

树鼩对人乙型肝炎病毒易感性的验证*

Susceptibility Inspecting for the Human Hepatitis B Virus Infection in Tree Shrews

苏建家 李 媛 王树声** 班克臣 覃柳亮 欧 超 张华远***
Su Jianjia Li Yuan Wang Shusheng Ban Kechen Qin Liuliang Ou Chao Zhang Huayuan

(广西肿瘤防治研究所 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Guangxi Cancer Institute, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要 为验证树鼩对人乙型肝炎病毒 (HBV) 的易感性, 用含 HBV 的人血清接种给 10 只成年树鼩 (雌雄各半) 然后每周抽血 1 次, 每只动物共抽血 11 次。用不同公司生产的 ELISA 试剂检测接种后的动物血清感染指标。实验观察至 13 周, 结果分别有 9 只和 7 只动物出现 HBsAg 阳性, 持续最短 1 周, 最长 7 周。用 PCR 检测, 结果有 1 只动物连续 4 周在血清中检测出 HBV DNA 表明树鼩能感染人 HBV, 但实验有待改进以延长感染持续时间。

关键词 树鼩 乙型肝炎病毒 感染

中图分类号 R-332

Abstract To examine the tree shrew's susceptibility for human hepatitis B virus, ten adult tree shrews (5 males, 5 females) were inoculated by human sera with HBV. After that, weekly blood sampling was carried out one time each animal lasted for 11 weeks. HBsAg was detected with ELISA kits purchased from two different companies. Results showed that 9 and 7 animals in this experiment were positive for HBsAg respectively. One animal was found HBV DNA in sera by PCR, which lasted for 4 weeks. The data indicates that tree shrew could be infected with human HBV, but the methods of inoculation or conditions need to be improved to achieve a chronic HBV infection with more persistence of viral replication.

Key words tree shrew, hepatitis B virus, infection

80年代中,作者先后报道了树鼩对人乙型肝炎病毒 (HHBV) 易感,并初步建立了实验感染 HHBV 树鼩模型^[1,2]。该项研究后来被列入国家“八五”、“九五”医学攻关课题,继续进行实验感染研究,以期建立一个实用的“乙型肝炎动物模型”。并先后由北京医科大学肝病研究所及中国药品生物制品检定所肝炎室进行验证。现将“九五”攻关研究中,广西肿瘤防治研究所和中国药品生物制品检定所肝炎室用不同厂家试剂检测血清 HBsAg ALT 及用 PCR 方法检测 HBV DNA 结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

成年树鼩 10 只,雌雄各半,购于中国科学院昆明

动物研究所。单只养于不锈钢笼中,编号为 F1-10号。饲以牛奶、蛋、水果及自配制主食料 (大米、面粉、黄豆、玉米、麦麸及矿物质等),驯养 1 个月后用于实验,接种 HHBV 前,抽血及肝活检作自身对照。

1.1.2 试剂

广西肿瘤研究所用于检测树鼩血清 HBsAg 及 HBeAg 的 ELISA 试剂购于河南理利生物技术公司,批号为 980601 血清谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒购于卫生部上海生物制品研究所,卫生部临床诊断试剂实验中心,批号为 980303 中国药品生物制品检定所肝炎室用于验证 HBsAg 的 ELISA 试剂来源于荷兰阿克苏公司,批号为 9811109 HBV PCR 试剂盒由中国上海复星实业股份有限公司生产,经中国药品生物制品检定所检定合格,批号为 98113

1.1.3 接种物

HBsAg HBeAg 均阳性,但抗-HBs 抗-HBe 均阴性的两名 HBV 携带者血清,等量混合后备用。

1.1.4 检测仪器

D751G 型分光光度计, (上海分析仪器厂); E960

2000-07-04 收稿。

* 国家“九五”攻关项目“乙型肝炎动物模型研究” (96-906-03-10)。

** 广西壮族自治区防疫站,广西南宁,530021

*** 中国药品生物制品检定所,北京。

型酶标仪 (MetetecHInc生产); PCR扩增仪 (P480).

1.2 方法

1.2.1 接种 HHBV

经证明血清及肝组织 HBV 感染标志物均阴性的 10 只树鼯首次每只经静脉注射 0.5 ml 含 HBV 的人血清, 3 d 后, 经腹腔注射等量同样血清 1 次。

1.2.2 血清 HBV 感染标志物的检测

从第 2 次接种后第 7 天开始, 每周抽血 1 次, 每次 1 ml ~ 1.2 ml, 分离血清, 用 ELISA 方法检测 HBsAg, 经酶标仪读结果, 剩余血清置 -40℃ 冰箱保存, 每只动物共抽血 1 次。

1.2.3 肝组织活检

每隔 2~4 周, 实验树鼯在氯胺酮全麻下, 剖腹, 切下如黄豆大小的肝组织, 其中一半置 10% 中性福尔马林液固定, 另一半先置液氮 3 hr ~ 4 h 后, 取出置 -80℃ 冰箱保存, 共肝活检 5 次。(肝细胞感染情况将另文报道)

1.2.4 PCR 检测

用 PCR 方法检测部分树鼯血清 HBV DNA, 引物位于 S 区及核心区。

2 结果

实验观察 13 周。树鼯接种 HBV 前, 经 2 次抽血作自身对照检测, HBV 感染标志物均为阴性, 肝活检 1 次。

(1) ALT 参照人的检测标准, 40 单位以下为正常。接种 HHBV 前, F9, F10 两只动物 ALT 值高于 40 单位, 其余动物 ALT 值在正常范围。接种后, 只有 F7 在第 1 周末开始升高, 至第 2 周恢复正常水平。最迟 F10 表 2 用河南理利生物技术公司生产的 ELISA 试剂检测 HBsAg 结果*

是在第 4 周升高, 到第 8 周仍高于正常。在血清中检出 HBsAg 及 HBV DNA 的 F5 号动物, 在观察时间内, 出现 2 个波峰, 第 1 个在第 2~6 周, 第 6 周降至正常, 第 8 周又升高 (表 1)

表 1 ALT 检测结果*

Table 1 Result of ALT test

动物号 Animal number	接种前 ALT ALT before inoculation		接种后各周 ALT ALT after inoculation in different week (s)							
	1	2	3	4	5	6	7	8		
F1	37	n	14	29	103	41	44	n	40.8	
F2	27	15	82	60	42	78	43	n	50	
F3	30	17	> 150	98	> 150	52	43	n	45	
F4	27	17	53	100	55	78	45	n	40	
F5	25	19	> 150	141	> 150	92	28	n	42	
F6	30	32	> 150	19	25	103	25	n	47	
F7	27	> 150	44	52	32	40	33	n	39	
F8	25	21	58	69	43	51	25	n	0	
F9	103	23	104	80	43	55	35	n	39	
F10	50	17	58	92	98	32	25	n	30	

* 正常值 <40^U Normal value < 40^U, n 未检测 Not tested

(2) 广西肿瘤研究所实验病理室用河南理利生物技术公司生产的 ELISA 试剂检测, 有 9 只树鼯血清呈 HBsAg 阳性 (90%), 其中 2 只仅在第 3 周出现 1 次 HBsAg 阳性, 其余动物阳性持续时间为 3~7 周 (表 2)。

中国药品生物制品检定所肝炎室用荷兰阿克苏公司生产的 ELISA 试剂验证, 有 7 只 (70%) 检出 HBsAg, 其中 3 例仅在第 3 周出现 1 次阳性, 其余阳性持续时间为 3~5 周 (表 3)。F5 号树鼯在接种后第 2 周开始血清 HBsAg 为阳性, 且 OD 值逐渐上升, 到第 4 周 OD 值达到最高峰, 而后逐渐下降, 第 7 周转为阴性 (图 1), 对其阳性的系列血清进行 1:100 倍稀释, 第 4 第 5 第 6 周血清 100 倍稀释后, HBsAg 仍为阳性

Table 2 Result of HBsAg tested by Henan (China) Lili Biotech Company's ELISA reagents

动物号 Animal number	接种后各周的 HBsAg 检测结果 HBsAg titers after inoculation in different weeks										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F1	-	4.2	-	-	1.37	-	-	-	-	-	-
F2	-	3.15	1.68	1.35	1.17	1.56	-	1.27	-	-	-
F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	-	-	1.08	4.29	1.35	-	-	-	-	-	-
F5	-	1.62	2.95	1.54	1.54	1.24	-	-	-	-	-
F6	-	4.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7	-	5.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F8	-	1.16	2.0	1.7	-	-	-	-	-	-	-
F9	-	2.78	1.30	1.17	1.27	-	-	-	-	-	-
F10	-	1.48	1.51	2.21	1.22	-	-	-	-	-	-

* 表中数值为 S/C 值, 大于 1 为阳性, - 为阴性 The numbers in the table are signal values vs cut off values. "> 1" means positive result; "-" means negative result.

表3 用荷兰阿克苏公司生产的 ELISA 试剂检测 HBsAg 结果^{*}

Table 3 Result of HBsAg tested by Holland Akesu Company's ELISA reagents

动物号 Animal number	接种后每周 HBsAg 检测结果 HBsAg titers after inoculation in different weeks										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
F1	-	+ /38.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	-	+ /36.6	+ /2.6	-	+ /18.5	+ /29.7	-	-	-	-	-
F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F5	-	+ /35.7	+ /39.4	+ /42.5	+ /41	+ /36.8	-	-	-	-	-
F6	-	+ /41.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7	-	+ /41.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F8	-	+ /35.6	+ /42.5	+ /42.5	-	-	-	-	-	-	-
F9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F10	-	+ /35	+ /40.4	-	+ /16.2	+ /1.1	-	-	-	-	-

* 表中数值为 S/C 值, 大于 1 为阳性, - 为阴性 The numbers in the table are signal values vs cut off values. + means positive result "> 1"; "-" means negative result.

(3) 血 HBV DNA 验证: 4 只感染树鼩 (F2 F5 F8 F10) 的 18 份血清 (其中 16 份 HBsAg 阳性, 2 份为阴性) 进行 HBV DNA 扩增反应, 结果只有 F5 动物的 4 份系列血清在接种后第 4 周开始 HBV DNA 阳性, 电泳带明显, 接种后第 5 第 6 第 7 周电泳带逐渐模糊, 第 8 周为阴性 (图 2) 与 HBsAg 检测结果一致, 其余血清 HBV DNA 均为阴性

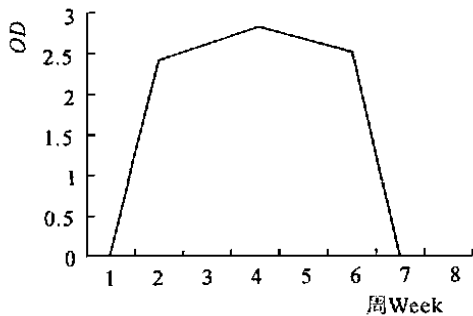


图 1 F5 树鼩感染 HBV 阳性血后每周 OD 值变化情况

Fig. 1 Alteration of OD value during the weeks after inoculating HBV serum to no. 5 tree shrew

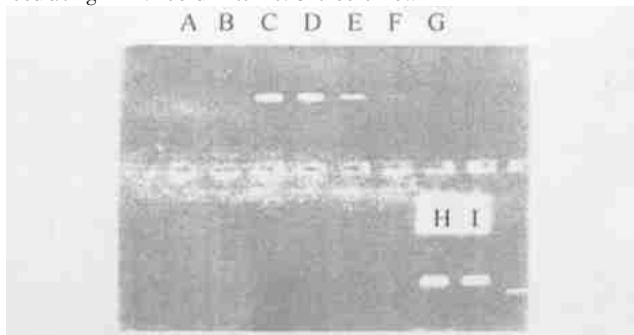


图 2 PCR 检测 F5 树鼩血清 HBV DNA 结果

Fig. 2 No. 5 tree shrew's serum HBV DNA tested by PCR. A, B, C, D, E, F, G 分别为接种后 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 周的血清. H, I 为阳性人血清.

A, B, C, D, E, F and G were the serum of 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 weeks after inoculation respectively; H and I were human positive serum.

两个单位用两个公司的 ELISA 试剂检测, 结果符合率为 90% ($P > 0.05$) (表 4).

表 4 不同厂家试剂检测结果比较

Table 4 Comparing results from the reagents produced by different companies

试剂 Reagent	HBsAg	
	阳性 Positive	阴性 Negative
A	7	3
B	9	1

A. 用荷兰阿克苏公司产的 ELISA 试剂检测结果; B. 用河南理利生物技术公司生产的 ELISA 试剂检测结果; $P > 0.05$ A. Result from Holland Company's ELISA reagents; B. Result from Henan (China) Lili Biotech Company's ELISA reagents $P > 0.05$.

3 讨论

本实验选用的树鼩在接种 HHBV 前, 经 2 次抽血检测, HBsAg 均为阴性, 表明这些实验动物无自发 HBV 感染. 两种 ELISA 试剂检测结果符合率为 90% ($P > 0.05$), 表明两种试剂质量无明显差别.

接种 HHBV 后第 7 天 (第 1 周末), 广西肿瘤研究所实验病理室及中国药品生物制品检定所肝炎室分别用河南理利生物技术公司及荷兰阿克苏公司生产的 ELISA 试剂盒进行血清检测. 10 只树鼩均未检出 HBsAg, 表明这时树鼩循环血中已无残留的接种物. 因此, 从接种 HHBV 后第 14 天以后, 在血清中检测到的 HBsAg 应是 HHBV 进入树鼩肝细胞后, 病毒复制的产物. 另外, 用 PCR 方法进行 HBV DNA 扩增反应, F5 树鼩接种后第 1 第 2 第 3 周血清未检出 HBV DNA, 到第 4 周开始 HBV DNA 呈阳性, 第 5 第 6 第 7 周病毒量逐渐下降, 第 8 周后为阴性, 也都表明这些 HBV DNA 是病毒进入肝细胞后复制出的而不是接种的 HBV DNA 的残留. 再者, 该动物第 2 周血清开

始出现 HBsAg,其 OD值呈现 1波峰,也表明这些 HBsAg是 HBV在树鼩肝细胞内复制后产生的。

接种 HHBV后第 1周末 ALT检测,除了 F动物明显高于正常值外,其余动物均在正常值范围;第 2周末有 9/10树鼩 ALT值高于正常,与血清 HBsAg阳性出现情况大致相符。因此,接种含 HBV的人血清后,树鼩血清 ALT值升高不是机体对人血清的反应,而是 HBV侵袭了树鼩肝细胞,引起肝细胞的损害所致。

两个单位两种 ELISA试剂检测,在接种后第 9周后的血清均未检出 HBsAg,表明这些树鼩发生的是急性 HBV感染^[3],个别为一过性感染。

1984年作者报道了树鼩可实验感染 HBV后,国内外学者也先后进行了类似的实验研究,刘芳华^[4]于 1987年报道,用 HBsAg和 HBeAg均阳性的人血清接种于 17只树鼩,有 12只发生了感染,用血凝法检测血清 HBsAg滴度为 1:8~1:16,用免疫组化 PAP法在肝细胞检出 HBsAg,1994年李奇芬^[5]报道,从尾静脉给 20只树鼩接种人 HBV,在 3~4周后,15只血清 HBsAg阳转,持续 3~5周,部分血清 HBV DNA阳性。德国 Blum^[6]的实验室于 1996年报道,树鼩离体原代肝细胞接种了 HHBV后,有病毒 DNA和 RNA合成,并能分泌 HBeAg进入培养基中。在体内实验中,接种了 HBV的树鼩肝细胞有病毒复制和基因的表达。上述诸多研究都证实树鼩能感染 HHBV。

另加,曾有学者^[7]先用疟原虫感染恒河猴致成慢性疟疾感染后,再接种 HBV,结果 4/6出现 HBsAg抗原血症,持续数 16天,最长 1例达 18个月。而单纯接种 HBV者,4/4均不出现 HBsAg抗原血症。认为慢性疟原虫感染所致的免疫抑制,增加了对 HBV的敏感性。我们过去的研究也表明,树鼩对 HBV的易感性也与动物自身免疫功能状态有关^[1]。通过非特异性皮肤迟发超敏反应 PHA试验,发现树鼩细胞免疫水平的个体差异较大,细胞免疫水平低的树鼩,接种 HBV后 HBsAg抗原血症出现较早,持续时间较长,滴度也较高。因此,若选取细胞免疫水平低的树鼩,或降

低其免疫水平,然后接种 HBV,有望提高感染率及感染持续时间。经过多年学术的探讨,目前多数动物学家、学者将树鼩归于食虫目和原始灵长目之间的攀援目,在动物进化上较啮齿类高级,更接近于人类^[8,9],因此,世界卫生组织(WHO)建议用树鼩代替日趋减少的黑猩猩、猴等进行医学实验研究^[10]。最近,有学者^[11]用人丙型肝炎病毒感染树鼩,获得成功。树鼩体形小,易于饲养管理,价廉,易获得,是有用的医学实验动物。能否用树鼩建立与人一样的慢性乙型肝炎病变过程的模型,有待进一步研究。

参考文献

- 1 严瑞琪,苏建家,陈志英等.人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼩的初步研究.广西医学院学报,1984,1:10.
- 2 苏建家,严瑞琪,甘友全等.成年树鼩实验感染人乙型肝炎病毒的研究.中华病理学杂志,1987,16(2):103.
- 3 高寿征主编.病毒性肝炎防治研究.北京:北京出版社,1993,26.
- 4 刘芳华.人乙型肝炎病毒血清实验感染树鼩的研究.贵州医药,1987,11(2):24.
- 5 李奇芬,丁明权,王洪等.成年树鼩实验感染丁型肝炎病毒的研究.第三军医大学学报,1994,3:封页.
- 6 Eike W, Ruth K, Blum HE et al. Hepatitis B virus infection of *Tupaia hepatocytes* in vitro and vivo. 1996, 24: 1~5.
- 7 Zuckerman A J. Viral hepatitis in non-human primates. In: Hepatitis viruses of man. London Press, 1979. 167~184.
- 8 Brack M. Spontaneous tumors in tree shrews (*Tupaia belonges*): population studies. J Comp Path, 1998, 118: 301~316.
- 9 Martin R D. Are tree-shrews primates? In: R P Martin. Primate origins and evolution: a phylogenetic reconstruction. London: Chapman & Hall, 1979. 191~213.
- 10 彭燕章,叶智彰,邹如金等.树鼩生物学.昆明:云南科技出版社,1991. 1~11.
- 11 Xie Zhichun, Riezu-Boj Josw-Ignaciac, Lasarte Juan-Joss et al. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. Virology, 1998, 244: 513~520.

(责任编辑:蒋汉明)