

巨细胞病毒宫内感染对子代豚鼠学习记忆的影响研究

乔 媛 刘 静 肖 娟 刘 涛 李家福 张元珍 陈素华

摘 要 **目的** 观察巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 宫内感染对子代豚鼠学习记忆的影响。**方法** PCR 法筛选 CMV DNA 阴性豚鼠,雌雄合笼受孕;孕龄 1~20 天时,感染组腹腔内接种 CMV 病毒悬液,对照组接种生理盐水,足月分娩的子代豚鼠分别喂养至 3 月龄和 6 月龄,应用 Morris 水迷宫实验检测学习记忆能力,观察大脑海马组织神经元细胞的形态。**结果** 感染组与对照组相比,子代豚鼠的学习记忆能力明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);感染组的海马组织神经元细胞结构层次紊乱,出现变性、灶性坏死及凋亡等病理改变。**结论** CMV 宫内感染可以导致子代学习记忆能力的下降。

关键词 巨细胞病毒 宫内感染 豚鼠 学习记忆

中图分类号 R714.53

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.017

Effect of Learning and Memory Ability in the Descendant Guinea Pig with Cytomegalovirus Intrauterine Infection Qiao Yuan, Liu Jing, Xiao Juan, et al. Department Obstetrics and Gynecology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei 430071 China

Abstract **Objective** To study the learning and memory of the descendant guinea pig with cytomegalovirus (CMV) intrauterine infection. **Methods** These female and male guinea pigs without CMV - infected identified by PCR were chosen in this study. The pregnancy was observed after each mating. CMV was injected into abdominal cavity to create CMV intrauterine infection model in gestational age from one to twenty, and saline was injected in control group. These full term offspring were fed for 3 months or 6 months respectively. The learning and memory ability was measured by Morris water maze. The changes of modality and apoptosis of hippocampal neurons were observed with light microscope. **Results** The learning and memory ability of guinea pigs in CMV - infected group was much lower than those in the control group ($P < 0.01$). In CMV - infected group, the layers of hippocampal neurons were confused, and pathologic changes were seen clearly such as degeneration, focal necrosis and apoptotic. **Conclusion** CMV intrauterine infection could decrease the ability of learning and memory of descendant.

Key words Cytomegalovirus; Intrauterine infection; Guinea pig; Learning and memory

巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 属于疱疹病毒 β 亚科,可通过胎盘引起宫内传播,造成新生儿神经系统发育落后,并呈渐进性恶化,是人类学习记忆能力下降的第 2 位原因^[1, 2]。研究表明,CMV 宫内感染儿 3~30 月龄智力发育指数显著落后,5.5~6.5 岁智力迟缓率约为 20%^[3, 4]。CMV 宫内感染儿的神经系统后遗症具有迟发型,出生时无明显临床症状,多被忽视。目前,CMV 宫内感染导致学习记忆能力下降的具体机制尚不清楚。

学习记忆能力是人类神经系统所具有的基本功

能,大脑海马组织是学习记忆能力的结构基础。为此,本研究通过建立豚鼠 CMV 宫内感染动物模型,初步体内探索 CMV 宫内感染对子代学习记忆的影响,报道如下。

材料与方法

1. 病毒与细胞:豚鼠巨细胞病毒 (guinea pig cytomegalovirus, GPCMV) 标准株 22122 和豚鼠胚肺细胞株均购于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。细胞和病毒按常规方法在医学科学研究中心培养传代,病毒半数组织培养感染量 (tissue culture infectious dose, TCID₅₀) 为 $10^{-4.78}$ 。人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) AD 169 毒株由湖北省病毒研究所提供。

2. 实验动物与分组:6 月龄左右 (体重 450 ± 25 g) 的 60 只雌性及 15 只雄性 Hartley 豚鼠,购于湖北省医学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK (鄂)

基金项目:武汉大学青年教师基金资助项目 (2042015kf0154)

作者单位:430071 武汉大学中南医院妇产科 (乔媛、李家福、张元珍);430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科 (刘静、肖娟、陈素华);271000 泰安市中心医院妇产科 (刘涛)

通讯作者:乔媛,电子信箱:qiaoyuan_505@hotmail.com

2010-0008,饲养于动物实验中心 SPF 级动物房。所有实验动物的操作及饲养均符合《The Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals》的规定。应用 PCR 法检测豚鼠外周血的 GPCMV DNA, DNA 阴性者列为研究对象。将雌雄豚鼠按4:1比例合笼,次日晨检查雌豚鼠,阴道分泌物涂片检测精子,以发现精子之日确定为受孕第0天。随机选择孕早期(孕龄1~20天)豚鼠分为两组:感染组25只,每只腹腔内接种 GPCMV 病毒悬液(1×10^7 TCID₅₀) 1ml,应用 PCR 法检测足月分娩的子代豚鼠外周血的 GPCMV DNA, DNA 阳性者再分为两亚组(每组30只),分别喂养至3月龄和6月龄,进行后续试验;对照组25只,每只腹腔内接种生理盐水1ml,分组及方法同感染组^[5]。

3. 主要试剂及仪器:Morris 水迷宫动物行为学分析系统(购自上海移数信息科技有限公司);尼氏(Nissl)染色液购自(上海碧云天生物技术公司);一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)购自上海(碧云天生物技术公司);其他试剂购自(武汉谷歌生物科技有限公司)。

4. 方法:PCR 法检测子代豚鼠外周血及脑组织中的 GPCMV DNA;根据参考文献[6]设计引物序列,应用 Prime 6.0 软件进行分析,由上海生工生物工程公司合成。每次扩增均设阴性对照组(HCMV AD169)和阳性对照组(GPCMV 培养上清液)。

5. Morris 水迷宫实验检测子代豚鼠的学习记忆能力,分为两部分^[7]:(空间记忆采集实验(acquisition trial)提前半小时将各组豚鼠置于房间,并以半随机(semi-random)方式选择入水点。实验者用手托起豚鼠,使其面向池壁,从池边4个固定点入水,并同步操作 Morris 软件,记录其运动轨迹。每只豚鼠训练4次/天,共6天。若豚鼠在60s内寻找到平台,记录其搜索及爬上平台所用的时间,即潜伏期;若其未在60s内找到平台,由实验者将其引导至平台,潜伏期记为60s。豚鼠爬上平台后,停留30s以便于其进行空间学习和记忆,并减少紧张感。计算各组豚鼠的潜伏期,游泳总路程,平均游泳速度及目标象限滞留时间/总时间;空间探索实验(retention trial)第7天撤除平台后,将豚鼠置入随机选择的一个入水点60s,计算各组豚鼠的平台穿越次数,总路程,平均游泳速度及目标象限滞留时间/总时间。每次实验结束后,用加热器烘干小鼠。

6. 观察组织形态学:Morris 水迷宫实验结束后,

处死各组豚鼠并无菌采集脑组织,分离出海马组织,立即置于4%多聚甲醛内固定。常规脱水包埋,连续冠状切片,片厚5 μ m。Nissl 法染色,中性树脂封片。光镜下观察各组豚鼠海马组织的神经细胞。

7. 观察细胞凋亡:运用 TUNEL 法处理各组豚鼠海马组织切片,细胞核呈现绿色荧光为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片随机选取5个高倍视野,观察凋亡细胞。

8. 统计学方法:应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 妊娠结局:感染组中,25只豚鼠在接种 CMV 后出现了不同程度的感染征象,如饮食减少、睡眠增多、体重下降、皮毛逆立、烦躁等,其中,21只豚鼠血液中检出 CMV-DNA(阳性率84%),2只豚鼠于接种病毒后第9天死亡;DNA 阳性豚鼠共分娩了83只子代,其中,72只为足月活产并存活至实验结束(存活率86.74%),70只血液及脑组织中均检出 CMV-DNA(阳性率97.22%)。对照组中,25只豚鼠未出现异常改变,共分娩了93只子代,其中,90只存活至实验结束,血液及脑组织中均未检出 CMV-DNA。提示豚鼠 CMV 宫内感染模型成功建立。

2. Morris 水迷宫实验检测结果:(1)空间记忆采集:随着实验时间的增加,各组豚鼠的潜伏期都逐渐减少;感染3月龄组(图1A)及6月龄组(图1B)的潜伏期均长于相应的对照组,两组间的差异有统计学意义($P < 0.01$);与相应的对照组相比,感染3月龄组(图2A)及6月龄组(图2B)的总路程显著增加($P < 0.01$),平均游泳速度也明显减慢(图3, $P < 0.05$);感染3月龄组(图4A)及6月龄组(图4B)的目标象限滞留时间占总时间百分比低于相应的对照组,两组间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。(2)空间探索实验:感染3月龄组(图5A)及6月龄组(图6A)的平台穿越次数多于相应的对照组($P < 0.01$),总路程也明显增加(图5B、图6B, $P < 0.01$),而平均游泳速度明显减慢(图5C、图6C, $P < 0.01$),两组间的差异有统计学意义;与相应的对照组相比,感染3月龄组(图5D)及6月龄组(图6D)的目标象限滞留时间占总时间百分比明显增加,两组间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。

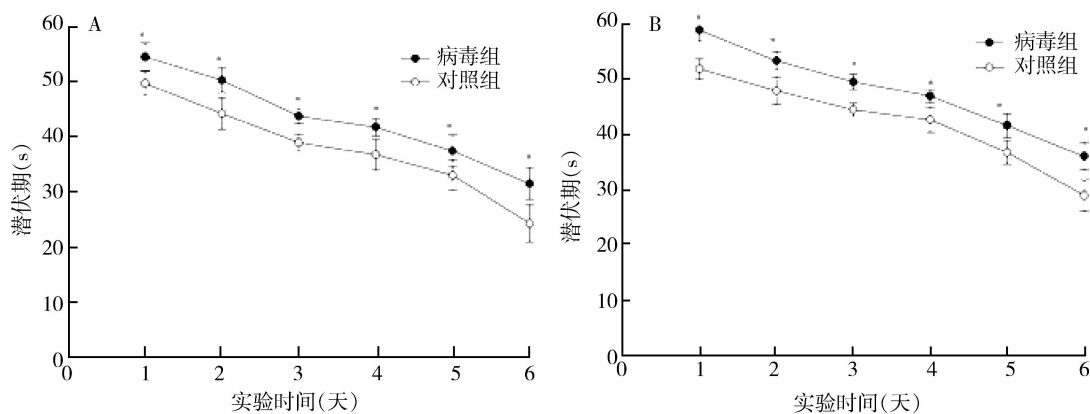


图1 CMV宫内感染对子代豚鼠潜伏期的影响

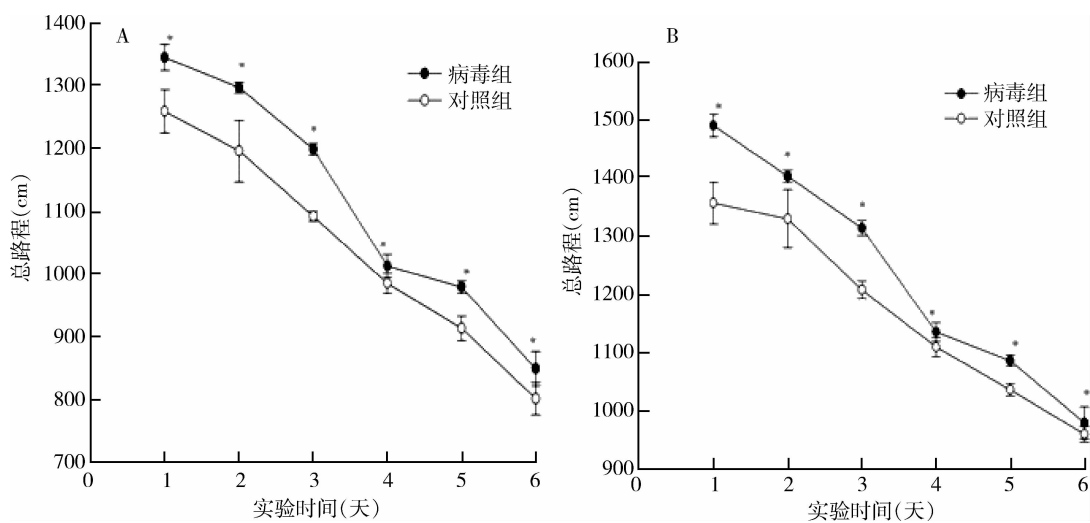
A. 3月龄组; B. 6月龄组; 与对照组相比, * $P < 0.01$ 

图2 CMV宫内感染对子代豚鼠总路程的影响

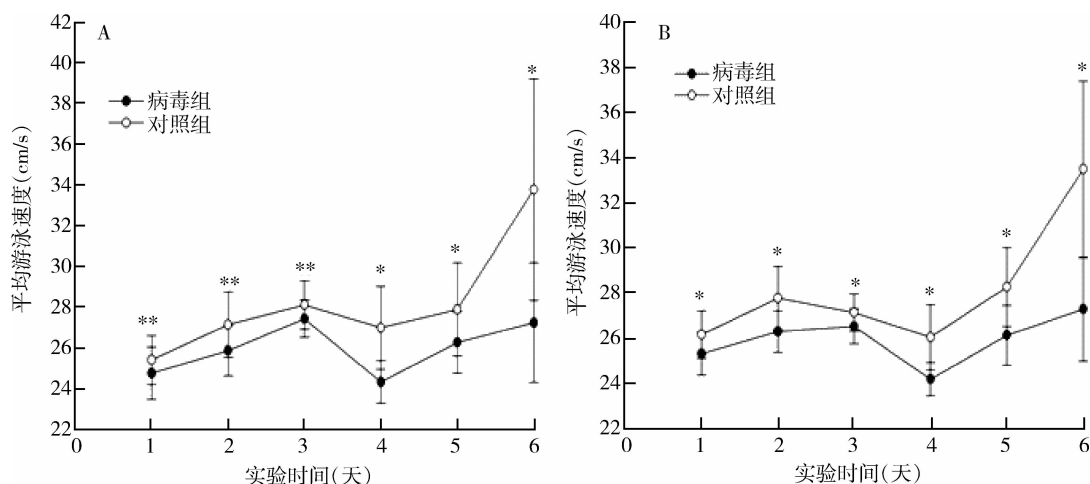
A. 3月龄组; B. 6月龄组; 与对照组相比, * $P < 0.01$ 

图3 CMV宫内感染对子代豚鼠平均游泳速度的影响

A. 3月龄组; B. 6月龄组; 与对照组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

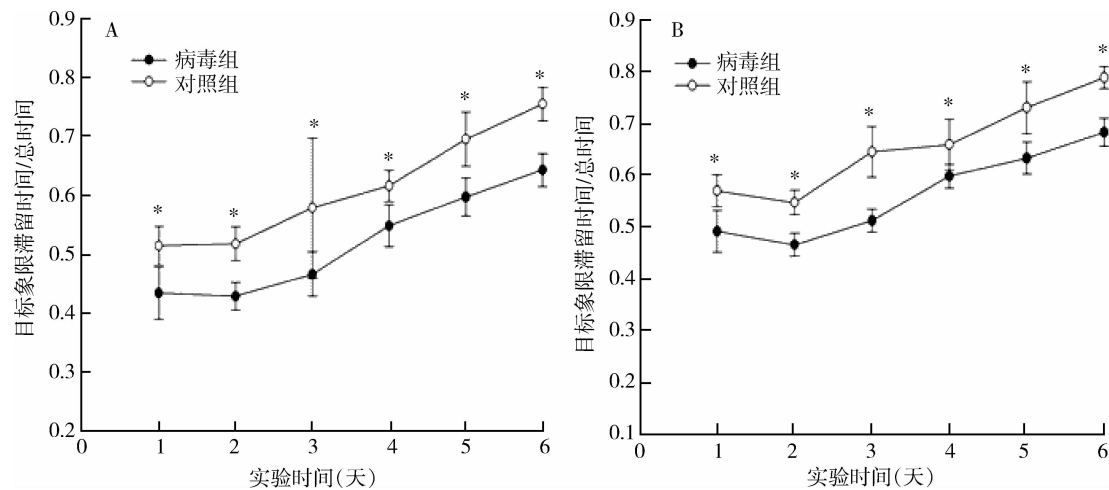


图4 CMV宫内感染对子代豚鼠目标象限滞留时间占总时间百分比的影响
A. 3月龄组; B. 6月龄组; 与对照组相比, * $P < 0.01$

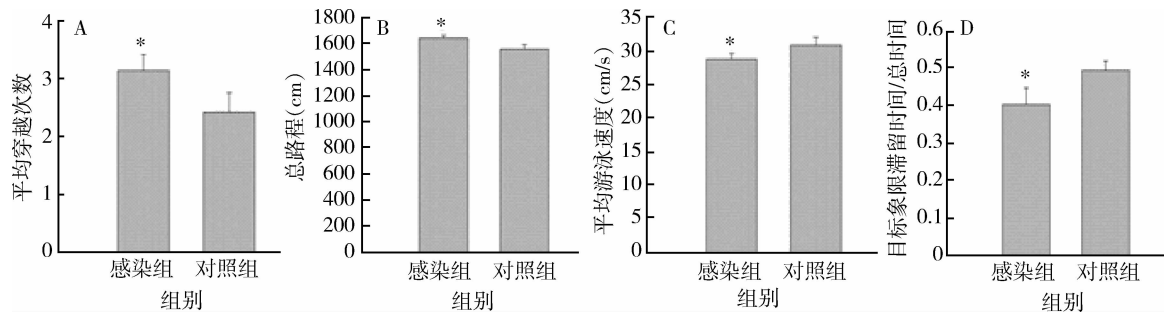


图5 CMV宫内感染对3月龄子代豚鼠空间探索的影响
A. 平台穿越次数; B. 总路程; C. 平均游泳速度; D. 目标象限滞留时间占总时间百分比; 与对照组相比, * $P < 0.01$

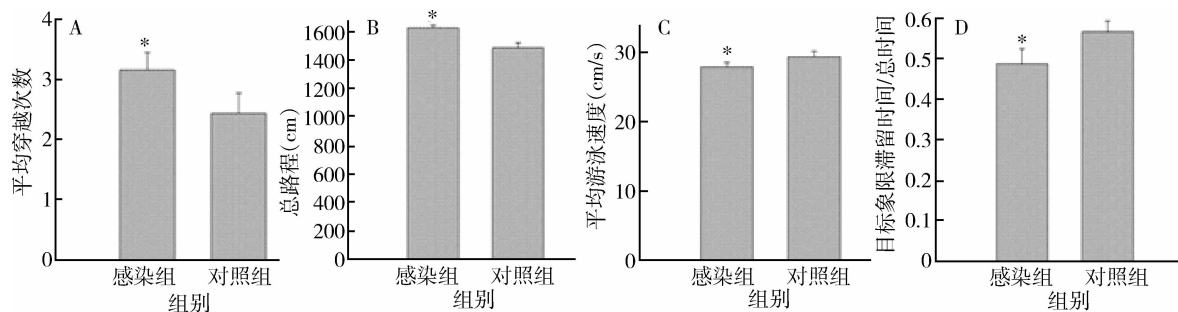


图6 巨细胞病毒宫内感染对6月龄子代豚鼠空间探索的影响
A. 平台穿越次数; B. 总路程; C. 平均游泳速度; D. 目标象限滞留时间占总时间百分比; 与对照组相比, * $P < 0.01$

3. Nissl 法染色结果:光镜下,对照 3 月龄组(图 7B)及 6 月龄组(图 7D)的豚鼠海马组织神经元层次清楚,细胞排列整齐,结构完整,形态正常,尼氏小体清楚;感染 3 月龄组的豚鼠海马组织神经元细胞排列疏松,数目减少,尼氏小体数量减少(图 7A),而感染 6 月龄组豚鼠的海马组织神经元结构层次更加紊

乱,大部分神经元出现变性、灶性坏死及血管周围炎性细胞浸润(图 7C)。
4. 神经细胞凋亡:各组豚鼠海马组织染色后,胞核呈绿色荧光,表明凋亡细胞存在。如图 8 所示,与相应的对照组相比,感染 3 月龄组及 6 月龄组的豚鼠海马神经元凋亡细胞明显增多。

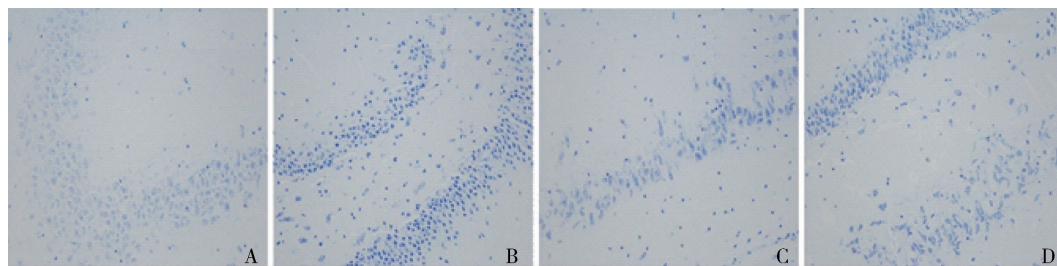


图7 CMV 宫内感染对子代豚鼠海马组织神经元形态的影响 (Nissl 法, $\times 200$)

A. 3 月龄感染组; B. 3 月龄对照组; C. 6 月龄感染组; D. 6 月龄对照组

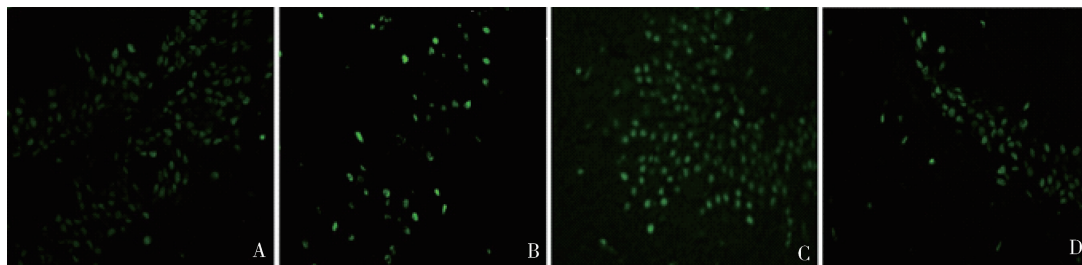


图8 巨细胞病毒宫内感染对子代豚鼠海马组织神经元凋亡的影响 (TUNEL 法, $\times 400$)

A. 3 月龄感染组; B. 3 月龄对照组; C. 6 月龄感染组; D. 6 月龄对照组

讨 论

为了模拟 CMV 宫内感染的病理过程,探讨 CMV 宫内感染与子代学习记忆的相关性,需要建立一个合适的动物模型。CMV 感染有严格的种属特性。小鼠胎盘由 3 层滋养层细胞构成,阻碍 CMV 病毒通过,因此,CMV 无法经过自然途径通过胎盘感染子代,以往建立的小鼠巨细胞宫内感染模型是经胎盘接种病毒,对研究 CMV 原发性感染存在一定的缺陷^[8,9]。豚鼠的孕期长,胎盘只有一层滋养细胞,结构与人类相似,利于 CMV 感染;并且,豚鼠 CMV 与人 CMV 的生物学特征相似^[10]。因此,豚鼠 CMV 宫内感染模型,是研究 CMV 宫内感染子代学习记忆的理想工具。

在世界范围内,活产儿的 CMV 感染率约为 0.2% ~ 2.2%,其中,40% ~ 58% 症状性感染儿和 13.5% 无症状性感染儿后期表现出神经性听力丧失、视力损伤和学习记忆障碍等永久性神经系统疾病^[11]。胚胎时期神经系统发育异常将影响子代出生后的生活质量,深入研究其机制将成为早期诊治的理论基础。自 1984 年以来, Morris 水迷宫实验已成为评估啮齿类动物空间学习记忆能力的有效工具^[12,13]。豚鼠脑的发育于胚胎期第 7 周左右已成熟,3 月龄和 6 月龄的豚鼠分别属于幼年期及少年期,因此,笔者选择豚鼠出生后 3 月龄和 6 月龄作为

检测时间。通过空间记忆采集实验,笔者发现,随着实验时间的增加,与对照组相比,CMV 宫内感染后的子代豚鼠到达平台的潜伏期及总路程延长,目标象限滞留时间百分比增加,游泳速度减慢,提示感染后的子代豚鼠空间学习记忆形成受损;通过空间探索实验,笔者发现,与对照组相比,CMV 宫内感染后的子代豚鼠平台穿越次数显著增加,提示感染后的子代豚鼠不能准确定位,同时,与对照组相比,CMV 宫内感染后的子代豚鼠的总路程明显延长,目标象限滞留时间百分比增加,游泳速度减慢,提示感染后的子代豚鼠空间学习记忆提取受损。这表明,CMV 宫内感染的子代豚鼠空间学习记忆能力明显下降,并且,随着感染子代的逐渐长大,其空间学习记忆能力无明显改善,依然低于正常子代。

为了观察不同脑组织在空间学习记忆中的作用,Becker 等通过损毁的方式发现海马完整的鼠类可精确完成 Morris 实验,而海马受损可导致空间学习记忆的损坏^[14,15]。海马位于侧脑室底部和内侧壁,主要由神经元和胶质细胞构成。神经元具有快速接收、处理、传递和输出信号的功能,其结构改变将导致突触形成异常,损伤空间学习记忆能力^[16]。CMV 是一种嗜神经病毒,感染脑组织的神经细胞及胶质细胞,主要分布于海马、皮质及脑室下区^[17]。本实验发现,

CMV 宫内感染的子代豚鼠海马神经元细胞结构层次紊乱, 尼氏小体数量减少, 出现变性、灶性坏死, 凋亡等病理改变, 提示感染后的子代豚鼠海马神经元细胞结构发育异常。

综上所述, 通过建立豚鼠 CMV 宫内感染模型, 由此推断 CMV 宫内感染的子代空间学习记忆能力下降, 这可能与感染后海马神经元细胞结构异常相关, 其作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(1):99-126
- 2 McCarthy FP, Giles ML, Rowlands S, et al. Antenatal interventions for preventing the transmission of cytomegalovirus (CMV) from the mother to fetus during pregnancy and adverse outcomes in the congenitally infected infant[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 3: D8371
- 3 Scott GM, Chow SS, Craig ME, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid[J]. J Infect Dis, 2012, 205(8):1305-1310
- 4 Wen LZ, Xing W, Liu LQ, et al. Cytomegalovirus infection in pregnancy[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2002, 79(2):111-116
- 5 Schleiss MR, Choi KY, Anderson J, et al. Glycoprotein B (gB) vaccines adjuvanted with AS01 or AS02 protect female guinea pigs against cytomegalovirus (CMV) viremia and offspring mortality in a CMV-challenge model[J]. Vaccine, 2014, 32(23):2756-2762
- 6 邓东锐, 陈素华, 熊锦文, 等. 宫内巨细胞病毒感染致异常妊娠结局的发生机制研究[J]. 中国妇幼保健, 2008, 9:1186-1188
- 7 Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assess-

- ing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848-858
- 8 郑翠, 陈素华, 冯玲. 巨细胞病毒感染对小鼠海马的 PKC 表达与 Ca^{2+} 浓度的影响[J]. 中国妇幼保健, 2009, 7:990-992
- 9 潘娜娜, 王琰琰, 吴德, 等. 宫内人巨细胞病毒感染对新生大鼠神经行为影响的追踪研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2014(6):600-604
- 10 Coleman S, Hornig J, Maddux S, et al. Viral glycoprotein complex formation, essential function and immunogenicity in the Guinea pig model for cytomegalovirus[J]. PLoS One, 2015, 10(8):e135567
- 11 Kenneson A, Cannon M J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection[J]. Rev Med Virol, 2007, 17(4):253-276
- 12 Weitzner DS, Engler-Chiurazzi EB, Kotilinek LA, et al. Morris water maze test: optimization for mouse strain and testing environment[J]. J Vis Exp, 2015, 100:e52706
- 13 Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e124521
- 14 Meck WH, Church RM, Olton DS. Hippocampus, time, and memory[J]. Behav Neurosci, 2013, 127(5):655-668
- 15 Geva-Sagiv M, Las L, Yovel Y, et al. Spatial cognition in bats and rats: from sensory acquisition to multiscale maps and navigation[J]. Nat Rev Neurosci, 2015, 16(2):94-108
- 16 Chen SY, Cheng HJ. Functions of axon guidance molecules in synapse formation[J]. Curr Opin Neurobiol, 2009, 19(5):471-478
- 17 Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(1):99-126

(收稿日期:2015-09-09)

(修回日期:2015-10-09)

(上接第 61 页)

- 4 WHO/UNICEF/ICCIDD. Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination[S]. Geneva:WHO, 2001
- 5 Laurberg P, Bülow Pedersen I, Knudsen N, et al. Environmental iodine intake affects the type of nonmalignant thyroid disease[J]. Thyroid, 2001, 11(5):457-469
- 6 高艳, 吴明惠, 刘大伟, 等. 新生儿先天性甲状腺功能减退症临床及发病特征分析[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(5):87-90
- 7 Teng W, Shan Z, Teng X, et al. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China[J]. N Engl J Med, 2006, 354(26):2783-2793
- 8 陈光庆. 尿碘测定中应注意的几个问题[J]. 检验医学与临床, 2014, 21:380-381
- 9 中华医学会内分泌学会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组. 中国甲状腺疾病诊治指南——甲状腺结节[J]. 中华内科杂志, 2008, 47(17):867-868
- 10 王锋锐, 张玲, 艾亥特·艾萨, 等. 1995-2011 年新疆碘缺乏病防治效果分析与病情预测[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(3):

351

- 11 中华医学会内分泌学会, 中华医学会外科分会内分泌学组, 中国抗癌协会头颈肿瘤专业委员会, 中华医学会核医学分会. 甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(10):779-797
- 12 单水阳, 田景琦, 朱林春等. 甲状腺结节性疾病与尿碘关系的病例对照研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(4):313-314
- 13 王青平. 甲状腺结节危险因素分析[J]. 中国地方病杂志, 2011, 30(6):706-707
- 14 潘晓芳, 孙喜岩, 贾晓东, 等. 辽宁省大连市健康体检人群甲状腺结节性疾病及其相关因素分析[J]. 中国地方病学杂志, 2009, 28(5):568-571
- 15 谷伟军, 赵玲, 朱笑笑, 等. 甲状腺恶性结节超声危险因素探讨——2453 例甲状腺结节超声特点分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(7):548-552

(收稿日期:2015-07-03)

(修回日期:2015-07-10)