

应用单克隆抗体免疫细胞化学法分析尸检组织中肾综合征出血热病毒 G2, NP 及 HA 结构蛋白抗原

杨守京¹ 刘彦仿¹ 刘莹莹² 晏培松¹ 徐志凯¹ 刘厚才³

(1. 第四军医大学, 西安, 710032; 2. 解放军 302 医院, 北京, 100039; 3. 解放军 145 医院, 山东莱阳, 265200)

摘要 本文应用 15 株分别抗肾综合征出血热(HFRS)病毒糖蛋白(Glycoprotein I G2), 核蛋白(Nucleocapsid, NP)及血凝素(Hemagglutinin, HA)抗原的单克隆抗体免疫细胞化学方法对 19 例 HFRS 尸检病例的 16 种组织中的病毒抗原进行了定位和分布的研究及抗原分析。结果表明, 死于早期 HFRS 人体组织内病毒抗原量大, 分布广泛, 主要以可溶性和颗粒性两种形式存在, 前者存在于细胞内和细胞外, 呈 G2, NP 及 HA 抗原阳性, 是参与形成免疫复合物的主要抗原形式; 后者是以单纯病毒 NP 或 HA 抗原阳性的病毒包涵体(IB)形式存在于细胞内, 是病毒直接作用所致细胞病变的标志, IB 的广泛分布但只有极个别阳性细胞发生坏死, 说明该病毒具有泛嗜性感染和弱致细胞病变能力的特性。

抗原分析结果显示, 组织细胞中病毒抗原的表达及其抗原量受宿主细胞的种属, 组织结构特点及病期的影响, 也存在个体差异以及因感染病毒株或血清型不同产生差异的可能性。病毒抗原染色形态学证实, NP 上具有 HA 抗原位点, 其抗原决定簇有三类, 其中的某些抗原决定簇可因病毒宿主动物或细胞的种属不同, 表达也不同。HA 抗原在人体组织细胞中的高表达和广泛分布也说明 HFRSV 对人体有很强的侵袭力。

关键词: 肾综合征出血热病毒 单克隆抗体 免疫细胞化学 血凝素 抗原分析

国内外已制备了多株抗肾综合征出血热病毒(HFRSV)单克隆抗体(MAbs)^[1-6], 并用于病毒及其结构蛋白的抗原性分析和病毒的分型, 但尚未见到用于人体组织中病毒结构蛋白形态研究和抗原分析的报道。作者利用国产的 15 株分别针对 G2, NP 及 HA 抗原的 MAbs, 以新建立起来的敏感的免疫细胞化学方法^[7], 分别对我国西安, 沈阳及广州等地的 HFRS 尸检病例组织中病毒结构蛋白进行了定位和分布的形态学研究及病毒抗原分析。

材料和方法

1 材料

HFRS 尸检共 19 例, 包括西安地区 17 例, 系第四军医大学病理教研室于 1961~1989 年收集; 沈阳地区 1 例, 广州地区 1 例。其中发热期 1 例, 休克期 8 例, 少尿期 2 例, 多尿期 4 例, 恢复期 4 例, 均为 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋的组织, 共 16 种, 分别做 5 μ m 的连续组织切片。

2 方法

多重 PAP 及多重 PAP 结合 ABC 法定位分析尸检组织中病毒抗原^[7]。抗 HFRSV MAbs 共 16 种(表 1), 做

本文 1992 年 11 月 17 日收到, 1993 年 2 月 4 日修回。

• 国家自然科学基金资助项目, No 39270290

1:2000稀释,分别单独使用。

表1 抗HFRSV单克隆抗体的性质及其来源

Tab. 1 the characteristics and sources of MAbs against HFRSV employed in our study

单抗 MAbs	免疫毒株 Immunogen	特异性 Specificity	蛋白 Pro.	抗体结合活力 Binding activity		抗体活性 MAb titer		参考文 献 Ref.
				50K	50K HA	NT	HI	
LV48A	L99(Ra. L)	Subgroup	G2			20	5120	6,17
LJ33	L99	Group	NP			20	20	6,17
A35	A9(Ap. a)	Group	NP	0.06	0.06	128	2560	3,4,28
A25-1	A9	Group	NP			320	20	3,4,28
A19	A9	Group	—			—	20	3,4,28
A20	A9	A-type	—			—	—	3,4,28
R31	R22(Ra. n)	R-type	50K			—	—	3,4,28
JA8	Chen strain	A,R	50K	0.04	0.01	40	20	5,14,15
3D8	(Pat.)	A,R	HA	300.00	200.00	5120	81920	5,14,15
3G1	(Pat.)	A,R	HA	6.00	5.00	10240	40960	5,14,15
5H5	(Pat.)	A,R	50K	0.10	0.10	20	20	5,14,15
7D1	(Pat.)	A,R	—	0.06	0.06	20	20	5,14,15
8F8	(Pat.)	A,R	HA	200.00	200.00	800	10240	5,14,15
8Q2	(Pat.)	A,R	HA	200.00	100.00	800	20480	5,14,15
8G3	Chen Strain	A,R	HA	100.00	100.00	320	20480	5,14,15

注: L99为江西罗赛鼠病毒; A9为野鼠型A9株病毒; R22为家鼠型R22株病毒; Chen strain, 为从病人分离的病毒; 结合活力₁为MAbs 50%结合病毒蛋白最大浓度($\mu\text{g/ml}$); 抗体活性₂为抗体中和或血凝抑制活性滴度的倒数。

组织脱蜡入水, 0.1%的双氧水处理组织40分钟以去除其中的内源性过氧化物酶活性, 以抗HFRSV MAbs 分别在4℃孵育组织72小时, 显示MAbs用羊抗鼠IgG 1:300(本室制备)桥接鼠单克隆PAP 1:10,000(武汉生物制品研究所), 或用生物素化羊抗鼠IgG 1:10,000及ABC复合物1:400(ABC试剂盒为美国Vector公司产品), 并重复后两步染色, 染色4~8个PAP或PAP+ABC不等, 一般为5~6PAP或PAP+ABC, 0.01% DAB + 0.001% H₂O₂ 呈色5分钟。

3 对照

阳性对照用陈株HFRSV感染的Vero E6细胞; 另外还设有正常组织对照, 替代对照及吸收对照。

结 果

1 病毒抗原染色一般情况

所检的19例HFRS尸病例均为阳性(19/19)(表2)。

2 病毒抗原的组织分布及定位

心、血管: 心肌纤维, 心内膜内皮, 全身血管平滑肌细胞(广州及部分西安病例), 小血管壁及内皮细胞;

肝:肝细胞,枯否氏细胞,肝窦及胆管上皮;
 脾:淋巴细胞,单核吞噬细胞;
 肺:支气管粘膜上皮,腺上皮,平滑肌,软骨细胞,肺呼吸道粘膜上皮; I, II 型肺上皮细胞,肺水肿液,渗出 WBC(图 1);

表 2 尸检组织抗 HFRSV MAbs 免疫细胞化学染色结果

Tab. 2 The results obtained from autopsy tissues stained by HFRSV-MAbs with repeated PAP and PAP+ABC methods

病例 Case No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A-1316	▲	-	▲	-	-	▲	*	-	▲	-	-	▲	*	-	-	-
A-1320	-	▲	-	-	-	▲	-	-	-	-	-	-	▲	-	-	-
A-1413	-	▲	-	-	▲	-	▲	-	-	-	-	-	-	▲	-	-
A-1616	-	▲	-	▲	-	-	-	*	-	-	-	▲	-	-	-	-
A-2232	▲	▲	-	△	-	▲	-	-	-	-	-	▲	-	-	-	-
A-2234	-	△	-	△	-	△	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-
A-2281	-	▲	▲	▲	-	▲	▲	▲	-	-	▲	▲	▲	-	-	-
A-2361	-	▲	-	*	-	-	-	-	-	-	-	*	▲	-	*	-
A-2524	▲	▲	▲	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	▲	-	-	-
A-2560	*	-	-	▲	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-
A-2604	▲	-	-	-	▲	▲	-	-	-	△	-	-	-	-	▲	-
A-2607	-	△	▲	*	*	▲	*	-	-	-	-	*	-	△	△	▲
A-2615	-	▲	-	-	▲	▲	▲	-	-	-	-	▲	-	-	-	-
A-2859	-	-	-	-	△	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-2930	-	▲	-	▲	▲	-	-	-	-	-	-	*	▲	-	-	-
A-3180	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	-	-	-	-	▲	▲	-	▲	▲
A-0780	-	▲	-	△	▲	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-8801	-	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-8802	△	△	-	△	△	△	-	-	-	-	-	-	△	-	-	-
Tot.	7	14	5	12	10	12	6	2	1	2	1	10	8	2	4	2

注 Note:

- 1. 心 Heart 2. 肝 Liver 3. 脾 Spleen 4. 肺 Lung 5. 肾 Kidney 6. 脑 Brain 7. 腺垂体 Pituitary gland 8. 扁桃腺 Tonsil 9. 颌下腺 Submandibular 10. 甲状腺 Thyroid 11. 胸腺 Thymus 12. 胰腺 Pancreas 13. 肾上腺 Adrenal glands 14. 前列腺 Prostate gland 15. 睾丸 Testis 16. 淋巴结 Lymph nodes
- ▲ 弥漫性阳性 Diffuse positive staining with one or more MAbs
- △ 空泡状 IB 阳性 Vesicular viral IB staining pattern with one or more MAbs
- * 颗粒状 IB 阳性 Granular viral IB staining pattern with one or more MAbs
- 未染色组织 Unstained tissues (符号意义下同)



图1 HFRS尸检支气管及肺组织。支气管粘膜上皮,腺体,平滑肌,血管壁及WBC呈病毒HA抗原阳性(1a,MAb 3D8-6PAP,X100,具有同样染色效果的MAbs还有7D1,8F8,8G2,8G3),肺呼吸性支气管粘膜上皮及脱落的上皮细胞中HA呈IB染色形态(1b,MAb 8G2-6PAP,X400),肺泡I、II型上皮细胞呈病毒NP或HA抗原阳性(1c,MAb A25-1或3D8-6PAP,X400,MAbs A35,R31,7D1,8F8,8G2,8G3具有同样染色结果);病毒G2抗原在肺泡中渗出的WBC呈弥漫阳性(1d,MAb LV48A-5PAP,X400)或肺泡弥漫阳性,在肺水肿液中出现G2抗原阳性空泡(1e,MAb LV48A-4PAP+4ABC,X400)

Fig. 1 Autopsy trachea and lung of the HFRS cadaver. The viral HA antigen was widely distributed in the mucosa epithelium, glands, smooth muscles, blood vessels and WBC in the wall of trachea stained by MAbs 3D8, 7D1, 8F8, 8G2, 8G3 (1a, MAb 3D8-6PAP, X100); the HA in the bronchiolar epithelial cells of the lung was in the shape of IB (1b, MAb 8G2-6PAP, X400); The squamous alveolar epithelial cells and great alveolar cells were also demonstrated to be NP and HA

antigens positive by MAbs A35, A25-1, R31, 3D8, 7D1, 8F8, 8G2, 8G3 (1c, MAb 3D8-5PAP, X400). The G2 antigen was diffusely positive in the infiltrated WBCs in alveolar cavities (1d, MAb LV48A-5PAP, X400) or diffusely positive in the alveolar walls and homogenous vesicles in the edema fluid of the lung (1c, MAb LV48A-4PAP+4ABC, X400).

肾脏:近曲小管,远曲小管,集合管,蛋白、颗粒及细胞管型,肾小球毛细血管,肾小球壁层及脏层上皮,肾间质水肿液(图 2);

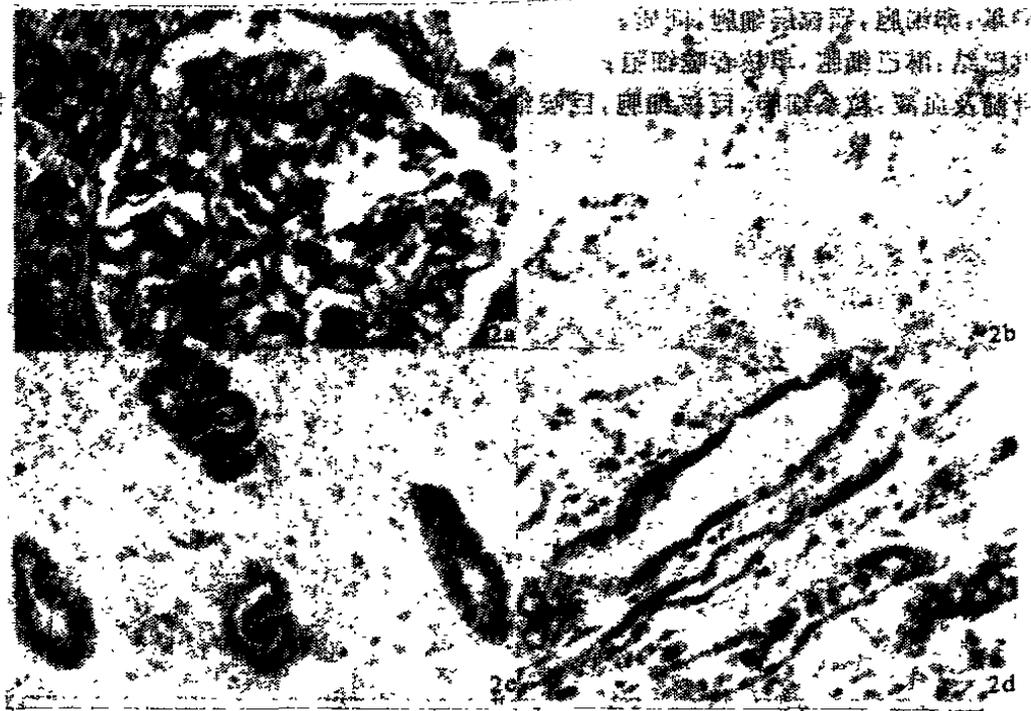


图 2 HFRS 尸检肾脏。在组织连续切片上用不同 MAbs 分别显示 NP 抗原呈弥漫分布(2a, MAb L133-6PAP, X400),或在近曲小管呈空泡状阳性,远曲小管上皮细胞呈 1B 形态(2b, MAb A25-1 或 8G2-5PAP, X400), NP 或 HA 抗原在增生的集合管上皮细胞呈 1B 阳性染色形态(2c, MAb 3D8-5PAP, X400, MAbs A35, A25-1, 7D1, 8G2, 8G3 同 3D8)或弥漫阳性(2d, MAb 3G1-5PAP, X400)

Fig. 2 Autopsy HFRS kidney. On the serial sections, the NP antigen was either in wide distribution with diffuse staining in the tissues (2a, MAb L133-6PAP, X400) or in vesicular positive staining in the proximal convoluted renal tubular cells and 1B staining in the distal renal tubular cells (2b, MAb A25-1 and 8G2-5PAP, X400), the NP and HA positive 1B also occurred in the proliferative renal collecting tubular cells stained by MAbs A35, A25-1, 3D8, 7D1, 8G2, 8G3 (2c, MAb 3D8-5PAP, X400), but the HA antigen stained by MAb 3G1 was diffusely positive in the renal collecting tubular cells (2d, MAb 3G1-5PAP, X400).

脑:神经细胞,胶质细胞,室管膜上皮;

胃:粘膜上皮细胞;

垂体:腺垂体细胞;

颌下腺:腺上皮,闰管上皮;

扁桃体:粘膜鳞状上皮,淋巴细胞及单核细胞(图3);
 甲状腺:腺上皮及胶质中脱落坏死上皮细胞;
 胸腺:胸腺上皮,胸腺小体及淋巴细胞,脂肪细胞;
 胰腺:胰腺上皮,胰岛细胞,腺导管上皮(图4);
 肾上腺:腺上皮,髓质及神经纤维;
 前列腺:腺上皮,平滑肌,间质;
 睾丸:曲细精管初级、次级精母细胞,精细胞,精液(图5);
 卵巢:卵细胞,颗粒层细胞,间质;
 淋巴结:淋巴细胞,单核吞噬细胞;
 骨髓及血液:粒系细胞,巨核细胞,巨噬细胞,单核细胞,淋巴细胞,红细胞,血小板及血浆。

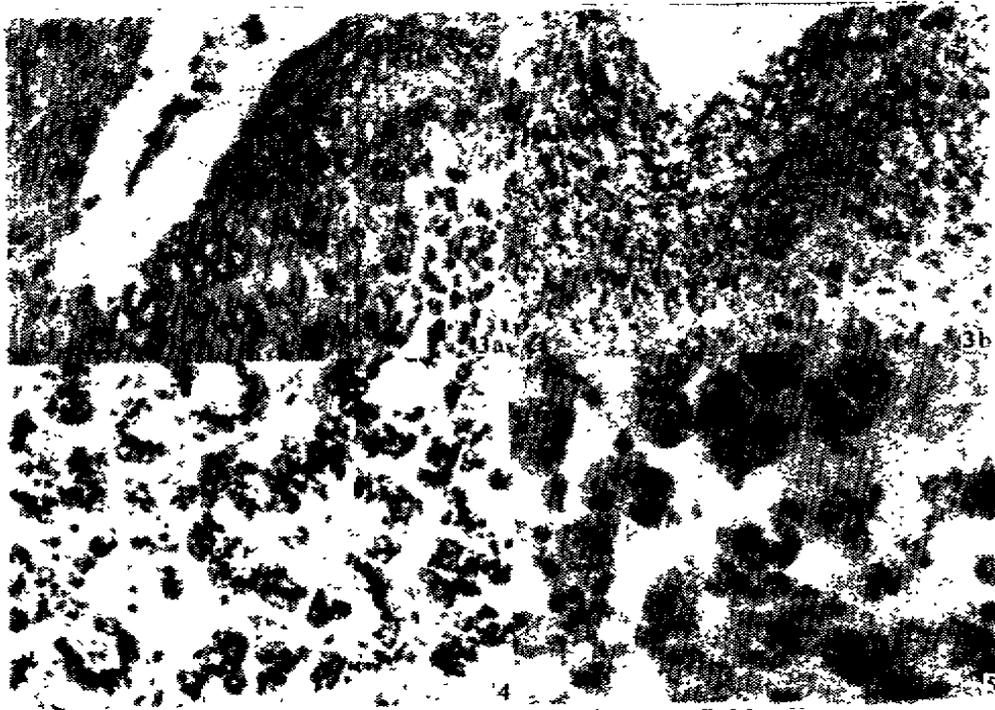


图3 HFRS尸检扁桃体。家鼠型病毒特异抗体染色,病毒抗原以弥漫和小颗粒阳性出现于鳞状上皮细胞胞浆中(3a, MAb R31-7PAP, X400),野鼠型病毒特异性抗体A20具有类似染色效果;NP或HA抗原为颗粒状IB染色阳性(3b, MAb 8G2-5PAP, X400, MAbs A25-1, 3D8, 7D1, 8F8, 8G3同8G2)

Fig. 3 Autopsy HFRS tonsil. The diffuse with granular staining in the squamous cells of the tonsil could be detected by the Hantaan or soul type HFRSV specific MAbs A20 and R31 (3a, MAb R31-7PAP, X400), While the coarse granular NP or HA antigen positive IB could be demonstrated on the serial sections by MAbs A25-1, 3D8, 7D1, 8F8, 8G2, 8G3 (3b, MAb 8G2-5PAP, X400)

图4 HFRS尸检胰腺。HA或NP抗原在胰腺腺上皮细胞胞浆中呈IB染色形态,阳性细胞广泛分布,MAb 7D1-5PAP, X400,

MAb 3D8, 8F8, 8G2, 8G3 同 7D1 (染色结果相同)

Fig. 4 Autopsy HFRS pancreas. The NP or HA antigens in the shape of IB staining pattern were localized in the acinar cells of the pancreas, the positive cells were in wide distribution, MAb 8G2-5PAP, X400, MAbs 3D8, 7D1, 8F8, 8G2, 8G3 had similar staining patterns.

图 5 HFRS 尸检睾丸。HA 抗原以粗大的 IB 阳性, 单个出现于睾丸生精上皮细胞胞浆中 (MAb 3D8-5PAP, X400, MAbs L133, A35, A25-1, 7D1, 8F8, 8G2, 8G3 (有类似的染色结果))。

Fig. 5 Autopsy HFRS testis. The HA antigen positive coarse granular IB could be detected in the convoluted seminiferous tubular epithelial cells of the male reproductive system of the patient died of HFRS by MAbs L133, A35, A25-1, 3D8, 7D1, 8F8, 8G2, 8G3 (MAb 3D8-5PAP, X1,000)

3 病毒抗原染色形态

3.1 可溶性抗原: G2, NP 或 HA 抗原阳性, 呈微细颗粒状分布于细胞内和细胞外。细胞外可溶性抗原分布于组织间, 水肿液, 尿液及血液内可伴有空泡状颗粒性抗原。

3.2 病毒包涵体: 病毒颗粒抗原多以 IB 的形式存在, 呈圆形、卵圆形或肾形, 边缘清晰, 单个或多个出现于感染细胞浆中, 大小在 $1\mu\text{m}\sim 9\mu\text{m}$, 单个存在者体积较大, 多个存在者体积较小, 呈 NP 及 HA 抗原阳性, 可伴有或不伴有胞浆弥漫性抗原染色, 有实性和空泡状 IB 两种类型。

PAb 染色: IB 结构多呈空泡状, 有大泡, 多泡及小泡状 IB 三种形态, 可混合存在^[13]。

MAbs 染色: 显示实性 IB 形态, N 抗原或 HA 抗原阳性, 在扁桃腺鳞状上皮; 支气管粘膜及腺上皮, 肺呼吸性气管粘膜上皮; 胰腺腺上皮; 肾远曲小管及集合管上皮等组织几乎所有细胞均为 IB 阳性。在腺垂体上皮; 睾丸生精上皮; 肺泡, I、II 型上皮; 血液 WBC; 肾上腺上皮细胞; 血管平滑肌细胞、心肌细胞、胰岛细胞、神经细胞等只有部分细胞呈 IB 阳性。部分 MAbs 还可显示空泡状 IB, 该空泡状 IB 大量出现于血管平滑肌细胞 (广州病例)、肾近曲小管上皮、甲状腺腺上皮, 另外还出现于肺水肿液, 渗出 WBC (沈阳病例), 血 WBC (广州病例), 胰腺上皮, 肝细胞, 血管内皮细胞, 肺泡上皮细胞等细胞。

4 抗体染色情况

具有 H1A, NA 活性的 MAbs 3D8, 8F8, 8G2, 8G3 及无 H1A, NA 活性的 MAbs 7D1, 5H5, IB 染色效果优于其它抗体, 伴有或不伴有弥漫性染色, 可显示出所有 IB 阳性部位的 IB; MAbs A25-1, 7D1, 8G2 既可有实性 IB 染色形态, 又可显示空泡状 IB, 可在同一组织的不同部位同时出现, 也可出现于不同病例的组织中, 出现实性 IB 的组织部位很少出现空泡 IB, 反之亦然。LV48A (G2) 可显示甲状腺上皮及水肿液中空泡状 IB 形态。MAbs L133, A35, A20, R31, 1A8 以弥漫性染色为主, 在 IB 阳性组织部位可伴有 IB 染色形态。在所有病例染色均为阳性的抗体为: LV48A, L133, A35, 5H5, 7D1, 8F8, 1A8, A20, R31; 部分病例阳性的抗体: A25-1, 3D8, 3G1, 8G2, 8G3; 弱阳性或几乎阴性的抗体为: A19。

5 病例和病期对抗原的影响

5.1 病例: 5/19 的病例组织中出现实性 IB; 4/19 的病例组织中存在空泡状 IB; 有 2/19 病例组织中抗原染色弥漫强阳性, 其余病例抗原为弥漫阳性或弱阳性。西安地区病例: 病毒抗原分布于各脏器的实质细胞, 组织间, 水肿液, 血管壁, 血液, 血细胞; 沈阳地区病例: 肺组织中抗原阳性强度高, 以弥漫可溶性出现于水肿液, 空泡状分布于肺渗出 WBC 及碎裂的细胞间; 广州病例: 抗原阳性以空泡出现于各脏器血管平滑肌细胞, 少数出现于血液, WBC 及血管内皮细胞。

胞,脏器的实质细胞基本呈阴性反应。

5.2 病期对组织中抗原的影响 死于休克期病期短的病例,组织中细胞内外可溶性抗原阳性强度高,分布广,部分病例组织细胞中有广泛分布的实性 IB;病期长的死亡病例组织中抗原染色强度弱且部分抗体染色阴性,但尚存留空泡状 IB 阳性。个别病期较短的病例(A2615,7天)组织中抗原较弱且无 IB,而个别病期较长的病例(A2607,14天),组织仍有大量 IB 广泛分布(表3)。

表3 部分病例组织 MAbs 染色结果统计

Tab.3 The results from the tissue sections of some cases stained by MAbs

病例 No.	病期(天) Phase (day)	MAbs														
		LV48A	L133	A35	A25-1	A19	3G1	3D8	8G2	8G3	5H5	7D1	8P8	1A8	A20	R31
A1413	5	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	—	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲
A2930		▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	—	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲	▲▲
A1316	8	▲	▲*	▲*	▲*	—	—	*	*	*	*	▲*	▲*	*	*	*
A1616		▲	▲*	▲*	▲*	—	—	*	*	*	*	▲*	▲*	*	*	*
A2361	7	▲	▲*	▲*	▲*	—	—	*	*	*	*	▲*	▲*	*	*	*
A2560	6	▲	▲*	▲*	▲*	—	—	*	*	*	*	▲*	▲*	*	*	*
A2607	14	▲	▲*	▲*	▲*	—	—	*	*	*	*	▲*	▲*	*	*	*
A2232	20	▲—	▲—	▲—	△	—	—	—	△	—	▲	△	▲	▲	▲	▲
A2234	27	▲—	▲—	▲—	△	—	—	—	△	—	▲	△	▲	▲	▲	▲
A780		▲—	▲—	▲—	△	—	—	—	△	—	▲	△	▲	▲	▲	▲
A1320		▲—	▲—	▲—	—	—	—	—	—	—	▲	▲	▲	▲	▲	▲
A2524	14	▲—	▲—	▲—	—	—	—	—	—	—	▲	▲	▲	▲	▲	▲
A2604		▲—	▲—	▲—	—	—	—	—	—	—	▲	▲	▲	▲	▲	▲
A2615	7	▲—	▲—	▲—	—	—	—	—	—	—	▲	▲	▲	▲	▲	▲

注:Note:▲-弥漫弱阳性

讨 论

1 关于人体组织中病毒抗原分布及定位的问题讨论

国内曾先后报道病毒抗原在 HFRS 尸检组织中的定位和分布^[8-13],但各家的结果难以统一,结合我们以前的报道的结果^[11-13]及本文的结果,分析其原因可能有以下几点:

1.1 抗体因素:各家所用抗体不一致。由于不同的抗体的性质及对抗原的结合能力不同^[1-6,14-17],染色结果也有差异,故用一种或几种 MAbs 混合染色难以全面反映病毒抗原的全部内容。

1.2 染色方法:经我们多年研究发现^[10-13]常规双 PAP 或 ABC 可以定位活检及新鲜尸检组织中病毒抗原,但陈旧尸检由于经常规固定,包埋等过程及长期存放等原因使病毒抗原性受到不同程度的破坏而减弱或部分消失,用常规方法显示就十分困难,需增加方法的敏感性提高阳性检出率。

1.3 抗原因素:本文结果说明宿主细胞的种属,病期及组织结构特点影响抗原的定位分布,其中也存在个体差异;此外,还可能因感染病毒株不同,造成染色结果的不同。

2 病毒抗原阳性与病变的关系

2.1 病毒抗原阳性的意义

在 HFRS 人体尸检组织中病毒抗原阳性分布广^[8-13],但在电镜下很难发现典型的病毒颗粒^[18-19],说明病毒抗原阳性并非一定代表病毒及细胞的病毒感染。结合本工作,病毒抗原阳性可能:1. 代表病毒的感染,只是病毒侵入机体后受宿主细胞的影响,大部分病毒形态发育不成熟,因而观察不到典型病毒形态;2. 是细胞以外的病毒抗原或 IC 造成的^[20,21]。本研究发现 IB 在人体组织细胞中是以单纯抗原形式存在,而无相应的 Ig 及补体的形态^[13,20],可做为判断病毒感染的可靠指标。

2.2 病毒包涵体与病毒致细胞病变作用

研究证实,HFRSV 可在感染的 Vero E6 细胞中产生 IB^[22],作者曾报道人体尸检组织中存在 IB^[13]。根据本工作中对实性与空泡状 IB 的组织部位不共存性及其与可溶性抗原的关系、病期的影响和电镜观察^[12],推测实性 IB 为病毒 NP 抗原产生或病毒复制的部位,或是病毒未成熟颗粒的堆积;而空泡状 IB 是实性 IB 病毒抗原释放后遗留的痕迹及高度扩张的带有病毒抗原的内质网及高尔基体形成的泡状结构。

病毒感染后,主要通过两个途径对宿主细胞产生损伤^[22],一是病毒直接致细胞病变作用(The direct cytopathogenic effect),即因病毒在繁殖复制过程中挪用了宿主细胞的代谢物质,或病毒的代谢产物不同程度抑制或干扰了宿主细胞的代谢而造成的细胞改变;另外一个机制是由病毒抗原或因病毒感染引起宿主细胞抗原性的改变,从而诱导机体细胞免疫或体液免疫产生宿主细胞的损伤,病变包括细胞的溶解坏死,大分子物质合成改变,细胞融合,病毒 IB 出现,以及细胞转化等。其中 IB 的出现是细胞病变的特征性标志。HFRSV IB 出现于下述几类病变细胞中:1) 上皮性组织中 IB 密度高,这可能与该组织代谢旺盛,高尔基体、内质网发达更有利于 HFRSV 感染和复制有关;2) IB 出现于结构破坏明显的组织细胞中,如扁桃体上皮细胞,及大血管平滑肌细胞等,但该类组织细胞极少出现坏死;3) 增生的上皮细胞中,如增生的集合上皮细胞,肝及垂体的二倍体细胞中。

IB 在体内组织中的广泛分布,充分说明 HFRSV 在人体组织内有泛嗜性感染的特性。但呈 IB 高密度分布的组织或含 IB 细胞除有结构的破坏及上皮细胞脱落以外,并无坏死现象,说明 HFRSV 对宿主细胞的致死能力是很弱的,大多表现为可逆性的损伤。因此,应将病毒感染致病变作用与病毒感染直接致病区别对待。

3 组织中病毒结构蛋白抗原性分析

3.1 关于结构蛋白细胞中定位的问题

国外^[1,2]用抗 HFRSV-MAbs 对病毒感染的 Vero E6 细胞进行间接免疫荧光染色(IFA)发现,病毒抗原有三种明显不同的染色类型,即胞膜弥漫型(MA 型);胞浆颗粒或包涵体染色(IB 型)及胞浆弥漫型(C 型)。其中 MA 型为 G1、G2 蛋白的染色形态;IB、C 型为 NP 蛋白染色形态,该方法已被广泛应用于 MAbs 的特异性初步鉴定和分类及病毒抗原性分析。但用 IFA 染色确定病毒结构蛋白类型也不完全准确,也有 NP MAbs 呈 MA 型染色的报道,如 Franko 等^[1]所制备的 6 株中的 5 株能与 50K NP 反应的 MAbs,其中有一株对 Vero E6 IFA 染色呈 MA 型;而

国内徐志凯等^[16]所用的7株能与50Kd蛋白反应的MAbs,有6株呈感染细胞IFA MA染色。汪力亚等^[14]报道的10株(其中包括本文中的1A8,3G1,5H5,A35四株)能与50KHA反应的MAbs均为MA阳性。但本文所应用的MAbs无论是抗G2, NP或HA者,也无无论是在病毒感染Vero E6细胞中,还是在人体组织中均未出现MA染色而是呈IB型和C型染色。因此作者提出,出现染色形态的差异可能主要是因标本的处理及染色方法的敏感性不同造成。

3.2 组织中病毒结构蛋白抗原性分析

根据本文中所用MAbs的性质及其在人体组织及Vero E6中的染色形态,阴阳性变化,将组织中与15株抗体反应的相应抗原划分为9类(表4)。

表4 MAbs免疫细胞化学染色分析组织细胞中病毒抗原结果

Tab. 4 Viral antigens analyzed by MAbs with immunocytochemical staining on cells and tissue sections

抗原类型 Classes of antigens	单抗 MAbs	抗体活性 Activity	病毒蛋白 Proteins	培养细胞 Vero E6 Cells	人体细胞 Human Cells
I	LV48A	H1A	G2	+	+
II	A25-1	NA	NP	+	+
III	A35	H1A, NA	NP, HA	+	+
	1A8	H1A, NA	NP, HA	+	+
	8F8	H1A, NA	—	—	+
IV	3D8	H1A, NA	HA	+	+
	8G2	H1A, NA	—	—	+
	8G3	H1A, NA	—	—	+
V	3G1	H1A, NA	HA	—	+
VI	L133	Non-H1A, NA	NP	+	+
	5H5	Non-H1A, NA	NP, HA	+	+
	7D1	Non-H1A, NA	NP	+	+
VII	A19	Non-H1A, NA	NP	+	—
VIII	A20	Non-H1A, NA	NP	+	+
IX	R31	Non-H1A, NA	NP	—	+

注: * 为颗粒状阳性

3.2.1 I, VI: 属共同抗原, 存在于NP上, 分别相应于MAbs A25-1, L133, 5H5, 7D。定位在组织细胞中可溶性抗原、实性或空泡状IB结构中, 但I只在部分人体组织中阳性, 多位于IB结构上。

VI相应于MAb A19, 也属于共同抗原, 但只在Vero E6细胞中阳性, 在人体组织中弱阳性或阴性。

3.2.2 VII A20, IX R31 属型特异性抗原, 位于NP上。在Vero E6细胞中能区别陈株病毒, VII阳性, IX阴性; 但在人体组织中两者均为阳性, 多数出现于可溶性抗原, IB染色不明显。说明型特异性抗原在组织中有交叉反应。

3.3.3 I, III, IV, V: 属HA抗原, 相应的MAbs能分别与G2(LV48A)及NP或50K HA反应。

I: 相应于 LV48A 的 G2 蛋白, 为亚组特异性抗原, 在 Vero E6 细胞及人体组织中均为阳性, 但有明显的染色形态的差异(图 6a)。

II: 相应于 MAbs A35, 1A8, 8F8; 除 8F8 不与感染 Vero E6 细胞中同源病毒反应外, 该类抗原在 Vero E6 细胞(图 6b)及全部尸检组织中均呈不同程度的阳性。

IV: 相应于 MAbs 3D8, 8G2, 8G3; MAb 3D8 在 Vero E6 细胞中呈胞浆弥漫型(C型)染色(图 6c), 但 MAbs 8G2, 8G3 不与 Vero E6 细胞中同源病毒反应; 该类抗原在部分(5/19)人体组织中均可阳性, 强表达于 IB 结构中, 个别病例呈弥漫阳性, 其它病例为微弱阳性或阴性。3D8 不与鼠脑病毒 50K HA 反应^[14]。

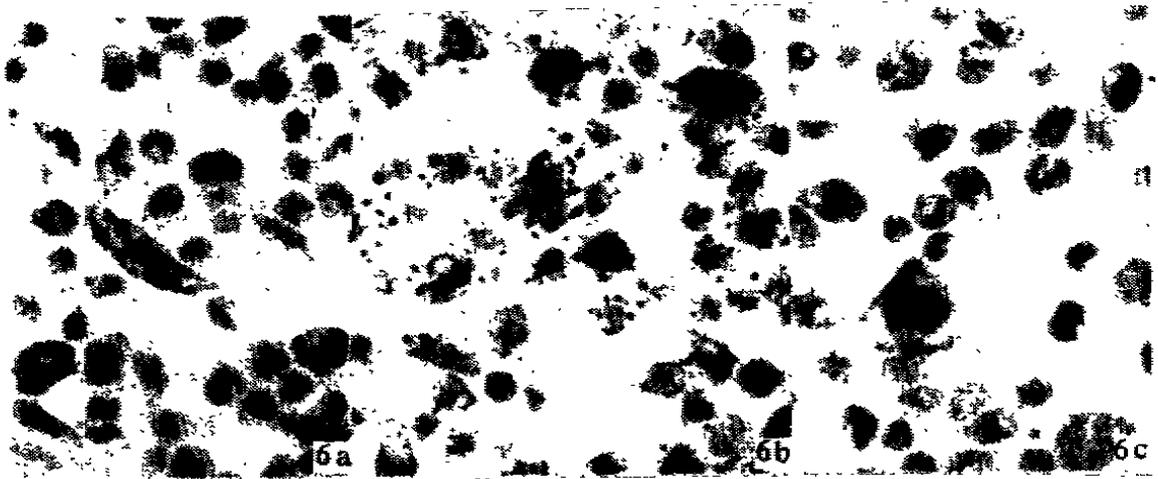


图 6 陈株 HFRSV 感染的 Vero E6 细胞。病毒 G2 蛋白以细小颗粒状阳性(6a, MAb LV48A-5PAP, X400), NP 蛋白以粗大颗粒状病毒包涵体(IB)阳性(6b, MAb A35-5PAP, X400), HA 抗原在少数细胞以细腻颗粒弥漫阳性(6c, MAb 3D8-5PAP, X400)出现于感染细胞胞浆中

Fig. 6 The Vero E6 Cells infected with Chen strain HFRSV. The viral G2 in fine granular staining pattern (6a, MAb LV48A-5PAP, X400), NP in coarse granular IB staining pattern (6b, MAb A35-5PAP, X400) and HA antigen in fine powdery staining pattern (6c, MAb 3D8-5PAP, X400) were respectively demonstrated in the cytoplasm of the infected cells.

V: 相应于 MAb 3G1; 不与 Vero E6 细胞中同源毒发生反应, 只与 IV 类抗原弥漫染色阳性病例的人体组织呈弥漫性染色反应。

9 类抗原中, 除 I 位于 G2 上外, 其余均与 NP 或 HA 有关, 且可出现某些病例组织细胞中同一染色形态上。II、VI、VII、IX 类抗原, 在人体组织中染色形态一致, 同时出现, 推测可能位于同一蛋白多肽上或位置临近; 共同抗原 II, VII 及 HA 抗原 IV, V, 在人体组织中其染色形态不一致, 也不同步出现, 与上述其它类抗原染色不一致, 故说明它们是分别存在, 位于不同多肽上或同一蛋白距离较远的部位。

结果说明: 1. HFRSV 某些共同抗原、型特异性抗原表达有宿主细胞的差异; 2. HFRSV 抗原在人体组织中的阳性与否及抗原量(染色强度)不一致, 受病期及组织结构特点的影响, 也存在个体差异; 3. 参与形成 IC 的抗原为可溶性抗原形式, 有 G2, NP 或 HA 参与。

4 关于 HFRSV 上的 HA 抗原

HA 的表达情况可反映出病毒对宿主动物及细胞的易感程度和毒力^[24, 25], 检测和定位人

体组织中 HA 可作为判断病毒易感程度及毒力的指标,但该方面的研究相当欠缺。

现已明确 G2 上存在 HA 抗原决定簇。至于 NP 是否存在 HA 抗原决定簇,国内外研究结果不一致。国外生产的抗 NP MAbs 均无 NA 和 HIA^[1,2];S 片段基因重组的表达产物(NP)不能诱导产生中和抗体及血凝抑制抗体,M 片段基因重组表达产物(G1,G2)只能诱导产生中和抗体^[26,27]。国内外先后制备出多株能与 NP 或 50K HA 反应,具有 HIA 或和 NA 的 MAbs,并用于 HFRSV 结构蛋白的分析^[4-6]。徐志凯等^[15]及汪力亚等^[14]分别用 5H5(无 NA,HIA)及 3G1(有 NA 及 HIA)MAbs 亲和层析纯化鼠脑陈株病毒组织悬液,均分别获得一个 50K 多肽(50K 多肽已被公认为 NP),前者无 HA 活性,不能诱生中和抗体和血凝抑制抗体,却能与具有 HIA 及 NA 的 MAbs 反应;后者具有 HA 活性,能诱生血凝抑制抗体,且既可与有 HIA 及 NA MAbs,又可与无该活性的 Mab 5H5 反应,因而认为 NP 存在 HA 抗原决定簇。郝连杰等^[16]和梁米芳等^[17]应用 MAbs 的分析结果也表明,病毒核蛋白可能有 NA 及 HA 抗原决定簇。

卫立辛等^[28]以 HFRSV 陈株、76-118 及 R22 株分别感染 BALB/c 乳鼠,24hr 后经腹腔分别接种具有 HIA 及 NA 活性的 MAbs 3D8,3G1,8F8,8G2,8G3(均为本文的所用的 MAbs),结果发现该 5 株 MAbs 可分别 100%保护乳鼠免受陈株和 76-118 株 HFRSV 致死性感染,面对 R22 株感染乳鼠除 8F8 可保护 25%外其它 MAbs 均无保护作用。陈伯权等^[29]用 Mab A35 保护 A9 株及 B78 株感染乳鼠获得同样效果。说明,HFRSV 的 50K HA 对易感细胞的侵犯和致死性感染也起重要作用。

本文应用上述 MAbs 在陈株病毒感染 Vero E6 细胞及人体组织内定位相应 HA,结果:1. 具有 HA 活性抗原决定簇可定位在 IB 结构上,区别于 G2 Mab 的微细颗粒及弥漫性染色形态,因而从形态上也说明 NP 上具有 HA 和 NA 抗原决定簇;2. NP 上 HA 抗原决定簇至少有三个,这与汪力亚等^[14]对 50K HA 分析结果一致,但我们结果还说明部分 HA 抗原决定簇的表达受宿主细胞种属的影响。HA 在人体组织中的阳性强度高及分布广,也说明了致病病毒在人体内广泛侵袭的特点。

抗原决定簇有构象型(conformation epitope)和顺序型(sequence epitope)两种。组织的固定、石蜡包埋等过程可破坏部分抗原决定簇或使抗原性减弱,而影响组织抗原分析结果的准确性。文献中也报道^[4,6]蛋白质变构效应可影响抗原与抗体的结合。本文中所用 HFRSV 感染 Vero E6 细胞除经丙酮固定外,虽未经任何其它人为破坏,MAbs 3G1,8F8,8G2,8G3 也不与同源陈株病毒发生反应,但人体尸检组织虽经福尔马林固定,石蜡包埋及长期存放,以敏感的方法仍然能很好地显示出相应 HA 抗原或 G2 蛋白,说明 HA 或 G2 蛋白抗原性是很强的,组织的处理对抗原分析结果不会产生很大影响。此作者认为,某些理应阳性抗体,染色出现阴性有因其相应抗原构型破坏而造成的可能性,但单纯以此来解释阴性结果是不全面的,还应考虑相应抗原决定簇在不同种属宿主细胞中是否表达及表达强弱程度以及检测方法敏感性对结果的影响。

5. 不同疫区 HFRS 尸检病例病毒抗原的差异

本文以同样的方法对西安(野鼠型 HFRS 疫区)、沈阳(家鼠野鼠混合型 HFRS 疫区)、广州(家鼠型 HFRS 疫区)等地尸检组织中的病毒抗原检测发现三个地区的病例组织中抗原分布确有一定差异,其原因可能与不同疫区病例所感染的病毒或血清型不同有关,病毒抗原分布的差异可能造成发病机理上的差异,因病例太少,有必要扩大病例继续研究。

参 考 文 献

- 1 Franko MC, Gibbs CJ Jr, Lee PW, et al. Monoclonal antibodies specific for hantaan virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80 (13) : 4149—4153.
- 2 Ruo SL, Sanchez A, Elliot LH, et al. Monoclonal antibodies of three strains of hantaviruses: Hantaan, R22, and puumala. *Arch Virol*, 1991, 119(1) : 1—11.
- 3 陈伯权, 周国芳, 杭长寿, 等. 流行性出血热单克隆抗体的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1983, 3(6) : 366—369.
- 4 陈伯权, 付建林, 廖化新, 等. 35 个流行性出血热病毒 McAb 对病毒抗原分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1985, 5 (3) : 136—139.
- 5 汪力亚, 汪美先, 郑仁瑞, 等. 分泌抗肾综合征出血热病毒血凝素单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立与鉴定. *第四军医大学学报*, 1988, 9(1) : 20—23.
- 6 梁米芳, 宋干, 杭长寿, 等. 流行性出血热单克隆抗体的特异性鉴定及对病毒结构蛋白作用的初步研究. *病毒学报*, 1989, 5(3) : 217—224.
- 7 杨守京, 刘彦仿, 刘莹莹, 等. 多重 PAP 及多重 PAP 结合 ABC 免疫细胞化学方法的建立、敏感性分析与应用. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1993, 2(1) : 42—52.
- 8 张小留, 王心禾, 刘绍春, 等. 双桥 PAP 法对流行性出血热患者各脏器病毒抗原定位的研究. *中华内科杂志*, 1987, 26 (8) : 461—463.
- 9 易先平, 邢寿喜. 应用免疫细胞化学方法检测流行性出血热尸检组织中病毒抗原的分布. *中华病理学杂志*, 1991, 20 (2) : 110—112.
- 10 刘彦仿, 杨守京, 晏培松, 等. 细胞中流行性出血热(EHF)病毒抗原部分弥散及其原位检测. *病毒学杂志*, 1991, 6(2) : 107—112.
- 11 杨守京, 刘彦仿. 用直接免疫金标法检测组织内流行性出血热病毒抗原. *第四军医大学学报*, 1992, 13(1) : 29—31.
- 12 杨守京, 刘彦仿, 刘莹莹. 流行性出血热患者骨髓细胞超微病理及病毒抗原的免疫组化定位. *第四军医大学学报*, 1992, 13(3) : 161—164.
- 13 杨守京, 刘彦仿, 晏培松, 等. 流行性出血热病人尸检材料中的病毒包涵体. *中国病毒学*, 1992, 7(3) : 246—252.
- 14 汪力亚, 汪美先, 王海涛, 等. 单克隆抗体亲和层析法纯化 HFRS 病毒血凝素抗原的初步研究. *免疫学杂志*, 1989, 5 (4) : 213—219.
- 15 徐志凯, 汪美先, 王海涛, 等. 单克隆抗体对肾综合征出血热病毒 50K 蛋白分析. *病毒学报*, 1988, 4(2) : 113—117.
- 16 Hao LJ. Monoclonal antibody analysis of virion protein of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome. *Abstract Proc 1st Intern Symp on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Wuhan P. R. China*, 1988, 43.
- 17 梁米芳, 宋干, 杭长寿, 等. 单克隆抗体分析流行性出血热病毒核蛋白抗原位点. *病毒学报*, 1989, 5(1) : 24—30.
- 18 朱平, 杨为松, 刘健, 等. 肾综合征出血热发病初期皮肤微血管病毒抗原定位和电镜观察. *中华医学杂志*, 1990, 70 (1) : 41—43.
- 19 Hung T, Zhao JY, Tang YM, et al. Identification of hantaan virus related structure in kidneys of cadavers with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Arch Virol*, 1992, 122 : 187—199.
- 20 杨守京, 刘彦仿, 晏培松. 流行性出血热尸检组织中的免疫复合物. *第四军医大学学报*, 1992, 13(4) : 314.
- 21 杨守京, 刘彦仿, 晏培松. 流行性出血热患者组织中红细胞病毒抗原、抗体及补体的原位检测. *中华微生物和免疫学杂志*, 1992, 12(4) : 261—263.
- 22 Hung T, Xia SM, Chou ZY, et al. Morphology and morphogenesis of viruses of hemorrhagic fever with renal syndrome. I. Inclusion bodies—ultrastructural markers of hantavirus infected cells. *Intervirology*, 1987, 27(1) : 45—52.
- 23 Youmans GP (eds). *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Disease*, Philadelphia, WB Saunders Co., 1985, 35—44.
- 24 夏东翔, 汪美先, 姜绍淳, 等. 肾综合征出血热病毒血凝素的研究. I. 病毒血凝素活性的初步研究. *病毒学杂志*, 1986, 1(3) : 37—41.
- 25 叶克龙, 李永良, 汤一苇, 等. 流行性出血热病毒血凝素的研究. *中华传染病杂志*, 1989, 7(2) : 90—92.
- 26 Pensiero MN, Jennings GB, Schmaljohn CS, et al. Expression of the hantaan virus M genome segment by using a vaccinia

- virus recombinant. *J Virol*, 1988, 62(3) : 696—702.
- 27 Schmaljohn CS, Sugiyama K, Schmaljohn AL, et al. Baculovirus expression of the small genome segment of hantaan virus and potential use of the expressed nucleocapsid protein as a diagnostic antigen. *J Gen Virol*, 1988, 69(4) : 777—786.
- 28 卫立辛, 汪美先, 徐志凯, 等. 单克隆抗体对肾综合征出血热病毒感染乳鼠保护作用的研究. *单克隆抗体通讯*, 1989, 2(1) : 5—7.
- 29 陈伯权, 倪大石, 沈宏开, 等. 广谱肾综合征出血热病毒单克隆抗体 A35 的生物学性状. *病毒学报*, 1987, 3(3) : 296—297.

The Viral Glycoprotein I (G2), Nucleoprotein (NP) and Hemagglutinin (HA) Antigens in the Tissues of Cadavers due to the Death of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Analyzed by Monoclonal Antibodies with Immunocytochemical Methods

Yang Shoujing¹ Liu Yanfang¹ Liu Yingying² Yan Peisong¹ Xu Zhikai¹ Liu Houcai³

(1. 4th Military Medical University, Xi'an, 710032 2. 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039 3. 145 Hospital of PLA, Laigang, Shandong Province, 265200)

The viral antigens in 16 kinds of 10% formalin-fixed paraffin-embedded tissues of 19 fatal cases due to the death of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) were detected and analyzed by 15 clones of monoclonal antibodies (MAbs) respectively against glycoprotein I (G2), nucleocapsid (NP) and hemagglutinin (HA) antigens of HFRSV with the repeated PAP and repeated PAP combined with ABC immunocytochemical methods developed in our Lab. The viral antigens, the soluble and granular, were demonstrated to be in large quantities with wide distribution in the tissues of the fatal cases died in the early phase and in less quantities with narrow distribution in the tissue of the fatal cases died in the late phases of the disease. The soluble antigens with G2, NP or HA positive, distributed in the cytoplasm and extracellular spaces, were determined to be the components of the soluble immunocomplexes. The granular antigens, in the forms of inclusion bodies (IB) with NP or HA antigen positive only, localized in the cytoplasm, were the signs of pathologic lesions of the infected cells caused by virus infection. The wide distribution of IB in the bodies with few positive cells necrosis indicated that the virus infection has no particular predilection for the given host cells, and only mild cytopathogenic effects on the host cells. The viral antigen analysis showed that three classes of HA antigenic determinants were determined to be on the NP by the MAbs against HA and morphological evidences. The expression and quantities of the viral antigens including some HA antigenic determinants on the NP in the bodies were affected by the species of the host cells, histological features of the tissues and the phases of the disease; the individuality as well as the strains and serotypes of the infected virus difference may also be the influential factors. The wide distribution and high expression of HA in the human tissues also suggested that the virus has the ability of wide infection of the cells in the human bodies.

Key words: Hemorrhagic fever with renal syndrome Monoclonal antibody Immunocytochemistry Hemagglutinin Antigen analysis