维普资讯 http://www.cqvip.com

流行性出血热病毒在人B淋巴母细胞中复制增殖

姚志强[1] 杨为松[1] 刘健[2] 张文彬[1] 白雪帆[1]
李学荣[2] 黄梅[2]

（1.第四军医大学唐都医院出血热室，西安）
（2.第四军医大学训练部电镜室，西安）

提　要

本文应用细胞培养、免疫荧光及电镜技术研究了B淋巴母细胞对EHF病毒的易感性。结果表明EHF病毒可在该细胞中增殖。感染细胞无明显细胞病变，在形态上与对照组无差别。虽然大部分感染细胞呈现明亮病毒抗原荧光，但在电镜下却难以找到完整的病毒颗粒，仅在扩张的囊泡中发现一些性质待定的微丝样物质。人B淋巴母细胞持续感染的建立，提示患者外周血中大量出现的异型淋巴细胞可能允许EHF病毒在其中复制。

关键词：流行性出血热；病毒定位；B淋巴母细胞

流行性出血热（EHF）患者外周血及骨髓中有B淋巴细胞增多、并出现大量异常的淋巴细胞。近陈氏通过电镜观察认为光镜下的多种形态的异型淋巴细胞在电镜下系不同发育阶段的浆细胞[1]。我们在进行EHF病毒血细胞定位研究中发现，除单核细胞外，B淋巴细胞中也有病毒抗原存在[2]。然而EHF病毒仅由B细胞表面携带还是在其中复制仍有待澄清。为此，我们进一步研究了EHF病毒对体外培养的人B淋巴母细胞的作用。现报告如下。

材料与方法

一、EHF病毒株　FLi株系本室1984年从一孕妇流产胎儿的肝脏中分离，属野鼠型。Seaul株为Lee、HW等从南朝鲜汉城的大家鼠中分离。这两株病毒均在BHK细胞中传代，病毒感染细胞阳性率100%、荧光亮度＋＋＋的培养细胞冻融上清液做为实验所用病毒液。

二、人B淋巴母细胞　EBV转化人外周血细胞由本校免疫教研室人单克隆组协助。简述如下：取正常人外周血10ml，肝素抗凝，Ficoll—Hypaque密度离心法分离单核淋巴细胞，10%FCS RPMI 1640液洗涤三遍后，调整细胞浓度为1.2×10^7，用EBV（B95-8株，法国引进，曾毅教授转赠）细胞培养上清液感染，用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养于24孔板；2×10^6细胞／ml／

*本文于1988年8月9日收到。
崔运昌、朱勇同志对本研究予以大力支持协助，特此致谢！

维普资讯 http://www.cqvip.com

孔，二周后完全发生转化，三周后开始实验。

三、实验步骤 将0.1ml病毒液(FLi株及Seoul株)分别与人B淋巴母细胞悬液37℃共同孵育2小时，离心弃上清，细胞团用1640液洗涤二遍后重悬于RPMI 1640液中（内含10%灭活小牛血清，3%L-谷氨酰胺，青链霉素各100μ(μg)／ml）调整细胞密度为$2\times10^5\sim1\times10^6$／ml，37℃温箱中培养。根据细胞生长情况及pH值变化，4—5天换液、传代一次，同时检查：①细胞形态；②细胞活力及增殖速度；③病毒抗原。实验对照组的B淋巴细胞不与病毒孵育，其余均同实验组方法。

四、病毒抗原荧光检查 1.液相染色 0.1ml（5×10^6）培养细胞悬液加25μl EHF 25—1 McAb—FITC，4℃染色30分钟，振洗三遍后滴片吹干，丙酮固定，封片镜检。

2.固相染色 培养细胞滴片，丙酮固定，用兔免疫血清做间接免疫荧光法染色。

五、形态观察 细胞传至第7代（35天），以4%戊二醛对半注入培养管，2000r／m离心15分钟，弃上清，重新加2%戊二醛置4℃下固定2小时，0.01mol／L pH7.4 PBS漂洗过夜，O_sO_4后固定，乙醇-丙酮逐级脱水，Epon812包埋，超薄切片，铀-铅复染，JEM-2000EX电镜观察。另外，每代细胞滴片，姬姆萨染色，光镜观察。

结 果

培养的人B淋巴母细胞感染EHF病毒FLi株及Seoul株后，生长良好，并可连续传代。

病毒抗原荧光在第2代后即可在感染细胞浆及胞膜(活细胞膜染色)上检出；荧光亮度及感染细胞数随培养时间（代次）延长而增强，培养至第7代时感染细胞数已由原来

图1 人B淋巴细胞中EHF病毒抗原荧光（第7代）
Fig 1 EHFV antigen in human B-lymphoblastoid cells by Immunofluorescence staining (Passage 7)

维普资讯 http://www.cqvip.com

的5—10%增至70—80%。详见图1。

培养至第7代时，虽然大多数细胞已显示明亮的病毒抗原荧光，电镜下却难以找到完整的病毒颗粒，仅在扩张的粗面内质网及高尔基体中发现一些特殊的丝状、絮状结构，囊泡内有散在中等电子致密度的微粒(直径50～70nm)堆积物，详见图2。

图2 感染细胞扩张囊泡中的致密颗粒(×75000)
Fig 2 A peculiar structure in dilated rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of infected HLBC(×75000)

持续感染的淋巴母细胞无细胞病变，形态上及增殖状况上与对照组无明显差别。

讨　论

在其它病毒性出血热实验中，已证明单核细胞和B淋巴细胞是病毒主要感染靶细胞[3,4]。我们在流行性出血热病毒血细胞定位研究中，不但从单核细胞、同样也从淋巴细胞中分离到EHF病毒，并进一步在非花环形成淋巴细胞(B细胞)中发现EHF病毒抗原荧光，初步证实除单核细胞外，B淋巴细胞中也有病毒抗原存在[2]。然而，EHF病毒仅由B细胞表面携带。还是在其中增殖尚有待澄清。

EBV转化人外周血淋巴细胞建立类B淋巴母细胞系已广泛得到公认、并成为人一人杂交瘤研究方法之一。我们借助于该项技术进行了EHF病毒对人B淋巴母细胞的体外攻击试验，结果在第二代细胞胞浆中开始出现病毒抗原阳性荧光，并可在细胞膜上表达，培养细胞可连续传代，荧光亮度及感染细胞数随培养代次延长而增强，这提示病

维普资讯 http://www.cqvip.com

毒在细胞与细胞间传播或感染细胞选择性增殖的现象。淋巴细胞无吞噬功能，因此认为病毒侵入B细胞中可能是一主动过程。以上结果表明，EHF病毒可侵入人B淋巴细胞并在其中增殖。

病毒在B细胞中持续感染的建立，结合形态学观察，说明在体外培养条件下EHF病毒增殖本身并不造成明显的宿主细胞病变，但在体内环境中，免疫细胞能否识别细胞膜上病毒抗原，介导细胞损害尚不得而知。值得注意的是，虽然已发现EHF病毒主要定位于单核细胞、B淋巴细胞，而EHF患者却常常伴有单核细胞和B细胞数目增加，其间发生原因及关系有待深入探讨。

与众多细胞内明亮的抗原荧光相反，电镜下难以寻找到相应完整的病毒颗粒，仅在高尔基体器及内质网池中发现一些性质待定的实心颗粒，周围散在微管样丝状物，这些结构特点及存在部位，与培养细胞、鼠脑及患者淋巴结中的病毒前体发生过程相近[5-7]。其性质是否为EHF病毒前体结构尚待进一步肯定。我们在进行EHF患者病毒血症研究中曾发现EHF病毒抗原较活病毒检出阳性率高、持续时间长[8]。病毒抗原较感染性病毒本身易检出提示：除与方法敏感性差异及病毒可能以CIC形式存在外，也可能有单独的EHF病毒抗原多肽成分存在。那么，这些性质待定的微粒物质与荧光抗原的关系及在病毒特性和发病机理研究中的意义值得深究。

异型淋巴细胞在患者外周血中大量出现是EHF感染的特征之一，这些细胞具有淋巴母细胞的性质，近陈氏认为光镜下的多种形态的异淋在电镜下系不同发育阶段的浆细胞[1]。我们在人B淋巴母细胞中复制EHF病毒成功，提示患者异淋也有可能允许病毒增殖。至于异淋的本质及来源有待深入研究。显然，EHF病毒在B淋巴母细胞中持续感染的建立，为此提供了一个很好的细胞模型。

参 考 文 献

〔1〕 陈德惠等：1965，中华病理学杂志14(4)：260.
〔2〕 姚志强等：1985，中华医学杂志67(9)：497.
〔3〕 Boonpucknavig S, et at., 1976, *American Journal of Pathology* 85：37.
〔4〕 Theofiloponlos A N, et al.1976, *J Imunol* 1 117：953.
〔5〕 洪涛等，1963，中华微生物学和免疫学杂志3(2)：69.
〔6〕 李德荣等，1985，解放军医学杂志10：95.
〔7〕 陈思毅等：1986，第四军医大学学报，7(3)215.
〔8〕 姚志强等，1986，中华微生物免疫学杂志8(4)：221.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Replication of HFRS Virus in Cultured Human Lymphoblastoid Cells with B Cell Characteristics

Yao Zhi qaong et al.

(*Lab of HFRS/Inf Dis Dept, Second Affiliated Hosp, Fourth Millitary Med College, Xi-an.*)

The susceptibility of human B lymphoblastoid cells to HFRS virus infection was studied. The results showed that the cells were productively infected by HFRS virus. The persistently infected cells had no obvious cytopathic effects and were indistinguishable morphologically from uninfected cells. It was difficult to identify complete virions in infected lymphoblasts by electron microscopy contrasted with strong immunofluorescence staining for intracellular HFRS virus antigens observed in the majority of these cells. The establishment of persistently infected human B type lymphoblastoid cells suggests that the atypical lymphocytes with many characteristics of lymphoblasts regularly found in peripheral blood of HFRS patients may support replication of HFRS virus.

Key words: epidemic hemorrhagic fever virus; human B lymphoblasts