其内出现许多类似核蛋白体样的小颗粒(见图9)。接着线粒体和内质网等细胞器空泡化,同时细胞质中出现许多溶酶体样的包含退化细胞器的大型自身吞噬体(见图10)。

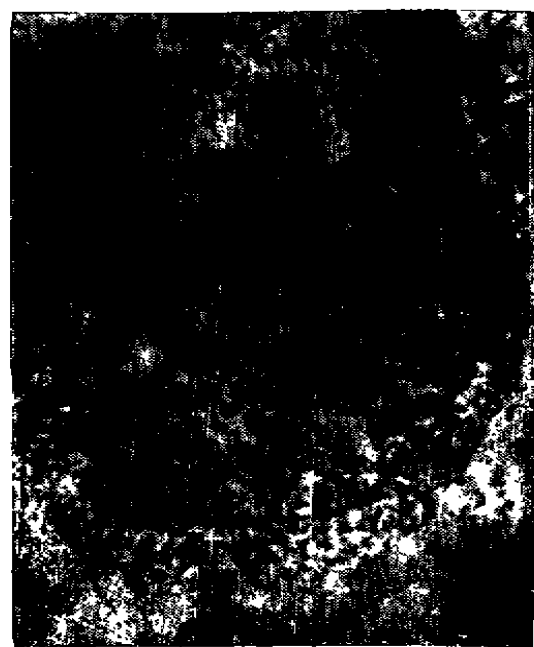
讨 论

用家蚕DNV感染细胞，细胞最显著的变化是：(1)核仁活性化，数目增多，并且出现核仁分裂和膨大现象。(2)细胞质变化。

核仁在细小病毒繁殖中的作用目前还未完全确定。Henry等(1972年)用荧光抗体法显示出核仁区有高浓度AHV-1抗原，并认为病毒衣壳蛋白亚基组装成衣壳可能发生在核仁中^[6]。Raskas等(1970年)提出腺病毒II型抑制核糖体RNA形成，并且引起核仁分裂^[7]。接着Philips和Raskas(1972年)进一步说明了腺病毒II型是干扰45S RNA正常加工过程而不是阻止它的合成^[8]。Fong等(1970年)也报道用H-1感染12小时的NB细胞，45S RNA生长过程发生异常现象^[9]。Kurstak等研究大蜡螟浓核病毒感染时，也观察到了核仁的膨大和分裂现象。Kurstak等将这种核仁分裂现象解释为核仁受到特殊损伤，它与核仁RNA合成受到干扰有关^[10]。

病毒感染细胞引起细胞质变化主要表现为形成特化小泡和积累大量核糖体样颗粒。

一般认为，这些特化小泡是由线粒体和溶酶体等细胞器演变而来，或是由内质网膨大形成。最早观察到核糖体结晶是在低温胚胎细胞中(Byers, 1967年)。按照Byers的观点^[11]，在分裂间期的细胞中，核糖体结晶的形成是由于多聚核糖体解聚而产生。另一方面，细胞在有丝分裂时，由于新蛋白质合成受抑制而在细胞质中产生许多核糖体，并使这些核糖体在分裂末期形成结晶。Kurstak等在分析大蜡螟浓核病毒感染时，认为细胞质中特化小泡内形成的结晶是由于DNV感染而引起粗面内质网退化，核糖体从内质网上游离出来，自由分散后形成核糖体结晶。我们初步认为本试验的核糖体样结晶产生可能是由于多聚核糖体的解聚和粗面内质网退化的结果。



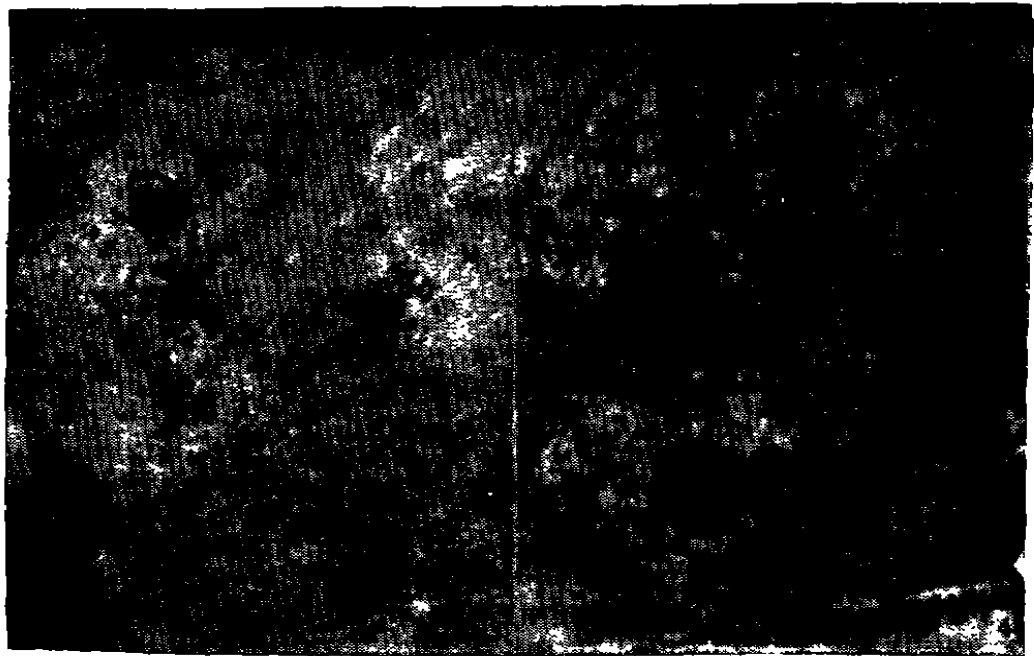


图 片 说 明

- 图 1 从家蚕幼虫中分离提纯的DNV ($\times 108000$)
 图 2 在Grace培养基培养2天的BS-484细胞超微结构,粗箭头示核仁,上细箭头示线粒体,下细箭头示粗面内质网。 ($\times 13400$)
 图 3 感染24小时,核仁开始分裂,箭头示核仁。 ($\times 5800$)
 图 4 感染48小时,核中出现多个核仁,箭头示核仁。 ($\times 7370$)
 图 5 感染60小时,核仁膨大,箭头示核仁。 ($\times 7370$)
 图 6 感染120小时,核中出现分散存在的球状病毒发生基质,病毒粒子在其中复制呈晶点状排列。 ($\times 25000$)
 图 7 感染120小时,病毒发生基质充满整个细胞核,病毒粒子在其中形成,箭头示病毒粒了。 ($\times 32000$)
 图 8 感染168小时,病毒粒子开始释放,细箭头示细胞核膜,粗箭头示病毒粒子正冲破核膜 ($\times 23500$)
 图 9 感染60小时,细胞质中出现许多小泡体,其内积累许多核糖体样颗粒。
 图 10 感染96小时,细胞质中出现大型自身吞噬泡,同时可见许多空泡化的细胞器 ($\times 14300$)

Legends for plates

- Fig 1. DNV isolated from larvae of *Bombyx mori*. ($\times 108,000$)
 Fig 2. ultrastructure of BS-484 cell, incubated in Grace medium for two days, black arrow, nucleus; upper arrow, mitochondria; below arrow, rough endoplasmic reticula. ($\times 13,400$)
 Fig 3. 24h after infection, nucleus segregation appeared, arrow, nucleus. ($\times 5,800$)
 Fig 4. 48h after infection, many nucleoli appeared, arrow, nucleus. ($\times 7,370$)
 Fig 5. 60h after infection, the hypertrophy of nucleoli appeared, arrow, nucleus. ($\times 7,370$)
 Fig 6. 120h after infection, in the infected nucleus dispersed virogenic stroma as patches occurred. Replicated virions arrayed in crystal. ($\times 25,000$)
 Fig 7. 120h after infection, virions formed from the virogenic stroma of entire nucleus, arrow, virions. ($\times 32,000$)
 Fig 8. 168h after infection, virions were released. ($\times 23,500$)
 Fig 9. 60h after infection, a lot of vesicle were found, in which a large number of ribosomes accumulated. ($\times 34,000$)
 Fig 10. 96h after infection, some large autophagosomes and vacuolate organelles appeared. ($\times 14,300$)



参 考 文 献

- [1] Grace, T.D.C., 1962, *Nature* 195: 788-789.
- [2] Mitsuhashi, J., 1982, In *Advances in cell Culture*, Vol. 2 (Maramorosch, K., ed.) 133, Academic Press, New York.
- [3] 钱元骏等, 1981, 蚕业科学 7(2): 100-103.
- [4] Susumu Masuda and Hitoshi Watanabe, 1978, *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* 22, 98-101.
- [5] 岩下嘉光、曹治孙, 1983, 蚕业科学 9(4): 219-222.
- [6] Henry, C.J., et al., 1972, *Virology* 49: 618-621.
- [7] Raskas, H.J. et al., 1970, *Virology* 40: 893-902.
- [8] Philips, D.M. and Raskas, H.J., 1972, *Virology* 48: 156-169.
- [9] Fong, C.K.Y. et al., 1970, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135: 585-588.
- [10] Kurstak, E. et al., 1977, *Densonucleosis viruses (parvoviridae) in Atlas of invertebrate and plant virus* (K. Maramorosch, ed.) PP 67-91 Academic Press, New York.
- [11] Breck Byers., 1967, *J. Mol. Biol.* 26: 155-167.

Electromicroscopic Observation of *Bombyx mori* Densonucleosis Virus Infecting Insect Cell Lines

Zou Shuai-zhou Xie Tian-en

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

There have not been formally reports of *Bombyx mori* densonucleosis virus infecting insect cell lines. In the present paper three insect ovary cells of *B. suppressaria*, *S. frugiperda* and *M. brassicae* infected with *Bombyx mori* densonucleosis virus. The result is that cytopathic effect was only observed in the ovary cells of *B. suppressaria*.

The ultrastructural changes of the infected cells have been observed both in the cytoplasm and nucleus. At an early stage of infection, the infected nucleus hypertrophied gradually, and many nucleoli appeared as the progress of infection. The nucleus hypertrophied greatly. Then two different patterns of infected nucleus were found. In the first pattern, virions were replicated in crystal arrays in virogenic stroma. In the second pattern, replicated virions were dispersed as patches and gradually condense and finally became large masses of virion. The nuclear membrane ruptured and viral masses were released into the cytoplasm.

In the cytoplasm of infected cell, rough endoplasmic reticula became vesicles or cisternae in which a large number of ribosome first appeared. With replication of the virions, organelles, such as mitochondria and endoplasmic reticula, vacuolated and degenerated. At the same time, many lysosomes appeared and some large autophagosomes containing the degenerated organelles occurred.

Key words: *Bombyx mori* densonucleosis virus Insect cell line Cytopathic effect Ultrastructure