

H7N9 禽流感病毒在小鼠体内的适应性

李枫棣, 鲍琳琳, 朱 华, 邓 巍, 许黎黎, 吕 琦, 秦 川

(中国医学科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 进一步探讨 H7N9 禽流感病毒对哺乳动物的感染与致病能力, 并对其分子机制进行研究。**方法** 以病毒滴鼻感染小鼠, 在 BALB/c 小鼠肺组织中连续传代, 通过病毒全基因组测序及比对探寻适应的分子机制。**结果** 禽流感 H7N9 A/Anhui/1/2013 病毒, 经过在小鼠体内进行 9 次传代后, 对鼠肺适应株与野生型毒株进行基因比对, 发现适应株 HA 基因, NA 基因以及 PA 亚基共发生了 4 个有义突变。**结论** 禽流感 H7N9 A/Anhui/1/2013 病毒经连续传代后基因发生突变, 但对病毒的毒力以及致病力影响仍需后续实验验证。

【关键词】 H7N9 禽流感病毒; 连续传代

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0056-03

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2014.001.013

Adaption of H7N9 avian influenza viruses in mice

LI Feng-di, BAO Lin-lin, ZHU Hua, DENG Wei, XU Li-li, LV Qi, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine,
Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To discuss the infective and pathogenic ability of H7N9 avian influenza virus in mammals. **Methods** The mice model was induced by nose dropping method with influenza virus, by continuous passage in the lung tissue of BALB/c, to get the adaption of seasonal H1N1 in mice and seasonal influenza virus infection model, the lung index and death rate was observed. **Results** After 9 times continuous passage in the lung tissue of BALB/c, Genome sequencing and alignment indicate that the HA gene, NA gene and PA gene was mutated. **Conclusion** H7N9 Avian influenza virus A/Anhui/1/2013 gene mutation occurs after continuous passage, but the virulence and pathogenic effects of the virus still need further verification.

【Key words】 H7N9 Avian influenza viruses; Continuous passage

禽流感(avian influenza, AI)是由 A 型流感病毒(avian influenza virus, AIV)感染引起的禽类全身性或呼吸器官性传染病^[7]。禽流感病毒(AIV)属甲型流感病毒。流感病毒属于 RNA 病毒的正黏病毒科,

分甲、乙、丙 3 个型,其中,甲型流感病毒依据血凝素(HA)的不同再分为 1~16 亚型,根据病毒神经氨酸酶(NA)的不同再分为 1~9 亚型,HA 不同亚型可以与 NA 的不同亚型相互组合形成不同的流感病

【基金项目】 十二五重大专项(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】 李枫棣(1983-), 硕士生, 研究方向: 比较医学。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

毒。其中甲型流感病毒多发于禽类,一些亚型也可感染猪、马、海豹和鲸等各种哺乳动物及人类;乙型和丙型流感病毒则分别见于海豹和猪的感染,引起禽流感综合征的 A 型流感病毒称之为禽流感病毒^[1]。禽流感病毒是引起禽类一种急性高度接触性传染病,属于甲型流感病毒中的多种亚型。1878 年意大利首次报道了禽流感。禽类特别是水禽是所有这些流感病毒的自然宿主,H7N9 亚型禽流感病毒是其中的一种。H7N9 亚型禽流感病毒既往仅在禽类中发现,荷兰、日本及美国等地曾发生过禽间暴发疫情,但未发现过人的感染。2013 年 3 月,上海、浙江以及安徽等地陆续发现人感染 H7N9 亚型禽流感病毒^[2]。本文旨在通过全基因组序列测定及比对,对 H7N9 禽流感病毒在小鼠体内的适应性进行研究,并对其毒力与致病力进行讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:4 周龄 SPF 级雌性 BALB/C 小鼠 36 只,体重 9~11 g,来自中国人民解放军军事医学科学院动物中心(SCXK-(军)2007-005)。

1.1.2 毒株:禽流感 H7N9 病毒 A/Anhui/1/2013,由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所提供。

1.1.3 实验场所:中国医学科学院医学实验动物研究所 ABSL-3 实验室(注册号:CNAS BL0010)。

1.2 方法

1.2.1 将动物分成 9 组,每组 3 只,以滴鼻方式进行攻毒,50 μL /只,第一次攻毒使用毒株为禽流感 H7N9 病毒 A/Anhui/1/2013, $10^6\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 。攻

毒后第 4 天摘眼球取血,安乐后解剖取肺组织,生理盐水涮洗后剪成 2 mm 左右小块,放入含 10% FBS 的 DMEM 培养基中稍作研磨后 3 000 r/min 离心取上清,进行再次滴鼻攻毒,50 μL /只,直至第 9 代。

1.2.2 病毒载量测定:使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen) 试剂盒提取每一代小鼠肺组织匀浆上清的总 RNA,并及时分装保存于 -80°C 。使用 Superscript III (Invitrogen) 试剂盒对 RNA 样品进行逆转录后,取 2 μL 样品进行 SYBR Green 染料法荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测。Real-time PCR 扩增反应在 StepOne PCR system (ABI) 上进行,总反应体积为 20 μL ,其中:去离子水 6 μL , 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (ABI) 10 μL , 10 μM 的上、下游引物各 1 μL ,引物序列为:

InfA-F: 5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3';

InfA-R: 5'-AGGGCATTYTTGGACAAAKCGTCTA-3'。

Real-time PCR 反应条件为: 94°C for 3 min (\times 1), 94°C 30 s (\times 35), 58°C 30 s (\times 35), 72°C 30 s (\times 35)。

1.2.4 基因组测序和比对:对所有的野生型和适应株病毒的基因片段进行高保真 PCR 扩增(KOD plus DNA polymerase, TOYOBO)。PCR 产物纯化和测序后使用 CLUSTAL W (version 1.83) 软件进行比对。

2 结果

2.1 病毒载量测定

感染野生型和鼠肺适应株病毒的小鼠在感染后第 4 天解剖,肺组织中均检测到病毒载量,载量一直保持在接近同一数量级。结果如图 1 所示:

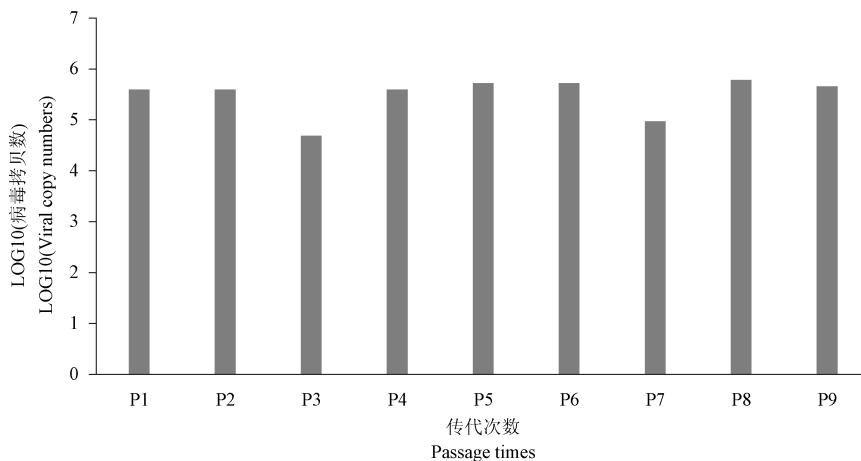


图 1 小鼠感染禽流感 H7N9 A/Anhui/1/2013 病毒后第 4 天肺组织中病毒载量

Fig. 1 RT-PCR results of mice which challenged with H1N1 H7N9 A/Anhui/1/2013 viruses of each passage

2.3 基因比对

经过基因比对发现小鼠适应株 P1 的 NA 蛋白, P9 的 HA 蛋白, NA 蛋白以及 PA 蛋白共发生 4 处突变, 分别为: HA 蛋白 143 位的 Ala 突变为 Thr; NA 蛋白 10 位的 Thr 突变为 Ile, 168 位的 Ser 突变为 Ile; PA 蛋白 4 位的 Phe 突变为 Cys 其余基因未出现突变情况。具体结果如表 1 所示。

表 1 禽流感 H7N9 A/Anhui/1/2013 病毒及小鼠适应株基因比对结果

Tab.1 Sequence alignment of H7N9 A/Anhui/1/2013 virus and mouse-adapted viruses of each passage

Gene	突变位点 Mutation (nt)			
	HA	NA		PA
AH1	G	C	G	T
P1	G	T	G	T
P2	G	T	G	T
P3	G	T	G	T
P4	G	T	G	T
P9	A	T	T	G
nt	427 GCA-ACA	29 ACT-ATT	503 AGC-ATC	11 TTT-TGT
aa	143 Ala-Thr	10 Thr-Ile	168 Ser-Ile	4 Phe-Cys

注: AH1, H7N9 A/Anhui/1/2013 病毒; P, 小鼠适应株; nt, 核苷酸; aa: 氨基酸。

Note: AH1, H7N9 A/Anhui/1/2013 virus; P, mouse-adapted; nt, nucleotide; aa: amino acid.

3 讨论

流感病毒属 RNA 病毒类的正黏病毒科, 是引起呼吸道感染的重要病原体^[2]。流感病毒所致呼吸道感染是临床常见病、多发病, 常引起地方性流行, 有时可致世界性大流行。因为小鼠与人类在肺炎上病理表现的一致性^[4], 基于流感病毒的小鼠模型为近年来研究病毒的致病机制、病毒跨物种传播、病毒重组预测、新型流感病毒疫情预测、治疗方案的评价、药物和疫苗的筛选评价等方面的研究的重要工具之一^[5]。许多相关文献已经报道过很多影响流感病毒毒力的因素, 血凝素 HA 是影响病毒毒

力的主要因素之一^[5]; NA 蛋白茎部 0 ~ 52 个氨基酸变化与流感病毒的致病力有关。另外根据已有的大量报道, PA 亚基被发现不但参与病毒复制过程, 而且还参与病毒 RNA 转录、内切核酸酶活性、蛋白酶活性以及参与病毒粒子组装等多种病毒活动过程^[6]。在此研究中, 小鼠适应株 P1 的 NA 蛋白, P9 的 HA 蛋白, NA 蛋白以及 PA 蛋白共发生 4 处突变, 分别为: HA 蛋白 143 位的 Ala 突变为 Thr; NA 蛋白 10 位的 Thr 突变为 Ile, 168 位的 Ser 突变为 Ile; PA 蛋白 4 位的 Phe 突变为 Cys。三个与病毒致病性和毒力相关的位点均发生了突变, 但经传代后的病毒毒力与致病力是否改变仍需后续实验验证。

参考文献:

- [1] 沈蕊华, 李子华. 禽流感病毒[J]; 海峡预防医学杂志; 2002 (8): 28 - 29.
- [2] 杨飞飞, 蒋琳, 金嘉琳, 等; 上海市人感染 H7N9 禽流感性感冒死亡一例报道及相关文献综述[J]; 中华传染病杂志; 2013 (1): 197 - 200.
- [3] Tang JW, et al. Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans [J]. Infect Dis Clin North Am. 24 (3): 603 - 617.
- [4] Matsuyama, T., Sweet, C., Collie, M. H. & Smith, H.. Aspects of virulence in ferrets exhibited by influenza virus recombinants of known genetic constitution [J]. Journal of Infectious Diseases 1980, 141, 351 - 361.
- [5] 鲍琳琳, 孙惠惠, 秦川, 等 A/California/7/2009 与 A/California/4/2009 病毒感染力比较[J]. 中国比较医学杂志; 2010 (20): 1, 26 - 28.
- [6] Xiaojing H, Jie Z, Bartlam M, et al. 流感病毒聚合酶 PA 亚基与 PB1 多肽复合体的精细三维结构[J]. 中国基础科学, 2009, 11 (2), 32 - 36.
- [7] 忻悦, 于志君, 程凯慧, 等. H6 亚型流感病毒在小鼠肺内的适应性传代研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7 (009): 641 - 643.

[修回日期] 2013-11-08