

# 单纯疱疹病毒性角膜炎小鼠模型的建立及鉴定

聂爱芹<sup>1</sup>, 席蕾<sup>2</sup>, 席兴华<sup>1</sup>, 雷璐贇<sup>1</sup>, 程芳<sup>1</sup>

基金项目:广东省科技计划基金(No. 2009B030801234)

作者单位:<sup>1</sup>(518020)中国广东省深圳市,暨南大学第二临床学院 深圳市人民医院眼科;<sup>2</sup>(510060)中国广东省广州市,中山大学眼科医院

作者简介:聂爱芹,硕士,研究方向:角膜病。

通讯作者:席兴华,博士,主任医师,眼科教研室主任,研究方向:角膜病. xhx96@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-10-20

## Establishing and identifying of herpes simplex keratitis mice model

Ai-Qin Nie<sup>1</sup>, Lei Xi<sup>2</sup>, Xing-Hua Xi<sup>1</sup>, Lu-Yun Lei<sup>1</sup>, Fang Cheng<sup>1</sup>

Foundation item: Guangdong Provincial Science and Technology Fund, China (No. 2009B030801234)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shenzhen People's Hospital, 2<sup>nd</sup> Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Eye Hospital, Sun Yat - sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xing-Hua Xi. Department of Ophthalmology, Shenzhen People's Hospital, 2<sup>nd</sup> Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. xhx96@yahoo.com.cn

Received: 2012-07-02 Accepted: 2012-10-20

## Abstract

• AIM: To establish a basis of in-depth study for herpes simplex keratitis through establishing different infection period herpes simplex keratitis mice model.

• METHODS: Totally 125 Balb/c mice were scratched the word of "#" in cornea using the back of a razor blade cutting edge after anesthesia under the microscope. Among the total of 100 mice were inoculated with herpes simplex virus type - I. The rest of 25 mice were not inoculated with HSV - I as normal control group. Using 10g/L sodium fluorescein stained and slit lamp microscope observed the occurrence of corneal disease after operation everyday. Corneal surface tears were taken to carry on the detecting of human embryonic kidney epithelial cells (HEK293T) to define whether the viral replication. The latently infected mice model were exposed to ultraviolet-B light(UV -B) to induce the recurrence of HSK.

• RESULTS: The eyes of 100 mice model which inoculated with HSV - I were all appeared acute epithelial keratitis within 3 days after inoculation. The corneal inflammation disappeared after acyclovir eye drops

treating for 1 week, but the virus detection of polymerase chain reaction (PCR) in cornea and trigeminal ganglion remained positive. The latently infected mice model were exposed to UV - B to induce the recurrence of HSK within 1 week, recurrent HSK were in the form of stromal HSV keratitis principally.

• CONCLUSION: Balb/c mice were inoculated with HSV - I virus by corneal scarification, through UV - B rays establishing infected, latent, recurrent herpes simplex keratitis mice model, and the operation is relatively simple, convenient and easy.

• KEYWORDS: herpes simplex keratitis; animal models

Citation: Nie AQ, Xi L, Xi XH, et al. Establishing and identifying of herpes simplex keratitis mice model. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(11):2059-2061

## 摘要

目的:探讨建立不同感染时期 HSK 小鼠动物模型,为 HSK 的深入研究建立基础。

方法:Balb/c 小鼠 125 只麻醉后在显微镜下用刀片背面尖端于角膜“#”字划痕,其中 100 只小鼠接种 HSV - I 病毒,另 25 只小鼠不接种病毒作为正常对照组。术后每天用 10g/L 荧光素钠染色后裂隙灯显微镜下观察角膜病变发生情况,并取角膜表面泪液进行 HEK293T 细胞检测以确定裂隙灯显微镜下有无病毒复制。对潜伏感染期小鼠模型采用紫外线 B 光照射以诱导 HSK 复发。

结果:接种 HSV - I 病毒的小鼠模型眼于接种后 3d 内全部出现急性上皮性角膜炎表现。经阿昔洛韦滴眼液治疗 1wk 后角膜炎消失,但角膜和三叉神经节中 PCR 检测病毒仍为阳性。潜伏感染期小鼠模型经紫外线 B 光照射后也都在 1wk 内复发,并表现为以基质型角膜炎为主要临床表现的角膜病变。

结论:采用角膜划痕法对 Balb/c 小鼠接种 HSV - I 病毒和紫外线 B 光照射可以成功地制作出原发感染期、潜伏感染期和复发感染期等不同感染时期的 HSK 模型,而且操作相对简单、方便易行。

关键词:单纯疱疹病毒性角膜炎;动物模型

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.04

引用:聂爱芹,席蕾,席兴华,等.单纯疱疹病毒性角膜炎小鼠模型的建立及鉴定. *国际眼科杂志* 2012;12(11):2059-2061

## 0 引言

单纯疱疹病毒性角膜炎是一种由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)感染所致的严重危害患者视功能的致盲性眼病,其临床特点主要表现为病程长、反复

发作,最终导致角膜白斑、角膜新生血管增生、角膜溃疡甚至穿孔等而严重危害患者的视功能<sup>[1-3]</sup>。有关 HSK 的临床基础研究,目前主要是通过建立 HSK 动物模型来进行。本研究参照近年来国内外的相关研究进展,采用角膜划痕接种和紫外线 B 光照射方法成功地建立了不同感染时期的小鼠动物模型,为 HSK 的进一步深入研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 选用健康清洁级雌性 Balb/c 小鼠 125 只,体质量约 18~20g,鼠龄为 4~6wk(购自广东省医学实验动物中心)。所有实验小鼠在病毒接种前均在裂隙灯显微镜下检查角膜情况,排除存在角膜或结膜病变者。各组小鼠在实验期间按组分笼饲养,自由摄食、饮水(每天以灭菌颗粒饲料喂养,饮水为经消毒处理的自来水),适应环境 1wk。动物房保持通风、自然光照,温度控制在(20.0±3.0)℃。

**1.1.2 病毒与细胞** I 型单纯疱疹病毒(HSV-I) F 标准毒株(暨南大学生命科学院提供),使用前滴度为 $2 \times 10^6$ 空斑单位(plaque forming unit, PFU)/mL。生产和检测病毒的细胞为人胚肾上皮细胞(HEK293T)。培养 HEK293T 细胞的培养液为含有 100mL/L 胎牛血清、青霉素(100U/mL)及链霉素(0.1mg/mL)改进的最小基础培养基(DMEM)。细胞孵箱的工作条件:温度 37℃、空气浓度 950mL/L、二氧化碳浓度 50mL/L。

**1.1.3 实验药物与试剂** (1)药物:2.5g/L 氯霉素滴眼液,8mL/支,广州东康药业有限公司生产,批号:国药准字 H44020212;阿昔洛韦滴眼液,8mL/支,武汉五景药业有限公司生产,批号:国药准字 H42021090。(2)试剂:细胞培养所用的 DMEM、胰蛋白酶(浓度 2.5g/L)、小牛血清购自北京达科为生物技术有限公司。

**1.1.4 实验设备** 动物手术台、常用手术器械、裂隙灯显微镜、裂隙灯眼前段照相系统(苏州六六视觉科技股份有限公司生产)、紫外线透射仪(上海颀村光电仪器厂生产)。

### 1.2 方法

**1.2.1 HSK 原发感染小鼠模型制备及判定标准** 所有小鼠购回后适应环境 1wk 期间给予每只小鼠双眼点滴 2.5g/L 氯霉素滴眼液,2 次/d。接种病毒前用 10g/L 荧光素钠对小鼠角膜进行染色,并在裂隙灯显微镜下检查角膜情况,排除存在角膜或结膜病变者。10g/L 水合氯醛(0.04mL/10g)腹腔注射麻醉下,显微镜下用 5 号手术刀片背面尖端于右眼角膜呈“#”字划痕,以穿透角膜上皮层为宜,再用吸管将 5 $\mu$ L 含或者不含 $2 \times 10^6$ PFU HSV-I 病毒的 DMEM 滴于右眼角膜表面,闭合眼睑后轻轻按摩 30s,以使病毒液充分接触角膜。其中 100 只小鼠接种 HSV-I 病毒,另外 25 只小鼠在角膜上皮划痕后滴不含病毒的 DMEM 液,即不接种病毒以作为正常对照组。模型制作后次日,各组小鼠右眼继续给予 2.5g/L 氯霉素滴眼液滴眼,2 次/d,连续 2wk。并于次日开始连续 3d,每天用 10g/L 荧光素钠染色后在裂隙灯显微镜下观察角膜病变的发生情况,同时用棉拭子取右眼角膜表面泪液进行 HEK293T 细胞检测以确定有无病毒复制。如病毒接种眼在接种后角膜出现点状、树枝状或地图状病灶,而且

角膜擦拭液 HEK293T 细胞出现细胞病理学改变(cell pathological effects, CPE),即表现为 HEK293T 细胞变大、变圆、呈葡萄状聚集改变,并使原本贴壁生长的细胞部分脱离漂浮在 DMEM 中(图 1),则判定为 HSK 原发感染模型制作成功。

**1.2.2 HSV-I 潜伏感染模型的制备及判定标准** 对上述 100 只 HSK 原发感染小鼠模型及 25 只健康对照组小鼠(未接种病毒),右眼在 2.5g/L 氯霉素滴眼基础上,增加 1g/L 阿昔洛韦滴眼液,2 次/d,连续 2wk,以促进 HSK 模型小鼠的急性上皮性角膜炎愈合,并使病毒在三叉神经节或角膜内建立潜伏感染。然后各组随机抽取 3 只模型小鼠,水合氯醛腹腔注射麻醉下摘取其角膜和三叉神经节,进行 PCR 检测。如急性上皮性角膜炎消失,而角膜和三叉神经节 PCR 检测病毒阳性,则确定为 HSK 潜伏感染模型建立。

**1.2.3 HSK 复发感染小鼠模型制备及判定标准** 取病毒接种后 7wk 并经角膜和三叉神经节样本 PCR 检测证实为 HSK 潜伏感染期小鼠模型,将其右眼表面麻醉后,暴露在波长为 302nm 的紫外线下照射 3min。紫外线透射仪功率为 1.4mW/cm<sup>2</sup>,照射强度为 250MJ/cm<sup>2</sup>。紫外线 B 光照射后次日开始连续 7d,每天用 10g/L 荧光素钠染色并在裂隙灯显微镜下观察角膜是否再次出现点状、树枝状、地图状病灶,并用蘸有 DMEM 的棉拭子擦拭右眼角膜后进行 HEK293T 细胞培养,并观察细胞病理学改变(CPE),以判断模型小鼠角膜擦拭液中是否有单纯疱疹病毒存在。如在紫外线 B 光照射后角膜再次出现点状、树枝状或地图状角膜病变,且角膜擦拭液培养出现 CPE 者即确定为 HSK 复发期模型建立。

## 2 结果

**2.1 HSK 原发感染的临床表现特征** 接种了 HSV-I 病毒的小鼠 100 只于接种后的第 1~3d 内全部出现急性上皮性角膜炎表现,首先表现为少量点状上皮浸润,继而整个上皮呈弥散性点状缺损,部分出现了树枝状、地图状浸润(图 2)。接种后第 7d 时角膜缘局部出现少量新生血管。而 25 只仅划痕未接种 HSV-I 病毒的对照组小鼠模型,在角膜划痕后的第 1d 裂隙灯显微镜下观察,仅在划痕处出现了轻度角膜水肿和“#”样荧光素钠着色,但随后角膜水肿消失,并恢复透明。角膜擦拭液 HEK293T 细胞培养结果显示,HSV-I 接种组均于培养后的 24~72h HEK293T 细胞出现 CPE 改变(图 1),而未接种组则均为正常。

**2.2 潜伏期 HSK 模型鼠的表现特征** HSK 原发感染小鼠模型 100 只在给予 1g/L 阿昔洛韦滴眼液连续治疗 2wk 后,急性上皮性角膜炎消失。但随机取样获得的 3 只模型小鼠角膜和三叉神经节 PCR 检测 HSV-I 病毒呈阳性。

**2.3 复发性 HSK 模型鼠的角膜病变特征表现** 所有 HSK 潜伏感染期模型小鼠经紫外线 B 光照射后 1wk 内,都出现了以基质型角膜炎为主要临床表现的角膜病变(图 3)。即原来光滑、透明的角膜再次出现不同程度的角膜基质层水肿和灶状角膜基质混浊,部分模型鼠还出现了局部角膜新生血管增生。同时,角膜擦拭液 HEK293T 细胞培养病毒检测呈阳性。而 25 只正常对照组小鼠经紫外线 B 光照射后角膜仅出现了短暂的轻度水肿,并多在 1wk 内角膜恢复光滑、透明。

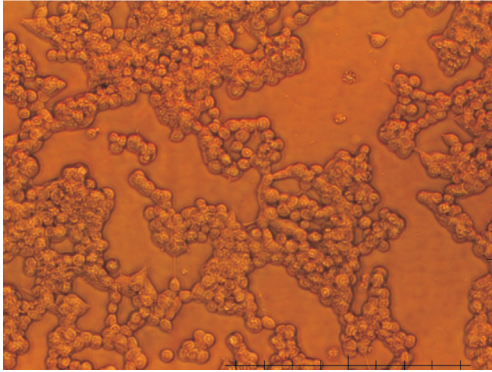


图1 HSV- I 感染后发生 CPE 病变的 HEK293T 细胞,表现为细胞变大、变圆、漂浮、呈葡萄状聚集改变,原本贴壁生长的细胞部分脱落、漂浮在培养液中。

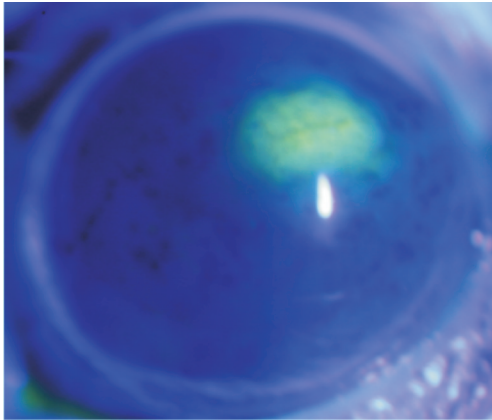


图2 鼠 HSV- I 原发感染模型,角膜树枝状上皮缺损,荧光素染色阳性。

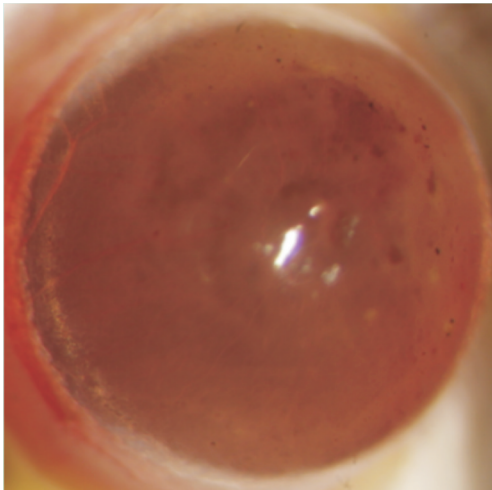


图3 鼠复发性 HSK,整个角膜基质混浊、水肿。

### 3 讨论

目前,有关 HSK 临床和基础的研究主要是通过建立动物模型的方法进行。因此,成功地建立不同感染时期

的 HSK 实验动物模型是深入开展相关研究的重要基础。通常可以用于 HSK 的动物模型应该具备的主要条件是:易于建立潜伏感染并且不容易发生自发性复发。家兔和小鼠均可被用于这一模型的建立,但有研究发现,家兔虽然容易建立起潜伏感染模型,但却容易产生自发性复发。而用小鼠建立的 HSK 潜伏感染模型,却不容易产生自发性复发<sup>[4]</sup>。本研究选用健康的 Balb/c 小鼠,采用角膜划痕后接种 HSV- I 的方法所制作的 HSK 原发感染模型全部成功,并且在潜伏感染期内无 1 例发生自发性复发,这与夏丽坤等的结果相一致。

通常诱导实验动物 HSK 复发的方法较多,如物理因素、化学方法、皮质类固醇药物或免疫抑制剂诱导等,但各种方法都有其优点和不足。我们采用 302nm 的紫外线照射模型小鼠角膜,照射量为 250MJ/cm<sup>2</sup>。此种照射强度对正常小鼠仅能使其角膜产生轻微的水肿,并可在 1wk 内消失。而对处于 HSK 潜伏感染期的小鼠却在照射后的不同时间内全部引起了复发感染。这证明该方法对诱导潜伏感染期小鼠模型复发不仅简便有效、容易操作,而且也更接近人类 HSK 复发的环境条件,对进一步深入研究环境因素对人类 HSK 复发的影响及其防治具有很好的启发作用<sup>[5]</sup>。

我们的研究表明:HSK 原发感染期的临床表现主要是急性上皮型角膜炎,角膜病变位于上皮的浅层。而 HSK 复发感染期的角膜病变则以基质型和内皮型角膜炎为主,其主要临床表现为角膜基质混浊、水肿、胶原纤维断裂甚至角膜新生血管增生等,这些角膜病变的表现特征与人类复发性 HSK 的基本特征相符。这些结果也进一步证实,复发性 HSK 的发生和发展不仅与 HSV 的存在有关,还可能与机体的免疫功能紊乱有密切的关系。

因此,本研究认为:应用 Balb/c 小鼠采用角膜划痕法接种法和紫外线 B 光照射法可以成功地制作出原发感染期、潜伏感染期和复发感染期等不同感染时期的 HSK 模型,而且操作相对简单、方便易行。

#### 参考文献

- 1 Duan R, van Dun JM, Remeijer L, *et al.* Prevalence of herpes simplex virus type 1 glycoprotein G (gG) and gI genotypes in patients with herpetic keratitis. *Br J Ophthalmol* 2008;92(9):1195-1200
- 2 李凤鸣. 单纯疱疹病毒性角膜炎. 北京:人民卫生出版社 2005: 1220-1224
- 3 Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):355-380
- 4 夏丽坤, 高殿文, 张劲松. 复发性单纯疱疹病毒性角膜炎实验模型的研究. *中国实用眼科杂志* 2001;19(9):706-709
- 5 吴惠琴, 汪玲, 马强. 解毒明目方抗鼠复发性单纯疱疹病毒性角膜炎的实验研究. *陕西中医* 2008; 29(10):1427-1428