

应用 APAAP 光镜技术发现两株
HFRSV 敏感细胞中 HFRSV 包涵体*

黄传书 金伯泉 汪美先 刘 健** 赵 宁

(第四军医大学免疫学教研室 西安 710032)

提 要

本文应用抗 HFRSV McAb 的 APAAP (碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶) 免疫组化技术, 首次用光镜在 HFRSV 感染 8—14 天的 Hep-2 和 wish 细胞中查出病毒包涵体, 并且根据其位置和形态特征可分为: (1) 中央型包涵体; (2) 外周型包涵体; (3) 脱落包涵体。上述所见包涵体均在电镜下得到证实。此结果对于了解 HFRSV 感染细胞后的致病变作用以及研究 HFRSV 感染细胞包涵体的特征、来源、性质和形成过程具有十分重要的意义。

关键词: HFRSV 包涵体 APAAP

肾综合征出血热病毒 (HFRSV) 为有囊膜的单链 RNA 病毒。1982 年美国 McCormick 将 HFRSV 病毒 76—118 株适应于绿猴肾传代细胞系 VeroE6 细胞中⁽¹⁾。此后, 大多数学者均用此细胞作为 HFRSV 病毒学研究的细胞感染模型⁽²⁻³⁾。我国学者洪涛用多株 HFRSV 病毒感染 veroE6 细胞后, 用超薄切片在透射电镜下查到病毒包涵体和其它的一些细胞病变⁽³⁾。但是至今尚未见有光镜检查出 HFRSV 包涵体的报道。本研究以我室新近筛选和鉴定得到的两株 HFRSV 敏感细胞为细胞感染模型, 应用 APAAP 技术在光镜下查出病毒包涵体, 并在电镜下得到证实。

材料与方 法

1. 病毒株及含病毒的鼠脑悬液制备: HFRSV 陈株由本校微生物学教研室提供。取陈株鼠脑悬液接种于 3—5 日龄 BALB/C 乳鼠 (本校动物中心提供) 0.03ml/只。7—10 天后感染乳鼠出现典型的后肢麻痹等症状时, 放血处死乳鼠, 取感染鼠脑, 经双 McAb-ELISA 间接夹心法⁽⁴⁾证实病毒抗原阳性者, 加入 0.01mol/L pH7.8. PBS 中, 在匀浆器上制备 20% (W/V) 鼠脑匀浆液, 置-70℃冻存。用前冻融后, 经 8000g, 30min 离心后, 用 10% FCS RPMI1640 稀释至 2% (W/V), 备用。

2. 细胞株及感染细胞悬液的制备: 人羊膜上皮细胞 Wish 引自中国医学科学院病毒学研究所, 人喉癌上皮细胞 Hep-2 由本校微生物学教研室提供。两株细胞均在 10% FCS RPMI1640 完全培养基中饲养, 0.25 胰蛋白酶消化传代。感染时将处于对数生长期的单层细胞上清弃去, 加入 2% (W/V)

本文于 1990 年 8 月 23 日收到, 1990 年 10 月 19 日修回。

* 国家自然科学基金资助项目 ** 本校中心实验室

HFRSV 陈株乳脑悬液,使之均匀地覆盖于培养瓶中的细胞表面。置 5% CO₂ 培养箱中静置 90 分钟,弃去含病毒的上清,用 2% 血清 RPMI1640 维持细胞。隔日换液一次。在感染 2—16 天之间分别取感染细胞制备细胞悬液,备用。

3. **APAAP 染色:** APAAP 复合物由牛肠碱性磷酸酶 VI 型, (Sigma) 4.3 μ l, 溶于 1ml 0.05 mol/L, pH7.6, TBS (简称 TBS), 加抗碱性磷酸酶 McAb (澳大利亚南澳医学研究所 Burns 教授赠给) 2 μ l 制备而成, 临用前 1:3 稀释。底物配制系 Naphthol AS-MX 25mg 溶于 1ml 二甲基甲酰胺 (西安化学试剂厂), 加 pH8.2, 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 49ml, 再加 Fast Red TIR (sigma) 50mg, 充分混匀, 每次用前新鲜配制。将待检感染细胞悬液用 5% BSA RPMI1640 悬浮, 调整细胞浓度至 4~5 $\times 10^6$ /ml。用自制细胞制片机制片, 干燥过夜。用含丙酮-福尔马林 PB 缓冲液固定 30 秒钟, 依次用自来水和 TBS 洗涤。在固定好的细胞抗原片上加入 1:50 的抗 HFRSV McAb3G₁、6E₁₂、1E₁ 的混合腹水稀释液 50 μ l, 室温下作用 30 分钟, TBS 洗涤。加 1:50 羊抗鼠 IgG (GAM IgG(H+L)) (澳大利亚 INC 公司) 30 μ l, 室温下作用 30 分钟, TBS 洗涤, 再加 APAAP 复合物 30 μ l, 室温下作用 30 分钟, TBS 洗涤。重复加 GAM IgG 和 APAAP 复合物各 2 次, 每次均室温下作用 10min。末次 APAAP 作用后, 底物液显色 15min, 自来水冲洗, 苏木精衬染, 同时设正常鼠血清, 抗肉毒毒素 McAb 对照和用正常细胞进行替代实验。

4. **间接免疫荧光染色:** 按常规间接免疫荧光法进行。FITC-GAM IgG 购自丹麦 DAKO 公司。

5. **透射电镜:** 将收获好的感染细胞悬液离心成团块, 以 4% 戊二醛, 1% OsO₄, 双固定, 常规方法制备环氧树脂 618 包埋块, 超薄切片, 醋酸铀和枸橼酸铅染色, JEM-2000EX 型电镜下观察。

结 果

一、感染细胞的生长状况, 当 Hep-2 和 wish 细胞感染 HFRSV 10—12 天后, 部分细胞发生融合, 14—18 天有的形成多核巨细胞。用双 McAb-ELISA 间接夹心法检测感染上清和细胞冻融液证实其病毒抗原滴度逐渐升高。间接免疫荧光和 APAAP 组化染色发现病毒抗原阳性细胞数逐渐升高, 染色强度逐渐增强 (详见另文报道)。

二、感染细胞包涵体的动态变化: 光镜下在细胞受病毒感染后 2—6 天内均未查出病毒包涵体, 在电镜也只能在感染后 7 天见到一些不典型的包涵体样结构和病毒样颗粒。从细胞感染第 8 天始, 在光镜和电镜下均可见到大小不一的较典型的包涵体, 每个细胞内包涵体数目不等, 形态不一 (图版 III 1、图版 III 2)。第 12—14 天包涵体形态最为典型, 细胞包涵体检出率约 50—60%。此后, 随着时间的延长包涵体检出率又逐渐下降, 两种靶细胞的结果基本类似。

三、感染细胞包涵体的特征: 在 HFRSV 感染细胞 8—10 天后, 可在胞浆中见到界线清楚的, 艳红色的园形或椭圆形包涵体, 根据包涵体的位置和形态特征可分为:

1. **中央型包涵体:** 这类包涵体多于感染细胞后 8—10 天出现。呈园形位于细胞核旁 (图版 III 2)。

2. **外周型包涵体:** 多见于病毒感染后 12—14 天的细胞中, 定位于近胞膜或突出于胞膜, 大小不一。根据其形态和有无空洞可再分为 (1) 外周园形包涵体; (2) 外周不规

则形包涵体;(3)外周空洞形包涵体三种。在外周不规则形包涵体中可见有钺铃状,蝌蚪状以及弧杆状的包涵体(图版Ⅲ3、图版Ⅲ4)。在外周空洞形包涵体中电镜下有时见有1至数个空洞,有时在空洞内还遗留有残存变性样物质(图版Ⅲ5、图版Ⅲ6)。

3. 脱落型包涵体:在细胞受病毒感染14天以后,可见有少数包涵体开始脱落,已脱落的包涵体还带有部分细胞胞浆和胞膜(图版Ⅲ4、图版Ⅲ5)。

讨 论

APAAP技术是近年来国内外发展起来的,在很多方面较过氧化物酶组化技术(如ABC、PAP法)优越的一种免疫组化技术,具有定位准确、敏感性高,特异性好等优点^[5]。1986年Musiani首次用间接碱性磷酸酶标记技术检测腺病毒感染的Hep-2细胞以及巨细胞病毒感染的人胚纤维母细胞中的病毒抗原和包涵体^[6],得到满意的结果。HFRSV感染细胞后,其致病作用不甚明显,虽然洪涛等人在电镜下于感染细胞中查出病毒包涵体^[3],但是由于绝大多数基层单位不具有电镜条件,而且电镜样品制备复杂,周期较长,费用也较大,所以给进一步研究包涵体的性质、来源和特征以及推广使用带来了困难。本实验首次应用APAAP组化技术在光镜下查出了HFRSV陈株感染两株细胞中的包涵体,根据包涵体的位置,形态特征分为三种类型,并与感染细胞的感染时间有明显的关系,这对于进一步了解包涵体的发生、发展具有一定的意义。另外,这两株HFRSV敏感细胞及其中病毒包涵体的出现,在HFRS的早期诊断及致病机理的研究中有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] McCormick J B et al., 1982, *Lancet*, 1: 765.
- [2] Hung T et al., 1983, *Chinese J. microbiol immunol*, 3(2): 69.
- [3] 洪涛等, 1985, *病毒学报*, 1(1): 30.
- [4] 徐志凯等, 1986, *病毒学报*, 2: 377.
- [5] Cordell J et al., 1984, *J. of histochem cytochem*, 32(2): 219.
- [6] Musiani M et al., 1986, *J. immunol methods*, 88: 255

Observation of HFRSV Inclusion Bodies under Ordinary Optical Microscope with APAAP Immunohistochemical Technique in Two HFRSV Sensitive Cell Lines

Huang Chuan-shu Jin Bo-quan Wang Mei-xian
Liu Jian Zhao Ning

(*Department of Immunology, The Fourth Military Medical University, Xi-an, 710032*)

Investigation of the HFRSV inclusion bodies was carried out under ordinary optical microscope with APAAP (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase) immunohistochemical technique in the Hep-2 and Wish cell lines infected by HFRSV (Hemorrhagic fever with Renal syndrome virus). It was found that there are three types of virus inclusion bodies, central, peripherical and shedding types. All these findings were verified by electron microscopy. These results have great significance for further understanding the pathological changes of HFRSV infected cells, and are very useful for studying on the morphological characterization, origin and formation of HFRSV inclusion body.

Key words, HFRSV Inclusion APAAP