

犬传染性肝炎病毒在体外细胞质内的发生

常国权 杨盛华

(解放军农牧大学军事兽医研究所, 长春 130062)

S 852.65

A

提要 通过对犬传染性肝炎病毒(ICHV)在犬肾传代细胞内形态发生及其抗原定位的电镜和免疫胶体金电镜研究,发现 ICHV 除了在宿主细胞核内发生外,还有一条细胞质内的发生途径。在细胞质内病毒核壳体的装配是以均质致密包涵体和副晶格包涵体为“基地”,这与人们熟知的细胞核内形态发生方式相似。免疫胶体金标记显示,细胞质包涵体中含有大量的 ICHV 抗原成分,是核壳体在细胞质内装配病毒的结构蛋白来源。此外,在感染的细胞质内还观察到与核内相同的病毒核心样结构。

关键词 犬传染性肝炎病毒,形态发生,病毒装配,抗原定位,免疫胶体金电镜技术

犬传染性肝炎病毒(Infectious Canine Hepatitis Virus, ICHV)是无囊膜的双股 DNA 病毒,属于腺病毒科哺乳动物腺病毒属的成员。一般认为,ICHV 的核壳体是在宿主细胞核内装配的^[1-4]。我们在 ICHV 的形态发生及其抗原定位研究中也证实了这一点。但同时大量实验中又观察到一种很有意义的新现象,即在 ICHV 感染的细胞质内,经常能观察到与核内相似的均质致密包涵体和副晶格包涵体,并且在这两种包涵体的周缘见有已装配好的或正在装配的病毒核壳体。这给我们提出了一个十分重要的启示:ICHV 除了在宿主细胞核内发生外,是否可能还存在一条细胞质内的发生途径?现将我们的研究结果报道如下。

材料与amp;方法

- 1 **病毒** ICHV A-8301 株,系本所病毒室从病死犬肝内分离获得,经系统鉴定证实为犬传染性肝炎病毒^[6]。
- 2 **犬肾传代细胞(MDCK)** 引自中国兽药监察所。按常规方法传代培养,待长成良好单层细胞后备用。
- 3 **豚鼠抗 ICHV IgG** 用上述病毒株经鼻、眼接种豚鼠共三次,即第一、二、四周各一次,每次 1ml/只。第五周后取血分离血清,并按常规方法提取 IgG。其血凝抑制试验滴度为 1:64。
- 4 **胶体金标记蛋白 A(SPA-G)** 购自军事医学科学院基础医学研究所。金颗粒直径为 15nm。
- 5 **常规电镜方法** 将 ICHV 接种于良好单层的 MDCK 细胞上。接毒后 12、18、22、24 和 48 小时,分别取材用戊二醛和锇酸固定,常规包埋、切片和双染色^[6]。
- 6 **免疫胶体金电镜方法** 同上述分别取材。用 2%多聚甲醛-0.025%戊二醛将细胞在 4℃固定 3-5 小时。经系列乙醇(30%、4℃ 30 分钟;50%、70%、80%、95%和 100%, -30℃ 各 1 小时)脱水后,用 Lowicryl K₄M(TAAB 产品)与无水乙醇的 1:1 和 2:1 混合液 -30℃ 各浸透 1 小时,再用 100% Lowicryl K₄M 在 -30℃ 浸透 1 小时或停留过夜。将细胞连同预冷的 Lowicryl K₄M 转入无水胶囊内,置于 30W 紫外灯下 -30℃ 聚合 48 小时,然后制成超薄切片。将切片打捞在不锈钢载网上,用 1%卵蛋白室温下处理切片 30 分钟,以封闭切片上非特异性吸附点。加适当稀释的豚鼠抗 ICHV IgG 室温下作用 2 小时。经 0.01mol/L PBS(pH7.2)洗涤后加入适当稀释的

• 本文于 1993 年 2 月 22 日收到,1994 年 1 月 17 日修回

SPA-G 室温下作用 1 小时,经 PBS 和蒸馏水充分洗涤后,常规双染色。

超薄切片在 JEM-7 型电子显微镜下观察和照像。

实验设正常细胞对照,免疫胶体金电镜法同时设感染细胞对照,用正常豚鼠 IgG 代替豚鼠抗 ICHV IgG,处理步骤相同。

结 果

本实验中我们分别观察了 ICHV 感染后 12、18、22、24 和 48 小时的细胞,除观察到细胞核内包涵体与病毒核壳体装配的密切关系(另文发表)外,同时还发现在细胞质内也存在着与核内相似的包涵体及其与病毒核壳体装配的密切关系。在病毒感染后 12 小时的细胞内,完全见不到装配好的核壳体。在感染后 18 小时,仅在细胞核内见到少量核壳体,而在细胞质内仍观察不到核壳体。病毒感染后 22 小时,在部分细胞的胞核中出现呈晶格样排列的病毒核壳体。与此同时,在核内电子密度较高的均质样物质中可见到直径约 50nm 左右的病毒核心样结构。此种结构呈致密的实心,大小均匀,排列较有规律(图 1)。值得注意的是,在感染的细胞质内也见到了这种病毒核心样结构(图 2)。免疫胶体金标记显示,细胞质和核内的病毒核心样结构均不能被免疫胶体金颗粒所标记,因而不具有病毒抗原性。病毒感染后 24 小时,在细胞质中可见到均质致密包涵体,这种包涵体由无数电子致密的小颗粒组成,大小均匀,多呈圆形,分散存在于细胞质中。有趣的是在这种包涵体的周缘常环绕一圈排列整齐的病毒核壳体,形似花环(图 3)。病毒感染后 48 小时,在细胞质中也观察到与核内相似的副晶格包涵体,这种包涵体大小不等,形态多样,在其周缘偶见有病毒核壳体。免疫胶体金标记显示,这种包涵体具有病毒抗原性(图 4)。对照实验表明,以上观察具有特异性。

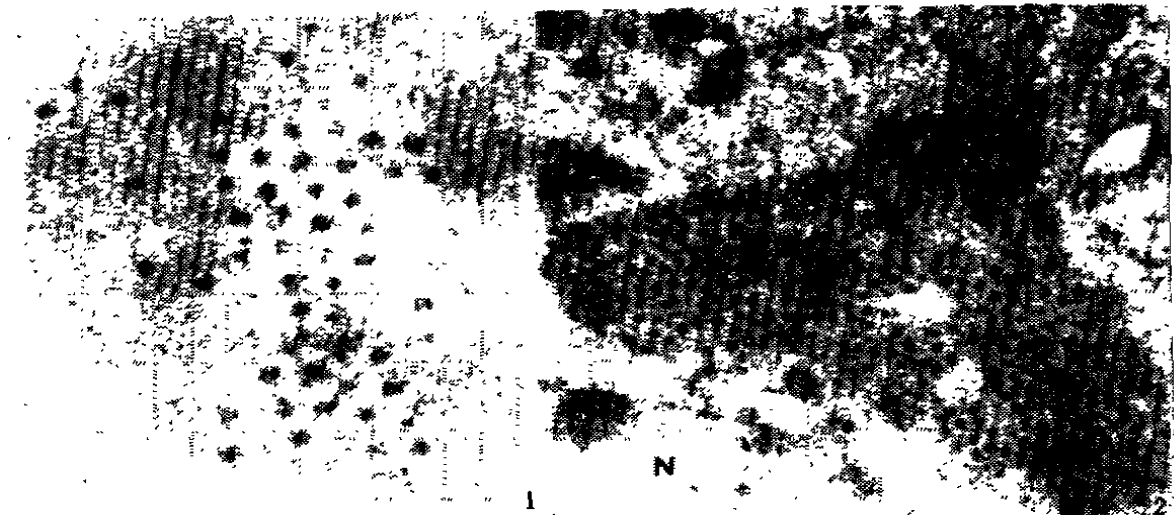


图 1 病毒感染后 22 小时的 MDCK 细胞($\times 64000$),示细胞核内的病毒核心样结构

Fig. 1 MDCK cell 22h postinfection with ICHV ($\times 64000$), showing virus core-like structures in the nucleus

图 2 病毒感染后 22 小时的 MDCK 细胞($\times 22000$),示细胞质内的病毒核心样结构

Fig. 2 MDCK cell 22h postinfection with ICHV ($\times 22000$), showing virus core-like structures in the cytoplasm

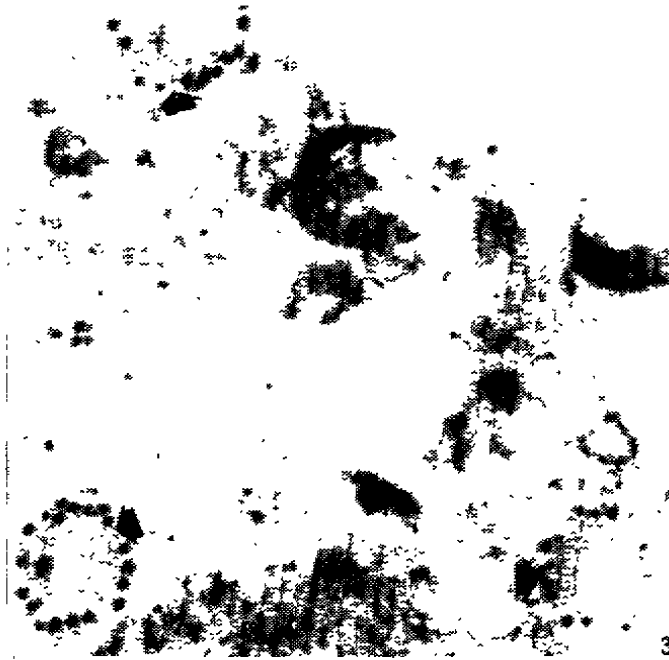


图3 病毒感染后24小时的MDCK细胞($\times 22000$),示细胞质内均质致密包涵体周围环绕一圈排列整齐的核壳体,形似花环(箭头)

Fig. 3 MDCK cell 24h postinfection with ICHV ($\times 22000$), showing homogeneous dense inclusions circled with nucleocapsids in the cytoplasm, resemble rosettes (arrows)



图4 病毒感染后48小时的MDCK细胞($\times 20000$),示细胞质内免疫胶体金标记的副晶格包涵体

Fig. 4 MDCK cell 48h postinfection with ICHV ($\times 20000$), showing paracrystalline inclusions labelled by the immunogold particles in the cytoplasm

讨 论

迄今,除痘病毒、虹彩病毒以及翟中和等^[7]和洪涛等^[8]分别报道的鸭瘟疱疹病毒和单纯疱疹病毒外,尚未见到其它 DNA 病毒在细胞质内装配的报道。ICHV 是典型的细胞核内装配的 DNA 病毒,它们的核壳体是在感染的细胞核内装配的^[1-4]。本实验也证实了宿主细胞核是 ICHV 复制及核壳体装配的主要场所。但是我们的实验同时还发现以下事实:(1)在 ICHV 感染的细胞质中经常能见到与核内相似的包涵体,并且在其周缘见到已装配好的或正在装配的病毒核壳体;(2)在细胞质和核内均观察到了病毒核心样结构,其大小、形态和电子密度与病毒核心相似;(3)在病毒感染的早期,细胞核中没有或仅有少量核壳体,这时核膜完整,细胞质中的病毒核壳体不可能来自细胞核内,它们只能是在细胞质中形成的。即使在感染的中后期,有些细胞核膜仍较完整,这时在细胞质中见到的包涵体体积较大,也不大可能来自于破损的细胞核;(4)免疫胶体金标记结果表明,细胞质包涵体中含有大量的病毒抗原成分,是核壳体在细胞质内装配病毒的结构蛋白来源。

Giese^[9]在研究单纯疱疹病毒发育的生化过程时发现,病毒的 DNA、mRNA 和结构蛋白都可通过核膜,尤其在病毒感染时核膜的通透性发生变化,细胞核内合成的大量 DNA 成分有可能被转运到细胞质中。Ashwell 等^[10]研究表明,细胞质中也有少量 DNA 复制、转录的酶系。病毒利用它们在细胞质中进行复制也有可能。此外,分子病毒学的研究表明,只要原料齐全,病毒的装配是自发的。细胞质中病毒结构蛋白大量存在,DNA 的来源又有可能,因此 ICHV 在细胞质内装配核壳体是可能的。

ICHV 在细胞质内的装配途径,在其它腺病毒上是否具有普遍性,尚需进行更多的研究。

致谢 本文经北京大学生物系翟中和教授、丁明孝教授、哈尔滨兽医研究所李成研究员以及本所殷震教授等审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Leader R W. Cytopathology and rate of release of infectious canine hepatitis virus grown in dog kidney cells. *Am J Vet Res*, 1958; 19:152~158
- 2 Tajima M, Motohashi T, Samejima T. Electron microscopy of infectious canine hepatitis virus grown in cultures of canine kidney cells. *Am J Vet Res*, 1961; 22:236~249
- 3 Moulton J E, Frazier L M. Deoxyribonucleic acid and protein changes in dog kidney cells infected with infectious canine hepatitis virus. *Virology*, 1961; 15:19~101
- 4 Garg S P, Moulton J E, Sekhri K K. Histochemical and electron microscopic studies of dog kidney cells in the early stages of infection with infectious canine hepatitis virus. *Am J Vet Res*, 1967; 28:725~730
- 5 夏威柱,王永贤,赵吉成,等. 犬传染性肝炎病毒的分离与鉴定. *兽医大学学报*, 1984; 4(3):228~233
- 6 洪涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 北京:科学出版社,1980,111~154
- 7 翟中和,丁明孝. 一种核内 DNA 病毒(鸭瘟病毒)在细胞质内的发生途径. *中国科学(B辑)*, 1982; 2:121~124
- 8 洪涛,楚雍烈,王见南,等. 单纯疱疹病毒的细胞质内形态发生方式. *微生物学报*, 1982; 22(2):175~179
- 9 Giese A C. *Cell Physiology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Saunders Press, 1979:192~194
- 10 Ashwell M, Work T S. The biogenesis of mitochondria. *Ann Rev Biochem*, 1970; 39:251~283

Cytoplasmic Morphogenesis of Infectious Canine Hepatitis Virus in Dog Kidney Cells

Chang Guoquan Yang Shenghua

*(The Military Veterinary Institute, University of Agriculture
and Animal Sciences of PLA, Changchun 130062)*

The morphogenesis and antigen localization of infectious canine hepatitis virus (ICHV) in dog kidney cells were studied with electron microscopy and immunogold electron microscopy. Apart from the assembly of ICHV in nuclei, virions were also assembled in cytoplasm of the infected cells. The mode of viral morphogenesis in homogeneous dense inclusions and paracrystalline ones in cytoplasm was similar to that well known in nuclei. Result of immunogold labelling showed that there were a lot of antigenic components of ICHV providing the viral structural protein for the assembly of nucleocapsids in these two kinds of inclusions in cytoplasm. In addition, some virus core-like electron opaque structures around 50nm in diameter were presented in cytoplasm as those in nuclei.

Key words Infectious canine hepatitis virus, Morphogenesis, Virus assembly, Antigen localization, Immunogold electron microscopy