维普资讯 http://www.cqvip.com

流行性出血热病毒对乳鼠致病特点的观察

曲春枫 杨占秋 向近敏

（湖北医学院病毒研究所，武汉，430071）

提 要

本文观察了两株从病人体内新分离的流行性出血热(EHF)病毒114株和435株对乳鼠的致病特点，并在感染的乳鼠脑内找到了EHF病毒。免疫荧光检查发现，病毒抗原广泛存在于感染鼠的脑、肺、肝、肾等脏器。脑内和腹腔两条感染途径的比较发现，病毒抗原在上述脏器中的分布基本一致，但前者脑内的病毒感染滴度较后者高一个对数单位。对病毒的动态观察发现，EHF病毒首先在乳鼠腹腔感染6小时后的腹腔巨噬细胞（Mφ）中分离到、并持续阳性；病毒血症出现在感染后2天，随之在脑、肺、肝、肾和脾脏中查到。以上结果表明：EHF病毒对乳鼠具有广泛的嗜性，脑内感染途径能获得较高滴度的感染性病毒。提示EHF病毒在鼠mφ中增殖并携带至全身播散，可能是造成乳鼠全身性弥漫性感染的主要原因。

关键词：流行性出血热病毒 乳鼠致病性 抗原分布

1978年Lee[1]等首次从疫区黑线姬鼠肺组织中分离到KHF病原体以来，国内学者相继在人体及多种动物体内分离到流行性出血热（EHF）病毒，并证实了二者之间的抗原关系。乳鼠作为EHF病毒的敏感动物[2]，感染EHF病毒后规律性地发病死亡，除用来进行病毒分离外[3]，还可用于对不同病毒株进行毒力比较[4]和抗病毒药物筛选[5]。我们以前的研究观察到EHF病毒114株（EHFV114）和435株（EHFV435）与来自湖北疫区黑线姬鼠体内的病毒存在抗原性差异[6]。因此，我们将这两株病毒对乳鼠的致病特点进行了观察，结果如下：

材料和方法

一、实验动物 3日龄内昆明种杂交小白鼠乳鼠，购于中国科学院武汉病毒研究所，孕鼠于产前4—5天运送到实验动物室。

二、病毒 EHFV435（来源于病人血浆），EHFV114（来源于病人尿液），适应于Vero—E_6细胞后，以感染滴度10^3TCID50/0.1ml作为乳鼠感染的第1代病毒。

三、感染方法及标本收集 将病毒接种3日龄内乳鼠，脑内接种量为0.02ml/只，腹腔接种量为0.04ml/只，观察乳鼠的变化，于发病频死时眼球取血分离血清，并收集脑、肺、心、肝、肾、脾和胸腺等脏器，冻存于-70℃，用于抗体和脏器病毒抗原的检查。发病后未死者于攻毒后第30天处死，处理同前。并取脑组织研碎，用含5%加热灭活小牛血清和400u青霉素及400ug链霉素的

本文于1989年7月27日收到

维普资讯 http://www.cqvip.com

Eagle's培养液制成10%（w/v）混悬液，冻融三次，3000r/m×30分离心，上清液作为乳鼠感染的第2代病毒。

四、病毒抗原检查 参照文献[1]进行。无菌取病死动物的脏器一部分作冰冻切片，冷丙酮固定10分钟，直接免疫荧光法（IF）检查。同时作同窝正常乳鼠、母鼠对照。

五、病毒感染滴度的测定 按上述方法制备脑组织悬液，10倍连续稀释（换滴头），每个稀释度0.1ml感染在24孔板内已长成单层的A549细胞，每个稀释度接种2孔，吸附4小时后弃去吸附物，加Eagle's维持液1 ml/孔，置5% CO_2、37℃中培养，常规换液，于感染后第10天作细胞刮片，采用直接IF法检查细胞内病毒抗原。50%细胞感染荧光为"廿"，定为滴定的终点。

六、乳鼠感染EHF病毒后的病毒血症抗原分布及抗体消长的动态观察 采用腹腔接种法、接种3日龄内乳鼠EHFV114 0.04ml/只，于接种后6小时，第1～5天各处死2只乳鼠，颈动脉取血，并用含5%灭活小牛血清和400u青霉素及400ug链霉素的Eagle's液冲洗小鼠腹腔，腹腔液离心，取沉淀物和全血分别接种已长成单层的Vero-E6细胞，每份标本接种2孔，培养2—3周，直接IF法检查细胞内病毒抗原，ELISA法检查上清病毒抗原。第7、9、10、12、14、16、17天分别处死4只乳鼠，2只取全血，处理同前，2只收集血清，间接IF法检查特异性EHFV IgG。处死的乳鼠并同时无菌取脏器标本，冻存于-70℃，用于病毒抗原的检查。

七、IF法和ELISA法 IF法参照文献[1]进行。直接IF法检查细胞内病毒抗原，采用FITC标记的McAb A-25-1直接染色；间接IF法测定鼠抗EHFVIgG，先将一定稀释度待测鼠血清与感染了EHFV的A549细胞抗原片作用45分钟，PBS冲洗后加FITC标记的羊抗鼠IgG染色，镜检。前者所用的FITC标记的McAb A25-1购自中国预防科学院病毒研究所；后者所用的FITC标羊抗鼠IgG由美国陆军传染病研究所惠赠。ELISA测定细胞上清液中的病毒抗原参照文献[7]进行。

八、电镜检查 采用鼠脑连续增毒，将第3代病毒感染的乳鼠于频死时，在注射处取海马回部位的脑组织，常规固定，制作电镜超薄切片，观察结果。

结　果

一、一般表现　10^3TCID50/0.1ml EHFV114和EHFV435脑内各种一组乳鼠，每窝为一组。乳鼠于接种后第11～13天发病，有的发病较晚，迟至第15天，表现为个体发育瘦小，耸毛、倦缩、尾强直及高反应性。感染EHFV114的乳鼠出现明显的后肢瘫痪，并于瘫痪后2—4天内死亡，频死时表现为痉挛，角弓反张和衰竭。而感染第1代EHFV435的乳鼠无明显的瘫痪表现，随后逐渐恢复，无一只死亡。取其脑组织制得第2代EHFV435感染乳鼠，则出现规律性的发病死亡。

二、不同代感染乳鼠脑的病毒滴度　将两株EHFV脑内接种的乳鼠于频死时取脑组织进行病毒的感染滴度测定，结果发现两株病毒在第1代感染的乳鼠脑组织中，其感染滴度均达到10^6TCID 50/0.1ml，第二代EHFV 114感染的鼠脑病毒滴度达10^7TCID 50/0.1ml。

三、病毒抗原分布及抗体反应两株病毒感染的乳鼠均有明显的抗体反应，第2代病毒感染的乳鼠比第1代病毒感染的乳鼠抗体反应高（见表1）。在所检查的乳鼠感染脑、肺、肝、肾、脾、心和胸腺中均可查到EHF病毒抗原，但在第1代病毒感染的乳鼠中，病毒抗原主要集中在脑组织的大脑皮层海马回的神经元胞浆内，经传代后，乳鼠感染的脏器范围扩大，感染细胞数增多，荧光强度增加。表1列出了两株病毒感染的乳鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com

脏器病毒抗原的分布情况。

表1，感染EHFV114和EHFV435乳鼠的体内抗原分布及抗体反应

Table 1 The Distribution of Antigens and Antibodies Response in Suckling Mice Infected with EHFV114 and EHFV435

	EHFV 毒株			
	EHFV114-1*	EHFV114-2	EHFV435-1	EHFV435-2
抗原分布				
脑	++(10/10)**	+++(11/11)	++(8/8)	+++(10/10)
肺	+(3/8)	++(6/11)	+(2/8)	++(4/10)
肝	+(2/8)	++(5/11)	+(1/8)	++(3/10)
肾	+(2/10)	+(3/11)	+(1/8)	+(2/10)
心	+(1/8)	+(2/10)	—(0/8)	+(1/8)
脾	+(1/10)	ND	—(0/8)	+(1/6)
胸腺	+(2/10)	+(5/11)	+(1/8)	+(3/10)
特异性IgG	1：160	1：320	1：80	1：160

*EHFV114-1、EHFV114-2、EHFV435-1、EHFV435-2分别表示EHFV 114株和435株乳鼠脑内的传代数

**括号内的数字其分母为检查的总数，分子为阳性数

Note：* EHFV114-1 EHFV114-2 EHFV435-1 EHFV435-2 indicate respectly the Passage of EHFV114 and EHFV435 Strains

** The Figures in the Curve is the total number checked and the positive.

四、乳鼠感染EHF病毒后的脑组织电镜观察　采用脑内接种法，在乳鼠频死时取其脑组织研磨成脑组织悬液后再接种乳鼠，连续增毒，取第3代鼠脑悬液感染后的乳鼠脑组织制成电镜超薄切片，电镜观察发现，海马回神经元细胞浆内粗面内质网扩张，高尔基氏体扩张、增生。在扩张的粗面内质网腔中可以看到直径为40—60nm，长短不一的管状结构，单条或多条平行排列，弯曲或转折。在部分扩张的高尔基氏体内可以看到有双层膜结构的病毒颗粒，呈园形或椭园形，直径约80—120nm，同时还能见到一些未发育成熟缺少核心的病毒样颗粒。

五、不同感染途径的观察　将滴度为10^5TCID50/0.1ml的EHFV114的鼠脑悬液分别以脑内和腹腔两条途径感染乳鼠，脑内途径感染的乳鼠发病时间较腹腔感染途径早一天，前者病毒抗原主要分布于脑组织，并以脑实质细胞为主，病毒的感染滴度高达10^7TCID50/0.1ml，特异性EHFV IgG为1：320；后者病毒抗原主要分布在肺组织，脑组织中也可查到病毒抗原，但抗原阳性细胞主要分布在脑实质的小血管内皮及其周围的实质细胞以及脉络丛上皮细胞。病毒的感染滴度为10^6TCID50/0.1ml，特异性IgG为1：640。其它脏器的病毒抗原分布基本一致。

六、乳鼠感染EHF病毒后病毒血症的抗原分布及抗体消长　将滴度为10^7TCID50／0.1ml的EHFV114 0.04ml/只感染3日龄内乳鼠，通过离心沉淀腹腔冲洗液分离腹腔细胞接种Vero-E_6细胞，发现乳鼠感染后6小时即可在腹腔细胞（以MΦ）为主）分离到EHF病毒，并持续分离阳性，病毒血症出现在感染后2天，脏器中病毒抗原首先在脑组织中查到（感染后4天），接着于感染后第5天在肺组织查到、肝、肾和脾脏中病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

抗原出现的时间分别为第7、9、9天。特异性IgG抗体于第10天出现，滴度为1∶10，到第16天达到高峰，滴度为1∶320。乳鼠感染后的一般表现与脑内接种途径的表现相同。

讨 论

尽管从病人体内分离的EHF病毒与从当地疫区黑线姬鼠体内分离的病毒存在着抗原性差异[6]，但对其致病性的研究发现，它们对乳鼠仍具有致病性。并且这两株未经乳鼠脑内增毒毒力不同，进一步证明乳鼠是EHF病毒的敏感动物[2]，病毒抗原性差异又反映出致病力的不同。检查乳鼠各脏器病毒抗原分布发现，EHF病毒抗原广泛存在于乳鼠体内，各个脏器均可查到病毒抗原。但乳鼠感染EHF病毒后，主要表现为神经系统的症状，脑组织的电镜超微结构观察也发现了神经元细胞超微结构的改变，并在其中找到了EHF病毒。推测部分EHF病人出现的神经系统症状可能也是由于EHF病毒直接作用于神经元细胞所致。

通过脑内和腹腔两条途径感染乳鼠的观察发现，尽管脑内感染乳鼠的病毒主要分布在脑组织，腹腔感染乳鼠的病毒主要分布在肺组织，但在脑组织中也能查到病毒抗原，两条途径感染的抗原分布基本一致。这为采用腹腔途径感染和用药进行抗病毒药物体内实验提供了依据。实验还发现，脑内感染的乳鼠病毒抗原主要分布在脑实质细胞，腹腔感染的乳鼠病毒抗原主要分布在大脑皮层的小血管内皮细胞及其周围以及脉络丝上皮细胞，且前者获得的感染性滴度较高，这可能是由于脑内接种直接感染脑实质细胞，病毒在其中大量繁殖，而腹腔感染要通过血脑屏障使细胞感染。因此，若要获得高滴度的病毒，脑内感染优于腹腔感染途径。

巨噬细胞除具有吞噬抗原的作用外，还有抗原提呈作用，在免疫应答过程中对T细胞的活化起着重要的作用[8]。我们的实验发现，EHF病毒首先在感染后6小时的乳鼠腹腔Mφ中分离到，并持续分离阳性，而病毒血症在感染后2天出现。这提示病毒可能在MΦ中增殖并携带全身扩散，引起乳鼠全身性弥漫性感染。据报道[9]，EHF病毒能在体外培养的长爪沙鼠，金黄地鼠，Balb/c小鼠腹腔Mφ和人外周血白细胞及单核细胞中增殖。EHF患者除具有广泛的病毒血症外，还表现为免疫功能的紊乱，这是否由于病毒在Mφ内增殖，导致抗原信号的持续表达而引起免疫应答状态的紊乱，尚有待于进一步探讨。

参 考 文 献

〔1〕 Lee, H.W et al., 1978, J. Infect. Dis. 137(2)：298.
〔2〕 李德荣等，1985，病毒学报 1：334.
〔3〕 杨明瑞等，1985，湖北医学院学报 6：114.
〔4〕 倪大石等，1985，安徽医学 6(3)：7.
〔5〕 Huggins, I.W. et al., 1983, J. Infect. Dis.
〔6〕 杨占秋等，1988，湖北医学院学报 9(4)：301.
〔7〕 杨占秋等，湖北医学院学报 待发表.
〔8〕 Unanue, E.R. et al Eds., 1983, Textbook of Immunol. P83.
〔9〕 姚小剑等，1988，病毒学杂志.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Pathogenicity of Epidemic Hemorrhagic Fever Virus in Suckling Mice

Qu Chun-feng Yang Zhan-qiu Xiang Jin-min

(*Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan,* 430071)

It was observed that two strains EHF virus which were isolated newly from patients had pathogenicity on suckling mice. The EHF virus particles were found in the infected mice brain under electron microscope. On IF examination viral antigen could be found in brain, lungs, liver, kidneys and other organs. Comparing intracerebral with intrapertoneal inoculation, it was found that there is no appaerent difference in viral antigen distribution. But the infectious virus titre of brain in the former was one logarithm unit higher than the later. The virus was kinestically observed. We found that the EHF virus was firstly isolated in the Mϕ of suckling mice which was challenged by I.P. inoculatoin and continuously positive. The viromia began at the second day after infection, then the viral antigen could be found in the lungs, brain, liver and kidneys.

These data firmed that EHF virus had pathogenicity on suckling mice and higher titer of infectious virus can be obtained by I.C. inoculation. It may be the main factor in the suckling mice infection that its Mϕ permited EHF virus replication and carried it to the whole body.

Key words: Epidemic Hemorrhagic Fever Pathogenicity on suckling mice Antigen distribution