DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.01.002

用光镜PAP法染色对小鼠实验性乙型脑炎脑中病毒抗原分布的研究

盛 鹏

（病理解剖教研室研究生）

指导者 晏良遂

提 要

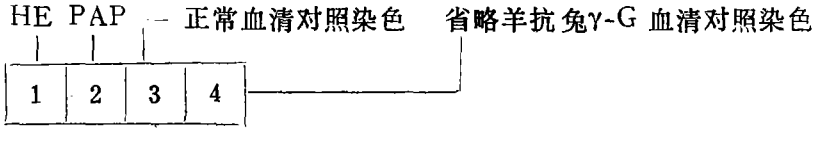
本实验以乙脑病毒京卫研1株腹腔接种小鼠，应用PAP法对常规石蜡包埋的小鼠脑组织中乙脑病毒抗原的分布等进行了观察；描述了病毒抗原阳性细胞出现的时间、部位、分布特点和种类以及病毒抗原在阳性细胞内的分布类型和变化规律，并对其中的一些观察结果与HE染色切片和电镜观察结果进行了对比和讨论；发现除其它神经细胞外，小脑皮质的颗粒细胞、高尔基细胞、分子层以及小脑内核的神经细胞中也可检出病毒抗原阳性细胞；进一步证实，感染后期，部分感染细胞的胞浆和核内可出现病毒抗原，认为主要是由于病毒粒子从胞浆进入核内所致，并发现此类型阳性细胞为坏死细胞；另外讨论了有关PAP法染色的几个问题。

PAP法染色自Sternberger等[1]于1970年首次用于测定钩端螺旋体以来，已被较广泛应用。此法较免疫萤光法、酶标法、搭桥法等免疫组化技术敏感，特异性也较高[1-3]。过去对乙脑病毒抗原分布的研究，主要采用免疫萤光法[4-7]，本实验用乙型脑炎病毒京卫研1株经腹腔接种小鼠，以PAP法染色常规石蜡包埋的鼠脑组织切片，对病毒抗原阳性细胞进行分析，其目的有二：1．我室80届研究生陈立明在经腹腔接种小鼠制成的动物模型中研究了乙脑的超微病理和病毒的形态发生，并获得了一些重要材料，但未做免疫组化染色，以了解感染小鼠脑病毒抗原阳性细胞的种类和分布等，本研究希望能补充这方面的材料；2．将所获得的材料与有关的电镜观察结果作对比。

材料与方法

1．取健康3周龄左右8—10g重昆明种小鼠120只，分实验和对照两组，每组各50只。以鼠脑传至第21代的乙脑病毒京卫研1株（系本校微生物学教研室提供）加肉汤制成10^{-2}浓度的鼠脑悬液，0.5ml/只经腹腔接种实验组小鼠，对照组经腹腔注射同量的正常鼠脑悬液。两组均于接种或注射后24、36、48、60、72、84、96、108、120、132小时10个时相点快速断头活杀取材。实验组和对照组每时相点各5只，实验组另加20只作机动，以补充未到取材时间死亡的动物。

光镜观察材料，取自两组各时相点活杀小鼠左半侧鼠脑的皮质、海马、间脑、中脑、延脑和小脑各部位，修成2mm左右厚小片，用95%乙醇85ml，甲醛10ml，冰醋酸5ml配制的固定液（以下简称AAF液）4℃冰箱内固定12小时，按常规制成厚5μ的连续石蜡切片，用HE和PAP法染色，作光镜观察。切片染色次序如下：



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

另取两组各时相点活杀小鼠的右半侧鼠脑，作为电镜观察材料，详见另文*。

2．抗血清的制备

（1）兔抗乙脑病毒血清的制备

用经地鼠肾细胞培养生产的乙脑灭活疫苗经静脉，皮下和肌肉（加福氏完全佐剂）多途径免疫家兔，所获血清经中和实验[8]测定中和指数为10,000。每次应用前以小鼠脑组织粉吸收两次，经对流免疫电泳鉴定，与正常小鼠脑组织匀浆之间未出现沉淀线。

（2）羊抗兔γ-G血清的制备

以饱和硫酸铵盐析法提取兔血清γ-G，加福氏完全佐剂充分乳化后，经肌肉多点注射免疫山羊，，所取血清经琼脂免疫双扩散法测效价为1:64。

（3）兔抗辣根过氧化物酶血清的制备

以辣根过氧化物酶（RZ=3）加生理盐水和福氏完全佐剂乳化后免疫家兔，采血经琼脂免疫双扩散法测定为单条沉淀线，效价至1:16—32时放血，分离血清。

3．PAP复合物的制备

根据Sternberger[1] 1970年报道的方法制备，所得PAP复合物经SP-8型分光光度计测定：OD280=0.826，OD400=0.432。PAP中酶与抗酶抗体的克分子比值约等于1.6。

4．光镜PAP法的染色

石蜡切片常规脱蜡，经各级酒精入水，用1%硼氢化钠处理30分钟，再以pH7.2 0.01M PBS冲洗，将正常羊血清稀释成1:20，抗乙脑病毒血清1:128，羊抗兔γ-G 1:20，PAP复合物1:15，按Sternberger介绍的方法染色，显色后再以1%锇酸溶液作用5秒钟，水洗、封片镜检。

5．对照染色

（1）内源性酶的对照：切片仅与0.05%DAB和0.01%H_2O_2作用，结果阴性。

（2）用正常兔血清代替兔抗乙脑病毒血清染色，结果阴性。

（3）省略羊抗兔γ-G染色：结果阴性。

（4）对正常小鼠脑组织染色：结果阴性。

观察结果

1．HE染色材料观察结果

接种后24、36、48各时相点取材的HE染色脑组织切片未见明显异常；60、72小时（即60、72小时时相点活杀的动物，下仿此）取材各部位可见少部份散在的神经细胞核仁数目增多，脑膜血管轻度扩张充血。84小时，部分神经细胞核仁增加，胞体轻度肿胀，胞浆嗜碱性增强，偶见核固缩细胞。脑内血管轻度扩张充血，血管周围有少数单核细胞浸润。96、108小时可见部分神经细胞胞浆疏松，胞体肿胀，变圆或细胞缩小，核固缩或形态不整，结构不清。极个别区域有脑软化灶，脑内血管周围有较多的单核细胞浸润。120小时后，神经细胞显核固缩者增多，在灰质区可成片状分布，以海马、间脑、中脑、延髓较显著。脑内血管周围有大量炎细胞浸润，可形成以血管为中心的炎细胞结节。

2．PAP染色材料观察结果

（1）酶反应阳性细胞出现的时间、部位及分布特点：

接种后60小时以前各时相点，脑组织取材各部位未见明显的酶反应阳性细胞。72小时，在大脑皮质、海马、间脑、中脑、小脑皮质出现稀疏散在的酶反应阳性细胞。84小时，上述各部位的阳性细胞逐渐增多。96小时以后，包括延脑在内各部位均出现大量酶反应阳性细胞，其中以120小时酶反应阳性细胞出现最多，大约可达切片中细胞的70%，以海马、大脑皮质、间脑、中脑、延脑各部位较为显著。海马酶反应阳性细胞可呈小片以至呈带状密集分布；大脑皮质以弥漫分布

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

为主（图1）；间脑、中脑、延脑神经核部位，阳性细胞多作团状或片状分布(图2)，它处则分布为散在性；小脑皮质分子层的酶反应阳性细胞亦作散在分布，而颗粒层阳性细胞分布主要为灶状或小片状（图3），蒲氏层偶见少数酶反应阳性细胞；小脑内核也可有阳性细胞。

（2）酶反应阳性细胞的种类：

经与HE染色切片对比观察，酶反应阳性细胞主要为包括小脑的颗粒细胞，蒲氏细胞，高尔基细胞，分子层和小脑内核神经细胞在内的各种神经细胞，也有少数胶质细胞。

（3）酶反应阳性产物在细胞中的分布：

病毒抗原阳性细胞在其内可见黄褐色至深褐色的酶反应颗粒。随感染时间的增加，酶反应颗粒增多、颜色加深，并可见融合成深褐色的团块，酶反应产物在细胞内的分布可表现为以下几种类型：

①核周型——酶反应产物主要分布在核周围的胞浆内，颜色较浅，量较少。

②部分胞浆型——酶反应产物多位于胞浆的一侧，占据胞浆的一部分，颜色较深。

③全胞浆型（图1）——酶反应产物遍布于全胞浆，颜色深，在部分区域可相互融合。

④核浆型（图2、4）——酶反应产物可同时见于细胞核（全部或部分）与细胞浆中（全部或大部）。此型细胞相对较小，形状不整，反应产物颜色深，可融合成团块状。

以上酶反应产物的分布类型并无十分明确的界限，各型之间多有过渡，其中有些细胞胞浆充满酶反应产物，近核处界限不清，酶反应颗粒似有从胞浆内进入核内的倾向。在脑组织的同一部位均可同时见到上述不同类型及不同酶反应程度的病毒抗原阳性细胞。但核周型多见于72小时出现的阳性细胞，晚期则不容易见到。84小时后的各时相点均以全胞浆型阳性细胞为主，而核浆型则见于晚期少数细胞中。

（4）酶反应阳性细胞与HE染色切片对比观察：

接种后72小时，各部位酶反应阳性细胞稀疏散在，酶反应颗粒多见于核周和部分胞浆内，相应部位的HE染色切片散在有核仁增多的神经细胞。84小时酶反应阳性细胞增多，可见全胞浆型阳性细胞；相应部位HE染色的细胞核仁增多，部分细胞胞体轻度肿胀。96小时及以后各时相点，酶反应阳性细胞主要为全胞浆型（图1）；相应部位的HE染色切片中部分细胞胞体肿胀，胞浆疏松。部分区域可见少数核浆型阳性细胞（图4左侧），相应部位的HE染色切片中有较多的体积缩小，核固缩、碎裂或消失的坏死细胞散在或密集分布（图4右侧）。

部分神经细胞自72小时起即可在突起内出现酶反应阳性产物，阳性细胞的周围亦可见一些点状酶反应阳性产物（图2）。

讨　论

1．本实验使用成都生物制品研究所生产的流乙脑炎灭活疫苗，经皮下、肌肉和静脉等途径免疫家兔，获得了中和指数为10,000的抗乙脑病毒血清。由于此疫苗产自地鼠肾细胞培养，故用其免疫动物所产生的抗血清，可减少与小鼠脑组织成份发生交叉反应的可能性，为确保这一点，本实验中又用小鼠脑组织粉连续吸收两次，经对流免疫电泳鉴定，抗血清与正常小鼠脑组织匀浆之间未出现免疫沉淀线，故可排除与小鼠脑组织成份的交叉免疫反应；同时，几种对照染色结果阴性，因此PAP法染色的特异性基本上可以得到肯定；加之所观察到的实验组小鼠出现阳性细胞数目和酶反应产物含量随时间增加而增多，颜色亦加深，以及电镜下相应的观察结果*等也有助于特异性的证明。

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

2．根据观察，病毒抗原阳性细胞在大脑皮质、间脑、中脑和小脑首先出现，这与我们电镜观察结果是一致的*；延脑则出现较迟。小脑病毒抗原阳性细胞出现的时间较Kusano[5]用免疫荧光法测定者早。

3．关于病毒抗原阳性细胞在脑内各部位的分布特点，就我们所查到的文献尚未见报导[4][5]。我们用PAP染色法观察到：早期病毒抗原阳性细胞作散在性分布，以后病毒抗原阳性细胞多与神经细胞的分布密度相一致，在脑神经核处多呈阳性细胞群，但在小脑皮质的颗粒层则以灶性分布为主，蒲氏细胞层偶见少数阳性细胞，晚期坏死的神经细胞分布区域中可见部分阳性细胞。

4．经PAP法染色发现，脑内各部位病毒抗原阳性细胞主要为神经细胞，偶见少数胶质细胞。这与文献报道的免疫荧光染色结果[4][5]和电镜[8-10]观察到的感染细胞种类相同。但在小脑，文献仅报道蒲氏细胞可出现病毒抗原[4]。我们用PAP法发现，小脑皮质的颗粒细胞，高尔基细胞，蒲氏细胞，分子层以及神经核中均可有病毒抗原阳性细胞，特别是小脑颗粒细胞层和分子层神经细胞中为数较多。这些发现并得到电镜观察结果*的进一步证实。可以说，脑内各部位的神经细胞都有可能受到乙脑病毒的感染。

5．根据观察结果，实验组小鼠脑中神经细胞PAP法染色酶反应阳性产物在细胞中的分布大致可分为4种类型，各型间多有过渡。最初以核周型较多见，以后全胞浆型为主。虽在脑炎病变发展过程中细胞受病毒感染的时间可有先后，在同一部位可同时见到几种类型的病毒抗原阳性细胞，但根据各型出现的总的趋势仍可推论：病毒抗原首先出现于核周胞浆，以后逐渐向全胞浆扩散。这一病毒抗原在细胞内分布的特点与部分作者经免疫荧光法观察到的结果基本一致[6][7][11][12]。但根据我们的电镜观察结果*，至少在小脑颗粒细胞核周型可包括核周间隙，因在这种细胞每见病毒粒子等首先出现于此处。至于核膜有无病毒抗原存在，凭我们现有材料难以判定。

关于核内有否病毒抗原的存在，各家观察结果不一[4][5][6][11][12]。Hamashima和张礼璧等分别在感染的鼠脑细胞和培养细胞的后期，观察到核内可出现特异性荧光。Hamashima进一步报道了核内抗原是由集结在核膜上的抗原突破核膜，侵入核内的，但后者的观察结果在其它一些作者的文献中未见报道，也缺乏形态学的对比观察。我们用PAP染色法观察到，感染后期，少数细胞的核和胞浆内均可出现酶反应阳性产物，表现为上文所称的核浆型病毒抗原阳性细胞。经连续切片HE染色的对比观察，可见核浆型的病毒抗原阳性细胞为坏死细胞。电镜观察结果也表明*，坏死细胞固缩的核以及胞浆中（图4）和核已碎裂的整个细胞中均有较多的病毒粒子存在。又PAP法染色全胞浆型阳性细胞中偶见胞浆内病毒抗原有进入核内的倾向，在电镜下*也见到某些坏死细胞核膜破坏，破坏处及核内可见较多的病毒粒子。综上所述可以认为，在感染晚期的坏死细胞中，部份坏死细胞胞浆内的病毒可出现于坏死细胞核内，或遍布于核已发生崩解的整个细胞中，表现为核浆型病毒抗原阳性细胞。

坏死细胞核中出现病毒粒子，考虑可有两种解释：一是坏死前核膜被破坏，病毒粒子进入核中同时引起细胞坏死；二是细胞先已坏死，然后病毒粒子进入坏死细胞的核。

6．我们用PAP法染色在感染小鼠的脑组织中观察到，阳性神经细胞的突起内可出现病毒抗原，阳性细胞的周围亦可出现点状酶反应产物。根据我们的电镜观察结果*推测，这意味着神经细胞突起内可有病毒粒子和病毒复制多泡体以及神经纤维网间隙中有由感染细胞释出的成堆病毒粒子(图6)。

7．免疫标记定位工作，要求组织固定

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

液既能保持组织细胞形态结构的完好，又要尽可能少损伤所检抗原的活性。我们在10种固定液中，对适用于鼠脑组织石蜡包埋，用PAP法检测乙脑病毒抗原的固定液进行了选择，认为AAF液较为理想，除其组织细胞结构和病毒抗原性保存相对较好外，且还具有渗透力强，反应颗粒较细以及可破坏内源性酶的活性等优点。

本实验中用硼氢化钠处理切片[13-14]，对消除或减弱由醛类固定液在组织中残留的醛基所致的非特异性染色效果很好。

* 详见《小鼠实验性乙型脑炎的超微病理观察》一文（待发表）

参考文献

1. Sternberger LA, et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry, preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 1970; 18:315

2. Sterberger LA: Immunocytochemistry. second edition 1979, p104

3. 朱培坤：《免疫酶技术》山东科学技术出版社 1983，p159

4. Hamashima Y: Immuno-cytological studies employing labelled active protein III encephalitis Japanica. Acta Pathologica Japanica 1959; 9:89

5. Kusano N: Studies on the pathogeneses of Japanese encephalitis. Acta Pathologica Japanica 1964; 14:207

6. Yoshida J, et al: Immunofluorescence of Japanese encephalitis virus infection in vitro: Localization of viral antigen in canine cerebllar tissue cultures. Japan J Microbiol 1966; 10:183

7. 张礼壁：用荧光抗体法研究流行性乙型脑炎病毒在细胞中的繁殖动态。中华医学杂志 1962; 48:316

8. 中国医学科学院流行病防治研究所：《常见病毒病实验技术》科学出版社 p 34, 275

9. Yasuzumi G, et al: Analysis of the development of Japanes B encephalitis (JBE) virus. 1. Electron microscope studies of microglia infected with JBE virus. J Ultrastr Res 1964; 11:213

10. Yasuzumi G, et al: Analysis of the development of Japanese B encephalistis (JBE) virus. 2. Electron microscope studies of neurons infected with JBE virus. J Ultrastr Res 1965; 12:304

11. Ohyama A, et al: Electron microscopic observation of the buding maturation of group B arboviruses. Microbiol Immunol 1977; 21:535

12. Takeda H, et al: Demonstration of RNA synthesis caused by Japanese encephalitis virus infection in Ps (Y15) cell with the aid of chromomycin A3. Jap J Med Sci Biol 1965; 18:111

13. Farr A: Immunohistochemistry with engyme labaled antibodies: A brief review. J Immunolgical Methods 1981; 47:129

14. Eldned, et al:Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. J Histochem Cytochem 1983; 31:285

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

Distribution of B Encephalitis Virus Antigen in Experimentally Infected Mouse Brain—A Study Using PAP Stainimg Technique

Sheng Peng

Tutor: Prof. Yan Liangsui

(Department of Pathology, Third Military Medical College)

B encephalitis virus of Jin Wei Yan I strain was injected into the peritoneal cavity of mice. Paraffin sections of the brain tissues of the mice were made and stained with PAP staining technique to locate the presence of virus antigen in the brain. The kinds of the brain cells involved, the patterns of the distribution of these cells, and the distribution patterns of the virus antigen in these cells were described. Some of the results of this observation were compared with the results obtained from the corresponding HE stained sections and from electron microscopy.

Besides othernerve cells, the granular cells, the nerve cells in the molecular layer, the Golgi cells and the cells in the central nuclei of the cerebrum, especially the former two, were also found to contain the virus antigen. In the later stage of infection, virus antigen could be found in the nuclei of the necrotic infected cells. It is considered by the author that the virus antigen cutered the nuclei from the cytoplasm.

In addition, certain problems of PAP staining were discussed.

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

用光镜PAP法染色对小鼠实验性乙型脑炎脑中病毒抗原分布的研究

（见正文第 7 页）

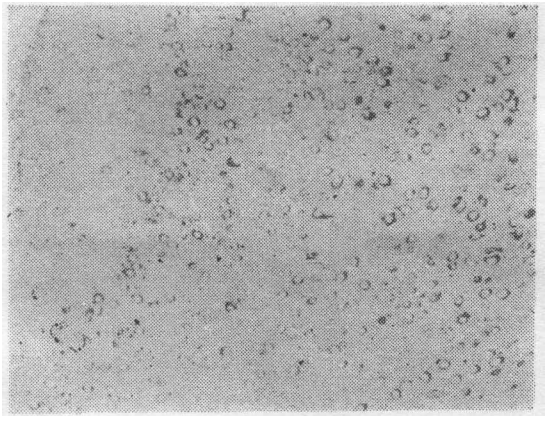


图 1　大脑皮质酶反应阳性细胞呈弥漫分布，阳性细胞主要为全胞浆型。接种后96小时。PAP×143

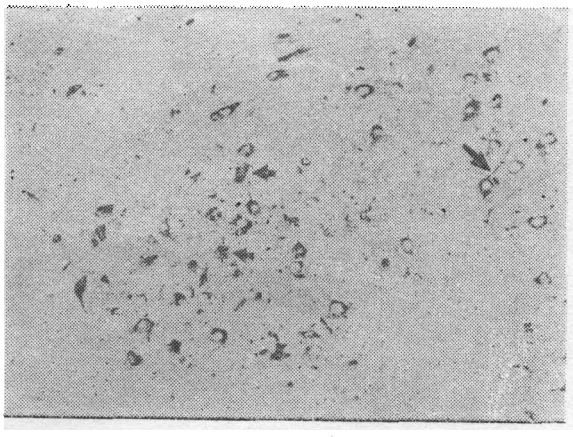


图 2　延脑呈团状分布的酶反应阳性细胞，其中可见核浆型阳性(短↑)，部分阳性细胞周围有点状酶反应阳性产物，细胞突起酶反应阳性(长↑)。接种后96小时。PAP×143

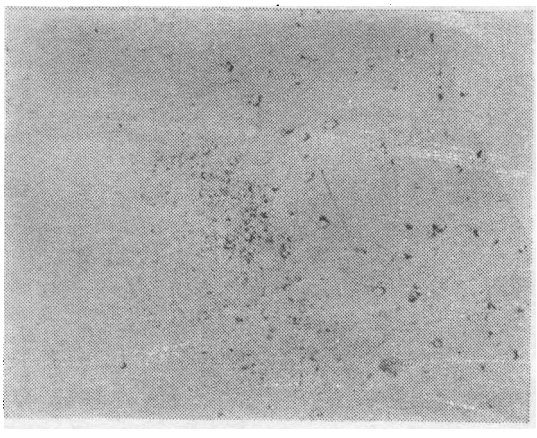


图 3　小脑皮质分子层有散在分布的酶反应阳性神经细胞，颗粒细胞层中的阳性颗粒细胞以灶状分布为主。接种后96小时。PAP×224

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

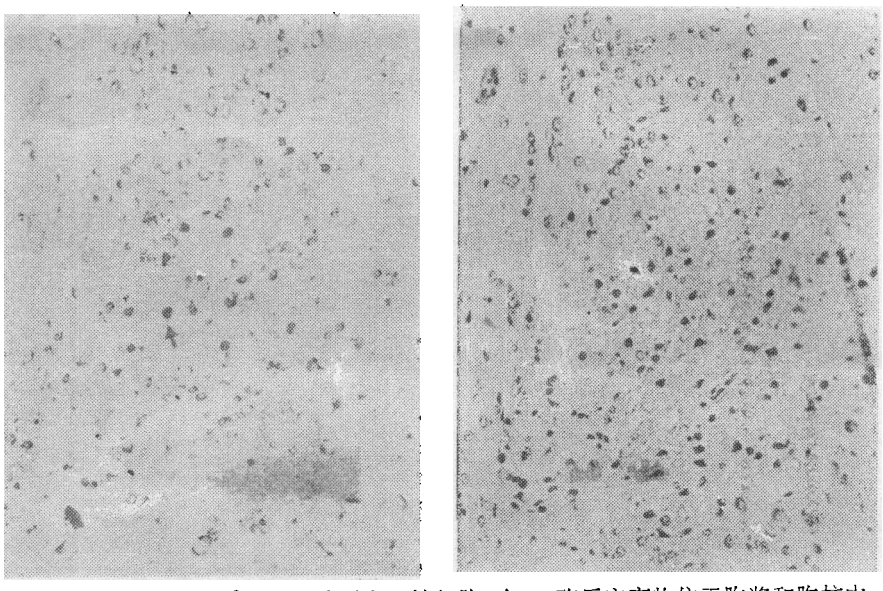


图 4　左侧示大脑皮质核浆型酶反应阳性细胞(个)，酶反应产物位于胞浆和胞核中，颜色较深，多融合成团块状。接种后120小时。PAP × 224
右侧示左侧所示部位的连续切片，可见成团分布的显核固缩的神经细胞，细胞周围组织疏松水肿。HE × 224

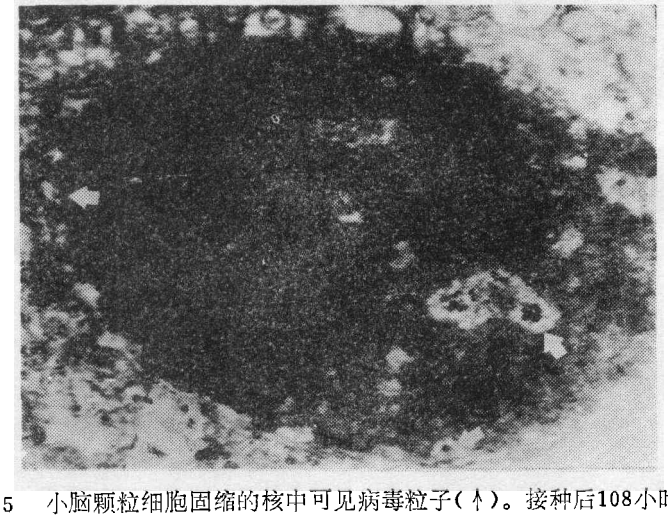


图 5　小脑颗粒细胞固缩的核中可见病毒粒子(↑)。接种后108小时。× 38,100

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

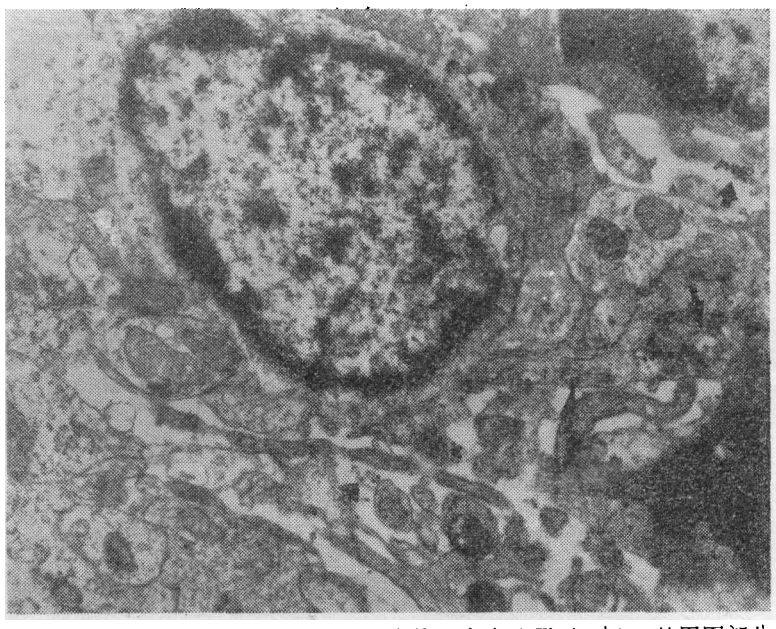


图 6　小脑颗粒细胞突起内可见复制多泡体和病毒粒子(长↑)，其周围部分细胞突起崩解，神经网间隙增宽，内可散在或成堆的病毒粒子(短↑)。接种后108小时。×27,000

小血管套叠“U”式缝合法的实验研究（正文见第37页）

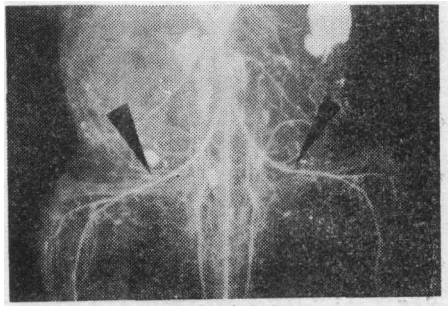


图 3　术后 3 天的造影图相
→：吻合部见有狭窄

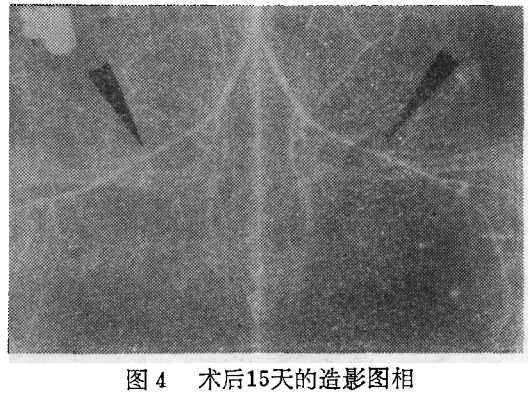


图 4　术后15天的造影图相
→：吻合部未见狭窄

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