

新生豚鼠巨细胞病毒感染后唾液腺和脾脏的病理改变

郑志明 林 娜¹ 张蔚英 张江虹
诸卫平 胡建明

(湖北医学院病毒研究所, 武汉)

提 要

豚鼠皮下接种巨细胞病毒(CMV)后, 出现发育迟缓、唾液腺和脾脏肿大, 唾液腺中出现高滴度的CMV。镜检唾液腺和脾脏发现有唾液腺导管细胞变性和导管细胞核内嗜酸性包涵体; 脾脏中性粒细胞浸润、散在的灶状出血、大量网状内皮细胞增生、脾小结增大甚至急性窦卡他性炎症。

新生儿巨细胞病毒(CMV)的感染在国内目前已引起广泛重视。但有关CMV感染发病机理的实验研究, 则很少见有报道。本文在建立豚鼠CMV动物模型的基础上, 观察了CMV在脾脏和唾液腺中引起的病理变化。现报告如下:

材 料 与 方 法

一、病毒和细胞培养 豚鼠CMV22122株得自美国耶鲁大学医学院熊菊贞教授实验室。在豚鼠中传代后, 取感染动物唾液腺制备成10%的悬液即为毒种, 滴度为5.5 Log₁₀TCID₅₀/ml。

原代豚鼠胚细胞的制备见文献^[1]。病毒的滴定在24孔Costar细胞培养板上进行。

二、动物接种和标本收集 体重100克左右的新生豚鼠为本院动物室提供。称重后, 在前肢皮下接种1ml豚鼠CMV毒种。体重相同的对照豚鼠皮下接种1ml10%正常豚鼠唾液腺悬液。所有动物均在接种后不同时间内称重、定期在乙醚麻醉下心脏放血处死, 试验组和对照组同时进行。无菌取出唾液腺和脾脏、进行肉眼观察和称重后, 一部分组织供病毒滴定用, 另一部分组织留作组织学检查用。

三、病毒滴定 将无菌取得的部分唾液腺用Hanks液清洗后, 用含2%小牛血清的Eagle维持液研磨成10%的组织悬液, 然后在含豚鼠胚细胞单层的24孔Costar细胞培养板

本文于1987年2月17日收到。

¹内蒙古医学院微生物教研室进修教师。

本文的病理观察曾得到本院病理教研室陈德基副教授的部分帮助和指导; 对本院摄影室倪祥明、刘永清同志的热心摄影、本所向近敏教授对本文的认真审阅表示致谢!

上滴定病毒含量。为了避免组织碎屑对豚鼠胚细胞的毒性作用，通常在接种待测唾液腺悬液后24小时，换新鲜细胞维持液一次。每隔一周加一次新鲜维持液，连续观察一个月。病毒滴度以TCID₅₀表示。

四、组织学检查 将无菌取得的部分唾液腺和脾脏用10%甲醛缓冲液固定过夜。然后，进行常规的石蜡切片和HE染色。

结 果

一、动物体重、唾液腺及脾脏的一般变化

豚鼠感染CMV后，出现竖毛、烦躁不安、发育迟缓、体重下降。在接种CMV后第1周，CMV感染动物的唾液腺重量平均是正常动物的1.8倍。在第2周，CMV感染动物的唾液腺重量是正常动物的1.5倍(图1)。感染动物的唾液腺肿大以急性感染早期最为明显。

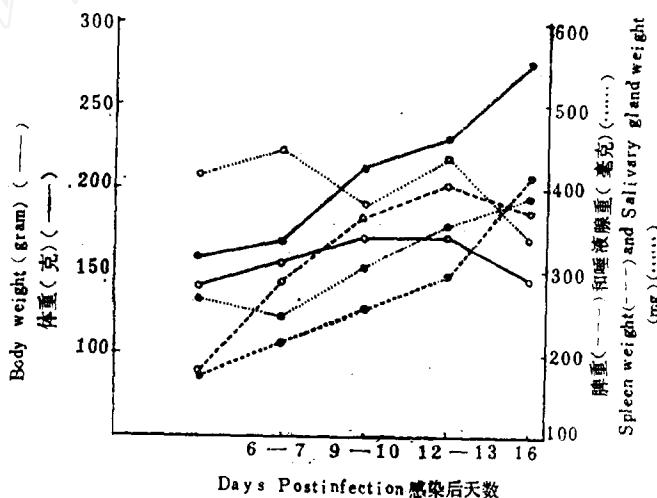


图1 豚鼠急性CMV感染期间体重、脾重和唾液腺重量的变化

Fig 1 Changes of body weight, spleen weight, and salivary gland weight of newborn guinea pigs during acute CMV infection
○ CMV-infected guinea pigs (28 animals) CMV感染的动物 (28只)
● Normal controls (22 animals) 正常对照动物 (22只)

自接种CMV后第5天开始，脾脏肉眼观察有充血和肿大。虽然在感染CMV后第3天，两组动物脾重无明显差别，但在接种CMV后第10天内，CMV感染豚鼠脾重是正常动物脾重的1.4倍；10天以后，增至正常动物脾重的1.8倍(图1)。

比较动物唾液腺重/体重(SGW/BW)和脾重/体重(SW/BW)的比例可以发现，正常动物在此期间的SGW/BW和SW/BW曲线比较平稳，而CMV感染的动物SGW/BW和SW/BW之比例曲线均明显高于正常动物(图2)，显示在此期间CMV感染的动物确有唾液腺和脾脏的肿大。

二、急性CMV感染期唾液腺病毒的含量

豚鼠在接种CMV后第5天即可在唾液腺中检出所接种的病毒，平均滴度达 $1.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 。但一般说来，在接种病毒后第3天很难从唾液腺中检测到病毒。即使有，滴度也相当低。唾液腺中的CMV滴度随病程的时间延长而逐渐增高。至接种CMV后第16天（本次实验的最后一天）唾液腺中的病毒滴度高达 $3.7 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 左右（图3）。在所检查的28只豚鼠唾液腺中，除4只在感染CMV后第3天没有查到病毒外，其余各个时间处死的动物唾液腺均可检出病毒。22只对照动物唾液腺病毒分离全部阴性。

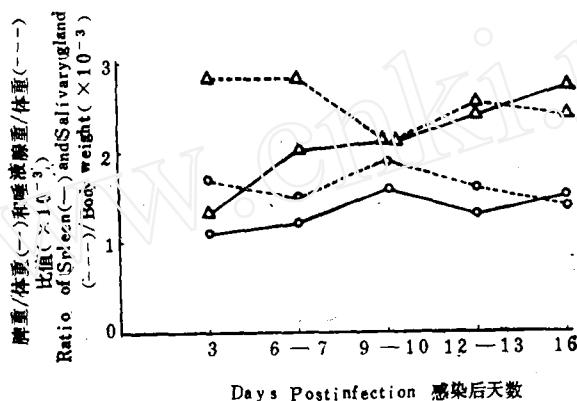


图2 豚鼠急性CMV感染期间脾重/体重和唾液腺重/体重比率
Fig. 2. Spleen and salivary gland/body weight ratio during acute CMV infection in newborn guinea pigs
△CMV-infected guinea pigs (28 animals) CMV感染的动物(28只)
○Normal Controls (22 animals) 正常对照动物(22只)

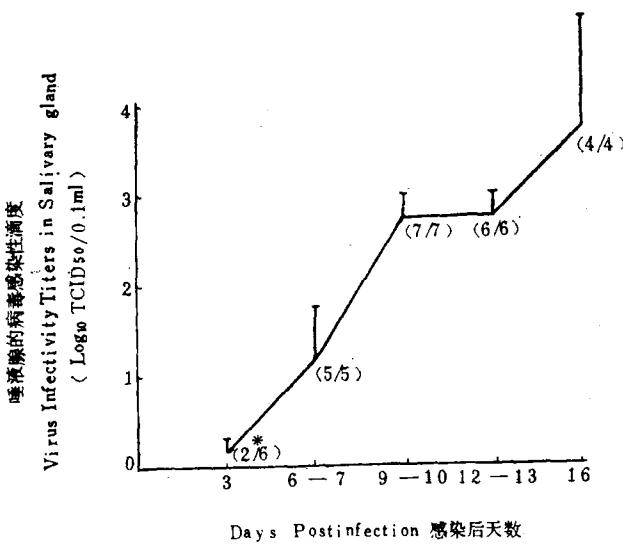


图3 急性CMV感染期豚鼠唾液腺的病毒含量
Fig. 3. Virus infectivity titers in salivary gland of newborn guinea pigs during acute CMV infection
*(感染数/实验数)



图 4 急性CMV感染时豚鼠唾液腺、脾脏的病理改变

- A. 感染CMV后第10天, 可见唾液腺导管变性(长箭头), 单核细胞和淋巴细胞向导管内浸润(短箭头)。($\times 200$)
- B. 感染CMV后第16天唾液腺导管细胞内的核内包涵体。($\times 400$)
- C. 同B。($\times 1000$)
- D. 感染CMV后第6天, 可见脾脏散在的灶状出血和炎性细胞浸润。($\times 200$)
- E. 感染CMV后第10天, 可见脾出血灶内有大量炎性细胞浸润(细箭头)。脾红髓可见网状内皮细胞增生活跃和核内包涵体(粗箭头)。($\times 400$)
- F. 同E. 示多核巨细胞。($\times 1000$)
- G. 感染CMV后第16天, 可见脾血管内大量炎性细胞聚集, 脾窦急性卡他性炎。($\times 1000$)
- H. 感染CMV后第16天, 可见脾窦内急性卡他性炎症及大量网状内皮细胞增生, 并出现核内嗜酸性包涵体(箭头所示)。($\times 1000$)
- Fig 4 Pathological changes of guinea pig salivary glands and spleen during acute CMV infection.
- A. The appearance of the degeneration (long arrow) of salivary gland duct cells and the infiltration of monocytes and lymphocytes into the duct cells (short arrow) at the 10th day after CMV infection. ($\times 200$)
- B. Virus inclusions in the duct cells of salivary glands at the 16th day after CMV infection. ($\times 400$)
- C. Same as B. ($\times 1000$)
- D. The scattered foci with hemorrhage and the infiltration of inflammation cells at the 6th day after CMV infection. ($\times 200$)
- E. The scattered foci with hemorrhage and many inflammation cells (small arrow), and the appearance of reticuloendotheliosis and intranuclear inclusions (big arrow) at the 10th day after CMV infection. ($\times 400$)
- F. Multinucleated cells in the spleen at the 10th day after CMV infection. ($\times 1000$)
- G. Many inflammation cells gathering in the splenic blood vessels and the appearance of splenic sinal acute catarrh at the 16th day after CMV infection. ($\times 1000$)
- H. Observation of splenic sinal acute catarrh, reticuloendotheliosis, and acidophilic intranuclear inclusions arrow at the 16th day after CMV infection. ($\times 1000$)

三、豚鼠CMV感染后唾液腺的病理改变

共检查16只感染动物。在接种CMV后第3、6天, 随机各取1只豚鼠进行唾液腺病检时, 可见唾液腺导管周围有单核细胞和淋巴细胞浸润, 偶见少许导管细胞变性。在接种CMV后第9~10天检查了5只、第12~13天检查了5只动物, 可见少数动物唾液腺导管周围有大量单核细胞和淋巴细胞浸润和导管变性。在接种CMV后第16天, 共检查4只动物, 此时, 可见很多导管细胞核内出现嗜酸性包涵体, 但导管周围单核细胞和淋巴细胞浸润减少, 代之以导管变性为主(图4A-C)。

整个观察期间均未在腺泡细胞中有CMV诱导的核内或胞浆内嗜酸性包涵体。

四、豚鼠CMV感染后脾脏的病理改变

共检查22只动物。在接种CMV后不同时间的病理变化如下:

第3天，可见脾脏中性白细胞浸润。

第6天，在靠近脾小梁的脾红髓内可见很多散在的灶状出血。出血灶内有中性白细胞浸润。脾边缘区有大量网状内皮细胞增生。

第9—10天，脾脏未检出新的出血灶，但见有大量炎性细胞浸润（单核细胞和中性白细胞）的病灶。有的细胞出现核固缩、核碎裂，可见细胞碎屑。脾红髓网状内皮细胞增生活跃，偶而可见脾细胞核内包涵体和多核巨细胞。脾小结增大。

第12—13天，脾脏新的灶样出血未被检出，可见有中性白细胞浸润。脾小结继续增大。脾红髓网状内皮细胞增生活跃。

第16天，所有CMV感染动物，其脾内网状内皮细胞增生异常活跃。未检出灶状出血，少见中性白细胞浸润。但有少数动物脾脏呈急性囊卡他性炎症表现。窦内皮细胞肿胀、着色差、核淡染，有的细胞可见核内嗜酸性包涵体。脾脏血管扩张，管腔内有大量炎性细胞聚集（图4D-H）。

讨 论

唾液腺在急性CMV感染期间有病毒排出已先后被许多人所证明^[2]。但有关新生豚鼠急性CMV感染期间唾液腺病毒含量的变化尚未见报道。本实验结果表明，新生豚鼠感染CMV后，唾液腺中病毒滴度的高峰时间（感染后第16天）比脾脏^[3]和胸腺^[4]（均为感染后第10天）晚。唾液腺中高滴度CMV量可达 $3.7 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ml}$ 。在唾液腺出现高滴度病毒时，脾脏和胸腺中病毒量已降低到1个对数以下^[3,4]。

感染动物脾脏肿大和唾液腺肿大是动物对CMV感染的一种反应。本研究进一步证明，急性CMV感染不仅可引起豚鼠脾肿大和唾液腺肿大，而且还可在这二种器官产生光学显微镜下的病理损害。感染早期，炎性细胞在唾液腺导管周围浸润，感染晚期，导管细胞核内出现病毒包涵体。由此可见，CMV感染后从唾液腺排出的病毒是由于病毒性感染的导管细胞释放入导管腔的结果。唾液腺高滴度病毒含量与导管细胞病理损害的程度相一致进一步支持了这一设想。至于小鼠CMV主要在唾液腺腺泡细胞而不是在导管细胞内增殖的报道^[5]在本实验中不能证实。

脾脏是一种免疫器官。先前的脾细胞亚群定量研究已证明，急性CMV感染早期，脾脏对CMV感染的免疫反应主要是多形核白细胞和巨噬细胞增多^[6]。本文的病理检查也表明，急性CMV感染早期，脾脏出现散在的灶状出血和炎性细胞浸润。而在感染晚期，组织病理学检查则以大量网状内皮细胞增生，脾小结增大为主。这一病理变化提示，CMV感染晚期脾肿大可能是上述细胞增生的结果。网状内皮细胞和脾小结淋巴细胞的增多是脾有核细胞增多^[6]的主要原因。

比较唾液腺和脾脏的炎性细胞浸润时还可发现，在CMV感染早期，脾脏主要是多形核白细胞浸润；而唾液腺导管周围则以单核细胞和淋巴细胞浸润为主，未见多形核白细胞。为什么不同脏器在同一时期浸润的炎性细胞不同，仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- (1) 郑志明等, 1984, 中华微生物学和免疫学杂志 4: 352
- (2) Bia, F J, et al., 1983, *Rev.Infect.Dis.* 5: 177.
- (3) 郑志明等, 1987, 病毒学报 3: 137
- (4) 郑志明等, 1987, 病毒学杂志 1: 43
- (5) Hudson, JB., 1979, *Arch.Virosl.* 62: 1.
- (6) Zheng, ZM., et al., 1987, *Develeop.Comparat.Immunol.* 11: 407.

**Pathological Observation of Salivary Gland and Spleen in
the Newborn Guinea Pigs with Acute
Cytomegalovirus Infection**

Zheng Zhi-ming, Lin Na, Zhan Wei-ying, Zhang Jiang-hong,
Zhu Wei-ping, Hu Jian-ming

(Virus Research Institute, Hubei Medical College, Wuhan)

Subcutaneous inoculation of guinea pig cytomegalovirus (CMV) into newborn guinea pigs resulted in acute CMV infection of the animals. Guinea pigs Infected had growth retardation, salivary gland swelling, and splenomegaly. Virus could be recovered from salivary gland 5 days after inoculation and the infectivity titers of CMV reached to a high titer of $3.7 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$ of 10% salivary gland suspensions 16 days after inoculation. Histopathological examination showed that CMV mainly caused degeneration of the ductal cells of the salivary glands and the appearance of virus-specific inclusions in the duct cells. In the spleen of CMV-infected guinea pigs, infiltration of polymorphonuclear neutrophils and scattered foci with hemorrhage were observed in the early of acute CMV infection. Moreover, reticuloendotheliosis was found in the splenic red pulp and the splenic lymph nodules were enlarged. Acute sinus catarrh sometimes occurred in the spleens during late stage of acute CMV infection. Focal necrosis were seldom observed in this study.