

原位杂交检测尸检组织中 SARS-CoV RNA

张庆玲¹ 袁彦青¹ 袁金林² 袁莉¹ 袁仲曦¹ 袁慧君¹ 袁俊杰¹ 袁进华¹ 袁文丽¹ 袁秋帆¹ 袁李欣¹ 袁康伟¹ 袁磊¹ 袁洪¹ 袁祖国¹ 袁韩惠霞¹ 袁陆药丹¹ 第一军医大学¹ 病理学教研室 袁南方医院传染科² 广东 广州 510515 袁

摘要目的 从分子水平检测急性重症呼吸综合征(SARS)患者的病变组织中 SARS 病毒(SARS-associated coronavirus, SARS-CoV)的存在和分布情况遥方法 应用原位杂交技术检测因 SARS 死亡患者的肺脾脏淋巴结垂体胰腺甲状旁腺肾上腺胃肠道皮肤脑肝肾血管四肢横纹肌组织骨髓心脏卵巢子宫和睾丸等组织的 SARS-CoV RNA 的表达和定位遥结果 尸检组织多部位包括肺泡上皮细胞支气管及支气管浆液腺上皮细胞肺内单核/巨噬细胞脾脏和淋巴结的单核/巨噬细胞胰腺腺泡细胞垂体嗜酸性细胞肾上腺皮质细胞甲状旁腺嗜酸性细胞食道鳞状上皮胃肠道上皮细胞及胃粘膜壁细胞皮肤汗腺细胞脑神经元细胞肝细胞肾远曲小管上皮细胞骨髓早幼粒细胞及小静脉内皮细胞袁SARS-CoV RNA 阳性遥结论 SARS-CoV 可侵犯全身多种器官袁SARS-CoV 在机体的分布情况与冠状病毒受体 CD13 分布相似袁皮肤汗腺胃肠道上皮及肾远曲小管上皮细胞 SARS-CoV RNA 阳性对确定 SARS 传播途径具有重要意义遥

关键词急性重症呼吸综合征(SARS) SARS 相关冠状病毒(SARS-CoV)原位杂交

中图分类号 R511; R361.2 文献标识码 文章编号 000-2588 2003 11-1125-03

Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus RNA in autopsy tissues with in situ hybridization

ZHANG Qing-ling¹, DING Yan-qing¹, HOU Jin-lin², HE Li¹, HUANG Zhong-xi¹, WANG Hui-jun¹, CAI Jun-jie¹, ZHANG Jin-hua¹, ZHANG Wen-li¹, GENG Jian¹, LI Xin¹, KANG Wei¹, YANG Lei¹, SHEN Hong¹, LI Zhuo-guo¹, HAN Hui-xia¹, LU Yao-dan¹

Department of Pathology¹, Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital², First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS autopsy tissues at the molecular level. Methods In situ hybridization was used to detect the expression and location of SARS-CoV RNA polymerase gene in autopsy tissues from SARS-Cov-infected subjects, including the lung, spleen, lymph nodes, pituitary, pancreas, parathyroid, adrenal glands, gastrointestinal tract, skin, brain, liver, kidney, blood vessels, striated muscles of the limbs, bone marrow, heart, ovary, uterus and testicles. Result SARS-CoV RNA was detected in the cytoplasm of the alveolar epithelia, infiltrating mononuclear phagocytes in the lungs, serous gland epithelium of the trachea/bronchus, monocytes in the spleen and lymph nodes, acinar cells in the pancreas, acidophilic cells in the parathyroid and pituitary, adrenal cortical cells, epithelia of the alimentary tracts, gastric parietal cells, sweat gland cells, brain neurons, hepatocytes near the central vein, epithelia of the distal renal tubules, bone marrow promyelocytes, and endothelia of the small veins. Conclusions SARS-CoV invades various organs of the body and distributes in a similar fashion to CD13, the receptor of human coronavirus 229E. The detection of SARS-CoV in the sweat glands, alimentary tracts and epithelia of the distal convoluted tubules of the kidney may help identify the transmission routes of SARS-CoV.

Key words: severe acute respiratory syndrome; SARS-associated coronavirus; in situ hybridization

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袁

2003 年 4 月 17 日 WHO 正式确认一种新型冠状病毒是 SARS 的病原体袁并被命名为 SARS 病毒(SARS-associated coronavirus, SARS-CoV)遥为探讨 SARS-CoV 在机体的分布情况寻找 SARS 新的传播途径提供依据袁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 检测遥

收稿日期 2003-06-23

基金项目 国家自然科学基金 SARS 紧急启动项目 0340015 军队医药卫生 SARS 专项(03F016-2) 广东省 SARS 专项 D2003-80 SARS Emergency Research Project Supported by National Natural Science Foundation of China (30340015); SARS Control Foundation from the Army (03F016-2) and Guangdong Province (GD2003-80)

作者简介 张庆玲 1970- 女 河南潢川人 袁现为第一军医大学在读博士研究生 袁电话 20-61641888-89099, E-mail: zqllc8@fimmu.com,

通讯作者 袁彦青 E-mail: dyq@fimmu.com

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袁心源性猝死患者的相应组织为阴性对照遥分别取肺尧淋巴结尧脾脏尧胰腺尧甲状旁腺尧肾上腺尧食道尧胃肠道尧脑尧肝尧皮肤尧骨髓尧血管尧心脏尧四肢横纹肌尧卵巢尧子宫和辜丸等部位组织袁所有标本经 4% 多基甲醛固定袁所用试剂和相关器械经二乙基焦碳酸酯渊iethylprocar-bonate袁EPC冤处理和 / 或高压灭菌处理遥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 基因序列设计袁是以编码 SARS-CoV RNA 聚合酶基因的特异序列 (5'-ATGAATTAC-CAAGTCAATGGTTAC-3' 和 5'-GAAGCTATTCGT-CACGTTTCG-3') 分别合成的 cDNA 片段渊上海博亚公司合成冤上述两个探针分别按照地高辛标记试剂盒渊Boehringer-Mannheim 公司冤说明进行标记袁检测标记后的探针浓度为 1 滋/滋遥原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物技术公司遥

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 次袁胃蛋白酶消化袁室温 20 min 袁BS 漂洗 2 次袁蒸馏水洗 1 次袁预杂交液 37 益预杂交 3 h 袁往杂交液中同时加入上述两个寡核苷酸探针渊使其工作浓度分别为 5 滋/ml 袁7 益杂交过夜渊8 h 冤 袁 0.5 益 SC 和 0.2 益 SC 梯度漂洗袁封闭液 37 益封闭 30 min 袁生物素化抗地高辛抗体 37 益 60 min 袁链霉抗生物素蛋白渊ABC冤 7 益 20 min 袁生物素化过氧化物酶 37 益 20 min 袁BS 漂洗 袁DAB 显色袁苏木素复染遥每批染色均设阴性对照 (非 SARS 患者相应组织尧杂交液不加探针) 遥

1.3 原位杂交检测评价标准

原位杂交阳性信号为棕黄色袁位于细胞质内遥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袁无着色者为 渊袁阳性细胞数 <25% 为 渊袁阳性细胞数在 25%~50% 之间为 渊+袁阳性细胞数逸 50% 为 渊++袁

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渊表 1 冤而作为阴性对照的心源性猝死患者的各组织内则均无阳性表达现象遥

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尧免疫系统尧内分泌腺尧消化系统和胃肠道和肝脏尧泌尿系统尧造血系统尧骨髓和中枢神经系统的大脑神经元胞以及循环系统的小血管内皮而中枢神经系统的小

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	-	-	-	-

脑尧生殖系统的各器官和机体各肌肉组织则均未见阳性信号遥上述 SARS-CoV RNA 表达阳性的各系统袁其阳性细胞的部位也各有不同袁其中袁呼吸系统的阳性细胞主要包括肺泡上皮细胞尧支气管浆液腺上皮细胞和肺内浸润的单核 / 巨噬细胞袁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袁免疫系统的阳性细胞主要是淋巴结和脾脏的单核 / 巨噬细胞袁而淋巴细胞未见阳性表达袁内分泌系统阳性细胞主要表现在脑垂体嗜酸性细胞尧甲状旁腺嗜酸性细胞尧肾上腺皮质细胞尧外分泌腺阳性细胞主要表现在支气管浆液腺上皮细胞尧皮肤的汗腺细胞和胰腺腺泡细胞尧胃肠道阳性细胞主要集中在粘膜表面柱状上皮尧泌尿系统以肾远曲小管上皮细胞强阳性为特点袁而肾小球尧近曲小管和集合管均为阴性遥

3 讨论

SARS-CoV 是冠状病毒家族成员袁为正义单链 RNA 病毒袁长约 30 kb 袁其基因组结构与其他冠状病毒相似袁编码蛋白质主要有刺突蛋白 S 渊spike protein 冤膜蛋白 M 渊membrane protein 冤小分子膜蛋白 E

small membrane protein 核衣壳蛋白 Nucleocapsid protein SARS-CoV 没有该家族常有的血凝素酯酶 HE(hemagglutinin esterase) 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支气管 / 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甲状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

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

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

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 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:

- Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus Science, 2003, 300: 1399-404.
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome Science, 2003, 300: 1394-9.
- Rest JS, Mindell DP. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting Infect Genet Evol, 2003, 3(3): 219-25.
- Wentworth DE, Holmes KV. Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): Influence of N-linked glycosylation J Virol, 2001, 75(20): 9741-52.
- 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 Chin J Pathol, 2003, 32(3): 195-200.
- Ding YQ, Wang HJ, Shen H, et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China J Pathol, 2003, 200: 282-9.