维普资讯 http://www.cqvip.com

246—252

8416(2)

第7卷第3期
1992年9月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.7 No.3
Sep.1992

流行性出血热病人尸检材料中的病毒包涵体

杨守京 刘彦仿 韩燕萍 徐志凯 晏培松

（第四军医大学病理教研室，西安710032）

R373.32

提 要

应用抗流行性出血热病毒多克隆及单克隆抗体结合敏感的方法在尸检组织切片上进行了免疫细胞化学染色，多克隆抗体可清楚地显示出尸检组织中病毒抗原阳性的包涵体结构。依光镜下染色的形态特点不同，可将包涵体分为四个类型即小泡型、大泡型、多泡型和实心型。单克隆抗体染色进一步证实，实心型及空泡型包涵体呈"N"抗原阳性，少数组织中空泡状包涵体也呈"G2"抗原阳性。病毒包涵体的出现可作为该病毒在人体细胞内感染及复制的形态学证据。

关键词：出血热流行性 尸检 病毒包涵体 免疫细胞化学

流行性出血热

在培养细胞中（Vero E6）出现流行性出血热病毒包涵体，国内学者早有报道[1]，在以前的观察中我们也曾注意到流行性出血热病人骨穿标本中有病毒包涵体样结构的存在[2]。由于在尸检组织中显示病毒抗原的困难，尚未见到尸检组织中有关病毒包涵体的描述。近来我们用抗出血热病毒多克隆及单克隆抗体，以多次重复PAP法（双PAP，三PAP，四PAP）及PAP结合ABC法对近期及陈旧尸检组织石蜡切片标本进行免疫细胞化学染色，在光镜下发现不同脏器的多种细胞中存在具有一定形态特征的病毒抗原阳性结构，确认为病毒特异性包涵体。病毒包涵体的出现为证实该病毒在人体多种脏器的泛嗜性感染及细胞内复制提供了直接的形态依据。

材料与方法

一、检测标本 选自1961年至1988年的流行性出血热病人尸检蜡块共18例，均为10%福尔马林固定，常规石蜡包埋的全身各组织，其中有心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、肠、垂体、甲状腺、胰腺、肾上腺、前列腺、睾丸等，切成5μm的组织切片。

二、免疫组织化学染色 对上述组织分别进行多克隆抗体及单克隆抗体的多次重复PAP及PAP+ABC染色[4]。

1. 多克隆抗体PAP染色：用兔抗出血热病毒多克隆抗体为第一抗体（本校微生物教研室提供），羊抗兔1：64为桥抗，兔PAP 1：200（本室自制），进行双PAP，三PAP，四PAP染色，即在传统的双PAP染色后对呈色为阴性或弱阳性的标本再重复桥抗及PAP一遍或二遍，直至明确

本文于1990年12月29日收到，1991年9月18日修回。
国家自然科学基金资助课题。

维普资讯 http://www.cqvip.com

阳性为止。

2. 多克隆抗体的PAP＋ABC染色：以兔抗出血热病毒多克隆抗体为一抗，生物素化羊抗兔1∶200为桥抗，连接PAP（同上）及ABC（Vectastain ABC Kit PK 4001），并重复生物素化桥抗及PAP和ABC染色，直至明确阳性。

3. 单克隆抗体PAP及PAP＋ABC染色：流行性出血热病毒G2蛋白单克隆抗体LV48A，N蛋白单克隆抗体L133，A35，A25-1（购于中国预防医学科学院病毒所），鼠PAP（武汉生物制品所），ABC（Vectastain ABC Kit PK 4002），多次重复PAP及PAP＋ABC染色，方法同前。

4. 对照：包括以PBS取代一抗的空白对照；以相同稀释度的无关同源血清及单抗代替一抗的替代对照；以多克隆抗体与组织孵育后再进行单抗染色的抗体阻断试验；鼠实验性流行性出血热组织为阳性对照。

结　　果

本文对18例流行性出血热病人尸检组织进行了染色观察，经多克隆及单克隆抗体染色出现阳性包涵体的病例及脏器分别见表1和表2。

表2　单克隆抗体染色出现阳性包涵体的病例及脏器

Tab. 2　The cases and organs with viral IB positive stained by MAbs

No	G2 MAb		N MAbs			
A1316			垂体[1], Pituitary[1],		肾上腺[3] Adrenal gland[3]	
A1616			肺[2] Lung[2],		扁桃体[1] Tonsil[1]	
A2132	甲状腺[2] Thyroid[2],	肾上腺[2] Adrenal gland[2]	甲状腺[2] Thyroid[2],		肾上腺[2] Adrenal gland[2]	
A2234	甲状腺[2] Thyroid[2]		肝[3] Liver[3],	肺[3] Lung[3],	肾上腺[2] Adrenal gland[2]	
A2361			肺 Lung[1],	支气管[1] Bronchus[1],	胰腺 Pancreas[1],	睾丸[1] Testis[1]
A2580			胰腺[1] Pancreas[1]			
A2604	甲状腺[2] Thyroid[2]		甲状腺[2] Thyroid[2]			
A2607			肝[1] Liver[1],	肺[1] Lung[1],	肾[1] Kidney[1],	脑[1] Brain[1],
			垂体[1] Pituitary[1],		胰腺[1] Pancreas[1],	睾丸[1] Testis[1]
A2642			肝[2] Liver[2]			
A2930	胰腺[2] Pancreas[2]		肺[2] Lung[2],	胰腺[3] Pancreas[3]	肾上腺[1] Adrenal gland[1]	
A8801			肾[2] Kidney[2]			

Note: 1. with solid IB positive.　2. with bubble IB positive.　3. 1 and 2.

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 多克隆抗体染色出现阳性包涵体的病例及脏器

Tab. 1 The cases and organs with viral IB positive stained by PAb

尸检号 No	性别 Sex	死亡日期 Died Date	脏器 organs
A1314	M	1961	脑 Brain
A1316	M	1961	垂体 Pitnitary, 胰腺 Pancreas, 肾上腺 Adrenal gland
A1320	M	1961	肝 Liver, 肾上腺 Adrenal gland
A1413	F	1962	肝 Liver
A1616	M	1963	肝 Liver, 胰腺 Pancreas
A2132	M	1968	甲状腺 Thyroid
A2232	M	1972	肝 Liver, 脑 Brain, 甲状腺 Thyroid, 胰腺 Pancreas, 睾丸 Testis
A2234	M	1972	肝 Liver, 脑 Brain, 垂体 Pitnitary, 甲状腺 Thyroid
A2281	M	1973	脑 Brain, 垂体 Pitnitary, 肾上腺 Adrenal gland
A2361	M	1974	肾上腺 Adrenal gland 睾丸 Testis
A2524	M	1978	肝 Liver, 肾上腺 Adrenal gland
A2604	M	1980	肝 Liver, 甲状腺 Thyroid, 前列腺 Prostate, 睾丸 Testis
A2607	M	1980	肾 Kidney, 垂体 Pitnitary
A2615	M	1980	脑 Brain, 胰腺 Pancreas
A2781	F	1983	肾 Kidney, 胰腺 Pancreas, 肾上腺 Adrenal gland
A2859	M	1984	肾 Kidney, 脑 Brain
A2930	M	1985	肝 Liver, 肾 Kidney, 胰腺 Pancreas, 肾上腺 Adrenal gland
A3801	M	1988	肾 Kidney

注：M—男性 F—女性

Note, M—Male. F—Female.

近期尸检组织中，多数脏器的细胞多克隆及单克隆抗体染色呈病毒抗原阳性反应，表现为胞浆弥漫着色，少数胞核内可见斑点状棕色颗粒，除个别病例的肾小管上皮偶见空泡状阳性结构外，未见明显的病毒包涵体。

陈旧尸检组织经多克隆抗体染色，可在大多数脏器的细胞浆内观察到病毒抗原阳性

维普资讯 http://www.cqvip.com

的小体，即病毒包涵体（表3，图5—9），包涵体的大小不等，小者直径在1μm以下，大者直径有6—7μm，一般为2—3μm，它们边缘整齐，多位于核旁，也可见于坏死及脱落的细胞中。根据其形态特征，可细分为实性包涵体（均匀的棕色颗粒，图4）；多泡型包涵体；大泡型包涵体（大的孤立空泡，图2，3）；小泡型包涵体（呈小泡状分散于胞浆中，图1）。

表3　四种类型的病毒包涵体常出现的部位

Tab. 3　The distribution of the four types of viral IB in the organs

类型 Types	脏器 Organs					
小泡型包涵体 Small-Bubble IB	肝 Liver,	肺 Lung,	脑 Brain,	甲状腺 Thyroid,	前列腺 Prostate,	睾丸 Testis
大泡包型涵体 Big-Bubble IB	肝 Liver,	肾 Kidney,	垂体 Pituitary,	胰腺 Pancreas,	肾上腺 Adrenal gland,	睾丸 Testis
多泡型包涵体 Multi-Bubble IB	肾 Kidney,	垂体 Pituitary,	甲状腺 Thyroid,	胰腺 Pancreas,	肾上腺 Adrenal gland	
实性包涵体 Solid IB	肝 Liver,	肺 Lung,	肾 Kidney,	胰腺 Pancreas,	垂体 Pituitary,	睾丸 Testis

上述病例的组织，经单克隆抗体染色大多呈特异性胞浆弥漫性棕色反应，部分病例的某些脏器中出现N抗原阳性的实性及空泡型包涵体结构，少数病例的个别脏器出现G2抗原阳性的空泡型包涵体，且同时伴有N抗原阳性（表2）。

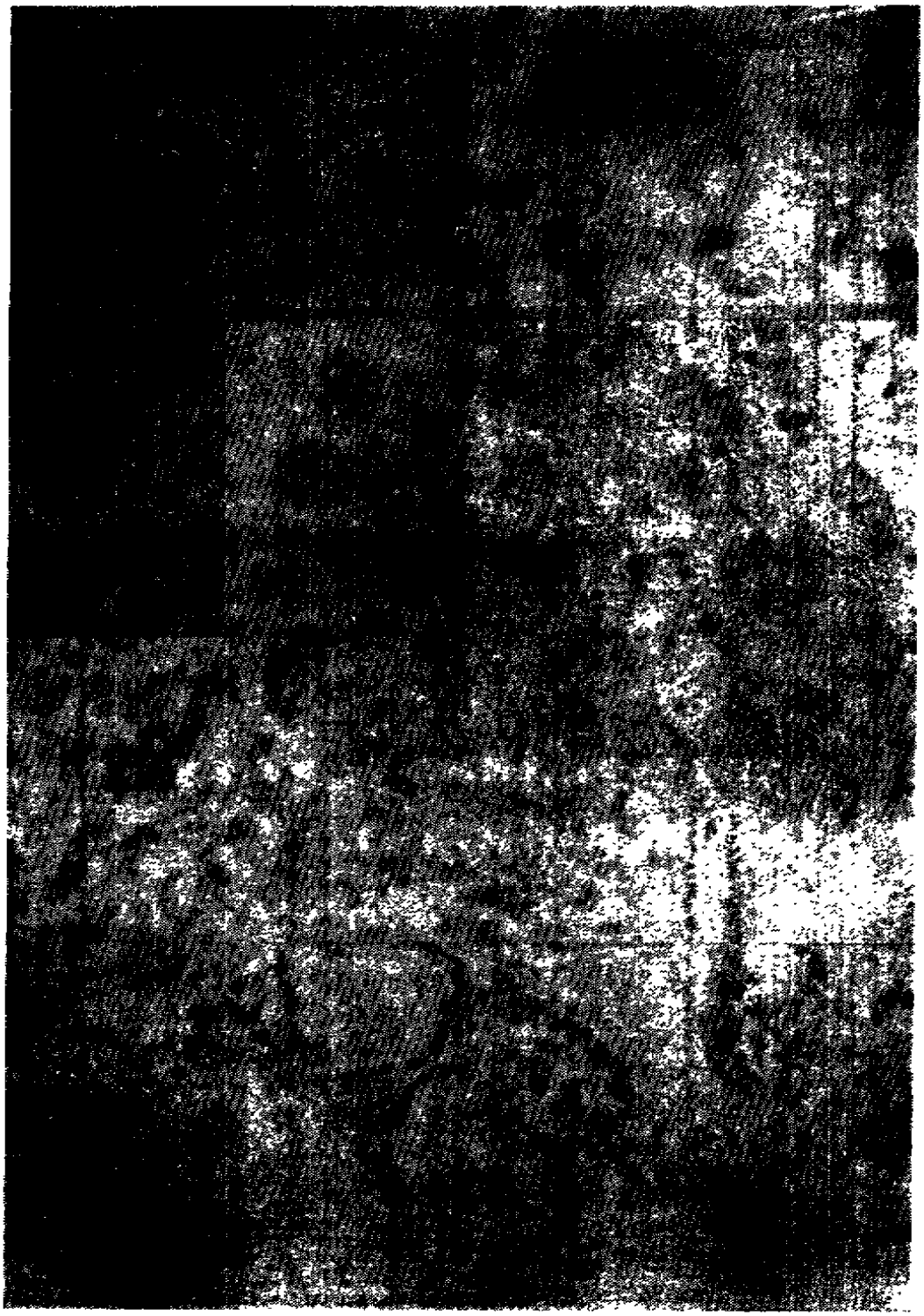
存在抗原阳性病毒包涵体的组织细胞，部分呈明确的退行性改变，在坏死细胞及坏死脱落细胞中也有病毒包涵体存在，多数细胞病变不明显，详细描述将另文发表。

讨　论

细胞内出现病毒包涵体是出血热病毒感染和复制的重要特征。以往由于未采用敏感的免疫组化方法，难以在尸检材料中定位病毒包涵体。应用出血热病毒单克隆抗体常规免疫组化方法也仅在胞浆中见到弥漫性阳性反应，多克隆抗体的应用虽可增加病毒抗原的阳性检出率[3]，但仍难以达到满意的染色效果。本工作利用抗出血病毒多克隆及单克隆抗体结合多次重复PAP法，PAP+ABC结合法以及PAP+ABC多次重复的方法，借以增加免疫组化检测抗原的敏感性，在近期及长期保存的尸检组织细胞胞浆中清晰地观察到了病毒特异性包涵体结构。

根据本文多克隆抗体染色，病毒包涵体可从形态上分为四个类型，即大泡、小泡、多泡及实心型，本质上是空泡状和实心性两种，除此之外，还有弥散于胞浆内的抗原成分，确定包涵体及弥散性抗原的性质，特别是空泡型包涵体的抗原性质，可有助于阐明细胞病变机制。为此，本文用了抗"G2"及"N"蛋白两种类型的单抗，在同一组织连续切片上染色，结果两种类型的单抗均可显示胞浆中弥散性抗原，此外抗G2单抗可显示少数脏器的空泡型包涵体，而抗N单抗可显示实性包涵体，有时也显示空泡型包涵

维普资讯 http://www.cqvip.com



维普资讯 http://www.cqvip.com

图1．脑神经细胞中"小泡型"病毒包涵体，PAb-4PAP，X 1,000

图2．脑垂体细胞中"大泡型"病毒包涵体，PAb-4PAP，X 1,000

图3．肾小管上皮细胞中"实心型"病毒包涵体，McAb-ABC，X 1,000

图4．肾小管上皮细胞中"多泡型"病毒包涵体，PAb-3PAP+3ABC，X 1,000

图5．肾上腺球状带状上皮"多泡型"病毒包涵体，PAb-3PAP+ABC，X 400

图6．胰腺，胰岛及腺上皮细胞中"多泡型"及"小泡型"病毒包涵体，PAb-3PAP+3ABC，X 400

图7．睾丸曲细精管生精上皮细胞中"小泡型"及"多泡型病毒包涵体PAb-3PAP+3ABC，X 400

图8．甲状腺上皮细胞中"小泡型"及"多泡型"病毒包涵体，PAb-3PAP+3ABC，X 400

图9．前列腺腺上皮细胞中"小泡型"病毒包涵体，LV48A MAb-3PAP+3ABC，X 400

Fig 1. Viral inclusion bodies (IB) in degenerated neuron small-bubble or central vesicular type, PAb-4PAP, X 1, 000

Fig 2. IB in cells of anterior pituitary gland, large-bubble type, PAb-4PAP, X 1,000

Fig 3 *IB in epithelium of renal tubule, solid type, McAb-ABC, X 1,000*

Fig 4. IB in epithelium of renal tubule, multi-bubble type, PAb-3PAP+ABC, X 1,000

Fig 5. IB in zona glomerulosa cells of adrenal gland, multi-type, PAb-3PAP+3ABC, X 400

Fig 6. IB in cells of island and acinar cells of pancreas, small and multi-bubble type, PAb-3PAP+3ABC, X 400

Fig 7. IB in spermatogenic cells, small and multi-bubble type, PAb-3PAP+3ABC, X 400

Fig 8. IB in epithelium of thyroid gland, Pb-3PAP+3ABC, X 400

Fig 9. IB in epithelium of prostate gland, small bubble type, McAb LV48A-3PAP+3ABC, X 400

体。这种实性包涵体其形态大小及抗原性质与电镜下感染细胞中出现的包涵体基本一致[1]，由此推断，本文中所描述的实性包涵体可能就是亚细胞水平的病毒包涵体。关于细胞中空泡型包涵体，多抗与单抗的染色结果不很一致，多抗在大多数组织中均可显示出该结构，而单抗只显示少数组织者，有时G2和N抗原均为阳性。产生这种差异的原因，空泡型包涵体的性质及意义，以及与电镜下的包涵体如何联系尚有待进一步工作。

病毒包涵体在人体各脏器多种细胞的广泛存在，进一步证实了该病毒可侵犯人体多种组织细胞，同时也说明了病毒感染的泛嗜性。在这些广泛的病毒抗原阳性细胞中，只有部分细胞发生退变坏死，多数细胞在形态上仍然正常，但就细胞的退变坏死程度而言，抗原阳性细胞远比抗原阴性者严重，说明细胞的退变坏死可能与病毒或其相关因素作用有关。

参考文献

〔1〕 Hung, T., et al., 1987, *Intervirology*, 27：45—52.

〔2〕 杨守京等，1990，中华医学会第二次全国流行性出血热学术会议论文汇编，西安。PP 33。

〔3〕 刘彦仿等，1991，病毒学杂志，6(2)：107—112.

〔4〕 Davidoff, M., and Schulze, W, 1990, *Histochemistry*, 93：531—536.

维普资讯 http://www.cqvip.com

The Viral Inclusion Bodies in the Autopsy Tissues of Patients with Epidemic Hemorrhagic Fever

Yang Shou-jing Liu Yan-fang Han Yan-ping Xiu Zhi-kai
(*Department of Pathology, Fourth Military Medical College, Xi'an* 710032)

Using polyclonal antibody (PAb)and monoclonal antibodies(MAbs) against epidemic hemorrhagic fever virus (EHFV), the viral antigens in fresh and long-term storage EHF autopsy tissues were studied comparatively with more sensitive multi-layer PAP and PAP combined with ABC (PAP+ABC) techniques. The results showed that the inclusion bodies (IB) with viral antigens positive could be demonstrated in the autopsy tissues. Four types of IB, designated solid, small-bubble, big-bubble and multi-bubble, could be observed in the light microscope depending on the morphological characteristics. The solid and bubble IB with nucleocapsid (N) protein antigen positive and the bubble IB in some tissues also with envelope glycoprotein II(G2)antigen positive were further confirmed by MAbs L133, A35, A25-1 against N and LV48A against G2. The existence of viral IB in human tissues could supply direct morphological evidence for the EHFV infection of cells.

Key words: Hemorrhagic Fever Epidemic Autopsy Immunocytochemistry Viral Inclusion Bodies