

H1N1 流感与 H7N9 禽流感感染 BALB/c 小鼠发病特点初步研究

杨玉琴¹, 徐春华¹, 朱召芹¹, 田 棣¹, 陈丽香¹, 杨 华¹, 秦波音¹,
宋志刚¹, 管文彩¹, 刘 伟¹, 蔡家麟¹, 周晓辉¹, 周文江^{1,2}

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 复旦大学药学院, 上海 201203)

【摘要】 目的 本实验旨在初步探讨 A/Shanghai/4664T (H7N9) 和 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 病毒感染 BALB/c 小鼠的发病特点, 为 H7N9 致病机制与防治的研究提供数据支持。方法 将同等剂量 (5×10^3 TCID₅₀) 流感病毒滴鼻感染 BALB/c 小鼠, 分析其在感染后体重、肺指数、病毒载量和肺组织病理的变化情况。结果 H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组小鼠在 7 d 内体重均持续减低, H1N1 PR8 组较 H7N9 组降低更为明显; 在感染后 3 d H7N9 组与 PBS 组肺指数无显著差异 ($P > 0.05$), 但感染后 7d H7N9 组与 PBS 组相比显著增高 ($P < 0.05$); H1N1 PR8 组比 H7N9 组感染后 3 d 肺指数显著增高 ($P < 0.05$), 但感染后第 7 天无显著差异 ($P > 0.05$)。H1N1 PR8 组和 H7N9 组病毒载量在感染后第 3 天均显著升高, 但两组无显著差异; 第 7 天两组病毒载量均有所降低, 但 H7N9 组病毒载量显著高于 H1N1 PR8 组 ($P < 0.05$)。H1N1 PR8 在感染后 3 d 主要病理变化为炎症细胞浸润和水肿, 而 H7N9 组主要轻度炎症细胞浸润; 在感染后 7 d H1N1 PR8 组可见大量炎症细胞浸润, 出现大面积肺水肿; H7N9 组表现为大量炎症细胞浸润。结论 H7N9 和 H1N1 PR8 感染 BALB/c 小鼠均可发病, 但发病特点有所差异, H7N9 病毒对鼠的适应性比 H1N1 PR8 差。

【关键词】 H7N9; H1N1 PR8; BALB/c 小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0040-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.001.010

A preliminary research on clinical characteristic of BALB/c mice infected by H7N9 and H1N1 PR8 virus

YANG Yu-qin¹, XU Chun-hua¹, ZHU Zhao-qin¹, TIAN Di¹, CHEN Li-xiang¹, YANG Hua¹, QIN Bo-yin¹,
SONG Zhi-gang¹, GUAN Wen-cai¹, LIU Yi¹, CAI Jia-lin¹, ZHOU Xiao-hui¹, ZHOU Wen-jiang^{1,2}

(1. Shanghai Clinical Center of Public Health, Shanghai 201508, China;

2. School of Pharmacy of Fudan University, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To compare clinical characteristics of BALB/c mice infected by H7N9 (A/Shanghai/4664T) and H1N1 PR8 (A/Puerto Rico/8/34) virus for providing clues for H7N9 virus pathogenic mechanism researches.

【基金项目】 上海市科委资助项目(12140903100), 科技部人感染 H7N9 禽流感应急防控研究专项 (KJYJ-2013-01-04); 上海市公共卫生临床中心 H7N9 应急项目(201316)。

【作者简介】 杨玉琴(1980-), 女, 硕士, 研究方向: 流感动物模型及机制研究。E-mail: fudanyan2007@sina.com; 徐春华(1982-), 男, 本科, 研究方向: 流感动物模型及机制研究。E-mail: xuchunhua@shaphc.org; 朱召芹(1978-), 女, 副研究员, 研究方向: 流感继发细菌感染机制研究。E-mail: zhaqinzh@163.com。以上三者为共同第一作者。

【通讯作者】 周文江, 副主任技师, 研究方向: 各种新发再现感染性疾病的研究。E-mail: wjzhou@shmu.edu.cn。

Method Each BALB/c mouse was inoculated by 5×10^3 TCID₅₀ H7N9 or H1N1 PR8 virus or PBS after anesthetize. The bodyweight change, lung index, viral load and pulmonary pathology were monitored and analyzed. **Result** BALB/c mice infected with H1N1 PR8 and H7N9 showed clinical characteristic differences. In terms of bodyweight change, both H1N1 PR8 group and H7N9 group were reduced gradually within 7 days post infection (d. p. i.), though the bodyweight of H1N1 PR8 group decreased more rapidly than that of H7N9 group. The lung viral loads of H1N1 PR8 group and H7N9 reached peak at 3 d. p. i., and reduced to very low level at 7 d. p. i. Nevertheless, though the H1N1 PR8 group and H7N9 have no significant difference at 3 d. p. i., H7N9 group showed a significantly higher level of viral loads than that of H1N1 PR8 group at 7 d. p. i. ($P < 0.05$). For lung pathological aspects, the major lesions of H1N1 PR8 group were infiltration of inflammatory cells and edema; H7N9 group showed mild inflammatory cell infiltration at 3 d. p. i. Subsequently at 7 d. p. i., the mainly lesions of H1N1 PR8 group were abundant of inflammatory cells infiltration with a massive pulmonary edema; H7N9 group showed a large number of inflammatory cells infiltrating in the lung. **Conclusion** BALB/c mice infected by H7N9 and H1N1 PR8 showed differences in pathogenic characteristics. H7N9 virus showed less mouse adaptability than the H1N1 PR8 virus. We need to consider the impact of virus titre on follow-up evaluation studies for the efficacy of potential H7N9 therapy drug and vaccine.

【Key words】 H7N9; H1N1 PR8; BALB/c mice

正粘病毒科禽流感血细胞凝集素神经氨酸酶流感人类禽流感 H7N9 亚型禽流感病毒是一种最近出现的新型 H7N9 禽流感病毒,其跨宿主在人类进行传播,既往仅在禽间发现,未发现过人的感染情况^[1-2]。H7N9 新型流感病毒是由三个已知禽流感病毒部分重组获得^[3]。截至 2013 年 5 月 31 日,中国内地共报告 131 例确诊病例,其中康复 78 人,在院治疗 14 人,死亡 39 人^[4]。虽目前病例仍处于散发状态,但目前仍无法排除其再次爆发的可能。最近研究结果显示 H7N9 禽流感病毒具备“有限的人际传播能力”,因此逐渐适应中的 H7N9 禽流感病毒极有可能在未来发生大流行^[5-6]。

本实验室前期研究中发现,从患者分离的 H7N9 流感病毒可以成功感染小鼠甚至导致小鼠死亡,但由于 H7N9 流感病毒必须在生物安全三级实验室进行,严重影响了对它的致病机制的揭示。同时,在对 H7N9 的了解相对较少的情况下,需要借助目前在致病机制和治疗研究较为深入的普通流感来对 H7N9 进行比较探讨。因此对于禽流感 H7N9 和普通流感发病特点的比较研究极为迫切,这将为禽流感 H7N9 的发病机制、药物和疫苗的研究提供线索。

1 材料和方法

1.1 病毒

选择 H1N1 病毒株 A/Puerto Rico/8/34(H1N1) (以下简称 H1N1 PR8) 和 H7N9 病毒株 A/Shanghai/4664T(H7N9) (以下简称 H7N9) 为研究对象, H7N9 和 H1N1 PR8 为本实验室保存。A/

Shanghai/4664T 为 H7N9 患者分离株。病毒经 MDCK 细胞和鸡胚培养滴定后, -80°C 储存备用, 实验均在动物生物安全三级实验室 (ABSL-3) 中进行 [高致病性病原微生物实验室资格证书编号为卫 BSL3-007; 中国合格评定国家认可委员会实验室认可证书编号为 NO. CNAS BL0016], 实验方案经过本单位动物伦理委员会审查。

1.2 动物

实验动物均选用 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6 ~ 8 周龄 (体重 18 ~ 20 g)。购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [SCXK(沪)2008-0016]。

1.3 感染方案

将 BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 即 H1N1 PR8 感染组、H7N9 感染组和 PBS 对照组, 每组 10 只, 每笼 5 只, 标记后分别称重。小鼠经七氟烷轻度麻醉后, 滴鼻感染小鼠, 每只小鼠感染病毒或 PBS 的量为 50 μL , 病毒剂量为 5×10^3 TCID₅₀/只, 置独立送风隔离笼具 (IVC) 中正常饲养, 逐日观察小鼠发病情况, 记录体重及大体变化。

1.4 动物取材

每日观察感染小鼠的活动状态及临床表现, 称量体重, 每组感染小鼠分别于感染后第 3 天和第 7 天脱臼处死, 每组每个时间点处死 3 只, 剩余小鼠继续观察体重及死亡情况。处死后小鼠取其肺脏, 取左上肺叶于组织裂解液中用于提取组织 RNA; 左肺下叶于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 剩余肺叶于冻存管置 -80°C 冰箱中备份保存。

1.5 肺组织总 RNA 提取及 PCR 检测

使用 Total RNA 抽提试剂盒 (QIAGEN, 美国)

表 1 H1N1 PR8 和 H7N9 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of H1N1 PR8 and H7N9 virus

引物名称 Name of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primer	片段长度 Fragment length	退火温度 T _m (°C)
H7-F	5'-CAA TGT GTC CGT CGT GGA TCT-3';	87 bp	60
H7-R	5'-GTC CTC AGT GTA GCC CAA GAT G-3';		
H7-P	5'-6-FAM-CGT GCC GCC TGG AGA AAC CT CC-TAMRA-3'		
FluA-F	5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3'	106 bp	60
FluA-R	5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA-3'		
FluA-P	5'-FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-TAMRA-3'		

抽提组织中的总 RNA,抽提产物用微量分光光度计(Nanodrop 1 000, 美国)测定核酸浓度(OD₂₆₀/OD₂₈₀)后,加 RNAase-free DNase I 37°C 放置 20 min,然后 65°C 放置 10 min。纯化后的样本用 One-step RT-PCR kit(TaKaRa, 大连宝生物)进行检测,扩增体系为 25 μL:12.5 μL TaqMan PCR 基础液,400 nmol/L 引物和 300 nmol/L TaqMan 探针,2.5 μL RNA 模板。将 96 孔板子放入荧光定量 PCR 仪(Eppendorf Master cycler eprealplex, 德国)。扩增程序:42°C 10 min;95°C 1 min;95°C 15 s,60°C 45 s,45 个循环。

1.6 肺组织病理检测

取小鼠肺组织,4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察其病理变化。

1.7 统计学方法

小鼠的体重变化($\text{weight}_{\text{infected day}} - \text{weight}_{0 \text{ day}} / \text{weight}_{0 \text{ day}} \times 100\%$),肺指数($\text{weight of lung} \times 100 / \text{bodyweight}$)。用统计学软件 GraphPad Prism Software 5.0 对组间差异应用 t 检验分析。

2 结果

2.1 小鼠感染后症状及大体观察

正常 PBS 组小鼠皮毛光泽,反应灵敏,饮食饮水正常,活动正常,体重增长。H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组小鼠于感染后第 2 天体重开始下降,感染后第 3 天开始出现竖毛、聚集成堆、反应迟钝、呼吸急促、食欲减退以及活动度下降严重。H1N1 PR8 感染组小鼠在感染后第 5 天开始死亡,对照组小鼠未见异常。在感染后 7 d 内 PBS 组小鼠体重逐渐升高,H1N1 PR8 组和 H7N9 组逐渐减低,H1N1 PR8 组较 H7N9 组降低更为明显,H1N1 PR8 感染组在第 7 天降到 30% 以上,H7N9 感染组降到 20% 以上(图 1);H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组小鼠在感染后第 7 天肺指数较第 3 天高,PBS 对照组无显著变化。感染后 3 d H1N1 PR8 组小鼠肺指数与

H7N9 组和 PBS 组相比显著增高($P < 0.05$),感染后 7 d H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组小鼠肺指数较 PBS 对照组相比显著增高($P < 0.05$)(图 2)。

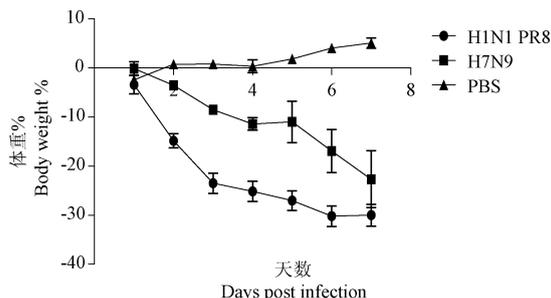
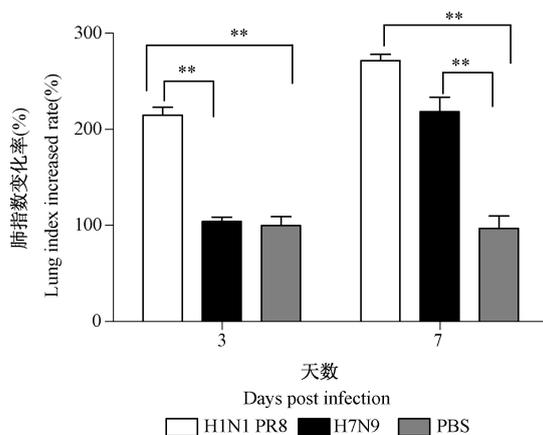


图 1 各组小鼠感染后体重增减情况

Fig. 1 The body weight change of infected mice in each group



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠感染后肺指数变化

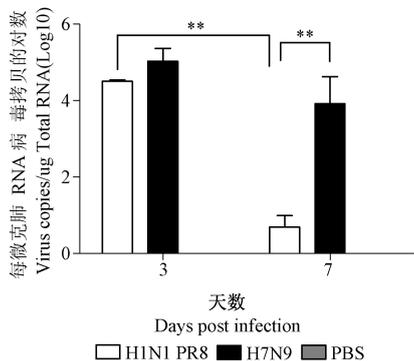
Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 2 The lung index change of infected mice in each group

2.2 感染小鼠肺组织病毒载量测定

感染后的各组小鼠,于感染第 3 天和第 7 天处死,取肺组织匀浆上清进行病毒载量分析。结果显示 PBS 组检测阴性,未检出病毒。H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组检测均为阳性,其病毒载量在感

染后第 3 日均为最高,第 7 日均降低,H1N1 PR8 感染组降低显著($P < 0.05$),H7N9 感染组降低不明显($P > 0.05$)。H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组小鼠病毒载量在感染后第 3 天无显著差异,第 7 天 H7N9 感染组显著高于 H1N1 PR8 感染组($P < 0.05$)。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠感染后肺内病毒载量变化

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 3 The lung viral load comparison of infected mice in three groups

2.3 感染小鼠病理组织学观察

2.3.1 肉眼观察

正常对照组小鼠肺脏呈淡粉红色,质地柔软,肺叶表面光滑润泽,无充血区。H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组均出现不同程度的肺脏病理改变,充血现象明显,呈现暗褐色外观,肺重增加。感染后 3 d H1N1 PR8 感染组小鼠肺脏病变面积达 10%,H7N9 感染组小鼠未见显著病变,感染后 7 d H1N1 感染 PR8 感染组小鼠病变面积达 95% 以上,H7N9 感染组小鼠病变面积只有 80% 左右。

2.3.2 镜下观察

正常对照组病理学检查,肺间质未见炎性细胞浸润,肺泡大小正常,无扩张及萎缩,肺泡间隔不增宽,各级支气管上皮完整无渗出物,毛细血管无充血、出血现象,仅在小支气管周围有少量淋巴细胞(彩插 10 图 4A,D)。H1N1 PR8 感染组和 H7N9 感染组均出现了一定程度的病理改变,在感染后 3 d H1N1 PR8 感染组主要改变轻度的炎症细胞浸润和水肿(彩插 10 图 4B);H7N9 感染组主要是轻度的炎症细胞浸润(彩插 10 图 4C)。在感染后 7 d H1N1 PR8 感染组主要改变是肺组织肺泡间隔增宽,肺内小血管及肺泡间隔的毛细血管扩张、淤血,肺泡腔不同程度缩小,出现大面积肺水肿(彩插 10

图 4E);H7N9 感染组主要是大量炎症细胞浸润,包括淋巴细胞和单核细胞的浸润,肺泡腔不同程度缩小,小部分区域出现实变(彩插 10 图 4F)。

3 讨论

BALB/c 小鼠是流感病毒研究中使用最为广泛的哺乳动物模型之一^[7-8],采用 H1N1 PR8 感染 BALB/c 小鼠建立流感动物模型有很多报道^[9-10],近期有 H7N9 成功感染 BALB/c 小鼠的报道^[11]。本研究主要是研究在同一感染剂量下,H1N1 PR8 和 H7N9 病毒感染后小鼠的发病特点是否存在差异。

研究结果发现 H1N1 PR8 和 H7N9 感染后小鼠在大体病变、病毒复制水平和病理病变等方面均存在一定程度的差异。从大体观察表现来看,H1N1 PR8 感染小鼠和 H7N9 感染小鼠在感染的 7 d 内体重均降低,但 H1N1 PR8 感染小鼠更明显;H1N1 PR8 感染小鼠的肺指数在感染后第 3 天的肺指数就已经增高,H7N9 感染小鼠的肺指数在感染后第 7 天才增高。且 H1N1 PR8 感染小鼠在感染后第 5 天出现死亡,而 H7N9 感染小鼠未出现。病理结果也显示在感染后第 3 天时 H7N9 感染小鼠病变较轻,总体来看 H1N1 PR8 感染小鼠比 H7N9 感染小鼠病变重。这可能最主要的原因因为 H1N1 PR8 为国际标准的鼠适应株,小鼠对其反应比较敏感,在同等剂量下病变明显;H7N9 病毒为临床分离株,对小鼠可以致病,但鼠适应性较差。

从病毒复制水平来看,H1N1 PR8 感染小鼠病毒载量在感染后第 3 天达最高后,第 7 天显著降低,而 H7N9 感染小鼠在感染后第 3 天达最高后,第 7 天没有显著降低。这可能是小鼠对 H7N9 病毒的清除能力较弱。病理结果提示 H1N1 PR8 感染小鼠和 H7N9 感染小鼠在感染的 7 d 病变均较为严重,但 H7N9 感染小鼠病变主要是炎症细胞浸润,而 H1N1 PR8 感染小鼠除炎症细胞浸润外,还有大面积的水肿。这可能是由于不同毒株触发的小鼠免疫机制存在不同而造成的。

综上所述,本次研究通过选用 H1N1 PR8 和 H7N9 感染 BALB/c 小鼠,发现小鼠在两种不同毒株感染下均可发病,但发病特点有所差异,由于 H7N9 未经过鼠适应性,因此对小鼠的致病性不是很高,但在小鼠体内的复制力很强,可以保持一段很长的时间,而 H1N1 PR8 则是致病性很强,但病毒迅速降

低。这两种病毒不同的致病特点将为 H7N9 致病机制与防治的研究提供初步线索,但是相关机制仍需进一步深入研究。本研究结果提示,由于 H7N9 病毒对鼠的适应性比 H1N1 PR8 差,后续用 BALB/c 小鼠进行药效和疫苗评价研究时需要考虑提高病毒滴度。

参考文献:

- [1] Cowling BJ, Jin L, Lau EH, *et al.* Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China; a population-based study of laboratory-confirmed cases [J]. *The Lancet*, 2013, 382(9887):129-137.
- [2] Xiang N, Havers F, Chen T, *et al.* Use of National Pneumonia Surveillance to Describe Influenza A (H7N9) Virus Epidemiology, China, 2004 - 2013 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(11). doi: 10.3201/eid1911.130865. CrossRef.
- [3] 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.
- [4] http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/rgrgzbxqlg_5295/rgrqlgyp/201305/t20130503_80728.htm.
- [5] Liu D, Shi W, Shi Y, *et al.* Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses [J]. *Lancet*, 2013, 381(9881):1926-1932.
- [6] Ai J, Huang Y, Xu K, *et al.* Case-control study of risk factors for human infection with influenza A (H7N9) virus in Jiangsu Province [J]. *Euro Surveill*, 2013, 18(26):20510 CrossRef.
- [7] 刘颖,邓巍,徐艳峰,等. 甲型 H1N1 流感病毒感染不同免疫缺陷小鼠的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(12):1-5.
- [8] 彭春香. 小鼠模型在不同亚型流感病毒致病性及跨种传播研究中的应用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(12):154-158.
- [9] 张炬榕,王涛,申元英,等. 甲型流感病毒感染 BALB/c 鼠动物模型的建立 [J]. *大理学院学报*, 2007, 6(10):25-27.
- [10] 鲍琳琳,孙惠惠,占玲俊,等. 甲型 H1 N1 流感病毒感染小鼠的发病机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(2):20-22.
- [11] Zhaoqin Zhu, Yuqin Yang, Yanling Feng, *et al.* Infection of inbred BALB/c and C57BL/6 and outbred Institute of Cancer Research mice with the emerging H7N9 avian influenza virus [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2013, 2:1-7.

[修回日期] 2013-11-20