86—91

9123(14)

第10卷 第1期
1995年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 10 No. 1
Mar. 1995

牛病毒性腹泻病毒的成熟和释放

张荣兴 王新华* 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所，上海 200031)
*(新疆农垦科学院畜牧兽医研究所，石河子市 832000)

S852.653

A

提要 试验中用电镜观察了牛病毒性腹泻病毒 Oregon C24V 株在感染新生牛睾丸细胞中的形态发生。成熟的病毒颗粒是直径约为 50nm 的球形颗粒，内含直径约为 30nm 的核心。病毒在宿主细胞的胞质内复制，通过糙面内质网膜出芽成熟。病毒可以通过外排或在细胞死亡后含有病毒颗粒的空泡崩溃而释放到胞外。

关键词 牛病毒性腹泻病毒，出芽过程，电子显微镜观察 出芽，成熟，

业已证明：牛病毒性腹泻病毒(BVDV)不仅是引起牛腹泻病或牛粘膜病的重要病原，也是羊的一种传染病病原。BVDV 的传染不仅给世界牛、羊饲养业带来重大的经济损失，同时也是牛制品和细胞培养物的重要污染源之一。

BVDV 的基因组为正链单股 RNA，它与羊边界病毒(BDV)和猪瘟病毒(HCV)原属披盖病毒科(Togaviridae)的瘟病毒属(Pestivirus)[1]，是瘟病毒属的代表种。但最近根据其基因组的构成和复制方式(replication strategy)与黄病毒科(Flaviridae)的相似性，已把它重新分类为黄病毒科[2,3]。

自 60 年代开始，有关 BVDV 的形态学研究已有大量报道。早期工作主要是纯化或部分纯化病毒的正染和负染标本的电镜观察，所报道的病毒颗粒的大小很不一致，其范围是 35—>100nm[4—9]。另一类形态学研究是感染组织或培养细胞的超薄切片的电镜观察[10—13]。这些研究表明，BVDV 为直径约 50nm 的有囊膜的球形颗粒，内含直径约为 27—29nm 核衣壳。迄今为止，上述研究主要涉及 BVDV 的形态发生，但均未观察到核衣壳通过内膜的出芽过程(budding process)。

本文观察了用 BVDV Oregon C24V 株感染的新生牛睾丸培养细胞(NBTE)的超微结构，在病变轻微的 NBTE 细胞中首次发现了颗粒通过变性内质网膜的出芽成熟，对 BVDV 的形态发生和病毒分类提供了新的证据。

材料和方法

1 病毒

BVDV Oregon C24V 株来自北京中国兽药监察所。

2 细胞制备

本文于 1994 年 3 月 25 日收到，6 月 6 日修回

新生牛睾丸用含青霉素(300μ/ml)、链霉素(300μg/ml)的Hanks液洗2次，去包膜后将睾丸剪成1－2mm³的小块。用上述Hanks液洗一次后加0.25%的胰蛋白酶37℃消化30分钟，每隔10分钟用力摇动1－2分钟。用大口吸管吹打后，经4－8层消毒纱布过滤，滤液经1000r/min离心5分钟后去上清，加含有20%小牛血清的1640培养液混匀后计数并分装培养瓶。用于病毒感染的细胞培养为第3－4代NBTE。

3　病毒感染

NBTE的细胞培养经含双抗的Hanks液洗一次后加BVDV悬液，37℃吸附2小时后吸出。在对照细胞培养和感染细胞培养中分别加含5%小牛血清的1640培养液，37℃培养。

4　电镜观察

对照细胞和呈现细胞病变效应(CPE)的感染细胞经Hanks液洗一次后从瓶内刮下，离心沉淀的细胞用2.5%戊二醛预固定后，再用1%OsO_4后固定。经常规脱水后用Epon-812包埋。超薄切片用5%醋酸铀和柠檬酸铅染色。用JEM-100B电镜观察。

结　　果

1　光镜观察

BVDV感染的NBTE细胞一般在24－28小时出现明显的CPE。整个细胞单层呈网状，细胞出现肿涨，固缩和空泡化等明显病变，且有许多细胞变圆，脱落最后裂解成细胞碎片，见图1b。对照细胞仍生长良好，见图1a。

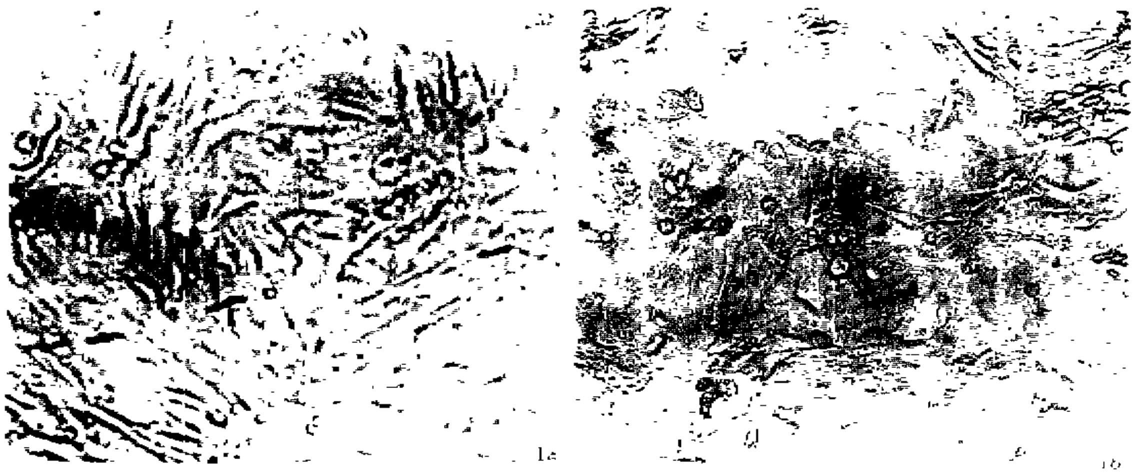

图1　未感染的NBTE细胞，120×
Fig 1a　Uninfected NBTE cells. 120×

图1b　BVDV感染24小时的NBTE细胞，示明显的CPE，120×
Fig 1b　NBTE cells 24hr after infected with BVDV. Note apparent CPE. 120×

2　电镜观察

由于各个感染细胞的病变程度不同，因而在不同的细胞中同时可以观察到BVDV形态发生中的不同过程。在病变较轻的细胞中，最先看到的超微结构变化是多聚核糖体分散，糙面内质网池扩大，附着在糙面内质网膜上的核糖体明显减少。同时在胞质内可见多个无定形的纤维区，这些纤维区往往紧靠变化了的糙面内质网。此时，在少数变化内质网池中可见少量成熟的BVDV颗粒，其直径约为50nm，内含直径约为30nm的核衣壳。在少数样品中，可见核衣壳

通过变化了的内质网膜向内质网池中出芽成熟。如图 2 所示,完整病毒的囊膜仍与内质网膜相连。在含有病毒颗粒的内质网膜上很少甚至见不到附着的核糖体。

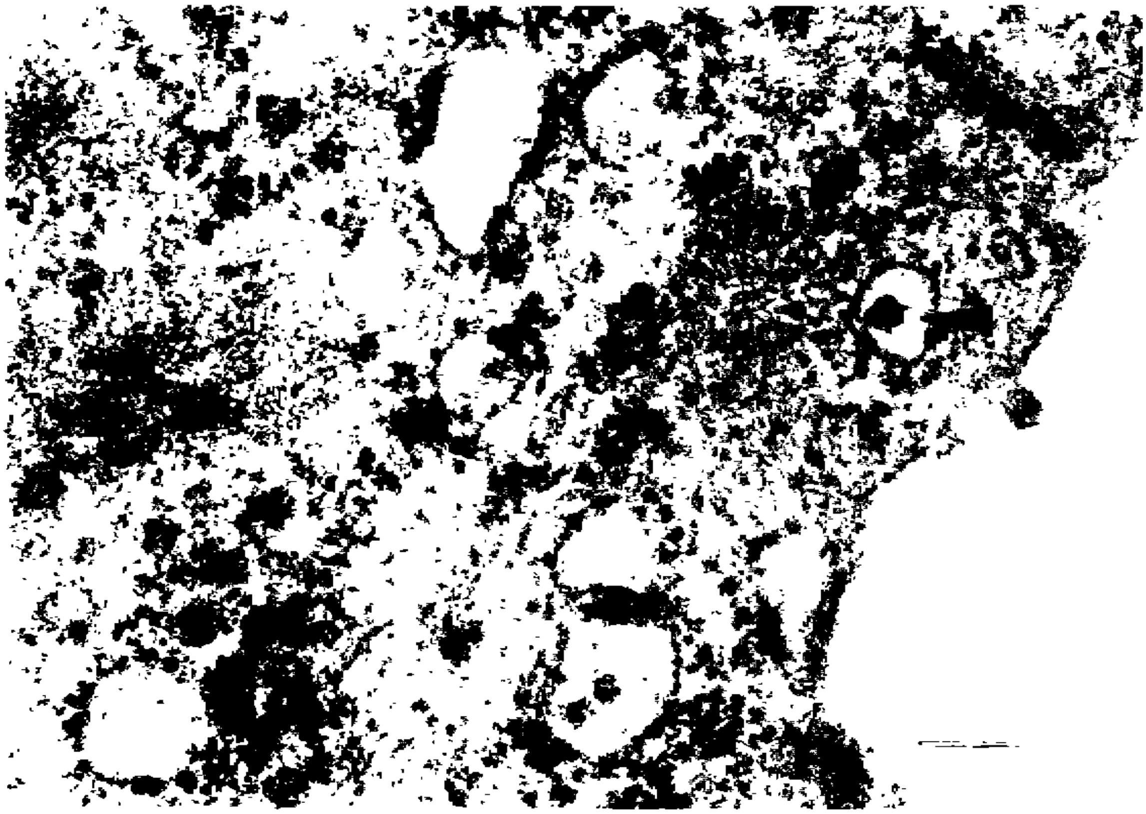

图 2 . BVDV 感染的 NBTE 细胞,示病毒向胞质小泡中芽殖(箭头)(标尺:250nm)
Fig2 NBTE cells infected with BVDV . Note budding of BVDV through membrane of modified RER (arrow). Bar=250nm

在病变较重的 NBTE 的细胞中,可见许多被 Ohmann 等[12]称之为空泡复合物(Vacuolar Complex)或小泡复合物(Vesicular Complex)的结构,在此空泡复合物中,可见大量直径约为 50nm 的病毒颗粒。同时,在胞质内仍可见仅含少量病毒颗粒的小泡(图 3)。

在我们所观察的材料中,细胞可以以两种方式释放病毒。一种是通过外排(Exocytosis)释放,即含有大量病毒的空泡复合物不断接近质膜,然后通过与质膜的融合,将成堆病毒排到胞外(图 5)。另一种是通过细胞裂解,将含有大量病毒颗粒的空泡复合物排到胞外,此时空泡复合物的界膜仍保持完整结构(图 4),随后可通过空泡的破裂释放病毒。

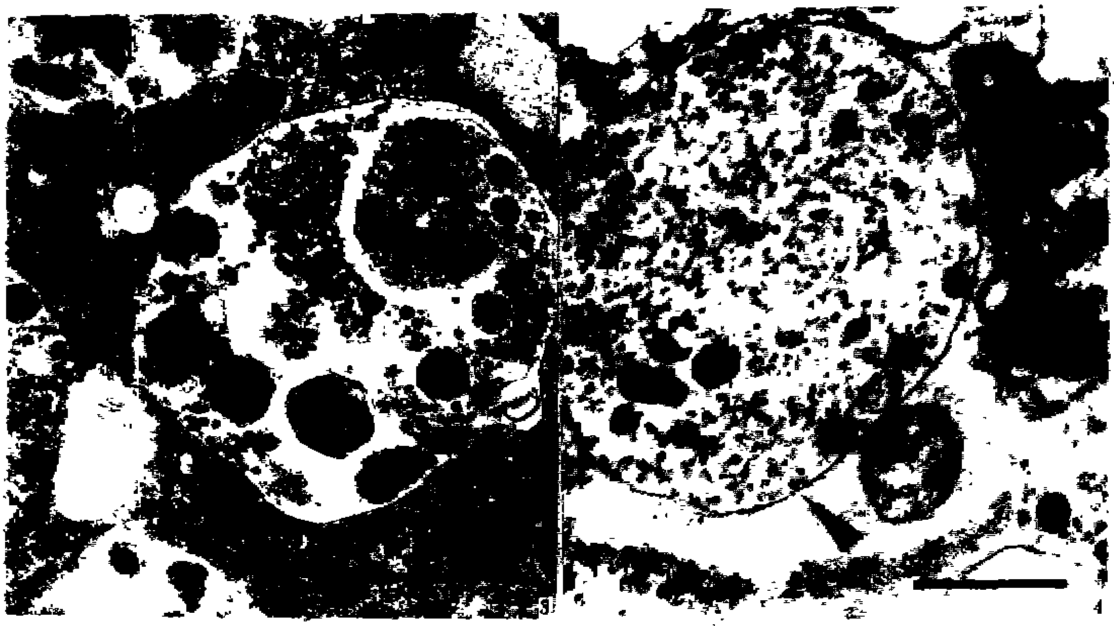

图3　BVDV感染的NBTE细胞，示含有大量病毒颗粒的小泡复合物(箭头)(标尺：1000nm)

Fig3　NBTE cells infected with BVDV. Note vesicular complex (arrow) containing many virus particles. Bar=1000nm

图4　BVDV感染的NBTE细胞，在破碎的胞质中可见含有大量病毒颗粒的小泡复合物(箭头)(标尺：1000nm)

Fig4　NBTE cells infected with BVDV. Note vesicular complex (arrow) containing many virus particles in disintegrated cytoplasm. Bar=1000nm

在正常对照细胞中，细胞结构基本正常，胞质内可见大量多聚核糖体和糙面内质网。虽在胞质内可见残渣小体，但未见病毒颗粒和感染细胞所特有的空泡复合物结构。

讨　论

BVDV感染细胞的超微结构研究已有较多的报告[10-13]。在以前的研究中，比较一致的结果是BVDV在感染细胞的胞质内复制，且与内质网膜密切相关，甚至看到病毒颗粒与内质网膜非常靠近，推测BVDV与黄病毒一样，病毒通过胞质内膜系统出芽成熟。但是，迄今为止从未看到病毒核衣壳通过细胞内膜系统的出芽成熟过程，对BVDV的形态发生也仍不很清楚。

在我们观察的材料中，BVDV感染的NBTE细胞的最先病变是多聚核糖体分散，附着于糙面内质网膜上的核糖体明显减少和内质网池的扩大，说明糙面内质网和游离的多聚核糖体与BVDV的胞质内复制密切相关。但是，在我们的材料中，未见Chasey与Roeder[11]、Gray与Nettleton[13]所报道的改变的糙面内质网(Modified rough ER)—管状内质网(Tubular ER)。在病变较轻的NBTE细胞中，我们首次看到了病毒核衣壳通过扩大的内质网膜的出芽成熟(图2)，这与黄病毒和HCV的成熟方式相同，但不同于甲病毒的成熟过程，后者是通过细胞质膜出芽成熟。最近，Greiser-Wike等[14]的免疫荧光结果证明，在细胞病变型和非细胞病变型BVDV感染的细胞表面检查不出病毒蛋白的表达，说明BVDV不通过胞膜出芽成熟，这与我们的结果相一致。我

们的结果为 BVDV 的形态发生和 BVDV 分类提供了新的证据。

在细胞病变较轻的细胞中，可以看到多个无定形的纤维区，其中有些紧挨扩大的内质网(图 2)，这是否是 Ritechie 与 Fernelius[10]认为的病毒装配区或"工厂"有待进一步证明，因为在我们的材料中，尚未在这些无定形的纤维区找到非常确定的病毒核衣壳状颗粒。

图 5 BVDV 感染的 NBTE 细胞，可见接近质膜的小泡复合物(箭头)和成堆的胞外病毒(插图)(标尺：500nm)

Fig5 NBTE cells infected with BVDV. Note that vesicular complex (arrow) has approached to plasma membrane. Insect: a cluster of extracellular virus particles. Bar=500nm

在病毒感染较重的细胞中，除了含有少量病毒的小泡外，还可见许多含有大量直径约为 50nm 的病毒颗粒的空泡复合物。它们既可以在细胞裂解时完整地排到胞外(图 4)，也可以在完整的细胞中不断靠近质膜并通过与质膜的融合将空泡内的病毒成堆地排到胞外。这些结果与 Ohmann 与 Bloch[12]的报道相一致。

有关 BVDV 的大小，以前报道的结果很不一致，其范围为 35－＞100nm[4-13]。我们所观察到的 BVDV Oregon 株的病毒颗粒的直径约为 50nm，内含直径约为 30nm 的核心。这些结果与大部分超薄切片观察结果[11-13]相一致，也与有些正、负染标本的电镜观察结果[5,7,9]相近，与 HCV 和 BDV 的直径也非常相近[13,15]。

参 考 文 献

1 Westaway E G, Brinton M A, Gaidamovitch S YA, et al. Togavindae. Intervirology, 1985; 24: 125—139

2 Collett M S, Wiskerchen M, Welniak E, et al. Bovine viral diarrhea virus genomic organization. Arch Virol, 1991; Suppl. 3: 19—27

3 Horzinek M C. Pestiviruses-taxonomic perspectivs. Arch Virol, 1991; Suppl. 3: 1—5

4 Horzinek M C. Comparative aspects of Togarviruses. J Gen Virol, 1973; 20(Suppl.): 87—103

5 Horzinek M C, Maess J, Laufs R. Studies on the substructure of togarviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhea and hog cholera viruses. Arch Ges Virusforschung, 1971; 33: 306—318

6 Hermodson S, Dinter Z. Properties of bovine virus. Nature(Lond.), 1962; 194: 893—894

7 Maess J, Retzko E. Electron optical studies of bovine viral diarrhoea mucosal disease virus(BVDV). Arch Ges Viurusforschung, 1970; 30: 39—46

8 Chu H J, Zee Y C. Morphology of bovine viral diarrhea virus. Am J Vet Res, 1984; 45: 845—850

9 Hafez S M, Petzoldt K, Reczko E. Morphology of bovine viral diarrhoea virus. Acta Virol, 1968; 12: 471—473

10 Ritchie A E, Fernelius A L. Characterization of bovine viral diarrhea viruses. Arch Ges Virusforschung, 1969; 28: 369 389

11 Chasey D, Roeder P L. Virus-like particles in bovine turbinate cells infected with bovine virus diarrhoea/mucosal disease virus. Arch Virol, 1981; 67: 325—332

12 Ohmann H B, Bloch B. Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. Arch Virol, 1982; 71: 57—74

13 Gray E W, Nettleton P F. The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. J Gen Virol, 1987; 68: 2339 2346

14 Greiser-Wilke I, Dittmar K E, Liess B, et al. Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells. J Gen Virol, 1991; 72: 2015—2019

15 Moenning V. The Hog cholera virus. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1992; 15: 189 201

Maturation and Release of Bovine Viral Diarrhea Virus

Zhang Rongxing　Ge Xirui

(*Shanghai Institute of Cell Biology, Academy Sinica, Shanghai* 200031)

Wang Xinhau

(*Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,*
Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation, 832000)

The morphogenesis of bovine viral diarrhea virus (BVDV) strain Oregon C24V in bovine testis cell culture was examined by electron microscopy. Virions were roughly round and approximately 50nm in diameter with a 30nm core. Virus replication took place within cytoplasm of host cells. Budding of BVDV through membrane of modified rough endoplasmic reticulum was observed. The virus might be released by exocytosis or by disintegration of the vacuoles containing virus after cell death.

Key words　Bovine viral diarrhea virus, Budding process, Electron microscopy