

人类甲型肝炎动物模型(狨猴)的研究

潘振业 马东林 邹 勇 沈菊阳 陈天培

(卫生部上海生物制品研究所,上海 200052)

摘要 本文报道以不同剂量的不同 HAV 毒株,经静脉和胃肠道分别接种普通狨猴和白须狨猴后,其血清 ALT、AST 和 LDH 活性均见升高。对酶活性比接种前增加,大于 $\bar{x} + 3SD$ 值的 6 只狨猴作肝活组织检查,见有与急性病毒肝炎相一致的组织病理变化。此外,用免疫电泳法检出狨猴粪便中 HAV 颗粒,狨猴接种 HAV 后 36 天,血清 IgM 类和总抗 HAV 抗体均阳转。上述结果提示,普通狨猴有可能作为研究甲型肝炎的理想动物模型。

黑猩猩 (*Pan troglodytes*)^[8-9,14,19] 和白须狨猴 (*Saguinus mystax*)^[6-7,10-18] 是研究人类甲型肝炎病毒的理想动物模型。但前者属濒危动物,价格昂贵(2 万美元/只)饲养设备复杂,实验操作困难。后者尽管价格便宜(350 美元/只),饲养和实验操作方便,但也属濒危品种,至今未见在实验室建立繁殖群的报道。鉴于普通狨猴 (*Callithrix jacchus*) 已可饲养繁殖,不仅来源和质量都有保证,且对实验室环境和人为刺激的适应能力强^[1],采血及肝活组织检查

(Liver biopsy)后恢复快^[2,4],其血常规及血清生化酶测定结果和白须狨猴一样与人类近似^[3,5]。据此,本文选用普通狨猴试作甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus, HAV)的感染动物模型,并以容易感染且可出现多种感染阳性指标的白须狨猴作对照。现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 动物 所用狨猴的品种和感染 HAV 情况(见表 1)。普通狨猴体重在 350—420 克,

表 1 猴类品种和接种 HAV 的毒株及剂量

动物品种	动物来源	编号	年龄	性别	接种毒株及剂量	感染途径
普通猕猴	日本实验室繁殖 1984 年引进	C1	6	雄	龙甲 7 10%×0.5ml	静脉注射
		C4	5	雄	龙甲 7 10%×0.5ml	
		C2	6	雄	龙甲 7 10%×1.0ml	
		C3	5	雄	龙甲 7 10%×1.0ml	
白须猕猴	秘鲁野外捕捉 1986 年 由 P.A.H.O. 引进	S1	成年	雄	龙甲 25 5%×2.0ml	胃肠道
		S12	成年	雌	龙甲 25 5%×1.0ml	

白须猕猴在 600—650 克。除从白须猕猴血液中检测到微丝蚴外，体内外无其他寄生虫。血常规和血清生化值测定未见异常。血清中免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M, IgM) 类和总抗 HAV 抗体均为阴性。

(二) 笼养环境 实验期间采用单独笼养，以避免交叉感染。饲养室保持室温 25±1℃，相对湿度 65±5%；光照时间 7—19 点，其间 8 点 30 分—16 点 30 分为太阳光灯全波谱光线。每天用 5% 过氧乙酸溶液对食物残渣和排泄物进行消毒处理。

(三) 饲料 普通猕猴每天摄取 20—30 克/只基本饲料，辅以 3—10 克新鲜水果；白须猕猴每天摄取 60—80 克/只基本饲料，15—20 克水果；每次采血和肝活检穿刺后，给予补充适量的维生素 B₁₂ 和人造补血药(含枸橼酸铁)。

(四) 实验设计 毒株系本所病毒研究室提供。普通猕猴静脉注射龙甲 7 毒株悬液，而白须猕猴则用龙甲 25 毒株悬液灌胃感染。感染后

每周取猕猴股静脉血 1—2 毫升。用 ENCORE 自动生化分析仪检测丙氨酸转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT) 谷氨酰转氨酶 (Aspartate, aminotransferase, AST) 和乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 的活性；并用 ABBOTT 公司的试剂盒测定血清中 IgM 类和总抗 HAV 抗体。凡血清酶活性比感染前 \bar{x} 高 3SD 值时判为显著升高。

动物经接种后即开始逐日取新鲜粪便，用免疫电泳法检查 HAV 颗粒。持续 30 天后，逐渐延长粪便标本采集的时隙，至实验结束前为每周采集一次。

(五) 肝活组织检查 在实验感染前(作正常对照)，感染后，根据动物临床症状，按猕猴血清酶活性首次显著升高，以及接种后第 60 天和第 90 天，按已介绍的方法作肝穿刺。

结 果

(一) 血清酶活性变化 两只白须猕猴经

表 2 静脉和胃肠道接种 HAV 猕猴的 ALT, AST, LDH 活性

动物 编号	ALT (u/l)			AST (u/l)			LDH (u/l)		
	基线*	最大值**	首次升高日期***	基线	最大值	首次升高日期	基线	最大值	首次升高日期
C1	20(18)	167(102)	102 天	156(13)	374(69)	29	430(32)	921(29)	29
C4	2(1)	32(35)	29 天	134(30)	177(29)****	29	287(48)	670(29)	29
C2	16(8)	83(77)	54 天	130(104)	274(54)****	54	332(106)	1529(54)	47
		243(110)	110 天		364(110)****			110	
C3	16(9)	288(16)	16 天	134(53)	357(16)	16	373(86)	2304(16)	16
S1	23(11)	171(41)	35 天	120(36)	469(66)	35	248(57)	1108(41)	41
S12	20(13)	55(66)	66 天	131(50)	307(66)	66	287(123)	722(41)	41

* 实验感染前测得的平均值(标准差)；

** 实验感染后测得的最大值(出现该值的日期)；

*** 实验感染后，酶活性首次升高>平均值+3SD；

**** 该数值<平均值+3SD。

胃肠道接种 HAV 后第 35—66 天, ALT、AST 和 LDH 活性均出现显著升高(见表 2)。每种酶的最高值分别依次为实验前平均值的 2.8—7.3, 2.3—3.9 和 2.5—4.5 倍。

四只普通猕猴经静脉接种 HAV 后第 16—54 天, ALT 均出现显著升高, 出现日期早于白须猕猴; ALT 上升幅度较大, 分别为实验前平均值的 8.4—18 倍, LDH 上升幅度分别为实验前平均值的 2.1—6.2 倍, 而 AST 上升幅度较低, 分别为实验前平均值的 1.3—2.8 倍, 其中有 2 只 (C₂, C₄) 活性未超过 $\bar{x} + 3SD$ 。C₂ 猕猴在实验后曾出现两次酶活性升高的高峰。

(二) 粪便排毒和血清中 HAV 抗体的动态 所有被感染猕猴不同天数后, 其粪便中都查见 HAV 颗粒(表 3)。

普通猕猴在接种后第 8—22 天血清 IgM 和总抗 HAV 抗体阳转(表 3) 至第 137 天血清 IgM 类抗 HAV 阴转而总抗体仍为阳性。白须猕猴在接种 HAV 后第 28 天和第 36 天血清 IgM 类和总抗 HAV 抗体才阳转。至第 143 天, 血

清 IgM 抗 HAV 阴转而总抗体仍为阳性。

表 3 接种 HAV 猕猴上所见病毒和血清学变化

动物编号	抗 HAV 抗体首次出现的日期	HAV 抗原首次在粪便中出现日期	血清酶活性首次升高日期
C3	8 天	9	16
C1	14 天	13	29
C4	14 天	17	29
C2	22 天	7	54
S1	28 天	15	35
S12	36 天	13	66

(三) 组织病理学变化 感染前各猴肝活组织检查基本正常, 而感染后当血清酶活性显著升高时, 肝活组织检查均出现明显的病理变化: 表现为肝细胞变性和轻度坏死, 炎症细胞浸润及 Kupffer's 细胞肥大增生, 汇管区炎症细胞浸润。在接种后 60 天, 肝组织病变加重, 肝小叶以弥散性点状或小灶性坏死为主, 伴以炎症细胞浸润, 以及 Kupffer's 细胞增生活跃, 尤以病灶区更为明显。感染后 90 天, 肝病理变化以细胞增生为主, 病变范围缩小, 门静脉区见慢性炎症细胞浸润外, 纤维母细胞增生, 病灶区双核肝

表 4 感染 HAV 猕猴的肝活组织检查中发现的组织病理

动物编号	肝 小 叶					汇 管 区				
	感染前	感 染 后			感染前	感 染 后				
		酶升高	第 60 天	第 90 天		酶升高	第 60 天	第 90 天		
C1	0	ND	++	+	0	ND	(?)	(?)		
C4	0	ND	ND	0	0	ND	ND	(?)		
C2	0	ND	+++	+	0	ND	(?)	+		
C3	0	++	+++	+	0	(?)	+	(?)		
S1	0	+	++	0	0	(?)	+	(?)		
S12	0	ND	++	ND	0	ND	(?)	ND		

动物编号	坏 死					柯 否 氏 细 胞 肥 大				
	感染前	感 染 后			感染前	感 染 后				
		酶升高	第 60 天	第 90 天		酶升高	第 60 天	第 90 天		
C1	0	ND	++	+	0	ND	++	+		
C4	0	ND	ND	++	0	ND	ND	0		
C2	0	ND	++	+	0	ND	++	0		
C3	0	+	++	+	0	+	++	+		
S1	0	+	+	0	0	+	+	0		
S12	0	ND	+	ND	0	ND	0	ND		

ND: 未进行肝活组织检查

(?): 标本中未见到汇管区

0: 未见病变 +: 轻微病变 ++: 中等程度病变 +++: 明显可见病变

细胞明显可见, Kupffer's 细胞增生活跃, 并可见吞噬现象。全部病理变化(见表 4)。

讨 论

本研究证明白须猴对国内分离的 HAV 毒株胃肠道接种十分敏感。这种模拟人类甲肝自然感染途径的动物模型, 对考核国产甲肝疫苗有很大价值。

但该种动物来源困难。为此, 我们试用普通猴, 实验证实实验室繁殖的普通猴对国内分离的 HAV 具有易感性。经静脉接种全部受试的 4 只猴均感染成功, 明显地高于国外文献的报道。提示普通猴也可作为研究甲肝的动物模型。

建立动物模型, 需要客观的检测指标。据我们经验, 检测 ALT, 辅以 AST、LDH 作甲肝实验动物 HAV 感染后血清酶活性升高的判别指标, 较为可靠。如本实验感染猴的 ALT 活性均超过感染前的 $\bar{x} + 3SD$ 值, 达实验前平均值的 15 倍和 16 倍。

值得注意的是各种阳性指标的出现迟早与感染途径有关。静脉感染的普通猴, 血清中 IgM 类和总抗 HAV 抗体阳转与粪便中查见 HAV 颗粒几乎同时发生; 而胃肠道接种 HAV 的白须猴则在粪便中查见 HAV 颗粒后 12—23 天, 血清中抗 HAV 抗体才阳转。究其原因, 可能是经静脉途径病毒能迅速定位于肝脏并进行增殖; 而经胃肠道接种的病毒可能先在肠粘膜和局部淋巴结增殖, 然后侵入血流形成病毒血症, 最终侵犯靶器官肝脏, 在肝细胞内增殖致病。

肝活检也是确证感染成功的重要指标。当感染后出现血清酶升高时, 肝组织即出现病理改变; 在接种后 60 天病理改变加剧; 到 90 天开始出现病变好转, 肝组织修复。

此外, 由于猴小而易, 频繁而过多的采血将会使红细胞数明显减少。如每周抽血一次, 连续八次后, 红细胞比原来减少 30%—50%。据我们的经验以每 2 周采血 1 毫升为宜。为迅速矫正短期实验内多次采血导致猴贫血, 除增加营养外还须及时补充适当铁剂, 但不宜过多,

以免妨碍动物对磷的吸收和利用, 甚至引起腹泻、黑便、胃肠炎等。我们选用含枸橼酸铁胺的“人造补血药”, 按成人每公斤体重大 10 倍的用量, 每天上午加在猴猴饮水中, 历时五个月未见该剂量引起补铁过量的症状。

参 考 文 献

- [1] 陈天培等 1986 猴猴的研究 野生动物 (2):3—6。
- [2] —— 1986 猴猴的研究 IV——普通猴猴的肝穿刺活检 上海实验动物科学 6(3):152—153。
- [3] —— 1987 猴猴血液学检查 动物学杂志 22(4):30—31。
- [4] 潘振业等 1986 猴猴的研究 II——基本实验操作 上海实验动物科学 6(1):32—34。
- [5] 高恒善男等编著 开发途上的实验动物 116 清至书院发行。
- [6] Appleton H. 1975 Hepatitis A in marmosets, *Dev Biol Stand* 30 (405): 7.
- [7] Deinhardt F. et al. 1975 Hepatitis in marmosets, *Am J Med Sci* 270 (73): 80.
- [8] Deinhardt F. 1976 Hepatitis in primates, *Adv Vir Res* 20 (113): 57.
- [9] Dienstag JL. et al, 1975 Experimental infection of chimpanzees with hepatitis A virus, *J Infect Dis* 132 (532): 45.
- [10] Ebert J W. et al, 1978 Experimental infection of marmosets with hepatitis A virus. *Primates Med* 10(295): 9.
- [11] Hilleman MR. et al, 1977 Infectious hepatitis (hepatitis A) research in nonhuman primates. *Bull Pak Am Health Organ* 11(140): 52.
- [12] Jensen DM. et al, 1984 Antibodies directed against human liver specific membrane lipoprotein (LSP) in marmosets experimentally infected with the hepatitis A virus. *Clin Exp Immunol* 55(535): 40.
- [13] Krawczynski KK. et al, 1981 Pathogenetic aspects of hepatitis A virus infection in enterally inoculated marmosets, *Am J Clin Pathol* 76(698): 706.
- [14] Maynard JE. et al, 1975 Preliminary studies of hepatitis A in chimpanzees, *J Infect Dis* 131(194): 7.
- [15] Methiesen LR. et al, 1978 Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus. *J Infect Dis* 138(369): 77.
- [16] Methiesen LR. et al, 1980 Hepatitis A virus in the liver and intestines of marmosets after oral inoculation, *Infect Immun* 28(45): 8.
- [17] Maynard JE. et al, 1975 Infectivity studies of hepatitis A and B in nonhuman primates. *Dev Biol Stand* 30(405): 7.
- [18] Provost PJ. et al, 1977 Suitability of the Rufiventer marmoset as a host animal for human hepatitis A virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 155(283): 6.
- [19] Schulman AN. et al, 1976 Hepatitis A antigen particles in liver, bile and stool of chimpanzees, *J Infect Dis* 134(80): 4.

A STUDY OF ANIMAL MODEL (COMMON MARMOSSET) FOR HUMAN HEPATITIS

PAN Zhenye MA Dongling ZHOU Yong SHAN Jujang CHEN Tianpei

(Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Public Health, Shanghai 200052)

ABSTRACT This study presents the results of experimental infection of human hepatitis A virus (The strains of Long-A-7 and Long-A-25, isolated in our country) by oral and intravenous inoculation on *Saguinus mystax* and *Callithrix jacchus*. All the animals showed marked elevation higher than of the individual level of serum ALT, AST and LDH levels 16—66 days after the inoculation. Both groups of *C. jacchus* and *S. mystax* shed the living virus in stool 7—17 days and 13—15 days respectively after the inoculation. All the animals were seropositive to HAV by 36

days after inoculation. A series of liver needle biopsies were done at regular intervals after the animals showed higher levels of serum enzymes. Pathological lesions compatible with obvious viral hepatitis and the progress of the lesion were found in the specimens from all the animals both under microscopic and electron microscopic observations.

The results of this study confirmed the susceptibility of *S. mystax* to HAV and implied that *C. jacchus* might be taken as the second choice for the animal model of human hepatitis A.