

文章编号:1000-5404(2014)20-2065-06

论著

WAS 基因缺陷小鼠巨细胞病毒急性感染模型的建立及感染特点

张玉琳, 罗小华, 刘林 (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院血液内科)

[摘要] **目的** 用小鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV) Smith株建立 WAS 基因缺陷小鼠(129S6/SvEvTac-Was^{tm1Sbs}/J)全身播散型感染模型并观察感染特点。**方法** 同窝内简单随机法选取实验组小鼠(129S6/SvEvTac) WASp^{-/-}(雌雄各半),感染对照组小鼠(129S1/SvImNJ) WASp^{+/+} 6只,雌雄各半,6~8周龄。腹腔内接种0.2 mL小鼠巨细胞病毒悬液 1×10^5 PFU;另设6只129S6小鼠为空白对照组。各组分别接种MCMV 9 d后处死小鼠,取小鼠唾液腺分离病毒,RT-PCR检测小鼠主要脏器组织中MCMV gB基因,HE病理染色观察小鼠脏器病理损害,流式细胞术检测WAS基因缺陷小鼠脾脏MCMV特异性细胞毒性T细胞(CTL)比例。**结果** 与对照组野生型小鼠相比,实验组WASp^{-/-}小鼠MCMV感染后一般状况差,体质量下降,活动少,耸毛反应明显,有死亡(1/6)。感染后第9天,实验组和感染对照组小鼠唾液腺均分离出巨细胞病毒,主要脏器心、肝、肺、肾和唾液腺中MCMV gB基因RT-PCR检测结果为阳性。实验组小鼠肺内MCMV gB基因mRNA含量显著高于对照组小鼠($P < 0.05$),空白对照组未检测出病毒。MCMV感染后主要脏器出现明显病理损害,其中肺部病理损害严重。流式细胞术检测结果显示WAS基因缺陷小鼠脾脏MCMV CTL比率与对照组比较无统计学差异($P = 0.26$)。**结论** 腹腔注射MCMV 1×10^5 PFU成功建立成年WAS基因缺陷小鼠急性感染模型,观察到较对照组野生型小鼠更明显的、较重的急性感染反应;肺为感染主要靶器官之一;初次感染后脾脏MCMV CTL比例无明显变化。

[关键词] 鼠巨细胞病毒;WAS基因缺陷小鼠;感染模型;流式细胞术

[中图分类号] R-332;R512.99;R593.3

[文献标志码] A

Establishment of WASp-deficient mice model of acute murine cytomegalovirus infection and infection characteristics

Zhang Yulin, Luo Xiaohua, Liu Lin (Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To establish a WASp-deficient mouse (129S6/SvEvTac-Was^{tm1Sbs}/J) model of induced systemic infection with murine cytomegalovirus (MCMV) and investigate the infection characteristics. **Methods** WAS-null mice were randomly chosen as model group and blank control group respectively ($n = 6$ for each group). They were infected with 1×10^5 PFU MCMV (0.2 mL) by intra-peritoneal administration. WASp^{+/+} mice were used as infection control ($n = 6$). All experimental mice were under closely observation and sacrificed in 9 d after the intraperitoneal injection. Tissue samples were collected under aseptic conditions from each experimental mouse. Salivary glands were taken for virus separation and titer test. The histological changes of the main visceral organs and tissues were examined after HE staining, and the mRNA expression of MCMV gB was detected by RT-PCR. Flow cytometry was used to detect the percentage of MCMV cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in splenic lymphocytes from model group and infection control group. **Results** Compared with WASp^{+/+} mice infection control, the general condition of infected mice in WASp^{-/-} infection groups was getting worse after the infection in terms of body weight reduction, lack of movement, more piloerection, with a mortality of 1/6. In 9 d after infection, cytomegalovirus was found in the salivary glands of both infection groups, and MCMV gB mRNA was positive in the heart, liver, lung, kidney and salivary glands, with the expression level significant higher in the WASp^{-/-} infection group than in WASp^{+/+} infection control ($P < 0.05$). No MCMV mRNA was detected in mice without the infection. Histopathological injury was found in the livers, kidneys, lungs and hearts, and the lung was the critical target organ. The proportion of

[基金项目] 国家自然科学基金(81100388)

[通信作者] 罗小华,电话:(023)89011532, E-mail: xiaohua.luo@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140702.1412.003.html> (2014-07-01)

MCMV CTLs in splenic lymphocytes had no significant difference among these groups ($P = 0.26$). **Conclusion**

An acute virus-infection model is established for the first time by intra-peritoneal injection of 1×10^5 PFU MCMV in adult WASp^{-/-} mice. More obvious and severe manifestations of acute infection are observed in WASp-deficient mice than in wide type, with lung as the critical target organ. There is no obvious change in the proportion of MCMV CTLs after the primary infection between the deficient and wild type mice.

[**Key words**] murine cytomegalovirus; WASp-deficient mouse; infection; flow cytometry

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81100388). Corresponding author: Luo Xiaohua, E-mail: xiaohua.luo@gmail.com

WAS 基因编码的 WAS 蛋白 (WASp) 是一种造血系统特异的细胞骨架关键调节因子,通过聚合、重组肌动蛋白,调节多种造血细胞的趋化、黏附、迁移和细胞活化^[1]。对于在 TCR 和共刺激分子激活下的 T 细胞, WASp 参与募集肌动蛋白和其他突触蛋白,与细胞骨架重新排列形成免疫突触,得以使 TCR 信号有效传导, T 细胞增殖。WAS 基因缺陷导致 WASp 表达异常可引起人类免疫缺陷病 Wiskott-Aldrich 综合征 (WAS), 主要表现为血小板减少、湿疹和严重的免疫功能紊乱,易导致出血,并发严重感染。国内外的研究均表明 WAS 患者行造血干细胞移植后 CMV 发生率较高,可以引起多脏器和系统的损害,较其他人群表现的更为严重,且对抗病毒药物治疗效果不理想^[2-3]。因此, WASp 可能参与 CMV 感染后机体的免疫调节过程。本实验应用小鼠巨细胞病毒 (murine cytomegalovirus, MCMV) Smith 株感染成年 WAS 基因缺陷 (WASp^{-/-}) 小鼠,建立 MCMV 全身播散感染模型,观察小鼠感染后脾脏 MCMV 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 的增殖及主要脏器的组织损害特征,旨在为研究 WASp 参与移植后 CMV 特异性免疫重建奠定理论和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 实验组和空白对照组采用 WASp^{-/-} 小鼠 (129S6/SvEvTac-Was^{tm1Sbs}/J) 各 6 只,购于美国 Jackson 实验室;感染对照组小鼠 (同品系小鼠,无 WAS 基因缺陷,表示为 WASp^{+/+}, 129S1/SvImNJ) 6 只,购自南京大学国家遗传工程小鼠资源库。每组雌雄各半,6~8 周龄,体质量 19~22 g,于重庆医科大学实验动物中心 SPF 级屏障环境饲养,其中实验组和空白对照组选取同窝小鼠按 2:1 的雌雄比例进行合笼繁殖,温度 (22±3)℃, 12/12 h 昼夜循环条件下自由进食。

1.1.2 细胞和病毒株 NIH 3T3 购自武汉大学保藏中心。于重庆医科大学眼科学实验室传代增殖后使用。MCMV Smith 病毒株购自美国典型培养物保藏中心,在 NIH 3T3 细胞系中传毒增殖,收获病毒用于本实验。

1.1.3 主要试剂和实验设备 D-Hanks、DMEM 和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;逆转录 PCR 试剂盒 (6110A) 和 PCR 扩增试剂盒 (RR701A) 购自 TaKaRa 公

司;PE 标记五聚体 [H-2Db/HGIRNASFI (MCMV m45 985-993)] 购自 ProImmune 公司,流式抗体 CD8a-Percp 为 BD 公司产品;PCR 扩增仪 (ABI 公司)、水平电泳仪 (北京市六一仪器厂)、常温离心机 (Eppendorf 公司)、流式细胞仪 (BD 公司) 和凝胶成像分析仪 (Bio-Rad) 由重庆医科大学眼科学重点实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 实验小鼠 WAS 基因型鉴定 无菌剪小鼠尾尖组织 0.5 cm 置入 1.5 mL Eppendorf 管中,裂解法提取基因组 DNA。基因型鉴定引物:共用上游引物:5'-CCCATCAGGTGCTCCACTA-3'; WASp^{-/-} 下游引物:5'-GCTATCAGGACATAGCGTTGG-3'; WASp^{+/+} 下游引物:5'-TTTGAATCCACTCGGTGCTC-3'。扩增片段长度:WASp^{-/-} 650 bp;WASp^{+/+} 175 bp。反应体系:50 μL。扩增条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 2 min;10℃ 保温。

1.2.2 MCMV 毒株制备 NIH 3T3 细胞经 0.25% 胰酶、0.02% EDTA 消化,以 1×10^6 /mL 传代并培养过夜,贴壁后倾去培养液,取 MCMV (2×10^5 PFU/mL) 5 μL 接种于单层的 NIH 3T3 上,置 37℃,5% CO₂ 培养箱中吸附 1.5 h (期间每 15 分钟晃动瓶身 1 次),加入 5 mL 维持液 (含 3% 胎牛血清的 DMEM),放置 CO₂ 培养箱中继续培养。每日在倒置显微镜下观察待 80%~90% 细胞发生细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 时,刮取贴壁细胞使其脱落,收获细胞培养物。反复冻融 3 次,在 4℃ 条件下以 6 000 r/min 离心 30 min,将上清液等量分装后 -80℃ 保存备用。

1.2.3 半数细胞培养物感染量 (50% Tissue culture infective dose, TCID₅₀) 测定 MCMV 感染力 无菌试管内用 D-Hanks 液对病毒液做连续 10 倍稀释。吸取每一稀释度的病毒液 100 μL 于已生长成单层细胞的 96 孔板,每一稀释度做 8 复孔,另取两孔加入 100 μL D-Hanks 液作为对照,置于 37℃ CO₂ 恒温培养箱吸附 1.5 h 后,每孔加入 100 μL 维持液维持细胞基本生长。每天观察至终点 (能看到引起细胞不再发生病变的病毒最高稀释度)。TCID₅₀ 计算 (Reed-Muench 法)^[4]: 距离比例 (PD) = (出现 CPE 孔高于 50% 的百分数 - 50) / (出现 CPE 孔高于 50% 的百分数 - 出现 CPE 孔低于 50% 的百分数); X = PD × 1 + 高于 50% 孔出现 CPE 稀释度的对数;故该病毒液的毒力为: TCID₅₀ = 10^X/0.1 mL。

1.2.4 MCMV 全身播散模型的建立 实验组及感染对照组小鼠腹腔内接种 1×10^5 PFU 病毒悬液 0.2 mL,空白对照组接种无菌 PBS 0.2 mL;每天观察小鼠体质量、食欲、活动、反应变化等情况,接种 MCMV Smith 毒株后第 9 天,无水乙醚麻醉,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌分离小鼠肝、脾、肺、肾、心脏组织和唾液腺。

1.2.5 唾液腺病毒分离及毒力滴定 将无菌取得的小鼠唾液腺用1 mL DMEM充分匀浆,3 000 r/min,20 min,4 ℃。按照1.2.3步骤对各组小鼠唾液腺匀浆液进行毒力滴定。

1.2.6 组织学检查及 RT-PCR 检测 将无菌分离出的心、肝、肺、肾组织各50 mg提取总RNA,将逆转录后的cDNA进行RT-PCR半定量分析。MCMV gB引物^[5]:上游引物:5'-GTCG-GCCATCTACGAGAGAC-3',下游引物:5'-GACCAGCGGTCTCG-AATAAC-3',扩增片段大小:164 bp。内参照鼠β-actin:上游引物:5'-AACAGTCCGCTAGAAGCAC-3',下游引物:5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3',扩增片段大小:281 bp。扩增条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 40 s,35个循环;72 ℃ 7 min,4 ℃ 保温。剩余组织用10%甲醛缓冲液固定过夜,常规石蜡包埋,切片,HE染色光镜检查组织病理损害。

1.2.7 MCMV CTL 流式细胞术检测 感染MCMV 9 d后取新鲜脾脏制备淋巴细胞悬液,每个样本取2 × 10⁶个细胞进行荧光标记。PBS缓冲液洗涤后用50 μL剩余液体重悬,先加入8 μL PE标记五聚体22 ℃避光孵育10 min,再加入Percp标记CD8a 2 μL,冰上避光孵育30 min,洗涤后直接上流式细胞仪检测CD8⁺T细胞内CTL比例。定义MCMV CTL为CD8a和五聚体双阳性细胞;CD8⁺T细胞内MCMV CTL细胞百分率=CD8a和五聚体双阳性细胞/CD8a阳性细胞 × 100%。

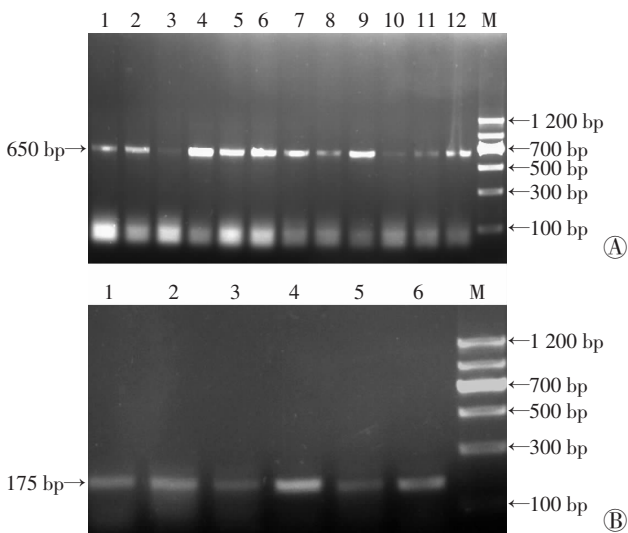
1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。独立样本t检验对WAS基因缺陷小鼠和对照组小鼠结果进行分析。对观察终点前已死亡小鼠,不纳入统计分析,只进行描述性分析。

2 结果

2.1 基因型检测结果

WAS基因为X染色体连锁隐性遗传,故所有WAS基因缺陷小鼠基因型均为WAS-/-。仅在650 bp处出现条带的为实验组WAS基因缺陷小鼠129S6(图1A),仅在175 bp处出现条带的为感染对照鼠129S1(图1B)。

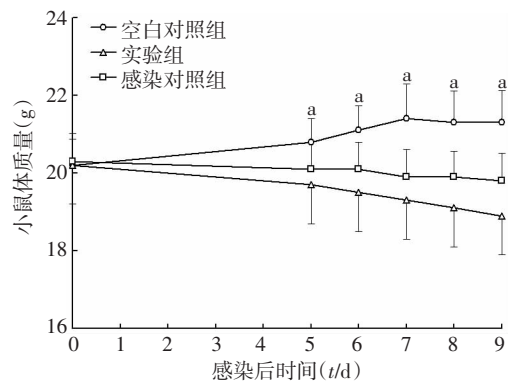


A: WAS基因缺陷小鼠 M:标准;1~6:空白对照组;7~12:实验组; B:正常基因型小鼠 M:标准;1~6:感染对照组

图1 PCR鉴定小鼠基因型结果

2.2 接种MCMV后小鼠体质量的一般变化

小鼠腹腔内接种1 × 10⁵ PFU MCMV后第2天开始逐渐出现明显食欲差、活动少、嗜睡、皮毛稀松、对刺激反应迟钝等表现。其中实验组小鼠感染后体质量下降、耸毛等反应尤其明显。其中1只WAS基因缺陷小鼠接种MCMV后出现腹泻、偶便中带血,体形消瘦明显,于感染后第5天死亡。其余小鼠平均体质量下降0.5~1.5 g(图2)。感染对照组小鼠上述症状均较轻,至处死前无小鼠死亡。从感染第5天开始,实验组小鼠体质量下降显著低于空白对照组(P < 0.05);感染第7天开始,实验组小鼠体质量下降显著低于与感染对照(P < 0.05)。



a: P < 0.05, 与实验组比较

图2 小鼠感染后平均体质量变化

2.3 MCMV感染小鼠唾液腺病毒分离及毒力滴定

实验组和感染对照组小鼠唾液腺匀浆上清液接种于NIH 3T3细胞后,均出现CPE。感染初期,病变细胞零星分布,胞体变大,其内胞质呈颗粒样变,细胞由梭形变为多角;病变中期以出现多核巨细胞,或细胞变圆、收缩聚集成岛状为特征表现;在感染后5~6 d,约50%细胞发生CPE;继续培养至8~9 d,可见病变细胞坏死,从瓶壁脱落,形成灶状空斑(图3)。空白对照组小鼠唾液腺中未分离出病毒。

TCID₅₀法对实验组和感染对照组小鼠唾液腺匀浆液进行毒力测定,实验组小鼠唾液腺感染性病毒量高于感染对照组,但差异无统计学意义(P > 0.05,表1)。

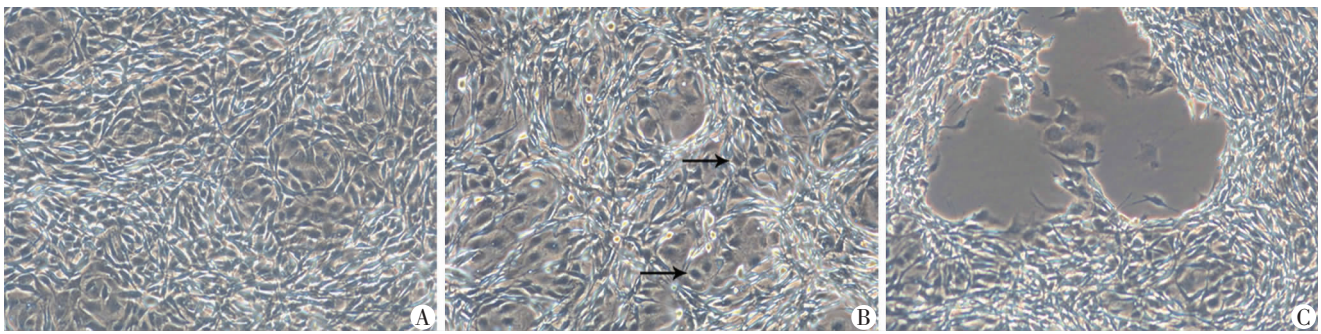
表1 MCMV感染9 d后小鼠唾液腺匀浆液MCMV毒力测定 (lg TCID₅₀)

组别	n	不同实验个体 lg TCID ₅₀						$\bar{x} \pm s$
		1	2	3	4	5	6	
实验组	6	4.77	4.5	-	4.65	4.38	4.65	4.59 ± 0.15
感染对照组	6	4.29	4.64	4.5	4.5	4.5	4.38	4.47 ± 0.12

-: 于感染第5天死亡,未进行毒力测定

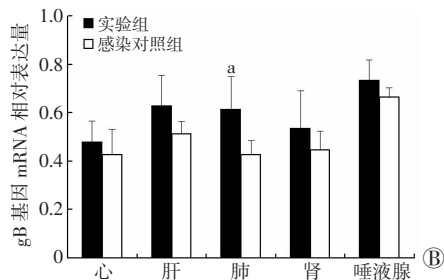
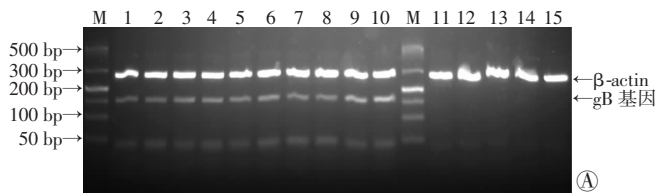
2.4 gB基因检测结果

感染MCMV 9 d后实验组和感染对照组小鼠脏器中均可检测到gB基因的扩增产物。与感染对照组小鼠相比,WAS基因缺陷小鼠肺内MCMV gB基因mRNA含量明显较高(P < 0.05)。其余各被检脏器内病毒载量也均高于感染对照组小鼠,但差异无统计学意义(P > 0.05)。



A: 正常未感染病毒细胞; B: 感染早期; C: 感染晚期 ↑: CPE

图3 MCMV 感染 NIH 3T3 细胞系倒置显微镜下观察 CPE (×200)



A: RT-PCR 检测结果 M: 标准; 1~5、6~10、11~15: 分别为实验组、感染对照组和空白对照组小鼠心、肝、肺、肾和唾液腺 MCMV gB 基因检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$, 与实验组比较

图4 RT-PCR 检测小鼠感染 MCMV 9 d 后各脏器 MCMV gB 基因的表达

2.5 WAS 基因缺陷小鼠 MCMV 感染后内脏组织的病理变化特点

与感染对照组小鼠相比, WAS 基因缺陷小鼠心、肝、肺和肾组织病理损害更为明显。主要表现为心肌细胞间质水肿, 部分心肌细胞溶解, 心肌细胞排列紊乱; 肝细胞空泡样改变, 胞质淡染疏松, 体积增大, 排列紊乱、拥挤, 肝细胞结构破坏, 有溶解性坏死; 两组小鼠感染后均出现肾小球体积变大, 球囊窄小, 但 WAS 基因缺陷小鼠肾小管上皮细胞空泡样变性、坏死、脱落和水肿更为严重。油镜下肺组织可见: WAS 基因缺陷小鼠肺部主要以肺泡间隔增宽尤其明显, 细胞成分明显增加, 间质充血、水肿伴大量以单核细胞为主的炎细胞浸润, 肺泡腔内少见渗出物(图5)。

2.6 WAS 基因缺陷小鼠 MCMV 感染后 MCMV CTL 比例

与空白对照组相比, 感染 MCMV 9 d 后, 小鼠脾脏淋巴细胞大量分裂增殖, 产生 MCMV CTL。流式细胞仪检测结果显示实验组 WAS 基因缺陷小鼠 MCMV CTL 细胞百分率为 $(3.22 \pm 0.53)\%$, 与感染对照组小鼠无统计学差异 ($P = 0.26$, 图6)。

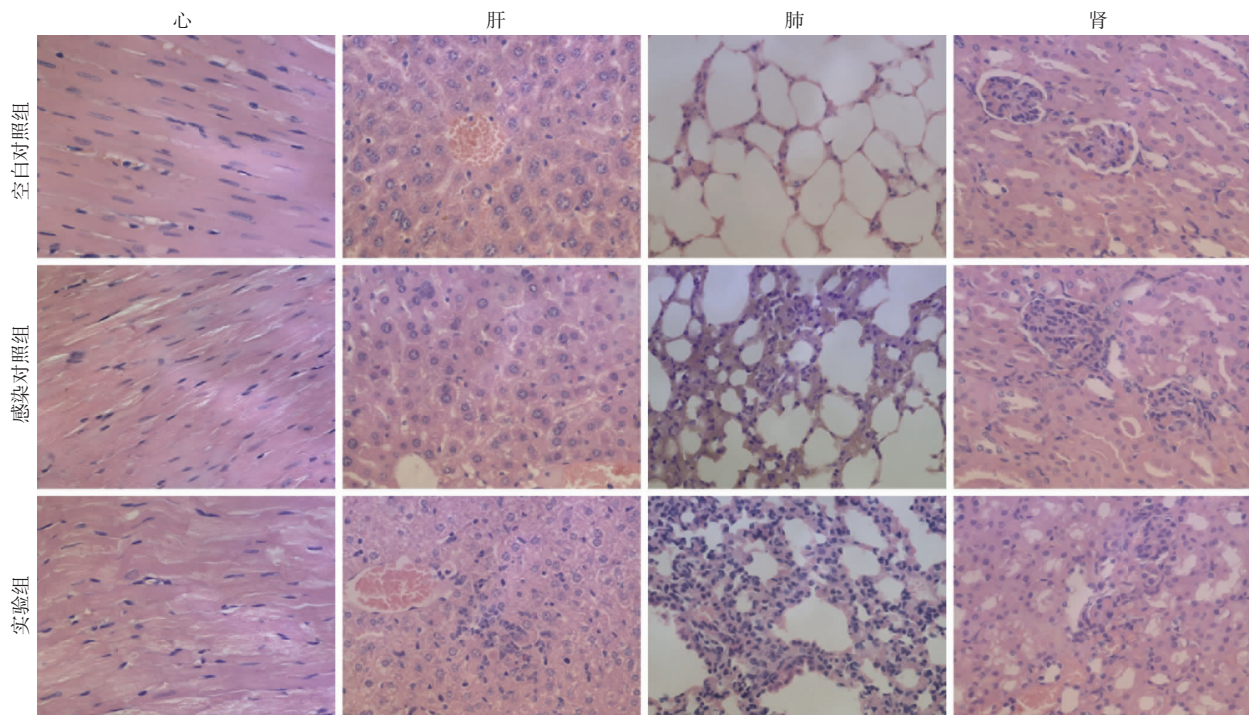
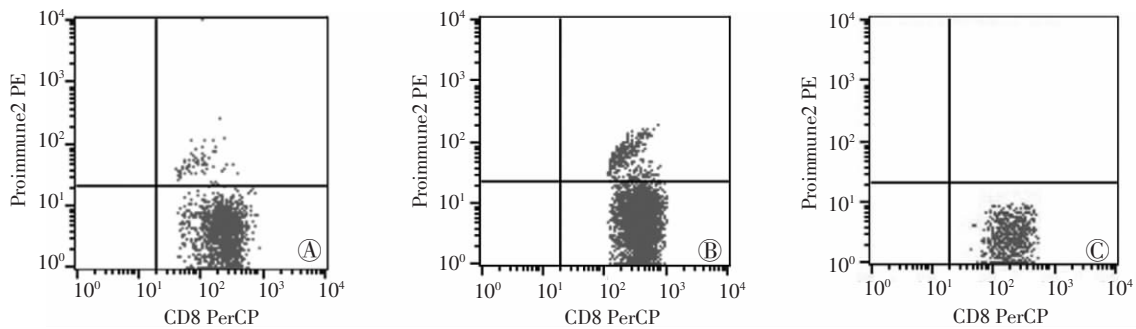


图5 各组小鼠感染后心、肝、肺、肾病理变化 (HE ×400)



A: 实验组; B: 感染对照组; C: 空白对照组

图6 流式细胞术检测小鼠脾脏 MCMV CTL (实验组 $n=5$; 感染对照组 $n=6$)

3 讨论

CMV 感染在人群中非常普遍,多数人群呈临床隐性或潜伏感染,但在机体免疫功能低下如进行造血干细胞移植的患者中易发展为显性感染,CMV 病仍然是移植后患者死亡的重要原因。从长期来看 CMV 的有效控制依赖于 CMV 特异性细胞毒性 T 细胞免疫功能的良好重建^[6-7]。WAS 患者病程中及行造血干细胞移植后多存在严重的 CMV 感染,恰恰为研究 WASp 参与机体免疫调节提供了极好的天然模型。然而,该类免疫缺陷病发病率较低,有必要建立 WASp 缺陷小鼠的 CMV 感染模型以加深对 WASp 参与机体免疫调节过程机制的研究。

现阶段关于 MCMV 感染的小鼠模型仅限于野生型 BALB/c 小鼠,国内外关于 WAS 基因缺陷小鼠与 MCMV 感染的研究少有报道。本实验所选取的 WAS 基因缺陷小鼠来源于 Jackson 实验室 129S6/SvEvTac, 目标敲除等位基因 Was^{tm1Sbs} , 该小鼠淋巴细胞发展过程、抗体反应和血清免疫球蛋白水平正常,但外周血淋巴细胞和血小板数目低于正常小鼠^[8]。由于 WAS 基因为 X 染色体连锁,故半合子的雄性小鼠也为 WASp 缺陷。鼠 CMV 具有很强的种属特异性,但在分子水平和致病机制上与人 CMV 十分相似。因此,我们选用 MCMV Smith 株一次性足量感染 WAS 基因缺陷小鼠,在不同器官中检测到病毒载量,以肺部为最高,HE 病理染色中显示大量以单个核细胞为主的炎细胞浸润,CTL 升高,成功建立了 WAS 基因缺陷小鼠 MCMV 急性感染模型。研究该动物模型的病毒感染特点,为认识 WASp 在人抗 CMV 感染中的作用和机制提供一个良好的研究平台。

本研究中,感染 10^5 PFU 剂量的病毒两组小鼠均出现了不同程度的临床症状,其中实验组 WAS 基因缺陷小鼠除有反应迟钝、厌食、耸毛等临床症状,体质量下降也较明显,出现动物死亡,而感染对照组小鼠这些症状表现轻微,提示与 WASp 缺失导致的免疫功能缺

陷密切相关。值得注意的是,与 WAS 患者临床表现的多样性相比,成年 WAS 基因缺陷小鼠并无造血系统恶性肿瘤及湿疹的表现,但绝大多数会出现慢性结肠炎,典型的病理表现为病变肠段扩张、肠壁增厚,肠黏膜增厚,固有层中性粒细胞及淋巴细胞浸润^[8]。根据我们对实验组小鼠饲养及繁殖的经验来看,发生慢性结肠炎的小鼠从 4 ~ 16 周龄,主要表现为少动,稀便、血便,食量减少或不食,偶有末端直肠黏膜脱出肛门外,极度消瘦,最终发展为恶病质死亡。故实验组小鼠出现死亡不排除小鼠发生早期结肠炎与病毒感染共同作用的结果。MCMV 扩增通常采取体外细胞培养或体内唾液腺扩增的方式,与体外细胞培养相比,唾液腺内扩增的病毒较少出现特征性的表型改变如转变为毒力较弱的多衣壳的病毒颗粒,这使得唾液腺扩增的病毒能够保持较强的毒力^[9]。由于 MCMV 感染过程中病毒的毒力与其导致的临床表现主要与病毒扩增方式有关,我们采用细胞内传毒的方式扩增病毒,感染对照组小鼠感染后出现的临床症状与 Krmpotic 等^[10]的报道一致,即组织培养方式获取 10^5 PFU MCMV 腹腔感染免疫功能正常的成年小鼠,小鼠不会表现出明显的临床症状;而同等病毒量感染免疫功能缺陷的 WAS 基因缺陷小鼠不但出现临床症状,且主要脏器病理变化也更为明显。WAS 基因突变不但可影响 T 淋巴细胞活化及细胞骨架重构过程,近年来的研究也证明 WAS 缺陷小鼠体内 B 淋巴细胞归巢现象减少,生发中心反应延迟及抗体产生低下,体液免疫应答同样受损^[11]。因此 WAS 基因缺陷小鼠在 MCMV 感染后不能有效清除病毒,多个脏器出现病理损害。

在心、肝、肺、肾等 MCMV 易感器官中,小鼠唾液腺是观察 MCMV 持续存在的最佳脏器。病毒随唾液排出是所有种属 CMV 的共同特点及主要水平传播方式,当唾液腺内不再检测到感染性病毒滴度,说明主要脏器不再排毒,感染进入慢性期^[5]。MCMV gB 基因编码病毒包膜糖蛋白,在病毒增殖周期中与病毒的吸附、融合密切相关,当宿主体内 gB 基因转录产物消失,则

MCMV 不再增殖,机体进入潜伏感染状态^[12-13]。我们采用 RT-PCR 对主要脏器官内 gB 基因进行检测,进一步证实了小鼠处于急性感染期。唾液腺内病毒蛋白颗粒的大量复制会促进感染宿主的体液免疫应答,从而保护宿主免于受到反复内生或外生病毒颗粒的袭击^[14]。尽管唾液腺是小鼠感染后的最主要的易感器官和排毒器官且病毒含量在各器官中最高,对唾液腺匀浆液进行毒力滴定及唾液腺内 MCMV mRNA 半定量检测均显示感染对照组小鼠唾液腺内感染性病毒含量较高,但组间无差别。然而比较其他脏器改变我们发现,心、肝、肺和肾等靶器官在感染后均出现细胞水肿,炎症细胞浸润等相应炎症病理变化,其中 WAS 缺陷小鼠肺内 MCMV mRNA 相对表达量高于对照组,HE 病理染色也证实 WAS 缺陷小鼠感染后肺内病理变化最为严重,这也与 WAS 患者肺部为 CMV 感染最常见的感染部位^[15]相一致。Andreansky 等^[16]研究了 3 种病原感染后的 WAS 缺陷小鼠,对甲型流感病毒、肺炎链球菌和牛结核分枝杆菌卡介苗均出现不同程度的免疫反应缺陷,易感性增加,肺部清除病原能力降低。这些结果显示肺部是 WAS 缺陷后 CMV 感染的主要器官之一, WASp 可能参与肺部清除病毒感染的免疫过程。

我们的流式细胞术结果检测到感染小鼠脾脏淋巴细胞 MCMV CTL 的存在,进而也证实了该感染模型的成功建立。虽然 WASp 参与多种免疫细胞的免疫应答过程,但 WAS 基因缺陷小鼠初次感染病毒后 MCMV CTL 比率与感染对照组无差异,与国外采用流感病毒等其他病原初次感染后的 WAS 基因缺陷小鼠模型结果一致,其原因可能是由于实验组免疫缺陷小鼠病毒感染负荷过大,病原清除反而推迟和导致相对正常的 CTL 增殖;另一方面鼠 WASp 可能主要参与再次感染后的 T 细胞免疫应答^[16-17],这还需要进一步的研究阐明其潜在机制。

综上所述,我们用 MCMV Smith 株 1×10^5 PFU 腹腔注射感染 WAS 基因缺陷小鼠成功建立 CMV 急性感染模型,有效模拟免疫低下患者 CMV 感染的生物学特性。现阶段关于 WASp 表达缺失引起免疫缺陷的机制还不是很清楚,且国内外尚少见关于 WASp 参与 MCMV 感染后免疫的相关研究。因此该模型的建立为后续研究 MCMV 感染后 WASp 对淋巴细胞的激活、增殖及炎症细胞因子分泌影响的研究提供一个良好的平台。

参考文献:

[1] 赵晓东. Wiskott-Aldrich 综合征研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(21): 1621-1624.
[2] 于洁, 管贤敏, 戴碧涛, 等. 造血干细胞移植治疗 Wiskott-Aldrich 综合征一例报告及文献复习[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(3):

183-188.
[3] Kaneko M, Watanabe T, Watanabe H, et al. Successful unrelated cord blood transplantation in an infant with Wiskott-Aldrich syndrome following recurrent cytomegalovirus disease[J]. Int J Hematol, 2003, 78(5): 457-460.
[4] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[W]. 北京: 科学出版社, 1997: 614.
[5] 刘兴楼, 舒赛男, 王慧, 等. 鼠巨细胞病毒感染小鼠感染性病毒滴度和基因表达的研究[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(4): 363-366.
[6] 罗小华, 常英军, 霍明瑞, 等. 同胞 HLA 全相合骨髓和外周血造血干细胞混合移植后血液病患者 CMV 特异性 T 细胞免疫重建规律[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(8): 605-609.
[7] Luo X H, Huang X J, Liu K Y, et al. Protective immunity transferred by infusion of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells within donor grafts: its associations with cytomegalovirus reactivation following unmanipulated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2010, 16(7): 994-1004.
[8] Snapper S B, Rosen F S, Mizoguchi E, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation[J]. Immunity, 1998, 9(1): 81-91.
[9] Chong K T, Mims C A. Murine cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity[J]. J Gen Virol, 1981, 57(Pt 2): 415-419.
[10] Krmpotic A, Bubic I, Polic B, et al. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection[J]. Microbes Infect, 2003, 5(13): 1263-1277.
[11] Westerberg L S, Dahlberg C, Baptista M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for peripheral B-cell development and function[J]. Blood, 2012, 119(17): 3966-3974.
[12] Banks T A, Rouse B T. Herpesviruses-immune escape artists? [J]. Clin Infect Dis, 1992, 14(4): 933-941.
[13] Reddehase M J, Podlech J, Grzimek N K. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview[J]. J Clin Virol, 2002, 25(Suppl 2): S23-S36.
[14] Kloover J S, van-den-Bogaard A E, van-Dam J G, et al. Persistent rat cytomegalovirus (RCMV) infection of the salivary glands contributes to the anti-RCMV humoral immune response[J]. Virus Res, 2002, 85(2): 163-172.
[15] Sullivan K E, Mullen C A, Blaese R M, et al. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome[J]. J Pediatr, 1994, 125(6 Pt 1): 876-885.
[16] Andreansky S, Liu H, Turner S, et al. WASP- mice exhibit defective immune responses to influenza A virus, Streptococcus pneumoniae, and Mycobacterium bovis BCG[J]. Exp Hematol, 2005, 33(4): 443-451.
[17] Strom T S, Turner S J, Andreansky S, et al. Defects in T-cell-mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector-mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells[J]. Blood, 2003, 102(9): 3108-3116.

(收稿:2014-03-20;修回:2014-05-09)

(编辑 王红)