

## 呼肠孤病毒与 SARS 相关的形态学依据

杨 怡<sup>1\*\*</sup>, 陈德蕙<sup>1</sup>, 端 青<sup>2</sup>, 朱 虹<sup>2</sup>, 郎振为<sup>3</sup>, 孟 忻<sup>3</sup>, 张德添<sup>1</sup>, 张 颀<sup>1</sup>

(1. 国家生物医学分析中心, 北京 100850; 2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100710; 3. 北京佑安医院病理科, 北京 100054)

### Morphological Evidence of SARS Associated Reovirus

YANG Yi<sup>1\*\*</sup>, CHEN De-hui<sup>1</sup>, DUAN Qing<sup>2</sup>, ZHU Hong<sup>2</sup>, LANG Zhen-wei<sup>3</sup>, MENG Xin<sup>3</sup>,  
ZHANG De-tian<sup>1</sup>, ZHANG Sa<sup>1</sup>

(1. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China; 2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 3. Pathological Department of Beijing Youan Hospital, Beijing 100054, China)

**Abstract :** To identify the pathogen isolated from lung tissue of a patient died from SARS by using electron microscope. Sample of lung tissue taken from autopsy of the SARS patient was inoculated onto Hep2 cultured cells. Any cultured cells exhibiting cytopathic effect were processed by routine techniques for ultrathin sections. Electron microscopic examination revealed the characteristic morphological features of reovirus. The virus particles showed in different mature stages, the matured particles with dense core and the incompletely assembled virus particles with lucent core. Both of them have capsid about 14nm in thickness with a size of virions about 60-80nm in diameter. Most of the virions were found in large clusters arranged in crystalline array and associated with the viral plasm and microtubular-like structure to form cytoplasmic inclusion bodies of different size and shape. In this study, we have provided further morphological evidence that reovirus may be associated with SARS. However, the correlation of the reovirus infection with SARS outbreak needs to be further investigated.

**Key words :** Reovirus; SARS; Electron Microscopy

**摘要 :** SARS 患者病理尸检肺组织样品分离病毒出现细胞病变的 Hep2 培养细胞, 按常规制作超薄切片, 透射电镜下观察。电镜下, 检出在感染细胞内复制、组装的呼肠孤病毒及其包涵体。病毒粒子衣壳立体对称、无包膜、直径在 60~80nm。成熟病毒粒子核心致密常排列呈晶格状, 不成熟病毒粒子核心空亮。数目不等的上述两种病毒粒子、长短不等的微管样结构和病毒浆常在核旁胞质内组成大小不等、无定形的病毒包涵体。此发现进一步提供了呼肠孤病毒感染有可能与 SARS 相关的形态学依据。

**关键词 :** 呼肠孤病毒; SARS; 电子显微术

中图分类号: R511 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)02-0105-03

2003 年, 我们曾报告了从北京市第一例 SARS 患者及其母亲的咽拭子中分离、检出呼肠孤病毒。在透射电镜下, 发现感染细胞胞质内有典型的晶格状排列的呼肠孤病毒粒子和病毒包涵体。血清学实验显示, 38 例 SARS 患者中 24 例对呼肠孤病毒呈阳性反应。针对呼肠孤病毒的基因保守序列(S2 基因片段)设计引物, RT-PCR 扩增出特异性 DNA, 核酸序列分析证实是一种独特的呼肠孤病毒(呼肠孤

病毒科正呼肠孤病毒属)<sup>[1,2]</sup>。最近, 我们又从北京佑安医院一例 SARS 患者的病理尸检肺组织标本中分离、检出呼肠孤病毒, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

患者, 男, 54 岁, 因发热一天伴干咳于 2003 年 5 月 21 日疑似 SARS 入院(北京佑安医院), 有接触

收稿日期: 2004-09-20, 修回日期: 2004-12-07

\*\* 通讯作者: 杨怡(1948-), 女, 上海籍, 高级实验师, 主要从事生物医学电镜研究。

Corresponding author. Tel: (010) 66930343, E-mail: yangyi@proteomics.com.cn

史。入院时体检:体温 38.4, 双肺听诊有散在湿性罗音,胸部 X 线片显示两肺纹理增多、模糊、右上肺有片状阴影,心影扩大。实验室检查:入院时白细胞总数  $4 \times 10^9/L$ ,中性粒细胞 87%,淋巴细胞 9.2%。患者既往有高血压病史十余年,尿毒症透析疗法一年。入院后先经给氧、透析、降压、抗生素治疗,病情未见明显好转。入院第 7 天加用激素,3d 后胸片显示炎症有所吸收。但病情再次恶化,于 2003 年 6 月 7 日在发病后 18d 因多脏器功能衰竭死亡。病理尸检确诊为重症急性呼吸综合征 (SARS)<sup>[3]</sup>。

### 1.2 病毒分离培养和细胞超薄切片的透射电镜观察

将患者尸检肺组织块制成匀浆按前文方法进行病毒分离培养<sup>[1]</sup>。刮取培养 36~48h 出现明显细胞病变 (CPE) 的感染细胞低速离心成团,按常规固定、脱水、Epon812 包埋、超薄切片染色后在 Philips CM 120 透射电镜下观察。取对照细胞同步制样观察。

## 2 结果与讨论

透射电镜观察可查见在感染细胞核周胞质内有

大小不等、无定形的病毒包涵体。包涵体由中等致密的细丝状病毒浆 (viral plasm) 和数目不等、直径在 60 - 80nm 的空心和实心的病毒粒子以及少量微管样结构所组成 (图 1 A - D)。组装不完善的病毒粒子仅有一个厚约 14nm 外壳 (衣壳),核心空亮 (空心) 为不成熟病毒粒子,排列无序 (图 1 C)。组装完善的病毒粒子核心致密 (实心) 为成熟病毒粒子,常排列呈典型的晶格状 (图 1 A, D)。在病毒包涵体内还可以查见少量平行排列、壁较厚的微管样结构,直径略小于病毒衣壳 (图 1 A, B),它有可能是病毒衣壳蛋白的前体结构。在细胞病变特别严重的感染细胞胞质内,病毒粒子排列松散,间距增宽,在包涵体外周可查见病毒粒子分散在变性肿胀的线粒体和粗面内质网之间 (图 1 E, F)。由此可以推测,病毒粒子通过细胞裂解后释放。根据上述感染细胞内病毒形态学和形态发生学特征可以鉴定所检出的病毒为呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 成员<sup>[4-7]</sup>。再则,在电镜下还发现不少感染细胞呈现典型的细胞凋亡的超微结构改变,提示呼肠孤病毒所诱导的靶细胞凋亡,可能在 SARS 的发病机制中起重要作用<sup>[8]</sup>。

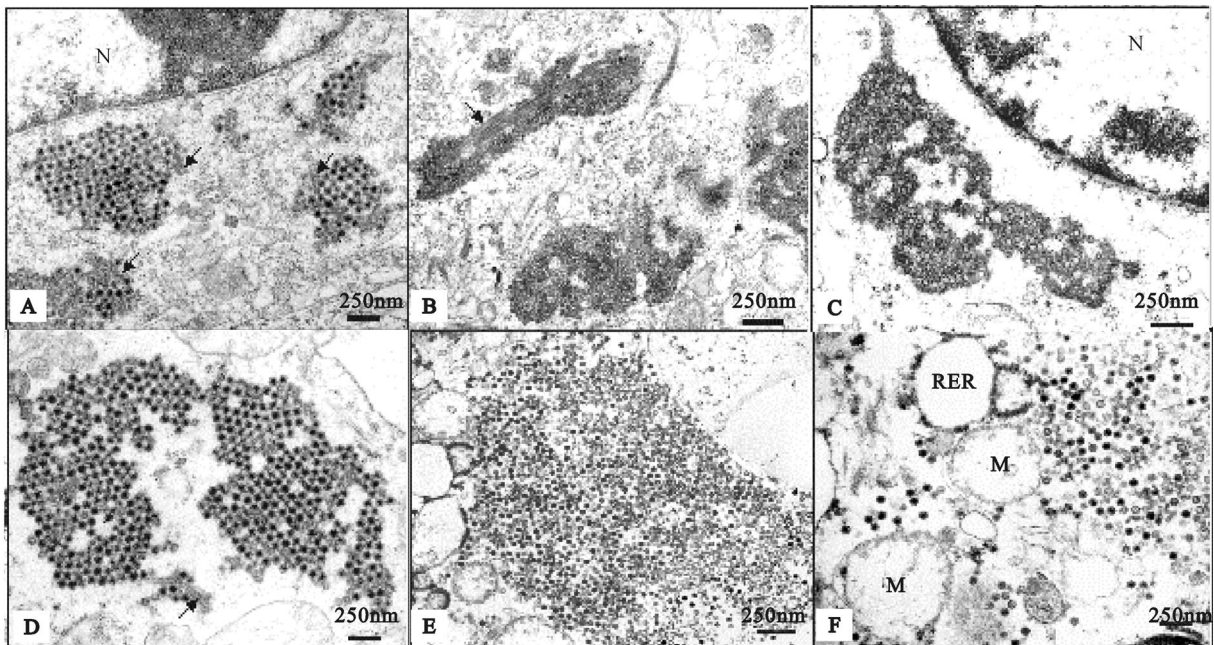


图 1 SARS 死亡患者尸检肺组织的病毒分离培养物的电镜图像

Fig. 1 Electron micrographs of the Hep-2 cells infected with reovirus isolated from the lung tissue of patient died from SARS

A-B, Showing viral inclusion bodies of various size and shape made up by the aggregation of viral particles with a few microtubular-like structures (arrows) in the cytoplasm close to the nucleus (N); C, Showing most of the reovirus particles with lucent core was in the process of assembling, nucleus (N); D, Showing reovirus particles with dense core aggregated in a crystalline-like array; E, F, Showing reovirus particles dispersed in between the degenerated mitochondria (M) and rough endoplasmic reticulum (RER).

据文献报道,呼肠孤病毒可导致人和实验动物的致死性间质性肺炎、肺组织纤维化和急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome,

ARDS) 或细支气管炎闭塞性机化肺炎 (bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, BOOP)<sup>[9-12]</sup>, 而该病毒所致肺炎最明显的和最重要的病理改变是

肺炎和肺纤维化。我们先后从北京市 SARS 患者生前咽拭子和死后肺组织中均分离、检出呼肠孤病毒,可能为 SARS 的致病因子提供新的启示。

在先前<sup>[1,7]</sup>我们还曾报道,在个别感染冠状病毒的 Vero-E6 细胞中,同时检出冠状病毒和呼肠孤病毒,有的竟出现在同一个感染细胞核两侧的胞质内。这种现象有可能是两种病毒的叠加感染(superinfection)值得关注 and 深入研究。陈德蕙<sup>[4]</sup> 1972 年曾在一份普通感冒患者的咽漱液分离病毒的人胚肾培养细胞中,在国内首次发现冠状病毒,而在那份样品中还同时检出微小核糖核酸病毒科的鼻病毒。这使我们联想到引起普通感冒的冠状病毒<sup>[7]</sup>与这次的 SARS 相关冠状病毒<sup>[13,14]</sup>会不会因为它们相伴的病毒的不同而产生致病性和临床表现的重大差异。进一步弄清楚这两种病毒,即冠状病毒和呼肠孤病毒,与 SARS 疫情的关系是完善特异诊断试剂,研制有效治疗药物和疫苗的必需。

本研究从 SARS 患者尸检肺组织中分离与检出呼肠孤病毒,进一步提出了呼肠孤病毒有可能与 SARS 相关的形态依据,但确定呼肠孤病毒与冠状病毒之间的关系以及它们在 SARS 疫情中的致病作用仍需要进行深入研究。

## 参考文献

- [1] 端青,朱虹,杨怡,等. 呼肠孤病毒,在 SARS 患者中分离与初步鉴定[J]. 科学通报,2003,48:1369-1372.
- [2] 左庭婷,檀华,何君,等. 从 SARS 患者标本中分离的呼肠孤病毒的分纯及鉴定[J]. 军事医学科学院院刊 2003,27:241-242.
- [3] 张立洁,郎振为,孟忻,等. 细胞因子在严重急性呼吸综合征中的作用初步探讨[J]. 世纪传染杂志 2003,3:370-372.
- [4] 陈德蕙. 几种呼吸道病毒的电镜鉴定[J]. 中华医学杂志,1974,4:211-215.
- [5] 陈德蕙,张贺秋,王国华. 电镜在病毒感染诊断中的应用[J]. 电子显微学报,1997,16:549-568.
- [6] 陈德蕙,张贺秋. 病毒、立克次体、衣原体和支原体感染的电镜诊断[C]. 武忠弼主编,超微病理诊断学[M]. 上海:上海科技出版社,2003,663-737.
- [7] 陈德蕙. 从 SARS 病原体电镜诊断得到的启示[J]. 电子显微学报,2004,23:1-8.
- [8] 杨怡,陈德蕙,端青,等. 呼肠孤病毒与细胞凋亡[J]. 电子显微学报,2004,23:195-200.
- [9] Tillotson J R, Lerner A M. Reovirus type 3 associated with fatal pneumonia[J]. N Engl J Med, 1967,276:1060-1063.
- [10] Bellum S C, Dove D, Harley R A, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of intraluminal fibrosis. A model for the study of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia [J]. Am J Pathol, 1997,130:2243-2254.
- [11] London L, Majeski E I, Paintlia M K, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of diffuse alveolar damage: a model of acute respiratory distress syndrome [J]. Exp Mol Pathol, 2003,72:24-36.
- [12] Lamirande E W, Nichols D K, Owens J W, et al. Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (Ekaphe species) [J]. Virus Res, 1999,63: 135-141.
- [13] Peiris J S M, Lai S T, Poon, L L M. et al. , Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. Lancet, 2003,361(9366): 1319-1325.
- [14] Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003, 348:1953-1996.