

扫描电镜研究呼吸道合胞病毒的融合细胞病变

钱澄怀 孙碧芳

(上海市医学科研测试中心) (上海市卫生防疫站)

1977—1979年我们使用国内建株的类淋巴传代细胞(SL)分离培养呼吸道合胞病毒(RSV),证实该株细胞对RSV敏感,可形成广泛典型的融合细胞病变^[1]。近几年来又将其使用于RSV的分离培养及中和试验等工作中。1979年曾对RSV在类淋巴传代细胞内的繁殖作了形态学研究^[2]。本文主要报道,用扫描电镜研究RSV在类淋巴传代细胞内繁殖所致的细胞病变和融合细胞形成的过程,观察结果如下。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 传代细胞株: 类淋巴传代细胞(SL)。
2. 病毒株: 呼吸道合胞病毒(RSV)long株及上海市卫生防疫站分离的呼吸道合胞病毒R₁₄株。
3. 临界点干燥器: 日立HCP-2型。

4. 真空镀膜台: 日立HUS-5GB型。
5. 离子溅射台: EIKOIB-5型。
6. 扫描电子显微镜: 日立H-3010, 加速电压25kV。

二、方法

1. 正常细胞对照: 培养细胞在盖玻片上分别培养24、48、72、96及120小时, 取出固定, 共作三批对照实验。
2. RSV感染细胞方法: 正常细胞生长24小时基本成片, 取其玻片细胞分别接种在1:10、1:100、1:1000稀释的病毒悬液(病毒原液的TCD₅₀/0.1ml为10⁻⁴)中。培养72、96、120小时, 取出玻片固定细胞。共重复四次。
3. 扫描电镜标本制作过程^[3,4]: ①固定: 经2.5%戊二醛—1%锇酸—2%鞣酸—1%锇酸依次固定, 每次固定完毕, 必需用pH 7.2—7.4的磷酸缓冲液洗净各固定液。②脱水: 用乙醇逐级

脱水,并替换至纯醋酸戊脂中。③临界点干燥:在临界温度及压力下干燥。④蒸金:在真空镀膜台上先蒸碳,后蒸金。⑤离子溅射:用铂钨作离子溅射。

4. 光学显微镜标本制作:取有融合细胞病变的细胞用甲醇固定,苏木紫-伊红染色。

结 果

1. 生长第5天的正常类淋巴传代细胞表面有长而茂密的绒毛(图版 I-1),绒毛经高倍放大观察,粗细均匀,表面平滑,绒毛有细小分枝(图版 I-2)。细胞与细胞间界限清楚,各相邻细胞绒毛的接触交错自然,无融合,绒毛间的细胞膜上有个别微小的泡状突起。

2. 细胞融合病变:接种病毒的细胞从接种后48小时即出现细胞融合现象。随接种时间的增长病变的数量增多。融合细胞大小悬殊,各个融合细胞的病变程度不同,有些小的融合细胞表面绒毛较正常,随时间增长,周围细胞不断融合入,融合细胞增大(图版 I-3)。大融合细胞的中央部分变性程度往往较四周为强,可能与病变发生的先后有关,晚期融合细胞整个变性坏死,或裂解成残片(图版 I-4),融合细胞与周围的正常细胞界限分明。

3. 融合细胞的变性病灶似花菜样,经放大见绒毛形状多样,有整根绒毛膨大;或不规则膨大;或绒毛顶端膨大呈小泡状(图版 II-5)。融合细胞绒毛病变程度不同,早期外观较正常,随细胞变性而进展;大部分绒毛变性坏死或仅残留绒毛痕迹。

4. 融合细胞膜上有圆球形突起,大小和数量都不相等,球形突起表面有浅沟嵴及绒毛遗痕(图版 II-6)。

5. 坏死的融合细胞由变性坏死而裂解(图版 I-4)。

6. 光学显微镜观察:融合细胞的形态不规

则,大小由核的多少决定,核的数目不等,多者可达数10个(图版 II-7)。

7. 三组不同稀释度病毒接种细胞,由接种病毒量的高、低,病变出现时相差一天,病变程度相差一个“+”(一个“+”为细胞面积的25%)。

讨 论

1. 在RSV的作用下,感染细胞由绒毛开始而至整个细胞融合,进而扩展到周围细胞。细胞感染RSV 48小时后,细胞绒毛有形态各异的不规则膨大,相邻细胞绒毛间有融合,为细胞融合的早期表现。融合细胞先由少数细胞融合,而后周围细胞逐渐融合入。正常对照细胞中未见此情况。大的融合细胞很大,难以计算由多少细胞融合组成,光学显微镜观察小的融合细胞仅有2个细胞核,大的有50个以上细胞核^[2]。大融合细胞中央部分病变程度往往较周围强,此与融合进展过程有关,中央部分是最早融合的部分,晚期整个细胞变性坏死,由坏死而裂解。

2. 由扫描电镜看到细胞表面有大小不等的圆球形突起,是扩大的内质网池在细胞表面成泡状突起形成。由透射电镜超薄切片看到在感染RSV细胞的超薄切片中,扩大的细胞内质网池成泡状,内有病毒,膜上还有病毒芽生等^[2,3],此点与扫描电镜观察到的细胞表面微细变化一致。

参 考 文 献

- [1] 钱澄怀等:微生物学报,19(4):383,1979。
- [2] 钱澄怀等:微生物学通报,7(4):162,1980
- [3] 洪涛等:生物医学超微结构与电子显微镜技术,科学出版社,北京,183页,1980年。
- [4] 田中敬一等:走查电子显微镜图介-生物试料制作法,朝香书店,57页,1980年。
- [5] Norrb, E. et al.: *Jour. Virol.* 6:240, 1970.