

人类病毒性肿瘤——传染性软疣的电子显微镜研究

洪涛 龐其方 周静仪

(中国医学科学院病毒学系病理形态组, 北京)

传染性软疣 (Molluscum Contagiosum) 是人类的良性皮肤赘瘤。有关本病病原的性质曾有过许多研究, 其病毒性病因也早已确定。但有关本病的病毒和受侵细胞的超微结构研究还不多, 而且意见仍不一致。

近年来由于病毒与肿瘤的关系日益为人们所注意, 传染性软疣再次被列入研究的内容。由于大量动物病毒性肿瘤的发现, 病毒可以引起某些动物肿瘤的问题已经很少有人怀疑, 但是病毒引起肿瘤的机制, 尤其是肿瘤病毒与一般传染性病毒之间的区别何在, 则意见纷纷, 因此深入地了解肿瘤病毒的特性是很必要的。

Dourmashkin 和 Bernhard^[1], Charles^[2], Banfield 等^[3,4] 曾利用电子显微镜进行了传染性软疣病毒在人体上皮细胞内发展过程的研究, 并提出了病毒生活周期的意见。

本实验基于已有的病理和组织化学研究的基础, 利用电子显微镜作进一步观察, 研究了8例传染性软疣皮肤病变, 以便对此病的病毒发展过程和病灶的超微结构变化进行探讨。

一、材料和方法

所用材料来自4—30岁的传染性软疣患者, 用外科手术将各期皮肤病变取下*, 立即投入2% 缓冲锇酸液 (pH7.3—7.4), 在4℃下固定2—3小时。经酒精脱水后, 用甲基丙烯酸甲脂和丁脂 (2:8, 4:6 按需要而定) 包埋, 在56—60℃中进行聚合, 经24小时即制成组织块。在本院自制薄片式超薄切片机或民主德国 Jung-Mai 超薄切片机上制成切片, 主要在 WF, SEM-III 电镜和 Zeiss, Typ C 型电镜上进行观察并用国产电子感光片照相。

二、实验结果

(一) 细胞的超微病理变化

按皮肤细胞的深度不同, 受病毒侵害的程度不一, 病变程度也不相同。一般说来, 较深层的细胞病变轻于浅层, 愈向皮肤表面, 病变愈严重。

早期出现的细胞病变是核的变化和细胞浆内致密区的出现。核膜呈不规则褶皱状, 细胞核体积增大。有些核膜褶皱伸展得很长, 形成“伪足”状结构 (图2), 而且“伪足”的顶端往往界线模糊, 似乎使核浆与胞浆连成一片 (图3)。核内的核浆也呈有集结的倾向, 并

* 本实验所用之病例均由北京天坛医院、市第一医院供给, 特此致谢。

本文1962年12月14日收到。

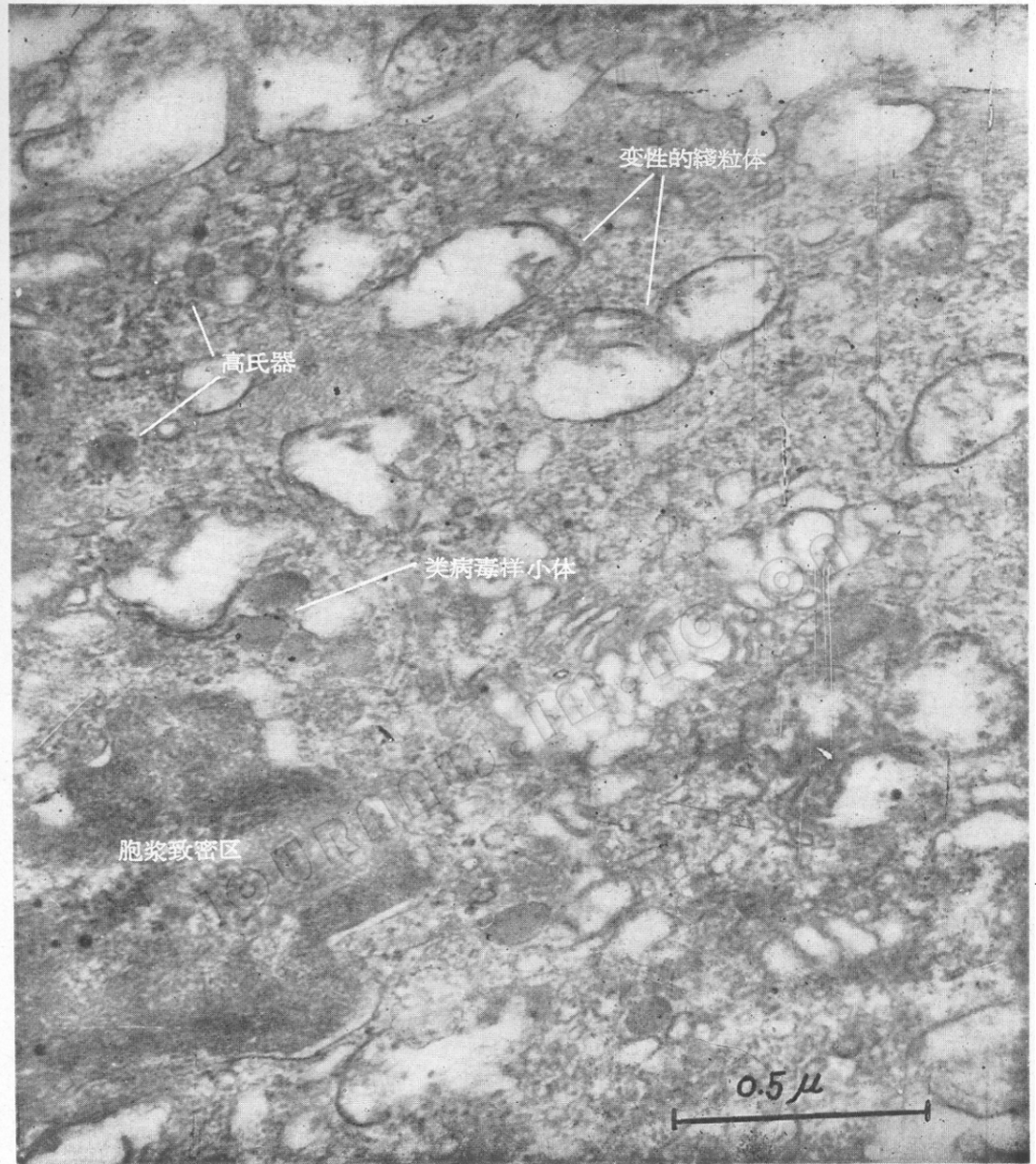


图1 上皮细胞胞浆的一部分， $\times 66,600$ 。

以核仁附近者较为显著。

核仁增大，以致达到原来的2—3倍。核中有时可见电子束不易透过的致密区（早期，见图1），以及许多大小不等的空泡（晚期病变，见图1、2）。

与细胞核变化的同时，细胞浆内基质的某些部分可见有明显的成团集合趋势。在这种致密的胞浆基质上可见无数的嗜锇酸性质点，成为各期病毒的发生基地。早期偶尔在一些病变的细胞浆内还出现少量而散在的类病毒样颗粒（图2）。

细胞浆内的线粒体病变甚为明显，呈现为各期变性。轻的表现为体积增大，嵴突模糊；重者嵴突消失，外膜折损，形成大小空泡（图1、2、3）。在病变严重的细胞内，成熟型病毒在数量上占绝对优势的区域中竟找不到线粒体的存在（图4）。

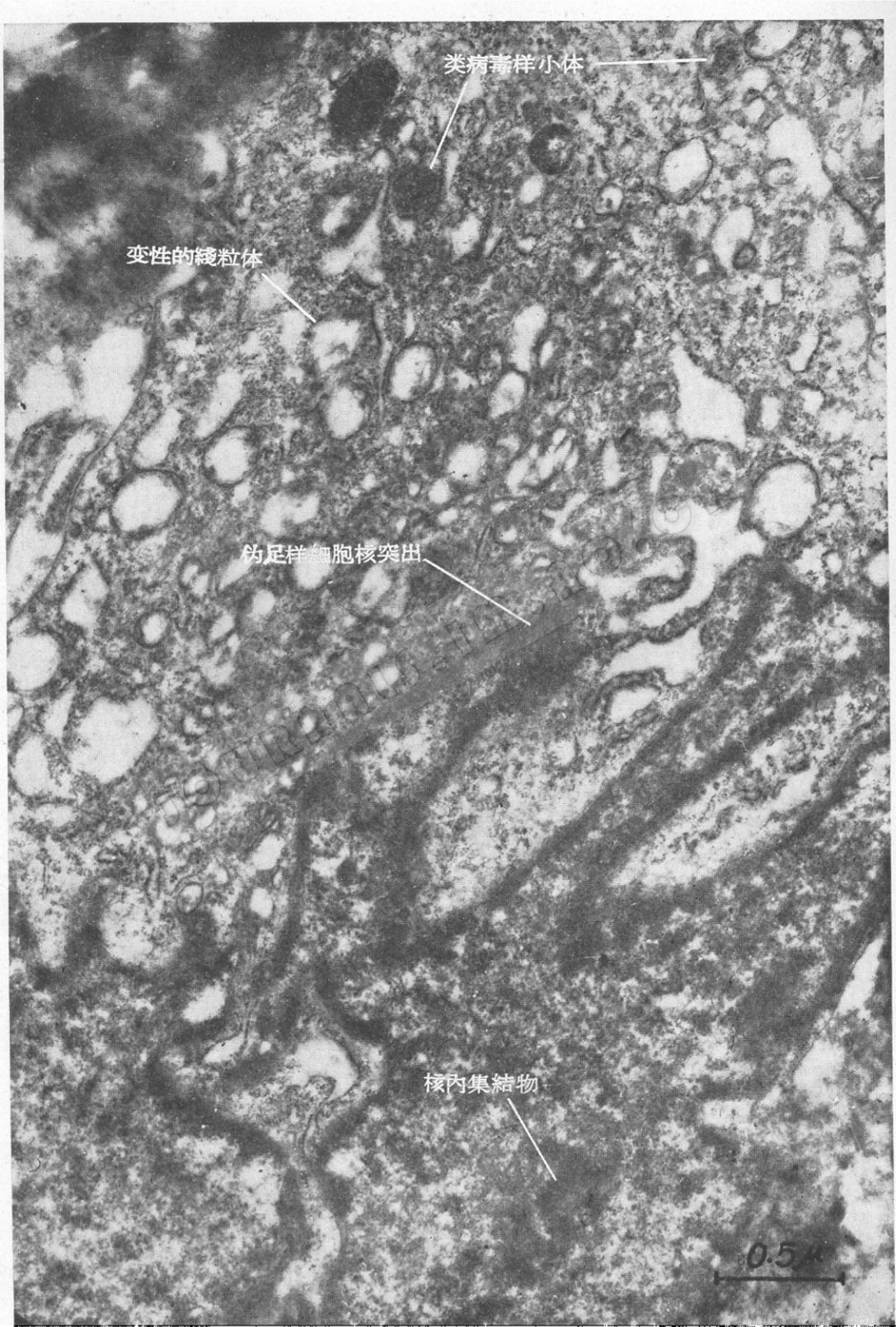


图 2 褶皱变形的上皮细胞核， $\times 36,000$ 。

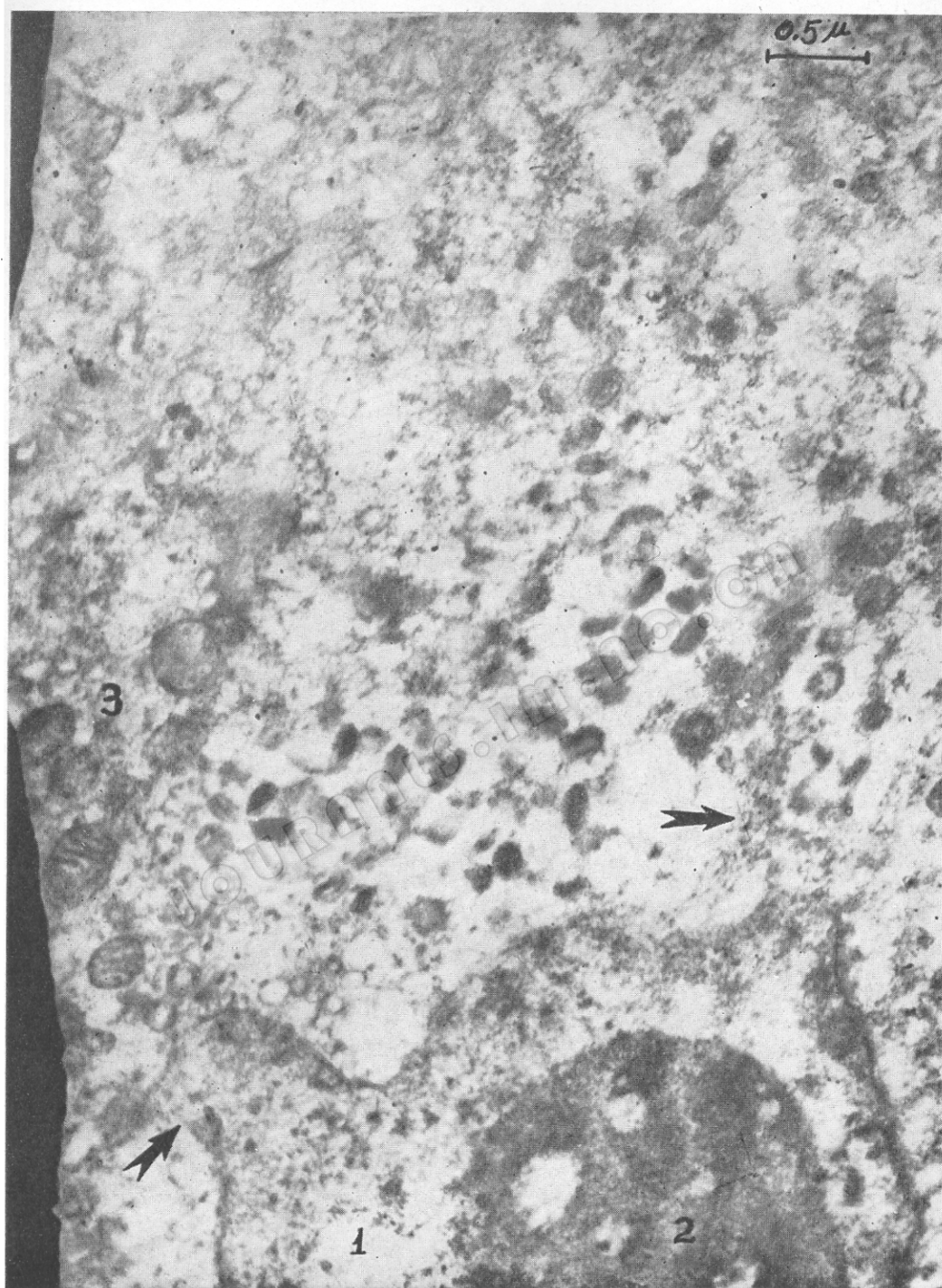


图3 1.有病变的细胞核；2.胀大的核仁内有空泡出现；3.线粒体不同程度的变性。

胞浆内可看到成熟和未成熟的病毒颗粒，箭头指示核浆和胞浆的融合处， $\times 25,000$ 。

内浆网质和高氏器已断续残存，附着在它们附近的微粒体也难以辨认。和线粒体一样，在严重病变的细胞里，上述几种细胞器亦不复见（图4）。

浅层皮肤细胞，亦即受到严重侵害的细胞，胞浆几乎全部为病毒包涵体所取代。细胞核则被压缩在一边，呈濒死状态。虽然核内有明显的病理变化，但核内从未发现有成形的病毒存在。

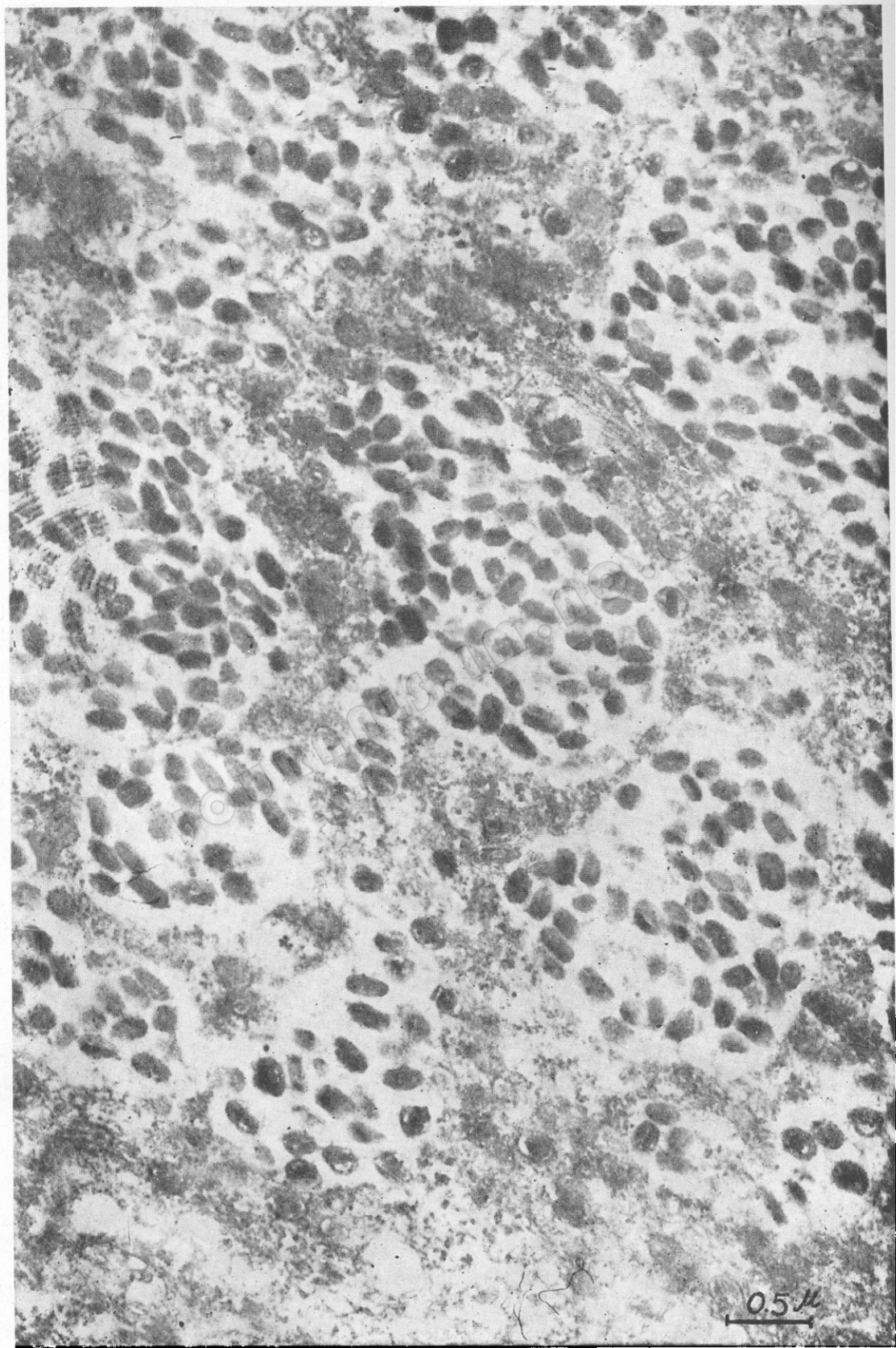


图4 传染性软疣成熟的包涵体， $\times 25,000$ 。

未成熟的病毒成簇存在其外周不見細胞基質。在 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

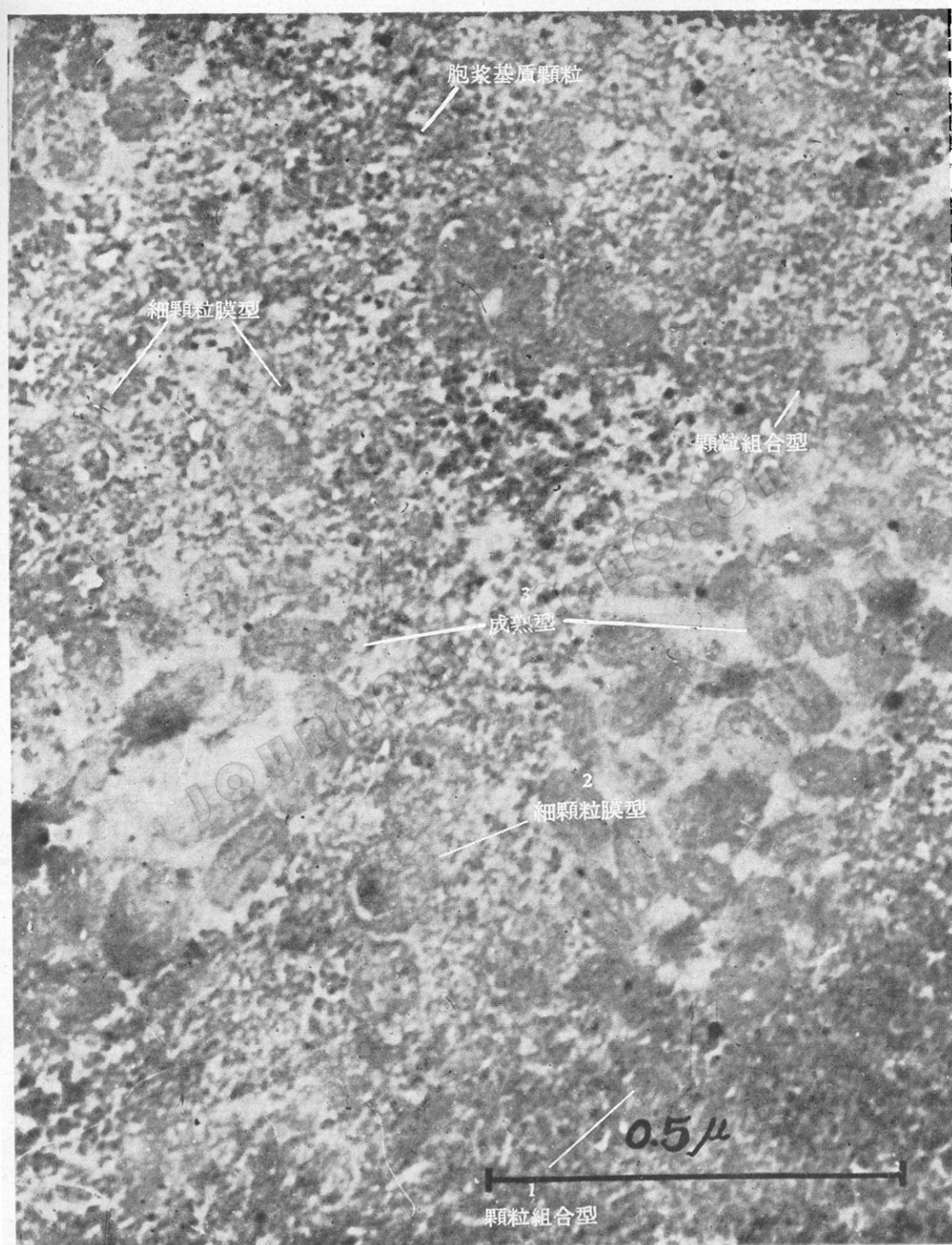


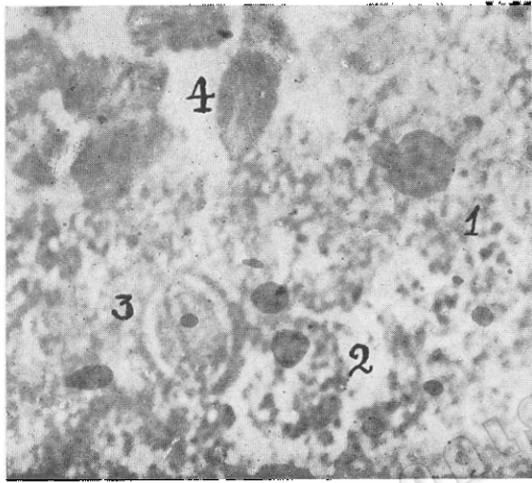
图 5 在胞浆致密区域内出现病毒颗粒。×100,000。

1. 颗粒组合型；
2. 细颗粒膜型(注意偏核)；
3. 成熟型。

(二) 病毒的形态和内部结构

在受染细胞浆的颗粒性基础上逐渐显出病毒形态。兹将观察到的 3 类病毒分别描述于后：

1. 颗粒组合型病毒，出现于受染细胞浆基质浓缩区内，体积较大，约 250—300 毫微米。此型病毒也可称为初期型病毒，是由多数嗜锇酸性颗粒质点（约 40—50 Å）集合而成。其质点颗粒开始融合，质点间界限变得模糊不清，并且与分布均匀的胞浆基质之间开始出现间隙。在大多数情况下已经可以辨认出中央部分（未来的核样结构）和外周部分（未来的膜）（图 5、6）。



2. 细颗粒膜型，也可称为中间型病毒。此型病毒常常与初期型病毒同时掺插并存，呈明显的椭圆形或圆形，直径在 150—200 毫微米之间，比初期型病毒为小。此型病毒的内部结构已初具规模，首先在其外层已能辨认有膜存在。往往在发展趋向完整的病毒外层可观察到双层外膜，各厚 30—35 Å，两层膜相距约 30 Å。在膜的内部是病毒浆（viroplasma），由细小而均匀的质点所组成。在这种病毒的中央部位或偏中央部位出现类病毒核样结构（vironucleoid structure），在类核样结构外层有一明显的空隙环（约 80 Å），将病毒浆与类核样结构相分隔（图 4、5、6）。

必须指出的是，发展尚未完善的本型病毒，其外膜可以不完整（断续地）的形式存在。而类核样结构可以有较大的体积（图 4、5、6）。

3. 成熟型病毒，此型病毒的病毒浆浓缩致密，细小颗粒质点的存在已不复见。它们呈砖形、椭圆形或橄榄形，体积较前二型都小，其长轴约 150—200 毫微米，短轴约 80—100 毫微米，其外层的双层膜已不可辨认，但与外界物质有明显的衬度差别。可能已具备了病毒膜（viromembrane）。

值得注意的是，在此型病毒中有明显的病毒核（vironucleus）形成。中间型病毒的

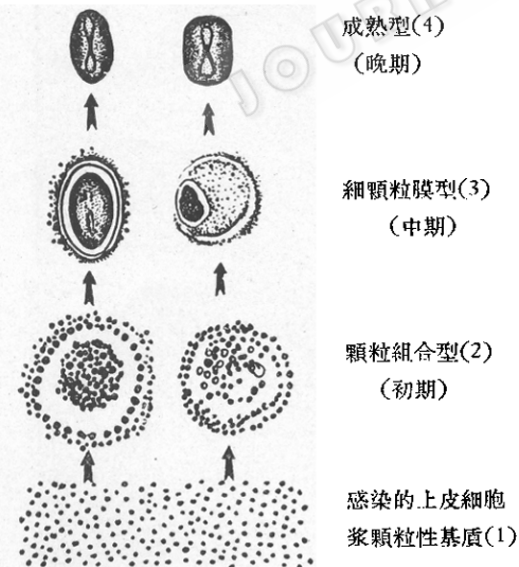


图 6 传染性软疣发展的示意图。

在上面的超薄切片像片中可见到发展各期的病毒。

类核样结构在本型病毒中已不可见，代之出现的是呈哑铃形的、处于中央部位的病毒核结构（图 5）。

成熟病毒几乎毫无例外地成簇存在，在其四周很少有细胞基质发现。成簇的成熟病毒往往将剩余的细胞基质分割成隔壁，病毒本身则处于“巢”内（图 4）。

以上三种类型的病毒按数量上的分布是: 初期型和中间型病毒主要存在于深层皮肤细胞中, 愈是到外层则愈少, 而成熟病毒愈靠外层则数量愈多。

三、討 論

Dourmashkin 等^[1] 在研究传染性软疣病毒生活周期时曾描写过 8 种病毒形态, 其中除“游离类核样颗粒”(free nucleoid particle) 外, 在我们的研究中都得到了证明。但他把各期病毒按组织细胞的深浅层次分类, 似乎与我们的观察结果有所不同。我们的观察是: 在感染的早期与细胞核变化的同时, 胞浆内出现基质的浓缩, 在此浓缩的基础上逐渐出现各种类型的病毒。深层上皮细胞中以未成熟的早期病毒居多, 成熟的占少数, 而浅层细胞中则大部分胞浆主要为成熟病毒所占, 但也有少数未成熟病毒。在未成熟的病毒里, 由于发展的早晚又可能有各种不同的过渡形态。我们认为深层和浅层细胞内的成熟与不成熟病毒只有量的差别, 而不能认为某一层次中仅有某种类型的病毒。

按本实验所获资料, 对病毒形成过程权作以下分析:

由电子显微镜观察所得图象看来, 病毒本身的形成与胞浆有密切的关系。胞浆基质先行局部浓缩, 并出现嗜钨酸性颗粒(40—50 Å)。这些颗粒逐渐团聚, 形成与周围有明显界限的“大颗粒”, 同时“大颗粒”内的嗜钨酸颗粒变成细小而均匀, 并区别于寻常的胞浆基质颗粒。在此种“大颗粒”中已出现类核样结构和膜的雏形, 但其结构分散而不完整。此种“大颗粒”我们称之为颗粒组合型病毒, 比成熟的病毒要大 2—3 倍, 又因它早期出现于基质部分, 故又可称为初期型病毒。

颗粒组合型病毒继续发展成长, 成为“细颗粒膜型病毒”, 或称中间型病毒, 呈椭圆或橄榄形, 比初期型为小, 但仍比成熟病毒为大。在中间型病毒内部已清晰可辨认其内部结构, 病毒体中央或偏于一面的区域中有浓缩的病毒浆, 形成类核样结构, 在类核样结构的周围有一层空隙环, 使类核样结构与病毒浆相互分隔。中间型病毒的另一特点是外膜已初具规模, 并在某些病毒中可见有双层的结构, 故我们又称其为“细颗粒膜型病毒”。

中间型病毒的继续发展, 就成为“成熟型病毒”, 这型病毒已具有明显的病毒形态特点, 体积小于以上两型病毒, 病毒浆内的细小颗粒已变成均匀物质。主要呈砖形, 椭圆和圆形, 在其中心部位往往可见有哑铃样结构, 而中间型病毒所具有的类核样结构已不复见, 可能已由类核样结构发展成为哑铃样核结构了, 哑铃样结构我们称之为病毒核。

成熟型病毒的外膜已不如中间型的清晰, 但从病毒本身与外界物质的界线的衬度上看来, 可以设想病毒膜已发展成为非常薄的一层膜结构, 并已能负起保护病毒本身或与外界相互作用的功能。这种外膜很可能用提纯病毒的阴性反差染色法, 在高分辨率电子显微镜中看到而证实其存在。

Morgan 等^[5,6] 在研究痘类病毒的发育过程时提出, 痘类病毒在细胞基质上首先形成核样小体结构, 然后由核样小体扩展而成病毒浆。Charles^[2] 把传染性软疣病毒的发育与痘类病毒作了比较, 并指出, 病毒浆出现于核样物之先, 核样物后来逐渐消散于已有的病毒浆内。

我们发现, 早在病毒开始由胞浆基质颗粒组合时, 病毒的中央核和病毒浆已能清楚辨认。中央部分与外周部分同时发生, 其轮廓渐趋明显(图 3、4、5)。病毒中央核在发育过

程中并不消失而改变其形态,到了成熟时期被哑铃样核结构所代替。

至于 Dourmashkin 等^[1]所观察到的中空病毒,在本实验中很少见到,即使有时可见,也是分散而个别地与初期型和中间型病毒混杂存在,而以上作者认为中空病毒是成熟病毒的见解,似不能在本实验中获得证实。相反地,本文作者怀疑中空病毒的出现是否是由于处理标本时人为的因素所致。

受侵细胞的早期病变表现为:核扩大,核膜呈不规则状凹凸而形成“伪足”,在核“伪足”外端的核浆与外面的胞浆相混合,以及较后期的核仁内空泡出现等现象说明,病毒在侵入上皮细胞的早期,虽然有形态特点的病毒尚未出现,可是细胞的反应却已被认出。很可能在早期感染时,病毒的分子亚单位已作用于细胞器(包括核内各部分)而引起病变。由于方法上的限制,本实验未作这方面的探讨。

值得指出的是,在细胞核“伪足”样突出的尖端,核膜往往变得模糊不清,核浆与胞浆在核膜缺损处有融合现象。这种融合现象可能来自两种原因:其一,为病毒对宿主细胞的侵害作用,使核膜受损;其二,可能来自细胞的主动代偿作用,在融合处核膜变弱,变松,以便加强胞核-胞浆间物质的代谢交换(图 2、3)。

在少量病毒出现在胞浆的同时,细胞浆中的线粒体变化很大:嵴突消失,膜也受损,体积胀大,形成空泡。此外,完整的高氏器和内网质已很少看到。较明显的是当大量病毒形成时,细胞浆基质减少,而且未成熟型病毒都存在于基质内,而在成熟病毒成簇之处基质几乎消失,说明细胞基质与病毒成长有一定的联系。按我们的推测,一部分细胞基质可能被病毒利用来繁殖自己。

关于传染性软疣的包涵体包膜的性质曾经有过不少报告^[7,8,9]。以往许多作者认为此种包膜或“细胞小束”是围绕病毒的外膜,与病毒发育无直接关系。近来的有关研究^[1,2],对此膜也未加讨论。从本实验资料看来,所谓包涵体包膜或“细胞小束”,实际上就是尚未被成熟病毒所占据的残余细胞浆基质。而且,在这些基质上可以见到处于各种发育过程中的病毒形态,因此对病毒发育来说是直接相关的。

本文叙述时用了病毒膜(viromembrane),病毒核(vironucleus),病毒类核样结构(vironucleoid structure)等名词。病毒既为细胞形态与非细胞形态生物的中间阶段,从推理上说来它具有一些膜、核等初步结构特征,是可以理解的。

四、总 结

作者利用电子显微镜技术研究人类病毒性赘瘤——传染性软疣——病毒的发育过程和相应的细胞超微病理变化。

在感染的上皮细胞里发现了细胞核的明显变化,讨论了变性细胞核“伪足”样突出及其尖端核浆与胞浆融合现象与病毒感染的关系。

与细胞核变化的同时,发现受染细胞的胞浆内出现致密区域,成为病毒发生的基地。

作者按形态特点描述了病毒发育过程中的 3 种类型:颗粒组合型(早期),细颗粒膜型(中期),成熟型(晚期),并讨论了它们之间的关系,分析了病毒的内部结构。

本文还讨论了病毒包涵体包膜的性质。

参 考 文 献

- [1] Doumashkin, R. & Bernhard, W.: *J. Ultrl. Res.*, 3:11—38, 1959.
- [2] Charles, A.: *J. Hyg. (Lond.)*, 58:45—58, 1960.
- [3] Banfield, W. G.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5:513—521, 1959.
- [4] Banfield, W. G. & Brindley, D. C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 81:145—163, 1959.
- [5] Morgan, C. et al.: *J. exp. Med.*, 100:195—202, 1954 a.
- [6] Morgan, C. et al.: *J. exp. Med.*, 100:301—310, 1954 b.
- [7] Rake, G., Blank, H. J.: *Invest. Dermat.*, 15:81—85, 1950.
- [8] Banfield, W. C., et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 77:843—847, 1951.
- [9] Blank, H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 54:869—874, 1952.

ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF A HUMAN VIRAL TUMOR—MOLLUSCUM CONTAGIOSUM

HUNG TAO, PANG CHI-FANG, CHOU CHING-YI

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Applying the electron microscopical technique, the sequential development of Molluscum Contagiosum virus and the corresponding pathological changes in ultrathin sections of human dermal cells infected by the virus were studied.

In parallel with the nuclear changes, some dense areas or congregating masses of cytoplasmic substrate which later served as the basis of the virus origin, appeared in the cytoplasm of the infected cells.

According to the morphological characteristics, three forms of the viral particles were observed in different stages, i.e. granular congregating form in the early stage; fine granulo-membraneous form in the intermediate stage and mature form in the late stage. These three forms were found to be dynamically related.

The changes of infected nuclei as noted in the early stage consisted of: foliation of nuclear membrane, formation of "pseudopod-like" protrusions as well as confluent phenomenon of the karyo- and cytoplasm at the end of the protrusion.

The possible causes of the confluent phenomenon of karyo- and cytoplasm and the nature of the capsule and septum of the virus inclusions were discussed.