



唾液酸受体并非流感病毒各亚型在雪貂组织中播散分布的决定因子

占玲俊, 邓巍, 鲍琳琳, 吕琦, 李枫棣, 马春梅, 许黎黎, 秦川

(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 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨流感病毒在雪貂组织中的分布与唾液酸受体的关系。方法 用病毒分离的方法分析流感病毒 H5N1 (SZ406H, A/VN/1203/04), SH1N1, H3N2 (Brisbane/09, HK/09) 在雪貂各组织中分布, 用直接免疫荧光法分析雪貂各组织的唾液酸受体的分布, 并通过体外实验证实活病毒与组织上受体的结合。结果 H5N1 (SZ) 和 H5N1 (A/VN/1203/04) 在雪貂的肝、脾、肺、肠中有分布, H5N1 (A/VN/1203/04) 在脑组织中也有分布, 而 SH1N1、H3N2 (Brisbane/09, HK/09) 只分布于肠组织。而唾液酸受体 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 的 I 型受体分布于脾、心、肺、肠、脑组织中, 和 SA α 2,3Gal II 型受体分布于肝、脾、心、肺、肠、脑组织。SH1N1 病毒与 SA α 2,6Gal 能结合, 而 H5N1 与 SA α 2,3Gal 结合。结论 H5N1 能在雪貂的多器官组织组织中分布和繁殖, 而 H3N2 和 SH1N1 仅能在肠组织中分布繁殖。SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 受体在雪貂多器官组织中均有表达, 说明唾液酸受体是病毒进入的门户, 但不是病毒分布的决定因子。

【关键词】 流感病毒; 雪貂; 组织分布; 唾液酸受体

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0023-04
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.006

Sialic Acid Receptors Are not Determinant Factors for the Organ Distribution of Different Subtype Influenza Viruses in Ferret

ZHAN Ling-jun, DENG Wei, BAO Lin-lin, LV Qi, LI Feng-di, MA Chun-mei, XU Li-li, QIN Chuan
(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between tissue tropism of influenza viruses and sialic acid receptors in ferret. **Methods** The distribution of influenza viruses H5N1 (SZ406H, A/VN/1203/04), SH1N1, H3N2 (Brisbane/09, HK/09) in infected ferrets was analyzed by virus isolation, and the distribution of sialic acid receptors in tissues was determined by direct immunofluorescence assay. The binding of influenza virus to sialic acid receptor was detected by indirect immunofluorescence assay. **Results** H5N1 (SZ) and H5N1 (A/VN/1203/04) viruses were detected in the liver, spleen, lung and intestine. In addition, H5N1 (A/VN/1203/04) virus was also detected in the brain. SH1N1 and H3N2 (Brisbane/09, HK/09) viruses were detected in the intestine. Sialic acid receptors type I SA α 2,6Gal and SA α 2,3Gal were distributed in the spleen, heart, lung, intestine, and brain, type II SA α 2,3Gal receptors were distributed

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费: DWS2011105。

【作者简介】 占玲俊(1981-), 博士, 助理研究员, 研究方向: 新发传染病。

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

in the spleen, heart, lung, intestine, brain, and liver. SH1N1 virus was bound to SA α 2,6Gal in the tissues, while H5N1 was bound to SA α 2,3Gal. **Conclusions** Our results indicate that H5N1 (SZ, VN) virus can be distributed in many organs in ferret. SH1N1 and H3N2 (HK, BR) viruses are only distributed in the intestine, while both SA α 2,3Gal and SA α 2,6Gal receptors are distributed in many organs. So that we would conclude that SA receptors are not determinant factors for organ distribution of different subtype influenza viruses in ferrets.

[Key words] Influenza virus; Ferret; Distribution; Sialic acid receptor

雪貂是研究流感病毒的理想动物模型,但是不同亚型流感病毒感染雪貂后在组织中的分布情况如何,目前还没有详尽系统的数据。而病毒在宿主体内的分布是流感病毒致病机制研究以及药物和疫苗安全评价不可或缺的资料。

病毒在宿主体内的播散和分布机制比较复杂,目前还未见系统的明确的报道。主要的影响因素包括:流感病毒的唾液酸受体的表达和分布;流感病毒蛋白 HA 上碱性酶切割位点的可切割性;宿主体内能切割流感病毒使其能播散的酶,以及其它的相关酶^[1-3]。

流感病毒的受体是唾液酸的糖链,糖链以糖脂和糖蛋白的形式存在于细胞表面。唾液酸在动物细胞表面广泛分布,不同物种其衍生物分子种类及其与半乳糖及连接键型不同。大多数禽流感病毒优先识别结合于 SA α 2,3Gal,人流感病毒优先结合于 SA α 2,6Gal。其中 SA α 2,3Gal 根据糖链 β 链的链接又分为 SA α 2,3-Gal β (1-4)GlcNAc 和 SA α 2,3-Gal β (1-3)GlcNAc,分别与凝集素 MAAI 和 MAII 结合,SA α 2,6Gal 则与 SNA 结合^[1]。

本研究中将着重探讨流感病毒 H5N1,SH1N1,H3N2 感染雪貂后在各组织中的分布,并用免疫荧光和共聚焦荧光显微镜分析组织上唾液酸受体的分布,并探讨唾液酸受体分布与病毒在组织中分布的关系。

1 材料和方法

1.1 病毒

禽流感病毒 H5N1 (A/VN/1203/04)、H5N1 (SZ406H/06)、H3N2 (Brisbane/09)、H3N2 (Hongkong/09) 和 swine H1N1 由本研究室保存。病毒在 10 日龄的鸡胚上传代后,测定病毒的滴度备用。

1.2 流感病毒感染雪貂

雪貂经兽用氯胺酮轻度麻醉后,将流感 A/HK/09 H3N2 病毒株以 10^6 TCID₅₀, A/BR/09 以 10^6 TCID₅₀, A/SZ/406H/06 H5N1 病毒株以 10^2 TCID₅₀,

A Vietnam/1203/2004 以 10^4 TCID₅₀ 每只雪貂鼻孔内均匀滴入 400 μ L 病毒液。感染前 0 d 采集鼻甲骨活检,感染后 1~5 d 鼻甲骨活检检测病毒载量和病毒滴度。感染后第 5 天处死雪貂,取雪貂的肝脾肺肠脑等组织做病毒滴度测定和免疫荧光。

1.3 样品的采集和组织匀浆

感染后第 5 天,用氯胺酮麻醉雪貂,然后无菌操作取雪貂的组织脏器,包括心、肝、脾、肺、肾、肠、脑等,一部分样品放在 10% 的中性福尔马林中固定,一部分放到含 1% 青-链霉素 DMEM 中,另一部分组织放入 -80°C 冻存备用。4% 甲醛溶液固定的组织用石蜡包埋,切成 5 μm 的组织切片,用于后面的免疫荧光和病毒与受体结合的分析。DMEM 中组织用电动研磨器 (Pro200, USA) 研磨,2 000 r/min, 10 min 离心后取上清液,用于病毒分离。

1.4 组织活病毒分离

将 100 μ L 组织匀浆 10 倍稀释接种于 MDCK 细胞。每个滴度接种 5 个复孔。放 37°C CO₂ 孵箱中吸附 1 h,补加 DMEM 培养基放入孵箱培养 48 h。从每孔中吸取 50 μ L 上清液至另一个 96 孔板中。每孔加入 1% 火鸡血 50 μ L,30 min 观察结果。结果按 Reed-Muench 法计算样品的 TCID₅₀。

1.5 组织上唾液酸受体的检测

石蜡包埋的组织切片脱蜡水合后,用 PBS 洗 3 遍,分别加入 FITC 标记的 SNA 和 MAA I (Vector laboratory),浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以及 TRITC 标记的 MAII (EY lab),浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。作为对照,加入唾液酸酶 A (pH 6.0), 37°C 作用 24 h,唾液酸酶能切割非还原性的末端唾液酸残基,优先顺序为: a(2,6) > a(2,3) > a(2,8) > a(2,9)。PBS 洗 3 遍后,加入荧光标记的凝集素 SNA、MAAI 和 MAII,与酶切过的组织 4°C 孵育过夜,而阴性对照组织片不加入荧光标记的凝集素。在共聚焦荧光显微镜下观察凝集素的结合。

1.6 活病毒与组织的结合

石蜡包埋的肺组织切片在二甲苯中脱蜡,然后在乙醇中水合。水合的组织切片放入盛有枸橼酸

钠溶液中,微波炉中高火 3 min,停 1 min 再中火 7 min 进行抗原修复。加入 TPCK 处理过的活病毒到组织切片上,37℃ 孵育 24 h,其中各加入 100 TCID₅₀ 的 H5N1 和 SH1N1 与组织进行孵育。孵育后,用羊血清封闭 30 min。分别加入 1:10 000 和 1:200 的鼠源性抗流感病毒的单克隆抗体孵育,4℃ 过夜。加入 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠的二抗,室温避光孵育 2 h。用 TBS 洗 3 次后,加入细胞核染色的荧光染料 DAPI,共聚焦显微镜观察活病毒结合的细胞定位。

2 结果

2.1 各亚型流感病毒在感染的雪貂各组织脏器中的分布

温和的流感病毒 H1N1 (CA7) 和 H3N2 (HK, BR) 感染雪貂后,只能在肠道中分离到活病毒。而禽流感病毒 H5N1 (SZ) 感染雪貂后,在雪貂的肝、脾、肺、肠中均能分离到活病毒,但脑组织中未分离到活病毒;H5N1 (Vietnam) 感染雪貂后,肝、脾、肺、肠、脑组织中均能分离到活病毒。由此可见,高致病性禽流感能侵袭易感动物的多组织脏器,其中 H5N1 (Vietnam) 在雪貂中侵袭的组织比 H5N1 (SZ) 广泛,并且肝、脾、肺、肠组织中病毒的滴度高于 H5N1 (SZ),说明前者对雪貂的毒力大于后者(表 1)。

2.2 雪貂各组织中唾液酸受体的分布

利用直接荧光法利用 FITC 标记的 SNA 检测唾液酸受体 SAa2,6-Gal,而 FITC 标记的 MAA I 和 TRITC 标记的 MAA II 分别检测唾液酸受体 SAa2,3-Galb (1 - 4) GlcNAc 和 SAa2,3-Galb (1 - 3) GalNAc。

雪貂的主要组织脏器肺、肝、肾、肠、脾、心、脑组织分别做免疫荧光,通过荧光共聚焦观察,发现上述组织上均有唾液酸受体的分布,其中 SNA 阳性代表 SAa2,6-Gal 表达阳性,MAAI 和 MAII 阳性分别代表 SAa2,3-Galb(1 - 4) GlcNAc 和 SAa2,3-Galb (1 - 4) GlcNAc 表达阳性(表 2)。

其中支气管、肺、肾、回肠和盲肠的唾液酸受体分布的荧光共聚焦结果最典型,如图 1 ~ 3。其中图 1A 是肺泡和细支气管上唾液酸受体的分布情况,图 1B 是支气管上唾液酸受体的分布。可见支气管,细支气管和肺泡上 SAa2,6-Gal,SAa2,3-Galb(1 - 4) GlcNAc 和 SAa2,3-Galb(1 - 4) GlcNAc 均有分布(图 1 A,图 1 B,见彩插 2。表 2)。肾脏上上述 3 种亚型的受体也均有分布(图 2、图 3A 见彩插 3)。而回肠和结肠上仅有 SAa2,6-Gal 和 Aa2,3-Galb(1 - 4) GlcNAc 表达(图 3B、图 4 见彩插 4)。对照各组织的病理切片,可以明确免疫荧光的组织切片上的阳性表达细胞类型(表 2)。

表 1 各亚型流感病毒感染的雪貂各组织的病毒分离结果 (单位:log₁₀ TCID₅₀)

Tab.1 Virus isolated from tissues of the influenza virus-infected ferrets. (Unit: log₁₀ TCID₅₀)

流感病毒亚型 Influenza virus subtype	毒株 Virus strain	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肠 Intestine	脑 Brain
H1N1	A/CA/07/09	0	0	0	1.87 ± 0.38	0
H3N2	A/HK/09	0	0	0	2.1 ± 0.26	0
	A/BR/09	0	0	0	1.8 ± 0	0
H5N1	A/SZ/406H/06	0.6 ± 1.04	1.0 ± 1.73	3.1 ± 2.69	1.53 ± 1.33	0
	A Vie/1203/2004	2.13 ± 2.38	1.1 ± 1.91	2.2 ± 2.0	3.17 ± 0.81	2.37 ± 2.45

表 2 雪貂各组织脏器的唾液酸受体的分布

Tab.2 Sialic acid receptor distribution in the tissues of ferret

组织 Organs	SNA (+)	MAAI (+)	MAAII (+)
肺 Lung	气管纤毛上皮	肺泡上皮	肺泡,支气管,呼吸性细支气管以下上皮,平滑肌,
肝 Liver	无	无	肝细胞强阳性
肾 Kindey	集合管,上皮细胞,肾小球,小管基底膜	集合管,近曲小管	近曲小管,小球
肠 Intestine	杯状细胞,内皮细胞	少量杯状细胞	粘膜下平滑肌,间质,
脾 Spleen	有阳性	少量阳性细胞	少量阳性细胞
心 Heart	心内膜	心肌膜,心血管	心肌膜,心内膜
脑 Brain	脉络丛上皮细胞表面,小血管,脑膜,神经元	脑膜,小脑白质细胞层,小脑神经元核膜,脉络丛表面	脉络丛上皮细胞表面,小血管

2.3 流感活病毒与组织切片上唾液酸受体的结合

流感病毒 H1N1 可以与 SAa2,6-Gal 受体结合, 而 H5N1 则可以和 SAa2,3-Gal 受体结合。通过组织切片的间接免疫荧光结果可以看出, H1N1 主要是与支气管上皮细胞上 SAa2,6-Gal 受体结合, 而 H5N1 则主要与支气管肺泡细胞上 SAa2,3-Gal(1-4)GlcNAc 结合。而这些阳性细胞与同一组织上唾液酸分布的成镜像吻合(图 3B、图 4 见彩插 4)。

3 讨论

不同亚型流感病毒感染雪貂后, 病毒在各组织中的分布不一样, 病毒滴度也存在差异。其中温和型的流感病毒只在肠道中增殖, 而禽流感病毒则可以在肝、脾、肺、肠、脑等多组织中繁殖。同一种亚型流感病毒感染雪貂后, 不同组织病毒的分布不一样, 可能与唾液酸受体有关, 也可能与宿主其它的限制因子有关, 比如宿主酶。

上呼吸道作为流感感染的门户, 其唾液酸受体 [SA(α -2,3), SA(α -2,6)] 的分布被重点关注。关于 SA 受体的分布的研究, Yasuo Suzuki 等的研究发现唾液酸受体是流感病毒侵袭不同宿主的决定因子^[1], Nicholls 的研究证明人呼吸道唾液酸受体分布是人源性和禽源性流感病毒广泛播散的基础^[1,4]。

本研究发现, 唾液酸受体在雪貂的主要组织脏器如心、肝、脾、肺、肾、肠、脑等组织均有分布, 但是活病毒并没有在相应的各组织均有分布, 尤其是人流感病毒和某些温和的流感病毒。另外, 体外活病毒与组织上唾液酸受体的结合, 可以证实上述受体检测结果的特异性和活性。由此可见, 唾液酸受体并不是流感病毒在雪貂各组织分布的决定因子, 而可能只是其中的条件之一。或者还有其它的受体和共受体。

高致病性的流感病毒(如 H5N1) 可以被普遍存在各组织的蛋白酶切割, 其中最有可能的是一种重要的前体蛋白内切酶弗林蛋白酶(furin)^[5]。这种弗林蛋白酶使流感病毒具有组织泛向性, 使流感病毒可以在动物的许多组织中进行复制, 损害动物重要的器官和组织, 导致受感染的鸟类发生疾病和死亡。另外, 还发现枯草杆菌蛋白酶也有切割多碱基位的特性, 并促进病毒在宿主体内广泛繁殖和传播^[2,3,6]。

而 LPAI、季节性流感病毒 H3N2、H1N1 和甲流 H1N1 在组织中分布于呼吸道和肠道, Bottcher 及其同事发现人肺来源的丝氨酸跨膜蛋白 2 (TMPRSS2) 和人呼吸道胰酶样蛋白酶(HAT) 能促进人流感病毒的传播^[3,7,8], 而 Chaipan 等^[9] 发现丝氨酸跨膜蛋白 2 和 4 (TMPRSS2, TMPRSS4) 能激活 1918 年 H1N1 的 HA, 由此可见作为内源性表达的酶 TTSP (TMPRSS2, TMPRSS4) 能活化 HA 并在外源性胰酶缺乏的情况下促进流感病毒在组织脏器间传播。

参考文献:

- [1] Yasuo TI, Takashi S, Robert EH, et al. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*, 2000, 74: 11825 - 11831.
- [2] Nicholls JM, Chan MC, Chan WY, et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med*, 2007, 13: 147 - 149.
- [3] Bottcher FE, Freuer C, Sielaff F, et al. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol*, 2010, 84: 5605 - 5614.
- [4] Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, et al. Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res*, 2007, 8: 73.
- [5] Stieneke GA, Vey M, Anglikler H, et al. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J*, 1992, 11: 2407 - 2414.
- [6] Kristensson K. Avian influenza and the brain—comments on the occasion of resurrection of the Spanish flu virus. *Brain Res Bull*, 2006, 68: 406 - 413.
- [7] Bottcher E, Matrosovich T, Beyerle M, et al. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 2006, 80: 9896 - 9898.
- [8] Bottcher E, Freuer C, Steinmetzer T, et al. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition. *Vaccine* 2009, 27: 6324 - 6329.
- [9] Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, et al. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, 2009, 83: 3200 - 3211.