

296-303

8424(10)

第7卷第3期
1992年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.7 No.3
Sep. 1992

茶毛虫核多角体病毒侵染后宿主细胞学的病变

邹 彤 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

S 476.13

提 要

本文应用超薄切片、冰冻断裂、扫描电镜等技术, 对茶毛虫核多角体病毒侵染后宿主细胞病理超微结构的变化等进行了研究。结果表明: 病毒侵染 72—120 小时后, 宿主中肠细胞器, 如线粒体、内质网、核糖体、板层小体、溶酶体等均有明显的病变。同时, 在中肠细胞表面有病毒粒子吸附外, 细胞表面的微绒毛亦有倒塌肿胀等病症表现。

关键词: 茶毛虫核多角体病毒 细胞器 病理学 超微结构 侵染;
茶毛虫; 核多角体病毒.

茶毛虫又名茶黄毒蛾 (*Euproctis pseudoconspersa* Strand), 俗称茶辣子, 属鳞翅目, 毒蛾科。它是我国产茶地区的主要害虫之一, 历年来危害严重。它还可以加害油茶、山茶、柑桔、枇杷等作物。幼虫体生长出许多毒毛, 人体触及毒毛后, 会引起皮肤红肿痛痒等过敏症, 对茶农采茶带来了直接的威胁。

茶毛虫核多角体病毒于 1974 年在贵州发现, 其后又在福建 (1976)、四川、湖北 (1978)、广西 (1979) 等地相继分离获得。日本、泰国等地区也有发生。该病毒的发现对茶毛虫的田间防治提供了重要的毒源。近几年来已对茶毛虫核多角体病毒的形态大小, 宿主范围, 生化特性, 血清学, 毒力测定和田间应用等方面均作了研究^[1]。然而, 茶毛虫 NPV 侵染宿主后组织细胞病理的研究报道甚少。

病毒侵染宿主后, 宿主的细胞学病变不仅取决于病毒的侵染能力, 而且也是宿主对病毒侵染的一种生理和病理反应。通过病毒侵染后宿主细胞学病变的研究, 对于进一步了解病毒复制与宿主细胞的相互关系具有重要意义。

本文应用超薄切片、冰冻断裂、扫描电镜等技术, 对茶毛虫核多角体病毒侵染后宿主细胞超微结构的病理变化等进行了研究, 现报告如下。

材 料 与 方 法

一、多角体病毒的分离纯化与电镜样品制备

1. 茶毛虫核多角体病毒由本室提供。
2. 将病毒多角体感染典型发病致死的茶毛虫尸体捣碎, 经过滤和差速离心后, 通过蔗糖梯

本文于 1991 年 8 月 28 日收到, 1992 年 2 月 15 日修回。

度离心,蔗糖浓度为40—60% (W/W)。取出多角体带,用蒸馏水反复洗涤数次去蔗糖后,收集多角体病毒置4℃冰箱内备用。

3. 取提纯的病毒多角体悬液,滴加在Formvar-碳膜上,在国产DX-5型扫描电镜中观察。此外,取少量多角体加入适量的10:1的0.05mol/L Na₂CO₃和0.05mol/L NaCl混合液,在30℃水浴中作用25—30分钟,经高低速离心后(3000r/m、10min,与18000r/m、30min),取病毒粒子悬液滴加在支持膜上,用1%磷钨酸(pH7.2)负染色,在JEM-100C型透射电镜下检测。

二、病毒感染幼虫及其细胞超薄切片的制备

将提纯的茶毛虫病毒核多角体悬液(6×10^8 PLB/ml)涂沫在净洗的新鲜茶叶片上,晾干后,饲喂3—4龄幼虫,24小时后换干净茶叶片。

病毒侵染后每隔24小时取一次样,七天内取完。即将茶毛虫幼虫中肠组织切成1mm³小块,按常规双固定、脱水、包埋、聚合,在LKB-2128型超薄切片机上切制。切片经双染色后分别在JEM-100C型透射电子显微镜中观察。并以正常幼虫的中肠组织细胞作对照处理。

三、幼虫组织细胞的扫描电镜样品的制作

1. 扫描电镜样品制备:取健康幼虫和分别对侵染病毒幼虫24—192小时的八个单位时间内解剖幼虫,取出中肠组织,切成2mm³小块,用2.5%戊二醛预固定1小时,再用1%锇酸后固定1小时。然后,经过酒精脱水,醋酸异戊酯置换30分钟。在日立HCP-2型临界点干燥器内干燥。再将样品移置IB-5型离子溅射仪中镀膜,于日立S-520型扫描电子显微镜中观察。

2. 冰冻断法制样:采用二甲基亚砜(DMSO)冰冻断法^[1],对侵染病毒后96和144小时两个单位时间的茶毛虫幼虫进行制样,即分别解剖幼虫取出中肠和整个虫体,用O-D-O法进行制作,在TE-I型冰冻断路器上割断,并同样经过液体CO₂临界点干燥,离子溅射镀膜等处理。

结 果

一、病毒多角体侵染后幼虫的症状表现

病毒多角体侵染3—4龄茶毛虫幼虫后,第四天幼虫开始烦躁不安,食欲减退,行动迟钝,对外界刺激反应缓慢,第七天开始体节肿胀,体色发红,稍触即破,流出脓液。其后,幼虫大量死亡。

二、多角体病毒形态大小及其在体内外的分布和细胞外表面的病变

茶毛虫病毒核多角体在扫描电镜下大多为不规则的多面体,表面光滑,少数有些皱折。多角体大小不一,测得其直径为0.9—1.94μm,平均直径为1.45μm(图1)。幼虫侵染病毒120—144小时后,中肠组织经冰冻断裂处理,中肠组织细胞破裂释放出多角体(图2),其形态大小与体外的多角体相同。而幼虫感染病毒多角体72小时后,发现中肠的杯状细胞外观膨大,在其表面吸附上4—5个短杆状的病毒粒子(图3b),它与体外纯化的病毒粒子(图3a)形态大小相符。然而,正常的杯状细胞外表面的微绒毛生长自然(图4),并无肿胀现象,有的排列正直似毛刷状(图5)。经病毒侵染72小时左右,细胞表面的微绒毛大部分倒塌,比较杂乱,其顶端呈膨胀的小球状(图6),如白色箭头所示。

三、病毒侵染后中肠组织细胞器的病理变化

1. 正常幼虫：茶毛虫幼虫中肠细胞细胞器的构造，在透射电镜下观察，细胞核呈卵圆形，具有双层核膜结构，核质均匀，有时亦可见到随机分布于核质内的染色质团块。核膜上有开放的核孔（图7）。线粒体多为短杆状或卵圆形，由内外两层膜所隔，内膜向内折叠成嵴，中间充满电子密度的基质。粗面内质网、核糖体、板层体等细胞器均属正常。

2. 侵染病毒后的细胞核：侵染病毒48—72小时后，核明显膨大，核膜有些部分皱折，无定形高电子密度的病毒发生基质，其后，病毒发生基质呈网状结构，中间有核衣壳出现，少数核衣壳正在获得套膜装配成病毒粒子（图8）。

3. 线粒体：侵染病毒72—120小时后，线粒体的数目增多并拉长（图9），有的线粒体肿胀，嵴伸长，后来有些线粒体的嵴断裂成模糊不清乃至空泡化。有的线粒体开始出现破裂，其中大量核糖体外溢（图11），如箭头显示。侵染120小时后，少量线粒体出现同心圆型的嵴（图12），膜已破裂无形态学上的完整性，也有些残破的线粒体被溶酶体自溶而成为髓样小体（图13）。在同一张切片上，不同构型线粒体的病变程度也有差异。

4. 粗面内质网与板层小体：侵染病毒72—120小时后，胞质内粗面内质网增生，可见到粗面内质网的腔和小池等。部分肿胀的内质网膜上核糖体的排列稀疏，有的核糖体大量脱落出现内质网空泡化（图9）。有时内质网特化成板层小体，成为一个中空的同心多层膜结构（图9，10）。

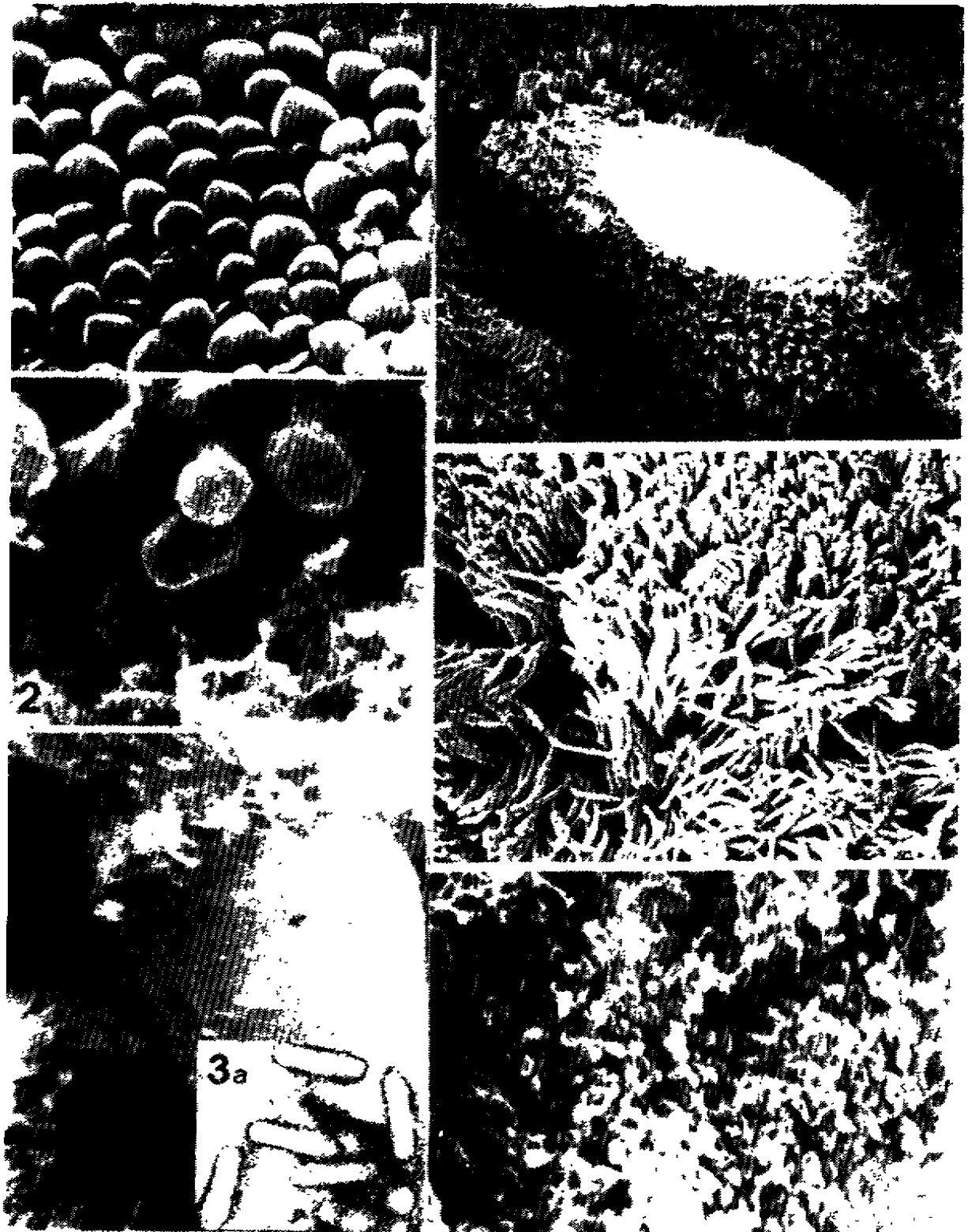
5. 核糖体：随着病程的进展与细胞器的病理变化，细胞内的核糖体颗粒增多，并且有部分的核糖体似以多聚体的形式存在。大约侵染72小时后，核糖体多以游离的形式存在于细胞质内。还有大量核糖体向胞核转移靠近，可能通过核孔进入核内参加病毒的复制。

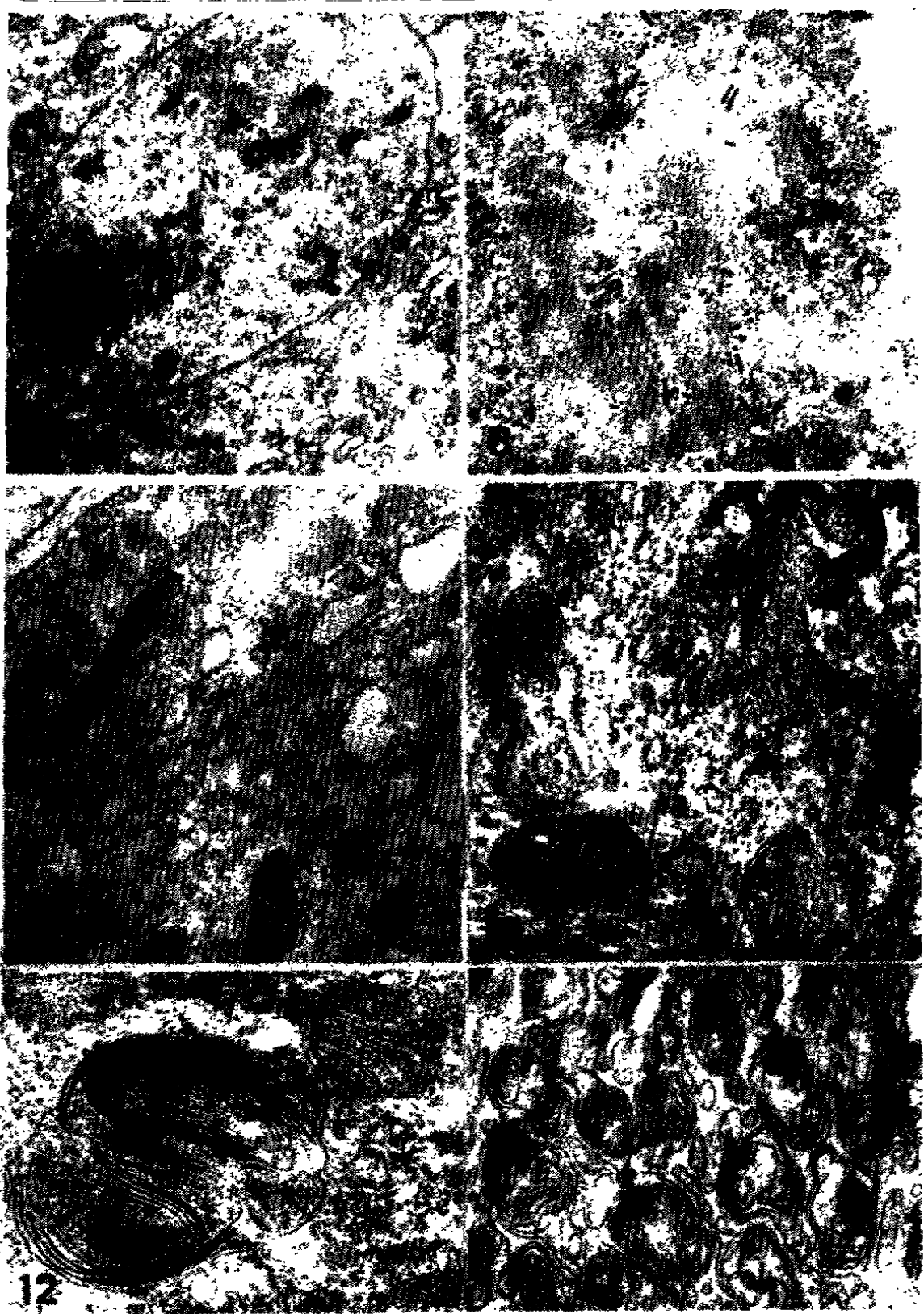
6. 溶酶体：病毒侵染后，细胞内的溶酶体数目增加。特别是感染晚期，细胞器开始出现破损时，溶酶体进行自体吞噬作用，有时成为单层膜所包围的吞噬膜状结构的吞噬小泡。

讨 论

一、茶毛虫核型多角体病毒侵染宿主细胞48小时以前，细胞内部的超微结构在电镜下几乎看不出任何变化。但在120小时之后，细胞器大多出现不同程度的破损，有些已无形态学的概念。因此，我们认为：研究病毒侵染后宿主细胞的超微结构的病理变化，选择时间范围要恰到好处。不同的杆状病毒侵染时间的范围还是有差异。如斜纹夜蛾NPV侵染48—96小时是比较适宜的（张立人等，1979）⁽⁸⁾。茶毛虫幼虫在侵染病毒72—120小时范围内观察其病变，可得到比较理想的结果。当病毒侵染以后，病毒的基因组利用宿主的复制系统进行病毒自身的复制。病毒在宿主细胞内的复制活动，往往会引起宿主细胞产生必然的病理变化，直至宿主细胞最后死亡。

二、病毒侵染宿主后，细胞核内出现高电子密度的病毒发生基质，这一事实早为Xeros（1956）发现⁽⁴⁾，随后得到许多学者的证实（Summer, 1969⁽⁵⁾；Harrps 1972⁽⁶⁾；





- 图1 茶毛虫核型病毒多角体扫描电镜像, $\times 18000$
- 图2 茶毛虫幼虫中肠组织细胞破裂释放的多角体, $\times 20000$
- 图3a 病毒粒子, 1% PTA, $\times 80000$
- 图3b 病毒粒子吸附在细胞表面, $\times 20000$
- 图4 正常幼虫中肠的单个杯状细胞, $\times 3000$
- 图5 正常幼虫中肠细胞的微绒毛, $\times 3000$
- 图6 病毒感染后中肠细胞的微绒毛倒塌、顶端膨大, $\times 3000$
- 图7 茶毛虫中肠上皮细胞超薄切片, $\times 11200$ N核、nm核膜
- 图8 病毒感染后核膜皱折, 核内出现病毒发生基质(VS)、核衣壳在中间, 有些正在获得囊膜, $\times 20100$
- 图9 病毒感染后线粒体拉长, 有的嵴模糊, 粗面内质网(Rer)呈池状, 有的空泡化, 核糖体开始脱落, 箭头指的为板层小体, $\times 33500$
- 图10 从内质网特化的板层体, $\times 33600$
- 图11 线粒体膜破裂, 大量核糖体外溢, 如箭头所指示, $\times 50000$
- 图12 一种具有同心圆型嵴的线粒体, $\times 50000$
- 图13 髓样小体, $\times 50000$
- Fig. 1 Scanning electron micrograph of E. P. NPB, ($\times 18000$)
- Fig. 2 E. P. NPB release from the larval midgut cell, ($\times 20000$)
- Fig. 3a Virions 1% PTA ($\times 80000$)
- Fig. 3b Virus particle adsorption on the cell surface ($\times 20000$)
- Fig. 4 A goblet cell of normal larval ($\times 3000$)
- Fig. 5 normal microvilli ($\times 3000$)
- Fig. 6 Microvilli topple down and top expand after infected with NPV ($\times 3000$)
- Fig. 7 The thin section on the normal midgut Epithelia cell. N, Nucleus nm nuclear membrane M, Mitochondrion Rer rough endoplasmic reticulum ($\times 11200$)
- Fig. 8 virogenicstroma and nucleocapsids in infected cell appeared, but nuclear membrane were fold ($\times 20100$)
- Fig. 9 mitochondrion drawing, some cristae blurred, The Rer presented cisternae and Ribosomes drop from that lamellar corpuscle (arrows) ($\times 33500$)
- Fig. 10 lamellar ($\times 33600$)
- Fig. 11 mitochondria membrane rupture, a lot of ribosomes drawing (arrow) ($\times 50000$)
- Fig. 12 Mitochondrial concentric cristae ($\times 50000$)
- Fig. 13 Myeloid body ($\times 50000$)

Kelly 1982^[7]; 张立人1985^[8])。我们认为病毒发生基质的出现, 胞核内核糖体数目的增多, 是病毒感染宿主细胞后, 病毒利用宿主细胞的复制系统迅速合成病毒组分而产生的变化。

三、线粒体是细胞能量发生和供应的主要场所, 它也是细胞病变的敏感器。我国黄冠辉等(1983)曾在颗粒体病毒感染的菜粉蝶幼虫中, 观察到线粒体发生类泡状或液泡化的异常病变^[9]。美国 Tanada (1969)^[10]、Hess R.T (1978)^[11]亦分别对感染杆状病毒的粘虫和苜蓿银纹夜蛾幼虫的线粒体和数量变化进行了研究。我们发现病毒感染早期, 线粒体的数目增多, 嵴伸长, 有时还看到具有同心圆型的嵴。这种同心圆型的线粒体在昆虫组织细胞中很少出现, 但在鼠类的精巢细胞内嵴呈同心圆仍时有出现^[12]。以上线粒体的出现与线粒体的肥大等变化, 我们认为线粒体积极进行能量代谢, 并加速与细胞内其它成份的交换, 以满足细胞内短暂的高活性生命代谢所需的能量, 它可能是

病毒复制时大量占用细胞内能量的结果。当然这种解释仍需要进一步证实。病毒侵染晚期,亦观察到线粒体嵴消失,核糖体的大量外溢,线粒体呈类空泡状,表明线粒体的能量代谢功能逐渐衰退或丧失,细胞自身处于瘫痪与崩溃状态。因此病毒复制停止,装配成完全的病毒粒子,并继续侵染周围的细胞。

四、病毒侵染宿主细胞后,粗面内质网大量增生,并特化成板层小体,这是内质网大量增生的标志之一。内质网上的核糖体呈平行排列,核糖体是最小的细胞器,也是细胞内蛋白质主要合成场所。病毒感染初期,核糖体内数目增多,或向核内输送。它为胞质和胞核内正在积极合成病毒复制所需要的蛋白质提供了物质基础。如能从动态细胞学上作进一步证实,那就更为完善。

五、微绒毛是协助细胞与外界进行物质交换的细胞器。感染初期,细胞表面微绒毛的胀大,拉长等变化是细胞与外界物质交换的结果。感染晚期,伴随细胞内各种细胞器的不同程度的病变、破损,以致细胞表面的微绒毛大量脱落乃至消失,细胞与外界进行物质交换的能力大大降低。

综上所述,宿主细胞作为一个生命活动的基本单位,其内部的各种细胞器各具其态,各施其能,以保证生命活动的协调与完整。当遇有异常变化,即病毒侵入后,细胞内各种细胞器均会联合协同作出适应性的反应。所以在研究病毒的特性与防治害虫时一定要考虑其与宿主细胞的相互关系,这是十分必要的。

参 考 文 献

- [1] 洪华珠等, 1985, 华中师范学院学报 (2): 90。
- [2] 田中敬一等, 1984, 图解扫描电子显微镜生物样品制作法, 1985年青岛中日电镜会议交流材料。
- [3] 张立人等, 1979, 中国科学 (4): 398。
- [4] Xeros, 1956, *Nature*, 178: 412
- [5] Summers M.D. 1969, *J. Ultrastruct Res.* 28: 462.
- [6] Harrp K.A. 1972, *Virology*, 50: 133.
- [7] Ketly D.C. 1982, *J. Gen. Virol.* 63: 1
- [8] Zhang Li Ren. 1985, *Recent Development of Electron Microscopy*, 233
- [9] 黄冠辉等, 1983, 昆虫学报, 26(1): 119。
- [10] Tanada Y. et al, 1969, *J. Inverteb Pathol*, 13: 394.
- [11] Hess R. T. et al, 1973, *J. Ultrastruct Res* 65: 253.
- [12] 郑国辑编著, 1980, 细胞生物学, 第125页, 高等教育出版社出版。

Cytopathic Changes of Host Infected by *Euproctis pseudoconspersa* Nuclear Polyhedrosis Virus

Zou Tong Zhang Li-ren

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

Cytopathology of midgut cells of *Euproctis pseudoconspersa* infected with a nuclear polyhedrosis virus was studied by transmission electron microscope, scanning electron microscope DMSO cracking method, ultramicrotome, energy dispersive X-ray microanalysis and negative staining method. Between 48—120 hours infected with EpNPV, host cellular organs had apparently pathological changes. Nucleus enlarged, virogenic stroma existed within the nucleus. The number of mitochondria increased, mitochondria hypertrophy in late infection, vacuole-like and myline-like appeared. Rough endoplasmic reticulum proliferated, ribosomes adhered to RER's surface closely, and then ribosomes took off its surface, concentric multilayered structure-special rough endoplasmic reticulum appeared. There are a lot of ribosomes within in nucleus and cytoplasm. Lysosomes made phagocytosis actively. Microvillis of infected cells enlarged, and were finally almost absent from cells. The cells hypertrophy and possessed rough surface with small protrusions. Based on all above, some evidence were given to about virus replication and interaction with host cells.

Key words: *Euproctis pseudoconspersa* strand nuclear polyhedrosis virus Organelles Pathology Ultrastructure