



H7N9 禽流感病毒小鼠感染动物模型的建立

朱华, 许黎黎, 鲍琳琳, 邓巍, 陈霆, 吕琦, 李枫棣, 袁静, 徐艳峰, 黄澜,
李彦红, 刘江宁, 姚艳峰, 于品, 雍卫东, 魏强, 张连峰, 秦川

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心,
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 建立 H7N9 禽流感病毒小鼠感染模型。方法 1×10^8 , 1×10^7 或 1×10^6 TCID₅₀ H7N9 禽流感病毒原液(A/Anhui/1/2013)滴鼻感染 BALB/c 小鼠。主要观测指标: 临床症状、死亡率、病理变化、病毒载量和血清抗体检测。结果 被感染的小鼠表现为竖毛、弓背、体重下降; 病理表现为间质性肺炎, 感染后第 2 天开始在呼吸道脱落细胞中检测到病毒; 免疫组化或病毒分离方法在肺、肾、脑、肠、脾等组织检测到病毒; 感染后 14 d 在小鼠血清中血凝抑制试验特异性抗体效价达到 160; 淋巴细胞减少, 中性粒细胞增多。结论 H7N9 感染 BALB/c 小鼠模型与人类禽流感感染疾病的基本特征相似, 为研究该病的发病机制及药物疫苗的研发提供了工作基础。

【关键词】 H7N9 禽流感病毒; 感染; 动物模型; BALB/c 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0018-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.004

Establishment of a mouse model of H7N9 avian influenza A virus infection

ZHU Hua, XU Li-li, BAO Lin-lin, DENG Wei, CHEN Ting, LU Qi, LI Feng-di, YUAN Jing, XU Yan-feng, HUANG-Lan,
LI Yan-hong, LIU Jiang-ning, YAO Yan-feng, YU- Pin, YONG Wei-dong, WEI Qiang, ZHANG Lian-feng, QIN Chuan

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medicine Center,
Peking Union Medical Collage; Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key
Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to establish a mouse model of H7N9 avian influenza A virus infection. **Methods** Seventy SPF healthy female BALB/c mice were used in this study. A/Anhui/1/2013 (H7N9) avian influenza virus was administered by intranasal instillation to BALB/c mice, inoculated in a dose of 50 μ L 1×10^8 , 1×10^7 or 1×10^6 TCID₅₀, respectively, 10 mice in each group. Other 30 mice were used for virus titration and pathological examination. Ten mice were given saline as control group. The changes of body weight, clinical signs and death of the mice were observed every 24 h from 1 to 14 d. Blood and several organ samples were taken for pathological examination, and avian influenza A (H7N9) virus was detected with virus titration and immunohistochemistry (IHC). **Results** The mice developed typical clinical signs including body weight loss, ruffled fur and humped back. The peak of virus shedding from respiratory tract was observed on 2 days post inoculation (d. p. i.), and histopathological examination observed interstitial pneumonia. The virus was also detected in the brain, liver, spleen, kidney and intestine from inoculated mice. The inoculation of H7N9 virus elicited seroconversion titers up to 160. There was reduction of lymphocytes and increase of neutrophils in the blood. **Conclusions** The mouse model of H7N9 avian influenza virus infection established in this study show similar signs of human avian influenza. Therefore, it provides a useful working basis for research of the pathogenesis, drug development, and vaccine evaluation of this disease.

【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】 朱华, 副主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。Email: zhuh@cnilas.org

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。研究方向: 病理与病理生理学 Email: chuanqin@vip.sina.com

【Key words】 H7N9 avian influenza virus; Infection; Animal model; BALB/c mouse

2013 年 2 月 19 日上海出现第一例呼吸道感染患者并且死亡,同年 3 月 31 日,中国疾病预防控制中心在 3 例患者标本中分离出甲型 H7N9 禽流感病毒并首次进行报道^[1]。截止到 2013 年 5 月 30 日世界卫生组织公布 H7N9 禽流感确诊 132 人,死亡 37 人^[2]。甲型 H7N9 禽流感病毒与以往的禽流感病毒有何不同?是固守在动物中流行还是像 H1N1 病毒一样变异后适应于人类并导致流行?这些问题并不清楚。因此,研制合适的禽流感 H7N9 感染疾病动物模型成为阐明其致病机制并开发出有效疫苗和药物的重要工作。本文将使用 BALB/c 小鼠建立 H7N9 禽流感病毒感染疾病动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 70 只,体重 13~15 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】提供。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全三级实验室中【卫 ABSL3-021】进行。并通过了中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物伦理委员会的审查,批准号【ILAS-PS-2013-006】。

1.1.2 毒株

A/Anhui/1/2013 (H7N9) 禽流感病毒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 仪器和试剂

血常规检测仪器:Beckman ACT TM Coulter, USA。麻醉用盐酸氯胺酮,沈阳兽药厂,批号 20130325;免疫组化试剂:甲型流感病毒 NP 蛋白小鼠单抗,IRR 公司,货号 FR-51。二抗及 DAB 显色剂为北京中杉金桥产品,货号 PV-9001, ZLI-0001。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

小鼠按照体重随机分为生理盐水对照组、高、中、低感染剂量组,每组 10 只,分别接种 1×10^8 , 1×10^7 或 1×10^6 TCID₅₀ 的病毒用于观察临床症状和死亡率。另外 30 只小鼠接种 1×10^6 TCID₅₀ 的病毒,分别于攻毒后 1、2、3、5、7 d 随机挑选 6 只安乐死,用于病毒载量检测和组织病理学观察。

1.2.2 攻毒

小鼠用浓度为 20 mg/mL 的盐酸氯胺酮注射液肌肉注射麻醉,麻醉剂量每只小鼠 0.1 mL。将 50 μ L 1×10^8 、 1×10^7 或 1×10^6 TCID₅₀ 的 H7N9 禽流感

病毒原液用移液器滴入小鼠鼻腔;对照组小鼠滴入 50 μ L 生理盐水。接毒后的小鼠正常饲养,供给饲料量为标准日粮,饮水用高压灭菌水,足量供给。

1.2.3 观察指标

攻毒开始前的时刻记为 0 天,攻毒后 14 d 内每隔 24 h 观察一次,包括小鼠的活动、反应性、饮食、呼吸及有无弓背、竖毛、蜷缩、颤抖和死亡等。每天用电子秤测量体重。

1.2.4 病理检查

攻毒后 1、2、3、5、7 d 随机挑选 3 只小鼠安乐死,取心、肝、脾、肺、肾、脑、肠用于病理标本制备,病理标本制备方法采用甲醛固定,石蜡包埋、切片, H. E 和免疫组化染色。免疫组化染色采用 SP 法:一抗稀释度 1:200,4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗;加二抗,室温孵育 10 min, PBS 洗; DAB 显色,苏木素衬染后脱水、透明、中性树脂封片。

1.2.5 病毒载量和抗体测定

攻毒后 1、2、3、5、7 d 随机挑选 3 只小鼠安乐死,用生理盐水对肺组织进行灌洗,取肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 和肺、心、肝、脾、肾、脑、肠等组织接种到 MDCK 细胞,观察细胞病变。攻毒后第 14 天摘取眼球取血,离心取上清,用血凝抑制法 (hemagglutination inhibition test, HI) 进行抗体滴度测试^[3]。

1.2.6 白细胞计数

感染后 1、2、3、5、7 d 摘取小鼠眼球取抗凝血进行白细胞总数和分类计数。

1.2.7 统计学方法

数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据应用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理数据。组间比较采用方差分析的两两 q 检验;率的比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示有统计意义。

2 结果

2.1 症状和体征

三个接种剂量的动物在攻毒后第 2 天体重开始减轻,第 3 天开始出现临床症状,主要表现为精神不振、弓背、蜷缩、竖毛、颤抖、反应差、活动少、扎堆 (图 2, A)。 1×10^8 和 1×10^7 TCID₅₀ 感染的动物第 5~6 天上上述症状加重,且小鼠极度消瘦,体温明显降低,呼吸急促,闭目,鼠尾苍白,并开始出现死亡 (表 1)。到第 14 天,80% 的 1×10^8 TCID₅₀ 感染动物、40%

的 1×10^7 TCID₅₀ 感染动物死亡 (图 1, A)。 10^6 TCID₅₀ 感染动物全部存活, 到第 9 天体重平均下降 28.9%

(图 1, B), 此后精神状态好转, 活动增加, 体重开始逐渐上升, 但竖毛现象一直持续到感染后 14 d。

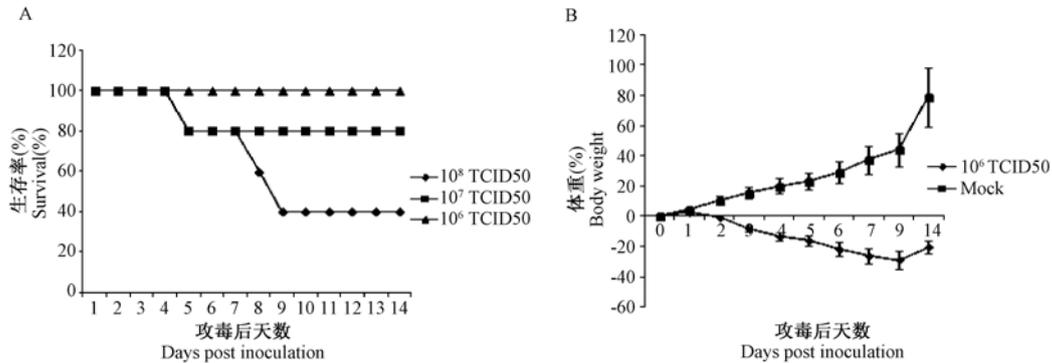
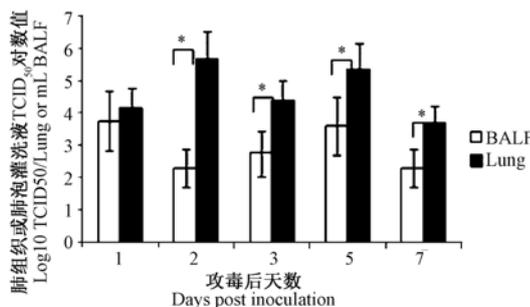


图 1 H7N9 病毒感染后小鼠存活率和体重减轻情况

Fig. 1 Survival rate and body weight changes of the mice inoculated with H7N9 virus

2.2 病毒载量和抗体滴度

从感染后的第 1 天开始到第 7 天都可以从小鼠的肺泡灌洗液和肺组织中检测到病毒。感染后第 2、3、5、7 天在肺组织中检测到的病毒载量高于肺泡灌洗液, 差异有显著性 ($P < 0.05$) (图 2)。肺泡灌洗液中病毒载量峰值出现在感染后第 1 天 (103.75 TCID₅₀), 而肺组织中的病毒载量峰值出现在感染后第 2 天 (105.69 TCID₅₀)。攻毒后第 2 天在脾、肾、第 3 天在肠组织中, 第 5 天在肝中分离到病毒, 脑组织和心脏中未分离出病毒 (表 2)。血凝抑制试验显示, 感染后第 14 天所有被感染小鼠都产生了抗 H7N9 的特异性抗体, 抗体滴度范围 80 ~ 160。



注: * $P < 0.05$, 差异有显著性。

图 2 病毒感染后肺泡灌洗液与肺组织病毒载量比较

Note: Data are presented as mean value \pm S, * $P < 0.05$.

Fig. 2 Virus shedding in the bronchoalveolar lavage fluid and lung tissues of inoculated mice.

2.3 全血白细胞计数

如表 3 所示, 感染第 2 天起到第 7 天, 被感染小鼠的白细胞总数减少, 与攻毒前比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。分类计数结果显示, 在感染的第 2 天, 淋巴细胞数量减少而中性粒细胞数量增加, 与攻毒

表 1 小鼠感染后临床症状

Tab. 1 Clinical signs in the mice

时间/d Time (d. p. i.)	临床症状 Clinical signs		
	体重降低 Weight loss	竖毛 Ruffled fur/只	死亡 Mortality
1	3/10	0/10	0/10
2	8/10	0/10	0/10
3	9/10	7/10	0/10
5	8/10	10/10	0/10
7	8/10	10/10	0/10

注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 小鼠感染后病毒载量结果

Tab. 2 Replication of H7N9 virus in the mice

肺泡灌洗液 BALF ^c	肺 Lung	脑 Brain	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肾 Kidney	肠 Intestine
3.75 (4/6) ^d	4.15 (4/6)	-	-	-	-	-	-
2.31 (5/6)	5.69 (5/6)	-	-	-	1.25 (2/6)	1.88 (4/6)	-
2.75 (6/6)	4.38 (6/6)	-	-	-	-	-	0.69 (5/6)
3.58 (6/6)	5.38 (6/6)	-	-	0.58 (2/6)	-	-	-
2.31 (6/6)	3.69 (6/6)	-	-	-	-	-	-

表 3 白细胞计数结果

Tab. 3 White blood cell counts of the blood

时间 Time (d. p. i.)	白细胞总数 WBC	淋巴细胞 百分比/% LY	中性粒细胞 百分比/% NE
-1	12.0	78.4	12.5
1	11.4	64.4	23.3
2	6.9*	48.7*	43.8*
3	5.5*	62.5	27.1
5	6.8*	77.1	15.7
7	5.3*	64.6	21.5

注: * $P < 0.05$, 与攻毒前比较

note: * $P < 0.05$ compared with the values of that before virus inoculation

前比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.4 病理学检查

感染后第 3 天至第 7 天,大体解剖可见 10^6 TCID₅₀ 感染动物肺组织呈现肺炎的病理改变:肺组织呈暗褐色外观,肺叶上有大小不等的实变区(图 3, B)。心、肝、脾、肾、脑、肠未见肉眼可见病变。显微镜下:感染后第 1 天即出现间质性肺炎的表现,主要变现为炎细胞浸润和炎性渗出物(图 4, E),第 3 天开始出现结构破坏,主要表现为肺间质充血、水肿和淋巴细胞浸润;血管周围淋巴细胞浸润,毛细血管扩张;终末细支气管上皮细胞变性、坏死、脱落,并有充血和单核细胞浸润(图 4, F);呼吸性细支气管内有出血和炎性渗出物,管壁不完整,溶解、脱落;肺泡中有出血和单核细胞浸润,有的肺泡溶合,肺泡间隔增宽(图 4, G);肺泡壁毛细血管充血、炎细胞浸润,部分病灶融合;肺泡腔内可见炎细胞及纤维素渗出(图 4, H)。免疫组化染色在肺、肾、脑、小肠等组织中检测到病毒,阳性细胞主要分布在肺组织的支气管上皮细胞(图 4, A)、脑组织的脉络膜细胞(图 4, B)、小肠黏膜柱状上皮细胞(图 4, C)和肾组织的小管上皮细胞内(图 4, D)。图 3、4 见彩插 8。

3 讨论

理想的禽流感动物模型,首先应该能够较全面的复制禽流感疾病的各项临床表现和病理变化,并且在病情进展与疾病转归上与临床病例相类似,还要求从人工感染的实验动物体内能重新获得禽流感病毒。我们的实验结果显示,感染的第 2 天开始动物就出现竖毛、弓背、反应迟钝、食欲减少、消瘦、体重下降等临床症状, 10^7 、 10^8 TCID₅₀ 感染动物陆续出现死亡,与人感染 H7N9 禽流感病毒后很快表现出急性流感样呼吸症状相似^[3]。临床资料显示被 H7N9 病毒感染的病人一般白细胞不高或降低,重症病人会出现白细胞和淋巴细胞的减少^[4],通过对全血白细胞进行计数,感染第 2 天起,被感染小鼠的白细胞总数减少,感染第 2 天,淋巴细胞数量减少而中性粒细胞数量增加,结果与感染病人的临床表现类似。

本次实验结果显示, H7N9 流感病毒在肺组织中的复制高峰期是在感染后的第 2 到第 5 天,此后病毒复制开始下降。被感染小鼠的肺、脑、肝、脾、肾中都分离或用 IHC 法检测到病毒,提示 H7N9 禽流感病毒的感染是广泛的。这与 H7N9 禽流感病毒感染其他动物的病毒分布情况基本一致^[5-7]。在小鼠肺中分离病毒的比率较其他器官高,这可能与病毒经过鼻腔接种后首先感染肺有关。另外,从病理变化也知道感染小鼠的肺部病变最严重,验证了禽流感病毒以肺为靶

器官,以肺巨噬细胞和气管上皮细胞为其靶细胞的报道^[8,9]。有报道在用 H7N9 禽流感病毒感染小鼠、雪貂中可观察到神经症状和分离到病毒^[5]。我们在被感染小鼠的脑中也用 IHC 法检测到了病毒,提示 H7N9 禽流感病毒有一定的嗜神经组织性。未在脑组织中分离到病毒可能与取材部位有关。

病理检查可见感染小鼠肺间质增宽,炎细胞浸润,间质血管扩张充血;肺泡腔内水肿液及炎细胞渗出;细支气管黏膜脱落坏死,与临床报道的禽流感病毒感染的尸检病人肺脏病理改变相似^[8]。

由于动物种系的差别,本实验建立的小鼠模型未观察到人类 H7N9 禽流感病毒感染疾病的发热表征,但在临床表现、体重变化、死亡率、病理改变、病毒复制指标等方面都能达到禽流感病毒疾病模型的造模要求,符合人类禽流感感染疾病的基本特征。此模型对研究 H7N9 流感病毒作用机制,评价药物治疗效果等具有重要的意义。

(本文图 3、4 见彩插 8。)

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] WHO/GIP. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H7N9) reported to WHO [DB]. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/08_reportWebH7N9Number.pdf
- [3] World Health Organization; Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [R]. Geneva, Switzerland; World Health Organization 140 p 2011.
- [4] 韩明峰,冉献贵,赵凤德,等. 国内 102 例人感染 H7N9 禽流感特点初步分析 [J]. 传染病信息 2013, 26(2):68-71.
- [5] 董晓毅,孙长贵. H7N9 禽流感病毒感染及其实验室诊断 [J]. 实验与检验医学, 2013, 31(2):105-108.
- [6] Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice [J]. Nature, 2013. Jul 10. doi: 10.1038/nature12391 [Epub ahead of print]
- [7] Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, et al. Infectivity, transmission and pathology of human H7N9 influenza in ferrets and pigs [J]. Science 2013, 341(6142):183-186.
- [8] Mok CK, Lee HH, Chan MC, et al. Pathogenicity of the novel A/H7N9 influenza virus in mice [J]. MBio 2013, Jul 2;4(4). pii: e00362-13. doi: 10.1128/mBio.00362-13.
- [9] Kuken T, Rimmelzwaan GF, Amerongen GV, et al. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques [J]. Vet Pathol, 2003, 40:304-310.
- [10] Huang R, Deng S, Wu Y, et al. A nonhuman primate model for evaluation of pathogenesis and immunity to avian influenza A (H5N1) virus [J]. J Am Assoc Lab Animal Sci, 2007, 46(4):97-98.

[收稿日期] 2013-10-15