维普资讯 http://www.cqvip.com

214—219 6842(4)

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

用DNA银染法研究传染性软疣病毒的形态发生发育过程

李德忠 肖同浩
(广州军区武汉总医院电镜室,武汉 430070)
吴 宁
(广州军区武汉总医院皮肤科,武汉 430070)

R373.12

A

提要 用DNA银染技术显示了传染性软疣病毒(MCV)形态发生发育及其过程中DNA的变化。结果显示:在被感染的皮肤表皮细胞内都有一个大小及构型不同的银染区(病毒工厂)。MCV的发生发育均在银染区内而不在胞质区内。其发生过程是先在细胞一侧的胞质内复制合成病毒DNA等物质,形成中等密度的银粒大小不等的银染区(病毒前包涵体区),然后在其中形成致密的细粒状银染区(病毒前基质区),接着在后者的周围出现弧形的粗粒银沉淀(初期MCV的外膜),逐渐分割包围病毒前基质而形成初期MCV。在发育过程中,初期MCV的外膜、基质,核心外膜及核心均经过一系列的形态变化。侧体是中期MCV向成熟期发育中出现的暂时性结构,其本质为含DNA成分的病毒基质。本研究提示:MCV的DNA物质进入皮肤表皮细胞后能大量复制,合成大量的病毒蛋白质,自主地装配成完整的初期MCV,后者有独特的形态发育过程。

关键词 传染性软疣病毒,DNA,银染方法,电镜观察 形态发生、

痘病毒、

传染性软疣病毒(molluscum contagiosum virus, MCV)是痘病毒属中未分类的病毒,是体积最大结构最复杂的DNA病毒之一[1]。它仅能在人皮肤表皮细胞中生长引起传染性软疣。我们用常规电镜观察了MCV的超微结构[2]及形态发生和发育过程[3]。然而,常规的铀、铅染色能使细胞器和MCV普遍着色,不能明确显示病毒DNA及含DNA成分结构的变化。显示DNA的孚尔根－六亚甲四胺银染色法能使含DNA的细胞器染色[4]。用该法显示病毒内DNA及胞质中病毒DNA物质及病毒形态发生发育的尚未见报道。本文用该方法对15例新生的传染性软疣组织进行了电镜观察,旨在进一步探讨MCV形态发生发育及其过程中病毒DNA的变化。

材料与方法

1 材料

15例新生的传染性软疣组织取自本院皮肤科患者,其中男性12例,女性3例,年龄最大的23岁,最小的2岁,多数为20岁左右。所选新生软疣的发生时间在一个月左右,疣体直径0.5～1 mm。在无菌操作下一例患者取3～5个疣体。

本文于1994年11月7日收到,1996年1月29日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 方法

组织以3%戊二醛固定2 h,二甲砷酸钠缓冲液洗3次,共45 min。梯度丙酮脱水,Epon 812包埋。半薄切片以多色染液染色[5],以光镜观察和定位。超薄切片捞在镍网上晾干。用1 mol/L HCl水解1 h,双蒸水洗3次,再用新配的六亚甲四胺银溶液暗处染色1.5 h(60 ℃)。水洗后晾干,在H-300透射电镜下观察。

结　果

光镜下见疣体组织从基底层到表层,胞体渐增大染色渐加深,大致呈四个层次。基底层的细胞小,染色浅,内无包涵体;近基底层的细胞稍大,染色稍深,内有小的包涵体,为感染初期细胞;棘细胞层大部分细胞明显增大,染色较深,内有巨大的包涵体,为感染中期细胞;相当于颗粒层的胞体大浓染,为感染晚期细胞(图1)。

电镜下见感染初期细胞的胞质中有一个大小不等的与胞质相界的中等密度的银染区,内无细胞器,小银染区内未见病毒,较大的银染区内有散在细密的银染点和团块,后者的边部有初期病毒形态发生结构及初期病毒。胞质区位于银染区的周围,其中有稀疏的银沉淀或无银沉淀(图2)。在高倍镜下,银染区内的银粒大小不等,密度不均。上述细密银染点和团块是初期病毒形态发生的部位,周围有弧状、半圆和近圆形的线状银沉淀分割包围细密银染团块和不同程度的初期病毒发生的结构,其内的银染物质仍与细密银染团块相连,在形态发生结构外围是已形成的初期MCV,其内为与细密银染团块相同的病毒基质,外膜上有致密的粗粒银沉淀,与其周围的银沉淀相延续(图3)。

在感染中期细胞内有一个巨大的与胞质区界限明显的银染区。该银染区由两种区域构成,一种是中度致密的银染区,内有MCV形态发生的结构,初期MCV及中早期MCV。另一种是含成熟及中晚期MCV的区域,其背景无银沉淀。胞质区位于银染区外细胞膜下呈带状,内膜性细胞器少或无,有少量的银沉淀(图4)。中期MCV位于病毒发生区与成熟病毒区交界处两侧,形状从圆形到椭圆形不等。圆形的外膜上有银沉淀,中央或边部有致密的粗粒银沉淀即类核结构。椭圆形的外膜上有少量银沉淀,中央有典型的圆或椭圆形的(类核结构)致密银沉淀,病毒基质浓缩集中在类核结构的两侧形成侧体。在接近成熟的椭圆形的中期病毒外膜上无银沉淀,中央为病毒核心样结构呈扁椭圆形,核心样结构外有20～30 nm厚的无银沉淀的环形空晕。病毒基质进一步浓缩位于核心样结构的两侧形成典型的侧体(图5、6)。成熟病毒呈簇状位于包涵体内的成熟病毒区(图4),该期病毒的外膜上无银沉淀,病毒基质仍有中等密度的银染,侧体结构消失。病毒核心呈双面凹的扁椭圆形,有致密的银沉淀。在病毒核心外有明显的包绕核心的无银沉淀的空晕(图5、6)。

在感染晚期细胞内有一个巨大的弱银染的包涵体,外有一层残余的胞质均质物包围着。包涵体内无中度致密的银染区和病毒形态发生结构。病毒呈皱状的扁椭圆形,外膜、基质及核心外晕层均无银沉淀。病毒核心为皱缩的双面凹的扁圆形,有致密的银沉淀。

讨　论

DNA银染方法显示:在MCV感染细胞初期,先在细胞一侧胞质中合成病毒DNA物质,随着病毒DNA及其它病毒物质的不断合成,就形成一个与胞质区相界的区域,此时尚无病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1 MC疣体半薄切片。A,基底细胞层;B,近基底的棘细胞层,内有感染初期细胞;C,棘细胞层,内为感染中期细胞;D,相当于颗粒层细胞,极度致密,为感染晚期细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

图2　感染早期细胞。　胞质内DNA银染区(↑),该区主要为病毒前包涵体区(PVIB)(*),病毒前基质区(PVM)(△),初期病毒(PV)(▲)

图3　感染早期细胞包涵体内MCV形态发生结构。　PVIB(*),PVM团块(△),病毒形成(↑),PV(↑↑),中初期病毒有类核(◇),初形成的成熟病毒包涵体区(▲)

图4　感染中期细胞。　胞质区(*),病毒包涵体区(↑),PVIB(△),成熟病毒包涵体区(MVIB)(▲)

图5　感染中期细胞病毒包涵体内PV发生结构。　PVIB(△),PVM(▲),病毒形成(↑),中期病毒内有侧体及核心样结构(◇),MVIB(*)

图6　感染中期细胞包涵体内MCV发生发育结构。　PVIB(*);MVIB(▲);中期MCV有类核(↑)及侧体(◇),侧体从大到小及消失(1、2、3、4、5)

Fig 1　MC tissue semithin section. Basal cell layer(A), early phase cells infected with MCV in suprabasal cells(B), middle phase cells(C), and later phase cells(D) (LM X100)

Fig 2　The early cell infected with MCV. A silver stained area containing DNA—previrus inclusion body area (PVIB)(↑), previrus matrix area(PVM)(△), primary MCV(PMCV)(▲)(×5000)

Fig 3　MCV morphogenesis in an early cell. PVIB(*), PVM(△), PMCV(↑↑), PMCV forming(↑), nucleoid body in the intermediate phase MCV(◇), early matural VIB(△)(×20000)

Fig 4　The middle phase cell infected with MCV. Cytoplasm area(*), VIB area(↑), PVIB(△), matural VIB area (▲)(×10000)

Fig 5　MCV morphogenesis in the middle phase cell. PVIB(△), PVM(▲), lateral bodies and core-like structure in middle phase MCV(◇), PMCV forming(↑), matural VIB(*)(×30000)

Fig 6　MCV morphogenesis and development in the middle phase cell. PVIB(*), matural VIB(△), nucleoid body(↑); lateral bodies(◇) which vary from large to small and finally disappear (1.2.3.4.5)(×20000)

形成,我们称之为病毒前包涵体。在病毒前包涵体不断增大的过程中,其内出现致密的细粒链状银染点和团块,我们称之为病毒前基质。而后在病毒前基质区的周围出现由粗粒银沉淀排成的程度不同的弧形结构——病毒外膜,外膜逐渐延伸最后合拢包围一定量的病毒前基质就形成初期MCV。病毒前基质被包在初期MCV后就称为病毒基质,而此时的包涵体则称为病毒包涵体。有研究认为MCV的形态发生过程是胞质基质先在局部浓缩,出现直径为4～5 nm的嗜锇性颗粒,此后这些颗粒团聚形成"大颗粒"即初期病毒[6]。本研究证明MCV感染的细胞内的银染区——包涵体——始终是一个与胞质区相界的独立区域,即在感染初期细胞内有一个较小的中等电子密度的银染区;在感染中期细胞内有一个较大乃至巨大的银染区;感染晚期细胞中有一个巨大的弱银染区。MCV形态发生及发育的全过程均在包涵体内,而不在胞质区内,装配MCV的是包涵体区内病毒基因反复复制和合成的病毒物质,而不是胞质基质。丁明孝等[7]报道,痘苗病毒感染细胞4 h后,新合成的DNA位于靠近核的某些胞质区域,该区中有中间纤维分布,可能是痘病毒复制的场所。Bernard等[8]证实痘病毒形成的初级阶段发生在有界的远离细胞膜的电子致密区域。我们认为MCV的形态发生与痘苗病毒的形态发生有相似之处。痘病毒具有真核DNA[8],又有RNA聚合酶[1],进入胞质内的MCV基因能利用胞质中的物质复制和合成病毒物质(DNA和蛋白质),经过反复复制和合成,使病毒物质不断增多,就形成胞质中独立的包涵体区,为MCV的形态发生提供场所和装配所需的物质。

以前有的研究将MCV的发育过程描述为初、中及成熟期三个阶段[6]。本研究发现在初期MCV形成之后还要进行一系列复杂的发育过程。先从初期规则的圆形发育为规则、不规则的圆形及椭圆形的中期MCV;然后发育为规则的扁椭圆状的成熟期MCV,最后变为皱状扁

维普资讯 http://www.cqvip.com

椭圆形的退变期MCV。该病毒在发育过程中,其构成成分亦发生一系列的变化。首先外膜在初期病毒时有明显的粗粒银沉淀,中期病毒时有少量银沉淀,成熟及退变期病毒时无银沉淀。证明初期病毒的外膜上有丰富的DNA物质,提示MCV在初期发育中有非常强的代谢活动,膜内外有活跃的物质交换,这对其发育可能起重要作用。随着病毒的发育这种物质交换活动减弱,当病毒成熟后消失。关于MCV外膜的来源,Hiller[8]认为是来源于高尔基器。本研究证明:MCV发生发育均在包涵体内,其中并无高尔基器等膜性结构,而且随着包涵体的增大和病毒的形成,位于胞质区的细胞器亦开始破坏。到感染中期细胞时包涵体基本占据整个细胞,细胞核及胞质区均被挤于细胞膜下,膜性细胞器消失。但包涵体内始终都有大量MCV形态发生结构,外膜仍在大量形成。这证明MCV的外膜不是来自胞质内的高尔基器及其它膜性结构,而是包涵体内自动形成的。痘病毒有自己的RNA聚合酶[1],能合成病毒装配时所需的膜性蛋白质,在形成病毒前基质或其后也形成弧状的双层外膜结构。

病毒核心的发育过程也有一系列的形态变化。初期时没有核心,中早期时为致密的不规则的斑状,中期时为圆形无外膜的核样结构,中后期时变为扁椭圆形的病毒核心样结构,到成熟期病毒发育为双面凹椭圆形核心,最后在退变期病毒时变为皱缩状的双面凹椭园形。关于MCV核心外膜尚未见报道。本研究在常规铀铅染色的超薄切片中观察到,中后期及成熟期MCV核心外有中等密度的均质物,其蛋白质细颗粒都呈环层排列包绕核心[3],所以不能辨认出MCV核心外膜的存在。用DNA银染显示:在中后期及成熟期的核心外均有20～30 nm的空晕。由于该方法不能使膜性结构染色,因此推测MCV在发育到中后期之后有核心外膜存在,且其厚度远比单位膜厚。这可能对核心内的DNA物质起保护作用,但是否还有阻止其再感染细胞的作用尚不清楚。

病毒基质在初期病毒内为均质细粒状银沉淀,稍发育后病毒基质浓缩以致外膜下出现间隙。发育到中期时病毒基质分布在类核及核心样结构的外围,中后期时病毒基质进一步浓缩位于核心样结构的两侧形成典型的侧体,处于侧体状态的病毒基质嗜银性强。在成熟病毒内侧体又扩展为绕核心分布的病毒基质。随着病毒成熟和退变病毒基质的银染性逐渐减弱到最后消失,证明侧体是富含DNA物质的病毒基质,是中期MCV向成熟期发育过程中出现的一种暂时结构,是病毒基质在病毒发育过程中的一个阶段。

参 考 文 献

1 Bernard NF, David MK. Poxvirndae and their replication. In: Fundamental Virology. Second edit. New York; Raven Press, 1991. 953

2 李德忠,肖同浩,吴宁等.传染性软疣病毒(MCV)的电镜观察.中国病毒学,1994,9(1):67

3 李德忠,肖同浩,吴宁等.传染性软疣病毒形态发生和发育过程的电镜观察.电子显微学报,1994,13(1):7

4 林钧安,高锦梁,洪健主编.实用生物电子显微术.辽宁:辽宁科学技术出版社,1989.192

5 郑若玄主编.实用细胞学技术.北京:科学出版社,1980,238

6 洪涛,庞其方,周静仪.人类病毒性肿瘤——传染性软疣的电子显微镜研究.微生物学报,1963,9(3):210

7 丁明孝,于文斗,于勤等.痘苗病毒复制与中间纤维的关系.电子显微学报,1992,11(5):237

8 Hiller G Weberk. Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypentide are used for vaccina virus envelopment. J Virol, 1985, 55:651

维普资讯 http://www.cqvip.com

Study on Morphogenesis and Development Process of MCV by Silver-DNA Staining and Electron Microscopy

Li Dezhong Wu Ning Xiao Tonghao

(*Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Region, Wuhan* 430070)

After using the methenamine silver-DNA staining, 15 cases of early molluscum contagiosum tissues were examined by electron microscopy. The results showed that there was a silver-stained DNA area (inclusion body, IB) in every cell infected with MCV. The morphogenesis and development of MCV took place in the IB, not in the cytoplasm area. The process of MCV morphogenesis was firstly to synthesize virus materials (DNA) which secondly accumulated into a filament-granular-like area(previrus inclusion body, PIB), and next to form some dense thin-granular-chain-like sturctures(previrus matrix, PM) in PIB, and then the bilayer membranes which cut and surround PM to form primary MCV. The development process was from primary to intermediate, then to matural and finally to degenerate MCV. And in the process the outer membrane, matrix, nucleus and the nuclear outermembrane of MCV had many changes. The lateral bodies were the temporal structures and the viroplasm containing DNA in the intermediate MCV. The results suggested that the MCV gene may spontaneously synthesize virus DNA, form previrus matrix and virus outermembranes and assemble primary MCV in the IB.

Key words Molluscum contagiosum virus, DNA, Silver staining, Electron microscopy