DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.009
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
396 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0396-05

登革病毒在中枢神经系统传播机制的研究

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

提 要:目的 分析登革(DEN)病毒感染后中枢神经系统(CNS)的病理变化及病毒在CNS内的传播方式。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,电镜观察感染后不同时间,DEN病毒在CNS的分布、增殖及感染细胞的病变特点。结果 在感染早期,脊髓中央管上皮细胞胞浆内可见数量不等的病毒颗粒,随着感染的进展,子代病毒主要分布在神经元的粗面内质网和高尔基体内。在感染晚期,典型的神经突触及有髓和无髓的神经纤维中均可见病毒颗粒,其中有些病毒颗粒有与突触前膜融合倾向。在感染过程中,被感染的神经元逐渐出现空泡变性,进而溶解、死亡。结论 经脑内接种的登革病毒可能通过脑脊液播散,侵入脊髓灰质,并在神经元内增殖;并且,除组织间隙外,从神经元到神经元的传播途径可能参与登革病毒在CNS内的传播。

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

Dissemination of dengue virus in nervous system in mice

ZHOU De-shan, AN Jing, WANG Jia-li (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the transmission of dengue (DEN) virus in the central nervous system (CNS) and the pathogenesis of DEN infection in the system of mice. Methods Severe combined immunodeficient mice were intracerebrally inoculated with dengue virus type 2 (DEN-2). The distribution of the virus in CNS and ultrastructural pathomorphology of the infected cells were observed with electron microscopy after infection. Results DEN virions were seen in the cytoplasm of the ependymal cells in central canal in the early phase of the infection, and filial virus was mainly observed in lumen of rough endoplasmic reticulum (RER), RER vesicles and Golgi complex of infected neurons in the spinal cord. DEN-2 was also found in the myelinated, unmyelinated nerve fibers and typical synapse of the neurons during the late phase of the infection. Some vesicles containing viral particles appeared to fuse with the membrane of presynapse. During the infection, the neurons gradually showed vacuolation and death. Conclusion The results suggest that DEN virus, replicating in the neurons, disseminates to gray matter of the spinal cord via the cerebral spinal fluid and ependymal cells. Beside these kinds of transmission, neuron to neuron transport might be involved in it too.

Key words: dengue virus; severe combined immunodeficient mice; neuron

登革(Dengue, DEN)病毒属于黄病毒属,根据抗原性不同分为4个血清型(DEN-1, 2, 3, 4)。该病毒以蚊子为传播媒介,可引起轻型的登革热(DF)和危及生命的症候群——登革出血热/登革休克综合征(DHF/DSS)[1]。据报道,世界上每年大约有1亿人的健康受到该病毒的威胁,且发病率近年来呈明显增加趋势。所以登革病毒感染已成为热带和亚热带地区严重的公共卫生问题。

一般来讲,典型DHF/DSS病例的临床表现主要是出血和由血管通透性增高引起的低血容量性休克及肝脏损害。然而,近年来一些不常见的临床表现如脑部症状在DEN病毒感染的病人中经常出现[2~4]。关于登革病毒感染后脑部症状的发生机制目前尚不明了。有学者认为可能与肝脏损害有关即肝性脑病。但也有学者根据DEN感染急性期出现的昏迷、炎症反应性脑电图及远期后遗症如四肢末端麻痹、感觉丧失等,对肝性脑病的理论提出异议,认为登革病毒感染可能累及中枢神经系统(CNS)[5~8]。在以往的研究中,我们用DEN-2经腹腔感染HepG2移植的SCID小鼠,发现接种后小鼠出现进行性脊柱后侧凸,进而瘫痪。免疫荧光染色法显示脑组织神经元呈现DEN病毒抗原阳性反应[9]。这一结果也支持DEN病毒感染可能累及CNS的论点。但目前,DEN病毒在CNS内的传播机制和感染的过程等尚未完全阐明,为此,本研究对SCID小鼠脑内接种DEN-2病毒,利用电镜于观察感染后不同时间,病毒在脊髓的分布以及被感染细胞的超微病理结构,为阐明DEN病毒在CNS的致病机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 小鼠

健康雌性、14周龄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。

1.2 接种病毒

DEN-2病毒(Tr1751)系从1例登革热病人血清中分离得到的,由Dr. Otani A(日本国立传染病研究所)惠赠。经白纹伊蚊细胞(C6/36)中增殖传代[10],-80 ℃冰箱保存。病毒滴度为10^6 pfu/ml。

1.3 病毒感染实验

每只小鼠脑内注射2.5×10^4 pfu(25 μl)的DEN-2,分别在第1, 3, 5, 7天和麻痹发作时(DP)取脊髓样本(每个时间点选用2只小鼠),用于超微结构的观察。另外选用3只小鼠经脑注射25 μl的MEM培养基作对照。

1.4 超微结构观察

在乙醚麻醉下,用Krebs'液行心脏灌注去除血液后,用

基金项目:重庆市科学技术委员会科研基金资助项目(2001)
作者简介:周德山(1958-),男,辽宁省昌图县人,博士,教授,主要从事消化道起搏细胞的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752231
收稿日期:2002-01-27;修回日期:2002-03-10

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

Kamovsky's 固定液(含 4% 的多聚甲醛和 2.5% 的戊二醛 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液)灌注 30 min。取出小鼠的脊髓, 修成 2 mm × 3 mm × 5 mm 的组织块, 并浸入上述固定液继续固定 2~3 h(4 ℃)。经相同的缓冲液漂洗后, 1% OsO_4 后固定 1 h (4 ℃)。蒸馏水漂洗, 醋酸铀染色后, 系列酒精脱水干燥。Epon 环氧树脂包埋。超薄切片(60 nm, Reichert 超薄切片机)后, 枸橼酸铅和醋酸双氧铀复染, 电镜观察(H-7000, Hitachi)。

2　结果

电镜下, 典型的登革病毒颗粒直径为 45~55 nm, 呈圆形, 中心电子密度较高的核衣壳被脂质双层所包绕。在感染早期(感染后 1~3 d), 在中央管上皮细胞质(非粗面内质网或高尔基体)、上皮细胞下细胞内可见数量不等的病毒, 并有向脊髓中央灰质扩散之趋势, 见图 1。子代病毒主要存在于脊髓神经元的粗面内质网及由粗面内质网衍生的小泡内, 见图 2, 粗面内质网常表现为轻度扩张、空泡化, 见图 3, 4。随着感染的发展, 高尔基体内可见大量小泡, 部分小泡含有病毒颗粒。在感染第 5 天至麻痹发作, 除粗面内质网和高尔基体外, 在有髓和无髓的神经纤维内及突触内均可见病毒颗粒, 见图 6~10。含病毒颗粒的小泡与突触前膜十分接近, 并与之融合。当小鼠麻痹时(感染后 8~9 d), 前角部分神经元消失, 这可能是登革病毒复制、破坏了神经元所致。对照组小鼠未见上述超微结构变化。

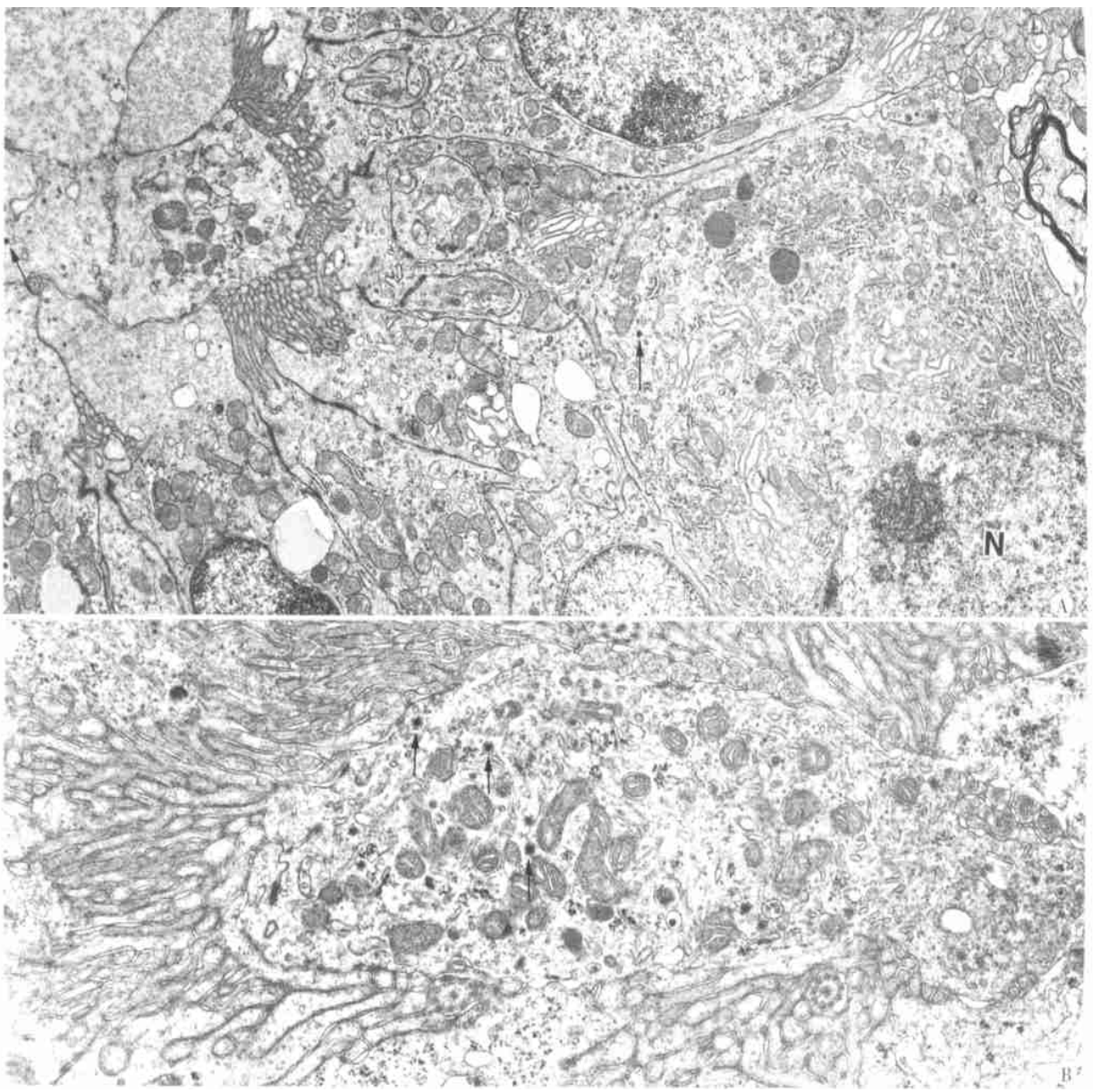


图 1　感染后 3 d 登革病毒颗粒(箭头)存在于上皮细胞胞浆及其上皮下细胞胞浆内

A: 登革病毒颗粒(箭头)存在于上皮细胞胞浆及其上皮下细胞胞头内(N: 细胞核, TEM × 8 000); B: 显示 A 中上皮细胞一部分, 登革病毒颗粒(箭头)存在于靠近中央管空腔的上皮细胞胞浆内(TEM × 18 900)

Fig 1　DEN viral particles are seen in the ependymal and subependymal cells of the central canal 3 d after infection

A: Viral particles (arrows) in the cytoplasm of ependymal and subependymal cells (N: nucleus, TEM × 8 000); B: Viral particles (arrows) in the cytoplasm of an ependymal cell near to the lumen of central canal from a part of Fig 1a (TEM × 18 900)

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

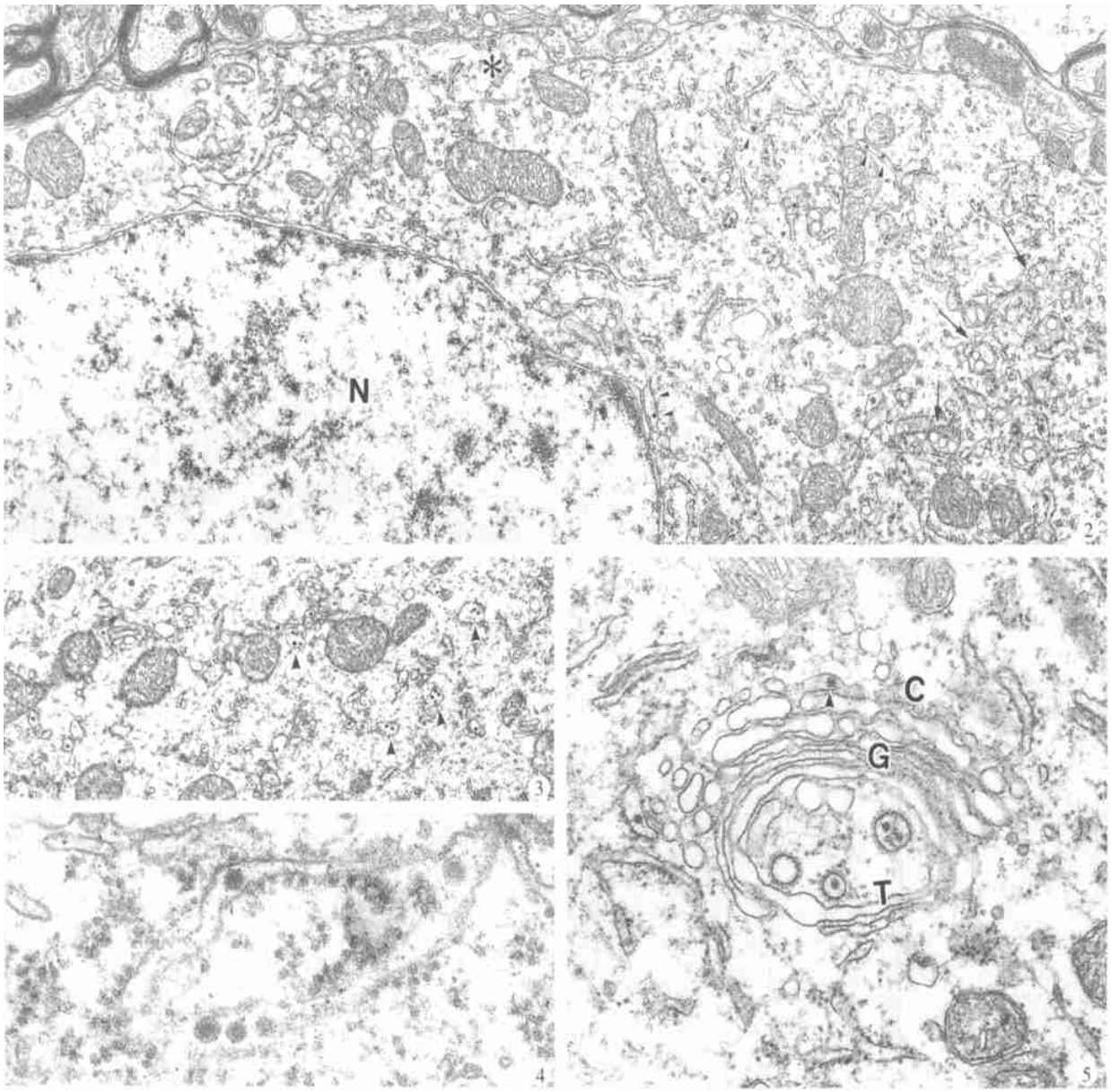


图 2 低倍电镜显示感染后 5 d, 登革病毒颗粒(arrowheads)、粗面内质网(RER)衍生的囊泡(arrows)存在于脊髓前角运动神经元细胞浆内, 一些含病毒颗粒的小泡位于细胞膜下(*), N: 细胞核 (TEM× 12 500)

Fig 2 Typical DEN viral particles (arrowheads) and membrane bounded vesicles (arrows) in rough endoplasmic reticulum (RER) are seen in a neuron of the anterior horn. A vesicle (*) containing virions adjacent to the membrane of the neuron is observed on day 5 postinfection (N: nucleus, TEM× 12 500)

图 3 感染后 5 d, 在脊髓灰质神经元内可见多数含有病毒颗粒的 RER 衍生的囊泡(Arrowheads) (TEM× 12 000)

Fig 3 Vesicles derived from many RER with the virions (arrowheads) are observed in the infected neuron in spinal cord gray matter 5 d after infection (TEM× 12 000)

图 4 感染后 3 d, 可见病毒颗粒存在于神经元的 RER 腔内 (TEM× 50 500)

Fig 4 Virions in the lumen of the neuron RER are seen on day 3 postinfection (TEM× 50 500)

图 5 小鼠感染 3 d, 登革病毒颗粒囊泡(Arrowhead)分布于高尔基体(G)的 cis-(C)和 trans (T)侧 (TEM× 30 000)

Fig 5 Vesicles with DEN viral particles (arrowhead) are seen in the cis-(C) and trans (T) compartments of the Golgi complex (G) 3 d postinfection (TEM× 30 000)

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

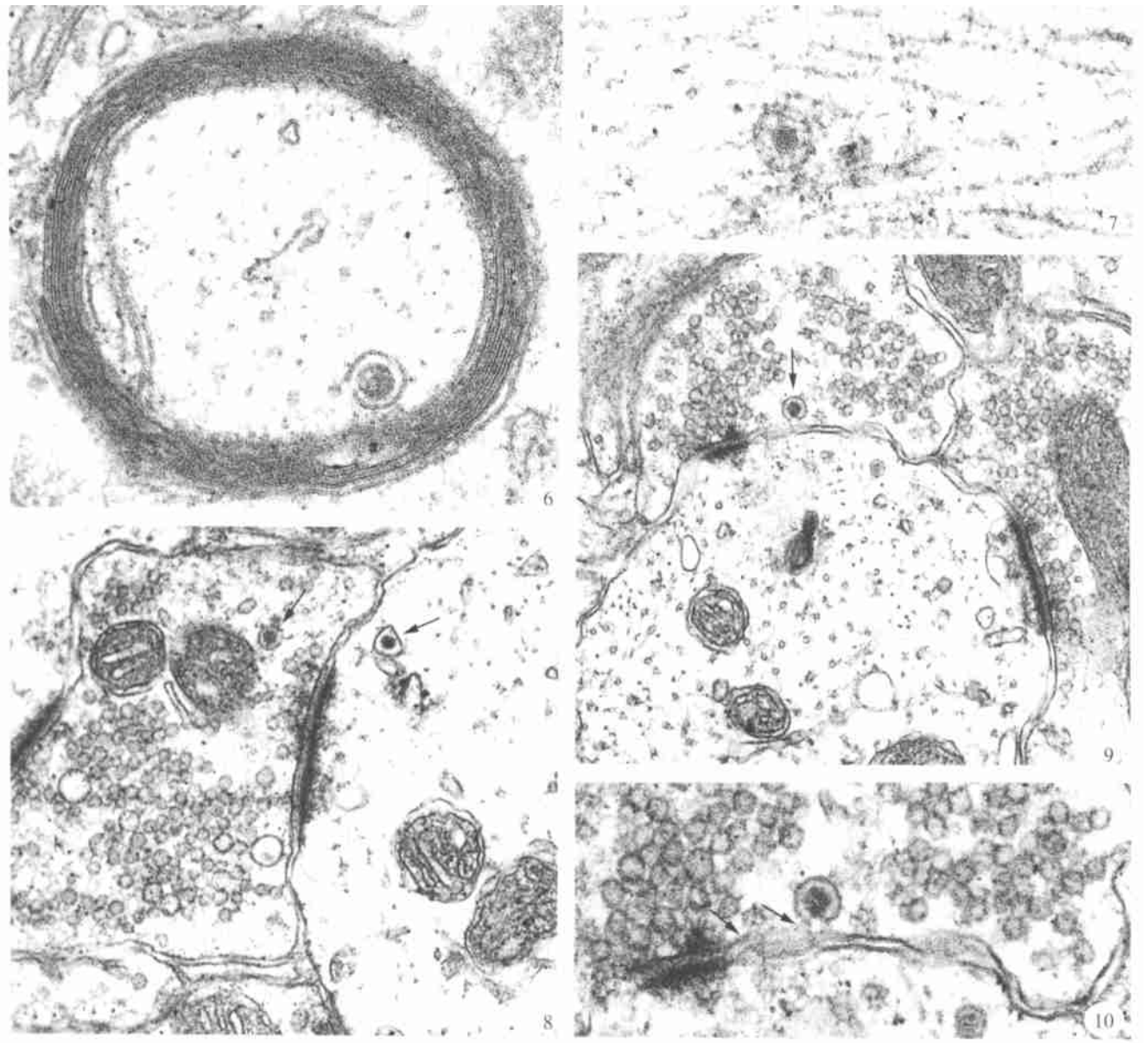


图 6　感染后 5 d、小鼠脊髓灰质可见含有病毒颗粒的小泡分布在有髓神经纤维内　(TEM× 103 000)

Fig 6　Membrane bound vesicles carrying virus particles are observed in the cross and longitudinal sections of myelinated nerve fibers in spinal cord gray matter on day 5 postinfection　(TEM× 103 000)

图 7　感染后 5 d、小鼠脊髓灰质可见含有病毒颗粒的小泡分布在无髓神经纤维内　(TEM× 92 000)

Fig 7　Membrane bound vesicles carrying virus particles are observed in the cross and longitudinal sections of unmyelinated nerve fibers in spinal cord gray matter on day 5 postinfection　(TEM× 92 000)

图 8　典型的突触结构: 含线立体、大量的突出小泡, 突触间隙、突触前、后膜活化区, 感染后 7 d、含有病毒颗粒的小泡 (arrows) 存在于突触的两侧　(TEM× 48 000)

Fig 8　Typical synaptic features are seen comprising mitochondria, clustered synaptic vesicles, cleft and active zones of the pre- and post-synaptic membranes. Membrane bound vesicles carrying viral particles (arrows) are seen in both sides of the synapse on day 7 postinfection　(TEM× 48 000)

图 9　感染后 7 d 含有病毒颗粒的小泡膜(Arrow) 靠近突触前膜, 似与之融合　(TEM× 35 000)

Fig 9　Membrane bound vesicle carrying a virus particle (arrow) near to the ending of an axon appears to be fusing with the presynaptic membrane on day 7 postinfection　(TEM× 35 000)

图 10　图 9 的高倍像显示病毒颗粒的小泡膜(arrows)与突触前膜融合部分　(TEM× 80 000)

Fig 10　Vesicle membrane seems to be fused with the presynaptic membrane (arrows) around the membrane bound vesicle indicated by an arrows in Fig 9　(TEM× 80 000)

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

3 讨论

在以往的研究中，有关感染登革病毒后细胞超微结构的变化通常是用体外细胞系来完成的[11,12]。本研究用登革病毒经脑感染SCID小鼠，在整体水平分析了感染后病毒在 CNS 内传播机制及感染细胞的病变特点，初步阐明了登革病毒在CNS内的可能传播模式。

由于在脊髓中央管上皮细胞中最早发现病毒，而且病毒复制在脑和脊髓中同时进行，所以本研究认为DEN-2 经脑接种后的初始分布可能与 Mims[13] 所报道的印度墨汁在脑内的分布一致，即注射的墨汁颗粒并不沉积在针尖处，而是沿着针迹扩散到整个脑脊液系统，包括脑室系统和脊髓中央管。由于中央管上皮细胞中的病毒仅分布于胞质而非粗面内质网，免疫荧光染色这些细胞对病毒抗原呈阴性反应，提示 DEN 病毒可能只是通过了上皮细胞，未在其中增殖，经脑接种的DEN-2 病毒可能经脑脊液、上皮细胞扩散侵入脊髓的中央灰质神经元，并在此增殖。

据报道，病毒进入神经系统后，经间质转移是其在脑和脊髓中扩散的主要途径之一[15]。本研究虽未在细胞外间隙观察到登革病毒颗粒，但不能排除上述途径存在于登革感染过程中，因为电镜下捕捉病毒经间质移动的瞬间是十分困难的。有趣的是，随着感染的发展，在神经元的突触和神经纤维中均可见登革病毒，并且部分含病毒颗粒的小泡与突触前膜十分接近，并与之融合。上述结果表明：在登革病毒感染过程中，除了经间质移动外，登革病毒还可能通过“神经元—神经元”的方式进行传播。

综上所述，我们认为登革病毒在神经系统的传播机制可能如下：经脑接种后，病毒颗粒通过脑脊液系统播散入大脑和脊髓灰质；然后，经间质和“神经元—神经元”途径在神经系统内扩散。病毒在神经细胞内增殖，使其发生空泡变性，最终导致神经细胞死亡。这些变化可能是该病的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 B N, Knipe D M, Howley P M, Eds:. Fields Virology, Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, 1996. 931—959.

[2] Solomon T, Dung N M, Vaughn D W, *et al*. Neurological 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]. In (Gubler DJ and Kuno G, Eds.) “Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever”, New York: CAB International, 1997. 115—133.

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

[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] Barth O R. Replication dengue viruses mosquito cell cultures-A model from ultrastructural observations[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1992, 87(3): 565—574.

[12] Takasaki T, Takada K, Kurane I. Electron microscopy study of persistent dengue virus infection: analysis using a cell line persistently infected with dengue-2 virus[J]. Intervirology, 2001, 44(1): 48—54.

[13] Mims C A. Intracerebral injections and the growth of viruses in the mouse brain[J]. Br J Exp Pathol, 1960, 41(1): 52—58.

[14] 安 静，周德山，张俊磊. 经脑感染后登革病毒在小鼠脊髓分布特点的研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(4)：401—403.

[15] Hase T. Virus-neuron interactions in the mouse brain infected with Japanese encephalitis virus[J]. Virchows Archiv B cell pathol, 1993, 64(2): 161—170.

（编辑 冷怀明）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)04-0400-01

中毒性胃肠炎伴双足血栓性皮肤损害 1 例

A case of toxic gastroenteritis combined with thrombo-embolism lesion of feet skin

王殿珍，吴雄飞，吴 亿 （第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心肾内科，重庆 400038）

患者，女，45 岁，因进食不洁食物后出现恶心呕吐、腹痛腹泻 4 d、少尿、双足冰冷 2 d，血尿素氮 21.0 mmol/L，血肌酐 683 μmmol/L，WBC 14.2×10^9/L，血小板 28×10^9/L 既往无皮肤出血、鼻衄等病史。查体 BP 11/7 kPa，口唇青紫，背部有瘀点瘀斑，双足冰冷。以中毒性胃肠炎、急性肾衰、血小板减少症于 2000-12-29 入院。入院后予抗休克、抗感染、纠正酸中毒、血液透析、输血小板，积极改善全身情况，注意肢体末端尤其是双足部的保暖等处理。住院第 3 天双足踝以下肿胀明显，皮肤潮红、灼

（下转 403 页）

作者简介：王殿珍(1964—)，女，四川省成都市人，主管护师，主要从事肾脏内外科及器官移植护理工作方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(023)68754188

收稿日期：2001-08-11；修回日期：2001-12-03

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