

应用雪貂作动物模型研究流感病毒的致病力

报告人 Harry Smith*

雪貂是一种极适合流感病毒研究的理想动物。它感染流感病毒后,发病过程和机体反应与人体相似,表现为非致死性感染。主要受感染的部位为上呼吸道,部分动物可有轻度病毒血症和肺部侵袭,但损害很轻。长期以来,我们利用这一动物模型对流感病毒的致病能力,强、弱毒株的毒力差别,以及机体反应等方面进行了研究,以期阐明人类流感病毒的致病机理。我们的研究选用了PR/8、64d二个弱毒株,和7a、64c二个强毒株,从EBID₅₀(50%批量感染量)、上呼吸道感染、发热、下呼吸道感染等四个方面进行探讨。

在上呼吸道感染实验中,我们主要采用了64d弱毒株和7a强毒株进行研究。当动物经鼻内接种感染病毒后,取不同时间的动物鼻腔洗液检查病毒繁殖量和炎症细胞数。感染后20小时,二株病毒的产量增加到同一水平。此后,64d弱毒株的产量开始下降,7a强毒株的病毒量继续上升,达到较64d株病毒量高10倍的水平,持续8小时后才逐渐降低。感染后初期,二株病毒引起的发热反应一样强,但在感染25小时后,7a株引起的发热显著较64d株所致的发热为高,平均高1°C左右。同时,都产生了强烈的局部炎症反应,炎症细胞数大大增加,并且伴有非特异性抑制物和干扰素产生。二株毒株的这些反应程度无明显差别。由此可见,在流感病毒感染雪貂上呼吸道后,动物机体产生了四种防御反应:发热、吞噬细胞、干扰素、非特异抑制物。64d和7a毒株除引起发热的程度不同外,其它的三种反应的能力相同。用PR/8弱毒株和64c强毒株进行研究,其病毒产生、发热和炎症反应的曲线分

别与以上二个毒株相似。虽然PR/8弱毒株的病毒产量似乎较7a和64c二个强毒株高,但由于它的抗原性与其它三株不同,所以它的炎症细胞反应较轻,干扰素产量也稍低。检查鼻洗液中的吞噬细胞,发现它们吸附64d和7a二个毒株病毒的能力无显著差别,吸附率分别为89%和93%。将这些吞噬细胞用冻融法或酶消化法裂解,病毒回收率仅为4%和7%,表明吞噬细胞对强、弱毒株病毒均有很强的破坏作用。上述结果表明,无论强毒株或弱毒株感染雪貂后,炎症反应和干扰素、非特异抑制物的产生均无明显差别,说明在这三种防御功能上,机体抵御强、弱毒株的能力一样。

雪貂的正常体温为39°C,鼻腔温度为34~35°C。当接种感染后,动物鼻腔出现炎症充血,局部温度也有一定上升。我们模拟动物体内情况,用34~35°C的温度进行鼻甲器官培养,然后接种感染64d和7a株病毒。感染后20小时内,两株病毒的繁殖量相等,但在20~27小时中,病毒产量发生变化,7a株病毒量高于64d株。这和体内感染的情形相同。将鼻甲器官置40°C培养时,病毒繁殖量较37°C培养有所下降。PR/8和64d二个弱毒株分别下降1.1和2.1对数值,7a和64c二个强毒株仅下降0.3和0.1对数值。在41°C培养时,病毒量下降更明显,PR/8、64d、7a和64c株分别较37°C培养时下降2.3、3.5、2.8和1.4对数值。这个研究说明,虽然吞噬细胞、干扰素和非特异抑制物对各流感病毒株的抗御作用一样,但

*是英国皇家医学会会员,英国伯明翰大学微生物系主任及教授。本文是他1983年8月1日在中国医学科学院病毒学研究所的报告内容

发热对它们的影响不同,这和上呼吸道感染时的情况一致。由于各毒株对体温的反应不同,所以病毒的产量也不相同。当发热较低时,弱毒株受到的影响明显大于强毒株。在发热很高时,强、弱毒株的繁殖都受到极大的影响。可见发热是机体抗御流感病毒感染的一个有力武器。反之,体温的降低会造成病毒在上呼吸道的繁殖增加,从而导致感染的延续和损伤的加重。试用水杨酸盐治疗来降低感染雪貂的发热,随后比较鼻洗液中的病毒量。结果发现感染雪貂经水杨酸盐治疗后,一部分动物的发热降低,而另一些则未降低。比较二者的病毒产量,凡体温下降的雪貂,其病毒量明显高于体温不降低组。临床上人们常用阿司匹林等水杨酸类药物治疗流感病毒感染引起的发热,我们相信随着人体温度的降低,也会引起病毒水平的增高和排毒时间延长,从而不利于机体康复。

流感病毒感染可引起发热、头痛、肌痛、食欲不振等全身症状。发热是由单核吞噬细胞释放的内源性致热物质所致。这种物质的释放是病毒在上呼吸道与吞噬细胞相互作用的结果。雪貂感染实验证明流感病毒的作用不是全身性的,它主要作用于上呼吸道,其证据为:

(一)采用静脉内注射病毒的方法感染雪貂,每半小时注入 $10 \times 10^8 \text{EBID}_{50}$ 的病毒,动物只有3~8小时的发热反应。用 $1 \times 10^8 \text{EBID}_{50}$ 的病毒量静脉内感染雪貂后,荧光法检查脾脏组织中病毒阳性。然而经鼻腔感染的动物,虽然发热时间长达24小时,但鼻腔内病毒量达到 10^8EBID_{50} 的时间仅持续3~4小时,脾组织中病毒阴性。这说明流感病毒感染雪貂的上呼吸道后,不能产生足够量的病毒来侵袭全身。

(二)如前所述,上呼吸道感染后,发热和炎症反应同时发生,在鼻腔的吞噬细胞中可查出大量的病毒。取这些细胞培养,半小时后上清液中就含有大量的致热物质。将这些上清液注入雪貂体内,引起了典型的发热反应。如把这些上清液 56°C 加热处理一小时,致热物质便被破坏,不再引起动物的发热反应。此外,另取正

常雪貂腹腔内的吞噬细胞,让其在体外与流感病毒发生作用,也获得这种不耐热的致热物质。用从感染流感病毒者中所得到的致热物质注射到其他志愿者体内,不仅可引起后者产生典型发热反应,而且还有头痛、肌痛、抑郁等症状。上述二点说明流感病毒感染后,其主要作用部位是上呼吸道,而不能直接侵袭其它脏器组织,感染后的全身性症状反应只是该病毒与上呼吸道相互作用的结果。当然,不同毒株的作用也不完全相同,因为发热是受病毒量和吞噬细胞量等因素的影响。不同毒株刺激产生内源性致热物质的能力也有差别。例如,64d弱毒株在上呼吸道的繁殖量较低,引起发热的程度也低;PR/8弱毒株的产量不低,但它引起的炎症程度较低,所以发热也较低。64c和7a二个强毒株都能引起高热,但前者病毒产量低于后者,因此可能64c毒株刺激产生内源性致热物质的能力较强。关于各毒株刺激产生致热物质的能力值得进一步研究,因为人们确实发现在不同的流感流行中,其症状表现也不同。

流感病毒感染下呼吸道的能力远较感染上呼吸道的能力为差。在下呼吸道,强、弱毒株间的感染差别也比它们感染上呼吸道的差别大。采用鼻腔接种途径感染雪貂,每天一次,连续四天。随后杀死动物取出整个支气管树,按肺门区、中间区、周围区分段切取支气管,制成组织悬液后检查病毒量。结果发现所有四个毒株的病毒繁殖量都比上呼吸道低很多,强毒株的繁殖量明显高于弱毒株。不论强、弱毒株,在下呼吸道各区的繁殖量也各不同,病毒量是肺门区>中间区>周围区。取感染后5、6天雪貂的支气管树和肺组织进行组织病损的定量检查,发现组织损害的主要部位是支气管,病损数远较肺组织病损数高。当肺组织受损时,损害部位也只限于毛细支气管末梢端的周围部分,而不累及肺泡。在下呼吸道,弱毒株造成的损害也较强毒株轻很多。从病毒量和损害程度来看,64c强毒株在肺门区、中间区的感染侵袭较7a强毒株严重,但7a株侵害周

围区重于64c株。免疫荧光检查在支气管上皮细胞中查到流感病毒，但支气管周围的肺泡组织却始终荧光检查阴性。这些结果说明强、弱毒株都不能引起雪貂肺泡组织的损害（这和人感染流感病毒后很少发生肺泡性肺炎的情况吻合）。它们在下呼吸道的感染只是支气管的感染，各毒株侵害支气管的能力不同。为了证明肺泡组织是否能被流感病毒感染，我们用不杂有支气管组织的肺组织体外感染流感病毒。结果证实这种组织也和支气管组织一样能被感染，荧光检查亦证明感染的肺组织培养细胞中含有病毒荧光。在体外培养的肺泡组织中，病毒繁殖量可达到4.8个对数值，但是该细胞的病毒释放量却极低，仅0.5%。这就使得感染不易播散到邻近细胞中。从正常雪貂肺泡组织中分离出吞噬细胞，让这些吞噬细胞与病毒在体外相互作用，结果不论强、弱毒株，这些细胞吸附病毒的百分率都达到80%左右，和用作对照的雪貂红细胞的吸附率一样高。将吸附有病毒的细胞用冻融法或酶消化裂解后，对照细胞的病毒回收率近于100%，吞噬细胞的回收率仅30%左右。上面二个实验的结果说明肺泡组织对流感病毒感染也敏感，病毒可以通过呼吸达到肺泡内，但由于肺泡组织中大量吞噬细胞的存在，病毒一旦侵入，很快就被吞噬细胞吸收破坏，从而防止了病毒在肺泡组织中的感染播散。

众所周知，流感病毒感染对婴儿和老人的危害较大。新生雪貂感染实验的结果也是如此，用1日龄新生雪貂鼻内接种少量病毒便可引起致死感染。造成新生动物死亡的二种主要病征为猝死和单纯性流感肺炎。这说明新生雪貂下呼吸道对流感病毒的敏感性增高，其原因可能是：（1）新生雪貂支气管和肺泡组织对病毒感染的敏感性增强；（2）新生雪貂支气管与肺泡组织的比例增高，即支气管量大，肺泡组织量小，这如同幼树一样，枝多叶少；（3）新生雪貂的吞噬细胞不成熟或量少。除第三个可能因素尚待证实外，下面的试验证实第一和第二种因素确实存在。用1日龄和半月龄雪貂的下呼吸道组织培养流感病毒，结果1日龄雪貂的支气管和肺泡组织的病毒繁殖量明显高于半月龄雪貂的繁殖量。荧光检查半月龄动物肺泡组织中病毒抗原几乎阴性，而1日龄雪貂的支气管和肺泡组织都有强烈的病毒荧光。用新生动物的下呼吸道组织进行器官培养感染实验也得到类似的结果。将肺连续切片后进行组织计量分析，1日龄雪貂的支气管：肺泡组织比例为0.12，半月龄雪貂为0.06，成年雪貂为0.03。由于流感病毒在下呼吸道的感染部位主要是支气管，而新生动物的支气管比例较成年动物高，所以新生动物的下呼吸道感染常十分严重。我们相信这些结果也符合于人体情况。

（廖华新、李成明整理 杭长寿校）

刺激视网膜血管生长的物质

《Med World News》1982；23（22）：77.

美国约翰斯·霍普金斯大学从动物和人的视网膜分离出一种能刺激生长新血管的物质。这一发现可能产生更好的、治疗糖尿病性视网膜病的方法，这种病在美国是造成失明的主要原因。

眼科学副教授Bert M Glaser和他的同事，在采集了牛、猫、狗、兔和人的视网膜后，提取并部分提纯了一种“血管生成因子”，在实验室试验中，表明它是新血管的强刺激物。

在最近的研究中，他们为在眼内产生异常新血管的糖尿病人进行玻璃体手术时，在取得的眼液中也发现了一种血管刺激物。

现在的工作是努力弄清这两种物质的化学成分和生物学作用。Glaser报告称，最近的研究表明，在视网膜中，受生成因子刺激的血管，与在糖尿病人眼中发现的血管具有共同的特点。

视网膜通常依靠致密的血管网供给营养，但在糖尿病人，有许多这种血管闭塞。在糖尿
（下转封四）