

新型 H7N9 病毒在同居小鼠中的传播途径

鲍琳琳^{1,2}, 朱华², 邓巍², 许黎黎², 陈霆², 吕琦², 李枫棣², 袁静², 徐艳峰²,
黄澜², 李彦红², 刘江宁², 姚艳丰², 于品², 秦川², 索勋¹

(1. 中国农业大学, 北京 100083; 2. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所,
卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 进一步了解新型 H7N9 流感病毒的致病性、传播能力以及通过何种途径进行传播。方法 H7N9 病毒感染小鼠后与同居小鼠合笼, 研究同居小鼠的临床变化指征、病毒复制情况、病毒在组织中的分布以及病理变化。以同居小鼠分泌物接种其他小鼠, 观察同居小鼠通过何种途径传播病毒。结果 H7N9 病毒可以在肺组织、肠组织和脑组织中复制, 并可以在同居小鼠中传播。H7N9 病毒感染小鼠其咽、眼分泌物以及粪便均具有感染性, 其中尤以咽拭子的传播风险最高。结论 H7N9 病毒可以不通过适应就感染小鼠, 并引起小鼠间传播。被感染小鼠分泌物具有感染性。

【关键词】 H7N9 流感病毒; 小鼠; 接触传播; 黏膜

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0027-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.006

Transmission routes of H7N9 influenza virus between mice in cohabitation

BAO Lin-lin^{1,2}, ZHU Hua², DENG Wei², XU Lili², CHEN Ting², LV Qi², LI FENG-di², YUAN Jing²,
XU Yan-feng², HUNG Lan², LI Yan-hong², LIU Jiang-ning², YAO Yan-feng², YU Pin², QIN Chuan² and SUO Xun¹

(1. China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine,
Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine,
Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective Increasing number of human infection caused by the novel avian-origin H7N9 subtype influenza virus underscores the need to better understand the pathogenesis and transmissibility of this virus in mammals. **Methods** Mice inoculated with H7N9 influenza virus and put into the cage with naive mice, which were then specifically measured their clinical signs, virus shedding, tissue dissemination and pathology. The secretion from the cohabitant mice was inoculated to other normal mice to analyze the possible transmission routes. **Results** H7N9 influenza virus replicated in the lung, intestine and brain of the experimental mice. It was worth noting that H7N9 virus could transmit between mice in close contact by mucosa and fecal-oral routes, with the highest concentration of virus found in pharyngeal secretions. **Conclusions** Our results demonstrate that the avian-origin H7N9 subtype influenza virus can infect mice without adaptation and spreads by mouse-to-mouse transmission. The secretions of infected mice are source of infection for mice in direct contact, and it is similar to the influenza virus transmission between humans.

【Key words】 H7N9 influenza virus; Transmission; mucosal; Transmission, fecal-oral; Mice

[基金项目] 十二五科技重大专项 (2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004, 2012ZX10004301-8), 国家自然科学基金 (31370203), 科技部 H7N9 禽流感应急防控专项 (KJYJ-2013-01-04), 协和青年教师培养项目 (2012Y2, 2012D15)。

[作者简介] 鲍琳琳 (1979 年 -), 女, 副研究员。E-mail: bllmsl@aliyun.com

[通讯作者] 秦川。E-mail: chuanqin@cnilas.org; 索勋。E-mail: 索勋@cau.edu.cn

自然界中的 A 型流感病毒的宿主主要是野生水鸟,通常并不使水禽致病^[1]。禽流感病毒传播可致家禽发病,一些基因的重配有潜在的引发人群大流行的危险^[2]。除了 H5N1 高致病性禽流感已经在世界范围内严重威胁人类健康,H7 亚型禽流感也可感染人类并致病^[1,3]。H5N1 高致病性禽流感病毒可以引起感染者严重的疾病和高死亡率,H7 型感染后通常表现为结膜炎/或轻度呼吸系统疾病^[4,5]。由于 H7 型禽流感病毒是比较温和的病毒,这反而增加了其在宿主上潜伏、传播、变异或与其他流感病毒重组的机会^[6]。

自 2013 年 3 月,人感染 H7N9 型禽流感病毒在华东地区爆发流行。大多数病人出现呼吸道感染,重症肺炎和呼吸困难的症状^[7-12]。更令人担忧的是这种病毒可以在人群传播以外引发人际大流行。2003 年荷兰曾发生 H7 型人传人的事件^[13]。此外,有 3 例家庭聚集性病例的报道,这可能表明 H7N9 病毒有人传人可能性^[14,15]。

由临床病人分离到的 H7N9 病毒株测序发现血凝素(HA)的 Q226L 和神经氨酸酶(NA)R292K7 发生突变,这是改变禽流感与禽源受体结合的关键位点,因此可能会改变病毒的传播能力^[16]。我们的研究发现,H7N9 病毒感染小鼠时,同笼小鼠可以被感染,病毒通过什么方式传播是值得研究的重点。

1 材料方法

1.1 病毒

病毒来自于感染 H7N9 病毒的死亡病例, A/Anhui/1/2013。患者女性,35 岁,来自安徽,有急性呼吸窘迫综合征,感染性休克,病发后 6 d 出现急性肾损害,死亡^[7]。病人咽拭子接种 9~11 日龄的鸡胚,收集尿囊液,保存于 -80℃ 冰箱。用 9~11 日龄鸡胚测定病毒滴度,滴度为 10^9 EID₅₀/100 μL。病毒基因测序发现 HA 的 Q226L 发生突变,使禽流感的受体结合力发生改变,增加了人型受体的结合力。

1.2 动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 280 只,4~6 周龄,13~15 g,中国医学科学院医学实验动物研究所提供 [SCXK(京)2009-0007];小鼠感染性操作均在生物安全三级实验室内进行【卫 ABSL3-021】,研究方案经中国医学科学院医学实验动物研究所动物伦理委员会审核批准【ILAS-PC-2013-007】。

1.3 方法

1.3.1 H7N9 病毒感染小鼠实验

小鼠轻度麻醉后经鼻滴入 H7N9 病毒 1×10^7

TCID₅₀。在小鼠感染后第 1、2、3、5、7 天处死小鼠,取肺组织、肠组织以及鼻甲用于病毒滴度测定,每个时间点安乐死 6 只小鼠。病毒滴度用 MDCK 细胞测定,以 TCID₅₀ 表示,采用 Reed-Muench 计算方法^[17]。小鼠感染后每日记录小鼠体重变化以及临床症状,直至感染后第 14 天。肺组织、肠组织、脑组织用于病理检查以及免疫组织化学检查。

1.3.2 H7N9 病毒同居小鼠传播实验

3 只 4 周龄小鼠轻度麻醉后以 1×10^7 TCID₅₀ 滴鼻,24 h 后与 7 只未被感染小鼠合笼饲养。在感染后 3、5、7 d,分别安乐死 7 只同笼未接种病毒小鼠,收集小鼠鼻洗液,取肺、脑、心、肝、脾、肾、肠组织用于病理及病毒检测。感染后第 14 天收集小鼠血清用于测定 HI 滴度。每日观察同居未被感染小鼠体重变化及临床体征。

1.3.3 H7N9 病毒感染小鼠分泌物的感染性研究

H7N9 病毒感染小鼠后 6、12 h 及 1、2、3、5 d 取血清测定病毒载量。1、2、3 d 采集小鼠眼睛拭子、咽拭子,分别接种于其他小鼠,每种拭子悬液接种 12 只小鼠,在接种后 2、4 d 分别处死 6 只小鼠,取小鼠鼻、肺、肠组织用于病毒检测;5 d 收集粪便放置于 1 mL PBS 中震荡混匀,溶液离心取上清,此上清接种于其他小鼠 12 只,于接种后 2、4 d 分别处死 6 只小鼠,取小鼠鼻、肺、肠组织用于病毒检测。实验设计见图 1。

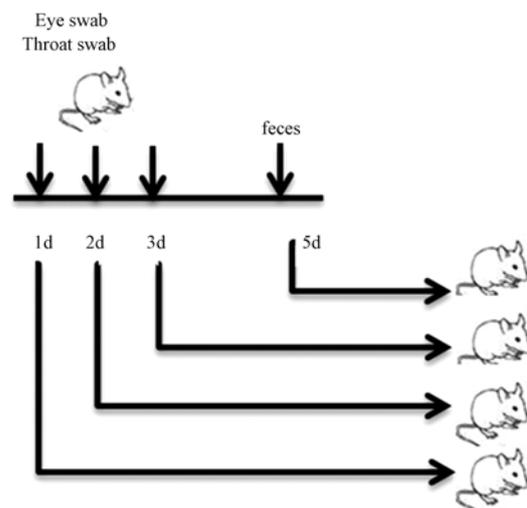


图 1 传播途径研究实验设计示意图

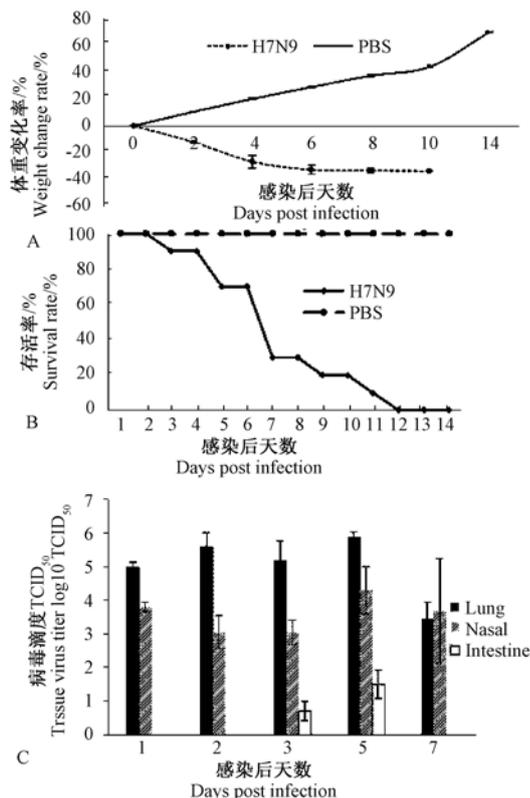
Fig. 1 Schematic design of the transmission route experiment

2 结果

2.1 H7N9 禽流感病毒对小鼠的致病性

小鼠感染 A/Anhui/1/2013 后会出现体重下降

(见图 2A), 感染后 3 d 出现明显的临床症状, 发病率达 100%, 病症一直持续至感染后第 14 天(见图 2B)。小鼠感染后第 1~7 天都能够在鼻甲和肺组织中检测到病毒复制(见图 2C)。脑组织中病毒滴度低于 1 TCID₅₀, 该结果没有显示。组织化学染色结果显示病毒抗原主要位于支气管上皮细胞内、小肠柱状绒毛上皮细胞以及炎性渗出细胞内、大脑脑膜上皮细胞内(见图 3A-C)。以上结果显示 H7N9 病毒与其他流感病毒类似, 可以直接感染小鼠引起出现典型的症状, 能够在肺组织中复制^[24,25]。前期研究报道, 小鼠感染病毒后肺组织出现严重的病理改变^[26-28]。小鼠感染 H7N9 病毒后肺间质扩张充血, 融合性间质肺炎; 在感染后 5、7 d 病变更为明显, 出现肺泡腔和支气管上皮有坏死的上皮细胞, 有炎细胞浸润, 以及纤维蛋白原的渗出(见图 3D-F)。以上结果显示 H7N9 病毒可以感染小鼠并致其产生致死症状及病理改变。图 3 见彩插 9。



注:A. 体重变化率; B. 14 d 存活率; C. 感染后组织病毒滴度。

图 2 H7N9 禽流感病毒感染小鼠后变化及组织病毒复制

Note: A. Body weight change rate; B. The survival was recorded daily for 14 d. p. i.; C. Tissue virus titers after infection.

Fig. 2 Phenotypic changes of the mice infected with H7N9 virus

2.2 H7N9 病毒在直接接触小鼠中的传播能力

在确认 H7N9 病毒可以直接感染小鼠后, 我们研究了该病毒在同居小鼠中的传播情况。小鼠感染 H7N9 病毒 24 h 后, 将其余小鼠放入同一笼, 3 只感染小鼠, 7 只未感染小鼠。小鼠在合笼后第 4~7 天出现竖毛的表现。直接接种病毒小鼠出现明显的体重下降, 低于 33% (见图 2A), 与之同笼小鼠在感染后 6 d, 6/7 只出现体重下降(见表 1)。小鼠感染后分时段采集血清测定其病毒载量, 结果显示并未在采集的时间点内检测到病毒 RNA (结果未显示)。直接感染小鼠肺组织、肠组织、脑组织中都检测到病毒, 其中肺组织病毒滴度最高达到 5.2~5.9 log₁₀ TCID₅₀/组织 (见图 2B)。同笼未接种病毒小鼠合笼后第 3、5、7 天在肺组织和肠组织检测到病毒复制, 脑组织仅在合笼后第 5 天检测到病毒(见表 2)。

表 1 H7N9 流感病毒在小鼠中传播临床症状结果

Tab. 1 H7N9 influenza virus transmission from infected to naive mice.

症状 Symptoms	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
竖毛 Ruffled	0/7	4/7	6/7	4/7	4/7
体重减轻 Weight loss	0/7	0/7	4/7	6/7	0/7
死亡 Death	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7

表 2 H7N9 病毒在同笼小鼠中复制情况

Tab. 2 Replication of H7N9 virus in naive mice following close contact

组织 Tissues	3 d	5 d	7 d
肺 Lung	1/7	1/7	1/7
肠 Intestine	3/7	3/7	1/7
脑 Brain	0/7	1/7	0/7

注: a: 组织病毒滴度 TCID₅₀ < 1。

Note: a: The tissue virus titer TCID₅₀ < 1.

与感染小鼠同居后 14 d, 检测其血清中抗 HA 抗体滴度, 结果显示其 HI 滴度在 80~160 (见表 2)。未同居小鼠血清 HI 抗体滴度呈阴性, 这更进一步证明 H7N9 病毒可以通过直接接触的方式传播。

未接种病毒的同居小鼠中通过组织化学染色研究 H7N9 病毒通过接触传播后在组织中的分布情况, 发现病毒抗原位于肺支气管上皮细胞、小肠绒毛隐窝细胞和炎性渗出细胞内(见图 4A, B)。病理学观察结果显示, 同居小鼠肺组织出现中度感染后炎症改变。小鼠合笼后第 3 天, 肺组织出现中度肺血管扩张(见图 4C), 第 7 天出现充血(见图 4D)。以上结果显示 H7N9 病毒可以通过直接接触在同居小鼠中传播并引起其产生轻微病变。图 4 见彩插 9。

2.3 H7N9 禽流感病毒传播途径

研究 H7N9 感染后的小鼠其分泌物的感染性,结果显示接种感染后 1、2 d 眼睛分泌物的小鼠,被接种小鼠肺组织和肠组织中能够检测到病毒复制,接种感染后第 3 天眼睛分泌物的小鼠,被感染小鼠肺组织和肠组织中检测不到 H7N9 病毒。感染小鼠 1~3 d 咽拭子接种其他小鼠,被接种小鼠肺组织与肠组织中均能检测到病毒复制。感染小鼠第 5 天粪

便悬液接种其他小鼠,被接种小鼠肺组织和肠组织,均可检测到病毒复制(见表 3)。研究结果显示感染 H7N9 病毒小鼠其咽分泌物具有较高的感染性,通过此途径感染的小鼠肺组织病毒载量 4.8~6.2 log₁₀ copies/组织(见图 5)。以上结果说明 H7N9 病毒感染后小鼠其咽分泌物具有较高感染性,同时其眼睛分泌物及粪便亦具有一定感染性。

表 3 感染 H7N9 病毒小鼠组织感染性测定结果

Tab.3 Replication of H7N9 virus in the naive mice following eye, nasal, or fecal inoculation.

组织 Tissues	ES-1		ES-2		ES-3		TS-1		TS-2		TS-3		F	
	2 d	4 d	2 d	4 d	2 d	4 d	2 d	4 d	2 d	4 d	2 d	4 d	2 d	4 d
肺 Lung ^a	1/6	0/6	0/6	3/6	0/6	0/6	1/6	3/6	1/6	2/6	0/6	1/6	1/6	1/6
鼻 Nasal ^a	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
肠 Intestine ^a	1/6	0/6	0/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6	1/6	1/6	1/6

注:a: 组织病毒滴度 TCID₅₀ < 1; ES: 眼拭子; TS: 咽拭子。

Note: a: The tissues virus titer TCID₅₀ < 1. ES: Eye swab; TS: Throat swab.

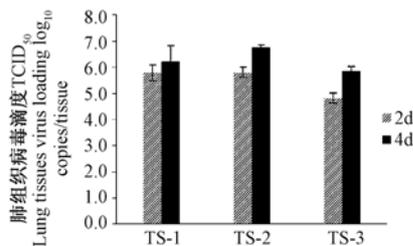


图 5 咽拭子分泌物接种小鼠后肺组织病毒滴度结果

Fig.5 Detection of virus titers following inoculation of naïve mice from throat swab.

3 讨论

H7N9 病毒能够有效地感染小鼠产生明显的病理改变,甚至致死,该病毒在世界多个地区出现,严重威胁人类健康。其分布在感染小鼠的鼻甲、肺组织、肠组织以及脑组织中。我们的前期研究显示 H7N9 病毒感染后症状会由感染后 3 d 持续至感染后 12 d^[17-20],这与人感染后的临床症状持续时间类似,而 H1N1 病毒感染小鼠模型病症持续时间通常为 3~8 d^[11]。同时发现 H7N9 感染后肺组织病毒滴度高于鼻甲病毒滴度(见图 2B),显示病毒在肺组织中的复制速度更快,这与报道中称 H7N9 感染病人有明显的肺炎表现,却没有明显的上呼吸道卡他样症状^[22-25]。

研究显示 H7N9 病毒可以通过气溶胶在雪貂中传播,我们的研究结果显示 H7N9 病毒可以在小鼠中传播,同时发现感染小鼠的眼睛分泌物、咽分泌物、粪便都具有感染性^[29]。这些来自于感染小鼠的分泌物可导致其他小鼠感染,可通过接种分泌物的小鼠肺、

脑、肠检测到病毒复制(见表 2),能检测到鼻的 H7N9 病毒 RNA,病毒拷贝数较低。同居小鼠中被感染小鼠肺组织出现中度间质性肺炎改变(见图 4C, D)。同笼中接种病毒小鼠肺组织病变较为接种病毒小鼠病变严重,这与小鼠接触流感病毒的量有关。

病人中病毒血症的发生率很低。实验结果显示,小鼠接种 H7N9 病毒后通过多个时间点的血清监测都没有检测到病毒 RNA^[30]。然而,这一结果并不能排除 H7N9 流感病毒没有形成病毒血症的风险,病毒血症的监测与感染者血清收集的时间密切相关。尽管我们的实验设计已经采集多个时间点监控病毒血症,病毒血症是一过性出现,目前的结果推测一过性病毒血症可能落于监控时间点之外。另外发现 H7N9 病毒感染小鼠的眼、咽分泌物以及粪便都具有感染性,尤其以咽的分泌物感染性较高。尽管眼分泌物的感染性略低,仍就可能成为传播病毒的媒介,尤其处于潜伏期的病人。考虑到典型的病人会出现严重的肺炎而上呼吸道症状不显著,结果提示被传染 H7N9 病毒的无症状患者其分泌物的感染性更具危险性。

(本文图 3、图 4 见彩插 9。)

参 考 文 献

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microb Rev, 1992; 56(1):152-179.
- [2] Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species [J]. Vet Microbiol, 2000; 74(1-2): 3-13.
- [3] Monto AS. The threat of an avian influenza pandemic [J]. N Eng J Med, 2005; 352(4): 323-325.

- [4] Abdel-Ghaffar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans [J]. *New Eng J Med*, 2008; 358(3):261–273.
- [5] Wong SS, Yuen KY. Avian influenza virus infections in humans [J]. *Chest* 2006; 129(1):156–68.
- [6] Tweed SA, Skowronski DM, David ST, et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10(12):2196–2199.
- [7] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med* 2013, 368(20):1888–1897.
- [8] Horby P. H7N9 is a virus worth worrying about [J]. *Nature* 2013, 496(7446):399.
- [9] Koopmans M, de Jong MD. Avian influenza A H7N9 in Zhejiang, China [J]. *Lancet* 2013. (9881):1882–1883.
- [10] Wu S, Wu F, He J. Emerging risk of H7N9 influenza in China [J]. *Lancet* 2013; 381(9877):1539–1540.
- [11] Zhang W, Wang L, Hu W, et al. Epidemiological characteristics of cases for influenza A (H7N9) virus infections in China [J]. *Clin Infect Dis* 2013, 57(4):619–620.
- [12] Uyeki TM, Cox NJ. Global concerns regarding novel influenza A (H7N9) virus infections [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20):1862–1864.
- [13] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [J]. *Lancet* 2004, 363(9409):587–593.
- [14] Li Q, Zhou L, Zhou M, et al. Preliminary report: epidemiology of the avian influenza A (H7N9) outbreak in China [J]. *N Engl J Med* 2013, April 24, [Epub ahead of print]
- [15] Parry J. H7N9 virus is more transmissible and harder to detect than H5N1, say experts [J]. *BMJ* 2013; 346: f2568.
- [16] Zhou J, Wang D, Gao R, et al. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus [J]. *Nature* 2013. 499(7459):500–503.
- [17] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *Am J Hygiene* 1938; 27: 493–497.
- [18] Xu L, Bao L, Li F, et al. Adaption of seasonal H1N1 influenza virus in mice [J]. *PLoS One* 2011; 6(12):e28901.
- [19] Jurgens HA, Amancherla K, Johnson RW. Influenza infection induces neuroinflammation, alters hippocampal neuron morphology, and impairs cognition in adult mice [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(12):3958–3968.
- [20] Kocer ZA, Krauss S, Stallknecht DE, et al. The potential of avian H1N1 influenza A viruses to replicate and cause disease in mammalian models [J]. *PLoS One* 2012; 7(7):e41609.
- [21] Dong W, Li-Feng X, Cun-Lian W, et al. A mouse model of swine influenza virus H9N2 infection with acute lung injury [J]. *Acta Virol*, 56(3):227–233.
- [22] Tait AR, Davidson BA, Johnson KJ, et al. Halothane inhibits the intraalveolar recruitment of neutrophils, lymphocytes, and macrophages in response to influenza virus infection in mice [J]. *Anesth Analg*, 1993; 76(5):1106–1113.
- [23] Blisard KS, Davis LE. The sequence of changes in liver and brain in the influenza B virus mouse model of Reye's syndrome [J]. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990, 49(5):498–508.
- [24] Gao P, Watanabe S, Ito T, et al. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong [J]. *J Virol* 1999, 73(4):3184–3189.
- [25] Gubareva LV, McCullers JA, Bethell RC, et al. Characterization of influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of zanamivir on H5N1 infection in mice [J]. *J Infect Dis*, 1998, 178(6):1592–1596.
- [26] Hodgson NR, Bohnet SG, Majde JA, et al. Influenza virus pathophysiology and brain invasion in mice with functional and dysfunctional Mx1 genes [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 26(1):83–89.
- [27] Maines TR, Lu XH, Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals [J]. *J Virol*, 2005, 79(18):11788–11800.
- [28] Reinacher M, Bonin J, Narayan O, et al. Pathogenesis of neurovirulent influenza A virus infection in mice. Route of entry of virus into brain determines infection of different populations of cells [J]. *Lab Invest*, 1983, 49(6):686–692.
- [29] Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, et al. Infectivity, transmission, and pathology of human-isolated H7N9 influenza virus in ferrets and pigs [J]. *Science*, 2013, 341(6142):83–186.
- [30] Likos AM, Kelvin DJ, Cameron CM, et al. Influenza viremia and the potential for blood-borne transmission [J]. *Transfusion*, 2007, 47(6):1080–1088.

[收稿日期] 2013-10-15