

SARS 病毒的形态结构及其在体外培养细胞中的感染装配*

张珈敏, 郑从义, 胡远扬**

(武汉大学生命科学院, 湖北武汉, 430072)

Morphology and Its Morphogenesis of the SARS-CoV Hb Strain *in vitro*

ZHANG Jia-min, ZHENG Cong-yi, HU Yuan-yang**

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Morphological characterization of purified SARS-associated virus(SARS-CoV) from Hubei patient was carried out by negative stain and ultrathin section electronmicroscopy. The spike of isolated SARS-CoV virus is shorter and smaller than *Human coronavirus*. A large quantity of SARS-CoV particles could be observed in the infected Vero cells. The process of infection, assembly and morphogenesis was observed.

Key Words: SARS-associated virus (SARS-CoV); Morphology; Virus assemble

关键词: SARS 病毒; 形态结构; 病毒装配

中图分类号: R511; R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)04-0404-03

人冠状病毒 1965 年由 Tyrrell 等从人胎儿器官培养(HET-OC)中最初分离。其后 Hamre 和 Kapikian 等从组织培养中分离了病毒^[1]。2003 年 4 月, 世界卫生组织正式确认, 引起这次非典型肺炎(国外称为重症急性呼吸综合症, Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)的病原体是冠状病毒的一个变种 SARS-CoV, 以前没有在人体内发现过。继加拿大和美国之后, 中国科学院北京基因组研究所和军事医学科学院微生物流行病学研究所完成了 SARS 病毒中国流行株的病毒全基因组核苷酸序列测定, 证实该病毒的基因序列与此前发现的冠状病毒存在较大差异, 属于一种新的冠状病毒^[2]。本研究利用电子显微镜负染色技术和超薄切片技术, 分析了 2003 年从湖北 SARS 患者血清中分离的冠状病毒的形态结构及其在敏感的体外培养细胞中感染、复制、装配过程。

1 材料与方法

病毒样品取自 2003 年湖北 SARS 患者初期血清标本。Vero-E6 细胞由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。将处理好的标本接种于长成单层细

胞的细胞培养瓶中, 37℃ 吸附 1h, 吸出标本液, 加含有 2% 小牛血清的细胞维持液, 置 37℃ CO₂ 培养箱培养。感染病毒后不同时间取材进行电镜超薄切片处理。病毒命名为 SARS-CoV Hb 株。

病毒粒子纯化: 取感染病毒 48h 后出现严重病变的培养细胞, 反复冻融后 3 000r/min 20min 离心取上清; 30 000r/min 2h 离心后沉淀悬浮, 再经 30% 蔗糖单梯度离心, 洗去蔗糖后电镜观察。

电镜观察: 负染色样品 2% 磷钨酸(PTA pH6.5) 染色, 超薄切片按常规方法固定、脱水、浸透、spurr 树脂包埋、聚合切片。HITACHI H-8100 电子显微镜观察。

2 结果分析

2.1 SARS-CoV Hb 株感染细胞的观察

取 37℃ 培养箱中培养 30h, 细胞处于对数生长期, 细胞数约 7×10^6 的 Vero-E6 细胞接种病例标本, 标本接种 Vero-E6 细胞培养 48h 后出现明显的细胞病变, 而且能够稳定地传代, 其分离物中经电镜检测含有大量病毒粒子。将稀释成 10^{-4} 的感染液接种 Vero-E6 细胞, 于 3h, 12h, 24h, 48h 进行显微镜观察,

收稿日期: 2003-07-02, 修回日期: 2003-07-08

* 基金项目: 湖北省 SARS 研究特别基金资助。

作者简介: 张珈敏 (1956-), 女, 副教授, 从事病毒生物化学研究。

** 通讯作者: Correspondence author.

结果如下。

未经接种处理的细胞保持贴壁生长,细胞成多边形与周围细胞相连,细胞内质均匀,透明发亮。接种 3h 的细胞单层形态完整、未发现有明显变化(图 1A)。接种 12h 的 Vero-E6 细胞可以看到少数细胞已经变圆,出现病变,但大多数细胞依旧完整(图 1B)。接种 24h 的细胞变圆的数量增多(未显示照片)。48h 后,80%以上的细胞单层存在细胞变圆、脱落形成空斑,培养液中也悬浮大量脱落的细胞(图 1C)。

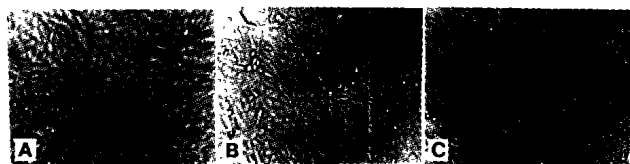


图 1 SARS-CoV Hb 株感染的 Vero 细胞

Fig.1 Infected Vero cells by SARS-CoV Hb

A, Control cells; B, Vero cell infected by SARS-CoV Hb after 12h; C, Vero cell infected by SARS-CoV Hb after 48h.

2.2 SARS-CoV Hb 株的形态结构

提纯后病毒粒子负染色电镜图像如图 2A 所示。病毒为近似椭圆形且大小较一致,直径 90~110nm 的多形态性的粒子。病毒囊膜表面有钉状纤突(Spike)。右下角为放大的 SARS 病毒,可以清晰看到病毒囊膜表面的冠状纤突。这些纤突根部细、前端粗圆、长约 12nm,大而稀疏的排列在病毒表面,像花冠一样。

此次分离的冠状病毒的一个显著特点是它的花冠较小。据文献报导,人冠状病毒粒子表面纤突前端球部直径为 9~12nm、长度约为 20nm。Thomas 等报告所分离 SARS 病毒的囊膜表面突起物为 20~40nm^[1]。而湖北分离的 SARS 病毒的花冠明显偏小,长度仅为 12nm,球部的直径也小得多。纤突由病毒的结构蛋白 S 蛋白组成,是病毒的主要抗原,它与 SARS 病毒侵入细胞的过程密切相关。一般认为冠状病毒 S 基因的突变与致病机理及毒力改变相关,SARS 病毒较人冠状病毒的花冠变小可能是其毒力增强的原因之一。

2.3 SARS 病毒在 VERO 细胞中感染装配

感染 SARS 病毒 3h 的 Vero-E6 细胞变化不大,但细胞膜内外已经难见到吸附和正在进入的病毒粒子(图 2B)。

病毒的感染与 SARS 病毒的花冠和敏感细胞细胞膜上的受体的相互识别有关。当 SARS 病毒的花冠特异性的与受体相应的调节部位结合时,引起受体蛋白质构象的变化使之激活,开始细胞内部功能

活动一系列变化。SARS 病毒入侵细胞的过程应该与流感病毒相似,即通过受体介导的胞吞作用入侵到细胞内。由于内吞泡中的 pH 低,病毒囊膜上的促融蛋白质被激活并和内吞泡融合,病毒核酸进入到胞质溶胶中,开始其复制^[3]。

感染病毒 12h 时,培养的 VERO 细胞里已有少数细胞中病毒粒子完成成熟装配,在细胞质中出芽释放至细胞内的空泡中(图 2C)。或者直接通过细胞质膜出芽释放至细胞外,箭头所示为正在和准备芽生释放的病毒粒子(图 2D)。感染初期的病毒粒子装配是在细胞质胶体中散在进行的,并逐渐聚集在一起,围绕在扩张了的内质网周围向空泡内芽生释放成熟病毒(图 2E)。此时细胞的线粒体还是基本完整。有时可以在感染细胞的细胞质膜上看到成熟的病毒粒子整齐的排列在细胞膜外面(图 2F),随着病毒数量的增加和内质网进一步扩张,数以百计的病毒进入空泡内,导致细胞破损死亡,形成裂解性感感染(图 2G)。成千上万的病毒和细胞碎片又开始感染其它细胞。在感染病毒 12h 时,绝大多数细胞中尚未见到病毒出现。

感染病毒 24h 后,已经有较多细胞出现病毒的复制和装配,此时的细胞中经常可以看到球形的包块,内面充满未成熟病毒颗粒。显示在病毒复制装配过程中细胞亦可能在限制和反抗(图 2H)。而感染病毒 48h 时,绝大多数细胞已经是病毒感染晚期,此时细胞质中的细胞器像线粒体等已无法分辨,细胞中出现许多内质网扩张形成的巨大的空泡。

此次流行传播的 SARS 病毒是一种传染性很强的烈性病毒,它在人体内的侵染、复制、装配、成熟过程及致病机制目前尚不清楚。病毒感染引起细胞产生的特异性变化也未弄清。因此在体外培养细胞模型中观察 SARS 病毒感染、复制、装配过程对于我们了解病毒的感染过程,了解病毒感染引起的细胞变化,了解病毒与细胞的相互作用具有重要意义。从超微病理角度直接观察 SARS 病毒感染体外培养细胞过程对于控制 SARS 病毒的研究来说也是一种重要的手段。

参考文献

- [1] Thomas G Ksiazek D V M, Erdmen D, Goldsmith C S, et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome[J]. *New Engl J MED*, 2003.348: (20) 1947-1958.
- [2] 祝庆余,秦鄂德,王翠娥,等. 非典型肺炎病例标本中新型冠状病毒的分离与鉴定[J]. *中国生物工程杂志*. 2003 23: (4) 106-112.
- [3] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] 保坂康弘,松本明. 电子显微镜图解病毒学[M]. 日本东京: 朝仓书店, 1983.

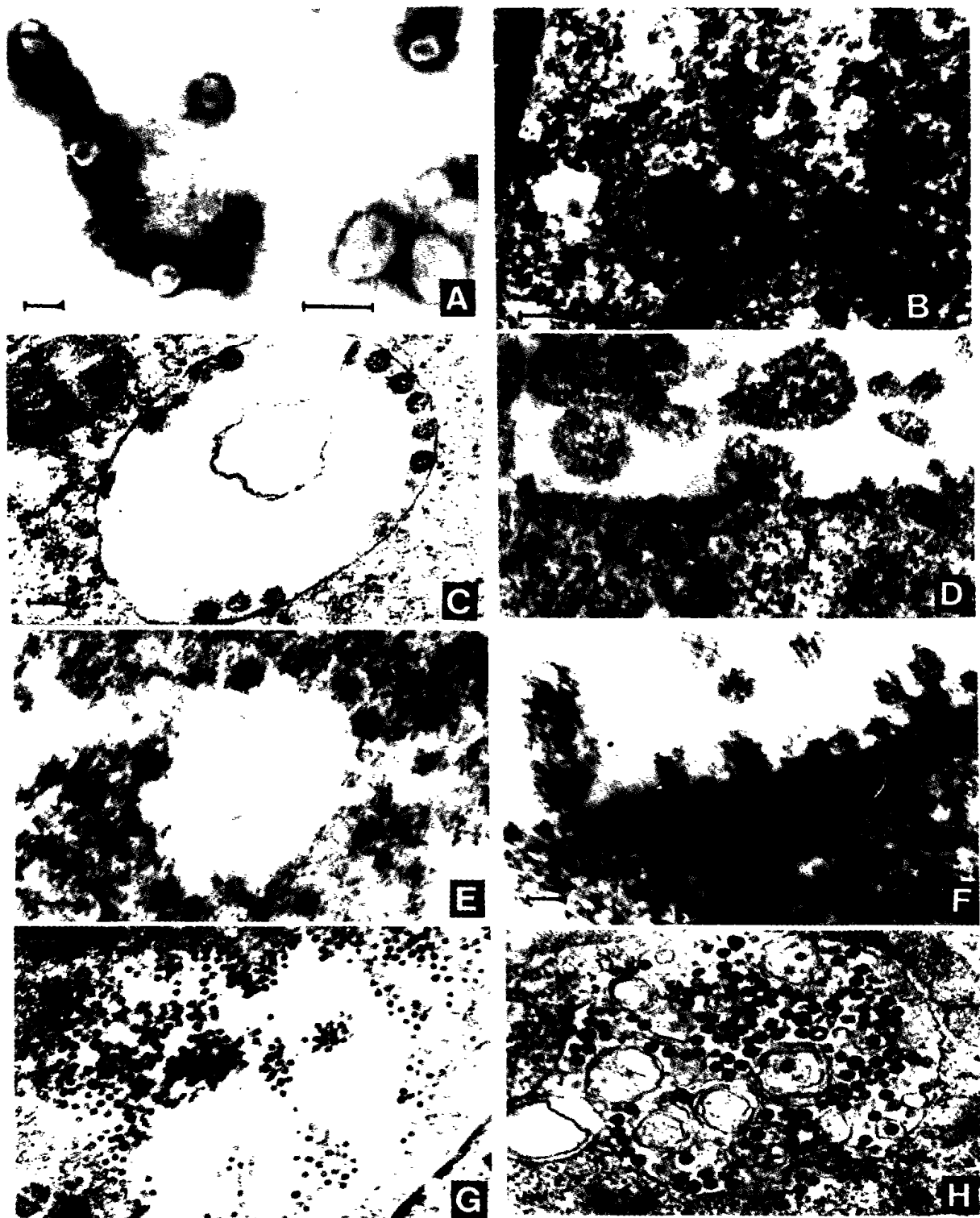


图 2 SARS-CoV Hb 株的形态结构及在细胞中的形态发生

Fig.2 Morphology and morphogenesis of the SARS-CoV Hb in Vero cells

Arrows indicate virus particles and Bar=0.1 μ m in this figure. A, Electron micrograph of negative staining of purified SARS-CoV Hb particles; B, The SARS-CoV Hb particles was in cytoplasm at 3h; C, A section showed virus begin budding and releasing to rough endoplasmic reticulum vacuole at 12h; D, Matured particles were budding and prepare to bud at 12h; E, The particles were maturely assembling(12hpi); F, The matured particles were arranged in the external membrane(12hpi); G, A section a large number of virus particle released to outstretched endoplasmic reticulum vacuole, and its member had ruptured(12hpi); H, A great deal of immature virus particles were surrounded to sphericity at 24.