研究报告

季节性流感疫苗对小鼠感染 H7N9 禽流感病毒的保护效力

吕琦,鲍琳琳,许黎黎,邓巍,李枫棣,袁静,于品,姚艳丰,秦川

(中国医学科学院,北京协和医学院,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**　评价季节性流感裂解疫苗对流感病毒 H7N9 的免疫保护效力。**方法**　用我国 2012 ~ 2013 年度季节性流感裂解疫苗,以腹腔注射方式免疫 BALB/c 小鼠,并设 PBS 免疫模型组,末次免疫 14 d 后以 5 LD_{50} A/Anhui/1(H7N9)进行攻试验。感染后观察记录小鼠临床表现,体重变化,并分别于第 2 天和第 4 天每组处死 3 只小鼠,取肺组织和鼻甲骨测病毒滴度和载量。**结果**　感染后疫苗与模型组小鼠体重下降明显,疫苗组存活率为 10%,模型组全部死亡。感染后第 4 天疫苗组鼻甲骨滴度显著低于模型组。血凝抑制试验及中和实验表明免疫小鼠血清无中和 H7N9 病毒抗体。**结论**　季节性流感疫苗在小鼠中对于 H7N9 流感病毒感染无明显保护作用。

【关键词】 H7N9 流感病毒; 季节性流感疫苗; 免疫保护效力

【中图分类号】Q95-33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1005-4847(2014) 01-0044-04

Doi:10. 3969/j. issn. 1005 -4847. 2014. 01. 009

Immune-protective effectiveness of seasonal influenza split vaccine against H7N9 influenza virus infection in mice

LV Qi, BAO Lin-lin, XU Li-li, DENG Wei, LI Feng-di, YUAN Jing, YU Pin, YAO Yan-feng, QIN Chuan

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

【**Abstract**】 **Objective**　To explore whether seasonal influenza split vaccine has immune protective effect on H7N9 influenza virus infection in mice. **Methods**　Seasonal influenza split vaccine and PBS were used to immunize mice by intraperitoneal injection. 14 days later, the mice were booster immunized with A/Anhui/(H7N9) virus. Then the mice were challenged with H7N9 influenza virus in a dose of 5 LD_{50}. H7N9 influenza virus was preincubated with mouse serum immunized with vaccine and titered by micro-neutralization and hemagglutination inhibition (HI) assay. The protective effect was judged by survival rate, body weight loss and residue virus titer in the lungs and turbinates 2 and 4 days post inoculation. **Results**　After infection, the body weight of mice in the vaccine and model groups were declined, the survival rate of the vaccine group was 10% and all mice of the model group died. The virus titers of the turbinates in the vaccine group were significantly higher than that in model group. The neutralizing antibodies raised in the sera of all mice vaccinated with seasonal influenza split vaccine did not neutralize H7N9. **Conclusion**　Seasonal influenza split vaccine cannot effectively protect mice against H7N9 influenza virus infection.

【**Key words**】 H7N9 influenza virus; Seasonal influenza split vaccine; Immune-protective effectiveness; Mice

---

[基金项目]十二五科技重大专项(2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004, 2012ZX10004301-8);国家自然科学基金(31370203);科技部 H7N9 禽流感应急防控专项(KJYJ-2013-01-04)。

[作者简介]吕琦(1982 年 -),女,实习研究员。E-mail: qqmei-qiqi@163. com

[通讯作者]秦川。E-mail: chuanqin@ cnilas. org

2013 年 3 月底上海和安徽两地,分别出现了 H7N9 亚型流感病毒感染人的疫情,为该亚型病毒全球首次出现。截至 5 月末,中国内地共报告人感染 H7N9 禽流感确诊病例 130 多例,大多数病人出现呼吸道感染,重症肺炎和呼吸困难的症状,其中死亡近 37 例,死亡率高达 30%,至今尚无有效疫苗[1-3]。虽然现有证据不足以证明发生人际传播,但 H7N9 流感病毒具有可以在人际间传播的可能性,而引发继 09 年大流感后的又一次大范围流感病毒的爆发。H7N9 疫苗的研制尚需时日,探讨目前使用的季节性流感疫苗是否与 H7N9 病毒存在交叉免疫保护变得很有必要。本研究以季流疫苗免疫小鼠,利用 H7N9 病毒进行攻击实验,探讨二者之间是否存在交叉保护,为 H7N9 疫苗发展做了一次新的探索和尝试。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　病毒

流感病毒 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所提供。

1.1.2　细胞

MDCK 细胞购自 ATCC,无支原体污染,细胞用 MEM 培养基培养,培养基内加入 10% 的胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素,培养条件为 37℃,5% CO_2。

1.1.3　疫苗

季节性流感病毒裂解疫苗(2012 ~ 2013 年)购自 GlaxoSmithKline。此疫苗包含两种甲型流感病毒(H1N1 和 H3N2)和一种乙型流感病毒的三价亚单位疫苗。

1.1.4　动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,4 ~ 6 周龄(体重 14 ~ 16 g),共 40 只。购自中国人民解放军军事医学科学院动物中心【SCXK(军)2012-0004】。

1.1.5　主要试剂与仪器

MEM 培养基、胎牛血清、双抗(购自 Gibco),TPCK、RDE 酶(购自 Sigma),ExTaqDNA 聚合酶、dNTPs(购自大连宝生物工程公司),RNeasy Mini Kit 提取试剂盒(购自 Qiagen 公司),Superscript III First Strand Synthesis Kit 试剂盒(购自 Invitrogen 公司),Step-One PCR system (ABI 公司)。

1.2　方法

1.2.1　分组

将 40 只小鼠随机分为 4 组,观察疫苗和模型组各 10 只,实验疫苗和模型组各 10 只。

1.2.2　小鼠免疫

采用加强免疫法,共免疫 2 次,每次间隔 14 d。小鼠后肢肌肉注射,每只注射剂量 50 μL,含 HA 抗原 1.5 μg。模型组采用 PBS 注射。末次免疫后 14 d 取静脉血,处理血清后用于测定对同型流感病毒 A/California/07/2009(H1N1)及异型流感病毒 A/Anhui/1(H7N9)的血凝抑制抗体效价及中和抗体效价。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全三级实验室中【卫 BLS3-006】进行。并通过了中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物伦理委员会的审查,批准号【ILAS-PS-2013-007】。

(1) 血凝抑制试验(HI)

使用 0.5% 的火鸡血进行小鼠血清血凝抑制试验。按照 OIE(Office Internationale des Epizooties,即 World Organization for Animal Health)颁布的标准 HI 测定方法测定收集的血清对流感病毒血凝抑制效价。

(2) 微量中和试验

血清倍比稀释,4 个复孔,加入等体积 100 $TCID_{50}$ 病毒混合,37℃孵育 1 h 后移入 MDCK 细胞中,37℃孵育 72 h; 用火鸡血测定凝血活性,以此判定细胞是否被感染。血球下流孔为中和抗体阳性,抗体效价按照 Reed and Muench 方法计算。

1.2.3　感染小鼠

末次免疫 14 d 时,确定小鼠抗体转阳。四组小鼠乙醚吸入麻醉后,5 LD_{50} 病毒液滴鼻感染小鼠,每只 50 μL。独立送风隔离笼具中正常饲养。实验期 14 d。

1.2.4　观察指标

观察组每日观察并记录小鼠活动状态及临床表现,并称量体重。实验组感染后分别在第 2 天和第 4 天每组处死 3 只小鼠,取肺组织和鼻甲骨测病毒滴度和载量。

(1) 小鼠体重变化和存活率计算

体重变化用体重百分比表示,即以小鼠当天体重减去其前一天体重的差值作分子,以其前一天的体重作分母,记录为平均体重变化百分比 ± 标准差,数值采用每组的平均数。小鼠存活情况用存活率表示,即以当天小鼠死亡只数做分子,总只数做分母。

(2) 病毒滴度测定

10 倍系列稀释的肺组织和鼻甲骨匀浆接种于

单层 MDCK 细胞中,37℃ 孵育 1 h 后,PBS 洗一次,并加入 200 μL 病毒培养基(MEM 培养基中加入 100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素和 1 μg/mL 胰蛋白酶),接种后第 3 天,收集感染细胞上清,火鸡血测定凝血活性,以此判定细胞是否被感染。Reed and Muench 计算组织细胞半数感染量($TCID_{50}$)[4]。

(3) 肺组织病毒载量测定

引物为 WHO 指定的 A 型流感病毒通用引物:InfA-F: 5′-GACCRATCCTGTCACCTCTGAC-3′; InfA-R: 5′-AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA -3′。扩增片段的大小为 100 bp。Qiagen 试剂盒法提取 RNA,反转录后进行 SYBR Green 定量 PCR。扩增条件:94℃,3min 预变性;94℃ 30 s 变性,58℃ 30 s 退火,72℃ 30 s 延伸,35 循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。标准品的制备方法由本实验室摸索完成。

1.2.5 统计分析

小鼠体重、病毒拷贝数以及病毒滴度在不同组之间存在的差异进行 ANOVA 单因素方差分析和 Bonferroni 校正分析。两组之间的差异运用 SPSS 11.5 软件包中的 *t*-检验进行分析。$P<0.05$ 时,认为两者之间差异存在显著性。

2 结果

2.1 末次免疫 14 d 后小鼠血清 HI 抗体效价及中和抗体效价

末次免疫 14 d 后取小鼠静脉血,血清处理后对疫苗株同型流感病毒 A/California/07/2009(H1N1)血凝抑制抗体效价均在 1:80 以上,中和抗体效价均在 1:256 以上,对于异型流感病毒 A/Anhui/1(H7N9)血凝抑制抗体反应阴性,中和抗体反应亦为阴性(数据未显示)。

2.2 感染后小鼠体征、体重及存活情况

H7N9 流感病毒感染小鼠后第 2 天,疫苗与模型组小鼠体重开始下降,体重下降最多达 39.7% 和 40.3%。感染后第 4 天开始,两组小鼠都出现竖毛,摄食量下降,活动度下降。在感染后第 4 天两组小鼠开始死亡。第 14 天为止,疫苗组存活率为 10%,模型组全部死亡。感染后疫苗和模型组小鼠体重变化和存活情况如图 1,2 所示。

2.3 肺组织和鼻甲骨的病毒分离

感染后第 2 和 4 天,疫苗和模型组每组各解剖 3 只小鼠,取肺组织和鼻甲骨匀浆接种于 MDCK 细胞进行病毒滴度的测定,每组取 3 只小鼠平均值,感染第 2 和 4 天后两组间肺组织病毒滴度差异无显著性,而疫苗组鼻甲骨病毒滴度第 4 天时显著低于模型组,结果如表 1 所示。

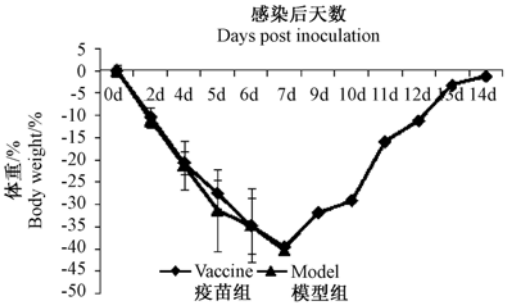

图 1 感染后小鼠体重变化

Fig. 1 Body weight of infected mice in the vaccine and model groups

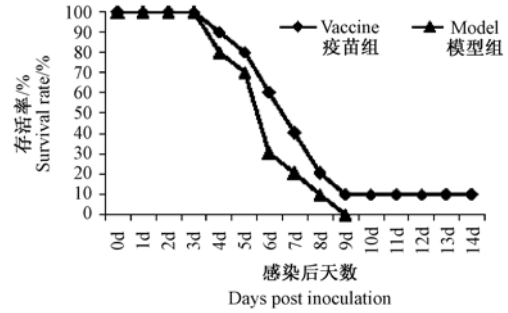

图 2 感染后小鼠存活率

Fig. 2 Survival rates of the infected mice of the vaccine and model groups

表 1 感染后第 2 和 4 天小鼠肺组织和鼻甲骨病毒滴度

Tab. 1 Virus titers in the mouse lungs and turbinates 2 and 4 days post inoculation

组别 Groups	肺组织 Lung (log_{10} TCID50/mL)		鼻甲骨 Turbinate (log_{10} TCID50/mL)	
	2 d	4 d	2 d	4 d
疫苗组 Vaccine	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.5	3.2 ± 0.6	1.9 ± 0.3 *
模型组 Model	3.2 ± 0.6	3.9 ± 0.6	3.7 ± 0.6	2.8 ± 0.3

注:与模型组比较,* $P<0.05$

Note: Compared with the model group, * $P<0.05$

2.4 肺组织和鼻甲骨的病毒载量

感染后第 2 和 4 天,疫苗和模型组每组各解剖 3 只小鼠,取肺组织和鼻甲骨匀浆做病毒载量分析,每组载量取 3 只小鼠平均值,结果两组间差异无显著性。如表 2 所示。

表 2　感染后第 2 和 4 天小鼠肺组织和鼻甲骨病毒载量

Tab. 2　Viral load in the mouse lungs and turbinates 2 and 4 days post inoculation

组别 Group	肺组织 Lung (log_{10} copies/mg)		鼻甲骨 Turbinate (log_{10} copies/mg)	
	2 d	4 d	2 d	4 d
疫苗组 Vaccine	5.3 ± 0.3	4.4 ± 0.5	4.1 ± 0.4	4.0 ± 0.2
模型组 Model	5.1 ± 0.3	5.4 ± 0.2	4.8 ± 0.4	4.8 ± 0.2

3　讨论

H7N9 流感病毒是首次发现新亚型人感染禽流感病毒，病死率高达 30%，至今尚无有效疫苗，人群对此病毒也缺乏免疫力，一旦病毒通过进化具有了人际传播可能性，必将引起流感大流行[1]。那么现有季节性流感疫苗可否防御此病毒就凸显重要。

小鼠病毒保护实验是疫苗保护效力评价的有力指标，我们利用季流疫苗免疫小鼠，免疫剂量为 1.5 μg HA 抗原，此免疫剂量可完全保护小鼠免受同型流感病毒感染[4]。末次免疫 14 d 确定抗体转阳，给予 H7N9 病毒感染，感染后两组小鼠体重成下降趋势，疫苗组存活率为 10%，模型组全部死亡。感染后第 4 天疫苗组鼻甲骨滴度显著低于模型组，据上述结果分析，季节性流感疫苗在小鼠中对于 H7N9 感染无明显保护作用。Michał 等[5]研究也证实这一点，季流疫苗不太可能诱导产生异型病毒间交叉免疫保护。

目前，多数学者认为，机体遭受流感病毒感染时中和抗体发挥主要作用，但在细胞免疫中 T 淋巴细胞免疫反应也至关重要[5]，Thomas 等[6,7]证明，细胞毒性 T 淋巴细胞缺陷小鼠在攻毒后明显恢复慢，死亡率高。HA 血凝素蛋白属 I 型糖蛋白，是病毒的主要免疫原性蛋白，不但能刺激机体产生中和抗体，在体内也能诱导细胞免疫[8]。本实验观察到疫苗组存活率稍高于模型组，鼻甲骨病毒分离显著低于模型组。从存活率和病毒分离结果分析，HA 所诱导产生的中和抗体并不能中和 H7N9 病毒，但细胞免疫可能发挥了一定作用，这可能是因为 HA 不同亚型间存在相同 T 细胞抗原表位，但需进一步的实验证明。实验中病毒载量检测拷贝数而非活病毒数，从而不能直接反应体内感染病毒情况，所以未得出与病毒滴度相似结果。

虽然季流疫苗在流感防控中起重要作用，但由于流感病毒 HA 抗原高度变异，难以诱发甲型流感病毒不同亚型间交叉免疫保护。与抗体应答不同，流感病毒的 NP 蛋白序列高度保守，因此其抗原肽能够诱导产生同型和异型病毒株的细胞毒性 T 淋巴细胞交叉免疫反应。Chang 等[8,9]在小鼠免疫季节性流感病毒后，加强免疫同亚型 NP 蛋白，将完全保护小鼠抵御 H5N1 禽流感病毒攻击，这提示在无有效疫苗时，此方式免疫产生保护力能否防御 H7N9 病毒，这将对 H7N9 病毒的防治策略给予重要提示意义。

参　考　文　献

[1] Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans [J]. Nature, 2013, 501(7468):551 – 555.

[2] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. N Engl J Med, 2013, 368(20):888 – 1897.

[3] Horby P. H7N9 is a virus worth worrying about [M]. Nature, 2013, 496(7446):399.

[4] Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010 [J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-8):1 – 62.

[5] Tendera M, Wojakowski W, Ruzyłło W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD341CXCR41 cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial [J]. Eur Heart J, 2009, 30(11):1313 – 1321.

[6] Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, et al. Cell-mediated protection in influenza infection [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(1):48 – 54.

[7] Zanetti AR, Mariano A, Romanò L, et al. Long-term immunogenicity of hepatitis B vaccination and policy for booster: an Italian multicentre study [J]. Lancet, 2005, 366(9494):1379 – 84.

[8] Chang H, Huang C, Wu J, et al. A single dose of DNA vaccine based on conserved H5N1 subtype proteins provides protection against lethal H5N1 challenge in mice pre-exposed to H1N1 influenza virus [J]. Virol J, 2010, 7:197.

[9] Antrobus RD, Berthoud TK, Mullarkey CE, et al. Co-administration of seasonal influenza vaccine and MVA-NP + M1simultaneously achieves potent humoral and cell mediated responses [J]. Mol Ther, 2013 Jul 8.

[收稿日期]　2013-10-15