维普资讯 http://www.cqvip.com

298-303, T001-T002

第6卷第4期
1991年12月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.4
Dec. 1991

树鼩对森林脑炎病毒的敏感性及发病机理的研究

侯宗柳[1] 自登云[1] 黄文丽[1] 包铭晖[2]

（1. 云南省流行病防治研究所，大理市671000
2. 大理州卫生学校，大理市671000）

R512.34
R373.31

提 要

从云南新分离森林脑炎病毒（YH和T57）及东北株经脑内、皮下及腹腔感染成年中国云南树鼩，均发生病毒血症，持续时间为7—9天。抗体应答反应和病理改变程度成反比，病变轻的能产生较好的免疫应答。血凝抑制抗体、中和抗体和补体结合抗体分别于感染后的第5、7、13天出现，且血凝抑制抗体和中和抗体均于高呈正相关。经抗原定位研究发现，腹腔注射后48小时，各组织器官均能查到抗原，除中枢神经系统外，其它组织内病毒抗原消失都很快，随病毒血症的消失而转阴，中枢神经系统携带抗原可持续27天，且病变随病程的延长而加重，表现为充血、血管周围淋巴细胞呈套状浸润，局灶性出血，神经元变性，胶质细胞增生，轴索断裂等，说明靶器官是中枢神经系统。试验表明，成年中国云南树鼩对森林脑炎病毒比较敏感，是森林脑炎病毒动物模型研究首选动物。

关键词：森林脑炎病毒　中国云南树鼩　敏感性　发病机理　动物模型

森林脑炎的发病机理的研究，过去常用鼠类、绵羊、豚鼠、山羊和猪等[1]，由于上述动物与人的种族差异较大，结果与人的发病过程及病理改变不大一致；猴子虽然是灵长类动物，但来源困难，价格昂贵。近年来，灵长类动物树鼩用于病毒性疾病的研究报告较多[2-5]，因此，本文用森林脑炎病毒感染成年中国云南树鼩，并对体内病毒的分布、消长及特异性抗体的应答，靶器官的病理改变等作了系统的动态比较研究，结果报道如下。

材料和方法

一、动物：所用的云南树鼩（Tupaia belangeri yunalis）[2]，都来自云南，捕获后分笼饲养，实验前SPA组化法检查血中是否存在森林脑炎病毒抗体，选择健康和未携带森林脑炎抗体的树鼩用于试验。每组4—12只，设对照两只。

二、毒株：RSSE株，系东北候氏患者脑中分离到，由哈尔滨医科大学公共卫生学院刘瑞璋教授惠赠，YH和T57株[6-7]分别分离自云南患者及卵形硬蜱。三株病毒经脑内接种乳小白鼠，待濒死解剖取脑，用次解乳蛋白研磨成10^{-2}悬液，3000r/m，15分钟取上清备用。

本文于1990年10月8日收到，1991年3月15日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

三、免疫血清：系森林脑炎病毒东北株、YH和T57株免疫家兔所得。

四、病毒的感染及观察：用RSSE、YH、T57株经脑内（0.2ml/只）、腹腔（1ml/只），及皮下（1.5ml/只）感染树鼩，接种后观察树鼩的活动、食欲和体温等情况。

五　病毒血症及特异性抗体的消长观察：自接种12小时起，从心脏采血，每天一次，两周后每4天一次，至第35天。

1．病毒血症的观察：将所采集的血液作10倍稀释，接种BHK细胞，延续培养15天，将感染细胞制成抗原片，用间接免疫荧光法检查细胞内携带抗原的情况，以"++"为阳性。

2．中和抗体的测定：采用固定病毒稀释血清法（病毒用100$TCID_{50}$），BHK细胞上做中和试验。

3．血凝抑制抗体测定：采用微量法。抗原用RSSE、YH、T57，使用单位为8个单位；IgM测定法采用70℃加温法。

4．补体结合抗体的测定用冷结合法[8]。

六、脏器内抗原定位检查：分别取感染病毒后第2、4、6、8天及发病死亡和出现症状的树鼩解剖，取其脑皮质、白质、脑干、小脑、脊髓、肺、肝、脾、肾、淋巴结、胃、肠和腹膜等13个脏器作冰冻切片，用IFAT法检查其组织细胞内病毒抗原。以"+"为阳性。

七、病理检查：上述脏器，同时做病理检查，由大理卫生学校病理室协助完成。

八、中和试验：用感染树鼩形成病毒血症材料（含100$TCID_{50}$）为抗原，中和抗体用RSSE、YH和T57免疫血清，方法同中和抗体测定。

结　　果

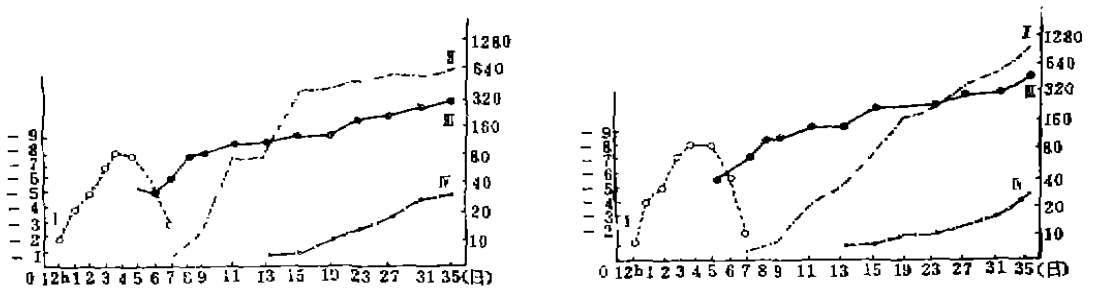
一、感染树鼩的发病情况：三株森林脑炎病毒经脑内和皮下感染7—11天后，每组均有1—2只树鼩发病，食量及活动减少（体温上升不明显），随后逐渐衰竭死亡。此外，东北株和YH分别感染的2只树鼩在第14天和20天先后出现后肢瘫痪。死亡的树鼩解剖后发现大脑及小脑血管充血、出血、胃肠梗阻，出血和尿潴留等，其它脏器无明显变化。

二、病毒血症及抗体应答反应：三株病毒在接种后第12小时血中即可查到病毒，高峰期为3—5天，持续7—9天。血凝抑制抗体于接种后第5天全部出现阳性，中和抗体于第7天查出，两者上升呈正相关。中和抗体滴度东北株上升缓慢，而YH和T57株则在感染15天后上升幅度较大。IgM抗体于第5天出现，两周左右达到高峰，以后逐渐下降。补体结合抗体于第13天出现，上升比较缓慢（图1）。

三、森林脑炎病毒在感染树鼩脏器中的定位：三株病毒感染后第二天，在大脑皮质、白质、脑干、小脑、脊髓及肝、脾、肺、肾、淋巴结、胃、肠及腹膜细胞中均查到特异性森林脑炎病毒抗原（表1、图版I 2），免疫器官病毒消失最早，仅持续4天，其它组织中病毒随病毒血症的转阴而消失，中枢神经系统和腹膜细胞病毒存在时间长达27日之久。

四、三株病毒感染树鼩后发病情况和免疫应答的关系：从表2可看出，发病程度和抗体免疫应答呈负相关，抗体滴度低或不产生特异抗体的树鼩，往往病情严重而导致死亡。

维普资讯 http://www.cqvip.com



a.YH感染
a. Infected with YH

b.RSSE感染 Ⅰ.病毒血症 Ⅱ.血凝抑制抗体
Ⅲ.中和抗体 Ⅳ.补体结合抗体
b.Infected with RSSEV Ⅰ.viremia Ⅱ.HI antibody
Ⅲ.neutralizing antibody Ⅳ.CF antibody

图1 森林脑炎病毒感染树鼩后病毒血症和抗体应答的消长曲线

Fig 1. The growth and decline curve of viremia and antibodies response after infection of tupaia belangeri yunalis with RSSEV

表1 森林脑炎病毒感染树鼩后组织器官携带病毒的动态观察

Table 1. Movable observation of organism carrying the virus after tupaia belangeri yunalis infected with RSSEV

组织 Organism	2			4			6			8			19	27(日D)	
	R	Y	T	R	Y	T	R	Y	T	R	Y	T	R	R	Y
大脑皮质 Brain mantle	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+
大脑白质 Brain neuropile	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	++	+
小脑 Cerebellum	+	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+
脑干 Branin stem	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	−
脊髓 Spinal cord	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+
淋巴结 Lymphoid node	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
胃 Stomach	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
小肠 Intestinun angustum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−
肝 Liver	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−
脾 Spleem	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
肺 Lung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
肾 Kidney	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
腹膜 Peritonaeum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

R=RSSEV Y=YHV T=T57V D=Days

维普资讯 http://www.cqvip.com

五、中和试验结果：RSSE、T57、YH株病毒免疫血清分别稀释于1：320、1：640、1：1280能中和100$TCID_{50}$病毒，感染树鼩的血清能较好地中和原始接种材料，表明树鼩的感染系接种材料所致。

六、病理检查：三株病毒接种树鼩后，仅中枢神经系统及肺出现病理改变（图版Ⅱ3），其它组织无明显的改变。其中YH株引起的病变较重，RSSE及T57次之。病变随病程的延长而加重：表现为大脑皮质、白质、脑干、小脑、脊髓血管扩张、充血、出血、血管周围淋巴细胞呈袖套状浸润，神经元变性、坏死，胶质细胞增生等。出现后肢瘫痪的树鼩，出现脊髓轴索肿胀、变性和断裂等反应。死亡的树鼩大脑皮质及脑干均有坏死灶和软化灶形成。

肺部表现为间隔毛细血管扩张、充血、局灶性出血等，呈间质性肺炎表现。

表 2　森林脑炎病毒感染树鼩后发病情况和抗体应答的关系

Table 2　The relationship between pathogen and antibody respoose on tupaia belangeri yunalis to RSSEV

毒株 Virus strains	注射途径 Inoculation route	病程(天) Course of disease(day)	发病情况 Degree of seriousness	HI抗体滴度 HI ab titer
YH	皮下 Subcutaneou	8	死亡 Death	—
YH	腹腔 Intraperitoneal	8	无症状 No symptom	1：80
YH	脑内 Intracerebral	7	死亡 Death	—
YH	脑内 Intracerebral	20	无症状 No symptom	1：610
RSSE	皮下 Subcutaneous	7	死亡 Death	—
RSSE	脑内 Intracerebral	9	死亡 Death	1：20
RSSE	脑内 Intracerebral	14	瘫痪 Paralysis	1：20
RSSE	腹腔 Intraperitoneal	11	无症状 No symptom	1：160
T57	皮下 Subcutaneous	11	死亡 Death	1：40
T57	腹腔 Intraperitoneal	11	无症状 No symptom	1：160
T57	脑内 Intracerebral	5	死亡 Death	—

讨　论

从病毒血症、抗原在组织内持续的时间及抗体应答可看出，病毒血症及抗原在周围组织内持续7天左右，中和抗体于第7天出现，故周围组织中的病毒及病毒血症随中和抗体的出现而消失。中和抗体和机体的保护性抗体，而病变程度依赖于机体的免疫应答水平。从表2可见，在相同病程情况下，免疫应答好的树鼩基本上不发病和不出现后遗症，而免疫力弱或不产生抗体的树鼩，大多急性期死亡或产生后遗症，与Варкова，З. А. и др.一致[9]。从抗原在组织器官的定位的动态观察可见，病毒在中枢神经系统持续的时间长，这是由于病毒的嗜神经性[10]，不易被抗体消除的缘故[11]，病毒长期繁殖对脑组织的作用，造成严重的病理变化。

从病毒的抗原定位、持续时间及组织病理变化可看出，森林脑炎病毒感染树鼩的靶

维普资讯 http://www.cqvip.com

器官是中枢神经系统，这与感染人的情况一致[10]。中枢神经系统的病理变化是树鼩致死及后遗症的主要原因。但同一病毒感染树鼩和人，引起病变的程度存在较大的差异：感染YHV的患者临床上没有任何神经系统症状及后遗症，而所感染的树鼩中枢神经系统的病变出现早且较重；东北株则相反，也可能由于动物间的种族差异而造成的病毒的致病性差异。

病毒感染树鼩后各种抗体应答出现的时间顺序与病人检测结果基本一致[12-13]。从YH的中和抗体应答曲线可看出，抗体第15天的上升幅度较大，与患者第二次发热相吻合[5]，符合双峰热的森林脑炎病毒抗体应答[1]。血凝抑制抗体和中和抗体的应答关系依赖于他们各自的抗原决定簇[14,15]，由于他们呈正相关关系，可以通过检测HI抗体了解抗体的免疫水平。IgM 抗体出现早，上升快，是早期诊断此病的理想抗体[16]。

由于本实验所用三毒株曾用交叉中和试验证实为森林脑炎病毒株[6,7]，从树鼩感染森林脑炎病毒后的靶器官、病理变化及抗体消长可得出结论：树鼩对森林脑炎病毒易感，是森林脑炎病毒理想的动物模型。

参 考 文 献

〔1〕 韩世杰，1965，中国留学生论文，中国科学院技术情报研究所编，第109页。
〔2〕 王应祥，1980，动物学研究 1(4)：563—564。
〔3〕 Darai G et al.，1980，*Arch Virol* 45：331.
〔4〕 刘丽华等，1985，中华微生物和免疫学杂志 5(5)：329—330。
〔5〕 万新邦等，1985，中华微生物和免疫学杂志 5(5)：304—306。
〔6〕 自登云等，1990，中华实验和临床病毒学杂志 4(4)：507—508。
〔7〕 侯宗柳等，1991，病毒学报 7(1)：75—77。
〔8〕 耿贯一，1984，流行病学—实验室方法在流行病学中的应用，第17—28页。
〔9〕 Варкова，З.А. и др.，1963 Вол. вирусол. 2：189.
〔10〕 中国医学科学院流行病防治研究所编，1978，常见病毒实验技术，第65页。
〔11〕 黄永成等，1959，微生物学报 7(1—2)：55。
〔12〕 樊武舫等，1986，中国人兽共患病杂志 (6)：29。
〔13〕 耿贯一，1984，流行病学—实验室方法在流行病学中的应用，第243页。
〔14〕 Franz.X et al.，1983，*Virology* 126：525—537.
〔15〕 Franz.X et al.，1933，*Virology* 130：485—501.
〔16〕 H.Hofmann.et al.，1979，*J.Gen.Virol* 42：505—511.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Susceptibilty and Pathogenesis Study of Tupaia Belangeri Yunalis to Experimental Infection with Russian Spring-Summer Encephalitis Virus

Hou Zong-liu[1] Zi Deng-yun[1] Huan Wei-li[1] Bao Ming-hui[2]

(1.*Yunnan Provincal Institute of Epidemic Control, Dali* 671000)

(2.*Dali Medical School Dali* 671000)

Chinese tupaia belangeri yunalises were infected with Russian spring-summer encephalitis viruses (Dongbai, YH, T57 strains) by intracerebral, intraperitoneal and subcutaneous route. All tupaia belangeri yunalies had viremia and lasted for 7—9 days. Immune response depended on pathogen which light pathological change induced good immune response. HI antibody, neutralizing antibody and CF antibody were checked out on 5th,7th and 13th day, respectively. The growth of both HI antibody and neutralizing antibody were positive relation.Erain mantle, brain neuropile, cerebellum, brain stem, spinal cord, lymphoid node, stomach, intestinum angustum, liver, spleen, lung, kidney and peritonaeum were examined by IFAT. The organs were negative with viremia gone off but the central nervous system. Pathological examination showed that pathological changes located in the central nervous system, hyperaemia, lymphoid leucocytes surrounded arround the blood vessel,hemorrhage in location,nerve cell denatured and necrosised, neuropongium cell hyperplasia and spinal nerve broke. It showed that central nervous system was the target organ.

Cross-neutralization test showed that the virus to lead to the special pathological changes of tupaia belangeri yunalis was the inoculation material. The experimental results showed that Russian spring-summer encephalitis virus was sensitive to Chinese tupaia belangeri yunalis that is ideal animal model of RSSEV.

Key words: Russian spring-summer encephalitis virus Chinese tupaia belangeri yunalis Susceptibility Pathogenesis Animal mode

维普资讯 http://www.cqvip.com

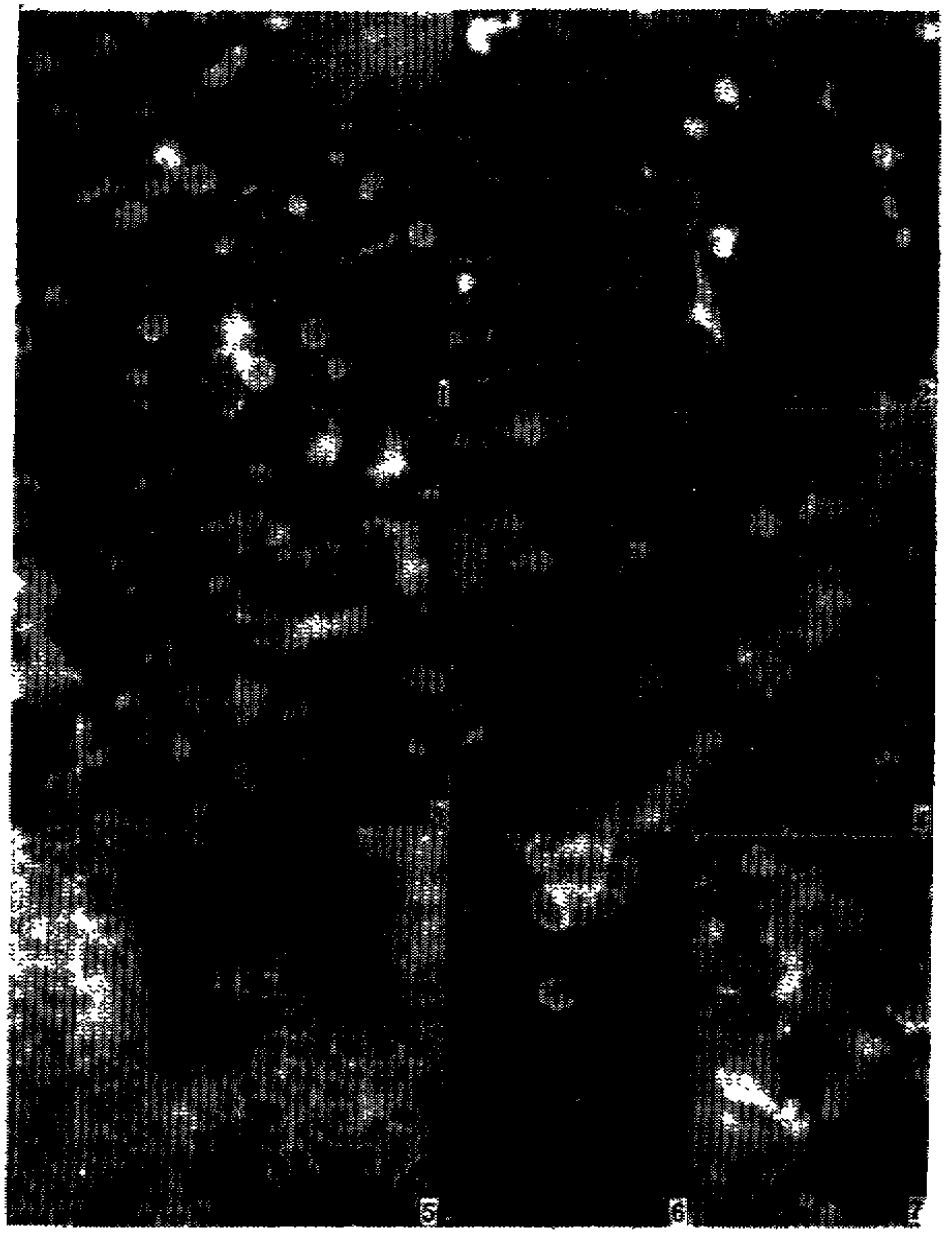


图2 直接免疫荧光法检查树鼩脑、脊髓、肺、肝、肾、脾、睾丸的定位
Fig 2. The viral antigen located in organism of Tupaia belangeri yunalis by IFAT

1. RSSEV 皮下感染后脑幕的荧光抗体反应
2. RSSEV腹腔感染后脊髓的荧光抗体反应
3. YHV 脑内感染后脑幕的荧光抗体反应
4. $T_{57}V$ 腹腔感染后脑幕的荧光抗体反应
5. RSSEV 腹腔感染后肺的荧光抗体反应
6. RSSEV 腹腔感染后腹膜的荧光抗体反应
7. YHV 腹腔感染后脊髓的荧光抗体反应

1. brain mantle by subcutaneous with RSSEV
2. spinal cord by intraperitoneal with RSSEV
3. brain mantle by intracerebral with YHV
4. brain mantle by intraperitoneal with $T_{57}V$
5. lunge by intraperitoneal with RSSEV
6. peritonaeum by intraperitoneal with RSSEV
7. spinal cord by intraperitoneal with YHV

维普资讯 http://www.cqvip.com

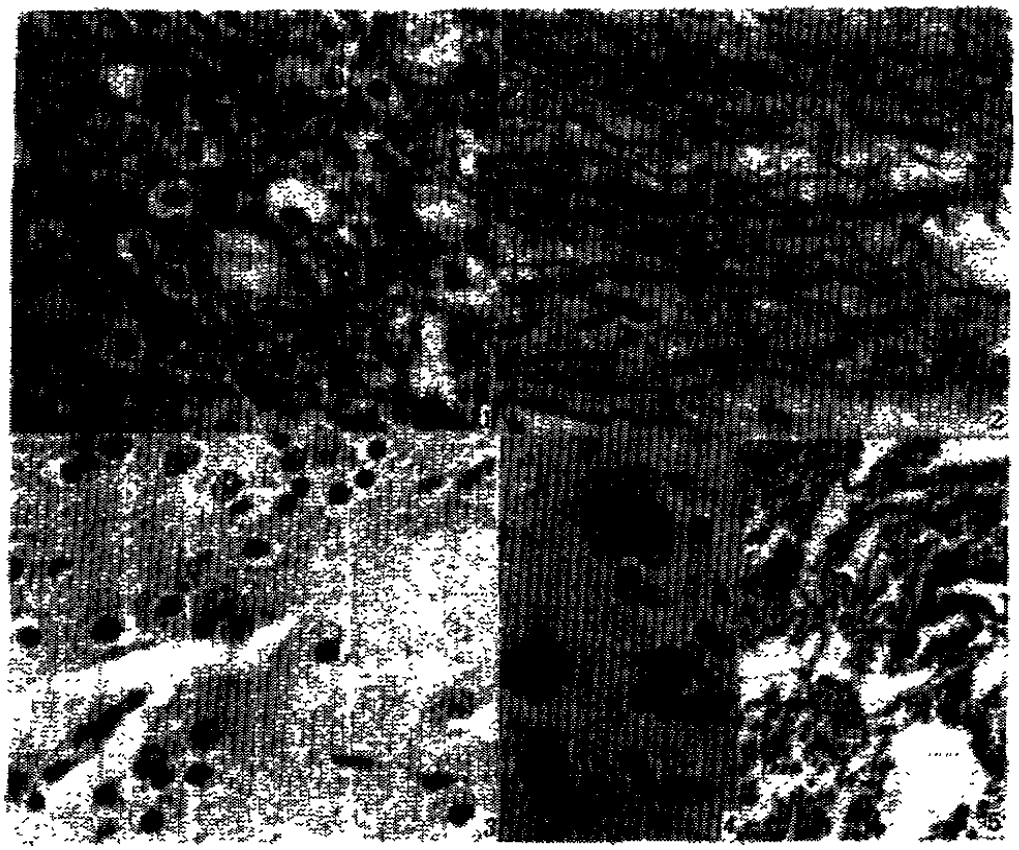


图3 森林脑炎病毒感染树鼩后组织器官的病理变化

Fig 3. Pathological change of organism of tupaia belangeri yunalis infeted with RSSEV

1. YHV腹腔感染树鼩，脊髓白质轴索肿胀、髓鞘肿胀
2. YHV脑内感染树鼩，大脑白质轴索肿胀、断裂、弯曲
3. YHV脑内感染树鼩，大脑坏死性基质溶解、神经细胞和神经胶质细胞坏死
4. RSSEV腹腔感染树鼩，脊髓前角运动神经元变性
5. T57腹腔感染树鼩，弥漫性间质性肺炎

1. Sweelling of neuraxon and neurolemma of spinal cord by intraperitoneal with YHV
2. Swelling, breaking and carving of brain marrow by intracerebral with YHV
3. NC and neuroglia cell necrosising and cytoplasmic matrix lyolysising of brain by intracerebral with YHV
4. Motoneuron of angulus anterior of spinal cord denaturing by intraperitoneal with RSSEV
5. Diffuse interstitial pneumonia by intraperitoneal with T57V