

## 蓝舌病毒 HbC 株与不同种系细胞相互作用及群特异性抗原特征\*

唐省三,董长垣\*\*,郭淑芳,陈晓,陈冬娥,桂亦瑞,芦莉莉,罗翔

(武汉大学医学院病毒研究所肿瘤病毒研究室,湖北武汉,430071)

### Effect of Interaction Between BTV-Hbc and Different Species Cell and Characteristics of Group Specific Antigen

TANG Xing-san, DONG Chang-yuan\*\*, GUO Shu-fang, CHEN Xiao,  
CHEN Dong-e, GUI Yi-rui, LU Li-li, LUO Xiang

(Institute of Virology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** *Bluetongue virus* (BTV) HbC strain and BTV-10 (the international standard strain) were respectively inoculated onto the different species monolayer cells such as Vero cell (monkey renal cell), C<sub>6</sub> cell (mouse neuroglioma cell) and Hela cell (human cervical cancer cell). We studied comparatively the replicated characteristics of BTV-HbC in different species cells, with BTV-10 in the same cells, morphologic characteristics under microscopy and electron microscopy after interaction between BTV-HbC and different cells, the serologic relation between BTV-HbC and BTV-10. It is further proved that the BTV-HbC strain is probably a new type of *Bluetongue virus* when connecting our previous research about BTV-HbC genome map and RT-PCR analyses of BTV-HbC S<sub>7</sub> gene coding group specific antigen.

**Key words:** *Bluetongue virus*; Interaction between virus and cell; Serologic Characteristic of BTV-HbC

**摘要:** BTV-HbC 株和蓝舌病毒标准株 BTV-10 分别接种在不同种系细胞如猴肾传代细胞(Vero)、人宫颈癌细胞(Hela)和小鼠神经胶质瘤细胞(C<sub>6</sub>)等细胞株上,比较研究了 BTV-HbC 在不同种系细胞上的增殖特征,BTV-HbC 与 BTV-10 在相同细胞上的复制增殖特征,病毒与细胞相互作用的显微和超微结构特征。用免疫交叉反应研究了 BTV-HbC 株与 BTV-10 型标准株之间的血清学关系。本研究结合本室对 BTV-HbC 株基因组图谱分析和蓝舌病毒群特异性抗原编码基因 S<sub>7</sub> 的 RT-PCR 分析,进一步证实了 BTV-HbC 株可能是一个新的血清型蓝舌病毒。

**关键词:** 蓝舌病毒;病毒与细胞相互作用;BTV-HbC 株血清学特征

中图分类号:Q939.44 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)04-0362-05

蓝舌病毒(*Bluetongue virus*, BTV)<sup>[1]</sup>为呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)环状病毒属(*Genus Orbivirus*)的代表种,有 25 个血清型,引起动物蓝舌病(*Bluetongue disease*),主要侵害羊及野生反刍动物,牛是其储存宿主,但是不引起人类疾病。动物蓝舌病由库蠓传播,在世界范围内广泛流行,严重威胁畜牧业

生产和资源保护,为国际动物病毒学家和环境病毒学家的研究热点,各国海关检疫的重点<sup>[2]</sup>。由于该病毒特殊的基因组结构、复杂的血清型,所以,也是研究病毒结构与功能、遗传与变异、病毒与细胞相互作用后果的极好材料。

蓝舌病毒湖北株(BTV-HbC 株)是我室于 1987

收稿日期:2002-06-07,修回日期:2002-07-10

\* 基金项目:国家自然科学基金(3927003)。

作者简介:唐省三(1963-),男,湖北省籍,副教授,主要从事肿瘤病毒学研究,现工作单位湖北省孝感学院生物系。

\*\* 通讯作者:董长垣(1949-),男,湖北省籍,教授,主要从事分子病毒学和分子癌学研究。

Correspondence author. E-mail: dongcy@public.wh.hb.cn

年从湖北襄樊分离得到, 并对其生物学和分子生物学特征进行了较系统的研究, 根据基因图谱分析, 推测可能是一个新的基因型<sup>[3]</sup>。本研究将进一步以 BTV-10 国际标准株为对照, 比较研究 BTV-HbC 株在不同种系单层细胞上的生物学特征和被感染细胞超微结构变化特征, 并与 BTV-10 型进行血清学免疫交叉反应, 进一步对 BTV-HbC 株进行血清学鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和细胞

蓝舌病毒 HbC 株为我室从我国湖北省分离得到, 并已适应在 Vero 细胞上。蓝舌病毒 10 型标准株(BTV-10)、Vero 细胞和 HeLa 细胞均为本室保藏, C<sub>6</sub> 细胞购自武汉大学典型培养物保存中心。

### 1.2 BTV-HbC 感染细胞及其增殖特征分析

补充 10% 小牛血清的 MEM 培养基用于制备三株细胞单层培养<sup>[4]</sup>。传代的 Vero 细胞、C<sub>6</sub> 细胞和 HeLa 细胞经培养并汇生成单层后, 按 1MOI 分别接种 BTV-HbC 株和 BTV-10 标准株, 用以活化和增殖病毒, 动态比较研究两株蓝舌病毒的 CPE 特征和制备病毒抗原。

### 1.3 被感染细胞超薄切片和电镜观察

接种病毒的单层细胞, 当 CPE 达 80% 时, 弃去维持液, 用自制橡皮垫刮取细胞, 收集于 5mL 的 EP 管中, 加入 2.5% 戊二醛溶液固定, 3 000r/min 离心 10min 成小丸。送电镜室超薄切片、染色, 透射电镜观察细胞内病毒颗粒和细胞超微结构变化。

### 1.4 病毒提纯

按本室常规蓝舌病毒分离纯化方法<sup>[3,5]</sup>提纯 BTV-HbC 和 BTV-10 颗粒, 备作抗原。

### 1.5 病毒免疫分析

1.5.1 抗 BTV-HbC, 抗 BTV-10 和抗 Vero 血清的制备 用 HeLa 细胞分别增殖 BTV-HbC 和 BTV-10 病毒, 并按本室常规方法制备 BTV-HbC 和 BTV-10 病毒免疫原<sup>[5]</sup>。

用 Vero 细胞分别增殖 BTV-HbC 和 BTV-10 病毒, 并按本室常规方法制备 BTV-HbC 和 BTV-10 病毒抗原<sup>[5]</sup>。

BTV-HbC 和 BTV-10 病毒免疫原和 HeLa 细胞裂解物免疫原按常规方法分别免疫兔子, 制备免疫抗 BTV-HbC、BTV-10 和 HeLa 细胞裂解物抗血清。

1.5.2 交叉免疫试验 琼脂糖双向扩散法测定 BTV-HbC 与标准株 BTV-10 的血清学关系。2 个琼脂糖双扩散反应加样分别为: ① 中间孔为 BTV-HbC 抗血清, 周围孔 1、4 为未感染病毒的 Vero 细胞抗原, 孔 2、5 为 BTV-HbC 抗原, 孔 3、6 为 BTV-10 抗原(见图 5-A); ② 中间孔为 BTV-HbC 抗原, 周围孔 1、4 为 HeLa 细胞免疫血清, 孔 2、5 为 BTV-HbC 抗血清, 孔 3、6 为 BTV-10 抗血清(见图 5-B)。

## 2 结果

### 2.1 BTV-HbC 株在不同种系细胞上的 CPE 特征

与 BTV-10 标准株一样, BTV-HbC 株亦能良好地在 Vero 细胞上复制增殖, 并于感染后 32 h CPE 达 95%。HeLa 细胞是人宫颈癌细胞株, 感染 BTV-10 32 h 后, CPE 可达 90%, 稍次于 Vero 细胞; 相形之下, BTV-HbC 株则 CPE 达 100%, 比 Vero 细胞更敏感。C<sub>6</sub> 细胞是这三株细胞中敏感性最差的细胞, 虽然敏感, 但感染病毒 32h 后, 其 CPE 均未超过 50%。

三株种系不同的细胞感染 BTV-10 型后出现不同程度的 CPE。Vero 细胞和 HeLa 细胞表现为细胞收缩变圆, 间隔变大, 细胞折光性增强, 轮廓增强, 胞内出现粗颗粒, 然后细胞逐渐脱落、飘浮, 直致死亡(图 1-A, B)。但是, 鼠神经胶质瘤 C<sub>6</sub> 细胞感染这两株病毒后, 出现的 CPE 形态特征则与 Vero 细胞和 HeLa 细胞明显不同, 表现为细胞收缩, 互相粘连成串, 或如葡萄状, 或如雪松状, 终致病变细胞成片脱落, 死亡(图 1-C)。

### 2.2 BTV-HbC 株在三株不同种系细胞上的一步生长曲线

按 0.5MOI 分别接种 BTV-HbC 株于三株细胞单层, 空斑分析感染病毒后 20h、28h、36h、48h、52h 后不同种系细胞的产毒量(即一步生长曲线), 结果见图 2。

图 2 示三株不同的细胞单层感染 BTV-HbC 株后的一步生长曲线。经空斑分析, 动态观察三株不同种系细胞感染 BTV-HbC 后的产毒量揭示出: HeLa 细胞和 Vero 细胞均于 36h 达最高产毒量, C<sub>6</sub> 细胞于 40h 达最高产毒量。其中 HeLa 细胞产毒量最高, 可达 10<sup>5</sup> pfu/mL; Vero 细胞次之, 为 10<sup>3</sup> pfu/mL; C<sub>6</sub> 细胞最差, 仅为 10<sup>1.5</sup> pfu/mL(图 2)。

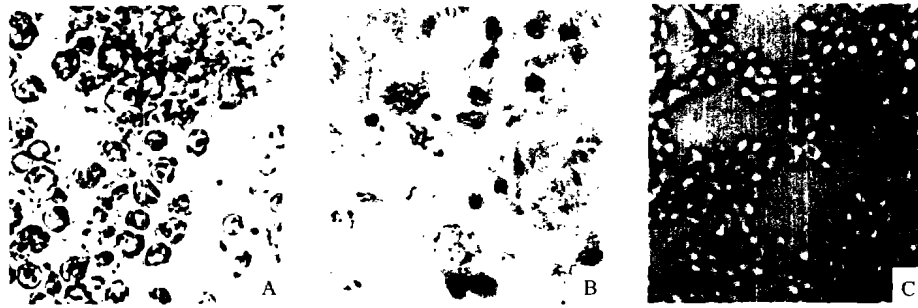


图1 BTV-HbC株在不同种系细胞上的CPE特征(×400)

A, 接种 BTV-HbC 株 32h 后的 Vero 细胞, CPE 达 95%; B, 接种 BTV-HbC 株 32h 后的 HeLa 细胞, CPE 近 100%; C, 接种 BTV-HbC 株 32h 后的 C<sub>6</sub> 细胞, CPE 近 40%。

Fig. 1 The CPE characteristics of BTV-HbC strain in the different species cells(×400)

A, CPE of Vero cell is 95% after BTV-HbC strain being inoculated onto monolayer Vero cell for 32 hours; B, CPE of HeLa cell is approximately 100% after BTV-HbC strain being inoculated onto monolayer HeLa cell for 32 hours; C, CPE of C<sub>6</sub> cell is approximately 40% after BTV-HbC strain being inoculated onto monolayer C<sub>6</sub> cell for 32 hours.

### 2.3 BTV-HbC 株感染三株不同种系细胞的电镜观察结果

取感染病毒 32h 的培养细胞作超薄切片、透射电镜观察, 可见到分别感染了 BTV-HbC 株和 BTV-10 型的三种不同种系的细胞的胞浆内均富含不同发育阶段的病毒颗粒, 完整病毒粒子直径约 70nm, 并形成包涵体; 成熟病毒粒子排列成晶格状。除此以外, 尚可见到大量的病毒空衣壳和未包装的病毒核物质(图 3A)。

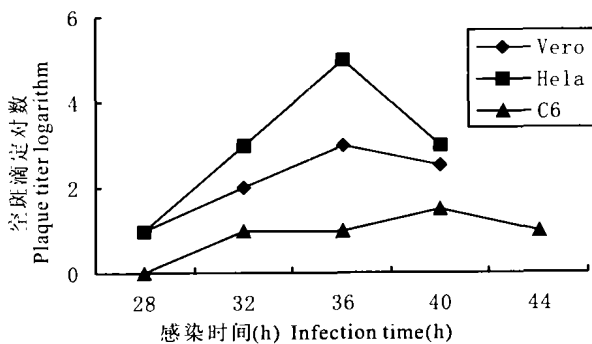


图2 BTV-HbC株在三株不同种系细胞上产毒量半对数线图

Fig.2 The semi-logarithm line chart of virus production of BTV-HbC strain in the different species cells

三株种系不同细胞分别感染 BTV-HbC 株和 BTV-10 后, 可以引起明显的细胞超微结构变化, 诸如, 胞浆内包涵体、线粒体肿胀、细胞膜溶解; 亦见到核膜结构完整但核染色质浓缩、成块、边聚、滑面内质网扩张的细胞(图 3B)。

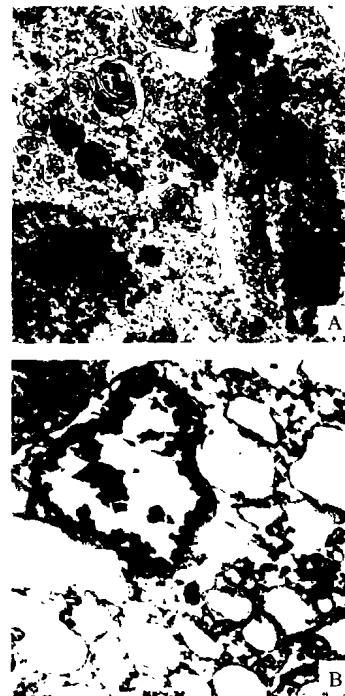


图3 接种 BTV-HbC 株 32h 的 Vero 细胞 (A, ×25 000) 和 C<sub>6</sub> 细胞 (B, ×10 000)

Fig.3 BTV-HbC strain being inoculated onto monolayer Vero cell (A, ×25 000) and C<sub>6</sub> Cell (B, ×10 000)

A: There are a lot of virus particles. Diameter of mature virus particles is about 70nm. It were arranged into crystal lattice. There are a lot of nucleus substance and particles of virus which locate the circumference of crystal lattice. Furthermore, there is capsid of virus which has no nucleus substance. B: Nucleus substance is condensed into mass which assemble under nucleus membrane. A lot of smooth endoplasmic reticulum expand into balloon-shaped in appearance. Other organelle is condensed. Rough endoplasmic reticulum is normal.

## 2.4 BTV-HbC 株和 BTV-10 国际标准株之间的免疫交叉反应

以 BTV-HbC 株特异性抗血清分别与 Vero 细胞抗原、BTV-HbC 抗原和 BTV-10 抗原作免疫交叉反应,免抗 BTV-HbC 血清与 BTV-HbC 株和 BTV-10 病毒之间均发生特异性免疫反应,可见明显的共同抗原沉淀带,与 Vero 细胞抗原之间免疫交叉反应阴性(图 4-A);以 BTV-HbC 抗原分别与 Hela 细胞免疫血清、BTV-HbC 抗血清和 BTV-10 抗血清作免疫交叉反应,BTV-HbC 抗原与免抗 BTV-HbC 血清和免抗 BTV-10 血清之间均发生特异性免疫反应,可见明显的共同抗原沉淀带,与 Hela 细胞免疫血清之间免疫交叉反应阴性(图 4-B)。

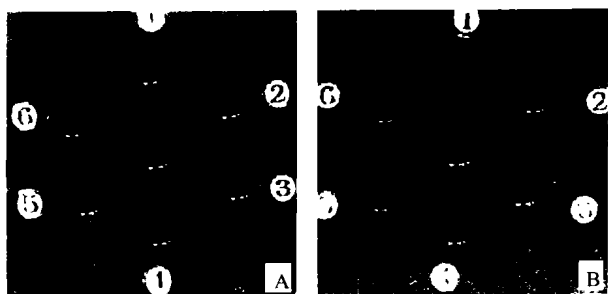


图 4 BTV-HbC 株和 BTV-10 间免疫交叉琼脂糖扩散试验

A, 中间孔为 BTV-HbC 抗血清, 1、4 孔, 未感染病毒的 Vero 细胞抗原; 2、5 孔为 BTV-HbC 抗原; 3、6 孔为 BTV-10 抗原; B, 中间孔为 BTV-HbC 抗原, 1、4 孔为 Hela 细胞免疫血清; 2、5 孔为 BTV-HbC 抗血清; 3、6 孔为 BTV-10 抗血清。

Fig. 4 Argarose diffusion test about immune across reaction between BTV-HbC and BTV-10

A, Center hole is antiserum of BTV-HbC. Surrounding hole 1, 4 are Vero cell antigen. Surrounding hole 2, 5 are BTV-HbC antigen. Surrounding hole 3, 6 are BTV-10 antigen; B, Center hole is BTV-HbC antigen. Surrounding hole 1, 4 is antiserum of Hela cell. Surrounding hole 2, 5 is antiserum of BTV-HbC. Surrounding hole 3, 6 is antiserum of BTV-10.

## 3 讨论

蓝舌病毒含双链 RNA(dsRNA)基因组。全套遗传信息由 10 分子基因片段所组成。蓝舌病毒 dsRNA 的电泳图谱将这 10 分子核酸片段分成长(L)、中(M)、短(S)三个组。L<sub>2</sub> 和 M<sub>5</sub> 是型特异性抗原编码基因, L<sub>3</sub> 和 S<sub>7</sub> 是群特异性抗原编码基因。BTV 与环状病毒群其它成员之间没有共同抗原性。蓝舌病毒内层衣壳主要结构多肽 VP7 是穿行于内外两层衣壳的结构多肽, 可能起内外两层衣壳的固

定作用, 并且携带有群特异性抗原决定簇<sup>[1,6,7]</sup>; 外衣壳主要结构多肽 VP2 含有型特异性抗原决定簇, 诱导机体产生中和抗体<sup>[8-11]</sup>。

### 3.1 BTV-HbC 株与不同种系细胞上相互作用后果

BTV-HbC 株在不同种系细胞, 如: 猴肾传代 Vero 细胞、小鼠神经胶质瘤 C<sub>6</sub> 细胞和人宫颈癌 Hela 细胞上增殖, 在相同条件下, 出现的 CPE 较国际标准株 BTV-10 高, 但细胞病变形态学基本相同。在透射电镜下, 所见到的 BTV-HbC 株和 BTV-10 国际标准株的病毒粒子形态、大小、结构一致(图 3A)。

三株不同种系细胞感染 BTV-HbC 株后细胞均出现与 BTV-10 感染后相同的超微结构变化, 可见到凋亡图象(图 3B)。这种凋亡图象似乎在 BTV-HbC 感染的 C<sub>6</sub> 细胞中更为明显。从而提示: BTV-HbC 株可能诱导被感染细胞凋亡, 并且该病毒诱导细胞凋亡依不同的细胞而具不同的程度。

### 3.2 BTV-HbC 株的免疫学特征

我们采取了两个措施避免病毒培养细胞引起的假阳性。其一, 制备病毒抗原采用了不同的培养细胞。制备抗血清的免疫原采用 Hela 细胞增殖病毒, 免疫交叉反应抗原用 Hela 细胞增殖病毒。其二, 设置了未感染病毒的 Vero 细胞提取物作对照抗原。

该实验揭示出了这两株病毒完全重合的沉淀带, 证明 BTV-HbC 株与蓝舌病毒标准株 BTV-10 编码有共同的抗原(图 4)。我们认为这种共同抗原应该是两个群特异性抗原, 而非型特异性抗原。并且这一试验没有揭示出型特异性抗原。假设这一抗原抗体反应揭示出了型特异性抗原的话, 那就应该是多条免疫沉淀带图像, 因为揭示型特异性抗原的同时, 必然也会揭示出群特异性抗原, 而蓝舌病毒除含有群特异性抗原外, 还含有两个型特异性主要抗原分子。当然, 有关此点, 有待我们利用单克隆抗体技术进一步深入研究。

### 3.3 BTV-HbC 株在不同种系细胞上的增殖表现出与标准株 BTV-10 不同细胞的生物学特征

本文在三株种系不同的细胞上对照研究了 BTV-HbC 株与标准株 BTV-10 感染不同细胞的生物学特征。

BTV-HbC 株可以在猴肾传代 Vero 细胞、小鼠神经胶质瘤 C<sub>6</sub> 细胞和人宫颈癌 Hela 细胞上增殖, 与蓝舌病毒标准株比较, 对于相同的被感染细胞, 其出现的 CPE 的时间较 BTV-10 型早; 敏感性较

BTV-10 型高;产毒量似乎也比后者大。

按 1MOI 接种单层细胞,动态观察发现:每株细胞产 BTV-HbC 量及其产毒峰值时间不一样,依次为:Hela 细胞>Vero 细胞>C<sub>6</sub> 细胞(图 2)。这些研究结果明显地提示了 BTV-HbC 株病毒与蓝舌病毒标准株 BTV-10 有明显不同的生物学特征,似乎比 BTV-10 对这些细胞具有更高的增殖感染性和选择性。

本研究结合本研究室对 BTV-HbC 基因组图谱分析<sup>[3]</sup>和型特异性抗原编码基因 S<sub>7</sub> 的 RT-PCR 分析<sup>[12]</sup>等结果,提示 BTV-HbC 株可能是一个新的血清型蓝舌病毒。

### 参考文献

- [ 1 ] 董长垣. 现代分子病毒学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1996, 183 - 188.
- [ 2 ] 于大海, 崔砚林. 中国进出境动物检疫规范[M], 北京: 中国农业出版社, 1997, 304 - 310.
- [ 3 ] 董长垣, 陈 晓, 严银纺, 等. 蓝舌病毒 HbC 株体外增殖和基因组特征[J]. 湖北医科大学学报, 1999, 20(1): 7 - 9, 120.
- [ 4 ] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1996, 78 - 98.
- [ 5 ] 陈 晓, 严银芳, 董长垣, 等. 蓝舌病毒 HbC 株的增殖和血清学特点. [J]. 湖北医科大学学报, 1999, 20(3): 179 - 180.
- [ 6 ] Mertens P P C, Browns F, Sangar D V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins they encode [J]. Virology, 1984, 135: 207 - 217.
- [ 7 ] Grubman M J, Appleton J A, Letchworth G J. Identification of bluetongue virus type 17 genome segments coding for polypeptides associated with virus neutralization and intergroup reactivity [J]. Virology, 1983, 131: 355 - 366.
- [ 8 ] Roy P. Orbivirus structure and assembly[J]. Virology, 1999, 216: 1 - 11.
- [ 9 ] Kahlon J, Sugiyama K, Roy P. Molecular basis of bluetongue virus neutralization [J]. J Virol. 1983, 48: 627 - 632.
- [ 10 ] Cowley J A, Gorman B M. Genetic reassortants for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin [J]. J Virol, 1987, 61: 2304 - 2306.
- [ 11 ] Hewat E A, Booth T F, Roy P. Structure of bluetongue virus particles by cryo - electron microscopy [J]. J Struct Biol, 1992, 109: 61 - 69.
- [ 12 ] 张凡玮, 董长垣, 涂 攀, 等. RT - PCR 检测蓝舌病毒技术的建立[J]. 中国病毒学, 2001, 16: 393 - 396.