

恒河猴感染 SARS 病毒致病模型的建立*

侯 炜¹, 杨占秋^{1**}, 朱润庆², 魏文进³, 周 俊¹, 钟 琼¹, 王 薇¹,
唐志佼², 汤宏斌³, 鲜巧阳³, 王 勇³, 文 利¹

(1. 教育部病毒学重点实验室/武汉大学医学院病毒学研究所, 湖北武汉 430071; 2. 武汉大学医学院病理生理系, 湖北武汉 430071; 3. 武汉大学实验动物中心, 湖北武汉 430071)

Establishment of Pathogenicity Model of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Infection on Macaca Rhesus

HOU Wei¹, YANG Zhan-qiu^{1**}, ZHU Run-qing², WEI Wen-jing³, ZHOU Jun¹, ZHONG Qiong¹, WANG Wei¹,
TANG Zhi-jiao², TANG Hong-bin³, XIAN Qiao-yang³, WANG Yong³, WEN Li¹

(1. key Laboratory of Virology of Ministry of Education, Institution of Virology, Medical School of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Pathology, Medical School of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Centre of Experimental Animal, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: To create the pathogenicity model of severe acute respiratory syndrome (SARS) on macaca rhesus, the macaca rhesus was infected with SARS coronavirus (SARS CoV) was detected in different samples coming from macaca rhesus in different days by virus isolation, immunofluorescence assay, pathological inspection and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that SARS CoV were isolated from the above samples, and SARS CoV RNA could be detected in blood of the 2nd and 5th day, secreta of nose-throat of the 7th and 9th day, faeces of the 3th day, and faeces and urines of the 5th day after infection. Under the microscope, it was found in the group infected by SARS CoV that pulmonary alveolus interval had been broadened and had many lymphocytes and monocytes infiltrated. There was much exudation in the chamber pulmonary alveolus, which even formed the hyaline membrane. The organized pneumonia could be found in several pulmonary alveolus. great necrosis foci was also observed in the liver, companied by some inflammatory cells infiltrated. It may be successful to create the model of SARS on macaca rhesus, and show that the animal model can be used to evaluate anti-SARS CoV drugs and vaccines.

Key words: Severe Acute Respiratory Syndrome virus; Pathogenicity; Model

摘要: 为建立恒河猴严重急性呼吸道综合征 (SARS) 的模型并对其致病特点进行观察, 采用病毒分离、免疫荧光、光镜及 RT-PCR 方法对病毒感染组和非感染组恒河猴不同时间、不同组织或分泌物进行检测。结果显示从恒河猴不同组织中分离到病毒, 而且在病毒感染后第 2d 和第 5d 的血液、第 7、9d 的鼻咽分泌物、第 3d 的粪、第 5d 的粪尿中均检测到 SARS-CoV RNA。光镜观察到病毒感染组肺组织肺泡间隔增宽, 有大量淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺泡腔有渗出, 甚至形成透明膜样物; 多个肺泡形成机化性肺炎的表现。感染组肝组织可见较大的坏死灶, 并伴有大量

收稿日期: 2004-05-17, 修回日期: 2004-07-05

- * 基金项目: 中国医学基金会新药基金; 北京华特森基因科技有限公司资助项目
作者简介: 侯 炜 (1970-), 男, 湖北省籍, 副教授, 博士生, 从事分子病毒学研究。
** 通讯作者: 杨占秋 (1952-), 男, 湖北省籍, 研究员, 从事医学病毒学研究。
Corresponding author, Tel:027-87331136, E-mail: yangzhanqiu@163.com

炎性细胞浸润。结论认为已成功建立了恒河猴 SARS 模型, 可用于评价抗 SARS 药物和疫苗的研究。

关键词: 严重急性呼吸道综合征 (SARS); 致病性; 模型

中图分类号: R374.31

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0545-04

严重急性呼吸道综合征(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS, 即非典型性肺炎)在全球二十多个国家和地区爆发, 是进入新世纪以来的一次威胁人类健康的重大灾害。在各国医学专家的共同努力下, 引起 SARS 的病原体已确定为新型的冠状病毒—SARS 冠状病毒 (SARS Coronavirus, SARS CoV) [1-3]。对 SARS CoV 生物学性状和实验室检测方面、疾病诊断与治疗等的研究尚处于起步阶段。为了最终控制 SARS 感染和评价抗 SARS 药物, 建立 SARS 的动物模型是十分必要的。在探讨 SARS CoV 灭活疫苗对恒河猴的免疫原性和免疫增强实验研究时, 我们首先进行了 SARS CoV 感染恒河猴模型的研究, 结果如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

SARS CoV NS- I 株, 为国家认可的 SARS CoV 标准株, 由北京华特森基因科技有限公司提供。Vero 细胞 (163 代) 由武汉大学典型物保存中心提供, 培养用 MEM 培养基+10%小牛血清, 常规加入青、链霉素 (自配)。普通恒河猴 (Macaca Rhesus) 12 只, 2~3 岁, 约 5kg 左右, 雌雄各半。健康良好, SARS CoV IgG 检测阴性, 购自云南省动物繁殖中心。

1.2 动物分组和病毒感染

设病毒感染组和非病毒感染组各 6 只恒河猴。猴笼保持空气新鲜, 维持相对湿度 60%, 温度 (20±5) °C, 感染部位常规消毒后, 将病毒用注射器经气管软骨气管内滴注, 病毒滴度为 10⁸PFU/mL, 感染剂量为 0.5mL/只。

1.3 病毒分离

恒河猴感染病毒后, 第 2、5d 分别静脉采血 2-3mL (不抗凝); 第 3、5、7、9d 采集鼻咽拭子和肛拭子, 并置于 1mL 生理盐水中; 第 1d 后隔日采集尿液; 上述标本存 4°C。第 10d 各处死 3 只恒河猴及第 14d 各处死另 3 只恒河猴, 并取肺组织存-30 °C。病毒感染前分别留血液、鼻咽拭子、肛拭子和尿液作为对照。病毒分离程序为: 将组织制成 10% 匀浆或分泌物离心上清, 取 0.2mL/孔, 接种到已长成单层的 24 孔细胞培养板内, 每份标本接种 4 孔, 37°C、5%CO₂ 培养, 观察细胞病变, 未病变标本盲传 3 代并作间接免疫荧光检测。

1.4 病理检查

取处死后恒河猴的肺、肝、肾、脾、心脏和脑组织, 常规病理固定、HE 染色, 光镜下观察。

1.5 病毒核酸检测

上述病毒分离材料 (包括 SARS CoV NS- I 株) 用 TRIzol RNA 抽提试剂 (Invitrogen 生命公司) 抽提 RNA, 所提 RNA 溶于 20μL 无 RNA 酶的水中备用。逆转录过程为: 组织 RNA 或 SARS CoV NS-1 株 RNA 4μL, 加 Oligo (dT) (0.5μg/μL) 2μL 补水至 10.5μL, 65°C 变性 10min, 后立即至冰浴, 依次加入 5×逆转录缓冲液 4μL、0.1mol/L DTT 2μL、0.01mol/L dNTP 2μL、RNasin (40U/μL) 0.5μL 及 AMV (5U/μL) 1μL, 43°C 水浴 1h, 后立即至冰浴。取 cDNA 5μL、10×Taq 酶缓冲液 5μL、dNTPs (0.01mol/L) 2μL、引物 1, 2 各 1μL (序列见下)、Taq 酶 (2U/μL) 1μL, 补水至总体积 50μL 进行 PCR 扩增, 反应参数为: 94°C 2min; 94°C 10s/55°C 30s/68°C 3min, 共 10 个循环; 94°C 10s/55°C 30s/68°C 3min, 共 25 个循环, 后 68°C 7min 延伸。引物序列为: 5'CAGAGTTG TGTTTCAAGTG 3' (21431-21450) 和 5'CACAGA GTAATCAGCAACAC 3' (22538- 22519)。反应产物经含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1.1kb 处出现特异性核酸扩增带者为阳性, 反之阴性。正常组织、病毒标准株分别作阴阳性对照。

1.6 间接免疫荧光检测

感染细胞滴片晾干, 冷丙酮固定 30min, 将已灭活的传染性非典型性肺炎的恢复期病人血清标本适当稀释后分别滴加到细胞抗原片上, 置 37°C 湿盒中孵育 30min, 冲洗, PBS 液中振荡洗 3 次, 晾干。然后加 FITC 羊抗人 IgG 荧光抗体, 同前常规孵育、冲洗、晾干并封片, 在荧光显微镜下观察染色结果。胞浆或胞膜上出现翠绿色荧光者为阳性, 桔红色者为阴性。

2 结 果

2.1 感染恒河猴的表现

SARS CoV NS-I 株感染恒河猴后, 2 只感染恒河猴出现一过性体温升高 (39.5°C, 高于猴体正常体温 38.0°C)。X 光片显示肺部出现轻度片状浸润性阴影 (见彩版 I 图 1)。14d 后病毒感染组和非感染组均未发病死亡。

2.2 感染恒河猴的不同组织光镜观察

病毒感染组肺组织表现为肺泡间隔增宽, 有大量淋巴细胞、单核细胞浸润, 肺泡腔有渗出, 甚至形成透明膜样物; 多个肺泡形成机化性肺炎的表现。感染组 6 只恒河猴肝组织均可见较大的坏死灶, 并伴有大量炎性细胞浸润。而感染组其他组织未见异常。同时非感染组肺、肝等组织未见上述病理性异常。(见彩版 I 图 2-A~D)

2.3 感染恒河猴的不同组织内病毒的检测

病毒感染后, 对恒河猴不同时间、不同组织进行病毒分离, 盲传三代未见明显的细胞病变, 但免疫荧光检测有病毒抗原存在(见彩版 I 图 3)。用 SARS CoV 3'末端特异性引物对中国代表株 NS-1 株进行扩增, 结果显示特异性引物可扩增出特异性片段(约 1.1kb), 其大小与理论值一致, 而用该引物对未感染的 Vero 细胞进行 RT-PCR 扩增未见特异性片段(见图 4)。用建立的 SARS CoV RT-PCR 方法

对分离于恒河猴不同时间的不同组织进行检测, 结果见表 1。

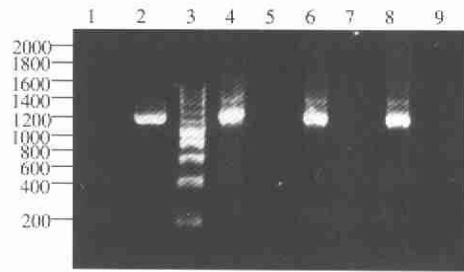


图 4 RT-PCR 对恒河猴不同组织中 SARS CoV 的检测
Fig. 4 Identification of SARS CoV RNA in different tissues of macaca rhesus by RT-PCR

Lane 1: Negative control; Lane 2: SARS CoV NS-1 strain; Lane 3: PCR Mark (200bp); Lane 5/7/9: Bloods, secretas of nose-throat, faeces and urines of macaca rhesus in the groups with disinfecting SARS CoV; Lane 4/6/8: Bloods, secretas of nose-throat, faeces and urines of macaca rhesus in the group with infecting SARS CoV.

表 1 恒河猴不同时间、不同组织中 SARS CoV 的检测
Table 1 Determination of SARS CoV RNA in different time and tissues of macaca rhesus

Groups	Nose-throat secretas(d)				Faeces(d)				Urines(d)					Bloods(d)			Lungs	
	3	5	7	9	3	5	7	9	1	3	5	7	9	pre-infection	2	5		
Virus infection (n=6)	**	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Normal control (n=6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: "+" positive amplification of SARS CoV; **: "-" negative amplification of SARS CoV.

3 讨论

严重急性呼吸道综合征(SARS)是一种以呼吸道传播为主的急性传染病, 该病临床主要表现为发热、干咳、肺部阴影等, 根据临床表现、病因不详及临床抗感染治疗效果不佳等特点, 命名为“非典型性肺炎”(atypical pneumonia, AP)。本病传染性强, 与病人密切接触的医务人员是本病的高危人群。由于患者呼吸系统受损症状突出, 产生严重呼吸窘迫, 据世界卫生组织介绍: 目前全球 SARS 病的病死率 24 岁以下 <1%, 25 岁~44 岁为 6%, 45 岁~64 岁为 15%, 65 岁以上为 50% 甚至更高^[4]。

因此, SARS 恒河猴模型的建立可用于 SARS 致病机理的研究, 也为抗 SARS 药物的筛选和抗 SARS 疫苗的疗效评价提供了新的手段。

目前已知猫、雪貂^[5]、乳鼠^[6]等可感染 SARS CoV, 引起动物的发病和死亡, 并从感染动物肺标本中观察到冠状病毒颗粒, 但不出现或出现较轻微类似人的严重急性呼吸道综合征的症状。荷兰鹿特丹医学中心和香港大学等^[7]用一株 SARS 死亡患者分离的 SARS CoV, 以 VeroE6 细胞培养后接种两只猕猴, 3d 后猕猴出现昏睡及短时间皮疹, 其中一只接种的第 4d 出现呼吸道症状; 2~6d 后, 可从猕猴的鼻咽喉部分离到病毒, 经电镜和 RT-PCR 检测证

实为 SARS CoV; 用间接免疫荧光法检测 Vero 细胞, 在猕猴感染 16d 后查出 SARS CoV 的血清抗体, 从一只猕猴粪便中分离到 SARS CoV, 一只猕猴尸检发现有肉眼可见的严重多灶性肺实变, 并能在肺组织中检测并分离出 SARS CoV。

本研究用 SARS CoV NS- I 株感染恒河猴, 虽然感染猴未出现类似 SARS 患者的发病特征, 但在感染猴的血液、鼻咽分泌物、粪尿及肺组织中均分离出病毒, 并且 PCR 方法也证实了恒河猴感染 SARS 病毒, 在病毒感染后第 2d 和第 5d 的血液、第 3d、5d、7d、9d 的鼻咽分泌物、第 3d 的粪、第 5d 的粪尿以及肺组织中均检测到 SARS-CoV RNA。由于 RT-PCR 法检测临床标本如血液、痰液、咽拭子、嗽口水中 SARS-CoV 阳性率偏低, 一般只在 30% 左右, 报道阳性率较高的约 70%^[8], SARS-CoV RNA 阳性判断标准: 应用 PCR 方法, 符合下列三项之一者可判断为检测结果阳性; (1) 至少需要两个不同部位的临床标本检测阳性(例: 鼻咽分泌物和粪便); (2) 收集至少间隔 2d 的同一种临床标本送检检测阳性(例: 2 份或多份鼻咽分泌物); (3) 在每一个特定检测中对原临床标本使用两种不同的方法, 或重复 PCR 方法检测阳性^[9,10]。本研究恒河猴体内病毒检测的结果符合上述标准。另外, 光镜观察发现, 病毒感染猴的肺、肝均出现类似临床“非典型性肺炎”相应组织的病理改变^[11,12]。这说明我们建立的 SARS 恒河猴模型是成功的。此外我们也已成功地将此模型用于 SARS CoV 灭活疫苗的免疫保护、安全性以及免疫增强试验的评价, 有关 SARS CoV 灭活疫苗在猴体内的抗 SARS CoV 效果将在另文介绍。

致谢: 感谢中国医学基金会新药基金李金健先生、孙妍女士等在动物饲养和取材、细胞培养等研究中的大力支持与帮助!

参考文献

- [1] Acute respiratory syndrome in China -update 3: disease outbreak reported. Geneva: World Health Organization, 2003[J/OL]. (Accessed March 31, 2003, at http://www.who.int/csr/don/2003_2_20/en.)
- [2] Booth C M, Matukas L M, Tomlinson G A, et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the Greater Toronto area[J]. JAMA, 2003;289:2801-9.
- [3] Yeung M C, Yu W C. Outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong special administrative region: case report[J]. BMJ, 2003; 326: 850..
- [4] Berger A, Drosten C H, Doerr H W, et al. Severe acute respiratory syndrome -paradigm of an emerging viral infection[J]. J Clin Virol, 2004; 29:13-22.
- [5] Martina B E, Haagmans B L, Kuiken T, et al. SARS virus infection of cats and ferrets[J]. Nature, 2003; 425: 915.
- [6] 王翠娥, 秦鄂德, 甘永华, 等. 非典型性肺炎标本感染乳鼠和 Vero E6 细胞的病理学观察[J]. 解放军医学杂志, 2003; 28 (5): 383-4.
- [7] WHO. Summary of the technical meeting on "SARS animal models" [J/OL]. http://www.who.int/entity/vaccine_research/diseases/sars/events/2004/02/en/sars_feb04_report.pdf.
- [8] 任 翊, 丁惠国, 吴清发, 等. RT-PCR 测定 SARS 患者粪便及嗽口中 SARS CoV RNA 及其临床意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003; 23(12): 930-3
- [9] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. The New England Journal of Medicine. 2003; 348:1967-1976.
- [10] 中华人民共和国卫生部, 国家中医药管理局. 传染性非典型肺炎 (SARS) 诊疗方案[R]. 2003.
- [11] 丁彦青. 严重急性呼吸道综合症的病理学及发病机制[J]. 解放军医学杂志, 2003; 28(6): 475-476.
- [12] 赵景民, 周光德, 孙艳玲, 等. 严重急性呼吸道综合征肺外器官的病理学观察研究[J]. 解放军医学杂志, 2003; 28(6): 480-481.

彩 版 I

侯 炜, 等. 恒河猴感染SARS病毒致病模型的建立 (正文见545页)

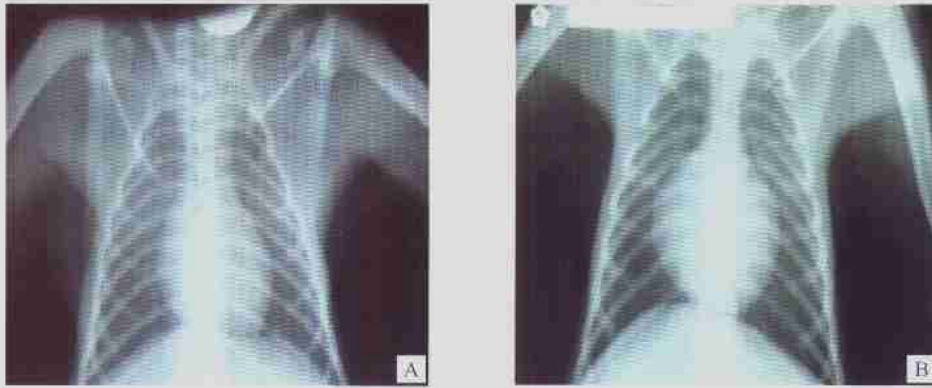


图1 恒河猴感染SARS CoV后肺部X光片

Fig.1 Chest radiographs of macaca rhesus infected with SARS CoV.

The normal lungs were showed in the left(A), and patchy consolidation was shown in the right(B) high zone.

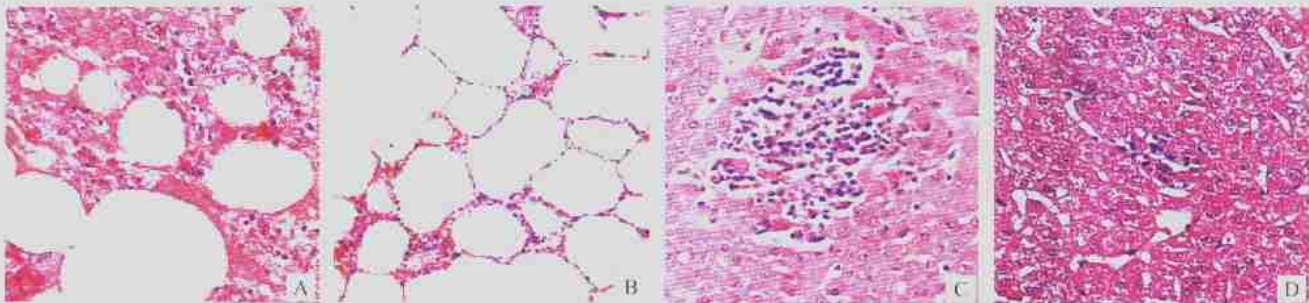


图2 恒河猴感染SARS CoV后不同组织的H.E染色结果

Fig.2 Haematoxylin-eosin staining of selected tissues of macaca rhesus infected with SARS CoV.

A showed the lungs infected by SARS CoV($\times 400$); B showed the lungs disinfected by SARS CoV($\times 200$); C showed the livers infected by SARS CoV($\times 400$); D showed the livers disinfected by SARS CoV($\times 200$);

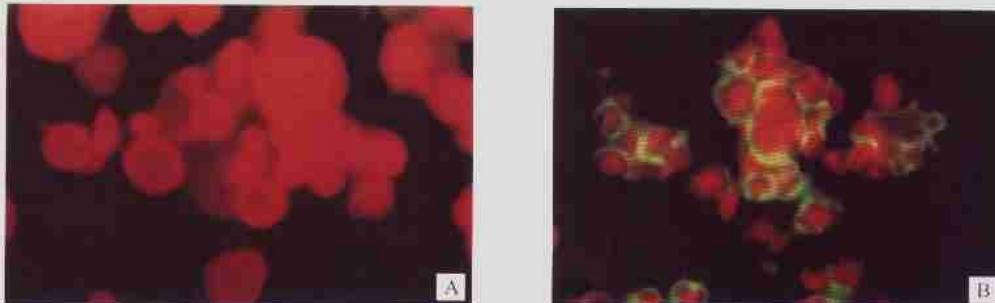


图3 间接免疫荧光染色结果

Fig.3 Results of indirect-immunofluorescence staining

The negative control was shown in the left, and the positive control was shown in the right.