

我国首次从艾滋病病人分离到 艾滋病病毒 (HIV)

曾 毅¹ 王必瑞² 邵一鸣¹ 赵尚德³ 苗学谦¹

提要 应用MT-4细胞,从1例美国籍来华旅游的艾滋病病人血液中分离到1株病毒,经间接免疫荧光试验和蛋白印迹法证明,所分离的病毒为HIV。这是在我国首次分离成功HIV病毒,为我国开展艾滋病诊断和防治提供了自己的毒株。本文还报告了分离病毒和制备蛋白印迹法抗原带的改进方法,可以推广。

关键词 艾滋病病人 艾滋病病毒

1981年首先发现艾滋病 (Acquired Immunodeficiency syndrome, AIDS), 随后, 这种严重致死性疾病在世界各地迅速蔓延。1983年法国Montagnier等^[1], 首先从一患淋巴腺病综合症 (Lymphadenopathy Syndrome, LAS) 的男性同性恋患者分离到一种新的逆转录病毒, 命名为淋巴腺病综合症相关病毒 (LIA)。1984年美国Gallo等^[2]也报告, 从艾滋病病人分离到逆转录病毒, 命名为嗜人类T淋巴细胞Ⅲ型病毒 (HTLV-Ⅲ), 后来称为LAV/HTLV-Ⅲ病毒或HTLV-Ⅲ/LAV病毒, 1986年统一称为人获得性免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)。为了预防和控制艾滋病在我国的流行, 我们从1984年开始进行艾滋病的血清流行病学调查研究^[3~5], 发现4例血友病病人在注射美国Amour公司生产的第八因子后, 感染了HIV, 产生HIV抗体。确诊了3例传入性艾滋病病人及7例HIV抗体阳性者。这些资料证实, HIV已于1983年通过血液制品传入我国, 感染了我国人民。随着我国对外开放政策的执行, HIV必将继续传入, 成为危险的传染源。已证明艾滋病毒HIV不只一型, 有HIV-1和HIV-2。此外, 还有与人HIV抗原有关的猴HIV病毒^[6]。因此, 从艾滋病病人或带HIV者分离HIV病毒十分必要, 了解其型别及为我国制备诊断抗原

及防治提供毒株。现报告从1例美国传入的艾滋病病人血液中分离到艾滋病毒。

材料和方法

一、血清: 1987年7月, 1例来华旅游的的美国公民, 因发病在昆明住进医院, 临床疑似艾滋病, 将此病人的血清送中国预防医学科学院病毒学研究所艾滋病研究检测中心检测HIV抗体。用ELISA、免疫荧光法、蛋白印迹法 (Western Blot) 和明胶颗粒凝集试验 (Gelatin Particle Agglutination test) 检查, HIV抗体阳性, 证实该病人患艾滋病。随即再抽血, 分离血清, 放液氮保存, 航运北京病毒学研究所艾滋病研究检测中心分离病毒。

二、细胞: MT-4细胞和H₉细胞

三、方法: 加1ml病人血清至含 1.5×10^6 MT-4细胞的试管中, 置37℃2小时。再加入4ml含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液, 放37℃培养, 每3天加入上述培养液1:2或1:3传代。定期用免疫荧光法检查细胞中是否有HIV抗原。如免疫荧光法检查HIV抗原阳性, 将细胞培养液上清接种MT-4细胞和H₉细胞传

1 中国预防医学科学院病毒学研究所

2 浙江医科大学传染病研究所在病毒所工作人员

3 云南省卫生防疫站

代, 并进一步用免疫荧光法和蛋白印迹法检查 HIV 抗原。

1. HIV 阳性血清: 为美国和法国艾滋病病人的血清, -20°C 保存。

2. 间接免疫荧光法: 为常规方法, 见文献^[3]。

3. 蛋白印迹法 (Western blot): 将免疫荧光染色阳性的细胞常规培养, 每 3 天传代一次, 培养至足够数量时收获细胞经 2000rpm10 分钟离心, 用 Hank 液洗细胞两次, 加蛋白提取缓冲液成 4×10^7 细胞/ml, 冻融三次后加等量样品缓冲液 (2 倍) 混匀, 放 100°C 水浴 3 分钟。参照文献 8 方法用 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 走电泳 (20mA) 4 小时, 电转 2 小时至硝酸纤维薄膜上。将膜浸在封闭液 (10% 牛血清 0.2% Tween-20 0.01M pH7.6 PBS) 中, 室温振荡封闭 1 小时。分别加入 HIV 阳性及阴性血清 (1:100), 室温振荡孵育 1 小时。用相同封闭液洗 40 分钟, 换液 4 次。加辣根过氧化物酶标记的 SpA (1:1000) 于封闭液中, 室温振荡孵育 1 小时, 继续用封闭液洗 40 分钟后再用 0.2% Tween-20 PBS 洗 5 分钟, 将膜置入酶底物液 (0.05% 二氨基联苯胺, 0.1M Tris-HCl, pH 7.6, 每 100ml 加入 $30\mu\text{l}$ 30% H_2O_2) 中显色, 用清水终止反应, 判断结果。同时用 HIV1 (LAV-1) 病毒感染的 Hut78 细胞制成蛋白印迹法抗原作比较。

结 果

一、病毒分离: 将 1ml 病人血清接种于 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的 MT 4 细胞中, 每 3 天传代一次。用艾滋病病人 HIV 抗体阳性血清定期检查是否有 HIV 抗原。在培养第 11 天的细胞中 (MT 4 - Ac) 发现少数细胞荧光阳性, 有 HIV 抗原。第 14 天 90% 以上的细胞都有 HIV 抗原, 结果见图 1 [本文插图均见插图第 (1、2) 页]。未接种病人血清的对照 MT-4 细胞, 用 HIV 抗体阳性血清检查结果仍为阴性。

二、病毒传代: 将培养 11 天发现有 HIV 抗

原的 MT-4 细胞上清液接种于 H_9 细胞 ($5 \times 10^5/\text{ml}$), 在 37°C 培养。每 3 天传代一次, 并检查 HIV 抗原。在培养第 6 天的 H_9 细胞中 (H_9 -Ac) 发现有 HIV 抗原; 用 HIV 阴性血清检查为阴性, 结果见图 2。由此可以确定, 此分离的病毒为 HIV 病毒, 命名为 HIV-AC-1 株。

三、蛋白印迹法: MT 4 细胞的蛋白转移条与 HIV 阳性及阴性血清反应时, 以及 MT4-Ac 细胞的蛋白转移条与 HIV 阴性血清反应时, 均无 HIV 特异性蛋白带出现; 而后者与 HIV 阳性血清反应时, 可见清楚的 HIV 特异性蛋白带, 如 p24、gp41、p55、p65、gp120 及 gp160 等, 结果见图 3。在 AC 株感染的 H_9 细胞中, 可见到 HIV 的蛋白带型, 此蛋白带型与 HIV-1 (LAV-1) 的蛋白带型相似。由此可证明, HIV-AC-1 株病毒属于 HIV-1 型, 结果见图 4。

讨 论

我们从 1 例美国籍来华旅游的典型艾滋病病人血清中分离到 1 株病毒。用艾滋病病人的 HIV 抗体阳性血清作间接免疫荧光检查, 证明所分离的病毒为 HIV, 其蛋白印迹带分布与 HIV-1 (LAV-1) 相似, 故属 HIV-1 病毒。这是在我国第一次分离成功 HIV 病毒, 为我国开展艾滋病诊断、制备抗原及防治等提供自己的毒株。

Harada 等报告^[7], MT-4 细胞对 HIV 很敏感。文献报告, 分离 HIV 病毒, 都是将艾滋病人的外周血淋巴细胞与经 PHA 激活的正常人外周血淋巴细胞共同培养, 此法较为复杂。我们直接用病人的血清感染 MT-4 细胞分离 HIV 成功。此法简便, 可作为 HIV 分离的常规方法。此外, 国外实验室或商业生产的蛋白印迹法抗原带, 都是大量培养病毒, 然后提纯抗原制备的, 步骤十分复杂。我们曾用 HIV (LAV-1) 感染 HIV102 细胞, 待 100% 细胞呈现 HIV 抗原阳性时, 直接用感染细胞制成蛋白印迹法抗原带, 获得满意的结果。本实验用分离到的病毒 (AC-1) 感染 H_9 细胞, 然后制成蛋白印迹法抗原带, 用

特异性艾滋病人血清, 鉴定此分离的病毒, 进一步证实为HIV病毒。

Isolation of human immunodeficiency virus from aids patient Zeng Yi, et al., Institute of virology, Chinese Academy of preventive Medicine, Beijing

A strain of virus was isolated from an American Aids Patient by using MT-4 cells. This virus was identified as human immunodeficiency virus (HIV-1) by means of immunofluorescence test and western blot assay. This virus was the first isolate of HIV-1 in china and can be used for Preparing the diagnostic reagents. The improved method for isolation of HIV and Preparation of western blot was reported.

Key words: HIV, Aids Patient

参 考 文 献

1. Barre-Sinoussi F, et al. Isolation of a T-ly-

mphotropic retrovirus from a Patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220: 868.

2. PaPovic M. et al. Detection, isolation, and continuous Production of cytoPathic retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. Science 1984; 224: 497.

3. 王必瑞, 等. 应用间接免疫荧光试验检测我国正常人和白血病人血清中嗜T淋巴细胞Ⅲ型病毒抗体. 病毒学报 1985; 1: 391.

4. 曾毅, 等. 血友病患者血清中淋巴腺病毒/人T细胞Ⅲ型病毒抗体检测. 病毒学报 1986; 2: 97.

5. 曾毅, 等. 艾滋病的血清流行病学调查研究. 中华流行病学杂志 1988; 9(3): 138.

6. Kanki PJ, et al. Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-3/LAV from wide-caught African Green Monkey. Science 1985; 230: 951.

7. Harada S, et al. Infection of HTLV-3/LAV in HTLV-1-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in plaque assay. Science 1985; 229: 563.

8. Wolf H, et al. III.1 standard procedures In: Course on Molecular Virology 1983.

国际流行病学协会地区性学术会议在泰国举行

国际流行病学协会(International Epidemiological Association, IEA)地区性学术会议, 于1988年1月24~29日在泰国帕塔亚(Pattaya)举行。国际临床流行病学网(International Clinical Epidemiology Network, INCLEN)会议和现场流行病学训练规划(Field Epidemiology Training Programs, FETPs)亚洲地区性会议与其联合举行。出席三个会议的有来自五大洲36个国家和地区的433位流行病学专家和有关工作者。我国参加这三个会议的共25人(包括台湾9人), 其中应邀参加国际流行病学协会地区性会议者3人。

会议共报告论文198篇, 其中国际流行病学协会地区性会议有论文63篇, 分别在全体会、专题讨论会和墙展发表。在全体会上报告的有美国Carl Taylor的“对于生存在1990年以后的儿童, 我们现在应该作些什么?”泰国朱拉隆功大学医学院院长Charas Suwanwela的“东南亚的流行病学和卫生”, 美国疾病控制中心Carl W. Tylor的“2000年流行病学的

实践——从霍乱到计算机”, 国际流行病学协会主席Holland的“流行病学和卫生实践”, 其他专家报告有“美国的伤害流行病学和监测”, “在中国和泰国吸烟对健康的影响”, “泰国的肿瘤流行病学”, “全球AIDS病现况”等。

专题报告包括有“流行病学监测”, “疟疾”, “昆虫传播疾病”“职业卫生”“东南亚环境卫生问题”, “初级卫生保健和环境卫生”, “疫苗可预防的疾病”, “心血管疾病”, “社会流行病学和肿瘤”等内容。我国参加国际流行病学协会地区性会议的名三代表均在专题会上宣读了论文。

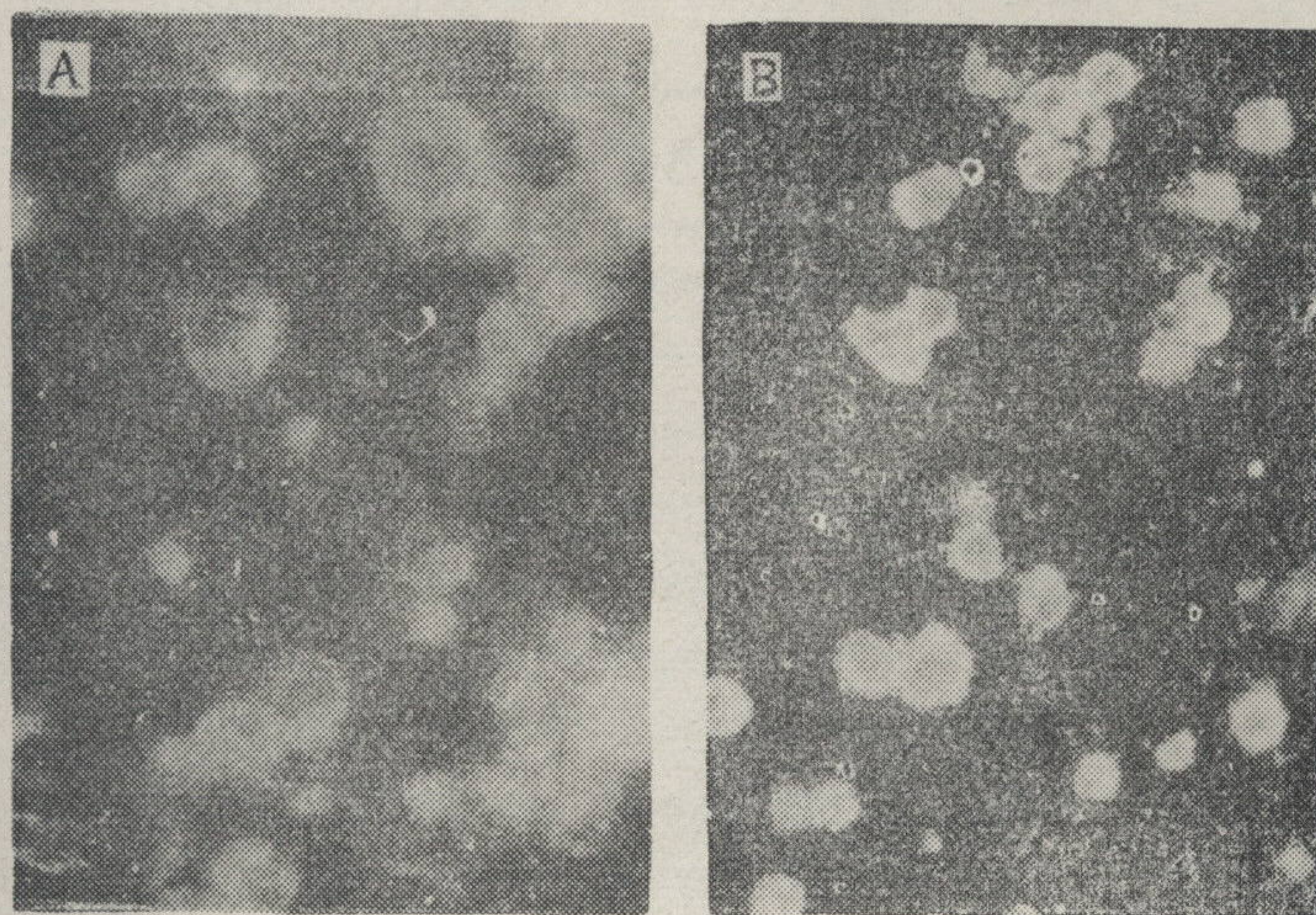
会议最后一天进行“东南亚流行病学教学工作讨论会”, 会议主持者还请我国代表简介了我国的流行病学教学情况。

本次会议使有关流行病学的三个国际组织联合在一起开会, 对于发展流行病学将起一定的作用。

(陆敏供稿, 曹家琪、耿贯一审)

我国首次从艾滋病病人分离到艾滋病病毒 (HIV)

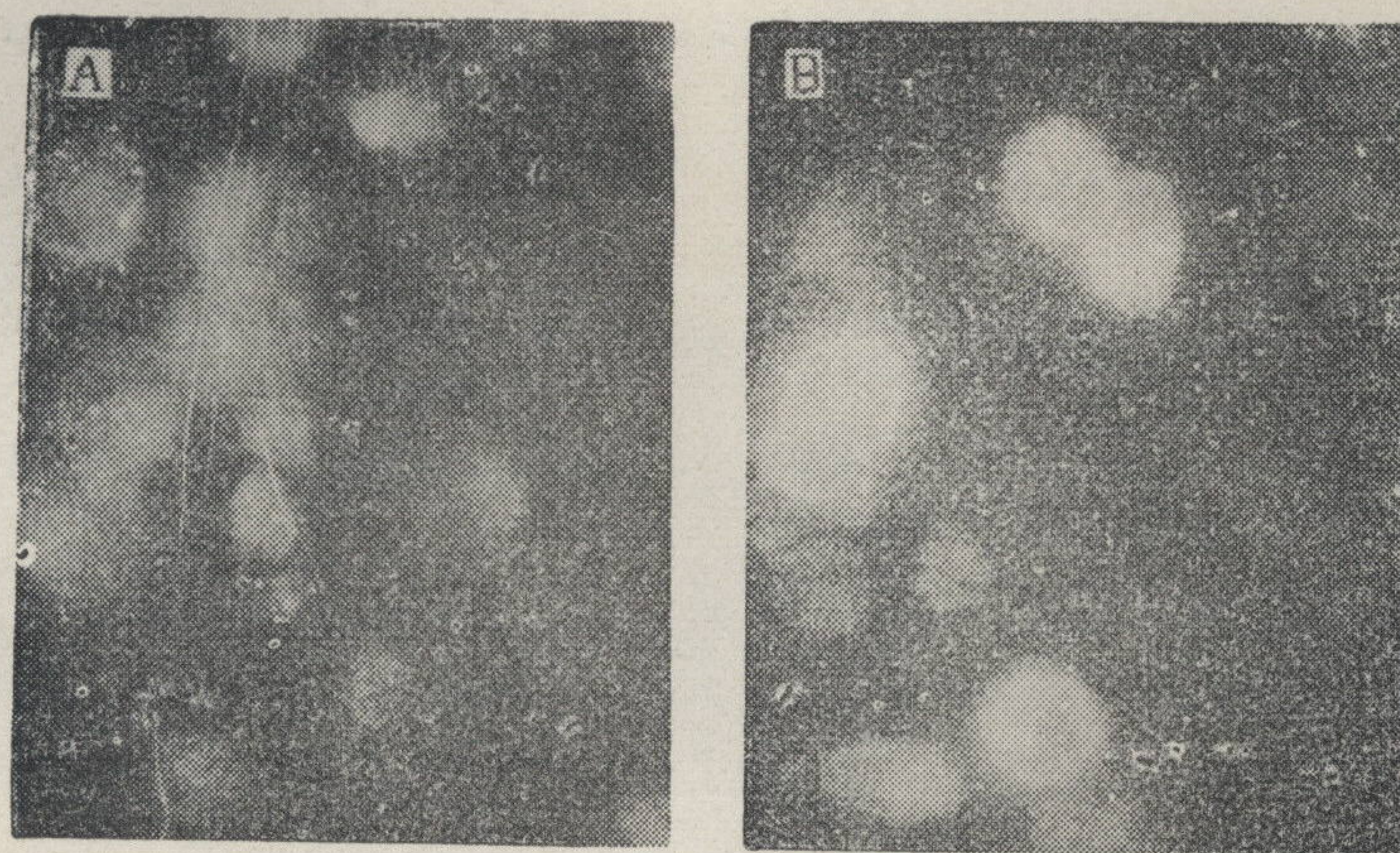
(正文见135页)



A. MT₄细胞 + HIV 阳性血清

B. 接种艾滋病工人血清后第14天的MT₄细胞 (MT₄-Ac) + HIV 阳性血清

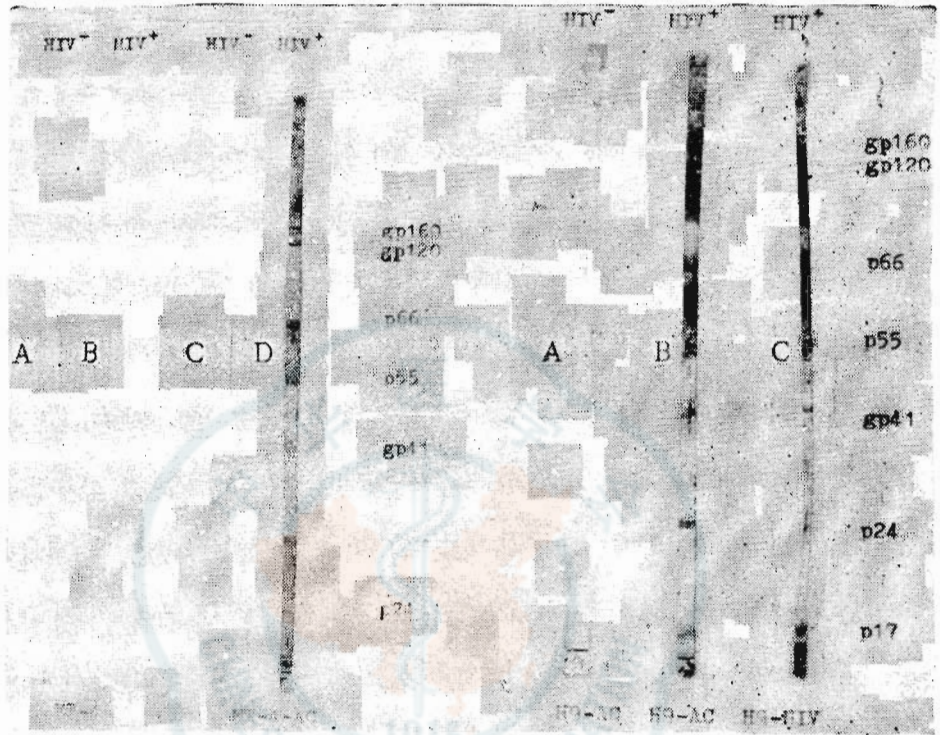
图1 接种艾滋病工人血清MT₄细胞的免疫荧光表现



A. H₉细胞 + HIV₁ 阳性血清

B. 接种MT₄-Ac细胞上清液后第6天的H₉细胞 + HIV₁ 阳性血清

图2 接种MT₄-Ac细胞上清的H₉细胞的免疫荧光表现



- A. MT₁细胞蛋白带与HIV₁阴性血清反应 无HIV特异性反应带
- B. MT₁细胞蛋白带与HIV₁阳性血清反应 无HIV特异性反应带
- C. MT₁-Ac细胞蛋白带与HIV₁阴性血清反应,无HIV特异性反应带
- D. MT₁-Ac细胞蛋白带与HIV₁阳性血清反应,可见HIV特异性的P24, gp41, P55, P66;gp120及gp160反应带

图3 MT₁细胞及接种艾滋病入血清的MT₁细胞 (MT₁-Ac) 蛋白印迹实验结果

- A. Ac株HIV感染的H₁细胞与HIV₁阴性血清反应 无HIV₁特异反应带
- B. Ac株HIV感染的H₁细胞与HIV₁阳性血清反应 可见HIV₁特异性的P17、P24、gp41、P55反
- C. HIV₁标准株感染的H₁细胞HIV₁阳性血清反应 同B

图4 标准HIV₁与Ac株HIV蛋白带形的比较

《艾滋病防治手册》征订启事

由卫生部卫生防疫司组织有关专家编写的我国第一部《艾滋病防治手册》，将于今年出版发行。本手册介绍艾滋病的最新知识、监测方案、防疫措施、个人防护及消毒方法等，并附录有关艾滋病的各种文件、诊疗法及标准，是一本带有指令性的手册，欢迎单位及个人订阅。每册定价1.30元，原征订截止日期为1988年31日，现延至1988年6月30日。

银行汇款 中国预防医学科学院流研所，北京昌平区人民银行沙河镇办事处，帐号 884144，请注明订“艾滋病手册”。

邮局汇款：北京昌平流字五号，《中华流行病学杂志》编辑部；附言栏内请注明订购“艾滋病手册”。