

HCMV 急性间质性肺炎小鼠模型的建立

庄晓亮¹, 木朝宇¹, 俞俊岭¹, 张文昌¹, 甘霖¹, 陈敬贤^{1,2}, 王明丽¹

摘要 目的 建立人巨细胞病毒(HCMV)急性间质性肺炎的小鼠模型。方法 用 5.5×10^5 PFU的HCMV AD169株尾静脉注射6~8周SPF级BALB/c小鼠作为实验组,同时设立正常细胞作为对照组,分别于接种后第5天和第30天处死小鼠,无菌取小鼠肺组织,通过病毒分离、PCR检测病毒特定保守基因、免疫组化、Western blot和HE染色的方法,观察检测小鼠肺组织中HCMV及其组织病理变化。结果 在感染后第5天和第30天实验组小鼠的肺组织中分离出了HCMV病毒;PCR检测到HCMV特异性早晚期基因IE和UL55 DNA;Western blot、免疫组化检测到HCMV特异性早晚期蛋白IE和gB;HE染色证实肺组织有明显急性间质性肺炎的病理改变;对照组对应结果全为阴性。结论 通过尾静脉注射HCMV AD169株病毒,在感染后第5天成功构建了HCMV急性间质性肺炎小鼠模型,该模型的建立有利于该种疾病的发病机制研究及相关抗病毒疫苗和药物的研发。

关键词 人巨细胞病毒;小鼠模型;间质性肺炎

中图分类号 R 563.1+3;R 373.9;R 341

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1214-04

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染引起的急性间质性肺炎是临床最常见的疾病之一,不仅与肾移植受体的急性排斥反应相关,多在术后3个月内发生,而且是引起移植受者死亡的重要原因,发病率为50%~70%,死亡率高达25%~31%^[1]。有研究^[2-3]表明,HCMV肺炎会引起炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者的死亡,尤其是引起伴有咳嗽、呼吸困难患者死亡的重要原因之一。临床实践证实,由HCMV感染引起的间质性肺炎相比其他原因引起的肺炎产生的后果更为

严重,致死率高^[4-5]。由于缺乏疫苗预防,目前能用于临床抗病毒治疗的药物不仅种类少,而且毒性高,且长期使用该类抗病毒药物会出现并发症,例如药物中毒、易出现耐药毒株等,所以亟需研发新的抗病毒药物。但目前缺乏可供研究用的合适动物模型。该研究采用尾静脉注射HCMV AD169毒株的方式感染BALB/c小鼠,通过特异性检测确定了HCMV急性感染BALB/c小鼠并导致急性间质性肺炎。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株和病毒株 人胚成纤维细胞株(HF株)由安徽医科大学微生物学教研室自行制备,并经PCR鉴定排除疱疹病毒污染,实验中使用的是6~8代HF细胞。HCMV AD169毒株由复旦大学医学院微生物教研室提供,本室自行保存,复苏后在HF细胞上进行增毒,并用空斑形成实验纯化3次后尾静脉注射接种小鼠。

1.2 实验动物 SPF级BALB/c雌性小鼠24只,4~6周龄,14~20 g/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,该系统由苏州吴县实验动物设备制造厂生产,等级为屏障系统。BALB/c小鼠需在该隔离系统内适应3 d后方可用于实验。

1.3 主要试剂 DMEM培养基、小牛血清购自美国Gibco公司;Taq酶购自大连TaKaRa公司;免疫组化试剂盒、抗 β -actin抗体、HRP标记的羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HCMV IE-1抗体、gB抗体为本室自制;聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自美国Biosharp公司;超敏化学发光试剂盒购自瑞士Thermo公司。

1.4 PCR引物 参照文献,分别以HCMV AD169株的即刻早期(IE)^[6]和晚期基因糖蛋白B(gB)^[7]基因为模板合成PCR引物,由上海Invitrogen公司合成。IE上游引物为5'-AAGCGGCCTCTGATAAC-CAAGCC-3',下游引物为5'-AGCACCATCCTCCTCT-TCCTCTGG-3',扩增产物为431 bp;gB上游引物为5'-GGAAACGTGTCCGTCTTTGA-3',下游引物为5'-

2014-01-06 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:30872253);安徽省科技厅科技攻关项目(编号:8010302179);安徽省教育厅自然科学重点课题(编号:KJ2009A041Z)

作者单位:¹安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

²哥伦比亚大学病理与细胞生物学教研室,纽约 10032

作者简介:庄晓亮,男,硕士研究生;

陈敬贤,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: jc28@columbia.edu;

王明丽,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 1952987441@qq.com

GAGTAGCAGCGTCCTGGCGA-3' 扩增产物为 488 bp。

1.5 HCMV 病毒感染剂量测定 操作在本教研室已建立的优化条件^[8]的基础上略有改变,即 HF 单层细胞经胰蛋白酶消化后吹打混匀,制成 1×10^5 / ml 细胞悬液,加入 24 孔板,1 ml/孔,24 h 达 90% 汇合时;用等量含 6% 小牛血清的双倍 DMEM 和 2% 琼脂糖混匀,配制成 1% 琼脂糖 DMEM 液为覆盖层,置于 50 ℃ 水浴锅中保温备用;弃去 24 孔板孔内的细胞培养液,将病毒悬液进行 10 倍系列递增稀释;每孔加入稀释后的病毒悬液各 0.2 ml,每个稀释度设置 3 个复孔,同时设置不加病毒只加维持液的细胞对照组,将 24 孔板置于 37 ℃ 吸附 1 h,每孔各覆盖 1% 琼脂糖 DMEM 液 1 ml,待琼脂糖层凝固后,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 7~10 d;每孔分别加入 1% 结晶紫染液 1 ml (含 10% 甲醛)染色 2 min;细水流冲去孔中的琼脂凝块,进行空斑计数;病毒滴度以 (PFU/ml) 表示,按下列公式计算:感染病毒剂量 (PFU/ml) = 3 孔蚀斑均数 × 病毒稀释倍数 / 病毒接种量 (ml)。经空斑形成实验测定, HCMV 病毒悬液中感染性病毒为 1.1×10^6 PFU/ml。

1.6 HCMV 感染模型的建立 将 BALB/c 小鼠随机分为两组:实验感染组和阴性对照组,每组 12 只,其中,各组又均分为第 5 天和第 30 天处死组,实验组小鼠采用尾静脉注射的方式接种含 5.5×10^5 PFU HCMV 病毒悬液,约 0.5 ml/只,同时对照组小鼠接种等体积细胞悬液,每日观察小鼠的一般情况。

1.7 样本的收集及检测 分别于接种后第 5 天和第 30 天,每组随机处死 6 只小鼠,无菌取小鼠肺组织,通过病毒分离、PCR、Western blot、免疫组化和 HE 染色的方法,观察小鼠肺组织中 HCMV 及其组织病理变化。

2 结果

2.1 小鼠肺组织匀浆病毒分离 无菌取小鼠肺组织,研磨匀浆后加 1 ml DMEM 混匀,4 ℃、1 000 r/min 离心 20 min,取上清液,接种于长满单层的 HF 细胞,7 d 盲传一次,盲传 3 代以内出现 HCMV 细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 则判为病毒分离阳性。在倒置显微镜下观察到的典型 HCMV CPE 为:起初出现局灶性病变,病变细胞折光性增强、肿胀、变圆、变大,形成巨大细胞,随后向周围的正常细胞扩散,最终导致整个细胞单层细胞脱落,细胞对照组 12 例均未见特征性 CPE,见图 1。

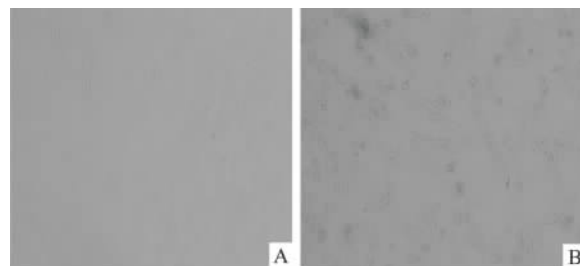


图 1 模型小鼠肺组织 HCMV 分离结果 未染色 ×100
A:对照组; B:实验组

2.2 PCR 检测

2.2.1 肺组织匀浆中 HCMV IE 基因 PCR PCR 检测结果显示,在 HCMV 感染后第 5 天和第 30 天检测实验组小鼠肺组织,均检出 431 bp 目的基因条带,对照组的样品未出现此类条带,PCR 产物经测序确认结果无误,见图 2A。

2.2.2 肺组织匀浆中 HCMV gB 基因 PCR PCR 检测结果显示,在 HCMV 感染后第 5 天和第 30 天,实验组小鼠肺组织中均检出 488 bp 的目的基因条带,对照组的样品未出现此类条带,PCR 产物经测序确认结果无误,见图 2B。

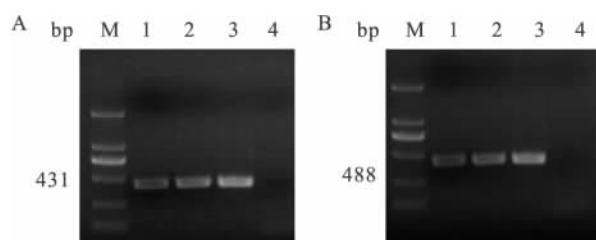


图 2 实验组小鼠肺组织 HCMV IE 和 UL55 基因 PCR 产物检测
A: HCMV IE 基因 PCR 产物检测结果; B: HCMV UL55 基因 PCR 产物检测结果; M: DNA Marker; 1: 感染后第 5 天; 2: 感染后第 30 天; 3: HCMV 阳性对照; 4: 阴性对照

2.3 小鼠肺组织切片免疫组化检测 UL55 基因编码的 gB 蛋白 与正常对照组相比,可见第 5 天和第 30 天的实验组小鼠的肺上皮细胞胞质中均可见棕色阳性信号,见图 3。

2.4 Western blot 检测 提取各组小鼠肺组织蛋白并经过蛋白定量后,进行 Western blot 实验,结果显示在 HCMV 感染后第 5 天和第 30 天分别检测到了由 HCMV IE 和 UL55 基因编码的相应的 IE 和 gB 蛋白条带,而细胞对照组未出现相应蛋白条带,见图 4。

2.5 小鼠肺组织切片 HE 染色 取各组小鼠肺组

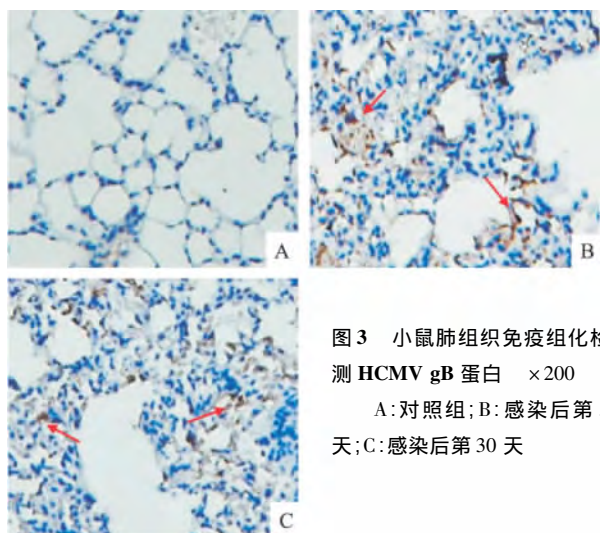


图3 小鼠肺组织免疫组化检测 HCMV gB 蛋白 $\times 200$

A:对照组;B:感染后第5天;C:感染后第30天

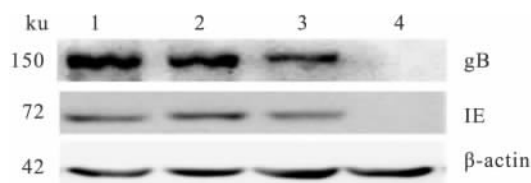


图4 小鼠肺组织 Western blot 检测 HCMV 蛋白结果

1:感染后第5天;2:感染后第30天;3:HCMV 阳性对照;4:阴性对照

织进行 HE 染色,与对照组相比,实验组小鼠肺泡间隔增宽或被破坏,大量急慢性炎症细胞浸润,可见到病变细胞肿胀变圆,胞质内出现嗜酸性包涵体。局部区域出现出血及淡红色水肿液渗出,肺组织细胞坏死,第30天实验组小鼠肺组织可见到残余的纤维结缔组织增生,见图5。

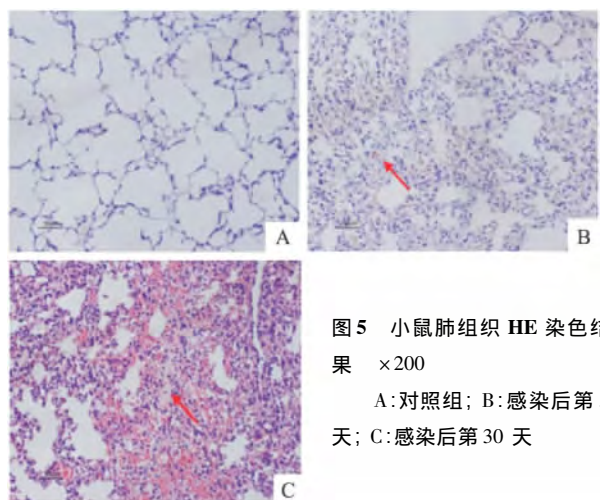


图5 小鼠肺组织 HE 染色结果 $\times 200$

A:对照组;B:感染后第5天;C:感染后第30天

3 讨论

本研究参考课题组以往建立动物模型的经验,

经过预实验摸索知小鼠急性间质性肺炎的病毒感染剂量为 5.5×10^5 PFU/只,实验中采用尾静脉注射的方式,将 HCMV AD169 株接种至 BALB/c 小鼠,在感染后第5天和第30天分别取小鼠肺组织进行检测,HCMV 急性间质性肺炎小鼠模型被建立。

病毒分离被认为是病毒学检测的金标准,本研究病毒分离结果显示,实验组小鼠在感染后第5天和第30天采取的肺组织匀浆上清液中均分离出 HCMV,在 HF 细胞培养物上出现肿胀、变圆、折光性增强等典型特征性的 CPE,在病毒分离出现 CPE 的细胞培养液中检测到 HCMV IE 基因,表明实验组小鼠肺组织中分离到了 HCMV 病毒;HCMV 基因具有时序性表达的特点,即刻早期(IE)、早期(E)和晚期(L)基因呈时序性级联表达,同时检测到 HCMV 特异性的高度保守序列 IE 基因和 UL55 基因可以作为 HCMV 活动性感染的指标^[9];通过 PCR 检测结果分析可见,实验组小鼠在感染后第5天和第30天肺组织中均检测到 IE 基因和 UL55 基因,且经测序确认结果无误,明确实验组小鼠在接种后处于 HCMV 活动性感染状态;Western blot 结果显示,在 HCMV 感染后第5天和第30天实验组小鼠肺组织中分别检测到了与 HCMV 阳性对照相对应的 IE 和 gB 蛋白条带,说明实验组小鼠肺组织中存在 HCMV 相应抗原;采用免疫组织化学染色法检测到感染组小鼠第5天和第30天肺组织上皮细胞胞质中出现了棕色阳性信号,再次表明实验组小鼠肺组织中存在 HCMV gB 蛋白;观察 HE 染色检测结果可见,实验组小鼠肺泡间隔增宽或破坏,可见病变细胞肿胀变圆,大量急慢性细胞浸润,大量红细胞漏出,局部区域出现淡红色水肿液,肺组织结构破坏、坏死,出现了典型的急性间质性肺炎症状,第5天组小鼠肺组织渗出的炎症物质在肺泡内表面形成一层蛋白质膜状物,第30天小鼠肺组织存在纤维结缔组织增生等病理改变;而对照组小鼠对应结果全为阴性。

本研究结果表明,通过尾静脉注射剂量为 5.5×10^5 PFU 的 HCMV AD169 毒株可以感染小鼠建立 HCMV 间质性肺炎小鼠模型,而且通过观察比较,发现在病毒感染的第5天即可出现 HCMV 原发急性间质性肺炎的病理特征,表明本次建立的模型可以为 HCMV 急性间质性肺炎的发病机制研究及评估相关抗病毒疫苗和药物的疗效提供良好的研究依据,为完善临床诊断及治疗提供可靠的证据资料。

参考文献

- [1] Basri N ,Abdullah K A ,Shaheen F A. Cytomegalovirus disease in renal transplant recipients: a single-center experience [J]. *Exp Clin Transplant* 2007 5(1):601-3.
- [2] Sato S ,Kobayashi H ,Saito R ,et al. A case of steroid-refractory ulcerative colitis complicated with Cytomegalovirus pneumonia[J]. *Fukushima J Med Sci* ,2007 53(1):27-32.
- [3] Cascio A ,Iaria C ,Ruggeri P ,et al. Cytomegalovirus pneumonia in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review [J]. *Intl J Infect Diss* 2012 16(7):e474-9.
- [4] Goussard P ,Kling S ,Gie R P ,et al. CMV pneumonia in HIV-infected ventilated infants [J]. *Pediatr Pulmonol* ,2010 45(7):650-5.
- [5] Zampoli M ,Morrow B ,Hsiao N Y ,et al. Prevalence and outcome of Cytomegalovirus-associated pneumonia in relation to human immunodeficiency virus infection [J]. *Pediatr Infect Dis J* ,2011 30(5):413-7.
- [6] Bergallo M ,Costa C ,Terlizzi M E ,et al. Evaluation of two set of primers for detection of immediate early gene UL123 of Human Cytomegalovirus (HCMV) [J]. *Mol Biotechnol* ,2008 38(1):65-70.
- [7] Lukacs A ,Tarodi B ,Endreffy E. Human Cytomegalovirus gB genotype 1 is dominant in congenital infections in South Hungary [J]. *J Med Virol* ,2001 65(3):537-42.
- [8] 张俊玲 ,王明丽. 人巨细胞病毒蚀斑实验条件优化及在抗病毒物质活性测定中的应用 [J]. *安徽医科大学学报* ,2007;42(5):485-9.
- [9] Sinclair J ,Sissons P. Latency and reactivation of Human Cytomegalovirus [J]. *J Gen Virol* 2006 87(Pt 7):1763-79.

A murine model of acute interstitial pneumonia induced by primary infection of human cytomegalovirus

Zhuang Xiaoliang , Mu Chaoyu , Yu Junling , et al

(*Dept of Microbiology , Anhui Medical University , Hefei 230032*)

Abstract Objective To establish the model of acute interstitial pneumonia induced by primary infection of human cytomegalovirus (HCMV) , and to provide a reliable platform for the research on pathogenesis of HCMV disease and for the estimate of antivirals and vaccines. **Methods** Twenty-four specific-pathogen-free BALB/c mice of 6 ~ 8 weeks old were randomly divided into two groups. The infection groups were injected with HCMV AD169-infected HF at 5.5×10^5 PFU by intravenous injection respectively , and the control group was injected with HF only. On the post infection days 5 and 30 , mice were anesthesia executed and lung samples were collected for analysis by viral isolation , polymerase chain reaction (PCR) , immunohistochemistry , Western blot and HE staining , to observe the correlation between HCMV and pathological change in lung of mice. **Results** After infection 5 d and 30 d , HCMV was only isolated from the lung homogenates of the infection group , the HCMV IE-1 and UL55 DNA were positive by PCR , and the viral major proteins , IE and gB antigen , were widely distributed in the interstitial lung epithelial cells by immunohistochemistry and revealed in the lung by Western blot in the group of infection , which were negative in the control group. The obvious pathological changes of acute interstitial pneumonia were found in the lung tissue of the infection group by HE staining. **Conclusion** The murine model of acute interstitial pneumonia is successfully established which only costs 5 days after intravenous injection of HCMV , providing an important platform for pathogenesis of HCMV acute interstitial pneumonitis and medicine intervention.

Key words HCMV; murine model; interstitial pneumonitis