

气管插管法接种 H5N1 病毒感染恒河猴 及系统组织病毒检测

吕琦, 邓巍, 鲍琳琳, 许黎黎, 李枫棣, 陈霆, 占玲俊, 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 测试气管插管法接种高致病性禽流感病毒 H5N1 感染恒河猴的优势效果及疾病分析, 为有效感染恒河猴、制备 H5N1 疾病模型提供实验依据。方法 使用人源 H5N1 病毒液经气管插管滴入恒河猴上呼吸道进行感染, 观察感染恒河猴的临床表现, 每天采集咽拭子、鼻灌洗液, 在感染前 2 d 感染后第 3、5、7 天采血, 感染后第 3 和 7 天分别解剖 1 只恒河猴, 取支气管淋巴结、肠淋巴结、鼻甲、心、肝、脾、肺、肾、肠、气管、脑及血液进行病毒分离、核酸载量检测和血常规测定。结果 感染后第 2 天恒河猴出现食欲下降, 活动减少, 并伴有一过性体温升高, 白细胞数和淋巴细胞数下降。咽拭子、鼻灌洗液、肺、心、气管、脑、肝、肾、肠和血液中都能分离到 H5N1 病毒。结论 气管插管法接种 H5N1 病毒能有效感染恒河猴, 并在猴体内多组织中分离、检测到病毒, 为制备完善的 H5N1 模型和检测指标确定、进一步研究 H5N1 病毒的致病机制等奠定了基础。

【关键词】 高致病性禽流感病毒 H5N1; 恒河猴; 病毒血症; 气管插管

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)12-0056-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.012.014

Endotracheal Intubation Inoculation of H5N1 Virus and Detection of Virus in Organ Tissues in the Rhesus Macaques

LV qi, DENG Wei, BAO Lin-lin, XU Li-li, LI Feng-di, CHEN Ting, ZHAN Ling-jun, QIN Chuan

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

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of endotracheal intubation route in preparation of H5N1 virus infection in rhesus macaques and to obtain a more sensitive animal model. **Methods** The rhesus macaques were infected with H5N1 avian influenza virus by endotracheal intubation. Clinical signs were assessed daily, and throat swab, nasal wash, major organs and blood were collected for detection of virus load, isolation and blood routine analysis. **Results** After infection the animals exhibited anorexia, lethargy and transient fever, and the total number of circulating leukocytes and lymphocytes was decreased. Virus isolation, RT-PCR assay of the throat swabs, nasal washes materials showed that the intestine, lung, brain, spleen, kidney, heart and liver were the target of the virus replication and the virus could replicate

[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; 科技重大专项——实验室生物安全保障技术平台的建立: 2009ZX10004-503; 卫生部行业基金——实验动物和人类疾病动物模型资源扩展: 200802036。

[作者简介] 吕琦(1982-) 硕士, 研究方向: 微生物学。

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

in organs outside the lung. In addition, virus was also detected in the blood 3 days after infection. **Conclusions** Rhesus macaques can be infected with H5N1 virus by endotracheal intubation, and it is proved to be a good method to obtain a more sensitive animal model of H5N1 virus infection. The experimental results will lay the foundation for further studies of pathogenetic mechanism of H5N1 infection.

【Key words】 H5N1 virus; Rhesus macaques; viremia; endotracheal intubation

高致病性禽流感病毒 H5N1 的危害不仅在于其能够引起禽类的大量死亡,更严重的是它跨越了物种屏障,多次造成人类感染并引起死亡,致死率高达 60% 以上^[1-2]。人类感染禽流感的风险也随着全球动物禽流感疫情的不断增加而增大,应该引起重视的是,随着病毒的不断变异,能导致人间传播的可能性也在增加,因此对禽流感发病机制研究,以及药物和疫苗的评价筛选成了当务之急,而这些研究都需要合适的动物模型。非人灵长类实验动物以其具有与人类最为相似的生理结构和免疫学应答,已被用作禽流感感染动物模型,但有文献报道该模型对 H5N1 病毒的敏感性较低^[3-4],不能完全模拟人类重症患者的发病特征。考虑到感染途径最有可能影响感染效果,本研究探索应用气管插管的新式感染 H5N1 病毒方法感染恒河猴,旨在改良以往模型的低敏感性,并密集动态检测病毒在体内的分布,为深入研究禽流感发病机制,筛选有效疫苗和治疗药物提供一个良好的技术平台。考虑到人源 H5N1 的高度致病性和感染大动物生物安全的控制要求,本实验在前期实验的基础上,使用 2 只恒河猴,在病毒复制和疾病凸显节点安乐处死动物,系统检测多项组织病毒分布。

1 材料和方法

1.1 病毒毒株

高致病性禽流感病毒 H5N1 A/SZ/406H/2006 株,由 WHO 惠赠,在本实验室经 10 日龄 SPF 级鸡胚传代扩增,MDCK 细胞测定 TCID₅₀ 为 10⁸/mL,液氮中保存备用。

1.2 动物

恒河猴(许可证号: IACUC-MC-07-6011) 年龄 5 岁,雄性,2 只,动物编号为 001 和 002。H5N1、H1N1 和季节性流感病毒抗体经检测均呈阴性。实验前恒河猴麻醉后将体温芯片植入其颈部后方、肩胛骨上方的背中线位置,每天用数据收集器扫描芯片来测量猴的体温。

1.3 方法

1.3.1 病毒感染: 感染前按照 10 mg/kg 复方氯胺

酮肌肉注射给予猴麻醉,待恒河猴肌肉彻底放松后,将其放置仰卧位,用喉镜撑开会厌,通过气管插管将 2 mL H5N1(2×10⁸ TCID₅₀) 病毒液滴入上呼吸道。所有操作均在 ABSL-3 实验室内完成(许可证号: II BSL3-006)。

1.3.2 临床观察: 每天从以下几方面观察恒河猴的感染后症状: (1) 体温,每天上午相同时间点通过芯片读取体温; (2) 鼻部症状,有无流涕; (3) 上呼吸道症状,有无咳嗽、气促、呼吸困难; (4) 消化道症状,有无呕吐、腹泻; (5) 摄食量,有无明显食欲缺乏; (6) 精神状态,有无精神萎靡及活动度减退等症状。

1.3.3 取样: 恒河猴感染 1 d 后,每天采集其咽拭子和鼻灌洗液放入 1 mL DMEM 溶液中,2 000 r/min 离心 10 min 取上清液, -80℃ 保存待检。感染前 2 d、感染后第 3、5 和 7 天分别静脉取血,血液放置 30 min 后 2 000 r/min 离心 10 min, -80℃ 保存待检。感染第 3 天和第 7 天各解剖 1 只恒河猴,取支气管淋巴结、肠淋巴结、鼻甲、心、肝、脾、肺、肾、肠、气管、脑组织,每个组织各剪取 50 mg 左右两小块,一块放入 1 mL DMEM 中用于病毒分离,另一块放入 1 mL buffer RLT(Qiagen, 已加入 1% 巯基乙醇) 用于核酸载量检测,研磨成组织匀浆后 3 000 r/min 离心 10 min 取上清, -80℃ 保存待检。

1.3.4 病毒分离和核酸载量的检测: 病毒分离方法: 取咽拭子鼻灌洗液处理后溶液、血清及组织匀浆上清 100 μL 接种于铺满 75% 以上 MDCK 细胞的 24 孔板中,每个样品设 3 个复孔,并设两个正常细胞对照孔,置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中孵育。1 h 后 DMEM 培养液洗 1 次,加入 1.9 mL 病毒生长液后再次置于 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养,每天观察细胞病变(CPE),持续观察 7 d,如无 CPE,将原代 24 孔板培养物 -80℃ 冻融 2 次再盲传二代,共盲传三代后仍不出现 CPE 视为阴性,血凝实验确认。核酸载量检测方法: 取咽拭子鼻灌洗液处理后溶液、血清及组织匀浆上清 100 μL 放入 250 μL RLT 中,按 Qiagen 试剂盒法提取样品 RNA,将 RNA 逆转录成 cDNA(逆转录试剂盒购自 Invitrogen),通

过荧光定量 PCR 仪直接测定病毒载量 (RT-PCR 试剂盒购自 ABI)。病毒分离及 RNA 提取操作步骤均在 ABSL-3 实验室内完成。

1.3.5 血常规: 血常规检测感染前 2 d 感染后第 3、5 和 7 天静脉采集的恒河猴血液。

2 结果

2.1 临床症状

感染后第 2 天恒河猴摄食量开始减少、自主活动减少。感染后第 1 天体温达到峰值,第 3 天时回落至正常范围,除以上症状外恒河猴未出现其他明显临床表现(图 1)。

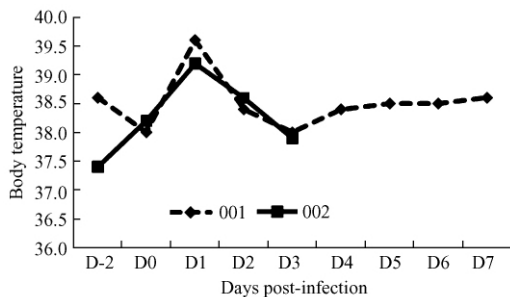


图 1 感染后恒河猴体温变化情况

Fig. 1 Body temperature of the monkeys post-infection

2.2 病毒分离和载量的检测

2.2.1 鼻灌洗液和咽拭子的病毒分离和核酸载量检测结果: H5N1 感染 1 d 后,每天采集鼻灌洗液和咽拭子至第 7 天,病毒培养鼻灌洗液除第 4、5 天为

阴性结果外,其余均为阳性。咽拭子除第 7 天为阴性外第 1~6 天均为阳性(表 1)。病毒阳性的细胞形态表现为: 肿胀圆化,细胞间隙增大,细胞核固缩或破裂,细胞部分或全部脱落,血凝实验中红细胞也发生凝集现象。病毒载量结果显示鼻灌洗液及咽拭子于感染后第 1 天载毒最高,此后逐渐下降(表 2)。

2.2.2 血液的病毒分离和核酸载量检测结果: 恒河猴感染 H5N1 病毒前 2 d 及感染后第 3、5 和 7 天静脉取血,002 号恒河猴在感染后第 3 天血液中 H5N1 病毒分离成阳性,血凝实验复检结果一致。核酸载量也达 10^4 copies/mL(表 3)。

2.2.3 组织器官的病毒分离和核酸载量检测结果: H5N1 感染后第 3 天和第 7 天各安乐一只恒河猴,剖取支气管淋巴结、肠淋巴结、鼻甲、心、肝、脾、肺、肾、肠、气管、脑组织进行病毒分离和核酸载量检测。除肺组织外,在恒河猴的心,气管,脑,肝,肾,肠多处组织器官中也能分离到 H5N1 病毒(表 4),血凝试验复检结果一致。病毒载量检测结果显示,所取组织中均存在高达 $10^5 \sim 10^7$ copies/g 的 H5N1 核酸拷贝(表 5)。

2.3 血常规

恒河猴感染 H5N1 病毒前 2 d 及感染后第 3、5、7 天采静脉血,进行血常规检测,结果如表 6 所示。感染后与感染前相比恒河猴白细胞数及淋巴细胞数下降,其他指标均无明显变化。

表 1 感染后恒河猴鼻灌洗液和咽拭子的病毒分离情况

Tab. 1 Virus isolation in the throat swab and nasal wash obtained from rhesus macaques post-infection

取样 Samples	猴号 Serial number	感染后天数 Days post-infection						
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
鼻腔灌洗液 Nasal wash	001	+	+	+	-	-	+	+
	002	+	+	+	处死	\	\	\
咽拭子 Throat swab	001	-	+	+	+	+	+	-
	002	+	+	+	处死	\	\	\

注 “+”为病毒分离成阳性,“-”为病毒分离成阴性,“\”为未取样。

Note “+” positive virus isolation, “-” negative virus isolation, “\” no sample

表 2 感染后恒河猴鼻灌洗液和咽拭子的病毒载量 单位: log₁₀ (copies/g)

Tab. 2 RT-PCR results of the throat swab and nasal wash obtained from rhesus macaques post-infection (log₁₀ copies/g)

取样 Samples	猴号 Serial number	感染后天数 Days post-infection						
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
鼻腔灌洗液 Nasal wash	001	6.5	5.9	5.5	4.9	4.5	4.4	4.1
	002	7.0	5.9	4.9	\	\	\	\
咽拭子 Throat swab	001	6.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.7
	002	6.5	4.1	4.0	\	\	\	\

注 “\”为未取样。Note “\” no sample

表 3 感染后恒河猴血液的病毒分离和病毒载量(病毒分离/病毒载量 单位 log10 (copies/mL))

Tab. 3 Virus isolation and RT-PCR results of the blood obtained from rhesus macaques post-infection (Virus isolation/ RT-PCR log10 copies/mL)

血浆 Plasma	- 2 d	3 d	5 d	7 d
001	- / -	- / -	- / -	- / -
002	- / -	+ /4.0	\	\

注 “+”为病毒分离成阳性,“-”为病毒分离成阴性,“\”为未取样

Note “+” positive virus isolation, “-” negative virus isolation, “\” no sample

表 4 感染后恒河猴组织样品的病毒分离情况

Tab. 4 Virus isolation in organ tissues obtained from the rhesus macaques post-infection

猴号 Serial number	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidneys	小肠 Small intestine	气管 Trachea	脑 Brain	支气管淋巴结 Bronchial lymph nodes	肠淋巴结 Intestinal lymph nodes	鼻甲 Nasal turbinate
001	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
002	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

注 “+”为病毒分离成阳性,“-”为病毒分离成阴性,“\”为未取样。

Note “+” positive virus isolation, “-” negative virus isolation, “\” no sample

表 5 感染后恒河猴组织样品的病毒载量 单位:log10(copies/g)

Tab. 5 RT-PCR results of the organ tissues obtained from rhesus macaques post-infection (log10 copies/g)

猴号 Serial number	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidneys	小肠 Small intestine	气管 Trachea	脑 Brain	支气管淋巴结 Bronchial lymph nodes	肠淋巴结 Intestinal lymph nodes	鼻甲 Nasal turbinate
001	7.1	7.7	7.1	5.1	7.5	5.6	7.2	7.4	7.2	7.3	5.5
002	7.5	7.4	7.4	5.6	7.4	5.1	6.4	7.4	7.1	7.0	6.4

注 “\”为未取样。Note “\” no sample

表 6 感染后恒河猴血常规各项指标的变化

Tab. 6 Changes of blood physiological parameters in the rhesus macaques post-infection

感染天数 Days postinfection	编号 Serial number	WBC	LYM	RBC	MCV	MCH	MCHC	RDW	PLT	MPV	HCT
- 2 d	001	12.8	7.79	4.64	74	23.8	324	12	287	8.3	0.342
	002	12	7.16	5.03	71	23.2	327	12.4	341	7.7	0.357
3 d	001	5.3	2.82	6.12	73	21.8	298	12.4	272	9.3	0.449
	002	6.3	2.95	5.23	70	22.3	318	12.2	292	8.4	0.366
5 d	001	6.2	2.81	5.9	69	25	361	12	281	8.8	0.409
7 d	001	8.2	5.41	5.73	68	24.6	364	12.1	243	9.1	0.387

3 讨论

Yunxin Chen、代小伟等^[3,4]人已成功建立了 H5N1 感染恒河猴模型,但病理变化以及病毒学检测结果显示 H5N1 只能在呼吸系统复制,恒河猴感染敏感性较低。针对以上不足本研究尝试性选取了一种新的感染方法及一株人源高致病性 H5N1 病毒经气管插管滴入的方式感染恒河猴,通过分析临床症状、病毒分离情况、血常规变化等检测指标,研究此方法感染恒河猴的临床及病毒变化,为 H5N1 的深入研究及提供更具理论指导意义和实际应用价值的动物模型做前期摸索。

人感染禽流感病毒后的症状表现为多样化^[1,2],从临床症状分析本实验感染后的恒河猴出

现一过性体温升高、摄食量减少、自主活动减少,表现为普通型的流感症状,并未出现其他明显临床症状。从病毒分离和核酸载量检测结果看,气管插管法感染的这株人源 H5N1 病毒侵袭机体的特点是系统性的,恒河猴全身多组织脏器包括心、肝、肾、小肠、气管和脑都能分离到病毒,不仅局限于肺部。而之前建立的 H5N1 感染恒河猴模型在急性感染期只有肺组织分离到病毒,引起这种差别的主要原因可能包括三方面:

首先,造成肺外感染的原因可能是感染途径的不同,Rimmelzwaan 等^[6]人利用滴鼻、上呼吸道感染和左右眼球感染,这种联合攻毒方式导致动物所表现的临床症状和组织病理学都严重于只滴鼻感染的猕猴。对于同样是呼吸道感染方式,环甲膜穿刺

对于机体有一定的微创性,并造成黏膜损伤,可能对病毒结合呼吸道受体有一定影响,而本研究所采用的气管插管可直接定位于上呼吸道,能准确控制感染剂量,对机体是无创性的,是很好的感染途径。

其次,病毒来源不同也会造成病毒侵袭力的不同,Hualan Chen 等人将三种不同来源的 H5N1 病毒株以 3 滴鼻方式等剂量感染恒河猴^[7],只有感染了其中一种病毒的恒河猴出现了肺外感染。本实验采用的高致病性禽流感病毒 H5N1 为一株人源毒株,而此前感染的毒株多为禽源性,因不同毒株致病力有所不同,所以导致了病毒对于机体侵袭力的不同。

恒河猴体内出现的病毒血症提示血液的流通可能将病毒带到了各个组织脏器中,病毒血症出现的原因至今尚不清楚,根据 Menno D de Jong 等人将感染 H5N1 的患者与感染两种季节性流感病毒的患者进行比较发现,感染 H5N1 患者咽部病毒载量显著高于季流患者,病死 H5N1 患者体内病毒载量水平最高,并在死亡患者血液中可以检测到 H5N1 病毒。本实验中恒河猴咽部分离的病毒载量也相对较高,但咽部的高病毒载量是否与病毒血症具有相关性还需进一步实验验证。通常病毒血症的出现一般在致死性的重症感染中^[3,5],而本实验猴只出现了轻微的临床症状,可见病毒血症的出现并不一定会造成严重的症状。在本实验中只有一只猴出现病毒血症,考虑到采血时间过于密集会导致猴的生理损伤而影响结果的判定,所以并不排除另一只猴因采血时间点的不密集也出现过病毒血症。

对于 H5N1 感染脑部的病毒分离结果,之前 Haeman J 基于小鼠的实验显示^[8],H5N1 型禽流感病毒具有嗜神经性,可以感染包括脑细胞在内的神经细胞,能够引发中枢神经系统蛋白质聚集紊乱,导致帕金森和老年痴呆症。他们还发现,禽流感的致死性更在于其肺外组织感染能力,尤其是大脑。本实验中也在感染急性期的恒河猴脑部中分离到 H5N1 病毒,进一步用基于非人灵长类的动物模型验证了 H5N1 能够跨越血脑屏障这一推测。

经气管插管感染的恒河猴感染急性期全身多组织脏器都可分离到 H5N1 病毒,血液中也出现了病毒血症,而禽流感的致死性之一也在于其肺外传

播能力,导致的多组织、脏器损伤,并且病毒血症可能就是造成这种传播的主要原因,所以气管插管感染的恒河猴对于进一步研究 H5N1 病毒的致病机制,及病毒血症与病毒体内传播的相关性具有重要的现实应用价值。

由于人源 H5N1 具有高度致病性,特别是进行感染大动物时,如实验猴,生物安全控制要求非常严格,因此,本试验仅使用 2 只恒河猴,在病毒复制和疾病凸显节点安乐处死动物,密集检测多项组织中的病毒分布,初步了解了该方法的有效性和感染病毒的特性,为更深入、全面建立动物模型等提供了良好的实验依据。

参考文献:

- [1] Uyeki TM. Human Infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus: review of clinical issues [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49: 279-290.
- [2] Neumann G, Chen H, Gao GF, et al. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties [R]. Cell Res, 2010, 20: 51-61.
- [3] Chen YX, Deng W, Jia CS, et al. Pathological lesions and viral localization of influenza A (H5N1) virus in experimentally infected Chinese rhesus macaques: implications for pathogenesis and viral transmission [J]. Arch Virol, 2009, 154: 227-233.
- [4] 代小伟,魏强,朱华,等. H5N1 型禽流感病毒感染非人灵长类动物的观察 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 271-274.
- [5] de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia [J]. Nature Med, 2006, 12(10): 1203-1207.
- [6] Rimmelzwaan GF, Kuiken van Aamerongen TG, et al. Pathogenesis of Influenza A (H5N1) Virus Infection in a Primate Model [J]. J Virol, 2001, 75(14): 6687-6691.
- [7] Chen HL, Li YB, Li ZJ, et al. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China [J]. J Virol, 2006, 80(12): 5976-5983.
- [8] Jang HM, Boltz D, Sturm-Ramirez K, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration [J]. PNAS, 2009, 106(33): 14063-14068.

(修回日期)2011-07-15