

人巨细胞病毒 AD₁₆₉株感染家兔致病机理的初步研究*高又新¹ 刘建军¹ 杨占秋¹ 姚学军¹ 曾庆斌² 彭倩²

(1. 湖北医学院病毒研究所 2. 湖北医学院附属第二医院, 武汉, 430071)

提 要 本文试用家兔作 HCMV 感染致病机制模型研究, 用家兔荧光法及病毒再分离技术考证了感染期间的病毒血症动态。观察到兔在原发性病毒感染后的第 13 天病毒首先在单核细胞 (MC)、淋巴细胞 (LC) 中显现, 并向血浆排放病毒, 进而随血道播散至全身组织, 引起相应靶器官感染致病。

关键词: 人巨细胞病毒 动物模型

R373.9
人类, 巨细胞病毒, 家兔

HCMV 过去一直为人们视为高种属特异性病毒, 因而对它的动物模型进行研究的人不多。加之 HCMV 在体内外复制周期较长, 较复杂, 在临床上还有表现症状感染型、无症状亚感染型及潜伏型等^[1], 这些使我们对 HCMV 致病机制细节的认识变得相当困难。我们在用家兔作 HCMV 感染的动物模型试探性研究中, 初步获得一些结果和新启发, 现介绍如下:

材料与方 法

- 1 家兔 选 2—3 月龄西班牙种短毛白兔共七只 (体重 1.5—2.0kg), 由本院动物室提供。
- 2 病毒 HCMV AD₁₆₉ 株, 经 HEL 细胞中增殖 14 天至 80% 细胞发生典型的 HCMV 感染后 CPE, 再经反复 3 次冻融, 3000r/m, 20min 离心处理, 取上清滴定 TCID₅₀ = 10⁻⁴, 贮 -80℃ 待用。
- 3 增殖及分离病毒用细胞 取自健康孕妇中期妊娠水囊引产胎儿肺组织, 按文献制备原代及传代细胞^[2], 用前经 FA 法 HCMV-Ag 检测为阴性。
- 4 动物接种 选择淋巴液回收丰富和血液吸收丰富的背、腹股沟和爪掌等皮下进行多点, 少量 (3ml/次), 多次 (共 3 次, 间隔 5—6h/次) 注射接种及口腔和外生殖器粘膜处作涂搽感染。病毒感染滴度 10⁷ TCID₅₀/ml。
- 5 血样采集、处理 自感染当天稍后起进行间日采血, 经 EDTA 抗凝, Histopaque-1077 分层液分离血浆及白细胞, 血浆贮 -80℃ 作特异 Ag 及 Ab 动态分析。白细胞 1 式 2 份用作 HCMV 血细胞分类感染动态及病毒再分离。
- 6 兔体征、解剖学及组织学观察 兔接种 HCMV 后, 分笼饲养, 坚持体征观察, 结合病毒血症动态确定适宜处杀时机, 尔后进行解剖学及脏器病检。
- 7 病毒再分离 将分离用血浆及白细胞 (需破碎处理) 分别接种新制单层 HEL (含扉片), 37℃ 吸附 1h, 加 5% FBSEagle 维持液继续培养, 2—3 日半量换液一次, 1—2 周盲传代一次, 一般追查 3—4 代。
- 8 兔血细胞和再分离标本测试 白细胞经抗 HCMV-McAbFA 法检测。再分离实验除定期作刮片 FA 法检外, 还注意 HCMV 所致 CPE。CPE 呈现后, 取扉片作 H-E 染色查包涵体^[3]。
- 9 血清特异 Ab 动态采用 IFA 法, 见文献^[4]。

结果与讨论

* 本文于 1992 年 1 月 24 日收到, 1993 年 2 月 16 日修回

1 FA 法检测实验兔病毒血症动态及定位:(一)兔感染 HCMV 后,血浆中除接种当天可检测到滴度很低的弥散 Ag 外,一般病毒 Ag 检出较晚(13 天以后),且波动不规则和低滴度。血浆病毒呈现似乎往往与 MC、LC 的 HCMV Ag 阳性伴行。(二)病毒血症期外周血细胞中查到 Ag 一般在感染后第 12—14 天,荧光特征为颗粒状,只存在于 MC、LC 中,维持时间 4—6 天,以后亦呈不规则呈现。这提示病毒感染机体后,先主要随淋巴液回收到局部淋巴组织短暂滞留,在 LC、MC 中增殖,病毒进入隐蔽期,尔后随其入血形成第一次病毒血症,血中 MC、LC 可能是病毒传播媒体,病毒通过其载体侵入机体靶器官。另外,由于机体血细胞生命周期一般短于 HCMV 增殖周期,且血细胞并非为 HCMV 的终宿主,故 FA 法检测时,通常是胞内 HCMV Ag 滴度较低和波动。

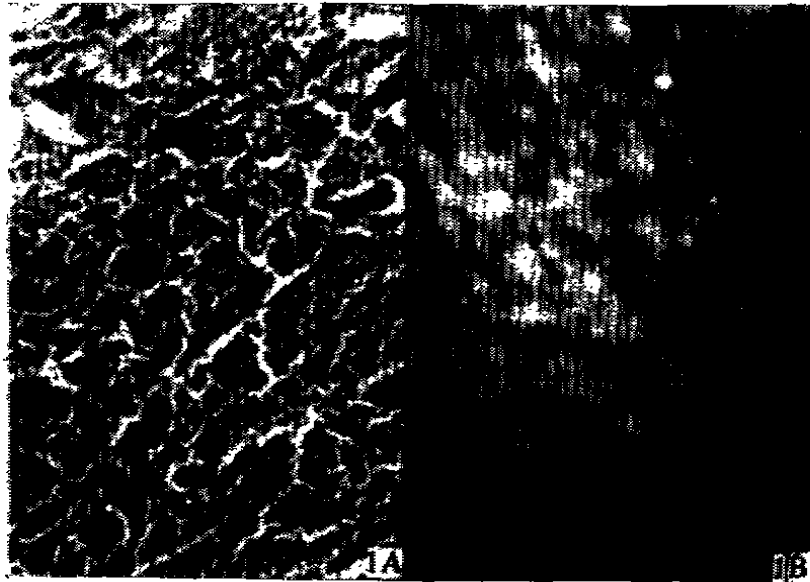


图 1A HCMV-AD₁₅₉株感染兔 35 天后的局部肝组织病变。如:胆汁性肝硬化,淤胆,胆小管上皮的坏死以及周围肝细胞病变

Fig. 1A The pathologica change of the local hepatic tissue has been showed, such as biliary cirrhosis, bile congestion and the necrosis of bile canaliculus epithelium. It was also showed that the pathological changes of hepatocytes have generated around. After the infection of HCMV-AD₁₅₉ for 35 days

图 1B HCMVAD₁₅₉株感染家兔后局部肝组织特异性阳性荧光

Fig. 1B The specific immunoflourescence positive on the local hepatic tissue of the rabbits infected with HCMV-AD₁₅₉ strain has been showed. It was stained with anti-HCMV McAb-IFA.

2 实验兔体征、解剖及组织学变化 兔接种 HCMV 后第 4 周起相继出现如下体征:齶毛、脱毛,部分动物爪丫、鼻前庭及耳廓根部有炎性红肿,继而发生真菌性癣样机会性感染。此外兔子时有厌食、消瘦,加食全脂牛乳制品后还会出现含脂蛋白粘液便。此时作外周血细胞追踪性 HCMV Ag 检查,可见一度消失的病毒 Ag 阳性再度显现。我们选择体征较典型动物于第 35 天

处杀 2 只进行解剖学组织学及免化检查时,能观察到脾肿大伴有炎性粘连,心外膜,肺、肝等器官有弥散结节形成,胰脏水肿及肠系膜淋巴结肿大。取材经冰冻切片进行组织学和免化 FA 检查,结节系 LC、MC 浸润所致,肝结节发生在胆总管处,造成胆汁淤滞,胆管上皮及相邻肝组织程度不一的坏死,并且上述受检脏器还呈 HCMV Ag 阳性(图 1A、B)。这进一步说明病毒血症仅是 HCMV 在体内播散过程,它真正靶器官可能是肺、肝、胰、脾、心、脑及肠系膜淋巴组织等。致使兔模型的解剖学、组织学变化与免化特检及体征异常吻合。且与人类的 HCMV 感染后巨细胞病毒包涵体病近似。

3 感染兔血浆和白细胞中 HCMV 再分离:我们虽仅对 3 只体征突出的兔作了追踪性病毒再分离实验,其结果均予表明体内活病毒的存在,且能重现 HCMV 特有的 CPE 包涵体特征及特异性 Ag 反应。

4 关于 HCMV 特异性 Ab 动态:兔子感染后,一般在第 8 天可查到低水平 Ab,而当病毒血症出现的第 15—20 天,体内 Ab 才显较高水平。但后续 Ab 水平一般也不太高,这可能与 LC、MC 被病毒直接感染受损及 CMV 感染所致机体 T_H/T_S 比例相对倒置,主要是 T_H 细胞减少及机体免疫调控机能紊乱有关^[5,6]。

参 考 文 献

- 1 宋干,刘宗芳.巨细胞病毒感染.见:黄祯祥主编.医学病毒学基础及实验技术.北京:科学出版社,1990,830
- 2 郭征主编.组织培养技术.北京:人民卫生出版社,1988,120—130
- 3 杜卓民主编.实用组织学技术.北京:人民卫生出版社,1980,84—85
- 4 戴华生主编.病毒学实验诊断技术.江西:江西科技出版社,1983,324—329
- 5 赵澄泉.骨髓移植与巨细胞病毒感染.国外医学微生物分册,1988,11(1):14—17
- 6 Alford Jr CA & Britt WJ. Virology. 1st ed. USA, Press NY, 1985, 636—637

An Experimental Animal Model Study on Infection and Pathogenesis of HCMV-AD₁₆₉ Strain

Gao Yuxian Liu Janjun Yang Zhanchou

(Institute of Virology, Hubei Medical College, Wuhan, 430071)

This paper is a study on the result of animal model with HCMV. Rabbits were inoculated with HCMV-AD₁₆₉ strain. The duration of viremic stage of rabbits infected with HCMV was studied by means of immunofluorescent assays and reisolation of the virus. Specific fluorescence for HCMV antigen was first observed in both monocytes and lymphocytes in the blood on 13th day, and released the virus to the plasma. It was indicated that HCMV was disseminated to rabbits body, thus caused target organs infection.

Key words: HCMV-AD₁₆₉ Animal model