DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.01.003

小鼠实验性乙型脑炎的超微病理和乙脑病毒的形态发生与释放

陈立明 指导者：晏良逖 梁廷杰（病理解剖教研室）

提 要 本研究通过用流乙脑炎病毒京卫研Ⅰ株鼠脑悬液10^{-2}稀释后，以0.3ml/只剂量经腹腔接种于三周龄昆明种小鼠复制成典型的乙脑模型。鼠脑各取材部位的神经细胞发生一系列以超微病变为主的病理变化。

本文分早、晚两期系统地描述并讨论了这些变化，其中不少未见有关流乙脑炎病理及流乙脑炎病毒形态发生和释放的文献提及。根据这些形态变化与作者自己的见解提出了一个初步的流乙脑炎病毒（京卫研Ⅰ株）形态发生及释放方式。该病毒也可在少枝胶质细胞内复制。观察到小胶质细胞吞噬病毒粒子，未发现病毒复制现象。可见，小胶质细胞仍能保持其吞噬功能，不为病毒mRNA所控制、复制病毒粒子。

关键词 流乙脑炎病毒；超微病理；流乙脑炎

关于流行性乙型脑炎病毒所引起宿主细胞的超微结构变化以及其形态发生，迄今研究较少，且多是在培养细胞进行的[1~8]。各家对流乙脑炎病毒的形态发生存在不同意见，还有不少问题尚待解决。本实验用乙脑病毒京卫研Ⅰ株经腹腔接种于小鼠，引起乙型脑炎，观察该病毒在小鼠脑内引起细胞、特别是神经细胞的超微结构改变，探讨流乙脑炎病毒的形态发生，希望能对文献中在这方面存在的问题和分歧提出一些看法。

材料与方法

用三周龄，9～11g昆明种小白鼠99只，分致病和对照两组。致病组用鼠脑传15代的乙脑病毒京卫研Ⅰ株鼠脑悬液稀释100倍，每只经腹腔接种0.3ml。对照组用同量的正常鼠脑悬液注入腹腔。两组均于接种或注入腹腔后1、2、3、4、5、5.5、6、6.5和7天活杀取材。致病组每时点6只、机动12只*；对照组除2、7天点各6只外、其它时点各3只，每只动物均取大脑皮质、丘脑、中脑和延脑组织进行各种观察。致病组各时点和对照组2、7天点各取3只电镜观察材料；按常规程序制备样品，用DXB_2-10型电镜观察。对所有动物组织均用石蜡包埋、切厚6μ片，部份组织块切40μ的连续厚片，用HE染色。

*机动动物系补充未到取材时间死亡的动物，实际本实验9只动物于取材前死亡，仅取材作常规光镜材料。

观察结果

一、接种后动物的表现和症状

致病组接种后第3天，部份动物毛蓬起，活动减少。第四天出现神经系统症状。3只动物处于濒死状态。第五天出现后肢瘫痪，9只动物处于濒死状态。5.5～7天大多数动物处于濒死状态，9只动物未到取材时间死亡。2只仅表现活动减少，毛蓬起。对照组动物全部无异常表现。

二、光镜观察结果

接种后1、2天（指接种后1～2天活杀的动物，下仿此）各部位部份神经细胞胞浆增多，略嗜碱性。核仁明显，数目多达3～4个。脑膜和脑内血管扩张充血，脑膜血管周围有单核细胞浸润。3天部份神经细胞核固缩、胞浆嗜酸性。脑内血管内皮细胞轻度增生、肿胀，血管周围有少数单核细胞浸润。4天，部份神经细胞核固缩、胞浆肿胀，尤其丘脑、海马、中脑和延脑显著。血管周围炎细胞增多，少数向邻近脑实质浸润。5天后，神经细胞核多固缩或溶解，胞浆淡染，重者仅留下细胞轮廓。脑实质、尤其灰质出现各种形状软化灶。脑内血管周围炎细胞浸润非常显著，形成以血管为中心的炎

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

细胞结节，主要是单核、淋巴和少量嗜中性白细胞。脑膜和脑内血管扩张充血均非常显著。

三、电镜观察结果

1。神经细胞：接种后1天神经细胞无显著异常。2天及以后诸时点各部位神经细胞均有以下改变：

内质网的变化与病毒复制多泡体的形成：接种后2天起内质网普遍增生呈滑面内质网形态。腔扩张成管状（图1），内有圆形、卵圆形小泡、直或弯曲的小管和不规则形小泡状结构。尼氏体少而小。3天后，大多数扩张的内质网均含上述圆形或卵圆形小泡等成份，后者有单层膜包绕，内含或多或少低电子密度物质，其中散在高电子密度微粒。它们紧靠内质网壁或游离于腔内，大小不一，数量不等，少则几个，多时充塞于整个内质网腔中。后者常含圆形，平均直径约40 nm，电子密度高的病毒粒子，其它圆形或卵圆形小泡常含电子密度较高的核心（图2）。在无核心和有核心小泡以及病毒粒子之间有种种过渡型，显见病毒粒子是由小泡内物质、特别是高电子密度的微粒凝集发展而来。含上述各种成份之扩张的内质网断面显作形似多泡体的构造，但其功能不同于一般多泡体，而是在其中复制病毒，本文名之为流乙脑炎病毒复制多泡体（以下简称多泡体）。又因多泡体内小泡为病毒粒子复制构造，故命之为流乙脑炎病毒复制小泡（以下简称复制小泡）。多泡体内小管和不规则形泡状结构，虽然和小泡的内容相似，但未见有向病毒粒子的过渡形态，因此称为流乙脑炎病毒类复制小泡(以下简称类复制小泡)。多泡体腔中以复制小泡为主，有的则以病毒粒子为主（图3）。多泡体表面一般光滑，但可有少数核糖体。接种后4天起特别是5～6天，大多数受感染神经细胞显退行性变，多泡体结构溶解，病毒粒子、复制小泡等散于胞浆基质内（图4），复制小泡等结构崩解为颗粒性物质，但病毒粒子完好。少数神经细胞结构保存尚好，每见其扩张的内质网一端呈多泡体结构，另一端则保留内质网形态，但含有病毒粒子。

高尔基体：2天后，高尔基体数目、体积及转运小泡增加，扁平囊扩张，含有单个或数个复制小泡（图5）和病毒粒子。4天后高尔基体囊内病毒粒子增多，偶成串珠状排列，部份含病毒粒子的扁平囊壁溶解（图5）。所有标本均未见到含病毒粒子的小泡与高尔基体生成面接触。

微粒聚合体与微泡微管聚合体：接种后2天及以后各时点，神经细胞基质内出现两种和多泡体密切接触的结构：（1）由电子密度较高的细微颗粒组成的团块，颗粒大小不一，可小于或大于核糖体。本文称这些团块为微粒聚合体。它位于核膜附近或紧靠内质网及多泡体。（2）由微泡、微管组成的大小、形状不一的密集团块。团块中央主要是密集的微泡，周边有少数微管样结构突出（图7）。团块的一侧，每见大小一致的圆形小泡，其内含中等电子密度的物质，与团块中央的微泡之间有过渡现象（图6）。本文称这种团块为微泡微管聚合体。它常紧靠多泡体并与其融合，其微泡、微管以及旁边的小泡在融合处崩解，形成一种低电子密度物质，其中散布有高电子密度的微粒丛。后者的微粒与复制小泡内散在的及其核心中的微粒在形态上相似（图6），微粒聚合体和微泡微管聚合体之间有疑似的过渡型。

游离多聚核糖体：接种后2～3天，多数神经细胞内游离多聚核糖显著增加（图1）。3天后各时点，游离多聚核糖体逐渐退变、减少。多泡体聚集的细胞内多聚核糖体减少或消失（图2）。

线粒体：接种后1～2天，线粒体轻度肥大，3天后线粒体间腔扩张，形成局灶性空泡，重者脱落形成空泡。

细胞核：接种后2天起，部份神经细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

核形状不规则，核膜内陷形成核内假包涵体，核周间隙显不规则扩张。核膜增生、层次增多，内外两层面积增大，可分别凸入核内或胞浆，形成与核周间隙相通的泡状结构，其横断面或斜断面显作核内及核外空泡，内均可有类病毒复制小泡。偶在同一核周间隙内见到病毒粒子、类复制小泡和核膜灶性溶解（图7）。有时见微粒聚合体靠近核外膜。核仁增大、形状不规则，数目增多达3～4个。5天后部份神经细胞核呈坏死变化。

病毒粒子的释放：接种后5天，神经细胞周围和神经纤维网间隙内出现病毒粒子，并见到病毒粒子从神经细胞膜溶解处逸出细胞的现象。逸出部附近可有崩解的多泡体（图8）。部份神经细胞树突内含有多泡体。

2．少枝胶质细胞：接种后2～3天，部份少枝胶质细胞核仁增大，增多，滑面内质网和高尔基体增生，扩张的内质网和核周间隙出现复制小泡。3天后，胞浆内出现多泡体，高尔基体扁平囊内可见病毒粒子和复制小泡。部份细胞核固缩、多泡体溶解、病毒粒子散于胞浆基质内。5天后多数细胞显退变或坏死。

3．炎细胞和小胶质细胞：接种后2～3天，脑内毛细血管腔内有单核细胞聚集并见到一个单核细胞正在游出血管，血管周围有单核细胞浸润。此时小胶质细胞处于静止状态，3天后，单核细胞向脑实质中游走，小胶质细胞进入活化状态。这两种细胞均显活跃的吞噬现象，胞浆吞噬泡内含病毒粒子，髓鞘样结构，细胞碎屑和各种膜性成份。小胶质细胞内无病毒复制的形态表现。

4．星形细胞：接种后3天前，星形细胞胶质纤维增多。3天后，常见细胞肿胀、尤其突起和脚板，重者，细胞变性坏死，未见病毒复制现象。

讨　论

一、本实验用流行性乙型脑炎病毒京卫研Ⅰ株鼠脑悬液10^{-2}稀释后，按0.3ml/只液量经腹腔接种于3周龄昆明种小白鼠，引起了典型乙型脑炎，即复制成功京卫研Ⅰ株流行性乙型脑炎动物模型，可供病毒学和病理学研究之用。小鼠脑内炎细胞以单核细胞为主，先出现于血管周围，随病程进展沿血管侵入周围脑实质形成细胞结节和树样病灶等，与晏良遂等[12][13]所描述者完全一致。

二、经连续观察，特别是电镜观察，发现鼠脑神经细胞发生一系列显著病理变化。早期病变为神经细胞成份显著增生、肥大以及在此基础上复制病毒粒子；晚期病变为细胞器和复制病毒特异性结构的退变及病毒粒子的释放。

早期神经细胞病变：神经细胞内成份的增生、肥大约于病毒接种后2日开始，见于核仁、核膜、线粒体、内质网和高尔基体。这一系列改变是细胞合成功能亢进的表现，为病毒复制所必需。

在上述病变的同时或稍后，明显的病毒粒子形成过程开始。增生的内质网扩张，其中出现复制小泡与类复制小泡，成为多泡体。同时，扩张的核周间隙以及核内、外空泡中、高尔基体内亦出现病毒复制小泡或类复制小泡，考虑可能也是病毒粒子形成之处，但为数远远不如在内质网中（即多泡体）形成者多，至于高尔基体，虽不能完全排除其形成病毒粒子的可能，但其中发现病毒粒子的数目远较复制小泡为多，且肥大的高尔基体往往与核外膜密切接近，其中的病毒粒子与复制小泡等有可能来自核周间隙。

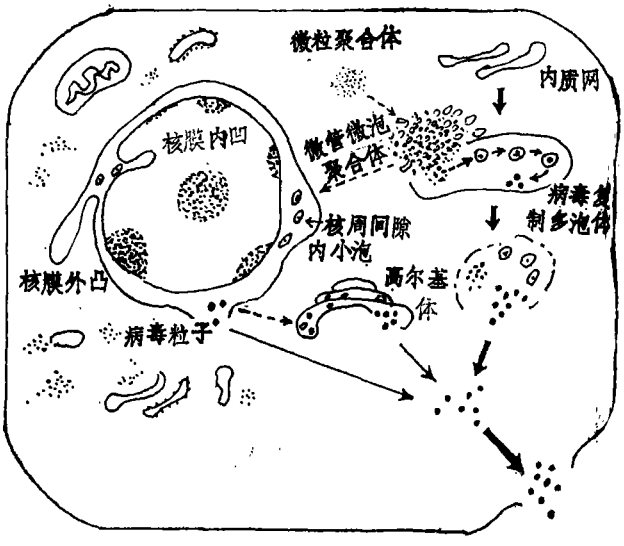
构成病毒的原料即病毒RNA与蛋白质或前期物质在何处形成，是一重要问题。据前述形态观察，考虑病毒RNA是在核仁中形成的，而病毒蛋白质则是在胞浆基质中的多聚核糖体合成的；这些物质在胞浆基质中聚合成微泡微管聚合体（微粒聚合体可能为其前期阶段）。微泡微管聚合体与多泡体等融合，其中微泡微管成份进入内质网等构

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

造中，转变成复制小泡的前身物质，而后变成复制小泡，泡中内容物凝集发育成病毒粒子。

晚期神经细胞病变：神经细胞出现退行性变，游离多聚核糖体溶解、消失，线粒体肿胀空泡化，核固缩或溶解，多泡体崩解，高尔基体和核膜局部溶解。病毒粒子从后三种结构中释放，进入胞浆基质。同时细胞膜局部溶解而形成缺口，进入胞浆基质的病毒粒子从缺口处排出细胞。

根据以上所述，将京卫研Ⅰ株乙型脑炎病毒在小鼠脑神经细胞内的形态发生和释放用示意图表示如下：



注：---→表示可能

三、据作者能参考到的文献，近年对流乙脑炎病毒形态发生的研究多数是观察感染的培养细胞，只有 Yasuzumi[9][10]是用脑内接种的方法感染小鼠。各家的观察得到一共同改变：即在大的泡状结构内含有小的泡状结构和病毒粒子。大的泡状结构称空泡(vacuole)或小泡（vesicle）。大泡中的小泡状结构有微泡（microvesciles）、球样小体（globular bodies）、平滑膜性结构（SMS）等名称。这样含小泡和病毒粒子的泡状结构与本实验所见者形态上一致。鉴于有充分证据说明病毒粒子复制是在其中进行，并且形态上颇为典型，可以认为是复制流乙脑炎病毒的一种特征性病变，故本文将其命名为流乙脑炎病毒复制多泡体；将多泡体内圆形或卵圆形小泡命名为流乙脑炎病毒复制小泡。多泡体内类似病毒复制小泡但形状不规则的各种构造，称为类复制小泡。

四、Yasuzumi等[9][10]和Leary等[8]较系统地提出了乙脑病毒形态发生的见解。Yasuzumi等[9][10]认为病毒粒子最初在细胞核内复制，然后出核进入含球样小体的空泡，球样小体功能不明；病毒粒子经有髓神经轴突释放。Leary等[8]指出Yasuzumi等所描述的核内病毒粒子可能是染色质周围颗粒或染色质间颗粒，我们考虑Yasuzumi等即令没有误认染色质周围颗粒或染色质间颗粒为病毒粒子，他们发现的核中病毒粒子也不一定是在核内形成的，而可能是核膜溶解，从核周间隙进入核中。Yasuzumi等[10]认为球样小泡是空泡壁凹陷入空泡内形成的内含变性的细胞浆基质，据其发表的电镜照片图4、图5和图6所示，球样小体中有明显形成病毒粒子的现象，且我们所称的复制小泡与球样小体形态相同。这种小泡在神经细胞病变早期阶段即可形成，而此时神经细胞正处于功能亢进状态，细胞基质毫无变性现象，且核内空泡中有类复制小泡，小泡内容不可能为变性的细胞浆基质，故Yasuzumi等所描述的球样小体实系流乙脑炎病毒复制小泡。

我们于京卫研Ⅰ株感染鼠脑神经细胞所见的微泡微管聚合体与Yasuzumi用Nakyama株感染鼠脑神经细胞所见者形态相同，他们认为与病毒发育有关，我们的材料支持这一见解。这种小体紧靠多泡体，并有与之融合的现象，进一步证明了其与病毒形态发

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

生的密切关系。

五、Leary 等[8]观察到本文所称的病毒复制多泡体，它们是作者参考到的文献中唯一认为病毒粒子是在多泡体内小泡中形成者。我们的观点与之完全一致。但他们认为这样形成的病毒粒子还须经内质网通道到达高尔基体，加工（糖基化），包装成和一般腺体的分泌颗粒一样，有一界膜包绕着进入胞浆基质。以后到达细胞膜，以胞吐方式逸出细胞。据我们的观察，这一观点，似尚有商榷余地，因为在神经细胞病变晚期，多泡体崩解，病毒粒子释放入胞浆基质，为一般规律，并有证据说明它们直接通过细胞膜因溶解而形成的缺口逸出细胞外；含病毒粒子的高尔基体扁平囊也有溶解破坏现象，病毒粒子可从此处逸入胞浆，无包装现象；同时，Leany 论文的插图也难以证明病毒粒子系由包装而排出高尔基体和由胞吐而排出细胞。

六、我国病毒学家庞其方等首先在感染乙脑病毒的培养细胞中，发现本文所称的流乙脑炎病毒复制多泡体，并观察到感染早期细胞功能活跃。作者也观察到神经细胞中一系列表明细胞功能亢进的形态变化。这些变化显然为其它研究者所忽略，事实上这是宿主细胞在病毒mRNA的控制下，为合成复制病毒所需物质的必备条件，故应将其看作病毒形态发生的重要部份。

七、过去于实验动物研究流乙脑炎病毒引起神经细胞超微病变和该病毒的形态发生者甚少，且系用脑内接种，并未注意接种动物是否发生了脑炎病变。本实验于小鼠制成的流行性乙型脑炎模型系经腹腔接种且发生了典型的光镜流乙脑炎病变，具有接近自然疾病的优点，有利于研究流乙脑炎的超微病理及其他方面的问题。

参 考 文 献

1. Ota Z, et al. A study of Japanese B encephalitis virus by fluorescent antibody method and electron microscopy. Japan J Clin Med 1963; 21:1939
2. Ota Z, et al. Electron microscopy study of the development of Japanese B encephalitis virus in porcine kidney stadle (PS) cells. Virology 1965; 25:372
3. 庞其方，等。流行性乙型脑炎病毒的电子显微镜研究。微生物学报 1964；10:294
4. Filshie BK, et al. Studies of the morphology of Murray Valley encephalitis and Japanese encephalitis virus growing in culture mosquito cells. Virology 1968; 34:435
5. Oyanagi S, et al. Electron microscopic observation in mice infected with Japanese encephalitis. Acta Neuropath 1969; 13:169
6. Kitano T, et al. Morphologic, chemical, and biological characterization of Japanese encephalitis virus virion and its hemagglutinin. Virol 1974; 14:631
7. Yoshinaka Y, et al. Morphological properties of Japanese encephalitis virus: Its nucleocapsid. Microbiol Immunol 1979; 23:39
8. Leary K, et al. Sequential events in the morphogenesis of Japanese encephalitis virus. J Ultrastr Res 1980; 72:123
9. Yasuzumi G, et al. Analysis of the development of Japanese B encephalitis (JBE) virus—electron microscope studies of microglia infected with JBE virus. J Ultrastr Res 1964; 11:213
10. Yasuzumi G, et al. Analysis of the development of Japanese B encephalitis (JBE) virus—electron microscope studies of neurons infected with JBE virus. J Ultrastr Res 1965; 12:304
11. Yasuzumi G, et al. Analysis of the development of Japanese B encephalitis (JBE)virus—electron microscope studies on inclusion bodies appearing in. J Ultrastr Res 1965; 12:317
12. 晏良遂，等。关于流行性乙型脑炎病理组织学几个问题。中华病理学杂志 1958；4：1
13. Yen Liang-suei, et al. Histopathology of experimental Japanese Type B encephalitis in Goats. Chinese Medical Journal 1964; 83:511

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

antigen in human are able to be depleted from epidermal grafts by epidermal cell culture, and suggest that the ECs cultured in our culture system can prolong their survival period as they are used as allografts.

Key words: Culture of human Human Epidermal cells; Langerans cells; Mixed epidermal cell-lymphocyte cnlture response (p.5)

Ultrastructural Pathology of Experimental Encephalitis B and Morphogenesis and Release of Encephalitis B Virus in Mice

Chen Liming Tutors: Yan Liansui and Liang Yanjie (Department of Pathology, Third Military Medical College)

An animal model of encephalitis B was successfully established with Jin Wei Yan I strain virus in mice, which made it possible to study the ultrastructural pathology as well as the morphogenesis and release of encephalitis B exerimentally.

The ultrapathological changes occurring to the brain tissues especially in the neuron cells were described systematically. A preliminary hypothesis about the morphogenesis and release of encephalitis B virus (Jin Wei Yan I strain) was proposed on the basis of these changes. Replication of the virus was also found to occur in the oligodendroglia but not in the microglia, which maintained its phagocytic function. This fact evidently shows that the micrioglia is not controlled by the mRNA of the virus.

According to the literature available to the authors, it seems that the ultrastructural pathological changes of encephalitis B with typical histological lesions in animals had not been reported previously.

Key Words: Encephalitis B virus; Ultrastructural pathology; Encephalitis B (p.9)

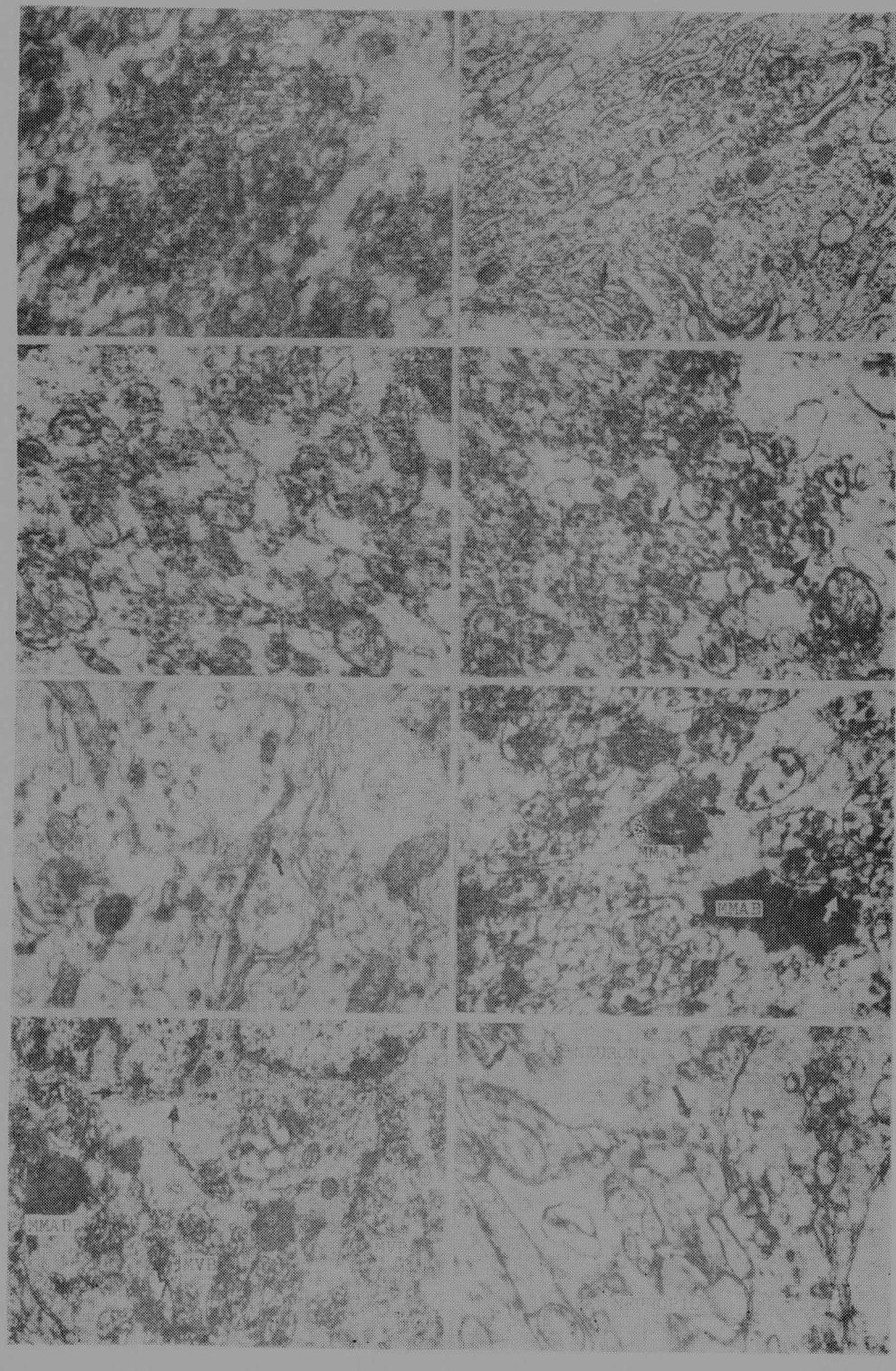
Effects of Activated Complement on Lung Fluid Exchange in Conscious Goats: Dependency on Superoxide Anion

Xie Zhonglin, et al (Department of Pathophysiology and Institute of Hypoxia, Third Military Medical College)

The effects of zymosan-activated plasma (ZAP) on lung fluid exchange and superoxide anion production by granulocytes were studied in 8 conscious goats with chronic lung lymph fistula. It was found that the circulating granulocytes were activated and the superoxide anion production was markedly enhanced af-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

小鼠实验性乙型脑炎的超微病理和乙脑病毒的形态发生与释放 （正文见第9页）



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

1|2
3|4
5|6
7|8

图1　神经细胞滑面内质网增多、扩张（白↑），尼氏小体变小，数目减少（黑↑），高尔基体体积增大，囊腔扩张，游离核糖体显著增多，溶酶体增加。接种后2天，×15,000

图2　神经细胞胞浆内含有大量的多泡体，其中部分复制小泡含有电子密度高的核心（↑）。接种后3天，×40,000

图3　神经细胞，一部分多泡体内以复制小泡和类复制小泡为主（白↑），而另一部分则以病毒粒子为主，并且泡壁有溶解（黑↑），胞浆基质中的游离多聚核糖体崩解。接种后4天，×54,000

图4　神经细胞内多泡体崩解，复制小泡与类复制小泡亦然，病毒粒子进入胞浆基质（内释放↑）。游离多聚核糖体破坏、消失，线粒体也遭破坏。接种后5天，×56000

图5　神经细胞高尔基体扁平囊内病毒粒子成串珠状排列，其囊壁部分溶解（黑↑），扁平囊内还含有复制小泡（白↑）。接种后5天，×36,000

图6　神经细胞、多泡体之间散在有微泡微管聚合体（MMAB），后者周边小泡和中间微泡有传行关系（黑↑）。聚合体和多泡体可以融合，融合处的复制小泡出现密度增高的核心（白↑）。接种后5天，×36,000

图7　神经细胞胞浆内出现大量的多泡体（MVB）和微泡微管聚合体（MMAB）。其一可见明显的微管状突起（白↑）。核周间隙不规则扩张，内含病毒粒子（黑短↑）和核膜局部溶解（黑长↑）。接种后5天，×16,000

图8　神经细胞胞浆内多泡体溶解（黑短↑），细胞膜局灶溶解，病毒粒子从该处逸出（黑长↑）。神经纤维网内也可见病毒粒子（白↑）。接种后5天，×24,000

绿脓杆菌外毒素A靶细胞的实验研究　（正文见第1页）

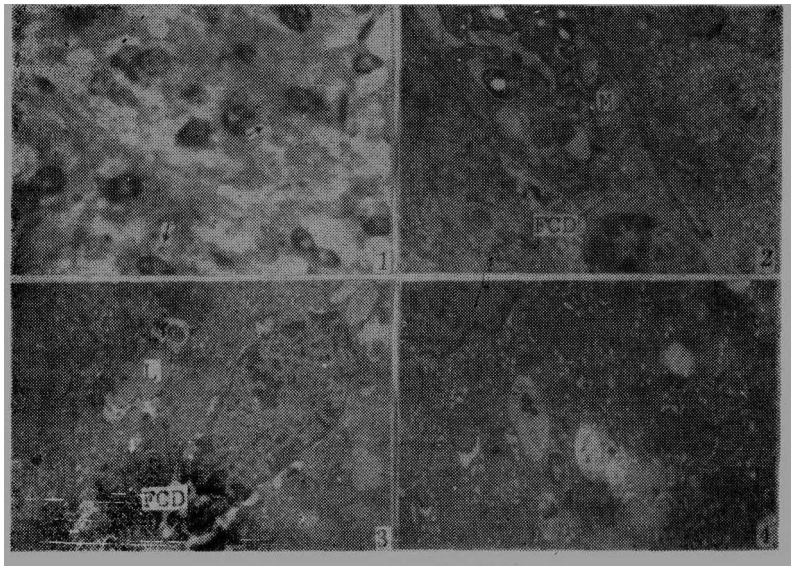


图1　肝索结构破坏、浊肿及空泡变性显著，胞浆内有自显影银盐颗粒出现（↑），HE染色，光镜1,000倍。

图2　靶肝细胞内质网显著扩张，可见多个髓鞘样结构（M）及FCD灶。电镜6,000倍。

图3　肝细胞内质网显著扩张，核周间隙扩大，可见脂质小体（L），髓鞘样结构（M）及灶性胞浆内变性（FCD）。电镜3,000倍。

图4　肝细胞内质网显著扩张，线粒体肿胀变性，脊模糊，可见多个FCD灶。电镜5,000倍。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n