



实验动物与人兽共患传染病

夏咸柱, 高玉伟, 王化磊

(军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130122)

【摘要】 人兽共患传染病的社会危害严重、经济损失巨大, 威胁着公共卫生乃至国家安全。作为重要支撑条件的实验动物在人兽共患传染病防控研究中发挥着不可替代的作用。本文从人兽共患传染病的危害、实验动物的作用、实验动物在重要人兽共患传染病研究中的应用、人兽共患传染病对实验动物健康的影响、人兽共患病研究中新型实验动物的开发等五个方面进行了综述和展望。

【关键词】 实验动物; 人兽共患传染病; 流感病毒; 狂犬病病毒

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10、11-0002-11

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10、11.002

Laboratory Animals and Zoonotic Infectious Disease

XIA Xian-zhu, GAO Yu-wei, WANG Hua-lei

(Institute of Military Veterinary, AMMS, Changchun 130062, China)

【Abstract】 Zoonotic infectious disease constitute a tenacious and major social and economic problem, and also a huge threat to public-health and the state security. Laboratory animals play an irreplaceable role in research on prevention and control of zoonotic infectious disease. The paper was a review and prospect in such respects as harm of zoonotic infectious disease, the role of laboratory animal, the application of laboratory animal in the study of important zoonotic infectious disease, influence of zoonotic infectious disease on laboratory animal's health, the exploitation of neotype laboratory animals.

【Key words】 Laboratory animals; Zoonotic infectious disease; Influenza virus; Rabies virus

1 人兽共患传染病的形势严峻

人兽共患病是指在脊椎动物与人类之间自然传播的疾病和感染, 即脊椎动物和人类由共同病原体引起的, 在流行病学上有相互关联的疾病。在WHO所分类的1415种人类疾病中, 有61%属于人兽共患病。在人类所知的300多种传染病中, 除十余种只感染人类之外, 其余的都是人兽共患传染病。近年发生的175种新发传染病中, 有132种是人兽共患传染病, 占75.4%。人兽共患传染病曾给人类造成了巨大的危害。1333年黑死病(鼠疫)肆

虐, 仅在欧洲就造成2000万人死亡; 1918年的“西班牙流感”在不到一年的时间内传遍世界, 导致5000万人死亡; 1957年“亚洲流感”导致100万人死亡; 1981年发现首例AIDS病人, 目前在全球已造成3000万人死亡; 2003年30余个国家和地区暴发SARS, 导致8437人发病, 813人死亡; 2003年再度发生的人禽流感导致564人发病, 330人死亡(截止2011年8月9日) 病死率近60%。

当前人兽共患传染病的防控形势十分严峻。一方面, 新发与烈性人兽共患传染病如SARS、禽流感、甲型H1N1流感、病毒性出血热等疫情不期而

[作者简介] 夏咸柱, 中国工程院院士, 主要从事动物病毒学研究。E-mail: Xia_xzh@yahoo.com.cn。

至 近年来几乎每 1~2 年就会出现一种全球性流行的新发传染病。另一方面,曾经严重威胁人类健康的炭疽、鼠疫、狂犬病、结核病、布鲁氏杆菌病等时有死灰复燃。如何有效预防、控制和消灭人兽共患传染病已成全人类面临的巨大挑战。

2 实验动物是人兽共患传染病防控重要支撑条件

实验动物是指以科学实验为目的,经人工饲养、繁殖,对其携带的微生物或寄生虫进行控制,遗传背景明确、来源清楚,而应用于科学研究、教学、生产和鉴定以及其他科学试验的动物。人们预测以生命科学为基础的第六次科技革命将来临,而实验动物是生命科学研究的基础和重要支撑条件。生命科学的支撑条件可概括为 AEIR 要素: animal (实验动物); equipment(仪器设备); information(信息); reagent(试剂)。实验动物居于生命科学研究四大支撑条件之首,足见其在生命科学研究中的重要性。很多重要的科研成果来源于实验动物,实验动物起着“活的天平”和“活的化学试剂”的作用。实验动物已被广泛用于科学研究的各个领域,尤其在生物医学研究中更是非常重要的支撑条件。同样实验动物也是人兽共患传染病研究的重要支撑条件。

3 实验动物在人兽共患传染病防控研究中的应用

作为支撑条件的实验动物在人兽共患病防控研究中应用颇为广泛,包括病原分离、感染与发病机制研究、药物筛选与评价、疫苗研制与评价、诊断用品制备等诸多方面。人兽共患传染病种类较多,病原体复杂多样,需要有针对性的开展防控研究。我国农业部在 2009 年 1 月 19 日会同卫生部发布了《人兽共患传染病名录》。名录包含 26 种传染病,其中收录了 3 种病毒性传染病,为高致病性禽流感、狂犬病和猪乙型脑炎。本文重点介绍实验动物在流感和狂犬病防控研究中的应用。

3.1 实验动物在 A 型流感防控研究中的应用

A 型流感病毒包括 16 个血凝素亚型(HA)和 9 个神经氨酸酶亚型(NA),理论上可以组合成 144 种 A 型流感病毒。A 型流感病毒的自然宿主是水禽和家禽。所有亚型都可以感染水禽。A 型流感病毒中的三种 HA 亚型(H1, H2, H3)和两种 NA 亚型(N1, N2)上世纪已经广泛引起人感染,这些在人群间常规流行的流感称之为季节性流感。在美国,季

节性流感每年可造成 2~3 万人死亡。HA 决定了 A 型流感病毒的抗原性,新抗原性流感病毒的出现会导致流感大流行的发生。例如 1918 H1N1 亚型“西班牙流感”导致了全世界 2000~5000 万人死亡,2009 年的 A/H1N1 流感在不到 3 个月的时间内形成全球大流行。禽流感病毒中的 H5, H7 和 H9 亚型已经从禽类跨种传播到包括猪、马和人在内的多种哺乳动物中。过去的研究中禽流感感染人或人流感感染鸭都表明其具有种间特异性,流感病毒不能很好复制。尽管如此,越来越多的自然感染事件表明流感病毒能够跨越种间屏障。例如,马流感 H3N8 能够传染狗,禽流感可以传染猪和人。2003 以来,高致病性 H5N1 禽流感以造成 546 人感染,330 人死亡,并且这些感染病例中大多是从感染的禽类直接传染给人的。A 型流感的复杂性和不断大流行促使人们要不断的对流感的传播机制、致病机制和防治开展深入的研究。

3.1.1 实验动物在 A 型流感病毒在哺乳动物间水平传播机制研究中的应用

雪貂和豚鼠被广泛用于 A 型流感病毒在哺乳动物间水平传播机制研究。1930 年,人们首次将雪貂用于流感病毒分离。自然状态下,雪貂对流感病毒十分敏感并且呈现与人相似的临床症状(如喷嚏、流鼻涕、体温升高等)。研究表明雪貂的上呼吸道受体与人相似,因此雪貂适用于评价 A 型流感病毒在哺乳动物间的传播能力。在 1941 年,研究人员首次用雪貂模型研究流感病毒的传播,发现感染的雪貂可以进一步感染同群健康雪貂,甚至当用物理屏障阻隔飞沫后还可以发生传播。后来很多学者都选择雪貂作为研究流感病毒传播的哺乳动物模型。但由于雪貂对多种病原敏感、价格较贵并且饲养条件要求高,一定程度上限制了流感病毒传播机制的研究。人们把目光转向了小鼠,尽管品系较纯的小鼠已经广泛用于流感病毒致病力的研究,但仅 L. SCHULMAN 等证明感染流感的小鼠可以传染同群的健康小鼠^[1]。随后多位研究者证明绝大多数流感病毒都不能在小鼠中传播,甚至 1918 H1N1 也未能引起传播。因此,小鼠不适宜作为研究流感传播的模型。研究人员发现豚鼠像雪貂一样对人流感病毒和禽流感病毒都敏感,他还进一步研究证明豚鼠适合研究流感病毒的传播。人流感病毒在豚鼠中可以高效传播(包括接触性传播和非接触性传播)。体积较小、价格低廉的豚鼠成为研究流感病

毒传播又一个重要的哺乳动物模型,但和雪貂不同,感染的豚鼠临床症状并不明显,即不易通过病理改变区分接触的豚鼠感染与否。

为探讨 H5N1 亚型流感病毒在哺乳动物间水平传播的能力和分子机制,我们应用豚鼠作为哺乳动物模型,评价了 5 株 H5N1 亚型鸭源和 1 株候鸟源病毒的复制和水平传播能力。结果其中两株病毒 A/duck/GX/35/01 (DKGX/35) 和 A/Bar-Head Goose/03/2005 能够在豚鼠间水平传播。应用一系列的拯救突变病毒进行传播实验,发现 PB2 基因 701Asn (N) 是 DKGX/35 水平传播的一个必要条件。另一个决定 DKGX/35 传播能力的条件是病毒的受体结合特性。DKGX/35 同时识别 SA α 2,3Gal、SA α 2,6Gal 和长型(伞型拓扑结构) SA α 2,6Gal 受体。血凝素(HA) Q226L 和 G226S 的双突变可使病毒只具有 SA α 2,6Gal 受体结合特性,且此突变病毒可在豚鼠间水平传播。HA 的 160 位氨基酸由 Ala (A) 变成 Thr (T) 时,35/HA-A160T 完全转变为 SA α 2,3Gal 受体结合特性,该变化导致病毒不能在豚鼠间水平传播。A160T 变异可导致 HA 增加一个糖基化位点,从而影响了病毒受体结合特性。该研究表明 H5N1 亚型流感病毒的 PB2 基因与 HA 基因是决定病毒能否在哺乳动物间传播的关键基因^[2]。

家禽(鸡、鸭、鹅)和猪是流感病毒的中间宿主,流感在这些动物体内病毒重组和宿主适应可能会发生,利用这些动物作为动物模型可以更好的理解宿主适应和流感病毒传播给人类的分子机制。近来,猫和狗已被用作流感病毒感染的模型。猫暴露于家禽或者野鸟间自然感染 H5N1 流感病毒的病例已有报告,并且 H5N1 流感病毒可以在猫之间传播。我们在 H5N1 病毒感染虎的研究中发现尚在哺乳期的小虎也可发生感染,说明 H5N1 病毒可能气源途径传播。在 2004 年佛罗里达州发现马的 H3N8 流感病毒在狗群间传播,在韩国也有发生狗自然感染 H3N2 流感病毒的病例。人类经常与猫和狗在一起使得研究这些动物对流感病毒的传播性受到人们的关注。

3.1.2 实验动物在 A 型流感病毒重配研究中的应用

近年来关于流感病毒重配的研究与报道正逐步成为热点,重配流感病毒对人类构成很大的威胁。历史性的 1957 年和 1968 年的大流行的流感病毒被认为是禽流感病毒和人类流感病毒的重配病毒,目

前 2009 年的甲流大流行被认为是禽流感、猪和人类病毒的重配病毒。流感病毒经常在各种生物环境下循环,然后进入不同的动物体内,衍生出各类流感病毒。应该警惕甲流和禽流感发生重配变异,若这种现象发生,对人类的影响将是灾难性的。研究人员已通过应用实验动物体内重组的方式或应用反向遗传操作技术人为重配的方式对 A 型流感病毒的重配机制开展了一系列的研究。Sara Jackson 等人将高致病性低传播性的禽 H5N1、低致病性高传播性的人 H3N2 在雪貂体内重配,分离纯化出 5 株含有 H5N1HA 基因的重配病毒^[3]。这些结果说明重配病毒能够在体内发生,这两种亚型的流感病毒的重配更易发生在雪貂的上呼吸道。这也很容易的推断出人季节性流感病毒与禽 H5N1 流感病毒持续暴露,能增加 H5 亚型重配病毒的可能性及风险。所以在高致病性高传播性的重配病毒出现之前这些研究就很有必要的,检测仍然是公共安全卫生的重要措施,以尽量减少这种重配的大流行毒株出现的风险。Chen LM 和 Chengjun Li 等人分别利用反向遗传操作研究禽 H5N1、人 H3N2 进行体外重配病毒,重组病毒的表面基因 HA、NA 来自禽 H5N1,其余六条片段随机组合。近一半的重配病毒在体外显示高效率复制,揭示了禽流感病毒和人流感病毒各基因之间的高度兼容性。研究结果突出监测的重要性,尤其是监测含有人流感病毒 PB2 段的 H5 病毒的重配病毒。Sun Y 等人利用反向遗传的方法将禽 H9N2 和甲流 H1N1 体外重配,其中重配病毒的 PA 基因来自甲流 H1N1。结果显示这些重配病毒有着很高的兼容性且一半以上的重配病毒在体外能高滴度复制。所有的结果提示我们 H9 亚型的重配流感病毒尤其是含有 H1N1/2009 起源的 PA 基因重配病毒的出现对人类有更高的潜在威胁,H1N1 PA 基因的重配病毒具有很高的公共安全卫生风险。J. Brian Kimble 等人利用反向遗传的方法将禽 H9N2 与甲流 H1N1 进行体外重配,并评估了 4 株重组病毒在雪貂模型中传播特性,结果证明禽流感病毒 H9N2 的表面基因与 H1N1 病毒的内部基因能通过飞沫在雪貂间有效地传播。重配病毒在 H1N1 病毒背景下包含 H9N2 的 HA 基因或者也包含 H9N2 的 NA 基因,产生的 4 株病毒有 3 株能有效的进行飞沫传播。但 4 株病毒存在复制效率上的差异。结果清楚地表明,禽流感病毒 H9N2 和 H1N1 病毒都可以偶尔感染猪,他们有产生感染哺

乳动物的新型重组病毒的潜力。Ca'ssio Pontes Octaviani 等人在细胞 MDCK-M2 内共感染猪 H1N1、禽 H5N1 病毒,并发现这两种病毒有很高的遗传兼容性,有些重配病毒比母本病毒有更好的生长动力^[4]。从而推出这两株病毒之间的重组可以发生,可能会造成 H5N1 重配病毒的大流行。应用适宜的动物模型评价流感病毒株之间的重配机制及重配病毒的生物学特性对流感大流行的预警和预测具有重要作用。

3.1.3 实验动物在 A 型流感病毒致病与救治研究中的应用

3.1.3.1 小鼠

在流感病毒致病性研究中,小鼠是最常用的实验动物。季节性流感病毒一般都不能有效的在小鼠体内复制,病毒在小鼠体内连续传代后可表现出复制能力和致病性增强。Puerto Rico/8/34,WSN/33 和 FM/1/47 等季节性流感病毒在小鼠体内适应后会表现出对小鼠的高致病性,这些毒株称之为鼠肺适应株。HA(G218E)和 NS1(D125G)氨基酸的突变与病毒的致病性增强相关。2009 年出现的新甲型 H1N1 流感病毒不需要适应就可感染小鼠,但同样表现出较低的致病性。我们在研究中发现 A/Jilin/XD/2009 在小鼠体内经 18 代的适应性传代后,病毒的致病性和抗原性均发生改变,进一步分析发现 PB2、PB1、PA、HA 和 NP 上氨基酸发生了变异。高致病性禽流感病毒和 1918 年西班牙流感病毒无需经过传代适应就能够在小鼠上引起严重的疾病。它们可以在小鼠肺部以外的组织中进行复制,并引起高死亡率。高致病性流感病毒聚合酶基因上的突变,例如 PB2-E627K 突变和 PB1-F2 蛋白的 N66S 突变,这些突变已经被证明参与损伤适应性免疫应答和介导宿主细胞凋亡,这些突变有助于增强病毒的复制和多器官感染。人感染高致病性禽流感病毒和 1918 年西班牙流感病毒后表现出严重的肺部病理变化,包括肺水肿和大量炎性浸润。比起感染低致病性流感病毒,感染这些病毒可以导致肺部的巨噬细胞和中性粒细胞的数量显著增加,表明这些细胞在急性肺损伤扮演重要的角色。一些 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒对小鼠是致死的,然而其它的则不是。小鼠感染无致死力的 H5N1 亚型流感病毒后只会出现短暂的淋巴细胞减少,然而当小鼠感染 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒后则表现出严重的淋巴细胞减少症。小鼠感染致死性的

H5N1 亚型流感病毒后,肺脏和淋巴样组织中的 CD4 + 和 CD8 + T 细胞以及白细胞介素 1 β 、干扰素 γ 和趋化因子巨噬细胞炎性蛋白质的合成均减少。相反,感染小鼠脑中的趋化因子和细胞因子的水平上升,另外有证据表明感染小鼠的脾脏和肺脏中出现细胞凋亡,这些研究结果表明一个淋巴细胞破坏机制^[5]。H5N1 亚型流感病毒对免疫系统的破坏效果也许有助于提高该病毒对哺乳动物的毒力。

3.1.3.2 雪貂

季节性人类流感病毒通常对雪貂有轻度或中度的致病性^[6]。雪貂感染的临床症状与人很相似,包括嗜睡,流鼻涕,打喷嚏,发烧,体重减轻。这些临床症状的严重程度取决于流感病毒的毒株。流感毒株造成雪貂轻微的疾病与肺部轻度炎症改变相关。雪貂感染高致病性病毒如 H5N1 亚型禽流感病毒和 1918 “西班牙流感”病毒表现出严重的症状,有可能引起致死。H5N1 病毒能够在雪貂的脑、脾、肠复制,而 1918 年流感病毒已经从雪貂的心脏和脾脏分离到。一些数据表明 H5N1 病毒在雪貂和小鼠体内具有嗜神经性。

3.1.3.3 非人灵长类动物

一般非人类灵长类动物对流感病毒的易感性比人类要弱,可检测到病毒的复制但动物不发病。一般来说,高剂量的病毒通过多种途径注射来保证动物感染流感病毒。比如,恒河猴和短尾猴只有通过气管感染和鼻内感染 H1N1 流感病毒时表现临床症状。短尾猴通过气管感染 H3N2 流感病毒不表现临床症状,尽管可以从鼻拭子和肺灌洗液中分离出病毒。相反,短尾猴感染季节性 H1N1 病毒产生疾病的临床症状,包括体重减轻、流涕、发热以及与人类相似的肺脏的病理变化。疾病在非人灵长类也可以进展表现出特殊的疾病症状,比如感染低毒力病毒后表现出的结膜炎和鼻液溢。其它流感病毒株,比如高致病力禽流感、1918 年流感和 2009 年 H1N1 流感病毒在非人灵长类动物体内复制并引起轻度到重度的疾病。1919 年流感病毒对短尾猴具有强致病性,可以引起急性呼吸窘迫并致死。1918 年流感病毒呈现复制能力和组织嗜性不同于同期的人流感。对于非人灵长类动物可以在感染后持续 8 天在上呼吸道和下呼吸道检测到 1918 年流感病毒,而季节性流感病毒仅限制于上呼吸道,一般在感染后 6 天就被清除。短尾猴和恒河猴同时也被用于研究高致病性 H5N1 流感病毒发病机制的动物模型。

这些猴子表现出与人类相似的系统性症状,包括发热、疲倦、食欲下降,但呼吸系统相关症状不明显^[7,8]。

3.1.4 实验动物在 A 型流感病毒靶向药物研究中的应用

在流感的救治研究中,最常用的动物模型同样是小鼠。我们以小鼠为模型,开展了靶向药物的研究。我们以禽流感病毒单链抗体作为靶向部分,以特异性抗禽流感病毒的反义核酸为杀伤感染细胞的效用部分,开展了靶向抗流感病毒药物研究。小鼠体内的攻毒保护试验显示针对 PA 基因的 PA492 和针对 NP 基因的 NP628 反义核酸均能保护部分小鼠免受致死剂量 H5N1 禽流感病毒的攻击,保护率分别为 50% 和 37.5%;同时 PA492 也能有效地保护小鼠免受致死剂量甲型 H1N1 流感病毒的攻击,保护率达 80%;进一步不同时间感染小鼠的体内肺病毒滴度和肺感染指数试验结果也显示 PA492 和 NP628 能抑制 H5N1 或 H1N1 流感病毒在小鼠体内的复制。禽流感病毒的血凝素抗原(HA)在感染细胞表面大量存在,能够在抗病毒靶向性治疗中作为特异性抗体的靶标。我们将禽流感病毒 HA 特异性的 scFv 基因和截短的人鱼精蛋白基因通过连接子(linker)结合,将获得的融合蛋白进行原核表达、纯化和复性,能够从 1L 细菌培养物中获得约 6 mg、纯度约为 90% 的融合蛋白,复性率约为 5%。细胞 ELISA 和间接免疫荧光试验显示融合蛋白对 HA 具有和单独单链抗体相似的识别和结合活性,以剂量依赖性方式和 HA 结合。EMSA 试验显示融合蛋白能够有效结合 DNA。流式细胞仪检测显示融合蛋白能介导含 EGFP 质粒和 FITC 标记的寡核苷酸特异性的传递到病毒感染的细胞表面。在融合蛋白结合反义核酸的实验中,通过病毒滴度、荧光定量 PCR 和间接免疫荧光试验显示融合蛋白能够提高 PA492 在 MDCK 细胞上的抗病毒活性,体内传递试验显示融合蛋白能够介导 FITC 标记的 PA492 进入禽流感病毒感染的小鼠肺部组织,小鼠体内的攻毒保护试验显示融合蛋白介导的 PA492 能够部分保护小鼠免受致死剂量 H5N1 流感病毒的攻击,保护率达 62.5%,效果稍好于脂质体的介导(50% 存活率)。此外,融合蛋白介导的 PA492 和脂质体介导的药物相比在感染小鼠体内有更低的肺感染指数和肺病毒滴度^[9,10]。

3.2 实验动物在狂犬病防控研究中的应用

狂犬病(Rabies)俗称疯狗病,又名恐水症,是一

种侵害中枢神经系统的急性人兽共患传染病,所有温血动物包括人类,均能被感染。野生动物是该病的主要贮存宿主,不同动物对狂犬病的敏感性差异大,其中患狂犬病的犬是人感染狂犬病的主要传染源。用于狂犬病研究的实验动物主要包括:小鼠、家兔、豚鼠及非人灵长类(恒河猴)等,实验动物广泛应用于狂犬病病原学、发病机制、疫苗及免疫学等各个研究领域。

3.2.1 实验动物在狂犬病病原诊断学研究中的应用

通过接种动物或细胞分离培养病毒是最常用的病毒确诊方法。病毒分离后才能对其进行进一步传代,并通过抗原或遗传进化分析进行特性鉴定。乳鼠脑内接种试验是目前最常用的狂犬病病毒(Rabies virus, RABV)分离方法,该方法敏感、可靠。本课题组近几年来通过乳鼠脑内接种试验已经分离到 15 株狂犬病病毒街毒株,并对其全基因组核苷酸序列进行了测定分析,结果发现我国的流行性街毒株均为基因 I 型,形成 2 个进化群,进化 I 群与中国犬源街毒株 BD06 进化关系极其相近,II 群与人源街毒株 HN10 同在一个进化分支。小鼠脑内中和试验是最早被采用的狂犬病病毒抗体检测方法,以小鼠或乳鼠测定病毒-血清感作后残存的病毒感染力。但由于此法操作繁琐,目前已基本被细胞水平的中和试验所代替。

3.2.2 实验动物在狂犬病致病机制研究中的应用

目前对于狂犬病的发病机制尚不完全明确,狂犬病实验动物人工感染模型的建立对于认识狂犬病的自然发病机制具有重要借鉴意义。狂犬病病毒具有严格的嗜神经性,病毒自咬伤部位入侵后,通过神经-肌肉接头或神经传感器侵入外周神经,再延脊髓到达中枢神经系统(central nervous system, CNS),病毒在 CNS 进行大量增殖后离心传播至外周神经系统。人或动物自然感染狂犬病通常具有较长的潜伏期,且时间长短不一。目前尚不完全明确狂犬病病毒自感染部位进入中枢神经系统之前是否在局部进行增殖,Murphy 等以病毒感染新生地鼠的实验研究表明:病毒可在接种部位的横纹肌内增殖^[11]。因此病毒感染和增殖的局部可能是狂犬病病毒长时间隐蔽的场所,Fekadu 及 Chaltron 分别以犬和臭鼬证明了此实验结果。与上述结果不同,

Shandkar 以病毒人工感染小鼠咬肌后发现: 病毒进入肌肉组织后不在局部复制而是直接侵犯中枢神经系统。狂犬病病毒一旦进入外周传入神经纤维之后,便在神经细胞内向心性运行。分别以狂犬病病毒固定毒株及街毒株感染小鼠模型的试验表明: 固定毒株向心性运行速度为 3.0 mm/h,而街毒株的运行速度要比固定毒株慢的多。Dean 等将相同剂量的狂犬病病毒 Flury LEP 分别接种狐狸颈部和腿部肌肉,结果发现与腿部肌肉注射相比,颈部注射试验动物潜伏期短、发病快及死亡率高。狂犬病病毒在脑内大量增殖后,一方面引起神经系统症状,一方面通过在传出性运动神经、感觉神经和自主神经系统中运行到达所支配的组织和器官,导致非神经组织的感染。狂犬病病毒随着腺体细胞的分泌进入唾液内,进而通过唾液传播至其它动物或人。实验动物感染试验表明: 感染动物唾液腺的感染性高低与实验动物种类密切相关,如犬、猫、猫的感染性高(74%~88%)而奶牛的感染性则较低(47%)。

研究表明: 乙酰胆碱受体(AchR)、神经细胞黏附分子(NCAM)及神经生长因子受体(p75NTR)可能是介导狂犬病病毒感染机体的受体。但 NCAM 及 p75NTR 基因缺失小鼠仍可感染狂犬病病毒的试验表明: 狂犬病病毒的真正受体有待进一步研究^[12,13]。

3.2.3 实验动物在狂犬病疫苗研究中的应用

预防与控制狂犬病有两大手段: 一是动物的免疫。众所周知,患病动物是人狂犬病的传染源,有效地预防动物狂犬病的流行,是控制人狂犬病发生的根本。日本、美国和西欧等大多数发达国家通过预防和控制动物的狂犬病,已经基本甚至完全消除了人的狂犬病。其二是人的免疫与治疗。人的免疫分为暴露前和暴露后免疫,暴露前免疫是给经常与狂犬病病毒或动物接触的人接种疫苗,暴露后免疫是给被患狂犬病动物或者疑似狂犬病动物咬、舔、抓伤的人及时接种疫苗及抗狂犬病免疫球蛋白。因此,安全、高效的狂犬病疫苗是控制狂犬病的基础。目前,人用狂犬病疫苗主要为灭活、纯化的细胞培养疫苗,该疫苗具有安全、高效等优点,已被广泛用于人狂犬病的暴露前及暴露后预防免疫。在疫苗制备过程中的安全性检测、效价评价(NIH 效力测定)等均以小鼠为动物模型进行。当前狂犬病

疫苗的研发主要集中于流浪犬、猫及野生动物口服疫苗。Kiney 等构建了痘苗-狂犬病病毒糖蛋白(VRG)重组病毒,该疫苗可在小鼠模型诱导产生高水平的狂犬病病毒中和抗体,并能抵抗致死性强毒攻击。目前该疫苗已在美国取得生产许可并广泛用于野生动物的免疫。Schnell 等利用反向遗传技术构建了表达 2 个糖蛋白及 3 个糖蛋白的重组狂犬病疫苗,傅振芳等构建了表达先天性免疫刺激因子的重组病毒^[14],在小鼠动物模型中,此类疫苗不仅对狂犬病具有良好的暴露前免疫预防效果,且具有显著的暴露后治疗效果。本实验室近年来也建立了狂犬病病毒 ERA、CVS-11、SRV9 株的反向遗传操作系统,并以此为基础构建了 G 蛋白突变株狂犬病病毒(rRVG^{*}),该病毒对乳鼠的致病力明显降低,对成年鼠无致病性,同时可在犬体内诱导良好的免疫反应。

3.2.4 实验动物在狂犬病免疫研究中的应用

3.2.4.1 保护性免疫应答

狂犬病病毒固定毒株感染刺激机体产生的抗病毒免疫应答可有效阻止狂犬病的发生,说明狂犬病病毒街毒株的致病性取决于病毒在 CNS 中传递却不引起保护性免疫应答的能力。Kaplan 及 Hooper 等以不同病毒毒株感染小鼠后发现,病毒的免疫原性与其糖蛋白的表达成正相关,因此病毒自身结构蛋白表达量可显著影响抗病毒免疫应答的诱导。Morimoto 等分别以表达低水平糖蛋白的高致病性病毒株 CVS-N2c 及表达高水平糖蛋白的低致病性病毒株 CVS-B2c 感染正常小鼠,结果发现, CVS-N2c 感染过程中由于糖蛋白表达水平低,诱导神经元凋亡能力也降低,免疫原性弱,因此高致病性狂犬病病毒株感染过程中 T 细胞功能及中和抗体水平均降低。与高致病性狂犬病病毒相比,低致病性病毒感染小鼠后可在脑内诱导高水平的 MHC-2 分子表达。此外,狂犬病病毒感染可下调细胞介导的免疫功能。Camelo 等以 TNF- α p55 受体基因缺失小鼠为模型研究发现,与正常小鼠相比, TNF- α p55 受体基因缺失小鼠感染高神经嗜性的狂犬病病毒 CVS11 后出现低水平的免疫抑制,因此 TNF- α p55 受体依赖通路可能参与此机制^[15]。

病毒入侵机体后,会诱导机体产生一系列的免疫应答过程,包括先天性免疫和获得性免疫反应。

狂犬病暴露后不一定能发病,可能因为病毒没有成功引起感染,或虽引起感染但却被机体产生的免疫反应控制在早期阶段。Fu 等以小鼠为模型研究发现,狂犬病病毒致弱毒株可激活机体的先天性免疫应答,尤其是 IFN- α/β 信号通路^[16]。狂犬病病毒致弱毒株感染后,若干 IFN 介导的信号通路和细胞转录活化过程中所参与的基因均发生上调,主要包括干扰素信号通路基因(Stat 1、2、3 和 Jak-2)和干扰素调节因子(IRF-1、2、7)。除 IFN- α/β 通路外,狂犬病病毒致弱毒株可同时刺激其它先天性免疫分子的表达,如细胞因子、趋化因子、TLRs 及补体成分等。先天性免疫分子表达的增多,可进一步引起中枢神经系统炎症反应及炎性细胞浸润。Zhao 等以反向遗传技术构建了表达 MIP-1 α 、RANTES 及 IP-10 等先天性免疫分子的重组狂犬病病毒,以小鼠为动物模型研究发现,表达 MIP-1 α 的重组病毒通过诱导短暂的先天性免疫应答而进一步降低病毒的致病性。然而表达 RANTES 及 IP-10 的重组病毒因持续诱导高水平的趋化因子表达,中枢神经系统炎性细胞浸润及血脑屏障通透性的变化而增强了病毒致病性。此外,先天性免疫分子的表达还可通过聚集、激活树突状细胞及 B 淋巴细胞增强病毒的适应性免疫应答。Wen 等将构建的表达 MIP-1 α 及树突状细胞刺激分子的重组病毒通过肌肉注射免疫小鼠,与母本病毒相比,重组病毒可诱导机体产生更高水平的狂犬病病毒中和抗体,并保护更多的小鼠免受强毒攻击。Wang 等以小鼠为动物模型,研究表达粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的重组病毒在狂犬病暴露后治疗中的作用。结果发现:即使在暴露后第 5 天,重组病毒仍然具有良好的暴露后治疗作用,此新型疫苗不仅可用于狂犬病的暴露前及暴露后预防,还可能用于狂犬病的临床治疗。其保护机制可能为:重组病毒在中枢神经系统中诱导的先天性免疫分子表达及炎性细胞浸润不仅可清除病毒感染细胞,将感染控制在早期阶段,还可增强血脑屏障通透性,进而使外周产生的抗体分子或 B 淋巴细胞得以进入中枢神经系统而进一步清除病毒感染细胞。Hooper 等以 RABV 致弱毒株感染小鼠后发现,可从 CNS 清除病毒的正常小鼠 CNS 内存在 B 淋巴细胞(CD19)和 λ 轻链 mRNAs,并可检测到狂犬病病毒中和抗体,从 CNS 分离的 B

细胞经体外培养后也能产生 RABV 特异性抗体。因此,CNS 中的特异性抗体可能是由渗入的 B 淋巴细胞产生,而不是外周循环抗体渗入。

病毒感染或自身免疫诱导产生的 CNS 炎症反应中,血脑屏障完整性的丧失通常可引起严重的神经症状。Hooper 等发现狂犬病病毒致弱毒株 CVS-F3 在小鼠脑内的清除是个例外,病毒清除过程中伴随血脑屏障通透性的增加及 CNS 炎症反应,而没有出现神经病理学变化。通常认为 TNF- α 与血脑屏障通透性的增加密切相关,Phares 等以 TNF- α (TNF $^{-/-}$)、B 细胞(J_HD $^{-/-}$)、T 细胞及 B 细胞(RAG-2 $^{-/-}$)基因缺失小鼠为模型研究发现:狂犬病病毒感染中 CNS 内 TNF- α 的表达与血脑屏障通透性的变化无关,CD4 $^{+}$ T 细胞而不是 CD8 $^{+}$ T 细胞或 B 细胞为增强血脑屏障通透性所必需。Roy 等分别以实验室致弱毒株和街毒株感染小鼠后发现,街毒株也在外周刺激机体产生高水平的免疫应答,而 CNS 内浸润的免疫炎性细胞却很少。因此,街毒株感染的高致死率与不能增强血脑屏障的通透性及不能输送病毒特异性免疫效应因子进入 CNS 有关^[17]。PLSJL 小鼠具有较低的下丘脑-垂体-肾上腺轴活性,却可介导高水平的 CNS 炎症反应。Roy 等以狂犬病病毒 SHBRV 株分别感染 PLSJL 及 129/SvEv 小鼠,50% 的 PLSJL 小鼠可抵御 SHBRV 感染,而所有的 129/SvEv 小鼠均死于狂犬病感染。进一步研究发现,两类小鼠对狂犬病病毒感染的敏感性差异主要取决于 PLSJL 小鼠可增强血脑屏障通透性^[18]。因此,设法使外周产生的免疫效应因子通过血脑屏障进入 CNS 是感染狂犬病病毒后机体存活或治疗所必需的。

细胞免疫和体液免疫是分别由 T、B 淋巴细胞介导的免疫反应。以淋巴细胞基因缺失小鼠为模型研究其对狂犬病病毒的敏感性发现,CD8 $^{+}$ T 细胞基因敲除小鼠对病毒不敏感,而 T、B 细胞缺失小鼠或 B 细胞缺失小鼠对病毒的敏感性增加。此外,B 细胞缺失但有功能性 CD4 $^{+}$ T 细胞和 CD8 $^{+}$ T 细胞的 JHD 小鼠,在感染狂犬病病毒致弱毒株后,尽管不能完全清除 CNS 中的病毒,但其存活时间明显延长。因此,T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞在控制 RABV 感染中均具有重要作用。

3.2.4.2 致病性免疫应答

大多数病毒感染的清除主要依赖于 CD8⁺ T 淋巴细胞介导的感染细胞的破坏, RABV 主要感染神经元细胞, 因此必然引起病理学变化, 对于麻痹型狂犬病尤其如此。麻痹型狂犬病动物神经损伤及麻痹主要依赖于 CNS 炎症反应相关的免疫应答。Weiland 等通过基因敲除小鼠研究发现, 麻痹型狂犬病小鼠的病理变化主要取决于 CD8⁺ T 淋巴细胞的表达情况。与脑炎型狂犬病不同, 麻痹型狂犬病小鼠体内通常可检测到高水平的狂犬病中和抗体, 且有时感染可被清除, 表明可清除感染的免疫机制与引起损伤的免疫机制密切相关。Hooper 发现 CNS 炎症反应对于 RABV 从 CNS 的清除至关重要, 而抗病毒反应的炎性组分通常也可引起病理损伤, 这主要包括单核细胞系产生的自由基和细胞毒性 T 细胞。因此, 如果抗病毒免疫应答产生的不恰当(如病毒中和抗体水平低或 CD8⁺ T 淋巴细胞介导高水平的细胞免疫反应)或在感染广泛传播后才产生, 免疫反应介导的 CNS 损伤将会十分严重, 此时是免疫反应而不是病毒本身引起机体死亡。狂犬病病毒感染途径可显著影响由病毒引起的免疫损伤, 外周途径感染小鼠通常引起外周神经元的损伤并引起麻痹型狂犬病, 而同一病毒经过脑内途径感染时却引起脑炎型狂犬病。Iwasaki 等发现只有免疫正常小鼠才出现麻痹型狂犬病, 进一步证明麻痹型狂犬病是由免疫反应介导。此外, Galelli 证明麻痹小鼠 CNS 内存在更多的免疫反应介导的感染神经元及旁细胞的凋亡^[19]。

免疫不完全的动物通常比未免疫动物死的更快的“早死现象”同样支持了免疫应答可增加致病性的观点。Prabhakar 及 Smith 等研究发现 RABV 感染后免疫缺陷小鼠比正常小鼠存活时间长, 表明免疫应答可加速 RABV 感染动物死亡。感染 RABV 的免疫缺陷小鼠注射免疫血清或过继免疫狂犬病康复动物淋巴细胞后, 同样可加速其发病与死亡, 说明抗病毒免疫血清同样可增强病毒致病性。狂犬病病毒入侵、复制及在 CNS 传播与激活抗病毒免疫应答所需时间之间的短暂平衡共同决定了免疫介导的 CNS 组织损伤。因此不难理解 RABV 感染的人或动物存活后留有严重的神经系统后遗症, 这主要是由病毒从 CNS 的清除所致。

Prośniak 研究发现 RABV 感染小鼠脑内一些利

于病毒复制的生长因子及细胞功能均上调, 可能是免疫效应因子诱导了这些分子的表达。此外, 不同的 RABV 均可在体外多种细胞内增殖^[20]。这些数据均表明, 先天性或适应性免疫应答可能直接或间接提高病毒的复制与传播。Roy 发现免疫细胞也可感染 RABV, 因此这些细胞可能将病毒从低神经支配区域传递至高神经支配区域, 进而加速病毒进入 CNS, 这或许能解释近年来发生的 RABV 可通过器官移植进行传播。

尽管保护性免疫应答对清除狂犬病病毒感染有重要作用, 及时并适当的免疫应答可阻止致死性结果, 但免疫应答通常也会增强病毒的致病性, 功能性的免疫病理通常与病毒的清除密切相关。在感染到达 CNS 的重要区域时, 保护性免疫应答可加速动物的死亡。因此, 感染途径、RABV 传播至 CNS 的能力、在不引发保护性免疫反应情况下病毒进行复制的特性、免疫应答产生的时间、免疫反应的本质共同决定了暴露后的结果。

狂犬病是一种烈性的接触性传染病, 是危害人类和家畜的主要疾病之一。实验动物模型特别是啮齿动物模型的建立, 已在狂犬病的致病机制及治疗措施中得到了广泛应用, 对预防、控制和治疗狂犬病的发生有重大意义, 但啮齿类动物实验模型对研究自然感染还存在极大的局限性。此外还有一个问题值得关注, 研究使用的病毒粒子数比唾液中传播的病毒粒子数要多, 但这是保证成功建立病毒感染模型所需。以后的工作旨在建立更完善的模型用于更好的再现自然感染现象, 更好的应用于对狂犬病的研究。

4 人兽共患病研究中的新动物模型研究

4.1 野生动物的实验动物化研究

我国拥有丰富的野生动物资源优势, 有针对性的加强和加快野生动物的开发和实验动物化, 对提升实验动物资源的丰富程度, 推动我国实验动物科学的发展, 为生命科学研究提供有力的支撑条件起着重要的作用。

4.1.1 树鼩

树鼩属于哺乳纲攀鼩目, 我国从 20 世纪 70 年代开始树鼩的人工驯养繁殖, 目前仅昆明地区就有近十个单位从事树鼩的驯化繁殖和销售。树鼩曾

用于甲型肝炎病毒、轮状病毒、单纯疱疹病毒、登革病毒的研究。新近的研究表明树鼯可作为研究乙型、丙型和丁型肝炎的实验动物,而且还有望作为艾滋病病毒研究的实验动物。

4.1.2 东方田鼠

东方田鼠可作为血吸虫抗病模型,该动物对血吸虫感染具先天抗性。日本血吸虫尾蚴感染东方田鼠后,尽管虫体在感染后 11 d 内能正常发育,但从第 12 天开始,虫体生长发育停滞,第 20~28 天虫体在体内全部消亡。研究人员将东方田鼠体内对日本血吸虫童虫有明显杀灭作用的基因和蛋白质转入小鼠体内,可提高小鼠抗日本血吸虫的能力。采用东方田鼠感染血清筛选到数个新的血吸虫抗原基因,提出了新的疫苗候选分子。

4.1.3 布氏田鼠

1994 年,布氏田鼠作为实验用动物被引入实验室。鼠疫杆菌经布氏田鼠适应后对人的致病力减弱,可用于研究宿主感染相关机制。SARS-CoV 可以有效感染布氏田鼠,成年布氏田鼠比幼年动物对 SARS-CoV 更敏感。布氏田鼠有望成为一种比较理想的小型 SARS 动物模型。

4.1.4 旱獭

旱獭属于啮齿目松鼠科,是一种公认的研究人类乙型肝炎(HBV)动物模型,可用于感染和致病机制研究。患有慢性拨鼠肝炎的旱獭是人类 HBV 慢性感染的抗病毒治疗的临床前评估最有价值的动物模型。

4.2 生物技术在新型实验动物研究中的应用

随着生物学技术迅猛发展,特别是基因敲除技术和转基因技术在实验动物模型研究中的广泛应用,从而使实验动物品种、品系及具有特定特征的模型动物种类数量快速增长。通过对这些模型的研究,可为发病机制与药物靶点筛选提供新的思路。

基因敲除又称基因打靶,通过外源 DNA 与染色体 DNA 之间的同源重组,精细地定点修饰和改造基因 DNA 片段。研究人员已应用该技术成功构建了心血管疾病、神经退化性疾病、糖尿病、癌症等小鼠模型。2002 年,赖良学等用核移植的方法获得了敲除了 α -1,3-半乳糖苷酶基因的克隆猪,是第一个将该技术应用于大型哺乳动物的成功工作。

转基因技术是指将具有特殊性状的外源基因

转入动物整合表达,使定向改变动物性状成为可能。转基因技术在动物基因表达调控、癌症动物模型、基因治疗与肿瘤学等诸多领域中发挥着巨大的作用。将小儿麻痹病毒的细胞性受体基因(human PVR gene)显微注射至 C57BL/10 小鼠的早期胚胎中,制作转基因小鼠并育成品系。这种小鼠表达人源的受体,有小儿麻痹病毒的感受性。而且感染了这种病毒的小鼠表现出和人一样的临床症状,对病毒株的特异性也表现出与人相同的性质。因此,这种小鼠除了是人的疾病模型之外,同时还可能替代猴子进行小儿麻痹病毒的效果、特异性等的检定,具有广泛的用途。此外在传染病研究中,抗病转基因动物也成为了研究热点。

5 人兽共患病与实验动物的健康

感染实验动物的人兽共患病会造成实验动物的死亡和质量下降,导致实验失败,而且还会危害人类和其它动物的健康。对实验动物危害严重的人兽共患病包括流行性出血热、狂犬病、流感、沙门氏菌、布氏杆菌、弓形体、钩端螺旋体病等。还有一些动物传染病会严重威胁到实验动物的健康如:鼠痘、犬瘟热、猫瘟热、犬出血性肠炎和兔瘟等。

5.1 流行性出血热

流行性出血热(EHF)又称肾综合征出血热(HFRS)是由汉坦病毒引起传播的一类人兽共患传染病,黑线姬鼠、田鼠和小家鼠是主要的储存宿主和传染源。人、大鼠、小鼠、豚鼠和兔均易感,因此该病对人和实验动物健康均构成威胁。目前我国大陆的 31 个省、市、自治区均有病例发生,台湾也有病例报告。年发病数最高曾超过 11 万,近十年来发病人数一直在 2~5 万左右。国内多次发生因实验动物携带病原而导致人的感染。如 2001 年 6 月,在北京,因使用不合格实验动物和实验不规范致使流行性出血热感染研究人员,导致 700 多师生紧急预防接种;2002 年 11 月湖北省药检学校的一名学生接触了带出血热病毒的实验动物而感染死亡;2006 年,东北三省由于个体户繁养和长途贩运不合格实验动物致使几十名教学科研人员感染。

5.2 布鲁氏菌病

布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌引起的一种人兽共患传染病,该病广泛分布于世界各地,

据报道有 170 多个国家和地区有布病疫情,其中人布病发病率超过 1/10 万的国家有 19 个,每年新发病人超过 50 万人。55 个国家的绵羊、山羊有布病流行,33 个国家的猪有布病存在。每年造成的经济损失高达数百亿美元。近十几年来,该病发病率在世界范围内呈上升趋势。该病对以羊为实验动物的研究人员威胁严重。2010 年 12 月 19 日,东北农业大学因未按规定使用羊进行动物实验导致 28 名师生感染。犬科动物也有感染布鲁氏菌的报道,应引起相关人员的重视。

5.3 弓形虫病

弓形虫病是一种重要的动物源性人兽共患寄生虫病,弓形虫和其它顶复亚门原虫不同,生活史复杂,宿主类型多,组织寄生性广泛,病程长而隐匿。估计全世界至少有三分之一的人感染弓形虫,1985 年的调查发现美国感染率为 84%、法国为 90%,我国 1986 年调查发现抗体阳性率为 5.169%。弓形虫的终末宿主为猫和猫科动物,中间宿主为人、小鼠、家鼠,其它哺乳类,鸟类和爬行类等。

5.4 鼠痘

鼠痘病毒,又名脱脚病,是实验小鼠最严重的病毒之一,传播快,死亡率高。小鼠,特别是 A 系、C3H、DBA/2、BALB/C、CBA 等品系小鼠。国内普通实验鼠抗体阳性率为 30%~70%。

5.5 犬瘟热

犬瘟热是对犬科动物危害最大的一种病毒性传染病,猫科动物及大熊猫等动物均可感染。临床上主要表现为发热、脓性鼻炎、肺炎、肠炎和结膜炎,有时出现神经症状。该病传染性强,发病率可达 100%,病死率达 80%。该病对犬科实验动物威胁较大,更重要的是还发现该病可跨种传播感染猕猴。2006 年至 2009 年期间,我国广西、湖北、云南等地养猴场、动物园和灵长类实验动物中心爆发多起无明显季节性、群体性恒河猴、食蟹猴类似麻疹的感染,其临床症状为高烧、典型上呼吸道感染及卡他症状、咽喉红肿、舌头乳头点状出血、皮疹、腹泻及严重肺炎,其中幼龄恒河猴易感,发病率约 60%,死亡率高达 30%,成年恒河猴发病率约 25%,死亡率约 5%。疫情使得猴场经济损失严重,动物实验中心有关猴的动物实验不能进行。我们通过

病原分离,序列测定 (GenBank: FJ405224 和 FJ405225) 和犬与雪貂的人工感染实验证实此次大规模猴群发病为麻疹病毒属的犬瘟热病毒强毒株。

6 结论与展望

实验动物是人兽共患传染病研究的重要支撑平台。有人统计生物医学的科研课题有百分之六十以上需要用实验动物,甚至有许多课题的研究离开了实验动物就寸步难行。我国也已成立了专门的研究中心与管理体制。今后还要进一步制定并执行相关管理法规,保证实验动物质量,符合国际统一的标准和规定。同时,在人兽共患传染病研究中更广泛的应用实验动物,为保障人类健康服务。

参考文献:

- [1] Schulman, J., Experimental transmission of influenza virus infection in mice [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1967. 125(3): p. 467.
- [2] Gao, Y., Y. Zhang, K. Shinya, et al., Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host [J]. *PLoS Pathog*, 2009. 5(12): p. e1000709.
- [3] Jackson, S., N. Van Hoeven, L. M. Chen, et al., Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: a public health risk assessment [J]. *J Virol*, 2009. 83(16): p. 8131-8140.
- [4] Octaviani, C. P., M. Ozawa, S. Yamada, et al., High genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses [J]. *J Virol*, 2010.
- [5] Hou, X. Q., Y. W. Gao, S. T. Yang, et al., Role of macrophage migration inhibitory factor in influenza H5N1 virus pneumonia [J]. *Acta Virol*, 2009. 53(4): p. 225-231.
- [6] Smith, J. H., T. Nagy, E. Driskell, et al., Comparative Pathology in Ferrets Infected with H1N1 Influenza A Viruses Isolated from Different Hosts [J]. *J Virol*, 2011. 85(15): p. 7572-7581.
- [7] Fan, S., Y. Gao, K. Shinya, et al., Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates [J]. *PLoS Pathog*, 2009. 5(5): p. e1000409.
- [8] Baskin, C. R., H. Bielefeldt-Ohmann, T. M. Tumpey, et al., Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(9): p. 3455-3460.
- [9] Zhang, T., C. Y. Wang, W. Zhang, et al., Generation and characterization of a fusion protein of single-chain fragment variable antibody against hemagglutinin antigen of avian influenza

- virus and truncated protamine [J]. *Vaccine*, 2010. 28(23): p. 3949 – 3955.
- [10] Zhang, T., P. S. Zhao, W. Zhang, et al., Antisense oligonucleotide inhibits avian influenza virus H5N1 replication by single chain antibody delivery system [J]. *Vaccine*, 2011. 29(8): p. 1558 – 1564.
- [11] Murphy, F. A. and S. P. Bauer, Early street rabies virus infection in striated muscle and later progression to the central nervous system [J]. *Intervirology*, 1974. 3(4): p. 256 – 268.
- [12] Tuffereau, C., K. Schmidt, C. Langevin, et al., The rabies virus glycoprotein receptor p75NTR is not essential for rabies virus infection [J]. *J Virol*, 2007. 81(24): p. 13622 – 13630.
- [13] Hotta, K., Y. Motoi, A. Okutani, et al., Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection [J]. *Microbes Infect*, 2007. 9(2): p. 167 – 174.
- [14] Wen, Y., H. Wang, H. Wu, et al., Rabies virus expressing dendritic cell-activating molecules enhances the innate and adaptive immune response to vaccination [J]. *J Virol*, 2011. 85(4): p. 1634 – 1644.
- [15] Camelo, S., M. Lafage, A. Galelli, et al., Selective role for the p55 Kd TNF-alpha receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2001. 113(1): p. 95 – 108.
- [16] Wang, Z. W., L. Sarmiento, Y. Wang, et al., Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system [J]. *J Virol*, 2005. 79(19): p. 12554 – 12565.
- [17] Phares, T. W., M. J. Fabis, C. M. Brimer, et al., A peroxynitrite-dependent pathway is responsible for blood-brain barrier permeability changes during a central nervous system inflammatory response: TNF-alpha is neither necessary nor sufficient [J]. *J Immunol*, 2007. 178(11): p. 7334 – 7343.
- [18] Phares, T. W., R. B. Kean, T. Mikheeva, et al., Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system [J]. *J Immunol*, 2006. 176(12): p. 7666 – 7675.
- [19] Galelli, A., L. Baloul, and M. Lafon, Abortive rabies virus central nervous infection is controlled by T lymphocyte local recruitment and induction of apoptosis [J]. *J Neurovirol*, 2000. 6(5): p. 359 – 372.
- [20] Prośniak, M., D. C. Hooper, B. Dietzschold, et al., Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(5): p. 2758 – 2763.

(修回日期)2011-09-14

(下接第 19 页)

- [2] Kate EJ, Nikkita GP, Marc AL, et al. Global Trends in emerging infectious diseases [J]. *Nature* 2008, 451: 990 – 994.
- [3] 张京. 加强生物安全意识 保证实验动物检测质量 [J]. *中国比较医学杂志* 2007, 17(8): S46 – S48.
- [4] 陶元清, 王忠东, 范薇, 等. 关注全球生物安全 加快实验动物标准化进程 [J]. *青海医药杂志* 2001, 31(12): 56 – 59.
- [5] 彭红, 李全录, 高翀. 农业系统实验动物使用中的生物安全控制 [J]. *实验动物科学与管理* 2005, 22(1): 33 – 34.
- [6] 卢胜明, 赵德明. 中国实验动物产业化发展现状及方向研究 [J]. *实验动物科学* 2008, 25(4): 33 – 44.
- [7] 尹松林. 实验外科中动物的生物安全、保护和福利伦理 [J]. *中华实验外科杂志* 2006, 23(7): 773 – 775.
- [8] The IACUC. Animal transport and biosecurity policy [M]. The university of north Carolina at Chapel Hill.
- [9] Handbook for investigators using laboratory animals [M]. Colorado state university, 2005.
- [10] Laboratory biosafety manual (Third edition) [M]. World health organization 2004.

(修回日期)2011-09-07