

## 汉坦病毒感染诱导乳鼠脑神经细胞表达热休克蛋白70\*

赵君, 杨守京\*\*, 刘彦仿

(第四军医大学病理学教研室, 陕西西安 710032)

HSP72-like Immunoreactivities in the Brains of  
Mice Experimentally Infected with Hantavirus

ZHAO Jun, YANG Shou-jing\*\*, LIU Yan-fang

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

**Abstract:** Sucking mice, 2-3 day after birth, were intraperitoneally inoculated with 0.05mL F<sub>1</sub>M<sub>10</sub> of Chen Strain Hantaan virus. At different time point after inoculation, the brains were taken, routinely fixed and embedded in paraffin for preparing 5 μm serial sections. Traditional and confocal immunohistochemical detection of viral antigens and heat shock protein 70 were performed to explore the cerebral stress response after viral infection. The results showed that HSP70 immunoreactivities could be stably detected in the viral antigen positive neurons, but not in the viral antigen negative or uninfected control tissues. By confocal microscopic examination, the HSP70 and viral antigens were colocalized in the neuronal cytoplasm. Our result, comparable to our previous findings in human tissues and culture cells, indicated that Hantavirus infection can induce the expression of HSP70 in the infected cells, and HSP70 expression might be necessary but not sufficient to keep the cell survival.

**Key words:** Heat shock protein; Hantavirus; Immunohistochemistry; Epidemic hemorrhagic fever

**摘要:** 生后2-3天的昆明乳鼠, 每只腹腔接种0.05 mL 100个半数致死量的陈株汉坦病毒, 于接种后不同时间点处死动物, 取其脑组织常规固定, 石蜡包埋制备5 μm连续组织切片, 用免疫组化法检测组织中的病毒抗原及热休克蛋白70的表达, 用共聚焦显微镜观察二者之间的关系。结果发现, 感染了病毒的组织能够稳定地检测到热休克蛋白70的表达, 而病毒阴性的组织则检测不到热休克蛋白70的表达, 且二者有共定位关系, 其分布与组织病变一致。这与在病毒感染的VeroE6细胞及EHF病人尸检组织中得到的结果一致, 说明病毒感染可诱导热休克蛋白70的表达, 后者可能具有保护组织避免或减轻损伤的作用。

**关键词:** 热休克蛋白; 汉坦病毒; 免疫组化; 流行性出血热

**中图分类号:** R392.11; R373.3\*2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0011-05

热休克反应(Heat shock response)是细胞在受到外界各种应急因素损伤时而做出的一种自身保护性反应, 该过程以暂时性下调许多细胞本身产物和有选择性的上调表达热休克蛋白(heat shock protein, hsp)为特点<sup>[1-2]</sup>。HSP是在种属进化过程中演变形成的一组高度保守的蛋白质, 分为HSP60、

HSP70、HSP90、HSP110和低分子量HSP等几个家族<sup>[3-5]</sup>。HSP70家族是目前研究比较深入的一个。HSP的诱导表达具有保护细胞免受各种微环境有害因素损伤、减小组织梗死面积、减轻脏器损伤和降低致死性应激状态下动物死亡率的作用<sup>[3-5]</sup>。

目前发现有很多病毒可以诱导细胞热休克反

收稿日期: 1999-11-2, 修回日期: 2000-06-10

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770664)

作者简介: 赵君(1971-), 女, 陕西咸阳籍, 助教, 硕士生, 主要从事流行性出血热的分子免疫病理研究。

\*\* 通讯作者. For correspondence

应、不同的病毒诱导不同的 HSPs 表达<sup>[7]</sup>,甚至同一种病毒在不同类型的细胞内诱导 HSPs 的类型及反应强度也有不同。汉坦病毒(Hantaviruses, HTV)是引起人类汉坦病毒性出血热的一类 RNA 病毒,其感染能否诱导细胞发生热休克反应并表达 HSP,这方面尚未见其它报道。我们在以前的研究中观察到:流行性出血热(EHF)人体多种组织中有 HSP70 蛋白的表达,并与病毒抗原有共存和互相抑制的关系;体外细胞培养证实病毒感染可直接诱导 HSP70 的表达。因此我们提出流行性出血热可诱导热休克反应,其中病毒感染是参与诱导热休克反应的重要因素之一<sup>[8,9]</sup>。本实验以汉坦病毒感染乳鼠为实验模型,目的在于探明热休克反应是否作为普遍规律,也出现于动物感染汉坦病毒的过程中。

## 1 材料与方法

### 1.1 乳鼠实验性汉坦病毒感染

生后 48~72 h 的昆明种乳鼠经腹腔接种 100 个半数致死量(LD<sub>50</sub>)的陈株汉坦病毒(0.05 ml),接种病毒后 1 d、2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d、14 d 时间点处死动物,每个时间点处死 2~3 只,取其脑组织,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,作 5 μm 的连续组织切片。以注射同等体积生理盐水的乳鼠作为对照。

### 1.2 病毒抗原和 HSP70 的免疫组化检测

组织切片常规脱蜡至水,室温置于 80% 甲醇双氧水中 40 min 以灭活内源性过氧化物酶的活性,与 4% 正常羊血清 37℃ 共孵育 1 h 以降低非特异性背景染色。分别将 1:1 000 稀释的抗病毒核蛋白单克隆抗体(McAb) 1A8(本校微生物教研室研制)和 1:50 稀释的抗 HSP70 McAb(Santa Cruce 公司)滴加于连续切片上,4℃ 孵育 48 h。以羊抗鼠 IgG(1:300)为桥抗的多重 PAP 法(1:1 000,武汉生物制品研究所研制)显色,显色底物为 0.01% DAB 和 0.001% 双氧水。以 PBS 和无关单抗作为阴性对照。

### 1.3 免疫荧光双标记激光共聚焦显微镜观察

组织切片常规脱蜡至水, PBS 洗 15 min, 2% 正常羊血清封闭非特异性结合位点,用兔抗 HTV 多抗(1:100,唐都二院传染科研制)和鼠抗人 HSP70 单克隆抗体(HSP70 mAb, 1:50 稀释, Santa Cruz)37℃ 孵育 1 hr, PBS 振洗,用 FITC 标记的山羊抗兔抗体(1:100 稀释,华美公司)和生物素化羊抗鼠 IgG 抗体(1:10,博士德公司)37℃ 孵育 1 hr, PBS 振洗,

加 Avidin-Texas-Red(1:1 000, Sigma)37℃ 孵育 1 hr, PBS 洗 5' × 3,用无荧光缓冲甘油封片, MRC-1024 激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scan Confocal Microscope LSCM, Bio-Rad 公司)观察。FITC 和 TR 的激发波长分别为 488 nm 和 568 nm。

## 2 结果

### 2.1 组织病变

脑组织病变最早出现于病毒感染后的第 2 天,表现为皮层下广泛神经细胞嗜酸性变、胞浆与胞核固缩红染、体积缩小。第 4 天开始出现皮层下散在的嗜酸性坏死,海马回部位开始出现灶状坏死。第 6 天开始见到典型的凋亡小体,病变以后渐重。动物在感染病毒 7-8 d 后开始出现耸毛、痉挛、抽搐、双后肢麻痹等症状,并开始陆续死亡。这时组织病变最重,表现为广泛分布的局灶状嗜酸性坏死,其中可见黑点状凋亡小体,皮质神经细胞数目显著减少,皮层变薄。之后如果动物免于死亡,其病变渐轻,10 d 后尚可见广泛的灶状坏死;接种病毒 12 d、14 d 的乳鼠脑组织中仅见皮层下嗜酸性变,海马回部位则几乎观察不到病变。

### 2.2 病毒抗原定位分布

病毒感染 1 d 的乳鼠脑组织中病毒 NP 抗原检测为阴性(0/6);感染后 2 d 的乳鼠脑组织开始出现病毒 NP 抗原染色阳性,但强度较弱,定位于神经细胞的胞浆内,呈包涵体样粗颗粒状着色;感染 8 d 的乳鼠脑组织病毒抗原检测呈强阳性,广泛分布于皮层下、海马回、小脑蒲肯野细胞层等部位。感染 10 d(彩版图 1)、12 d、14 d 的脑组织中病毒抗原阳性细胞逐渐减少,呈灶性分布。未感染乳鼠脑组织中未检测到病毒抗原。用无关抗体对照染色阴性。

### 2.3 HSP70 的表达和分布

接种病毒 1 d 的乳鼠脑组织中未检测到 HSP70;接种 2 d 的乳鼠脑组织中开始出现 HSP70 阳性染色,但强度较弱,定位于神经细胞胞浆内;感染 8 d 的乳鼠脑组织中 HSP70 染色最强,广泛分布于皮层下、海马回、小脑蒲肯野氏细胞层;感染 10 d(彩版图 2)、12 d、14 d 乳鼠脑组织中 HSP70 阳性细胞逐渐变少,但始终与病毒抗原阳性部位保持一致。在围绕坏死区周围的组织细胞中 HSP70 表达量很高,其分布与细胞损伤一致,强度与损伤程度有关。

### 2.4 病毒抗原、热休克蛋白免疫荧光双标共定位

用间接免疫荧光双标记法激光扫描共聚焦显微

镜观察感染 8 d 的鼠脑组织,在细胞胞浆内可见由 FITC 标记的病毒抗原发出黄绿色荧光(彩版图 3),由 Texas-Red 标记的 HSP70 发出红色荧光(彩版图 4),均呈颗粒状,病毒抗原和 HSP70 在胞浆内部分重叠,呈黄色颗粒荧光(彩版图 5),表明汉坦病毒 NP 与 HSP70 有共定位关系。对照组细胞的病毒抗原和 HSP70 染色均为阴性。

### 3 讨论

#### 3.1 汉坦病毒感染可诱导乳鼠神经细胞表达 HSP70

本研究通过实验感染乳鼠建立汉坦病毒动物感染模型,检测组织中病毒抗原及热休克蛋白 70 的表达,研究它们之间的关系。结果发现,感染了病毒的组织总是能够检测到 HSP70 的表达,而没有检测到病毒的组织同样也没有检测到 HSP70 的表达,且其定位分布与组织病变一致。通过共聚焦显微镜检测证实二者存在共定位关系。这与在病毒感染的 VeroE6 细胞及 EHF 病人尸检组织中得到的结果一致,说明病毒感染诱导热休克蛋白 70 的表达。

HSPs 是一族高度保守的蛋白,且参与一些重要的细胞功能,如蛋白质的折叠、聚集及转运。因此称之为“分子伴侣”<sup>[10]</sup>。HSPs 诱导代表的是对细胞内存在变性蛋白的一种反应,是一个非常敏感可靠的细胞损伤的标志物<sup>[11]</sup>。检测组织细胞中 HSP70 的表达,可反映组织细胞的应急状态和损伤,在神经系统,可作为神经细胞损伤的证据。HSP70 免疫组化检测发现,乳鼠脑神经细胞中有 HSP70 的表达,主要定位于胞浆中,也出现于少数神经细胞等胞核中,表明神经细胞有损伤和抗损伤反应。HSP70 发挥细胞内保护作用据推测可能是通过 HSP70 识别变性蛋白并限制其聚合,利用 ATP 水解产生的能量修复它们<sup>[12]</sup>,不能修复者则在 ATP 依赖的方式下刺激溶酶体摄取和降解蛋白底物<sup>[13,14]</sup>。有许多实验证实,如细胞内高表达的 HSP70 可增加细胞对 TNF- $\alpha$  毒性的抵抗力、缺血诱导的 HSP70 有减少心肌梗死面积并有利于心功快速恢复的作用等。因此感染乳鼠神经细胞中表达 HSP70 可能具有保护组织避免或减轻损伤的作用。

#### 3.2 HSP70 在汉坦病毒感染过程中的作用

我们在实验中发现,汉坦病毒感染可以引起 HSP70 的高表达,且病毒与 HSP70 在细胞内有共存关系。已证实有许多病毒能够诱导 HSPs 的表达,

且这一现象并无固定模式。病毒诱导特定的 HSPs 表达取决于感染病毒双及被感染细胞的类型。病毒感染诱导热休克蛋白生成的意义还不甚明确。目前主要有两种说法,一种推测是 HSPs 起到分子伴侣作用,促进病毒的复制<sup>[15]</sup>,另一种则认为某些病毒蛋白的半衰期由于与 HSPs 的结合而延长了,HSP70 通过阻止病毒前体加工成为成熟的病毒颗粒而抑制病毒的复制,因此对机体是有利的<sup>[16]</sup>。另外,病毒感染引起的热休克蛋白表达可能还有免疫学上的意义。

本实验以汉坦病毒感染乳鼠为实验模型,证明了热休克反应作为普遍规律也出现于动物感染的过程中,为进一步研究 HSP70 在汉坦病毒感染过程中的作用及其诱导产生的机制打下了基础。

#### 参考文献

- [1] Linquist S. The heat shock response[J]. *Annu Rev Biochem*, 1986, 55:1151-1191.
- [2] Linquist S, Craig EA. The heat shock proteins[J]. *Annu Rev Genetics*, 1988, 22:631-377.
- [3] Macario AJ. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. *Int J Clin Lab Res*, 1995, 25(2):69-70.
- [4] Jindal S. Heat shock proteins: applications in health and disease[J]. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(1):17-20.
- [5] Henderson B. Molecular Chaperones and disease[J]. *Inflamm Res*, 1996, 45(4):155-158.
- [6] Welch WJ. Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides[J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(6):1229-1237.
- [7] Sedger L. Heat shock response to vaccinia virus infection[J]. *J Virol*, 1994, 68(7):4685-4689.
- [8] 叶苓,杨守京,刘彦仿.流行性出血热病例组织中热休克蛋白表达的原位杂交和免疫组化研究[J]. *中国病毒学*, 1998, 13(4):327-331.
- [9] 叶苓,刘彦仿,杨守京.流行性出血热患者心肌组织中热休克蛋白表达的意义[J]. *第四军医大学学报*, 1998, 19(5):488
- [10] Gething M, J. Sambrook. Protein folding in the cell[J]. *Nature (London)*, 1992, 355:33-45.
- [11] Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock gene[J]. *Science (Washington)*, 1986, 232:522-524.
- [12] Paleros DR, Welch WJ, Fink AL. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on kinetics of binding[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(130):5719-5723.
- [13] Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, et al. A role for a 70-KD heat shock protein in lysosomal degeneration of intracellular pro-

- teins[J]. *Science*, 1989, 246: 383 - 385.
- [14] Gerleky SR, Chiang HL, Olson TS, *et al*. Protein and peptide binding and stimulation of *in vitro* lysosomal proteolysis by the 73-KD heat shock cognate protein[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267 (13): 9202 - 9209.
- [15] Ellis RJ, van der Vies SM. Molecular chaperons[J]. *Annu Rev. Biochem*, 1991, 60: 321 - 347.
- [16] Macejak DG, Sarnow P. Association of heat shock protein 70 with enterovirus capsid precursor P1 in infected human cells[J]. *J Virol*, 1992, 66: 1520 - 1527.

\*\*\*\*\*

## 《中国病毒学》稿约

(2001年1月修订)

《中国病毒学》是由中国科学院主管,中国科学院武汉病毒研究所承办,科学出版社出版,国内外公开发行的\*\*高级学术\*\*期刊。为中国科学引文数据库和中国科技信息所《中国科技论文统计与分析》的统计源期刊,被著名文摘(CA(化学文摘))《BA(生物学文摘)》和国内主要生物学医学文摘收录,是中国生物学和医学核心期刊。主要刊载病毒学及各分支学科具有较高学术水平的原始研究论文,以及病毒学研究的新技术、新方法,酌登综述和研究简报。

### 1 来稿要求和注意事项

- 1.1 来稿时请附作者单位介绍信。稿件必须一式两份,其中一份应是原件。
- 1.2 本刊已加入《中国学术\*\*期刊(光盘版)》和“中国期刊网”、“中国科技信息网”。作者如不同意将文章编入光盘版和网上数据库,请在投稿时声明,否则视为同意。
- 1.3 经评审需要补充、修改的稿件,本刊将修改意见和原稿一并寄作者修改。作者应在2个月内将修改后的稿件寄回,逾期寄回的作新收稿处理。本刊将按稿件的收稿日期排队逐期发表。
- 1.4 来稿务必论点明确,论据充分,数据可靠,行文精练,层次分明。每篇综述、论文应控制在4个印刷页码(约6000字以内),研究简报控制在2个印刷页码(约3000字)。
- 1.5 文稿经审查通过后,本部将通知作者将最后修改稿定稿后录入软盘(文件存储格式为文本文件(.txt),插图请用word文件另存),随同一份内容与之一致的打印稿寄给本部。

### 2 文章编写格式

#### 2.1 研究论文文稿撰写顺序

- 2.1.1 题名:中文题名一般不超过20个字,凡获基金资助课题应在题名右上角标注“\*”。
- 2.1.2 作者:多作者之间用“,”隔开,不同工作单位的作者应在作者右上角标注数字以示区别,通讯作者右上角标注“\*\*”。
- 2.1.3 工作单位:全部作者的工作单位全称用“( )”标注,不同单位应在单位前以标注作者的相应数字表示。
- 2.1.4 英文相应内容:

英文题名(应与中文题名一致)。作者汉语拼音(姓氏字母全部大写置前,双名的前名首字母大写、后名全部小写,两名中间加“-”符隔开,姓名均不缩写),国外作者遵从所在国习俗。通讯作者用“\*\*”标注并在地脚处注明。单位英译全称(单位全称,省市名 邮编, China)。“Abstract”(英文摘要:不超过150个英语单词)、“Key words”(关键词:与中文关键词相同)。如文稿系用英文撰写,需在英文关键词下相应加注“CLC number:”, “Document code:”, “Article ID:”。

- 2.1.5 中文摘要(不超过250字)、关键词(3~8个)。
- 2.1.6 关键词下行标注“中图分类号:”、“文献标识码:”、“文章编号:”(内容由本刊填写)。
- 2.1.7 正文

(下转第21页)