

# 人巨细胞病毒孕早期先天性感染模型子代大鼠孤独症谱系障碍症状研究\*

刘乐<sup>1</sup> 张学敏<sup>1</sup> 崔珍珍<sup>1</sup> 段博阳<sup>1</sup> 王月<sup>1</sup> 王璐璐<sup>1</sup> 唐久来<sup>1</sup> 吴德<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**建立人巨细胞病毒(HCMV)孕早期宫内感染模型,探讨子代大鼠ASD症状。探讨HCMV孕早期先天性感染致子代孤独症谱系障碍(ASD)症状。

**方法:**随机选取孕3天SD大鼠14只,实验组7只腹腔注射 $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>病毒悬液0.5ml,对照组7只腹腔注射人胚肺成纤维细胞(HELFL)上清液0.5ml。仔鼠中随机各取6只,实验组母鼠的仔鼠记为HCMV组(n=6),对照组母鼠的仔鼠记为HELFL组(n=6),分别进行病理及行为学试验。

**结果:**病理及电镜结果显示实验组子代大鼠海马髓鞘破坏。Morris游泳距离:HCMV组1—4天总路程(d1:17.97±3.82;d2:15.22±2.96;d3:14.22±2.08;d4:10.87±2.34)m,高于HELFL组1—4天总路程(d1:9.36±1.95;d2:6.31±1.65;d3:5.36±1.23;d4:5.01±1.24)m,差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。刻板行为结果:HCMV组刻板动作次数(40.7±3.98,38.7±3.4,38.3±4.13,40.2±3.4,39.7±2.01,38.5±3.00)次,明显多于HELFL组(18.5±2.70,21.7±3.17,26.4±3.26,20.2±2.29,19.2±2.94,20.9±3.00)次,差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。旷场实验结果:HCMV组站立次数(19.15±3.63)次、跨格子数(41.70±11.05)均显著低于HELFL组站立次数(22.05±4.14)次、跨格子数(66.05±12.57)( $P < 0.05$ )。悬吊试验HCMV组仔鼠得分(1.52±0.61)显著低于对照组(2.70±0.73)( $P < 0.01$ )。斜坡试验HCMV组仔鼠评分(1.96±0.29)显著低于HELFL组(4.25±0.48)( $P < 0.01$ )、倾斜板试验HCMV组停留时间(48.17±7.15)s显著低于HELFL组(63.99±5.76)s( $P < 0.01$ )。

**结论:**HCMV孕早期感染,子代大鼠有ASD样症状,表明HCMV孕早期宫内感染可能是诱发ASD的病因之一。

**关键词** 人巨细胞病毒;孤独症谱系障碍;动物模型;神经行为学

**中图分类号:**R493,R749.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-05-0517-05

Offspring symptoms of autism spectrum disorder in the rat's SD model of HCMV congenital infection/  
LIU Le, ZHANG Xuemin, CUI Zhenzhen, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35  
(5): 517—521

## Abstract

**Objective:** The intrauterine infection model of HCMV in early pregnancy was established to investigate the ASD symptoms of offspring rats.

**Method:** Fourteen SD rats with 3 days pregnant were randomly selected:7 rats in the experimental group were intraperitoneally injected with 0.5ml of  $1 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub> virus suspension, and 7 rats in the control group were intraperitoneally injected with 0.5 ml supernatant of human embryonic lung fibroblast (HELFL). Six offspring rats were randomly selected from each group. The offspring rats of the experimental group were recorded as the HCMV group (n=6), and the offspring rats of the control group were recorded as the HELFL group (n=6). Pathological and behavioral tests were conducted respectively.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.05.002

\*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472167)

1 安徽医科大学第一附属医院儿科小儿神经康复中心,安徽省合肥市,230022; 2 通讯作者

第一作者简介:刘乐,女,硕士研究生; 收稿日期:2019-10-14

**Result:** Pathological and electron microscopy results showed that the hippocampal myelin sheath of the offspring of the experimental group was destroyed. Morris swimming distance: 1—4 days total distance of HCMV group (d1:17.97±3.82; d2:15.22±2.96; d3:14.22±2.08; d4:10.87±2.34)m, was higher than that of HELF group (d1:9.36±1.95; d2:6.31±1.65; d3:5.36±1.23; d4:5.01±1.24)m, and the difference was significant ( $P<0.01$ ). Stereotyped behavior results: the number of stereotyped actions in the HCMV group (40.7±3.98, 38.7±3.4, 38.3±4.13, 40.2±3.4, 39.7±2.01, 38.5±3.00) times was significantly more than the HELF group (18.5±2.70, 21.7±3.17, 26.4±3.26, 20.2±2.29, 19.2±2.94, 20.9±3.00) times, and the difference was significant ( $P<0.01$ ). Open field experiment results: the number of standing times (19.15±3.63) and the number of cross lattices (41.70±11.05) in the HCMV group were significantly lower than the number of standing times (22.05±4.14) and the number of cross lattices (66.05±12.57) in the HELF group ( $P<0.05$ ). The suspension test: The score of offspring in the HCMV group (1.52±0.61) was significantly lower than that in the control group (2.70±0.73) ( $P<0.01$ ), and the score of the slope test in the HCMV group (1.96±0.29) was significantly lower than that in the HELF group (4.25±0.48) ( $P<0.01$ ). In the inclined plate test, the residence time of HCMV group (48.17±7.15)s was significantly lower than HELF group (63.99±5.76)s ( $P<0.01$ ).

**Conclusion:** Early infection of HCMV pregnancy and asd-like symptoms in offspring rats suggest that early intrauterine infection of HCMV pregnancy may be one of the causes of ASD induction.

**Author's address** Department of Children Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui, 230022

**Key word** human cytomegalovirus; autism spectrum disorders; animal models; neuroethology

人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)是先天性感染最常见原因<sup>[1-2]</sup>。先天性及围产期HCMV感染可导致多系统、多脏器受累,其中以中枢神经系统损害最为严重<sup>[3]</sup>。人巨细胞病毒是β-疱疹病毒亚家族的成员,具有约230k碱基对的双链DNA大基因组。在世界范围内,HCMV感染非常普遍,血清流行率从40%到接近100%<sup>[4]</sup>。孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)是一种精神发育性疾病,表现为广泛的行为障碍,目前孤独症谱系障碍的病因尚不明确,但是孕早期病毒感染被认为是导致其发病的一个常见病因<sup>[5]</sup>。然而,巨细胞病毒早期宫内感染引起的认知缺陷和其他神经系统后遗症如小头畸形、颅内钙化等,使得其引起的孤独症谱系障碍的早期症状识别复杂化<sup>[2]</sup>。本研究拟建立早期HCMV先天性感染模型,仔鼠生后进行孤独症样症状行为学检测,探讨仔鼠孤独症谱系障碍的程度,为孤独症谱系障碍的早期识别和治疗提供临床指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型制备

处于育龄期的SPF级成年健康Sprague-Dawley

大鼠(购于北京维通利华实验动物技术有限公司), 体质量雌性250—260g, 20只, 雄性280—290g, 10只。饲养于安徽医科大学动物实验中心。适应性饲养2周后,于18:00以雌雄比例2:1合笼,次日7:00查阴道涂片,以查得阴栓为孕第0.5天,将孕鼠随机分为两组,实验组、对照组各7只,未孕鼠6只不纳入实验,孕鼠单笼饲养。动物饲养于23±2℃环境中,12h明暗交替(8am—8pm),自由饮水及进食。孕3天时实验组腹腔注射HCMV  $1\times 10^6$ TCID<sub>50</sub>病毒悬液0.5ml,对照组腹腔注射人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblasts, HELF)上清液0.5ml。模型制备参考唐久来等先天性中枢神经巨细胞病毒感染小鼠模型<sup>[6]</sup>。仔鼠中随机各取6只(均为足月鼠)进行行为学实验。

### 1.2 平衡功能检测

悬吊试验:32日龄子代大鼠前肢抓一水平玻璃棒,悬空放置离桌面50cm处,记录掉落时间。评分标准:1分<10s;2分:10—30s;3分:30s—20min;4分:2—5min;5分:>5min。休息20min,依次重复试验3次,取平均值。

斜坡试验:32日龄子代大鼠实验鼠被头朝下倒置于45°斜坡上。记录实验鼠转为头向上>135°的时

间,按s(秒)为单位计算。

倾斜板试验:32日龄子代大鼠将实验鼠放置在倾斜75°的斜面上,记录停留时间。

### 1.3 Morris水迷宫测试

Morris水迷宫包括一个直径为160cm,高55cm内壁黑色圆形水池,水池边4个标记线将水池等分为4个象限,目标象限的中央放置直径12cm的圆形透明平台,平台高度低于水面下2cm,水池正上方安置有显像系统的摄像机,计算机自动跟踪计时并同步记录大鼠的游泳轨迹,Anymaze软件采集并记录相关数据及图像结果。测试再试的运动能力,即运动路程,从实验开始到实验结束。动物可以利用环境标记物与隐匿平台的关系来判断水中平台位置,从而形成稳定的空间认知。测试前进行适应性训练,尽量减少误差,选取28日龄仔鼠,第1—2天进行标识平台学习,第3—6天Morris定位航行实验,大鼠面向池壁入水,从4个固定的入水点,记录120s内大鼠入水位置到结束位置的路程。

游泳距离:即运动路程。

### 1.4 重复-刻板动作检测

旷场红外线检测系统(Flex Field system),参照Schneider和Przewlocki所建立的方法。方法简述如下:旷场红外线检测系统为一长×宽×高为48cm×24cm×20cm的顶部开口的长方形实验盒,盒顶盖上玻璃,侧壁安装有束状红外线发生器和探测器系统,旷场红外线检测系统,利用鼠是否阻断红外线而自动全时程检测记录动物的活动情况。通过预实验后确定本实验选取PN15日龄幼鼠作测试,使用旷场红外线检测系统记录一定时程(30min内)内各只幼鼠每5min的第1min内呆板和非自主刻板性动作的出现次数,然后对HCMV组和HELFL组刻板动作出现次数均值进行比较。

### 1.5 旷场试验

装置为40cm×40cm×40cm无顶方盒,箱底用黑线分成9个等分小格。选择PN18日龄幼鼠作测试,每组各6只。仔鼠放入旷场底面中心,记录其在30s内的水平移动格数(crossing,大鼠四肢均跨入临近方格的次数)、后肢站立次数(rearing,后肢直立次数),每测完一只大鼠后,用清水清洗敞箱并用75%乙醇溶液擦拭敞箱内壁及底面,以清除大鼠在测试

过程中遗留大小便、气味等,以免影响下次测试结果。每只仔鼠进行一次行为测定,且在进行行为学测试前12h内未受到外界刺激。方格间穿行次数评价其运动活性改变。站立次数评价其探究行为改变。

### 1.6 病理检测

光镜检查:无菌取PN60天仔鼠脑组织,立即置于4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE染色,镜下观察结果。

电镜检查:无菌取PN60天仔鼠脑组织,组织块切成1mm<sup>3</sup>大小,立即置5%戊二醛缓冲液固定,乙醇脱水,环氧树脂包埋,对包埋好的组织进行超薄切片机制片,片厚70nm,醋酸铀和枸橼酸铅双染,日本JEOL-1230透射电镜下观察摄片。

### 1.7 统计学分析

应用SPSS 25.0统计软件对实验数据进行处理,测定结果以均数±标准差表示。多组间比较采用 $\chi^2$ 检验,两因素混合实验设计的重复测量方差分析;两组间计量数据比较用 $t$ 检验,方差不齐的采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 平衡功能

悬吊试验:HCMV组得分(1.52±0.61)显著低于HELFL组得分(2.70±0.73),差异具有显著性意义( $Z = -3.823, P < 0.01$ )。

斜坡试验:HCMV组评分(1.96±0.29)显著低于HELFL组(4.25±0.48),差异具有显著性意义( $t = 21.88, P < 0.01$ )。

倾斜板试验:HCMV组在斜板上停留的时间(48.17±7.15)显著低于HELFL组(63.99±5.76),差异具有显著性意义( $t = 6.182, P < 0.01$ )。

### 2.2 Morris水迷宫试验

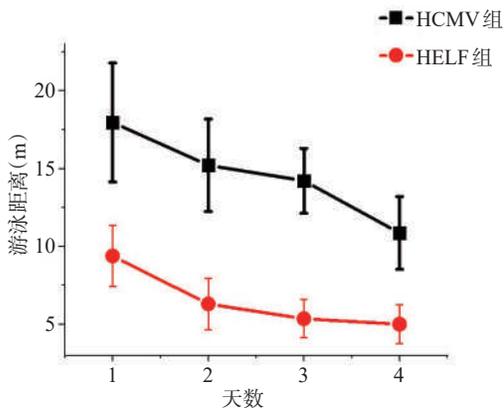
水迷宫定位航行试验结果显示(图1):随着训练天数增加,两组仔鼠到达平台的路程均缩短,HCMV组1—4天总路程(d1: 17.97±3.82; d2: 15.22±2.96; d3: 14.22±2.08; d4: 10.87±2.34)高于HELFL组1—4天总路程(d1: 9.36±1.95; d2: 6.31±1.65; d3: 5.36±1.23; d4: 5.01±1.24),差异有显著性意义( $F = 120.516, P < 0.05$ )。

### 2.3 重复刻板行为

重复刻板行为结果(图2)旷场红外线检测系统记录30min内各只幼鼠每5min的第1min内呆板和非自主刻板性动作的出现次数,HCMV组依次为:40.7±

3.98,38.7±3.4,38.3±4.13,40.2±3.4,39.7±2.01,38.5±3.00。HELFL组:18.5±2.70,21.7±3.17,26.4±3.26,20.2±2.29,19.2±2.94,20.9±3.00。HCMV组刻板动作次数明显多于HELFL组,差异有显著性意义( $P<0.01$ )。

图1 水迷宫定位航行试验结果



HCMV组:实验组;HELFL组:对照组

### 2.4 旷场试验

两组仔鼠旷场试验,结果显示,HCMV组站立次数、跨格子数低于HELFL组,差异有显著性意义( $P<0.05$ )。见表1。

表1 两组仔鼠旷场实验情况比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

项目	HELFL组 (n=6)	HCMV组 (n=6)	t值	P值
跨格子数	66.05±12.57	41.70±11.05	1.531	0.041
站立次数	22.05±4.14	19.15±3.63	2.356	0.024

图3 HELFL组(对照组)脑组织光镜结果(HE,×100)

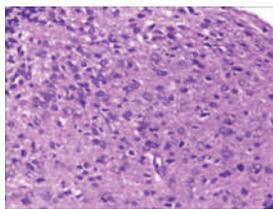
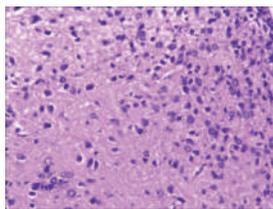


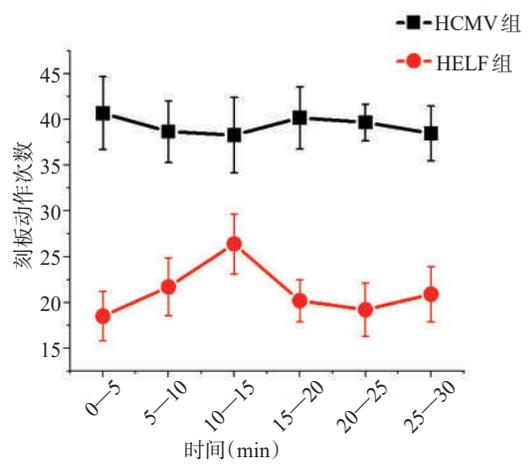
图4 HCMV组(实验组)脑组织光镜结果(HE,×100)



### 3 讨论

巨细胞病毒被认为是孤独症的产前危险因素<sup>[7]</sup>。各种因素影响先天性感染的神经发育后果,这些因素包括传染源的倾向性、孕妇的免疫状态和母体感染的

图2 重复刻板行为结果



HCMV组:实验组;HELFL组:对照组

### 2.5 病理学检查结果

光镜:HELFL组(图3):子代大鼠海马颗粒层神经细胞形态正常,排列整齐,细胞核完整,核仁清楚;HCMV组(图4):海马神经细胞颗粒层显著减少,结构明显紊乱,神经元变性、血管周围炎性细胞轻度浸润。

电镜:HELFL组(图5):神经髓鞘结构完整,胞内重要细胞器结构正常;HCMV组(图6):神经髓鞘出现轻度溶解,部分严重变形、破裂,线粒体嵴紊乱破坏,溶解。

图5 HELFL组(对照组)脑组织电镜结果

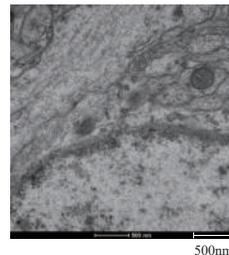
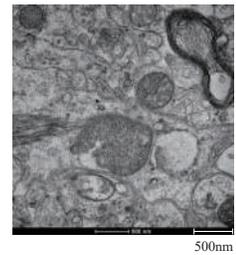


图6 HCMV组(实验组)脑组织电镜结果



时机等<sup>[8]</sup>,母体病毒感染会增加后代患精神分裂症和孤独症的风险。孕妇感染流感可导致妊娠并发症,如死产和流产。值得注意的是,即使是较轻的产妇感染也可能导致毁灭性的后果。许多流行病学研究发现,

在妊娠中期暴露于流感的妇女其后代患精神分裂症的风险显著增加。而感染风疹、麻疹、水痘带状疱疹和白喉也可产生类似的风险增加<sup>[9]</sup>。ASD是一种中枢神经系统发育过程中的早发性疾病,自身免疫可能在孤独症的形成过程中起着关键作用<sup>[10]</sup>。先天性巨细胞病毒感染导致ASD的机制包括直接致畸作用和炎症对发育中大脑的间接作用<sup>[11-12]</sup>。

ASD是一种以社交障碍,及重复性兴趣和活动为主要特征的终身疾病<sup>[13]</sup>。孤独症的行为特征包括以下四个主要类别:发育速度缺陷和/或序列缺陷;感觉刺激反应缺陷;言语、语言和认知能力缺陷;以及与他人交往的社交行为或方式上的缺陷。孤独症是一种非常复杂的神经紊乱表现。我们将其作为一种自身免疫性疾病来研究,在这种疾病中,病毒与自身免疫系统相互作用可能导致中枢神经系统的病理变化。感染病毒的母鼠所生小鼠的运动能力显著下降(流行病学研究表明),母亲感染流感病毒也会增加成年子女患精神分裂症的风险<sup>[14]</sup>。本研究通过构建HCMV孕早期先天性感染的模型,对宫内HCMV感染的子代大鼠海马结构的检测,确定早期感染模型建立。孤独症行为学检测参考李天苏等<sup>[15]</sup>大鼠孤独症行为学特点分析,采用水迷宫、刻板行为和旷场实验分析仔鼠孤独症样行为,根据仔鼠发育里程碑的不同及预实验结果,分别在15日龄进行重复刻板行为检测,18日龄进行旷场实验,32日龄进行运动平衡检测。其中HCMV组结果显示: HCMV孕早期先天性感染导致子代出现显著得重复刻板行为,且运动能力发育落后(站立次数、跨格子数、悬吊试验、斜坡试验和倾斜板试验等较正常对照组差),智力障碍(水迷宫定位航行试验路程较正常对照组远)。说明HCMV孕早期宫内感染,子代大鼠出现ASD的症状较正常大鼠显著增加,表明HCMV宫内感染可以导致ASD的发生。文献报道ASD与出生时有症状的先天性巨细胞病毒感染有关, Yamashita等<sup>[16]</sup>报道7例有症状的先天性CMV感染患儿中有2例后来发展为ASD。

通过本实验的研究结果,认为HCMV宫内感染,导致子代大鼠ASD的症状较正常大鼠显著增加,说明宫内感染是诱发ASD的一个重要病因。先天性巨细胞病毒感染与ASD之间的生物学机制尚

不清楚,仍需要我们不断探索。

## 参考文献

- [1] Patro ARK. Subversion of immune response by human cytomegalovirus[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:1155.
- [2] Sweeten TL, Posey DJ. Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection[J]. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2004, 34(5):583—586.
- [3] Noyola DE, Jimenez-Capdeville ME, Demmler-Harrison GJ. Central nervous system disorders in infants with congenital cytomegalovirus infection[J]. *Neurol Res*, 2010, 32(3):278—84.
- [4] Fonseca Brito L, Brune W, Stahl FR. Cytomegalovirus (CMV) pneumonitis: cell tropism, inflammation, and immunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16). pii:E3865. doi: 10.3390/ijms20163865.
- [5] Valayi S, Eftekharian MM, Taheri M, et al. Evaluation of antibodies to cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in patients with autism spectrum disorder[J]. *Hum Antibodies*, 2017, 26(3):165—169.
- [6] Tang JL, Wang ML, Qiu JJ, et al. Building a mouse model hallmarking the congenital human cytomegalovirus infection in central nervous system[J]. *Archives of Virology*, 2002, 147(6):1189—1195.
- [7] King CR. A novel embryological theory of autism causation involving endogenous biochemicals capable of initiating cellular gene transcription: a possible link between twelve autism risk factors and the autism 'epidemic'[J]. *Medical Hypotheses*, 2011, 76(5):653—660.
- [8] Ostrander B, Bale JF. Congenital and perinatal infections[J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 162:133—153.
- [9] Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, et al. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(1):297—302.
- [10] 朱静, 唐久来. 孤独症谱系障碍的神经免疫学研究进展[J]. *中国儿童保健杂志*, 2015, 23(9):956—958.
- [11] Cheeran MCJ, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22:99—126.
- [12] Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults[J]. *Ann Neurol*, 2012, 71:444—57.
- [13] Posar A, Visconti P. Long-term outcome of autism spectrum disorder[J]. *Turk Pediatri Ars*, 2019, 54(4):207—212.
- [14] Moreno JL, Kurita M, Holloway T, et al. Maternal influenza viral infection causes schizophrenia-like alterations of 5-HT<sub>2A</sub> and mGlu<sub>2</sub> receptors in the adult offspring[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(5):1863—72.
- [15] 李天苏, 潘娜娜, 唐久来, 等. Sprague-Dawley大鼠孤独症模型的建立及行为学特点分析[J]. *安徽医学*, 2013, 34(7): 865—868.
- [16] Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T, Matsui-shi T. Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder[J]. *J Autism Dev Disord*, 2003, 33:455—459.