

单纯疱疹病毒致病模型的研究

罗军 刘振安

(广州军区总医院预防保健科, 广州 510010)

杨占秋 肖红 文利

(湖北医科大学病毒研究所, 武汉 430071)

R373.11

R752.11

A 摘要 对单纯疱疹病毒(HSV)感染小白鼠致病特点进行了观察。小白鼠感染 HSV 第 4 天后开始发病, 感染后 2 h 血液内可分离出病毒, 第 48 小时病毒血症水平和病毒检出率较高。不同组织病毒分布不同, 脑、神经节在感染后第 72 小时病毒滴度较高, 心、肝组织在第 5 天达到高峰。结果说明所建立的 HSV 致病模型可用于评价抗 HSV 药物。

关键词 单纯疱疹病毒, 小白鼠, 致病性, 模型, 致病模型。

人群中单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus, HSV)感染十分普遍, 人初次感染 HSV 以后, 多数无明显临床症状, 少数表现为口腔、齿龈、唇局部疱疹, 严重者可引起肝炎、脑炎等, HSV-2 主要通过性接触引起生殖器炎症^[1-3]。因此, 建立 HSV 的致病模型是评价抗 HSV 药物的重要手段, 也是最终控制 HSV 感染的主要研究内容。为了评价大黄的抗 HSV 作用, 我们进行了 HSV 致病模型的研究, 结果如下:

材料与方 法

1 病毒

HSV-1F 株, HSV-2 333 株均为标准株, 由美国 Hersey 医学中心微生物学科 Rapp 教授惠赠。

2 动物

小白鼠为昆明种, 体重 15 ± 1.6 g, 购于中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心。

3 细胞

Hep-2 细胞由湖北医科大学病毒研究所保存, 培养用 199 培养基 + 10% 小牛血清、常规加入青链霉素。

4 病毒感染

动物室保持空气新鲜, 维持相对湿度 60%, 温度 20 ± 4 °C, 感染部位常规消毒后, 将病毒用 4 号针头经右侧脑内注射, 病毒滴度为 100 LD₅₀/mL, 感染剂量为 0.02 mL/只。

5 病毒分离

动物感染后 2 h、24 h, 第 2、3、4、5 天分别处死动物 4 只, 收集血液、脑、肝、肾、神经节进行病毒分离, 自然死亡动物同时收集脑、肝、肾、神经节进行病毒分离。病毒分离程序为: 将组织制成 10% 匀浆、血液标本取血清 0.2 mL/孔, 接种到已长成单层的 24 孔细胞培养板内, 每份标本接种 4 孔, 37 °C 培养。观察细胞病变, 同时用免疫荧光法检测感染细胞内病毒的存在, 免疫荧光法参见文献^[4]。

6 电镜检查

将上述用于病毒分离的材料取 1/4, 0.25% 戊二醛固定、切片、电镜观察。

结 果

1 感染动物的特征

100 LD₅₀/0.02 mL 的 HSV-1 和 HSV-2 感染小白鼠后, 感染动物出现规律性的发病特征, 表现为消瘦、耸毛、卷缩、肢体麻痹、低反应性、衰竭和死亡。HSV-1 感染小白鼠后第 4 天开始发病, 70% 动物在第 5 天发病, 少数动物在第 6~7 天发病, 并在发病 2 d 内死亡, 发病特征在两型病毒间没有差异, HSV-1 和 HSV-2 感染鼠的平均存活天数各为 6.1 ± 0.6 和 6.6 ± 0.8 d, 在感染后第 8 天内, 两组动物均发病死亡, 无一存活, 而未感染的对照动物均未发病死亡。

2 病毒血症检测

小白鼠感染 HSV 后, 病毒血症检出率和血液内病毒滴度变化见表 1。从表 1 可知, 病毒血症高峰期是病毒感染动物后第 24、48 h, 此时病毒血症检出率高, 体内病毒滴度也较高, HSV-1 感染后第 4 天血液内查不出病毒, HSV-2 则在感染后第 6 天血液内查不出病毒。

免疫荧光检查病毒分离的阳性细胞胞膜出现绿色荧光(图 1A), 电镜检查发现感染细胞内有圆形病毒颗粒, 有包膜(图 1B), 大小为 120~200 nm 左右。

3 组织内病毒的检测

病毒感染后, 组织内病毒检测见表 2。从表 2 可以看出, HSV 感染鼠组织内病毒高峰期是在感染后第 3 天以后, 不同器官病毒高峰时间不一致, 脑、神经节内, 病毒增殖在第 3 天开始达高峰, 心、肝组织在第 5 天达高峰。

表 1 HSV 感染小白鼠病毒血症的比较

Table 1 The detection of viremia in HSV infection mice

病毒 Virus	感染后不同时间病毒血症 Viremia						
	2h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
HSV-1							
检出率(%) Detection rate(%)	72.1	96.7	98.2	24.1	0	0	0
滴度 Titre(TCID ₅₀ /mL)	2.7	2.9	3.9	2.1	0	0	0
HSV-2							
检出率(%) Detection rate(%)	48.6	78.4	94.7	45.1	0	18.2	0
滴度 Titre(TCID ₅₀ /mL)	1.7	2.8	3.7	2.7	0	1.7	0

表 2 HSV 感染鼠脏器内病毒测定

Table 2 The detection of virus in HSV infection mice in tissues

实验组 Group	脏器类型 Tissues	感染后不同时间病毒滴度 Virus titre (log TCID ₅₀ /0.1mL)						
		2h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
HSV-1 感染组 HSV-1 group	脑 brain	3.1	2.4	2.8	4.7	5.1	5.7	5.7
	心 heart	—	—	1.9	2.1	—	3.1	5.0
	肝 liver	1.7	2.4	2.9	2.7	2.1	4.9	5.1
	神经节 sensory ganglia	—	—	1.7	4.4	4.7	5.1	5.9
HSV-2 感染组 HSV-2 group	脑 brain	2.1	—	—	2.7	4.1	4.9	5.1
	心 heart	—	—	—	2.5	—	2.8	1.9
	肝 liver	—	1.4	1.1	2.1	—	4.7	2.7
	神经节 sensory ganglia	1.7	2.8	3.7	2.1	—	1.7	—

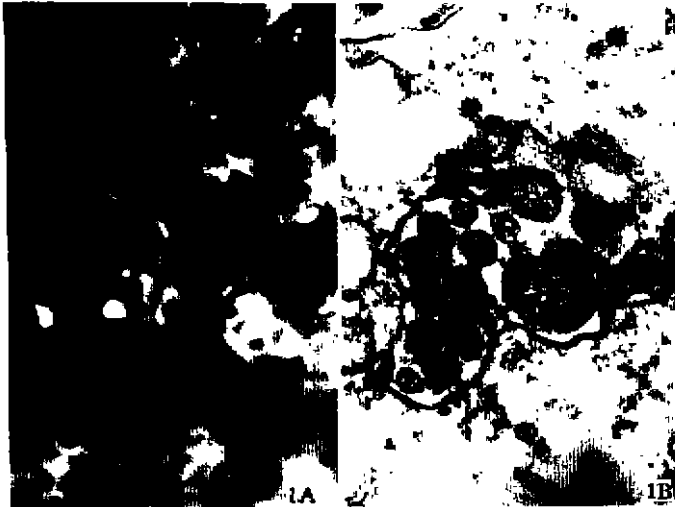


图 1 HSV 感染鼠血液内病毒的检测(A 为免疫荧光显示 HSV 感染细胞内的病毒抗原; B 为 HSV 感染细胞内的病毒颗粒, $\times 20000$)

Fig 1 Detection of virus in blood in HSV infected mice (A viral antigen and B. viral particles, $\times 20000$)

4 感染组织的电镜观察

感染鼠的主要组织(脑、心肌)出现线粒体变性坏死,粗面内质网扩张,感染组织出现空泡化是较为普遍的现象,在脑组织还可看到成熟与未成熟病毒颗粒。见图 2、图 3。



图 2 脑组织超微结构变化($\times 30000$)

Fig 2 Ultrastructure change in brain ($\times 30000$)

图 3 心肌超微结构改变($\times 8000$)

Fig 3 Ultrastructure change in heart ($\times 8000$)

讨 论

HSV 因感染部位不一致,其致病特点也不尽相同。根据 Collins 等的报道^[5],我们将 HSV-1F 株, HSV-2 333 株分别感染小白鼠,成功地复制了 HSV 的致病模型,病毒感染鼠出现规律性地发病死亡,在感染鼠的血液内可分离出病毒,感染性病毒也可在脑、心、肝、神经节中检出。电镜观察发现病毒感染鼠的组织出现超微结构改变,并可找到病毒颗粒,说明我们建立的 HSV 致病模型是成功的。HSV 致病模型的建立可用于 HSV 致病机理的研究,也为抗 HSV 药物的筛选和抗 HSV 药物的疗效评价提供了新的手段。我们已成功地将此模型用于评价大黄的抗 HSV 作用,有关大黄在体内的抗 HSV 效果将在另文介绍。

从结果还可看出,HSV-1 感染鼠的发病时间较 HSV-2 感染鼠早,且体内病毒含量亦较 HSV-2 感染鼠高,但两型病毒的发病特点(症状)并无差异。这是否为病毒型的差异仍有待深入研究。

参 考 文 献

- 1 Catalano LW, Johnson LD. Herpesvirus antibody and Carcinoma *in situ* of the cervix. *J Am Med Assoc*, 1971, 217:447-450
- 2 Stone KM, Brooks CA, Guinan ME *et al*. National survey - lance for neonatal herpes simplex virus infection: sexually transmitted disease. *J Med Virol*, 1989, 16:152-156
- 3 Hammerberg O, Watts J, Chernesky E *et al*. An outbreak of herpes simplex virus type 1 in an intensive care nursery. *Pediatric Infect Dis*, 1983, 2:290-294
- 4 杨占秋, 蒋文玲, 朱宝莲. 单纯疱疹病毒的免疫荧光点片法及其应用. *蚌埠医学院学报*, 1985, 10:175-177
- 5 Collins P, Oliver NM. Acyclovir treatment of cutaneous herpes in guinea pigs and herpes encephalitis in mice. *Am J Med*, 1982, 73(suppl):96-99

Pathogenicity of Herpes Simplex Virus on Mice

Luo Jun Liu Zhenan

(Guangzhou General Hospital of Chinese PLA Guangzhou 510010)

Yang Zhanqiu Xiao Hong Wen Lie

(Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan 430071)

The pathogenicity of herpes simplex virus (HSV) in mice was observed. The mice appears syndrome and sign after inoculation 4 days. HSV could be isolated in the blood on 2 hours postinfection. The isolation rate of HSV and level of viremia were increased on 48 hours postinfection. The distributions of HSV were different in virious tissues. The HSV titers in brain and sensory ganglion reached the peak on 72 hours postinfection, but in heart and liver on 5 days. Above results showed that the pathogenicity model of HSV can be used to search anti-HSV agents.

Key words Herpes simplex virus, Mice, Pathogenicity, Model