

张卓,刘学武,陈相池,等. 不同浓度柯萨奇病毒 B 组 3 型感染幼龄大鼠动物模型的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(7): 1032-1042.

ZHANG Z, LIU X W, CHEN X C, et al. Tissue and immune pathology in young-rat models of coxsackievirus B3-infection in relation to virus concentration [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(7): 1032-1042.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.07.010

不同浓度柯萨奇病毒 B 组 3 型感染幼龄大鼠动物模型的研究

张卓^{1,2}, 刘学武^{1,2}, 陈相池^{1,2}, 肖洒^{1,2}, 杨柳^{1,2},
姜德建^{1,2}, 彭冬冬^{1,2*}

(1. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司,长沙 410329;

2. 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410329)

【摘要】 目的 利用不同浓度柯萨奇病毒 B 组 3 型(Coxsackievirus B3, CVB3)感染幼龄 SD 大鼠,探究病毒在大鼠组织分布、免疫应答以及炎症因子的反应,有助于揭示病毒感染的免疫病理,为药物筛选和疗效评价提供实验依据。**方法** 7 日龄 SD 大鼠经腹腔注射不同剂量的 CVB3(TCID₅₀ 为 10^{-3.34}/100 μL),分别于造模第 4、8 天采用流式细胞检测全血中淋巴细胞亚群比例(CD4⁺、CD8⁺),利用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测心脏、肝、脾、脑、肾、胃肠道组织 CVB3 载量,采用大鼠 ELISA 试剂盒检测组织中 TNF-α、IFN-γ 水平,并采用苏木素-伊红(HE)染色观察组织形态学变化。**结果** 不同剂量的 CVB3 可引起幼龄大鼠出现不同程度的腹泻,且体质量下降;CVB3 主要分布于胃、小肠、大肠组织及粪便,其中在大肠及粪便中载量最高;与正常组比较,原液组(TCID₅₀ = 10^{-3.34}/100 μL)幼龄大鼠全血中 CD8⁺ T 比例增加和 CD4⁺/CD8⁺比值减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),大肠组织中 TNF-α 高表达和 IFN-γ 低表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),病理组织观察可见大肠组织黏膜下层水肿及炎症细胞浸润,而 10⁻¹ 组、10⁻² 组、10⁻³ 组幼龄大鼠全血中淋巴细胞亚群比例、TNF-α、IFN-γ 含量及组织形态学均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 以不同剂量的 CVB3 诱导幼龄 SD 大鼠感染模型,其中原液攻毒 CVB3(TCID₅₀ = 10^{-3.34}/100 μL)可引起幼龄大鼠大肠组织病理损伤、病毒大量复制可引起炎症因子水平及免疫细胞失调,提示 CVB3 病毒对幼龄大鼠具有独特的致病机制,为开发抗 CVB3 病毒感染药物评价策略提供理论基础。

【关键词】 CVB3; 幼龄 SD 大鼠; 组织分布; 免疫病理

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 07-1032-11

Tissue and immune pathology in young-rat models of coxsackievirus B3-infection in relation to virus concentration

ZHANG Zhuo^{1,2}, LIU Xuewu^{1,2}, CHEN Xiangchi^{1,2}, XIAO Sa^{1,2},
YANG Liu^{1,2}, JIANG Dejian^{1,2}, PENG Dongdong^{1,2*}

(1. Hunan Prima Drug Research Center Co. Ltd, Changsha 410329, China; 2. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329, China)

Corresponding author: PENG Dongdong. E-mail: pengdongdong@hnse.org

【基金项目】 湖南普瑞玛药物非临床研究创新创业团队(2021)。

Funded by Hunan Prima Drug Non-Clinical Research Innovation and Entrepreneurship Team(2021).

【作者简介】 张卓,男,硕士,助理研究员,研究方向:新药药效与安全性评价。Email: zhangzhuo@hnse.org

【通信作者】 彭冬冬,男,硕士,副主任药师,研究方向:药理学。Email: pengdongdong@hnse.org

[Abstract] Objective Using different concentrations of Coxsackievirus B3 (CVB3) to infect young SD rats. To investigate the distribution of coxsackievirus B3 (CVB3) in rat tissues and the immune response and inflammatory factors, to clarify the immunopathological mechanism of viral infection and provide an experimental basis for drug screening and efficacy evaluation. **Methods** Young SD rats (7 days old) were injected intraperitoneally with different doses of CVB3 ($TCID_{50} = 10^{-3.34}/100 \mu\text{L}$) and the proportions of lymphocyte subsets ($CD4^+$, $CD8^+$) in whole blood at days 4 and 8 were detected by flow cytometry. The CVB3 loads in the heart, liver, spleen, brain, kidney, and gastrointestinal tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, $TNF-\alpha$ and $IFN-\gamma$ levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and histomorphologic changes were observed by hematoxylin and eosin staining. **Results** Different doses of CVB3 caused different degrees of diarrhea and decreased body mass in young rats. CVB3 was mainly distributed in the stomach, small intestine, large intestine, and stools, with the highest load in the large intestine and stools. The stock solution group ($TCID_{50} = 10^{-3.34}/100 \mu\text{L}$) increased the proportion of $CD8^+$ T cells in the whole blood in young rats and decreased the $CD4^+/CD8^+$ ratio ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the normal group high $TNF-\alpha$ and low $IFN-\gamma$ expression were observed in the large intestine of young rats in the concentrate group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and submucosal edema and inflammatory cell infiltration were observed in the large intestine (cecum and rectum). There were no significant differences in the proportion of lymphocyte subsets, $TNF-\alpha$ and $IFN-\gamma$ levels, and morphological changes in whole blood of young rats in the group 10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3} ($P > 0.05$). **Conclusions** Different doses of CVB3 can induce infections in young SD rats. CVB3 ($TCID_{50} = 10^{-3.34}/100 \mu\text{L}$) causes pathological changes in the large intestine (cecum and rectum) in young rats, and high virus replication can increase levels of inflammatory factors and cause an imbalance of immune cells. CVB3 may have a unique pathogenic mechanism in young rats, providing a theoretical basis for developing evaluation strategies for drugs against CVB3 virus infections.

[Keywords] CVB3; young SD rats; tissue distribution; immunopathology

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

肠道病毒可引发多种传染性疾病,其中柯萨奇病毒 B 组 3 型 (Coxsackievirus B3, CVB3) 为人体肠道常见的感染性肠病毒,属于小 RNA 病毒科肠道病毒属。任何年龄均可感染,幼儿较成年人更易受到感染,其主要侵犯免疫力低下的围生儿,感染后能在胃肠道内大量繁殖,引起胃肠道系统紊乱,主要表现为反复腹泻^[1-2]。如治疗不及时,病情恶化后,病毒可通过胃肠道系统侵入到血液中,引起多种人类疾病,包括病毒性心肌炎、疱疹性咽炎、无菌性脑膜炎、胰腺炎、干燥综合征、手足口病、中枢神经系统症状,甚至导致新生儿猝死^[3-6]。迄今为止, CVB3 感染尚无特效药物救治或疫苗预防。体外实验是开展相关研究的理论基础,已有大量资料描述关于 CVB3 的细胞免疫学及有关动物抗病毒疫苗的研究^[7-8]。而体内构建 CVB3 感染的动物模型,如通过腹腔注射 CVB3 建立小鼠、叙利亚金黄地鼠、恒河猴等感染动物模型虽然有报道^[9-11],但这些动物感染 CVB3 模型与幼龄儿童作为研究对象存在一定差异,因此在前人研究基础上,本研究采用幼龄 SD

大鼠(年龄对应新生儿)作为研究对象,经腹腔注射不同浓度的 CVB3,旨在深入探究 CVB3 感染幼龄大鼠后,观察大鼠组织中的定植、免疫系统反应以及组织结构的变化,为药效学评价和机制研究提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 日龄 SPF 级 SD 大鼠 70 只(7 窝,10 只/窝,带母鼠),10 ~ 15 g,雌雄各半,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,饲养于湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏障环境动物实验室 C 区生物安全实验室 (ABSL-II) 【SYXK(湘)2020-0015】,染毒后于 IVC 笼饲养,期间给予全价颗粒饲料,自由饮水,室温为 20 ~ 26 ℃,湿度 40% ~ 70%,光照明暗各 12 h,照度:100 ~ 200 lx,通风良好。本研究所有动物实验均经湖南普瑞玛药物研究中心有限公司实验动物管理伦理委员会批准(IACUC-2021(2)003-1)。

1.1.2 病毒株

CVB3, 编号: ATCC VR-30, 由美国 ATCC 提供。在本中心病原微生物实验室 (BSL-II, 实验室备案编号: 长卫健实备字 (2021) 第 B010 号) 培养、扩增及接种。

1.1.3 细胞

恒河猴肾细胞 (LLC-MK2) (武汉普诺赛生命科技有限公司, CM-0141)。

1.1.4 主要试剂与仪器

Rat CD4 抗体 (BD Pharmingen, 554838), Rat CD8 抗体 (Biolegend, 200609), 高糖 DMEM 培养基 (Gibco, 8121512), 胎牛血清 (美国 ScienCell 公司, 2300015), 大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司, 202112), 大鼠 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司, 202112)。

BCR-MI02-72-C11-PPSU 型大鼠独立通气笼盒系统、BSC1300-II-B2 型生物安全柜 (均购自山东新华医疗器械股份有限公司, 中国); CJ-1F 型医用净化工作台 (苏州冯氏实验动物设备有限公司, 中国); 3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司, 美国); DMIL 倒置显微镜 (德国 Leica 公司, 德国); DFC 420C 病理成像系统 (德国 Leica 公司, 德国); Spectra Max i3x 型多功能酶标仪 (奥地利美谷光子公司, 奥地利); 核酸微量检测仪 (美国 Thermo Fisher, 美国); Beckman: A00-1-1102 流式细胞仪 (美国 BD 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 病毒复苏、扩增及毒力检测

LLC-MK2 复苏: 从液氮中取出 LLC-MK2, 迅速放入 37 °C 左右水浴完全融化。将管中液体转移至已加培养液的离心管中, 于 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 5 mL 含 10% FBS 的完全培养液重悬, 用吸管吹打 8 ~ 10 次, 将细胞悬液接种到细胞瓶中, 补加适量的完全培养液, 放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

病毒扩增: 从液氮中取出冻存管, 迅速放入 37 °C 左右水浴完全融化。将管中液体加入已培养好的 LLC-MK2 中, 补充培养基至刚好覆盖细胞, 进行病毒吸附 1 ~ 2 h, 每隔 15 min 轻轻晃动培养瓶, 使病毒吸附均匀。病毒吸附 2 h 后, 加入

适量的病毒生长液放入 33 ~ 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

病毒半数组织培养感染剂量 (50% tissue culture infection dose, TCID₅₀) 测定: (1) 细胞铺板: 将适宜细胞制备成 5×10^4 /mL 的单细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μ L, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育过夜; (2) 病毒接种: 待细胞长至单层贴壁后, 将病毒原液用 DMEM 培养基进行 10 倍倍比稀释, 依次稀释至 10^{-1} ~ 10^{-6} , 每个稀释度重复接种 8 个孔。弃去 96 孔板中原有培养基, 并用 PBS 液洗涤两次, 然后每个孔加入相应浓度病毒稀释液 100 μ L。同时设置 8 个未接种病毒的细胞孔作为阴性对照; (3) 培养观察: 病毒接种后, 将 96 孔细胞培养板置于相应培养条件的培养箱中孵育 2 h, 每隔 30 min 将培养板取出并轻轻晃动, 以促进病毒吸附。2 h 吸附结束后, 每孔换成病毒维持液 100 μ L, 继续培养。然后逐日在显微镜下观察细胞病变效应, 并记录病变效应 (cytopathic effect, CPE) 的孔数, 以最高稀释度不再出现病变时为终点, 根据 Reed-Muench 公式计算 TCID₅₀。

Reed-Muench 公式: $TCID_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ CPE 的病毒最高稀释对数} + \text{距离比例值} \times \text{稀释倍数的对数}$

距离比例值 = (高于 50% CPE 的百分比 - 50%) / (高于 50% CPE 的百分比 - 低于 50% CPE 的百分比)

1.2.2 分组与造模

选取检疫合格的 7 日龄 SD 大鼠 60 只 (6 窝), 雌雄各半, 按性别及体质量随机分为正常组、原液组 (TCID₅₀ = $10^{-3.34}$ /100 μ L)、 10^{-1} 组、 10^{-2} 组、 10^{-3} 组, 每组 12 只动物。按每只 0.5 mL 分别腹腔注射相应浓度的 CVB3, 正常组按相同方法注射等体积的 0.9% NaCl 注射液。

1.2.3 指标检测

(1) 一般临床观察: 每天观察各组幼龄大鼠的排便及体质量变化情况。

(2) 淋巴细胞检测: 于造模第 4 天及造模第 8 天, 分别从各组中选择幼龄大鼠, 6 只/组, 心脏采血, 将血液中的凝血块去掉, 加入 1 mL 红细胞裂解液, 在室温裂解 7 min 后 1500 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 加入 1 mL 红细胞裂解液, 室温裂解

7 min 后 1500 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 用 100 μ L 的 PBS 重悬, 每个样本中加入 0.5 μ g 兔抗 CD4 抗体和 0.25 μ g 兔抗 CD8 抗体, 样本设置阴性和单染管, 避光染色 30 min, 采用流式细胞术检测血中淋巴细胞亚群 (CD4⁺、CD8⁺) 的比例。

(3) 总 RNA 提取及荧光定量 PCR: 于造模第 4 天及造模第 8 天, 从各实验组分别取 6 只大鼠, 处死, 解剖取心脏、肝、脾、脑、肾、胃、小肠及大肠组织, 提取 RNA, 以 RNA 为模板, 采用 qRT-PCR 方法检测组织中 CVB3 病毒载量。探针序列: 5'-CCAAAGCTCCTGTTACA-3'; 探针修饰标记: 5' FAM, 3' MGB。引物序列: Forward Primer: 5'-GCTGGTATCAAACAAACATAGTGG-3'; Reverse Primer: 5'-TGCTGCGAAATGAAAGGAGT-3', 由生工生物工程有限公司合成。反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 32 s 为一个循环, 检测 40 个循环。采用构建的 CVB3 标准品及标准曲线, 计算组织中 CVB3 载量。

(4) 组织中 TNF- α 、IFN- γ 因子检测: 于造模第 4 天及造模第 8 天, 从各实验组分别取 6 只大鼠, 处死, 解剖取心脏、肝、脾、脑、肾、胃、小肠及大肠组织, 称取组织质量 (g): 0.9% NaCl 注射液 (mL) = 1 : 9 加入 0.9% NaCl 注射液, 研磨匀浆, 3000 r/min 离心 10 min 取上清液, 利用大鼠 ELISA 试剂盒检测组织中 TNF- α 、IFN- γ 的含量。

(5) 组织病理学检测: 于造模第 8 天, 从各试验组分别取 6 只大鼠, 处死, 解剖取心脏、肝、脾、脑、肾、胃、小肠及大肠组织, 经 10% 中性福尔马林溶液灌注固定后, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 置于

光镜下观察心脏、肝、脾、脑、肾、胃、小肠 (十二指肠、空肠、回肠)、大肠 (盲肠、结肠、直肠) 组织病理学变化。发现异常, 记录病变特征, 并根据组织病变程度半定量分级分析, 病变范围累及 (0% ~ 25%) 的组织作为轻度, 病变范围累及 (25% ~ 50%) 的组织作为中度, 病变范围累及 (50% ~ 75%) 的组织作为重度, 轻度、中度、重度分别记录为 “+” “++” “+++”, 未见明显异常记录无显著病变 (no significant lesion, NSL)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 Leven's test 方法检验正态性和方差齐性; 频数资料采用秩和检验进行两两比较分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 病毒毒力检测

病毒原液滴度检测结果为 $TCID_{50} = 10^{-3.34} / 100 \mu\text{L}$ 。

2.2 一般临床观察

如表 1 所示, 染毒前各组幼龄大鼠体质量基本一致; 染毒后出现不同程度的腹泻, 体质量减轻, 并与染毒剂量呈正相关; 与正常组比较, 原液组和 10^{-1} 组幼龄大鼠第 1 ~ 7 天体质量均显著减轻 ($P < 0.05, P < 0.01$), 10^{-2} 组幼龄大鼠第 1 天、第 3 ~ 5 天、第 7 天体质量均显著减轻 ($P < 0.05, P < 0.01$), 提示染毒后各组幼龄大鼠体质量增长相对缓慢。

表 1 CVB3 对幼龄大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of CVB3 on body mass of young rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	体质量/g Body mass/g							
	第 0 天 Day 0	第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3	第 4 天 Day 4	第 5 天 Day 5	第 6 天 Day 6	第 7 天 Day 7
正常组 Normal group	14.8 $\pm$ 0.4	17.6 $\pm$ 0.9	20.0 $\pm$ 1.0	22.3 $\pm$ 1.0	25.6 $\pm$ 1.9	29.6 $\pm$ 3.8	31.0 $\pm$ 4.6	35.1 $\pm$ 4.8
原液组 Concentrate group	14.8 $\pm$ 1.2	16.1 $\pm$ 0.7 ⁺	16.9 $\pm$ 1.6 ⁺⁺	19.1 $\pm$ 1.5 ⁺⁺	20.4 $\pm$ 1.3 ⁺⁺	21.4 $\pm$ 2.1 ⁺⁺	23.4 $\pm$ 2.4 ⁺⁺	23.9 $\pm$ 2.2 ⁺⁺
10^{-1} 组 Group 10^{-1}	14.5 $\pm$ 1.0	16.1 $\pm$ 1.0 ⁺	17.8 $\pm$ 1.3 ⁺	19.2 $\pm$ 1.5 ⁺⁺	21.0 $\pm$ 1.4 ⁺⁺	23.2 $\pm$ 1.4 ⁺⁺	25.2 $\pm$ 1.7 ⁺⁺	27.0 $\pm$ 1.6 ⁺⁺
10^{-2} 组 Group 10^{-2}	14.6 $\pm$ 0.6	15.7 $\pm$ 1.6 ⁺⁺	18.2 $\pm$ 2.4	20.2 $\pm$ 2.8 ⁺	23.0 $\pm$ 2.7 ⁺	25.6 $\pm$ 1.8 ⁺⁺	28.5 $\pm$ 1.6	31.1 $\pm$ 1.3 ⁺
10^{-3} 组 Group 10^{-3}	14.9 $\pm$ 1.1	17.0 $\pm$ 1.1	18.7 $\pm$ 1.2	20.8 $\pm$ 1.2	23.4 $\pm$ 1.7	26.8 $\pm$ 1.7 ⁺	30.2 $\pm$ 1.8	32.2 $\pm$ 1.9

注: 与正常组相比, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with the normal group, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$. (The same in the following tables)

2.3 对淋巴细胞亚群比例的影响

如表 2 及图 1 所示,与正常组比较,造模第 4、8 天原液组幼龄大鼠血中 CD8⁺淋巴细胞比例均显著增加($P < 0.01, P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺淋

巴细胞的比值显著减少($P < 0.01$),造模第 4 天 10⁻¹ 组、10⁻² 组幼龄大鼠血中 CD8⁺淋巴细胞比例均显著增加($P < 0.05$),提示幼龄大鼠感染 CVB3 后,其体内免疫细胞可能失衡。

表 2 CVB3 对幼龄大鼠淋巴细胞亚群比例的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of CVB3 on the proportion of lymphocyte subsets in young rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	第 4 天 Day 4			第 8 天 Day 8		
	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常组 Normal group	26.0 ± 3.5	12.7 ± 1.8	2.1 ± 0.4	28.3 ± 4.5	14.1 ± 1.9	2.0 ± 0.1
原液组 Concentrate group	25.3 ± 5.1	21.3 ± 5.2 ⁺⁺	1.2 ± 0.2 ⁺⁺	23.6 ± 6.8	17.7 ± 3.8 ⁺	1.3 ± 0.2 ⁺⁺
10 ⁻¹ 组 Group 10 ⁻¹	30.5 ± 1.2	17.4 ± 1.5 ⁺	1.8 ± 0.2	26.4 ± 3.5	14.9 ± 2.3	1.8 ± 0.1
10 ⁻² 组 Group 10 ⁻²	31.7 ± 5.0	17.5 ± 2.6 ⁺	1.8 ± 0.2	30.5 ± 5.5	16.7 ± 2.6	1.8 ± 0.1
10 ⁻³ 组 Group 10 ⁻³	30.5 ± 5.4	15.6 ± 3.4	2.0 ± 0.1	24.9 ± 3.9	14.2 ± 2.7	1.8 ± 0.1

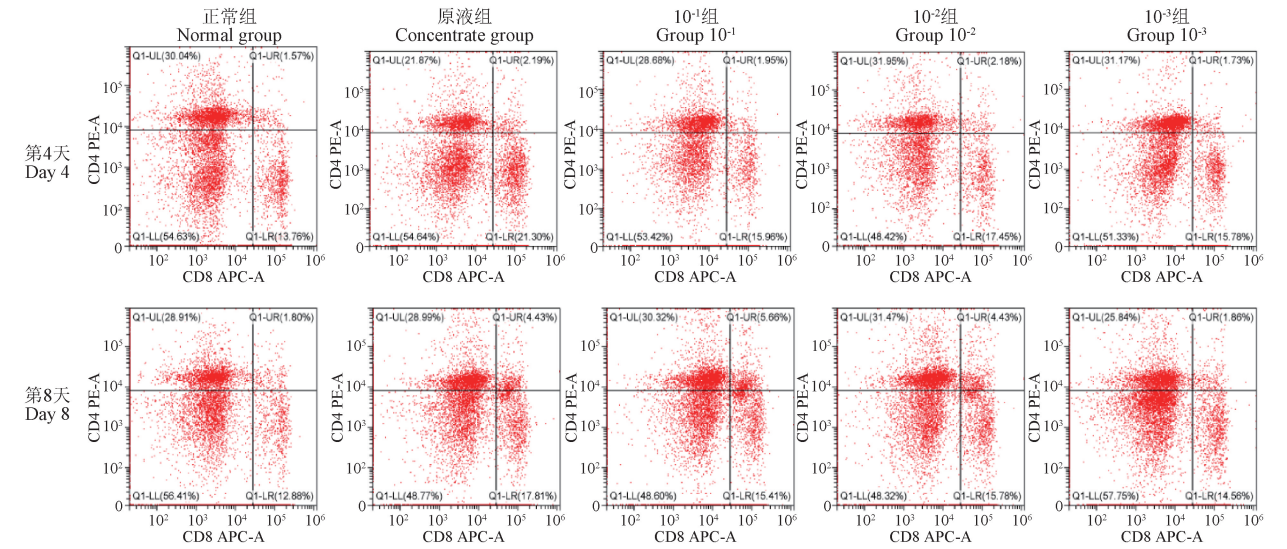


图 1 各组幼龄大鼠外周血淋巴细胞亚群 CD4⁺和 CD8⁺比例流式结果

Figure 1 Flow results of CD4⁺ and CD8⁺ ratio in peripheral blood lymphocyte subsets of young rats in each group

2.4 对组织病毒载量的影响

采用 qRT-PCR 检测幼龄大鼠心脏、肝、脾、脑、肾组织 CVB3 载量,结果显示幼龄大鼠上述组织中均无 CVB3 定植,但胃、小肠、大肠组织及粪便中可检测到 CVB3 表达。如表 3 所示,与正常组比较,原液组造模第 4 天幼龄大鼠胃、小肠、大肠组织中 CVB3 载量均显著升高($P < 0.01$),10⁻¹ 组幼龄大鼠小肠、大肠组织及粪便中 CVB3 载量均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),10⁻² 组、10⁻³

组幼龄大鼠大肠组织及粪便中 CVB3 载量均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$);原液组造模第 8 天幼龄大鼠小肠、大肠组织及粪便中 CVB3 载量均显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),10⁻¹ 组幼龄大鼠大肠组织及粪便中 CVB3 载量显著升高($P < 0.01$)。

2.5 对组织中细胞因子的影响

根据 qRT-PCR 结果显示,心脏、肝、脾、肾、脑组织未检测到 CVB3,但在胃肠道检测到 CVB3,故仅进行胃肠道组织细胞因子检测。如表 4、表 5

表 3 CVB3 对幼龄大鼠胃肠道组织病毒载量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of CVB3 on viral load in gastrointestinal tract of young rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

阶段 Stage	组织类型/单位 Organization type/unit	正常组 Normal group	原液组 Concentrate group	10 ⁻¹ 组 Group 10 ⁻¹	10 ⁻² 组 Group 10 ⁻²	10 ⁻³ 组 Group 10 ⁻³
第 4 天 Day 4	胃/(10 ² copies/g) Stomach/ (10 ² copies/g)	0.00 ± 0.00	1.12 ± 0.85 ⁺⁺	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	小肠/(10 ³ copies/g) Small intestine/ (10 ³ copies/g)	0.00 ± 0.00	1.06 ± 0.81 ⁺⁺	0.76 ± 0.34 ⁺	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	大肠/(10 ⁵ copies/g) Large intestine/ (10 ⁵ copies/g)	0.00 ± 0.00	80.02 ± 10.26 ⁺⁺	10.25 ± 5.26 ⁺⁺	0.65 ± 0.34 ⁺⁺	0.01 ± 0.02 ⁺
	粪便/(10 ⁶ copies/g) Feces/ (10 ⁶ copies/g)	0.00 ± 0.00	29.39 ± 17.50 ⁺⁺	1.45 ± 0.11 ⁺⁺	0.26 ± 0.19 ⁺⁺	0.11 ± 0.05 ⁺⁺
	胃/(10 ² copies/g) Stomach/ (10 ² copies/g)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	小肠/(10 ³ copies/g) Small intestine/ (10 ³ copies/g)	0.00 ± 0.00	5.20 ± 2.30 ⁺	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
第 8 天 Day 8	大肠/(10 ⁵ copies/g) Large intestine/ (10 ⁵ copies/g)	0.00 ± 0.00	90.75 ± 46.11 ⁺⁺	5.36 ± 3.15 ⁺⁺	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	粪便/(10 ⁶ copies/g) Feces/ (10 ⁶ copies/g)	0.00 ± 0.00	15.13 ± 14.25 ⁺⁺	1.31 ± 1.71 ⁺⁺	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

表 4 CVB3 对幼龄大鼠胃肠道组织 TNF-α 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of CVB3 on TNF-α levels in gastrointestinal tract of young rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	胃/(pg/g) Stomach/(pg/g)	小肠/(pg/g) Small intestine/(pg/g)	大肠/(pg/g) Large intestine/(pg/g)			
	第 4 天 Day 4	第 8 天 Day 8	第 4 天 Day 4	第 8 天 Day 8	第 4 天 Day 4	第 8 天 Day 8
正常组 Normal group	2290 ± 81	2558 ± 208	2827 ± 239	3078 ± 115	2648 ± 148	2576 ± 126
原液组 Concentrate group	2295 ± 157	2468 ± 177	2777 ± 236	2899 ± 292	2829 ± 98 ⁺⁺	2806 ± 96 ⁺⁺
10 ⁻¹ 组 Group 10 ⁻¹	2306 ± 80	2615 ± 201	2826 ± 145	2911 ± 302	2711 ± 125	2698 ± 314
10 ⁻² 组 Group 10 ⁻²	2278 ± 63	2345 ± 115	2915 ± 138	3025 ± 156	2614 ± 156	2656 ± 117
10 ⁻³ 组 Group 10 ⁻³	2294 ± 102	2495 ± 184	2845 ± 301	3125 ± 251	2695 ± 145	2591 ± 129

表 5 CVB3 对幼龄大鼠胃肠道组织 IFN-γ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of CVB3 on IFN-γ levels in gastrointestinal tract of young rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	胃/(pg/g) Stomach/(pg/g)	小肠/(pg/g) Small intestine/(pg/g)	大肠/(pg/g) Large intestine/(pg/g)			
	第 4 天 Day 4	第 8 天 Day 8	第 4 天 Day 4	第 8 天 Day 8	第 4 天 Day 4	第 8 天 Day 8
正常组 Normal group	17395 ± 902	19055 ± 1032	16191 ± 898	17533 ± 788	19019 ± 1037	19046 ± 1269
原液组 Concentrate group	17744 ± 1481	18203 ± 1213	16559 ± 978	17093 ± 1511	17502 ± 645 ⁺	16779 ± 2078 ⁺
10 ⁻¹ 组 Group 10 ⁻¹	18060 ± 1002	19014 ± 1198	16781 ± 1004	18056 ± 1251	18974 ± 1654	19697 ± 1569
10 ⁻² 组 Group 10 ⁻²	17569 ± 1023	20124 ± 1347	17004 ± 1235	17856 ± 1237	19897 ± 1478	20019 ± 1252
10 ⁻³ 组 Group 10 ⁻³	17865 ± 1126	20012 ± 1523	16871 ± 1259	18026 ± 1450	20459 ± 1266	18996 ± 1126

所示,与正常组比较,造模第 4、8 天原液组幼龄大鼠大肠组织 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$), IFN- γ 水平显著降低 ($P < 0.05$),胃、小肠组织 TNF- α 、IFN- γ 水平均无明显差异。

2.6 对组织病理学改变的影响

如表 6、表 7 所示,与正常组比较,原液组幼龄大鼠大肠(结肠、盲肠、直肠)组织病变程度(表现为黏膜下层水肿及炎症细胞浸润)均显著加重 ($P < 0.01$),而各组幼龄大鼠小肠(十二指肠、空

肠、回肠)组织仅有个别病变,均无明显统计学意义,因此根据上述结果表明 CVB3 感染幼龄大鼠,可引起大肠组织黏膜下层水肿及炎症细胞浸润。幼龄大鼠经腹腔注射不同剂量的 CVB3 后,各组幼龄大鼠心脏、肝、脾、肾、脑组织形态学均无明显异常,见图 2。而胃组织均出现不同程度上皮空泡化的病变,但与正常组、病毒剂量梯度均无明显差异,见图 3 ~ 图 5。提示该组织病变可能是幼龄大鼠胃未发育完全所致,与病毒感染无关。

表 6 CVB3 对幼龄大鼠胃肠道组织病理的影响

Table 6 Effects of CVB3 on gastrointestinal histopathology in young rats												
组别 Groups	胃 Stomach				小肠 Small intestine				大肠 Large intestine			
	-	+	++	P 值 P value	-	+	++	P 值 P value	-	+	++	P 值 P value
正常组 Normal group	0	1	5	-	5	1	0	-	6	0	0	-
原液组 Concentrate group	0	3	3	0.394	5	1	0	1.000	0	1	5	0.002 ⁺⁺
10 ⁻¹ 组 Group 10 ⁻¹	0	2	4	0.699	4	2	0	0.523	2	3	1	0.065
10 ⁻² 组 Group 10 ⁻²	0	2	4	0.699	5	1	0	1.000	3	3	0	0.180
10 ⁻³ 组 Group 10 ⁻³	0	4	2	0.180	5	1	0	1.000	5	1	0	0.699

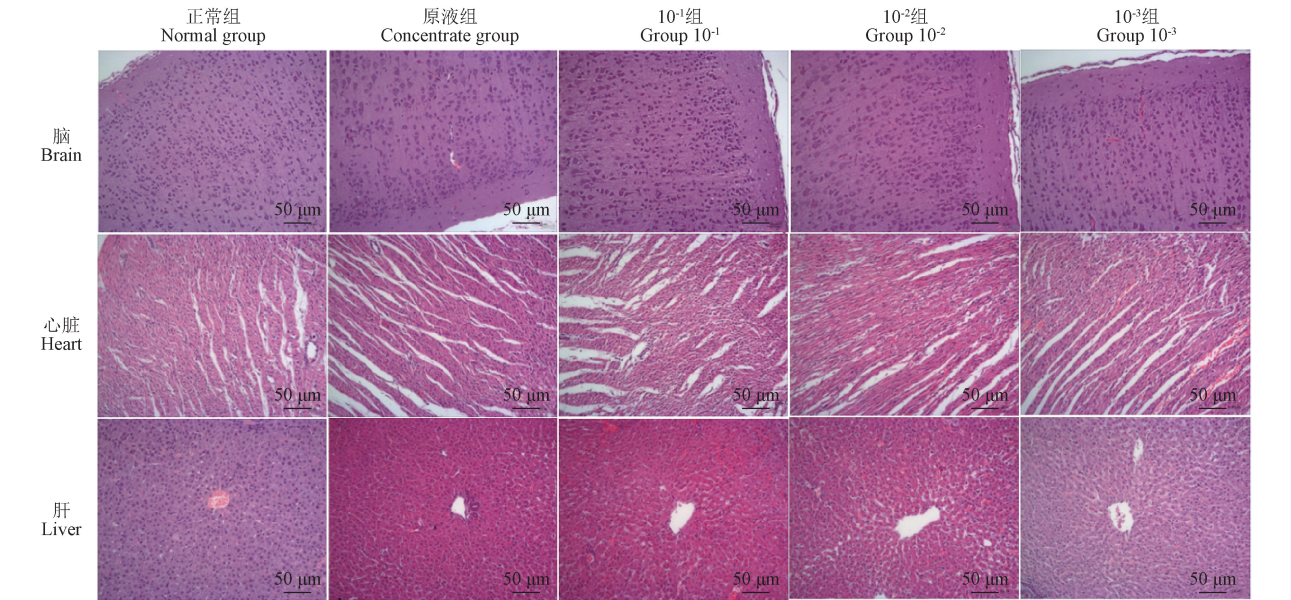


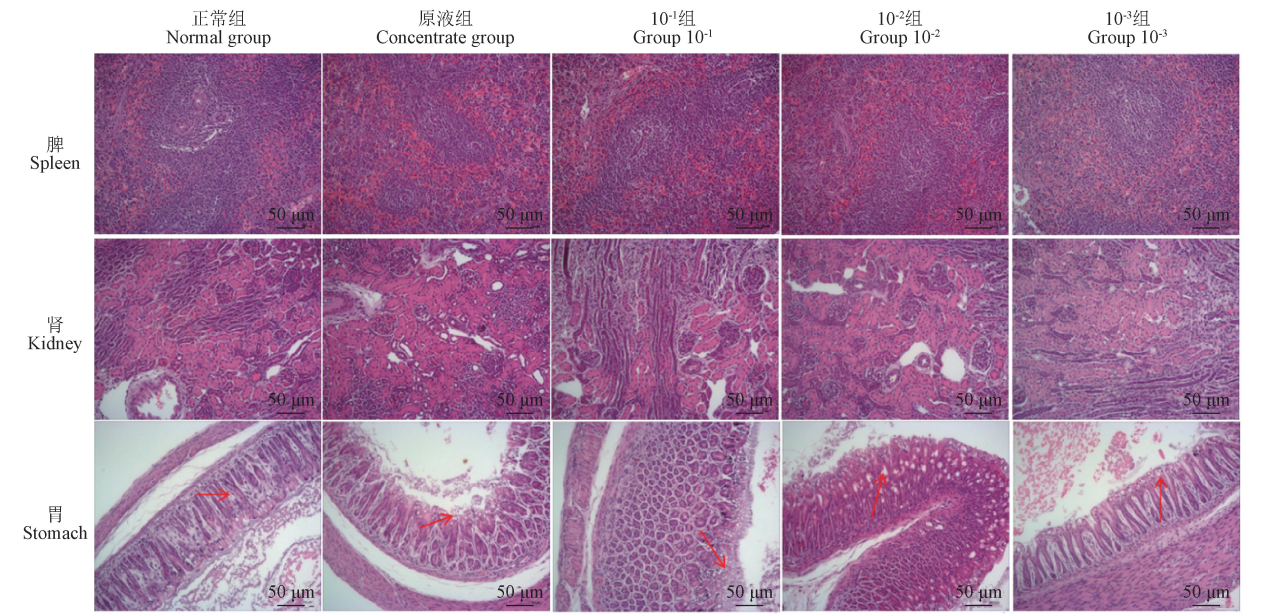
图 2 幼龄大鼠脑、心脏、肝组织 HE 染色

Figure 2 Brain, heart and liver stained HE staining in young rats

3 讨论

柯萨奇病毒属肠道病毒的一种,为小核糖核

酸病毒科。按血清型可分为 A 组(1 ~ 22 和 24 血清型)和 B 组(1 ~ 6 血清型),其中 CVB3 是一种单股正链 RNA 病毒,基因组约 7.4 kb,极易在

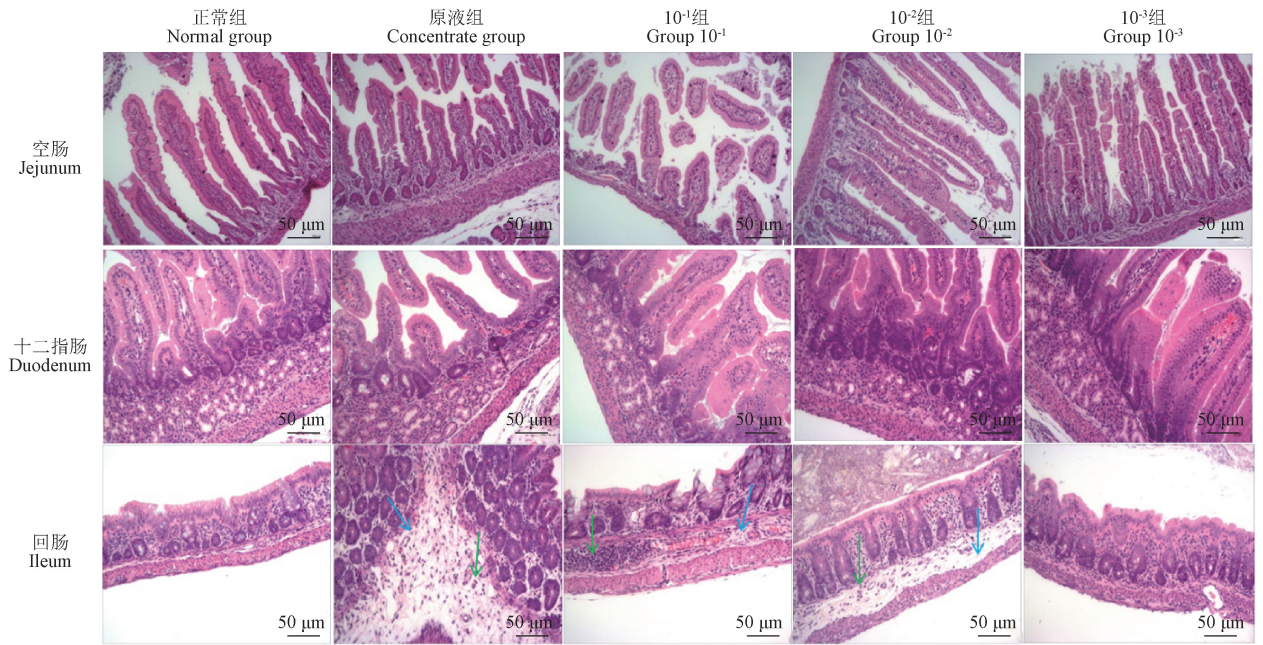


注:红色箭头:黏膜上皮空泡化。

图 3 幼龄大鼠脾、肾、胃组织 HE 染色

Note. Red arrow. Mucosal epithelial vacuolation.

Figure 3 Spleen, kidney and stomach stained HE staining in young rats



注:蓝色箭头:肠黏膜水肿;绿色箭头:淋巴细胞浸润。

图 4 幼龄大鼠小肠组织 HE 染色

Note. Blue arrow. Intestinal mucosal edema. Green arrow. Lymphocyte infiltration.

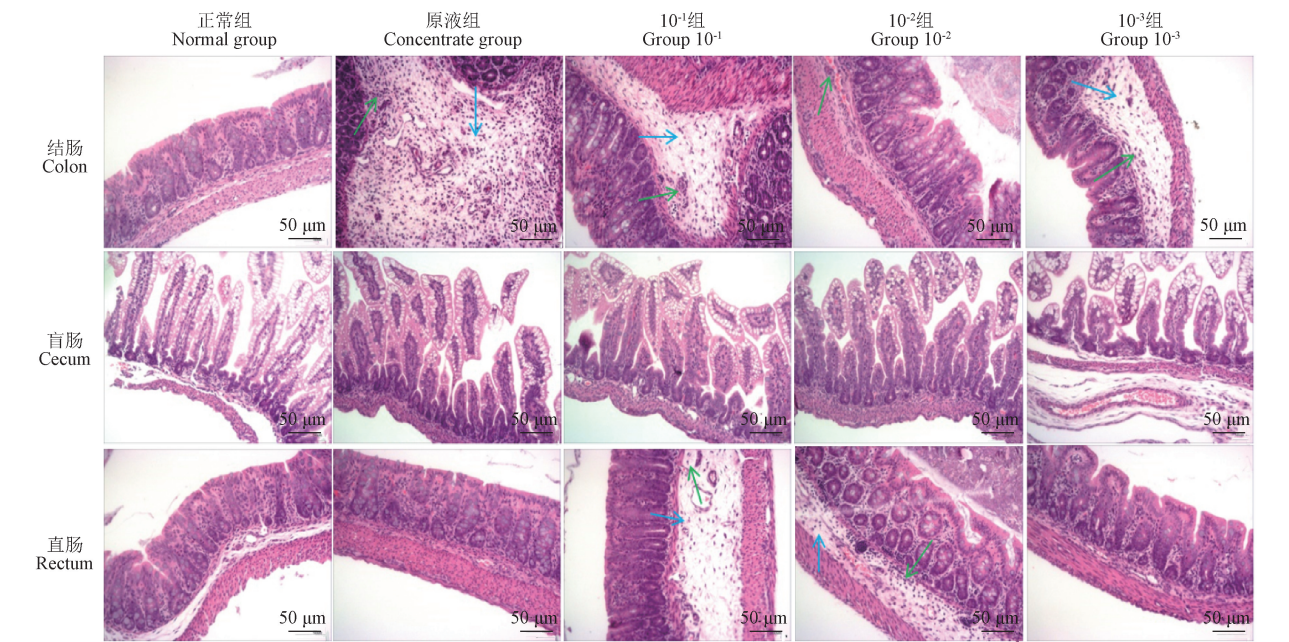
Figure 4 Small intestine stained HE staining in young rats

人肠道细胞中增殖,侵入血流到达中枢神经系统或其他靶器官,使临床表现多种多样且轻重程度悬殊,以隐性及轻型感染居多,其中最常见的病症为婴幼儿及青少年病毒性心肌炎。CVB3 的传播途径主要通过消化道的粪-口途径,打喷嚏或咳嗽从呼吸道排出的分泌物也可能传播。幼儿中的 CV 携带率可以高达 5% ~ 50%,引发的相关疾病病程发展一般为潜伏期 2 ~ 3 d,高峰期 3 ~ 5 d,

表 7 CVB3 对幼龄大鼠主要脏器组织病理的影响

Table 7 Effect of CVB3 on histology of major organs in young rats

组别 Groups	心脏 Heart			肝 Liver			脾 Spleen	肾 Kidney	脑 Brain
	-	+	P 值 P value	-	+	P 值 P value	-	-	-
正常组 Normal group	6	0	-	6	0	-	6	6	6
原液组 Concentrate group	5	1	0.699	6	0	1.000	6	6	6
10 ⁻¹ 组 Group 10 ⁻¹	6	0	1.000	5	1	0.699	6	6	6
10 ⁻² 组 Group 10 ⁻²	6	0	1.000	6	0	1.000	6	6	6
10 ⁻³ 组 Group 10 ⁻³	6	0	1.000	5	1	0.699	6	6	6



注:蓝色箭头:肠黏膜水肿;绿色箭头:淋巴细胞浸润。

图 5 幼龄大鼠大肠组织 HE 染色

Note. Blue arrow. Intestinal mucosal edema. Green arrow. Lymphocyte infiltration.

Figure 5 Large intestine stained HE staining in young rats

一般可在 1 周左右自愈,但有部分感染案例可导致较为严重的后果,如 SOLER-CARDONA 等^[12]首次发现了 CVB3 病毒感染能够引起婴儿期急性出血性水肿。

病毒感染通常会引起宿主组织细胞损伤、炎症反应等。细胞损伤是病毒感染的一个重要特征,病毒可以通过直接破坏细胞膜或者操纵细胞内的生物学过程等方式导致细胞死亡或者功能异常。病毒感染还会引起炎症反应,炎症反应是

机体对病原体入侵的一种保护性反应。然而,过度或持续的炎症反应也可能导致组织损伤和器官功能障碍。除了直接破坏和炎症反应,病毒感染还可能引起组织损伤和器官功能障碍的其他机制,如病毒所产生的毒素、机体对病毒感染产生的免疫反应等。根据相关文献报道,CVB3 感染后,病毒将入侵 NF-κB 细胞、CD4⁺ T 细胞,导致免疫系统失衡,引起 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞的比值减少,而病毒入侵引起的 T 淋巴细胞介导的细

胞免疫反应,将进一步提高 CD8⁺ T 细胞的数量,使 CD4⁺/CD8⁺ 的比值进一步减少^[13-15]。同时 CD8⁺ T 细胞的大量增加将聚集与激活巨噬细胞极化,使巨噬细胞分泌大量的肿瘤坏死因子,并使 NK 细胞释放干扰素,从而杀伤感染细胞,抑制病毒分裂繁殖^[14]。病毒在体内不断复制,机体内细胞及体液免疫被激活,产生一系列炎症因子及细胞黏附因子,从而进一步加重组织损伤。本研究采用幼龄 SD 大鼠腹腔注射 CVB3 建立体内感染模型,结果显示,幼龄大鼠经 CVB3 感染后,能引起幼龄大鼠血中 CD8⁺ 淋巴细胞比例增加和 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值减少,从而引起大肠组织中 TNF- α 水平高表达,IFN- γ 水平低表达,上述幼龄大鼠感染 CVB3 后免疫细胞及相关细胞因子(TNF- α 、IFN- γ)的变化与文献报道^[13-15]基本一致。

组织病毒载量分析是对病毒的结构、传播途径和致病机制等方面进行研究和分析的重要手段,是判断病毒感染的程度、评价治疗效果的重要指标。通过对病毒感染宿主后引起的组织病理变化的观察和分布情况研究,可以揭示病毒感染对宿主组织结构和功能的影响,从而进一步了解病毒感染对机体的影响和病毒致病的机制,这对于研发治疗手段、制定预防策略以及加强公共卫生工作都具有重要意义。本实验采用了不同浓度梯度的 CVB3 感染幼龄 SD 大鼠后,CVB3 主要分布在胃、小肠、大肠及粪便,而未在脑、心脏、肝、脾、肾组织分布,病毒载量随着感染时间延长而减少,可能与自身机体产生特异性中和抗体,从而增强幼龄大鼠对病毒耐受程度恢复有关;并能引起幼龄大鼠盲肠、直肠黏膜下层水肿,伴有炎症细胞浸润,其中胃组织可见不同程度的病理改变(以胃黏膜上皮空泡变性为主),但正常组幼龄大鼠亦出现同样的病变,且与 CVB3 的感染剂量无明显相关性,提示胃组织病变可能与幼龄大鼠胃发育不完全有关。值得注意的是,本次实验幼龄大鼠腹腔注射 CVB3 后,主要在胃肠道及粪便定植,并引起盲肠、直肠组织损伤,这与现有 CVB3 对脏器损伤(心脏、肝等)文献报道不一致^[16],这可能意味着 CVB3 病毒在这些器官中的复制能力较弱,或者这些器官具有更强的抗病毒能力和免疫保护机制,在未来研究中应更加关注病毒与宿主之间的相互作用以及病毒的靶向性。

4 结论

综上所述,以不同剂量的 CVB3 感染幼龄 SD 大鼠后,感染剂量为 $10^{-3.34}$ TCID₅₀/100 μ L 原液可引起幼龄大鼠大肠(盲肠、直肠)病理损伤、病毒大量复制可引起炎症因子水平及免疫细胞失调,与其他类型病毒引起发病靶器官不同,提示 CVB3 病毒对幼龄大鼠具有独特的致病机制,为开发针对 CVB3 病毒感染的特异性治疗策略提供了重要的实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] QIN Y, LIN L, YANG S, et al. Circular RNA circ_0076631 promotes coxsackievirus B3 infection through modulating viral translation by sponging miR-214-3p [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 975223.
- [2] LIU H, LUO H. Development of group B coxsackievirus as an oncolytic virus: opportunities and challenges [J]. Viruses, 2021, 13(6): 1082.
- [3] RASQUINHA M T, LASRADO N, PETRO-TURNQUIST E, et al. PhIP-seq reveals autoantibodies for ubiquitously expressed antigens in viral myocarditis [J]. Biology (Basel), 2022, 11(7): 1055.
- [4] SIOOFY-KHOJINE A B, RICHARDSON S J, LOCKE J M, et al. Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with the presence of the predisposing allele of the type 1 diabetes risk gene *IFIH1* and with disease stage [J]. Diabetologia, 2022, 65(10): 1701-1709.
- [5] PUPINA N, AVARLAID A, SADAM H, et al. Immune response to a conserved enteroviral epitope of the major capsid VP1 protein is associated with lower risk of cardiovascular disease [J]. EBioMedicine, 2022, 76: 103835.
- [6] SOBCZYK M K, GAUNT T R. The effect of circulating zinc, selenium, copper and vitamin K₁ on COVID-19 outcomes: a mendelian randomization study [J]. Nutrients, 2022, 14(2): 233.
- [7] QI X, LU Q, HU J, et al. Spontaneous C-cleavage of a truncated intein as fusion tag to produce tag-free VP1 inclusion body nanoparticle vaccine against CVB3-induced viral myocarditis by the oral route [J]. Microb Cell Fact, 2019, 18(1): 66.
- [8] GAO Y, YUE Y, XIONG S. An albumin-binding domain peptide confers enhanced immunoprotection against viral myocarditis by CVB3 VP1 vaccine [J]. Front Immunol, 2021, 12: 666594.
- [9] XUE Y, CHEN M, CHEN Q, et al. Neutralization of

- interleukin-38 exacerbates coxsackievirus B3-induced acute myocarditis in mice [J]. Virol J, 2021, 18(1): 220.
- [10] 李咏洁, 张伟, 杨凤梅, 等. 柯萨奇病毒 B 组 1 型感染叙利亚金黄地鼠动物模型建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 50-56.
- LI Y J, ZHANG W, YANG F M, et al. Establishment of an animal model of Coxsackievirus B1 infecting syrian golden hamster [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 50-56.
- [11] 段素琴. 人柯萨奇病毒 B 组 2 型恒河猴感染模型初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2019.
- DUAN S Q. The preliminary experimental infection of rhesus model with human Coxsackie virus group B type 2 [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2019.
- [12] SOLER-CARDONA A, TANEW A, RADAKOVIC S. Coxsackie B3 virus-induced acute hemorrhagic edema of infancy [J]. Acta Dermatovenereol Croat, 2021, 29(3): 159-163.
- [13] WU Z, PENG H, DU Q, et al. GYY4137, a hydrogen sulfide-releasing molecule, inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases in Coxsackie virus B3-infected rat cardiomyocytes [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1837-1844.
- [14] DHALECH A H, CONDOTTA S A, PATTNAIK A, et al. Coxsackievirus B3 elicits a sex-specific CD8⁺ T cell response which protects female mice [J]. PLoS Pathog, 2023, 19(9): e1011465.
- [15] 沈雅婧, 李兰娟. B3 型柯萨奇病毒感染对胰岛细胞糖尿病相关 LncRNA 表达的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(10): 1101-1106.
- SHEN Y J, LI L J. Effects of Coxsackievirus B3 infection on the expression of diabetes-related LncRNA in islet cells [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2019, 24(10): 1101-1106.
- [16] NIE X, LI H, WANG J, et al. Expression profiles and potential functions of long non-coding RNAs in the heart of mice with Coxsackie B3 virus-induced myocarditis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 704919.

[收稿日期] 2024-11-13

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评价的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

