维普资讯 http://www.cqvip.com

第14卷第2期 中国病毒学 Vol.14 No.2
1999年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1999

129-134

戊型肝炎病毒实验感染恒河猴的研究*

R512.63

马雁冰 孙茂盛 庄俊英 谢天宏 张光明
徐维明 戴解杰 李鸿钧 戴长柏

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所,昆明 650107)

摘 要 报道了用戊型肝炎(Hepatitis E, HE)病人粪便悬液感染恒河猴后的组织病理学、血液生化与免疫学以及病毒学分子生物学检测的结果。三只实验猴在感染后第3～4周均出现ALT异常;粪便以及肝脏与胆囊组织超薄切片中电镜观察到27～34 nm大小的病毒样颗粒;病理组织切片观察表明,肝脏组织有典型的急性炎症病灶;粪便与血清经RT-nPCR扩增到戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus, HEV)特异性片段,粪便排毒从感染后第7天持续至第50天左右,病毒血症迟于粪便排毒,出现于感染后两周左右,维持1～2周;ELISA检测发现,实验猴血清中HEV IgG抗体水平在感染后3～4周阳转,4～5个月后转阴。这些实验结果提示,恒河猴作为HEV感染实验动物模型是理想的,建立系统的恒河猴实验模型对探讨HEV感染发病机理、机体免疫应答以及临床诊断与疫苗研制具有重要意义。

关键词 戊型肝炎病毒(HEV),动物模型,恒河猴

1989年,东京国际肝炎会议把经肠道传播的一类非甲非乙型肝炎正式命名为戊型肝炎,戊肝暴发流行几乎遍及全世界,患者达数百万,大规模的流行主要集中于经济不发达,卫生状况较差的发展中国家,尤以印度恒河流域及非洲尼罗河流域严重。1986～1988年,我国新疆也曾有较大规模的戊肝爆发流行,患者达十多万,此外,辽宁,北京,上海,山东,吉林,湖北等许多省市均有小规模戊肝爆发流行及散在病例的报道。戊型肝炎传播迅速,流行面广,主要威胁青壮年身体健康,对孕妇尤其妊娠期最后三个月者危害极为严重,常导致死胎和流产,孕妇病死率可高达20%。戊肝人群感染取样调查较困难及戊肝病毒体外组织培养至今尚不成功,很多基础研究主要依赖于动物模型,特别是疫苗的研制与动物模型有着密切关系。因此,建立系统可靠的戊肝动物感染模型具有极为重要的意义。Balayan等[1]以及其他研究者先后进行了HEV实验感染非人灵长类动物模型的研究,获得了许多有意义的结果。本研究用HEV成功感染了实验恒河猴,观察到典型的组织病理改变,初步了解血清ALT,血清HEV IgG抗体,病毒血症与粪便排毒等各自的消长规律以及其相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物感染 HEV毒种由中国预防医科院病毒所毕胜利教授惠赠,实验用恒河猴由本所灵长类中心提供,选用2～3周岁,体重2～3 kg猴,经筛选无HAV、HBV、HEV抗体者分笼喂养。取戊肝患者急性期粪便

收稿日期:1998-04-20,修回日期:1998-08-17
* 国家"九五"攻关资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

样，以0.1 mol/L PBS缓冲液制成10%悬液，经离心、滤菌后，由后肢静脉注射三只恒河猴，每只1.5 mL，另设实验对照猴一只，注射PBS缓冲液。每日收集粪便样，每周两次采集血清，-70 ℃保存备用。

1.2 IEM观察 粪便悬液10 000 r/min，离心10 min，上清经40 000 r/min超速离心2 h，弃溶液后用0.1 mol/L PBS重悬病毒颗粒，加入等体积戊肝病人急性血清，37 ℃保温1 h，4 ℃过夜，磷钨酸染色后电镜观察。

1.3 组织超薄切片的电镜观察 Maca-5075猴于感染后第36天，ALT由峰值开始下降时宰杀，取胆囊组织与肝组织制成超薄切片进行电镜观察。

1.4 病理组织切片观察 取Maca-5075猴感染后第26天活体肝穿样与尸检肝脏组织制成切片进行观察。

1.5 ALT测定 在自动生化分析仪上完成。

1.6 RT-nPCR检测

1.6.1 RNA的抽提 取粪便悬液超离样或血清样50 μL，参照异硫氰酸胍一步法[2]进行，溶于20 μL DEPC处理的无菌去离子水。

1.6.2 RT-nPCR 引物设计参照中国株HEV序列[3]，由上海生工公司合成，序列如下：F1(4458～4478)：5′TGCTATTATGGTGGAGTGTGG，R1(4876～4859)：5′CAGGGCCCCAATTCTTCT，F2(4520～4540)：5′CTGCGTGGATCCTGCAGGCCC，R2(4762～4741)：5′CCTTCAACTTCAGGCCACAGCC。反转录反应20 μL体系中进行，取2 μL RNA作为模板，其余各反应成分终浓为：1×RT缓冲液，3 μmol/L引物R1，0.5 mmol/L 4×dNTP，95 ℃ 2 min，冰浴冷却，加入30 u RNasin，4.5 u AMV RT(Promega产品)，42 ℃反应1 h，95 ℃加热5 min以灭活AMV RT，冰浴冷却。PCR外循环按下列条件进行：在50 μL体系中加入2.5 μL反转录产物，1 μmol/L引物F1及R1，0.25 mmol/L 4×dNTP，1×反应缓冲液，1.75 mmol/L $MgCl_2$，Tsg酶1.5 u(上海生工产品)，循环参数如下：95 ℃，30 s；55 ℃，30 s；72 ℃，30 s，共30循环，取2.5 μL反应产物作为模板进行PCR内循环，引物为F2与R2，其余条件同外循环。取5 μL产物1.5%琼脂糖电泳分析。

1.7 ELISA检测 抗原为本室构建表达的HEV ORF2 C端片段，兔抗猴IgG经纯化猴IgG免疫兔子制备，羊抗兔IgG-HRP为北京生物制品所产品。以pH9.6碳酸缓冲液稀释抗原至3～5 μg/100 μL，包被酶标板，4 ℃过夜；PBS-T洗涤5次，每次5 min，每孔加入3% BSA封闭，37 ℃，2 h；洗涤，加入待测血清样100 μL(1∶20稀释)，37 ℃温育1 h；洗涤，再加入100 μL兔抗猴IgG，37 ℃，1 h；洗涤，加100 μL酶标二抗，37 ℃，1 h；洗涤，加入100 μL底物溶液(4 mgOPD/10mL柠檬酸缓冲液，15 μL H_2O_2)，避光37 ℃反应10 min，加入100 μL 2 mol/L H_2SO_4终止反应，在酶标仪上读取OD_{490}值。

2 结果

2.1 病毒形态的观察 Maca-5075猴感染后第17天，粪便样中IEM观察到27～34 nm大小病毒样颗粒，具有实心与空壳两种形态，病毒颗粒间有明显抗体桥(图1)。超薄组织切片的电镜观察表明，肝组织细胞包涵体中存在戊肝病毒大小的病毒样颗粒(图2A)，溶解坏死的胆囊上皮细胞碎片中可见一簇聚集在一起的病毒样颗粒(图2B)，胆囊组织细胞突起中散在病毒样颗粒(图2C)。

2.2 病毒组织切片观察 尸检肝脏病理组织切片可见肝实质疏松坏死，大量淋巴细胞和少量中性白细胞灶性浸润(图3A)，中央静脉壁被破坏，淋巴细胞浸润，汇管区类症细胞浸润(图3B)。

2.3 ALT，HEV IgG抗体水平测定以及排毒检测 实验对照猴Maca-5271在整个实验过程ALT水平无明显变化，HEV IgG抗体保持阴性(图4A)；Maca-5075猴在感染后第25天血清HEV IgG抗体阳转，第28天ALT出现异常，一周内达到峰值，为感染前的5倍，感染后第7天可在粪便中检测到HEV RNA，病毒血症检出在第14～21天之间(图4B)；Maca-5532猴在

维普资讯 http://www.cqvip.com

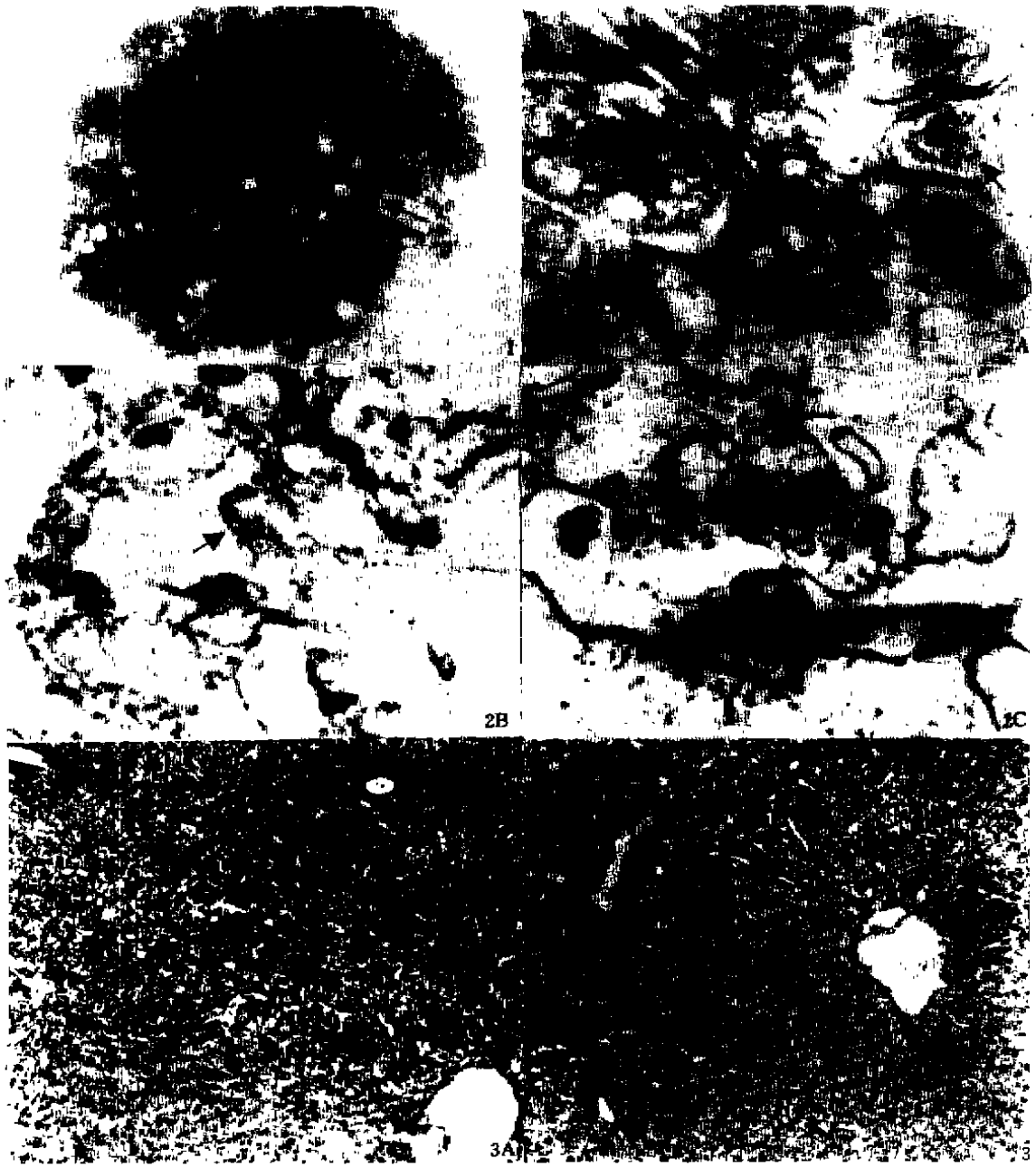

图 1　粪便悬液中戊型肝炎病毒样颗粒的免疫电镜观察　（×90 000）

图 2　超薄组织切片中戊型肝炎病毒样颗粒的电镜观察

图 3　肝脏组织切片病理检测　（×120）

Fig 1　Immune electron microscopy of HEV like particles from fecal suspensions（×90 000）

Fig 2　Electron microscopy of HEV like particles from super-thin tissue slice

A. liver tissue（×20 000）; B. gallbladder tissue（×30 000）; C. gallbladder tissue（×30 000）

Fig 3　Pathological detection of liver tissue slice（×120）

维普资讯 http://www.cqvip.com

感染后第28天抗体阳转，120天左右回复正常，抗体阳转的同时ALT轻微异常，峰值为感染前3倍、粪便排毒从感染后第7天持续至第55天，病毒血症为第14～28天(图4C)；Maca-5535猴在感染后第18天抗体即阳转，120天左右转阴，ALT在抗体阳转数天后出现轻微异常，峰值为感染前2倍，粪便排毒在第9～42天、病毒血症为第18～32天(图4D)。

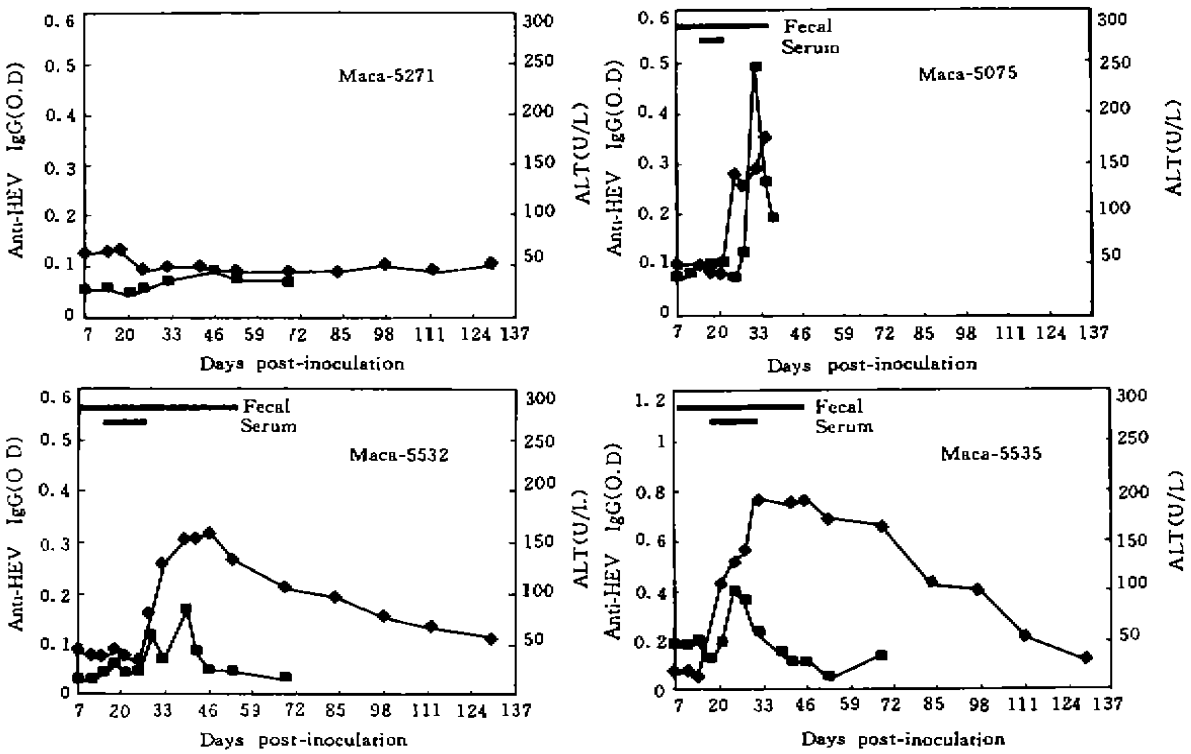

图4 实验恒河猴血清ALT、HEV IgG抗体、血清和粪便HEV RNA的动态变化

Fig.4 Dynamics of ALT elevation anti-HEV conversion, and HEV RNA in sera and feces in experimental Macaques

—◆— anti-HEV IgG —■— ALT

—— The presence of HEV RNA detected by RT-nPCR

3 讨论

戊型肝炎病毒实验感染恒河猴的研究，国内外已有文献报道[4~8]。戊肝病毒可在恒河猴中传代、感染后猴体肝脏发生典型急性肝炎病变，并伴随有ALT异常，HEV抗体阳转，粪便中可见病毒颗粒、表明恒河猴对戊肝敏感，是较好的动物模型。在本研究中，我们较为全面细致地探讨了实验猴组织病理、血清ALT、血清HEV抗体、病毒血症与粪便排毒等的动态变化规律及相关性。

实验猴感染HEV后粪便经IEM观察到实心与空壳两种形态的病毒颗粒。粪便中的空壳病毒，推测为复制时RNA未能掺入或病毒经过消化道时RNA降解、丢失造成。在肝脏与胆

维普资讯 http://www.cqvip.com

囊组织中也观察到 27～34nm 大小的病毒样颗粒。提示经血液感染后，HEV 在肝组织进行复制，然后经胆汁进入消化道排放，这与文献报道一致。组织病理切片表明 HEV 感染可引起实验恒河猴肝脏典型的急性肝炎病变，症状较轻微，三只实验猴感染后均出现 ALT 异常，时间不超过两周，峰值达感染前平均值的 2～5 倍，这与殷书荣等[5]的报道相近，表明一般情况下 HEV 感染对实验猴肝脏损伤较轻且恢复较快。在 ELISA 检测血清抗体实验中，所采用的抗原为我们表达的非融合型的 ORF2 C 端片段，该片段抗原性好，检测灵敏度高，详细情况另文介绍。实验中我们发现血清抗体阳转与血清 ALT 升高没有明显相关性，实验猴血清 HEV IgG 抗体在 ALT 升高之前阳转，与文献报道在 ALT 升高后阳转有所差异。李凡等[8]用 HEV 感染实验猴，一般 6 周后抗体降至低水平，有个别达 12 周。我们在实验中发现，IgG 抗体可维持 4～5 个月，它对 HEV 的再次攻击是否有保护作用，或者机体感染 HEV 后是否产生细胞免疫以及免疫记忆等，都有待进一步研究。在排毒检测中我们采用 RT-nPCR 技术，较国内其他报道采用的免疫电镜检出灵敏度与特异性显著提高。同时，在检测中我们采用超速离心处理样品，以浓缩病毒和降低粪便中物质对检测造成抑制的可能，并通过优化 PCR 条件，进一步提高了灵敏度与特异性。检测表明，病毒血症迟于粪便排毒，仅维持 1～2 周，其出现于 ALT 升高与抗体阳转之前、在抗体峰值前结束，而粪便排毒则检出较早且维持 50 d 左右，提示戊肝预防的重点是掐断粪-口传播途径，同时也不排除特殊情况下血液传播的可能。实验动物在感染戊肝后 ALT 水平、抗体应答、排毒等均表现出个体差异，可能与猴体自身免疫能力、病毒复制速度等有关。

综上所述，为了解 HEV 感染途径、致病机理，组织病理学改变及排毒、ALT、抗体消长规律提供了一些有意义的依据，要更系统、全面地评价上述问题，以便更好地指导临床诊断、疾病预防与疫苗研制，仍需做进一步深入细致的工作。

致谢　本所检定室罗其胜副主任技师帮助完成病理切片观察，李春宏同志参加了本课题工作，本文照片由石怀生同志拍摄，特致谢忱。

参 考 文 献

1 Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS *et al*. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology 1983, 20: 23～31

2 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorofrom extraction. Anal Biochem 1987, 162: 156～159

3 毕胜利，刘崇柏，曹学义等. 我国戊型肝炎病毒基因组 cDNA 全序列测定及分析. 病毒学报，1992，8(3)：271～279

4 Gupta H, Tondon BN, Sriramachari S *et al*. Animal transmission of enteric nonA-nonB hepatitis infection to *Macaca mulatta* by feco-oral route. Indian J Med Res, 1990, 91: 87～90

5 殷书荣，刘崇柏，鲍作义等. 肠道传播的非甲非乙型肝炎在恒河猴中的传代研究. 病毒学杂志，1990，3：265～272

6 王光明，庄辉，方喜业等. 用肠道传播的非甲非乙型肝炎病毒感染恒河猴中的研究. 实验和临床病毒学杂志，1989，3：1～5

7 黄如统，魏君，李得荣等. 我国戊型肝炎病毒 87A 株实验感染恒河猴的研究. 军事医学科学院院刊，1997，21(3)：190～193

8 李凡，庄辉，郭晓霞等. 实验感染戊型肝炎病毒(HEV)猕猴血清抗 HEV 的动态变化. 中华实验和临床病毒学杂志，1992，6(1)：10～13

维普资讯 http://www.cqvip.com

Study on Experimental Infection of Rhesus Monkeys with Hepatitis E Virus

Ma Yanbing Sun Maosheng Zhuang Junying Xie Tianhong Zhang Guangming Xu Weimin Dai Jiejie Li Hongjun Dai Changbai

(*Institute of Medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming* 650107)

Abstract Three rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) were inoculated intravenously with fecal suspensions obtained from hepatitis E patients. The alanine aminotransferase (ALT) level in the three monkeys elevated 3 to 4 weeks after infection. Virus-like particles about 27 to 34 nm were found in the stool specimens, the liver and the gallbladder tissues by electron microscope examination The liver tissue slice showed characteristic histopathologic changes of acute hepatitis. Specific HEV fragments were obtained by RT-nPCR from feces and sera. Excretion of virus began on the 7th day and lasted to about the 50th day after infection. The appearance of virus in serum was 2 weeks after inoculation and lasted for only 1 to 2 weeks. Anti-HEV IgG was detected by enzyme-linked immunosorbent assay 3 – 4 weeks after infection and negative conversion took place 4 to 5 months later.

Key words Hepatitis E virus (HEV), Animal model, Rhesus monkey

中国科学院武汉病毒研究所与荷兰农业大学病毒系

无脊椎动物病毒学联合实验室

1999年开放研究课题指南

一、本实验室主要从事昆虫病毒及水生无脊椎动物病毒的基础和应用研究。主要研究方向和研究内容有：无脊椎动物病毒资源以及病毒的分类与进化；无脊椎动物病毒基因(基因组)结构与功能；工程病毒杀虫剂的研制；新型杆状病毒表达载体系统的构建及应用；昆虫病毒杀虫剂的应用生态学以及水生无脊椎动物病毒病的防治等。

近期支持有关下列内容的研究工作：新种无脊椎动物病毒的鉴定与分类；无脊椎动物病毒的分子分类及进化研究；杆状病毒与细胞及宿主昆虫相互作用的分子机理；新型快速工程病毒杀虫剂的构建及重组病毒的生产技术研究；昆虫杆状病毒虫体表达系统的组建以及重要活性多肽的克隆与表达；与杆状病毒流行性能相关的分子生物学研究及昆虫病毒田间流行病学规律的研究；水生无脊椎动物病毒的基因组结构以及水生无脊椎动物病毒病的早期诊断与防治。欢迎对上述研究有兴趣的国内外科学家作为访问学者来实验室工作。

二、申请须知

1. 凡具有助理研究员或硕士以上水平的国内外科技人员愿意来本实验室工作者，请来函索取申请书(中、英文)，填写后随同本人简历寄武汉病毒所科研处梁莉(邮编430071、电话027－87641921)，9月底截止申请。每年年底提请学术委员会评审，结果于次年元月份通知。

2. 访问学者在本室工作时限以课题所需为准，一般1－2年，期满后经双方同意可以延长。

3. 申请获准的访问学者在本室有关组工作，或参加已有课题研究，本室将根据情况给予必要的经费支持。也欢迎访问学者提出课题自带经费，经学术委员会评审后开展工作。鼓励访问学者与本室人员联合申请国家研究课题和科学基金。

4. 课题结束时，须向实验室提交研究论文，研究成果为本室和访问学者原单位共有，论文发表时，同时注明本联合实验室与研究者所在单位。

5. 本室为访问学者提供必要的工作条件。访问学者工资待遇由原单位支付，本室可给予适当的生活补助。