

• 论著 •

老龄大鼠脑缺血-再灌注微血管基底膜损伤变化及与纤溶酶原激活系的关系

刘轲 李建生 王明航 刘敬霞 赵跃武 刘振国

【摘要】目的 研究老龄大鼠脑缺血-再灌注(I/R)不同时期微血管基底膜损伤与纤溶酶原激活系的关系。**方法** 采用大脑中动脉阻塞(MCAO)线栓法制备大鼠局灶性脑 I/R 模型,将大鼠分为青年假手术组、老龄假手术组、青年模型组和老龄模型组,其中模型组又分为 I 3 h, I/R 6、12、24、72 和 144 h 各时间点组。采用免疫组化、酶谱与反向酶谱分析等方法测定各脑微血管结构、基底膜 IV 型胶原、层连蛋白(LN)和纤溶酶原激活系的变化。**结果** 与青年假手术组比较,老龄假手术组 IV 型胶原、LN 表达增强。随着 I/R 时间的延长,老龄与青年大鼠基底膜成分 IV 型胶原和 LN 表达递减;组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)表达水平呈先增强后降低的趋势。与青年模型组相同时间点比较,老龄模型组 IV 型胶原(I 3 h, I/R 6 h, I/R 12 h)、LN(I 3 h, I/R 6 h~24 h)、t-PA(I/R 6 h~24 h)、u-PA(I/R 12 h~144 h)表达增强,PAI-1(I/R 12 h, I/R 24 h)表达降低,差异均有显著性。另外,PAI-1 的反向酶谱分析比较,量的变化与免疫表达规律基本一致。**结论** 随着增龄,大鼠脑微血管基底膜成分 IV 型胶原、LN 增加。在脑 I/R 微血管基底膜损伤方面,老龄大鼠较青年严重,其损伤的特点与纤溶酶原激活系变化有关。

【关键词】 老龄; 大鼠; 缺血-再灌注,脑; 微血管基底膜; 细胞外基质; 纤溶酶原激活系

Relationship of changes in basement membrane of microvessels after cerebral ischemia/reperfusion and plasminogen activator system in aged rats LIU Ke, LI Jian-sheng, WANG Ming-hang, LIU Jing-xia, ZHAO Yue-wu, LIU Zhen-guo. Department of Geriatrics, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan, China

【Abstract】Objective To study the relationship of changes in basement membrane of cerebral microvessels and plasminogen activator system after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in aged rats. **Methods** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was produced by the introduction of a thread. Rats were divided randomly into sham-operation group with young rats (cerebral ischemia 3 hours and I/R 6, 12, 24, 72, 144 hours groups), sham-operation group and I/R groups in aged rats (cerebral ischemia 3 hours and I/R 6, 12, 24, 72, 144 hours groups). Immunohistochemical technique, zymogram analysis, and reverse zymogram analysis were used to study changes in basement membrane structure of cerebral-cortex microvessel, type IV collagen (Col IV) and laminine (LN) contents, and plasminogen activator system in every group. **Results** With the increase of age, Col IV and LN contents of the microvessel basement membrane increased. With prolongation of I/R, the contents of Col IV and LN decreased in both young and aged rats, while the contents of tissue plasminogen activator (t-PA), urokinase plasminogen (u-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) expression increased at the beginning and decreased subsequently. Compared with young groups, Col IV (ischemia 3 hours - I/R 12 hours), LN (ischemia 3 hours - I/R 24 hours), t-PA (I/R 6 - 24 hours) and u-PA (I/R 12 - 144 hours) expression levels were higher in aged rats, but PAI-1 (I/R 12 and 24 hours) expression was lower. In addition, changes in PAI-1 contents as determined with reverse zymogram analysis method coincided with its immunoexpression. **Conclusion** With the increase of age, alterations in constituents of cerebro-microvessel basement membrane (Col IV and LN) increased. Injury to cerebro-microvessel basement membrane resulted in more serious changes in aged rats compared with the young rats. Changes in cerebro-microvessel basement membrane after I/R injury in the aged SD rats is related to change in plasminogen activator system.

【Key words】 aged; rats; cerebral ischemia/reperfusion; microvessel basement membrane; extracellular matrix; plasminogen activator system

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371812);河南省高校创新人才基金项目(2000-10)

作者单位:450003 郑州,河南中医学院老年医学研究所

作者简介:刘轲(1966-),男(汉族),河南省南阳市人,博士,主治医师,研究方向为中医药治疗缺血性脑血管疾病,主持国家中医药管理局科研项目 1 项,参加国家级、省部级和厅局级科研项目 6 项,获省级科技进步二等奖 2 项,局级科技进步一等奖 1 项,申请发明专利 1 项,主编著作 1 部,参编著作 1 部,发表论文 20 余篇。

脑缺血-再灌注(I/R)引起的继发性脑水肿加重及出血等损伤与再灌注脑微血管结构尤其是基底膜的降解有关。基底膜的降解与纤溶酶原激活物(PA)及其抑制剂(PAI)的变化有关^[1,2]。目前,有关脑 I/R 时微血管基底膜损害的机制研究较少,尤其动态观察老龄动物脑 I/R 的研究尚未见报道。本实验拟采用大脑中动脉阻塞(MCAO)线栓法制备大鼠局灶性脑 I/R 模型,动态研究老龄大鼠脑 I/R 不同时期脑微血管基底膜损害与纤溶酶原激活系变化的关系,进一步探讨脑 I/R 的损伤机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:5~6 月龄 SD 雄性青年大鼠 56 只,体重 250~350 g(动物合格证号 99011);20~21 月龄 SD 雄性老龄大鼠 56 只,体重 450~600 g(动物合格证号 410117),均由郑州大学医学院实验动物中心提供。IV 型胶原(Col IV)抗体(兔抗鼠)和层连蛋白(LN)抗体(兔抗鼠)均购自武汉 Boster 生物工程有限公司。组织型 PA(t-PA)抗体、尿激酶型 PA(u-PA)抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)由上海化学试剂采购供应站提供。PM-10AD 光学显微镜(Olympus Optical Co. Ltd, 日本),DSC-F717-2002 Sony Corporation 数码相机(日本),LEICARM2145 自动切片机(德国)。

1.2 局灶性脑 I/R 模型制备:采用 Longa 等^[3,4]介绍的改良 MCAO 法制备大鼠局灶性 I/R 动物模型。术后大鼠单笼饲养,待其清醒后观察行为和症状。线栓 3 h 后分两次缓慢将插线拔出颅外并进行再灌注,按再灌注后不同时间取材。

1.3 分组与处理:青年大鼠按体重结合随机数字表法分为青年假手术组、青年模型组[根据缺血及再灌注时间不同分为脑缺血(I)3 h, I/R 6、12、24、72 和 144 h 组];老龄大鼠按体重结合随机数字表法分为老龄假手术组、老龄模型组(分组同青年模型组)。以上各组均为 8 只大鼠。

1.4 取材与标本处理:在规定时间内断头处死大鼠后,于冰盘上迅速分离全脑,驱除嗅球、小脑及脑干,于视交叉前 2.0 mm 处向后冠状切取 4 片脑组织。其中:第 1 脑片用于测定含水量;第 2、3 脑片用于测定梗死面积;第 4 脑片用冰生理盐水冲洗 3 次,除去积血并吸干水分,用体积分数为 4%的多聚甲醛固定,待行常规病理及免疫组化检查。电镜标本选取额极后 4 mm、中线旁开 4 mm 处的左侧脑皮质组织块 1 mm³,用体积分数为 2.5%的戊二醛固定,磷酸盐

缓冲液(PBS, pH 7.2)冲洗 3 次,每次 10 min;体积分数为 1%的锇酸固定 2 h,蒸馏水冲洗 3 次,每次 10 min;梯度乙醇脱水,环氧四烷置换,纯树脂浸透,包埋,制成超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅(铅-铀)染色,用 HITACHI-7500 透射电子显微镜观察。

1.5 测定指标

1.5.1 Col IV、LN 免疫组化观察及 t-PA、u-PA、PAI-1 表达水平:采用免疫组化链菌素亲生物蛋白-过氧化物酶免疫组化法(SP 法)和彩色病理图文分析系统 HPAIAS-1000(同济医科大学千屏影像工程公司)。在显微镜下($\times 200$)选取 MCAO 侧大脑皮质病灶区 6 个视野,观察阳性反应灰度级(gray, Ca)和比较反应面积像素数以及测试区域的灰度级和背景面积像素数。测试仪器的最大灰度分级为 cmax256。应用申洪推导的免疫组化原位杂交定量计算公式计算阳性单位(PU)值^[5]。

1.5.2 PAI-1 的反向酶谱分析:将液氮中保存的脑组织标本取出,于冰浴中快速提取蛋白;反向十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)酶谱分析法^[6],提取的蛋白样品同稀释缓冲液(含 0.4 mol/L Tris pH6.8,质量分数为 5%的 SDS,体积分数为 20%的甘油和 0.03%的溴酚蓝)稀释。加样于质量分数为 5%的浓缩胶和 10%的分离胶,110 V 下电泳 4 h。将胶置于体积分数为 2.5%的 TritonX-100,振荡 30 min $\times 2$ 次。胶被含 40 mg/L 纤溶酶原、250 U/L 尿激酶及质量分数为 1.25%的琼脂和 2%的脱脂奶粉覆盖,然后置入 pH 8.1 的 0.1 mol/L Tris,4 $^{\circ}$ C 下过夜,然后在 37 $^{\circ}$ C 下温育 3~6 h,未被消化的酪蛋白在黑色背景下,至 50 ku 处带区未染色胶上显出一浅灰色带。用英国产 UVP Gelworks ID Intermedltes Version 3.01 测定吸光度(A 值)。计算同酶谱法^[6],得出酶单位(U)。

1.5.3 脑组织微血管病理观察:组织切块经固定、脱水、浸透、包埋,制成超薄切片,经铅-铀染色,用 HITACHI-7500 透射电子显微镜观察、摄片。

1.6 统计学方法:计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 For Windows 软件进行统计处理,计量资料(两组均数比较)先进行正态分布检验,符合正态分布者采用单因素方差分析,不符合正态分布者进行数据转化使其符合正态分布或者采用非参数检验。显著性标准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 一般情况:所有实验大鼠于手术中呼吸频率、血压维持在正常生理范围内,手术口无明显活动性

出血,青年模型组在 I/R 6、12 和 24 h 各死亡 1 只, 72 和 144 h 各死亡 2 只,成功率为 87.5%。老龄模型组在 I/R 6 和 12 h 各死亡 1 只,24、72 和 144 h 各死亡 2 只,成功率为 85.7%。老龄大鼠的死亡率高于青年大鼠。

2.2 各组大鼠 Col IV 和 LN 表达水平比较见表 1。

表 1 各组 Col IV 和 LN 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of Col IV and LN expression among each group($\bar{x} \pm s$) PU

组别	动物数(只)	Col IV	LN
青年假手术组	8	23.04±2.19	20.16±2.09
青年模型组 13 h	8	22.71±2.07	19.70±1.92
I/R 6 h	7	20.61±2.54	18.07±1.32
I/R 12 h	7	18.03±1.71 ^{##} ☆☆	15.93±1.73 ^{##} ☆☆
I/R 24 h	7	14.85±3.32 ^{##} ☆☆	11.88±1.72 ^{##} ☆☆
I/R 72 h	6	10.75±2.47 ^{##} ☆☆	8.28±1.60 ^{##} ☆☆
I/R 144 h	6	8.31±1.55 ^{##} ☆☆	6.90±1.32 ^{##} ☆☆
老龄假手术组	8	28.89±3.29 ^{**}	28.84±2.50 ^{**}
老龄模型组 13 h	8	27.45±2.09 ^{**}	27.18±1.22 ^{**}
I/R 6 h	7	24.16±2.39 ^{##} ☆☆	25.22±2.39 ^{##} ☆☆
I/R 12 h	7	20.96±2.30 ^{##} ☆☆	20.95±2.90 ^{##} ☆☆
I/R 24 h	6	16.66±3.52 ^{##} ☆☆	16.36±5.58 ^{##} ☆☆
I/R 72 h	6	12.40±2.88 ^{##} ☆☆	10.28±2.11 ^{##}
I/R 144 h	6	9.73±2.04 ^{##} ☆☆	7.42±1.90 ^{##} ☆☆

注:与相同年龄假手术组比较:^{##} $P < 0.01$;与本组 I 3 h 比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与青年组相同时间点比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

2.3 各组大鼠 t-PA、u-PA、PAI-1 表达水平及 PAI-1 含量反向酶谱分析比较见表 2。

2.4 各组大鼠脑皮质微血管形态学病理观察:电镜下青年假手术组大鼠脑皮质微血管结构完整,基膜及管周均无水肿;模型组随着 I/R 过程的延长,可见管周由轻度水肿、中度水肿向高度水肿转变,管壁

结构基本完整均匀,可见局部变厚或变薄。老龄假手术组大鼠脑皮质微血管结构基本正常;模型组有管周围水肿,也可以在视野里(I/R 144 h)见到红细胞(出血灶),基底膜结构基本完整,基底膜部分增厚,有折叠、扭曲,部分水肿,甚至有分层、部分模糊(I/R 24 h)、溶解、断裂和缺损。

3 讨论

微血管基底膜作为血-脑屏障的重要组成部分,是由 LN、Col IV、内肌动蛋白、纤维连接蛋白及一些糖蛋白等大分子物质组成的超分子网状结构,其中 LN、Col IV 是构成基底膜的主要物质。正常基底膜是由 Col IV 形成三维网状骨架,构成基底膜基本框架,上面连接 LN、纤维连接蛋白等。Col IV 既可以与 LN 连接,也可通过内肌动蛋白与 LN 连接,形成聚合网;LN 可通过自身结合形成网络结构,同时又通过 Nidogen 与 Col IV 网络连接,构建基底膜的主体结构。蛋白质免疫印迹法(Western blot)、免疫组化法可证实 Col IV 与 LN 的降解参与 I/R 微血管基底膜的损伤^[7-9]。

本研究资料显示,随着增龄,大鼠脑血管基底膜成分 Col IV 和 LN 含量上升,似乎与老龄大鼠微血管基底膜厚度增加成正比。老龄与青年模型组大鼠脑 I/R 损伤随再灌注时间延长而加重,脑缺血 3 h 时 Col IV 和 LN 含量变化不明显,随再灌注时间的延长,两指标逐渐下降,再灌注 24 h 基底膜成分降解变化达到峰值,再灌注 144 h 时其损伤趋势有所减缓,老龄组变化早于青年组。可能因为随着增龄,老龄大鼠脑血管基底膜成分含量上升,但由于基底膜厚度增加,成分分布不均,或弹性蛋白含量降低、

表 2 各组纤溶酶原激活系指标表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the indexes of plasminogen activator system among each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	t-PA(PU)	u-PA(PU)	PAI-1(PU)	PAI-1(U)
青年假手术组	8	5.98±1.97	6.23±1.77	6.72±1.87	0.58±0.28
青年模型组 13 h	8	10.57±2.00 ^{##}	6.71±1.34	9.85±1.98 [#]	0.84±0.23
I/R 6 h	7	13.14±1.90 ^{##} ☆☆	7.39±1.75	15.23±1.92 ^{##} ☆☆	1.37±0.26 ^{##} ☆☆
I/R 12 h	7	21.81±1.60 ^{##} ☆☆	14.94±1.86 ^{##} ☆☆	28.94±2.34 ^{##} ☆☆	1.90±0.27 ^{##} ☆☆
I/R 24 h	7	27.99±2.54 ^{##} ☆☆	23.37±1.98 ^{##} ☆☆	23.23±2.18 ^{##} ☆☆	1.66±0.15 ^{##} ☆☆
I/R 72 h	6	22.96±2.99 ^{##} ☆☆	29.37±2.29 ^{##} ☆☆	16.06±2.90 ^{##} ☆☆	1.35±0.18 ^{##} ☆☆
I/R 144 h	6	14.81±3.24 ^{##} ☆☆	16.15±1.93 ^{##} ☆☆	10.51±2.45 ^{##}	1.12±0.25 ^{##}
老龄假手术组	8	6.52±2.26	7.13±1.05	7.98±2.82	0.76±0.32
老龄模型组 13 h	8	12.01±2.07 ^{##}	7.65±1.30	10.38±1.73	1.02±0.33
I/R 6 h	7	16.78±1.75 ^{##} ☆☆	8.13±1.10	17.38±2.23 ^{##} ☆☆	1.45±0.19 ^{##} ☆☆
I/R 12 h	7	25.28±2.99 ^{##} ☆☆	17.87±1.47 ^{##} ☆☆	25.77±2.42 ^{##} ☆☆	1.61±0.24 ^{##} ☆☆
I/R 24 h	6	31.45±2.46 ^{##} ☆☆	26.98±1.20 ^{##} ☆☆	19.04±2.88 ^{##} ☆☆	1.52±0.28 ^{##} ☆☆
I/R 72 h	6	25.61±3.05 ^{##} ☆☆	32.26±2.37 ^{##} ☆☆	14.19±3.42 ^{##} ☆☆	1.26±0.27 ^{##}
I/R 144 h	6	17.41±2.75 ^{##} ☆☆	19.10±2.41 ^{##} ☆☆	9.15±2.30	1.02±0.23

注:与本组假手术组比较:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与本组 I 3 h 比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与青年组相同时间点比较:

^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

非弹性成分增多,导致脑血管脆性增加,通透性增加,较青年大鼠更易遭受 I/R 损伤,使得老龄大鼠脑微血管基底膜损伤较青年大鼠严重。大鼠脑 I/R 损伤与血-脑屏障基底膜成分 Col IV、LN 降解,脑 I/R 后伴随炎症细胞因子、黏附分子的表达,大量白细胞浸润并产生大量的明胶酶降解基底膜细胞外基质有关,当青年与老龄大鼠遭遇相同条件的 I/R 损伤时,老龄大鼠脑微血管基底膜损伤较青年大鼠严重且损伤提前,与文献〔7,9,10〕报道的结论基本一致,本实验中的病理观察也与上述结论一致。

脑内 PA 与 PAI 主要是由微血管内皮细胞、神经元和神经胶质细胞产生和分泌的。脑缺血可以促进 PA 活化的增强,可通过一系列酶促反应,使毛细血管基底膜的主要成分 Col IV、LN、纤维粘连蛋白等降解,血-脑屏障受损,微血管通透性增加,促使血管源性脑水肿〔1,2〕。Hosomi 等〔11〕研究发现,MCAO 后缺血基底节区的内源性 u-PA 活性快速增加,u-PA 和 PAI-1 的增加与微血管基底膜的降解相一致。Rosenberg 等〔12〕检测到自发性高血压大鼠 MCAO 后梗死半球脑组织 u-PA 明显增加,并有继发血管源性水肿,表明 u-PA 增加在继发血管源性水肿中起重要作用。Manuel 等〔13〕用线栓法制备 MCAO 模型,6 h 后血管通透性明显升高,其机制与 t-PA 活性升高有关。目前,对 t-PA 在脑缺血性损伤中的认识意见不一,可能与制模方法、动物种类、测定组织部位及时间点选择不同有关〔14〕。

本研究中发现,t-PA 及 u-PA 的表达有时间依赖性,表明 I/R 损伤可诱导 t-PA 和 u-PA 的表达,t-PA 和 u-PA 参与了缺血后再灌注损伤;同时表明,老龄大鼠降解细胞外基质 Col IV 和 LN 的能力较青年大鼠强,这可以部分解释 I/R 损伤老龄较青年严重的原因。而随 I/R 时间延长,老龄大鼠 PAI-1 表达呈先增强后降低的趋势,说明其抑制

PA 的能力较青年大鼠弱,这也可以部分解释老龄大鼠 I/R 损伤较青年严重且难以恢复的原因。

参考文献:

- 1 Cruz - Flores S, Thompson D W, Boiser J R. Massive cerebral edema after recanalization post - thrombolysis [J]. Neuroimaging, 2001, 11: 447 - 451.
- 2 Ahn M Y, Zhang Z G, Tsang W, et al. Endogenous plasminogen activator expression after embolic focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 1999, 837: 169 - 176.
- 3 Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84 - 91.
- 4 Bederson J B, Pitts L H, Germano S M, et al. Evaluation of 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats [J]. Stroke, 1996, 17: 1304 - 1308.
- 5 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4: 89 - 92.
- 6 David H, Reza F, Alexander W, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 and increase after arterial injury in rats [J]. Circ Res, 1997, 80: 491 - 496.
- 7 Hamann G F, Okada Y, Fitridge R, et al. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion [J]. Stroke, 1995, 26: 2120 - 2126.
- 8 Hamann G F, Liebetrau M, Martens H, et al. Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 526 - 533.
- 9 李玲, 黄如训, 张小燕, 等. 局部脑缺血再灌注病损区脑微血管基底膜及其成分改变的实验研究 [J]. 中华老年医学杂志, 2000, 19: 363 - 367.
- 10 李建生, 任小巧, 刘轲, 等. 老龄大鼠脑缺血-再灌注神经细胞凋亡变化规律研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 151 - 154.
- 11 Hosomi N, Lucero J, Heo J H, et al. Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2001, 32: 1341 - 1348.
- 12 Rosenberg G A, Navratil M, Barone F, et al. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat [J]. Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16: 360 - 616.
- 13 Manuel Y, Maria S, Elizabeth G, et al. Tissue - type plasminogen activator induces opening of the blood - brain barrier via the LDL receptor - related protein [J]. J Clin Invest, 2003, 117: 1533 - 1540.
- 14 邵延坤, 杨宏, 徐忠信. 局灶性脑缺血/再灌注后大鼠脑组织 t-PA 表达变化与细胞凋亡 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2002, 19: 261 - 263.

(收稿日期: 2005 - 06 - 17 修回日期: 2005 - 07 - 28)

(本文编辑: 李银平)

小知识: 人类禽流感的诊断依据是什么

人类禽流感的诊断原则是根据流行病学、临床症状和实验室检查等手段, 综合分析, 予以诊断。参照于恩庶主编的《新发现和再肆虐传染病诊断标准和防治指南》, 诊断依据如下:

① 流行病学史 禽流感发生在前, 即某地区某禽类(鸡、鸭、鹅等)养殖场大批禽出现禽流感样症状, 并死亡; 附近或周边地区出现禽流感流行或暴发。

② 临床表现 突然起病, 发热(大于 38℃)、咳嗽、咽痛, 可出现头痛、头晕、全身酸痛、乏力等中毒症状, 可伴有干咳、流鼻涕、流泪等呼吸道症状。少数病例有食欲减退, 伴有腹痛、腹胀、呕吐等消化道症状。

③ 实验室检查 从病人鼻咽或气管分泌物中分离到流感病毒; 患者恢复期血清中抗流感病毒抗体滴度比急性期高 4 倍以上; 在患者呼吸道上皮细胞查到流感病毒颗粒特异的蛋白成分或特异的核酸; 采集标本经敏感细胞将病毒增殖一代后, 查到流感病毒颗粒特异的蛋白或特异的核酸。

④ 病例分类 我国目前还没有统一的人类禽流感病例分类标准, 国家卫生部正在组织制定。