

原位分子杂交研究肾综合征出血热 尸检组织中汉坦病毒 M 和 S RNA 的分布^{*}

杨守京¹ 刘彦仿¹ 张劲风³ 尚高峰² 晏培松¹ 胡明华⁴

¹(第四军医大学病理学教研室,西安 710032)

²(第四军医大学附属唐都医院传染科,西安 710032)

³(大连军医学校病理学教研室,大连 116013)

⁴(江西医学院病理学教研室,南昌 330006)

R512.803
R373.13

A

提要 本文以核酸原位分子杂交法研究了国内不同地区 HFRS 尸检病例组织中病毒 RNA 的分布和定位。结果在 19 例病例组织中均可检测到病毒 RNA。陕西及沈阳地区病例,阳性部位主要是各脏器上皮及实质细胞。江西地区病例,病毒 RNA 主要出现于各脏器组织内血管壁及毛细血管内皮细胞。广州一例,病毒 RNA 主要分布于肝脏灶性溶解性坏死区域,肺泡壁和肾间质血管等部位。病毒 RNA 主要定位于细胞胞浆,呈颗粒状或全浆阳性,也出现于部分组织少数细胞胞核中。此外,病毒 RNA 还出现于细胞外液和红细胞表面。结果说明,HFRS 病毒具有泛嗜性感染及上皮性组织或血管内皮细胞易感的特点,后者可能取决于不同地区 HFRS 病例所感染的病毒的血清型或毒株不同,从而引起不同类型 HFRS 及其病理和发病机理的差异。

关键词 肾综合征出血热,汉坦病毒,核糖核酸,人,尸检,原位分子杂交 RNA;

汉坦病毒为肾综合征出血热(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)的致病因子,其基因组含有大(Large, L)、中(Medium, M)、小(Small, S)三个 RNA 基因片段,分别编码产生病毒一大分子 RNA 聚合酶,糖蛋白(G1 和 G2)及核蛋白(NP)^[1]。HFRS 尸检组织中病毒 M 和 S RNA 基因表达产物 G2、NP 和血凝素抗原的定位研究已有报道^[2],但尚缺乏组织中病毒 RNA 系统定位和比较研究的资料。为此本文用核酸原位分子杂交技术研究了我国不同地区 HFRS 尸检组织中汉坦病毒 M 和 S RNA 的分布和定位。

材料和方法

1 材料

陕西西安地区 HFRS 尸检病例 15 例,系第四军医大学病理学教研室于 1961—1986 年间收集;沈阳、广州地区各 1 例,江西地区 2 例,系江西医学院病理教研室收集。共 19 例。其中休克期 12 例,病程 6—8 天;少尿期 1 例,病程 9 天;多尿期 2 例,病程分别为 14 和 20 天;恢复期 1 例,病程 25 天;病程在 27—46 天的病例 3 例。组织经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,做 5μm 连续组织切片。

2 原位分子杂交

质粒 M56 及 PGS 分别含有 Hantaan 病毒 M 和 S RNA 全片段 cDNA,系美国军事医学传染病研究所

本文于 1994 年 3 月 7 日收到,7 月 11 日修回
^{*} 国家自然科学基金资助项目, No. 39270290

Schmaljohn CS 构建^[3,4],经核酸内切酶 Pst I 消化、低熔点琼脂糖电泳分离纯化回收特异性片段,经变性后,分别用异羟基洋地黄毒苷配基-11-dUTP (Digoxigenin-11-dUTP)随机引物延伸法标记作为探针。非放射性 DNA 标记及检测试剂盒为西德 Boehringer Mannheim 公司产品。每次约标记 2 μ g 的 cDNA,临用前经变性,用预杂交液稀释到 1ml。组织的预处理、杂交过程分别按有关文献^[5]及试剂盒操作指南进行。杂交后,用碱性磷酸酶标记的抗 Dig 抗体检测,NBT/BCIP 呈色,核固红染核,脱水,透明,封片。试验同时设有 Dig 标记 pBR328 DNA 杂交的无关探针对照,略去探针的空白对照和 RNase 消化组织阴性对照及阳性组织对照。

结 果

1 病毒 RNA 阳性组织及组织分布

在 19 例病例组织中均可检测到部位不等的阳性信号,但早期病例 RNA 阳性细胞呈弥漫分布。病期较长的病例(46 天),大多数组织阴性,但仍可在肝脏、肠粘膜中检测到病毒 RNA。病毒 M RNA 和 S RNA 的组织分布和细胞定位基本一致。对照:在病毒感染的培养细胞及动物组织上杂交阳性,RNase 消化后或用 Dig 标记的 pBR322 DNA 或预杂交液代替特异性探针杂交对照阴性;阳性组织经两次以上杂交证实(表 1)。

表 1 病毒 M 和 S RNA 阳性组织及分布

Tab. 1 Hantavirus RNA distribution in the tissues of HFRS fatal cases

病例 Case No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A1314		-	-	-				+		+		+				+
A1316	-	+	+	+	+		+				+	-	-	-		+
A1320		+	-	-		+					+		-	-		
A1616	-	+	-	+	+	-				+			-			
A2232	+	+	-	-	+	-						-	-			-
A2234	-	+		-		+	+				-	-				
A2361	-	+	-	+	+								-	-		+
A2518		+	-	+	+						+		-			
A2560	+	+		+	+		+	+			+	-				+
A2566	-	+	+	+		-					+	+	-			
A2607		+	+	+	+	-	+				+		+		+	+
A2615		+	-	+	+	+									-	-
A2859	-	+	-	-	-	-		+					-	-		-
A2930	+	-		+	+											
A3180		-	-	-	+	-			+			-	-	-		-
A780	+	+	-	+	+	+								-		
Az	+	+	+	-	+	+	-									
A2394	+	+	+	+	+	+	+	+			+		+	+		+
A2406	+	+	-	+	+			+			+		+	+	+	-
总计	13	19	16	19	15	12	5	5	1	2	8	6	13	9	4	8
Total	13	19	16	19	15	12	5	5	1	2	8	6	13	9	4	8

注 Note: 1. 心 heart 2. 肝 liver 3. 脾 spleen 4. 肺 lung 5. 肾 kidney 6. 脑 brain 7. 胃 stomach 8. 肠 intestine 9. 垂体 pituitary 10. 扁桃体 tonsil 11. 颌下腺 submandibular gland 12. 甲状腺 thyroid gland 13. 胰腺 pancreas 14. 肾上腺 adrenal gland 15. 前列腺 prostate gland 16. 睾丸 testis

2 病毒 RNA 的定位和分布

2.1 陕西地区 HFRS 尸检病例组织中病毒 RNA

病毒 RNA 主要定位于细胞胞浆中,有胞浆内粗颗粒状病毒包涵体样和全胞浆弥漫阳性,也出现于部分组织少数细胞胞核中。分布于心肌纤维;肝细胞(图 2),肝窦内皮及中央静脉壁;脾单核吞噬细胞及淋巴细胞;支气管,支气管粘膜上皮,粘膜下腺体及软骨细胞,肺内呼吸道粘膜上皮,肺上皮,血管内皮,部分病例肺泡内渗出的 WBC;肾间质血管及肾小球毛细血管,肾小管上皮细胞及个别病例少数肾小管上皮细胞核(图 4);脑神经细胞及胶质细胞核及近核膜处;胃肠粘膜上皮和腺上皮(图 6a);腺垂体细胞胞浆及胞核;扁桃体鳞状上皮和淋巴细胞;甲状腺腺上皮,甲状腺胶质内;颌下腺腺上皮(主要是粘液腺)细胞,部分腺导管上皮及腺(浆液腺)上皮细胞核;胰腺上皮(图 7a)及少数胰岛细胞和导管上皮;肾上腺皮质束状带局部区域上皮细胞及髓质中央静脉平滑肌细胞;前列腺腺上皮及部分胞核;睾丸曲细精管生精上皮,精细胞及少数睾丸间质细胞(图 8a)等各脏器的实质细胞。部分病例组织内血液,肺及肾间质水肿液,肾小管管型,腺腔分泌物,精液及红细胞表面也检测到阳性杂交信号。

2.2 江西地区 HFRS 尸检病例组织中病毒 RNA

病毒 RNA 主要分布于心、肝、脾、肺、肾、脑、肠壁、颌下腺、胰腺、肾上腺、睾丸等各脏器组织中血管壁和毛细血管内皮;也出现于肝窦内皮、Kupffer 细胞、脾单核吞噬细胞、部分脑胶质细胞、心肌细胞、肝细胞、肾近曲小管上皮细胞胞浆中。个别肝细胞和肾小管上皮细胞核也出现病毒 RNA 杂交阳性染色,可伴有或不伴有胞浆阳性。另外血液中 WBC,肺水肿液,肾管型也出现阳性(图 1,3,5,6b,7b,8b)。颌下腺、甲状腺、胰腺、前列腺等腺上皮、睾丸生精上皮、脑神经细胞等均为阴性。

2.3 沈阳及广州地区 HFRS 尸检病例组织中病毒 RNA

沈阳地区病例,病毒 RNA 定位和分布同陕西病例。广州一例,病毒 RNA 主要出现于肝脏灶性溶解性坏死区域、肺泡壁、肾间质血管和心肌细胞等。

3 病毒 RNA 阳性组织细胞的病变

病毒 RNA 阳性细胞多数无明显的形态改变,少数组织及细胞出现病变,如肾脏的肾近曲小管上皮细胞有玻璃样变性;呼吸道、粘膜、腺体、肺泡、甲状腺、颌下腺导管、前列腺、肾小管等部位的阳性的粘膜上皮或腺上皮细胞脱落入腺管管腔中;肝脏、脑、颌下腺导管等组织部位可观察到散在的或小灶性的溶解性坏死。全身各组织中血管内皮和毛细血管,除出血部位有毛细血管断裂外,多无坏死脱落等明显病变。此外,脑胶质细胞,腺垂体细胞,肝细胞以及肾髓质灶性坏死区域的集合管上皮细胞有增生。

讨 论

核酸原位杂交融杂交组织内病变和杂交阳性部位同时观察于一体,是病因诊断明确病因与病变的关系的重要方法。以往研究 HFRS 病毒感染及其在组织细胞内定位和分布,多限于免疫学及免疫组织化学的方法,而涉及到原位杂交的文献很少^[6,7],也无详细系统地介绍尸检组织中病毒 RNA 定位和分布的报道。为此,我们在对尸检组织中病毒 M 及 S RNA 基因表达产物 G2、NP 和 HA 进行详细研究分析的基础上^[2],又对该组病例组织中病毒 M 和 S RNA 定位和分布进行了原位分子杂交检测。



图 1 HFRS 尸检心肌, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。阳性信号位于血管内皮($\times 200$)。

图 2 HFRS 尸检肝脏, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。病毒 RNA 定位于肝细胞胞浆, 阳性细胞呈灶性分布于汇管区周围设置($\times 200$)。

图 3 HFRS 尸检肺, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。病毒 RNA 阳性出现于肺泡壁和血管内皮($\times 200$)

图 4 HFRS 尸检肾脏, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。肾小管上皮呈病毒 RNA 杂交阳性($\times 400$)。

图 5 HFRS 尸检脑组织, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。杂交阳性信号出现于脑毛细血管($\times 200$)。

Fig 1 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy myocardium. The positive signal was restricted to endothelium of blood vessels($\times 200$).

- Fig 2 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy livers. Virus RNA was localized in the hepatocytes cytoplasm. the positive cells were in focal distribution($\times 200$).
- Fig 3 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy lung, virus RNA was distributed in alveolar walls and endothelium of blood vessels($\times 400$).
- Fig 4 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy kidney. Renal tubular epithelial cells displayed strong positive signal($\times 400$).
- Fig 5 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy brain. the positive staining was confined to small blood vessels and capillaries($\times 400$).



图 6 HFRS 尸检胃、肠, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。杂交阳性信号出现于胃粘膜上皮及腺上皮(6a, X200)及肠壁血管内皮(6b, X400)。

图 7 HFRS 尸检胰腺, Dig 标记 M cDNA 探针原位分子杂交。胰腺腺上皮和部分细胞核呈病毒 RNA 阳性($\times 400$)。

图 8 HFRS 尸检睾丸, Dig 标记 M cDNA (8a) 和 S cRNA (8b) 探针原位分子杂交。睾丸生精上皮(8a, $\times 400$) 和间质血管内皮(8b, $\times 400$) 阳性。

Fig 6 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy stomach and intestine. The mucosal and glandular epithelial cells of stomach(6a, $\times 200$), and endothelium of blood vessels of intestine wall (6b, $\times 400$) revealed positive signal.

Fig 7 In situ hybridization of dig-labelled M cDNA probe to HFRS autopsy pancreas. The probe was hybridized to the cytoplasm and some of nuclei of acinar epithelium($\times 400$).

Fig 8 In situ hybridization of dig-labelled M (8a) and S(8b) cDNA probes to HFRS autopsy testis. Positive signals were seen in the seminiferous epithelial cells, sperms(8a, $\times 400$) and endothelium of blood vessels(8b, $\times 400$).

1 病毒 RNA 的定位和分布

1.1 不同地区 HFRS 尸检组织中病毒 RNA 分布存在差异。陕西地区病例(野鼠型), 病毒 RNA 可在多种类型的组织细胞中检测到, 多出现于上皮性组织。江西地区尸检病例(家鼠型或家鼠野鼠混合型)组织中, 病毒 RNA 主要分布于血管和毛细血管内皮细胞中。说明汉坦病毒对人体组织细胞具有泛嗜性感染和上皮及血管内皮易感的特点。病毒 RNA 体内分布的差异可能与不同地区病例所感染的病毒毒株或血清型不同有关, 并有可能造成发病机理上的差异, 这也可能是 HFRS 多样化的原因。另外, 我们还发现肾脏和肝脏中病毒 RNA 阳性率较高, 这与临床上 HFRS 肾脏和肝脏受累较重的事实一致。肾脏中病毒 RNA, 除病毒感染外, 还可能与免疫复合物(IC)有关, 因为病毒可直接参与 IC 形成并通过肾脏排泄, 而肝脏是最适合于 HFRS 病毒生存, 还是病毒 RNA 在肝脏的破坏或降解慢等有关有待研究。

1.2 病毒 RNA 主要定位于细胞胞浆中。一般 RNA 病毒多在胞浆中复制和繁殖, 本研究中 HFRS 病毒 RNA 主要在细胞胞浆中检测到, 这符合该病毒在感染细胞胞浆内繁殖和复制的一般规律和病毒颗粒存在于胞浆内的电镜观察结果。另外, 我们还观察到病毒 RNA 也出现于少数某些细胞核中, 这与唐志佼等^[6]报道的尸检组织(武汉地区)中的病毒 RNA 定位在神经细胞核内及核膜部位的结果类似。有文献描述某些 RNA 病毒也出现于胞核中, HFRS 病毒是否也是如此, 有待进一步考证。

1.3 细胞外液中存在病毒 RNA。以往文献曾分别报道从病人的血液、体液、尿液等细胞外液和红细胞表面检测出病毒抗原和 IC^[8,9], 并从循环 IC 中分离和检测出病毒 RNA^[10]。我们在上述部位观察到病毒 RNA, 提示病毒有可能作为抗原直接参与 IC 形成以及直接激活补体参与 HFRS 的发病, 细胞外液中病毒可能来源于感染细胞内病毒的胞吐释放或感染细胞的破坏。

1.4 病程和病期对体内病毒定位和分布的影响。早期病例病毒 RNA 阳性细胞为弥漫分布。病期较长的病例, 虽仍可在肝脏、肠粘膜中检测到病毒 RNA, 但总的趋势是阳性组织和细胞数减少, 说明病毒在人体内有一个自限性的感染过程, 可能与人作为该病毒的终末宿主有关。

2 病毒 RNA 阳性与病变的关系

本研究结果显示人体组织中绝大多数 RNA 阳性细胞无明显的形态改变, 仅少数细胞表现为单个细胞的溶解性坏死及灶性溶解性坏死, 该结果与我们以前观察到的一致^[2]。由于病变部位无炎细胞浸润和 IC, 也有别于因缺血休克引起的局部组织的梗死样坏死, 因此这种病变可

能与病毒感染有关。结果说明病毒感染可引起宿主细胞的病变,但致病变能力是较弱的。

参 考 文 献

- 1 Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA, *et al.* Characterization of hantaan virion, the proto-type virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*, 1983; 148(6): 1005—1012
- 2 杨守京,刘彦仿,刘莹莹,等.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. *中国病毒学*, 1993, 8(3): 243—256
- 3 Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, *et al.* Coding strategy of the S Genome segment of hantaan virus. *Virology*, 1986; 155(2): 633—643
- 4 Schmaljohn CS, Schmaljohn AL and Dalrymple JM. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, Nucleotide sequence and Gene order. *Virology*, 1987; 157(1): 31—39
- 5 Furuta Y, Shinohara T, Sano K, *et al.* In situ hybridization with digoxigenin-labelled RNA probes for detection of viral genomes. *J Clin Pathol*, 1990; 43(2): 806—809
- 6 唐志俊,邢寿富,张波,等.免疫组织化学和原位分子杂交双重检测在流行性出血热尸检组织中的应用. *中华病理学杂志*, 1993, 23(3): 140—142
- 7 王春杰,邓平非,张雯,等.应用原位杂交及免疫组化检测肝活检组织中流行性出血热病毒 RNA 及抗原. *中国病毒学*, 1993, 8(3): 213—217
- 8 刘彦仿,杨守京,晏培松.流行性出血热病毒抗原在细胞外液的形态及分布. *中华医学杂志*, 1993, 73(6): 341—342
- 9 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. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1992, 12(4): 262—264
- 10 杨佩珍,陈国芬,孙涛,等.流行性出血热循环免疫复合物中病毒的研究. *中华传染病杂志*, 1991, 9(4): 197—199

In situ Hybridization Detection of Hantavirus M and S RNA in Autopsy Tissues of the Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome

Yang Shoujing¹ Liu Yanfang¹ Zhang Jinfeng³ Shang Gaofeng² Yan Peisong¹ Hu Minghua⁴

¹(Department of Pathology, 4th Military Medical University, Xi'an 710032)

²(Department of Infectious Disease, Tangdu affiliated Hospital, 4th Military Medical University, Xi'an 710032)

³(Department of Pathology, Dalian Military Medical School, Dalian 116013)

⁴(Department of Pathology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006)

In situ hybridization was used for detection of hantavirus RNA in the tissues of 19 cadavers with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) collected from different HFRS endemic foci in China. Viral RNA was detected in all the 19 cases. It was mainly located in epithelial or parenchymal cells of various organs with the positive cells in scattered, focal or wide distribution in the cases from Shaanxi and Shenyang, and in vascular endothelial cells of various organs as well as part of parenchymal cells in the cases from Jiangxi, while in the case from Guangzhou, it was positive in focal necrotic

hepatocytes, alveolar sacs, renal interstitial vasculatures, etc. Viral RNA mainly localized in the cytoplasm with coarse granules or fine powdery speckling staining, to a lesser extent also over cellular nucleus. Besides, the positive hybridization signals were also demonstrated in extracellular spaces and on RBC in some tissues and cases. The results suggest that hantavirus infection in human was pantropic and predilection for epithelial or endothelial cells and the latter may be caused by the difference of strain or serotype of infected virus, and may result to the variance in pathogenesis of HFRS.

Key words Hemorrhagic fever with renal syndrome, Human being, Autopsy, Hantavirus, RNA, Hybridization in situ