

季节性流感病毒 H1N1 BALB/c 鼠肺适应株 的建立及其分子机制

李枫棣, 许黎黎, 鲍琳琳, 吕琦, 秦川

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 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 建立季节性流感病毒 H1N1 的鼠肺适应株, 并对适应的分子机理进行研究。方法 以病毒滴鼻感染小鼠, 通过在 BALB/c 小鼠肺组织中连续传代, 观察小鼠存活情况及肺病理改变, 来获得季节性流感病毒 H1N1 的鼠肺适应株。结果 季节性流感 H1N1 A/Brisbane/59/2007 病毒野生型毒株, 经过在小鼠体内进行 8 次传代后, 毒力逐渐增强, 从无致病力到致死率达到 100%, 对鼠肺适应株与野生型毒株进行基因比对, 发现适应株 HA 基因发生了 3 个有义突变。结论 野生季节性低致病力 H1N1 流感病毒可在小鼠中经过多次传代而获得高致病力 H1N1 鼠肺适应株, HA 蛋白 89 位 Thr 至 Ile 的突变对毒力的增强起决定性作用。

【关键词】 季节性流感病毒 H1N1; 鼠肺适应株; 感染模型; 连续传代

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0022-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.005

Establishment of a mouse-adapted seasonal H1N1 virus strain via BALB/c mice and its molecular mechanism

LI Feng-di, XU Li-li, Bao Lin-lin, Lv Qi, Qin Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine,
Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To establish adapted strain of seasonal H1N1 influenza virus in mice and infection model. **Methods** The mice model was induced by nose dropping method with influenza virus, by continuous passage in the lung tissue of BALB/c, to get the adapted strain of seasonal H1N1 in mice and seasonal influenza virus infection model, and the lung index and death rate was observed. **Results** After 8 times consecutive passages in the lung tissue of BALB/c, virulence of wild type seasonal H1N1 virus was increased to a high level. Genome sequencing and alignment indicated that the HA gene was mutated. **Conclusion** The virulent mouse-adapted variant A/Brisbane/59/2007-MA can be acquired from the avirulent A/Brisbane/59/2007 strain by continuous passage in the lung tissues of mice. Mutation of Thr to Ile at residue 89 of HA protein is the key virulence determinant.

【Key words】 Seasonal H1N1; Mouse-adapted strain; Infection model; Continuous passage

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒(influenza virus, IFV)引起的一种急性呼吸道传染病,每年约有 15%~20% 的人群被流感病毒感染,严重危害

人类健康和生命。甲型流感病毒是引起流感大流行的毒株。迄今为止,甲型流感病毒已在世界范围内引起至少五次全球性流感大流行(flu pandemic),严

【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;2009ZX10004-016;2009ZX10004-402;2009ZX10004-503, 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(DWS201112)。

【作者简介】 李枫棣(1983-), 硕士研究生, 研究方向: 比较医学

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

重危害人类健康,对社会造成了很大的冲击^[1]。2009 年 8 月,根据香港最近的流感病毒分析, H1N1 占全部流行株的 49%^[2],显示该病毒已成主流流行株。建立 H1N1 流感病毒感染的动物模型,尤其是从经济角度及遗传背景角度最优的 BALB/c 小鼠模型,对于疾病机理的深入研究及新药和疫苗的临床前检定都具有非常重要的意义^[3,4]。然而,野生型季节性流感病毒 H1N1 通过常规接种方式并不能感染小鼠,但研究发现通过将低毒力的病毒对小鼠肺组织进行连续传代,有望获得毒力显著增强的鼠肺适应株病毒^[5]。本实验用毒力较弱的野生型季节性流感 H1N1 病毒在小鼠体内进行连续多次传代,已获得强毒力的季节性流感 H1N1 鼠肺适应株,并通过全基因组序列测定及比对,对导致毒力增强的分子机制进行了研究。本实验为季节性流感病毒致病机理的深入研究,尤其是流感病毒的跨物种传播机制,以及在此过程中所发生的环境选择压力下流感病毒的分子进化行为,和机体免疫系统的协同防御机制等方面的研究均可提供重要的理论指导,同时基于鼠肺适应株建立的重症小鼠感染模型对于相关新药和疫苗的临床前评价都具有广阔及重要的实际应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

5 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 64 只,体重 13~15g,来自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。

1.1.2 毒株

季节性流感 H1N1 病毒 A/Brisbane/59/2007,此毒株为香港大学陈洪霖教授惠赠。滴定毒株为 10^6 TCID₅₀/mL。

1.1.3 实验场所

中国医学科学院医学实验动物研究所 ABSL-3 实验室【卫 ABSL3-021】。

1.1.4 仪器试剂

RNeasy Mini Kit (Qiagen) 试剂盒; Superscript III (Invitrogen) 试剂盒; StepOne PCR system (ABI)

1.2 方法

1.2.1 鼠肺适应株的建立

将动物分成 8 组,每组 3 只,以滴鼻方式进行攻毒,每只 50 μ L,第一次攻毒使用毒株为季节性

流感 H1N1 病毒 A/Brisbane/59/2007, 10^6 TCID₅₀/mL。攻毒后第 4 天摘眼球取血,安乐后解剖取肺组织,生理盐水冲洗后剪成 2 mm 左右小块,放入含 10% FBS 的 DMEM 培养基中稍作研磨后 3000 r/min 离心取上清,进行再次滴鼻攻毒,50 μ L 每只,直至小鼠出现典型临床表现改变及肺组织发生明显病变。

1.2.2 病毒载量测定

使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen) 试剂盒提取每一代小鼠肺组织匀浆上清的总 RNA,并及时分装保存于 -80°C 。使用 Superscript III (Invitrogen) 试剂盒对 RNA 样品进行逆转录后,取 2 μ L 样品进行 SYBR Green 染料法荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测。Real-time PCR 扩增反应在 StepOne PCR system (ABI) 上进行,总反应体积为 20 μ L,其中:去离子水 6 μ L, 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (ABI) 10 μ L, 10 μ mol/L 的上,下游引物各 1 μ L,引物序列为:

SF-F, 5'-ctgagaagcagatactgggc-3'; SF-R, 5'-ctg-cattgtctcgaagaat-3'。

Real-time PCR 反应条件为: 94°C for 3 min (\times 1), 94°C 30 s (\times 35), 55°C 30 s (\times 35), 72°C 30 s (\times 35)。

1.2.3 基因组测序和比对

对所有的野生型和鼠肺适应株病毒的基因片段进行高保真 PCR 扩增 (KOD plus DNA polymerase, Toyobo)。PCR 产物纯化和测序后使用 Clustal W (version 1.83) 软件进行比对。

1.2.4 感染性比较研究

将小鼠分为 4 组,每组 10 只,采用滴鼻的方法分别接种 10^6 TCID₅₀/mL 的野生型及 HA 位点发生突变的 3 株鼠肺适应病毒,50 μ L 每只,通过观察体重变化,死亡率等临床表现,来对野生型及鼠肺适应株的感染性进行比较。

2 结果

2.1 鼠肺适应株的建立

野生型季流 H1N1 病毒传至第二代时,感染小鼠开始出现竖毛现象,从第三代起,肺组织开始出现局部病灶,从第六代起,小鼠开始死亡,而感染野生型和第一代鼠肺适应株的小鼠均未出现临床病症,可见小鼠适应株毒株毒力呈现逐步增强趋势。具体死亡情况及临床表现见表 1。

表 1 小鼠感染季节性流感 H1N1 A/Brisbane/59/2007 病毒野生型及小鼠适应株后第 4 天临床表现

Tab. 1 Clinical characteristics of mice challenged with wild-type and mouse-adapted seasonal H1N1 A/Brisbane/59/2007 viruses at 4 days after infection

毒株 Strain	死亡 Death	濒死 Near death	存活小鼠临床表现 The clinical manifestations of the survival mice	
			竖毛/只 Pilo-erection	肺组织病变 Pulmonary pathological changes
WT	0	0	无 None	无 None
MA-1	0	0	无 None	无 None
MA-2	0	0	2	无 None
MA-3	0	0	3	1 只近肺门处出现暗红色病灶 Dark red lesions appeared near the hilum of lung
MA-4	0	0	3	大面积 Large area
MA-5	0	0	3	大面积 Large area
MA-6	1	0	2	大面积 Large area
MA-7	1	1	2 + 弓背 Hunchback	大面积 Large area
MA-8	2	1	1	全部 All

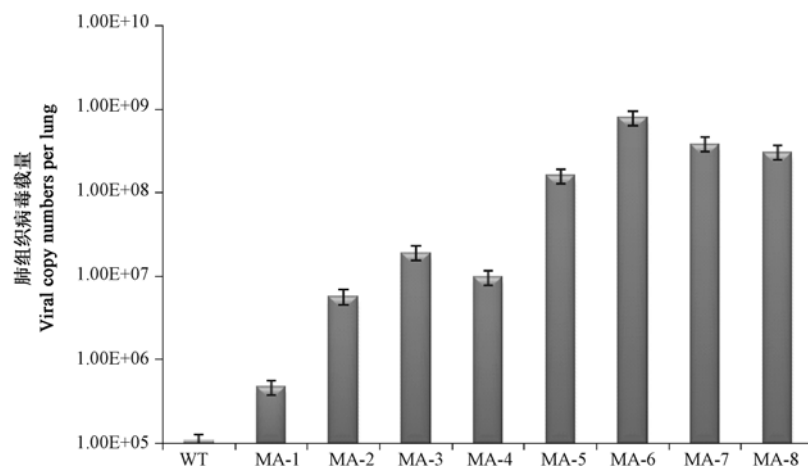
注: WT, 野生型毒株; MA, 小鼠适应株。

Note: WT, wild-type; MA, mouse-adapted

2.2 病毒载量测定

感染野生型和鼠肺适应株病毒的小鼠在感染后第 4 天解剖, 肺组织中均检测到病毒载量, RNA 拷

贝数呈现上升趋势, 于第 6 代达到峰值并稳定于该数量级。结果如图 1 所示。



注: WT, 野生型毒株; MA, 小鼠适应株

图 1 小鼠感染季节性流感 H1N1 A/Brisbane/59/2007 病毒野生型及小鼠适应株后第 4 天肺组织中病毒载量

Note: WT, wild-type; MA, mouse-adapted

Fig. 1 Viral load of mice challenged with wild-type and mouse-adapted seasonal H1N1 A/Brisbane/59/2007 viruses at 4 days after infection

2.3 基因比对

经过基因比对发现小鼠适应株 MA-2, MA-3 及 MA-8 的 HA 蛋白共发生 3 处突变, 分别为: 125 位的天冬酰胺 (Asn) 突变为苏氨酸 (Thr); 221 位的天冬氨酸 (Asp) 突变为甘氨酸 (Gly); 89 位的苏氨酸 (Thr) 突变为异亮氨酸 (Ile)。其余 7 个基因未出现突变情况。具体结果如表 2 所示。

2.4 感染性比较研究

感染后第 14 天各组小鼠存活数: WT 组 10 只, MA-2 组 7 只, MA-3 组 7 只, MA-8 组 0 只。WT 组小鼠感染后 14 天内均为发现异常, 且体重变化呈上升趋势; MA-2, MA-3 组小鼠均在感染后第 3 天出现竖毛现象, MA-8 组在感染后第 2 天出现竖毛现象。MA-8 组感染后第 7 天全部死亡, MA-2, MA-3 组小鼠在感染后第 10 天体重回升, 并逐渐恢复。各组存活率及体重变化情况如图 2, 图 3 所示。

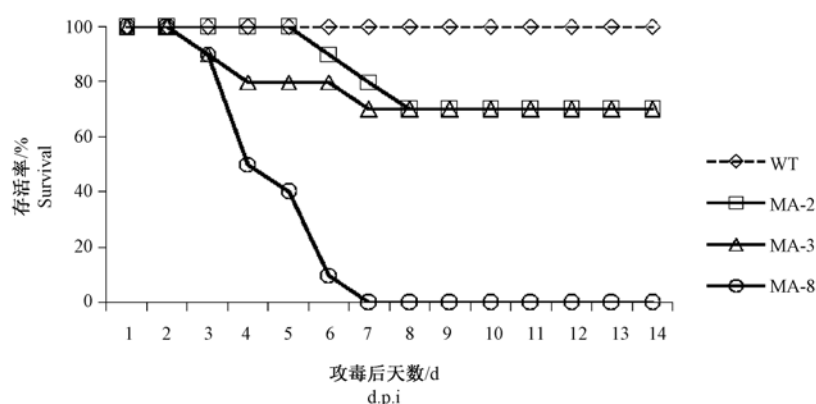
表 2 季节性流感 H1N1 A/Brisbane/59/2007 病毒野生型及小鼠适应株基因比对结果

Tab. 2 Sequence alignment of wild-type and mouse-adapted seasonal H1N1 A/Brisbane/59/2007 viruses of each passage

毒株 Strain	PB2	PB1	PA	HA						NP	NA	M2&M1	NEP&NS1		
				nt		aa		nt						aa	
				317	89	425	125	713	221						
WT	-	-	-	C	Thr	A	Asn	A	Asp	-	-	-	-		
MA-1	-	-	-	C	Thr	A	Asn	A	Asp	-	-	-	-		
MA-2	-	-	-	C	Thr	C	Thr	A	Asp	-	-	-	-		
MA-3	-	-	-	C	Thr	C	Thr	G	Gly	-	-	-	-		
MA-4	-	-	-	C	Thr	C	Thr	G	Gly	-	-	-	-		
MA-5	-	-	-	C	Thr	C	Thr	G	Gly	-	-	-	-		
MA-6	-	-	-	T	Ile	C	Thr	G	Gly	-	-	-	-		
MA-7	-	-	-	T	Ile	C	Thr	G	Gly	-	-	-	-		
MA-8	-	-	-	T	Ile	C	Thr	G	Gly	-	-	-	-		

注: WT,野生型毒株; MA,小鼠适应株; nt,核苷酸; aa: 氨基酸。

Note: WT: Wild-type; MA: Mouse-adapted; nt: Nucleotide; aa: Amino acid.

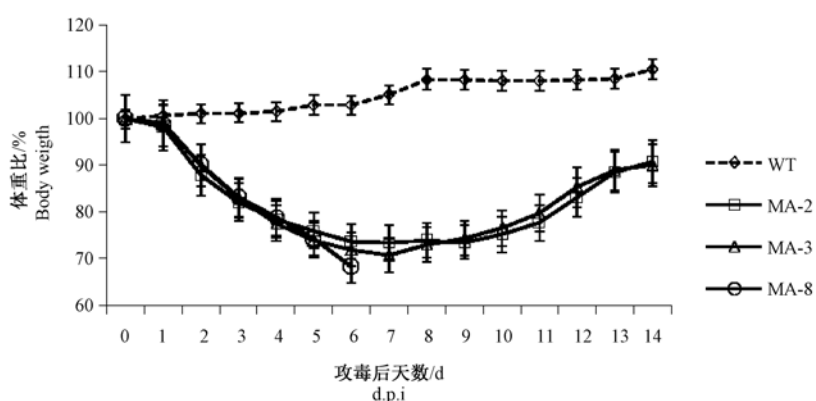


注: WT,野生型毒株; MA,小鼠适应株

图 2 小鼠感染季节性流感 H1N1 A/Brisbane/59/2007 病毒野生型及发生突变的小鼠适应株后 14 d 内存活率

Note: WT, wild-type; MA, mouse-adapted; d. p. i: days post inoculation

Fig. 2 Survival rate of mice intranasally challenged with wild-type and mutation mouse-adapted seasonal H1N1 A/Brisbane/59/2007 viruses at 14 days after infection



注: WT,野生型毒株; MA,小鼠适应株。图中显示结果为攻毒后每天体重与 0d. p. i 体重比值。

图 3 小鼠感染季节性流感 H1N1 A/Brisbane/59/2007 病毒野生型及发生突变的小鼠适应株后 14 d 内体重变化

Note: WT, wild-type; MA, mouse-adapted; d. p. i: days post inoculation. Mean body weight and SD were calculated as percentage of body weight compared with those at 0 d. p. i.

Fig. 3 Body weight changes of mice intranasally challenged with wild-type and mutation mouse-adapted seasonal H1N1 A/Brisbane/59/2007 viruses at 14 days after infection

3 讨论

流感病毒属 RNA 病毒类的正黏病毒科,是引起呼吸道感染的重要病原体^[6]。流感病毒所致呼吸道感染是临床常见病、多发病,常引起地方性流行,有时可致世界性大流行。因为小鼠与人类在肺炎上病理表现的一致性^[7],基于流感病毒的小鼠模型为近年来研究病毒的致病机制、病毒跨物种传播、病毒重组预测、新型流感病毒疫情预测、治疗方案的评价、药物和疫苗的筛选评价等方面的研究的重要工具之一^[3]。在自然情况下,小鼠并不能感染流感病毒,但是我们可以通过实验的手段对其进行人工感染,并通过将病毒在其体内连续传代的方式从而获得鼠肺适应株。本实验中,用野生型流感病毒感染小鼠肺部,虽然病毒在小鼠肺部,细支气管及气管中进行了复制并且达到了很高的效价,但并没有让小鼠表现出任何临床症状,病毒的大量复制激发了小鼠体内的自体免疫,使病毒在短时间内被清除。但是当病毒基因发生突变,形成小鼠适应株后,病毒会使受感染动物的气管或肺部发生病变,致病能力增强并引发肺炎。许多相关文献已经报道过很多影响流感病毒毒力的因素,血凝素 HA 是影响病毒毒力的主要因素之一^[3]。在此研究中,强毒力的鼠肺适应株 A/Brisbane/59/2007-MA 是从低致病力的 A/Brisbane/59/2007 毒株突变而来的,从小鼠的临床

表现以及病理检测中可看出小鼠适应株 A/Brisbane/59/2007-MA 在感染小鼠后毒力远远强于野生型 A/Brisbane/59/2007,基因组测序及比对结果表明小鼠适应株的毒力增强获益于 HA 基因的三处突变,但最主要原因是由第 89 个位点上 Thr 至 Ile 氨基酸的改变所造成。本次实验为以后对鼠肺适应的机理的深入研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Cheung TKW, Poon LLM. Biology of influenza a virus[J]. Ann New York Acad Sci, 2007, 1102(1): 1-25.
- [2] 王真行,徐冰. 2010~2011 年北半球流感流行季节使用流感疫苗病毒的建议[J]. 国际生物制品学杂志, 2010, 33(3).
- [3] 鲍琳琳,孙惠惠,占玲俊,等. A/California/7/2009 与 A/California/4/2009 病毒感染力比较[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(1): 6-9.
- [4] 吕进. 甲型流感病毒(H1N1)感染介导的小鼠肺免疫损伤机制研究[D];中国人民解放军军事医学科学院;2010.
- [5] Ward AC. Changes in the neuraminidase of neurovirulent influenza virus strains[J]. Virus Genes, 1995, 10(3): 253-260.
- [6] Tang JW, Shetty N, Lam TTY, et al. Emerging, novel, and known influenza virus infections in humans[J]. Infect Dis Clinics North Am, 2010, 24(3): 603-617.
- [7] Matsuyama T, Sweet C, Collie MH, et al. Aspects of virulence in ferrets exhibited by influenza virus recombinants of known genetic constitution[J]. J Infect Dis, 1980, 141(3): 351-361.

[收稿日期] 2013-10-25