

建立 H5N1 流感病毒感染雪貂动物模型

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 H5N1 流感病毒感染雪貂动物模型^[1-3]。方法 H5N1 流感病毒株 A/Vietnam/1203/2004 病毒以 10^3 和 10^4 TCID₅₀ 滴度分别感染雪貂。对 4~10 月龄去势雪貂经兽用氯胺酮轻度麻醉后进行滴鼻感染, 每个稀释度接种 3 只雪貂, 感染后第 5 天安乐处死。感染后每天记录雪貂一般临床变化。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。处死时取雪貂气管、肺、心、肝、脾、肾、小肠、脑组织作病毒滴度检测和病理检查。结果 H5N1 10^3 和 10^4 TCID₅₀ 的病毒分别感染雪貂, 雪貂死亡都率在 33%。 10^3 TCID₅₀ 和 10^4 TCID₅₀ 病毒分别感染雪貂, 动物都出现持续 3 d 体温升高, 10^4 TCID₅₀ 组出现超过 20% 的体重下降。上呼吸道排毒呈现上升趋势, 并可在除呼吸系统以外的组织器官中分离到病毒。感染的雪貂病理表现为重度肺炎。结论 雪貂感染 H5N1 病毒株后在临床表现、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 H5N1 病毒动物模型已建立, 10^4 TCID₅₀ 病毒滴度是一个建立感染动物模型比较合适的剂量。

【关键词】 A/Vietnam/1203/2004; H5N1; 雪貂; 模型

【中图分类号】 R373; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)09-0040-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.09.010

Establish H5N1 Flu Virus Infection Ferret Animal Model

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 the Influenza H5N1 influenza virus infection ferrets animal model. **Methods** Groups of three 4-to 6-month-old ferrets were inoculated intranasally with 10^3 and 10^4 TCID₅₀ of H5N1 A/Vietnam/1203/2004 in a volume of 500uL. Ferrets were monitored daily for clinical signs of influenza infection, and body temperatures were recorded once daily. Every day take nasal turbinates for RT-PCR. On day 5 postinoculation, ferrets were euthanized and trachea, lung, heart, liver, spleen, kidney, small intestine, and brain tissue were harvested, and examined by light microscopy. **Results** For each titer virus tested, in infected ferrets, we observed fever, weight loss, nasal rattling, sneezing and died. Virus was detected in the nasal turbinates and heart, liver, spleen, kidney, small intestine, and brain from all of the infected ferrets. Of the ferrets inoculated with H5N1 virus, there show focal severe pneumonia in lung. **Conclusions** In clinical signs, virus detection, and histological changes were observed ferrets were infected H5N1

[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。

influenza virus, which 10^4 TCID₅₀ titer was a more appropriate to establish flu animal models.

【Key words】 A/Vietnam/1203/2004; H5N1; Ferret; Model

H5N1 病毒从鸟直接传到人的首次病例是於 1997 年在香港发现。迄今,绝大多数的人类感染病例都直接来自鸟,只有个别的病例被认为是来自被感染的人,不过 H5N1 病毒尚未能在人与人之间建立持续的传播链。根据禽流感致病性的不同,可以将禽流感分为高致病性禽流感、低致病性禽流感和无致病性禽流感。由 H5N1 血清型引起的禽流感称高致病性禽流感,发病率和死亡率都很高,危害巨大。高致病性禽流感病毒可以直接感染人类。1997 年,在我国的香港地区,高致病性禽流感病毒 H5N1 型导致了 18 人感染,6 人死亡,首次证实高致病性禽流感可以危及人的生命。

本研究选用人源 H5N1 亚型禽流感病毒 A/Vietnam/1203/2004 对雪貂进行人工感染试验,以期建立人源流感病毒感染雪貂模型^[4-8],为探索禽流感病毒的病原特性、致病机制、药物筛选及其疫苗评价提供研究平台。同时,为进一步防控禽流感在人间的暴发流行提供必要的实验参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 H5N1 病毒株: A/Vietnam/1203/2004 (V), 其 HA 效价都为 1:256, 10^8 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,500~1200 g。实验前进行血清学检查,HI 方法检测 H1N1, H5N1 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,每个滴度 3 只,每笼一只。将雪貂采用兽用氯胺酮轻度麻醉,将流感 A/Vietnam/

1203/2004 病毒株分别以 10^3 TCID₅₀ 和 10^4 TCID₅₀ 滴鼻感染,每只雪貂鼻孔内均匀滴入 500 uL 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 d,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,取动物气管、肺、心、肝、脾、肾、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

雪貂取肺组织、肠组织放入 1 mL DMEM (青霉素、链霉素各 1000 IU/mL) 液中,用匀浆器将组织研磨成乳剂,3000 r/min 离心 10 min,取上清。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。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,详细观察气管、肺、心、肝、脾、肾、小肠、脑组织的形态变化;病理切片制备,取处死动物的肺等组织,10% 甲醛固定,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 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。总 RNA 中取 8 μL RNA 应用 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) 逆转录。取 cDNA2 μL 应用 Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) 作定量 PCR。引物: NP688Fwd 5'-

ttccaaacagcagcacaag-3' , NP817Rvs2 5' -tatgggc caatgatectctc-3' 。程序:①94℃ for 3 min; ②94℃ for 30 s ,③61℃ for 30 s ,④72℃ for 30 s(②-④运行 35 个循环) ,⑤95℃ ,15 s; ⑥60℃ ,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 ,10³ TCID₅₀ 组和 10⁴ TCID₅₀ 组由感染后第 1 天一直持续到实验结束 ,10⁴ TCID₅₀ 组在感染后体重下降最高达 20% 以上 ,体重 变化见表 1。雪貂感染后体重变化率见图 1。

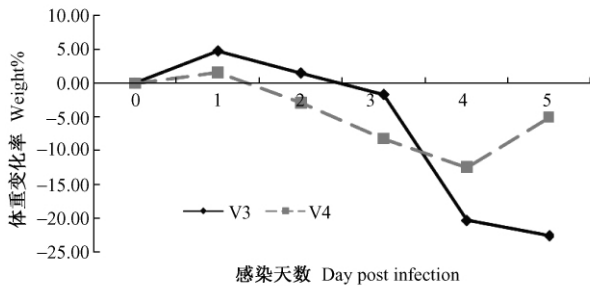


图 1 雪貂感染后体重变化率 (%)

Fig. 1 Body weight change of ferrets (%)

体重变化率% = (当天体重-0 天体重) / 0 天体重 * 100%

$$\text{Weight change rate\%} = (\text{the day weight} - 0 \text{ day weight}) / 0 \text{ day weight} * 100\%$$

2.2 雪貂感染后体温变化

雪貂感染后出现体温升高 ,与感染前比较体温 最高上升 2℃。10³ TCID₅₀ 和 10⁴ TCID₅₀ 组雪貂在感 染后第 2 天出现体温升高 ,一直持续到实验结束 (感染后第 5 天) ,体温变化见图 2。

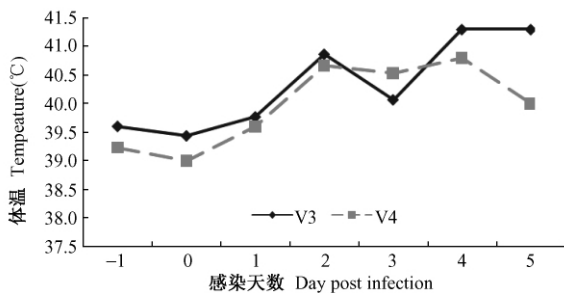


图 2 雪貂感染后体温变化 (°C)

Fig. 2 Body temperature change (°C)

2.3 雪貂感染后临床表现

雪貂感染然后表现为

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动度两个部分 ,具体指标见 表 1。

表 1 雪貂感染后临床评分标准
Tab.1 Criteria for clinical sign score

评分 Score	鼻部症状 Nasal symptoms	活动度 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, not alert

雪貂感染后出现以活动度下降为主临床改变 , 即表现为不活跃、对外界刺激的反应性下降 ,上呼 吸道感染的症状如: 打喷嚏、流鼻涕、呼吸困难的症 状几乎观察不到。具体到 2 个剂量组的反应可以看 到 10⁴ TCID₅₀ 组症状要明显较 10³ TCID₅₀ 组严重 ,也 主要是以活动度下降为表现的变化。其中 10³ TCID₅₀ 组雪貂感染后第 4 天 2#死亡 ,10⁴ TCID₅₀ 组雪 貂感染后第 5 天 6#死亡 ,特别值得注意的是感染雪 貂死亡前临床没有出现突然地体温升高、呼吸急 促、呼吸困难等症状。雪貂感染后临床变化情况见 图 3。

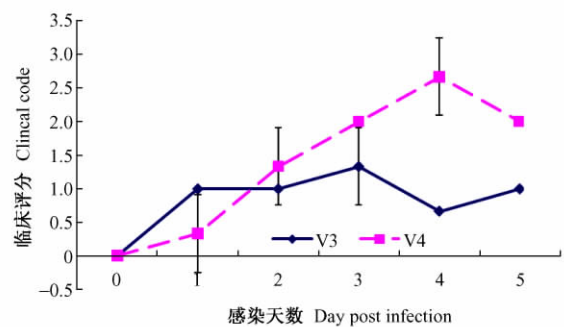


图 3 雪貂感染后临床表现评分

Fig. 3 Score of clinical sign

2.4 感染雪貂病理变化结果

雪貂感染 H5N1 病毒第 5 天后肺组织大体呈现 多个肺叶腹侧面和背侧面出现片状灶状的坏死灶 和出血灶 ,其他组织大体观察未发现明显异常。镜 下观察发现肺组织呈炎性充血、出血、水肿、坏死、 渗出的重度肺炎病理改变。大脑组织可见局灶性 脑炎 ,血管周围炎细胞呈“套袖”装浸润 ,可见小灶

表 2 雪貂感染后鼻甲骨活检物病毒培养滴度情况(单位: \log_{10} TCID₅₀)
 Tab.2 Virus detection and titration in samples from nasal cavity (\log_{10} TCID₅₀)

		感染天数 Days post infection						
		0	1	2	3	4	5	
H5N1	10 ³ TCID ₅₀	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	2.3	3.8	/	/
	10 ⁴ TCID ₅₀	3	-	-	-	-	-	-
		4	-	2.2	2.3	2.4	3.6	3.9
	5	-	2.3	-	3.8	-	-	
	6	-	-	2.2	3.7	-	/	

注: - 结果阴性, /动物死亡。
 Note: - negative, /dead.

表 3 雪貂感染后组织病毒培养滴度情况(单位: \log_{10} TCID₅₀)
 Tab.3 Virus culture from tissues of ferrets (\log_{10} TCID₅₀)

		心	肝	脾	肺	肾	肠	气管	脑
		Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Intestine	Trachea	Brain
H5N1	10 ³ TCID ₅₀	1	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	1.9	5.9	-	-	4.3
	10 ⁴ TCID ₅₀	3	-	4.3	-	-	-	-	-
		4	-	1.7	3.3	3.9	-	2.3	-
	5	-	4.7	-	-	-	3.9	-	2.2
	6	1.8	-	-	2.7	1.8	3.3	5.2	4.9

状坏死。免疫组化染色可以观察到, 尽管小肠组织没有观察到病变, 在肺组织、脑组织、小肠组织均可以看到被病毒感染的阳性细胞, 见彩插 5 图 4。

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 10³ TCID₅₀ 组雪貂在感染后第 2~3 天检测到病毒, 病毒滴度为 10^{2.3} ~ 10^{3.8} TCID₅₀。10⁴ TCID₅₀ 组雪貂在感染后第 1~5 天都检测到病毒, 病毒滴度为 10^{2.3} ~ 10^{3.8} TCID₅₀。病毒分离结果显示雪貂在感染后上呼吸道排毒是呈现随感染的天数逐渐上升的趋势, 即表示病毒在上呼吸道不断复制排出。这与温和的季流病毒比较有明显的不同, H3N2 病毒株感染后通常会出现上呼吸道的病毒排出随天数增加而下降, H5N1 作为高致病流感病毒株致死率高可能与这个结果有一定的关系。鼻甲骨活检物病毒滴度结果见表 2。

雪貂在感染后第 5 天安乐处死, 取雪貂气管、肺、心、肝、脾、肾、小肠、脑组织做病毒滴度测定。结果显示各个组织都能够分离到病毒, 其中以气管和肺组织的病毒滴度最高, 10³ TCID₅₀ 组雪貂病毒分离的阳性率为 5/24, 10⁴ TCID₅₀ 组雪貂病毒分离的阳性率为 13/24。以上的结果反映了 H5N1 病毒感染雪貂, 呼吸系统的器官是病毒侵袭的重要对象, 呼吸系统以外的器官也会受到病毒的攻击, 并且病毒可以突破血脑屏障感染脑组织, 这就解释了为什么感染禽流感病毒病人会出现多系统多器官受损

和出现神经系统的症状。各组织脏器病毒滴度结果见表 3。

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 10³ TCID₅₀ 组和 10⁴ TCID₅₀ 组雪貂在感染后第 1 天至感染后第 5 天, 病毒载量呈现曲线上升的趋势, 这与病毒分离的结果是相一致的, 结果见图 5。

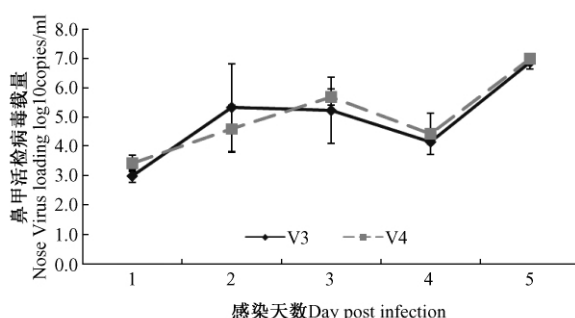


图 5 雪貂鼻中病毒载量变化

Fig. 5 Virus loading on nose of ferrets infected

3 讨论

H5N1 型高致病性流感传播途径主要有两种, 通过水禽或其污染物直接传到人或通过中间宿主(如: 猪) 传到。人感染高致病性禽流感后, 起病很急, 早期表现类似普通型流感。主要表现为发热, 体温大多在 39℃ 以上, 持续 1~7 d, 一般为 3~4 d, 可伴有流涕、鼻塞、咳嗽、头痛、全身不适, 部分

患者可有恶心、腹痛、腹泻、稀水样便等消化道症状,极少数会出现神经系统症状。高致病禽流感感染死亡率超过 60%。

实验结果显示,A/Vietnam/1203/2004 人源 H5N1 型禽流感病毒可以感染雪貂,应用的病毒滴度死亡率为 33%。感染后在雪貂除气管和肺组织还可在心、肝、脾、肾、小肠、脑组织中分离到病毒。说明该病毒能够侵染雪貂的肺、脑、肝、肾等多种器官并造成神经系统感染,这与感染人的 H5N1 禽流感病毒毒株具有共同的特性^[9-10]。雪貂鼻甲骨活检物病毒分离结果显示病毒在感染后第 2 天至第 5 天呈现上升的趋势,病毒载量的结果与此结果相一致,这与温和型的季节性流感 H3N2 在雪貂上的表现不一致(病毒释放呈逐天下降的趋势)^[2]。这可能也是雪貂感染后持续体温升高,体重严重下降,活动度下降的原因之一。雪貂的临床症状出现的早晚和严重程度与接毒量有关,接毒量大的雪貂体重下降快,症状出现早,体重下降多;随接毒量减少症状出现渐晚,症状减轻。因此,有理由推断,即使 H5N1 型禽流感在人间大流行,因个体差异和接触病毒量的差别,其致病性也会有所差异。感染后雪貂解剖发现肺组织呈炎性充血、出血、水肿、坏死、渗出的重度肺炎病理改变,脑组织的组化染色中可以观察到被病毒感染的阳性细胞。

雪貂对该 H5N1 型禽流感病毒呈现出规律的与人类感染流感病毒相似的以肺炎为主的临床症状、典型的病理变化和高致死率,是良好的 H5N1 相关研究的动物模型。

参考文献:

- [1] Fouchier R A , Schneeberger P M , Rozendaal F W , 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 USA , 2004 , 101(5) : 1356 - 1361.
- [2] Herlocher M L , Elias S , Truscon R , et al. Ferrets as a transmission model for influenza: sequence changes in HA1 of type A (H3N2) virus [J]. Infect Dis , 2001 , 184: 542 - 546.
- [3] Fan J , Liang X , Horton M S , et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice , ferrets , and rhesus monkeys [J]. Vaccine , 2004 , 22: 2993 - 3003.
- [4] Belser , Lu XH , Taronna 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.
- [5] Banks J. , Speidel E. C. , McCauley J. W. , et al. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. [J]. Arch Virol , 2000 , 145: 1047 - 1058.
- [6] Bitko V. , Musiyenko A. , and Barik S. . Viral infection of the lungs through the eye [J]. J Virol , 2007 , 81: 783 - 790.
- [7] Capua I. , and Alexander D. J. . Avian influenza: recent developments [J]. Avian Pathol , 2004 , 33: 393 - 404.
- [8] Dybing J. K. , Stacey S. C , Swayne D. E. , 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.
- [9] Gubareva L V , Mc: Cullers J A , Bethcll R C , et al. Characterization of influenza A/Hongkong/156/97(H5N1) virus in a mouse model and protective effect of Zanamivir on H5N1 infection in mice [J]. J Infect Dis , 1998 , 178: 1592.
- [10] Lipatov A S , Krauss S , Guan Y , et al. Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001 [J]. Virol , 2003 , 77: 3816 - 3823.

(修回日期)2011-01-20

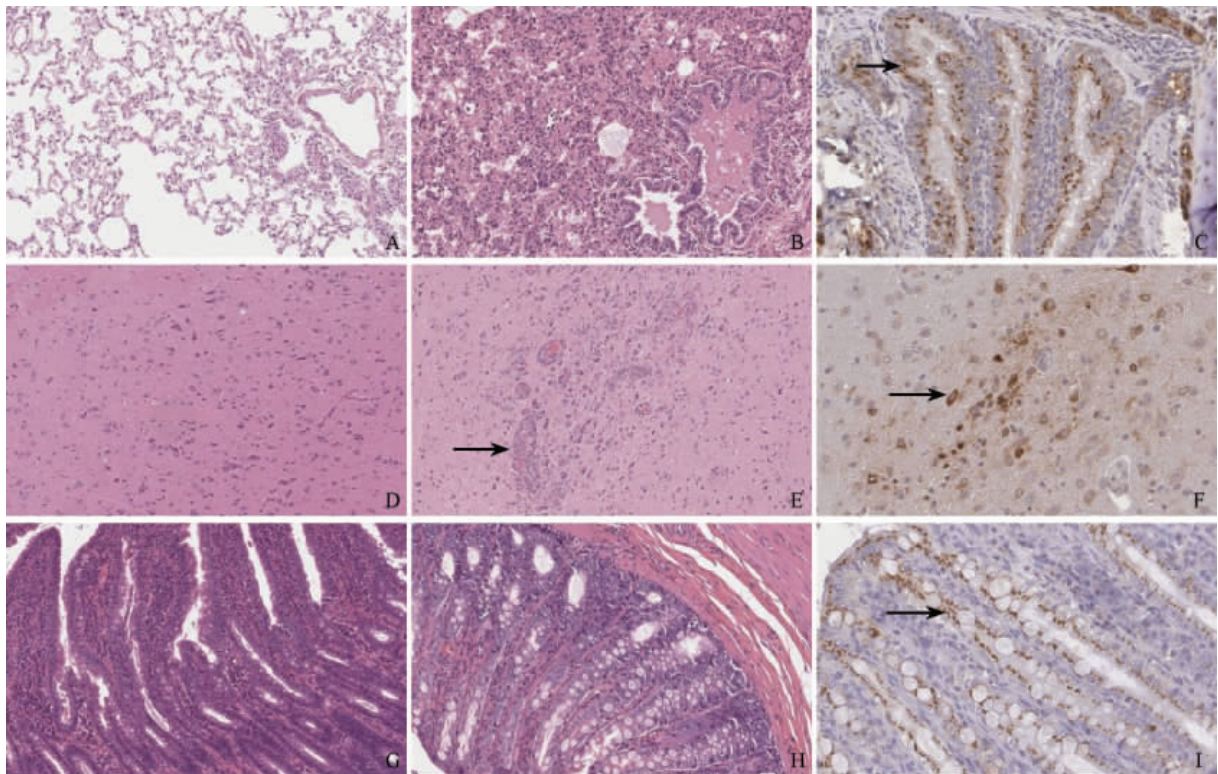


图 4 感染 H5N1 雪貂的肺、大脑及小肠的组织病理学改变

Fig. 4 Histological features of the lung, brain and small intestine in ferret's inoculated with H5N1 virus

注:对照组动物的肺(A)、大脑(D)、小肠(G)未见异常。感染组动物肺脏呈重度渗出坏死性肺炎改变,大量炎细胞、水肿液广泛渗出,可见坏死出血灶(B);大脑组织可见局灶性脑炎,血管周围炎细胞呈“套袖”装浸润,可见小灶状坏死(E);小肠组织未见异常(H)。免疫组化显示感染动物的肺(C)、大脑(F)、小肠(I)均可见大量感染病毒的细胞。A、B、D、E、G、H:HE×100;C、F、I:IHC×200

Note: No abnormality was seen in the lung (A), brain (D) and small intestine (G) in the ferrets of control group. Of the ferrets inoculated with H5N1 virus, there show a pattern of necrotizing alveolitis in the lung. The alveolar walls are necrotic, and alveolar air spaces contain edema fluid, desquamated epithelial cells, and inflammatory cells (B). In brain there show prominent perivascular infiltration (arrow) (E). No abnormality was seen in the small intestine (H) in the infected ferrets. Influenza viral antigen was seen in respiratory epithelium of bronchioles (C) and small intestine (I) and gliocytes in brain (F) by IHC (arrow). A、B、D、E、G、H: HE×100; C、F、I: IHC×200