DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.002

丙型肝炎病毒感染成年树鼩的实验研究

刘 志* 毛 青 王宇明 李奇芬 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨成年树 (Tupaia)感染 HCV的可能性。方法: 用 HCV RNA阳性人血清接种 10只健康成年 Tupaia 观察临床表现;定期检测血清 ALT和 HCV RNA正、负链;检测肝组织中 HCV 3种抗原和负链 HCV RNA;行肝组织病理检查。结果: Tupaia接种阳性血清后, 10例均出现不同程度的肝炎症状; 10例血清 ALT升高,其中 3例在 28周时仍高于正常; 6例肝组织中 HCV抗原持续阳性,持续时间大于 28周; 10例出现急性肝炎的肝组织病理学变化,其中 4例有慢性肝炎病变。检测 4只动物血清的系列标本, HCV RNA均呈间歇性阳性;检测 3只动物肝组织负链 HCV RNA均为阳性;检测 1例动物肝外组织,其中心肌细胞、胰岛细胞和肾小管上皮细胞中有 HCV 3种抗原染色阳性信号。结论: HCV能够感染成年 Tupaia,并可形成慢性病变,感染率约为 60%,慢性病变发生率约为 40%。 Tupaia可作为研究丙型肝炎的实验动物。

关键词 丙型肝炎病毒;疾病模型;动物,树
中图法分类号 R512.63

迄今尚无理想的丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV)感染的小动物模型。树 (Tupaia)属低等灵长类动物,经济易得。世界卫生组织曾呼吁用 Tupaia代替黑猩猩等濒危的非人灵长类动物用于医学研究[1]。本实验以 HCV阳性血清接种成年 Tupaia,观察血清和肝组织中 HCV感染标志及肝组织病理变化,探索 Tupaia感染 HCV的可能性,试图为建立丙型肝炎动物模型提供一种较为理想和实用的动物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生成年 Tupaia购自中国科学院昆明动物研究所,体重 116~148 g,每笼双只关养于铁笼中,喂予综合饲料: 鸡蛋、牛奶、水果、蚕蛹及小鼠颗粒饲料,饮用自来水。

1.2 感染血清的筛选

用 RT-PCR方法从献血员及丙型肝炎患者中分别筛选 HCV RNA阳性血清各 1份,用 ELISA法检测 IgM抗-HAV、HBsAg、HBeAg、IgG抗-HBc、HDV Ag、IgG抗-HEV、IgG抗-HGV均为阴性; IgG抗-HCV阳性。2份血清 -20℃冻存,用前过滤除菌。

1.3 接种动物及标本留取方法

1.3.1 接种丙型肝炎患者血清组(简称 A组) 5只健康 Tupaia(编号 A1~A5),经尾静脉接种患者血清 0.3 ml/只,第 3天腹腔内再注射 0.2 ml/只。

1.3.2 接种献血员血清组(简称 B组) 5只健康 Tupaia(编号 B1~B5),接种方法同前。

1.3.3 对照组 4只健康 Tupaia,以同样方法接种健康献血员血清。

1.3.4 标本留取方法 每只 Tupaia于接种前和接种后定期在 3%戊巴比妥钠麻醉下,行肝组织活检, 4%多聚甲醛固定。取肝组织后第 3天无菌采集心血约 0.8 ml,立即分离血清检测血清 ALT,剩余标本 -20℃冻存。血及肝组织标本共收集 6个月。第 28周处死 A4动物,收集心、肝、脾、胆囊、胰腺、肾脏、小肠及性腺组织。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 改良赖氏法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT) 按说明书操作。

1.4.2 RT-PCR法检测血清中正、负链 HCV RNA 病毒 RNA提取试剂由军事医学科学院二所五室提供。引物序列为: 外引物: 正链 5′-GGCGACACTCCACCATAGAT-3′;负链 5′-GGTGCACGGTCTACGAGCCT-3′。内引物: 正链 5′-CTCCC-CTGTGAGGAACTACT-3′;负链 5′-AAGCACCCTATCAGGC AGTA-3′。检测正链 HCV RNA在逆转录体系中加入外引物负链,检测负链加入外引物正链。第 1次 PCR循环参数: 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环;第 2次 PCR循环参数: 94℃ 1 min, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环。扩增 HCV cDNA长度为 265 bp。

1.4.3 免疫组化检测肝组织及肝外组织 HCV抗原 链霉菌亲生物素蛋白-过氧化酶连接免疫组化试剂盒、3,3′-二氨基联苯胺(DNB)显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;抗-HCV CP10单克隆抗体(McAb)由本实验室制备;抗-HCV NS3抗-HCV NS5 McAb购自北京医科大学肝病研究所。实验方法在试剂盒说明书基础上加以改进。

1.4.4 原位杂交法检测肝组织中负链 HCV RNA 核苷酸探针由军事医学科学院二所五室合成并纯化,序列为: 负链 5′-CTGCTAGCCGACTAGTGTTGGGTCCGAAACCGCTTGTG G-3′。核苷酸 3′末端地高辛标记试剂盒、碱性磷酸酶标记的抗

* 刘 志,男, 27岁,住院医师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

地高辛抗体、封闭试剂和 NBT/BCIP溶液均为德国宝灵曼公司产品。原位杂交实验方法参照《实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术》[12]稍加改进后进行。

1.4.5 肝组织常规病理检查　　多聚甲醛固定的组织经石蜡包埋、切片、HE染色,光镜下行常规病理检查。

2 结果

2.1 临床表现

全部实验组动物接种 HCV RNA阳性血清后 1~ 8周,出现不同程度的精神差,活动减少,被毛粗乱无光,食欲下降,并反复出现稀便。A3动物间歇性腹泻 12周,体重下降明显。对照组无明显改变。

2.2 血清 ALT变化情况

对照组 Tupaia血清 ALT均低于 40 IU/L,实验 A B组 10只动物接种前 ALT亦低于 40 IU/L。接种后可见全部实验组动物血清 ALT均有不同程度升高。前 10周实验组每只动物 ALT都有两次以上明显升高。多在第 2周达到第一个峰值,随后迅速降至低于或接近 40 IU/L,并在 6~ 8周出现第 2个峰值,峰值范围 97~ > 400 IU/L,平均为 127 IU/L。在随后观察的 8~ 28周中,5只动物 ALT降至 < 40 IU/L,其余 5只(A1、A4、A5、B1、B2) ALT波动范围较大,第 28周仍有 3只(A1、B1、B2)动物 ALT> 40 IU/L。

2.3 血清 HCV RNA变化情况

对照组和实验动物接种 HCV前的血清经检测 HCV RNA均为阴性。接种后第 1周,除 B2动物外全部实验组 9只动物均出现血清正链 HCV RNA阳性,其中 A3、A5、B1、和 B5血清负链 HCV RNA也同时出现阳性。此后检测了 A1、A4、A5、B1动物 1~ 28周所有采集血清,发现正、负链 HCV RNA均呈间歇性表达。4只动物在 1~ 28周的观察时间中,血清正链 HCV RNA的检出频率从低至高依次为 A1(41.7%)、A5(58.3%)、A4(71.4%)、B1(71.4%)。结果见表 1及图 1。

表 1　Tupaia血清 HCV RNA RT-PCR检测结果

Tab 1　RT-PCR results of serum HCV RNA in Tupaia

Animal No.	HCV RNA	Before infection	After infection (week)													Positive rate of P HCV RNA
		1 week	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	18	23	28	
A1	P	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	D		5/12(41.7%)
	N	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	D		
A4	P	−	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	+	+	−	+	10/14(71.4%)
	N	−	−	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	
A5	P	−	+	−	−	+	+	+	−	+	+	nd	−	nd	+	−	7/12(58.3%)
	N	−	+	−	−	+	+	+	−	+	+	nd	−	nd	+	−	
B1	P	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−	10/14(71.4%)
	N	−	+	+	−	+	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−	
Positive rate of P HCV RNA			4/4	3/4	1/4	2/4	2/4	3/4	2/4	3/4	3/4	1/3	2/4	3/3	2/3	0	

P: Positive strand; N: Negative strand; nd: no detection; D: death



图 1　A4动物血清 HCV RNA RT-PCR结果

(+): 阳性对照; M: 标准参照

Fig 1　RT-PCR results of serum HCV RNA in A4

(+): Positive control; M: Standard control

2.4 肝组织 HCV抗原表达

所有实验组 10只动物在接种 HCV阳性血清后第 1周肝组织中即出现 HCV抗原表达,在随后观察的 28周内,有 6只 Tupaia肝组织中的 HCV抗原呈持续阳性;阴性对照及替代对照中未见阳性结果。HCV NS3、NS5和 CP10表现出的阳性颗粒均呈棕黄色,阳性信号多呈均质型定位于细胞浆中,少数细胞可见核型。Tupaia肝组织中有 3种阳性细胞分布形式(弥漫分布、散在分布、灶状或点状分布)。以上 3种分布形式均可见于实验组动物的不同感染时期。光镜下多数染色阳性肝细胞形态基本正常,少数细胞肿胀、气球样变性,细胞形态结构尚完整,见图 2。

2.5 肝组织负链 HCV RNA原位杂交检测结果

选择 3只实验动物(A4、A5、B1) 1~ 6周的肝组织切片进行原位杂交试验,结果 3只 Tupaia肝组织中均可用原位杂交方法检测出负链 HCV RNA。负链 HCV RNA表现出的杂交阳

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性信号呈紫兰色,阳性物质分布于细胞浆及细胞核周围。

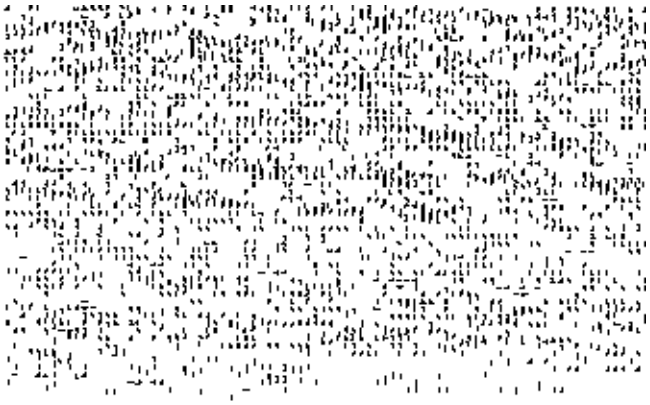


图 2 肝组织中 HCV NS3表达阳性细胞点状分布 (DAB× 200)

Fig 2 Scattered distribution of cell positive with HCV NS3 antigen in liver (DAB× 200)

2.6 A4动物肝外组织 HCV抗原检出及病理检查

第 28周后,处死 A4动物,检出心肌细胞、胰岛细胞及肾小管上皮细胞有 HCV NS3、NS5及 CP10抗原阳性信号;脾脏、胆囊、小肠、睾丸及外周血单个核细胞中均未见。病理检查发现肾小管上皮细胞轻度水肿,心肌及胰腺组织结构正常。见图 3

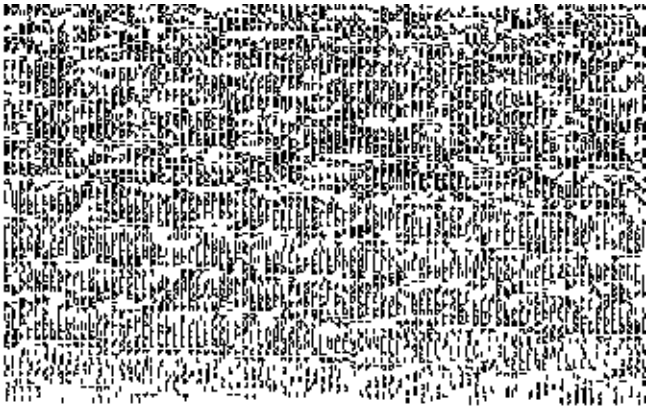


图 3 HCV NS3表达阳性的 A4动物心肌细胞 (DAB× 400)

Fig 3 Cardiac muscle cell positive with HCV NS3 antigen (DAB× 400)

2.7 肝组织病理检查结果

所有 A、B组实验动物在接种 HCV阳性血清 1周后,均出现不同程度的肝细胞胞浆疏松、肿胀、气球样变及点状、灶性坏死。坏死灶内有少量中性粒细胞浸润。中央静脉、汇管区有淋巴细胞浸润。少数动物肝细胞嗜酸性变,小叶内有淋巴细胞浸润,枯否细胞增生。A3、A5、B1、B2号动物病变较重,灶性坏死明显。感染 8周以后,病变较重的动物肝组织汇管区开始出现少量纤维组织增生,并向小叶内延伸。感染 5~6个月,大多动物肝细胞仍肿胀变性,汇管区有炎细胞浸润,其中 A3、A5、B1、B2动物病变仍较重,表现为灶性出血、淤血、肝细胞弥漫性气球样变性,溶解坏死,汇管区有较多炎细胞浸润及少量纤维组织增生,病理改变向慢性化发展,见图 4,对照组 Tupaia肝组织基本正常。

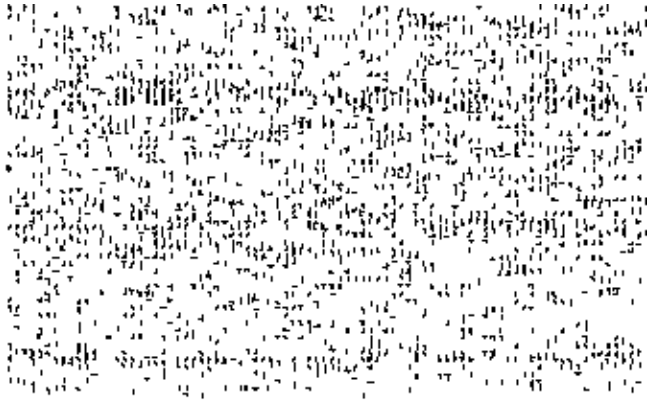


图 4 汇管区大量炎细胞浸润,有少量纤维组织增生,并向小叶内延伸 (DAB× 100)

Fig 4 A large number of inflammatory cells infiltrated in portal area and a few fibrous tissues proliferated in liver lobule (DAB× 100)

3 讨论

黑猩猩是目前唯一得到公认的丙型肝炎模型动物[4],国内学者用 HCV感染猕猴初步获得成功[3],但黑猩猩和猕猴均属保护动物,数量稀少,价格昂贵,使其应用受到限制。Tupaia属低等灵长类动物,由于其特殊的分类地位和存在许多自发性疾病,以及易于饲养、成本低廉等特点,已被广泛应用于医学和生物学研究中。本研究通过输入较大剂量 HCV阳性人血清,以增加感染成功的机率。我们根据:① 伴随血清 ALT升高,感染 HCV的 Tupaia出现不同程度的肝炎症状;② 出现间歇性病毒血症,持续时间不少于 28周;③ 肝组织中检出 HCV Ag和 HCV负链 RNA;④ 肝组织具有典型的病理改变,初步认为 Tupaia可作为丙型肝炎的动物模型。由于未对实验组所有动物的血清进行 HCV RNA检测,无法进行统计分析。从免疫组化结果分析,10只动物中,有 6只动物肝组织中 HCV抗原阳性持续时间大于 28周,感染率约为 60%。

在本研究中,Tupaia接种阳性血清后,酶血症及

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病毒血症出现时间较早。前 10周 ALT升高集中出现在 1~ 2周和 6~ 8周,而在同一时间段,血清 HCV RNA阳性检出率也较高,表明 ALT的升高可能是病毒复制所致。在系列检测 1~ 28周血清 HCV RNA的 4只动物中, HCV RNA阳性检出频率高的 3只动物(A4 A5 B1)肝组织中 HCV抗原阳性细胞多呈弥漫性和散在性分布,而阳性检出频率较低的 A1则多呈点状、灶状分布,结果表明 Tupaia感染 HCV后,病毒血症能够在一定程度上反映肝组织中 HCV复制水平。

Tupaia肝细胞 HCV抗原阳性信号在肝细胞中的定位、抗原阳性细胞的分布形式及存在状态都与人类丙型肝炎近似[5~8]。感染前 8周病理改变与人类急性肝炎的病理表现相似。但人类急性丙型肝炎的特征病变,如:显著的嗜酸性变性、脂肪变、胆管损伤等,在 Tupaia肝组织病理变化中未曾观察到。因为 Tupaia肝脏组织结构有其特殊性(肝细胞较小,肝小叶纤维组织较少无明显界板,肝小叶分界不清,汇管区和小叶间胆管较少),所以不能完全生搬人类丙型肝炎的病变标准来评判 Tupaia的病理变化。在 8~ 28周的观察时间里,除先前的病变仍存在外,在 4只病变较重的 Tupaia肝组织中开始出现少量纤维组织增生,并向小叶内伸展,其中 2只 28周时 ALT仍大于 40 IU/L,病变向慢性化发展。可以认为在本研究中, Tupaia感染 HCV后可形成慢性肝炎病变,慢性肝炎发生率约为 40%。在本研究中,发现一只 Tupaia的胰岛细胞、心肌细胞和肾小管上皮细胞中有 HCV 3种抗原表达,提示 HCV感染 Tupaia可能存在泛嗜性,但这一结果尚需要更多实验资料的验证。

参考文献

1 彭燕章,叶智彰,邹如金,等 主编. Tupaia生物学.昆明:云南科学出版社, 1991. 1~ 2

2 蔡文琴.原位杂交组织化学.见:蔡文琴,王伯　主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994. 406~ 413

3 夏宁邵,毕胜利,杨永平,等.中国株丙型肝炎病毒实验感染3种猕猴的初步结果.中国科学(B辑), 1995, 25(7): 732

4 Parci P, London W T, Wong D C, *et al*. The natural history of infection with hepatitis C virus in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first-and second-generation assays. and relationship to HCV viremia. J Infect Dis, 1992, 165(6): 1006

5 师明霞,朱世能,陆世伦,等.人肝组织中丙型肝炎病毒抗原的显示.上海医科大学学报, 1992, 19(2): 94

6 Ballardini G, Groff P, Giostra F, *et al*. Hepatocellular codistribution of C100, C33, C22 and NS5 hepatitis C virus antigens detected by using immunopurified polyclonal spontaneous human antibodies. Hepatology, 1995, 21(3): 730

7 Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus C100 antigen in liver tissue from patients with acute and chronic infection. Hepatology, 1993, 18(2): 240

8 张长法,周永兴,王春杰,等. HCV感染的慢性肝病患者肝组织 HCV RNA和 HCV C33C检测.中华内科杂志, 1995, 34(3): 176

(收稿: 1998-09-15;修回: 1998-11-04)
(编辑　冷怀明)

An experimental study on infection of hepatitis C virus in adult Tupaiae

Liu Zhi, Mao Qing, Wang Yuming, Li Qifen (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the possibility of infection of hepatitis C virus (HCV) in adult Tupaiae. Methods: After 10 Tupaiae were inoculated intravenously and intraperitoneally with the human serum positive for HCV RNA, the clinical signs were observed daily and the blood and liver specimens collected regularly. The ALT levels, the positive and negative strands of HCV RNA in the serum, the HCV NS3, NS5, CP10 antigens and the negative strands of HCV RNA in the liver were examined. The hepatic morphological changes were observed with light microscope. All these steps were kept on until the 28th week after inoculation. Results: ① All the animals presented signs of hepatitis after inoculation. ② The serum ALT levels were increased and the elevated levels were detected in 3 animals even in the 28th week after inoculation. ③ The HCV antigens in the liver tissue were continuously positive in 6 animals. ④ The positive and negative strands of HCV RNA were detected intermittently in the serum of 4 animals. ⑤ In one Tupaia, the HCV NS3, NS5 and CP10 antigens were found in the cardiac muscle cells, pancreatic islet cells and renal tubular epithelial cells. ⑥ The hepatic morphological changes in all the 10 animals were similar to those in patients with acute hepatitis. Conclusion: Tupaiae can be used as the experimental animals for study on hepatitis C for they are susceptible to HCV.

Key words hepatitis C virus; disease model/animal; Tupaia

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net