

狂犬病毒鼠脑复壮后的典型形态恢复及 感染细胞内的形态发生学

韩小虎¹, 邹啸环², 江禹², 宣华¹, 涂长春^{2*}

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062)

(² 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062)

摘要:【目的】观察比较鼠脑复壮前后狂犬病毒的形态变化, 并观察病毒感染 BHK-21 细胞后不同时间的形态发生情况。【方法】以保存时间较长的 SRV9 毒株为原始材料, 经乳鼠脑传代复壮后接种 BHK-21 细胞, 浓缩、纯化后观察。【结果】(1) 未经复壮的病毒中 DI 粒子占较高比例, 典型粒子只占少数, 而复壮后典型粒子所占比例升高到病毒粒子总数的 90%。(2) 感染 24h 后在细胞浆内可以观察到典型病毒粒子, 其数量随着培养时间的延长而增加。带毒传代之后的培养过程中细胞内病毒数量增加不明显。(3) 病毒可以在细胞内的空泡膜表面以多种方式成堆出芽。【结论】(1) 鼠脑复壮可恢复狂犬病毒中典型粒子所占比例。(2) 带毒传代 1~2 次时为狂犬病毒收获的最佳时机。(3) 本研究为狂犬病毒的装配机制补充了数据。

关键词: 狂犬病毒; 复壮; 形态; 形态发生

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0834-05

狂犬病 (Rabies) 是由狂犬病毒引起的人畜共患烈性传染病, 目前尚无有效治疗方法, 发病后几乎全部以死亡而告终, 且 99% 以上的狂犬病死亡例发生在包括我国在内的发展中国家^[1]。野生动物是本病的自然储存宿主, 带毒犬是人狂犬病的主要传播来源, 犬的有效免疫是控制狂犬病流行的关键^[2]。其病原狂犬病毒为弹状病毒科的典型成员, 不同毒株在相同细胞内病毒粒子数量有明显差异。在培养过程中因感染量大或经长期培养易出现 DI 粒子^[3], 大量 DI 粒子的存在可显著降低病毒的免疫原性^[4]。

狂犬病毒 SRV9 株是本实验室以 SAD 株经过系列空斑克隆而筛选到的免疫原性好而毒力很低的弱毒疫苗株, 其毒力显著低于目前的弱毒疫苗 ERA 和 Flury 株, 与国际最低毒力的 SAG1 和 SAG2 毒力相当, 是目前毒力最低的动物用疫苗候选株之一^[5]。

研究发现, SRV9 用于口服免疫时, 未经复壮的病毒产生的中和抗体水平较低且保护期较短, 免疫效果不理想。经乳鼠脑复壮后, SRV9 免疫效果显著优于复壮之前, 免疫效果良好(数据另发)。为了探讨造成鼠脑复壮前后免疫原性改变的原因, 本研究观察比较了鼠脑复壮前后 SRV9 病毒粒子形态的差异, 从形态学角度分析其对免疫原性的影响。同时对 SRV9 在 BHK-21 细胞内的形态发生情况进行观察, 丰富了对狂犬病毒形态发生情况的认识, 也为狂犬病疫苗的生产提供了理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞 毒株为-80 保存 2 年以上的 SRV9。BHK-21 细胞由本实验室保存。细胞生长液和维持液分

基金项目: 国家自然科学基金(30600445); 国家“863 计划”(2006AA02Z456)

*通讯作者: Tel: +86-431-87960009; E-mail: changchun_tu@hotmail.com

作者简介: 韩小虎(1977-), 男, 山西忻州人, 博士研究生, 研究方向为人兽共患病。E-mail: hxx8849@163.com

收稿日期: 2007-11-05; 修回日期: 2008-01-25

别为含 5% 和 2% 小牛血清的为 MEM (GIBCO BRL)。

1.1.2 主要试剂和仪器: JEM-1200EXII 型透射电子显微镜 (日本电子公司); UC65 超薄切片机 (德国 Leica 公司); Sorvall Ultro pro80 型超高速离心机 (德国 Sorvall 公司), 及 Himac CR21 高速离心机 (日本日立公司)。

1.2 病毒的复壮、培养及收毒

病毒解冻后在 BHK-21 细胞培养 2 代后的培养物 30 μ L 脑内接种 3 日龄昆明乳鼠, 待其发病死亡后无菌取鼠脑, 用 5 \times 体积的 MEM 研磨、1000 \times g 离心 30 min 去沉淀, 取上清同上继续接种鼠脑 2 次。取鼠脑传代 3 次后发病死亡的小鼠脑, 同上研磨离心后取上清按 1% 体积接种已长成单层的 BHK-21 细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 96 h 后将细胞培养物冻融 3 次作为复壮后的毒种。

分别取复壮和未经复壮的 SRV9 接种 BHK-21 细胞, 同上 96 h 后以常规方法带毒传代, 继续培养 96 h 后分别收取上清, 用于浓缩; 分别于 24 h、48 h、72 h、96 h、带毒传代 96 h 时, 将复壮毒种感染的 BHK-21 细胞弃上清, 刮取细胞层, 用作制备超薄切片。

1.3 制备超薄切片

将收获的细胞经 1500 \times g 离心 30 min 后, 弃上清, 加入适量 2.5% 浓度的戊二醛、1% 锇酸双固定, 乙醇逐级脱水、Epon812 浸透包埋、制备超薄切片, 以醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色, 于电镜下观察并照相。

1.4 病毒浓缩

将带毒传代培养 96 h 的细胞上清以 1000 \times g 离

心 30 min, 收取上清, 按照文献[6]所述方法进行浓缩、纯化。

1.5 病毒粒子负染色观察

用附有 Formvar 膜的铜网沾取上述浓缩病毒液, 以 2% 磷钨酸滴于铜网上染色 1 min, 晾干后用于电镜观察。

2 结果

2.1 纯化病毒的形态观察结果

蔗糖密度梯度离心后, 经鼠脑复壮的病毒仅在 40% 密度蔗糖的底端出现 1 条较宽的病毒浓缩带。而未经鼠脑复壮的病毒在离心时出现 3 条浓缩带, 分别位于 40%、30%、20% 密度蔗糖的底端, 且 30% 密度蔗糖处的浓缩带最宽。取各个浓缩带进行负染电镜观察。结果表明鼠脑复壮后狂犬病毒粒子绝大多数为典型状态, 与文献[7]描述相一致。观察未经复壮的病毒, 在其位于 40% 密度蔗糖处的浓缩带中, 病毒主体为典型的病毒粒子, 与图 1-A 中病毒基本一致。在 30% 密度蔗糖浓缩带中, 可见到大量特殊形态的病毒粒子, 其长度明显较短, 约为 80 nm; 钝圆端变尖, 形状多呈圆锥形、三角形、新月形或不规则型 (图 1-B), 即“缺陷型干扰粒子”或 DI 粒子^[8]。在 20% 蔗糖密度处的浓缩带中, 可见大量丝状物 (可能是部分破裂病毒释放出来的核酸或者是核蛋白丝) 和少量的 DI 粒子, 典型粒子极少 (图 1-C)。

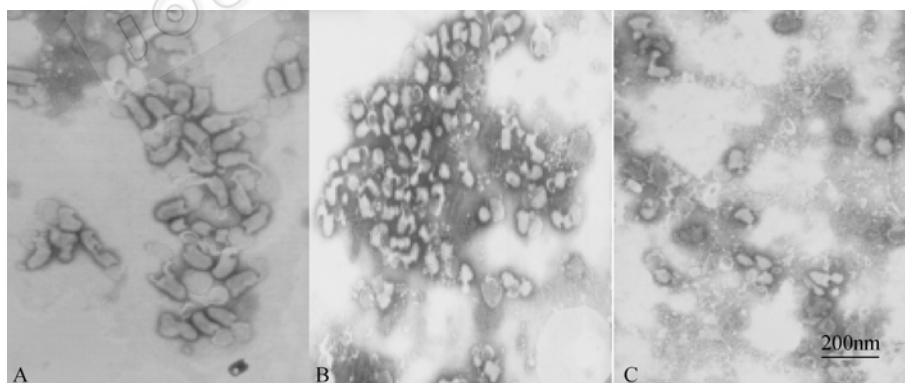


图1 电镜下复壮前后狂犬病毒的形态观察(40000 \times)

Fig. 1 Morphology of purified rabies virus particles under electromicroscopy (40000 \times). Typical viral particles could be observed at 40% sucrose density gradient after rejuvenation (A), while a lot of DI particles observed at 30% and 20% sucrose density gradient before rejuvenation (B and C respectively). Arrows indicating the particles resembling those of inactivated viruses.

2.2 SRV9 在 BHK-21 细胞内形态发生的观察结果

感染 24 h 时, 开始观察到病毒在细胞浆的空泡 (vacuole, V) 内出芽而获得囊膜的成熟 (图 2-A 中箭头所指), 且在感染 96 h 内病毒数量随着培养时间

延续而持续增加并最终导致空泡局部或完全破裂 (图 2-B, 感染 96 h)。

感染 96 h 后的感染细胞带毒传代, 观察到细胞浆内病毒的数量与传代之前 (培养至 96 h 时) 有所

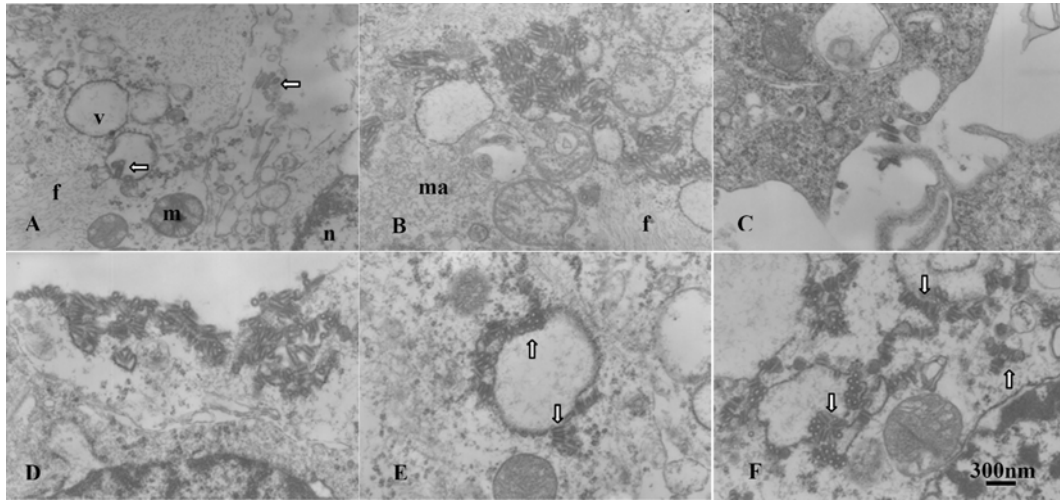


图2 SRV9 在 BHK-21 细胞内的形态发生过程的观察(20000 \times)

Fig. 2 Morphogenesis of rabies virus in BHK-21 cells. A: virus particles budding in the vacuoles 24h post infection (arrows). B: accumulated matured virus particles in the vacuole 96h p.i.; C: viruses at budding from the cell membrane; D: a budding lot on the cell surface where a number of virus particles are released; E, F: viral budding at vacuoles (arrows). f: microfilament; m: mitochondrion; ma: matrix; n: nucleus; v: vacuole.

增加但差别不大 (TCID₅₀ 由 $10^{-6.8}$ 提高到 $10^{-7.1}$), 并且在此后的培养过程中病毒数量无明显增加, 但病毒从细胞膜表面释放到细胞膜外的数量明显增加 (图 2-D)。此时病毒在细胞内的数量及释放量均达到顶峰, 且 DI 粒子含量较低, 提示此期为收获 SRV9 的理想时机。

除具备以上特征外, 观察到病毒出现不同于先前所述的获得囊膜的方式 (图 2-E、F), 即为数众多的空泡内无或仅有少数病毒粒子, 但大量病毒粒子在该空泡膜表面以各种方式成堆出芽。第一种方式为部分已经装配完全的病毒以纵面和横面贴附于空泡膜外表面, 显示其未经过向空泡内出芽的过程 (图 2-E 中箭头所指); 第二种为类似花瓣样的出芽, 中间为一病毒纵向面而周围为数个横向排列的病毒, 位于空泡膜表面 (图 2-F 左下方箭头所指); 第三种为多个病毒粒子整齐排列在空泡膜表面, 显示其经由空泡内部向外出芽 (图 2-F 上方箭头)。此外还有部分病毒游离于细胞浆中, 多个病毒粒子平行排列, 既不在空泡内, 周围也没有破裂空泡的痕迹, 似乎与空泡没有直接联系 (图 2-F 右方箭头所指); 而之前观察到的病毒多在空泡内或病毒附近有破碎的空泡结构。

3 讨论

3.1 鼠脑复壮前后病毒形态的变化及其与免疫效果的关系

本研究表明, 鼠脑复壮虽然不能完全去除 DI 粒

子, 但其对提高典型粒子所占比例的效果是很明显的。对犬的口服免疫实验结果显示, 复壮后的病毒产生了较高水平的中和抗体且维持较长的时间, 未经复壮的病毒产生的中和抗体水平则极低甚至为零, 这反应出典型粒子所占的比例可影响口服免疫的效果。因此, SRV9 经细胞培养一定代次之后, 可接种小鼠脑组织进行复壮, 确保典型粒子占较高的比例后再回归细胞培养, 以保证其良好的免疫原性。

3.2 DI 粒子的产生及其特点

几乎所有病毒在培养过程中都会产生 DI 粒子, 其出现至少在细胞培养中推动了病毒粒子的进化和演变^[9]。只要细胞内存在或产生一个 DI 粒子, 经一次传代之后即可对典型粒子的复制产生明显的抑制作用, 且 DI 粒子呈数量级增加, 很快占主导地位^[10]。DI 粒子的产生所需要的接种浓度(MOI), 及其干扰典型病毒复制的确切分子生物学机理尚不清楚。一般认为由于 DI 粒子的核酸较短, 复制子代核酸所需时间较少, 同时该颗粒的核酸对病毒复制酶有更高的亲和力, 以及该病毒的核酸更容易被衣壳蛋白所包裹, 因此其增殖速度快于典型病毒粒子^[11]。

DI 粒子含有典型病毒的全部 5 种蛋白, 各种生物学特征与典型粒子基本一致, 但其基因组长度大约只有完整病毒粒子的一半或更少且不能编码蛋白, 只有在完整病毒粒子存在的情况下才能复制^[12]。DI 粒子能特异性干扰同源典型病毒的复制从而调控病毒

的毒力,使毒力减弱甚至消失^[13];同时DI粒子还可能干扰宿主的免疫功能^[14]。这提示在接种病毒时宜采用较低的病毒量并尽可能减少传代次数以减少或延迟DI粒子的产生和增殖。DI粒子能否产生足够的保护力尚存在争论。我们认为减毒疫苗中如果含有DI颗粒可影响狂犬病病毒的复制,使其在体内的增殖潜力降低,从而相对减少了抗原量;同时由于其对免疫系统产生干扰,最终对免疫效果产生一定影响。

3.3 关于狂犬病毒粒子的出芽

目前尚不明确病毒出芽的位置如何确定。已经认识到,病毒糖蛋白在内质网rRNA上合成之后,羧基末端插入到细胞膜内并向外膜外伸出,在此过程中被宿主膜的酶糖基化;而氨基端留在细胞质一边,所以糖蛋白横跨脂质双层(跨膜蛋白),因此同一病毒在不同细胞上生长时其脂类和碳水化合物也有差异^[15];与病毒装配密切相关的M蛋白新合成之后有10%~20%分布在细胞膜内侧和细胞内其它膜性结构的外侧,其余分布于细胞浆^[16];核蛋白丝如果被M蛋白包裹,就能够自动启动出芽^[17]。因此狂犬病毒可以从细胞内膜性结构和细胞膜表面出芽获得囊膜,而空泡内的病毒可通过空泡与细胞膜融合而释放,经以上过程细胞仍可存活且外观无明显CPE^[15]。本研究中发现的数种不同于以上所述的出芽方式(见前文)未见有文献报导,可能由M蛋白及G蛋白的分布位置发生变动而引起,以减少出芽过程对空泡(或其它细胞器)的损伤,但其确切发生机理和生物学意义尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Knobel DL. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bullet World Health Organization*, 2005, 83(5): 360–368.
- [2] 罗明, 张茂林, 涂长春. 我国狂犬病流行情况分析防治对策. 中国人兽共患病杂志(*Chinese Journal of Zoonoses*), 2005, 21(2): 188–191.
- [3] Meslin FX, Kaplan MM, Oprowski HK. *Laboratory techniques in rabies*. Fourth Edition. World Health Organization, Geneva, 1996.
- [4] 刘霓红, 蔡红, 李成, 等. 狂犬病毒不同毒株的形态学研究. 电子显微镜学报(*Journal of Chinese Electron Microscopy Society*), 2006, 25(2): 178–181.
- [5] 侯世宽, 岳军明, 张茂林, 等. 狂犬病毒口服疫苗株的筛选、鉴定和实验免疫研究. 中国人兽共患病杂志(*Chinese Journal of Zoonoses*), 1995, 11(6): 145–149.
- [6] Sokol F, kuwert E, Wiktor TJ, et al. Purification of Rabies Virus grown in tissue culture, *Journal of Virology*, 1968, 2(8): 836–849.
- [7] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [8] Wiktor TJ, Dietzschold B, Leamnson RN, et al. Induction and biological prological properties of Defective Interfering Particles of Rabies Virus. *Journal of Virology*, 1977, 21(2): 626–635.
- [9] Bangham CR, Kirkwood TB. Defective interfering particles and virus evolution. *Trends Microbiol.* 1993, 1(7): 260–264.
- [10] Benjamin M, Blumberg, Daniel K. An analytical review of defective infections of vesicular stomatitis virus. *J gen Virol*, 1983, 64: 1839–1847.
- [11] 闻玉梅. 医学分子病毒学及其应用. 第一版. 上海: 上海医科大学出版社, 1995.
- [12] Wiktor TJ, Dietzschold B, Leamnson RN, et al. Induction and biological properties of Defective Interfering Particles of Rabies Virus. *Journal of Virology*, 1977, 21(2): 626–635.
- [13] Lopez-Ferber M, Simon O, Williams T, et al. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* 270: 2249–2257.
- [14] Browning MJ, Hunecutt BS, Huang AS, et al. Replication-defective viruses modulate immune responses. *The Journal of Immunology*, 1991, 147(8): 2685–2691.
- [15] 王志玉. 医学病毒学原理. 第一版. 北京: 中国医药科技出版社, 1996.
- [16] Depolo NJ, Giachetti C, Holland JJ. Continuing coevolution of virus and defective interfering particles and of viral genome sequences during undiluted passages: virus mutant exhibiting nearly complete resistance to formerly dominant defective interfering particles. *Journal of Virology*, 1987, 61(2): 454–464.
- [17] Mebatsion T, Konig M, Conzelmann KK. Budding of Rabies Virus Particles in the Absence of the Spike Glycoprotein. *Cell*, 1996, 84(6): 941–951.

Morphological comparison of rabies viral particles before and after rejuvenation in suckling mice and morphogenesis of the rejuvenated virus in cells

Xiaohu Han¹, Xiaohuan Zou², Yu Jiang², Hua Xuan¹, Changchun Tu^{2*}

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

(²The Military Veterinary Institute, Academy of Military Medicine of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: [Objective] To observe the morphological recovery of rabies virus strain SRV 9 after rejuvenation in suckling mice and to study its morphogenesis in BHK-21 cells. [Methods] The long freeze-preserved rabies virus strain SRV 9 was rejuvenated through intracerebral inoculation of suckling mice twice, followed by propagation in BHK-21 cells. After cell culture the virus was purified through sucrose gradient density ultracentrifugation. [Results] Electromicroscopy of the purified virus showed that effective recovery of viral shape was obtained after the rejuvenation with majority of viral particles having a typical bullet-like shape and intact spikes on viral membrane. The proportion of DI particles (with short triangle and irregular shapes) in rejuvenated virus supernatant was significantly decreased compared to un-rejuvenated virus. Viral morphogenesis in cells showed that typical virus particles could form in intracytoplasm 24 hours p.i. and the number of matured viral particles in cytoplasm increased significantly as culture was prolonged from 24 hours to 96 hours p.i.. Furthermore, the rejuvenated virus was observed budding from vacuole membrane in different patterns. [Conclusion] (1) The proportion of DI particles can be significantly decreased by rejuvenated through intracerebral inoculation of suckling mice. (2) The optimal harvest opportunity of SRV9 is after being 1~2 undiluted passaged. (3) This research provided more information about morphogenesis of rabies virus.

Keywords: Rabies virus; rejuvenation; morphology and morphogenesis

Supported by the National Science Foundation of China (30600445) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z456)

*Corresponding author. Tel: +86-431-87960009; E-mail: changchun_tu@hotmail.com

Received: 5 November 2007/ Revised: 25 January 2008

1953 年创刊以来所有文章全文上网

2008 年 1 月中旬,《微生物学报》自 1953 年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载摘要和全文!

建立全文数据库的工作是从 2007 年初开始,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史久远,其间经历了期刊的变化。将变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

2008 年 6 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953~1956	半年刊	1~4	1~2
1957~1958	季刊	5~6	1~4
1959	季刊	7	1~2
1959~1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3~4
1963~1965	季刊	9~11	1~4
1966	季刊	12	1~2
1966~1972	停刊 6 年半		
1973~1988	季刊	13~28	1~4
1989~2007	双月刊	29~47	1~6
2008	月刊	48	1~6