

裸鼠呼吸道合胞病毒感染的动物模型*

周娟, 王莉佳, 崔玉霞, 刘雪梅, 杨锡强**

(重庆医科大学儿童医院免疫研究室, 重庆, 400014)

Animal Model of Respiratory Syncytial Virus Infection in Nude Mice

ZHOU Juan, WANG Li-jia, CUI Yu-xia, LIU Xu-mei, YANG Xi-qiang**

(Children's Hospital affiliated to Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Respiratory syncytial virus (RSV) is a worldwide leading viral cause of lower respiratory tract infection in children. Immunodeficient individuals are vulnerable to severe RSV infection. No ideal animal model is available at the present time. To establish an ideal murine model, RSV was dripped in tranasally into cellular immunodeficient nude mice, then pulmonary virus was isolated and viral antigen in bronchi-alveolar lavage fluid was identified by direct immunofluorescent assay. Pulmonary viral titers detected by plaque forming assay, peaked on the 3rd day post infection, and were still detectable by the 9th day post infection. RSV antigen was mainly localized in cytoplasm of alveolus and bronchioles by immunohistochemistry assay. RSV infected nude mice developed interstitial pneumonia with prominent lymphocyte infiltration; meanwhile the virus destroyed the air-blood barrier and viral inclusions were found by electron microscopy. The numbers of leukocyte in bronchi-alveolar lavage fluid increased significantly and peaked at the 9th day post infection. All these results indicated that RSV infected nude mice showed similar patterns of viral replication and pulmonary histopathology as with infected humans, and had a high level, durative viral replication. Therefore, RSV infected nude mice appears to be a workable murine model for assessing the effect of antiviral agents against RSV.

key words: Respiratory syncytial virus; Nude mice; Animal model

摘要: 呼吸道合胞病毒 (RSV) 是全世界婴幼儿下呼吸道感染的首位病毒病原体, 免疫缺陷个体容易发生严重感染, 目前尚无理想 RSV 感染动物模型用于研究。我们用细胞免疫缺陷裸鼠感染 RSV, 旨在建立理想的动物模型, 为 RSV 感染的防治研究奠定基础。裸鼠滴鼻感染 RSV 后肺组织分离到病毒, 直接免疫荧光检测到支气管肺泡灌洗液 RSV 抗原阳性, 空斑形成实验检测肺组织病毒滴度在感染后第 3 天达高峰, 并持续到第 9 天仍能检测到病毒。免疫组化检测 RSV 抗原主要分布在细支气管、毛细支气管和肺泡上皮细胞胞浆内。肺组织病理学显示 RSV 感染导致裸鼠淋巴细胞浸润为主的肺间质性炎症, 电镜分析超微结构可见到细胞内病毒颗粒和气血屏障的破坏。支气管肺泡灌洗液白细胞计数显示裸鼠 RSV 感染炎症高峰在感染后第 9 天。裸鼠 RSV 感染的病毒复制和病理改变特点与人相似, 病毒持续高水平复制, 是客观而实用的评价抗 RSV 制剂效果的小鼠模型。

关键词: 呼吸道合胞病毒; 裸鼠; 动物模型

中图分类号: R373.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0288-06

人呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是全球婴幼儿下呼吸道感染首位病毒病原体,

几乎所有儿童两岁前感染过至少一次 RSV^[1], 免疫功能不全个体 RSV 易感性高, 容易发生严重感染

收稿日期: 2005-10-18, 修回日期: 2006-2-14

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30340045)

作者简介: 周娟 (1977-), 女, 重庆籍, 博士研究生, 研究方向小儿感染与免疫性疾病, zhoujuan1112@yahoo.com.cn

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 023-63624479, E-mail: xqyang@eta.cq.cn

甚至死亡^[2]。世界卫生组织早就将开发 RSV 疫苗列为重要发展计划,但目前仍无安全有效的疫苗和治疗药物,缺乏理想的动物模型是阻碍研究的重要原因之一^[3]。本文以 RSV 感染细胞免疫缺陷裸鼠,试图建立理想动物模型,探讨免疫缺陷个体 RSV 感染的特点。

1 材料和方法

1.1 实验动物病毒接种

无特殊病原(specific pathogen free, SPF)级、8—12 周龄、体重 18—22g、雌性裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心,饲养于重庆医科大学 SPF 级动物中心,在重庆医科大学儿童医院 P2 实验室(生物安全 2 级)进行实验。54 只小鼠随机分组,腹腔注射戊巴比妥钠 $0.06\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 麻醉后,各感染组裸鼠鼻腔缓慢滴入 $2\times 10^6\text{PFU}/\text{mL}$ RSV A2 株病毒液 $50\mu\text{L}$,滴鼻后第 1、2、3、6、9、12 天处死,每组 8 只,6 只阴性对照裸鼠鼻腔滴入 $50\mu\text{L}$ 含 2% FBS 的 DMEM 培养基,滴鼻后第 3 天处死。

1.2 组织病毒分离与细胞培养

感染组和阴性对照组裸鼠滴鼻后第 3 天无菌条件下取肺、肝、脾和肾组织,按 $10\text{ml}/\text{g}$ (wt/vol) 加入预冷组织平衡液匀浆制备组织悬液^[4], 4°C , 2500g 离心 10min,取上清接种于 Hep2 细胞,用含 2% FBS 的 1640 培养基,在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养,逐日光镜下观察细胞病变。

1.3 直接免疫荧光实验

感染组和阴性对照组裸鼠滴鼻后第 3 天处死,气管插管,用 0.5mL 预冷生理盐水灌洗 2 次,收集支气管肺泡灌洗液(BALF), 4°C , 1000g 离心 10min,取细胞沉渣涂片, 4°C 丙酮固定干燥,按 Light Diagnostics Respiratory panel 1 DFA 免疫荧光试剂盒(Chemicon, USA)说明书鉴定 RSV 抗原,荧光显微镜下观察结果。

1.4 肺组织病毒滴度分析

取感染组裸鼠感染后不同时间肺组织悬液上清,10 倍比稀释, $100\mu\text{L}$ 接种至单层致密无孔 Vero 细胞,每个浓度设复孔,未感染病毒的细胞为对照。病毒吸附 2h 后覆盖含 1.5%的琼脂糖凝胶和 2% FBS 的 1640 培养基,在 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 条件下

倒置培养 5d, $5\text{mg}/\text{mL}$ MTT 显色,空斑计数,计算病毒滴度。

1.5 免疫组织化学检查

RSV 抗原免疫组织化学检查采用 SP 染色试剂盒(北京中杉生物技术公司),一抗是针对 RSV 整个病毒抗原的山羊多克隆抗体(USBiological, USA)。取滴鼻后第 3 天感染组和阴性对照组裸鼠肺组织,4%多聚甲醛固定,常规切片,各步操作按试剂盒说明进行,DAB 显色后显微镜下观察。同一标本未滴加一抗的切片作空白对照。图像分析采用北航真彩色病理图像分析系统 4.0,平均光密度反映染色强弱。

1.6 肺组织病理学检查

取滴鼻后第 6 天、未经支气管肺泡灌洗的感染组和阴性对照组裸鼠肺组织,一部分用 4%多聚甲醛固定,常规苏木素—伊红(HE)染色,光镜观察形态结构。参照 Cimolai 的病理评分系统^[5]对肺部病理改变记分;另一部分立即用 2.5%戊二醛固定,送重庆医科大学电镜室包埋、制成超薄切片,透射电镜观察超微结构。

1.7 支气管肺泡灌洗液白细胞计数

血球计数仪计数滴鼻后第 3 天阴性对照组和不同时间感染组裸鼠 BALF 白细胞总数。BALF 细胞沉渣涂片, Wright 染色,显微镜下计数 200 个白细胞,按中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞形态学特点分类计数。

1.8 统计分析

SPSS 10.0 软件统计分析,结果用均数±标准差表示,两两组间比较用 t 检验,各组间比较用方差分析。 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 组织病毒分离

正常 Hep2 细胞呈梭形,接种感染组裸鼠肺组织悬液后 2—3 天出现特异性细胞融合病变,形成圆形、椭圆形合胞体,并有拉丝现象,证明肺组织 RSV 感染成功。感染组裸鼠肝、脾和肾脏悬液和阴性对照组肺悬液接种均未见上述典型细胞病变。

2.2 直接免疫荧光实验

感染组裸鼠 BALF 免疫染色后, 细胞浆有明亮的黄绿色荧光, 颗粒状分布, 细胞核无荧光, 提示 RSV 感染阳性。阴性对照组细胞胞浆暗红色, 无阳性荧光分布。(图 1)。

2.3 肺组织病毒滴度

裸鼠感染 RSV 后第 2 天肺内病毒滴度升高, 第 3 天达峰值(6.59 ± 0.62) \log_{10} PFU/g 后逐渐降低, 但在一定时间内维持较高水平, 第 9 天仍能测到肺组织病毒 (3.14 ± 1.41) \log_{10} PFU/g, RSV 感染

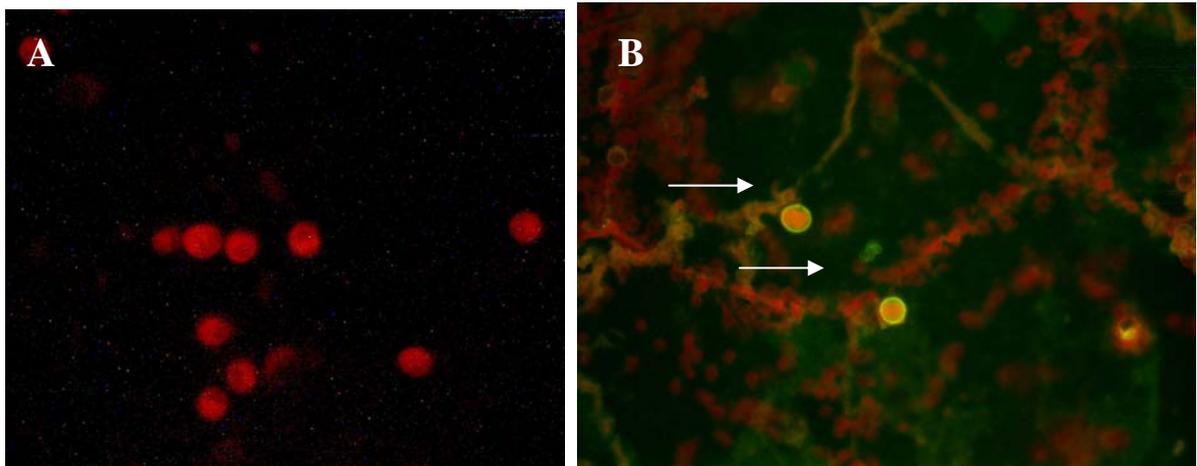


图 1 裸鼠 BALF RSV 抗原直接免疫荧光检测

Fig.1 RSV antigen identification by direct immunofluorescent in BALF of nude mice

A showed control nude mice without positive fluorescence. B showed RSV infected nude mice, and arrows directed the bright apple-green fluorescence of positive RSV antigen.

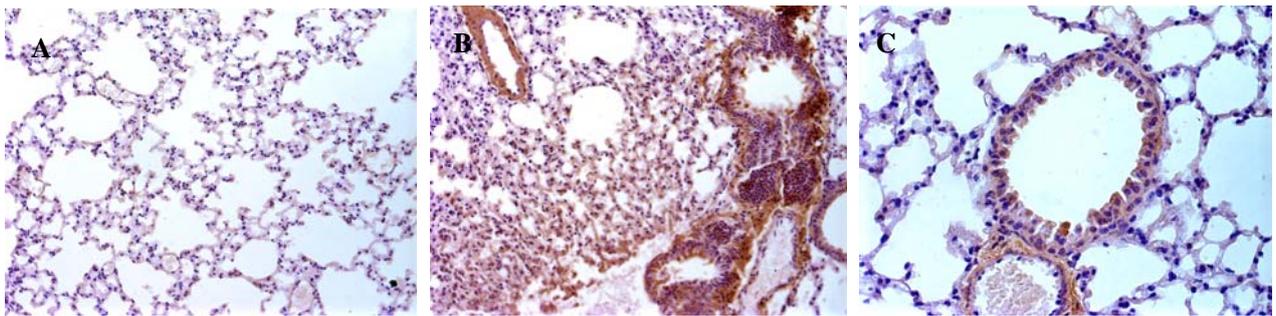


图 3 肺组织 RSV 抗原免疫组化

Fig.3 Pulmonary RSV antigen detected by immunohistochemistry.

A showed control nude mice without positive stain, B showed RSV infected nude mice with brown positive stain, C showed RSV antigen localized in pulmonary epithelium cytoplasm of infected nude mice.

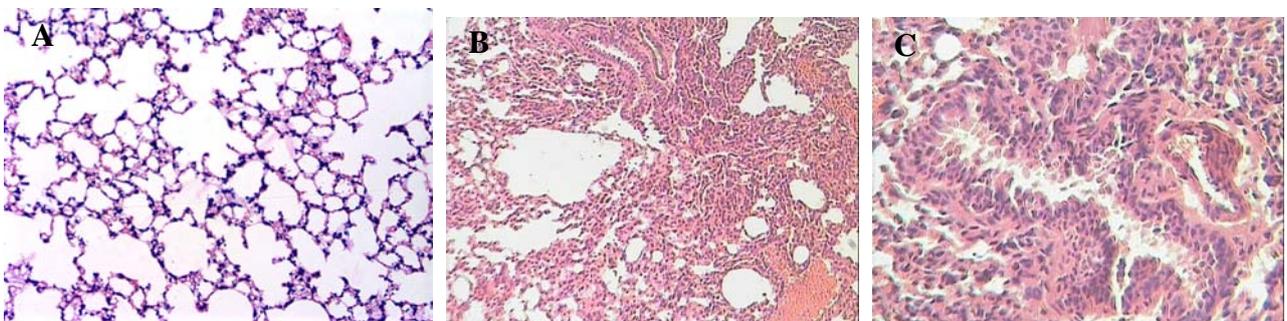


图 4 肺组织病理学 H.E 染色

Fig.4 Pulmonary histology assay by H.E stain

A showed control nude mice, B showed RSV infected nude mice, C showed severe bronchioles epithelial swell and extensive lymphocytes infiltration of infected nude mice.

裸鼠肺组织时间-滴度曲线如图 2。阴性对照裸鼠肺组织悬液实验没有空斑形成, 检测不到病毒。

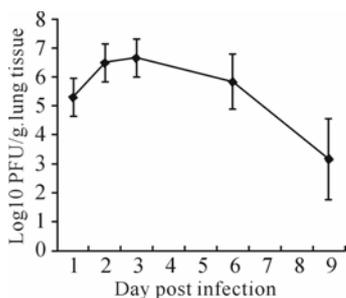


图 2 RSV 感染裸鼠肺组织病毒滴度

Fig.2 Pulmonary RSV titers of infected nude mice

Horizontal axis showed day post RSV infection, vertical axis showed pulmonary viral titers denoted by \log_{10} PFU/g lung tissue weight.

2.4 RSV 抗原免疫组织化学检查

RSV 感染裸鼠肺组织病毒抗原免疫组化呈棕黄色阳性反应, 染色平均光密度 0.227 ± 0.085 明显高于阴性对照裸鼠 0.008 ± 0.003 , $P < 0.05$ 。RSV 抗原主要分布在细支气管、毛细支气管和肺泡上皮细胞胞浆内, 在毛细血管周围与上皮细胞交界处也有分布。病变轻的上皮细胞完整, 阳性染色沿气道壁规则分布; 严重感染的上皮细胞坏死脱落, 阳性染色分布不均匀, 管腔内有形态不规则的脱落阳性上皮细胞。(图 3)

2.5 肺组织病理学检查

光镜观察阴性对照裸鼠细支气管和肺泡结构清晰, 无炎症细胞浸润, 感染组裸鼠肺组织大量炎症细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 其次单核细胞和中

性粒细胞, 偶见嗜酸性粒细胞, 在小气道和血管周围间质成套状浸润。毛细支气管和肺泡壁肿胀显著时甚至压闭肺泡腔, 肺泡隔断裂, 红细胞漏出。感染组裸鼠肺组织病理评分 18.79 ± 2.97 , 显著高于阴性对照裸鼠 0.59 ± 0.06 , $P < 0.01$ 。(图 4)

电镜观察阴性对照裸鼠肺组织气血屏障薄而清晰, I 型肺泡细胞扁平而宽大, 内皮结构完整, 圆形的 II 型肺泡细胞有短小微绒毛, 胞质内较多同心圆样板层小体。感染组裸鼠气血屏障破坏, I 型肺泡细胞肿胀明显, 含大量吞饮小泡, 内皮结构不完整, II 型肺泡细胞线粒体肿胀变形, 板层小体结构松散细胞器结构破坏甚至消失, 部分感染细胞胞质内可见圆形、椭圆形, 直径约 150—200nm 的病毒颗粒。(图 5)

2.6 支气管肺泡灌洗液白细胞计数

阴性对照裸鼠 BALF 白细胞数目少, 分类以单核细胞为主, 与之比较, 感染组裸鼠 BALF 白细胞总数明显升高, 在感染后第 9 天达峰值后下降, 分类以淋巴细胞为主。感染组裸鼠 BALF 白细胞亚群分类淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞分别在感染后第 6 天、第 12 天和第 6 天最高, 在第 12 天感染组裸鼠白细胞亚群分类与阴性对照组没有显著区别(表 1)。

表 1 BALF 白细胞计数及分类计数 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 leukocyte and subgroup cell count in BALF ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Number	Total leukocytes ($\times 10^5$)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)
Control mice	4	0.28 ± 0.16	22.38 ± 5.49	70.23 ± 53.21	6.45 ± 4.28	0.94 ± 0.57
Infected mice PID3	5	$24.84 \pm 10.32^{\#}$	$70.23 \pm 34.56^{\#}$	$20.31 \pm 12.63^{\#}$	$7.56 \pm 4.30^{\#}$	1.91 ± 1.76
Infected mice PID6	6	$42.56 \pm 14.78^{\#}$	$75.45 \pm 38.79^{\#}$	$12.65 \pm 5.78^{\#}$	10.38 ± 7.41	1.51 ± 1.27
Infected mice PID9	4	$55.49 \pm 17.57^{\#}$	$71.23 \pm 40.13^{\#}$	$15.23 \pm 5.49^{\#}$	8.94 ± 4.76	$4.60 \pm 2.37^{\#}$
Infected mice PID12	4	$20.34 \pm 9.67^{\#}$	39.23 ± 16.79	49.61 ± 19.56	9.84 ± 4.91	1.32 ± 0.98

Note: $^{\#}$ denoted value of $P < 0.05$ compared with nude control mouse. PID stand for post infection day.

3 讨论

RSV 是婴幼儿时期最常见下呼吸道感染原, 每年住院治疗的 50%~75% 婴幼儿毛细支气管炎和 25%~40% 的肺炎是其直接引起。早产儿、老年人和化疗的肿瘤患者等免疫功能不全的个体易发生

RSV 严重感染, 骨髓移植后感染病死率高达 50%^[6]。我们以细胞免疫缺陷的裸鼠建立 RSV 感染动物模型, 为 RSV 感染发病机制和抗 RSV 药物和疫苗的研究提供手段。

我们通过 RSV 感染裸鼠肺组织病毒分离发现特异性合胞体, BALF 病毒抗原免疫荧光阳性证明

气道感染成功,但在 RSV 感染裸鼠肝、脾、肾组织未能分离到病毒,说明 RSV 特异性定植于裸鼠气道上皮粘膜,在其他组织不能复制,这与 BALB/c 鼠和人类 RSV 感染相同⁽⁷⁾。因为 RSV 这种单纯气道感染形式,抗 RSV 制剂适合气道给药途径,药物直接在靶器官浓集,也减少在其他器官的分布和系统毒副作用。RSV 感染裸鼠肺组织病毒滴度动态分析发现,病毒复制高峰在感染后第 3 天,达

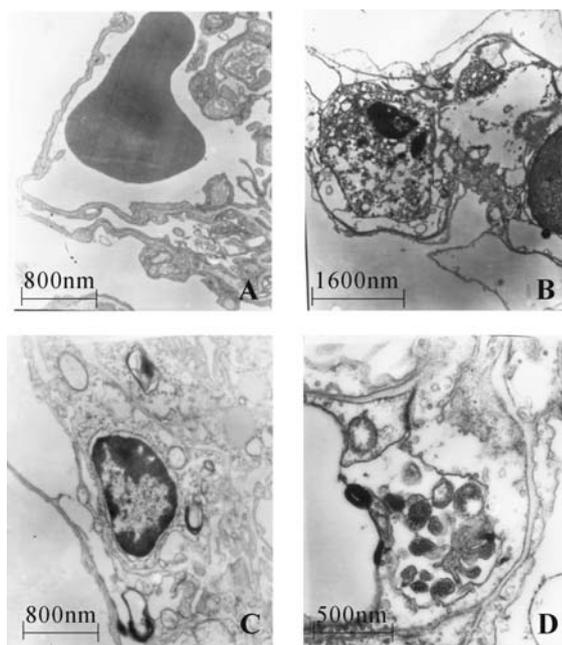


图5 肺组织电镜检查

Fig.5 Pulmonary electron microscope assay

A showed normal air-blood barrier of control nude mice (bar=800nm), B showed severely destroyed air-blood barrier of RSV infected nude mice (bar=1600nm), C showed distorted type II alveolar cell of RSV infected nude mice (bar=800nm), D showed round or ellipse viral inclusions in epithelium of RSV infected nude mice directed by the arrows (bar=500nm).

10^6 PFU/g 水平, 并且持续较长时间, 第 9 天仍能检测到肺组织病毒滴度在 10^3 PFU/g 水平, 而普通 BALB/c 鼠感染 RSV 第 7 天就检测不出肺组织病毒滴度^[4, 8, 9], 裸鼠由于没有细胞免疫对病毒的清除作用, 病毒复制持续时间更长。

免疫组织化学定位检测 RSV 抗原主要分布在感染裸鼠细支气管、毛细支气管、肺泡上皮以及周围的血管间质, 气道腔内有 RSV 抗原阳性的脱落上皮细胞, 说明 RSV 感染可直接引起气道损伤。RSV 感染裸鼠 BALF 动态分析发现炎症细胞数在第 9 天达高峰, 以淋巴细胞为主, 说明 RSV 感染裸鼠气道炎症高峰滞后于病毒复制高峰。RSV 感染主要导致淋巴细胞、单核细胞浸润的肺间质性炎症, 这与人、灵长类动物和其他啮齿类动物 RSV 感染的炎症病理类型是一致的^[10, 11]。电镜超微结构分析可见 RSV 感染裸鼠肺泡上皮细胞内的病毒颗粒, 气血屏障的破坏, 导致气体交换功能的障碍。

从 RSV 发现至今, 人们已采用黑猩猩、猕猴、雪貂、牛、棉鼠、豚鼠和小鼠等动物建立感染模型。黑猩猩、猕猴等灵长类动物感染 RSV 与人有相似的临床症状, 但由于稀少而珍贵, 广泛应用困难; 不同年龄组雪貂 RSV 复制能力差别大, 稳定性差;

牛只对牛 RSV 敏感, 而牛 RSV 与人 RSV 同源性并不高^[11, 12]。小鼠是目前应用最广泛的实验动物, 它易获得, 遗传背景清楚而均一, 基因改造技术成熟, 已有多种商品化试剂。但小鼠不是 RSV 自然宿主, 普通 BALB/c 鼠感染 RSV 后肺内病毒滴度水平低, 下降快, 带毒时间短, 该模型用于抗 RSV 制剂的研究时, 由于病毒滴度本身随时间自然下降明显, 不能客观评价抗 RSV 的效果^[4, 13, 14]。我们用裸鼠建立 RSV 感染模型, 它既具有普通小鼠的优势, 又有 RSV 持续高水平的复制, 在抗 RSV 制剂的研究中能延长观察时间、增大病毒滴度变化幅度, 较客观的评价抗病毒效果, 减少机体免疫应答对病毒清除作用和病毒感染自限性的干扰, 是较理想的 RSV 感染小鼠模型。

综上所述, 我们用裸鼠建立 RSV 感染动物模型, 通过病毒分离、病毒抗原检测和病毒滴度分析等多种方法证明感染成功。RSV 感染裸鼠的病毒组织、细胞定位, 病理改变类型与人是一致的, 与其他非啮齿类动物模型比较实用性更强, 与普通小鼠模型比较病毒复制水平更高、更持久, 是客观评价抗 RSV 制剂效果和研究免疫功能不全个体 RSV 感染的有效手段。

References

- [1] Black C P. Systematic Review of the Biology and Medical Management of Respiratory Syncytial Virus Infection [J]. *Respiratory Care*. 2003, 48 (3) : 209-233.
- [2] Meissner H C, Rennels M B, Pickering L K, *et al*. Risk of severe respiratory syncytial virus disease, identification of high risk infants and recommendations for prophylaxis with palivizumab [J]. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23 (3) : 284-285.
- [3] Schmidt A C, Johnson T R, Peter J M, *et al*. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium-RSV 2003 [J]. *Virus Research*. 2004, 106 : 1-13.
- [4] Lian G L, Yu H G, Zhao X D, (廉国利, 俞海国, 赵晓东) *et al*. Establishment of respiratory syncytial virus infection model in mice [J]. *Journal of Xi'an Medical University (Chinese)*, 2003, 24 (4) : 329-332.
- [5] Cimolai N, Taylor G P, Mah D *et al*. Definition and application of a histopathological scheme for an animal model of acute *Mycoplasma pneumoniae* pulmonary infection [J]. *Microbial Immunol*, 1992, 36 (5): 465-478.
- [6] Ottolini M G, Curtis S R, Mathews A, *et al*. Palivizumab is highly effective in uppressing respiratory syncytial virus in an immune-

- osuppressed animal model [J]. Bone Marrow Transplant. 2002, 29 (2) :117-120.
- [7] Ogra P L, From chimpanzee coryza to palivizumab : changing times for respiratory syncytial virus [J]. *Pediatr Infect Dis J*. 2000, 19 (8) : 774-779.
- [8] Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejias A et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice [J]. *J Infect Dis*. 2004; 189 (10) : 1856-1865.
- [9] van Schaik S M, Enhorning G, Vargas I, Welliver R C. Respiratory syncytial virus affects pulmonary function in BALB/c mice[J]. *J Infect Dis*. 1998; 177 : 269-276.
- [10] Domachowske J B, Bonville C A, Rosenberg HF. Animal Models for Studying Respiratory Syncytial Virus Infection and Its Long Term Effects on Lung Function [J]. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23 (11) : S228-S234.
- [11] McArthur-Vaughan K, Gershwin L J. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection [J]. *J Med Primatol*. 2002; 31(2) : 61-67.
- [12] Byrd L G, Prince G A. Animal models of respiratory syncytial virus infection [J]. *Clin Infect Dis*. 1997, 25: 1363-1368.
- [13] Nguyen H, Hay J, Mazzulli T, et al. Efficient generation of respiratory syncytial virus (RSV) -neutralizing human MoAbs via human peripheral blood lymphocyte (huPB L)-SCID mice and scFv phage display libraries [J]. *Clin Exp Immunol*. 2000,122 (1) : 85-93.
- [14] Ottolini M G, Porter D D, Hemming V G, et al. Effectiveness of RSVIG prophylaxis and therapy of respiratory syncytial virus in an immunosuppressed animal model. *Bone Marrow Transplant* [J]. 1999, 24 (1) : 41-45.