

熊芮, 吴勇, 杨艳伟, 等. $IL2rg^{-/-}$ 大鼠支持人 RSV 在体内的长期感染 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 17-24.
XIONG R, WU Y, YANG Y W, et al. $IL2rg^{-/-}$ rats support prolonged infection of human RSV [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 17-24.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.01.003

$IL2rg^{-/-}$ 大鼠支持人 RSV 在体内的长期感染

熊芮^{1,2}, 吴勇¹, 杨艳伟³, 屈哲³, 刘甦苏¹, 王誉雅¹, 马丽颖¹,
付瑞¹, 彭宜红², 梁春南^{1*}, 范昌发^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所(国家啮齿类实验动物资源库), 北京 102629; 2. 北京大学医学部基础医学院病原生物学系, 北京 100083; 3. 中国食品药品检定研究院安全评价研究所(国家药物安全评价监测中心), 北京 100176)

【摘要】 目的 为了克服已有人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, hRSV)动物模型的局限性, 如半受纳性和感染持续时间短, 本文利用 TALEN 基因编辑技术建立了 $IL2rg^{-/-}$ 的大鼠模型。**方法** 用 hRSV 滴鼻感染该动物模型, 观察感染期(0 ~ 35 d)的临床表征、体重及体温变化; 记录不同时间点(滴鼻感染后第 4、11、20、35 天)鼻腔、气管、肺等呼吸道脏器的病毒总拷贝数; 在观察终点(滴鼻感染后第 35 天)对感染动物的靶器官进行病理分析; 观察不同时间点(滴鼻感染后第 4、20、35 天)外周血 T、B、NK、NKT 细胞的变化及不同时间点多种细胞因子的变化。**结果** (1)通过鼻内接种 hRSV 后, 纯合的 $IL2rg^{-/-}$ 大鼠的呼吸道内能保持较高的病毒载量, 鼻腔中病毒的平均峰值滴度能快速升至 1×10^{10} copies/g, 至第 5 周时, 病毒依然能维持复制, 病毒载量亦可达到 1×10^7 copies/g。(2)但其鼻、气管和肺组织, 无明显病变。(3)感染 hRSV 的 $IL2rg^{-/-}$ 大鼠外周血 B 细胞含量有上升。(4)IL-6 和 MCP-1 两种细胞因子都在感染前期上升, 在观察终点回落。**结论** 本研究基于 TALEN 技术建立了 $IL2rg^{-/-}$ 大鼠模型, 并发现该模型能很好地支持 hRSV 高水平复制和并长期感染, 为抗病毒药物筛选、抗 hRSV 抗体体内效力评价, 提供了良好的动物模型。

【关键词】 $IL2rg^{-/-}$ 大鼠; TALEN 基因编辑技术; NK 细胞缺陷; 人呼吸道合胞病毒; 感染动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 01-0017-08

$IL2rg^{-/-}$ rats support prolonged infection of human RSV

XIONG Rui^{1,2}, WU Yong¹, YANG Yanwei³, QU Zhe³, LIU Susu¹, WANG Yuya¹, MA Liying¹,
FU Rui¹, PENG Yihong², LIANG Chunnan^{1*}, FAN Changfa^{1*}

(1. Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Beijing 102629, China; 2. Department of Microbiology & Infectious Disease Center, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China; 3. National Center for Safety Evaluation of Drugs, Institute for Food and Drug Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)
Corresponding author: FAN Changfa. E-mail: fanchf@nifdc.org.cn; LIANG Chunnan. E-mail: chunnan_liang@nifdc.org.cn

【Abstract】 Objective To overcome the limitations of existing human respiratory syncytial virus (hRSV) animal models, such as semi-permissiveness and short duration of infection, this study established an $IL2rg$ gene knockout

【基金项目】 国家重点研发计划(2021YFC2301700), 国家科技重大专项(2017ZX10304402)。

Funded by the National Key R&D Program of China(2021YFC2301700), the National Science and Technology Major Projects for Infectious Disease of China(2017ZX10304402)。

【作者简介】 熊芮, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 传染病动物模型研究。Email: xiongr3769@163.com

【通信作者】 范昌发, 男, 研究员, 博士, 研究方向: 疾病动物模型研究。Email: fanchf@nifdc.org.cn;

梁春南, 男, 副主任技师, 博士, 研究方向: 实验动物资源开发与研究。Email: chunnan_liang@nifdc.org.cn。

* 共同通信作者

(IL2rg^{-/-}) rat model using TALEN gene editing technology. **Methods** The animal model was infected with hRSV intranasally. Clinical characteristics, body weight, and temperature changes were observed over the infection period (0 ~ 35 days). The total viral loads in respiratory organs, such as the nasal tissue, trachea, and lungs, were measured at various time points (4, 11, 20, and 35 days post-infection). Pathological analysis was conducted on target organs at the endpoint of observation (35 days post-infection). Changes in peripheral blood T, B, NK, and NKT cells and various cytokines were assessed at various time points (4, 20, and 35 days post-infection). **Results** (1) IL2rg^{-/-} knockout rats sustained high viral loads in the nasal cavity upon intranasal inoculation with hRSV. The average peak titer rapidly reached 1×10^{10} copies/g in nasal tissue and 1×10^7 copies/g up to 5 weeks post-infection. (2) However, no significant pathological changes were noted in nasal, tracheal, or lung tissues. (3) An increase was observed in the content of peripheral blood B cells in hRSV-infected IL2rg^{-/-} rats. (4) IL-6 and MCP-1 were increased in the early stage of infection and then decreased at the end of the observation period. **Conclusions** This study established a new IL2rg^{-/-} rat model using TALEN technology and found that this model effectively supported high-level replication and long-term infection of hRSV, providing a good basis for antiviral drug screening and *in vivo* efficacy evaluation of anti-hRSV antibodies.

[Keywords] IL2rg^{-/-} rat; TALEN technology; NK cell defects; human respiratory syncytial virus; infection animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

人呼吸道合胞病毒 (human respiratory syncytial virus, hRSV) 为具有包膜的肺病毒科 (*Pneumoviridae*)、正肺病毒属 (*Orthopneumovirus*) 的单股负链病毒^[1]。其感染呈全球性分布,并有季节性流行的特点^[2-3]。hRSV 的主要感染对象为 2 岁以下的婴幼儿,临床上多表现为较轻的上呼吸道症状,如鼻塞、咳嗽等^[4]。hRSV 感染导致的重症多见于 1 ~ 6 月龄的婴儿,通常发展为细支气管炎肺炎,出现低烧、喘息、胸壁回缩和呼吸急促等^[5-6]。

人可能会反复感染 hRSV,目前有两种 hRSV 疫苗获批被用于 60 岁以上老年人接种免疫。hRSV 疫苗和治疗性药物在临床试验阶段或临床前研究中取得有限的进展,这在一定程度上是由于缺乏能够完全模拟人类临床感染特征、且持续感染的动物模型。现有的 hRSV 动物模型,包括常见的 hRSV 非人灵长类及啮齿类动物感染模型,各有优势,但局限性也很突出。除黑猩猩外,如最常用的棉鼠和 BALB/c 小鼠,为 hRSV 的半受纳宿主,仅部分个体易感。为了建立 hRSV 模型,通常采用大剂量病毒攻毒。即便如此,hRSV 在很多动物模型的呼吸道靶器官内复制维持时间普遍较短^[7],且组织病理改变轻微^[8-10],与临床表现存在较大差异。

有研究发现采用 hRSV 感染免疫功能受到抑制的棉鼠 (环磷酰胺处理),其症状与普通棉鼠有明显不同^[11-12]。最为明显的变化是 hRSV 清除时间延迟,免疫抑制的棉鼠在 hRSV 感染 6 周后依旧能在其肺部检测到高滴度病毒,并且肺部病理出现更严

重的炎症反应。这提示在免疫缺陷情况下,可能有利于建立症状更加典型的 hRSV 感染模型。白介素 2 受体 γ 链 (interleukin 2 receptor subunit gamma chain, IL2rg) 是 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 的共同受体亚基,IL2rg 基因的缺陷会导致大鼠机体免疫功能严重降低,尤其缺乏成熟的 NK 细胞^[13]。为了制作免疫缺陷效果显著的动物模型,本研究选择敲除 IL2rg 基因,使大鼠缺乏功能性 NK 细胞,构建稳定的免疫缺陷环境,以支持 hRSV 在体内持续、高水平复制,以建立更加稳定的感染模型,支持 hRSV 治疗性药物体内有效性评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wild-type SD 大鼠 (WT) 由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所【SCXK (京) 2022-0002】提供,纯合型 SPF 级 SD-IL2rg^{emx/NIFDC} 大鼠 (缩写为 IL2rg^{-/-}) 为实验动物资源研究所模式动物研究室自主构建。WT 和 IL2rg^{-/-} 大鼠均为 3 周龄各 17 只,雌雄各半,体重约为 60 ~ 75 g,动物繁殖及实验均在中国食品药品检定研究院屏障设施【SYXK (京) 2022-0014】内进行,温度 24 ~ 26 °C,相对湿度 40% ~ 70%,12 h 明/12 h 暗,饲喂⁶⁰Co 灭菌 SPF 级饲料,自由饮灭菌自来水。动物实验方案经本院实验动物福利伦理审查委员会审查批准 (IACUC2021-B-004),RSV 感染实验在 ABSL-2 动物实验室进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(15 mg/mL, 75 mg/kg), RNeasy Lysis Solution (Invitrogen), PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa), TB Green (TaKaRa), RBC Lysis Buffer (BioLegend), Cell Staining Buffer (BioLegend), Rat T/B/NK Cell Cocktail 抗体(BD), Bio-Plex Pro Rat Cytokine 24-plex Assay (Bio-rad)。

BD LSR II 流式细胞仪, Roche 罗氏 LightCycler 480。

1.2 方法

1.2.1 IL2rg^{-/-}大鼠模型的构建和 hRSV 感染模型的构建

使用 TALEN GoldenGate 系统针对大鼠 *IL2rg* 基因外显子 2 设计 TALEN。将对 IL2rg 特异的 TALEN 质粒转染到大鼠 C6 细胞(ATCC, CCL107)中。用蛋白质印迹分析(Western Blot)确认 TALEN 表达,并用 MSDase 测定及检查 TALEN 的活性。在体外转录 IL2rg-TALEN mRNA 并通过显微注射将其注射到 SD 大鼠的受精卵中,然后将受精卵转移至假孕 SD 雌性大鼠。

WT 和 IL2rg^{-/-}大鼠的 hRSV 攻毒组和 DMEM 组在滴鼻(Intranasal, I. N.)之前用戊巴比妥钠溶液浅度麻醉。将胰岛素注射器针头磨平,吸取 40 μ L hRSV 病毒(1×10^6 TCID₅₀)悬液或 DMEM 培养液,缓慢滴进大鼠的鼻孔内。

1.2.2 DNA 提取和基因检测

苯酚氯仿法提取鼠尾 DNA,剪取鼠尾(长度 < 0.5 cm)置于 1.5 mL Ep 管中,每管加 250 μ L 裂解液(含蛋白酶 K 5 μ L, TaKaRa)。将样品放置 55 $^{\circ}$ C 水浴锅过夜,加入 250 μ L TRIS-酚与氯仿的混合物(125 μ L TRIS-酚 + 122.5 μ L 氯仿 + 2.5 μ L 异戊醇),充分颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min。吸取 200 μ L 上清液至另一新 Ep 管中,加入 700 μ L 冰冷的异丙醇,待有 DNA 析出,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入冰冷的 70% 乙醇(-20 $^{\circ}$ C) 1000 μ L 漂洗 1 次,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清。用 TE(pH = 8.0)溶液在 55 $^{\circ}$ C 溶解沉淀 2 h,测定浓度并稀释后用做 PCR 模板。用 PCR 法检测 *IL2rg* 基因敲除大鼠 F0 代基因,大鼠 IL2rg 引物为 IL2rg-F(5'-GCTCCAAGGTCCTCATGTCCAG-3') 和 IL2rg-R(5'-ATCTTCGCCTTTCTGCCCATGAC-3'),电泳后测序。

1.2.3 细胞与病毒培养

将 HEp-2 细胞接种于 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 培养基,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养备用。当细胞达到 90% 满瓶时,吸去细胞培养基,用 PBS 缓冲液冲洗一遍,加入 2 mL 含 2% FBS DMEM 培养基稀释的 hRSV 病毒,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中感染 2 h 后弃去上清,用 PBS 缓冲液冲洗 1 遍,再加入 10 mL 2% FBS DMEM 培养基培养 2 ~ 3 d,当在显微镜下观察到病变细胞比例达到 80% ~ 90% 时,将培养瓶先后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱和 37 $^{\circ}$ C 培养箱中交替冻融裂解细胞,取上清病毒液,保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.4 临床症状观察与体重

当大鼠接种 hRSV 或 DMEM 培养液后,连续 6 d 在同一时间段测量体重,后每隔 2 d 测量 1 次至 21 dpi(days post infection);连续 8 d 在同一时间段测量大鼠肛温,后每隔 1 d 测量 1 次至 18 dpi,同时观察有无呼吸道症状、弓背表现、及精神状态异常等临床症状。

1.2.5 病毒载量检测

用戊巴比妥钠溶液麻醉后处死实验动物,取鼻腔、气管和肺组织放入 1.5 mL 无菌离心管,加 1 mL RNeasy Lysis Solution 保存液,4 $^{\circ}$ C 过夜后弃去 RNeasy Lysis Solution 保存液并将组织放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱长期保存。用 TRIzol 法提取组织 RNA,用 DEPC 水溶解 RNA 后 -80 $^{\circ}$ C 保存。将 hRSV 的 RNA 逆转录为 cDNA 后,采用绝对荧光定量 PCR 检测组织 hRSV 病毒载量。目的基因使用引物 hRSV-F(5'-AAGCGACCGCTAAGACAC-3'), hRSV-R(5'-GCCATCATATTCATAGCCTCGG-3')。

1.2.6 流式法测定免疫细胞含量

用毛细玻璃管从眼内眦取血 200 μ L, EDTA 抗凝。用抗体标记细胞,混匀后室温避光孵育 20 min。裂解红细胞后,Cell Staining Buffer 混匀后避光低温放置 4 h 内上机检测分析,在 BD LSR II 流式细胞仪上采用 FACS Diva 6.0 Software 软件获取细胞数据。

1.2.7 细胞因子检测

用毛细玻璃管经眼内眦取血 200 μ L,室温放置 2 h, 7000 r/min, 离心 20 min, 吸取血清后放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。细胞因子用 MSD(Meso Scale Discovery)法检测。将微珠加入样品孔中孵育,结束时加入细胞因子检测抗体继续孵育,后用试剂盒中的 Streptavidin-PE 荧光色素显色,使用 Bio-Plex 200 系统读板,得最终检测结果,单位为 pg/mL。

1.2.8 组织病理观察

取鼻和肺组织,用 10%中性福尔马林缓冲液固定,石蜡包埋切片,厚度 0.3 μm,苏木精-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色,中性树胶封片,显微镜观察并拍照。

1.3 统计学分析

实验的结果均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并使用 GraphPad Prism 9.0 分析数据。采用独立样本 *t* 检验或双因素方差分析来评估差异的显著性,以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

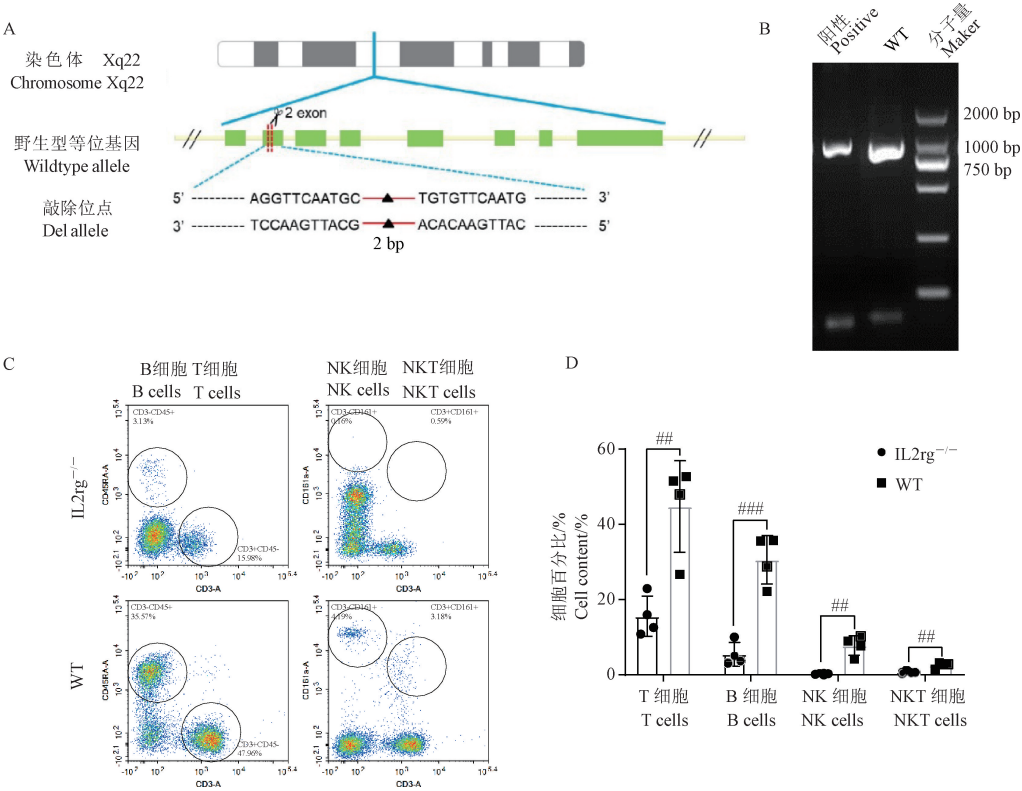
2.1 获得 NK 细胞缺失的纯合 IL2rg^{-/-} 敲除大鼠

IL2rg 基因位于 X 染色体上,全长 3.7 kb,本模型设计的敲除位点位于 2 号外显子(图 1A)。设计 PCR 引物扩增 IL2rg^{-/-}大鼠目标基因切割位点附近

序列,从 WT 大鼠中扩增获得长度为 929 bp,IL2rg^{-/-}大鼠的 PCR 片段长度为 927 bp(图 1B),测序获得敲除序列为 5'-TT-3'。另外,用流式细胞术检测纯合型 IL2rg^{-/-}大鼠外周血中的 T、B 及 NK 细胞表达含量(图 1C,1D)。结果发现,与 WT 大鼠相比,IL2rg^{-/-}大鼠的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、及 NKT 细胞含量均显著性降低(*P* < 0.01)。以上结果表明,IL2rg 基因敲除成功,IL2rg^{-/-}大鼠表型符合预期,可以用于后续实验。

2.2 建立 IL2rg^{-/-}大鼠 hRSV 感染模型

将大鼠麻醉后经滴鼻途径感染 hRSV,观察其临床特征和病理改变,并检测部分脏器中的病毒载量,血清细胞因子等参数,用以建立 hRSV 的 IL2rg^{-/-}大鼠感染模型。在 35 d 观察期间内,未发现 IL2rg^{-/-}大鼠的明显临床症状。其体重与 WT 大鼠无显著性差异(*P* > 0.05)(图 2A),也未出现体温升高(图 2B)。



注:A:敲除大鼠 IL2rg 基因的位点;B:IL2rg^{-/-}大鼠基因型 PCR 鉴定;C:IL2rg^{-/-}和 WT 大鼠外周血 T、B、NK 和 NKT 细胞含量的流式图;D:IL2rg^{-/-}大鼠外周血 T、B、NK 和 NKT 细胞的含量;与 WT 大鼠相比,## *P* < 0.01, ### *P* < 0.001。

图 1 构建敲除 IL2rg 基因的 IL2rg^{-/-}大鼠(*n* = 4)

Note. A. Site of IL2rg gene knockout in rats. B. Genotype identification of IL2rg^{-/-} rats by PCR. C. Flow cytometry test analysis of T, B, NK and NKT cells in the peripheral blood of WT rats and IL2rg^{-/-} rats. D. Flow cytometry test analysis of T, B, NK and NKT cells in the peripheral blood of IL2rg^{-/-} rats. Compared with WT rats, ## *P* < 0.01, ### *P* < 0.001.

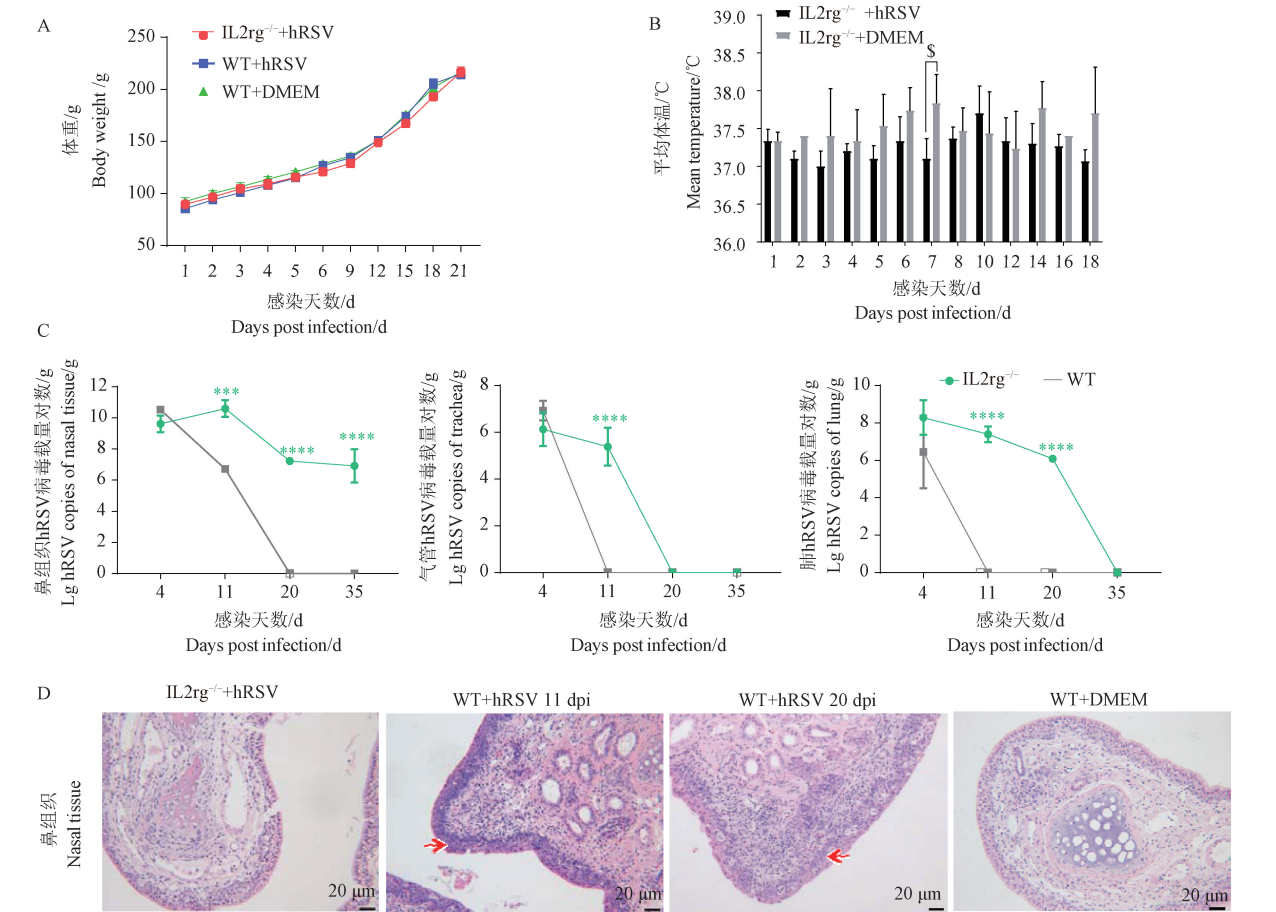
Figure 1 Construction of IL2rg^{-/-} rats with IL2rg gene knockout(*n* = 4)

用 RT-qPCR 法检测大鼠呼吸道各组织的病毒载量(图 2C)。hRSV 感染 IL2rg^{-/-}大鼠后,鼻组织中的病毒载量在 11 dpi 达到峰值 1 × 10¹⁰ copies/g 组织;在 35 dpi 时,病毒载量仍维持 1 × 10⁷ copies/g。而在 IL2rg^{-/-}大鼠气管和肺组织中,病毒载量随 hRSV 感染时间延长呈下降趋势,高拷贝数的病毒载量维持时间短,但在气管组织中,病毒复制维持到 11 dpi 左右,肺组织中,维持在 20 dpi 以上。WT 大鼠呼吸道各组织的病毒载量下降迅速,在感染中期均被清除。

hRSV 感染的 IL2rg^{-/-}大鼠其鼻、气管和肺组织未见炎症细胞浸润,组织结构完整,攻毒组和 DMEM 对照组情况一致,无明显病变(图 2D)。WT 大鼠鼻组织中,偶见极轻度病理改变,在 11 dpi 和 20 dpi 时,WT 大鼠鼻组织移行上皮细胞和呼吸上皮细胞出现变性坏死,并伴炎性细胞浸润。

2.3 hRSV 感染 IL2rg^{-/-}大鼠引起的免疫反应

用流式细胞术分析 IL2rg^{-/-}大鼠感染 hRSV 过程中免疫细胞群的变化,结果如图 3 所示。IL2rg^{-/-}大鼠感染 hRSV 感染后,外周血 T 细胞含量基本维



注:A:IL2rg^{-/-}大鼠和 WT 大鼠的体重曲线;B:hRSV 感染后 IL2rg^{-/-}大鼠(*n* = 5)的体温曲线;C:RT-qPCR 法检测 IL2rg^{-/-}大鼠(*n* = 12)呼吸道组织的病毒载量;D:hRSV 感染后 IL2rg^{-/-}大鼠和 WT 大鼠的鼻组织病理改变,红色箭头表示移行上皮细胞/呼吸上皮细胞变性坏死伴炎性细胞浸润;与 IL2rg^{-/-}大鼠 DMEM 组(*n* = 5)相比,**P* < 0.05;与 WT 大鼠(*n* = 12)相比,****P* < 0.001, *****P* < 0.0001。

图 2 构建 IL2rg^{-/-}大鼠的 hRSV 感染模型

Note. A. Body weight of IL2rg^{-/-} rats and WT rats. B. Rectal temperature of IL2rg^{-/-} rats with hRSV (*n* = 5). C. Total hRSV copies in the target organs of IL2rg^{-/-} (*n* = 12) according to RT-qPCR. D. Respiratory histopathology of IL2rg^{-/-} rats and WT rats, degeneration and necrosis of transitional epithelium and inflammatory cell infiltration (red arrows) observed in the nasal cavity of WT rats after hRSV infection. Compared with IL2rg^{-/-} rats with DMEM group (*n* = 5), **P* < 0.05. Compared with WT rats (*n* = 12), ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

Figure 2 Construction of an hRSV infection model using IL2rg^{-/-} rats

持不变($P > 0.05$),而 4 dpi 的 B 细胞含量有上升,达到 19.84%,随后下降。NK 细胞和 NKT 维持在极低水平,且含量较稳定。而 WT 大鼠感染 hRSV 后,可见 B 细胞含量有上升趋势,但无统计学意义($P > 0.05$),而在 IL2rg^{-/-}大鼠的 B 细胞含量明显上升,在 4 dpi,其含量增长了近 3 倍,在 20 dpi 下降到感染前水平。NK 细胞含量在 hRSV 感染后有轻微波动,但无显著性差异($P > 0.05$)。

感染 hRSV 病毒后,IL2rg^{-/-}大鼠血清 24 种细胞因子中(图 4A),绝大多数 WT 大鼠无显著性差异,唯有 IL-6 与 MCP-1 的含量在病毒感染前后有明显不同(图 4B)。

WT 大鼠在感染后的 0 dpi、4 dpi 和 20 dpi 这 3 个时间点的 IL-6 含量均无显著性差异,IL2rg^{-/-}大鼠的 IL-6 含量在 4 dpi 明显高于 0 dpi 与 20 dpi 时的水平。IL2rg^{-/-}大鼠和 WT 大鼠感染 hRSV 病毒后,外周血中 MCP-1 的变化趋势相同,MCP-1 含量都是先升高后降低,但 IL2rg^{-/-}大鼠 MCP-1 因子升幅高于 WT 大鼠。

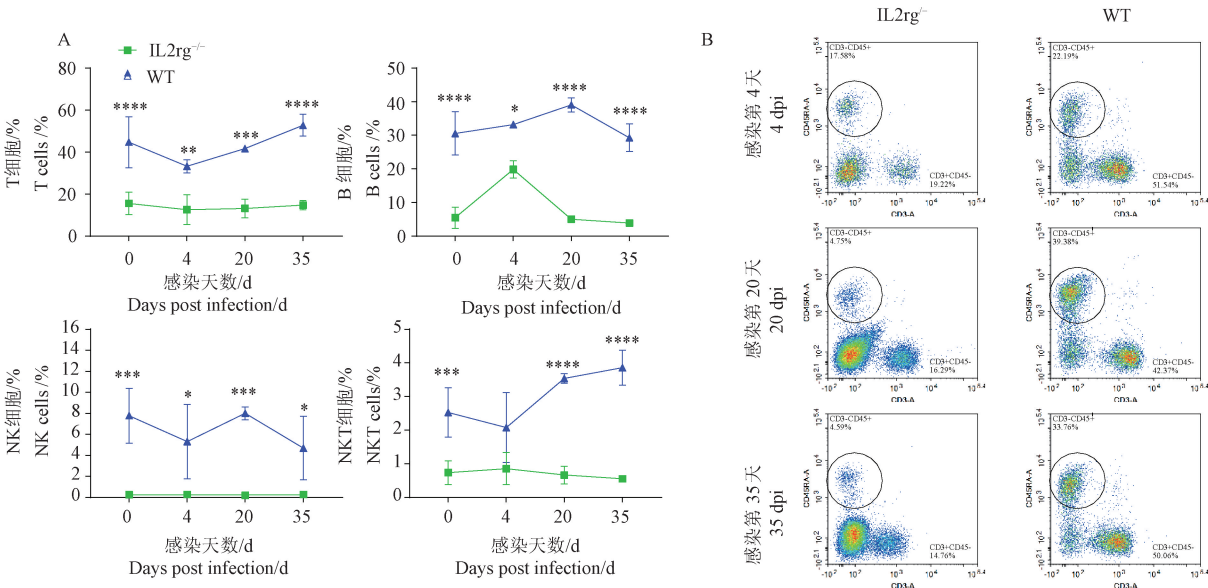
3 讨论

为了获得能支持 hRSV 病毒感染与复制、重现

临床感染症状的动物模型,已经开展了大量的研究^[7]。在环磷酸胺处理,抑制宿主免疫系统的情况下,棉鼠对 hRSV 易感性增强。本文采用 TALEN 基因编辑技术敲除 SD 大鼠的 IL2rg 基因,经过筛选传代,获得可连续传代并稳定遗传基因敲除品系。纯合的 IL2rg^{-/-}大鼠的 NK 细胞呈功能性失活,导致大鼠固有免疫应答缺陷。在滴鼻感染 hRSV 后,其体重与 WT 大鼠相比,减缓不明显,这与现有大多数 hRSV 灵长类模型和啮齿类模型相似。

而在本研究中,观察到 hRSV 能在 IL2rg^{-/-}大鼠的呼吸道靶器官内有效增殖,达到很高的滴度。虽然 IL2rg^{-/-}大鼠下呼吸道中 hRSV 病毒载量随感染时间延长而降低,气管内 hRSV 病毒仍可维持 2 周左右,与 WT 大鼠相比,无论是病毒载量还是维持时间,都显示出明显的优势。与已有免疫功能正常的 hRSV 感染小鼠和棉鼠模型相比^[14-15],IL2rg^{-/-}大鼠肺组织的病毒载量与感染时间也明显延长至 3 周。在前期的工作中,发现 hRSV 在 T、B 细胞缺陷的小鼠模型中,病毒水平及维持时间均大幅提高^[16],这也说明适应性免疫缺陷对 hRSV 感染的影响。

IL2rg^{-/-}大鼠的 B 细胞在 hRSV 感染后早期有明显增殖现象,而 T 细胞无变化,说明 B 细胞可能



注:A:IL2rg^{-/-}大鼠感染 hRSV 后,外周血 T、B、NK 和 NKT 细胞水平变化;B:IL2rg^{-/-}大鼠和 WT 大鼠感染 hRSV 后,各时间点外周血 B 细胞水平流式图。与 WT 大鼠相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 hRSV 感染后 IL2rg^{-/-}大鼠的免疫细胞改变($n = 12$)

Note. A. The contents of T, B, NK and NKT cells in IL2rg^{-/-} peripheral blood on various time points following hRSV infection. B. The abundance of B cells in a representative IL2rg^{-/-} rat at 3 time points after infection. Compared with WT rats, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Abundance of immune cells in IL2rg^{-/-} rats during hRSV infection($n = 12$)

syncytial virus disease in childhood [J]. Br Med Bull, 2002, 61: 13-28.

[7] TAYLOR G. Animal models of respiratory syncytial virus infection [J]. Vaccine, 2017, 35(3): 469-480.

[8] BELSHE R B, RICHARDSON L S, LONDON W T, et al. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of Primates [J]. J Med Virol, 1977, 1(3): 157-162.

[9] COLLINS P L, PURCELL R H, LONDON W T, et al. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human respiratory syncytial virus [J]. Vaccine, 1990, 8(2): 164-168.

[10] CLARKE C J, WATT N J, MEREDITH A, et al. Respiratory syncytial virus-associated bronchopneumonia in a young chimpanzee [J]. J Comp Pathol, 1994, 110(2): 207-212.

[11] WONG D T, ROSENBAND M, HOVEY K, et al. Respiratory syncytial virus infection in immunosuppressed animals; implications in human infection [J]. J Med Virol, 1985, 17(4): 359-370.

[12] OTTOLINI M G, PORTER D D, HEMMING V G, et al. Effectiveness of RSVIG prophylaxis and therapy of respiratory syncytial virus in an immunosuppressed animal model [J]. Bone Marrow Transplant, 1999, 24(1): 41-45.

[13] BLANCO E, IZOTOVA N, BOOTH C, et al. Immune reconstitution after gene therapy approaches in patients with X-linked severe combined immunodeficiency disease [J]. Front Immunol, 2020, 11: 608653.

[14] GRAHAM B S, PERKINS M D, WRIGHT P F, et al. Primary respiratory syncytial virus infection in mice [J]. J Med Virol, 1988, 26(2): 153-162.

[15] PRINCE G A, JENSON A B, HORSWOOD R L, et al. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats [J]. Am J Pathol, 1978, 93(3): 771-791.

[16] XIONG R, FU R, WU Y, et al. Long-term infection and pathogenesis in a novel mouse model of human respiratory syncytial virus [J]. Viruses, 2022, 14(8): 1740.

[17] GRAHAM B S, BUNTON L A, WRIGHT P F, et al. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice [J]. J Clin Invest, 1991, 88(3): 1026-1033.

[18] TAYLOR G, STOTT E J, HUGHES M, et al. Respiratory syncytial virus infection in mice [J]. Infect Immun, 1984, 43(2): 649-655.

[19] CURTIS S J, OTTOLINI M G, PORTER D D, et al. Age-dependent replication of respiratory syncytial virus in the cotton rat [J]. Exp Biol Med, 2002, 227(9): 799-802.

[20] JOHNSON R A, PRINCE G A, SUFFIN S C, et al. Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats [J]. Infect Immun, 1982, 37(1): 369-373.

[收稿日期] 2023-07-06