

## 小鼠巨细胞病毒实验性持续感染模型的建立

胡纯达 闻玉梅

(上海医科大学微生物教研室, 上海)

### 提 要

应用小鼠巨细胞病毒 (MCMV) Smith株, 经腹腔感染我国繁殖的 C57BL/6 近交系小鼠, 在高剂量感染组 ( $10^{5.33} \text{TCID}_{50}$ )、中剂量感染组 ( $2 \times 10^{4.53} \text{TCID}_{50}$ )、低剂量感染组 ( $2 \times 10^{3.33} \text{TCID}_{50}$ ) 均可引起感染。自感染后第 5—14 天, 所有感染组鼠脾脏均可 100% 分离到病毒。自第 14 天开始, 高、中剂量感染组唾液腺中已可 100% 分离到病毒; 低剂量感染组唾液腺中到 21 天亦可全部分离到病毒; 中剂量感染组小鼠追踪至第 102 天, 唾液腺中仍 100% 可分离到病毒。MCMV 感染后第 21 天的小鼠唾液腺切片中, 还可见到腺体细胞核增大, 核质疏松, 有些细胞可见核内包涵体。本研究中全部对照小鼠均未分离到 MCMV, 说明本研究所用的 C57BL/6 小鼠可进行实验性 MCMV 感染的研究。

巨细胞病毒 (CMV) 属疱疹病毒科, 是一种可引起持续性感染的病毒。由于近交系小鼠遗传背景清楚, 实验条件可人为控制, 小鼠巨细胞病毒 (MCMV) 的实验感染模型可重复出人巨细胞病毒 (HCMV) 引起的各种人类疾病<sup>[1, 2]</sup>, 因此, 动物 CMV 中, 研究最多的是 MCMV。迄今, MCMV 实验性感染模型在国外已被广泛用于研究 CMV 感染的病理变化、持续性感染、病毒的潜伏与复活<sup>[2, 3, 4]</sup>、病毒感染引起的免疫应答及免疫抑制等<sup>[2, 4]</sup>。

本文报道用国外引进的 MCMV 标准毒株 Smith 株, 经腹腔感染 C57BL/6 近交系小鼠后, 建立了小鼠唾液腺中规则持续带毒 102 天以上的慢性持续性感染的动物模型。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 动物

C57BL/6 近交系小鼠, 鼠龄 3—4 周, 体重 8—11g。

#### (二) 病毒

MCMV Smith 株由美国 ATCC 引进, 在原代鼠胚纤维母细胞培养 (Mouse Embryo

Fibroblast Cell Cultures MEFC) 上增殖, 滴度为 $10^{4.5}TCID_{50}/0.2ml$ 。毒种经本实验室在MEFC上传代扩增后, 滴度为 $10^{4.33}TCID_{50}/0.1ml$ , 定为MCMV<sub>TP3</sub>。

### (三)MEFC 的制备

怀孕 14—16 天普通昆明种小白鼠无菌剖腹, 取出子宫, 剥出鼠胚, 剔去内脏后用 Hanks' 液漂洗, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞, 在含 10% 小牛血清 Eagles' 液 (含 0.03% 谷氨酰胺, 100u/ml 青霉素、100r/ml 链霉素和卡那霉素) 中培养, 37°C 48 小时后长成细胞单层, 形态主要为梭形纤维母细胞。

### (四)实验感染

90 只 C57BL/6 小鼠分成 3 个感染剂量组与 1 个正常对照组。高剂量组 20 只小鼠, 每只经腹腔注射 MCMV<sub>TP3</sub> 1ml (相当于 $10^{5.33}TCID_{50}$ )。中剂量组 30 只小鼠, 每只经腹腔注射 MCMV<sub>TP3</sub> 0.2ml (相当于 $2 \times 10^{4.33}TCID_{50}$ )。低剂量组 20 只小鼠, 每只经腹腔注射 1:10 稀释的 MCMV<sub>TP3</sub> 0.2ml (相当于 $2 \times 10^{3.33}TCID_{50}$ )。对照组 20 只小鼠, 每只经腹腔注射仅含 10% 小牛血清 Eagles' 液 0.2ml。感染组与对照组分房饲养以避免交叉感染。

### (五)观察指标

(1) 发病或/及死亡。(2) 感染 2、5、8、14、21、32 天分批杀鼠, 各感染剂量组与对照组各杀小鼠 3 只, 分别取脾、唾液腺制成匀浆及全血接种 MEFC 作病毒分离。标本接种后 3—5 天可见典型的 MCMV 病变, 病变细胞呈局灶性肿胀、变圆、脱落。(图 1)。观察到第 10 天不出现者弃去, 定为病毒分离阴性。(3) 取 MCMV 感染后第 5 及第 21 天脾脏与唾液腺, 经甲醛固定, 石蜡包埋后作组织切片, HE 染色, 寻找核内与胞浆内特征性包涵体。

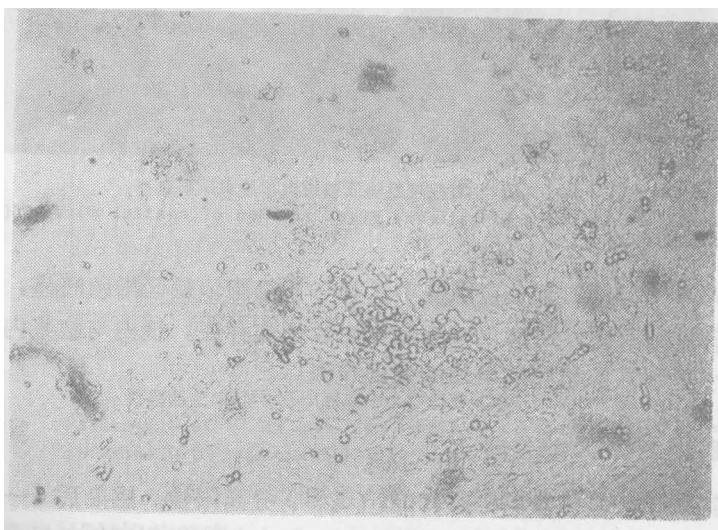


图1 鼠巨细胞病毒感染MEFC后出现折光性增高部分细胞脱落

Fig.1 MEFC after MCMV infection, showing cell swollen rounded, refractile and detached.

## 结 果

### (一)发病或/及死亡

3个不同剂量感染组小鼠经腹腔接种后第3—8天,出现呆滞、团缩、躬背、耸毛等发病现象。在开始发病的时间上,3组无明显差异。所有小鼠在第10天以后,均恢复至外观正常。感染期间无小鼠因发病而死亡。

### (二)唾液腺与脾脏的病理学观察

感染后第5天的小鼠唾液腺组织,细胞核致密,显微镜检下形态与对照小鼠无明显差异,核内、胞浆内均未见包涵体(图2)。感染后第21天3组小鼠唾液腺均可见腺体细胞肿大,核质疏松,核仁明显可见。有些细胞内,并可见形态不规则,外周围有一圈不着色“晕”的核内包涵体(图3)。还可见到融合细胞。

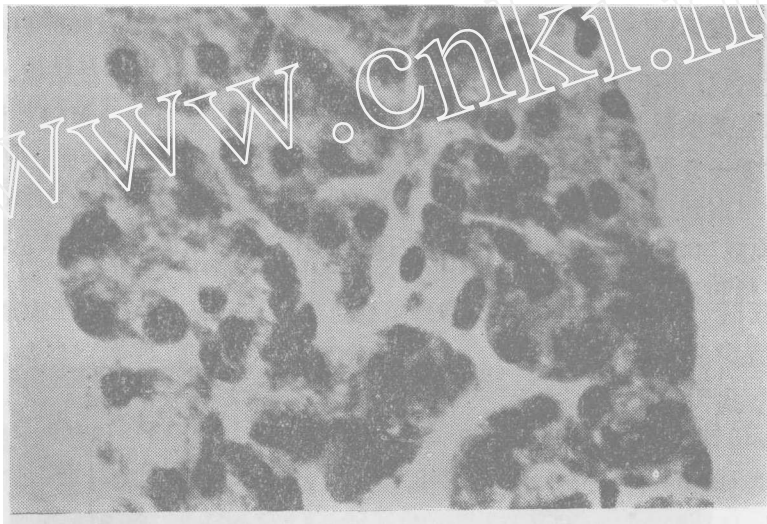


图2 对照鼠组唾液腺组织切片 HE 染色

Fig.2 HE staining of salivary gland section of control mice (1000×)

感染后第5天与第21天小鼠脾脏中,T与B细胞依赖区增殖旺盛,细胞核增大,核质疏松,核仁明显可见,并有巨核细胞与融合细胞存在。核内与胞浆内未找见典型的包涵体。对照小鼠唾液腺与脾脏中均未发现包涵体。

### (三)脾脏中 MCMV 的分离

感染后第2天,高剂量感染组100%(3/3)分离阳性。感染后5—14天,3个感染组均100%(3/3)分离阳性。感染后第21天,仅在低感染剂量组1只小鼠脾脏中分离到MCMV,而此时该小鼠唾液腺中病毒分离却为阴性。至感染后第32天,除中剂量感染组

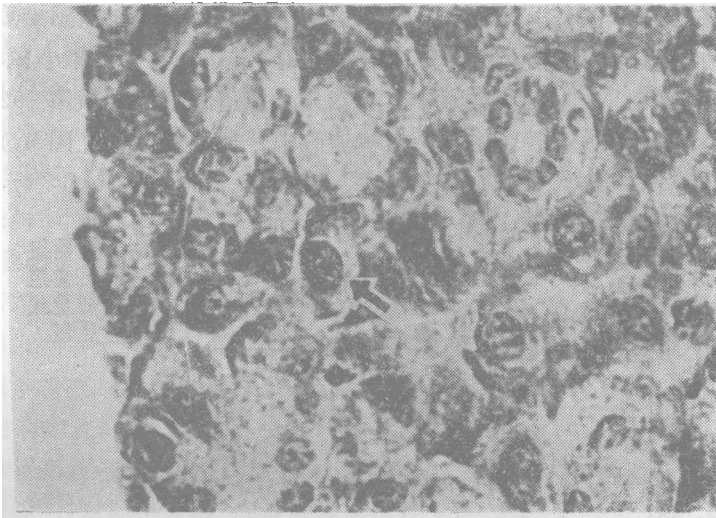


图3 鼠巨细胞病毒感染后第21天唾液腺组织腺体细胞核异常增大、核质淡染，箭头所示可见核内包涵体 H.E.染色×1000倍

Fig.3 Salivary gland tissue of 21st day MCMV infected mice, abnormal enlarged nuclei with light staining. Intranuclear inclusion (A) could be found. (H.E.1000x)

1只小鼠仍分离到MCMV外，其余脾脏标本分离均为阴性。对照组小鼠脾脏中分离始终阴性。(图4)。

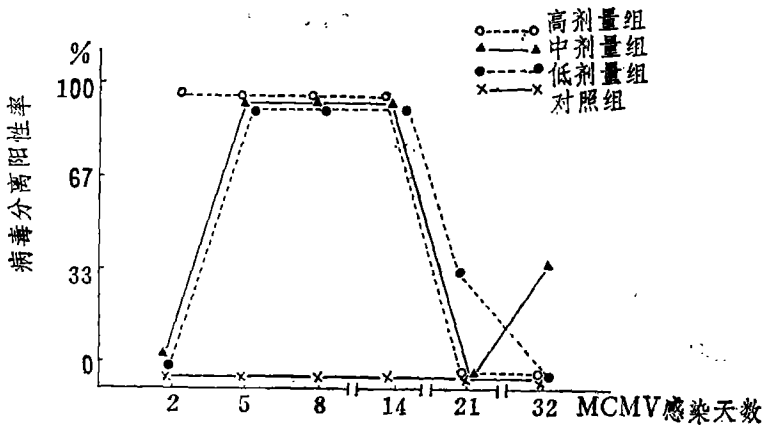


图4 三种剂量MCMV经IP感染小鼠脾细胞分离阳性率示意图

Fig.4 Percentage of MCMV positive isolation of spleen cells of mice infected intraperitoneally with three dosages.

#### (四)唾液腺中MCMV的分离

自感染后第5天起，中剂量感染组中，2只小鼠唾液腺中分离到MCMV。同时，这

2只小鼠全血标本中病毒分离也是阳性。感染后第8天,高剂量感染组100%(3/3),中剂量感染组67%(2/3)分离阳性,低剂量感染组则为阴性。从感染后第14天起,除低剂量感染组小鼠在第21天时,分离率为67%(2/3)外,其余感染小鼠均100%可从唾液腺中分离到MCMV。中剂量感染组中,有5只小鼠追踪至感染后第102天,唾液腺中分离率仍为100%(5/5)阳性。对照小鼠唾液腺中分离始终阴性(图5)。

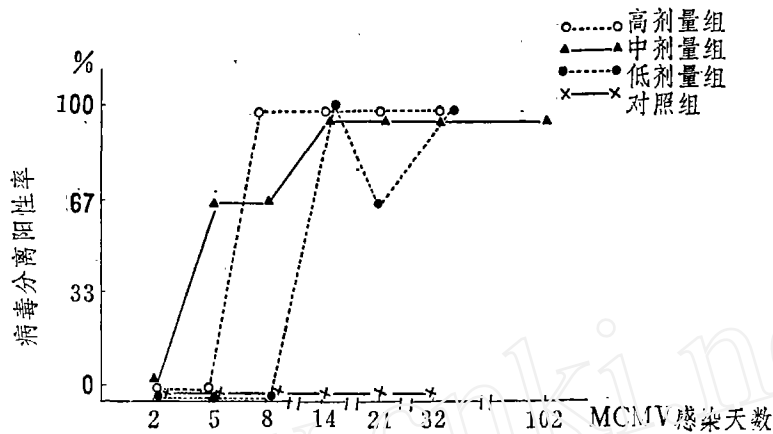


图5 三种剂量MCMV经IP感染后小鼠唾液腺病毒分离阳性率  
Fig.5 percentage of MCMV positive isolation of salivary glands of mice infected intraperitoneally with three dosages.

### (五)全血标本中MCMV的分离

全血标本仅在感染后第5天,中剂量感染组2只小鼠与低剂量感染组1只小鼠中分离到MCMV。高剂量感染组小鼠全血标本分离全部阴性。对照组小鼠全血标本分离始终阴性。

## 讨 论

Allan等<sup>[6]</sup>曾用 $10^{5.6}$ PFU(致死剂量)与 $10^{4.0}$ PFU(亚致死剂量)MCMV唾液腺病毒株,经腹腔感染C57BL/6小鼠,发现在用 $10^{5.6}$ PFU MCMV感染C57BL/6小鼠后第1天,脾脏中即可测到低滴度的病毒。在感染后2—3天,脾脏内MCMV滴度达到高峰,第3—5天后MCMV滴度下降,在感染后第5天时降为 $10^2$ PFU/g脾重,至感染后第9天,病毒量显著减少。本文应用组织培养中增殖的病毒,感染我国繁殖的C57BL/6近交系小鼠获得成功。高剂量感染组小鼠在经腹腔接种后第2天内,100%(3/3)从脾脏中分离到MCMV。接种后第5—14天内,所有3组感染小鼠均100%从脾脏中分离到MCMV。至接种后第21天时,绝大部分小鼠脾脏中已分离不到MCMV,与Allan报道相符。Allan等报道,C57BL/6小鼠经MCMV感染后的病毒血症主要出现在感染后的2—3天内。本研究中,仅在MCMV感染后的第5天,从2只中剂量感染组与1只低剂量感染组小鼠的全

血标本中分离到 MCMV。高剂量感染组小鼠中未分离到 MCMV 的原因,可能是由于高剂量感染组小鼠的病毒血症时间早于采血标本时间。我们观察到的 MCMV 病毒血症出现的时间相对迟于 Allan 的等报道,可能与所用的 MCMV 毒株及感染剂量不同有关。Allan 等发现,在 MCMV 感染后第 3 天,即可从唾液腺中分离到病毒,并被认为是病毒血症所致。我们的结果也与之相似,即在 MCMV 感染后第 5 天中剂量感染组仅有 2 只小鼠唾液腺 MCMV 分离阳性,但这 2 只小鼠全血标本当时也分离到 MCMV。其他感染组小鼠的唾液腺,在感染后第 14 天方可分离出 MCMV,以后可持续带毒。我们观察直到感染后第 102 天,中剂量感染组的 5 只小鼠唾液腺中仍可 100% 分离到 MCMV,说明已成功地建立了 MCMV 的持续感染模型。用组织病理学检查包涵体的方法,在 MCMV 感染后第 5 天与第 21 天小鼠脾脏中并未见到包涵体。因此,在建立 MCMV 实验感染模型中,病毒分离方法比组织病理学查找包涵体的方法为敏感且特异。包涵体的发现有助于进一步佐证 MCMV 感染的确立。

国外文献报道,在质量较差的商品来源小鼠中,可有 MCMV 的潜伏感染<sup>[6]</sup>。在本研究的整个实验过程中,对照小鼠脾、唾液腺与全血标本中,始终未分离到 MCMV,也未查见有核内与胞浆内包涵体存在。用 MCMV 实验感染,全部动物均可被感染并分离到病毒。因此,可以认为所用的 C57BL/6 小鼠无 MCMV 的急性感染,并可用于实验 MCMV 感染的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Lussier, G., 1975, *Adv Vet Sci* 19:233—247.
- [2] Hudson, J.B., 1979, *Arch Virol* 62(1):1—29
- [3] Ho, M., 1982, Murine cytomegalovirus pp.223—243, In: *Cytomegalovirus—Biology and Infection*, plenum Medical Book Company.
- [4] Hamilton, J.D., 1982, Latency pp.21—26, In: *Cytomegalovirus and Immunity—Monographs in Virology*, vol.12, Ed: Melnick, J.L, S.Karger, Basel, Munchen, Paris, London, New York, Sydney.
- [5] Allan, J.E, et al., 1984, *Arch. Virol.* 81:139—150.
- [6] Manini, A, et al., 1966, *Am.J.Hyg.* 73:329—343.

## ESTABLISHMENT OF EXPERIMENTAL PERSISTENT INFECTION OF MOUSE CYTOMEGALOVIRUS MODEL

Hu Chun-da                  Wen Yu-mei

(*Department of Microbiology, Shanghai Medical Univ. Shanghai*)

Smith strain of murine cytomegalovirus (MCMV) was used for intra-peritoneal infection of C57BL/6 inbred mice. In all three groups of high ( $10^{5.33}\text{TCID}_{50}$ ), medium ( $2 \times 10^{4.33}\text{TCID}_{50}$ ) and low ( $2 \times 10^{3.33}\text{TCID}_{50}$ ) dosage infected mice, MCMV infection was successfully established. During 5-14 days after infection, in all dosage groups MCMV could be isolated from the spleens. Starting from the 14th day after infection, salivary glands from all mice of the high and medium dosage groups were MCMV positive, whereas in the low dosage group, MCMV was isolated from the salivary glands 21 days after infection. In the mice infected with medium dosage that were followed up to the 102nd day, MCMV could still be isolated from the salivary glands of MCMV infected mice, abnormal enlarged nuclei with light staining and intranuclear inclusion bodies could be observed. All control mice were negative for MCMV isolation throughout this study, which indicates that the C57BL/6 inbred mice from our medical university are acceptable for experimental infection study of MCMV.