

218-225

416(4)

第8卷 第3期
1993年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 8 No. 3
Sept. 1993

肾综合征出血热病毒对不同生理状态小鼠的实验感染及在小鼠淋巴细胞亚群中的定位

唐永明¹ 杨为松¹ 洪涛² 周静仪²

(1 第四军医大学唐都医院传染科, 西安, 710038)

(2 中国预防医学科学院病毒研究所, 北京, 100052)

R373.3

提 要 本文用双标记免疫细胞化学和双标记免疫电镜技术观察了环磷酰胺处理的 BALB/c 小鼠及乳鼠实验感染肾综合征出血热病毒后的发病和病毒定位情况, 结果发现, 免疫功能不成熟或有缺陷的小鼠感染后发病并有规律地死亡, 而免疫功能正常鼠只呈隐性感染。在发病的和隐性感染的小鼠之间, 病毒定位主要差别在于 HFRSV 是否感染免疫器官, 即 HFRSV 抗原可见于发病鼠外周血, 脾和胸腺的单个核细胞中, 而在隐性感染小鼠的这些免疫器官中则为阴性, HFRS 病毒颗粒及病毒抗原广泛见于发病鼠的 T 细胞亚群中, 在 Thy-1, L3T4 和 Lyt-2 亚群中, 双标记阳性细胞百分比分别为 24.6±15.3%, 7.5±6.1% 和 17.7±6.1%。对 HFRSV 在 T 细胞中分布的差异还作了动态比较, 结果提示: 细胞免疫可受 HFRSV 的直接影响, 病毒对宿主免疫系统的感染是 HFRSV 感染发病的一个关键因素。

关键词: 肾综合征出血热 实验感染 淋巴细胞亚群 病毒定位 双标记免疫细胞化学

病毒

淋巴细胞

与人类肾综合征出血热(HFRS)感染发病相比较, 啮齿动物自然或实验感染 HFRSV 后的结局有较大差异^[1-3]。目前对细胞免疫在发病机理中的作用未形成统一的认识。为了阐明人和鼠之间病毒定位和淋巴细胞改变的特点, 本文比较了小白鼠成鼠和乳鼠感染后病毒脏器定位和在淋巴细胞亚群中分布的差异, 并观察了环磷酰胺(CP)处理的成年鼠感染 HFRS 后的发病情况。

材料和方法

1 研究对象:

1.1 成鼠: 40 只 BALB/c 小鼠, 雌雄各半, 鼠龄为 20 天, 将其分为 4 组: I 组接种 CP 和病毒; II 组只接种病毒; III 组接种 CP; IV 组接种生理盐水和 RPMI-1640。

1.2 乳鼠: 48 只 2 日龄的 BALB/c 乳鼠分为试验和对照两组。

1.3 病毒: HFRSV-CHEN 株^[4]感染的乳鼠悬液, 其 TCID₅₀ 为 1×10⁷ PFU/ml。

2 主要试剂:

2.1 CP 是上海第 12 制药厂产品, 成鼠的接种剂量为 300mg/kg。

2.2 大鼠抗小鼠淋巴细胞亚群的单克隆抗体(鼠 T LC McAb)由北京医科大学免疫教研室提供, 其中包括 Thy-1.2(鼠全 T 细胞), L-2.1(鼠 T 抑制/杀伤细胞)和 L3T4(鼠 T 辅助/诱导细胞)。

• 本文于 1992 年 8 月 19 日收到, 1993 年 1 月 6 日修回。

- 2.3 亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)和生物素化羊抗鼠 IgG 抗体(Bio-SAMr)为 Becton-Dickinson 公司产品。
- 2.4 抗 HFRSV 抗体,以 HFRS 病人恢复期血清为第一抗体,其荧光抗体滴度为 $1:10240$ 。
- 2.5 酶标羊抗人 IgG(HRP-SAMr),滴度为 $1:64$ 。
- 2.6 酶底物,3-氨基-9-乙酰卡巴唑(AEC)为 Becton-Dickinson 公司产品,呈红色。氯化钴处理的 3,3'-二氨基联苯胺(Co-DAB)^[6]呈深灰蓝色。
- 2.7 胶体金标记的羊抗鼠 IgG(Au20-SAMr),按 Frens 法^[7]制备。
- 3 单酶双底物双标记免疫细胞化学,参照 Ohmann HB 法^[8]进行。简述如下:
 - 3.1 加入抗 HFRS IgG(终浓度为 $1:500$)和鼠 T LC 单克隆抗体混合物于细胞上,4℃作用 18 小时,清洗吹干。
 - 3.2 用 1%双氧水甲醇阻断内源酶。
 - 3.3 加入抗 HFRS IgG 和 Bio-SAMr 的混合物,4℃作用 1 小时,清洗和吹干。
 - 3.4 加 ABC 试剂,37℃作用 15 分钟。
 - 3.5 加 Co-DAB 使 T 细胞标志抗原呈深灰蓝色。
 - 3.6 加 HRP-SAMr,37℃作用 1 小时。
 - 3.7 加 AEC 使 HFRS 抗原部位呈砖红色。
 - 3.8 光镜下计数双标记细胞的个数。
- 4 双标记免疫电镜:
 - 4.1 固定,用 PLP 固定液 4℃固定 1 小时。
 - 4.2 包埋前染色,
 - 4.2.1 加入抗 HFRS IgG 和鼠 T LC 单克隆抗体室温作用 18 小时。
 - 4.2.2 用 1%的双氧水甲醇阻断内源酶。
 - 4.2.3 加 Bio-SAMr 和 Au20-SAMr 室温作用 8 小时。
 - 4.2.4 加 ABC 试剂,室温作用 8 小时。
 - 4.2.5 DAB 反应。
 - 4.2.6 常规电镜标本处理和观察。

结 果

1 乳鼠感染 HFRSV 的表现和死亡率

腹腔接种了 100 TCID₅₀的病毒后,所有的乳鼠发病和有规律地死亡。病症为蜷曲,痉挛和抽搐,毛发生长明显迟缓,与正常小鼠比较形体明显缩小。一般在接种病毒的第 14 天死亡,最早 8 天,最晚 16 天。

2 CP 对成鼠感染 HFRSV 的影响

CP 处理的成鼠感染 HFRSV 后 10 天亦出现类似于感染乳鼠的症状,如动作迟缓,蜷缩和抽搐等,症状出现数天后,感染鼠均死亡(见表 1)。

血清学检查表明,CP 处理的感染成鼠血清中对 HFRSV 的抗体应答水平(5376 ± 2817)明显低于未用 CP 的感染成鼠(12288 ± 6009),几何平均滴度分别为 3.679 ± 0.222 和 4.040 ± 0.346 , $P < 0.01$ 。该两组感染中,HFRSV 阳性脾细胞百分率分别为 39%和 2%, $P < 0.01$ 。

3 HFRSV 在内脏中分布的差异

乳鼠从接种病毒 4 天后在外周血和肾脏中开始出现 HFRSV 抗原,接种 5 天后,全部被检组织中均能测到 HFRSV 抗原,脾细胞中 HFRSV 抗原阳性率在接种第 7 天达到高峰($39.5 \pm$

5.6),并在此16天内保持该水平,从接种第5天开始,血清中出现HFRSV特异性抗体。

未用CP的感染成鼠于接种第9天在肺和肾脏中可检出HFRSV抗原,但持续时间较短(约3天),且脾脏等免疫组织中未能检出病毒抗原(见表2)。

表1 CP处理对成鼠感染HFRSV后结果的影响

Table 1 Differences of Results in HFRSV Infected Adult Mice with and without CP Treatment

组别 Group	总计 Total No.	发病数 Morbidity	死亡数 Mortality	中和抗体滴度 NTAb titer	脾细胞中HFRS抗原(%) HFRS-Ag in spleen cell(%)
I, CP+V	10	10	7	5376+—2817	39
II, V	10	0	0	11264+—5288	2
III, CP	10	0	1	ND	ND
IV, Medium	10	0	0	ND	ND

CP——环磷酰胺(cyclophosphamide);

V——HFRS病毒(HFRSV);

NTAb——HFRSV的中和抗体(Neutralizing antibody for HFRSV);

ND——未测(Non-detected);

Medium——RPMI-1640培养基(RPMI-1640 medium)

表2 HFRSV抗原在不同条件下的小鼠内脏中的分布

Table 2 Distribution of HFRSV Antigen in Viscera of Infected Mice at Different Conditions

组别 Group	数量 No.	HFRSV抗原阳性程度 Positivity of HFRSV antigen						
		Thy	Spl	Bra	Lun	Kid	Liv	Hea
乳鼠 Suckling	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
成年鼠 Adult	6	ND	—	+-	++	+	+	—
CP处理 CP-treated	9	ND	++	++	++	++	++	—

Thy——胸腺; Spl——脾; Bra——脑; Lun——肺; Kid——肾;

Hea——心; Liv——肝

“+++”, 深强阳性; “++”, 强阳性; “+”, 阳性;

“+-”, 弱阳性; “-”, 阴性。

从表2可见,与未用CP的感染成鼠相比,CP处理的成鼠及乳鼠感染后HFRSV脏器分布的主要差异在于HFRSV对免疫脏器(如胸腺和脾脏)的侵袭。

4 脾单个核细胞中HFRSV抗原的动态变化及与血清中特异性抗体水平的关系

如图1所示,从接种病毒第4天开始,脾单个核细胞中可检出HFRSV抗原,并在较长的时间内保持较高的水平(35+—7.5%)。

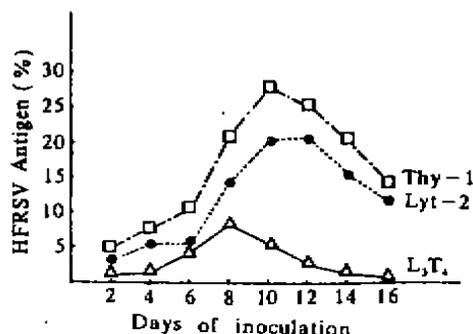


图1 感染乳鼠的T淋巴细胞亚群中HFRSV病毒抗原阳性率的动态变化

Fig. 1 Kinetic changes of HFRSV antigen positive rates in T LC subset of infected suckling mice

将脾细胞中HFRSV抗原阳性率与血清中特异性抗体水平做相关分析,结果未见显著性相关($r=0.27, P>0.05$)。

5 鼠淋巴细胞亚群中的病毒定位

5.1 HFRSV抗原在淋巴细胞亚群中的定量分布:通过双标记免疫电镜技术观察HFRSV抗原在感染乳鼠及CP处理的成鼠外周血和脾组织T细胞亚群中的定量分布,结果见表3和图1。在Thy-1, Lyt-2和L3T4阳性标志的细胞亚群中,均可检出HFRSV抗原,双标记细胞阳性率在Thy-1组为 $24.6 \pm 15.3\%$, L3T4组为 $7.5 \pm 6.1\%$, Lyt-2组为 $17.7 \pm 6.1\%$ 。

表3 HFRSV在鼠T淋巴细胞亚群中的分布

Table 3 Distributions of HFRSV in Mouse T Lymphocyte Subpopulations

组别 Group	外周血淋巴细胞 PBL			脾 Spleen			胸腺 Thymus		
	Thy1	L3T4	Lyt2	Thy1	L3T4	Lyt2	Thy1	L3T4	Lyt2
乳鼠 Suckling *	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CP-处理 CP-treated **	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND
成鼠 Adult ***	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND

* 乳鼠, Suckling; ** CP处理的成鼠 CP-treated adult; *** 未经CP处理的成鼠 non-treated adult; ND, 未测。

未用CP处理的感染成鼠各淋巴细胞亚群中未见到HFRSV抗原。

动态观察鼠T淋巴细胞亚群中HFRSV抗原的数量分布可见, HFRSV抗原阳性细胞百分比在感染的第8—10天最高, 此时发病最重、死亡率最高。随后在L3T4组中双标记阳性细胞百分比迅速降低甚至测不出, 而在Thy-1和Lyt-2组中双标记阳性细胞百分比在较长的时间内仍保持较高的水平。

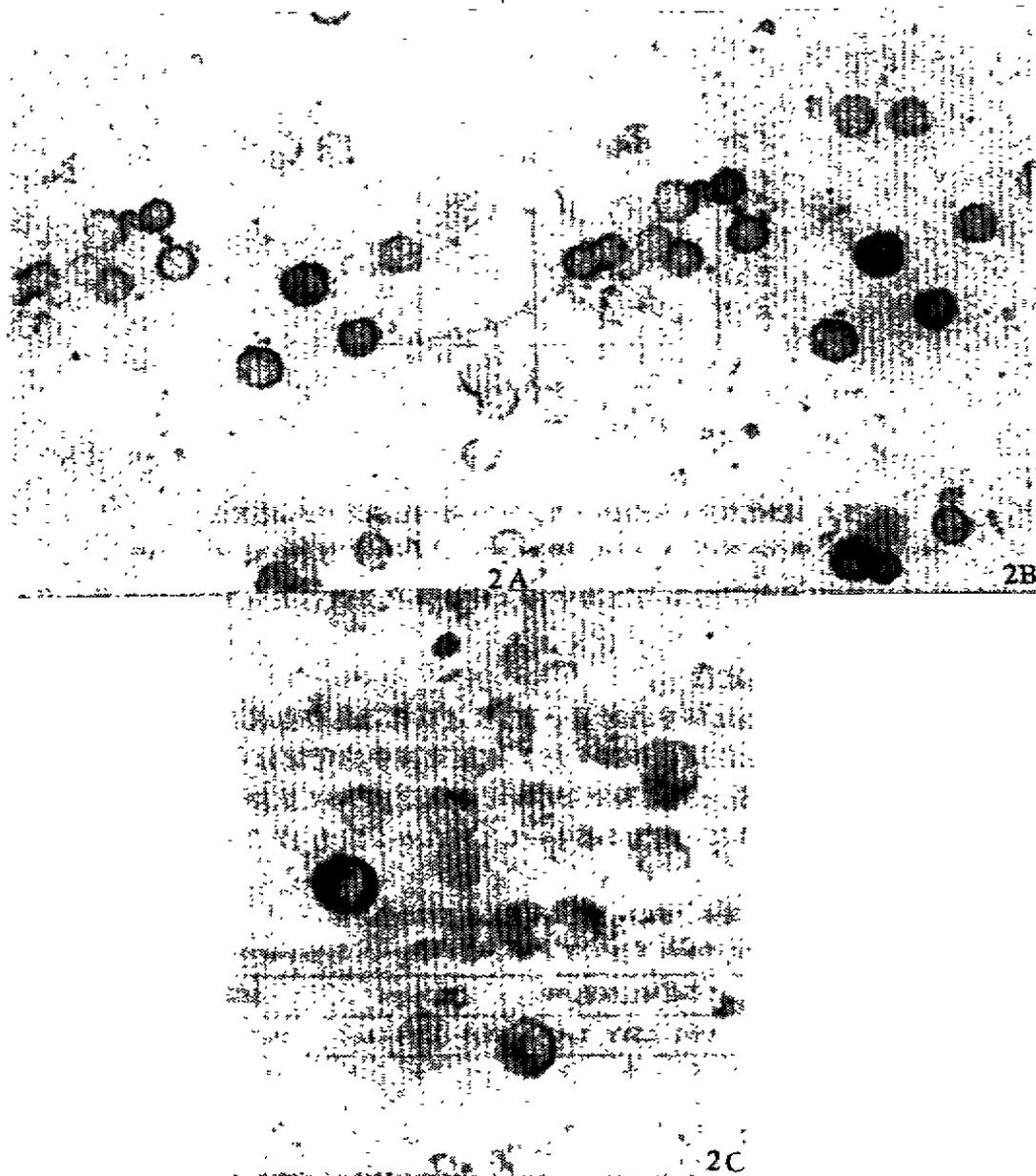


图2 双标记免疫细胞化学法检测 HFRSV 感染乳鼠的外周血淋巴细胞。钴化 DAB(灰蓝色)用于显示小鼠 T 淋巴细胞亚群的标志, AEC(砖红色)用于显示 HFRSV 抗原。(A) Thy-1 组中双标记阳性细胞, (B) L₃T₄ 组中双标记阳性细胞, (C) Lyt-2 组中双标记阳性细胞。

Fig. 2 Double immunocytochemistry for peripheral blood lymphocytes from HFRSV infected suckling mice. DAB-C (greyish blue) is used to show mouse T LC subset marker, and AEC (brick red) to show HFRSV antigen (A) double-labeled cells in Thy-1 group (B) double-labeled cells in L₃T₄ group (C) double-labeled cells in Lyt-2 group.



图 3 电镜检查环磷酰胺处理的成鼠感染 HFRSV 后脾细胞中的 HFRSV 颗粒

Fig. 3 Electron microscopy for HFRSV particles in spleen cells from HFRSV infected adult mice with CP treatment

图 4 双标记免疫电镜法检测 HFRSV 感染乳鼠的脾细胞

(A) Lyt-2⁺ 细胞 (胶体金标记) ($\times 10000$), (B) Lyt-2⁺ 细胞胞浆空泡中特异性病毒颗粒 (酶标记)。

Fig. 4 Double immunoelectron microscopy for the spleen cells from HFRSV infected suckling mice. (A) Lyt-2⁺ cells (colloidal gold labeled) ($\times 10000$), (B) Specific viral particles (enzyme labeled) within plasmic vesicles of Lyt-2⁺ cells

5.2 电镜观察结果: 电镜下在感染乳鼠的胸腺和脾脏组织中发现 HFRSV 颗粒, 有双层囊

膜,直径约 120nm。双标记免疫电镜显示感染乳鼠脾脏中 Thy-1, L3T4 及 T_{yt}-2 阳性 T 细胞胞浆空泡中有免疫酶标记的病毒颗粒。

讨 论

本实验证实了 HFRSV 对成鼠无致病力,但对新生小鼠却产生严重的甚至致命的感染,这与 Kim 和 McKeel^[9]报道的结果相一致。为了澄清这种年龄依赖性发病是否与免疫系统不成熟或缺陷有关,我们在用 HFRSV 攻击以前先用 CP 处理,以干扰免疫系统的正常功能。结果表明,CP 作为一种免疫抑制剂,可以增加小鼠对 HFRSV 感染的易感性。其他学者^[4,10]亦报道了 CP 处理的这种效应,如用 CP 处理猕猴和地鼠可产生类似于人类感染 HFRSV 的症状和特征。CP 的这种抑制效应在用药后 48 小时最高。B 细胞是 CP 作用的主要靶细胞,此外,其他免疫活性细胞(如 T, NK 和巨噬细胞)可在不同程度上受 CP 的影响。因此,CP 有助于 HFRSV 突破宿主的免疫屏障,在体内传播。

Nakamura T 等^[11]报道了正常鼠和无胸腺小鼠在 HFRSV 感染发病方面的差异,发现 HFRSV 感染后正常小鼠发病具有年龄依赖性,而无胸腺鼠的发病则与年龄无关。此外,与新生 24 小时内小鼠相比,5—7 日龄小鼠感染 HFRSV 后死亡时间早得多,而体内 HFRSV 病毒滴度却低得多。这说明了细胞免疫不但在清除体内病毒方面而且在免疫病理损伤方面具有一定的作用。Asada H^[12]证实了 T_{yt}-2 阳性 T 细胞对 HFRSV 的感染具有保护作用,但尚未证明在体内 T 细胞亚群是否会受到 HFRSV 的影响。

本文用多种免疫细胞化学方法探讨了 HFRSV 在小鼠 T 淋巴细胞亚群中的分布,发现感染发病的小鼠体内不但在非免疫器官,而且在外周血、脾脏及胸腺等免疫器官中有 HFRSV 抗原的分布,而感染未发病的小鼠体内 HFRSV 抗原只见于非免疫脏器中。这提示了 HFRSV 要突破宿主的免疫屏障并建立感染,对免疫器官的感染侵袭是一关键性因素。本文证明了 HFRSV 可感染小鼠外周血、脾和胸腺的多种淋巴细胞亚群(Thy-1, L3T4 和 T_{yt}-2)。在电镜下这类细胞可见到病毒颗粒。比较 T 细胞亚群中 HFRSV 抗原阳性率和持续时间可见, T_{yt}-2 组(与 CD8, T_s/c 类似)的 HFRSV 抗原阳性率和持续时间明显大于 L3T4 组(与 CD4, Th/i 类似)。说明细胞免疫可受到病毒的影响。这些结果可解释为什么给感染乳鼠输注 T_{yt}-2 细胞悬液可发挥保护作用。

参 考 文 献

- 1 Kurata T, et al. Immunofluorescence studies of disseminated Hantaan virus infection of suckling mice. *Infection & Immunity*. 1983, 41(1), 391~198
- 2 Tanishita O, et al. Persistent infection of rats with haemorrhagic fever with renal syndrome virus and their antibody responses. *J Gen Virol*, 1986, 67(5), 2819~2824
- 3 Lee P W, et al. Pathogenesis of experimental Hantaan virus infection in laboratory rats. *Arch Virol*, 1986, 88(1), 57~66
- 4 徐晓,等. 流行性出血热病毒实验感染猕猴的初步研究. *中华传染病杂志*, 1990, 8(1), 25~28
- 5 倪大石,等. 流行性出血热实验动物模型的研究. *安徽医学*, 1985, 6(3), 7~9
- 6 Hsu S. M., Raine L and Fanger H. A comparative study of peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*, 1981, 75(5), 734~738
- 7 John M. *Techniques in Immunocytochemistry*. Vol 3. 1st ed. London: Academic Press, 1985, 204~215
- 8 Ohmann H. B. Double-immunolabeling systems for phenotyping of immune cells harboring bovine viral diarrhoea virus. *J His*

- tochem Cytochem, 1987, 35(6), 627~633
- 9 Kim G. R. and McKee K. T. Pathogenesis of Hantaan virus infection in suckling mice; Clinical, virologic and serologic observations. *Am J Trop Med Hyg*, 1985, 34(2), 388~395
- 10 姚楚铮, 等. 流行性出血热动物模型的建立. *中华医学杂志*, 1987, 67(5), 243~246
- 11 Nakamura T. et al, Differential susceptibility and resistance of immunocompetent and immunodeficient mice to fatal Hantaan virus infection, *Arch Virol*, 1985, 86(1-2), 109~120
- 12 Asada H, et al. Role of T lymphocyte subsets in protection and recovery from Hantaan virus infection in mice. *J Gen Virol*, 1987, 68(7), 1961~1969

Experimental Infection of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus in Mice and Viral Antigen Localization in Mouse Lymphocyte Subpopulations

Tang Yongming* Yang Weisong*
Hong Tao** Zhou Jingyi**

* (Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038)

** (Institute of Virology, The National Academy of Prevention, Beijing, 100052)

Double-immunocytochemistry and double-immunoelectron microscopy were applied to investigate the pathogenesis and virus localization in cyclophosphamide-treated adult and suckling BALB/c mice after the infection of hemorrhagic fever with renal syndrome virus. It was found that, after the infection, immunologically immature or deficient mice developed disease and died regularly, while normal adult mice showed only a subclinical infection. The major difference of virus localization between the diseased and non-diseased mice was whether the immune organs would be infected by HFRS virus. HFRSV antigen was observed in the immuno-competent cells in peripheral blood, spleen and thymus from suckling mice and diseased adult mice, but was not detected in the corresponding cells from non-diseased adult mice. It was also found that HFRSV was distributed in a variety of lymphocyte subpopulations. The percentage of double-labeled cells was $24.6 \pm 15.3\%$ in Thy-1 group, $7.5 \pm 6.1\%$ in L3T4 group and $17.7 \pm 6.1\%$ in Lyt-2 group. In addition, kinetic changes of HFRSV positive rate in T lymphocyte subsets were observed in the present study.

Key words: Hemorrhagic fever with renal syndrome Experimental infection Lymphocyte subpopulation Virus localization