

电镜观察从非典型肺炎患者尸检标本中发现衣原体样和冠状病毒样颗粒

洪涛 王健伟 孙异临 段淑敏 陈良标 屈建国 倪安平 梁国栋
任丽丽 杨仁全 郭岚 周为民 陈杰 李德新 许文波 徐红
郭元吉 戴淑玲 毕胜利 董小平 阮力

【摘要】 目的 探索 2002 年末暴发于广东等地的非典型肺炎的病原。方法 对来自广东、山西、四川省和北京市的 7 例非典型肺炎死亡病人的尸体解剖标本进行超薄切片电镜观察, 将病人肺组织提取物接种于 293 细胞(人胚肾转化细胞系), 分离病原, 对病人组织中和分离的病原进行免疫学鉴定。结果 超薄切片电镜观察, 在死亡患者的肺(7 例)、脾(2 例)、肝(2 例)、肾(3 例)和淋巴结(1 例)中均观察到衣原体样包涵体和网质小体、中间体、原生小体颗粒的存在, 并在 3 例病人肺组织中同时见到了冠状病毒样颗粒和未知的基质样结构。用 RT-PCR 方法从 2 例病人肺组织中扩增出冠状病毒 RNA 聚合酶基因片段。将病人肺组织提取物接种于 293 细胞进行培养, 取第 2 代细胞作电镜观察, 也发现衣原体样颗粒和包涵体的存在。在病人组织和培养细胞中见到的衣原体样颗粒均不能与衣原体属特异性抗体和抗肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体抗体反应, 提示可能为新的衣原体样因子。结论在死亡病人组织和培养细胞中发现的衣原体样和冠状病毒样颗粒, 可能是广东等地暴发的非典型肺炎的主要病原。

【关键词】 衣原体科; 冠状病毒科; 显微镜检查, 电子; 非典型肺炎

Chlamydia-like and coronavirus-like agents found in dead cases of atypical pneumonia by electron microscopy HONG Tao*, WANG Jian-wei, SUN Yi-lin, DUAN Shu-min, CHEN Liang-biao, QU Jian-guo, NI An-ping, LIANG Guo-dong, REN Li-li, YANG Ren-quan, GUO Lan, ZHOU Wei-min, CHEN Jie, LI De-xin, XU Wen-bo, XU Hong, GUO Yuan-ji, DAI Shu-ling, BI Sheng-li, DONG Xiao-ping, RUAN Li. *Institute of Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China*
Corresponding author: HONG Tao (Email: hungt@public3.bta.net.cn)

【Abstract】 Objective To explore the causative agents of the atypical pneumonia (also SARS) occurred recently in some regions of our country. **Method** Organ samples of 7 dead cases of SARS were collected from Guangdong, Shanxi, Sichuan Provinces and Beijing for electron microscopic examination. 293 cell line was inoculated with the materials derived from the lungs to isolate causative agent(s). The agents in the organs and cell cultures were revealed by immunoassay. **Results** Both Chlamydia-like and coronavirus-like particles were found in EM. Inclusion bodies containing elementary bodies, reticulate antibodies and intermediate bodies of Chlamydia-like agent were visualized in multiple organs from the 7 dead cases, including lungs(7 cases), spleens(2 cases), livers(2 cases), kidneys(3 cases) and lymph nodes(1 cases), by ultrathin section electron microscopy (EM). In some few sections, coronavirus-like particles were concurrently seen. A coronavirus RNA- polymerase segment (440 bp) was amplified from the lung tissues of two cases of the SARS. After inoculated with materials from the lung samples, the similar Chlamydia-like particles were also found in the inoculated 293 cells. Since the Chlamydia-like agents visualized in both organs and cell cultures could not react with the genus specific antibodies against Chlamydia and monoclonal antibodies against *C. pneumoniae* and *C. psittaci*, the results might well be suggestive of a novel Chlamydia-like agent. **Conclusion** Since the novel Chlamydia-like agent was found co-existing with a coronavirus-like agent in the dead cases of SARS, it looks most likely that both the agents play some roles in the diseases. At the present time, however, one can hardly determining how did these agents interact each other synergetically, or one follows another, need further study.

作者单位: 100052 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(洪涛、王健伟、段淑敏、毕胜利、陈良标、屈建国、梁国栋、任丽丽、杨仁全、郭岚、周为民、李德新、许文波、徐红、郭元吉、戴淑玲、董小平、阮力); 北京市神经外科研究所电镜室(孙异临); 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院检验科(倪安平), 病理科(陈杰)

通讯作者: 洪涛 (Email: hungt@public3.bta.net.cn)

【Key words】 Chlamydiaceae; Coronaviridae; Microscopy, electron; Atypical pneumonia

自 2002 年 11 月中旬开始,我国广东省境内出现了一种不寻常的传染病——非典型肺炎(atypical pneumonia),该病最近被世界卫生组织(WHO)暂时定名为严重的急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)。据 WHO 统计,截至 2003 年 3 月 25 日,累及 15 个国家和地区,其中包括我国的广州、香港特别行政区、山西、广西和北京等地以及越南、泰国、德国、加拿大和美国的个别城市。死亡患者尸体解剖见全肺严重充血肿胀,呈肝样实变;有的尸体胸腔大量积水,腹腔也有积水,积水有的呈血性;肝、脾、肾等多器官充血、肿胀。我们对来自广东、山西、四川、北京等地的 7 例非典型肺炎死亡患者的尸检器官样品和组织培养细胞进行了电镜观察,以探索此次流行的非典型肺炎的病原。

材料与方法

一、材料

1. 尸检标本:取自 7 例在本次流行中死亡并被确诊为非典型性肺炎的病人,死亡后进行尸体解剖,并采集脏器组织标本。其中 4 例来自广东省(编号为 1~4),标本由广东省疾病预防控制中心提供;1 例来自山西省(编号为 5);1 例来自北京佑安医院(编号为 6);1 例系香港病人,死于成都(编号为 7),标本由四川省疾病预防控制中心提供。非肺炎的肺癌病人切除组织由北京同仁医院提供。

2. 细胞系:293 细胞(人胚肾转化细胞系)由本所病毒保藏中心提供。

3. 抗原、抗体与试剂盒:鹦鹉热衣原体抗体分别由北京协和医院检验科和军事医学科学院五所端青研究员提供,鹦鹉热衣原体与肺炎衣原体阳性对照免疫荧光片、肺炎衣原体和衣原体属特异性抗体由北京协和医院检验科提供。肺炎衣原体 IgM、IgG 诊断试剂盒购自华美试剂公司。FITC 标记的抗人 IgG、IgM 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。Trizol 试剂逆转录酶 Superscript II、Taq 酶购自美国 Invitrogen 公司。

二、方法

1. 电镜标本的制作:所有尸检标本经戊二醛固定后,进行超薄切片和电镜观察,具体方法参见文献[1]。

2. 病理标本的制作:尸检肺组织经甲醛固定、灭活后,按常规方法[2,3]进行包埋和病理组织切片。

3. 病原分离培养:具体方法参见文献[4]。尸检肺组织经研磨后,离心去除组织块,取上清,经孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤和青、链霉素、红霉素处理后,接种于 293 细胞,37℃培养,传 2 代后进行电镜观察。

4. 间接免疫荧光和免疫组织化学:均按常规方法[2,3,5]进行。

5. 冠状病毒 RNA 聚合酶基因的巢式 RT-PCR 检测:按 WHO 提供的方法[6]进行。将部分病人肺组织做成 20%匀浆后,用 Trizol 试剂提取 RNA(按产品说明书进行),首先用随机引物进行逆转录反应,42℃,60 min。然后,取 5 μl 逆转录产物为模板进行第一轮 PCR 反应,引物序列为 C1: 5' GGGTIGGGACTATCCTAAGTGIGA 3', C2: 5' TAA-CACACAAACACCATCATCA 3',反应条件为 94℃,1 min, 52℃,1 min, 72℃,1 min。共进行 30 个循环。然后取 5 μl 第一轮 PCR 产物为模板,进行第二轮 PCR,引物序列为 C3: 5' GGTIGGGACTAT-CCTAAGTGIGA 3', C4: 5' CCATCATCAGATAGAA-TCATCATA 3',除了将退火温度降为 49℃外,其余条件与第一轮 PCR 相同。最后取 5 μl PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,将目的 DNA 片段回收后进行 DNA 序列分析。

结 果

一、在尸检组织中发现衣原体样颗粒

将 7 例死亡患者的组织标本经超薄切片行电镜观察,在肺等多个脏器中均发现了衣原体样颗粒的存在(表 1)。在肺、脾、肝、肾和淋巴结组织里都发现了衣原体的包涵体和相应组成包涵体的网质小体(reticulate body)、中间体(intermediate body)和原生小体(elementary body)(图 1A、B)。包涵体位于细胞质

表 1 7 例非典型肺炎患者尸检组织标本中衣原体样颗粒的电镜检查结果

病例序号	来源	肺	脾	肝	肾	淋巴结	心
1	广东	+	UA	UA	UA	UA	UA
2	广东	+	UA	UA	UA	UA	UA
3	广东	+	UA	UA	+	UA	UA
4	广东	+	+	+	+	UA	—
5	山西	+	+	+	+	+	—
6	北京	+	UA	UA	UA	UA	UA
7	四川	+	ND	ND	ND	ND	ND

注:+, 阳性;—, 阴性;UA, 未得到标本;ND, 未做

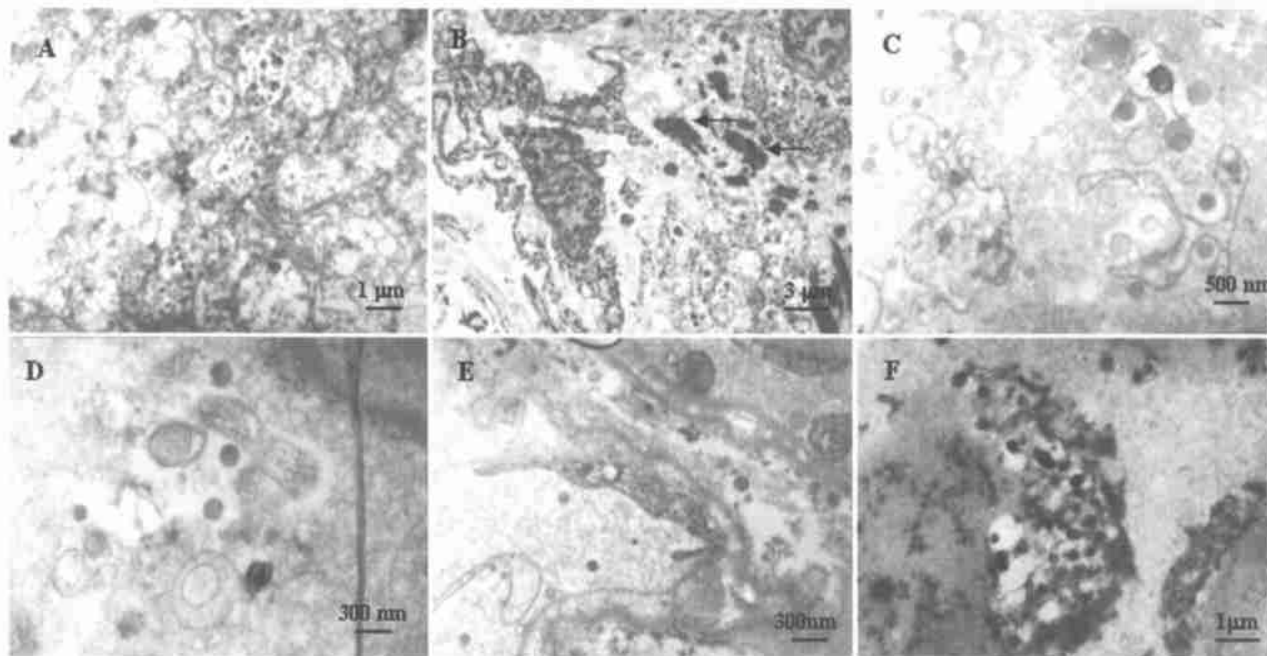


图1 非典型肺炎死亡病人脏器标本电镜观察见到的衣原体样颗粒(A: 5号患者的肝组织; B, C: 2号患者的肺组织; D: 3号患者的肺组织; E, F: 2号患者的肺组织)

内,呈空泡状,一个细胞中往往可见多个包涵体,有时包涵体很大,占据整个细胞质,使细胞膨胀,细胞核被挤压到细胞的一边,而变形或浓缩碎裂,而且常见细胞核深深的块状坏死。衣原体颗粒的形态结构基本上与鹦鹉热衣原体相同,网质小体较大,约 $0.3 \sim 1.0 \mu\text{m}$,呈圆型或椭圆型,质地比较松散,内含细小分散的透明颗粒,外周有明显的一层外膜状物包裹。中间体体积比网质体小,约 $0.2 \sim 0.8 \mu\text{m}$,呈多型性,其内常可见到偏心而浓密的核样物,以切面不同,显出不同的形态和大小,颇似人类免疫缺陷病毒颗粒(图1C、D);原生小体更加浓缩,电子致密,而且体积很小,大多在 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$ 左右,在其内部见不到任何结构,在高倍放大下,可见一层松散、弯曲的薄膜包绕。上述衣原体样颗粒同时可在肺泡内渗出物中见到,此时往往以原生小体为多,有的可见少量冠状病毒样颗粒(图1E)。包涵体也常常可在坏死脱落的肺泡上皮细胞内见到,在此情况下,原生小体往往成了包涵体的主要成分(图1F)。

二、在尸检组织中同时发现冠状病毒样颗粒

在3号、4号和7号病人的肺组织细胞的胞质内,除了衣原体样颗粒外,还见到了疑似冠状病毒样颗粒(图2A、B),其大小约 $100 \sim 150 \text{ nm}$,在电子致密的核心外周隐约可见少量纤突状结构。此外,在病人肺组织超薄切片上还见到着色很深的、似由很细的纤维组成的不明结构。另外,在发现衣原体的

细胞质里偶尔见到细胞内膜曲折回转,在其胞质中见到电子致密的基质样结构(图1B箭头所示),其性质未明,有待研究。

三、从病人肺组织中检测到冠状病毒 RNA 聚合酶基因片段

利用巢式 RT-PCR 方法,我们从4号、7号死亡病人肺组织中扩增出长度为 440 bp 的冠状病毒 RNA 聚合酶基因片段(图3),序列分析表明我们获得的 cDNA 序列与 WHO 公布的序列是一致的,并且从2例患者肺组织中扩增出的基因序列也是一致的,但没有患非典型肺炎的肺癌病人切除肺组织中扩增出冠状病毒基因,表明非典型肺炎病人肺组织中有冠状病毒的存在。对于更多病人组织标本中冠状病毒基因的检测还在进行中。

四、在培养细胞中分离到衣原体样颗粒

将3号、4号、5号病人肺组织提取物接种于293细胞,4 d后细胞出现聚集、圆缩、脱落等病理改变。细胞培养中第2代出现上述病理改变的时间为4 d,第3代为7 d,第4代为12 d。收集第2代细胞进行超薄切片电镜观察,见细胞质内充满大量的衣原体样网质小体、中间体和原生小体(图4),其清晰度优于尸检组织。正常对照细胞中未见到衣原体样颗粒。

五、血清学特征

鉴于在死亡病人组织中看到了大量的衣原体样

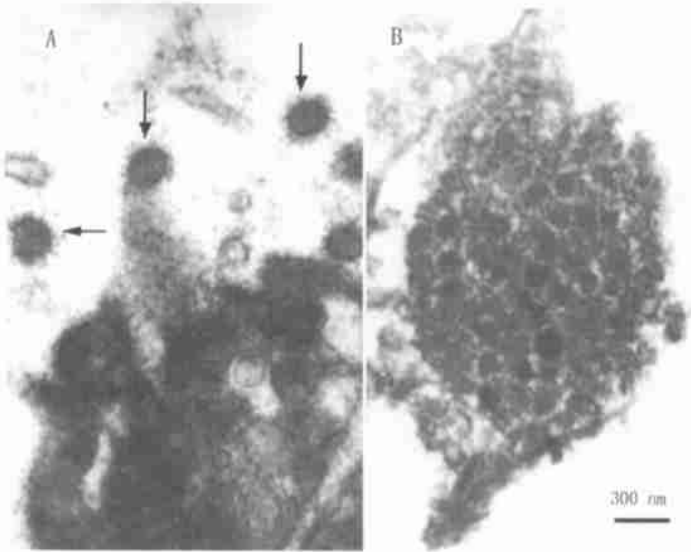
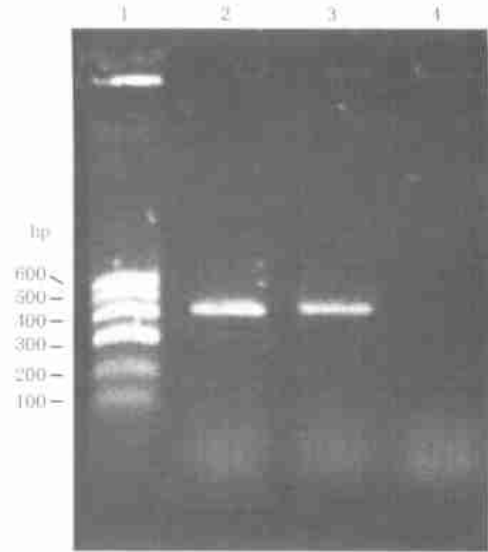


图 2 非典型肺炎死亡病人肺组织切片电镜观察见到的疑似冠状病毒样颗粒(A: 3 号病人的肺组织, 箭头示冠状病毒样颗粒; B: 7 号病人的肺组织)



1 DNA markers; 2. 4 号病人肺组织; 3. 7 号病人肺组织; 4. 肺癌病人肺组织
图 3 非典型肺炎死亡病人肺组织中冠状病毒 RNA 聚合酶基因片段的巢式 RT-PCR 扩增

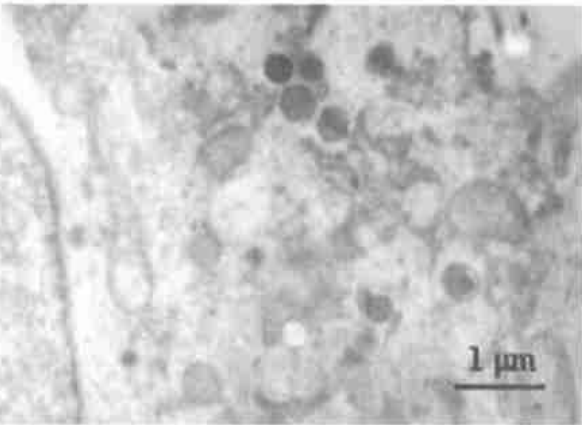


图 4 接种非典型肺炎死亡病人肺组织提取物的第 2 代 293 细胞培养物的电镜观察, 见大量衣原体样颗粒

结压片后, 分别用来自广东省和山西省的 13 份病人血清, 进行免疫荧光检测, 全部为阳性, 说明淋巴结中含有本次非典型肺炎暴发的病原, 但是, 用衣原体的属特异性荧光抗体检测却为阴性, 说明已知的肺炎、鹦鹉热等衣原体不是非典型肺炎的病原。

表 2 非典型肺炎死亡病人组织和细胞培养物对衣原体抗体的免疫检测结果

标本	属特异性抗体	肺炎衣原体抗体	鹦鹉热衣原体抗体
2 号肺 * △	—	—	—
3 号肺 *	—	—	—
4 号肺 *	—	—	—
5 号淋巴结 △	—	ND	ND
培养细胞物 △	—	ND	ND

注: —: 阴性; ND: 未做; *免疫组织化学法; △免疫荧光法

讨 论

我们在来自不同地区(广东省、山西省、四川省和北京市)不同医院的非典型肺炎患者的尸检肺、肝、脾、肾等器官里看到了衣原体样颗粒, 在 3 例病人肺组织标本中还同时看到了冠状病毒样颗粒。相继将尸检肺组织进行了培养细胞和传代, 所接种的 293 细胞出现病变, 超薄切片电镜观察证明所见的细胞病理变化由衣原体样颗粒所致, 分离的衣原体毒株已传代 4 次, 但与已知的衣原体抗原性不同。这些初步结果提示一种新的衣原体样因子很可能是此次非典型肺炎的致病或死亡的病因之一。

衣原体(Chlamydia)是一类严格的真核细胞内寄

颗粒, 为了对其进行定性, 我们首先调查了病人血清中肺炎衣原体抗体的存在情况, 对 107 份来自广东的非典型肺炎病人血清进行了检测, 只有 15 份 IgM 为阳性, 因此肺炎衣原体不可能是非典型肺炎的病原。

为了确定我们所看到的衣原体样颗粒是否为已知的衣原体, 我们将病人肺组织切片后, 分别用衣原体属特异性单克隆抗体和肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体种单克隆抗体进行免疫组织化学和间接免疫荧光检测, 结果均为阴性(表 2)。将组织培养物用衣原体属特异性抗体进行检测, 结果也为阴性。这些结果提示, 我们所见到的衣原体样颗粒的抗原性与现有已知的衣原体是不同的。进而将 5 号病人的淋巴

生的原核生物, 目前被划分到衣原体科, 该科只有一个衣原体属, 其中沙眼衣原体、肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体和兽衣原体是 4 个最主要的种, 已知肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体能引起人类肺炎。衣原体能通过细菌滤器, 对粘膜表面的柱状上皮有嗜性。形态为圆形或椭圆形, 具有细胞壁, 其组成与革兰阴性菌相似, 含有 DNA 和 RNA 两类核酸。对多种抗生素, 尤其是大环内酯类抗生素敏感。衣原体目前被认为是社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia) 的重要病因^[5, 7-10]。虽然衣原体已经被发现多年, 但是人类对其认识还远远不够。近年来, 国际上报道了一些新的衣原体样因子, 如副衣原体科 (Parachlamydia acanthamoebae) 和 Simkania negevensis, 这些因子与医院内感染和社区获得性肺炎有关^[11, 12]。基于我们电镜研究的初步结果, 我们认为所见到的衣原体样颗粒可能是一种新的, 也许是变异的衣原体。因为除了上述证据之外, 还有以下一些间接证据, 即临床上此病对大多常用的抗生素不敏感, 如大环内酯类抗生素; 病原的毒力强, 传播快, 病人白细胞不仅没有显著升高, 相反往往出现明显降低的情况。目前我们正在使用衣原体多克隆抗体、补体结合试验和免疫组织化学、原位杂交等实验进行进一步鉴定。

冠状病毒 (coronavirus) 是一种 RNA 病毒, 因形似王冠而得名, 其形态为圆形、椭圆形或轻度多形性, 直径为 100 ~ 120 nm, 表面的棒状突起长约 20 nm, 外面有脂质双层膜。该病毒在世界范围内广泛存在, 感染多发于冬春季。冠状病毒感染可造成上呼吸道疾患、肺炎、腹泻等, 人类和动物感染率很高, 但严重疾病的暴发迄今未见报道^[12]。目前不能排除变异的冠状病毒引起本次暴发疫情的可能。

当前, 关于非典型肺炎的病原学研究出现了复杂的局面。经过国家疾病预防控制中心和广东省专家的努力, 目前已经排除了细菌、支原体、鹦鹉热衣原体、肺炎衣原体、腺病毒、汉坦病毒、流感病毒、麻疹病毒等多种可能引起肺炎的病原。近来 WHO 和有关研究单位宣布分离到一种新的冠状病毒, 并把非典型肺炎改称为冠状病毒肺炎 (coronavirus pneumonia)。我们认为, 在新的疾病出现初期, 关于病原的研究出现不同的报道是不足为奇的。在本文 7 例尸检标本的研究中, 我们在发现衣原体样因子的同时, 也特别关注其他可能的病原, 并在 3 例肺标

本中也见到了冠状病毒样颗粒, 其本质为何, 尚需进一步研究。我们也从 2 例肺组织中, 利用 RT-PCR 技术扩增出与国外报道的序列一致的冠状病毒 RNA 聚合酶基因片段, 表明冠状病毒的存在。究竟衣原体样因子和冠状病毒在非典型肺炎的发病和死亡中发挥何种作用, 尚需要进一步的研究。

志谢 广东省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、第一军医大南方医院、北京神经外科研究所、北京协和医院、军事医学科学院和北京同仁医院给予大力协助

参 考 文 献

- 1 洪涛, 主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 北京: 科学出版社, 1980.
Hung T, ed. Biomedical ultrastructure and electron microscopic technology. Beijing: Science Press, 1980.
- 2 D.L. 斯佩克特, R.D. 戈德曼, L.A. 莱因万德, 编. 细胞实验指南. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2001.
Spector DL, Godman RD, Leinwand LA, eds. Cells laboratory manual. Huang PT, Transl. Beijing: Science Press, 2001.
- 3 纪小龙, 施作霖. 诊断免疫组织化学. 北京: 军事医学科学出版社, 1997.
Ji XL, Shi ZL, eds. Diagnostic immunohistochemistry. Beijing: Military Medical Sciences Press, 1997.
- 4 黄桢祥, 主编. 医学病毒学基础及实验指南. 北京: 科学出版社, 1990.
Huang ZX, ed. Basic medical virology and experimental manual. Beijing: Science Press, 1990.
- 5 倪安平, 林光宇, 杨玲, 等. 肺炎衣原体、沙眼衣原体及鹦鹉热衣原体在不同人群中的血清流行病学调查研究. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13: 69-71.
Ni AP, Lin GY, Yang L, et al. Seroepidemiological investigation on C. pneumoniae, C. trachomatis and C. psittaci in different population. Chin J Zoonosis, 1997, 13: 69-71.
- 6 Preiser W. Personal Communication. 2003.
- 7 Wyrick PB, Gutman LT, Hodinka RL. Chlamydiae. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, eds. Zinsser microbiology. 20th ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1992.
- 8 Hahn DL, Azenabor AA, Beatty WL, et al. Chlamydia pneumoniae as respiratory pathogen. Front Biosci, 2002, 7: 66-76.
- 9 范明远. 衣原体感染. 首都预防医学. 2002, 1: 39-47.
Fan MY. Infection of Chlamydia. Capital Prevent Med, 2002, 1: 39-47.
- 10 李子华. 肺炎衣原体. 见: 李子华, 焦新安, 主编. 新发现和再肆虐的传染病 (续编). 香港: 亚洲医药出版社, 2002. 250-268.
Li ZH. Chlamydia pneumoniae. In: Li ZH, Jiao XA, eds. New found and re-emerging infectious diseases (Continuation). Hong Kong: Asia Medical and Pharmaceutical Press, 2002. 250-268.
- 11 Corsaro D, Valasina M, Venditti D. Increasing diversity within Chlamydiae. Crit Rev Microbiol, 2003, 29: 37-78.
- 12 Greub G, Raoult D. Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. Emerging Infect Dis, 2002, 8: 625-630.
- 13 Holmes KV. Coronaviruses. In: Krieger DM, Howley PM, eds. Fields virology. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001. 1163-1204.

(收稿日期: 2003-04-04)

(本文编辑: 高健)