文章编号:1000-5404(2009)15-1479-04

论著

轮状病毒感染致乳鼠肠外损害的实验研究

陈军华,解元元,朱朝敏,刘作义 (重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨轮状病毒(rotavirus, RV)感染引起肠外脏器损害情况及其发病机制。**方法** 用MA104细胞培养猴RV SA-11经口感染生后7 d昆明小鼠乳鼠,实验组每只经口接种0.1 ml培养物冻融液(3.75×10^7 pfu/ml),对照组经口接种0.1 ml正常对照细胞冻融液。接种后3 d处死乳鼠,光镜下观察脑、肺、心、肝、胰和肾组织病理改变,电镜下观察心肌细胞超微结构改变;以免疫荧光方法检测各器官RV抗原分布情况;以Phalloidin-TRITC对丝状肌动蛋白染色并经软件(Imageproplus5.1, IPP5.1)测量分析以观察心肌组织丝状肌动蛋白含量有无改变;以原位凋亡细胞检测方法检测肝细胞和心肌细胞凋亡情况;以巢式RT-PCR方法检测各器官内RV RNA分布情况。**结果** 在光镜下脑、肺、胰和肾组织未见明显病变,但可见心肌间质水肿,心肌细胞浊肿,肝细胞空泡变性;电镜下心肌细胞肌丝溶解,线粒体内室扩张,滑面内质网扩张,核周间隙增宽;Phalloidin-TRITC染色未见心肌组织丝状肌动蛋白含量改变;除脑组织外其他器官内见到RV抗原分布,而各器官内均有RV-RNA分布;肝细胞凋亡增加,而心肌细胞未见凋亡。**结论** RV可播散到肠外脏器并引起病理损害,但总体上程度较轻。病毒感染导致丝状肌动蛋白解聚及细胞骨架损害、诱导细胞凋亡不仅是肠黏膜损伤的机制,同时也是肠外损害的机制。

关键词: 轮状病毒; 感染; 乳鼠; 肠外损害
中图法分类号: R-332; R373.2; R574 **文献标识码:** A

Extraintestinal lesions caused by rotavirus: An experimental study on suckling mice

CHEN Jun-hua, XIE Yuan-yuan, ZHU Chao-min, LIU Zuo-yi (Department of Infectious Disease, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the extraintestinal lesions induced by rotavirus (RV) infection and explore the pathogenesis. **Methods** Simian rotavirus SA11 was cultured in MA-104 cells. After inoculation, the pathological changes in brain, lung, heart, liver, pancreas and kidney tissues were observed, the RV antigens detected, and the apoptotic cells observed. Besides, we stained the filamentous actin (F-actin) with Phalloidine-TRITC, and then quantified the F-actin amount. **Results** Several pathological changes, inclusive of myocardial interstitial edema, granular degeneration in cardiacytes, hepatic congestion, and hepatocellular vacuolar degeneration, were found, but not found in the brain, lung, and pancreas tissues. Meanwhile, several ultrastructural changes, inclusive of dissolved myocardial F-actin, extended smooth endoplasmic reticulum, swollen mitochondria, and widened perinuclear space, were found. No difference was found in the quantity of myocardial F-actin. Apoptosis was found in liver cells, but not in myocardial cells. RV RNA was detected in tissues such as brain, lung, heart, liver and pancreas tissues. **Conclusion** All the results suggest that RV may spread from the intestine to various extraintestinal organs and hence induce injury. Filamentous actin depolymerization, cytoskeleton damage and apoptosis induced by RV infection are the important mechanism not only in intestinal damages, but also in extraintestinal lesions.

Key words: rotavirus; infection; suckling mouse; extraintestinal lesion

资料显示,5岁以下婴幼儿急性腹泻住院者大约39%是因为轮状病毒(rotavirus,RV)感染,估计该病患儿死亡人数全球每年有61.1万[1]。近年研究发现,RV除造成胃肠道感染外,同时可造成病毒血症,并发肠外多系统器官损害,严重时也可导致患儿死亡[2]。目前RV感染造成肠外损害的机制仍未研究清楚。Brunet等[3]研究表明RV感染可使人肠上皮细胞*Caco-2 cells*细胞内钙离子浓度改变,从而导致丝状肌动蛋白解聚,破坏细胞骨架,Boshuizen等[4]研究表明RV感染可引起肠上皮细胞凋亡,我们的前期研究也与上述研究结果一致[5],但尚不知这些致病机制在RV感染肠外损害中是否也起作用。因此,本研究用RV SA-11感染昆明乳鼠,对其产生肠外损害的情况进行相关实验研究,以探索RV感染肠外损害产生的机制。

作者简介: 陈军华,男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事儿童感染消化病方面的研究。E-mail:cjh460@163.com
通信作者: 刘作义,电话:(023)63624014
收稿日期: 2008-10-22; **修回日期:** 2008-12-17

1 材料与方法

1.1 RV和动物准备及动物感染和取材

实验所用RV(SA-11)经MA104细胞(武汉大学中国典型

培养物保藏中心)扩增。实验采用42只出生后7 d清洁级昆明乳鼠(重庆医科大学实验动物中心),体质量48~172 g,雌雄不拘,分成3组,每组采用随机数字表法随机选取10只为实验组,余下4只为对照组,乳鼠与母鼠一同饲养,随意哺乳。对照组经口接种0.1 ml正常培养细胞冻融液,实验组经口接种0.1 ml(3.75×10^7 pfu/ml)病毒培养细胞冻融液。接种后3 d,断颈处死乳鼠,70%酒精清洗皮肤后,取脑、肺、心、肝、胰、肾。第1组各标本取出后,随机选取2只实验组和1只对照组乳鼠部分心肌组织2.5%戊二醛固定送电镜检查,余乳鼠各组织均10%甲醛固定,并制成石蜡切片,以进行形态学改变观察、Phalloidin丝状肌动蛋白染色和原位细胞凋亡检测。第2组标本用于检测RV感染后病毒抗原分布情况,为了去除器官内残余的血,取标本前,参照文献[6]方法从左心室进行PBS灌注,直到肺和肝变得苍白,其后参照第1组方法制成石蜡切片。第3组标本用于检测病毒核酸分布情况,参照第2组方法去除器官内残余的血,但标本取出后随即置液氮冻存。

1.2 形态学观察

各组织石蜡切片HE染色观察形态学改变。同时所取部分心肌组织2.5%戊二醛固定制成电镜切片,锇酸染色后电镜观察。

1.3 免疫荧光

以免疫荧光方法检测各器官RV抗原分布情况。一抗为山羊抗RV多克隆抗体(AB1129),购自Chemicon公司。二抗为FITC标记兔抗羊IgG,购自鼎国生物公司。取乳鼠脑、肺、心、肝、胰、肾组织石蜡切片进行免疫荧光检测了解RV抗原分布情况。操作严格按说明书进行。

1.4 Phalloidin-TRITC染色

以Phalloidin-TRITC对丝状肌动蛋白染色并经图像分析软件(IPP5.1)测量分析以观察心肌组织丝状肌动蛋白含量有无改变。实验组10只乳鼠每只随机取心肌石蜡切片2张共20张,而对照组4只乳鼠每只随机取5张切片共20张,用Phalloidine-TRITC(Sigma, 77418)对丝状肌动蛋白染色。染色后荧光显微镜观察并照像,IPP5.1测量荧光强度。

1.5 原位细胞凋亡检测

以原位凋亡细胞检测方法检测RV感染后诱导肝细胞和心肌细胞凋亡情况。取3 d心肌和肝脏组织石蜡切片用原位细胞凋亡试剂盒(货号1684817,购自Roche公司,)进行原位细胞凋亡检测。操作严格按说明书进行。

1.6 巢式RT-PCR

以巢式RT-PCR方法检测各器官内RV RNA分布情况。取乳鼠脑、肺、心、肝、胰、肾、肠组织,匀浆后提取RNA,用巢式RT-PCR法检测组织中RV RNA。引物按VP6基因序列设计:外正向引物:5′-GGCTTTTAAACGAAGTCTTC-3′,外反向引物:5′-AATCCACGAAATAATCAATT-3′,内正向引物:5′-ACATGGATGTCCTATACTCT-3′,内反向引物:5′-ATTTCTTGCCGTTTCAACAT-3′。检测所用试剂盒购自成都宝生物公司RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 TaKaRa,操作严格按说明书进行。

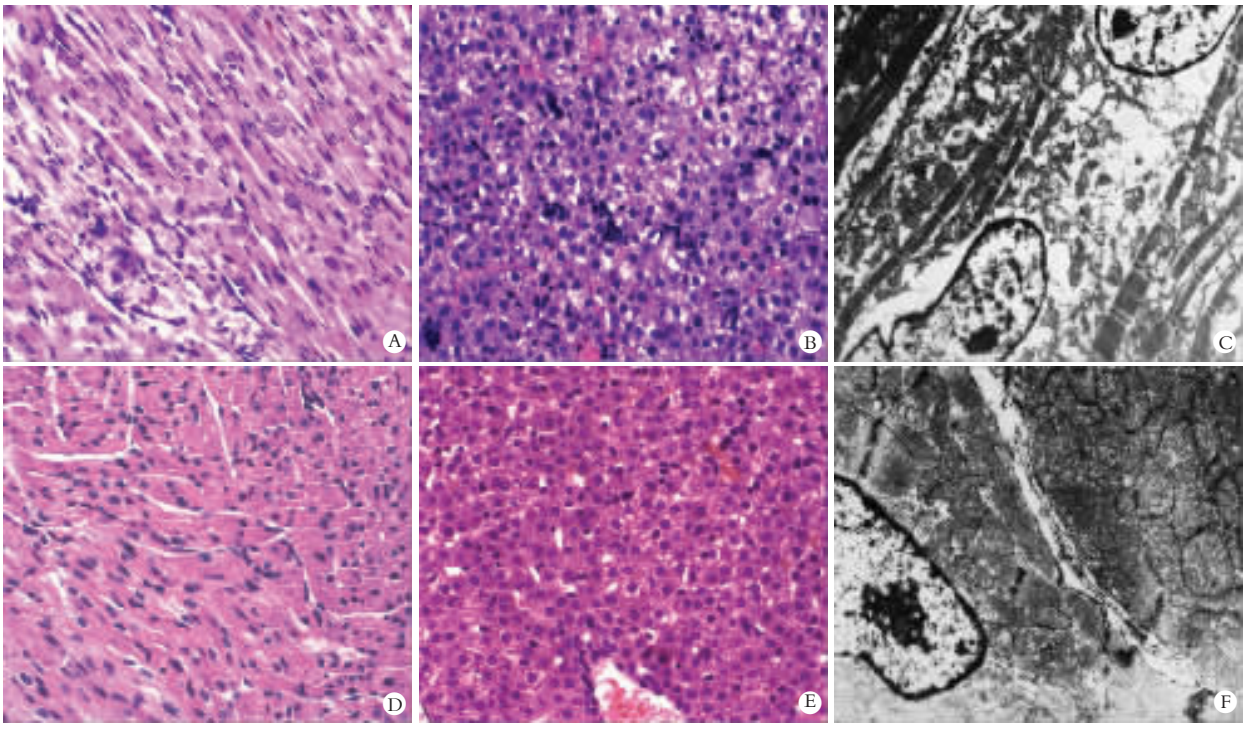
1.7 统计学分析

实验采用SAS 8.1统计软件进行t检验。

2 结果

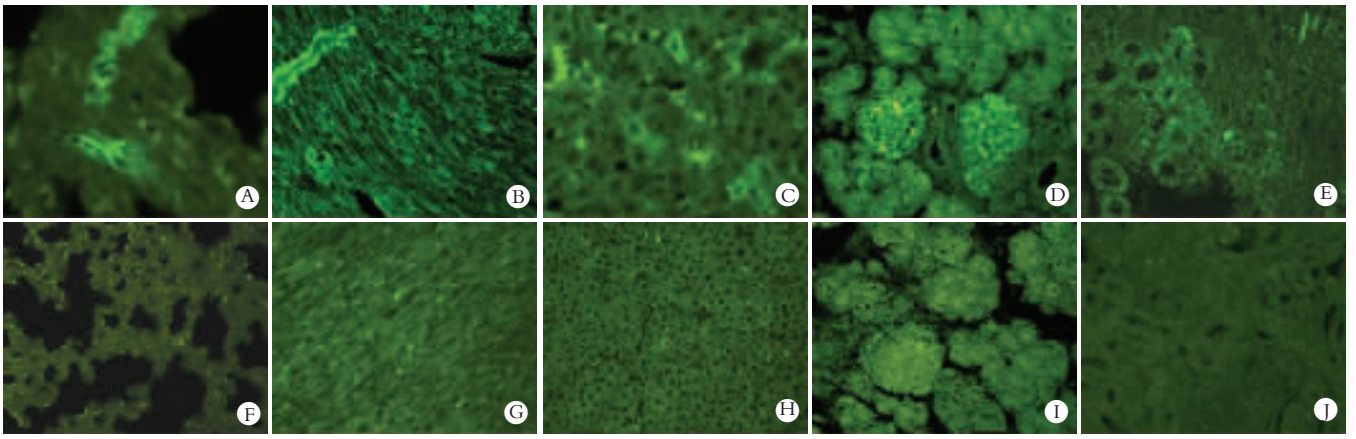
2.1 形态学观察

光镜下,脑、肺、胰和肾未见明显病变,心脏可见轻度心肌细胞浊肿及间质水肿,灶性肌丝溶解,未见明显炎性细胞浸润(图1A、B),肝细胞浊肿,空泡变性,并见到淋巴细胞浸润(图1C、D)。电镜下可见心肌细胞肌丝溶解,线粒体内室扩张,滑面内质网扩张,核周间隙增宽(图1E、F)。



A:实验组心肌组织 (HE×200);B:实验组肝组织 (HE×200);C:实验组心肌细胞 (TEM×6 000)
D:对照组心肌组织 (HE×200);E:对照组肝组织 (HE×200);F:对照组心肌细胞 (TEM×6 000)

图1 RV感染致乳鼠肠外脏器损害的形态学观察



A:实验组肺泡细胞;B:实验组心肌细胞;C:实验组肝细胞;D:实验组胰腺细胞;E:实验组肾小管上皮细胞
F:对照组肺泡细胞;G:对照组心肌细胞;H:对照组肝细胞;I:对照组胰腺细胞;J:对照组肾小管上皮细胞

图 2　RV 感染后肠外脏器病毒抗原分布的免疫荧光观察　(FITC ×400)

2.2　免疫荧光观察

心肌细胞、肺泡细胞、肝细胞、胰腺细胞、肾近曲小管和集合管上皮细胞细胞质内抗原阳性。其中胰岛细胞细胞质内有大量 RV 抗原分布。脑组织中未见明显 RV 抗原分布(图 2)。

2.3　丝状肌动蛋白 Phalloidin-TRITC 染色

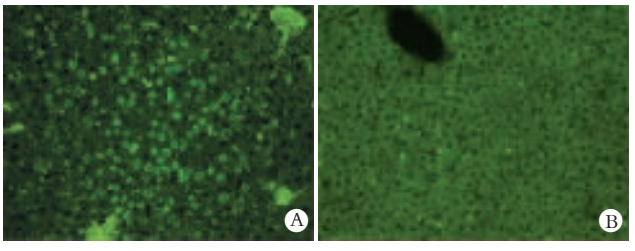
经过 IPP5.1 测量和 SAS8.1 统计(Parewise t-test)分析表明,1、2、3、4 d 心肌丝状肌动蛋白染色实验组和对照组之间无显著差异($P>0.05$)。

2.4　原位细胞凋亡检测

3 d 实验组肝细胞可见细胞凋亡,对照组未见细胞凋亡。而 3 d 实验组和对照组心肌细胞均未见凋亡(图 3)。

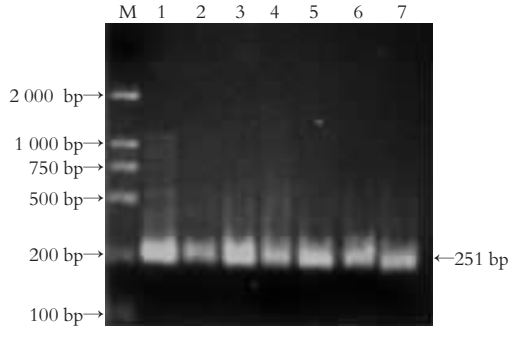
2.5　巢式 RT-PCR 检测 RV 核酸

巢式 RT-PCR 结果显示:感染后 3 d 实验组 KM 乳鼠脑、肺、心、肝、胰、肾、肠组织中均可检测到 RV 核酸(第 6 基因片段),见图 4。



A:实验组肝细胞;B:对照组肝细胞

图 3　RV 感染后乳鼠肝细胞凋亡检测　(FITC ×400)



M:标准;1:脑;2:肺;3:心;4:肝;5:胰;6:肾;7:空肠

图 4　RV 感染后各器官 RV RNA 检测结果

3　讨论

随着 RV 感染造成肠外脏器损害的报道日渐增多,RV 全身感染近年来越来越受到人们的重视。临床研究和动物实验均表明 RV 病毒血症是存在的,病毒不仅可以播散到肠外脏器,而且可以在其中增殖并造成损害[6,7]。为了进一步明确 RV 肠外感染并造成损害的情况,我们进行了相关的研究。

本研究发现 RV 感染后,在乳鼠肺、心、肝、胰、肾组织中均发现特异免疫荧光,提示 RV 抗原的存在,但在脑组织中未检测到 RV 抗原分布。而经 nRT-PCR 检测到 RV RNA 在脑、肺、心、肝、胰、肾组织中均呈阳性。Crawford 等[6]研究表明 RV 感染大鼠乳鼠后除上述脏器外,还在膀胱、胸腺和脾中发现 RV 抗原分布,由于同时检测到 NSP4 抗原分布,提示病毒可能在这些脏器中发生了增殖,但也未在脑中检测到 RV 抗原。这可能是由于血脑屏障的作用,进入脑的 RV 量少,而 PCR 比免疫荧光检测灵敏度更高,故前者阳性而后者为阴性。实验中我们发现,RV 抗原明显集中在胰岛处,这为临床上报道的 RV 感染导致急性胰腺炎提供了实验依据[8]。有实验研究发现 RV 可以感染初级胰岛细胞并在其中增殖,并有可能导致产生针对胰岛细胞的自身抗体[9]。是否 RV 感染胰岛细胞后使其抗原性发生改变,导致自身抗体的产生,而使患儿出现糖尿病的可能? 这有待进一步研究。

本研究显示 RV 感染造成了乳鼠肠外多个脏器损害,但总的来说病变程度较轻。RV 感染后光镜下可见心肌间质轻度水肿,心肌细胞轻度浊肿,电镜下发现心肌细胞有核周间隙扩大,滑面内质网扩张,肌丝溶解等改变,这为临床上轮状病毒肠炎患儿常并发心肌损害找到了客观依据。国内有研究用人 RV 经口或腹腔

接种感染生后3 d昆明乳鼠,未见明显心肌细胞超微结构改变,可能与乳鼠日龄及接种病毒和接种途径不同有关[10,11]。肝细胞空泡变性,淋巴细胞细胞浸润,未见明显坏死等表现,与临床上RV肠炎患儿可有肝酶如ALT、AST等增高,但有临床症状者极少的情况相符合。而脑、肺、胰和肾组织未见明显改变,这与临床上RV感染后相对应的脏器损害表现不明显也是一致的。但临床上也有报道RV感染后患儿出现脑损害和胰腺炎表现者[8,12,13]。

RV全身性感染已由很多研究所证实,但造成肠外脏器损害的机制却尚未清楚。首先已经证实RV可以侵入多个脏器。至于RV如何播散到肠外脏器,有研究表明可能与非结构蛋白NSP3基因型有关,其次还与VP6基因型有关[14]。另外,除胃肠道黏膜上皮细胞上有RV受体存在外,肠外脏器如肾小管上皮细胞上也含有RV受体[15],且肾脏近段集合管上皮细胞与小肠上皮细胞在生理学上很相似,这可能也是RV肠外感染的首要机制[16]。体外研究RV可以在肾细胞、肝细胞、胰腺细胞内复制增殖[17],这也在动物实验中得以证实[6]。

有研究显示NSP4能调节细胞内钙离子浓度,从而影响对钙离子敏感的蛋白如丝状肌动蛋白、绒毛蛋白、微丝蛋白等,从而损害细胞骨架[18]。本研究发现心肌细胞肌丝溶解可能与这种机制有关。然而我们发现RV感染后实验组和对照组之间丝状肌动蛋白含量并无统计学差异($P>0.05$),其原因可能是进入心肌病毒量少,病变较轻的缘故。尽管如此,这仍可被看成是RV感染造成肠外损害的机制之一。而这种损害机制是不是在肠外其他脏器损害过程中也起相同的作用?其他的病毒蛋白和非结构蛋白的作用如何都尚未明确。

本研究发现RV感染后可造成肠上皮细胞凋亡明显增加,在肝脏中也发现明显凋亡病灶[19]。故有理由相信RV感染引起细胞凋亡也是肠外脏器损害的重要机制之一。

综上所述,RV感染后病毒可播散到肠外脏器并能在其中复制,造成肠外脏器损害,但损害较轻。损害的机制并不完全清楚。病毒蛋白的毒性作用,如NSP4影响丝状肌动蛋白合成,破坏细胞骨架及病毒感染诱导细胞凋亡不仅是肠黏膜损害的重要机制,同时也是造成肠外脏器损害的重要机制。

参考文献:

[1] Parashar U D, Gibson C J, Bresse J S, *et al*. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2): 304-306.

[2] 黄晓磊, 陈 洁, 虞燕萍, 等. 轮状病毒病毒血症与肠道外脏器损伤的研究[J]. 浙江大学学报:医学版, 2006, 35(1): 69-75.

[3] Brunet J P, Cotte-Laffitte J, Linxe C, *et al*. Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration[J]. J Virol, 2000, 74(5): 2323-2332.

[4] Boshuizen J A, Reimerink J H, Korteland-van-Male A M, *et al*. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice[J]. J Virol, 2003, 77(24): 13005-13016.

[5] 陈军华, 解元元, 凌 华, 等. 轮状病毒感染乳鼠致病机制的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1230-1233.

[6] Crawford S E, Patel D G, Cheng E, *et al*. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model[J]. J Virol, 2006, 80(10): 4820-4832.

[7] Blutt S E, Kirkwood C D, Parreno V, *et al*. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? [J]. Lancet, 2003, 362(9394): 1445-1449.

[8] De-La-Rubia L, Herrera M I, Cebrero M, *et al*. Acute pancreatitis associated with rotavirus infection[J]. Pancreas, 1996, 12(1): 98-99.

[9] Coulson B S, Witterick P D, Tan Y, *et al*. Growth of rotaviruses in primary pancreatic cells[J]. J Virol, 2002, 76(18): 9537-9544.

[10] 姚英民, 欧巧群, 陈 瑶. 人类轮状病毒感染新生小鼠肠道外组织超微结构的变化[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(9): 1334-1336.

[11] 姚英民, 欧巧群, 陈 瑶. 人类轮状病毒感染新生小鼠肠道外组织的病理变化[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(7): 651-653.

[12] de-Villiers F P, Steele A D, Driessen M. Central nervous system involvement in neonatal rotavirus infection[J]. Ann Trop Paediatr, 2003, 23(4): 309-312.

[13] 顾亚明. 轮状病毒肠炎与肠外脏器损害因素探讨[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(2): 95-96.

[14] Mossel E C, Ramig R F. A lymphatic mechanism of rotavirus extraintestinal spread in the neonatal mouse[J]. J Virol, 2003, 77(22): 12352-12356.

[15] Keljo D J, Smith A K. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1988, 7(2): 249-256.

[16] Gilger M A, Matson D O, Conner M E, *et al*. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency[J]. J Pediatr, 1992, 120(6): 912-917.

[17] Schwarz K B, Moore T J, Willoughby R E Jr., *et al*. Growth of group A rotaviruses in a human liver cell line[J]. Hepatology, 1990, 12(4 Pt 1): 638-643.

[18] Brunet J P, Jourdan N, Cotte-Laffitte J, *et al*. Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration[J]. J Virol, 2000, 74(22): 10801-10806.

[19] Sato A, Iizuka M, Nakagomi O, *et al*. Rotavirus double-stranded RNA induces apoptosis and diminishes wound repair in rat intestinal epithelial cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(3): 521-530.

(编辑 吴培红)