维普资讯 http://www.cqvip.com

①
93,18(1)
1—3

乳鼠脑内感染肾综合征出血热病毒的电镜和免疫电镜观察

R 373.32

微生物教研室 罗玉刚 裴润芳

提 要 本文观察发现乳鼠大脑皮质神经细胞、胶质细胞和毛细血管内皮细胞均对HFRS-V易感，病毒在细胞浆内增殖，可见呈特异性着色反应的不同成熟阶段的病毒颗粒和病毒包涵体，其邻近的膜性结构也常呈特异性着色，感染细胞内，有时可见呈特异性着色的小空泡样颗粒和病毒抗原性物质，其与病毒形态发生的关系尚待进一步研究。

关键词 肾综合征出血热病毒；病毒形态发生学；免疫电镜 流行性出血热，肾病综合征
中图分类号 R373.32；R392.31

近年来，有许多学者对肾综合征出血热病毒（virus of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome，简称HFRS-V）的形态和形态发生学进行了研究[1—5]，目前关于HFRS-V的形态学资料主要来源于病毒-细胞培养系统的观察，而对病毒-感染动物系统的观察尚少[6—8]。为进一步比较HFRS-V与布尼亚病毒科已知成员的形态和形态发生学，进一步阐明HFRS-V与HFRS发病机理的关系，我们采用常规电镜和免疫电镜技术，观察了HFRS-V感染鼠脑的超微结构病理改变及病毒的形态发生。

材料和方法

1. 毒株及主要药品试剂

（1） 毒株 HFRS-V陈株，系安徽省医科院分离适应于Vero-E6细胞[9]，由重庆市卫生防疫站转赠。

（2） 兔抗HFRS-V血清 由浙江省卫生防疫站提供，经本室用硫酸铵盐析法提纯制备特异性IgG。

（3） 酶标羊抗兔IgG 成都生物制品所提供，批号88-1。

（4） 多聚甲醛—赖氨酸—过碘酸钠固定剂（PLP）按文献[10]配制。

2. HFRS-V感染鼠脑传代及标本采取

用HFRS-V陈株Vero-E6细胞培养上清液脑内接种2～3d龄乳小白鼠，每只0.02～0.03ml，连续传4代，至第5代开始，分别于接种后第4d、6d和濒死期活杀取大脑皮质，切成1mm³和3mm³大小，放入PLP液中固定6～7h，同时取同龄正常鼠脑对照，1mm³标本用于制作常规电镜标本，3mm³标本用于制作免疫电镜标本。

3. 电镜标本制作

（1） 常规电镜标本制作

组织块经PLP固定后，再经1%O_sO_4后固定2h，转入酒精-丙酮系列脱水，醋酸铀块染，环氧树脂618包埋，超薄切片，柠檬酸铅复染，以JEM-100SX和H-600型电镜观察。

（2） 免疫电镜标本制作

组织块经PLP固定后，依次进7%、15%、25%蔗糖PBS，每次4～12h，恒冷箱冰冻切片，切片厚5μm，收集于含4.5%蔗糖PBS的试管中，按文献[11]的方法并略加修改，在切片中依次加入下列试剂，①3%H_2O_2—0.05M pH7.6 Tris盐酸缓冲液，室温30min；②含0.02%皂素的PLP液，室温

维普资讯 http://www.cqvip.com

5min；③1:20兔抗HFRS-V血清，37℃1h，转4℃冰箱过夜；④1:25酶标羊抗兔IgG，37℃1h，转4℃冰箱过夜；⑤ 2.5%戊二醛固定30min；⑥ 含0.012%氯化钴和0.01%硫酸镍铵的DAB盐酸盐溶液，室温20min，再加入过氧化氢(终浓度0.01%)室温20min。以上每步反应之后均以0.01M pH7.2 PBS（含4.5%蔗糖）浸洗3次，每次5～10min，然后转入常规电镜标本制作程序，一部分标本不加铅铀染色，超薄切片，以JEM-100SX和H-600型电镜观察。同时设置正常鼠脑、正常兔血清，阻断实验和底物对照。

结　果

在电镜下观察，乳鼠感染HFRS-V后不同时期，大脑皮质中神经细胞、胶质细胞及毛细血管内皮细胞均发生不同程度的超微病理改变，在感染后期胞浆内出现病毒包涵体及病毒颗粒。

1. **感染早期（接种后第4d）** 胞浆内高尔基体增生扩张，囊膜堆数目增多，内质质网小池小泡扩张，个别细胞内可见包涵体（未列出照片）。

2. **感染后期（接种后第6d和濒死期）**

高尔基体及内质网明显增生、扩张，线粒体肿胀、空泡化，核糖体明显增生，核膜凹凸卷曲甚至断裂溶解，在胞浆空泡内及胞浆基质均可见病毒颗粒（图1,2,3,4）。

（1） 病毒颗粒的大小、形态

病毒颗粒在胞浆内比较分散，形态多为圆形或椭圆形（图1,2,3），少数为杆形（图4），病毒外围以包膜、膜上可见排列较规整的刺突，核心为比较疏松的细颗粒状(图1)，有的可见一明显的电子致密"核芯"(图2,3)，病毒颗粒大小在87—150nm之间，平均97nm，杆形颗粒位于胞浆空泡内，直径约51nm，长约180nm。

（2） 病毒的装配成熟

胞浆基质内可见处于不同装配阶段的病毒颗粒（图2），其中有一种环状或螺旋状的结构，直径约110nm（由直径约15nm的小颗粒排列而成），形态不很规整（图2短箭号），我们称之为"病毒前体"。成熟病毒颗粒与病毒前体均呈特异性着色反应。胞浆内有时可见病毒正从空泡膜或内质网膜芽生成熟（图2,3箭号），经免疫电镜证实芽生部位的内质网膜表面有免疫复合物沉积（图3箭号）。

（3） 包涵体

感染细胞内常可见呈特异性着色反应的包涵体（图5，6），与包涵体邻近的内质网膜、核膜及细胞膜也常呈特异性着色反应（图5长箭号、图6箭号），在包涵体附近可见呈特异性着色的病毒颗粒（图5短箭号）。在感染细胞浆内有时可见呈特异性着色反应的成堆排列的圆形小空泡颗粒，直径约40～50nm（图7箭号），其与包涵体性质不同。

（4） 病毒的释放

在细胞外未查见病毒，也未观察到病毒释放的全过程，只观察到病毒从细胞膜芽生释放的趋势（图8），在芽生处的细胞膜有电子致密性增厚（图8箭号）。有的感染细胞膜下可见厚约25nm呈特异性着色反应的电子致密物（图9箭号）。

讨　论

HFRS-V的形态发生较为复杂，用常规电镜在动物感染组织中难以找到病毒颗粒[5]，我们采用改进的免疫电镜技术观察感染的鼠脑组织，获得了较满意的结果。

1. HFRS-V的形态和形态发生

HFRS-V已归属于布尼亚病毒科，我们观察到的病毒形态和内部结构与文献报道的基本一致[1～5]，此外尚观察到有的病毒有一明显致密的核芯，可能为未成熟病毒。HFRS-V的成熟模式与布尼亚病毒科已知成员不同[6～8]，可通过内质网膜、高尔基体束泡及细胞膜多部位芽生成熟，且这些膜性

维普资讯 http://www.cqvip.com

结构表面常有特异性电子致密物沉积[1~5]，通过与布尼亚病毒科已知成员比较并结合我们的观察，认为这些特异性电子致密物沉积的膜性结构部位可能就是HFRS-V芽生成熟的部位。

布尼亚病毒科病毒感染的细胞内没有病毒前体颗粒[6~8]，而HFRS-V感染的细胞浆内可见不同装配成熟阶段的病毒颗粒，其中有一种呈螺旋状或环状的病毒前体结构，与新疆出血热病毒前体相似[12]，这些不同装配阶段的病毒颗粒均呈特异性着色，表明其均为病毒性结构。病毒可能在胞浆基质内装配成核衣壳及病毒前体，再通过细胞膜性结构芽生成熟。病毒释放主要为芽生释放[1~4]，我们也观察到病毒有从细胞膜芽生释放的趋势，但未观察到细胞破裂和细胞排粒释放[5]。

与布尼亚病毒科其它病毒不同，HRRS-V感染细胞内有较多的包涵体，其附近常可见未成熟病毒颗粒[2,3]，邻近的细胞膜性结构常具有病毒抗原性，这些特征均提示包涵体与HFRS-V的形态发生有着密切的关系。此外我们在胞浆内观察到一种成堆排列的圆形小空泡颗粒，在细胞膜下观察到带状的电子致密物，它们均具有病毒抗原性，其与病毒形态发生的关系尚不清楚，有待进一步的研究。

2. HFRS-V的多嗜性

国内有文献报到，HFRS患者的血细胞、毛细血管内皮细胞及多个脏器均发现有病毒抗原，因而部分学者认为HFRS-V对组织细胞的直接侵害在HFRS的发病中有重要的作用[13~16]，我们的实验观察发现

（下转18页）

HFRS-V不仅侵害神经细胞，而且也侵害神经胶质细胞及毛细血管内质细胞，并引起相应的超微病理改变，这为阐明HFRS的发病机理提供了病原学的依据。

参 考 文 献

[1] Mc Cormick JB, et al. Lancet 1982; (1):765

[2] 洪 涛，等. 病毒学报 1985; 1(1):30

[3] Hong Tao, et al. Intervirol 1985; 23 (2):97

[4] 蔡保健，等. 中华流行病学杂志 1983; 4 (3):137

[5] 李德荣，等. 病毒学杂志 1986; 1(4):37

[6] Lyons MJ, et al. Virolcgy 1973; 54: 37

[7] Bishop DHL, Shope RE. Comprehensive Virology. New York, Plenum Press 1979; 14(1)

[8] Jonathan FS, et al. Virology 1982; 121:61

[9] 倪大石，等. 中华医学杂志 1983; 63:65

[10] Mclean IW, et al. J Histochem Cytochem 1983; 22(2):1077

[11] Palmer E, et al. Archs Virol 1985; 85:189

[12] 李 锋，等. 中华流行病学杂志 1983; 4 (3):135

[13] 张小留，等. 中华内科杂志 1987; 26(8): 461

[14] 杨为松，等. 第四军医大学学报 1988; 9 (3):200

[15] 姚志强，等. 第四军医大学学报 1988; 9 (3):201

[16] 朱 平，等. 中华医学杂志 1990; 70(1): 41

（收稿日期 1991-05-15）