维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第4期 中国病毒学 Vol.13 No.4
1998年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1998

# 流行性出血热尸检组织中热休克蛋白70 mRNA的定位及分布*

叶苓 杨守京 刘彦仿 晏培松
(第四军医大学病理学教研室,西安 710032)

**摘 要** 应用核酸原位分子杂交技术研究了国内不同地区30例流行性出血热患者尸检组织中病毒RNA及HSP70 mRNA细胞内定位,同时观察了汉坦病毒感染的Vero $E_6$ 细胞中HSP70的表达情况。结果表明,热休克蛋白70 mRNA在多数组织中均可检测到,分布与病毒RNA一致,并且与组织的病理损害有关;体外实验的结果也表明在出血热病毒感染的细胞中有HSP70的高表达。提示热休克蛋白与汉坦病毒的致病以及流行性出血热的发病机理有关。

**关键词** 热休克蛋白,核酸分子原位杂交,汉坦病毒,流行性出血热

流行性出血热(Epidemic hemorrhagic fever, EHF)是由汉坦病毒引起的一种急性传染病,对该病发病机理的研究多集中于病毒的定位及免疫复合物致病,然而对于发病过程中组织细胞自身保护性反应则较少研究。通常组织细胞受到缺氧、炎症、病毒感染、免疫反应等刺激时,会出现自身保护性应激反应,以表达热休克蛋白为特征[1]。通常根据其分子量大小及其功能将热休克蛋白分为三类,即HSP90家族、HSP70家族和低分子量三个家族,其中HSP70是与损伤保护作用有明确关系,也是研究比较深入的一个家族。另外一些体外实验证实,细胞在受到某些病毒感染后可以诱导热休克蛋白的产生[2]。我们用HSP70 cDNA探针和Hantaan病毒S片段cDNA探针,检测了HFRS患者尸检组织中编码HSP70蛋白的mRNA水平及其与病毒RNA分布的关系,并用汉坦病毒感染培养的敏感细胞株观察感染后HSP70的表达情况,以期了解流行性出血热发病过程中热休克蛋白的合成及其与病毒感染的关系。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 尸检材料 陕西西安地区EHF病例17例,系第四军医大学病理学教研室收集;上海地区EHF病例12例,为上海第一医科大学病理教研室收集;江西地区EHF病例1例,江西医学院病理教研室收集。这些病例中休克期13例,少尿期16例,病程在6~10 d,多尿期1例,病程20 d。尸检组织均经10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,做5 μm连续组织切片。

1.2 细胞及病毒 汉坦病毒敏感细胞株非洲绿猴肾上皮细胞Vero-$E_6$ 细胞来自中国预防医学科学院病毒所,本室保存;汉坦病毒A9株为中国预防医学科学院病毒所馈赠。Vero-$E_6$ 细胞用含5%正常胎牛血清的

收稿日期:1997-12-16,修回日期:1998-04-20
* 本课题为国家自然科学基金资助项目 No.39770664

维普资讯 http://www.cqvip.com



1640培养基，内加抗生素（青霉素50 μg/mL，链霉素50 μg/mL），谷胺酰胺2 mg/mL，于5% $CO_2$ 37 ℃孵箱中培养。

**2 方法**

2.1 探针制备 质粒PhHSP70和pGs分别含HSP70基因cDNA全片段及Hantaan病毒S片段cDNA，分别经适当酶切，冻融法及低融点琼脂糖电泳分离纯化回收特异性片段，溶于15 μL无菌三蒸水中待用。

2.2 探针标记 回收的特异性片段经加热变性后用异羟基洋地黄毒苷配基-11-dUTP（Digoxigen-11-dUTP）随机引物延伸法标记制备探针，每次标记约2 μg的cDNA，分别加入2 μL dNTPs混合液，2 μL Dig标记的dUTP及1 μL的Klenow酶，至总体积20 μL，放置于37 ℃ 48 h，2 μLEDTA终止反应，纯化好后用1 mL预杂交液稀释，-20 ℃保存待用。

2.3 杂交 石腊切片常规脱蜡至水，DEPC水浸泡以阻断RNA酶，0.2 mol/L盐酸消化30分，4%多聚甲醛后固定30 min，逐级酒精脱水，将用预杂交液稀释的探针加热变性，37 ℃杂交48 h，依次用2×SSC、1×SSC、0.5×SSC反复振洗，逐级酒精脱水，2%正常小牛血清封闭，加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。用相应的各种正常组织做阴性对照，免去加探针做空白对照。

2.4 细胞感染病毒及模拟感染 将Vero-$E_6$细胞在含5%胎牛血清的1640培养基中培养，将细胞分为两组，第一组为病毒感染组，待细胞长成单层时，倾倒掉大部分培养液，接种汉坦病毒A9株乳鼠脑悬液，置37 ℃病毒吸附1 h后加入5%胎牛血清的1640培养液，并分别于感染后4 h、8 h、24 h，72 h及5 d时收集被感染细胞，分别做细胞铺片，于同样时间收取少量细胞涂片用间接免疫荧光法检测病毒生长情况。第二组为模拟感染组，与感染细胞同时倒掉大部分培养液但不加入病毒，1 h后加入培养液，与被感染细胞同样时间段收取细胞做相应检测。

## 结 果

**1 HSP70的定位、分布及与病毒RNA分布的关系**

HSP70 mRNA阳性信号表达于细胞浆内，分布在各组织及脏器内的毛细血管内皮细胞及血管内单个核细胞（Fig 1），在肝脏检测8例、阳性6例，主要位于肝细胞浆，部分病例也可见于肝脏枯否氏细胞（Fig 2）；21例被检脑组织中，阳性10例，主要位于脑组织内毛细血管和胶质细胞浆（Fig 3）；胃肠道被检7例，阳性4例，位于胃肠黏膜上皮及腺上皮细胞；在5例被检肾上腺中，阳性4例，均位于皮质球状带上皮细胞胞浆（Fig 4）；心脏检测20例，阳性15例，见于心肌细胞浆，呈紫蓝色细小或粗大颗粒、心肌间质中巨噬细胞浆内（Fig 5）；16例被检肺脏组织，6例阳性，阳性杂交信号位于肺泡上皮细胞及肺泡壁内巨噬细胞内；在24例肾脏组织，阳性17例，主要见于肾小管周围间质毛细血管内皮细胞及血管内单核细胞浆内（Fig 6），少数也可见于肾小球毛细血管内的巨噬细胞；5例脾脏，阳性2例，主要位于脾脏内网状内皮细胞内。病毒RNA的分布与HSP mRNA的分布基本一致。

**2 HSP70阳性区域与细胞病变的关系**

尸检组织各个脏器阳性细胞多数无明显的形态改变，仅在各脏器的部分区域可见少数病变，且病变较轻微，为脏器中实质细胞的变性，单个细胞的坏死，各脏器间质毛细血管扩张充血。部分区域可见出血，病毒RNA的分布与病变无明显相关性，但与HSP70 mRNA阳性杂交信号有明显一致性。在出血明显的肾髓质周围扩张的毛细血管内的单个核细胞浆内，可见明显HSP70 mRNA阳性杂交信号，而在病变较轻的肾皮质区周围血管内炎细胞内阳性杂交信号则不明显。HSP70 mRNA的强度及分布与病期及病程似无明显关系。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 1　流行性出血热尸检肾脏 Dig 标记的 HSP70 cDNA 探针原位杂交。示阳性杂交信号位于肾间质毛细胞血管内皮(×100)

图 2　流行性出血热尸检肝脏 Dig 标记的 HSP70 cDNA 探针原位杂交。阳性杂交信号分布于肝细胞浆及枯否氏细胞浆(×

维普资讯 http://www.cqvip.com



400)。

图3 流行性出血热尸检脑组织Dig标记的HSP70 cDNA探针原位杂交。脑组织内毛细血管及少数胶质细胞浆内阳性杂交信号(×100)。

图4 流行性出血热尸检肾上腺Dig标记的HSP70 cDNA探针原位杂交。杂交阳性信号位于肾上腺皮质球状带细胞浆内(×400)。

图5 流行性出血热心脏Dig标记的HSP70 cDNA原位杂交。心肌细胞浆内紫蓝色细小及粗大颗粒(×400)。

图6 流行性出血热肾脏Dig标记的HSP70 cDNA原位杂交。杂交阳性信号位于肾间质毛细血管内单个核细胞浆内(×400)。

Fig 1 ISH of Dig-labelled HSP70 probe to EHF autopsy kidney. The positive signal was showed in endothelium of capillaries(×100).

Fig 2 ISH of Dig-labelled HSP70 probe to EHF autopsy liver. The positive signal was located at liver cell plasma and Kupffer cell plasma (×400).

Fig 3 ISH of Dig-labelled HSP70 probe to EHF autopsy brain. The positive signal was seen in capillaries and glia cells (×100).

Fig 4 ISH of Dig-labelled HSP70 probe to EHF autopsy adrenal gland. The positive signal was localized in the global zone of adrenal cortex (×400).

Fig 5 ISH of Dig-labelled HSP70 probe to EHF autopsy myocardium. The positive signal was distributed in myocardiocytes(×400).

Fig 6 ISH of Dig-labelled HSP70 probe to EHF autopsy kidney. The positive signal was localized in mononuclear leukocytes in the capillaries of kidney.

### 3 病毒感染Vero $E_6$细胞中HSP70的表达

病毒感染的Vero $E_6$细胞经间接免疫荧光法证实有汉坦病毒病毒蛋白存在，同时进行免疫组织化学ABC法检测HSP70的表达情况，可见感染的细胞浆及细胞核内棕黄色阳性颗粒，阳性信号于感染后4 h出现，并于4 h后可见阳性颗粒由细胞浆转入核仁内，感染8 h后阳性信号在核内达到高峰，以后阳性信号逐渐减弱，但直至感染后5 d仍可见HSP70表达。相应对照组则仅见个别细胞胞浆内出现棕黄色阳性颗粒。

## 讨 论

### 1 流行性出血热组织中可检测到HSP70 mRNA与病毒RNA

流行性出血热是汉坦病毒感染引起的急性传染病，本研究通过ISH检测到汉坦病毒RNA，显示这些病例组织中有病毒感染存在，同时也检测到被检组织中HSP70 mRNA，且二者分布基本一致，提示HSP70与汉坦病毒在体内的感染有关。HSP70在不同病毒感染过程中促进或抑制病毒的产生。有文献报道，在体外病毒感染与细胞应激反应间的关系，是在感染组织内的诱导型HSP70的表达，后者与细胞核内的病毒蛋白的积累有关[4]。有研究发现GRP78(Bip)，HSP70家族中的另一个成员，参与维持流感病毒的血凝素单体(hemagglutinin monomers)处于一种三聚体状态，使此蛋白半衰期延长，因此有人提出HSPs与病毒的结合干扰病毒蛋白的整合及产生，由于其阻碍了病毒的复制及由前体病毒颗粒转变为成熟颗粒的过程，因而对宿主细胞有利[5]。从本研究结果看，汉坦病毒诱导热休克反应可能起到抑制病毒复制和参与细胞保护作用，但具体作用机理尚有待进一步研究。

### 2 HSP70可能的诱发因素及在EHF发病过程中的作用

已证明病毒感染、炎症介质、氧自由基在多种细胞系中诱导热休克反应，体外实验结果表明病毒感染与增高的HSP70表达有关[6]，HSP70的主要功能是以“分子伴娘”的形式在细胞内

维普资讯 http://www.cqvip.com



帮助新合成的多肽链正确折叠转运,部分错叠的多肽链复性并重新折叠和异常及外来蛋白质的降解。病毒感染时HSP70的表达可能与病毒蛋白或宿主细胞蛋白的错叠有关;同时病毒感染在机体局部造成的细胞损伤和炎症时产生的氧自由基和/或细胞因子如IL-1, TNF-α, IL-2和IFN-α, IFN-β也直接或间接地促进细胞应激反应表达热休克蛋白。另外,病毒抗原引起的体液及细胞免疫所致损伤也可诱导HSP70的增加。研究认为汉坦病毒感染后,通过两个途径对宿主细胞产生损伤,其一是病毒的直接致病变作用,即病毒在繁殖复制过程中挪用了宿主的代谢物质,或病毒的代谢产物不同程度地抑制和干扰了宿主细胞的代谢,而致细胞发生病变;其二是病毒抗原诱导机体细胞免疫或体液免疫而产生宿主细胞的损伤。目前大多数研究均认为人类血管内皮细胞为汉坦病毒感染的原始靶细胞,在其内病毒增殖复制直接造成细胞不同程度的损伤,并且病毒蛋白作为抗原诱发机体的免疫反应而致血管内皮损伤,本研究在被检各种组织的血管尤其是毛细血管内皮细胞胞浆中均可见到病毒RNA阳性杂交信号,说明血管内皮细胞对汉坦病毒的易嗜性,并同时可见HSP70 mRNA水平的增高,考虑由于HSPs的"分子伴娘"作用,可使其与病毒蛋白和错叠的细胞蛋白结合并将其转运至溶酶体将其降解[3],保护细胞免受或减少因病毒感染而致的损伤,已有一些体外实验的结果支持这种观点[5]。

## 3　病毒感染细胞中HSP70表达的意义

本研究中细胞实验的结果表明,病毒感染细胞后数小时内细胞即出现明显HSP70表达增高,并发现HSP70由正常时的胞浆内移至胞核及核仁内。至于汉坦病毒感染所致HSP70的过度表达仅是宿主细胞的应激反应,抑或HSP70同时能主动参与病毒复制的控制,进一步的研究正在进行之中。

## 参　考　文　献


1　Feige U, Polla B S. Heat shock proteins: the HSP70 family. Experientia, 1994, 50: 979 – 986

2　Linda D Santomenna, Anmaris M Colberg-Poley. Induction of cellular HSP70 expression by Human Cytomegalovirus. J Virol, 1990, 64: 2033 – 2040

3　Terieky S R. HSP70s and lysosomal proteolysis. Experientia, 1994, 50: 1021 – 1025

4　Oglesbee M, Krakowka S. Cellular stress response induces selective intranuclear trafficking an accumulation of morbillivirus major core protein. Lab Invest, 1993, 68: 109 – 117

5　Terlecky S R, Chiang H L, Olson T S *et al*. Protein and peptide binding and stimulation of *in vitro* lysosomal proteolysis by the 70-kDa heat shock cognant protein. J Biol Chem, 1992, 267: 9202 – 9209

6　Simon, M C, Kitchener K, Kao H T *et al*. Selective induction of human heat shock gene transcription by the adenovirus E1A gene products, including the 12S E1A product. Mol Cell Biol, 1987, 7: 2884 – 2890

7　Gething M L, McCannon K, Sambrook J. Expression of wild type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. Cell, 1986, 46: 939 – 950

维普资讯 http://www.cqvip.com



# Localization and Distribution of HSP70 mRNA and Hantaan Virus in Autopsy Tissues of the Patients with EHF and in Virus-infected Cells

Ye Ling Yang Shoujing Liu Yanfang Yan Peisong

(*The Fourth Military Medical University, Xi'an* 710032)

**Abstract** With *in situ* hybridization technique the localization and distribution of HSP70 mRNA and Hantaan virus RNA in the tissues of 30 cadavers with epidemic hemorrhagic fever (EHF), which were collected from different EHF epidemic foci in China, were examined. HSP70 mRNA was detected in most of the 30 cases and consistent with the localization and distribution of viral RNA. The distribution of HSP70 mRNA was partly related with the pathogenesis of HFRS. The over expression of HSP70 was also found in the virus-infected Vero $E_6$ cells. It suggested that HSP was associated with the infection of Hantaan virus.

**Key words** Heat shock proteins, *in situ* hybridization, Hantaan virus, Epidemic hemorrhagic fever