

轮状病毒感染 BALB/c 乳鼠乳糖不耐受模型的建立

章孝成¹, 丁锐², 张晓燕¹, 韩毛振², 黄升海^{1, 2}

摘要 通过轮状病毒(RV)灌胃感染 SPF 级 7 日龄 BALB/c 乳鼠,同时设立 PBS 阴性对照组和正常对照组,所有鼠均饲养在 SPF 级动物房,每日观察乳鼠腹泻情况。分别于接种后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 每组各处死 5 只乳鼠,在无菌环境中取乳鼠的小肠组织,通过 qPCR 方法检测病毒含量,HE 染色观察并检测乳鼠小肠组织中 RV 载量及其组织病理变化,试剂盒检测乳糖酶活力。RV 在感染第 1 天乳鼠的小肠组织中检测出病毒且相对含量表达较高;感染后前 3 d 出现严重腹泻;HE 染色可见乳鼠的小肠组织有损坏,小肠绒毛脱落,长度变短。PBS 阴性对照组和正常对照组对应结果均为阴性;乳糖酶活力检测较 PBS 阴性对照组和正常对照组降低。因此,建立 RV 感染 BALB/c 乳鼠继发性乳糖不耐受动物模型,为研究乳糖不耐受症的发病机制及药物干预提供有力保障。

关键词 轮状病毒; BALB/c 鼠; 乳鼠; 继发性乳糖不耐受

中图分类号 R 373.2

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020)12 - 1964 - 05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.12.029

乳糖不耐受症(lactose intolerance, LI)是由机体内乳糖酶缺乏所引起,症状为腹部不适、胀气、和腹泻等。LI 是由于机体内乳糖酶缺乏而引起的腹部不适、胀气和腹泻等临床症状。目前 LI 是影响儿童营养不良、发育迟缓的重要疾病,全球许多人群面临不同程度的 LI,严重影响人们的生活质量^[1-2]。继发性乳糖不耐受(secondary lactose intolerance, SLI)是一种暂时性 LI,常继发于肠道各种病毒或寄生虫感染性疾病、克罗恩病或放射性肠炎等,使肠绒毛受损而出现乳糖酶的缺乏,发生 LI 腹泻;待绒毛恢复能分泌足量乳糖酶后疾病有所恢复^[3]。目前,SLI 的发生机制研究并不完善,主要原因是缺乏相关的 SLI 动物模型。该文通过构建轮状病毒(rotavirus, RV)

感染 7 日龄 BALB/c 乳鼠 SLI 模型,为 SLI 的研究提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与病毒株 恒河猴胚胎肾细胞 MA104 细胞株、轮状病毒 VR-2018 病毒株均购自武汉病毒研究所,课题组自行培养保存。病毒复苏后在 MA104 细胞上进行培养增殖,通过半数组织细胞感染剂量(median tissue culture infective dose, TCID₅₀)测定感染剂量为 10^{-4.51}/0.1 ml 后,用于灌胃感染乳鼠。

1.2 实验动物 SPF 级 1~8 周龄 BALB/c 小鼠 36 只,由安徽省实验动物中心提供,饲养于独立送风隔离笼具系统内,该系统由安徽医科大学基础医学院动物房提供,等级为 P2 级。待雌雄鼠自行配种生产乳鼠,随机选取 150 只 7 日龄 BALB/c 乳鼠,3.5~4.0 g/只。

1.3 主要试剂 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司(批号:1868817);小牛血清购自芜湖天明生物技术有限公司(批号:C0257);二甲基亚砷购自美国 biosharp 公司(批号:D5879);乳糖酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所公司(批号:A082-1);TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司(批号:15596-026);逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒购自北京全式金公司(批号:AH311-02、AE411-02);其他各种规格的培养板购自美国 Falcon 公司。

1.4 RV 增毒及感染剂量测定 MA104 细胞经 0.2% EDTA、0.25% 胰蛋白酶消化后反复吹打混匀,制成 5 × 10⁵/ml 细胞悬液;将细胞悬液接种到 24 孔细胞培养板,1 ml/孔,在 24 孔细胞培养板中生长 24 h 后,细胞单层达 90% 融合,吸弃培养液,用无血清 MEM 培养液洗涤 2 次;每孔加入 100 μl 含 7 μg/ml 胰酶的无血清 MEM 培养液,再加 100 μl 病毒悬液混匀,37 °C 培养吸附 1 h,每隔 20 min 取出摇匀一次;吸弃接种液,细胞用无血清 MEM 洗涤 2 次后加入 1 ml 含 7 μg/ml 胰酶的无血清 DMEM 培养液,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养;逐日观察细胞生长状态,当 80% 以上细胞出现病变时收获病毒。收获的

2020 - 06 - 15 接收

基金项目:安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2017zhyx26)

作者单位:安徽医科大学¹微生物学教研室、²生命科学学院,合肥 230032

作者简介:章孝成,男,硕士研究生;

黄升海,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: huang-shh68@aliyun.com

病毒悬液 10 倍连续稀释,经 TCID₅₀ 测定,RV 病毒悬液中感染性病毒为 $1 \times 10^{-4.51}$ /0.1 ml。

1.5 RV 感染模型的建立 将 BALB/c 乳鼠随机分为 3 组:实验感染组、PBS 阴性对照组和正常对照组,每组 5 只,实验感染组、PBS 阴性对照组采用灌胃的方式接种,其中实验感染组接种 TCID₅₀ 为 $1 \times 10^{-4.51}$ /0.1 ml RV 病毒悬液 200 μ l/只,PBS 阴性对照组接种等体积 PBS 溶液,正常组对照组不接种任何试剂,乳鼠于接种前后各饥饿 2 h,每天观察乳鼠的腹泻情况。

1.6 样本的收集及检测 接种后每日处死乳鼠,无菌取乳鼠小肠组织,通过 qPCR 方法检测病毒增殖水平,HE 染色和乳糖酶活力检测,观察及检测乳鼠小肠组织中 RV 的含量及其组织病理变化。

1.7 qRT-PCR 法 收取乳鼠小肠组织,预冷 PBS 洗涤 3 次后用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定其纯度和浓度后,按照 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒操作说明书配置逆转录反应体系和操作;靶 cDNA 按照 TransStart Green qPCR SuperMix 试剂盒操作说明书配置 RT-PCR 反应体系和操作。以 GAPDH 为本实验的内参。引物序列见表 1。

表 1 基因的引物序列及扩增片段长度

引物	序列	扩增片段长度(bp)
GAPDH	F: 5'-AGCCCGTCTGCTGAGTATGTC-3'	104
GAPDH	R: 5'-GGCGGAGATGATGACCCTT-3'	
NSP5	F: 5'-GATCCACTCACCAGCTTTTCG-3'	108
NSP5	R: 5'-CCCAACCTTACTTGAAGGTCG-3'	

1.8 乳糖酶活力测定 取新鲜的乳鼠肠组织匀浆,并测定其蛋白浓度,设立空白管、标准管、测定管和对照管 4 个实验管,各管先加入 50 μ l 底物,空白管加入 25 μ l 双蒸水,标准管加入 25 μ l 浓度为 5.55 mmol/L 葡萄糖液,测定管加入 25 μ l 乳鼠肠组织匀浆液,对照管不加任何物质,混均,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min 后各试管加入 25 μ l 终止剂,对照管加入与测定管相对应的 25 μ l 乳鼠肠组织匀浆液,各试管混均 4000 r/min 离心 10 min,取上清液备用,取 96 孔酶标板,加入 8 μ l 上述的各试管的上清液,每个试管管设立两个复孔,每孔加入 200 μ l 显色剂,轻轻震荡孔板 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后,酶标仪 505 nm 处读取各孔吸光度(optical density, OD) 值。通过公式:乳糖酶的活力(U/ mgprot) = (测定 OD 值 - 对

照 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) \times 标准品浓度(5.55 mmol/L) / 反应时间(20 min) / 待测样本蛋白浓度(mgprot/ml) \times 1 000

1.9 统计学处理 使用 SPSS22.0 进行统计差异分析,实验数据均数通过 One way ANOVA 即单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RV 的增殖 轮状病毒 VR-2018 株感染正常 MA104 细胞后在细胞内增殖,病变细胞随着病毒不断复制和增殖而加重,细胞出现贴壁能力减弱、大量圆缩、悬浮、变形和破裂等现象,见图 1。

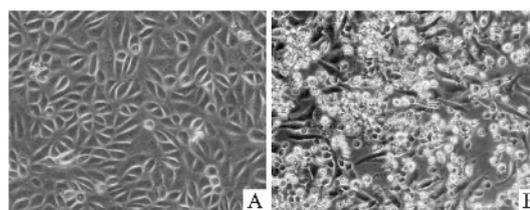


图 1 正常 MA104 细胞和 RV 感染的 MA104 细胞 $\times 400$
A: 正常 MA104 细胞; B: RV 感染的 MA104 细胞

2.2 qPCR 检测乳鼠小肠组织内 RV 相对含量 小肠组织中 RV NSP5 基因通过荧光定量 PCR 检测,结果显示,RV 感染第一天在小肠组织中即可检测到,RV NSP5 基因的 mRNA 表达含量呈现先升高后逐渐降低的趋势,前 4 d 在小肠组织中病毒的表达水平均较高,其中第二天最高($P = 0.0174$, $F = 13.69$),感染第 7 天以后相对表达水平很低,见图 2。

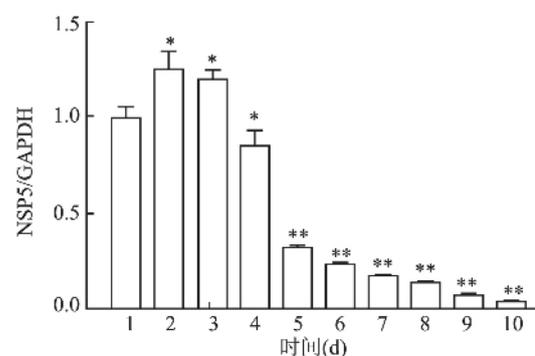


图 2 实验组乳鼠小肠组织 RV NSP5 基因 mRNA 表达与感染后第一天比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 乳鼠攻毒后的腹泻情况 乳鼠攻毒后每隔 24 h 观察其体征和腹泻情况,连续观察 10 d 并记录。

按压乳鼠腹部产生应激排便,通过粪便的形态判断腹泻情况,腹泻的评分参考标准分成3个等级:未腹泻、普通腹泻和严重腹泻,通过观察乳鼠粪便形态进行分级,未腹泻:无便或正常固体粪便,记为0分或1分;普通腹泻:黄色颗粒状便,记为2分;严重腹泻:软便或水样便,记为3分。通过观察,正常对照组无腹泻情况,实验感染组感染后前3 d出现严重腹泻,腹泻持续约7 d左右。见图3。

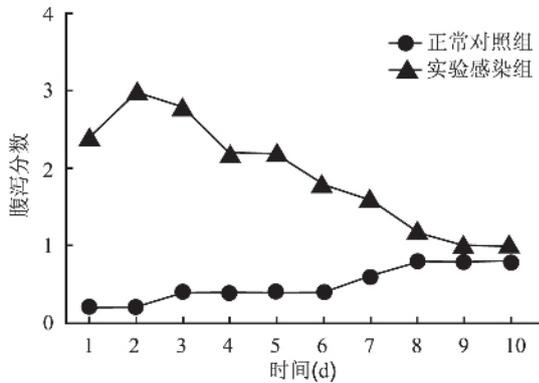


图3 乳鼠腹泻结果

2.4 乳鼠小肠外观性状 解剖乳鼠观察小肠组织外观性状: PBS 阴性对照组和正常对照组小肠完整,表面光滑透亮;实验感染组小肠色泽较正常对照组灰暗,小肠上皮有很多出血点,见图4。

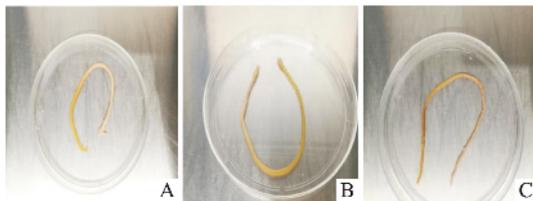


图4 乳鼠小肠外观性状

A: 正常对照组; B: PBS 阴性对照组; C: 实验感染组

2.5 乳鼠小肠组织切片 HE 染色 取实验感染组,正常对照组和 PBS 阴性对照组小肠组织进行 HE 染色。正常对照组和 PBS 阴性对照组整体状态一致,小肠各层结构完整清晰,细胞胞质致密,绒毛排列整齐完整;实验感染组乳鼠肠组织出现病变,表现为空泡,细胞水肿,有炎性细胞浸润,小肠绒毛中分布的血管扩张充血,绒毛出现破损杂乱,绒毛长度较对照组变短。见图5。

2.6 乳糖酶活力检测 与正常对照组比较,实验感染组的乳糖酶活力在前4 d逐渐降低,第2天开始,差异有统计学意义($P = 0.0173, F = 11.26$),在第4

天达到最低($P < 0.01, F = 15.88$),第5天后逐渐恢复到正常对照组水平。见图6。

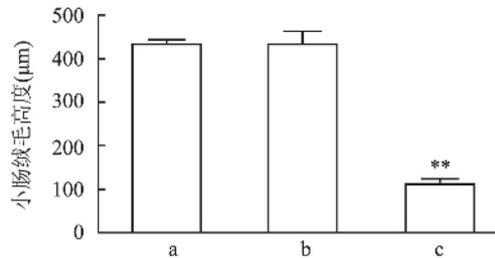
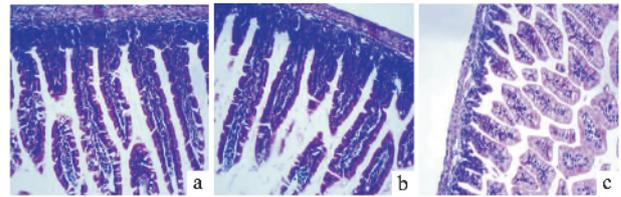


图5 BALB/c 乳鼠小肠组织 HE ×400

a: 正常对照组; b: PBS 阴性对照组; c: 实验感染组; 与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

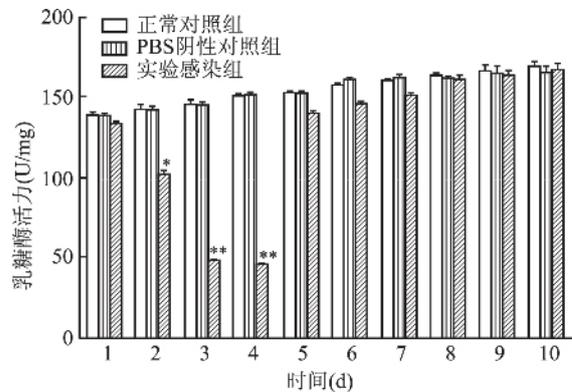


图6 实验组乳鼠小肠组织乳糖酶活力检测

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

RV 是引起全球范围内儿童腹泻的主要病原体,主要经消化道传播,是导致 SLI 的原因之一^[4]。目前,关于 RV 导致腹泻的动物模型相关报道很多,如牛、狗、猪、兔、羊和鼠等,其中由于鼠易获得、易饲养、繁殖能力强等优点在很多的动物模型中被广泛应用^[5]。RV 感染人体后在机体肠道的小肠上皮绒毛上端复制,使得肠上皮基底膜中粘连蛋白疏松,导致细胞间连接紧密性下降、小肠上皮微绒毛细胞骨架结构破坏,乳糖酶活性表达下降,进而引起腹泻等一系列临床症状。BALB/c 乳鼠因动物体质量轻,易获得,所用的病毒剂量小,实验成本低,适合批量建模;BALB/c 乳鼠能够模拟婴幼儿 RV 感染急性肠

炎的临床特征,可快速构建病毒感染动物实验模型,实验稳定性好,可重复。RV 病毒感染方式为粪-口途径传播,故本实验采用灌胃感染病毒,为排除人为操作等因素对小鼠机体损伤的干扰,设置 PBS 阴性对照组表明实验的科学性与严谨性。RV 感染后前 3 d 出现严重腹泻,腹泻约持续 7 d 左右,对照组阴性,表明病毒的感染能导致乳鼠腹泻。HE 染色结果显示 RV 感染小肠组织后,小肠组织损伤、小肠绒毛结构破坏,出现水肿等炎症反应,从病理学角度证明 RV 感染会导致小肠组织发生炎症,进而引起位于肠上皮细胞刷状缘上端的乳糖酶活性降低。通过乳鼠小肠组织乳糖酶活性检测,表明 RV 感染后会影响到乳糖酶活性且使其降低。乳鼠乳糖酶活性的降低和出现腹泻临床症状表明乳鼠产生 SLI。从病理结构来看,乳糖酶的活性和数量在空肠中最高,而 RV 主要侵袭小肠黏膜上皮细胞刷状缘上端,使得肠上皮细胞发生空泡化,出现水肿和绒毛断裂脱落的现象,致使小肠黏膜损伤,小肠组织结构破坏,严重影响到小肠黏膜吸收水分和电解质功能,从而引起腹泻且使得乳糖酶的数量和活性降低^[6-7]。本课题组的模型研究结果与之一致。

参考文献

- [1] Rachel G B, Sigal L, Olga L, et al. Use of a novel probiotic formulation to alleviate lactose intolerance symptoms – a pilot study [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2020, 12(1): 112 – 8.
- [2] Di Costanzo M, Berni Canani R. Lactose intolerance: common misunderstandings [J]. *Ann Nutr Metab*, 2018, 73(Suppl 4): 30 – 7.
- [3] Vandeplass Y. Lactose intolerance [J]. *Asia-pac J Clin Nutr*, 2015, 24 (Suppl 1): S9 – S13.
- [4] Pankov R C, Gondim R N D G, Prata M M G, et al. Rotavirus a infections in community childhood diarrhea in the Brazilian Semi-arid region during post-vaccination era [J]. *J Pediatr Gastr Nutr*, 2019, 69(4): e91 – 8.
- [5] Kashyap G, Singh R, Malik Y S, et al. Experimental bovine rotavirus-A (RV-A) infection causes intestinal and extra-intestinal pathology in suckling mice [J]. *Microb Pathog*, 2018, 121: 22 – 6.
- [6] 杨辉, 李小芹, 于静, 等. 乳糖酶治疗小儿急性腹泻继发乳糖不耐受的临床观察 [J]. *中国民康医学*, 2015, 27(1): 63 – 4.
- [7] Du J, Lan Z, Liu Y, et al. Detailed analysis of BALB/c mice challenged with wild type rotavirus EDIM provide an alternative for infection model of rotavirus [J]. *Virus Res*, 2017, 228: 134 – 40.

Establishment of lactose intolerance model in BALB/c suckling mice infected with rotavirus

Zhang Xiaocheng¹, Ding Rui², Zhang Xiaoyan¹, et al

(¹Dept of Microbiology, ²College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract The 7-day-old SPF grade BALB / C suckling mice were gavaged with rotavirus (RV). At the same time, PBS negative control group and normal control group were set up, all mice were kept in SPF grade animal room to observe the diarrhea of suckling mice every day. On the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th, 9th and 10th day after inoculation, respectively, 5 suckling mice were killed. The small intestine tissues of suckling mice were collected in sterile environment. The viral content was detected by qPCR method, RV load and the histopathological changes were observed by HE staining, and the activity of lactase was detected by commercial kit. RV was detected in the intestinal tissue of suckling mice on the first day of infection, and the relative content of RV was higher; severe diarrhea occurred in the first 3 d after infection; HE staining showed that the small intestine tissue of suckling mice was damaged, the villi of small intestine were shed off, and the length became shorter. The corresponding results of PBS negative control group and normal control group were negative; the lactase activity was lower than that of the PBS negative control group and normal control group. Therefore, the establishment of RV infected BALB/C suckling mice with secondary lactose intolerance animal model will provide a strong guarantee for studying the pathogenesis of lactose intolerance and drug intervention.

Key words rotavirus; BALB/c mice; suckling mice; secondary lactose intolerance