

肠道传播非甲非乙型肝炎在恒河猴中的传代研究*

殷书荣 田 辛 鲍作义 蒋豫图
洪松芳 曹军田

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京100071)

提 要

用 ET-NANBH 感染的两只猴 (R5 和 R6) 含病毒颗粒的粪便悬液和肝组织悬液分别接种 7 只和 4 只恒河猴, 分别有 5 只猴和 4 只猴在攻毒后 20—49 天内 ALT 开始升高, 持续时间为 7—10 天, 肝组织学的特征性改变为肝细胞的嗜酸性变和嗜酸小体的形成。在猴 ALT 升高前 2—3 天和升高后一周内均检查到大量的 27—34nm 的病毒样颗粒, 这些颗粒只与 ET-NANBH 病人血清、黑猩猩和猴感染后急性期和恢复期血清发生特异性聚集。在猴感染后血清中未检出抗-HAV、抗-HAV-IgM、HBsAg 和抗-HBc-IgM。结果提示: 恒河猴是研究 ET-NANBH 较适宜的动物模型; 病人和猴粪便中的 27—34nm 的病毒样颗粒是 ET-NANBH 的病原因子。

关键词: 非甲非乙型肝炎 动物模型 免疫电镜

肠道传播非甲非乙型肝炎 (ET-NANBH) 病毒虽然能在许多种动物中获得感染, 但多数作者用分离的病毒传代却未获成功, 部分原因是这些动物 ALT 升高并不是感染的 ET-NANBH⁽¹⁾。1987 年, Bradley 等⁽²⁾报道食蟹猴不仅可以被 ET-NANBH 病毒感染, 而且可以传代, 他们已在动物体内传了 5 代。而这种动物在我国却不易获得。为此, 我们将新疆 ET-NANBH 病人粪便悬液感染恒河猴后分离的 ET-NANBH 病毒在恒河猴中传代并获得了成功。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、感染材料

第一代: 用 ET-NANBH 病人的潜伏期粪便悬液感染恒河猴, 详细结果在另文报道。简述如下: 一例经流行病学、血清学确诊的 ET-NANBH 病人的发病前 6 天和前 3 天的粪便悬液感染 5 只恒河猴和 1 只狨猴, 其中有 3 只恒河猴在攻毒后 10—29 天 ALT 开始升高, 在猴 ALT 升高前 2—3 天以及升高后的一周内的粪便中检查到较多的 27—34nm 的病毒样颗粒 (图 1B)。

本文于 1989 年 8 月 21 日收到

* 本课题为国家自然科学基金资助项目

第二代: 1. 粪便悬液: 第一代发病的两只猴 (R6 和 R5) 感染后 24 天和 25 天 (R6) 及 29 天和 30 天 (R5) 经 IEM 观察到病毒样颗粒的 20% 混合粪便悬液 (图 1B)。

2. 肝脏悬液: R6 感染后 30 天和 R5 感染后 35 天经手术肝活检标本制备的 20% 的悬液。制备方法为: 称取 2 克肝脏, 剪成小碎块, 用 PBS 洗净后, 碾磨器人工研磨, 4000r/m 离心 30 分钟, 重复二次, 上清用含 0.5% 牛血清白蛋白的 PBS 调至 20% 的浓度。

3. 正常猴粪便悬液: R5 和 R6 在攻毒前一天的粪便中观察到较分散的 22—25nm 的病毒样颗粒 (图 1A), 用此粪便制备成 20% 的悬液。

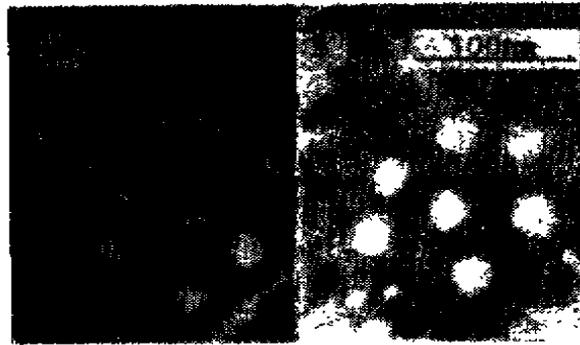


图 1. IEM ($\times 200000$), R5 和 R6 粪便中观察到的病毒样颗粒
A. 感染前粪便标本 B. 感染后粪便标本
FIG 1. IEM ($\times 200000$), Virus-like particles
observed in stool specimens from R5 and R6
A. 22- to 25-nm VLPs in preinoculation stools
B. 27- to 34-nm VLPs in postinfection stools

二、实验动物及接种前的观察

14 只恒河猴领回实验室后, 在攻毒前除观察 ALT 的变化外, 还对每只猴进行肝穿刺活检。14 只猴中有 2 只 ALT 出现暂时的升高 (R₁₁ 和 R₁₅), 1 只猴肝组织学检查有炎症改变 (R₁₅), 因此这 3 只猴另设一组观察。上述 14 只猴年龄均在 1—1.5 岁。

三、实验动物分组及实验观察

第一组: 4 只猴 (R₁₉, R₂₀, R₂₁, R₂₂)。

第二组: 3 只猴 (R₁₁, R₁₅, R₁₈)。

上述两组猴的感染材料为 R5 和 R6 感染后含有病毒颗粒的混合粪便悬液。

第三组: 4 只猴 (R₂₃, R₂₄, R₂₅ 和 R₂₆), 感染材料为 R5 和 R6 ALT 升高后的混合肝脏悬液。

第四组: 3 只猴 (R₁₅, R₁₇, R₂₈), 感染材料为 R5 和 R6 感染前的混合粪便悬液。

猴感染后, 每隔 1 天静脉采血 1 次, 检测 ALT, 并且每天收集粪便, -70°C 保存。发现 ALT 升高的猴, 在酶达高峰期进行肝穿刺取肝活组织。另外, 感染 R5 和 R6 感染前粪便悬液的猴 (第四组) 在感染后 35 天进行肝穿刺取肝活组织。上述肝组织标本经处理和进行编号后作光镜检查。

四、感染剂量和途径

1. 感染剂量: 20% 悬液 2ml。

2. 感染途径: 后腓静脉。

五、ALT 检测方法 参照文献 [3]。

六、免疫电镜方法 (IEM): 20% 粪便悬液 0.5ml 与 ET-NANBH 病人急性期血清 (1:20) 0.5ml 混合, 37°C 保温 1 小时, 4 °C 过夜, 2 0000r/m 离心 2 小时 (35000g), 沉淀物用 40μl PBS 悬液, 覆盖铜网, 3% 磷钨酸 (pH6.5) 染色后, 电镜观察。每份标本观察 5 个目。由于病毒颗粒周围抗体桥不清楚, 因此只能按在相同条件下病毒颗粒的多少说明粪便中的病毒量和血清中的抗体效价。

七、鉴定用血清

1. 甲型肝炎恢复期血清。
2. R5 和 R6 感染前和感染后急性期血清和 R6 恢复期血清。
3. 混合甲肝单克隆抗体 (AG₂、AD₂ 和 AE₄), 购自四川省卫生防疫站。
4. 正常人血清 (七个月正常婴儿血清)。
5. ET-NANBH 感染的黑猩猩感染前、急性期和恢复期血清, 由美国 NIH 的 Purcell 博士赠给。

结 果

一、猴肝酶的变化, 第一组猴中有 3 只猴分别于攻毒后 20 天 (R₁₉)、35 天 (R₂₀) 和 28 天 (R₂₂) ALT 开始升高, 于第 23 天、38 天和 30 天达高峰 (图 2)。R₁₉ 出现了两个峰, 第二个是在肝脏穿刺后第 2 天 ALT 升高, 并且持续时间较长, 可能与肝脏穿刺过程中操作不慎, 肝脏受到细菌感染有关。

第二组猴有 2 只猴分别于攻毒后 20 天 (R₁₁) 和 28 天 (R₁₆) 出现 ALT 升高, 于 28 天和 30 天达高峰 (图 3)。

第三组猴攻入肝脏悬液后第 2 天, 4 只猴均有 ALT 升高, 第 4 天 3 只猴 ALT 恢复正常, 1 只猴 (R₂₃) 出现持续高水平的 ALT 活性, 因此该猴的 ALT 有两个正常值上限, 较低的上限值代表感染前的 ALT 水平, 较高的上限值代表感染后 ALT 出现急剧增高前的 ALT 水平。这 4 只猴分别于感染后 25 天 (R₂₃)、49 天 (R₁₄)、28 天 (R₂₆)

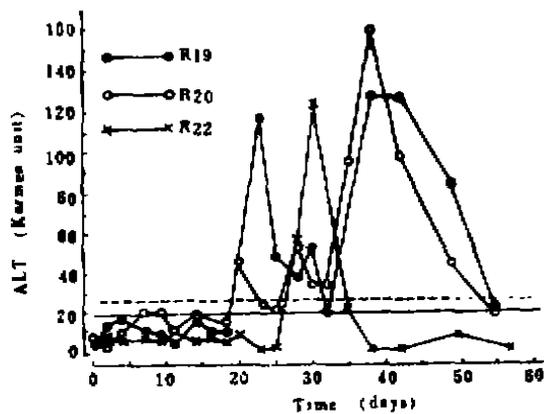


图 2. R₁₉、R₂₀、R₂₂ 攻毒后的肝酶变化

FIG2. ALT levels in Rhesus monkeys (R₁₉, R₂₀, and R₂₂) inoculated with pool of stool suspensions from R5 and R6

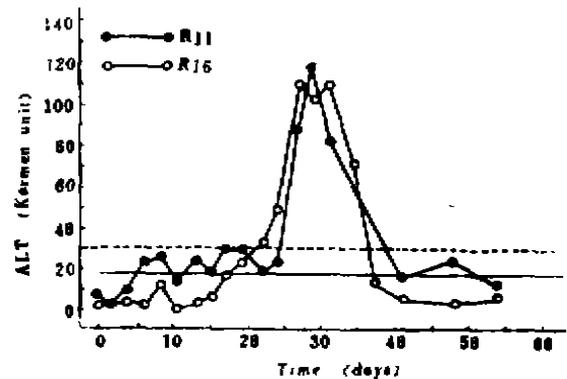


图 3. R₁₁ 和 R₁₆ 攻毒后的肝酶变化

FIG3. ALT levels in Rhesus monkeys (R₁₁ and R₁₆) inoculated with pool of stool suspensions from R5 and R6

和 30 天 (R_{23}) ALT 开始升高, 于 28 天、55 天、35 天和 35 天达高峰 (图 4)。 R_{24} 在感染后 35 天表现为萎靡不振, 不活泼, 抽血时出现面色青紫和呼吸困难, 该猴在 ALT 升高后第 10 天处死解剖发现患全身弥漫性结核病, 两肺已大部分硬化, 所以该猴 ALT 升高较晚可能与机体免疫状态低下有关。

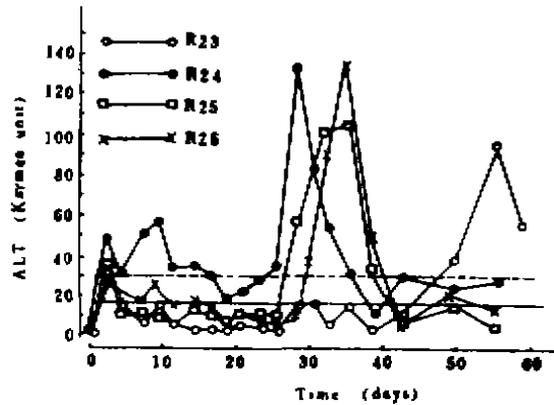


图 4. R_{23} 、 R_{24} 、 R_{25} 和 R_{26} 攻毒后的肝酶变化
FIG 4. ALT levels in Rhesus monkeys (R_{23} ,
 R_{24} , R_{25} , and R_{26}) inoculated with pool of
liver suspensions from R5 and R6

第四组的 3 只猴在整个观察过程中没有出现 ALT 升高。

上述猴肝酶异常的持续时间为 7—10 天, ALT 升高的最早时间为感染后 20 天, 最迟为 49 天。如果 R_{24} 的发病时间除外, 正常猴感染 ET-NANBH 后的平均潜伏期为 26.8 ± 5.0 天。

二、肝组织学改变

上述猴在肝酶异常升高后的肝活检组织均呈现不同程度的病理改变。表现有肝细胞排列紊乱, 肝细胞空泡样变, 肝实质和门脉区的淋巴细胞浸润, 肝细胞浆嗜酸性变和嗜酸小体的形成。表 1 示 ET-NANBH 感染后的猴肝组织学的明显改变是肝细胞浆嗜酸性变性和肝细胞嗜酸小体的形成。

三、病原和血清学检查

无论是攻击粪便悬液还是肝脏悬液, 在猴 ALT 升高前后均可见到较多的 27—34nm 的病毒样颗粒 (图 5)。对攻击粪便悬液的两只猴 (R_{10} 和 R_{10}) 以及肝脏悬液的两只猴 (R_{25} 和 R_{26}) 进行粪便标本的系列观察, 猴在 ALT 升高前 4 天开始排毒, 一般持续约 10 天左右停止排毒。

猴感染前和感染后的血清学检查未发现 HBsAg、抗-HBc-IgM 以及抗-HAV-IgM 阳性, 含病毒颗粒的粪便悬液也未检出甲肝抗原阳性。

四、病毒颗粒的初步鉴定

将含病毒颗粒的 R5 和 R6 混合粪便悬液以及 R_{25} 和 R_{26} 混合粪便悬液分别于 ET-NANBH 病人混合急性期血清、混合恢复期血清、ET-NANBH 病人 AMD 和 MT 单独急

表 1 ET-NANBH 感染的猴肝组织病理检查结果
Table 1 Liver biopsy changes of Rhesus monkeys infected with ET-NANBH inacula

Animal number	Pre-infection	Post-infection					
		liver cell			lymphocytes infiltration		
		irregular arrangement	ballooning degeneration	acidophilic degeneration	acidophilic bodies	in portal zone	in liver parenchyma
3	NS	—	+	—	—	++	+
5	NS	—	—	++	+	++	—
6	NS	+	—	+	—	+	+
11	—	—	—	+	—	—	+
16	—	+	+	—	—	—	—
19	—	—	—	++	—	—	—
20	—	+	+	—	—	—	—
22	—	—	—	+	—	—	+
23	—	—	—	++	—	—	—
24	—	+	—	++	+	—	—
25	NS	—	++	+	—	++	+
26	NS	—	—	++	+	+	+
15	—	+	+	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	—
28	NS	—	—	—	—	—	—

NS, No specimens

性期血清、ET-NANBH 感染的第一代猴 (R₆) 和第二代猴 (R₂₅) 以及黑猩猩感染前、急性期和恢复期血清、甲型肝炎恢复期血清、混合甲肝单克隆抗体, 正常人血清作 IEM 检查, 结果表明 27—34nm 病毒颗粒只与 ET-NANBH 病人血清、猴和黑猩猩急性期和恢复期血清发生聚集。表 2 和表 3 示 ET-NANBH 在恒河猴中的传代结果及粪便中病毒样颗粒的鉴定结果。

虽然我们在猴粪便中也检查到聚集的 22—25nm 的病毒样颗粒, 但从猴感染前和感染后的系列粪便标本 IEM 观察, 这些颗粒很普遍地存在于猴粪便中。这些颗粒除与 ET-NANBH 病人血清发生聚集外, 也与甲型肝炎病人血清、正常人血清发生聚集, 而不与甲型肝炎病毒单克隆抗体、ET-NANBH 感染的黑猩猩血清发生聚集。这些颗粒与 ET-NANBH 无病原学关系。

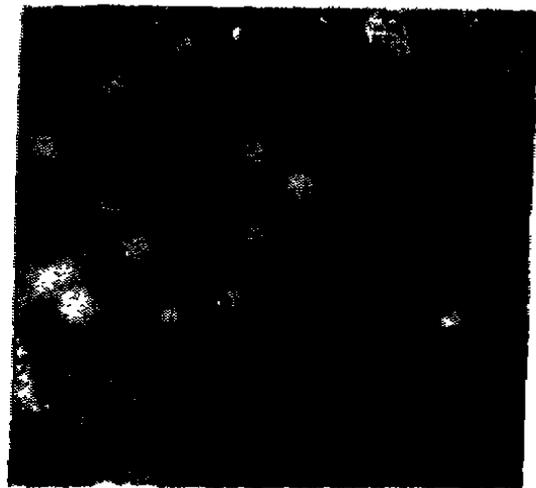


图 5 IEM(X200000), R₂₅ 粪便中的病毒样颗粒
FIG 5, IEM(X200000), Virus-like particles visualized in the stool of R25

表2 ET-NANBH 在恒河猴中的传代结果
Table 2 Passage of ET-NANBH in Rhesus monkeys

Passages	Inocula	No. infected/ no. inoculated	Animal no.	Liver enzyme values(ALT)			Liver histo-pa thology		
				Baseline mean value	Cutoff value	First enzyme elevation day		Peak en- zyme day	
1	AMD1125 (human)	1 / 3	R3	21.3	26.3	10	65.1	±	
				17.6	25.1	29	78.9	+	
	AMD1122 (human)	2 / 3	R5	12.7	21.4	25	62.9	+	
				R6	13.8	23.7	20	113.2	+
2	R5 and R6 (pool of stool specimens)	5 / 7	R11	15.4	37.3	28	121.9	+	
				R16	19.4	30.0	20	117.3	+
				R19	18.1	30.8	35	159.1	±
				R20	11.5	19.2	28	121.9	+
				R22	14.7	21.6	25	135.0	+
				R23	(38.9)*	(49.3)*			
				R24	10.0	23.3	49	97.0	+
	R5 and R6 (pool of liver suspension)	4 / 4	R25	13.4	22.0	28	108.8	+	
			R26	19.5	29.3	30	135.0	+	

*ALT values between after the inoculation and before the ALT significant elevation in this monkey

表3 ET-NANBH 病人和猴类便中 VLPs 的 IEM 检查结果
Table 3 IEM for virus-like particles in ET-NANBH stools

Antiserum	VLP detected in stool suspensions			
	patient(AMD)		Rhesus monkeys	
	AMD1122	AMD1125	R5 and R6	R25 and R26
Human serum				
(ET-NANBH)				
acute pool	+	++	+++	+++
conval. pool	NT	NT	++	++
patient				
AMD acute	+	+	+++	+++
MT acute	+	+	+++	+++
Monkey serum				
R6,				
pre-infection	NT	NT	—	—
acute	NT	NT	++	++
conval.	NT	NT	++	++
R25,				
pre-infection	NT	NT	—	—
acute	NT	NT	++	++
conval.	NT	NT	++	++
Chimpanzee serum*				
pre-infection	NT	NT	NT	—
acute	NT	NT	NT	++
conval.	NT	NT	NT	+
Control serum				
HAV conval.	—	NT	—	—
HAV McAb pool (three strains)	NT	NT	—	—
Normal serum	NT	NT	—	—

VLPs observed in five grids, +++ stands for >100, ++ for 10-100, + for <10, NT for no test

*The chimpanzee sera were kindly sent by Dr. Robert H Purcell

讨 论

自 1983 年 Balayan 等^[1]报道用 ET-NANBH 病人急性期粪便提取物进行人体实验感染和动物实验感染后,在人和动物的粪便中检查到 27—30nm 的病毒样颗粒以来,已有许多实验室^[5-8]使 ET-NANBH 在非人灵长类动物中获得感染,并在感染的动物粪便中检查到 27—30nm 的病毒样颗粒,但用动物分离的病毒在动物中继续传代,绝大部分结果令人失望^[1]。为此,1986 年 11 月,由 Fogarty 国际中心、美国国立卫生研究院变态反应和传染病研究所以及世界卫生组织发起的 ET-NANBH 的讨论会中建议:欲证明 ET-NANBH 动物实验感染成功必须符合下列几项或全部标准:(1)血清转氨酶至少连续 2 次比感染前的平均值高 2 倍以上;(2)在血清转氨酶升高的同时,肝活检应证明有肝炎或某些特殊的形态学或超微结构改变;(3)在相应的病期,从动物的肝组织或粪便中,应检测到特异性抗原或病毒颗粒;(4)用这种抗原或病毒颗粒检查感染前和恢复期血清,应证明有抗体阳转;(5)将急性期粪便或肝脏提取液接种于同种的其他动物,可传播本病。1987 年,Bradley 等^[9]成功地将 ET-NANBH 在食蟹猴连续传代,分离出 27—34nm 的病毒样颗粒。虽然王光明等^[10]报道已用我国新疆和沈阳发生的 ET-NANBH 使恒河猴获得感染,但 Bradley 等和我们的 ET-NANBH 传代结果表明,猴感染后的 ALT 持续时间很少超过 2 周。王光明等的结果中有 2 只猴 ALT 持续升高 4 周以上,其原因有待进一步研究。我们用病人发病前 3 天含有 20—40nm 的病毒样颗粒的粪便悬液感染的第一代猴中,一只猴(R₁)也表现了 ALT 的升高,并且持续时间较长,但只在感染后第 6 天的粪便标本中检查到较紧密的 22—25nm 的病毒样颗粒,然而很难解释这种颗粒是 ET-NANBH 的病原体。

我们以新疆流行的 ET-NANBH 感染恒河猴并首次用猴含病毒颗粒的粪便悬液和肝脏悬液传代获得成功,实验结果全部满足上述 5 项标准。

1. 恒河猴感染 ET-NANBH 的潜伏期、肝功能和肝组织学改变符合急性病毒性肝炎的特征。

2. 从动物的粪便中分离到较多的 27—34nm 的病毒样颗粒,将含病毒颗粒的猴粪便悬液和肝脏悬液再感染恒河猴,5/7(接种粪便悬液)和 4/4(接种肝脏悬液)的猴发生了转氨酶的升高,并且肝组织学呈现肝炎的特征性改变和粪便中观察到同样的颗粒,而对照组(接种猴感染前粪便悬液)未发生 ALT 升高。这进一步证明了感染 ET-NANBH 的猴粪便和肝脏中含有 ET-NANBH 的病原体^[2]。

3. 无论是对第一代还是第二代猴粪便中的病毒颗粒,用第一代和第二代猴感染前血清和感染后的急性期血清作 IEM 检查,均表现了抗体阳转;用黑猩猩的 3 份血清(感染前、急性期和恢复期)作 IEM 检查,也表明了抗体阳转,这说明我国新疆 ET-NANBH 的病原与世界其他国家的 ET-NANBH 病原是相关的。

ET-NANBH 实验动物感染成功,为我国研究 ET-NANBH 提供了可靠的病毒来源。同时在细胞培养尚未获得成功之前,为利用恒河猴研究 ET-NANBH 病原的感染性、理化特性提供了较适宜的动物模型,并且为用分离的病毒提纯制备单克隆抗体、建立特

异诊断方法提供可能。

参 考 文 献

- [1] Gest, ID, et al., 1987, *J. Infect. Dis* 156 : 630.
- [2] Krawczynski, K, et al., 1989, *J. Infect. Dis* 159 : 1942.
- [3] Bauer, JD, et al., 1974, *Clinical Laboratory Methods*, eighth edition, the C. V. Mosby Company, p481.
- [4] Balsysn, MS, et al., 1983, *Intervirolology* 20 : 23.
- [5] Kane, MA, et al., 1984, *J. A. M. A* 252 : 3140.
- [6] Tandon, BN, et al., 1982, *Indian J. Med. Res* 75 : 739.
- [7] Pillot, J, et al., 1987, *J. Med. Virol* 21 : 29A.
- [8] Arankillo, VA, et al., 1988, *Lancet* 1 : 550.
- [9] Bradley, DW, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6227.
- [10] 王光明等, 1989, *实验和临床病毒学杂志* 3 : 1.

Study on Propagation of Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis Agent in Rhesus Monkeys

Yin Shu-rong, Tian Xin, Bao Zuo-yi,
Jiang Yu-tu, Hong Song-fang, Cao Jun-tian

(Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Significant alanine aminotransferase (ALT) elevation was observed in five of seven and all of four Rhesus monkeys (*Macaca mulata*) between 20 and 49 days after intravenous inoculation of pool of stool suspensions and crude liver homogenate respectively that were derived from two monkeys (R5 and R6) infected with stool suspensions obtained from epidemiologically and serologically defined case of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis (ET-NANBH) originating in Xinjiang, China. Characteristic histopathologic changes were acidophilic degeneration of the liver cell and sporadic acidophilic bodies. 27- to 34- nm virus-like particles were identified in stool specimens from a Chinese patient with ET-NANBH and experimentally infected monkeys with the first and second passages of the disease. These particles were specifically aggregated by antibody contained in acute-phase sera from patients and acute- and convalescent-phase sera from ET-NANBH infected chimpanzee and monkeys. These findings indicated that Rhesus monkeys are suitable experimental animal models for studies of ET-NANBH, the liver was the site of virus replication, the 27- to 34- nm virus-like particles found in infected human and primate stool specimens may be etiological agent of ET-NANBH.

Key words: Non-A, non-B hepatitis Animal model Immunoelectromicroscopy