维普资讯 http://www.eqvip.co 1696で(リー)

21-28 第11卷第1期 1996年3月

中国病毒学 VIROLOGICA SINICA Vol. 11 No. 1

Mar. 1996

用原位分子杂交和免疫组化研究肾综合征 出血热肾组织中的病毒感染^{*}

杨守京1 刘彦仿1 胡锡祺2/李明升2 胡明华3

1(第四军医大学病理教研室,西安 710032)

2(上海医科大学病理学教研室,上海 200032)

3(江西医学院病理学教研室,江西南昌 320050)

R512.802

提要 应用原位分子杂交和免疫组化技术研究了陕西、沈阳、上海、江西、广州等地收集的 36 例肾综合征出血热(HFRS)户检肾组织中的病毒 RNA 和抗原的定位和分布。病毒 RNA 检测 34 例,28 例阳性;抗原检测 34 例,30 例阳性,病毒 RNA 及其抗原主要定位于细胞胞浆中。西安及沈阳地区的病例,病毒 RNA 和抗原阳性部位主要是肾小管上皮细胞,较少出现血管阳性。上海、江西和广州地区病例病毒 RNA 主要出现于肾间质血管和少数病例的个别肾小球毛细血管和肾小管上皮细胞;病毒抗原分布于肾间质血管和肾小管上皮中。1 例(广州病例)肾血管平滑肌细胞检测到空泡状病毒 NP 抗原。另外在 3 例西安病例和 9 例上海病例肾远曲小管和集合管上皮中检测到 NP 和HA 阳性的病毒包涵体。结果说明 HFRS病毒可感染肾脏中肾小管上皮和血管内皮,并在肾小管上皮细胞产生包涵体。不同地区病例肾脏中病毒感染的部位不同,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。肾小管上皮细胞和血管内皮的损伤除病毒直接作用外,还可能有免,疫因素参与。

关键词 肾综合征出血热,肾脏,病毒 RNA,抗原,原位分子杂交,免疫组织化学 无病毒 底产,

HFRS 肾病变以急性肾小管坏死和血管的损伤为特点,有关肾衰发病机理尚不完全清楚,大多数学者倾向于病毒直接作用和免疫发病机理^[1]。另外不同临床类型的 HFRS 是否存在病毒感染部位和发病机理上的差异至今尚无充分的实验依据证实。为此,本文用原位分子杂交和免疫组化技术,对我国不同流行地区 HFRS 尸检肾组织中病毒 RNA 和抗原的定位和分布进行了研究。

材料与方法

1 标本

HFRS 尸肾脏共 36 例(表 1),包括陕西西安地区 13 例,为第四军医大学病理教研室收集;上海地区 17 例,上海医科大学病理学教研室收集;江西地区 3 例,江西医学院病理教研室收集;另有沈阳地区 1 例和广州地区 2 例。其中男性 31 例,女性 5 例;年龄最小者 16 岁,最大者 66 岁;组织经 10%的福尔马林固定,石蜡包埋,做 5 μm 的连续切片。

本文于 1995 年 1 月 23 日收到, 1995 年 9 月 18 日修回

国家自然科学基金资助项目 No:39270290

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, 系由 Schmaljohn 构建^[2,3]。质粒经酶切、电泳分离纯化回收特异性片段,变性后,分别用异羟基洋地黄毒苷配基-11-dUTP 随机引物延伸法标记为探针,每次约标记 2 μg cDNA,临用前经变性,用预杂交液稀释至 1 ml。探针的标记、组织的预处理,杂交过程及免疫学检测均按试剂盒操作指南进行。非放射 DNA 标记及检测试剂盒为西德 Boehringer Mannheum 公司产品。实验同时设有 Dιg 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。

3 免疫组织化学

抗 HFRS 病毒糖蛋白(G2)单克隆抗体(MAb)LV48A,核蛋白(NP) MAb L133、A35、A25-1、A19、A20、R31 (中国预防医学科学院病毒研究所)1A8、5H5、7D1 和抗血凝素(HA) MAb 3D8、3G1、8F8、8G2、8G3(第四军医大学分子病毒室),1:2000 稀释后单独使用。羊抗鼠 IgG 1:300(本室制备),鼠 PAP 1:10000(武汉生物制品研究所),ABC 试剂盒(美国 Vector 公司产品)。免疫组化染色按文献进行^[4]。实验中以陈株 HFRSV 感染的 Vero E6 细胞作为抗原阳性对照;用病毒抗原吸收抗 HFRSV MAbs 为吸收对照,另外,还分别设有正常组织对照,无关单抗及 PBS 代替一抗的替代对照。

结 果

1 病毒 RNA 的定位和分布

对 36 例 HFRS 尸检肾组织中的 34 例进行了病毒 RNA 检测, 有 28 例阳性(表 1)。阳性率为 82.35%。

表 1 HFRS 病例肾组织中病毒 RNA 和抗原检测结果

Tab 1 The distribution and localization of virus RNA and antigens in the renal tissues

病例 Cases	来源 Source	病期 Pbase	RNA RNA	抗原 Antigen	病例 Cases	来源 Source	病期 Pbase	RNA RNA	抗原 Antigen
A1316	Xi an	Hypot	Τ	T, CIB	A2019	Shanghai	Hypot.	V,G	V, T
A1413	h-	-	nt	T	A2740	••	•	_	_
A1616	II.	-	T	nt	A3455	I)	**	N	N
A2361	le .	*	T	T, CIB	A4075	I)	"	T	V, T, ClB
A2560	le .	•	T	T	A2368	"	Oliguric	\mathbf{v}	V, T
A2615	10	4	T, N	Т	A2372	**	- "	V, T	V, T, ClB
A3180	10	~	T, N	T	A3080	*	*	v	T, CIB
A8801	10	~	T	Т	A3051	•	7	V	V, T
A2607	IÞ.	Diuretic	T	T, CIB	A3414	le .	•	T	T, CIB
A2518	1e	Conval.	T	_	A3418	I)	*1	V, T	V, T, CIB
A2232	10	Severe	T	T	A3579	ш	~	V, G	V, T, CIB
A2859	10	~	_	_	A3886	п	-	T	Т
A2930	10	*	T	Т	A4137	ш		_	T, CIB
A0780	Sbenyang	Hypot.	T	Т	A4171	n .		V, T	V, T, CIB
A2394	Jiangxi	10	V, T	V, T	A4244	ш		_	T
A2406	"	le .	V	v	A2714	ш	Diuretic	_	_
A2409	II .	.,	_	Т	GZ001	Guangzhou	Hypot.	nt	v
A2004	Sbangbai	Hypot.	v	V, T, CIB	GZ002	"	Hypot.	v	nt

注:Xi'an, 西安病例; Shenyang、沈阳病例; Jiangxi, 江西病例; Shanghal, 上海病例; Guangzbou, 广州病例; Hypot = 休克期, hypotension phase; Oliguric = 少尿期, oliguric phase; Diuretic = 多尿期, diuretic phase; Conval. = 恢复期, convalescent phase; Severe = 危重病例, severe case. G = 肾小球, glomerular capilliaries; T = 肾小管, tubular cells; V = 血管、vessels; N = 细胞核, nuclus; nt = 未测, not tested; CIB = 胞浆内包涵体, cytoplasmic inclusion body.

西安及沈阳病例肾脏中病毒 RNA 阳性部位以肾小管上皮细胞为主(图 1A),包括近曲小管,远曲小管和集合管,为胞浆阳性,有时也出现于肾小管管型,肾间质水肿液和血细胞,但肾小球毛细血管和肾间质血管出现病毒 RNA 阳性的机会不多;有 2 例肾脏少数肾小管上皮细胞胞核阳性。江西的 3 例肾脏,有 2 例病毒 RNA 阳性,阳性部位有肾间质血管,血管内皮和血细胞,以及肾小管上皮(1/2)(图 IB)和肾小管管型。上海的 17 例病例肾脏中,有 13 例阳性,其中 2 例休克期和 6 例少尿期病例肾脏肾间质血管内皮、血管内 WBC 和凝集的红细胞与个别肾小球毛细血管阳性(图 IC,1D,2A-2C),当中的 3 例少尿期病例同时伴有部分肾小管上皮呈细颗粒状弱阳性;1 例休克期和 3 例少尿期病例肾脏,仅肾小管上皮阳性;1 例休克期病例肾脏

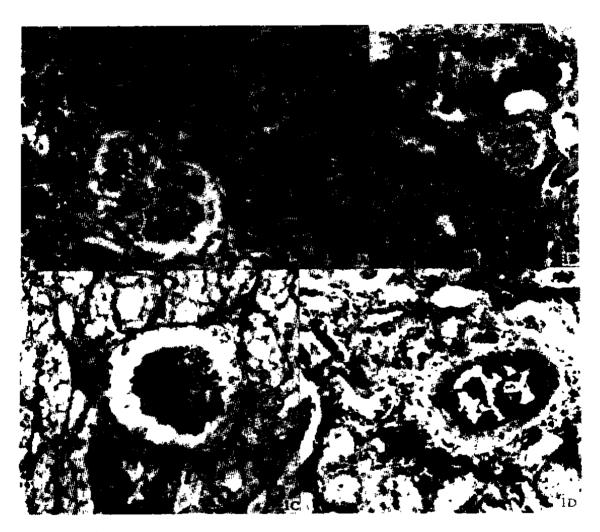


图 1 HFRS 病例肾脏、肾小管上皮细胞胞浆中病毒 RNA 阳性伴有明显的变性和坏死(1A, ~ 200)以及玻璃样变性 (1B, ~ 200)。肾小球毛细血管(1C, ~ 200)和血管内皮(1D, ~ 200)呈病毒 RNA 阳性。

Fig 1 The autopsy renal tissues of patients with HFRS. Renal tubular cells revealed virus RNA positive and exhibited necrosis (1A, ~400) and hyaline degeneration (1B, ×200). Glomerular capillaries (1C, ×200) and vascular endothelial cells (1D, ×200) also showed positive for virus RNA.

第 11 卷

肾远曲小管和集合管上皮多数细胞胞核阳性(图 2D)。1 例休克期,2 例少尿期和1 例多尿期肾脏阴性。广州地区的1 例病例, 病毒 RNA 阳性仅出现于肾间质少数血管内皮。休克期及少尿期死亡的病例, 杂交信号分布较广, 处于恢复期以及病程较长的死亡病例, 杂交阴性。病毒 M 和 S cDNA 探针杂交结果基本一致。



图 2 HFRS 病例肾脏。皮质(2A, ×200)及體质间质血管(2B, ×100), 血管内皮和白细胞呈病毒 RNA 阳性(2C, ×400)并伴有明显血管充血, 血管破坏和出血。肾小管上皮细胞胞核呈病毒 RNA 阳性(2D, ×100)。

Fig 2 The renal tissues of patients with HFRS. Virus RNA was located in the renal cortical (2A, × 200) and submedullary (2B, × 100) interstitial vasculatures, endothelial cells and white blood cells (2C, • 400), where congestion, destruction of blood vessels and hemorrhage occurred. Virus RNA was also located over the nuclei of renal tubular cells (2D, 100).

2 病毒抗原的定位和分布

对 36 例肾脏中的 34 例进行抗原检测, 有 30 例阳性, 阳性率为 88.24%, 结果见表 1。西安及沈阳病例, 病毒抗原主要分布于肾小管上皮细胞, 呈胞浆内 G2、NP 和 HA 抗原弥漫阳性,

血管阳性不明显(图 3A)。上海及江西病例肾脏肾间质血管内皮和血管壁中检测到病毒抗原,阳性抗体为 LV48A、L133、A19、A20、R31、3D8 和 3G1、1A8 和 7D1,多数病例伴有肾小管上皮细胞阳性(图 3B)。在该组病例中,分别有 3 例西安病例和 9 例上海病例肾脏的远曲小管和集合管上皮细胞中检测到 NP 和 HA 抗原阳性的胞浆内病毒包涵体(CIB)(图 3C),阳性抗体有



- 图 3 HFRS病例肾脏。近曲小臂上皮细胞(3A,、400),增生的集合臂上皮细胞(3B, ~400)及间质血管(3C, ×200)星病毒抗原阳性。广州 HFRS病例肾脏,病毒 NP抗原以空泡状阳性出现于肾血管平滑肌细胞中伴有管壁结构的 破坏(3D, ×200).
- Fig. 3 The autopsy renal tissues of patients with HFRS. Immunohistochemically, viral antigens were positive in the proximal convoluted the tubular cells (3A, × 400), the regenerative collecting tubular cells (3B, 400) and interstitual vasculatures (3C, × 200). It was also localized in the smooth muscles of blood vessels with destruction of the structure (3D, × 200).

MAb 1A8、3D8、5H5、8F8、8G2、8G3 以及 MAb A35、7D1(西安病例阳性)和 MAb A20、R31(上海病例阳性)。广州 1 病例,病毒抗原以空泡状阳性主要出现于肾血管平滑肌细胞(图 3D),此外在部分病例组汁中的血液、尿液、水肿液、各种管型和红细胞表面等细胞外液也检测到病毒 G2、NP或 HA 抗原阳性。早期病例组织中,病毒抗原阳性强度高、分布广。晚期病例,抗原阳性范围小,弱阳性或只在个别部位出现阳性,部分抗体染色是阴性的。

3 组织细胞病变

肾小管有不同程度的变性,玻璃样变性甚至胞浆空泡化和坏死脱落,肾小管结构破坏,管腔阻塞,管型多见。CIB 阳性的肾小管形态基本正常,还出现于增生的肾远曲小管和集合管上皮细胞中。血管特别是髓质血管有不同程度的扩张充血、出血、血管内皮脱落和血管壁的破坏并伴有间质水肿。肾小球病变轻微,仅有球系膜细胞的轻度增生;间质有散在的少数淋巴细胞和单核细胞浸润。病程较长的病例肾间质有不同程度的纤维结缔组织增生。

讨 论

HFRS 病毒 RNA 和病毒抗原主要定位于细胞胞浆中,符合该病毒在感染细胞胞浆内繁殖和复制的一般规律以及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 也出现于少数病例(3 例)肾小管上皮细胞胞核中。有文献报道某些 RNA 病毒如流感病毒其 RNA 可出现于感染细胞胞核中^[5],另外也不能排除因感染细胞损伤后的病毒 RNA 被动弥散到胞核的可能性,其详细原因有待进一步研究。

血管内皮的损伤和功能的改变是 HFRS 的基本病理生理改变^[1]。最初有人在血管内皮细胞中检测到病毒抗原,因而提出血管的损伤与病毒的直接作用有关^[6],为了寻找病毒直接作用的证据,许多学者纷纷对体外培养的人血管内皮进行病毒感染的实验研究,结果无论是对人体有无致病性的病毒均可感染内皮细胞,但不引起细胞病变^[7,8]。本研究中,上海及江西病例肾间质血管有明确的病毒 RNA 和抗原阳性,说明血管内皮是病毒感染的靶细胞。阳性部位的血管有不同程度的扩张充血,血管内皮脱落和血管壁的破坏并伴有出血和间质水肿等病变,从表面上看病毒感染与病变有直接的关系,但进一步的研究发现,在病变部位往往可同时检测到病毒抗原、抗体和补体成分,提示肾组织内血管内皮的损伤除病毒直接作用外还可能有病毒感染所诱发的免疫病理机制(Ⅱ型变态反应)参与。

病毒包涵体是确定病毒感染的重要标志^[9],本研究在 9 例肾脏的远曲小管和集合管上皮细胞内观察到病毒 NP 和 HA 抗原阳性胞浆内包涵体、抗体和补体成分阴性,说明肾小管存在病毒的感染。CIB 阳性的肾小管上皮细胞在光镜下形态基本正常,有的甚至出现增生,说明HFRS 病毒的弱致病变性。在部分病例的近曲小管上皮细胞可同时检测到病毒 RNA、抗原、免疫球蛋白和补体成分^[10],并伴有明显玻璃样变性、坏死和脱落,提示肾小管中也存在因病毒感染所诱发的补体系统原位激活的可能性,或肾近曲小管对过滤到原尿中免疫复合物的重吸收,后者可能是造成肾小管病变的因素之一。另外、上述肾血管的病毒感染和损伤、肾髓质的出血引起的肾小管的缺血,也可能是造成其损伤的重要因素。

在我国, HFRS 主要有野鼠型和家鼠型两种临床类型, 两者有地理分布及病情轻重程度方面的差异, 肾脏受累的程度也不同, 陕西地区的 HFRS 是以野鼠型即重型 HFRS 为主, 上海及江西为家鼠型和混合型 HFRS 疫区^[11]。本研究中陕西和沈阳地区病例肾脏中病毒 RNA 和抗

原主要分布在肾小管上皮细胞中;上海和江西病例肾间质血管和肾小管均可呈病毒抗原阳性, 而病毒 RNA 阳性以间质血管为主,肾小管上皮细胞阳性者少,经严格对照和反复实验证实该 结果是可靠的。因同一地区病例和同一地区不同病期病例组织中病毒 RNA 的定位未见明显 不同,作者认为上述尸检组织中病毒感染部位的差异是客观存在的,该差异可能与不同疫区病 例所感染的病毒毒株或血清型不同有关。由于不同地区病例肾组织中病毒感染部位的差异, 可能导致肾脏的病变程度、病情轻重和发病机理的差异。

参 考 文 献

- 1 Cosgriff TM, Lewis RM Mechanisms of disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. Kidney International, 1991; 40 (suppi 35):72-79
- 2 Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of hantaan virus. Virology, 1986;152(2); 631~643
- 3 Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymaple JM. Hantaan virus M RNA; Coding strategy, nucleotide sequence and gene order. Virology, 1987; 157(1):31 ~ 39
- 4 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):42-45
- 5 Svante Hermodsson. Orthomyxoviruses(influenza virus). In; Text book of Medical Virology, Erik Lycke and Erling Norrby eds., London; Burtterworth, 1983;262 ~ 271
- 6 Kurata T, Tsai TF, Bauer SP, et al. Immunofluorescence studies of disseminated hantaen virus infection of suckling mice. Infect Immun, 1983, 41(1):391~398
- 7 Yanagihara R, Silverman DJ. Experimental infection of human vascular endothelial cells by pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. Arch Virol, 1990;111:281 ~ 286
- 8 Pensiero MN, Sharefkin JB, Dieffenbach CW, et al. Hantaan virus infection of human endothelial cells. J Virol, 1992;66(10): 5929 ~ 5936
- 9 杨守京,刘彦仿,晏培松,等,流行性出血热人体尸检材料中的病毒包涵体,病毒杂志,1992;7(3):246~252
- 10 杨守京, 刘彦仿, 晏培松, 流行性出血热尸检组织中的免疫复和物, 第四军医大学学报, 1992; 13(4); 314
- 11 Tang YW, Li YL, Ye KL, et al. Distribution of hantavirus serotypes hantaan and seoul causing hemorrhagic fever with renal syndrome and identification by hemagglutination inhibition assay. J Clin Microbiol, 1991;29(9):1924~1927

Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) Virus Infection in the Renal Tissues of Patients with HFRS Studied by in situ Hybridization and Immunohistochemistry

Yang Shoujing¹ Liu Yanfang¹ Hu Xiqi² Li Mingsheng² Hu Minghua³

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus RNA and antigens were simultaneously detected by in situ hybridization and immunohistochemical techniques in the autopsy renal tissues of the patients with HFRS. In 36 cases collected separately from Shaanxi, Shenyang, Shanghai and Jiangxi HFRS endemic foci, 34 cases were subjected to virus RNA detection and 28 cases were positive, 34 cases were subjected to viral antigen detection and 30 cases were positive. Virus RNA and antigens were mainly localized in the cytoplasm. In the cases from Xi'an and Shenyang, they were mainly distributed in the renal tubular cells. In the cases from Shanghai, Jiangxi and Guangzhou, virus RNA was mainly distributed in the renal interstitial vasculatures and endothelial cells, occasionally in glomerular tufts and tubular cells, while viral antigens were distributed in vasculatures and renal tubular cells, and in Guangzhou cases in smooth muscles of blood vessels. Moreover, 3 cases from Xi'an and 9 cases from Shanghai also displayed cytoplasmic inclusion bodies (CIB) in their distal convoluted and collecting tubular cells, which were positive for viral nucleocapsid protein(NP) and hemagglutinin(HA). These findings indicated that HFRS virus could infect both the endothelial cells and/or renal tubular cells and produce CIB in the tubular cells in kidney. The variance of target cells of virus infection may be related to the different viral strains or serotypes prevailed in different HFRS endemic foci. The immunemediated mechanism, besides virus direct attack, might be involved in the tubular damage and vascular lesion.

Key words Hemorrhagic fever with renal syndrome, Kidney, Virus RNA, Antigen, *in situ* hybridization, Immunohistochemistry

⁽Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

²(Department of Pathology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

³(Department of Pathology, Jiangxi Medical College, Nanchang 320050)