

BALB/c 小鼠经不同途径感染单纯疱疹病毒 II 型的病理学比较分析

程继帅, 牟唐维, 柳 蕾, 吴化叶, 李琦涵

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

[摘要] 目的 比较 BALB/c 小鼠经不同途径感染单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)后的病理学变化。方法 分别采用经阴道、鼻腔和眼角膜 3 种不同的攻毒方式使 BALB/c 小鼠感染 HSV-2, 观察小鼠的临床表现及攻毒部位和神经组织的病理变化, 检测神经组织中的病毒载量。结果 鼻腔组小鼠无明显症状, 但至观察期结束仅有 27.27% 的存活率; 阴道组小鼠表现不同程度的外阴炎以及体质量下降等症状, 观察至感染后 8 d, 小鼠的存活率已为 0; 角膜组小鼠表现不同程度的角膜炎, 观察期结束存活率仍有 63.64%。病理变化结果显示, 鼻腔组小鼠仅脑组织存在明显的病理变化; 阴道组和角膜组小鼠攻毒部位均发生明显的病理变化, 但阴道组小鼠脑和脊髓均可见明显的病理变化。神经组织病毒载量检测结果表明, 与对照组相比, 3 个实验组小鼠脑和脊髓中 HSV-2 的病毒载量均显著升高, 且随着感染时间的增加而升高。结论 BALB/c 小鼠经 3 种不同途径感染 HSV-2 均可引起小鼠不同程度的病理学变化。本研究为 HSV-2 感染引发的神经系统疾病的发病机制研究提供了理论基础。

[关键词] 单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2); BALB/c 小鼠; 病理学分析; 感染途径

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)01-0015-07

单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)感染是最常见的性传播感染之一, 其为疱疹病毒科 α 病毒亚科成员, 主要引起外生殖器感染和新生儿感染^[1-3]。全世界年龄在 14 岁到 49 岁的人群中有超过 5 亿人被感染^[4]。HSV-2 是一种具有生命周期的疱疹病毒, 周期性地脱落, 在没有病灶的情况下, 携带者

也可能在生殖道脱落 HSV-2^[5]。HSV-2 是复发性生殖器疱疹的主要原因, 并且 HSV-2 携带者感染人类免疫缺陷病毒(HIV)的风险增加了 3 倍^[6]。与 HSV-1 感染相似, 原发性感染后 HSV-2 可扩散至神经系统, 潜伏病毒可在感染个体的骶神经节内长期存在, 复发性感染通过激活潜伏在骶神经节中的病毒而发生^[7]。

尽管 HSV-2 感染成年人引起的疾病通常是轻微的, 但它对新生儿和免疫功能低下的人群来说可能是危及生命的, 现已成为全球重要的公共卫生问题之一^[8,9]。目前, 治疗 HSV-2 疾病的主要方法是系统地抗病毒, 如阿昔洛韦等嘌呤核苷类似物可以部分降低 HSV 的传播风险, 但不能完全抑制病毒脱落^[10]。因此, 了解 HSV-2 的发病机制对防止病毒传播、降低疾病发病率以及靶向抗病毒药物和抗 HSV-2 疫苗的研制至关重要。

目前, 研究人员^[11-13]多采用眼角膜、后肢足

[收稿日期] 2019-06-27

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-1-019); 云南省重大科技专项(2017ZF020; 2017ZF006); 中央高校基本科研业务费(3332018129)

[作者简介] 程继帅(1991-), 女, 免疫学博士研究生, 研究方向: 疱疹病毒感染机制。

E-mail: handsome@imbcams.com.cn

[通信作者] 李琦涵, 男, 研究员, 从事病毒感染机制的研究及病毒疫苗的研发。

E-mail: liqihan@imbcams.com.cn

垫、阴道、鼻腔等接种方式感染实验用小鼠,对其感染 HSV-2 后的免疫反应进行研究,少部分的研究人员^[14]在猕猴模型中进行 HSV-2 感染后生殖道黏膜的免疫学研究,也有部分研究人员^[15,16]在豚鼠及猕猴模型中进行 HSV-2 疫苗的临床前研究。尽管 HSV-2 感染可引起致命性的神经性疾病,但对神经系统的研究较少。本研究拟采用不同的攻毒方式使成年雌性 BALB/c 小鼠感染 HSV-2,观察感染后小鼠的临床表现,同时对攻毒部位和神经组织进行病理学分析,并对神经组织的病毒载量进行检测,以期对 HSV-2 感染引起的神经性疾病的发病机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,4~6 周龄,体重 14~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],饲养于本所 SPF 级屏障设施内[SYXK(滇)K2014-0007]。实验操作在本所 SPF 级屏障设施内进行,并通过中国医学科学院医学生物学研究所动物实验伦理委员会审查[DWSP201805012],遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

1.2 主要试剂与仪器

主要仪器有:高速低温离心机(22R Centifuge),购自美国贝克曼库尔特有限公司;荧光定量 PCR 仪(CFX96 Touch),购自美国伯乐生命医学产品有限公司;酶标仪(Eon),购自美国伯滕仪器有限公司等。主要试剂有:Premix Ex Taq™(Probe qPCR),购自宝日医生物技术(北京)有限公司;AxyPrep 病毒 DNA/RNA 试剂盒,购自康宁生命科学(吴江)有限公司;PBS,购自 Gibco 公司;通用型组织固定液(中性),购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 毒株

HSV-2 (病毒滴度 2.5×10^6 pfu/mL),由本所病毒免疫室提供。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 小鼠随机分为 4 组,每组 30 只。阴道组、鼻腔组、眼角膜组分别经阴道、鼻腔、

眼角膜进行攻毒,剂量为 20 μ L/只;对照组则经阴道注射 PBS。

1.4.2 临床表现 攻毒后,每日观察小鼠的临床表现(如是否弓背倒毛)、活动情况、精神状态、死亡情况等,持续观察 15 d,并监测各组的体质变化。

1.4.3 组织病理分析 分别在感染后 1 d、3 d、5 d 和 7 d,每组取 1 只小鼠,采用腹腔注射戊巴比妥钠(150~200 ng/g 体质量)方法施行安死术,然后取其阴道、鼻腔、眼周皮肤;在感染后 3 d、7 d,每组取 1 只小鼠,施行安死术后取其脑和脊髓,置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 3~5 d。固定好的组织经脱水、透明、石蜡包埋、切片、HE 染色、封固后,显微镜下观察组织的病理变化情况。

1.4.4 病毒载量的检测 在感染后 1 d、3 d、5 d、7 d,每组分别取 3 只小鼠,施行安死术后取其脑和脊髓,称重记录,加入 250 μ L PBS 缓冲液,组织匀浆后 $13\,400 \times g$ 离心 5 min,取上清 200 μ L 转入 1.5 mL 离心管中,用 AxyPrep 病毒 DNA/RNA 试剂盒提取组织中的病毒 DNA。按照 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 配制反应体系,上机进行 Q-PCR,利用 HSV-2 标准品标准曲线换算样品病毒 DNA 分子拷贝数^[17]。

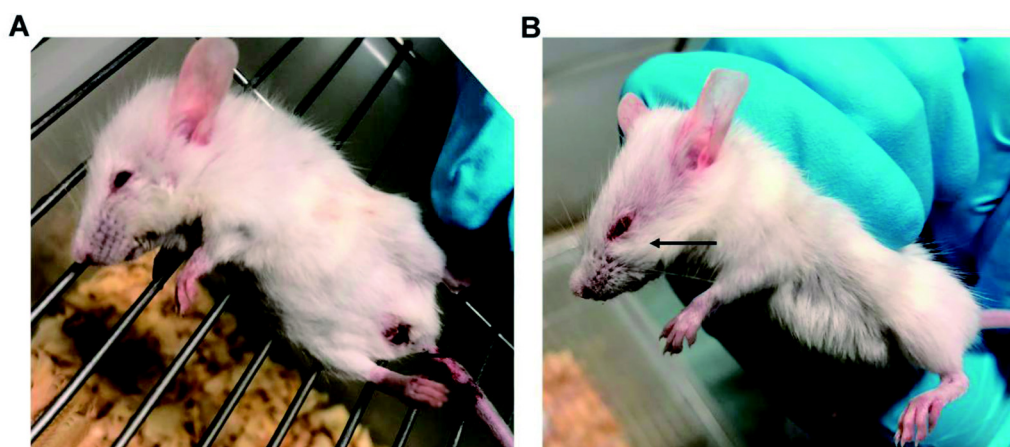
2 结果

2.1 临床表现

阴道组小鼠感染 5 d 后表现外阴炎,甚至外阴溃烂(图 1A);眼角膜组小鼠感染 5 d 后表现角膜炎,甚至失明(图 1B)。鼻腔组小鼠未表现明显的临床症状。与对照组相比,3 个实验组小鼠体质量均有下降,阴道组小鼠的体质量在 5 d、6 d 显著下降,而鼻腔组和角膜组小鼠的体质量 10 d 后趋于稳定(图 2)。阴道组小鼠在感染后 9 d 时,存活率已降为 0;鼻腔组小鼠在 9 d 时,存活率降为 25%,之后未再继续下降;而角膜组小鼠在 9 d 时存活率仍大于 75%,且并未继续下降(图 3)。

2.2 神经组织病理变化

阴道组小鼠感染 HSV-2 后 7 d 可见脑组织局部神经元间质结构疏松,大量神经元细胞核固缩深染,小范围可见坏死液化,伴有少量出血(图 5C);



A: 阴道组(箭头所示为阴道损伤部位); B: 眼角膜组(箭头所示为角膜炎部位)

图1 BALB/c小鼠感染HSV-2后的临床症状

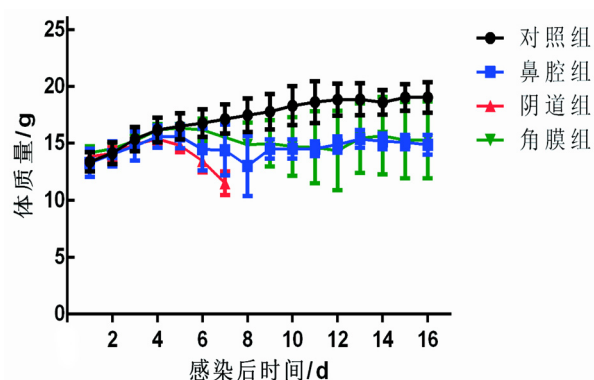


图2 BALB/c小鼠感染HSV-2后的体质量监测

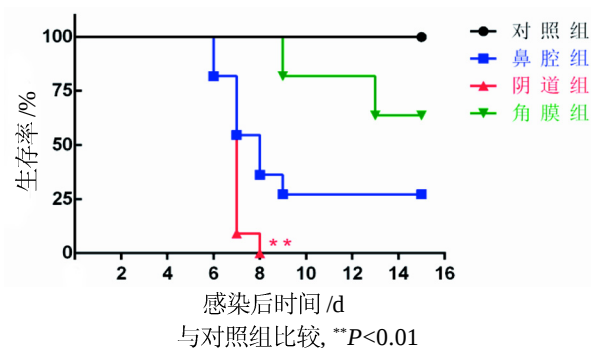


图3 BALB/c小鼠感染HSV-2后的存活情况

脊髓组织在感染后7 d可见血管周围少量神经元细胞和血管平滑肌细胞坏死,血管腔中可见少量白细胞,组织小范围出血(图5D)。角膜组小鼠感染后脑和脊髓组织未见明显病理变化(图5E、5F)。鼻腔组小鼠仅HSV-2感染后7 d的脑组织可见明显的组织损伤及结构破坏并伴有出血,大量神经元

细胞核固缩深染(图5G),而脊髓组织未见明显的病理变化(图5H)。

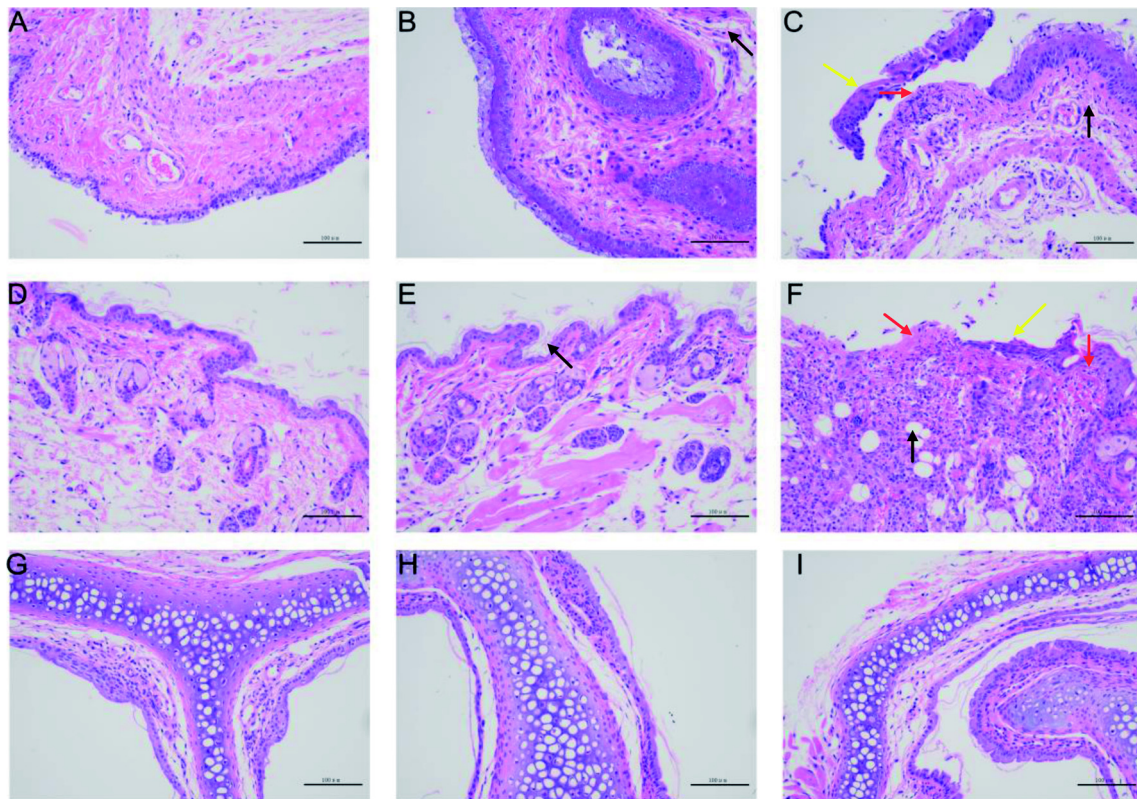
2.4 脑和脊髓组织病毒载量

各组小鼠脑组织中的病毒载量随着感染时间的增加而增加,感染后7 d脑组织中的病毒载量最高,与对照组相比,3个实验组小鼠的检测结果显示均有统计学意义(图6)。与脑组织相似,脊髓组织中的病毒载量随着感染时间的增加而增加,在感染后7 d达到最大值,与对照组相比,感染后7 d的病毒载量均显著上升(图7)。

3 讨论

HSV-2感染在全球多个地区高度流行,其传播与年龄、性别、种族、性伴人数、文化程度、HIV感染等社会人口学因素有关^[18,19]。HSV-2不仅可以经性生活而且还可以经唾液、生殖道分泌物进行传播。无典型临床表现而存在间歇性病毒排放现象的感染者是目前最重要的传染源^[20]。本研究采用3种不同的攻毒方式使成年雌性BALB/c小鼠感染HSV-2,观察感染后小鼠的临床表现以及攻毒部位和神经组织的病理变化,并对神经组织的病毒载量进行检测分析。

本研究中HSV-2分别经鼻腔、阴道、眼角膜感染小鼠,临床症状观察发现,阴道组和角膜组均出现了不同程度的皮肤黏膜感染症状(如外阴炎、角膜炎),而鼻腔组未观察到明显的临床症状。攻毒部位的病理分析结果同样佐证了临床症状的观



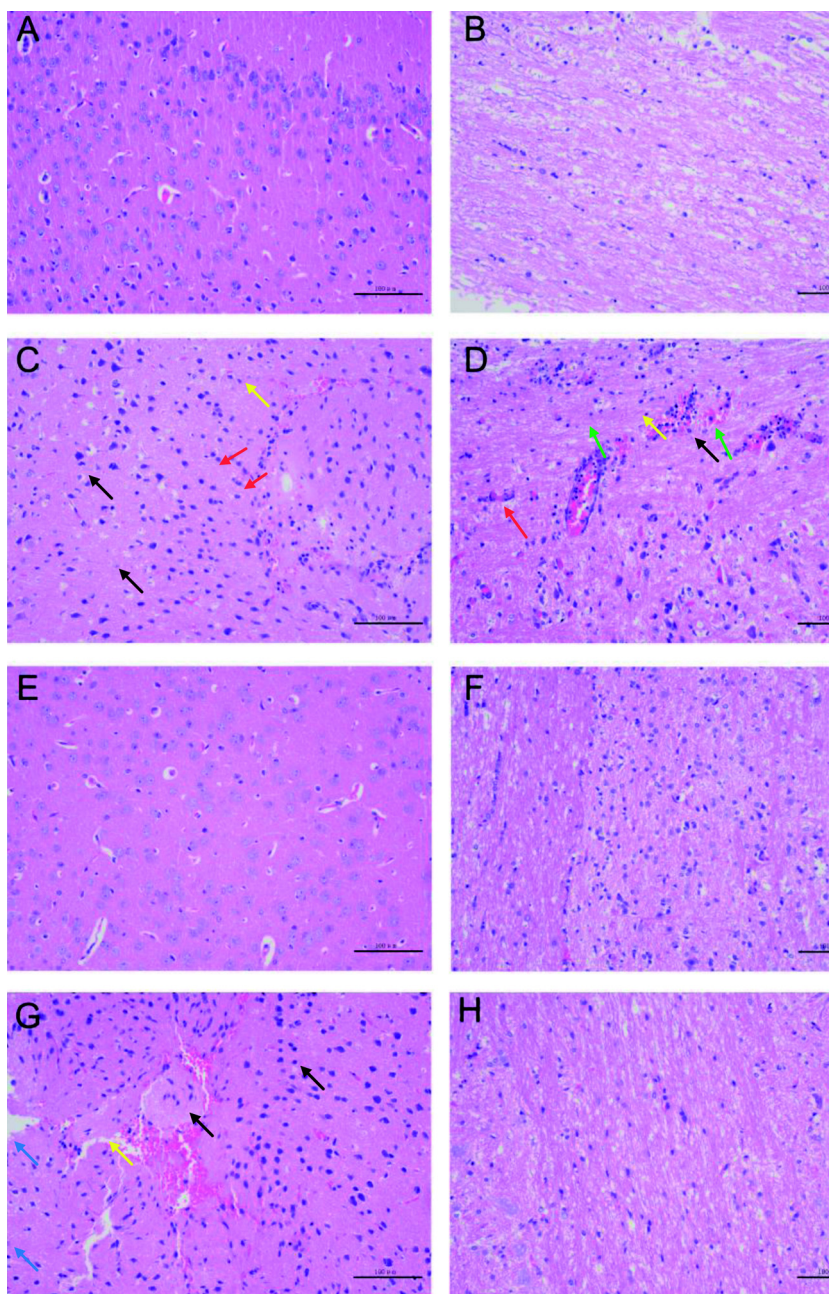
A: 对照组阴道组织; B: 阴道组感染后 3 d 阴道组织; C: 阴道组感染后 7 d 阴道组织;
D: 对照组眼周皮肤; E: 角膜组感染后 3 d 眼周皮肤; F: 角膜组感染后 7 d 眼周皮肤;
G: 对照组鼻腔组织; H: 鼻腔组感染后 3 d 鼻腔组织; I: 鼻腔组感染后 7 d 鼻腔组织
(黑色箭头为炎性细胞浸润, 红色箭头为细胞坏死, 黄色箭头为上皮细胞脱落)

图 4 BALB/c 小鼠感染 HSV-2 后攻毒部位的病理变化(HE × 200)

察结果。鼻腔组鼻周皮肤切片未见明显的病理变化, 而阴道组和角膜组分别在其攻毒部位表现出随着感染时间的增加而加重的病理变化。有研究发现, HSV-2 不仅可以引起生殖系统感染, 也可引起其他皮肤黏膜(如口腔、鼻腔、眼睛等)的感染^[21]。本研究经眼角膜感染 HSV-2 后引起了眼周皮肤的病理损伤, 同样也证实了上述的研究观点。

神经组织的病理分析可以看到, 鼻腔组和阴道组的脑组织感染后 7 d 均表现出明显的组织损伤、结构破坏、出血、细胞坏死等病理变化, 且阴道组的脊髓组织也出现了相似的病理变化, 而角膜组的神经组织并未发现明显的病理变化。神经组织病毒载量的检测结果显示, 与对照组小鼠相比, 感染 HSV-2 后各组小鼠脑和脊髓中 HSV-2 的病毒载量均显著升高, 且随感染时间的增加而升高。尽管角膜组小鼠脑组织中的病毒载量高于

鼻腔组和阴道组小鼠, 但其脑组织并未出现明显的病理变化; 而阴道组小鼠脊髓组织中的病毒载量高于鼻腔组和角膜组小鼠, 且其脊髓组织表现出明显的病理变化。HSV-2 病毒感染除了可以引起皮肤黏膜的感染, 也会侵入神经组织引起神经组织的病理变化。病毒载量的检测结果也可看到, 鼻腔组和角膜组小鼠脑组织中的病毒载量较高于阴道组小鼠, 而阴道组小鼠脊髓组织中的病毒载量较高于角膜组和鼻腔组, 这就说明病毒载量的高低可能与攻毒部位具有一定的联系。小鼠存活情况也可知, 阴道组在观察周期尚未结束时存活率已为 0, 而鼻腔组小鼠在观察周期结束时尚有 27.27%, 角膜组小鼠在观察周期结束时仍有 63.64%。结合神经组织的病理学分析可知, 病毒侵入神经组织以及病毒造成神经组织的病理损伤是导致小鼠死亡的重要原因。



A: 对照组脑组织; B: 对照组脊髓组织; C: 阴道组感染后 7 d 脑组织;
D: 阴道组感染后 7 d 脊髓组织; E: 角膜组感染后 7 d 脑组织; F: 角膜组感染后 7 d 脊髓组织;
G: 鼻腔组感染后 7 d 脑组织; H: 鼻腔组感染后 7 d 脊髓组织

(黑色箭头为神经元细胞核固缩深染, 红色箭头为细胞坏死, 黄色箭头为出血,
蓝色箭头为组织损伤, 绿色箭头为炎性细胞浸润)

图 5 BALB/c 小鼠感染 HSV-2 后神经组织的病理变化 (HE × 200)

本研究中, 阴道组和角膜组小鼠均能较好地模拟 HSV-2 感染人后急性期表现出的皮肤和黏膜组织病理损伤的临床症状, 而鼻腔组小鼠感染后并不表现明显的急性感染期症状, 但在其神经组

织中有着较高的病毒潜伏, 这与 HSV-2 病毒的潜伏感染特点相吻合。HSV-2 感染后不仅能够引起机体皮肤和黏膜的感染, 同时也可侵入神经组织, 造成致死性的神经组织病理变化。本研究为

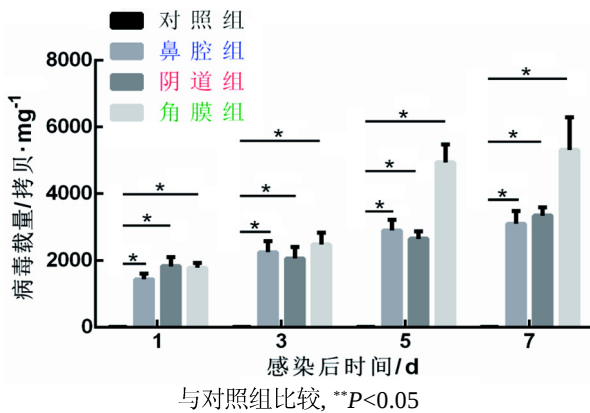


图6 BALB/c小鼠感染HSV-2后脑组织中的病毒载量

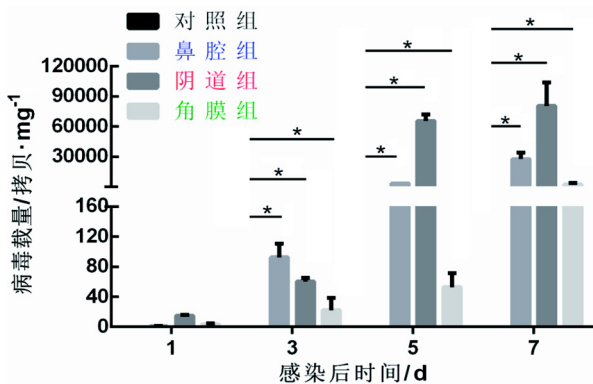


图7 BALB/c小鼠感染HSV-2后脊髓组织中的病毒载量

HSV-2 感染的发病机制研究、治疗药物的药效评价以及预防疫苗的临前研究提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 樊建勇, 赵阳, 杨慧兰. 单纯疱疹病毒的潜伏、复发感染与防治[J]. 中国医学文摘: 皮肤科学, 2017, 34(1):9-17.
- [2] Johnston C, Corey L. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: diagnostics and pathogenesis of genital tract [J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(1):149-161.
- [3] Meyding-Lamadé U, Strank C. Herpes virus infections of the central nervous system in immunocompromised patients[J]. Ther Adv Neurol Disord, 2012, 5(5):279-296.
- [4] Looker KJ, Maqaret AS, Turner KM, et al. Correction: Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e114989.
- [5] Tronstein E, Johnston C, Huang ML, et al. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection[J]. JAMA, 2011, 305(14):1441-1449.
- [6] Freeman EE, WEISS HA, Glynn JR, et al. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies[J]. AIDS, 2006, 20(1):73-83.
- [7] 杨荷丹, 蒋娟. 单纯疱疹病毒感染的复发机制与治疗的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2018, 34(11):694-697.
- [8] Nicoll MP, Proenca JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(3):684-705.
- [9] Efstathiou S, Preston CM. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency[J]. Virus Res, 2005, 111(2):108-119.
- [10] 候亚林, 杜立行, 欧柏生, 等. 参芪止孢颗粒抗HSV-2的体外实验研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(1):10-13.
- [11] Parr MB, Parr EL. Protective immunity against HSV-2 in the mouse vagina[J]. J Reprod Immunol, 1997, 36(1-2):77-92.
- [12] Parr MB, Parr EL. Vaginal immunity in the HSV-2 mouse model[J]. Int Rev Immunol, 2003, 22:43-63.
- [13] McDermott MR, Smiley JR, Leslie P, et al. Immunity in the female genital tract after intravaginal vaccination of mice with an attenuated strain of herpes simplex virus type 2 [J]. J Virol, 1984, 51(3):747-753.
- [14] Lo M, Zhu J, Hanson SG, et al. Acute infection and subsequent subclinical reactivation of herpes simplex virus-2 after vaginal inoculation of rhesus macaques[J]. J Virol, 2019, 93(2):e01574-18.
- [15] Bernstein DI, Cardin RD, Pullum DA, et al. Duration of protection from live attenuated vs. sub unit HSV-2 vaccines in the guinea pig model of genital herpes: Reassessing efficacy using endpoints from clinical trials[J]. PLoS One, 2019, 14(3):e0213401.
- [16] Awasthi S, Hook LM, Shaw CE, et al. An HSV-2 trivalent vaccine is immunogenic in rhesus macaques and highly efficacious in guinea pigs[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(1): e1006141.
- [17] 杜丽芳, 张晓焕, 高华, 等. 检测II型单纯疱疹病毒DNA拷贝的real-time qPCR方法的建立及其应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(10):1082-1086.
- [18] Burrell S, Boutolleau D, Ryu D, et al. Ancient Recombination Events between Human Herpes Simplex Viruses[J]. Mol Biol Evol, 2017, 34(7):1713-1721.
- [19] 陈平, 马良, 刘二战, 等. 不同人群感染单纯疱疹病毒2型的流行病学特点[J]. 国际生物制品学杂志, 2015, 38(4):189-192.
- [20] Awasthi S, Mahairas GG, Shaw CE, et al. A dual-modality

Herpes simplex virus 2 vaccine for preventing genital herpes by using glycoprotein C and D subunit antigens to induce potent antibody responses and adenovirus vectors containing capsid and tegument proteins as T Cell immunogens

[J]. J Virol, 2015, 89(16):8497-8509.

[21] 范胜涛, 冯敏, 徐兴丽, 等. 1 型单纯疱疹病毒经不同途径感染小鼠建立病理模型的分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 5(5):472-476.

Comparative Pathological Analysis of Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in BALB/c Mice by Different Routes

CHENG Jishuai, MOU Tangwei, LIU Lei, WU Huaye, LI Qihan
(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences
& Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

[Abstract] Objective To compare the pathological changes of BALB/c mice infected with herpes simplex virus type 2 (HSV-2) by different routes. **Method** BALB/c mice were challenged with HSV-2 by three different ways, namely, through vagina, nasal cavity and cornea. The clinical manifestations of mice and the pathological changes of challenged site and nerve tissue were observed, and the viral load in nerve tissue was detected. **Result** There was no overt symptom in the nasal cavity of which the survival rate was 27.27% at the end of observation period. The vaginal group showed different degrees of vulvitis and weight loss and other symptoms, and the survival rate of the mice on day 8 was 0. Corneal group mice showed different degrees of keratitis, the survival rate at the end of observation period was still 63.64%. The results of pathological changes showed that there were obvious pathological changes in the brain tissue of nasal group mice. Both the vagina group and the cornea group mice showed significant pathological changes in the offending sites, and the brain and spinal cord of the vagina group mice showed obvious pathological changes. The results of viral load detection in the nerve tissue showed that, compared with control group, the viral load of HSV-2 in the brain and spinal cord of the three experimental groups was significantly increased with the increase of infection time. **Conclusion** The infection of HSV-2 by three different ways can cause different pathological changes in mice. This study provides a theoretical basis for the study of the pathogenesis of nervous system disease induced by HSV-2 infection.

[Key words] Herpes simplex virus type 2(HSV-2); BALB/c mice; Pathological analysis;
Infection route