

## 流行性出血热病毒对健康人外周淋巴细胞 和大白鼠骨髓细胞染色体影响的研究

刘文芳 杨占秋 钱其珍 向近敏

(湖北医学院病毒学研究所 武汉430071)

朱光奇

(湖北医学院流行病学教研室 武汉430071)

### 提 要

用流行性出血热病毒 (EHFV) A9 株, 滴度为  $TCID_{50}10^{-5}/0.1ml$ , 加入 10 名健康人外周血, 作淋巴细胞姊妹染色单体互换 (SCE) 和染色体畸变的检测。每份血分对照组 (不加病毒悬液) 和 A、B、C 实验组 (根据加不同病毒量而分)。其结果: 一、SCE 频率, 实验组 A ( $8.9 \pm 0.19$ )、实验组 B ( $9.9 \pm 0.2$ )、实验组 C ( $11.6 \pm 0.22$ ) 与对照组 ( $6.57 \pm 0.15$ ) 比较, A、B、C、实验组均分别高于对照组,  $P < 0.01$ , 差异有高度显著性, A、B、C 三个实验组比较,  $P < 0.01$ , 差异有高度显著性。二、染色体畸变, A、B、C 三个实验组分别与对照组比较,  $P > 0.05$ , 差异均无显著性。

用 EHFV HA 108 株,  $ID_{50}10^{-6}/0.02ml$  接种 2—5 日龄大白鼠脑内, 15 天后颈动脉放血处死, 取骨髓细胞培养, 另取幼大白鼠骨髓细胞培养作对照, 检测 SCE 和染色体畸变。结果: 一、SCE 频率, 实验组 ( $9.8 \pm 0.35$ ) 高于对照组 ( $5.4 \pm 0.19$ ),  $P < 0.01$ , 差异有高度显著性。二、染色体畸变, 实验组与对照组比较,  $P > 0.05$ , 差异无显著性。以上两个实验结果表明, EHFV 作用于细胞, 无论是在机体或试管内, 都引起 SCE 频率增高, 即 EHFV 促使 DNA 产生初级损伤, 但不致染色体畸变。

**关键词:** 流行性出血热病毒 染色体异常 人淋巴细胞 大白鼠骨髓细胞

1984 年, 我们首次报道了 39 例流行性出血热 (EHF) 患者外周血淋巴细胞姊妹染色体互换 (SCE) 频率升高<sup>[1]</sup>。为了证明 EHFV 对机体细胞染色体的影响, 我们用 EHFV 作用健康人外周血淋巴细胞和人工感染乳大白鼠骨髓细胞, 以观察 EHFV 对机体细胞染色体畸变和 SCE 频率的影响, 结果如下:

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料来源

1. 病毒 EHFV A9 株从病人血中分离到<sup>[2]</sup>, 实验用  $TCID_{50}10^{-5}/0.1ml$ ; EHFV HA 108

本文于 1988 年 6 月 16 日收到

株从黑线姬鼠分离到<sup>[3]</sup>。

2. 外周血淋巴细胞 10名健康人、男女各5名, 年龄27—60岁, 取外周血, 肝素抗凝。

3. EHFV感染大白鼠 将EHFV HA 102株, 第6代鼠脑用Eagle液漂洗, 研碎冻融, 2500r/m离心20min, 取上清稀释成20%,  $ID_{50}10^{-6}/0.02ml$ 接种2—5日龄大白鼠脑内, 15天后颈动脉放血处死, 取股骨骨髓细胞培养, 另取5只18日龄左右的正常大白鼠骨髓细胞培养作对照。

## 二、细胞培养

1. 培养基 每管盛RPMI-1640 4ml, 内含20%小牛血清, 青、链霉素常规量。

2. 病毒接种与培养 取健康人肝素抗凝血0.2ml于一瓶培养基中, 加PHA(自制)0.2ml (0.55mg/ml), 共接种4瓶, 3瓶分别加入EHFV A9株病毒悬液0.05ml、0.1ml、0.15ml为实验组, 另一瓶不加病毒作对照组。置37℃孵箱, 培养24hr后, 加入Brdu, 最终浓度10 $\mu$ g/ml, 用黑纸遮光, 继续培养48hr, 加入秋水仙素0.2 $\mu$ g, 再培养4hr。取EHFV感染的4只幼大白鼠骨髓细胞, 接种于培养基内, 加入Brdu, 最终浓度10 $\mu$ g/ml, 置38℃孵育48hr后, 加入秋水仙素0.2 $\mu$ g, 再培养4hr, 另取5只幼大白鼠骨髓细胞培养作对照。

## 三、制片与区别染色

1. 制片 取外周血和骨髓细胞培养物, 分别用1000r/m离心, 收集细胞, 再用0.075 mol/L KCl 38℃低渗20min, 以3:1甲醇、冰醋酸溶液固定二次, 按常规制片。

2. 区别染色 将室温保存1—2天的标本片, 置45℃水浴箱板上, 加pH 7.4 PBS复盖于标本片表面, 再用20W紫外灯照射15—20min, 间距10厘米, 然后立即用蒸馏水冲洗, 即用1:20 Giemsa pH 7.4 PBS染液染色15—20min, 油镜下即可见着色深浅不同的染色单体。

## 四、染色体畸变、SCE观察与计数

选择分散良好的中期相细胞, 观察其染色体结构改变, 每例50个细胞。选择Brdu掺入经过两个细胞分裂周期, 两条姊妹染色单体染成一深一浅的中期相, 每例标本至少观察30个细胞。SCE计数按照Lamber等标准。凡在端部或着丝粒部发生的SCE均计数为一个互换, 在中间部位出现的SCE则计数为两个互换<sup>[4]</sup>。

# 结 果

一、EHFV对健康人外周血淋巴细胞SCE频率及染色体畸变的影响(见表1、表2)

表1 EHFV对健康人外周血淋巴细胞SCE频率的影响  
Tab 1 Effect of EHFV on SCE frequency of lymphocytes of the peripheral blood of healthy persons

例 数	组 别	病毒量 (ml)	观察 细胞数	观察染 色体数	SCE 数	SCE / 中期细胞		SCE / 每条染色体	
						均值 $\pm$ SE	范围	均值 $\pm$ SE	范围
	对照	0	344	16250	2259	6.57 $\pm$ 0.15	2—15	0.148 $\pm$ 0.003	0.045—0.033
10	实 验 A	0.05	307	13754	2718	8.9 $\pm$ 0.19	2—22	0.198 $\pm$ 0.003	0.048—0.48
	B	0.10	328	14716	3246	9.9 $\pm$ 0.2	3—24	0.22 $\pm$ 0.003	0.086—0.52
	组 C	0.15	325	14551	3771	11.6 $\pm$ 0.22	4—29	0.259 $\pm$ 0.004	0.087—0.83

1. 检验: P 值, 1. 对照组分别与 A、B、C 三个实验组 SCE 频率比较,  $P < 0.01$   
2. A、B、C 三个实验组比较,  $A < B < C$   $P < 0.01$

以上结果表明, EHFV 可引起健康人外周血淋巴细胞 SCE 频率增加, 并随病毒量增加而增加, 各组之间差异具有高度显著性,  $P < 0.01$ , 但 EHFV 不引起染色体畸变, 见表 2。

表 2 EHFV 对健康人外周血淋巴细胞染色体畸变的影响

Tab 2 Effect of EHFV on chromosome abnormality of lymphocytes of the peripheral blood of healthy persons

例数	组别	病毒量 (ml)	观察 细胞数	断裂		间隙	
				数目	均值±SE%	数目	均值±SE%
10	对照	0	552	2	0.36±0.25	5	0.89±0.39
	实 验 A	0.05	524	6	1.15±0.46	4	0.76±0.36
	实 验 B	0.10	521	6	1.15±0.46	5	0.96±0.46
	实 验 C	0.15	545	7	1.3±0.48	11	2.0±0.6

按泊松分布计算, P 值, 对照组分别与 A、B、C 实验组比较:  $P > 0.05$ , 差异无显著性

## 二、EHFV 对大白鼠骨髓细胞 SCE 与染色体畸变的影响 (表 3、表 4)

表 3 EHFV 对大白鼠骨髓细胞 SCE 频率的影响

Tab 3 Effect of EHFV on SCE frequency of bone marrow cells of rats

组别	实验 动物数	观察 细胞数	观察染 色体数	SCE 数	SCE/中期细胞		SCE/每条染色体	
					均值±SE	范围	均值±SE	范围
对照	5	154	6365	832	5.4±0.19	1-11	0.13±0.004	0.024~0.26
实验	4	131	5347	1286	9.8±0.35	2-24	0.24±0.008	0.024~0.53
P 值					<0.01		<0.01	

P 值按  $\chi^2$  检验计算, 差异有高度显著性

表 4 EHFV 对大白鼠骨髓细胞染色体畸变的影响

Tab 4 Effect of EHFV on chromosome abnormality of bone marrow cells of rats

组别	实验 动物数	观察 细胞数	断裂		间隙	
			数目	均值±SE%	数目	均值±SE%
对照	5	253	3	1.2±0.68	4	1.58±0.78
实验	4	202	3	1.49±0.85	2	0.99±0.7
P 值				>0.05		>0.05

P 值按泊松分布计算, 差异无显著性

## 讨 论

流行性出血热病毒 (EHFV) 作用健康人外周血淋巴细胞和人工感染的大白鼠骨髓细胞, 均引起 SCE 频率增加, 这与我们 1984 年报道的 39 例 EHF 患者外周血淋巴细胞

SCE 增高的结果是一致的。在外周血淋巴细胞培养中还表现出 SCE 随病毒量增加而升高。这些均说明机体细胞 SCE 频率增高是 EHFV 直接作用的结果, 而且也证实了陈思毅等发现 EHF 患者骨髓细胞和外周血有核细胞中均有 EHFV 存在<sup>[5]</sup>。

我们的研究还指出, EHFV 对机体染色体的影响均不致染色体畸变。Gebhart 提出, 病毒作用于细胞能诱发染色体畸变, 而 SCE 不增加; 或者 SCE 增加, 但无染色体畸变, 这两种现象可能反映了病毒不同作用机制。Callwag 和 walf 的研究也已证实 SCE 和断裂形成是互相孤立的。Brown 等发现 Rausher 白血病病毒感染小鼠成纤维细胞培养后, SCE 频率明显增加, 但未观察到染色体畸变<sup>[6]</sup>, 这与本实验所观察的 EHFV 对细胞染色体作用是一致的。

### 参 考 文 献

- [1] 刘文芳等, 1985, 湖北医学院学报 5(1): 58.
- [2] 倪大石等, 1983, 中华医学杂志 63(2): 65.
- [3] 杨明瑞等, 1985, 湖北医学院学报 6: 114.
- [4] Lamber B, et al., 1979, *Hereditas* 83: 163.
- [5] 陈思毅等, 1987, 中华传染病杂志 5(1): 19.
- [6] Brown et al., 1982, 国外医学遗传学分册 5(2): 128.

## Study of Effect of EHFV on Peripheral Blood Lymphocytes of Healthy Persons in Vitro and on Bone Marrow Cells of Rats in Vivo

Liu Wen-fang et al

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan 430071)

Epidemic hemorrhagic fever virus (EHFV) A9 strain was inoculated into peripheral blood samples of 10 normal persons for incubation and sister chromatid exchange (SCE) and chromosome abnormality of lymphocytes were examined. Three experimental groups, named A, B, and C according to different dosages of virus supernatant and one group without virus as control were used. The frequencies of SCE of group A ( $8.9 \pm 0.19$ ), of group B ( $9.9 \pm 0.2$ ), of group C ( $11.6 \pm 0.12$ ) were each significantly higher than that of control group ( $6.5 \pm 0.15$ ). There is also significantly difference for the SCE rates of A, B and C groups,  $p < 0.01$ . As to the chromosome abnormality, there is no obvious difference,  $p > 0.05$ .

EHFV HA108 strain was inoculated into brain of suckling rats with ages of 2—5 days. Bone marrow cell cultures were done 15 days after infections. This experiment was also controlled by bone marrow cell cultures of normal suckling rats. The frequency of SCE of the test group ( $9.3 \pm 0.35$ ) was higher than that of control group ( $5.4 \pm 0.19$ ),  $P < 0.01$ , no difference in chromosome

abnormality,  $P > 0.05$ .

It may be concluded that EHFV can injure cell DNA without causing chromosome abnormality.

**Key words,** Epidemic hemorrhagic fever virus    Human lymphocytes  
Rat bone marrow    Chromosome abnormality