维普资讯 http://www.cqvip.com

343—347 6863(9)

第11卷第4期 中 国 病 毒 学 Vol.11 No.4
1996年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1996

风疹病毒分离株在 BHK_{21} 细胞中的形态与形态发生

王志玉 宋艳艳 姚 苹 王桂亭 许洪芝
(山东医科大学病毒学研究室,济南 250012)
王 芃
(山东省医学科学院,济南 250062)

R373.11

A

提 要 利用超薄切片电子显微镜技术对本室分离的风疹病病毒(RV)JR_{23}株在 BHK_{21} 细胞中的形态及形态发生过程进行了研究,同时与RV标准野毒株 Gos－10 作了比较。结果表明,RV JR_{23} 株感染 BHK_{21} 细胞后 6 h 开始于细胞浆内观察到病毒颗粒,96 h 达到高峰。病毒颗粒呈圆形,有双层脂质包膜包绕,直径 45～75 nm,核衣壳 25～35 nm。细胞浆内见到大量病毒相关颗粒,直径 20～30 nm。病毒包膜来自于细胞浆中的空泡膜或细胞膜。被RV感染的细胞浆中还观察到"繁殖复合体",由膜性结构包绕着许多类似病毒颗粒的囊泡构成。两株RV在形态与形态发生方面未发现差异。

关键词 风疹病毒,形态学,形态发生,电子显微镜检查 BHK21细胞

风疹病毒(Rubella Virus, RV)是披膜病毒科风疹病毒属中的唯一成员,但不同株间在生物学特性、结构蛋白的氨基酸顺序等方面存在着一定差异[1~3]。

RV JR_{23}株是从济南地区风疹病人中分离出的野毒株之一[4],它具有与标准野毒株 Gos－10 不同的特点,被认为是强毒株之一。

我们虽曾对 JR_{23}和 Gos－10 进行过一系列比较研究,但许多方面尚未明了。本研究对两株病毒在 BHK_{21} 细胞中的形态发生过程进行了较细致的观察研究,以便对 JR_{23}株有更全面的了解,更好地控制RV在本地区的流行。

迄今为止,国内有关RV的形态学与形态发生学未见报道。国外虽有人涉及此领域,但未见有人利用 BHK_{21} 细胞在这方面进行详细的研究,而我们对本地分离的 RV JR_{23}株进行此领域的研究更具有特殊意义。

材料与方法

1 **细胞** BHK_{21} 细胞引自北京生物制品研究所,按本室常规培养传代[1]。

2 **病毒** RV JR_{23}株由本室分离[4],RV Gos－10 株由浙江医科大学传染病研究所提供,滴度分别为 10^6 TCID/mL 和 $10^{6.25}$ $TCID_{50}$/mL,均在 BHK_{21} 细胞上传代。

3 **标本收集** 取滴度为 10^6 $TCID_{50}$/mL 的RV悬液 0.5 mL,接种于生长旺盛的 BHK_{21} 细胞,加足维持液于

本文于1996年4月8日收到,6月7日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

37 ℃培养，分别于感染后6、12、24、48、72、96、144、168 h取出，弃维持液，用PBS洗涤后，将细胞刮于离心管中，1500 r/min离心5～10 min，弃上清，加入适量2.5%的戊二醛固定，4 ℃保存备用。

4 **电镜样品制备及观察** 各时间收集的标本用PBS洗涤后用锇酸固定，逐级乙醇脱水，用Epon812树脂包埋，超薄切片，切片厚度为500 Å。常规染色，于JEM－1200EX电镜下观察，拍照记录与分析。

结 果

1 RV JR_{23}株和RV Gos－10株的形态观察

两株RV在电镜下形态相似，呈圆形或椭圆形，核衣壳电子致密度较高，直径25～35 nm，外面由双层脂膜包绕，膜表面隐约可见突起。有包膜的病毒颗粒直径45～75 nm(图1)。有时可见膜不完整病毒(图1)和大量核心样电子致密颗粒，直径20～30 nm，呈无规则排列(图2)，称作核心相关颗粒。

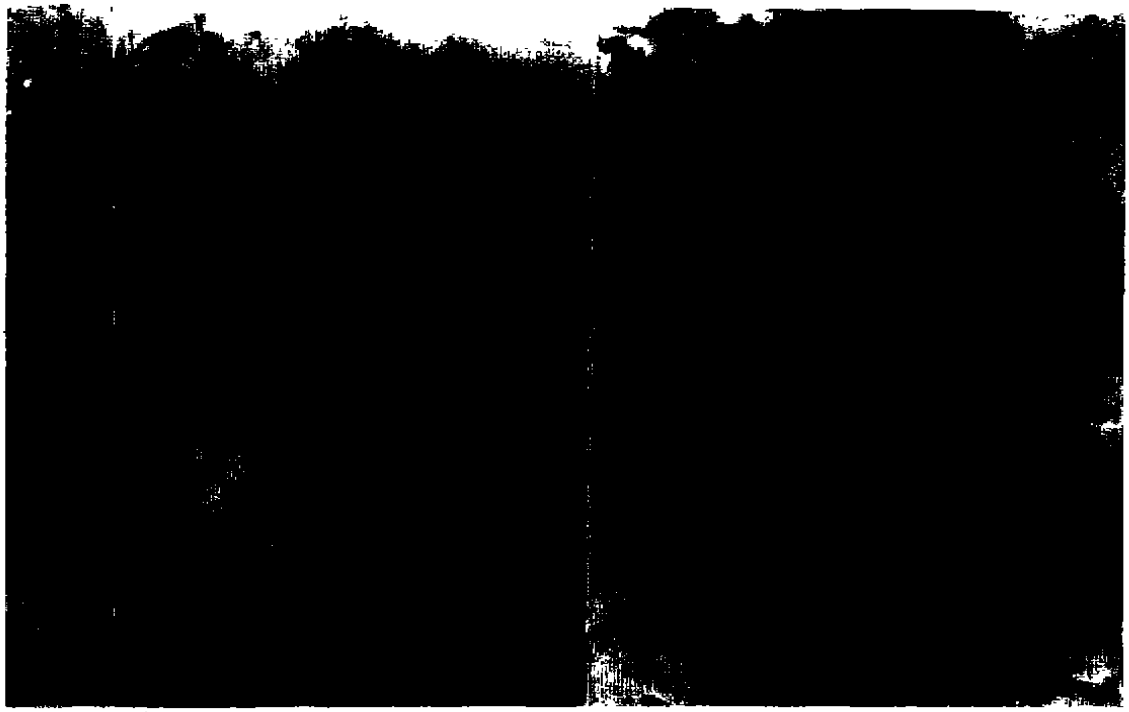

图1 RV JR_{23}株感染BHK_{21}细胞96 h。细胞浆内可见大量病毒颗粒。A.完整病毒；B核衣壳样结构；C.破碎病毒；D.双层膜结构。横杠100 nm。

Fig 1 BHK_{21} cell culture was infected with rubella virus (RV) JR_{23} strain for 96 hours. A number of virions were observed in the cytoplasm. A. Intact virion; B. Capsid－like structure; C. Broken virion; D. Doublelayered membrane structure.
Bar: 100 nm

图2 BHK_{21}细胞感染RV JR_{23}株96 h。细胞浆内可见大量电子致密颗粒(A)和散在病毒颗粒(B)。横杠200 nm。

Fig 2 BHK_{21} cell culture was infected with RV JR_{23} for 96 hours. A large number of electron－dense particles (A) and a few virions (B) were observed in the cytoplasm.
Bar: 200 nm

维普资讯 http://www.cqvip.com

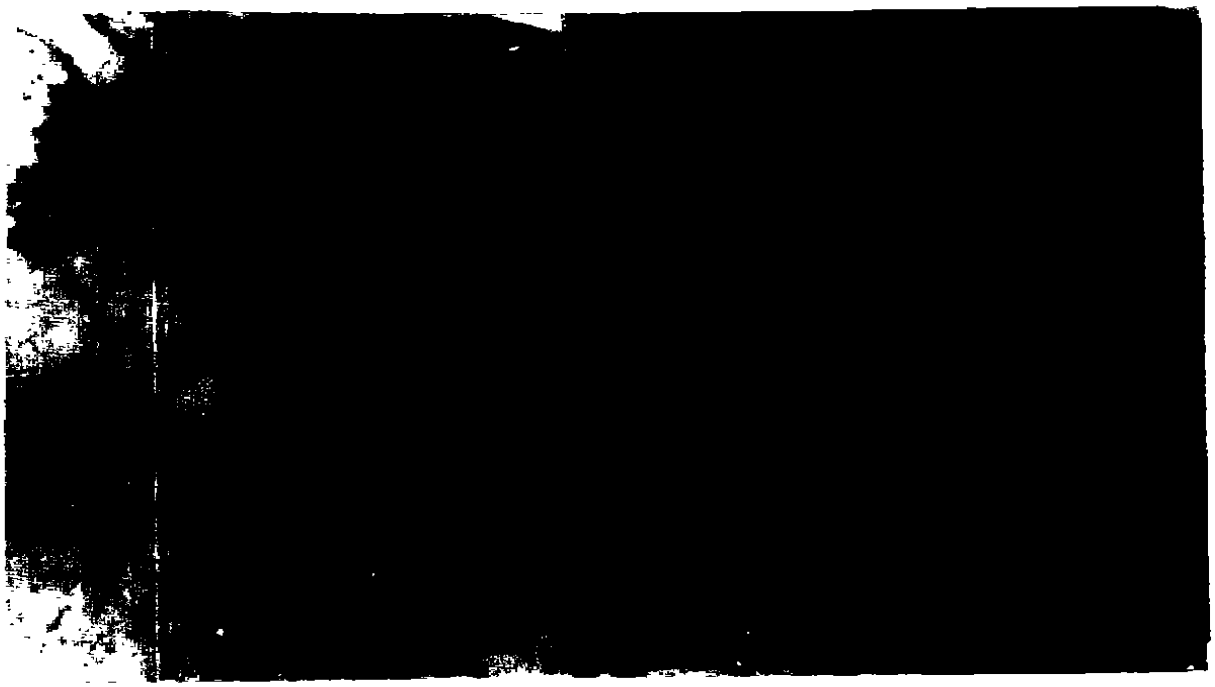

图 3　BHK_{21} 细胞感染 RV JR_{23} 株 96 h。可见细胞外病毒和正在芽生的病毒(箭头)。横杠 200 nm。

Fig 3　BHK21 cell culture was infected with RV JR23 strain for 96 hours. Virions out of cells were budding from cell membrane (arrow).
Bar: 100 nm

图 4　BHK_{21} 细胞感染 RV JR_{23} 株 72 h。细胞浆内可见由膜性结构(长箭头)包绕许多囊泡(短箭头)构成的"繁殖复合体"。横杠 200 nm。

Fig 4　BHK21 cell culture was infected with RV JR23 strain for 72 hours. "Replication complexex" composed of vacuoles (short arrows) enveloped by membrane (long arrows) could be seen in the cytoplasm.
Bar: 200 nm

2　RV JR_{23} 株和 RV Gos－10 株的形态发生过程

RV 感染 BHK_{21} 细胞 6 h 后,细胞浆内开始出现病毒颗粒,24 h 开始增多,72 h 时几乎每个细胞内均可观察到病毒颗粒,96 h 时达到高峰,细胞内外均可见到大量完整的病毒颗粒(图 1,3,6)。病毒包膜来自空泡膜或细胞膜,通过芽生方式获得(图 3,6)。因此,细胞浆的空泡内往往聚集大量病毒(图 1),细胞外的病毒也有一定的聚集性(图 3,6),提示病毒通过一定途径释放于细胞外。

在 RV 感染的细胞浆中还观察到"繁殖复合体",由膜性结构包绕着许多类似病毒颗粒的囊泡构成(图 4,5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图5 BHK_{21}细胞感染RV Gos－10株48 h。细胞浆内可见"繁殖复合体"(箭头)。横杠:200 nm。

Fig 5 BHK21 cell culture was infected with RV Gos－10 strain for 48 hours. "Replication comolex" (arrow) could be seen in the cytoplasm. Bar:200 nm

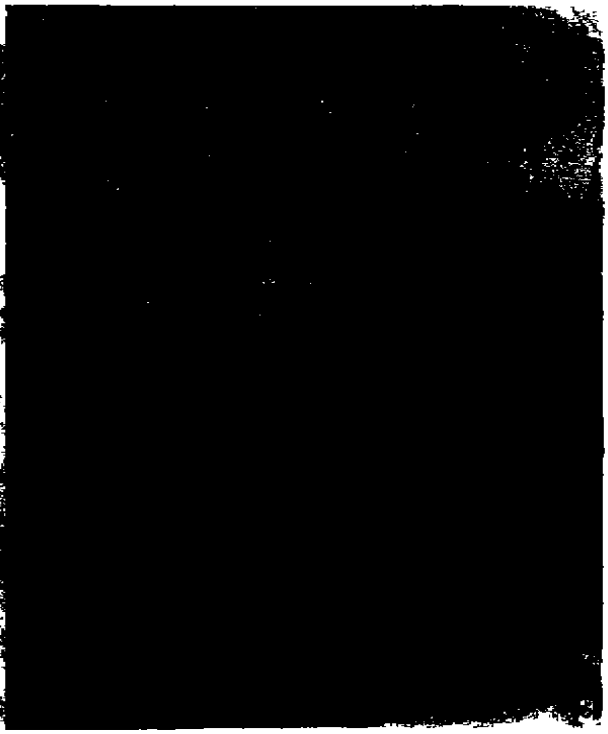

图6 BHK_{21}细胞感染RV Gos－10株96 h。细胞膜表面和细胞外可见到许多完整病毒颗粒,并可见正在芽生之病毒(箭头)。横杠:200 nm。

Fig 6 BHK21 cell culture was infected with RV Gos－10 strain for 96 hours. Many virions could be seen on the cell surface and out of cells, one of which was budding from cell membrane (arrow). Bar:200 nm.

讨 论

BHK_{21}细胞是RV的敏感细胞之一,RV可增殖到很高滴度。JR_{23}株和Gos－10株均能引起细胞产生病变,但前者致病能力更强,病变出现早,且能致细胞融合[1]。JR_{23}株在BHK_{21}细胞中的形态发生过程一无所知。

本研究表明,JR_{23}株有与Gos－10株相同的形态及形态发生过程,其核衣壳只有一种类型。病毒颗粒的数量随感染时间的延长逐渐增多,于96 h达到高峰。这一结果与生长曲线基本一致[6],但此时细胞病变(CPE)却不十分明显,而是120 h才出现明显的CPE。

Lee等于RV Putnam株感染的Vero细胞中发现了大量的"繁殖复合体",且出现于病毒感染的早期。BHK_{21}与Vero属于产生高滴度RV的两种细胞系。RV JR_{23}和Gos－10感染BHK_{21}细胞后也出现所谓的"繁殖复合体",但其形成过程及其意义有待进一步研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

RV的包膜来源于细胞浆中的空泡膜或细胞膜,提示不同病毒颗粒的包膜来源不同,其化学成分的种类、含量、比例可能存在一定的差异。而其中病毒基因编码的糖蛋白 E_1 和 E_2 含量是否也存在着差异,尚需进一步研究。

参 考 文 献

1 王志玉,韩世杰.风疹病毒济南地方株的生物学特性.山东医科大学学报,1987,25(4):50

2 韩世杰,王志玉.不同风疹病毒株结构多肽的 SDS-PAGE.山东医科大学学报,1986,24(3):6

3 王志玉,韩世杰.不同风疹病毒株的结构多肽肽图分析.山东医科大学学报,1986,24(3):11

4 韩世杰,王桂亭,周何安等.风疹病毒的分离.山东医科大学学报,1985,23(2):22

5 Lee J Y, Marshall J A, Bowden D S. Replication complexes associated with the morphogenesis of rubllla virus. Arch Virol, 1992, 122:95

6 牛锐光,韩世杰.风疹病毒在 RK13、BHK21、Vero 传代细胞上致病变作用及繁殖特点的比较研究.山东医学院学报,1982,3:12

Morphology and Morphogenesis of the Isolated Strain of Rubella Virus in BHK21 Cell

Wang Zhiyu Song Yanyan Wang Guiting Yao Ping Xu Hongzhi

(*Dept. of Virology, Shandong Medical University, Jinan* 250012)

Ultrathin secction electron microscopy was used to investigate the morphology and morphogenesis of rubella virus (RV) JR23 and Gos-10 strains in BHK21 cells and its effects on cellular ultrastructures. The results showed that virions were observed in the cytoplasm at 6 h postinfection and a large number of enveloped virions were seen at 96 h postinfection. The virion was spherical, 45 to 75 nm in diameter, with a 25~35 nm electron-dense core covered by a double-layered loose envelope. A numbers of roughly spherical electron-dense particles, 20~30 nm in diameter, could be seen in the cytoplasm. The virus was enveloped by budding through cytoplasmic or vacuole membrane. There was no difference between the two strains in the morphology and morphogenesis.

Key words Rubella virus, Morphology, Morphogenesis, Electron microscopy