

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002256

重庆地区小鼠诺如病毒的感染及其对免疫功能影响的初步研究

田娜,何丽雯,曾莉,谭冬梅,韩志刚,谭毅

(重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016)

【摘要】目的:建立实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,普查重庆市实验小鼠诺如病毒(murine Norovirus, MNV)的感染情况及其对 BABL/c-nu 小鼠免疫功能影响的初步研究。**方法:**①根据 GenBank 中收录的 MNV 全基因组序列,设计 MNV 特异性引物,检测其特异性、灵敏度、重复性和稳定性,并和两个实验动物质量检测单位对 123 份小鼠临床样本开展比对检测,以最终构建荧光定量 RT-PCR 检测方法。②应用该方法比较小鼠不同肠道排泄物(盲肠内容物、新鲜粪便和排出体外 24 h 粪便)中 MNV 的检出情况。③应用该方法普查重庆市实验小鼠感染 MNV 的情况。④6~8 周的 BABL/c-nu 小鼠被随机分为 3 组($n=3$):正常对照组、MNV 感染 30 d 组、MNV 感染 60 d 组,收集各组小鼠血清及肝、肺、脾、结肠,HE 染色观察各脏器的病理变化;酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清、脾和结肠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ)的含量。**结果:**①建立的荧光定量 RT-PCR 方法特异性强,与同种属其他病毒均不发生交叉反应,方法的灵敏度、重复性和稳定性良好,与另外两个实验动物质检单位的检测结果吻合度高达 98%。②新鲜粪便与盲肠内容物中 MNV 的检出结果完全一致;24 h 的陈旧粪便也能准确反映出该笼小鼠 MNV 的感染情况。③重庆市实验小鼠存在较高的 MNV 感染率,且封闭群和近交系小鼠 MNV 感染率无品系特异性(68.3% vs. 70.6%, $\chi^2=0.116$, $P=0.733$),但基因修饰小鼠比普通小鼠更易感染 MNV(78% vs. 64%, $\chi^2=6.434$, $P=0.011$)。④与正常对照组小鼠相比, BABL/c-nu 小鼠自然感染 MNV 后肝、肺、脾和结肠均出现不同程度的炎症细胞浸润和明显的组织病理变化,且结肠组织的 TNF- α 、IFN- γ 水平明显升高($F=21.682$, $P=0.002$; $F=77.223$, $P=0.000$)。**结论:**本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法可靠,且可通过小鼠粪便样本,日常监测 MNV 的感染情况等;重庆市实验小鼠有较高的 MNV 感染率,且 BABL/c-nu 小鼠感染 MNV 会对动物实验结果造成干扰。因此,各实验动物单位应该重视 MNV 的传播和防控,加强实验动物的饲养管理,降低实验动物感染 MNV 的风险。

【关键词】小鼠诺如病毒;实时荧光定量 RT-PCR; BABL/c-nu 小鼠;酶联免疫吸附法;肿瘤坏死因子- α ;干扰素- γ

【中图分类号】Q95-33

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-07-29

Preliminary study on the infection of mouse Norovirus and its effect on immune function in Chongqing

Tian Na, He Liwen, Zeng Li, Tan Dongmei, Han Zhigang, Tan Yi

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a real-time fluorescent quantitative RT-PCR method to survey murine Norovirus(MNV) infection in laboratory mice in Chongqing, and explore the effect on immune function. **Methods:** ①A pair of specific primers were designed targeting MNV GenBank genomic sequence, the specificity, sensitivity, repeatability and stability of the assay were evaluated, and comparison test of 123 clinical samples were carried out with two laboratory animal testing institutions to establish reliable real-time

作者介绍:田娜, Email: tianna91@126.com,

研究方向:实验动物学。

通信作者:谭毅, Email: tanyee66@hotmail.com。

基金项目:重庆市委社会事业与民生保障科技创新专项资金项目(编号: cstc2017shmsA00008、cstc2017shmsA00007); 重庆市委中央引导地方科技发展专项资金项目(编号: cstc2016zyydx1002)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190906.1336.008.html>
(2019-09-09)

RT-PCR assay for MNV detection. ②The detection of MNV in different intestinal excretions(caecum contents, fresh feces, and excreted feces for 24 hours) was compared by real-time quantitative RT-PCR. ③Real-time quantitative RT-PCR was used to investigate the infection of MNV in laboratory mice in Chongqing. ④Six to eight week-old BABL/c-nu mice were randomly divided into 3 groups($n=3$ for each group): control, MNV natural infection for 30 d, MNV infection for 60 d. Serum, liver lung,

spleen, and colon were collected, the pathological changes of various organs were observed by HE staining; and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) levels in serum, tissue homogenates of spleen and colon were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** ①To established real-time RT-PCR assay could specifically detect MNV and had no cross reactions with mouse other virus. The sensitivity and repeatability were also excellent and the coincidence degree of comparison test in 123 clinical samples is as high as 98%. ②The detection results of MNV in fresh feces and caecum contents were completely consistent, excrement for 24 h *in vitro* can also accurately reflect MNV infection of mice in the cage. ③MNV infection rate in Chongqing is 65% to 85%, and no strain differences (68.3% vs. 70.6%, $\chi^2=0.116$, $P=0.733$), but genetically modified mice were more susceptible to MNV than normal mice (78% vs. 64%, $\chi^2=6.434$, $P=0.011$). ④Compared with Control group, BABL/c-nu mice showed that inflammatory cell infiltration and the obvious pathological changes in liver, lung, spleen and colon after natural infection with MNV, and the levels of TNF- α , IFN- γ in colon were significantly increased ($F=21.682$, $P=0.002$; $F=77.223$, $P=0.000$, respectively). **Conclusion:** The established real-time fluorescent quantitative RT-PCR method is reliable and can monitor the infection of MNV through the stool samples of mice, MNV infection rate of mice in Chongqing is high and the infection in BABL/c-nu mice has interfered with the experimental results. Therefore, it is necessary to enhance the animal breeding management to reduce the risk of MNV infection in mice.

[Key words] mouse Norovirus; real-time RT-PCR; BABL/c-nu mice; enzyme linked immunosorbent assay; tumor necrosis factor- α ; interferon gamma

诺如病毒 (Norovirus, NoV) 属于杯状病毒科诺如病毒属, 无囊膜, 二十面体对称, 核酸为单股正链 RNA, 是导致急性胃肠炎暴发的重要病原体之一^[1-2]。2003 年 Krast^[3]从信号转导蛋白和转录激活因子 1 (STAT1^{-/-}) 及重组体激活基因 2 (RGA2) 缺陷 (RGA2^{-/-}/STAT1^{-/-}) 小鼠中首次分离得到鼠诺如病毒株 (murine Norovirus, MNV)。研究证实, 诺如病毒已成为实验小鼠中感染率较高的病毒, 其感染率是排在第二位的细小病毒的 10 倍^[4]。MNV 会对几种先天性免疫缺陷小鼠造成致死性感染, 如 RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}、STAT1^{-/-}、STAT1^{-/-}/PKR^{-/-}和 IFN $\alpha\beta\gamma$ R^{-/-}等小鼠, 而免疫活性小鼠和多数免疫缺陷小鼠感染后无明显的临床症状和病理变化^[5], 但在进行小鼠实验的过程中, 携带的 MNV 可能会对实验结果产生影响^[6-7]。

2010 年, 袁文等^[8]首次报道我国广东省实验小鼠携带 MNV, 用 RT-PCR 的方法检测出 37.38% 的 MNV 阳性感染率。近年来, MNV 已经成为国外实验动物健康监测的一个病原体指标, 而我国实验动物国家标准尚未将 MNV 纳入监测行列, 并且国内有关 MNV 的感染报道仅限于广东、北京、上海等发达城市^[9-11], 其他地区 MNV 的感染情况并未见详细报道。

目前 MNV 的检测方法主要为 ELISA、间接免疫

荧光试验 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 和 RT-PCR 方法, 并且被收录入中国实验动物学会团体标准 T/CALAS 22-2017。尽管普通 RT-PCR 方法具有快速、简便、灵敏、特异等优点, 且已成为 MNV 感染诊断的重要手段, 但是随着实验技术的不断创新和发展, 荧光定量 RT-PCR 方法具有更高的灵敏性、特异性、快速和可定量等优点, 已被广泛应用于病原微生物的检测。然而, 在 PCR 检测中, 由于检测仪器、试剂等的差异, 各地区建立实时荧光定量 PCR 方法并不普遍适用。因此, 建立适用于本地区的检测方法, 普查并实时监测本地区实验小鼠感染 MNV 的情况至关重要。MNV 在免疫功能正常的小鼠中呈现隐性感染, 但是对一些免疫缺陷小鼠会发生致死性感染, 然而, MNV 感染是否干扰小鼠的实验研究以及对何种实验指标造成影响尚未见报道。

本文根据 GenBank 中收录的 MNV 全基因组序列, 选择 MNV 基因保守区域 5018-5450 设计荧光定量 PCR 引物序列, 建立快速、灵敏、高效的实时荧光定量 PCR 方法, 用于普查重庆市各单位实验小鼠 MNV 的感染情况, 同时有针对性地选取使用最广泛的免疫缺陷小鼠 BABL/c-nu 作为研究对象, 观察自然感染 MNV 30 d、60 d 后小鼠免疫功能的变化, 以评估 MNV 感染对动物实验的可能影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及环境 送检的 SPF 级小鼠、BALB/c-nu 小鼠[生产许可证号:SCXK(京)2014-0004]。实验动物使用许可证号:SYXK(渝)2018-0003。本研究符合重庆医科大学伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 病毒、载体及检测样本 小鼠诺如病毒(MNV)、小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus,JHM)、仙台病毒(Sendai virus,SV)、小鼠肺炎病毒(pneumonia virus of mice,PVM)、小鼠脑脊髓炎病毒(Theiler's murine encephalomyelitis virus,TMEV)均由广东省实验动物监测所惠赠。pMD19-T simple vector 质粒标准品委托宝生物工程(大连)有限公司合成。样本来源于重庆各单位送检的活体小鼠,在无菌条件下采集活体小鼠的盲肠内容物,-80℃保存待用。

1.1.3 主要试剂及仪器 TRIzol 提取试剂盒(Invitrogen,英国),RNA 逆转录试剂盒(Bio-Rad iScript cDNA Synthesis Kit,美国),SYBR Green supermix 荧光染料(Bio-Rad,美国),ELISA 试剂盒(武汉基因美科技有限公司,JYM0540Mo),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad CFX96,美国),酶标仪(EPOCH,BioTek,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 MNV 引物设计 根据 GenBank 中收录的 MNV 全基因组序列(序列号为 KM 458057.1),选择 5018-5450 基因保守区域,采用 Primer5.0 PCR 引物设计软件,并使用 Genbank 的 Blast 软件与 NCBI 数据库的其他 MNV 毒株序列进行比较,保证引物的通用性和特异性,设计扩增引物 5 对,从扩增效率、特异性、灵敏度等方面分析,选择最佳引物。MNV-F:5'-CGGGCAAATTAACCAAAT-3';MNV-R:5'-CGAGGTGAAATGGAAAC-3',扩增大小为 81 bp,引物序列由上海生工生物有限公司合成。

1.2.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及反应条件优化 SYBR Green Supermix 试剂盒操作说明,通过分析扩增效率、熔解曲线,优化荧光定量 PCR 反应体系中的模板、引物、PCR Mix 浓度,确定的最佳反应体系见表 1。最佳反应条件为:95℃预变性 3 min;然后 95℃20 s,57℃30 s,共 40 个循环,在每个循环延伸结束时采集荧光信号,最后进行扩增曲线和熔解曲线分析。

表 1 MNV 荧光定量 PCR 反应体系

反应体系	体积(μL)
SYBR Green supermix(2×)	10.0
PCR 上游引物(10 μmol/L)	0.4
PCR 下游引物(10 μmol/L)	0.4
DNA 模板	2.0
无酶水	7.2
总体积	20.0

1.2.3 MNV 质粒标准品的制备 将 MNV BJ10-2062 基因保守区域(5018-5450 nt)接至 pMD19-T simple vector 构建标准阳性质控品,该片段包含引物所要扩增的片段并可进行熔解曲线分析。将重组质粒转染至大肠杆菌 DH5α,用含有 Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆,测序鉴定。用质粒提取试剂盒提取质粒,分光光度计测定质粒的浓度和纯度,根据公式计算 MNV 病毒质粒的拷贝数。拷贝数(copies/μL)=(6.02×10²³)×DNA 浓度(g/μL)/(DNA length×660),DNA Length=载体序列碱基数+插入序列碱基数,质粒稀释至 1.0×10⁹ copies/μL,分装保存于-20℃。

1.2.4 病毒核酸的提取 无菌获取小鼠盲肠内容物或粪便置于组织匀浆管中,加适量预冷 PBS,漩涡震荡,匀浆,将内容物悬液 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液转移至新 EP 管中,参照 Trizol(Invitrogen 公司)操作说明书提取病毒 RNA,逆转录后以 cDNA 为模板检测 MNV。

1.2.5 BALB/c-nu 小鼠 MNV 的自然感染 收集经检测判定为感染 MNV 阳性的小鼠生活垫料,转移到 BALB/c-nu 小鼠笼盒中,每天收集小鼠新鲜粪便,采用 RT-PCR 方法检测小鼠是否成功感染 MNV,从感染成功的第 1 天开始计算,分别于自然感染 30 d 和 60 d,收集小鼠的血清及各脏器组织,一部分组织于 4%多聚甲醛中固定,通过 HE 染色观察感染小鼠肝、肺、脾、结肠组织的病理变化;另一部分的脾脏、结肠经 PBS 洗净擦干水分后,分别称取 50 mg,按照 1:9 的比例加入 450 μL PBS 进行组织匀浆,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于-20℃保存待用。ELISA 方法检测血清、脾和结肠组织匀浆中 TNF-α、IFN-γ 的含量。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,率的比较采用卡方检验进行分析,符合正态分布且方差齐的计量资料用均数±标准差表示,采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 法,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 小鼠 MNV 实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立及验证

采用本实验室建立的实时荧光定量 PCR 方法对小鼠 MNV、JHM、TMEV、SV 及 PVM 的 RNA 进行检测,结果如图 1 所示:MNV 具有明显的 S 型扩增曲线,其他病毒均无扩增,表明建立的实时荧光定量 PCR 方法具有良好的特异性。随后利用质粒标准品为模板,检测该方法的灵敏度,结果如图 2 所示:构建的荧光定量标准曲线 Ct 值与模板浓度呈良好的线性关系,线性相关性高,最低检测限度达到 10 copies/μL,定量结果有效、可靠。对 3 份 10 倍系列稀释的 MNV 阳性标准品(1.0×10⁶~1.0×10⁴)进行 6 次试验内和 4 次试验间重复,结果见表 2;批间及批内 Ct 值变异系数均小于 2%,表明方法精密度高,具有良好的重复性和稳定性。

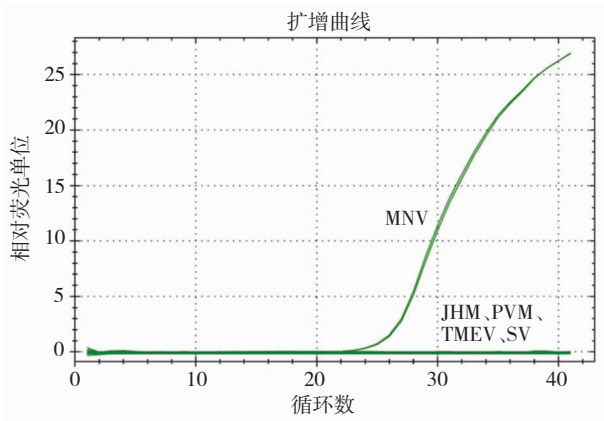
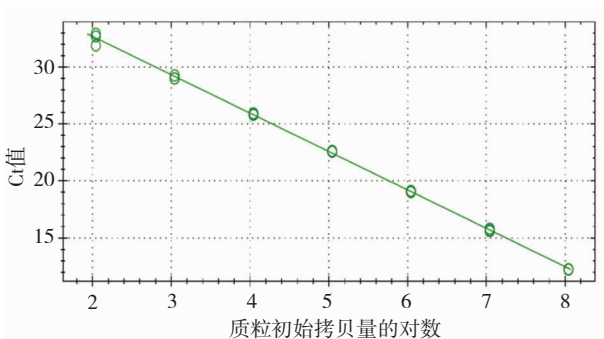


图 1 MNV 荧光定量 RT-PCR 特异性检测



注:10 倍系列稀释质粒标准品的标准曲线: $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/ μ L 质粒标准品

图 2 MNV 荧光定量 RT-PCR 灵敏性检测

表 2 MNV 荧光定量 RT-PCR 重复性和稳定性检测

重复性	标准质粒 (copies/ μ L)	C_t 值		
		平均值	标准差	变异系数 (%)
试验内 (n=6)	10^6	18.19	0.66	0.36
	10^5	21.60	0.10	0.44
	10^4	24.18	0.10	0.41
	10^6	18.28	0.12	0.67
试验间 (n=3)	10^5	21.84	0.08	0.35
	10^4	24.20	0.40	1.61

应用所建立的实时荧光定量 PCR 方法,对 123 份小鼠盲肠内容物样品,与广东省实验动物监测所和中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所开展比对检测。结果显示:本方法的阳性检出率为 81.3%(100/123),其他两家单位的阳性样本检出率分别为 79.67%(98/123)和 82.9%(102/123),吻合率达 98%,进一步证明该方法准确、可靠,可用于本地区 MNV 的日常监测。

2.2 不同肠道排泄物样品中 MNV 检出情况的比较

研究表明粪便或盲肠内容物是较好的 MNV 检测样本。然而,小鼠 MNV 在排出体外的粪便中能维持多久的病毒活性,能否被 PCR 方法准确检出则未见报道。本研究选择小鼠盲肠内容物、新鲜粪便及排出体外 24 h 的陈旧粪便进行 MNV

的实时荧光定量 PCR 方法检测,结果见表 3:新鲜粪便与盲肠内容物中 MNV 的检出结果完全一致;排出体外 24 h 陈旧粪便中的 MNV 也能被 RT-PCR 方法检出,能准确反映出该笼小鼠 MNV 的感染情况。提示 MNV 在小鼠粪便中至少能保持 24 h 的病毒活性,具有较强的环境稳定性,不易降解,是日常监测 MNV 的最佳选材。

表 3 小鼠盲肠内容物、新鲜粪便及陈旧粪便中 MNV 检出情况比较

组别	小鼠编号	盲肠内容物 检测 MNV	新鲜粪便检 测 MNV	排出 24 h 粪便 检测 MNV
A 笼	1	+	+	+
	2	-	-	-
	3	+	+	+
	4	+	+	+
B 笼	5	+	+	+
	6	+	+	+
	7	+	+	+
	8	-	-	-
C 笼	9	-	-	-
	10	-	-	-
	11	-	-	-
	12	-	-	-
D 笼	13	+	+	+
	14	-	-	-
	15	+	+	+
	16	+	+	+
E 笼	17	+	+	+
	18	-	-	-
	19	+	+	+
	20	+	+	+

2.3 重庆市实验小鼠 MNV 感染情况普查

对重庆市 3 家单位送检的实验小鼠,采用本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法检测 MNV 的感染情况。结果显示,3 家送检单位小鼠 MNV 的感染率分别为 65.1%(84/129)、88.7%(71/80)和 85.0%(102/120),提示重庆地区小鼠 MNV 感染率较高。进一步利用新鲜粪便对重庆市封闭群和近交系小鼠 MNV 感染情况进行比较,发现封闭群和近交系小鼠 MNV 阳性感染率分别为 68.3%(54/80)和 70.6%(56/80),卡方检验显示两者 MNV 感染率无统计学差异($\chi^2=0.116, P=0.733$),表明 MNV 的感染无品系特异性。

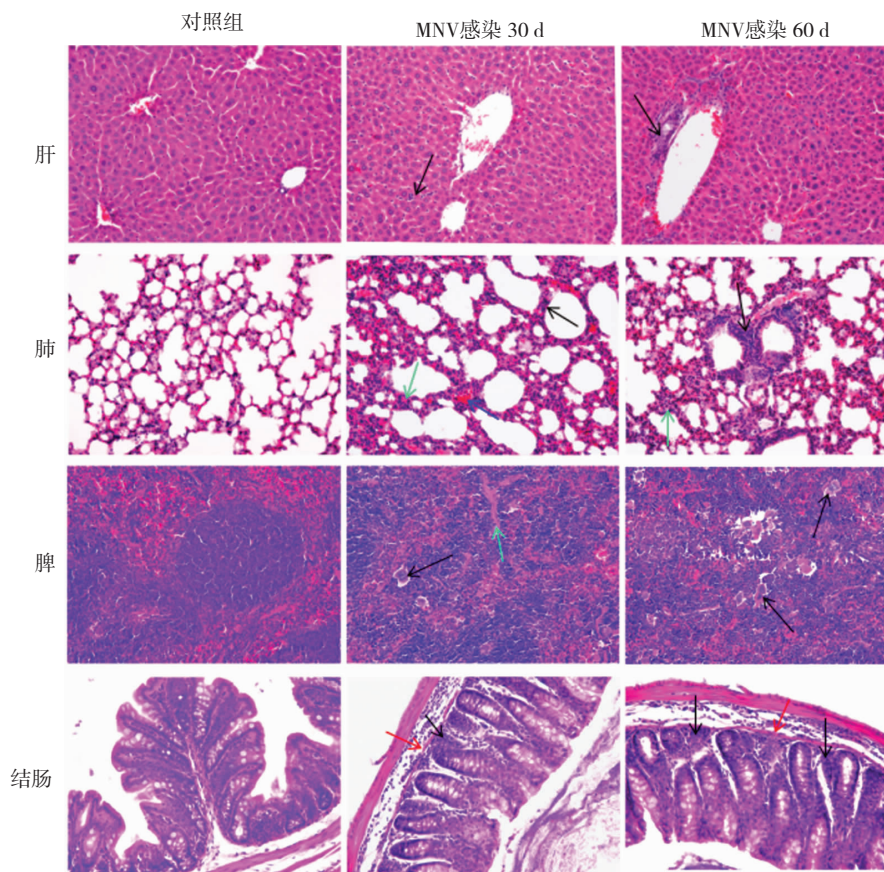
目前,基因修饰小鼠已成为研究使用最为广泛的一类实验动物。本研究收集了重庆市的基因修饰小鼠和普通小鼠排出 24 h 的陈旧粪便进行 MNV 检测。结果显示:基因修饰小鼠 MNV 阳性检出率高达 78%(124/159),非基因修饰小鼠 MNV 阳性检出率仅为 64%(73/114),卡方检验显示基因修饰小鼠 MNV 阳性感染率明显高于普通小鼠($\chi^2=6.434, P=0.011$),表明基因修饰小鼠比普通小鼠更容易感染 MNV。

2.4 BABL/c-nu 小鼠感染 MNV 后免疫功能的变化

不同的免疫缺陷小鼠感染 MNV 后其症状存在差异,为探究免疫缺陷小鼠自然感染 MNV 后免疫功能是否发生改变,本研究对自然感染 MNV 30 d 和 60 d 的 BABL/c-nu 小鼠进行组织学和血清学检测。HE 染色结果如图 3 所示:小鼠感染 MNV 后,肝、肺、脾及结肠组织都出现明显的炎症反应。肝脏组织可见明显的炎症细胞浸润;肺组织中肺泡壁轻微增厚,间质可见明显充血,组织出现明显炎症细胞浸润;脾脏组

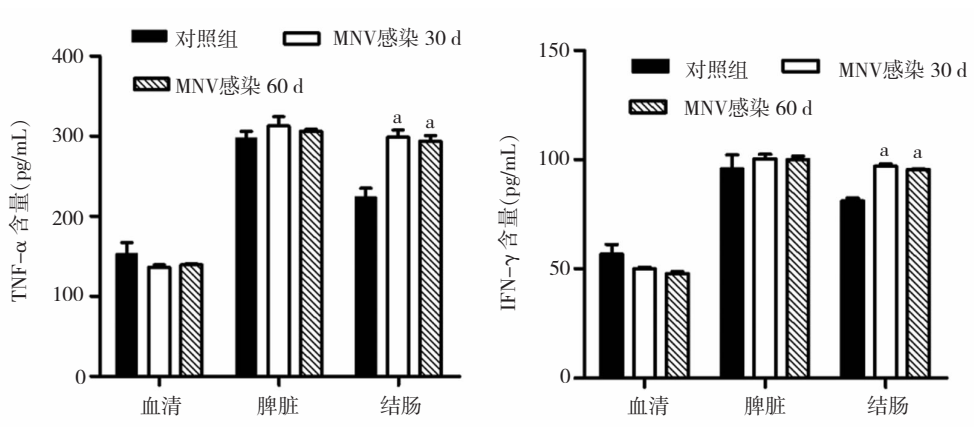
织整体结构正常,但脾小结轮廓不清,红髓白髓界限不明,组织中可见结缔组织增多,大量中性粒细胞浸润;结肠组织整体结构基本正常,肠绒毛排列较整齐,但黏膜层可见大量炎症细胞浸润,黏膜下层发生轻微水肿现象。

ELISA 检测结果(图 4)显示:感染小鼠血清及脾脏中 TNF- α 、IFN- γ 的水平与对照组均无明显差异($P>0.05$),但结肠的 TNF- α 、IFN- γ 水平均明显高于对照组[TNF- α : $F=21.682$, $P=0.001$ (30 d), $P=0.002$ (60 d); IFN- γ : $F=77.223$, $P=0.000$ (30 d), $P=0.000$ (60 d)]。



注:黑色箭头表示炎症细胞浸润;绿色箭头表示肺泡壁增厚;蓝色箭头表示肺泡间质充血;红色箭头表示肠黏膜下层水肿

图3 感染 MNV 的 BABL/c-nu 小鼠肝、肺、脾、结肠组织病理学改变 (HE 染色, 200 $\times$)



注:a,与对照组比较, $P<0.01$

图4 ELISA 检测 BABL/c-nu 小鼠感染 MNV30 d 和 60 d 后血清、脾脏、结肠中的 TNF- α 及 IFN- γ 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

自 2003 年 Krist^[3]首次在小鼠体内发现 MNV 以来,世界各地关于小鼠 MNV 的感染陆续被报道。研究发现,MNV 是小鼠中传播最广泛的病毒之一。2003 至 2005 年的报告显示,20% 以上的血清样本含鼠诺如病毒抗体;2011 年,欧洲采用 PCR 和血清学检测方法对实验小鼠进行检测,结果显示 MNV 感染率高达 58%~64%^[12-13]。MNV 已被国际上的一些实验动物权威监管和检测机构列为实验小鼠的常规必检项目,然而我国实验动物的发展起步较晚,目前的国家标准(2011 版)并没有将 MNV 列为检测对象。

MNV 传统的检测方法主要是血清学抗体检测。目前,实时荧光定量 RT-PCR 逐渐成为小鼠 MNV 检测方法中灵敏度、准确度最高的检测方法之一^[14-15]。该方法可直接检测小鼠粪便、盲肠内容物等样本,具有操作简便、实验周期短、可直接读取数据等优点。因此,国内实验动物发展较好的省市,如广东、北京、上海和江苏,已逐步建立适合自身情况的实时荧光定量 RT-PCR 方法,用于小鼠 MNV 的检测。为进一步提高重庆市实验小鼠质量,便于与国内发达省市开展合作研究并与国际接轨,重庆市亟需建立小鼠 MNV 检测的相关标准。因此,本研究旨在建立适用于本地区的一种快速、灵敏的实时荧光定量 RT-PCR 方法,应用于重庆市小鼠 MNV 的普查和日常监测,并探究免疫缺陷小鼠感染 MNV 后其免疫功能的变化,为实验动物 MNV 感染防控提供理论依据和参考。

本研究选择 MNV 高度保守区域为靶基因设计引物,所建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法特异性强,不与同种属其他病毒产生非特异性反应;线性范围广,灵敏度高;批间及批内试验 Ct 值变异系数均小于 2%,表明其重复性和稳定性好,可用于 MNV 核酸的定量检测。将所建立的实时荧光定量 PCR 方法应用于重庆市 SPF 级小鼠 123 份盲肠内容物样品检测,并与广东省实验动物监测所和中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所的检测进行比对,检测结果吻合度高达 98%,证明本研究所建立的实时荧光定量 PCR 方法良好,检测结果可靠。

研究表明 MNV 感染小鼠后,在粪便和小鼠盲肠中阳性检出率高于其他脏器,提示粪便或盲肠内容物是较好的 MNV 检测样本。在进行实验动物的微生物检测时,如果以粪便作为检测对象,可以进行动物的活体检测,避免未带毒动物被处死。然而 MNV 在小鼠排出体外的粪便中能维持多久的病毒活性,能否被 PCR 方法准确检出并未见报道。本研究分别取每笼小鼠排出 24 h 的陈旧粪便、抓取小鼠应激产生的新鲜粪便和盲肠内容物进行比较检测,结果显示:新鲜粪便与小鼠盲肠内容物 MNV 阳性检出情况完全一致,24 h 的陈旧粪便也能准确反映出该笼小鼠 MNV 的感染情况。因此,在日常的 MNV 监测中,各实验动物单位只需在换笼过夜后的小鼠笼盒中拾取粪便即可进行 MNV 的检测,操作方便快捷,且不需处死动物。

通过对重庆市实验小鼠的调查发现,SPF 级小鼠具有较高的感染率,且感染多呈集中趋势,同一个饲养区域的小鼠多数呈现相同的检测结果,其原因可能与 MNV 传播途径及持续性感染有关。小鼠感染 MNV 后主要经粪口途径传播,也有研究报道 MNV 可经过空气进行传播^[14,16],因此生活在相同饲养间的小鼠会互相感染 MNV。此外,各屏障设施中的封闭群和近交系小鼠 MNV 的阳性感染率无统计学差异,表明 MNV 的感染无品系特异性。随着国家对科技投入的加大和国际学术交流的增多,基因修饰小鼠的科研应用越来越普遍。近年来,从国外引进、在国内各单位实验动物中心保存的基因修饰小鼠的品种和数量逐年上升,截至 2018 年 12 月,重庆市拥有基因修饰小鼠的品种超过 200 个,每年繁殖生产和使用的数量超过 2.0 万只。为探究重庆市基因修饰小鼠 MNV 的感染情况,本研究抽检了 126 种共 159 笼基因修饰小鼠,发现其 MNV 阳性检出率高达 78%,而非基因修饰小鼠 MNV 阳性检出率为 64%。两者的阳性感染率具有明显的统计学差异,表明基因修饰小鼠相较普通小鼠更容易感染 MNV,原因可能是由于小鼠正常基因发生改变后,机体的免疫活性下降,导致抗病毒能力减弱,从而更容易感染 MNV。

免疫活性小鼠和大多数免疫缺陷小鼠感染 MNV 后,通常无临床症状和明显的病理变化^[5,17],但可能会对实验结果产生影响^[6-7],然而具体哪些品系

的免疫缺陷鼠会受 MNV 影响,以及感染 MNV 后对哪些实验结果造成影响则未见报道。本研究选择最常用的 BABL/c-nu 小鼠为观察对象,研究 MNV 感染对主要脏器及机体免疫的影响。实验发现,BABL/c-nu 小鼠感染 MNV 后,肝、肺、脾及结肠组织中可见明显的炎症细胞浸润,出现不同程度的炎症反应和组织病理变化,且结肠组织的免疫调节因子 TNF- α 和 IFN- γ 的水平明显高于正常小鼠,而外周血清及脾脏组织匀浆中的免疫调节因子并未发生改变。TNF- α 是一类重要的促炎症因子和免疫调节因子,IFN- γ 具有抗病毒、免疫调节特性。MNV 感染对机体的免疫,尤其是对肠道的炎症影响较大,因此,在免疫缺陷小鼠的实验研究中,要严格控制 MNV 感染,提高小鼠的质量,同时加强动物饲养环境的控制。

综上所述,本研究建立了快速、特异、灵敏的实时荧光定量 RT-PCR 方法,成功应用于重庆市实验小鼠 MNV 的普查,发现重庆地区小鼠的 MNV 感染率较高,且在封闭群和近交系小鼠无明显性差异,但基因修饰小鼠较非基因修饰小鼠有更高的感染率。同时,证实了 24 h 的陈旧粪便能准确反映该笼小鼠 MNV 的感染情况,为 MNV 的日常监测采样提供了方便。此外,BABL/c-nu 感染 MNV 后,主要脏器出现炎性病理改变,且结肠组织的 TNF- α 和 IFN- γ 水平明显升高。尽管 MNV 多为隐性感染,且目前实验动物微生物控制的国家标准中,没有把 MNV 列入检测对象,但 MNV 感染对动物尤其是免疫缺陷动物的免疫功能造成明显的影响。因此,各实验动物单位应该重视 MNV 的传播和防控,加强实验动物的饲养管理,降低实验动物感染 MNV 的风险。

参 考 文 献

- [1] Van Winkle JA, Robinson BA, Peters AM, et al. Persistence of systemic murine Norovirus is maintained by inflammatory recruitment of susceptible myeloid cells[J]. Cell Host Microbe, 2018, 24(5): 665–676.e4.
- [2] Aybeke EN, Belliot G, Lemaire-Ewing S, et al. HS-AFM and SERS analysis of murine Norovirus infection; involvement of the lipid rafts[J]. Small, 2017, 13(1): 1600918.
- [3] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a norwalk-like virus[J]. Science, 2003, 299(5612): 1575–1578.
- [4] Henderson KS. Murine Norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice[J]. Lab Animal (NY), 2008, 37(7): 314–320.
- [5] Fischer AE, Wu SK, Proescher JB, et al. A high-throughput drop microfluidic system for virus culture and analysis[J]. J Virol Methods, 2015, 213: 111–117.
- [6] Lencioni KC, Seamons A, Treuting PM, et al. Murine Norovirus; an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease[J]. Comp Med, 2008, 58(6): 522–533.
- [7] Paik J, Fierce Y, Drivdahl R, et al. Effects of murine Norovirus infection on a mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance[J]. Comp Med, 2010, 60(3): 189–195.
- [8] 袁文, 张钰, 刘忠华, 等. 广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 78–82.
- [9] 向丹丹. RT-PCR 检测实验小鼠自然和实验感染鼠诺如克病毒及病毒分离[D]. 上海: 东华大学, 2013.
- [10] Xiang Z, Tian S, Tong W, et al. MNV primarily surveillance by a recombination VP1-derived ELISA in Beijing area in China[J]. J Immunol Methods, 2014, 408: 70–77.
- [11] 袁文, 王静, 赵维波, 等. 结合内标的小鼠诺如病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 49–56.
- [12] Mähler M, Köhl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and Mycoplasma pulmonis in laboratory mice and rats in western Europe[J]. Lab Anim (NY), 2009, 38(5): 161–165.
- [13] Ohsuqi T, Matsuura K, Kawabe S, et al. Natural infection of murine Norovirus in conventional and specific pathogen-free laboratory mice[J]. Front Microbiol, 2013, 4: 12.
- [14] Kitajima M, Oka T, Takagi H, et al. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine Noroviruses[J]. J Virol Methods, 2010, 169(2): 269–273.
- [15] Hanaki K, Ike F, Kajita A, et al. A broadly reactive one-step SYBR green I real-time RT-PCR assay for rapid detection of murine Norovirus[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e98108.
- [16] Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine Norovirus; a model system to study Norovirus biology and pathogenesis[J]. J Virol, 2006, 80(11): 5104–5112.
- [17] Mumphy SM, Changotra H, Moore TN, et al. Murine Norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses[J]. J Virol, 2007, 81(7): 3251–3263.

(责任编辑:唐秋姗)