



原位杂交检测尸检组织中SARS-CoV RNA

急性重症呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)是一种传染性强的感染性疾病,2003年4月17日,WHO正式确认一种新型冠状病毒是SARS的病原体,并被命名为SARS病毒(SARS-associated coronavirus, SARS-CoV) [1]。为探讨SARS-CoV在机体的分布情况、寻找SARS新的传播途径提供依据,本研究利用原位杂交技术对SARS尸检组织进行了系统的SARS-CoV RNA检测。

1 材料与方法

1.1 材料

所有SARS组织标本均来源于本教研室收集的已确诊为SARS死亡患者的尸检标本,以心源性猝死患者的相应组织为阴性对照。分别取肺、淋巴结、脾脏、胰腺、甲状旁腺、肾上腺、食道、胃肠道、脑、肾、肝、皮肤、骨髓、血管、心脏、四肢横纹肌、卵巢、子宫和睾丸等部位组织,所有标本经4%多基甲醛固定,所用试剂和相关器械经二乙基焦碳酸酯(diethylprocarbonate, DEPC)处理和/或高压灭菌处理。SARS-CoV寡核苷酸探针根据加拿大公布SARS冠状病毒多伦多株的nsp11基因序列设计,是以编码SARS-CoV RNA聚合酶基因的特异序列(5'-ATGAATTACCAAGTCAATGGTTAC-3'和5'-GAAGCTATTCGTCACGTTTCG-3')分别合成的cDNA片段(上海博亚公司合成)。上述两个探针分别按照地高辛标记试剂盒(Boehringer-Mannheim公司)说明进行标记,经检测标记后的探针浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物技术公司。

1.2 原位杂交检测尸检组织中SARS-CoV聚合酶RNA表达

原位杂交实验步骤为常规石蜡切片的脱腊和蒸馏水漂洗2次,胃蛋白酶消化,室温20 min, PBS漂洗2次,蒸馏水洗1次;预杂交液37 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交3 h;往杂交液中同时加入上述两个寡核苷酸探针(使其工作浓度分别为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜(18 h); 2 \times SSC、0.5 \times SSC和0.2 \times SSC梯度漂洗,封闭液37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min,生物素化抗地高辛抗体37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min;链霉抗生物素蛋白(SABC)37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min;生物素化过氧化物酶37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, PBS漂洗;DAB显色,苏木素复染。每批染色均设阴性对照(非SARS患者相应组织、杂交液不加探针)。

1.3 原位杂交检测评价标准

原位杂交阳性信号为棕黄色,位于细胞质内。高倍视野下计数每个玻片5个视野内的阳性细胞数并进行染色结果评价,无着色者为(-),阳性细胞数<25%为(+),阳性细胞数在25%~50%之间为(++),阳性细胞数 \geq 50%为(+++)。

2 结果

2.1 SARS-CoV聚合酶RNA的原位杂交检测定位

4例SARS尸检组织的多个部位存在阳性杂交信号(表1),而作为阴性对照的心源性猝死患者的各组织内则

表 1 原位杂交检测 SARS 尸检组织中 SARS-CoV RNA
探针阳性信号的分布情况

Tab.1 Distribution of SARS-CoV RNA polymerase
gene in SARS autopsy tissues detected by *in situ*
hybridization

Organ (cells)	Case No.			
	A1061	A1062	A1065	A1076
Alveolar epithelium	+++	+++	+++	+++
Serous gland epithelium of the trachea/bronchus	+++	+++	+++	+++
Monocytes of the spleen	+	+	+	+
Monocytes of the lymph node	++	++	++	++
Acidophilic cells of the pituitary	+	+	+	+
Squamous epithelium of the esophagus	+	+	+	+
Gastric parietal cells	++	+	+	+
Epithelium of the intestinal tract	++	+	+	+
Acidophilic cells of the parathyroid	++	++	++	++
Acinar cells of the pancreas	+	+	+	-
Adrenal cortical cells	++	++	++	++
Sweat gland cells	++	++	++	++
Epithelial cells of the distal convoluted tubule of the kidney	++	++	++	++
Hepatocytes near the central vein	+	+	+	+
Bone marrow promyelocytes	+	+	+	+
Small vein endothelium	+	+	+	+
Aorta	-	-	-	-
Cerebrum	-	-	-	-
Cerebellum	-	-	-	-
Heart	-	-	-	-
Striated muscle of the limb	-	-	-	-
Testicle	-	-	-	-
Ovary	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-

对杂交结果系统分类发现：SARS-CoV聚合酶基因原位杂交阳性信号主要分布于呼吸系统、免疫系统、内、外分泌腺、消化系统(胃肠道和肝脏)、泌尿系统、造血系统(骨髓)和中枢神经系统的大脑神经元细胞以及循环系统的小血管内皮；而中枢神经系统的小脑、生殖系统的各器官和机体各肌肉组织则均未见阳性信号。上述SARS-CoV RNA 表达阳性的各系统，其阳性细胞的部位也各有不同：其中，呼吸系统的阳性细胞主要包括肺泡上皮细胞、支气管浆液腺上皮细胞和肺内浸润的单核/巨噬细胞，尤其是增生融合的肺泡上皮及浸润的单核/巨噬细胞均呈较强的阳性表达；免疫系统的阳性细胞主要是淋巴结和脾脏的单核/巨噬细胞，而淋巴细胞

未见阳性表达；内分泌系统阳性细胞主要表现在脑垂体嗜酸性细胞、甲状旁腺嗜酸性细胞、肾上腺皮质细胞；外分泌腺阳性细胞主要表现在支气管浆液腺上皮细胞、皮肤的汗腺细胞和胰腺腺泡细胞；胃肠道阳性细胞主要集中在粘膜表面柱状上皮；泌尿系统以肾远曲小管上皮细胞强阳性为特点，而肾小球、近曲小管和集合管均为阴性。

3 讨论

SARS-CoV是冠状病毒家族成员，为正义单链RNA病毒，长约30 kb，其基因组结构与其他冠状病毒相似，编码蛋白质主要有刺突蛋白S(spike protein)、膜蛋白M(membrane protein)、小分子膜蛋白E(small membrane protein)、核衣壳蛋白N(nucleocapsid protein)，但SARS-CoV没有该家族常有的血凝素酯酶HE(hemagglutinin esterase) [2]。冠状病毒进入宿主细胞后，首先以病毒基因组RNA为模板翻译出病毒RNA聚合酶，然后利用该酶完成负链亚基因组RNA的转录和各结构蛋白mRNA合成以及病毒基因组RNA复制，SARS-CoV RNA聚合酶在SARS-CoV复制过程中起着重要作用，该基因具有高度保守性 [3]，因此，本研究以SARS-CoV RNA聚合酶基因为对象检测了SARS-CoV的存在。

本研究在SARS尸检标本全身多系统发现SARS-CoV的存在，其分布部位包括肺泡上皮细胞、气管/支气管浆液腺上皮细胞和肺内单核/巨噬细胞，淋巴结、脾脏和骨髓的单核/巨噬细胞、脑垂体嗜酸性细胞、甲状旁腺嗜酸性细胞、肾上腺皮质细胞；汗腺细胞和胰腺腺泡细胞、胃肠道粘膜表面柱状上皮细胞和肾远曲小管上皮细胞，以及大脑神经元细胞。这一检测结果表明SARS-CoV分布与CoV受体CD13分布具有明显的相似性 [4]，提示CD13可能是SARS-CoV的受体之一。其中，肺泡上皮细胞、支气管浆液腺上皮细胞和肺内单核/巨噬细胞，淋巴结和脾脏的单核/巨噬细胞均有较强的SARS-CoV RNA阳性表达，也说明呼吸系统和免疫系统是SARS-CoV作用的主要靶点 [5]。

皮肤汗腺细胞、肾远曲小管上皮细胞和胃肠道柱状上皮细胞的SARS-CoV RNA阳性说明这些器官受侵犯的同时，也提示SARS-CoV可能会通过汗液、尿液和粪便排泄物进行传播。因此SARS-CoV的传播途径可能有多种，除呼吸道传播外，SARS-CoV可能还会通过以上三种途径进行传播。

另外，脑垂体嗜酸性细胞、甲状旁腺嗜酸性细胞、肾上腺皮质细胞、支气管浆液腺上皮细胞和胃肠道壁细胞等细胞SARS-CoV RNA阳性提示内外分泌腺是SARS-CoV的又一作用靶点。SARS-CoV对内分泌系统的广泛侵犯可能会造成该系统功能紊乱，引起激素分泌异常，导致神经-体液调节系统功能紊乱，对机体造成相应的不良后果；而且，由于内分泌系统对全身多系统的调节作用，也从一个侧面体现了SARS是一种全身性疾病 [5]。但值得注意的是，SARS尸检标本的内分泌器官除了具有强的SARS-CoV RNA表达外，并没有发现明显的病理形态学改变 [6]，因此，SARS-CoV对内分泌系统的作用方式和影响程度还有待进一步研究，并且加强SARS患者的内分泌系统监测可能有一定意义。

对于SARS尸检标本的中枢神经系统研究显示出有一个有意思的现象：大脑神经元细胞SARS-CoV阳性，而小脑神经细胞则均为阴性。提示大脑神经元细胞是SARS-CoV的攻击对象，而小脑神经细胞则不受侵犯。对循环系统的SARS-CoV检测，我们发现包括肺、肾、肾上腺、淋巴结、肝脏、四肢肌肉间和脑在内的小静脉血管内皮细胞均呈SARS-CoV强阳性表达，研究结果印证了SARS-CoV可引起全身微循环障碍的事实 [5]。

本研究从分子生物学水平对SARS尸检组织SARS-CoV进行了全面系统的检测。检测结果显示SARS死亡患者全身多系统内存在SARS-CoV RNA聚合酶基因，从分子水平证明SARS-CoV可侵犯全身多部位，进一步证实了我们先前的研究结果 [6]：SARS是一种以呼吸系统、免疫系统侵犯为主的全身性疾病；SARS-CoV的分布特点与冠状病毒受体(CD13)分布具有相似性，提示CD13可能是SARS-CoV的受体之一；肾远曲小管、消化道上皮细胞、皮肤汗腺的SARS-CoV RNA聚合酶基因阳性结果将为SARS传播途径研究提供线索。

参考文献：

[1] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. Science, 2003, 300: 1399-404.

[2] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus

associated with severe acute respiratory syndrome[J]. Science, 2003, 300: 1394-9.

[3] Rest JS, Mindell DP. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting [J]. Infect Genet Evol, 2003, 3(3): 219-25.

[4] Wentworth DE, Holmes KV. Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): Influence of N-linked glycosylation [J]. J Virol, 2001, 75(20): 9741-52.

[5] 丁彦青, 王慧君, 申洪, 等. 严重急性呼吸综合症病原体检测及临床病理学观察[J]. 中华病理学杂志, 2003, 32(3): 195-200.

Ding YQ, Wang HJ, Shen H, et al. Study on etiology and pathology of severe acute respiratory syndrome[J]. Chin J Pathol, 2003, 32(3): 195-200.

[6] Ding YQ, Wang HJ, Shen H, et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China [J]. J Pathol, 2003, 200: 282-9.

参考文献:

[1] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus[J]. Science, 2003, 300: 1399-404.

[2] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. Science, 2003, 300: 1394-9.

[3] Rest JS, Mindell DP. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting [J]. Infect Genet Evol, 2003, 3(3): 219-25.

[4] Wentworth DE, Holmes KV. Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): Influence of N-linked glycosylation [J]. J Virol, 2001, 75(20): 9741-52.

[5] 丁彦青, 王慧君, 申洪, 等. 严重急性呼吸综合症病原体检测及临床病理学观察[J]. 中华病理学杂志, 2003, 32(3): 195-200.

Ding YQ, Wang HJ, Shen H, et al. Study on etiology and pathology of severe acute respiratory syndrome[J]. Chin J Pathol, 2003, 32(3): 195-200.

[6] Ding YQ, Wang HJ, Shen H, et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China [J]. J Pathol, 2003, 200: 282-9.