

对分离自褐家鼠的汉滩型和汉城型病毒的毒力测定

段正秀 李明慧 于娟 王文 郭文平 张永振

【摘要】 目的 比较分离自褐家鼠的汉滩病毒(HTNV)CGRn5310株和汉城病毒(SEOV)HR54株的毒力差异,探索汉坦病毒(HV)“溢出”到非宿主动物后的毒力变化。方法 选取从贵州省褐家鼠中分离的CGRn5310株HTNV和从河南省褐家鼠分离的HR54株SEOV,用不同稀释度的病毒悬液经颅内接种于昆明乳鼠,观察小鼠发病症状,测定其半数致死量(LD₅₀),并用免疫荧光法检测脑与肺组织内HV特异抗原。结果 接种2株病毒后的小鼠生长缓慢,均出现不同程度的神经症状。CGRn5310株的LD₅₀是10^{-6.42},HR54株的LD₅₀是10^{-4.51}。在死亡小鼠的脑与肺组织中均能检测到HV特异抗原,而对照组脑与肺组织内未检测到病毒抗原。结论 从褐家鼠中分离到的CGRn5310株HTNV的毒力大于从褐家鼠中分离到HR54株SEOV,这可能意味着HV“溢出”到非宿主动物后毒力变化较小。

【关键词】 汉坦病毒; 汉滩病毒; 汉城病毒; 毒力

Comparison on the difference of virulence between Hantaan virus and Seoul virus isolated both from *Rattus norvegicus* DUAN Zheng-xiu^{*}, LI Ming-hui, YU Juan, WANG Wen, GUO Wen-ping, ZHANG Yong-zhen. *College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China*
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com. *National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China*

【Abstract】 **Objective** Comparing the difference of virulence between the strain CGRn5310 (HTNV) and the strain HR54 (SEOV) isolated both from *Rattus norvegicus*. **Methods** Suckling mice were used to compare the difference of virulence between the two strains. Hantavirus antigens were detected in brain and lung tissues collected from the infected mice. **Results** Compared with the control group, all infected mice grew slowly. Furthermore, the mice inoculated intracerebrally with either CGRn5310 or HR45 appeared ruffled fur, and reduced activity, followed by neurological symptoms, such as paralyzes and convulsions. The half lethal dose (LD₅₀) of CGRn5310 strain was 10^{-6.42}, whereas the LD₅₀ of HR54 strain was 10^{-4.51}. Hantavirus antigens were identified in brain and lung tissues from the mice infected with the strain CGRn5310 and the strain HR54. **Conclusion** LD₅₀ of the strain CGRn5310 was significantly higher than that of the strain HR54. Our results suggested that the virulence of the spillover hantavirus might only slightly be influenced by the non-reservoir rodents.

【Key words】 Hantavirus; Hantaan virus; Seoul virus; Virulence

汉坦病毒(Hantavirus, HV)的宿主主要为啮齿类动物,在人与宿主动物间主要通过气溶胶传播。尽管宿主动物感染HV后不表现出任何临床症状,但人感染HV后能导致两种不同类型的疾病:主要

流行于亚欧大陆的肾综合征出血热(HFRS)和流行于美洲大陆的汉坦病毒肺综合征(HPS)^[1]。我国是世界上受HV危害最严重的国家,除新疆、青海、西藏等省(自治区)无原发病例外,其他省市均有HFRS的报道^[2]。长期的流行病学研究发现我国至少存在7个血清型或基因型的HV^[3,4],但至今仅发现由汉滩病毒(Hantaan virus, HTNV)和汉城病毒(Seoul virus, SEOV)引起的HFRS^[3,4]。临床上HTNV引起的HFRS比SEOV引起的HFRS严重。人感染HV后不同的临床表现及其严重程度取决于HV的型别与同一型内不同病毒株之间的毒力差异^[5]。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.010.016

基金项目:科技部“十五”科技攻关课题(2003BA712A08-02)

作者单位: 832003 新疆石河子大学生命科学院(段正秀、王文、郭文平); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(李明慧、于娟、张永振)

段正秀与李明慧同为第一作者

通信作者:张永振, Email: yongzhenzhang@sohu.com

而不同 HV 株的毒力与宿主的种类、在宿主中的适应与进化、病毒株的遗传特征等有关^[1-5]。为此,本研究比较了从褐家鼠分离到的 1 株 HTNV 和 1 株 SEOV 的毒力,现将研究结果报道如下。

材料与方法

1. 病毒株及来源:HR54 株病毒用 Vero-E6 细胞分离自河南省疫区捕获的褐家鼠,为 SEOV;CGRn5310 株病毒用 Vero-E6 细胞分离自贵州省捕获的褐家鼠,为 HTNV。

2. 实验动物:实验用 1~2 日龄的昆明乳鼠,购自中国医学科学院实验动物研究中心。

3. 病毒在乳鼠脑内传代:取 HR54 株和 CGRn5310 株病毒,研磨成 10%(W/V)悬液,经-70℃交互冻融 3 次,于 4℃以 6000 r/min 离心 15 min,吸取上清,用除菌滤器过滤,脑内接种(0.02 ml/只)于乳鼠 1~2 窝(每窝 8~9 只不等),并用接种 PBS 的乳鼠作为对照,根据预实验结果,乳鼠在接种后 8~9 d 小鼠开始发病死亡,濒死前处死并无菌取小鼠脑组织。

4. 病毒抗原的检测:为了确定发病的乳鼠确为 HV 引起,取发病乳鼠的脑组织印片、鼠肺组织冰冻切片,冷丙酮固定,用常规间接免疫荧光法(IFA)进行病毒抗原检测:鼠肺标本经冷冻切片,紫外灯下照射 15 min,自然风干后,置于丙酮(-20℃)固定 15 min,取出后自然晾干。滴加兔抗 HV 血清(1:30) 8 μl,置 37℃湿盒内作用 30 min,用蒸馏水洗 3 次,再用 PBS 洗 3 次,每次 2 min。吹干后,加异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 抗体 10 μl,置 37℃湿盒内作用 30 min,洗涤吹干后滴加 10%缓冲甘油,封片后在荧光显微镜下观察。

5. 病毒悬液的稀释:取经 IFA 检测阳性的鼠脑混合研磨,按上法处理后制成 10%的悬液,再经冻融、离心、除菌、过滤后,分别作 10 倍系列稀释,制备成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的悬液,用于病毒毒力的测定。

6. 病毒半数致死量(LD₅₀)测定:取制备好的 2 株病毒悬液经脑内途径接种于出生后 1~2 d 的昆明乳鼠。每个稀释度从低到高接种乳鼠 6~8 只(剂量 0.02 ml/只),对照组小鼠每只脑内注射 0.02 ml PBS。接种后 7 d 内死亡的乳鼠均为非特异性死亡,不列入统计。各组小鼠每日观察死亡情况并做记录,连续观察 15 d,记录各组的发病症状、小鼠死亡数、死亡时间,并统计死亡数、死亡率和存活率。根

据每个稀释度的乳鼠病死数,用 Reed 和 Muench 法计算不同毒株的 LD₅₀^[6],比较不同毒株毒力的差别。将濒死状态的鼠处死,无菌状态下取脑与肺组织,用 IFA 法检测 HV 在上述组织中的分布情况。

结 果

1. 昆明乳鼠发病症状:HV 感染昆明乳鼠后,其发病症状主要表现为神经症状:皮毛耸起、活动减少、行动迟缓、背弓、全身蜷缩、尾强直,部分鼠后肢麻痹瘫痪、痉挛抽搐,直至死亡;其中痉挛抽搐在死亡的前一天开始变得愈加明显,表现出易兴奋性,个别乳鼠还出现发育障碍。乳鼠一般在发病后的 1~2 d 死亡。濒死状态鼠处死剖检时,肉眼观察重要脏器:可见脑膜毛细血管扩张充血;各肺叶呈暗红色,纹理消失,多数有一叶或两叶坏死,胸腔往往有积液;肝、脾、肾出现充血,有的可见胃肠膨胀,其他脏器未见明显异常。对照组乳鼠各脏器剖检时未见异常。

2. 2 株病毒的毒力:用 HV 经脑内途径接种乳鼠后,小鼠出现死亡,而且用高滴度 HV 感染组的小鼠发病死亡时间较早(图 1、2)。从感染病毒后小鼠存活情况的变化曲线可以看出(图 1),用不同滴度的 CGRn5310 株 HV 感染乳鼠后,4 组(1.00E-04~1.00E-07)的小鼠感染 8 d 后均出现不同程度的死亡,第 1、第 2 组小鼠在感染 12 d 后全部死亡。但第 3、第 4 组小鼠在感染 10 d 后才出现死亡,且第 4 组小鼠在感染 12~14 d 无小鼠死亡。用 HR54 株 HV 感染乳鼠后,感染病毒滴度为 1.00E-02~1.00E-05 的小鼠在感染 8 d 后均出现不同程度死亡(图 2),感染病毒滴度为 1.00E-02~1.00E-03 两组小鼠全部死亡,但感染病毒滴度为 1.00E-06 组的小鼠则全部存活。用 Reed 与 Muench 测算,CGRn5310 株病毒的 LD₅₀ 是 $10^{-6.42}$,HR54 株病毒的 LD₅₀ 是 $10^{-4.51}$ 。上述结果也说明该 CGRn5310 株病毒的毒力强,而 HR54 病毒株的毒力相对较弱。

3. 病毒抗原的检测:将濒死状态的小鼠处死,取脑与肺组织,用 IFA 法检测 HV 抗原,用 CGRn5310 和 HR54 感染小鼠的脑和肺组织均为 HV 抗原阳性(图 3),而在对照小鼠的脑和肺组织中均未检测 HV 抗原。

讨 论

HV 具有高度的遗传多样性,在临床上既能引起病死率高达 40% 以上的 HPS,也能引起临床表现很

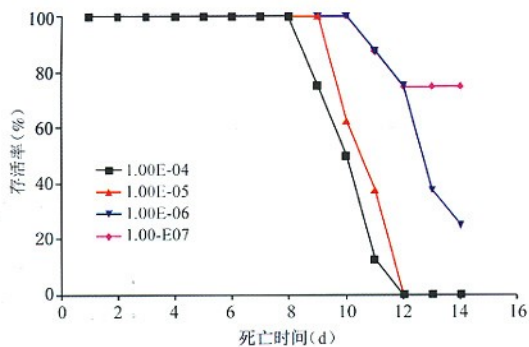


图1 用不同滴度 CGRn5310 株 HNTV 感染后小鼠的存活率与死亡时间

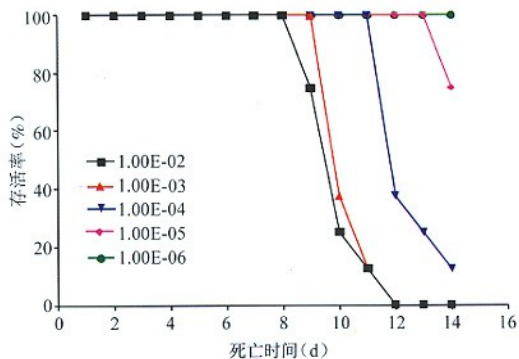
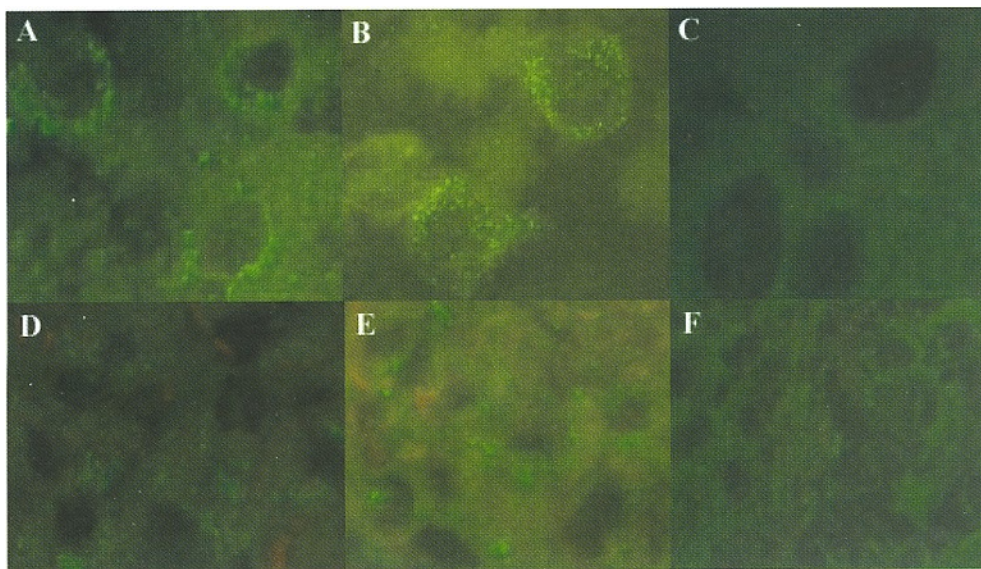


图2 用不同滴度 HR54 株 SEOV 感染后小鼠的存活率与死亡时间

轻、病死率较低 (<1%) 的 HFRS (如肾病肾炎)^[1]。另外,包括在我国发现的大别山病毒 (DBSV)、沅江病毒 (YUJV)、北海道病毒 (HOKV) 等其他 HV 是否

对人致病目前仍不清楚^[3,4]。因此,研究不同 HV 株的毒力将有助于揭示 HV 发病机制,提高防治的效果。由于 HV 感染后能导致小鼠乳鼠发病甚至死亡^[7,8],因而测定 HV 毒力也多用小鼠乳鼠为动物模型,经脑内或腹腔途径接种病毒后比较小鼠乳鼠有无发病及病死率的高低来确定病毒的毒力^[8-12]。本研究用昆明小鼠乳鼠动物模型,经脑内接种途径来比较 2 株分离自褐家鼠的 HTNV 与 SEOV 的毒力,结果发现接种 CGRn5310 及 HR45 毒株 8 d 后小鼠出现神经症状,并有不同程度的死亡,用免疫荧光法检测小鼠的脑与肺组织,有 HV 特异的抗原存在,从贵州省褐家鼠中分离的 CGRn5310 株病毒的 LD₅₀ 为 10^{-6.42},而从河南省褐家鼠中分离的 HR54 株病毒的 LD₅₀ 为 10^{-4.51}。CGRn5310 株病毒的毒力远大于 HR54 株病毒的毒力,符合 HNTV 比 SEOV 的毒力及致病性强的特点,与以往的研究结果一致^[9,12]。

HV 在长期适应啮齿动物的遗传环境过程中,形成了与其宿主的共进化,全世界已发现的 20 多个血清型/基因型的 HV 中,每一型均来自一种或少数几种密切相关的啮齿动物^[13,14]。因此从不同型病毒的毒力及致病性不同可以看出,病毒的毒力及致病性是病毒与宿主动物之间适应及进化的结果,宿主动物也由于遗传环境的不同而影响着体内所携带病毒的毒力及致病性。然而 HV 在与宿主的共进化过程中,也出现了病毒与宿主动物不一致的现象,即宿主“溢出”(spillover),多种宿主携带同一型病毒或一种



注:A:感染 CGRn5310 病毒株的小鼠脑组织; B: 感染 HR54 病毒株的小鼠脑组织; C: 正常小鼠的脑组织; D: 感染 CGRn5310 病毒株的小鼠肺组织; E: 感染 HR54 病毒株的小鼠肺组织; F: 正常小鼠的肺组织

图3 小鼠脑和肺组织中的 HV 抗原(40×10)

宿主携带多型病毒的现象^[15]。然而至今国内外还很少有人研究HV从宿主动物“溢出”到非宿主动物后其毒力及致病性的变化情况。在本研究中,我们比较均分离自褐家鼠的HTNV及SEOV的毒力,研究表明,分离自褐家鼠的CGRn5310株HTNV的毒力远大于分离自褐家鼠的HR54株SEOV的毒力。而且,CGRn5310和HR54株病毒分别与以往研究HTNV及SEOV毒力的结果相似^[9,12]。这表明CGRn5310株病毒虽由黑线姬鼠“溢出”到褐家鼠,但可能由于在褐家鼠中存在的时间较短,褐家鼠还未能改变这株HTNV基因组上与毒力相关的毒力位点。由于本研究是对非宿主动物对HV毒力及致病性的初步研究,有必要进一步将CGRn5310株的毒力及其致病性与其他从黑线姬鼠或其他动物中分离到的HTNV毒株比较,以研究更多的发生宿主“溢出”病毒的毒力,揭示动物对不同病毒毒力及致病性的影响。

参 考 文 献

- [1] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3(2): 95-104.
- [2] 张永振, 肖东楼, 王玉, 等. 中国肾综合征出血热流行趋势及其防制对策. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(6): 466-469.
- [3] Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, et al. Genetic diversity of hantaviruses isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. *Virology*, 2000, 278(2): 332-345.
- [4] Zou Y, Xiao QY, Dong X, et al. Genetic analysis of hantaviruses carried by reed voles *Microtus fortis* in China. *Virus Res*, 2008, 137(1): 122-128.
- [5] Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist Å, et al. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis*, 2003, 3: 653-661.
- [6] 黄祯祥. 医学病毒基础及试验技术. 北京: 科学出版社, 1990: 143-144.
- [7] McKee KT, Kim GR, Gree DE, et al. Hantaan virus infection in suckling mice: virologic and pathologic correlates. *J Med Virol*, 1985, 17(2): 107-117.
- [8] Araki K, Yoshimatsu K, Lee BH, et al. Hantavirus-specific CD8 (+)-T-cell responses in newborn mice persistently infected with hantaan virus. *J Virol*, 2003, 77(15): 8408-8417.
- [9] Yon YC, Yeshimatsu K, Yoshida R, et al. Comparison of virulence between seoul virus strain SR-11 and hantaan virus strain 76-118 of hantavirus in newborn mice. *Microbiol Immunol*, 1993, 37(7): 557-562.
- [10] 康文臻, 黄长形, 白雪帆, 等. 汉坦病毒基因重排病毒株毒力变化的初步研究. *医学研究生学报*, 2002, 15(4): 290-292.
- [11] 邱建明, 宋干, 杭长寿, 等. 汉坦病毒毒力标志的建立. *病毒学报*, 1995, 11(4): 298-304.
- [12] 王昭孝, 付德庆, 吕太富, 等. 流行性出血热病毒株在乳白小鼠脑内传代及其毒力的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1991, 11(5): 315-318.
- [13] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256: 47-75.
- [14] Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol*, 1996, 77(11): 2677-2687.
- [15] Zou Y, Hu J, Wang ZX, et al. Genetic characterization of hantaviruses isolated from Guizhou, China: evidence for spillover and reassortment in nature. *J Med Virol*, 2008, 80(6): 1033-1041.

(收稿日期: 2009-06-02)

(本文编辑: 张林东)