

SARS冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体在 SARS 尸检组织中的表达

贺莉¹ 袁彦青¹ 袁小燕² 袁庆玲¹ 袁仲曦¹ 袁慧君¹ 袁洪¹ 袁祖国¹ 袁俊杰¹ 袁进华¹ 袁秋舰¹ 袁欣¹ 袁张文丽¹ 袁慧霞¹ 袁康伟¹ 袁扬磊¹ 袁药丹¹ 第一军医大学¹ 病理学教研室 袁珠江医院实验中心 袁广东 广州 510515 袁

摘要 目的 观察 SARS 死者的尸检组织中 SARS 冠状病毒 SARS-CoV 的存在与分布情况遥方法 应用免疫组化技术检测 4 例尸检标本肺 脾脏 淋巴结 垂体 心脏 肾脏 胰腺 气管 食管 胃肠道和骨髓等组织的 SARS-CoV N 蛋白遥结果 肺泡上皮 脾脏 淋巴结内浸润的单核细胞 / 巨噬细胞 脑神经元 肝细胞 远曲小管上皮细胞 胰腺腺泡细胞 垂体嗜酸细胞 甲状旁腺嗜酸性细胞 肾上腺皮质细胞 管及支气管浆液腺上皮细胞 食管粘膜鳞状上皮 胃肠道柱状上皮细胞及胃壁细胞 骨髓早幼粒细胞及小静脉内皮细胞等细胞质内 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体均为阳性遥结论 SARS-CoV 可侵犯全身多种器官和组织遥 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体在胃肠道 远曲小管及汗腺细胞内的阳性表达 对研究 SARS-CoV 传播途径具有重要意义遥

关键词 急性重症呼吸综合征 SARS 袁 SARS 冠状病毒 袁 免疫组化

中图分类号 袁 519.9 文献标识码 袁 文章编号 袁 000-2588 袁 003 袁 1-1128-03

Expression of the monoclonal antibody against nucleocapsid antigen of SARS-associated coronavirus in autopsy tissues from SARS patients

HE Li¹, DING Yan-qing¹, CHE Xiao-yan², ZHANG Qing-ling¹, HUANG Zhong-xi¹, WANG Hui-jun¹, SHEN Hong¹, LI Zhu-guo¹, CAI Jun-jie¹, ZHANG Jin-hua¹, GENG Jian¹, LI Xin¹, ZHANG Wen-li¹, HAN Hui-xia¹, KANG Wei¹ 袁 YANG Lei¹, LU Yao-dan¹

Department of Pathology¹, Central Laboratory, Zhujiang Hospital², First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the presence and distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) in autopsy tissues obtained from patients died of SARS. Methods Immunohistochemical technique was applied in 4 fatal SARS cases to examine the autopsy tissues including the lungs, spleen, lymph nodes, brain, pituitary, heart, liver, kidney, pancreas, trachea, esophagus, gastrointestinal tract, adrenal glands, parathyroids, skin and bone marrow. Results Immunohistochemistry identified positive monoclonal antibody against SARS-CoV nucleocapsid (N) protein in the alveolar epithelium and the infiltrating monocytes or macrophages in the lung, spleen and lymph nodes; the presence of the antibody was also detected in the serous gland epithelium of the trachea/bronchus, squamous epithelium of the esophagus, the gastric parietal cells, the epithelium of the intestinal tract, acidophilic cells in the parathyroids and pituitary, acinus cells in the pancreas, adrenal cortical cells, sweat gland cells, small vessel endothelium, bone marrow promyelocytes, epithelial cells of the distal convoluted tubule of the kidney, brain neurons, and the hepatocytes near the central vein. Conclusion A variety of organs and tissues can be infected by SARS-CoV, and the positive expression of SARS-CoV N protein in the epithelial cells of the gastrointestinal tract, the distal convoluted tubule of the kidney and the sweat gland cells is significant for studying the transmission routes of SARS.

Key words: severe acute respiratory syndrome; SARS coronavirus; immunohistochemistry

收稿日期 袁 003-06-23

基金项目 袁 国家自然科学基金 袁 340015 袁 军队医药卫生 SARS 专项基金 袁 3F016-2 袁 广东省 SARS 专项基金 袁 D2003-80 袁

Supported by National Natural Science Foundation of China (30340015); Dedicated Fund for SARS control from the Medical Science Research Project of the Army (03F016-2) and from the Guangdong Province (GD2003-80)

作者简介 袁 贺莉 袁 972- 袁 袁山西忻州人 袁 第一军医大学在读硕士研究生 袁 电话 袁 20-61640114-89099 袁 袁-mail: hely@fimmu.com

通讯作者 袁 袁彦青 袁 电话 袁 20-61642148 袁 袁-mail: dyq@fimmu.com

急性重症呼吸综合征 袁 severe acute respiratory syndrome 袁 SARS 袁 是一种传染性很强的感染性疾病遥 2003 年 4 月世界卫生组织宣布该病是由新型冠状病毒所致 袁 并命名该病毒为 SARS 冠状病毒 袁 SARS-associated coronavirus 袁 SARS-CoV 袁 本研究利用 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体检测尸检组织中的 SARS-CoV 的存在及分布 袁 为 SARS 传播途径及发病机制研究提供依据遥

1 材料与方法

1.1 材料

4 例 SARS 组织标本均为本教研室收集的已确诊为 SARS 死亡患者的尸检标本... 脾脏、心脏、肾脏、胃肠道、肾上腺、甲状旁腺、垂体、骨髓、皮肤、四肢横纹肌组织... 中性甲醛固定... 石蜡包埋... 切片备用

1.2 SARS-CoV 抗体制备

抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体由珠江医院制备... SARS 冠状病毒核壳... 抗原用谷胱甘肽 S- 转移酶... 融合蛋白纯化试剂盒提取和纯化 SARS 冠状病毒核壳... 鉴定纯度达 95% 以上... 免疫小鼠... 间接 ELISA 检测血清效价... 免疫小鼠制备杂交瘤和筛选... 辛酸 - 硫酸铵方法纯化抗体... 间接 ELISA 法行免疫球蛋白 Ig 亚类鉴定... 抗体特异性鉴定采用间接 ELISA 法... 将纯化流感病毒... 肺炎衣原体... 肺炎支原体全抗原包被的微孔板与杂交瘤细胞培养上清反应... 间接免疫荧光法... SARS 冠状病毒感染 VeroE6 细胞... 腺病毒感染 293 细胞... 组轮状病毒感染 MA104 细胞... 然后用杂交瘤细胞培养上清对病毒感染细胞分别进行免疫荧光检测... 抗体表达情况... 免疫印迹... 10% SDS-PAGE 分离 GST-N 蛋白... 转印到硝酸纤维素膜... 转印膜在 10% 脱脂牛奶... 4 益封闭过夜... 分别与杂交瘤细胞培养上清和 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 孵育... 洗涤膜后... EC 显色

1.3 免疫组织化学染色及结果评价

试剂盒采用 DAKO 公司产品... 切片依次脱蜡至水... BS 漂洗 10 min... 微波修复... 室温冷却... 过氧化酶阻断... 抗为 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体... 4 益过夜... 以心原性猝死相应组织作正常对照... BS 和健康羊血清替代一抗做阴性对照... 滴加二抗室温孵育 30 min... DAB 显色... 苏木素复染... 切片... 染色评价标准... 不着色者为阴性... 阳性细胞数 < 25% 为弱阳性... 阳性细胞数逸 25% 为阳性... 阳性细胞数逸 50% 为强阳性

2 结果

SARS-CoV N 蛋白特异性单克隆抗体检测显示院 4 例尸检肺组织增生和脱落的肺上皮细胞... 局部浸润的单核细胞... 支气管和支气管浆液腺上皮细胞... 脾脏和淋巴结单核细胞... 皮肤汗腺上皮细胞... 远曲小管上皮细胞... 垂体嗜酸性细胞... 大脑神经元... 甲状旁腺嗜酸性细胞... 胃肠道黏膜鳞状上皮... 胃肠道柱状上皮细胞及胃壁细胞... 胰腺腺泡上皮细胞... 肾上腺皮质细胞和近中央静脉处肝细胞... 静脉血管内皮细胞... 肺淋巴结... 肾上腺等部位... 骨髓早幼粒细胞均有不同程度的阳性表达... 阳性部位定位于细胞质... 棕黄色... 其中肺泡上皮细胞... 淋巴结脾脏浸润的单核巨噬细胞... 汗腺上皮细胞... 远曲小管上皮细胞胞质内均呈强阳性表达

3 讨论

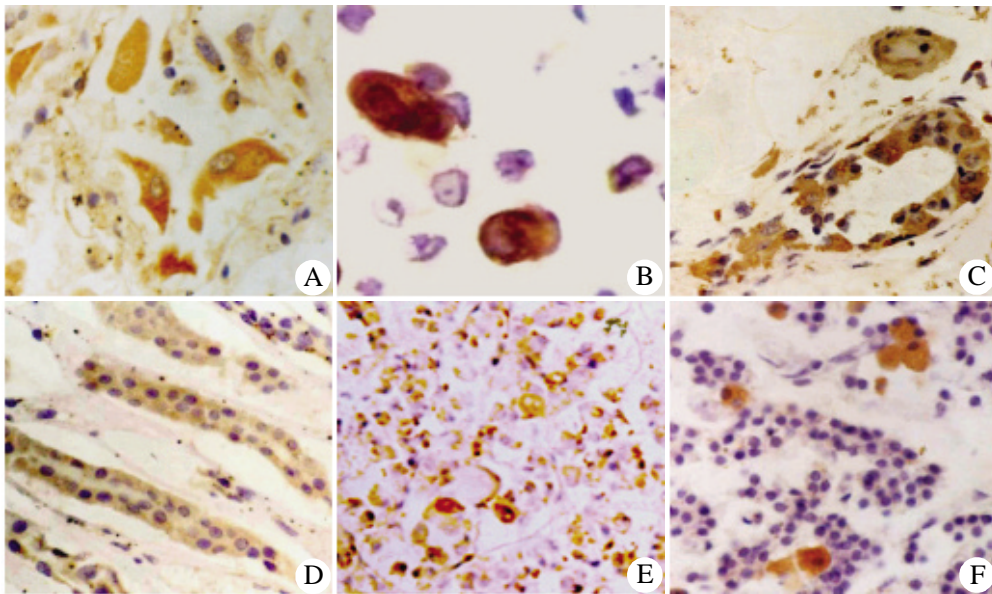


图 1 SARS-CoV N 蛋白特异性单克隆抗体的免疫组化检测结果

Fig.1 Immunohistochemical detection of SARS-associated coronavirus (DAB staining)

A: Pneumocytes (伊00); B: Monocytes in the lung tissue (伊00); C: Sweat gland cells (伊00); D: Eepithelial cells of the distal convoluted tubule of the kidney (伊00); E: Acidophilic cells in the pituitary (伊00); F: Acidophilic cells in the parathyroid (伊00)

SARS 是一种以呼吸道传播为主的急性传染病,由冠状病毒感染所致。冠状病毒通常寄居于动物体内,冠状病毒因属类的不同而病变发生部位不同。其原因为这些部位有冠状病毒独特的受体。主要受体为人氨基肽酶 N (human aminopeptidase N, 又称 CD13) 存在于呼吸道纤毛上皮表面。胃肠道上皮、支气管上皮、肺泡上皮、血管内皮、粒细胞、巨噬细胞和纤维细胞。冠状病毒感染人体后在不同的部位引起不同的病变及临床症状。在中枢神经系统引起广泛的脱髓鞘,出现脑炎症状。在胃肠道引起腹泻。在呼吸道引起类似上呼吸道感染的症状。

SARS-CoV 是一种新型冠状病毒,为正义单链 RNA 病毒。其基因组结构与其它冠状病毒相似。研究表明其编码蛋白质主要为 S、M、E 蛋白等。其中 N 蛋白是包含有 422 个氨基酸的强碱性蛋白,相对分子质量为 460 000,可以与基因组 RNA 结合形成核衣壳,提供核信号,干扰核进程,病毒复制和 RNA 整合等作用。本研究以 N 蛋白为靶点,应用免疫组化技术检测尸检组织中 SARS-CoV 抗原的存在及分布状况。研究结果显示 SARS-CoV 可侵及全身多种器官。病毒抗原主要存在于肺泡上皮细胞、肾远曲小管、胃肠道上皮、皮肤汗腺、大脑神经元细胞、血管内皮细胞和脾脏及淋巴结的单核/巨噬细胞。胰腺腺泡上皮等部位。并定位于细胞质。其中肺泡上皮细胞及单核巨噬细胞均呈强阳性表达。说明肺泡上皮细胞是 SARS-CoV 的易感细胞。随着 SARS-CoV 进入肺泡细胞内产生病毒蛋白,病毒基因组进行复制,子代病毒颗粒装配,释放出感染邻近细胞和组织,导致肺泡上皮及小血管内皮细胞增生、脱落、凋亡,产生严重肺水肿,大量透明膜形成,肺广泛性实变。这可能是造成呼吸系统功能障碍的机制之一。尸检组织中大量增生和浸润的单核/巨噬细胞内 SARS-CoV N 蛋白呈强阳性表达。这一点可能说明了在 SARS-CoV 入侵时,病毒与单核巨噬细胞表面受体结合,诱导单核巨噬细胞趋化,使其对 SARS-CoV 进行有效清除。此结果也证实了在机体免疫系统遭到严重破坏情况下,

单核巨噬细胞在抵御 SARS-CoV 入侵作用中起了重要作用。提示单核巨噬细胞有可能与 SARS 的发病机制相关。值得一提的是发现胃肠道上皮细胞、皮肤汗腺细胞、肾远曲小管上皮细胞均可观察到 SARS-CoV 抗原存在。这为研究 SARS 的传播途径提供了新的线索。研究中还发现部分内分泌器官和组织如肠壁细胞、肾上腺皮质细胞、甲状旁腺和垂体嗜酸性细胞不同程度的表达 SARS-CoV N 抗原。这是否与 SARS-CoV 存在新的受体有关,还有待进一步研究。

参考文献

- 喻哲车小燕,丘立文,潘玉先,等.快速高效的免疫方法制备 SARS 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体.第一军医大学学报,2003,23(7): 640-2.
- Che XY,Qiu LW,Pan YX, et al. Rapid and efficient preparation of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein by immunizing mice. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 640-2.
- 喻哲 Tresnan DB, Levis R, Holmes KV. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. J Virol, 1996, 70(12): 8669-74.
- 喻哲 Hegyi A, Kolb AF. Characterization of determinants involved in the feline infectious peritonitis virus receptor function of feline aminopeptidase N. J Gen Virol, 1998, 79(pt 6): 1387-91.
- 喻哲 Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. Science, 2003, 300: 1399-404.
- 喻哲柳树群,过涛,季星来,等. SARS-CoV 蛋白质组的生物信息学及其进化关系.科学通报(Sci Rep), 2003, 48(13): 1359-68.
- 喻哲 Yang L, Xu S, Rui FY, et al. Identification of an epitope of SARS-coronavirus nucleocapsid protein. Cell Res, 2003, 13(3): 141-5.
- 喻哲 Ding YQ, Wang H, Shen H, et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. J Pathol, 2003, 200: 282-9.
- 喻哲贺莉,丁彦青,王蔚,等.免疫细胞标志物在 SARS 病变组织中的表达及其作用.第一军医大学学报,2003,23(8): 774-6.
- He L, Ding YQ, Wang W, et al. Study on mechanism and expression of immunocyte markers in SARS. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(8): 774-6.