

人巨细胞病毒先天性潜伏感染再激活致老年小鼠肝脏的损伤

胡雪影, 王明丽

■背景资料

近几年关于人巨细胞病毒感染与婴幼儿肝炎之间的关系已经确立, 但其发生的机制尚不明确, 对于疾病的诊断、治疗、预防及其前瞻性研究尚有待探索。

胡雪影, 王明丽, 安徽医科大学微生物学教研室 安徽省合肥市 230032

胡雪影, 2004级安徽医科大学硕士生。

教育部科学技术研究重点项目, No. 01052

安徽省“十五”生物医药重大科技专项, No. 01303003

通讯作者: 王明丽, 230032, 安徽省合肥市, 安徽医科大学微生物学教研室. wangmlli@mail.hf.ah.cn

电话: 0551-5123422 传真: 0551-5123422

收稿日期: 2006-03-04 接受日期: 2006-03-29

Study on liver damage induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus in aged mice

Xue-Ying Hu, Ming-Li Wang

Xue-Ying Hu, Ming-Li Wang, Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Supported by the Key Item of Science and Technology from Ministry of Education, No. 01052, and the Important Special Item of Biological Medicine in the Tenth Five-Year Plan of Anhui Province, No. 01303003

Correspondence to: Ming-Li Wang, Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. wangmlli@mail.hf.ah.cn

Received: 2006-03-04 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To establish the model of liver damage induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus (HCMV) in aged mice, and to explore the pathogenic mechanism of HCMV reactivation.

METHODS: Firstly, the mouse model of congenital latent HCMV infection was established. After raised in specific pathogen free (SPF) barrier system for 18 mo, 9 offspring mice served as cell controls and 18 were taken out for experiment, half of which were treated with cyclophosphamide to reactivate the HCMV infection. The mice without HCMV infection were used as normal controls. All the mice were sacrificed to obtain liver tissues for virus isolation, polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription PCR (RT-PCR) and HE staining.

RESULTS: HCMV was isolated from the supernatant of liver tissue homogenate only in the group of infection- reactivated mice. HCMV DNA was detected by PCR in the supernatant of cell culture with cytopathogenic effect (CPE). Pathological changes in liver consisted of swollen cytoplasm, destroyed nuclei of hepatocytes, distinct intranuclear inclusion in the hepatocytes, and predominant infiltration of phagocytic cells. HCMV DNA was found by PCR in the group of infection-reactivated and latently-infected mice, but HCMV mRNA was only found in the group of infection-reactivated mice by RT-PCR.

CONCLUSION: Reactivation of congenital latent HCMV infection can induce liver damage in mice.

Key Words: Human cytomegalovirus; Infection reactivation; Liver; Infant hepatitis syndrome

Hu XY, Wang ML. Study on liver damage induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus in aged mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(12):1146-1150

摘要

目的: 建立HCMV先天性潜伏感染再激活致肝脏损伤的BALB/c老年小鼠模型, 初步探讨HCMV潜伏再激活感染的致病机制。

方法: 建立HCMV先天性感感染小鼠的模型, 将子代小鼠饲养于SPF级屏障系统中18 mo后, 从子代小鼠中分别取病毒感染组18只、细胞对照组9只, 随机将病毒感染组中半数进行环磷酰胺激活, 建立HCMV潜伏再激活感染鼠模型, 按照实验设计分别处死细胞对照组、病毒潜伏组和病毒潜伏再激活组小鼠, 无菌取出小鼠肝组织, 进行病毒分离、PCR、RT-PCR及HE染色。

结果: 潜伏再激活组小鼠的肝组织匀浆上液中分离出HCMV, 在病毒分离出现细胞病变

效应(CPE)的细胞培养液中检测HCMV DNA; HE染色证实肝组织有炎性改变, 肝细胞肿大, 核内有嗜酸性包涵体等; PCR检测到HCMV DNA, RT-PCR检测到组织中HCMV mRNA. 病毒潜伏组仅PCR检测到HCMV DNA, 其它与细胞对照组一样均是阴性.

结论: HCMV先天性潜伏感染再激活导致肝脏病理损伤.

关键词: 人巨细胞病毒; 潜伏再激活感染; 肝脏; 婴儿肝炎综合症

胡雪影, 王明丽. 人巨细胞病毒先天性潜伏感染再激活致老年小鼠肝脏的损伤. 世界华人消化杂志 2006;14(12):1146-1150
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1146.asp>

0 引言

人巨细胞病毒(HCMV)感染非常普遍, 多数感染者是先天性感染或围生期感染且感染率很高. 有报道肝脏是婴幼儿时期HCMV感染的重要靶器官之一, 可以引起肝脏的不同疾病, 其中最常见的是婴儿肝炎综合征^[1], 除少数可能出现严重的肝功能损害外, 大多数婴幼儿预后较好, 但是当机体痊愈后, 大部分的病毒并没有从机体清除, 而是以基因组或者部分基因转录产物的形式长期或者终身潜伏于各种器官, 其中肝脏是HCMV易侵犯、潜伏的重要器官之一^[2]. 此种潜伏状态可以被外来的刺激因素所激活而形成复发性感染, 从而导致免疫功能尚未成熟或低下的机体器官的损伤, 表现出明显的临床症状. 汤正好 *et al*^[3]采用HCMV接种至成年Balb/c雌雄鼠腹腔后配对喂养, 成功建立了HCMV先天性感染胎鼠致肝脏损伤的小鼠模型, 初步探讨了HCMV可以通过胎盘造成胎鼠的先天性感染, 导致肝脏损伤, 并与母体感染的病毒量有关. 但呈HCMV潜伏感染状态的老年小鼠在使用免疫抑制剂的情况下, 病毒对肝脏组织是否有损伤的研究, 目前国内外尚无报道. 因此在本次研究中通过建立HCMV先天性潜伏再激活感染致肝脏损伤的Balb/c小鼠模型, 为进一步研究人类HCMV潜伏感染至中老年时期再激活对肝脏损伤的研究提供有价值的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 主要化学和分子生物学试剂分别购自Sigma公司、Promega公司等, HCMV UL83基因PCR引物利用Primer5.0软件设计, 并由上海生

工生物工程技术服务有限公司合成: sense: 5'-G AATTCACCGTGGAACTGCGTCAGT-3'; anti-sense: 5'-CTCGAGACCCTGAACCGTAGCCA-3'. 莱卡倒置荧光显微镜(Leica 德国)、基因扩增仪(Hema8000, 珠海黑马医学仪器有限公司)、紫外凝胶成像系统(BioSens SC720型)等. 6-8代的人成纤维细胞株(HF), 安徽医科大学微生物学教研室制备. HCMV AD169株由上海复旦大学医学院微生物学教研室提供, 使用前进行病毒复苏及增毒. 参照文献[2], 建立HCMV先天性感染小鼠的模型, 将子代小鼠(病毒感染组、细胞对照组)饲养于SPF级屏障系统中18 mo, 期间小鼠生长、发育状况正常, SPF级屏障系统由上海市实验动物质量监督检验站检测. 本次实验从子代小鼠中分别取病毒感染组18只、细胞对照组9只. 随机将病毒感染组中半数进行环磷酰胺激活, 建立HCMV潜伏再激活感染鼠模型, 病毒潜伏再激活组即病毒感染组小鼠按照实验计划ip环磷酰胺(剂量150 mg/kg, 每6 d 1次, 共3次), 观察各组小鼠的行为学改变情况及体质量变化, 最后一次激活后6 d颈椎脱臼处死动物, 立即取肝脏标本进行有关检测.

1.2 方法 参照文献[4]病毒分离, 无菌取小鼠肝脏, 将其制备成 1×10^9 /L肝细胞悬液, 取细胞悬液接种到已经长满单层HF细胞的12孔培养板内, 37℃吸附1 h后, 置37℃、50 mL/L CO₂培养箱培养, 同时设正常细胞对照及HCMV AD169株阳性对照(各组均做3孔). 24 h后换维持液, 1 wk后盲传, 每周1次, 共3次. 观察细胞病变效应(CPE), 对出现特征性CPE者, 取上清液检测HCMV DNA. 按常规碱裂解法抽提小鼠肝组织及细胞中的DNA, 并以此为模板进行PCR扩增(条件: 95℃ 2 min, 95℃ 1 min, 62℃ 45 s, 72℃ 1 min, 72℃ 10 min, 30个循环), 将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 经紫外透射仪观察凝胶电泳情况后, 再利用紫外凝胶成像系统拍照、记录. 按常规方法进行抽提小鼠肝组织中的RNA, 按试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA后, 再进行PCR扩增、电泳检测等. 另在冰盘上无菌取出老年小鼠肝组织, 常规经40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE染色, 中性树胶封片. 用显微镜(OLYMPUSBX-50)观察后用PM-20型显微摄像系统照相.

统计学处理 用SPSS 11.0软件对实验数据进行录入统计, 结果以mean±SD表示, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义.

■创新盘点

本次研究选用了SPF级BALB/c老年小鼠作为HCMV潜伏感染模型, 并通过环磷酰胺(一种氮芥类细胞毒药物)进行再激活, 该模型状态与中老年人群易患的疾病(如肿瘤、感染等)及其进行的一些特殊治疗所引起机体免疫系统的损伤状态一致.

■应用要点

长期以来,人们一直采用鼠巨细胞病毒(MCMV)感染小鼠来制作HCMV感染的动物模型,但小鼠自然感染MCMV后不能像HCMV一样通过胎盘引起胎鼠的先天性感染。本研究中所建立的模型成功的解决了以上问题,为HCMV致病机制的研究提供可靠的平台。

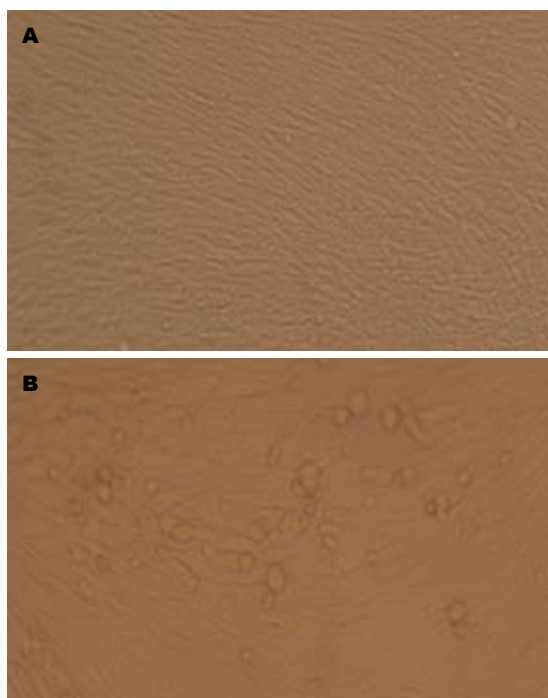


图1 肝组织病毒分离(×100). A: 正常; B: HCMV CPE.

2 结果

细胞对照组与病毒潜伏组小鼠无异常表现,病毒潜伏再激活组小鼠表现竖毛、饮食减少、活动减少、精神萎靡、反应迟钝等,小鼠平均体重明显低于对照组($P<0.01$),有统计学意义。

2.1 肝组织病毒分离鉴定 细胞对照组及病毒潜伏组小鼠的肝组织匀浆过滤后接种HF细胞,2 wk内未观察到HCMV特征性CPE,盲传3代后,CPE仍为阴性。用HCMV特异性引物扩增后,未见特异性条带,病毒潜伏激活组肝组织匀浆接种HF细胞后3 wk左右,HF细胞开始肿胀、核变大,形成巨核细胞,病变在3-4 wk时最明显,呈局灶性(图1A-B),用HCMV特异性引物扩增后,可见特异性条带。

2.2 小鼠PCR及RT-PCR结果 病毒潜伏组激活前后小鼠肝组织在516 bp处均可以检测到UL83基因(序列位点1006-1522)特异性条带,细胞对照组PCR均为阴性(图2A); RT-PCR产物凝胶电泳中只有病毒潜伏激活组肝组织在516 bp处显示有HCMV UL83基因的转录产物存在(图2B)。

2.3 小鼠肝组织HE染色结果 病毒潜伏再激活组小鼠肝脏肿大、呈暗红色;病毒潜伏组与细胞对照组小鼠肝脏呈粉红色、大小同正常小鼠肝脏。将各组胎鼠组织进行苏木精-伊红染色发现,潜伏再激活组小鼠肝组织内呈明显炎性改变、肝小叶结构紊乱、部分肝细胞肿胀、空泡

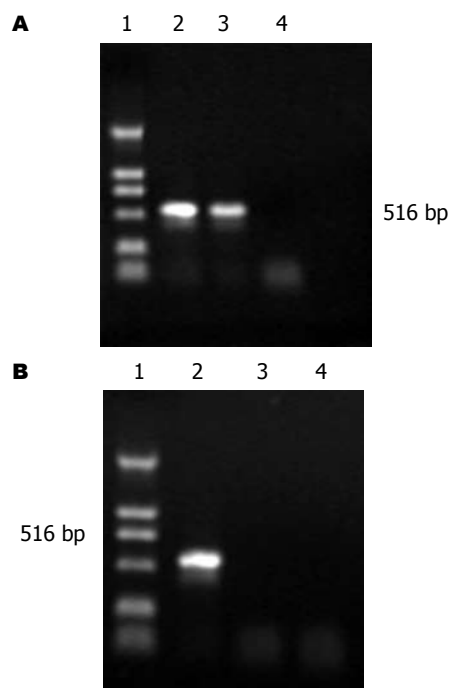


图2 肝组织UL83产物. A: PCR; B: RT-PCR. 1: Marker(2000 bp); 2: 病毒潜伏再激活组肝组织; 3: 病毒潜伏组肝组织; 4: 细胞对照组肝组织。

变性、核内有嗜酸性包涵体、部分肝细胞呈坏死、肝窦明显充血等表现(图3C);病毒潜伏组肝组织轻度炎性改变,肝小叶结构紊乱程度相对较轻,肝细胞轻度肿胀,但未发现核内包涵体,肝细胞坏死亦不明显(图3B);细胞对照组肝小叶结构清晰,排列整齐,无明显炎性改变(图3A)。

3 讨论

HCMV感染在全世界不同种族人群中都是普遍存在的,其感染率高达70%-100%^[5],而在老年人中HCMV感染率几乎为100%。在免疫功能正常个体,经过一段时间后转为潜伏感染,大多数感染是亚临床型,但在免疫缺陷的人群(如器官移植、艾滋病感染、应用免疫抑制剂或抗代谢药物等)能引起严重的疾病^[6-8]。因此HCMV感染严重地危害人类的健康,影响到我国人口素质的提高。众所周知,在我国目前有1.32亿60岁以上的老人,占总人口的10%以上,并且老人的数量以每年3.2%的速度在增加,如何提高老年人的生活质量已经是一个很严峻的问题,因此HCMV潜伏再激活感染致病机制的探索有重要的理论和临床意义。

我们选用了SPF级BALB/c老年小鼠作为HCMV潜伏感染模型,并通过环磷酰胺(一种氮芥类细胞毒药物)进行再激活,环磷酰胺对机体

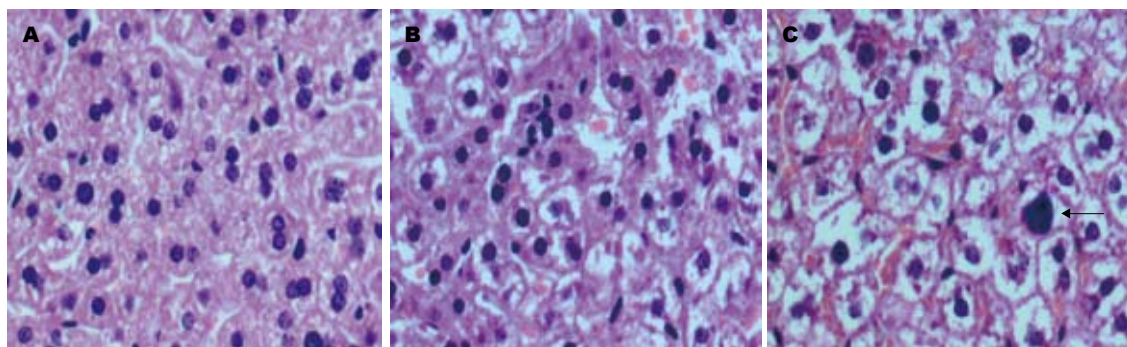


图3 小鼠肝组织病理(HE × 400). A: 细胞对照组; B: 病毒潜伏组; C: 病毒潜伏再激活组.

的细胞免疫及体液免疫都有一定的抑制作用^[9]. 当病毒潜伏组小鼠腹腔注射环磷酰胺后, 机体的体液免疫及细胞免疫均受到抑制, 尤其当细胞毒性T淋巴细胞及自然杀伤细胞数目减少时, 潜伏的病毒基因就会被激活、产生大量有传染性的病毒颗粒^[10], 继而引起肝脏的损伤. 另外, SPF级小鼠饲养在屏蔽系统中, 实行严格的微生物控制, 从而排除了其他可能病原的干扰; Balb/c系是小鼠近交系动物, 具有遗传均质性、反应一致性的优点^[11]; 老年小鼠可以模拟人类中老年的机体状态, 这类人群整个机体免疫功能与年轻人相比较差. 因此这类人群易患的疾病(如肿瘤、感染等)及对其进行的一些特殊治疗所引起机体免疫系统的损伤与HCMV潜伏感染再激活状态一致. 因此, 该模型的建立为研究HCMV先天性潜伏感染到老年期再激活的致病机制、药物筛选及疫苗的研制和应用提供了可靠的实验平台.

在本实验中, 因为潜伏感染阶段体内没有感染性子代病毒颗粒产生, 但在潜伏感染的细胞内可发现以不同形式存在于细胞核内的病毒基因组, 因此病毒分离阴性、RT-PCR也没有检测到HCMVRNA, 但组织PCR能检测出HCMV DNA. 在潜伏再激活感染阶段, HCMV被激活、并复制大量传染性病毒颗粒, 导致机体器官的损伤. 因此激活组小鼠病毒分离在3 wk左右, HF细胞开始肿胀、核变大、形成巨核细胞, 病变在3-4 wk时最明显, 呈局灶性, 用HCMV特异性引物扩增后, 电泳可见特异性条带(516 bp); 组织RT-PCR检测出HCMV RNA; 小鼠肝组织HE染色结果出现明显的病理变化, 肝组织有炎症改变、肝细胞肿胀、空泡变性、核内有嗜碱性包涵体、部分肝细胞呈坏死表现等. 对实验结果进行综合分析, 说明潜伏感染的HCMV在使用环磷酰胺激活后, 能够导致HCMV的生产性感染, 这为现在临床病人免疫功能低下、

AIDS、器官移植等患者并发HCMV感染提供理论解释, 为人类临床研究HCMV与老年肝脏疾病之间的关系提供参考. 但是HCMV潜伏再激活具体的致病机制目前尚不清楚, 还需要进一步的研究、探索.

对于婴儿肝炎综合征患儿及HCMV潜伏感染的人群, 在其免疫功能正常时不表现出任何临床症状, 但并不能排除这类人群具有HCMV再激活感染的风险, 当其步入中老年伴有机体免疫功能降低或丧失时, 临床医生应当考虑到监测HCMV的感染情况, 合理使用免疫抑制剂及一些抗病毒药物, 做到早诊断、早治疗.

4 参考文献

- 1 Shibata Y, Kitajima N, Kawada J, Sugaya N, Nishikawa K, Morishima T, Kimura H. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 771-777
- 2 方峰, 董永绥, 魏晴, 刘双义. 巨细胞病毒所致婴儿肝脏损害的前瞻性研究. *中华儿科杂志* 1995; 33: 350-351
- 3 汤正好, 王明丽, 袁中玉, 李京培. 人巨细胞病毒先天性感染胎鼠致肝脏损伤的小鼠模型. *中华传染病杂志* 2001; 19: 338-341
- 4 王明丽, 曹慧, 史百芬, 李京培, 张广民, 聂红先, 何家艾. 特发性血小板减少性紫癜与HCMV活动性感染. *安徽医科大学学报* 1996; 31: 16-18
- 5 Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2006; 259: 219-246
- 6 Kottaridi C, Ploumidis G, Grapsas E, Feretis C, Benakis P, Filalithis P, Bouzarelou D, Nasioulas G. Elucidation of cytomegalovirus disease recurrence in an HIV-1-positive patient. *J Gastroenterol* 2003; 38: 643-646
- 7 Ambrose A, Zemlicka J, Kern ER, Drach JC, Gullen E, Cheng YC. Phosphoralaninate pronucleotides of pyrimidine methylenecyclopropane analogues of nucleosides: synthesis and antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005; 24: 1763-1774
- 8 Mizuta M, Schuster MG. Cytomegalovirus hepatitis associated with use of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1071-1072

■名词解释

1 潜伏感染: 当机体初次感染HCMV后, 在机体免疫系统保护性下, 体内的病毒将被局限或者清除, 但是通常不能被完全清除, 在潜伏感染的细胞内可发现以不同形式存在于细胞核内的病毒基因组及部分转录产物, 但此时患者体内没有感染性子代病毒产生.

2 潜伏再激活感染: 潜伏状态可以被外来的刺激因素所激活而形成复发性感染, 从而导致免疫功能尚未成熟或低下的个体表现出明显的临床症状.

■同行评价

本文通过PCR, RT-PCR, 病毒分离及HE染色从基因、细胞、组织学方面分析了先天性潜伏感染和再激活感染状态下HCMV复制和基因表达以及对宿主的致病作用, 有助于HCMV感染所致婴儿肝炎综合征的发病基础研究.

- 9 Ma J, Wang YL, Hu HM, Fox BA, Si LS. Mechanism of augmented anti-tumor immunity in reconstituted lymphopenic mice immunized with melanoma vaccine. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 708-712
- 10 Soderberg-Naucler C, Streblow DN, Fish KN, Allan-

Yorke J, Smith PP, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J Virol* 2001; 75: 7543-7554

- 11 魏泓. 医学实验动物学. 第1版. 成都: 四川科学技术出版社, 1998: 24-30

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间