278—282 6771(2)
维普资讯 http://www.cqvip.com

第10卷 第4期 中国病毒学 Vol. 10 No. 4
1995年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1995

EHFV感染家兔后组织脏器的病毒抗原定位及其病理变化

林雨霖 彭红梅 高又新
张蔚英 陈红斌 向近敏

(湖北医科大学病毒研究所,武汉 430071)

R512.802

提要 采用流行性出血热病毒(EHFV)114株实验感染家兔,用免疫荧光法(IFA)及PAP双桥法对家兔各脏器组织进行病毒抗原定位,同时将各脏器石蜡切片作常规H-E染色,观察受检组织的病理变化。结果表明:家兔在感染后7—15天中,用IFA法在胸腺、心、肺、肝、脾、胰腺、淋巴结、脑、睾丸、卵巢、肾、大肠及小肠中均检出EHFV抗原。用PAP双桥法在细胞水平进行病毒抗原定位,发现所有受检组织小血管及毛细血管内皮细胞均为EHFV的原始靶细胞。生殖腺实质细胞病毒抗原阳性,为EHFV的垂直传播提供了实验依据。从肺支气管粘膜内皮细胞、尤其是腔面的纤毛柱状上皮内检出病毒抗原。推测EHFV通过气溶胶造成传播可能是水平传播的方式之一。病理学初步观察,各脏器组织细胞未发现不可逆的病理损害。

关键词 流行性出血热病毒,家兔,组织,抗原 定位,病理

流行性出血热(EHF)是一种由EHF病毒引起的自然疫源性疾病,目前研究结果表明,其发病机理主要是由于免疫病理损伤的结果[1-4],另外,病毒的直接破坏作用不可忽视[5-6]。为进一步搞清病毒对组织脏器的侵犯与发病机理的关系,用EHFV 114株实验感染家兔,利用IFA技术及PAP双桥法,结合病理学观察,在脏器组织和细胞两个水平上,研究了EHFV感染家兔后病毒抗原的动态分布及其与病理变化的关系,对EHF的发病机理及传播途径有了新的认识。

材料与方法

1 **家兔** 体重2—3 kg,3—4月龄,雌雄不分,EHFV抗体阴性,由本院动物室提供。

2 **病毒** EHFV-H-114株经乳鼠脑内传代增毒后,将鼠脑研碎,用含10%胎牛血清Eagle's液制成10%(W/V)混悬液,离心取上清,细胞培养测得病毒滴度为10^5 $TCID_{50}$/ml,−70℃冻存,作为病毒感染家兔。

3 **动物接种** 将EHFV-H114株悬液同时经腹腔、肌肉、双侧腹股沟及双脚掌皮下接种家兔,其中腹腔接种

本文于1994年9月26日收到,1995年5月22日修回

* 现在湖北医科大学附属第一医院,武汉 430060

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.8 ml/只,肌肉0.5 ml/只,腹股沟及双脚掌皮下各0.6 ml/只。

4 **标本的收集和处理** 接种病毒后第5—20天,耳静脉注入空气,处死动物,解剖取胸腺、心、肺、肝、脾、胰、肾、淋巴结、脑、小肠、大肠、睾丸、卵巢,将上述标本分成二份,一份低温保存,用来制备冰冻切片;一份置Bouin氏固定剂中,制备石蜡切片用,分别用以免疫荧光染色和PAP免疫酶染色、H-E染色。

5 **脏器EHFV抗原的动态检查** 将上述冰冻组织切片冷丙酮固定后,用兔免疫血清(本室自制)及EHF-A_{25-1}-McAb(中国预防医学科学院病毒所制)分别进行间接及直接荧光染色。将上述经Bouin氏固定的组织常规石蜡切片,用白乳胶作为粘贴剂,半干后将组织切片捞起,置60℃烘烤2小时,再置37℃ 6天后,置室温下,供PAP免疫酶染色。

直接及间接荧光法、PAP双桥免疫酶法按常规进行。实验设正常家兔脏器组织对照,PBS及正常兔血清对照,抑制试验的特异性阻断抗体为兔抗EHFV免疫血清(本室自制)。

6 **感染家兔各脏器组织病理学观察** 将上述石蜡切片作常规H-E染色。光镜下观察组织细胞的病理变化。

结　果

1 感染家兔脏器组织细胞病毒抗原分布

1.1 免疫荧光法检测 家兔感染后7—15天中,从所有受检脏器组织可检出EHFV抗原,抗原的检出高峰在感染后9—12天,其中胸腺、淋巴结、胰腺、睾丸、卵巢及小肠显示出较强的抗原荧光反应,抗原荧光颗粒在细胞浆中常绕核分布,呈沙颗粒、簇状排列(见图1)。阻断试验结果表明,兔抗EHFV免疫血清可使特异性荧光抗体的荧光着染明显减弱或消失,说明染色结果是特异的。

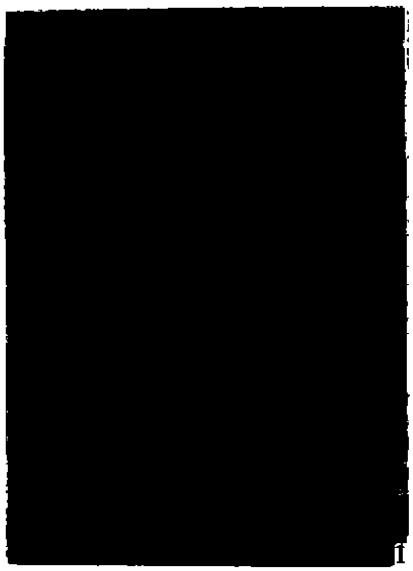


图1 抗原荧光颗粒分布于淋巴结中
Fig 1 Viral artigen,as evidence by granalar, was detected in lymph node

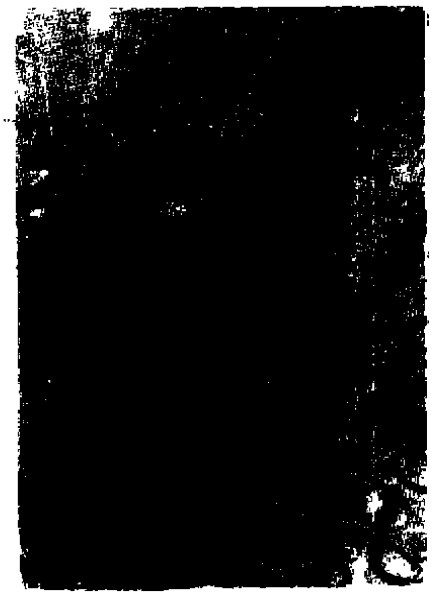


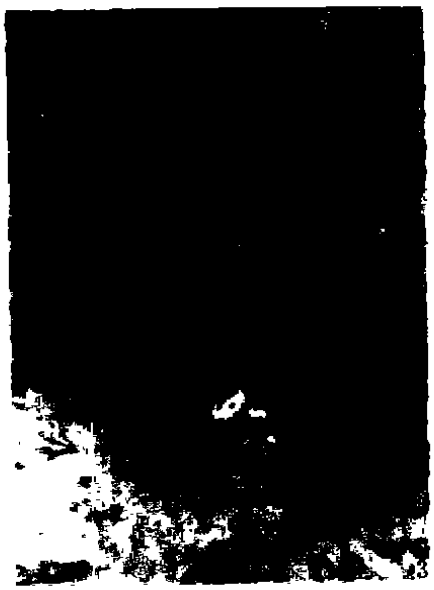
图2 肺脏中的阳性细胞见于支气管粘膜上皮细胞和小血管内皮细胞
Fig 2 The positive cells in the lungs were the epithelial cells of bronchus and the endothelical cells of small blood vesseles

1.2 PAP双桥法检测 本法除病毒抗原检出时间较荧光法早一天、阳性动物脏器检出数高于荧光法外,其余结果两种方法基本一致。观察EHFV抗原在受检组织中的分布及细胞定位

维普资讯 http://www.cqvip.com

特点：肺支气管粘膜上皮细胞阳性，尤以腔面纤毛柱状上皮明显，可见许多肺泡上皮细胞阳性（图2）。胸腺皮质上皮性网状细胞间的血窦内皮细胞、皮质深层及髓质实质细胞明显阳性，呈弥散性分布。脑内病毒抗原阳性细胞主要为脑皮、髓质内散在的小血管、毛细血管内皮细胞。淋巴结内阳性细胞主要见于髓质和副皮质区；阳性细胞主要为淋巴窦内皮细胞，还可见于淋巴细胞、网状细胞和巨噬细胞。脾脏内阳性细胞分布呈弥散性，尤以脾动脉、中央动脉周围明显；阳性细胞主要为脾血窦内皮细胞，还可见许多的网状细胞和巨噬细胞呈阳性（图3）。肝小叶血窦内皮细胞、中央静脉内皮细胞及汇管区小血管内皮细胞明显阳性，阳性肝细胞呈弥散分布。小肠中阳性的细胞主要是粘膜下层和固有膜毛细血管内皮细胞（图4）。肠上皮细胞及某些浸润的单核细胞，肾小球毛细血管内皮细胞及肾小管上皮细胞明显阳性。睾丸的部分曲细精管各级生精细胞、管间结缔组织中毛细血管内皮细胞有EHF病毒抗原的典型分布。卵巢生长期卵泡中的卵泡细胞，卵细胞以及卵泡间小血管及毛细血管内皮细胞呈现较强的EHFV抗原反应。

实验所设正常家兔脏器组织切片染色及阴性抗体对照均呈阴性反应。



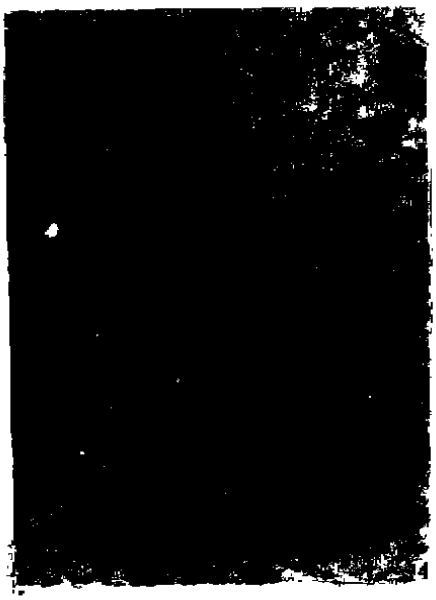


图3 脾脏内的阳性细胞主要为脾血窦内皮细胞、网状细胞和巨噬细胞
Fig 3 The positive cells in the spleen were mainly the endothelical cells of spleen sinoscid marophages and megakarycytes
图4 小肠内的阳性细胞主要为浸润的单核细胞及血管内皮细胞
Fig 4 The positive cells in the small intestine were mainly the monocytes and endothelical cells of small blood vesseles

2 病理学观察结果

在病毒抗原反应最强时期（感染后第9—12天），各脏器的小血管、毛细血管以及血窦有不同程度的充血扩张，抗原阳性的肝细胞及肾小管上皮细胞轻度浊肿，未见不可逆的器质性病理损害。

讨 论

本研究用EHFV-H114株实验感染家兔，在用免疫荧光法检测脏器组织病毒抗原的同时，采用了酶标免疫组化法中的PAP双桥法对常规石蜡组织切片中的病毒抗原在细胞水平上进

维普资讯 http://www.cqvip.com

行检测,同时观察受检组织的病理变化。结果表明,家兔在感染后7—15天中,用免疫荧光在胸腺、心、脾、胰腺、淋巴结、脑、睾丸、卵巢、大肠、小肠中检出EHFV抗原。PAP双桥法检测结果表明,该法较荧光法敏感,PAP法的阳性检出时间较IFA法早,其阳性动物检出数也较高。在感染家兔多处脏器中检出EHFV抗原,表明家兔是EHFV的敏感动物。

EHFV感染的原始靶细胞是目前国内外学者在发病机理研究中普遍争论的焦点。乳鼠动物模型结果表明,血管内皮细胞为EHFV侵犯的原始靶细胞[7],体内外实验结果表明,人体的血管内皮细胞亦为EHFV感染的原始靶细胞[3,8]。本研究将石蜡组织切片经PAP双桥法染色,在细胞水平上对病毒抗原进行定位,结果所有受检组织中的小血管及毛细血管内皮细胞均为EHFV抗原阳性细胞,进一步说明了EHFV有嗜血管性,血管内皮细胞为EHFV感染的原始靶细胞。

免疫器官中抗原分布表明,胸腺的皮质深层及髓质实质细胞为明显阳性;淋巴结中的阳性细胞以髓质和副皮质区多见,阳性细胞为淋巴细胞、单核-吞噬细胞及网状内皮细胞;脾中的中央动脉周围T细胞区的阳性细胞可见于淋巴细胞、单核-吞噬细胞及网状内皮细胞。据文献报道,EHFV可侵入感染家兔外周血的单个核白细胞中,并在其中增殖,引起较长期的病毒血症[9]。说明EHFV在侵入机体后,可在免疫细胞和巨噬细胞中增殖,对体液、细胞免疫产生影响;同时携带病毒全身传播,引起各脏器组织的感染。

EHFV的传播途径是目前迫切需要搞清而又未完全阐明的问题。近年国内有报道:EHFV可经人体胎盘感染胎儿[10],人工感染及自然感染怀孕鼠类中均有本病病毒的垂直传播[10—11]。本病的垂直传播途径已证实可经血胎盘屏障外,是否有可能因生殖腺的实质腺细胞感染EHFV后引起胎儿感染?本研究首次从感染EHFV家兔的睾丸、卵巢实质腺细胞中检出病毒抗原,为以上推测提供了病原学方面的依据,值得进一步研究。从感染家兔的肺脏支气管粘膜内皮细胞,尤其是腔面的纤毛柱状上皮内检出病毒抗原,说明上呼吸道的内皮细胞对EHFV敏感,故从病原学方面推测EHFV通过气溶胶造成传播可能是水平传播的方式之一。已有报道从感染EHFV动物的动物房空气中分离出了EHFV[12]及EHFV存在呼吸道传播的可能性,这些进一步为本文的推测提供了实验依据。

病理学研究初步结果表明,在抗原检出的高峰时期,病毒抗原阳性的血管均表现为程度不同的扩张充血,阳性的实质细胞有轻度的浊肿,未发现不可逆的病理损害,说明病毒对感染细胞的直接损伤并不严重,未引起实质破坏。EHFV的感染可引起人体致死性病变,部分脏器出现明显的坏死等病理变化。然而,在家兔有明显病毒抗原分布的脏器似乎未见明显的病理损害,动物亦未表现出明显的临床症状,这是否与种属差异等因素有关仍有待证明。

参 考 文 献

1 王文余,田泉光,吴长有,等.流行性出血热免疫学发病机理研究.哈尔滨医科大学学报,1984;18(3):24—30

2 张润苍,贾昌明,唐利平,等.流行性出血热免疫功能检测及其意义的探讨.四川医学,1985;6(1):39—40

3 于升萍.流行性出血热临床研究的某些进展.中华内科杂志,1984;23(7):438—441

4 吴仲君,唐思洁,韩淮书,等.流行性出血热患者Tr细胞动态变化规律观察.四川医学,1985;6(1):36—38

5 杨为松,张文彬,白雪帆,等.流行性出血热孕妇流产胎儿脏器中病毒抗原分布的免疫组化研究.第四军医大学学报,1988;9(3):147—148

6 易先平,邢存富.应用免疫组织化学方法检测流行性出血热尸检组织病毒抗原的分布.中华病理学杂志,1991;20(2):110—112

维普资讯 http://www.cqvip.com

7 Takeshi Kurata, Theodore F Tsai, Sally P Bauer, *et al*. Immunofluorescence studies of disseminated hantaan virus Infection of suckling mice. Infection and Immunity, 1983; 41(1): 391—398

8 朱平，杨为松. 人体内皮细胞体外培养及感染流行性出血热病毒的初步观察. 第四军医大学学报. 1988; 9(3): 155—157

9 彭红梅，林雨霖，高又新，等. 感染流行性出血热病毒家兔病毒血症研究. 病毒学杂志. 1990; 4: 374—378

10 杨为松，白宪光，张文彬，等. 流行性出血热病毒经人体胎盘传播及其在人胎部分脏器定位的研究. 中国公共卫生. 1987; 6(2): 85—89

11 Liu Jiangqiu, Li Zhongyi, Sen Baojun, *et al*. An investigation on the vertical transmission of EHFV among the mice. Proceedings of International symposium on Hemorrhagic Fever with Renal Symdrome. Hubei, China. 1988: 10

12 Zhao Zhuangluo, Yan Fangliu. Isolation of epideic hemorrhagic fever virus from the air of rearing experimental animal room. Proceedings of International Symposium on Hemorrhagic Fever with Renal Symdrome. Hubei, China, 1988: 10

Distribution of Virus Antigen and Pathologic Changes in the Tissues of Rabbits Infected with EHFV

Lin Yulin Peng Hongmei Gao Yiuxing *et al*

(*Virus Research Institute, Hubei Medical Unwersity, Wuhan* 430071)

Rabbits were inoculated with EHFV-H114 strain, the distribution of virus antigen in the tissues of rabbits was studied by immunoflourescent technique and double bridge peroxidase (PAP) method. Meantime, pathologic change in the tissues embedded in paraffin was observed by H-E staining. The results showed that the viral antigen was detected in every tissue 7—15 days after infection by IFA. PAP staining, the positive cells were mainly the endothelical cells of capillary, small blood vessele in every tissue detected, the results indicated that the endothelial cells of capillary, small blood are EHFV target cells. Also, the EHFV antigens were detected from glond cells of both ovary and testis of the rabbits, it provides EHFV vertical tranmission with the data of etiology. The specific antigens were also found in epithelial cells of bronchus of the rabbits, it suggests that the epithelial cell be susceptible to EHFV, and there be possibility of EHF aerosol spread.

From the observation of the pathologic change in positive tissues, we found that there was not observable pathologic change in positive tissues.

Key words Epidemic hemorrhagic fever virus (EHFV), Rabbit, Tissue, Antigen