

菜粉蝶野田村病毒感染宿主的病理学变化及病毒的装配*

邱乐泉,张珈敏**,刘传凤,蔡大威,徐佳,胡远扬

(武汉大学生命科学院,湖北武汉 430072)

Histopathological and Cytopathological Changes in *Pieris rapae* Infected by a New Nodavirus

QIU Le-quan, ZHANG Jia-min**, LIU Chuan-feng, CAI Da-wei, XU Jia, HU Yuan-yang
(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The major pathological changes of *Pieris rapae* infected by a new nodavirus (PrNV) and a mixture of PrNV and *Pieris rapae* Granulosis virus (PiraGV) were studied by electron microscopy and histochemistry. The results showed that PrNV replicated only in the cytoplasm of larval midgut cells. After infection, prominent changes took place in the organelles of permissive cell, such as mitochondrion, endoplasmic reticulum and ribosome. The PrNV assembly was also studied.

Key words: *Pieris rapae*; *Nodavirus*; Histopathology; Cytopathology; Viral assembly

摘要:应用光学组织切片和电镜超薄切片技术对菜粉蝶新的野田村病毒感染菜青虫幼虫的组织病理学和超微病理学变化以及菜青虫颗粒体病毒混合感染后的病理学变化进行了研究。结果表明该病毒只在菜青虫中肠细胞质内增殖。病毒侵染时,线粒体、内质网等细胞器均发生显著病变。该病毒与前人报告的能侵染菜青虫的其它病毒均有所不同。本文还讨论了野田村病毒的装配。

关键词:菜粉蝶;野田村病毒;组织病理学;细胞病理学;病毒装配

中图分类号:S43 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)06-0664-04

野田村病毒是第一个已知既能感染脊椎动物又能使昆虫致病的病毒,该病毒粒子为呈二十面体对称的球状粒子,大小为29~30nm。其基因组核酸为RNA,衣壳蛋白由40kDa的主要多肽和44kDa的次要多肽组成^[1-3]。

本实验室近年来在湖北省自然罹病死亡的菜青虫幼虫中分离到一种新的非包涵体病毒。分子生物学实验和核苷酸序列测定结果表明,它与甲型野田村属的 *Pariacoto virus* 有一定的同源性,可以确定这株病毒是一株新的野田村病毒(结果另文发表)。这是迄今为止在中国境内发现的第一株野田村病毒^[4]。我们将其暂时命名为菜青虫野田村病毒(*Pieris rapae nodavirus*, PrNV)。本株病毒的宿主与国外报告的野田村病毒科的宿主完全不同,它不是来自蚊虫、蛴螬、蜚蠊,而是来自和人类生活密切相关的蔬菜害虫菜青

虫。这株国内外尚未见报告的新的野田村病毒研究具有重要的学术价值和实际应用价值。这是国内外第一次在菜青虫中发现野田村科病毒。

野田村病毒是一种性质十分独特的昆虫病毒。它既能感染无脊椎动物宿主,也能感染脊椎动物宿主。野田村病毒经脑内、皮下注射,或者通过埃及伊蚊将病毒传递感染小白鼠乳鼠,使其麻痹死亡。为了弄清菜青虫野田村病毒的宿主特异性、感染特征和感染宿主的组织病理学变化,了解野田村病毒在宿主细胞中的装配过程。我们通过组织病理切片和电镜超薄切片,用光学显微镜和电子显微镜对菜青虫野田村病毒感染的组织病理变化以及病毒的复制装配进行了观察。其结果有助于了解这种新型病毒的感染特征和病毒的装配过程。

收稿日期:2005-09-12,修回日期:2005-09-28

* 基金项目:国家自然科学基金(30570068)

** 通讯作者:张珈敏(1956-),从事昆虫病毒分子生物学研究。Corresponding author. Tel:027-68756654;E-mail:yyhu@whu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 病毒的分离提纯

实验中所用菜青虫野田村病毒和菜青虫颗粒体病毒均为本室分离收藏。

将用野田村病毒感染的菜青虫罹病死虫捣碎, PBS 缓冲液中浸泡、冻溶、匀浆, 5000r/min 离心 20min。取上清加入预冷的 CCl_4 , 充分搅拌, 5000r/min 离心 20 min, 取上清加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使终浓度为 55%, 充分搅拌后 4℃ 静置过夜。8000r/min 离心 50min, 沉淀用 Tris 缓冲液重新悬浮。8000r/min 离心 20min 后取上清, 40 000r/min 离心 2h 即可得到初步纯化的菜青虫野田村病毒颗粒。利用 40% 的蔗糖单梯度将病毒进一步纯化后, 再用 10%-40% 的线性蔗糖梯度进行水平转头离心, 梯度仪分步收集, 紫外分光光度计检测后确定病毒带, 最后洗脱浓缩得到精制病毒保存备用。

菜青虫颗粒体病毒的分离提纯见文献^[5]。

1.2 病毒对菜青虫的感染

感染实验菜青虫从未施用农药的菜地采回后室内饲养一天, 挑取发育正常的 2~3 龄的健康幼虫供试, 试验中以新鲜甘蓝叶为饲料供养幼虫。

将提纯的菜青虫野田村病毒稀释配制成 2×10^6 个/mL 的悬液。将菜青虫颗粒体病毒也配制成 2×10^6 PIB/mL 与菜青虫野田村病毒 2×10^6 个/mL 悬液等量混合。将两种悬液涂抹在洗干净幼嫩甘蓝叶片上, 晾干后喂食经 4hr 饥饿的 2~3 龄菜青虫, 食完后喂食新鲜甘蓝叶片。设置正常对照组, 饲养温度 23℃, 相对湿度 70%。

1.3 石蜡组织切片样品制备

挑取不同感染时期的幼虫, Carnoy's 固定液固定 4h, 常规方法脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、苏木精-伊红双染色、封片、干燥后光镜观察、拍照分析。

1.4 电镜超薄切片样品制备

同上述方法取感染症状明显幼虫, 解剖取出中肠和脂肪体, 经 2.5% 戊二醛固定, 1% 锇酸再固定, 系列梯度乙醇脱水。环氧树脂 EPON812 包埋, LKB 超薄切片机切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, H-8100 透射电子显微镜观察、拍照、分析。

2 结果

2.1 感病症状

菜青虫野田村病毒单独感染菜青虫的感染率较混合感染的感染率稍低。野田村病毒感染的典型病变表现为身体发育缓慢; 体型较小、龄期变长; 食量

明显降低; 表皮皱褶、体色变暗、有时呈现节状环纹; 感染晚期虫体瘫痪; 病程约 7~9d。菜青虫野田村病毒和颗粒体病毒混合感染的感染率很高, 为 99%~100%。混合感染的病虫大多数呈现较典型的颗粒体病的病症, 如体节肿胀; 体色变灰黄; 腹部发白, 但体型肿胀的程度明显小于颗粒体病毒单独感染的菜青虫的体型。混合感染的初期症状一般出现在 3~4d 左右, 整个病程约 6~7d。

2.2 组织病理变化

正常菜青虫中肠组织细胞排列紧凑整齐, 细胞间界限清晰, 核质比例适中。虫体组织的细胞核大小较一致, 基质均匀(图 1A)。

野田村病毒单独感染菜青虫时, 感染病变一般从中肠后段开始, 然后逐渐向前推移。最后整个中肠被病毒所侵染。而脂肪体、马氏管、表皮等组织则未见有病变产生。感染 48h 后, 中肠细胞的细胞质变混浊、细胞界限不清晰; 至 72h 后, 中肠肠壁增厚, 继而柱状细胞胞质混浊加深。细胞界限几乎完全消失, 细胞排列紊乱, 杯状细胞散乱夹杂其中, 细胞核缩小。96h 后, 已有细胞破裂从肠壁上脱落。至感染 120h 后, 细胞从肠壁上大量脱落, 仅剩基底膜存在。在病毒感染 120h 时候, 中肠前段仍处于感染初期(图 1B)。

菜青虫野田村病毒和颗粒体病毒混合感染菜青虫时, 初期中肠上皮细胞变化与野田村病毒单独感染时相似。此后, 中肠后段肠壁增厚, 感染向中肠前

表 1 不同感染条件下菜青虫幼虫组织病变发生时间
Table 1 time of histopathological changes took place in the tissues

Virus	Infected time(h)	Midgut	Fat body	Epidermis	Malpighia tubules
PrNodavirus	48	+	-	-	-
	72	+	-	-	-
	96	+	-	-	-
	120	+	-	-	-
PrNodavirus + PrGV	48	+	-	-	-
	72	+	+	-	-
	96	+	+	+	+
	120	+	+	+	+

+: Pathological changes. -: No pathological changes

段推移。感染 72h 时, 肠壁出现空泡, 细胞分泌物增多。脂肪体细胞明显肿胀, 细胞核浓染, 染色质扩散。继而表皮细胞肿大, 并与角质层分离, 与菜青虫颗粒体病毒感染的病变十分相似。

2.3 野田村病毒感染的超微病理及病毒的装配

在野田村病毒单独感染的菜青虫细胞中,病毒复制增殖的细胞主要是中肠柱状上皮细胞和杯状上皮细胞。在感染24h后可以发现在中肠柱状上皮细胞的微绒毛上吸附有大量的野田村病毒颗粒。并可见少数病毒颗粒已经穿过微绒毛的膜进入到细胞中(图1C)。菜青虫野田村病毒在细胞内增殖和装配的地点是发生在细胞质中。在病毒感染的细胞质中

可以观察到病毒发生基质存在的部位和区域,在那里聚集着染色浓度很高的物质并可见病毒粒子在其中进行装配(图1D)。在病毒感染装配的初期细胞器最明显的变化就是内质网扩张,形成一个个较大的园形的池。有时可以看到内质网进行旋转包裹成巨大的螺旋状,而已经装配完毕的病毒粒子整齐的排列在其中(图1F)。在感染晚期,细胞质中出现一

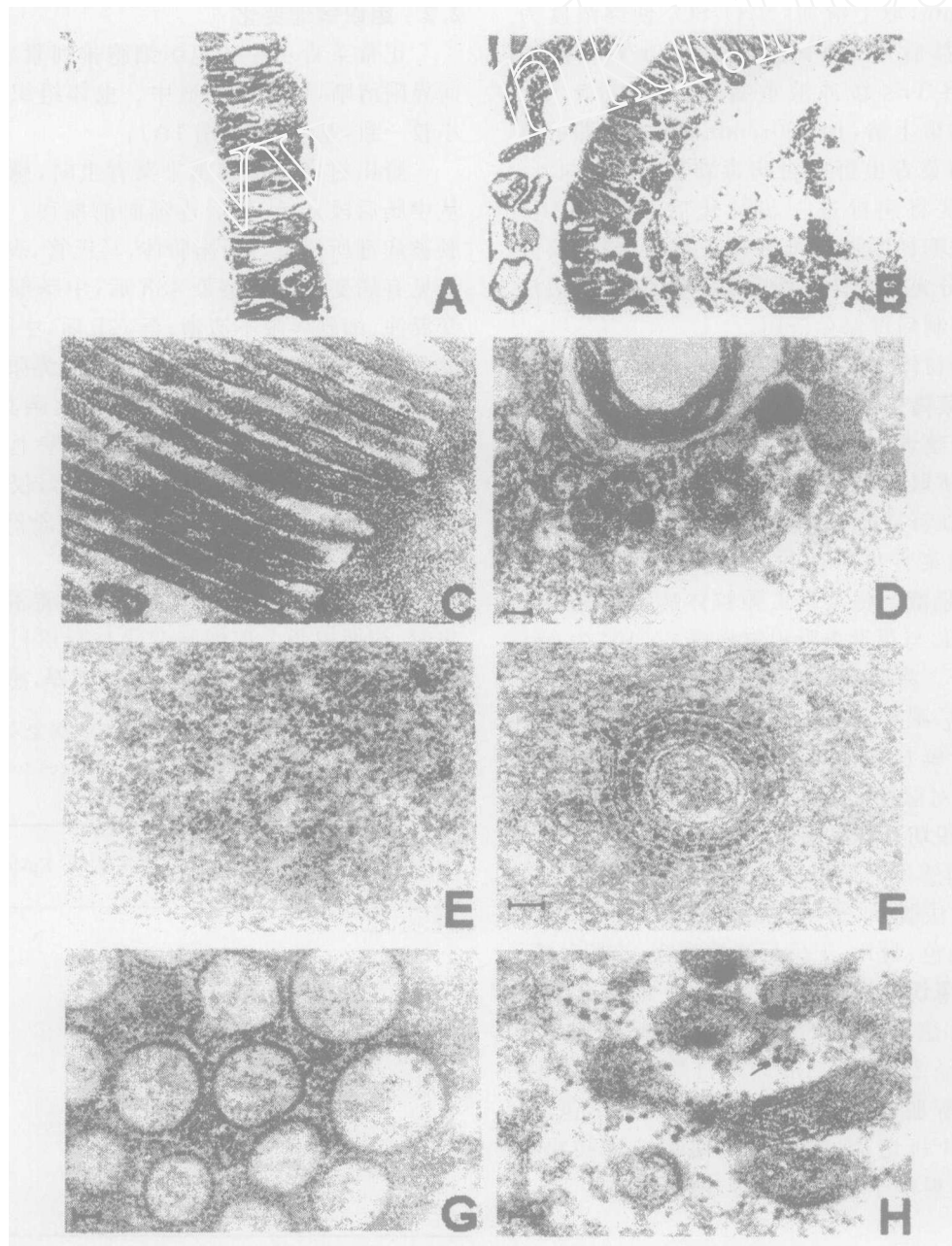


图1 菜粉蝶野田村病毒感染宿主的病理学变化及病毒的装配

Fig.1 Histopathological and Cytopathological Changes of *Pieris rapae* infected by New nodacirus and viral assembly

Arrows indicate virus particles and Bar=100nm in this figure. A, Normal *pieris rapae* larva midgut cell; B, The midgut of *pieris rapae* infected by PrNV at 96h; C, A lots PrNV are absorbing and invading the microvilli of epithelium cell of *pieris rapae* larva; D, The virus particles were maturely assembling in strong matter; E, Viruses are propagating greatly in the cytoplasm; F, The endoplasmic reticulum twists and becomes a great helix, in which the assembled viruses array orderly. G, Many large vesicles, around which virus particles array, appear in the cytoplasm. H, In the course of viruses assembling, the dye concentration of some virions is higher than other apparently.

个个巨大的空泡,病毒粒子会整齐地围在空泡的周围(图 1G)。这种空泡有时扩张得非常大,可以将巨大的细胞质内物质和数以百计的病毒粒子包裹在其中。病毒感染时细胞另一个重要变化是细胞中的线粒体。在感染过程中线粒体变化非常明显,晚期细胞中的线粒体外形扭曲,内部的嵴排列十分混乱。

菜青虫野田村病毒在中肠细胞中复制数量很大,整个细胞质内充满了病毒颗粒。最后数以万计的病毒颗粒使细胞破裂死亡(图 1E)。

在病毒装配的过程中,可以看到一部分病毒粒子的染色浓度明显高于另一部分病毒颗粒的染色浓度。这是否是增殖过程中无感染性前病毒粒子经过成熟切割变成有感染性病毒粒子的区别有待于进一步加以证实(图 1H)。

菜青虫野田村病毒可以和菜青虫颗粒体病毒在同一细胞的细胞质中共同复制增殖,互不干扰,这也是十分有趣的现象。

3 讨论

已经报告的几株野田村病毒(野田村病毒、东方蜚蠊病毒、羊舍病毒、巴拉奈病毒等)都没有显著的宿主特异性。绝大部分野田村病毒属成员在实验室内人工接种都能在大蜡螟(*Calleria mellonella*)体内繁殖。从蛴螬(*Costelytra zealandica*)分离的羊舍病毒可在烟草夜蛾及培养的果蝇细胞内复制增殖。除野田村病毒外,其它成员都可在果蝇细胞单层培养上形成空斑。野田村病毒还通过埃及伊蚊可以传染乳鼠。而菜青虫野田村病毒具有很高的组织和细胞特异性,它只在中肠的柱状上皮细胞和杯状上皮细胞中复制增殖。从这一点上来说,它们之间存在明显差异。

在野田村病毒感染过程中,细胞内的粗面内质网和线粒体变化非常大。线粒体是细胞内能量供应

的主要场所,而粗面内质网和核糖体直接参与病毒蛋白的合成,它们都是细胞中特别敏感的细胞器,病毒感染时往往发生明显的病理学变化。侵染初期,线粒体数量增多和内质网同心园状排列,说明病毒的复制已经使细胞内的能量产生和蛋白质合成产生巨大变化。因为病毒在细胞中的大量复制增殖,需要消耗大量能量和蛋白质。到了侵染晚期线粒体扭曲变形、内质网极度扩张或者断裂成片段化并逐步消失。这些病理变化都与病毒增殖过程中细胞原料的大量消耗相关。

两种不同的病毒同时感染同一宿主的不同细胞或者同一细胞时,会产生相互干扰、相互协同、相互独立等复杂关系。在菜青虫野田村病毒和颗粒体病毒混合感染时,可以看到这两种病毒在同一细胞质中大量增殖,当然野田村病毒的数量要远远多于颗粒体病毒。一个是 RNA 病毒,另一个是 DNA 病毒,又是在同一细胞质中复制增殖,它们在利用细胞的原料、能源过程中这两种病毒间的相互策略、竞争方式是值得探讨的问题。

参考文献

- [1] Ball L A, Johnson K L. Nodaviruses of insects[A]. In: The Insect Viruses[C]. (Miller L. K, Ball L A, eds. New York: Plenum Publishing Corporation, 1998. 225-267.
- [2] Bailey L, Scott H A. The Pathogenicity of Nodamura virus for insects[J]. Nature, 1973, 241, 545.
- [3] Johnson K L, Price B D, Ball L A. Recovery of Infectivity from cDNA clones of Nodamura virus and Identification of Small Nonstructural Proteins[J]. Virology, 2003. 305: 436-451.
- [4] Tihova M, Dryden K A, Le T L, et al. Nodavirus coat protein imposes dodecahedral RNA structure independent of nucleotide sequence and length[J]. J Virol. 2004, 78(6):2897-2905.
- [5] 刘年翠,梁东瑞,张起麟. 菜粉蝶颗粒体病毒的分离、提纯、鉴定、超微结构和应用[J]. 武汉大学学报, 1981. 2: 49-60.