DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.011
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

文章编号:1000-5404(2002)04-0401-03

论著

经脑感染后登革病毒在小鼠脊髓分布特点的研究

安 静[1],周德山[2],张俊磊[1] (第三军医大学基础医学部:[1]微生物学教研室;[2]组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分析登革(DEN)病毒在中枢神经系统(CNS)内的生长规律和分布特点。方法 用2型登革病毒(DEN-2)对严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠进行脑内接种,应用空斑法和免疫荧光染色分别检测感染后小鼠CNS和血清中的病毒滴度及病毒抗原的分布。结果 感染后小鼠逐渐出现皮毛不整、脊柱侧凸及弛缓性麻痹。从感染后3d到麻痹发生日,可在小鼠的脑皮质和脊髓中检测到滴度较高的DEN-2病毒,而血清中则检测不到病毒。免疫荧光染色显示DEN病毒抗原大量存在于大脑海马、基底核和脊髓灰质的神经元内。登革病毒抗原在感染早期和晚期在脊髓灰质的分布也存在差异。结论 感染后DEN在脊髓灰质内的分布不同提示脊髓不同部位的神经元对登革病毒的易感性可能不同。病毒在大脑、脊髓神经细胞内的增殖造成的细胞损害可能是登革病毒感染某些临床表现的病理基础。

关键词:登革病毒;严重联合免疫缺陷小鼠;脊髓
中图法分类号:R373.33;R512.802 文献标识码:A

Distribution of dengue virus in the spinal cord of mice after intracerebrally inoculation

AN Jing, ZHOU De-shan, ZHANG Jun-lei (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the replication rules and distributions of dengue (DEN) virus (and viral antigen) in the central nervous system. Methods Severe combined immunodeficient (SCID) mice were intracerebrally inoculated with dengue virus type 2 (DEN-2). The distribution of the virus was detected by using plaque assay and immunohistochemistry staining respectively. Results After inoculation, the mice showed ruffle and kyphoscoliosis and developed paralysis. A higher virus titer of DEN-2 was detected in the brain and spinal cord but not in the serum. DEN viral antigens were found predominately in the hippocampus and basal nuclei in the brain and in gray matter of the spinal cord. Interestingly, different distribution of DEN-2 virus in the spinal cord was noted at the early and late phase of the infection. Conclusion Dengue virus can replicate in the neurons and then lead to death of the neurons. The distribution of the virus in the spinal cord might be related to the different susceptibility of the neurons.

Key words: dengue virus; severe combined immunodeficient mice; spinal cord

登革(Dengue, DEN)病毒为黄病毒属单链RNA病毒,根据抗原性不同分为四个血清型(DEN-1, 2, 3, 4)。该病毒以蚊子为传播媒介,可引起人类急性传染病,从轻型的登革热到危及生命的登革出血热/登革休克综合征(DHF/DSS)[1]。一般认为,DHF/DSS的典型临床表现主要有出血和由血管通透性增高引起的低血容量性休克。但是,近年来,一些不常见的临床表现如脑症和肝脏病变的症状在DEN病毒感染的病人中经常出现[2~4]。虽然DEN病毒的靶细胞尚不清楚,但从DEN感染发热期出现的神经系统症状如嗜睡、意识模糊和昏迷以及远期后遗症包括四肢末端麻痹、感觉丧失等症状,可以看出在病毒感染过程中可能累及了神经系统[5~8]。以往的研究发现,HepG2-SCID小鼠在腹腔内接种DEN-2病毒后,逐渐出现皮毛不正,进行性脊柱后侧凸,进而瘫痪。免疫荧光染色法可在其脑组织的神经元中检测到DEN病毒抗原[9]。这些结果进一步表明DEN病毒感染可能累及中枢神经系统(CNS)。但是,DEN病毒在CNS内的致病过程尚不清楚,为此,本研究利用SCID小鼠脑内接种DEN-2,检测感染后不同时间病毒在血清、脊髓和脑组织中的生长规律和分布特点,初步探讨登革病毒性脑病发生的可能机制。

基金项目:重庆市卫生局医药卫生基金资助项目(2000)
作者简介:安 静(1960-),女,辽宁省阜新市人,博士,教授,主要从事登革病毒方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752239
收稿日期:2002-01-17;修回日期:2002-03-11

1 材料与方法

1.1 动物

雌性、14周龄的SCID(C.B.-17/Icr Tac-scid)小鼠从Clea Co.(日本东京)购入并在无菌室中饲养。SCID(severe combined immunodeficient)小鼠是指T、B淋巴细胞均缺陷的小鼠。

1.2 病毒接种材料

DEN-2病毒(Trl751株,由日本国立传染病研究所Dr. Otani A博士惠赠)从一例登革热病人血清中分离获得。在白纹伊蚊的细胞(C6/36)中增殖传代[10]。

1.3 病毒感染实验

实验分为感染组和对照组。感染组共40只小鼠,每只小鼠经脑接种2.5×10^4 pfu(25μl)的DEN-2病毒,接种后每天观察小鼠是否出现病征,特别是有无麻痹。分别在感染后1, 3, 5, 7 d和麻痹发作日(DP)采集小鼠的血液、脑组织和脊髓标本。每个时相点8只小鼠,5只用于病毒滴度测定的标本取出后于-80 ℃保存,3只用于免疫荧光染色,标本处理见后。另外,对照组小鼠脑内接种25μl MEM培养基,共5只,2只用于免疫荧光染色,3只用于病毒滴度的测定,标本采取和处理同感染组。

1.4 病毒滴度测定

加入适量的病毒稀释液(含2%小牛血清,10 mmol/L HEPES, pH 7.2~7.4)于组织标本中并将其碾碎,离心15 min

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(4℃, 15 000 r/min), 收集组织悬液, 用空斑法测定其病毒滴度。血清的病毒滴度用同样方法测定。

1.5 免疫荧光染色

分别在感染后 1, 3, 5, 7 d 和 DP 时采取大脑褐脊髓标本, 进行免疫荧光染色, 检测 DEN 病毒抗原的分布。取材和标本制作方法简述如下: 4% 多聚甲醛(0.2 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液配制)灌流固定后, 取大脑和脊髓标本, 再用 4% 多聚甲醛继续固定 2 h(4 ℃)。0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗后, OCT 包埋剂包埋, 制成冰冻切片(10 μm)。与 DEN 病毒反应的两种小鼠单克隆抗体(504 和 301)为检测 DEN 病毒抗原的第一抗体[11], 荧光素异硫氰酸盐标记的抗小鼠免疫球蛋白(DAKO)为第二抗体, 染色步骤参照文献[12]。用荧光显微镜观察免疫荧光反应(Axiolpan, Zeiss, Germany)。

2 结果

2.1 临床资料

脑内接种 DEN-2 病毒后, 小鼠逐渐出现运动迟缓、脊柱后侧凸, 在感染后 8~9 d, 所有小鼠均发生后肢和/或前肢麻痹, 并在麻痹出现 24 h 左右死亡。

2.2 DEN-2 病毒在 CNS 中的生长

如图 1 所示, 感染后 3d, 可在 80% 的小鼠脊髓和脑组织中检测到病毒, 滴度分别为 $10^{1.9}$ pfu/g 和 $10^{2.5}$ pfu/g, 感染后 5 d 至 DP, 脊髓和脑组织病毒检出率均为 100%, 但滴度略有不同, 脊髓的为 $10^{5.1}$ ~ 10 5.7 pfu/g[1], 脑组织为 $10^{5.7}$ ~ $10^{6.3}$ pfu/g。在感染后同一时相点, 脊髓的颈、胸和腰段的病毒滴度无明显差别。在感染的全过程血清中未检测到病毒。

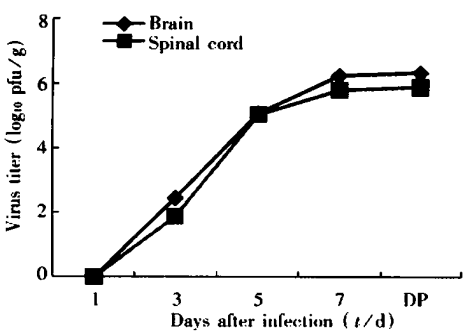


图 1 感染后 DEN 病毒在大脑和脊髓的生长增殖, 每一点的数值为 5 只小鼠标本的平均值

Fig 1 Growth curves of DEN—2 virus in the brain and spinal cord of infected mice after inoculation. Virus titer is determined with plaque assay on a Vero cell monolayer culture. Value of the tissues from 5 mice is averaged for each time point. DP: Day of paralysis onset

2.3 DEN-2 病毒在中枢神经系统中的分布

免疫荧光染色显示 DEN 病毒抗原主要分布在脊髓灰质及大脑海马和基底核, 见图 2a。在脊髓, 感染后 3 d, 仅见极少的前角神经元呈弱阳性, 见图 2a, 5 d 时数量明显增多且呈强阳性, 而侧角和后角在感染后 5 d 才观察到染色较弱的 DEN 免疫反应性神经元, 7 d 和麻痹发生时, 数量增多且染色增强, 见图 2b。与此同时, 前角阳性神经元数明显减少。DEN 病毒在颈段、胸段和腰段脊髓均表现出如上所述的传播模式, 即前角神经元的感染先于侧角和后角。在大脑, 感染后 5 d, 海马和基底核的 DEN 免疫反应性神经元呈弱阳性, 数量较少。随着病毒复制, 感染后 7 d 和麻痹发生时, 可见大量的 DEN 免疫反应性神经元呈强阳性(图 2c)。然而在感染后 1 d, 中枢神经元中未见登革病毒抗原; 未见神经胶质细胞存在 DEN 病毒抗原。对照样本为登革病毒抗原阴性。

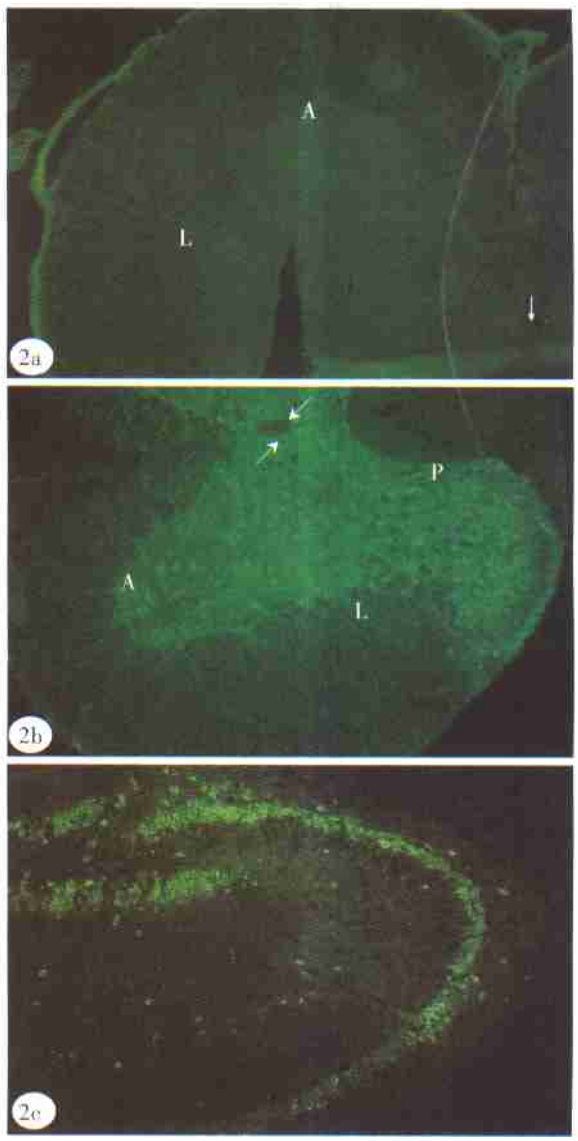


图 2 免疫荧光显示 DEN 病毒抗原在脊髓和大脑的分布

2a: 感染早期(3 d), 在脊髓前角观察到少数染色较弱 DEN 病毒抗原阳性神经元 (× 150); 2b: 感染晚期(7 d), 在脊髓侧角(L)和后角(P), 观察到数量不同、染色较强 DEN 病毒抗原阳性神经元, 但此时前角(A)阳性神经元数较早期明显减少 (× 200); 2c: 感染后 7 d, 在大脑的海马和基底核, 观察到较多的 DEN 阳性神经元 (× 170)

Fig 2 DEN viral antigens in cryosection of the spinal cord and brain

2a: A few of DEN viral antigen positive neurons with weak staining in the anterior horns (A) on day 3 postinoculation(× 150); 2b: A lot of DEN viral antigen positive neurons with strong staining in the neurons of lateral (L) and posterior (P) horns on day 7 after injection though the amount of the neurons in the anterior horns (A) decreasing at this time (× 200); 2c: Many DEN viral antigen positive neurons with strong staining in the hippocampai and basal neclei of the brain on day 7 after inoculation(× 170)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

近年来, 不常见的登革病毒感染病例(肝、脑损害等)明显增多, 昏迷、嗜睡等临床症状的发生表明: 在 DEN 病毒感染过程中, 中枢神经系统可能被累及, 但登革病毒感染神经系统的过程和传播机制尚不清楚。我们用 DEN-2 病毒经脑感染 SCID 小鼠, 观察了感染后病毒在大脑和脊髓的生长和分布特点。本研究发现: 感染后 3 d, 脊髓前角仅有少量的神经元呈现登革病毒抗原阳性反应; 随着感染的发展, 前角登革病毒抗原阳性神经元的数量逐渐增多且染色明显增强, 同时在脊髓侧角和后角也发现数量不等、染色阳性的神经元。当小鼠出现麻痹时, 在侧角和后角可见大量染色较强的阳性神经元, 而此时前角的阳性神经元数明显减少, 这可能是被病毒复制所破坏之故。这些结果提示与侧角和后角神经元相比, 前角神经元对登革病毒可能更加易感, 因此感染后首先受到该病毒的侵入。

本研究还观察到感染 DEN-2 病毒的小鼠出现脊柱后侧突和麻痹, 但是这些症状的发病机制尚未完全明了。接种后, 在脊髓和脑内均测得较高的病毒滴度, 在脑部海马和基底核, 以及脊髓前、侧、后角的神经元中, 也发现有病毒抗原, 这表明接种后 DEN-2 病毒侵入神经元, 并在此增殖。随着感染加重, 脊髓前角的受感染神经元因病毒复制而死亡, 这可能是本研究中小鼠麻痹发生的主要原因。登革病毒在神经细胞中增殖可能是该病毒感染过程中某些神经系统症状的病理基础。

参考文献:

[1] Rice C M. Flaviviridae: the viruses and their replication [A], In Fields Virology. (B N Fields, D M Knipe, P M Howley, Eds) 1996, 931—959. Lippincott—Raven publishers: Philadelphia, Third edition.

[2] Solomon T, Dung N M, Vaughn D W, *et al*. Eurological manifestations of dengue infection[J]. Lancet, 2000, 355(2): 1 053—1 059.

[3] Rajajee S, Mukundan D. Neurological manifestations in dengue hemorrhagic fever[J]. Indian Pediatr, 1994, 31(6): 688—690.

[4] Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue infection with unusual manifestations [J]. J Med Assoc Thai, 1994, 77(8): 410—413.

[5] Angibaud G, Luaute J, Laille M, *et al*. Brain involvement in dengue fever [J]. J Clin Neuronsci, 2001, 8(1): 63—65.

[6] Bhamarapravati N, Clinical Spectrum of dengue infection[A]. Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever (D. J. Gubler and G. Kuno, Eds.), 1997, 115—133. CAB International, New York.

[7] George R, Lum C S, Clinical Spectrum of dengue infection[A]. Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever (D. J. Gubler and G. Kuno, Eds.), 1997, pp: 89—114. CAB International, New York.

[8] Lum L C S, Lam S K, Choy Y S, *et al*. Dengue encephalitis: A true entity? [J]. Am J Trop Med Hyg, 1996, 54(3): 256—259.

[9] An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, *et al*. Development of a novel mouse model for dengue virus infection[J]. Virology, 1999, 263(2): 70—77.

[10] Igarashi A. Isolation of Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses[J]. J Gen Virol, 1978, 40(3): 531—544.

[11] Kimura-Kuroda J, Yasui K. Antigenic comparison of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies[J]. J Gen Virol, 1986, 67(pt12): 2 663—2 667.

(编辑　冷怀明)

(上接 400 页)

热、疼痛难忍, 夜间不能眠, 第 5 天, 双足出现散在瘀点瘀斑, 并渐融合成中央皮肤变白的大片状瘀斑, 右 2 趾皮肤变紫黑, 感觉迟钝, 实验检查提示血浆纤维蛋白原含量 1.3 g/L, 3P 试验阳性, PT 17 s, 考虑弥散性血管内凝血(DIC), 即用肝素、复方丹参、激素静滴治疗, 粪培养+药敏试验示沙门氏菌, 对头孢呋肟敏感; 第 7 天双足大片瘀斑出现散在的数十个小水疱, 第 9 天渐融合成大水疱。对双足处理: 抬高患肢、防止局部感染、水疱抽液减压、局部敷氟哌酸药粉, 白天暴露并行 TDP 治疗仪照射, 夜间加压包扎等处理, 第 17 天双足皮肤开始干燥结痂, 瘀斑、肿胀逐渐消退, 足趾皮肤恢复正常色泽, 住院第 31 天肾功正常, 长出新皮, 病愈出院。

讨论

患者相继出现双足肿胀、水肿, 皮肤温度升高、花斑状紫绀、皮肤变紫黑, 符合血栓性静脉炎皮肤损害的临床诊断标准。其发生的病因分析如下: ①与内毒素有关。沙门氏菌为革兰阴性杆菌, 进入体内后产生内毒素[1], 引起机体凝血、扩张小血管, 释放氧自由基与溶酶而损伤血管内皮细胞[2,3], 使毛细血管壁通透性增加, 引起局部肿胀、水肿; 与血液中性粒细胞反应, 使之产生并释放组胺等扩血管的多肽类活性物质, 进一步加重微循环障碍, 引起肢体末梢缺氧。缺氧通过加速内皮细胞凋亡破坏内皮结构, 使内皮功能异常, 导致血管痉挛[4]。②与 DIC 有关。DIC 时微血栓形成, 对循环差的双足更容易形成血栓, 并阻塞相应部位的血流, 当阻塞动脉时引起局部缺血缺氧, 表现为皮肤苍白、冰冷, 阻塞静脉时局部血液回流受阻引起肿胀、水肿、皮温升高, 继发出血使局部肿胀更加明显, 出现花斑状紫绀。③与肾功能衰竭有关。肾脏功能受损时通过肾脏排泄的有毒物质潴留在体内, 由于血管通透性增加, 有毒物尤其是尿素通过皮肤排泄增加, 毒素对局部皮肤的毒性刺激增强, 加重了皮肤病损。以上因素使双足皮肤经历缺血缺氧、瘀血肿胀、血管周围瘀点性出血、炎症、水泡等改变, 有效的抗凝治疗使微循环得以改善, 血液透析在清除体内代谢产物及其他有害物质, 改善机体内环境, 亦改善了局部病变。本病例提示任何原因引起的循环障碍, 应特别关注末梢循环, 避免肢端皮肤损害。

关键词: 中毒性胃肠炎; 血栓栓塞; 皮肤损害
中图法分类号: R573.306　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 聂和青 主编. 感染性腹泻[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 352—353.

[2] 贺石林. DIC 的发病机制与诊治研究的进展[J]. 湖南医学, 2000, 17(5): 349—352.

[3] 石富胜, 徐根贤, 王利平, 等. 内毒素、烧伤病人血清诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的体外实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(10): 600—602.

[4] 晋　军, 祝善俊, 黄　岚, 等. 血管内皮生长因子对缺氧诱导内皮细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(2): 196—198.

(编辑　潘式文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net