

新疆出血热病毒特性的研究

Ⅲ 新疆出血热病毒的电子显微镜观察

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

李 烽 蔡保健* 严玉辰 孔令雄 高守一

新疆出血热(XHF)是一种病死率很高的急性传染病,1966年首次分离病毒,1968年进一步得到证实,确定本病为蜱传,非常近似于苏联中亚地区的出血热^[1,2]。从血清学试验可以证明XHF与克里米亚-刚果出血热(CCHF)有抗原上的一致性^[3]。XHF病毒对酸和乙醚等化学试剂敏感,浮力密度为1.16~1.18克/毫升^[4]。本文报告XHF病毒在Vero E₆株细胞中传代后的病毒形态研究。

材料和方法

一、新疆出血热病毒株:BA68038株,自病人血液中经小白鼠乳鼠脑内传代分离,乳鼠脑内毒力为LD₅₀/0.02毫升10⁻⁶~10^{-6.5}。

二、细胞培养:将Vero E₆株细胞接种方瓶2日后生长成单层使用。

三、病毒感染:用10%乳鼠脑BA68038毒株1毫升,感染已生成单层的Vero E₆细胞,于感染后第四天再将细胞消化,分瓶培养72小时,再用鼠脑病毒感染一次,4天后制备电镜标本。

四、电镜标本的制备:将感染的Vero E₆细胞从方瓶中刮取,经离心收集上清。沉淀的细胞以2%缓冲戊二醛和1%缓冲四氧化锇两次固定,缓冲液充分洗涤,经丙酮系列脱水,以环氧树脂600*进行浸透并包埋,在78°C烤箱中聚合后进行超薄切片,并以醋酸铀及枸橼酸铅复染,用电镜观察、拍照。

将离心收集的上清,经30,000转/分离心2小时,用PBS制成病毒悬液,滴于有支持膜的电镜铜网上,用2%磷钨酸盐染色,干燥后

电镜观察拍照。

观察结果

在电镜下反复观察发现新疆出血热病毒,在大小和电子密度上是不一致的。在超薄切片标本中,病毒颗粒从形态上可分为两种,一种是病毒的核心,电子致密度较高,染色也较深,而且看到病毒颗粒最外面有一层明显的囊膜,囊膜的里面有一层很窄的透明带,把囊膜与核心部分分开,其直径为92~105毫微米。它主要分布于细胞外。在细胞质空泡或接近于细胞膜边缘也有这种类型的病毒颗粒(图1、2、3,见插图页,后同)。另一种病毒颗粒为中等电子密度,大部分病毒中心部位较为电子透明,有时看到中心有几个致密颗粒,有的病毒中心可看到9~11毫微米直径的细纤维丝,呈螺旋状盘绕。在核心外面也可看到一条透明带,把囊膜与核心分开。病毒体最外面的囊膜比前一种类型病毒颗粒的囊膜要宽些,这种病毒的大小为85~95毫微米(图3、4)。这两种形态的病毒在电镜下很容易区别。

病毒在感染细胞中为圆形或椭圆形,多数为单个存在,也有几个或十余个病毒颗粒分散或成堆地分布于细胞肿胀的高尔基氏区空泡中及内质网池中。中等密度的病毒颗粒主要分布在细胞内,致密度较高的病毒颗粒主要在细胞膜边缘及细胞外。

在感染细胞的胞质里,可观察到没有病毒结构的环状及单螺旋状结构,可称为病毒前体。这种结构大小不等,约为100毫微米(图4、

*现已调卫生部药品生物制品检定所。

5)。环状或单螺旋状物是由15毫微米的小颗粒排列组成，但每一个环状物中颗粒数目不等，有的仅为十几个，有的则有20~30个颗粒环绕而成。这种环状的病毒前体，有时比装配好的病毒颗粒还要大些(图4、5)。

在超薄切片标本中，还看到病毒形成的不同阶段，利用宿主细胞的膜结构进行组装病毒。可以看到在细胞质中膜结构和空泡及内质网中病毒在发芽，形成成熟的病毒颗粒(图6)。

观察负染色的标本，可见XHF病毒为圆形及椭圆形，最外面裹着一层囊膜，病毒的直径为90~105毫微米(图7)。

讨 论

在Vero E₆株细胞中繁殖的XHF病毒在电镜下观察有两种形态，一种为核心电子密度较强的且有一层明显囊膜的病毒，它的直径为92~105毫微米。另一种病毒颗粒直径为85~95毫微米，它的囊膜较前者厚。内部结构为中等电子透明，中心部位可见几个致密小颗粒或为9~11毫微米的细纤维。在致密度较高的那种病毒颗粒中心有时也能看到这种纤维。在负染色的标本中，这种结构不明显。Donets等认为这种细纤维是病毒的核部分^[8]。XHF病毒主要在细胞的高尔基氏区装配成熟，从病毒的形态特征及病毒在细胞定位来看，与Murphy, Jelinkova等报告的CHF病毒结构特征类似^[5,6]。不少报道提及布尼亚病毒及其亚群病毒在复制中出现上述两种类型颗粒^[5,6,7]。我们认为XHF病毒的两种颗粒形态可能是病毒复制过程的不同时期。

在病毒血清学试验中，XHF病毒与CCHF病毒在抗原性上是一致的^[3]，从形态学的观察中也看到XHF病毒与文献上所描述的CCHF病毒是相同或相似的^[5,6,8]。总之，从形态学及病毒结构等方面来看，我们认为XHF病毒也应同属于布尼亚病毒科，内罗病毒属^[9]。

病毒的形成和复制是一个十分复杂的过程。我们在Vero E₆细胞感染XHF后，病毒体装配的前期，看到细胞质中有由小颗粒组成的环状及螺旋状的病毒前体。不少报告中提到虫媒病毒有病毒前体^[8]，但这种结构并不能经常见到。通过我们的观察，看到XHF病毒从形成初期到病毒装配，是在细胞内的高尔基氏区、内质网等内膜丰富的部位，它们利用宿主细胞的膜结构组装病毒的囊膜，然后释放到细胞外。而且看到不易见到的病毒前体结构和形态。

摘 要

本文观察了XHF病毒在Vero E₆细胞中的形态。XHF病毒在细胞内外均有，病毒定位于细胞的高尔基氏区、内质网及空泡中。XHF有囊膜，圆形或椭圆形，直径为85~105毫微米，在电镜下可见到病毒复制中的病毒前体和病毒芽生形态。从形态和结构上XHF与CCHF病毒相似，同属于布尼亚科病毒。

ABSTRACT

XHF virus was detected by electron microscopy in ultrathin section of Vero E₆ cells. Round or oval particles of 85-105nm in diameter with envelope were found intra- and extracellularly. In the cells, the virus particles were observed in the Golgi region, intracytoplasmic cisternae or vesicles. The precursors of mature virion and budding virions of the reproduction cycle of XHF virus were also found. Based on their size, the density of contents and structure, XHF and CCHF viruses were extremely similar. Both were Bunyaviridae, Nairobi virus.

参 考 文 献

1. 新疆维吾尔自治区卫生防疫站：新疆出血热资料汇编(内部资料) 1975。
2. 中国医学科学院流行病防治研究所等：流行病防治研究，(2)：71, 1973。
3. 严玉辰等：中华流行病学杂志，4(3)：129, 1983。
4. 严玉辰等：中华流行病学杂志，4(3)：132, 1983。
5. Murphy F A et al: Intervirology, 1: 297, 1973.
6. Jelinkova A et al: Acta Virol, 19: 369, 1975.
7. Wong K K et al: Electron Microscopy, Vol. 2, P. 380, Microscopical Society of Canada, 1978.
8. Donets M A et al: Intervirology, 8: 294, 1977.
9. Bishop DHL et al, Intervirology, 14: 125, 1980.

新疆出血热病毒特性的研究 (III)

(正文见135页)

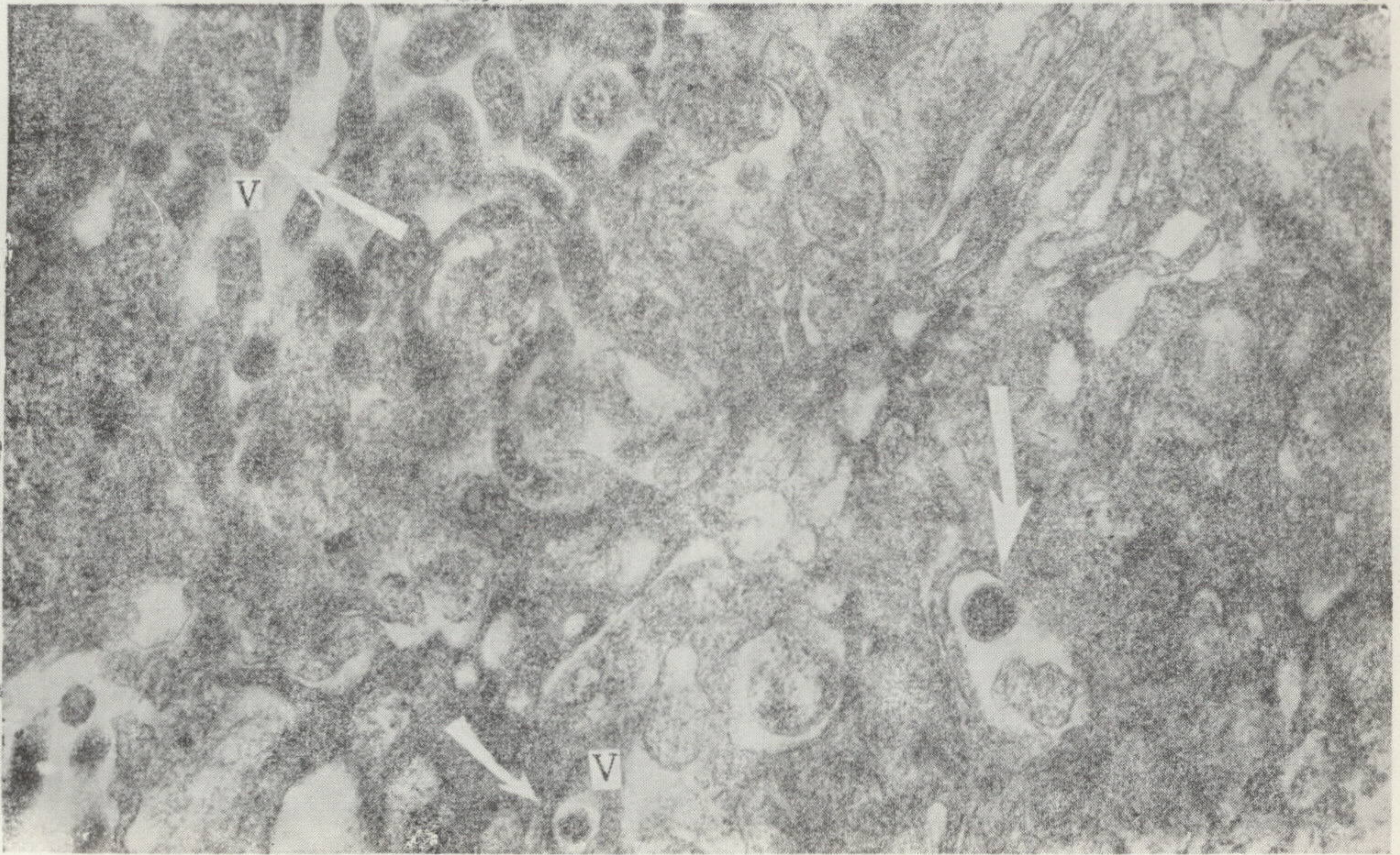


图1 新疆出血热病毒在VeroE₆细胞中的超薄切片, 箭头处可见XHF病毒, 中心电子密度较高, 直径为92—105nm, 在高尔基氏区呈单个出现。图中V为Virion (病毒颗粒) ×28,000

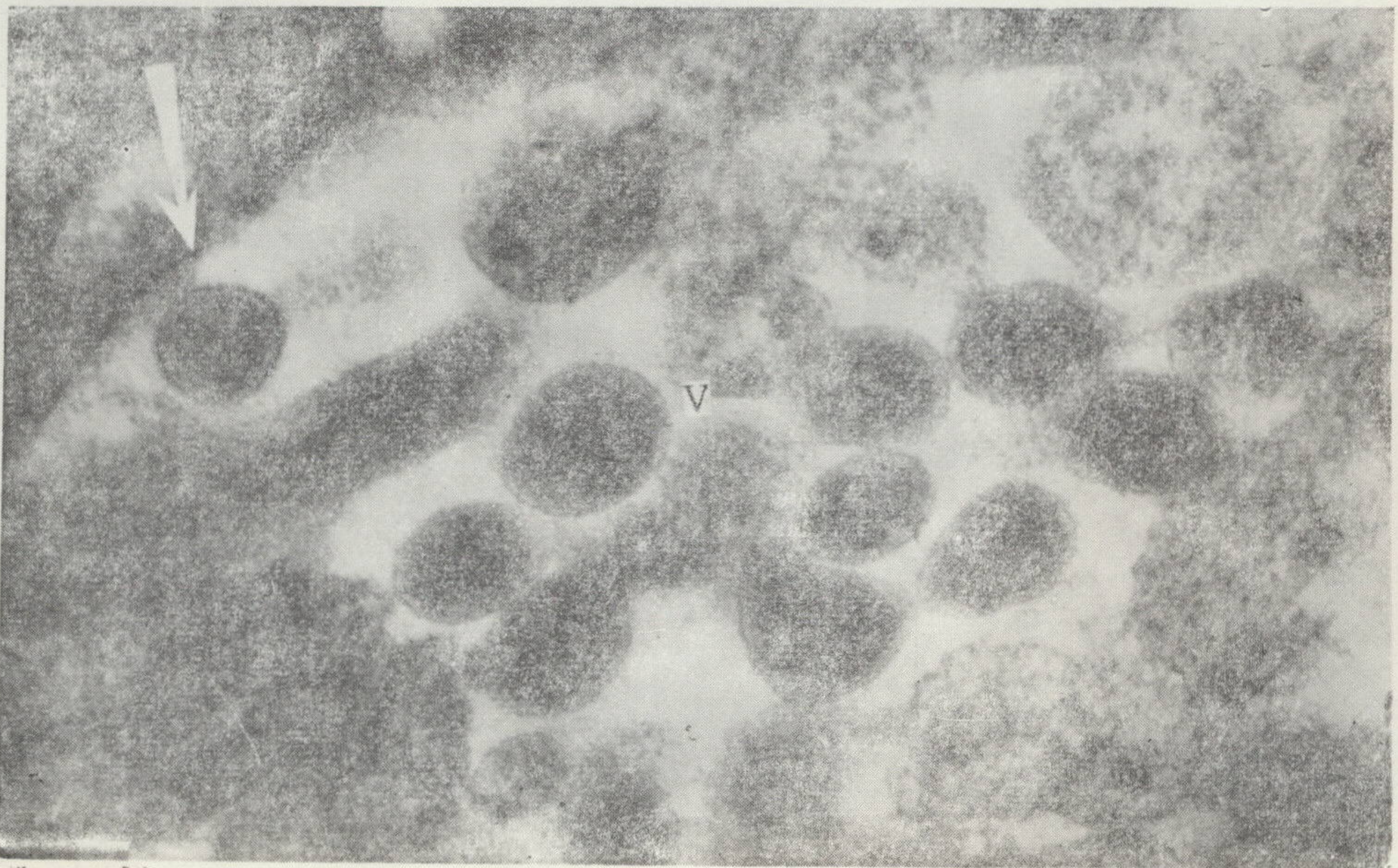


图2 成堆的XHF病毒, 中心电子密度较高, 外面有一层较薄的囊膜 ×105,000

(正文见135页)

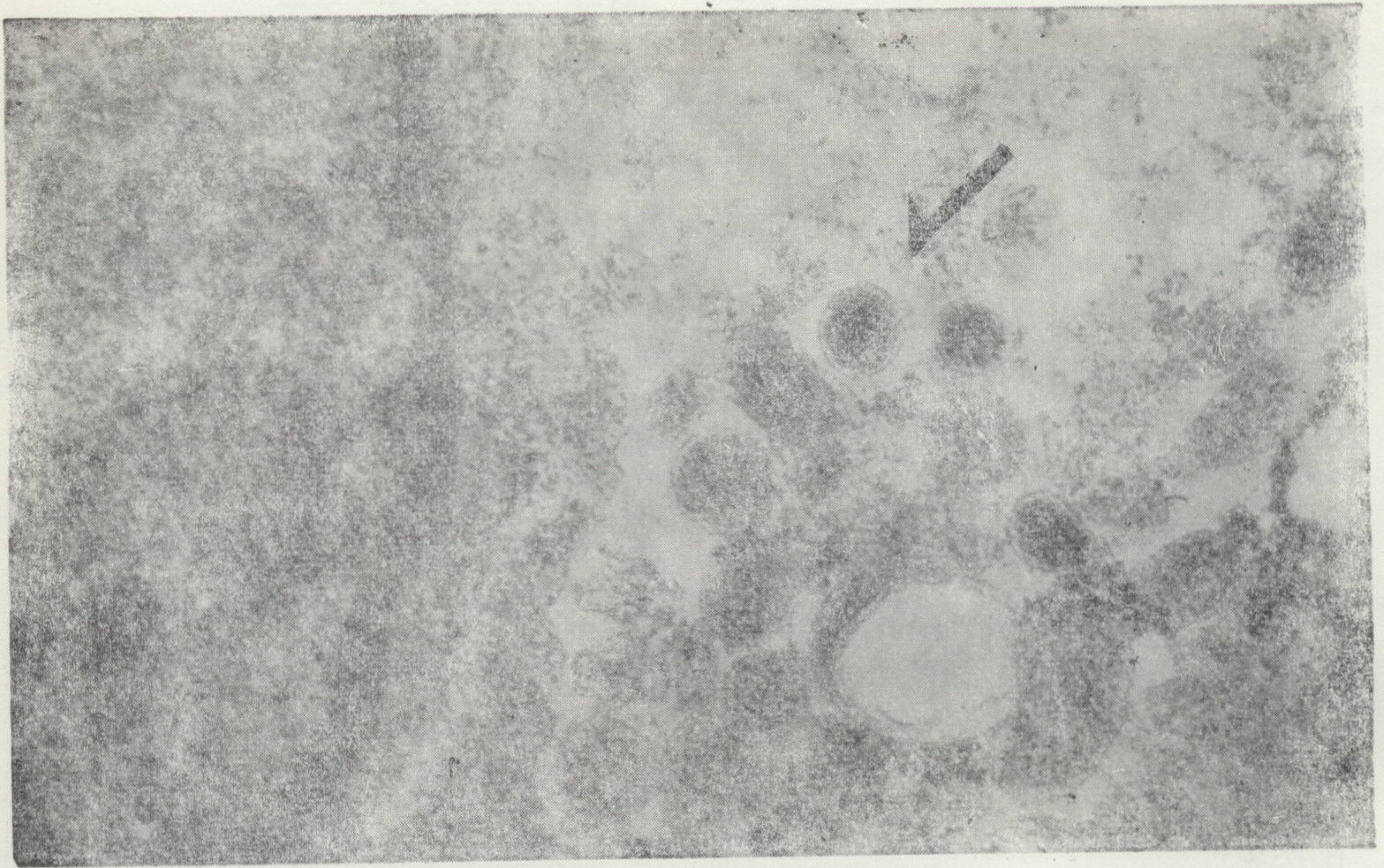


图3 新疆出血热病毒颗粒 ×65,000

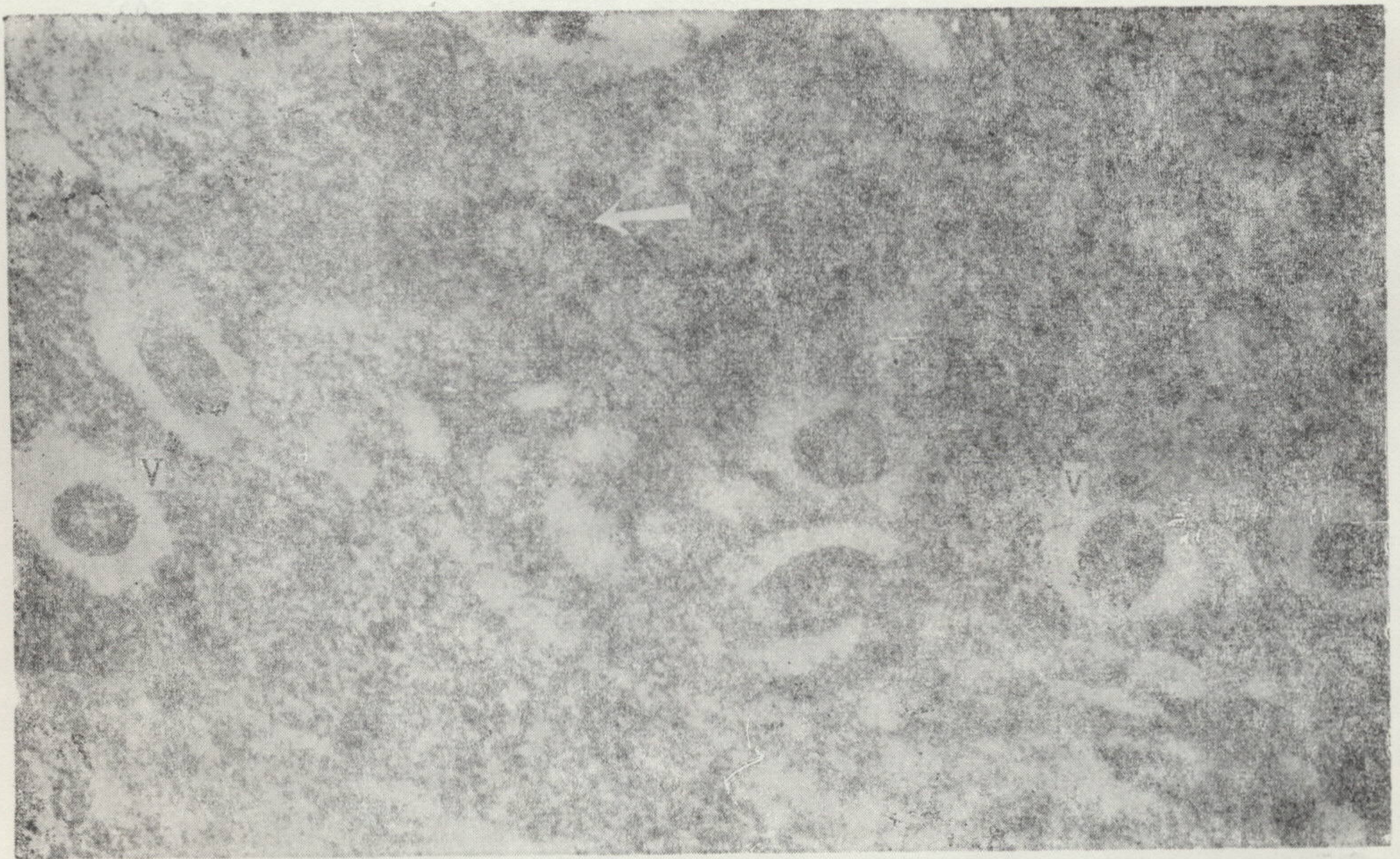


图4 中心电子密度较低的XHF病毒, 可见到病毒核部位有细的纤维丝 (V箭头处) 及由颗粒组成的病毒前体 ×72,000

(正文见135页)

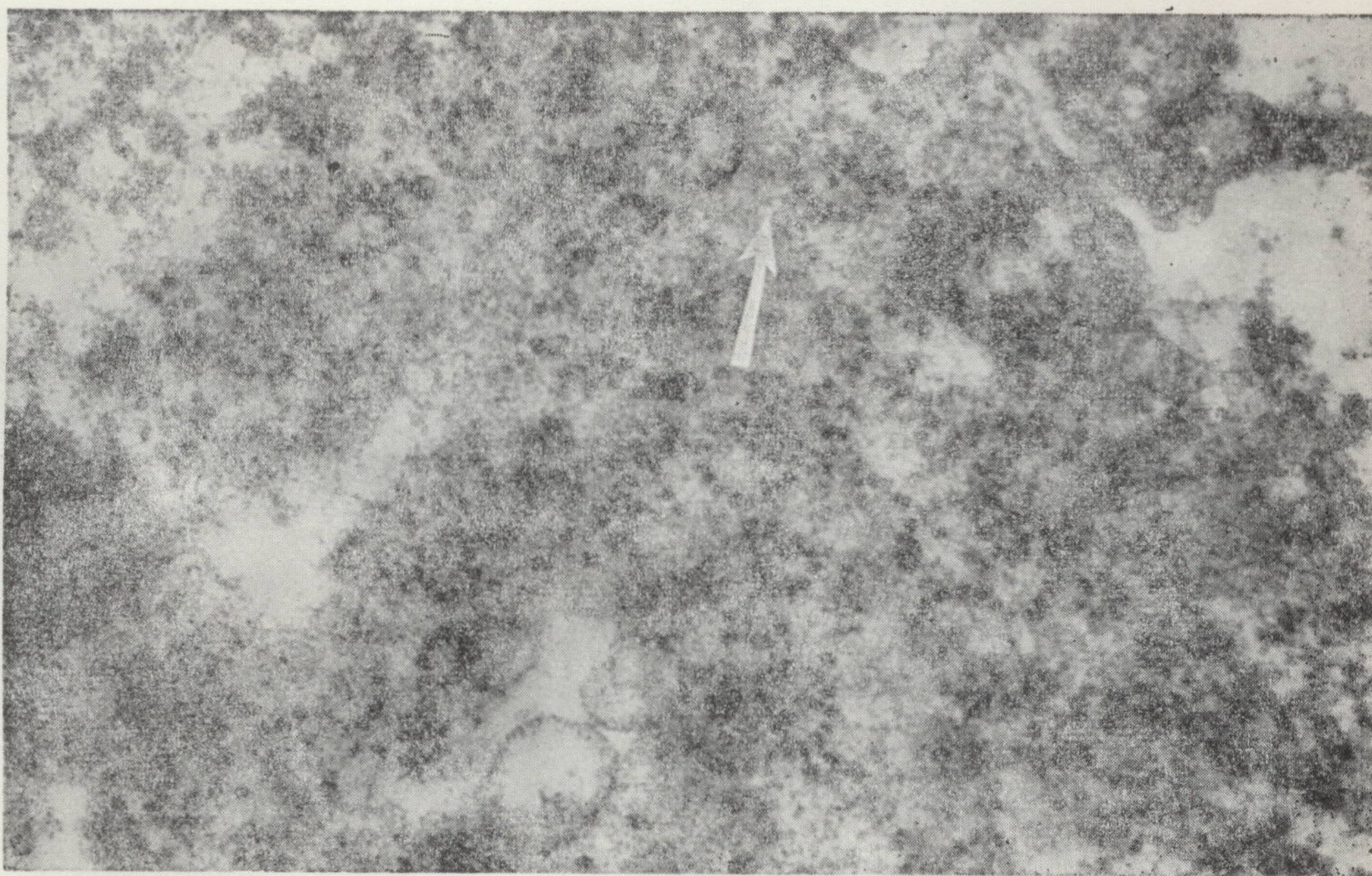


图5 XHF病毒的病毒前体，呈环状或螺旋样结构，由小颗粒构成 $\times 625,000$

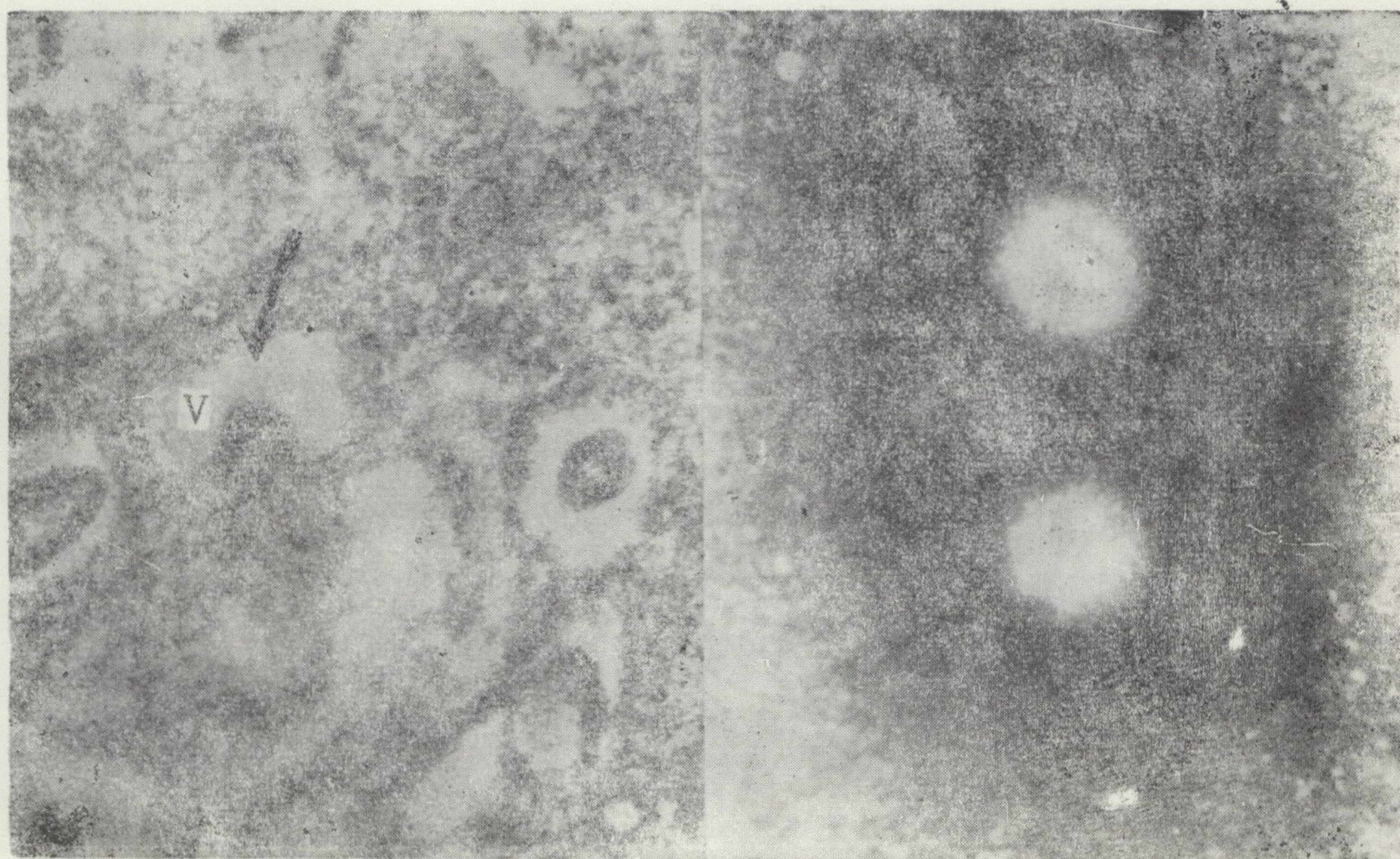


图6 中心电子密度低的XHF病毒利用宿主细胞的膜结构芽生形成成熟病毒 $\times 68,000$

图7 XHF病毒负染色的电镜图像 $\times 140,000$