

雪貂感染流感病毒 H3N2 动物模型的建立

鲍琳琳, 占玲俊, 邓巍, 许黎黎, 朱华, 吕琦, 李枫棣, 秦川

(中国医学科学院实验动物研究所, 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 建立甲型流感病毒 H3N2 感染的雪貂动物模型。方法 按实验要求筛选出流感抗体反应阴性的雪貂, 经兽用氯胺酮轻度麻醉后进行滴鼻感染 H3N2 流感病毒株 A/Brisbane/10/07, 设立两个稀释度 10^6 和 10^7 TCID₅₀, 每个稀释度接种 3 只雪貂, 感染后第 5 天安乐处死。感染前采集鼻甲骨活检, 感染后 1~5 d 鼻甲骨活检检测病毒载量, 每天记录雪貂一般临床变化。处死时取雪貂肺、肝、脾、小肠、脑组织作病毒滴度检测, 肺组织做病理检查。结果 10^6 和 10^7 TCID₅₀ 的 H3N2 病毒分别感染雪貂, 没有雪貂死亡。雪貂感染后都出现一过性的体温升高, 体重的下降, 流涕、打喷嚏等症状。在鼻甲骨活检物中可测到病毒载量, 肠组织可分离到病毒。肺组织以轻度性间质性肺炎为主要病理变化。结论 雪貂感染 H3N2 病毒株 A/Brisbane/10/07 后, 临床表现、病毒学、分子生物学、病理学方面的检测都可以证实雪貂感染 H3N2 病毒动物模型已建立, 其中 10^6 TCID₅₀ 病毒滴度的是一个建立感染动物模型比较合适的剂量。

【关键词】 A/Brisbane/10/07; H3N2; 雪貂; 模型; 动物

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0005-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.08.002

Establishment of a Ferret Model of H3N2 Influenza Virus Infection

BAO Lin-lin, ZHAN Ling-jun, DENG Wei, XU Li-li, ZHU Hua, LV Qi, LI Feng-di, 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 establish a ferret model of H3N2 influenza virus infection. **Methods** Six ferrets were divided into two groups for three each. After anesthetized by ketamine, the ferrets were inoculated intranasally with 500 μ L of 10^6 and 10^7 TCID₅₀ H3N2 A/Brisbane/10/07 influenza virus, respectively. Clinical signs were monitored daily, and body temperature was recorded once every day postinfection. Nasal turbinate biopsies were taken every day from day 0 to postinfection day 5 (d 0 to d. p. i. 5) for real time PCR analysis, the ferrets were euthanized and the lung, liver, spleen, small intestine and brain tissues were harvested at d. p. i. 5. The lungs were further examined by histopathology. **Results** For each virus titer tested, transient elevation of body temperature, weight loss, nasal rattling and sneezing were observed in the infected ferrets, but no ferret died. Virus was detected positively in the nasal turbinates and small intestine from all the infected ferrets. The ferrets inoculated with H3N2 virus showed mild interstitial pneumonia in the lung. **Conclusions** The ferrets were successfully infected with H3N2 influenza virus proved by clinical signs, virus detection, and histological examination. Furthermore, 10^6 TCID₅₀ titer is a more appropriate dose for establishment of a ferret model of

[基金项目] 科技重大专项-艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治: 2009ZX10004-402; 卫生公益性行业科研专项项目: 200802036; 中央级公益性科研院所基本科研业务费: DWS200810。

[作者简介] 鲍琳琳, 助理研究员, 研究方向: 艾滋病免疫治疗。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: chuanqin@vip.sina.com; 张连峰, 教授, 博士生导师。E-mail: zhanglf@cilas.org。

flu H3N2 virus infection.

【Key words】 Influenza virus, H3N2 strain; A/Brisbane/10/07; Ferret; Model, animal

流感病毒具高传染性,且每年在很多国家都会造成区域性的流行。20 世纪曾发生过 4~5 次世界大流行(pandemics),每次间隔 9~39 年;其中以 1918~1919 年期间,H1N1 流感病毒造成 4 500 万人的死亡最为严重^[1]。自 1933 年以来甲型病毒已经历了 4 次抗原转变:1933~1946 年为 H0N1(原甲型,A0),1946~1957 年为 H1N1(亚甲型,A1),1957~1968 年为 H2N2(亚洲甲型,A2),1968 年以后为 H3N2(香港型,A3)。2009 年 8 月,根据香港最近的流感病毒分析,甲型 H1N1 流感占 49%,H3 占 43%,显示两种病毒已成主流。甲型 H3 病毒在香港相当普遍,2008 年主要是 Brisbane 型,2009 年出现的甲型 H3 流感病毒与 Brisbane 型不同,出现基因漂移情况,但应是源自 Brisbane 型的变种。2009 年 8 月,据报道,香港已出现 3 宗因 H3 流感的死亡个案。所以,在系统研究流感,预防和治疗流感任重而道远。

研究流感过程中重要环节就是动物试验,因此流感病毒感染动物模型的合理建立显得尤为重要。雪貂是目前为止最为敏感的流感病毒感染动物模型,本研究应用雪貂建立 H3 流感动物模型,从临床症状到实验室检测多个方面系统的评价雪貂感染后的变化,为研究 H3 流感病毒发病机制评价药物和疫苗奠定基础^[2,5]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株: H3N2 病毒株为 A/Brisbane/10/07,其 HA 效价都为 1:256, 10^7 TCID₅₀/mL,由香港大学陈鸿霖教授惠赠。

1.1.2 动物: 由美国引进去势雪貂(Mustela Putorius Furo)6 只,4~10 月龄,500~1 200 g。实验前进行血清学检查,HI 方法检测 H1N1,H3N2 抗体,抗体阴性为合格雪貂方可入组实验。

1.1.3 试剂: RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司,逆转录试剂盒 SuperScript III First-Strand Synthesis System 购自 Invitrogen 公司,荧光染料 Power SYBR green PCR master mix,48 孔 0.2 ml PCR 反应管 fast optical 48-well RXN plate,及光学反应盖膜 48-well optical adhesive film 25PK 均购自 ABI 公司,实时荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司

StepOne 系列产品。

1.2 方法

1.2.1 雪貂的感染性: 实验在本所的 BSL-2 实验室中进行。将 6 只雪貂随机分为 2 个组,每个组 3 只,每笼 1 只。将雪貂采用兽用氯胺酮轻度麻醉,将流感 A/Brisbane/10/07 病毒株分别以 10^6 TCID₅₀ 和 10^7 TCID₅₀ 滴鼻感染,每只雪貂鼻孔内均匀滴入 500 μ L 病毒液。独立送风隔离笼具中正常饲养。实验的观察期为 5 d。

1.2.2 皮下芯片植入: 实验开始前 2 周,雪貂采用兽用氯胺酮轻度麻醉后,皮下植入芯片,通过芯片录入实验动物编号,每日读取动物体温数值。

1.2.3 临床观察和取样: 实验开始前 1 周每日记录雪貂体温及体重变化作为感染前背景资料。感染后每天记录体温、体重变化、观察并记录有无咳嗽、流涕、呕吐、腹泻、气促、呼吸困难、明显食欲缺乏等临床表现。感染前 0 天,感染后第 1~5 天取鼻甲骨活检物测定病毒载量和病毒滴度。感染后第 5 天安乐处死动物,取动物肺、肝、脾、肺、小肠、脑组织测定病毒滴度,做病理检查。

1.2.4 病毒滴度的测定: 雪貂取肺、肝、脾、小肠、脑组织放入 1 mL DMEM(青霉素、链霉素各 1 000 IU/mL)液中,用匀浆器将组织研磨成乳剂,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。组织上清液 $10 \times$ 连续稀释至 10^{-8} ,接种于单层培养 MDCK 细胞的 96 孔细胞培养板上,每个稀释度接种 4 个重复孔,CO₂ 培养箱中 35℃ 静止培养,观察记录各孔细胞病变(CPE)情况,连续观察 3 d,用 1% 火鸡血球复检,出现凝集反应的结果为阳性^[3]。按照 Reed-Muench 方法计算感染雪貂脏器病毒的 TCID₅₀。

1.2.5 病理学检查: 大体观察,处死动物后,详细观察肺、肠组织的形态变化;病理切片制备,取处死动物的肺、肠组织,10% 甲醛液固定,石蜡包埋,常规病理组织切片处理后,HE 方法染色,镜检观察。

1.2.6 PCR 检测: 鼻甲骨活检物可以直接应用试剂盒 RNeasy mini kit(Qiagen)提取 RNA。鼻甲骨活检物溶于 1 mL DMEM 培养基中,RNA 最终浓度溶于无 RNA 酶的水中,20 mg 肺组织总 RNA 提取物定容于 30 μ L 无 RNA 酶的水中。总 RNA 中取 8 μ L RNA 应用 SuperScript III reverse transcriptase(Invitrogen)逆转录。取 cDNA 2 μ L 应用 Power

表 1 雪貂感染 H3N2 后体重变化
Tab. 1 Changes of the body weight of ferrets infected with H3N2 influenza virus

感染剂量 Infection doses	Days post infection 感染天数							
		0	1	2	3	4	5	
10^6 CID ₅₀	1	718	698	711	684	690	682	
	2	706	713	724	681	687	697	
	3	838	860	858	836	858	862	
H3N2	平均	764 ± 90	757 ± 90	764 ± 81	734 ± 89	745 ± 98	747 ± 100	
	10^7 CID ₅₀	4	741	751	754	765	765	771
		5	776	770	742	762	767	778
		6	816	806	794	775	794	802
	平均	778 ± 38	776 ± 28	764 ± 27	767 ± 6	775 ± 16	783 ± 16	

SYBR green PCR master mix (ABI) 作定量 PCR。引物: BR-10F 5' -gagaatccagcacacaagag-3', BR-10R 5' -tttcaggtcaagagtgtctc-3'。程序: ① 94℃, 3 min; ② 94℃, 30 s, ③ 61℃, 30 s, ④ 72℃, 30 s (②-④运行 35 个循环), ⑤ 95℃, 15 s; ⑥ 60℃, 1 min; 此后运行溶解曲线程序, 95℃, 15 s, 60℃, 1 min; 95℃, 15 s。荧光定量 PCR 仪可直接读取病毒载量结果。

2 结果

2.1 雪貂感染后体重变化

雪貂感染后出现体重下降, 10^6 TCID₅₀ 组由感染后第 1 天一直持续到实验结束, 10^7 TCID₅₀ 组在感染后第 1 天呈现体重下降, 在感染后第 4 天到实验结束体重开始回升, 体重变化见表 1。雪貂感染后体重变化率见图 1。

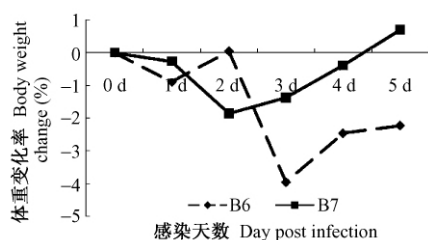


图 1 雪貂感染 H3N2 后体重变化率(%)
Fig. 1 Changes of the body weight of ferrets infected with H3N2 influenza virus (%)

2.2 雪貂感染 H3N2 后体温变化

雪貂感染 H3N2 后出现体温升高, 10^6 TCID₅₀ 组在感染后第 2 天、第 3 天出现体温升高, 10^7 TCID₅₀ 组在感染后第 2 天出现体温一过性升高, 体温变化见图 2。

2.3 雪貂感染后临床表现

雪貂感染 H3N2 后的表现临床评分标准: NIH 提供的雪貂感染实验观察指标分为鼻部症状和活跃度两个部分, 具体指标见表 2。2 组感染的雪貂临

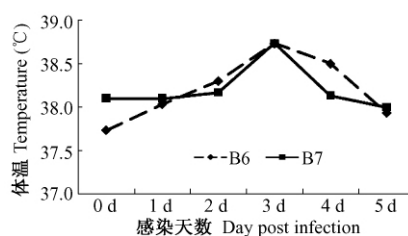


图 2 雪貂感染 H3N2 后体温变化(°C)
Fig. 2 Changes of the temperature of ferrets infected with H3N2 influenza virus

表 2 雪貂感染 H3N2 后临床评分标准:
Tab. 2 Criteria for clinical sign scores in the ferrets after H3N2 influenza virus infection

评分 Score	鼻部症状 Nasal symptoms	活跃度 Activity level (playfulness)
0	无症状 No symptoms	活跃 Fully playful
1	鼻部抽吸或打喷嚏 Nasal rattling or sneezing	仍活动但不如开始活跃 Responds to play overtures but does not initiate play activity
2	流涕无法自控 Nasal discharge on external nares	警觉不活跃 Alert but not playful
3	口式呼吸 Mouth breathing	不活跃不警觉 Not playful, no alert

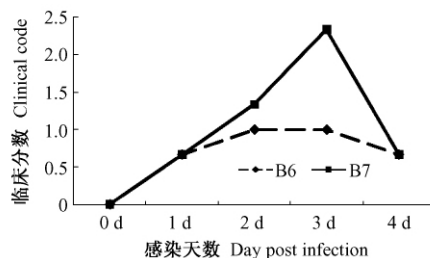


图 3 雪貂感染后临床表现评分(分)
Fig. 3 Scores of clinical signs of the ferrets infected with H3N2 influenza virus

床变化相似, 雪貂在感染后 1 d 出现症状, 主要表现

为流涕、打喷嚏等上呼吸道感染的表现,伴有一定程度的活动度下降。雪貂感染后临床变化情况见图 3。

2.4 感染雪貂病理变化结果

感染 5 d 后,雪貂安乐死解剖,大体观察到肺组织背侧面和腹侧面有散在点状出血灶,其他组织未见异常。镜下观察发现以肺组织轻度间质性肺炎为主要表现,肺组织肺静脉及肺泡壁毛细血管明显扩张充血,部分肺静脉壁及周围组织明显水肿,局部支气管及肺泡上皮细胞坏死、脱落,肺泡腔内可见渗出和漏出的红细胞、水肿液、炎细胞及坏死脱落的上皮细胞碎屑。其他组织未见明显异常(图 4, 见封二)。 10^6 TCID₅₀ 组与 10^7 TCID₅₀ 组肺组织病变差异没有显著性。

2.5 感染雪貂病毒的复制及释放

雪貂感染后,每天取鼻甲骨活检物做病毒滴度测定,结果显示 10^6 TCID₅₀ 组雪貂在感染后第 2 天就可以检测到病毒,滴度为 $10^{2.1}$ TCID₅₀,一直到感染后第 4 天可以检测到病毒,而且观察到鼻甲骨活检物的病毒检测呈现下降的趋势。 10^7 TCID₅₀ 组雪貂在感染后鼻甲骨活检物没有检测到病毒,结果见表 3。以上的结果说明 H3N2 病毒感染雪貂后,出现上呼吸道排毒的现象,而且病毒的复制和释放随着感染的天数呈现下降的趋势。从另外一方面来看,2 个滴度的病毒感染雪貂后,上呼吸道排毒的现象结果不一致在一定程度上显示 10^6 TCID₅₀ 是一个感染雪貂比较合适的剂量。

雪貂在感染后第 5 天安乐处死,取雪貂肝、脾、肺、小肠、脑组织做病毒滴度测定。结果显示肝、脾、肺、脑组织都未分到病毒, 10^6 TCID₅₀ 组雪貂小肠组织的病毒在 $10^{1.8} \sim 10^{2.3}$ TCID₅₀ 之间, 10^6 TCID₅₀ 组在 $10^{1.8}$ TCID₅₀ (表 4)。以上的结果反映了 H3N2 病毒感染雪貂是主要以上呼吸道受到病毒感染为主,肺组织受到病毒感染的程度比较低。肠道组织的高病毒滴度从一定程度可以说明 H3N2 病毒株可以感染呼吸道以外的组织脏器,并在其中复制释放。

雪貂感染后,每天取鼻甲骨活检物做病毒载量测定,结果显示 2 个滴度组雪貂在感染后第 1 天至感染后第 5 天,上呼吸道排毒都呈下降趋势,见图 5。从 10^6 TCID₅₀ 组和 10^7 TCID₅₀ 组雪貂鼻甲骨的病毒载量测定结果来看没有差异。

3 讨论

利用小鼠模型能够进行流感病毒感染、免疫和抗流感病毒药物作用等方面的研究。小鼠作为流感的动物模型会表现为较重的下呼吸道感染的症状(间质性肺炎),有一些人际感染的流感病毒在小鼠身上并不能复制,需要经过多代的适应建立相应的鼠肺适应株才能够感染小鼠。雪貂是目前比较公认的流感适合的动物模型,A 型和 B 型流感病毒都可在雪貂上直接感染不需要经过传代适应。雪貂的解剖结构分为上下气室,有利于研究流感病毒对不同气室的感染。

表 3 雪貂感染后鼻甲骨活检物病毒培养滴度情况(\log_{10} TCID₅₀)

Tab. 3 Virus detection and titration in samples from nasal cavity (virus titer was expressed in \log_{10} TCID₅₀)

感染剂量 Infection doses		感染天数 Days post infection						
		0	1	2	3	4	5	
H3N2	10^6 TCID ₅₀	1	-	2.1	-	-	-	-
		2	-	-	-	+	+	-
	10^7 TCID ₅₀	3	-	-	+	-	+	-
		4	-	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-	-
		6	-	-	-	-	-	-

表 4 雪貂感染后组织病毒培养滴度情况(\log_{10} TCID₅₀)

Tab. 4 Virus culture from tissues of ferrets (\log_{10} TCID₅₀)

感染剂量 Infection doses		肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	小肠 Small intestine	脑 Brain	
H3N2	10^6 TCID ₅₀	1	-	-	-	2.3	-
		2	-	-	-	1.8	-
	10^7 TCID ₅₀	3	-	-	-	2.2	-
		4	-	-	-	1.8	-
		5	-	-	-	1.8	-
		6	-	-	-	1.8	-

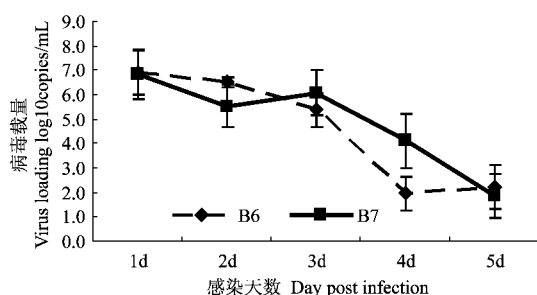


图 5 雪貂鼻中病毒载量变化

Fig. 5 Virus loading from nose of infected ferrets

本次实验中雪貂感染 H3N2 病毒后出现明显的上呼吸道感染的症状,例如体重下降,体温升高,活动度下降,流涕,打喷嚏等,这与人感染季节性流感病毒后的症状是相似的,雪貂感染后肺部病理改变是散在的点状病灶^[4,6]。本试验应用的病毒株是 A/Brisbane/10/07,病毒感染雪貂后,病毒分离结果显示, 10^6 TCID₅₀ 组雪貂鼻甲骨活检物在第 1 天至第 4 天都可以分离到活病毒,这个结果反映了雪貂感染后出现了持续的上呼吸道排毒,并且病毒的排出呈现下降趋势,鼻甲骨活检物病毒载量的结果也与这一结果相吻合。 10^7 TCID₅₀ 的 A/Brisbane/10/07 病毒株感染雪貂后,病毒分离的结果没有显示出上呼吸道排毒现象,病毒载量的结果与 A/HK/43358/09 感染的结果相似,呈现出病毒载量逐天下降的趋势(结果未显示)。这表明 A/HK/43358/09 病毒株的感染力较弱,相比较而言 A/Brisbane/10/07 更适于建立雪貂感染 H3N2 动物模型。A/Brisbane/10/07 病毒株感染雪貂后,解剖大体检查发现肺组织上、中、下肺叶背侧面和腹侧面有散在点状暗红色出血灶,镜下可见肺毛细血管明显扩张充血,周围有水肿,局部支气管及肺泡上皮细胞坏死、脱落,肺泡腔内可见大量渗出和漏出的红细胞、水肿液、炎细胞及坏死脱落的上皮细胞碎屑^[7]。总结几方面的结果发现 10^6 TCID₅₀ 组雪貂的临床症状和病毒分离结果

较 10^7 TCID₅₀ 组更明显, 10^6 TCID₅₀ 的病毒滴度更适用于建立感染雪貂模型。

季节性流感 H3N2 病毒是 A 型流感病毒中比较温和的病毒株,难以感染小鼠,建立小鼠感染动物模型通常需要建立鼠肺适应株^[8]。对于 H3N2 病毒感染机制的研究,药物、疫苗评价需要合适的动物模型,本次试验的结果说明雪貂感染的动物模型在临床表现、病毒复制情况以及实验室检查结果几方面都与人感染流感后结果相似,为 H3N2 流感病毒研究提供了一个研究平台。

参考文献:

- [1] Capua I, and Alexander D J. Avian influenza: recent developments[J]. Avian Pathol, 2004, 33: 393 - 404.
- [2] Belser, Lu XH, Taranna R. et al. Pathogenesis of avian influenza (H7) virus infection in mice and ferrets: enhanced virulence of Eurasian H7N7 viruses isolated from humans[J]. J Virol, 2007, 81: 11139 - 11147.
- [3] Banks J, Speidel EC, McCauley JW, et al. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses [J]. Arch Virol, 2000, 145: 1047 - 1058.
- [4] Bitko V, Musiyenko A, Barik S. Viral infection of the lungs through the eye[J]. J Virol, 2007, 81: 783 - 790.
- [5] 杨松涛,高玉伟,夏咸柱,等. 虎源 H5N1 亚型禽流感病毒感染小鼠模型的建立[J]. 中国病毒学, 2006, 21(4): 253 - 357.
- [6] Dybing J K, Stacey SC, Swayne DE, et al. Distinct pathogenesis of Hong Kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. [J]. J Virol, 2000, 74: 1443 - 1450.
- [7] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101: 1356 - 1361.
- [8] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 156 - 158.

(修回日期)2011-01-20

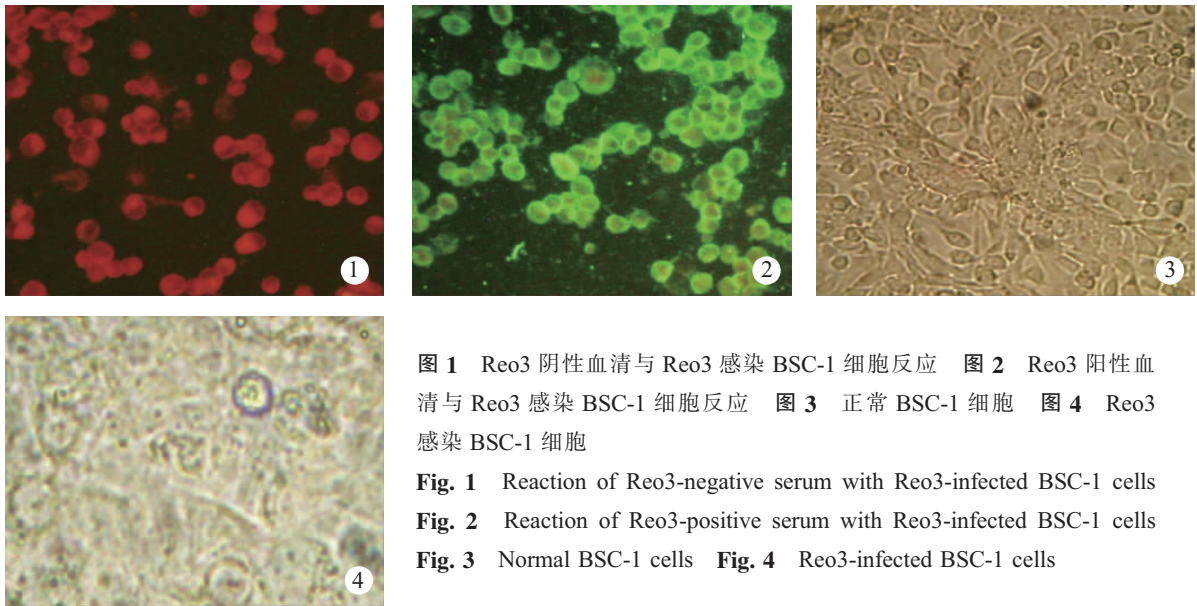
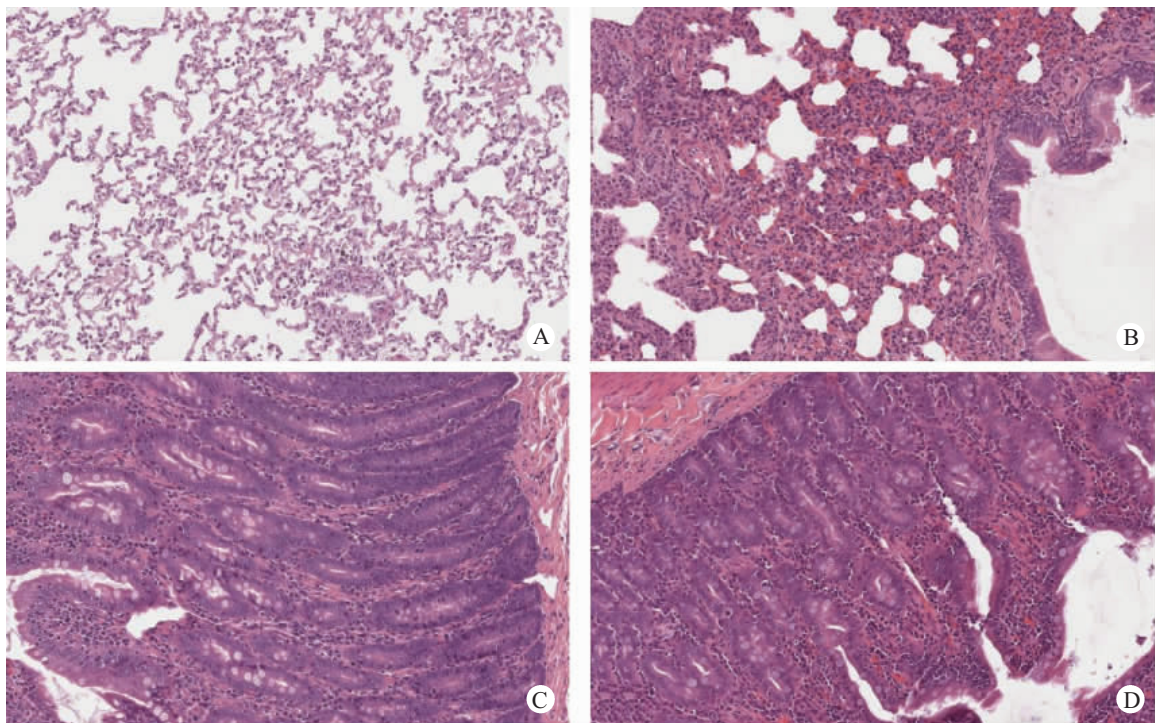


图 1 Reo3 阴性血清与 Reo3 感染 BSC-1 细胞反应 图 2 Reo3 阳性血清与 Reo3 感染 BSC-1 细胞反应 图 3 正常 BSC-1 细胞 图 4 Reo3 感染 BSC-1 细胞

Fig. 1 Reaction of Reo3-negative serum with Reo3-infected BSC-1 cells

Fig. 2 Reaction of Reo3-positive serum with Reo3-infected BSC-1 cells

Fig. 3 Normal BSC-1 cells Fig. 4 Reo3-infected BSC-1 cells



对照组动物的肺(A)、小肠(C)及感染组动物的小肠(D)均未见异常。感染组动物肺脏呈局灶性间质性肺炎改变,局部肺间隔毛细血管扩张充血,炎细胞浸润(B)。A、B、C、D:(HE)。

图 4 感染 H3N2 雪貂的肺及小肠的组织病理学改变

No abnormality is seen in the lung (A) and small intestine (C) of the control ferrets. Focal interstitial pneumonia can be seen in the lung of infected ferrets, showing congestion of capillaries and infiltration of leukocytes in alveolar walls (B). No abnormality is seen in the small intestine in the infected ferrets (D). (HE staining)

Fig. 4 Histological appearance of the lung and small intestine in the ferrets.