

## 轮状病毒肠道外感染乳鼠模型的建立

夏 群, 陈兰举, 陈名武, 周 瑞, 沈怀云, 丁周志, 徐家丽, 薛 莲, 刘 欣

**[摘要]** 目的: 建立轮状病毒 (rotavirus, RV) 肠道外感染乳鼠模型。方法: 实验动物选用 10 ~ 11 日龄的清洁级 ICR 乳鼠, 将 32 只乳鼠随机分为 2 组, 每组 16 只, 即 RV 肠道外感染组: 乳鼠经腹腔注射 150  $\mu$ l 猴 RV S111 (病毒滴度 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-4</sup>); 对照组: 乳鼠经腹腔注射 150  $\mu$ l 生理盐水。接种后每天观察乳鼠的活动状况、饮食情况、毛色、体型、大便变化等, 4 天后处死, 留取心、肝、肾、脾、肠进行病理学切片和匀浆培养。结果: 感染组在接种 RV 后第 2 天开始出现食欲不振, 体毛蓬松、无光泽, 活动减少, 呆滞、嗜睡, 对刺激反应淡漠, 大便量少, 上述症状逐渐加重, 到第 4 天症状最明显, 并有 3 只乳鼠出现腹泻, 观察中累积腹泻率和发病率分别为 18.75% 和 100.00%。光镜下肝、肾、脾、小肠有病理改变, 且肝、肾、小肠组织匀浆培养 72 h 后出现不同程度细胞病变, 余阴性。对照组乳鼠无明显变化。结论: 该方法初步建立了 RV 肠道外感染乳鼠模型。

**[关键词]** 轮状病毒; 肠道外感染; 乳鼠; 动物模型

**[中国图书资料分类法分类号]** R 373.2 **[文献标识码]** A

### Establishment of suckling mouse model of extraintestinal rotavirus infection

XIA Qun, CHEN Lan-ju, CHEN Ming-wu, ZHOU Rui, SHEN Huai-yun, DING Zhou-zhi, XU Jia-li, XUE Lian, LIU Xin

(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the suckling mouse model of extraintestinal rotavirus infection. **Methods:** Thirty-two ICR mouse aged from 10 to 11 days were randomly divided into two groups, with 16 in each. The extraintestinal infection group were inoculated by intraperitoneal injection of 150  $\mu$ l simian rotavirus S111 (the virus titer of TCID<sub>50</sub> was about 10<sup>-4</sup>) and the control group were inoculated by intraperitoneal injection of 150  $\mu$ l normal saline. After inoculation, the mouse activities, diet, somatotype, change of hair color and stool were observed. All the suckling mouse were killed 4 days later, and the heart, liver, kidney, spleen and intestines were collected for pathological section and homogenate culture. **Results:** After two days of infection, the suckling mouse in extraintestinal infection group began to lose appetite, their clothing hair was tarnished and activities were decreased; They were dull, lethargy and slow to outside stimulus; meanwhile, their stool amount was reduced; the symptoms aggravated gradually and reached the peak at the fourth day; moreover, three mouse demonstrated the symptom of diarrhea. In the whole process of observation, the cumulative diarrhea rate and inception rate were 18.75% and 100.00%, respectively. Pathological changes were observed in the liver, kidney, spleen and intestines by light-microscope. After 72 hours of homogenate culture, cytopathic effect was observed in the liver, kidney and intestines, but no obvious changes were noticed in the heart or spleen. The suckling mouse in control group presented normal condition. **Conclusions:** It is feasible to establish the suckling mouse model of extraintestinal rotavirus infection with this method.

**[Key words]** rotavirus; extraintestinal infection; suckling mouse; animal model

轮状病毒 (rotavirus, RV) 是世界范围内急性腹泻病最主要的病原体之一, 每年有数亿人感染, 死亡人数达 50 万以上<sup>[1]</sup>。RV 可导致病毒血症和侵犯全身多个器官, 成为导致 RV 腹泻死亡的重要原因之一, 已引起人们的广泛关注<sup>[2]</sup>。到目前为止, 在 RV 的肠道外感染研究工作中, 尚无成熟的动物模型可供研究之用, 国外有关 RV 肠道内感染的模型和资料很多, 但乳鼠的 RV 肠道外感染动物模型的实验资料尚未见报道。本文就 RV 肠道外感染动物模型的建立作一报道, 旨在为 RV 肠道外感染发病

机制及防治等研究奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级健康 ICR 乳鼠 32 只, 4 窝 (8 只/窝), 由扬州大学比较医学中心提供, 卫生许可证号: SCXK (苏) 2007-0001, 10 ~ 11 日龄, 体重 (7.8  $\pm$  0.5) g, 实验前其大便 RV 抗原经胶体金法检测呈阴性。

1.1.2 毒种和细胞 感染病毒为恒河猴 RV S111 株, 培养细胞为恒河猴肾传代细胞 MA104, 均由广州市儿童医院馈赠。

#### 1.2 方法

1.2.1 病毒增殖和滴度测定 MA104 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液中, 当细胞成单层

[收稿日期] 2008-12-16

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2006kj107C)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 儿科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 夏 群 (1984 -), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 陈兰举, 研究生导师, 主任医师, 教授。

后用无血清 MEM Eagle's 培养液洗 2 次。然后加入经 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  胰蛋白酶预处理的 RV S111 株, 37  $^{\circ}\text{C}$  吸附 1 h, 弃上清液, 加含 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  胰酶但无胎牛血清的 MEM Eagle's 维持液, 静置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育。待 75% 以上细胞出现病变 (Cytopathic effect, CPE) 时, 收取细胞培养物。细胞培养物经 3 次冻融, 4 000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 1 h, 弃沉淀, 取上清液分装, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

病毒感染性滴度测定用 MA104 细胞在 96 孔培养板中进行 (微量滴定法)。当细胞在培养板中长至单层时, 接种用维持液 10 倍连续稀释的病毒液, 每孔 100  $\mu\text{l}$ 。接种前病毒和细胞的处理同前述。接种病毒后的细胞放置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 72 h, 观察 CPE。取板孔中 50% 细胞出现 CPE 的病毒稀释度的倒数定为病毒感染性滴度, 表示为  $\text{TCID}_{50}^{[3]}$ 。

1.2.2 动物分组及模型建立 随机将乳鼠分成 2 组, 每组 2 窝, 16 只。RV 肠道外感染组: 用乙醚麻醉完全后, 经腹腔注射 150  $\mu\text{l}$  S111 株 RV 培养液 (病毒  $\text{TCID}_{50}$  为  $10^{-4}$ )。对照组: 同样的方法腹腔注射等量的生理盐水。病毒接种后, 各组正常母乳喂养, 隔离饲养观察。

1.2.3 观察指标 观察两组乳鼠有无 RV 肠道外感染症状及脏器病变。(1) 肉眼每天观察乳鼠的活动状况、饮食情况、毛色、体型、大便变化等。(2) 接种 RV 后 4 天, 处死乳鼠, 先剖开胸腔, 然后剖腹, 无菌条件下, 感染组和对照组随机留取一部分心脏、肝

脏、肾脏、脾脏、小肠。一分为二, 一部分组织利用 10% 甲醛固定, 待做病理切片。另一部分组织分别称重, 加入 PBS 液 (pH 7.4) 置入高速匀浆中研磨, 制成 10% 的悬液, 4 000 r/min, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 1 h, 提取上清液。将上清液中加入等体积终浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的胰蛋白酶, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵化 1 h 后接种到 MA104 细胞上增殖培养, 观察细胞病变 (方法同上)。

## 2 结果

2.1 一般表现 感染组在 RV 感染后第 2 天, 开始出现肠道外症状。主要表现为食欲不振, 体毛蓬松、无光泽, 活动减少, 呆滞, 倦缩嗜睡, 对刺激反应差, 大便量减少, 上述症状逐渐加重, 到第 4 天症状最明显, 并有 3 只小鼠出现腹泻表现, 整个观察过程累积腹泻率和发病率分别为 18.75% 和 100.00%。对照组一直保持正常情形, 体毛平顺, 表面有光泽, 食欲正常, 精神活跃, 对刺激反应灵敏。

2.2 光镜下组织形态学观察 感染组肝细胞明显肿胀, 严重空泡变性, 肝实质间淋巴细胞浸润不很明显, 叶间胆管细胞无明显肿胀 (见图 1); 肾小体和肾小管上皮轻度空泡变性, 少量肾小管上皮坏死脱落 (见图 2); 脾脏白髓增生, 部分出现生发中心增多或 T 细胞区扩大 (见图 3); 小肠上皮细胞水肿空泡变性、绒毛脱落, 黏膜下少量淋巴细胞浸润 (见图 4), 心肌未见明显改变; 对照组各器官未见明显改变。

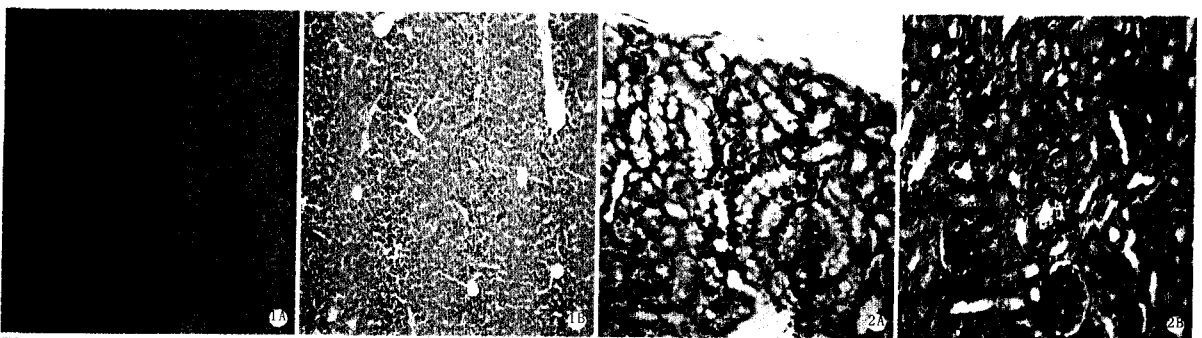


图 1 乳鼠肝脏形态学改变 (HE  $\times 200$ ) (A: RV 感染组, 全肝细胞明显空泡变性, 胞质疏松, 叶间胆管细胞无明显肿胀; B: 对照组, 基本正常) 图 2 乳鼠肾脏形态学改变 (HE  $\times 400$ ) (A: RV 感染组, 肾小体和肾小管上皮轻度空泡变性, 少量肾小管上皮坏死脱落; B: 对照组, 基本正常)

2.3 组织匀浆 RV 的培养 感染组小肠、肝脏和肾脏匀浆培养 72 h 后出现不同程度 CPE, 主要表现为细胞肿大变圆脱落, 边界不清, 部分被拉长或膨胀形成拉网状。脾脏、心脏匀浆培养未见细胞病变。

## 3 讨论

RV 是引起世界范围内婴幼儿急性腹泻最主要

的病原体之一, 每年造成大量的儿童死亡, 肠道外感染可能是导致死亡的重要原因。研究发现, RV 不仅可以感染小肠上皮细胞, 还可以感染心、肝、胆、肾、胰腺等重要脏器<sup>[4]</sup>。但是到目前为止, RV 肠道外感染的发病机制及防治措施还不很明确, 建立一个稳定而可靠的 RV 肠道外感染动物模型是进行各项临床和基础研究的前提。

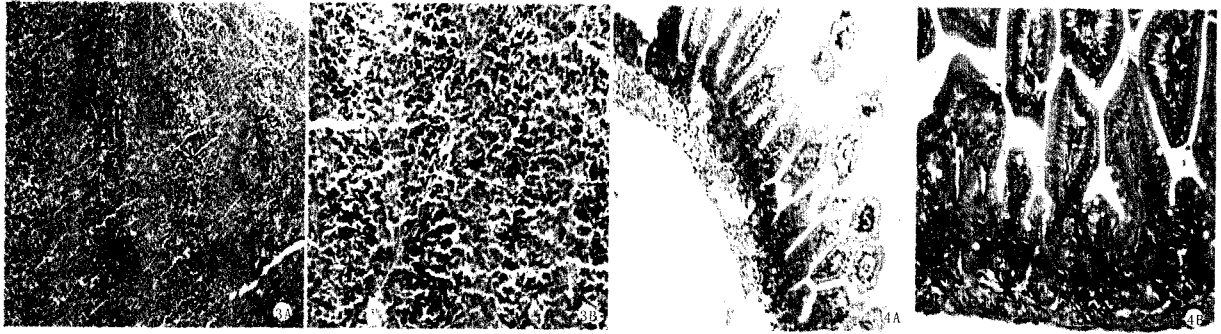


图 3 乳鼠脾脏形态学改变 (HE  $\times 100$ ) (A: RV 感染组, 脾脏白髓增生, 出现较多生发中心, T 细胞区扩大; B: 对照组, 未见明显生发中心) 图 4 乳鼠小肠形态学改变 (HE  $\times 400$ ) (A: RV 感染组, 肠上皮细胞空泡变性, 部分上皮细胞和肠绒毛脱落, 上皮完整性破坏; B: 对照组, 结构正常)

动物模型的临床经过和 RV 株种类、毒力、剂量及感染途径等多种因素有关。RV 的毒力相同而感染的途径不同, 对各器官、组织的损害也不相同。感染途径相同, 但是病毒株不同, 对器官的损伤也不相同<sup>[5]</sup>。重要的是通过实验, 对各方面因素进行合理的调整, 建立一个理想稳定的动物模型进行研究。国外经腹腔注射细胞传代的猴和牛 RV, 已经成功的建立 RV 肠道外感染胆道闭锁模型, 认为猴 RV 对小鼠的肝胆系统易感, 是胆道闭锁动物模型的最佳选择<sup>[6]</sup>。乳鼠对 RV SAI1 株极具有敏感性, 其免疫功能不完善, 各屏障与组织器官发育不成熟, 或在某些诱因存在的情况下, 均可导致病毒血症向全身扩散, 引起肠道外组织感染。本实验选用 10 日龄左右乳鼠, 经腹腔注射 RV SAI1 株, 通过腹膜及腹腔内的血管和淋巴系统直接转移到靶器官, 相当于模拟 RV 已穿过肠道屏障, 人为造成 RV 病毒血症后, 肠道外感染的情况, 并通过组织匀浆培养判断模型是否成功。为了避免交叉感染, 我们将对照组隔离饲养, 生理盐水注射组组织无病变, 表明无机会感染。实验结果证实, 我们用此种方法建立的动物模型, 从临床表现角度发病率 100%, 并发现肝脏、肾脏、脾脏、小肠的病理切片出现不同程度的病变, 和国内外研究基本一致<sup>[7-8]</sup>。最主要的是小肠、肝、肾组织匀浆培养出现细胞病变, 感染 RV 是明确的, 说明我们的动物模型是成功的。经腹腔接种 RV 不仅可以再现 RV 易感的肠道内感染, 也可同时出现严重的肠道外感染。

本实验为 RV 肠道外感染建立了较简便的操作方法。但是实验组只有很少的乳鼠出现腹泻, 同时

心脏和脾脏匀浆培养未见细胞病变, 可能是通过腹腔注射播散到不同组织的病毒量相对较少亦或不同组织对 RV 的敏感性及组织中病毒复制能力的差异, 这也提示我们在以后的研究工作中可以采用不同的感染途径, 不同的感染剂量对动物进行感染对比, 通过多次探讨、摸索和改进, 以获得比较理想的 RV 肠道外感染模型, 这将为我们更深入了解 RV 肠道外感染发病机制、预防及治疗措施奠定基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Lambert Y, Lombet J. Vaccination against rotavirus: an old challenge, an ongoing reality [J]. *Rev Med Liege*, 2006, 61 (9): 653 - 655.
- [2] Ray P, Fenaux M, Sharma S, *et al.* Quantitative evaluation of rotaviral antigenemia in children with acute rotaviral diarrhea [J]. *J Infect Dis*, 2006, 194 (5): 588 - 593.
- [3] 沈惠卿. 病毒性疾病诊疗新技术实用大全 [M]. 3 版, 北京: 中国教育出版社, 2005: 127 - 250.
- [4] Graham KL, Donnell JA, Tan Y, *et al.* Rotavirus infection of infant and young adult nonobese diabetic mice involves extraintestinal spread and delays diabetes onset [J]. *J Virol*, 2007, 81 (12): 6446 - 6458.
- [5] Fenaux M, Cuadras MA, Feng N, *et al.* Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice [J]. *J Virol*, 2006, 80 (11): 5219 - 5232.
- [6] Huang L, Gu WZ, Si XM, *et al.* Expression of NF- $\kappa$ B in rotavirus-induced damage to the liver and biliary tract in neonatal mice [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6 (2): 188 - 193.
- [7] Crawford SE, Patel DG, Cheng E, *et al.* Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model [J]. *J Virol*, 2006, 80 (10): 4820 - 4832.
- [8] 黄为民, 李宁, 欧巧群, 等. 新生小鼠轮状病毒全身扩散的实验研究 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2008, 23 (10): 782 - 784.

欢 迎 订 阅

欢 迎 投 稿