

· 实验研究 ·

汉坦病毒和恙虫病东方体复合感染的组织细胞培养研究

邓小昭 许可 孔晶 刁振宇 钱俊英 谈永飞 张矛 曹广文 张云

【摘要】 目的 了解汉坦病毒(HV)和恙虫病东方体(Ot)在宿主体内共生情况。方法 采用 Vero E6 细胞体外培养法研究 HV、Ot 在宿主细胞内共生特征。结果 5 组感染 Vero E6 细胞体外培养检测结果发现:先后、同时和单纯实验感染的 5 组细胞中,HV 和 Ot 先后、同时接种感染组在细胞传至第 3 代时检测均见有 HV 和 Ot 的双重感染,阳性率随传代次数增加而增加。而 HV 和 Ot 单纯分别感染组细胞传第 2 代时即可检测到 HV 和 Ot,阳性率亦随传代次数的增加而增加。在传代培养中单纯感染组的阳性率均显著高于先后和同时感染组。其结果均用 PCR 和 RT-PCR 进行了基因鉴定。结论 研究结果提示 HV 和 Ot 可在同一宿主细胞内共生,在感染初期有相互抑制作用;对 HV 和 Ot 的流行病学有一定的理论意义。

【关键词】 汉坦病毒;恙虫病东方体;宿主;组织细胞

Study on the coinfection of Hantavirus and *Orientia tsutsugamushi* in tissue cell culture DENG Xiao-zhao^{*}, XU Ke, KONG Jing, DIAO Zhen-yu, QIAN Jun-ying, TAN Yong-fei, ZHANG Mao, CAO Guang-wen, ZHANG Yun. *The Institute of Military Medicine, Nanjing Command, Nanjing 210002, China*

Corresponding author: ZHANG Yun, Email: zhanyun111@suhu.com; CAO Guang-wen, Email: guangwencao@yahoo.com

【Abstract】 Objective To investigate the possibility of Hantavirus (HV) and *Orientia tsutsugamushi*(Ot) coinfection in their hosts. **Methods** HV and Ot were used to infect Vero E6 cells cultured in vitro singly, simultaneously or successively. Genes of HV and Ot were identified in different generation cells with RT-PCR. **Results** Five experiment groups of infected Vero E6 cells were tested, the results were as follows: HV and Ot were both positive in infected Vero E6 cells passaged 2 times and the positive rate increased following the passaged times in HV and Ot infection groups, simultaneously or successively. However, in the groups which were infected with HV and Ot separately, the gene of HV or Ot could be detected in infected Vero E6 cells passaged only once and the positive rate increased following the times of the passaged. The positive rate was higher in the singly infected groups than in those infected simultaneously or successively. **Conclusion** Coinfection of HV and Ot did exist in the hosts while HV and Ot could inhibit each other in the initial infection stage.

【Key words】 Hantavirus; *Orientia tsutsugamushi*; Host; Tissue cell

肾综合征出血热(HFRS)和恙虫病分别为汉坦病毒(Hantavirus, HV)和恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*, Ot)感染危害严重的自然疫源性疾

病,在我国广泛流行^[1,2]。近年来调查发现江苏省北部、山东省等地区同时存在 HFRS 和恙虫病流行区,并有“四同”现象[同一地区,同一季节(秋冬型),同一宿主(黑线姬鼠),同一媒介(小盾纤恙螨)]^[3]。因此,进一步研究 HV 和 Ot 可否同时存在于同一媒介和宿主中,对 HFRS 和恙虫病的预防有重要的流行病学意义。2004 年我们用 HV 和 Ot 先后交替感染实验鼠发现 HV 和 Ot 可在实验鼠中双重感染并分别定位于鼠的肺脏和脾脏。1995 年日本学者 Tamura 等^[4]将 HeLa, Vero E6, BHK, McCoy and L 作为 Ot 的敏感细胞,其中 Vero E6 细胞又是 HV 的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471491);江苏省自然科学基金资助项目(BK 2005005);全军医学“十一五”科技攻关资助项目(06G65)

作者单位:210002 南京军区联勤部军事医学研究所(邓小昭、孔晶、刁振宇、张云);南京医科大学(许可);陕西省疾病预防控制中心(钱俊英);江苏省宜兴市人民医院(谈永飞、张矛);解放军第二军医大学(曹广文)

通讯作者:张云,Email: zhanyun111@suhu.com;曹广文,Email: guangwencao@yahoo.com

敏感细胞。为进一步了解 HV 和 Ot 共生意义,我们用 Vero E6 细胞体外培养方法进行 HV 和 Ot 实验感染研究,结果报告如下。

材料与方 法

一、材料

Vero E6 细胞购自中国科学院上海细胞所。HV 76-118株制备:感染小白鼠乳鼠第 5 代鼠脑,经研磨、冻融后,用 Eagle's 液制成 10% 悬液,4000 r/min 离心 30 min (4℃),取其上清液,TCID₅₀ 测定病毒滴度为 1500 TCID₅₀/ml,置 -20℃ 冰箱保存备用。Ot 毒株由郭恒彬教授惠赠,是福建省平潭岛恙虫病疫区黑线姬鼠分离株。Ot 感染小白鼠检测阳性的脾脏悬液 W/W,置 -20℃ 冰箱保存备用。HV 和 Ot 检测材料:① HV 陈株免疫血清效价 1:640,由安徽省医学研究所提供;② 抗兔 IgG 荧光抗体为上海生物制品研究所产品;③ Giemsa 染色材料由南京军区联勤部军事医学研究所药供室提供,检测方法见文献[5];④ 蛋白酶 K、溶菌酶等为上海生物工程公司产品;⑤ HV PCR 扩增及检测:设计 HV 76-118株的两个寡核苷酸引物,由上海 Sangon 公司合成经 PAGE 纯化;正向引物 5'-GCA TCATGTGAAGCCTTTTC-3' (1199~1218 nt),反向引物 5'-GCAGATGTGGCCCAACCATG-3' (1478~1497 nt)。PCR 扩增产物为 299 bp;试剂 AMV RTase 10× PC 缓冲液, dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品, PGEM-7zI/Hae III DNA Markers 为上海华美公司产品;⑥ Ot PCR 扩增及检测引物设计和合成参照郭恒彬等^[6]根据 Ot-sta56KDa 外膜蛋白基因部位序列设计,由上海生物工程公司合成。

二、方法

(一) HV、Ot 先后感染 Vero E6 细胞:

1. HV、Ot 先后感染组:将 Vero E6 细胞按 10⁵/ml 细胞数分别置于 25 ml 培养瓶内,每瓶 1 ml,加含 10% 胎牛血清 199 培养液 2 ml,置 37℃ 温箱内传代培养 2 d 后待细胞生长成单层,弃去培养液取上述 HV 0.5 ml 接种于培养瓶内,轻轻振摇待细胞面全部接触 HV 悬液后,置 37℃ 温箱吸附 2 h 弃去 HV 悬液,用 Hank 液洗涤 3 次,加含 10% 胎牛血清 199 培养液 3 ml。次日弃去培养液,加上述 Ot 脾悬液上清 0.5 ml 轻轻振摇待细胞面全部接触 Ot 液后再 37℃ 温箱吸附 2 h,弃去 Ot 悬液加含 10% 胎牛血清 199

培养液 3 ml 过夜,次日换维持液 3~4 d 换液一次,培养 6~7 d 后传代。传第 2 代始每次取细胞贴片用 IFAT 和 Giemsa 检测 HV 和 Ot 感染。

2. Ot、HV 先后感染组:同上 HV、Ot 先后感染组。将 Vero E6 细胞按 10⁵/ml 细胞数分别置于 25 ml 培养瓶内,每瓶 1 ml,传代培养待细胞培养成单层后,先接种感染 Ot,次日接种感染 HV。其接种、吸附、培养及 Ot、HV 感染检测均同上述 HV、Ot 先后感染组。

3. HV、Ot 同时感染组:Vero E6 细胞培养、接种、吸附及 HV、Ot 感染等均同上。其区别仅为 HV 悬液和 Ot 脾悬液各 0.5 ml,均匀混合后同时接种于 Vero E6 细胞单层,吸附 2 h 弃去换培养液。

4. HV、Ot 单纯感染组:Vero E6 细胞培养、HV、Ot 接种、吸附及 HV、Ot 接种后感染检测均同上述。其区别,该细胞仅单纯接种感染 HV 或 Ot。

(二) HV 和 Ot 感染 Vero E6 细胞 PCR 检测鉴定:

1. HV-RNA 和 Ot-DNA 模板制备:

(1) HV-RNA 的提取:取 10⁶/ml 感染细胞悬液 2 ml,在 -20℃ 冰箱反复冻融 3 次每次 1 h,然后 1000 r/min 离心 5 min (4℃),取上清 500 μl 置 1.5 ml 微型离心管内,按文献[7]提取 HV-RNA 制备 RNA 模板。

(2) Ot-DNA 的提取:按文献[6]略加改变。① 取 10⁶/ml 感染细胞悬液 2 ml 同上述方法冻融,1000 r/min 离心取上清 500 μl,加 1× TE 缓冲液,5000 r/min 离心 5 min,取沉淀;② 加入 400 μl 裂解缓冲液 [10 mmol/L Tris (pH 值 8.0), 0.1 mol/L EDTA, 0.5% SDS],蛋白酶 K 10 μl (20 mg/ml) 至终浓度 0.5 mg/ml,混匀,加溶菌酶 (4 mg/ml) 2 μl,50℃ 水浴 6 h;③ 加入等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1),混匀 3~5 min,5000 r/min 离心 5 min,取水相,重复③步骤 2~3 次;④ 取水相,加 1/10 体积 3 mol/L NaAc, RnaseA (10 mg/ml) 至终浓度 0.25~0.3 μg/μl,37℃ 孵育 30 min;⑤ 加 2.5 倍体积预冷的无水乙醇,置 -20℃ 过夜;⑥ 10 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次 (每次 10 000 r/min 离心 10 min),待乙醇挥发干净后,加 20 μl 无菌双蒸馏水溶解, -20℃ 备用。

2. RT-PCR 和 PCR 扩增产物的纯化:

(1) HV-RNA PCR 反转录反应:在 RT-PCR 30 μl 的反应体系中含 RNA 模板 5 μl, AMVRTase

1 μ l (5 U), 10 \times 反应缓冲液 3 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ l, 40 μ l RNasin 1.5 μ mol/L 外引物 1 μ l, 将此反应体系放入 42 $^{\circ}$ C 的温水中反应 1 h。反转录结束后, 94 $^{\circ}$ C 5 min 灭活反转录酶, 自然冷却至 30 $^{\circ}$ C。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 38 次循环, 最后一次循环延长 7 min, 取产物 2 μ l 用 2% 琼脂糖凝胶电泳紫外线下观察其阳性带。

(2) Ot-DNA PCR: 反应总体积为 50 μ l, 其中无菌三蒸水 36.75 μ l; 10 \times PCR buffer 5 μ l; 15 mmol/L MgCl₂ 2 μ l; 10 mmol/L dNTPs 3 μ l; Taq 酶 (5 U/ μ l) 0.25 μ l; 10 μ mol/L 引物 11 μ l; 10 μ mol/L 引物 21 μ l; DNA 模板 1 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取 PCR 产物 3~5 μ l 进行 2% 琼脂糖电泳, 紫外灯下可见 317~332 bp 带者为阳性。实验同时设阳性和阴性对照。

(3) PCR 扩增产物的纯化: 采用美国 Milipore 公司生产的 Ultrafree-DA, 一步离心法从琼脂糖中回收 DNA 片段。做法: 在紫外灯下切下包含目的片段的琼脂糖胶条 (约 100 mg), 将胶条放入碎胶器中, 5000 r/min 离心 15 min, 将碎胶器及 Ultrafree-MC 取出丢弃, 回收的产物留在回收管底部。加 2.5 倍体积的无水乙醇 -20 $^{\circ}$ C 过夜, 10 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次, 蒸干后, 加 20 μ l 无菌三蒸水重溶, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

结 果

1. 感染 HV、Ot 细胞生长情况: 5 组 Vero E6 细胞分别先后、同时和单纯感染 HV 和 Ot。除单纯感染组在分别接种感染 HV 和 Ot 细胞可经传 5 代 (每代 4~6 d), 第 5 代后细胞开始脱落、老化。先后和同时感染组细胞接种感染第二天有 5%~10% 细胞脱落, 镜下细胞生长缓慢, 传至第 2 代时细胞生长恢复正常, 第 4 代细胞开始老化、脱落; 较单纯感染组细胞生长较差。

2. 感染 HV、Ot 细胞阳性检测: 5 组 Vero E6 细胞分别先后、同时和单纯感染 HV 和 Ot 后, 其单纯感染组于传第 2 代时取细胞涂片用 IFAT 和 Giemsa 检测有 10% 左右细胞呈阳性反应 (表 1)。HV 感染细胞 IF 阳性颗粒分布于细胞核周围; 而 Ot 多为球杆状, 也有球形、短杆状、长杆状, 位于胞浆内或靠近核旁呈紫蓝色成堆排列, 以细胞浆多见。以后随着传代次数的增加而阳性率增加; 当传第 4 代时即有

80% 左右的细胞呈阳性。第 5 代细胞开始脱落难以再维持传代培养 (图 1)。HV 和 Ot 先后和同时感染组, 细胞在传第 2 代时, 涂片检查未见阳性反应。传第 3 代时涂片检查即有 5% 细胞呈阳性反应, 传至第 4 代和第 5 代 (存活组) 时, 阳性细胞数显著增加 (50%~80%) 其阳性颗粒, HV 多见于细胞核周围, 而 Ot 则多见于细胞浆内。在 5 组感染 HV 和 Ot 细胞检测发现, 在传代培养 2 代和 3 代时涂片检查其阳性率, 先后、同时和单纯感染组差异显著 ($P < 0.05$), 传至第 4 代后其感染细胞则无差异 ($P > 0.05$)。

表 1 HV、Ot 五种感染方式各组阳性率均数

感染方式	阳性率 (%)			
	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代
先 HV 后 Ot	0(4/6)	4.125(4/6)	56.75(4/6)	68.75(2/6)
先 Ot 后 HV	0(5/6)	5.50(5/6)	53.70(5/6)	67.50(1/6)
同时 HV、Ot	0(5/6)	5.90(5/6)	52.50(5/6)	78.50(3/6)
单纯 HV	6.40(5/5)	18.80(5/5)	70.20(5/5)	77.83(3/5)
单纯 Ot	6.80(5/5)	14.30(5/5)	69.10(5/5)	71.96(3/5)
P 值	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05

注: 括号内数据为感染组/实验组

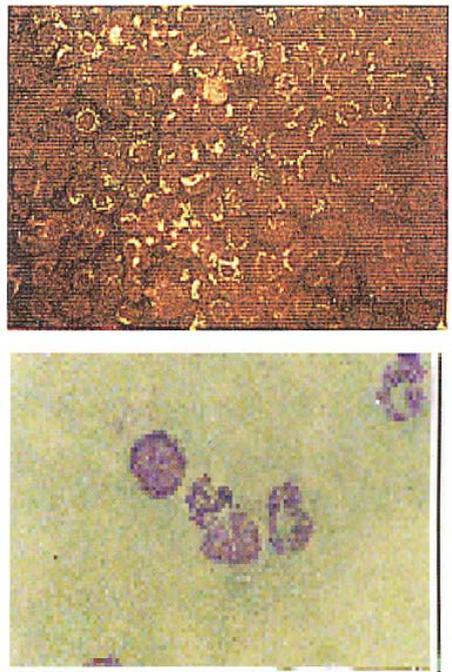
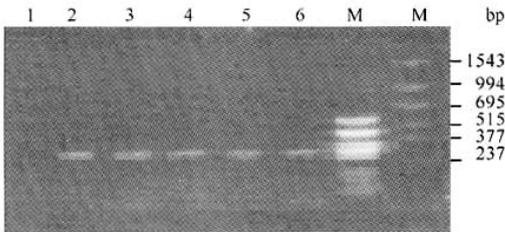


图 1 HV 和 Ot 感染 Vero E6 细胞 20 天后 IF 检测的 HV (上) 和 Giemsa 染色检测的 Ot (下) 图像

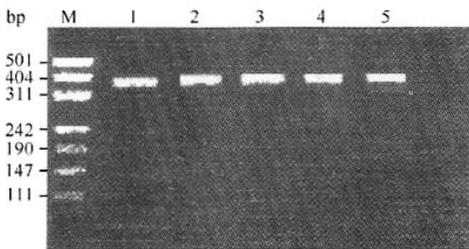
3. 感染 HV、Ot 的细胞用 PCR 检测鉴定: 取上述 5 组感染 HV 和 Ot 的 Vero E6 细胞, 用 IFAT 和 Giemsa 检测 HV 和 Ot 感染阳性细胞分别提取 HV-

RNA 和 Ot-DNA 制备 RNA 和 DNA 模板。用方法中各自引物扩增序列。取产物 5 μl 电泳溴化乙锭 (EB) 染色。结果凡 IFAT 和 Giemsa 检测阳性的细胞提取的 HV-RNA, 用组引物扩增后均有 299 bp 的阳性带 (图 2); 提取的 Ot-DNA 经引物 1 和 2 个扩增后均见有 317~332 bp 的扩增带 (图 3)。



1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: HV、Ot 先后感染组; 4: Ot、HV 先后感染组; 5: HV、Ot 同时感染组; 6: HV 单纯感染组

图2 HV 和 Ot 感染 5 组 Vero E6 细胞 20 天后 HV PCR 检测结果



1: Ot 单纯感染组; 2: HV、Ot 先后感染组; 3: Ot、HV 先后感染组; 4: HV、Ot 同时感染组; 5: 阳性对照组

图3 HV 和 Ot 感染 5 组 Vero E6 细胞 20 天后 Ot PCR 检测结果

讨论

20 世纪 80 年代我们课题组的研究证明, 小盾纤恙螨和黑线姬鼠分别为 HV 和 Ot 的媒介和宿主动物。2004 年我们用 HV 和 Ot 先后分别和同时感染小白鼠, 发现 HV 和 Ot 在实验鼠间有双重感染现象。为进一步证明 HV 和 Ot 对宿主动物双重感染的可能性, 用 Vero E6 细胞体外培养, 接种 HV 和 Ot, 观察 HV 和 Ot 在 Vero E6 细胞内感染情况。结果提示 HV 和 Ot 在同一宿主细胞内可共生。但在感染初期, 不同的感染方式镜检病原体阳性率存在显著差异: 单纯感染组在细胞传至第 2 代时阳性感染率已达到 6%, 而复合感染组尚未见感染阳性细胞, 推测原因可能是 HV 和 Ot 两种病原体在感染细

胞的过程中存在一定的相互抑制作用, 可能是竞争细胞表面的作用受体; 而在细胞传至第 4 代时, 感染阳性率已无显著差异, 可能是病原体经过一定的入侵阶段, 在细胞内有不同的定位, 可以各自繁殖造成。而 HV、Ot 以不同方式复合感染的各组间, 细胞感染阳性率未得到统计学差异。一种病原体的优先感染并未抑制另外一种病原体的感染, 一方面说明 HV 和 Ot 对 Vero E6 细胞的感染能力没有明显的强弱之分, 另一方面说明这两种病原体的同时存在彼此毒力不会削弱。

本研究在实验动物小白鼠体内检测到 HV、Ot 的复合感染, 在此研究基础上, 成功地进行了 Vero E6 细胞的 HV、Ot 复合感染, 这一研究为证明自然界中存在 HV、Ot 的复合感染提供了初步依据, 但需要得到自然感染的研究资料, 才能进一步明确这两种病原体在自然界中对同一宿主的复合感染存在的可能性, 以及感染后病原体在媒介和宿主体内的繁殖情况等。

该研究结果对探讨出血热和恙虫病自然疫源地的维持有重要的流行病学意义。在 HFRS 和恙虫病的疫区, 应考虑同时监测 HV、Ot 的同一宿主和媒介携带这两种病原体, 可能条件下对相应临床患者进行两种病原体的检测。

参考文献

- 1 张云, 陶开华, 赵学忠, 等. 流行性出血热传播途径研究. 中华预防医学杂志, 1994, 28: 132-135.
- 2 吴光华. 华东地区三种类型恙虫病自然疫源地调查. 中华流行病学杂志, 2000, 21: 34-38.
- 3 Wu GH, Zhang Y, Guo HB, et al. The role of *Leptotrombidium scutellare* in the transmission of human diseases. Chin Med J, 1996, 109: 670-673.
- 4 Tamura A, Urakami H, Murata M, et al. Microbiological aspects of *Rickettsia tsutsugamushi*. In: Akiyoshi Kawamura YA, Hiroshi Tanaka, Akira Tamura, eds. Tsutsugamushi disease. Japan: University of Tokyo Press, Tokyo, 1999. 35-95.
- 5 吴光华, 杨佩英, 唐家琪, 主编. 八种重要传染病的防治. 北京: 人民军医出版社, 2001. 43, 307.
- 6 郭恒彬, 吴光华, 唐家琪, 等. 应用 nPCR 发现我国 Kawasaki 型恙虫病立克次体. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11: 22-24.
- 7 张云, 朱进, 邓小昭, 等. 用分子生物学方法检测螨体内汉坦病毒研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17: 107-111.

(收稿日期: 2005-08-25)

(本文编辑: 张林东)