DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.015

肾综合征出血热病毒 R_{22}株感染人血管内皮细胞的核酸原位杂交研究

孟冀昌 古春雷 姚 磊 朱德钟 盛 鹏 (第三军医大学基础部微生物学教研室)重庆,630038

提 要 用地高辛配基(Dig-)标记我国肾综合征出血热(HFRS)病毒 R_{22}株 M片段 cDNA R_3克隆探针,对 HFRS病毒 R_{22}株感染的人血管内皮细胞(HECs)作核酸原位杂交。杂交结果显示在受染的血管内皮细胞胞浆内有明显的杂交信号,而正常细胞和 HFRS病毒感染细胞经 RNA酶处理组不出现杂交信号。结果表明 HFRS病毒 RNA主要定位于血管内皮细胞的细胞浆中,提示病毒 RNA在胞浆中复制。

关键词 核酸原位杂交;出血热病毒;内皮细胞;地高辛探针
中图法分类号 Q52; R373.32

近年来,用原位杂交技术检测肾综合征出血热(Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)病毒的报道较多,但其关于病毒 RNA在细胞中的定位结果多不相同。研究表明,人血管内皮细胞(Human endothelial cells, HECs)是 HFRS病毒感染的原始靶细胞[1],为明确 HFRS病毒 RNA在 HECs中的定位,本实验用地高辛配基(Dig-)标记我国 HFRS病毒 R_{22}株 M片段 cDNA R_3克隆280 bp探针,对 HFRS病毒 R_{22}株感染体外培养的人脐静脉血管内皮细胞进行核酸原位杂交,现将初步结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒

HFRS病毒 R_{22}株,由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。

1.2 人脐静脉血管内皮细胞的分离、培养与鉴定

按 Jaffe等[2]方法略加改进。实验所用细胞均为原代培养的人脐静脉血管内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),其鉴定依据为倒置显微镜观察细胞形态、排列以及直接免疫酶法检测凝血Ⅷ因子相关抗原(ⅧR Ag)。

1.3 病毒接种

HFRS病毒 R_{22}株接种于已长至单层的 HUVEC,37℃吸附2 h,补足含10%小牛血清的 RPMI-1640维持液,以后每2 d~3 d换液1次。同时设置正常 HUVEC对照组,只加 RPMI-1640维持液。定期取培养板孔中贴附有内皮细胞的盖玻片作核酸原位杂交和间接免疫荧光法(IFA)检测病毒抗原。

1.4 HFRS病毒 R_{22}株 M片段 cDNA 280 bp探针的制备

HFRS病毒 R_{22}株 M片段 cDNA R_3克隆由中国预防医学科学院病毒学研究所杭长寿教授提供。按文献[3]碱裂解法大量提取质粒 DNA,EcoRI酶切,电泳透析带法回收酶切280 bp片段,适量 TE液溶解,待标记。

1.5 地高辛标记 cDNA探针

随机引物法(Random hexanuoleotide priming, RHP)将 Dig-dUTP标记到 HFRS病毒 cDNA 280 bp探针,按宝灵曼(Boehringer Mannheim, B.M)公司提供的说明书进行。主要步骤如下:取10 μl样品 cDNA(约1 μg),95℃水浴变性10 min,迅速置于冰上3 min,然后依次加入2 μl六聚体核苷酸混合物、2 μl dNTP标记混合物、5 μl重蒸水和1 μl Klenow酶,37℃水浴24 h,68℃水浴10 min终止反应,-20℃保存待用。地高辛配基标记和检测试剂盒由 B.M公司提供。

1.6 HFRS病毒 R_{22}株感染 HUVEC的原位杂交

参照文献[4]进行,主要步骤如下。

1.6.1 细胞固定和杂交前处理 取病毒感染后的细胞片,PBS漂洗,4%多聚甲醛室温固定10 min,PBS充分漂洗。蛋白酶 K(1 μg/ml)37℃消化处理15 min,0.2%甘氨酸漂洗15 min,终止蛋白酶反应。4%多聚甲醛室温下固定10 min,PBS充分漂洗,乙醇脱水干燥。

1.6.2 预杂交,42℃,3 h 预杂交液:50%甲酰胺,5× SSC,5× Denhardt's,0.5% SDS,100 mg/L(μg/ml)变性鲑精 DNA

1.6.3 杂交,42℃,24 h 杂交液:50%甲酰胺,5× SSC,5× Denhardt's,0.5% SDS,100 mg/L(μg/ml)变性鲑精 DNA,10%硫酸葡聚糖,4 ng/μl变性探针。

1.6.4 杂交后漂洗、抗体孵育及显色,按 B.M公司提供的说明书进行,酶标抗地高辛抗体(1∶1000)37℃,2 h;显色液为 X-磷酸盐-NBT,暗处,显色12 h。

1.6.5 1%甲基绿复染,水洗净,乙醇脱水,二甲苯透明,封片,镜检。

设置以下对照:(a)正常 HUVEC;(b) HFRS病毒 R_{22}株感染 HUVEC,经 RNA酶处理;(c) IFA检测病毒抗原;(d)点杂交(Dot blot)检测标记探针的特异性。核酸样品为:R_3克隆质粒 DNA、HFRS病毒 R_{22}株感染 HUVEC和 Vero-E_6细胞提取的病毒 RNA;PUC_{18}质粒 DNA、正常 HUVEC和 Vero-E_6细胞提取的总 RNA、病毒 RNA和细胞 RNA的提取参考文献[3]。点杂交方法按 B.M公司提供的说明书进行。具体所用试剂用原位杂交所用试剂。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

ISH检测在病毒感染细胞早期(第 3天),在细胞胞浆中即可见阳性杂交信号,但信号弱,阳性细胞数也少。感染后第 11天,约 70%～ 80%的细胞呈阳性反应,在细胞胞浆中可见明显的阳性杂交反应信号,呈紫蓝色颗粒状;细胞核绿染,未见有阳性反应信号,见图 1a 1b。

对照实验结果如下: (1)正常细胞组和感染细胞经 RNA酶处理组细胞胞浆内未见阳性杂交反应信号,仅可见被甲基绿复染的细胞核,细胞界限不清,见图 1c 1d; (2) IFA检测病毒抗原,感染后 5 d可检出,荧光强度为+ ,感染后 11 d检测荧光强度为++～ +++,为分布于细胞胞浆的颗粒状或片状荧光,见图 2; (3)点杂交结果显示标记探针可与 R_3克隆质粒 DNA HFRS病毒 R_{22}株感染 HECs和 Vero-E_6细胞提取的病毒 RNA发生阳性杂交反应,而不与 PUC$_{18}$质粒 DNA正常 HECs和 Vero-E_6细胞提取的 RNA发生杂交反应,见图 3。

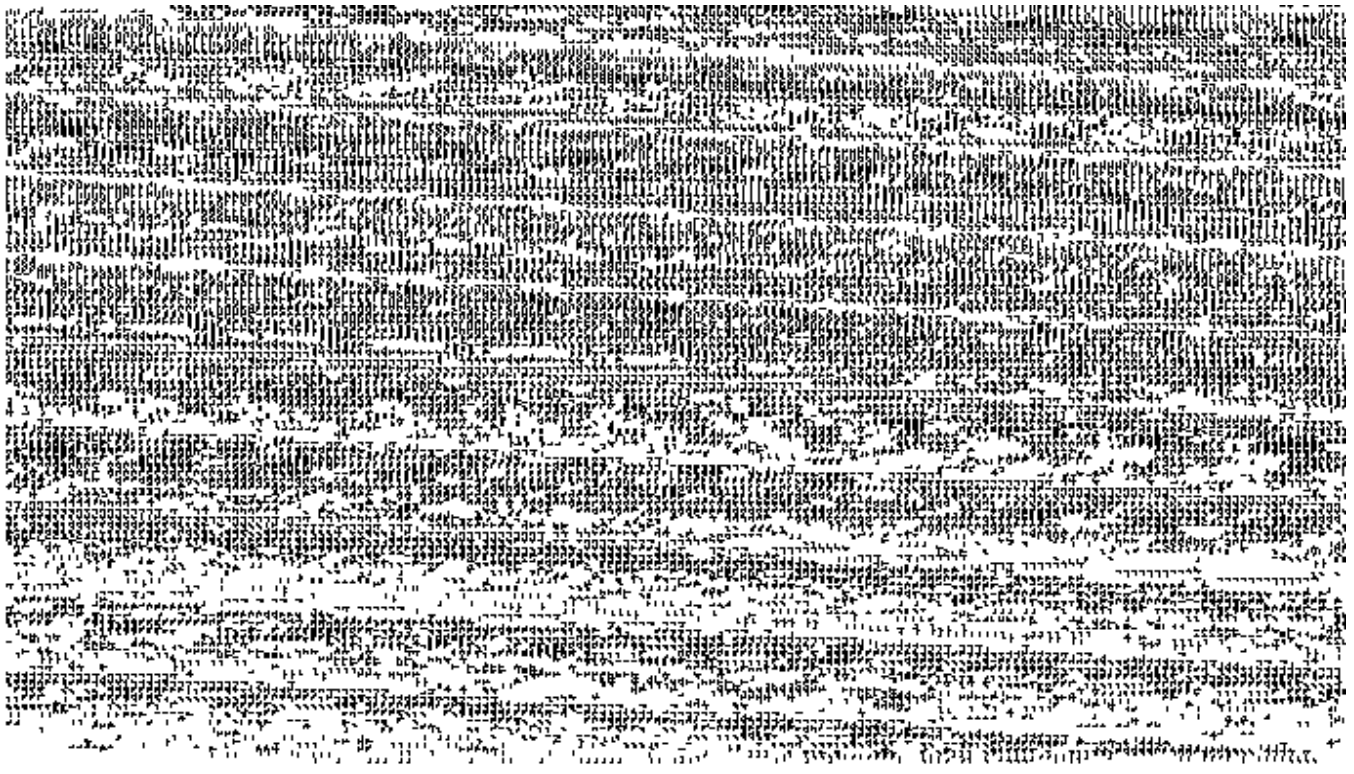


图 1 核酸原位杂交

a b HFRS病毒感染的 HUVEC, 11 d 多数细胞胞浆内可见明显的杂交阳性反应信号 (甲基绿复染× 250)

c 正常 HUVEC,第 5天; d HFRS病毒感染的 HUVEC, 11 d RNA酶消化处理 仅可见甲基绿复染的细胞核,胞浆内均未见明显的杂交信号 (甲基绿复染× 250)

Fig 1 Nucleic acid *in situ* hybridization

a, b Obvious positive hybridization signal was seen in most cytoplasma. HFRS infected HUVEC, 11 d (methyl green counter staining× 250)

c Normal HUVEC, 5d; d HFRS infected HUVEC digested by RNA enzyme, 11d. No obvious positive hybridization signal was seen in cytoplasma, only the methyl green counter stained nucleus was seen (methyl green counter staining× 250)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

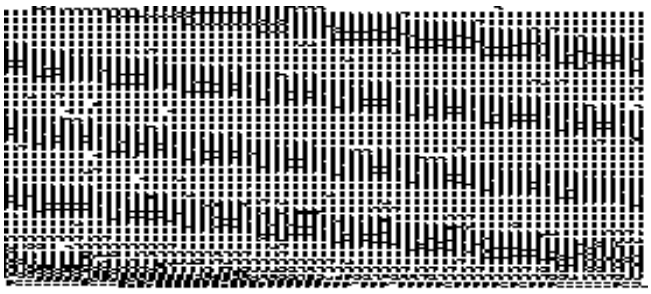


图 2　间接免疫荧光法检测病毒抗原

HFRS病毒感染的 HUVEC,11 d 细胞胞浆内可见呈颗粒状或片状荧光,荧光强度++~+++　(× 250)

Fig 2　Detection of virus antigen with indirect immunofluorescence

HFRS infected HUVEC, 11d. Patchy or granular fluorescence with the intensity of++~+++ was seen in cytoplasma　(× 250)



图 3　点杂交 (左→右)

上排: HFRS病毒感染 HUVEC提取的病毒 RNA, HFRS病毒感染 Vero-E_6细胞提取的病毒 RNA　R_3质粒 DNA

下排: 正常 HUVEC提取的总 RNA,正常 Vero-E_6细胞提取的总 RNA, PUC_{18}质粒 DNA

Fig 3　Dot hybridization (left→right)

Upper row: Virus RNA extracted from HFRS infected HUVEC, virus RNA extracted from HFRS infected Vero-E_6 cells, R_3 plasmid DNA

Lower row: Total RNA extracted from normal HUVEC, total RNA extracted from normal Vero-E_6 cells, PUC_{13} plasmid DNA

3　讨论

近年来,随着分子生物学技术的发展,核酸分子杂交技术已广泛地应用于病毒性疾病的研究中。原位杂交方法(*In situ* hybridization, ISH)作为核酸分子杂交中的一种,主要用来检测组织细胞中的病毒 DNA分子或 RNA分子,可显示出病毒核酸在感染细胞中的定位,说明病毒增殖的原始部位,对阐明 HFRS的发病机理和传播途径具有重要的理论意义和广泛的应用价值。有学者应用原位杂交方法检测 HFRS尸检病例组织中病毒 RNA的定位和分布,结果表明 HFRS病毒具有泛嗜性感染的特点,对上皮细胞或血管内皮细胞易感,在病毒 RNA分子水平证实了血管内皮细胞是病毒感染的原始靶细胞[5]。关于 HFRS病毒 RNA在感染细胞中的定位,许多研究结果表明病毒 RNA主要定位于细胞胞浆中[5,6],但也有报道病毒 RNA分布在细胞核[7]或胞浆及胞核均有分布[8]。本实验用核酸原位杂交方法,对 HFRS病毒 R_{22}株感染人血管内皮细胞中病毒 RNA的定位进行了初步的研究,结果显示在 HUVEC的细胞浆内可见有明显的阳性杂交反应信号,表明 HFRS病毒 RNA主要分布于血管内皮细胞胞浆中,从而为确定 HFRS病毒 RNA在血管内皮细胞中的超微结构定位提供了参考,为 HFRS病毒致病机制的研究提供更为准确的形态学依据。结合病毒抗原主要定位于细胞胞浆中,提示 HFRS病毒可在血管内皮细胞胞浆内大量复制。实验中设置了严格的对照,说明结果是特异的,可靠的。

HFRS病毒核酸探针的应用研究现有 Schmaljohn等采用的 Hantaan病毒 S M全片段 cDNA标记探针[9,10],它们既带有保守的序列,也带有非保守的序列,限制了探针的敏感性与特异性,此外探针过长本身也能减弱其杂交的敏感性,最理想的探针长度应为 50~200 bp。本实验以我国杭长寿教授等所采用的我国 HFRS病毒 R_{22}株 M片段 cDNA R_3克隆为探针,该探针包含 HFRS病毒 3′末端的保守序列,核酸长度为 280 bp[11],这比 Schmaljohn等应用的 S M全片段核酸探针具有更高的特异性和敏感性。

本实验采用的非放射性洋地黄毒苷配基(地高辛配基, Dig-) DNA标记和检测系统是一敏感的标记和检测方法,它克服了放射性同位素标记技术相对不安全、昂贵、放射不稳定等缺陷,以及生物素——亲合素标记检测系统普遍存在的内源性生物素干扰等不足之处,使得核酸检测本底更低、特异性更高、定位更准确。

参考文献

1 朱　平,杨为松,刘　健等.肾综合征出血热病毒感染人血管内皮细胞的观察.中华医学杂志,1989, 89(10): 588

2 Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G *et al*. Culture of human endothelial cells derived from umbilical vein. Identification by morphologic and immunologic critera. J Clin Invest, 1973, 52: 2745

3 J.萨姆布鲁克, E. F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯.分子克隆实验

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

指南.第2版.北京:科学出版社,1992:92~101
4 陈 ,陆应麟,张朝山等.培养细胞盖玻片原位杂交方法.军事医学科学院院刊,1994;18(1):70
5 杨守京,刘彦仿,胡锡祺等.肾综合征出血热病毒感染人体上皮细胞和血管内皮细胞的原位杂交.中华传染病杂志,1995;13(4):199
6 杨守京,刘彦仿,胡锡祺等.肾综合征出血热肾组织中病毒感染及病毒抗原的来源和意义.第四军医大学学报,1995;16(6):401
7 唐志佼,邢寿富,张 波.免疫组织化学和原位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;22(3):140
8 赵洪礼,汪美先,姜绍谆等.用原位杂交检测肾综合征出血热病毒 RNA.第四军医大学学报,1990;11(30):233
9 Schmaljohn C S, Jennings G B, Hay J *et al*. Coding strategy of the S genome segment of hantaan virus. Virology, 1986;155:633
10 Schmaljohn C S, Schmaljohn A S, Dalrymple J M. Hantaan virus mRNA: Coding strategy, nucleotide sequence and gene order. Virology, 1987;157:31
11 杭长寿, Sanchez A,陈思毅等.流行性出血热病毒 R_{22}株 cDNA克隆及其特异性鉴定.病毒学报,1988;4(3):208

(收稿:1996-06-22;修回:1996-09-04)
(编辑 刘 鹏)

In situ hybridization of nudeic acid in human vascular endothelial cells infected by hemmorrhagic fever with renal syndrome virus

Meng Jichang, Gu Chunlei, Yao Lei, Zhu Dezhong, Sheng Peng (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract RNA genome of R_{22} strain of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus was detected in human vascular endothelial cells (HVECs) with *in situ* hybridization using Dig-labelled R_3 cDNA probe. The positive hybridization signal was seen in the cytoplasma of the infected HVECs but not in the control cells including the normal HVECs and the infected HVECs pretreated with Rnase. This indicates that RNA of HFRS virus is mainly located and replicates in cytoplasma of HVECs.

Key words hemorrhagic fever viruses; human vascular endothelial cells; Digoxigenin-labelled probe; *in situ* hybridization

(上接 494页)

讨论

本例从个人生活史分析,近8年曾与6个~7个女性有性接触,患者自述所接触女性均不吸毒,从静脉吸毒后,未再有性行为,在静脉吸毒中,经常与其他吸毒者共用一支注射器,我们认为患者此期间感染上 HIV 可能性较大。中国的 HIV 感染者大多数来自中缅、中老边界的西南省份,主要发于静脉药瘾者,并造成了 HIV 流行。艾滋病从感染者到发病,潜伏期一般为5个月到数年不等,大多平均4年左右,该患者从静脉吸毒到确诊约两年,其潜伏期不超过两年。艾滋病的皮肤表现已越来越多受到有关专家的注意。WHO发布最新艾滋病诊断标准修改方案中提到广泛的瘙痒性皮肤病作为一个次要诊断标准之一。Stern[1]研究了684例感染者中有540例(占70%)有一种或多种皮肤病的诊断记录。如脂溢性皮炎、单纯疱疹、传染性软疣和脓疱病。本例四肢躯干有广泛的粟粒大小丘疹、丘疱疹和结痂伴色素沉着,双手尤为明显,我们诊断为湿疹样皮炎,该种皮肤损害是否为艾滋病皮损的一种较特异表现,有待更多临床资料积累。另外,本例下肢有脓疱疮和臁疮,可能与搔抓继发感染有关。脓液培养出细菌和白色念珠菌,这一现象值得引起注意。患者入院次日查 HIV 抗体筛选试验阳性后,由于初次认识艾滋病,患者是感染者还是病人有些模糊,经详细询问病史、查体、实验检查和查阅文献,我们认为本例诊断艾滋病患者依据非常充分,其依据如下:① HIV 抗体阳性(初筛和确证实验);② 口腔念珠菌感染;③ 长期腹泻(2月,每日3次~4次);④ 间歇性发热;⑤ 体重减轻>10%;⑥ 广泛的瘙痒性皮肤病和脓皮病;⑦ T_4/T_8 等于0.67体会:① 目前国内艾滋病病人较少,其表现又多样性,早期常易漏诊,不少病例是在晚期或死亡以后,检测血清才发现,所以,对国内医务工作者来说应加强有关知识学习,对高危人群应引起警惕。本例我们根据其吸毒与夜游史,入院后就给查 HIV 抗体,从入院到确诊仅用5 d时间并进行了预防性隔离,从而最大可能地避免了医院感染。② 患者入院后因考虑湿疹样皮炎诊断,我们给肌注地塞米松10 mg,2 d后改为强的松20 mg/d,第5天出现右外踝脓肿,是否与用激素有关,有待更多资料积累证实。但是,对这类病人应尽量避免用抑制免疫功能的药物。

关键词 获得性免疫缺陷综合征
中图法分类号 R512.91

参考文献

1 Stern R S. Epidemiology of skin disease in HIV infection: a cohort study of health maintenance organization members. J Invest Dermatol, 1994;102:34

(收稿:1996-03-11;修回:1996-09-26)
(编辑 王 红、沈锡庚)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net