

恙虫病立克次氏体引起宿主细胞的组织化学改变

馮慧敏 欧阳祥林 白施恩

(中山医学院微生物学教研组, 广州)

本文叙述应用 RNA 及 DNA 染色方法, 观察恙虫病立克次氏体感染兔睾丸单层细胞后的核酸染色改变。随着感染后日数的增加, 在胞浆内细胞核旁可见有规律地出现堆状排列的鲜红色 RNA 小颗粒, 这些颗粒与恙虫病立克次氏体的排列位置一致, 出现时间亦与立克次氏体的繁殖曲线平行; 同时感染后的细胞浆 RNA 染色往往也较对照深。此外, 感染后的细胞核及核仁有时亦可见到一些不规则的改变。

研究恙虫病立克次氏体引起宿主细胞代谢改变的情况, 有利于进一步阐明恙虫病的发病与免疫的机制。过去关于这方面的工作尚未见有报道。本文目的是介绍应用组织化学方法研究恙虫病立克次氏体感染兔睾丸单层细胞后, 引起核酸改变的初步观察结果。

方 法

立克次氏体株 应用自病人、野鼠及恙虫分离所得的何株、徐株、恙株、“49”株^[1]及 63-1 株 (1963 年自广州地区黄毛鼠 (*Rattus exiguus* losca) 的脾脏分离获得)。

兔睾丸单层细胞制备及感染方法 与过去本实验室报道方法基本相同^[1], 不同的是于接种细胞的小试管中预先放入小玻片一块 (9×19 毫米), 细胞接种量为 60—70 万个细胞/管, 每管含营养液 1—1.2 毫升, 待长出成片的单层纤维母细胞后用于感染, 感染后置 28℃ 中孵育, 经一定间隔时间后, 取出小玻片进行固定及染色检查。

核糖核酸染色法 用甲绿-派若宁染色法显示核糖核酸。① 染色步骤: 感染恙虫病立克次氏体后, 在不同间隔时间, 取出培养管中的小玻片, 用蒸馏水稍洗涤以除去附着于玻片上的含血清营养液, 然后按一般方法固定及按顺序入水、甲绿-派若宁, 染色时间为 20 分钟。② 核糖核酸酶处理法: 用甲绿-派若宁染色前, 先用 0.1% 核

糖核酸酶水溶液 37℃ 处理 30 分钟, 对照用蒸馏水代核糖核酸酶按同法处理, 酶作用后用蒸馏水洗去附着于玻片上的酶溶液, 然后用甲绿-派若宁如上染色。

脱氧核糖核酸染色法 用 Feulgen 染色法显示脱氧核糖核酸。① Schiff 氏试液的配制, 按 de Tomasi 法^[2]; ② 标本的固定及染色按一般步骤进行, 1N HCl 的水解时间为 7 分钟 (58—60℃); ③ 脱氧核糖核酸酶处理, 按 Sokolov N. N. 等氏法 (1963)^[3]。标本于用 1N HCl 水解前先以 0.1% 脱氧核糖核酸酶 37℃ 处理 3.5 小时, 以后再用盐酸水解及染色, 如上述。对照以缓冲液代脱氧核糖核酸酶按同法处理。

结 果

一、用甲绿-派若宁染色结果

于感染恙虫病立克次氏体后 4、8、12、16、20 日各自培养管中取出小玻片进行固定及染色, 并以同法同时制备的正常细胞作对照。20 日以后由于大部分细胞片已经脱落, 故只进行少数批次的实验。结果见图 1。感染后早期 (第 4 日) 细胞的染色与对照无明显区别, 大部分细胞的细胞浆均染成淡红色, 核呈淡紫蓝色, 核仁呈红色

本文 1973 年 1 月 22 日收到。

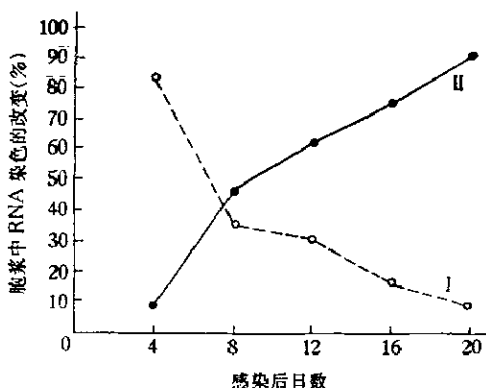


图1 兔睾丸单层细胞感染恙虫病立克次氏体后,胞浆中RNA染色的改变

I. 与正常细胞RNA的染色无显著区别的实验批数;

II. 胞浆染色加深,同时在胞核旁出现堆状排列的鲜红色小颗粒的实验批数。

(见图3)。只有少数批次的细胞,其胞浆的染色较对照深,只有一批感染细胞于核旁胞浆中出现堆状排列的鲜红色小颗粒,而正常细胞无此现象。感染后第八日,11批试验结果,半数以上的细胞胞浆均有变化,主要是在细胞核旁出现堆状排列的鲜红色小颗粒,同时可见胞浆的染色较正常深。于胞浆发生变化的同时,核仁的染色较对照明显,体积似稍增大(见图4)。随感染后日数的增加与立克次氏体的繁殖^[1],胞浆的变化更明显,大部分细胞的胞浆中均可见清楚的核旁呈堆状排列的鲜红色小颗粒,这种变化明显而规律(见图5)。但核仁看不到这样明显而规律的改变,在胞浆出现堆状鲜红色小颗粒的同时,有不少细胞的核仁与正常细胞无区别。但有时核仁的染色较正常深,呈鲜红色,也有时看不见核仁,只见核染色呈一片明显的蓝绿色。

经核糖核酸酶处理后,正常及感染细胞的胞浆及核仁着色性消失,感染后胞浆中异常的鲜红色小颗粒也消失。经酶处理后,无论正常或感染细胞只有细胞核染成很淡的蓝绿色,胞浆只见模糊的影子。

二、用Feulgen染色法显示脱氧核

糖核酸的结果

正常细胞经Feulgen法染色后,细胞核一般呈淡紫红色,核内常为均匀分布的微粒状结构,有些标本核仁不清楚,有些标本可见到一部分细胞相当于核仁部位染不上色,呈一个空白晕,于少部分标本偶见个别细胞核仁部位较核质显更深的染色,但这种情况并不多见(99份标本中,只有2批出现)。感染后细胞染色改变我们分三个方面来观察:①观察核染色与对照有无区别;②核内颗粒粗细与对照有无差异;③观察核外有无其他Feulgen法染色阳性的颗粒。在感染后整个观察过程中,核染色看不到显著变化,有半数以上的标本,核染色与对照无区别,核内颗粒大小也无明显改变,有小部分标本可见核内颗粒较对照粗,但在感染后早期(第4日),有45%的标本于核仁部位染上DNA阳性,呈圆形小体。但随着感染日数的增加,这些变化反而没有早期这样显著。至于核外,除了看到一些疑为破碎的核残渣Feulgen法染色呈阳性外,没有看到特殊的着色颗粒。

用脱氧核糖核酸酶进行对照染色后,经酶处理的标本,只剩下一个很淡的模糊的核的影子,而对照的核染色呈清楚的紫红色。

讨 论

(一) 本文应用生长在玻片上的单层细胞固定后直接进行核酸染色,经酶处理的对照染色证明这种方法能特异性地显示DNA与RNA。

(二) 用RNA染色能规律地发现感染恙虫病立克次氏体后的组织细胞于胞浆内核旁呈堆状排列的鲜红色小颗粒,这些颗粒较一般用Giemsa染色的立克次氏体体积小些,但排列位置与细胞内恙虫病立克次

氏体的排列位置一致,而且出现时间与立克次氏体的繁殖曲线平行(图2)。用感染恙虫病立克次氏体的小白鼠腹腔液涂片,固定后用甲绿-派若宁染色,于单核细胞内

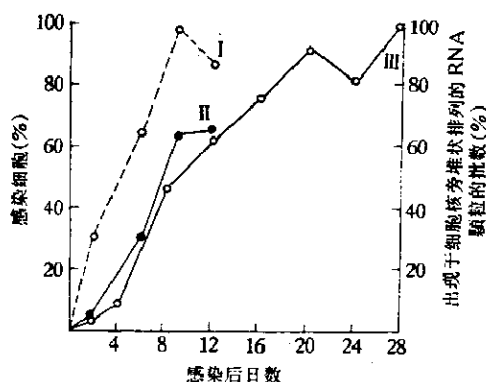


图2 立克次氏体繁殖曲线与胞浆核旁成堆状排列的RNA颗粒出现曲线的比较

I、II. 表示恙虫病立克次氏体于兔睾丸单层细胞中的繁殖曲线[引自冯慧敏等(1963)^[17]];

III. 感染恙虫病立克次氏体后的兔睾丸单层细胞于胞浆中核旁出现成堆状排列的RNA颗粒的批数%。

核旁同样出现鲜红色的小颗粒,大小与组织培养所见者相同(见图6)。故推测这些小颗粒很可能是恙虫病立克次氏体本身的RNA成分染上颜色。但由于没有直接的证据,故尚未能排除它可能是由于恙虫病立克次氏体繁殖,扰乱了细胞代谢所产生的改变。过去史密斯(Smith)等^[4]分析Q热立克次氏体,科恩(Cohen)等^[5]分析莫氏立克次氏体用生化方法均证实这些立克次氏体含有DNA与RNA。但为什么用Feulgen染色时,立克次氏体染不上颜色?是否由于恙虫病立克次氏体所含的DNA量很少故不易察见?如科恩等证实莫氏立克次氏体的DNA的量明显少于RNA, RNA与DNA之比为3.5:1。根据東昇等氏(1960)^[6]用电子显微镜研究恙虫病立克次氏体形态学的资料,发现恙虫病立克次氏体的外壳为蛋白质,其内主要为RNA,用DNA酶处理恙虫病立克次氏体时,看

不到明显的形态学改变。故很可能恙虫病立克次氏体内DNA的含量不多,因此用Feulgen法染色时,立克次氏体染不上颜色。

(三)感染后的细胞RNA染色较对照深,是否说明恙虫病立克次氏体进入宿主细胞后,刺激宿主细胞合成大量的RNA,供立克次氏体繁殖所必需?抑或立克次氏体具有较独立的代谢能力,核酸仍由立克次氏体本身合成,宿主细胞只是提供立克次氏体生长的适宜环境^[8]?这些问题尚待进一步研究才能解决。应用示踪元素及对核酸成分的分析有利于进一步解决这个问题。

(四)感染恙虫病立克次氏体后的组织细胞,核仁的改变没有胞浆这样明显及规律,用RNA染色只有时见感染后的细胞核仁染色较对照深,呈更鲜红的颜色,于立克次氏体大量繁殖时,有时见不到核仁。用DNA染色时,于感染后的早期约有半数的标本可见相当于核仁部位着上颜色,这是否由于立克次氏体感染后早期使细胞核的染色质分布发生改变,包围在核仁周围的染色质增加,由于我们的标本不是切片而是完整的单层细胞片,故看到整个核仁部位着上颜色?这些变化有没有意义?我们没有进一步探索,至于变化不够规律的原因,可能是由于我们实验条件所限,隔4天观察一次,容易将一些短暂的变化忽略。

(五)研究立克次氏体引起宿主细胞代谢改变,有利于进一步研究立克次氏体必需在宿主细胞内才能繁殖的原因,以及致病原理等问题。罗什迪(Roshdy)^[8]还应用DNA染色研究立克次氏体在壁虱体内的分布。

本文只是对恙虫病立克次氏体引起宿主细胞核酸染色改变进行初步的探索,今



图3 正常兔睾丸单层细胞经 RNA 染色后, 细胞浆呈淡红色, 核淡紫蓝色, 核仁红色。



图4 感染恙虫病立克次氏体的兔睾丸单层细胞 RNA 染色后, 胞浆染色较深, 于胞浆核旁出现呈堆状排列的鲜红色小颗粒, 核仁染色较对照深, 体积较正常大。

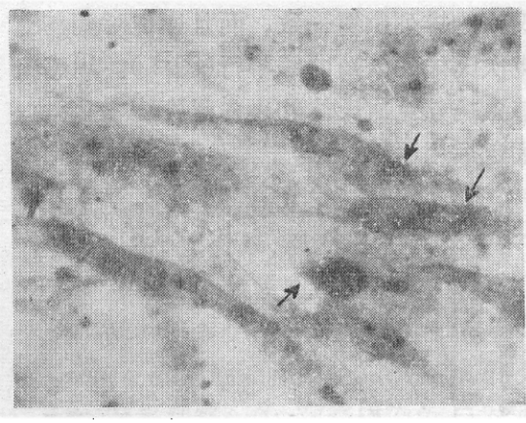


图5 与图4同, 但变化较图4更明显, 视野中多个细胞均发生改变。

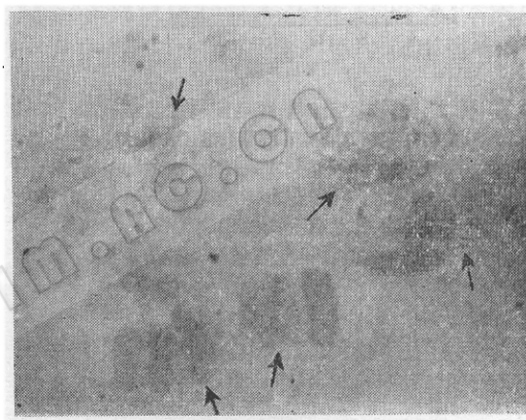


图6 感染恙虫病立克次氏体的小白鼠腹腔液涂片, 经 RNA 染色, 于胞浆核旁可见立克次氏体染成鲜红色小颗粒。

后尚需进一步研究立克次氏体引起宿主细胞核酸量的改变及质的改变, 特别是宿主细胞受立克次氏体感染后出现了那些主要代谢环节的改变。

参 考 资 料

- [1] 冯慧敏、罗瑞仙、白施恩: 微生物学报, 9: 280—283, 1963。
- [2] Pearse, A. G. E. (马仲魁等译): 组织化学, 135—167, 人民卫生出版社, 北京, 1960。
- [3] Sokolov, N. N., Parfanovich, M. I., Mekler, L. B.: *Acta Virologica*, 7:209—216, 1963。
- [4] Smith, J. D. and Stoker, M. G. P.: *Brit. J. Exp. Path.*, 32:433—441, 1951。
- [5] Cohen, Z. A. and Hahn, F. E.: *Science*, 127:282—283, 1958。
- [6] 東昇多村、憲尾崎良克: 日本病毒学, 10: 64, 1960。
- [7] Пшеничников, А. В., Пшеничников, Р. А., Печеркина, С. А. и Плаксина, А. Н.: *Ж. М. Э. Н.* (3): 3—7, 1964。
- [8] Roshdy, M. A.: *Nature*, 199:827, 1963。

THE HISTOCHEMICAL CHANGE OF CELL CULTURE INFECTED BY *RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI*

FENG HUEI-MIN, OUYANG CHANG-LIN AND PAI SHI-EN

(*Department of Microbiology, Chungshan Medical College, Canton*)

Rabbit testicular monolayer cell culture infected with *Rickettsia tsutsugamushi* was incubated at 28°C, and the changes of nucleic acids were investigated by staining with methyl green-pyronin and Feulgen methods at 4,8,12,16 and 20th days after infection. Observations revealed that the changes of RNA in the infected cell cytoplasm paralleled with the multiplication curve of *Rickettsia*. The changes of RNA were demonstrated by the appearance groups of small brilliantly red granules in the cytoplasm near the nucleus forming a zone of deeper redness than those seen in the controls. These changes increased with the duration of the infection. Besides, it was found

in some specimens that the nucleoli stained deeper in color and their size somewhat enlarged. Sometimes, the nucleus showed a homologous deep blue-green color and the nucleolus disappeared. However the changes of nucleoli in RNA stain were not so regularly seen as those of cytoplasm.

In DNA stain, some changes were found at an early period of infection with *Rickettsia*. In the nucleoli of some of the cells, positive stain of DNA was seen in 45% of the specimens. As the infected period prolonged such changes gradually disappeared. The significance of these changes were briefly discussed.