

两种鳊病毒的共感染现象及引起感染细胞的超微变化

张奇亚 陶建军 黄晓红 李正秋 袁秀平

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要:借助细胞培养和电镜技术, 揭示了鳊球形病毒 (*Siniperca chuatsi* spherical virus, SCSV) 与鳊弹状病毒 (*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCR) 在草鱼鳍细胞 (Grass carp fins, GCF) 中共感染的现象。在筛选到敏感鱼类细胞系和建立了鳊病毒体外增殖系统的基础上, 取患典型病毒感染出血症的鳊组织, 制备组织悬液, 接种到 GCF 细胞中传代培养, 在攻毒后间隔不同时间收集细胞, 对攻毒细胞的超薄切片进行电镜观察。揭示两种形态的鳊病毒可在同一个 GCF 细胞中增殖, 并描述和分析了病毒复制引起感染细胞的超微病变。本研究结果有助于阐明鱼类重要病毒病害的发生过程及致病机理。

关键词:鳊病毒; 共感染; 超微变化

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)05-0473-06

在人们掌握了水产动物的繁育技术之后, 大面积暴发的水生动物病害就成为制约渔业可持续发展的瓶颈。而不同病毒病原共感染, 导致水生动物发病或死亡, 增大疾病防治的困难, 加速病害扩散、流行及水环境恶化^[1], 给人类生产和生活带来不良影响。因此, 探讨由复杂病毒病原引起的水生动物流行病是一个很有意义的课题。作者起初在患病鳊组织中观察到不同形态的病毒颗粒存在^[2], 也对鳊球形病毒的鱼体回接感染及病原性等作了详细研究^[3]。但限于材料和研究系统, 对鳊复杂的病毒病原及病原间相互作用的认识难以深入。经过敏感细胞的筛选, 借助本实验室建立的鳊病毒体外扩增系统, 并结合应用电镜技术, 进一步对鳊两种病毒及与宿主细胞的相互作用进行了仔细观察和研究, 查明鳊球形病毒和弹状病毒可在鱼类培养细胞中引起共感染。

1 材料与方法

1.1 鳊病毒的来源及宿主细胞 病毒来源于患致死性出血病的鳊组织匀浆液。宿主细胞为草鱼鳍细胞系 (Grass carp fins, GCF)^[4]。

病毒粗提液的制备及体外扩增: 取患病鳊的肝、脾、心和肾等内脏器官, 剪碎、匀浆, 加入双抗 (青霉素 100IU, 链霉素 100μg) 置 -20℃ 过夜, 冻融后离心, 上清为病毒粗提液。过滤后接种到已长成单层的

GCF 细胞中。25℃ 培养 2—3d, 光镜下观察, 可见有细胞病变。收集鳊病毒感染的细胞液 (鳊病毒悬液), 再接种到正常单层 GCF 细胞中。如此进行多次传代培养, 使细胞病变出现的时间和状况保持稳定。

1.2 电镜样品的制备及超微观察 在细胞培养瓶中培养 5 组 GCF 单层细胞, 1 组为不接种病毒的对照细胞, 另外 5 组分别接种经过多次传代培养、感染性稳定的鳊病毒悬液, 在接种病毒悬液后 12h, 16h, 24h, 32h 和 36h 各取一组样, 经胰酶消化后离心收集细胞, 戊二醛固定, 包埋, 用 Leica Ultracut-R 超薄切片机 (莱卡公司产品) 制备超薄切片, 经透射电镜 (日本电子公司产品) 观察, 透射电镜图像传输系统 Gatan Model 780 Dualvision 300W (美国 Gatan 公司产品) 转存图像。

2 结果

2.1 病毒的形态特征

电镜下观察到鳊球形病毒的形态呈球状或近似球状, 其大小不均一, 多数病毒颗粒的直径为 150nm 左右, 少数颗粒直径超过 200nm 或不足 100nm (图 1A)。鳊弹状病毒是大小为 70—110 × 30—45nm, 其形态是一端尖头、另一端平头的标准子弹状颗粒; 由于弹状病毒有一个中央核心, 当观察到超微结构的横切面时, 可见其圆心呈现一个黑点 (图 1B)。

收稿日期: 2004-09-15; 修订日期: 2004-10-20

基金项目: 国家海洋 863 项目 (2002AA626010)、中国科学院创新项目 (KSCX2-SW-302)、中国科学院领域前沿项目 (220313) 资助

作者简介: 张奇亚, 博士, 研究员。从事水生病毒学研究。E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

2.2 两种病毒在宿主细胞中的增殖

当用鳊病毒接种 GCF 细胞后,在 12h 和 16h 这一时段中,扩增的病毒大多数是球形病毒(图 2A, 2B);在 24h 至 32h 时段中,可观察到球形病毒与弹状病毒同时存在(图 1B)。

接种病毒 16h 后,随时间延长,宿主细胞内弹状病毒量随之增加,直至接种 32h—36h,观察到在宿主细胞内大多数是弹状病毒,有时可见到双倍(或多倍)长度的弹状颗粒及串列样结构(图 2C, 2D)。观察结果显示,鳊球形病毒和弹状病毒能在同一宿主细胞中增殖,它们有各自最佳增殖时段。一般看来,球形病毒大量增殖的时段要早于弹状病毒。

2.3 病毒的分布、释放及与细胞的相互作用

增殖后病毒分布在宿主细胞质中,可散在、聚积或形成包涵体,而释放在胞外的病毒粒子也可散在、堆积或围绕在空泡周围(图 1, 图 2)。鳊球形病毒和弹状病毒在宿主细胞中增殖后,都可通过出芽方式释放。球形病毒增殖后可通过细胞内膜出芽,释放到胞质空泡小腔中(图 2A),也可在细胞膜上出芽,释放到细胞膜外(图 3A)。弹状病毒也可通过类似的方式,出芽释放到胞质空泡小腔中(图 2C),或释

放到细胞外(图 3A, 图 3B)。另外,球形病毒和弹状病毒可同时或不同时释放。

尽管多数情况下,球形病毒增殖的时段要早于弹状病毒,但在接种病毒 16h—32h 之间,两种病毒往往可同时增殖。如当球形病毒大量增殖和释放后,弹状病毒仍按部就班在宿主细胞内增殖。反之亦然,在接种病毒后 24h 的细胞超薄切片中,可见弹状病毒大量增殖并释放到细胞间隙后,在胞质中还存在许多尚未装配的球形病毒衣壳,显示球形病毒保持继续增殖的势头(图 3B)。这提示,鳊两种病毒共感染时,不会因一种病毒的增殖和释放而对另一种病毒增殖造成明显的抑制作用。

病毒入侵和感染所引起的宿主细胞超微病变主要表现为:有的细胞肿胀变圆,使原本贴壁的细胞失去黏附力,同时细胞外周被释放病毒颗粒和凋亡小体的混合物所围绕(图 3C);有的核膜皱缩,胞核凝集,核质边缘化,胞质浓缩,内质网扩张形成细胞质气泡,在胞质中会出现大小不一的空泡,有时空泡内还可见有病毒存在(图 3D),通常病变细胞的胞膜还能保持完好。这些表现大多具有典型细胞凋亡的特征。

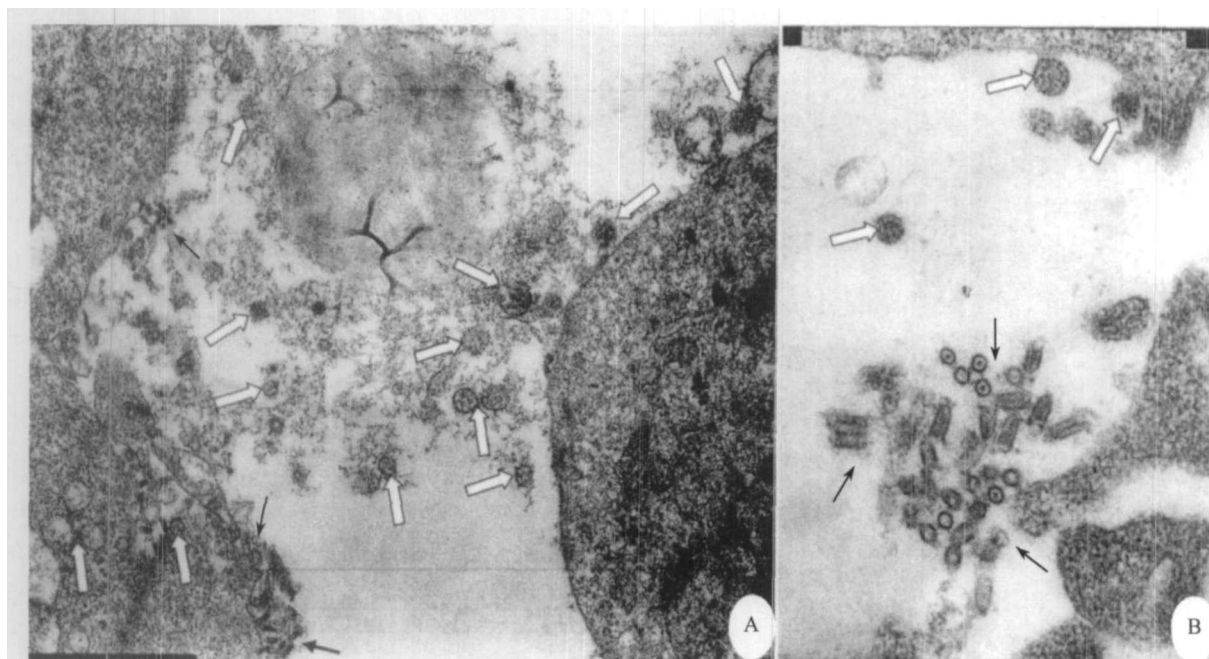


图 1 鳊两种病毒的电镜照片。A. 接种病毒 24h 的细胞,产生了大量散在的子代球形病毒颗粒,如箭头所示($\times 30,000$)。B. 接种病毒 32h 的细胞,聚积在一起的子代弹状病毒,如箭头所示($\times 40,000$)。图例同图 3

Fig. 1 Electron micrographs of *Siniperca chuatsi* spherical virus (SCSV) and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV). A. Many progeny virus particles of SCSV and SCR were observed from the grass carp fins (GCF) cells at 8h post infected, showed by arrowheads ($\times 30,000$). B. The virus particles were examined to be aggregated, showed by arrowheads ($\times 40,000$)

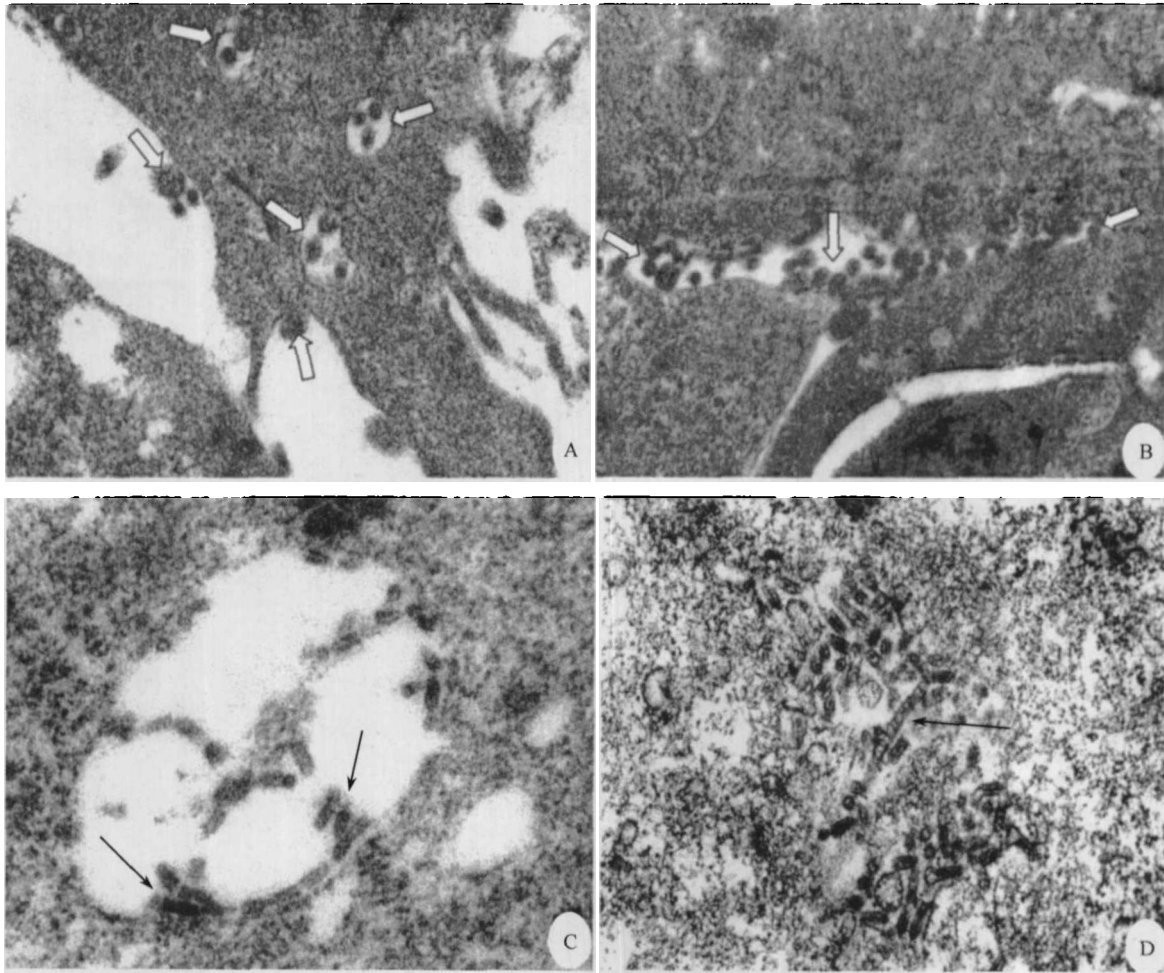


图2 病毒在宿主细胞中的增殖。A. 接种病毒 12h 的细胞,在胞质空泡中的子代球形病毒,如箭头所示($\times 15,000$)。B. 接种病毒 16h 的细胞,子代球形病毒释放在细胞间隙中,如箭头所示($\times 15,000$)。C. 接种病毒 32h 的细胞,在胞质空泡中有大量子代弹状病毒($\times 40,000$)。D. 接种病毒 36h 的细胞,堆积在胞质中的子代弹状病毒($\times 40,000$)。图例同图 3

Fig.2 Amplification of SCSV and SCR in cytoplasm of host cells. A. The progeny virus particles of SCSV in the vacuum of cytoplasm at 12h post infected, showed by arrowheads ($\times 15,000$). B. Released virions of SCSV in between cells at 16h post infected, showed by arrowheads ($\times 15,000$). C. Many virus particles of SCR in the vacuum of cytoplasm at 32h ($\times 40,000$). D. The virus particles of SCR aggregated in cytoplasm of host cell at 36h post infected($\times 40,000$)

3 讨 论

作者曾直接在患病鳃组织中观察到存在不同形态病毒颗粒的现象^[2],对鳃球形病毒病原的检出方法及组织病理也进行了测试分析^[3]。但当时限于未找到鳃病毒体外感染的适当条件和敏感细胞,对不同病毒病原间及其与宿主的关系尚未涉及。经过反复筛选,本实验室建立了稳定的鳃病毒体外扩增系统。在此基础上,利用 GCF 细胞对鳃两种病毒进行了体外多次传代培养,辅以电镜技术,观察到鳃球形病毒和弹状病毒的体外共感染现象,并阐述鳃两种病毒共感染引起鱼类培养细胞产生超微变化的特点。后续实验还证实,鳃球形病毒和弹状病毒均能分别感染几种鱼的培养细胞。这为揭示鳃病难以防

治的重要原因之一是存在多种病毒病原提供了直接证据,也为低等脊椎动物病毒相互作用、分子进化及其致病机理等研究提供了新的材料和系统。

不同病毒之间的作用可分为两大类,一类是一种病毒增殖有利于另一种病毒的增殖协同作用,如利用辅助病毒及其产物拯救失活的鱼病毒性败血症病毒(VHSV)、重组鲑鱼弹状病毒等^[5,6];一类是一种病毒增殖有碍另一种病毒的干扰抑制作用,如鱼的传染性胰腺坏死病毒(IPNV)与传染性造血器官坏死病毒(IHNV)之间存在干扰作用^[7]。深入探讨病毒与病毒之间、病毒与宿主细胞之间的相互作用是认识病毒遗传、变异与进化等本质特征的基础,也是阐明病毒病原致病机理及其控制对策的必要途

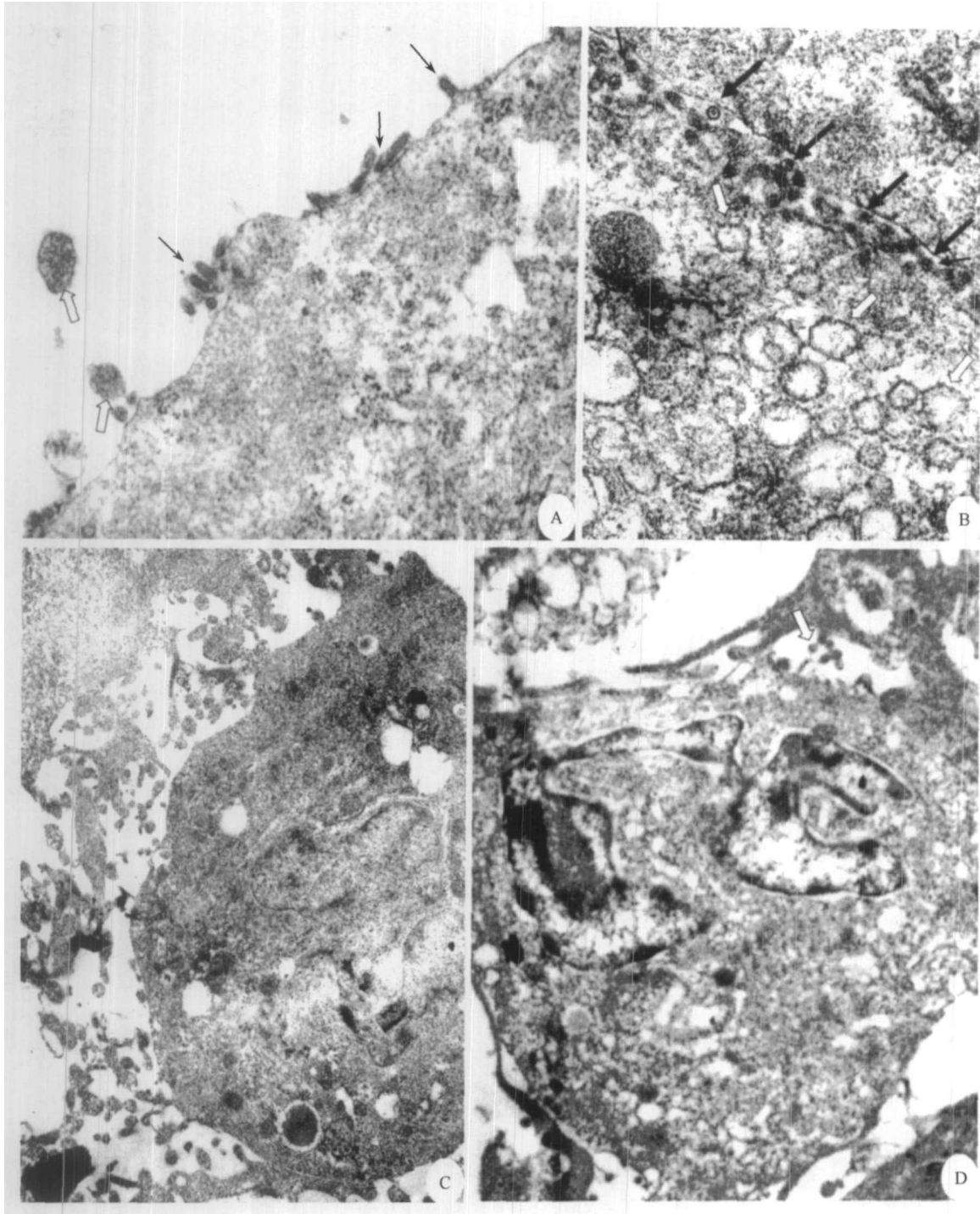


图3 病毒释放及对宿主细胞的损害。A. 接种病毒 24h 的细胞, 病毒从细胞膜上出芽释放, 如箭头所示 ($\times 40,000$)。B. 接种病毒 24h 的细胞间隙中充满弹状病毒颗粒, 而胞质中存在许多球形病毒衣壳, 如箭头所示 ($\times 40,000$)。C. 接种病毒 32h 的细胞周围散布有大量凋亡小体 ($\times 8,000$)。D. 接种病毒 24h 的细胞核凝集呈不规则形态, 核质边缘化, 胞质中有许多空泡, 大小不一。有的空泡中还存在球形病毒颗粒, 如箭头所指 ($\times 8,000$)

Fig.3 Release of viruses and host cell damages. A. Budding virions from the membrane of infected cell at 24h post infected, showed by arrowheads ($\times 40,000$). B. A lot of SCR virus particles in between cells and number of the virus capsids of SCSV in the cytoplasm of host cell at 24h at post infected, showed by arrowheads ($\times 40,000$). C. Viruses induced GCF cells apoptosis at 32h post infected, a great lot of apoptosis bodies formation and around the infected cell ($\times 8,000$). D. The cell pathological changes of virus infected, nuclear condensation, karyotin margination, cytoplasmic vacuoles, and some particles of SCSV in the vacuole, showed by arrowheads ($\times 8,000$)

⇨ 示球形病毒颗粒 indicated *Siniperca chuatsi* spherical virus (SCSV)

→ 示弹状病毒颗粒 indicated *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV)

径^[8,9],同时还可促进相关学科的发展,如人类腺病毒伴随病毒的发现和作为基因载体,就导致了人类疾病基因治疗技术的突破^[10-12]。因此,人们对阐明病毒共感染现象、不同病毒间的相互作用及建立相应的病毒病防治技术持有浓厚兴趣^[13]。对卫星病毒、DI 颗粒等的研究较为深入,并对病毒的分子进化、生物学性状及实际应用都产生了影响^[14]。现已知伴随病毒难以单独完成复制有感染性子代病毒的全过程,但当辅助病毒存在时则可使伴随病毒恢复其感染性^[15,16]。

对鳊病毒感染细胞的超薄切片进行电镜观察的结果显示,在鳊球形病毒大量增殖之前,没有出现弹状病毒。这表明鳊球形病毒可以不依赖弹状病毒而独立复制和增殖,不是弹状病毒的伴随病毒。而鳊弹状病毒是在继球形病毒大量增殖之后才开始出现的,那么鳊弹状病毒是否是球形病毒的伴随病毒呢?对此专门进行了鳊弹状病毒的分离与纯化,并获得了能起细胞病变的鳊弹状病毒株,这表明鳊弹状病毒也不是球形病毒的伴随病毒。进一步的观察还显示,鳊的两种病毒增殖时段是不同步的。这样比它们采取同时增殖给宿主细胞造成的空间、能量和原料需求的压力要小。当两种病毒成熟后,主要是通过出芽释放,使宿主细胞较少裂解或不裂解。观察结果还显示,出现凋亡细胞的量比裂解细胞的量要多 2—3 倍,可见病毒感染对宿主细胞的影响主要是引起细胞凋亡。

关于鱼类两种病毒的共感染现象尚未见报道。本研究所观察的样品是病鳊组织悬液接种细胞,并经过体外多次传代培养所获得的。在经多次传代后,弹状病毒和球形病毒仍然相伴相随,是什么机制使鳊鱼两种病毒能长期和谐相处?这是一个有趣且有待进一步探讨的问题。

参考文献:

- [1] Zhang Q Y. A review of viral diseases of aquatic animal in China [J]. *Acta Hydrobiology Sinica*, 2002, 26(1): 89—101 [张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况. 水生生物学报 2002, 26(1): 93—101]
- [2] Zhang Q Y, Li Z Q. Three different viruses observed from the tissues of diseased mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44(5): 437—440 [张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到三种病毒. 科学通报, 1999, 44(2): 192—195]
- [3] Zhang Q Y, Li Z Q. Detection of viral pathogen from diseased mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) with pathological observation [J]. *Acta hydrobiologica sinica* 1999, 23(2): 151—154 [张奇亚, 李正秋, 1999. 鳊鱼病毒病原的检出及组织病理分析. 水生生物学报, 23(2): 151—154]
- [4] Lu Y, Lannan C N, Rohovec J S, et al. Fish cell lines: Establishment and characterization of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). In *Vitro* [J]. *Cell Dev Biol*, 1990, 26: 275—279
- [5] Betts A M, Stone D M. Rescue of viral haemorrhagic septicemia virus minigenomes by helper virus [J]. *Virus Res* 2001, 77(1): 19—23
- [6] Biacchesi S, Yu Y X, Bearzotti M, et al. Rescue of synthetic salmonid rhabdovirus minigenomes [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (Pt 8): 1941—1945
- [7] Alonso M, Rodriguez S, Perez-Prieto SI. Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Arch Virol*, 1999, 144(4): 657—673
- [8] Nee S. Mutualism, parasitism and competition in the evolution of coviruses [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2000, 355(1403): 1607—1613
- [9] Scholtissek C, Stech J, Krauss S, et al. Cooperation between the hemagglutinin of avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses [J]. *J. Virol* 2002, 76(4): 1781—1786
- [10] Flotte T R, Carter B J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy [J]. *Gene Ther*, 1995, 2: 357—362
- [11] Hillgenberg M, Schnieders F, Loser P, et al. System for efficient helper-dependent minimal adenovirus construction and rescue [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(6): 643—657
- [12] Ehrhardt A, Kay M A. A new adenoviral helper-dependent vector results in long-term therapeutic levels of human coagulation factor IX at low doses *in vivo* [J]. *Blood*, 2002, 99(11): 3923—3930
- [13] Sena-Esteves M, Hampl J A, Camp S M, et al. Generation of stable retrovirus packaging cell lines after transduction with herpes simplex virus hybrid amplicon vectors double dagger [J]. *Gene Med*, 2002, 4(3): 229—239
- [14] Levin B R, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis [J]. *Science*, 1999, 283: 806—809
- [15] Domi A, Moss B. Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(19): 12415—12420.
- [16] Le Mercier P, Jacob Y, Tanner K, et al. A novel expression cassette of lyssavirus shows that the distantly related Mokola virus can rescue a defective rabies virus genome [J]. *J. Virol*, 2002, 76(4): 2024—2027.

COINFECTION OF TWO *SINIPERCA CHUATSI* VIRUSES AND MORPHOLOGIC CHANGES OF THE INFECTED CELLS

ZHANG Qi-Ya, TAO Jian-Jun, HUANG Xiao-Hong, LI Zheng-Qiu and YUAN Xiu-Ping

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

Abstract: Serious economic losses in the aquaculture industry have been resulted from viral diseases in China as well as the worldwide. Mandarin fish *Siniperca chuatsi* is a special aquaculture fish in China. *Siniperca chuatsi* spheriacal virus (SCSV) has been demonstrated to be pathogen by a series of experiments such as electron microscope observation, cell challenge, host fish infection and histopathological investigation. However, the epizootic disease of mandarin fish could not be efficiently controlled by the viral vaccine. Different kinds of viruses were observed from the tissues of diseased mandarin fish with outbreak of infection and acute lethality.

This study reveals two kinds viruses, *Siniperca chuatsi* spherical virus (SCSV) and *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV) from diseased mandarin fish coinfecting *in vitro*. The samples of viruses were prepared from tissues of the diseased mandarin fish with typical hemorrhage syndrome. The fish cell line of grass carp fins (GCF) was used to amplify the viruses. The infected GCF cells were collected at different time after infection, and the ultra thin section were cut, stained and examined by transmission electron microscopy. Two kinds of different viruses were observed, one is spherical virus and other is rhabdovirus. The morphogenesis, coinfections and cellular interactions with GCF cells were investigated, such as the virus amplification in cytoplasm of infected cells, budding from the plasma membranes, and damages of the cells. These results may help explain the fact that different virus species are responsible for significant disease problems and pathogenesis in cultured fishes.

Key words: Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*); Virus; Coinfection; Morphologic changes