

三个品系小鼠流感病毒气溶胶感染模型的比较

杨玉琴¹, 徐春华¹, 朱召芹¹, 胡芸文¹, 周文江^{1,2*}

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 复旦大学药学院, 上海 201203)

【摘要】 **目的** 通过气雾攻击产生气溶胶的感染方式对三个品系的小鼠分别进行感染, 比较三个品系小鼠在感染过程中的感染差异, 从而对三个品系小鼠流感模型的特点进行分析, 为流感发病机制的研究及疫苗和药物的开发选择合适的感染模型提供参考。**方法** 选用 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 病毒株, 采用气雾攻击的方法感染近交系 C57BL/6、BALB/c 和远交群 ICR 三个品系的小鼠, 每日称小鼠体重, 肉眼观察小鼠状态, 分别于感染后 3、7、14 d 处死小鼠, 取肺脏称其湿重, 进行肺脏的病毒测定及病理观察。**结果** 三个品系小鼠均可感染, 其中 C57BL/6 小鼠的存活率低于其他两个品系, 3 d 的肺指数和病毒载量均明显高于 ICR 小鼠 ($P < 0.05$), 镜下病理结果显示较其他两个品系也更明显。BALB/c 小鼠与其他两个品系小鼠相比, 体重在后期的恢复最慢, 存活率比 C57BL/6 高但比 ICR 低; 肺指数和病毒载量与其他两个品系相比差异无显著性; 镜下病理改变相似, 但弱于 C57BL/6 强于 ICR。ICR 小鼠的发病进程与其他两个品系小鼠基本相似, 但体重、存活率、肺指数、病毒载量及镜下病理改变等指标均弱于其他两个品系。**结论** 三个品系小鼠均可建立流感气溶胶模型, 但感染后的三个模型各有特点, 在实验中可以根据不同的研究目的来选用合适的小鼠品系建立模型。

【关键词】 气溶胶; 流感病毒; 模型; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0145-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.007

Comparison of three mouse models infected with influenza virus by aerosol

YANG Yu-qin¹, XU Chun-hua¹, ZHU Zhao-qin¹, HU Yun-wen¹, ZHOU Wen-jiang^{1,2*}

(1. Shanghai Clinical Center of Public Health, Shanghai 201508, China;

2. School of Pharmacy of Fudan University, Shanghai 201203)

【Abstract】 **Objective** To compare and analyze the differences and characteristics of three strain mouse models infected by influenza virus aerosol inhalation, and provide the reference for choosing the appropriate infection model in the research of pathogenesis of influenza and the development of vaccines and drugs. **Method** C57BL/6, BALB/c and ICR mice were infected with A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus strain by aerosol inhalation. The symptoms and body weight of mice were observed every day. At 3, 7, 14 days after infection, the mice were sacrificed. The lungs of mice were weighed, then virus assay and pathological observation were carried out. **Results** The three strains of mice were infected. The survival rate in the C57BL/6 mice was lower than those in the BALB/c and ICR mice. The lung index and viral load of C57BL/6 mice were significantly higher than those of ICR mice ($P < 0.05$) at 3 days after infection. The pathological changes of C57BL/6 mice were also more obvious than other two strains. Compared with other two mouse strains, the weight recovery of BALB/c mice was the slowest. The survival rate in BALB/c mice was higher than that of C57BL/6 mice and lower than that of ICR mice. The lung index and viral load were not significantly different among the three strains of in-

[基金项目] 上海市科委资助项目(12140903100)。

[作者简介] 杨玉琴(1980-), 女, 硕士。主要从事实验动物及动物实验研究, E-mail: fudanyan2007@sina.com

[通讯作者] 周文江, 主任技师, 主要从事实验动物研究和管理, E-mail: wjzhou@shmu.edu.cn

infected mice. The pathological changes among the three strains of infected mice were similar, but the degrees of pathological changes in the BALB/c mice were milder than in the C57BL/6 mice and worse than in the ICR mice. Compared with other two mouse strains, the process of disease is similar, but the body weight, mortality, lung index, viral load, and the microscopic pathological changes were lighter in the ICR mice than in the other two strain mice. **Conclusions** The three strain mouse models can be established by influenza virus aerosol inhalation, but showing different characteristics. Appropriate strain mice can be chosen to build model according to different research purpose in the experiment.

【Key words】 Aerosol; Influenza virus; Model; Mice

Corresponding author: ZHOU Wen-jiang, E-mail: wjzhou@shmu.edu.cn

流感是人类面临的主要公共健康问题之一。据统计,在世界范围内,流感每年的发病率为 10% ~ 30%,死亡率 0.1% 左右^[1-2]。我国是流感高发地区,每年有 15% ~ 20% 的人群被感染。流感病毒具有极强的变异性,近些年来新型的高致病性流感病毒不断出现,例如 2004 年东亚地区爆发的 H5N1 (禽流感),2009 年墨西哥、美国等多国接连暴发的甲型 H1N1 型流感(H1N1 型猪流感),以及 2013 年在上海首先出现的 H7N9 禽流感^[3],这些都对人类健康产生了巨大威胁。因此对于流感发病机制及新型流感疫苗和药物的开发显得极为迫切,而选择合适的实验动物模型是进行此类研究的基础与保证。

小鼠是建立流感模型最常见的动物,但小鼠的品系繁多,各个品系小鼠建立的模型有哪些特点,这些特点更适用于流感哪方面的研究,目前未见明确的报道。本研究选择近交系 C57BL/6、BALB/c 和远交群 ICR 小鼠,通过气溶胶的感染方式进行感染,希望通过对其感染结果的分析,获得三个品系的感染特点,为流感不同层面的研究选择合适的模型提供参考。

1 材料与方法

1.1 病毒

流感病毒株为 H1N1 PR8,经 SPF 级鸡胚增殖后收集病毒尿囊液,TCID₅₀ 均为 2×10^4 , -80℃ 储存备用,实验均在本中心 BSL-2(生物安全 II 级)实验室中进行(注册备案号:金字第 022006005 号)。

1.2 动物

实验动物选用 SPF 级 C57BL/6、BALB/c 和 ICR 小鼠,4 ~ 6 周龄,体重 18 ~ 20 g。购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2013-0016]。

1.3 感染小鼠及分组

C57BL/6、BALB/c 和 ICR 小鼠各 40 只,雌雄各半,标记后分别称重。各品系小鼠分别接种 H1N1 PR8 2×10^4 TCID₅₀, 5 mL。将每组小鼠放入气雾攻

击装置(Madison III),病毒放入吸入的玻璃管中,按照预热 15 min、病毒液雾化 30 min、病毒液沉降 30 min、紫外杀菌 15 min 的程序进行气溶胶感染,病毒流速为 17.8 μ L/s。感染当日记为 0 d,感染后各组小鼠均分别放入 4 个独立送风隔离笼内进行饲养,观察 14 d。

1.4 动物取材

每日观察感染小鼠的活动状态及临床表现,称量体重,每组感染小鼠分别于感染后第 3、7 天和 14 天脱臼处死,每组每个时间点处死 6 只,剩余小鼠继续观察体重及死亡情况。小鼠处死前称量其体重,内眦静脉采血后,脱臼处死,打开腹腔,肉眼观察肺脏情况,并迅速取出肺称量肺湿重。取左肺上叶同一部位 1 cm \times 1 cm \times 1 cm 组织置于 4% 甲醛溶液固定、石蜡包埋、常规 HE 染色,光镜下观察其病理变化;再取一部分肺做病毒检测。根据每日体重变化,计算体重变化率(体重变化率% = (当日体重 - 0 d 体重)/0 d 体重 \times 100%),根据处死小鼠的肺湿重和体重计算肺指数(肺指数 = 小鼠的肺重/小鼠的体重 \times 100)。

1.5 肺组织总 RNA 提取及 PCR 检测

使用 Total RNA 抽提试剂盒(Qiagen,美国)抽提组织中的总 RNA,抽提产物用微量分光光度计(Nanodrop 1000,美国)测定核酸浓度(A260/280)后,加 RNAase-free DNase I 37℃ 放置 20 min,然后 65℃ 放置 10 min。纯化后的样本用 One-step RT-PCR kit(TaKaRa,大连宝生物)进行检测,扩增体系为 25 μ L:12.5 μ L TaqMan PCR 基础液,400 nmol/L 引物(F: 5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3', R:5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA-3')和 300 nM TaqMan 探针(5'-FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-TAMRA-3'),2.5 μ L RNA 模板。将 96 孔板子放入荧光定量 PCR 仪(Eppendorf Master cycler Eprealplex,德国)。扩增程序:42℃ 10 min;95℃ 1 min;95℃ 15 s,60℃ 45 s,45 个

循环。

1.6 统计学方法

用统计学软件 GraphPad Prism Software 5.0 对组间差异应用 *t* 检验分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床症状观察

C57BL/6、BALB/c 和 ICR 小鼠均在感染后的第 2 天出现反应迟钝、厌食、竖毛及体重减轻等症状,之后症状逐渐加重,在感染后第 9 天症状开始减轻。在体重降低比率方面,在感染后前 8 d 体重降低期,三个品系小鼠的体重降低比率为 C57BL/6 > BALB/c > ICR,在感染后 9 ~ 14 d 的体重恢复期体重降低比率为 BALB/c > C57BL/6 > ICR,但三个品系小鼠体重总体改变趋势差异无显著性,均为感染前 8 d 体重逐渐降低,8 d 后体重开始逐渐恢复(见图 1)。C57BL/6 小鼠第 6 天出现死亡,至 14 d 时,其存活率为 50%,BALB/c 和 ICR 小鼠均在第 8 天出现死亡,至 14 d 时,BALB/c 小鼠的存活率为 66.7%,ICR 小鼠的存活率为 75%(见图 2)。三个品系小鼠的肺指数变化趋势均为感染后先逐渐增高然后逐渐降低,在感染后第 7 天达到最高。第 3 天的肺指数,C57BL/6 小鼠与 ICR 小鼠相比差异有显著性 ($P < 0.05$);第 7 天的肺指数 C57BL/6 > BALB/c > ICR,但三者差异无显著性;第 14 天的肺指数,三个品系小鼠无差异(见图 3)。

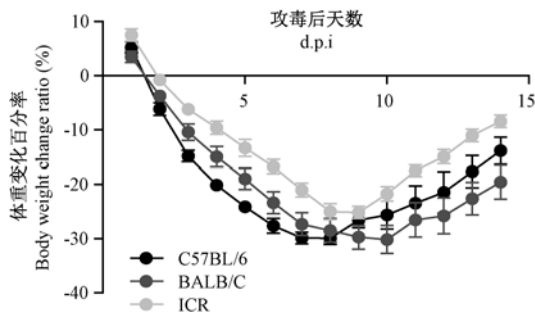


图 1 攻毒后小鼠体重变化率

Fig. 1 The body weight change ratio of the mice after virus inoculation

2.2 感染小鼠肺组织病毒载量测定

感染后的各组小鼠于感染后第 3 天、7 天和 14 天处死取肺组织匀浆上清进行病毒载量分析,结果显示感染各组均于感染后第 3 天的病毒载量最高,第 7 天和 14 天逐渐降低。在感染后第 3 天 C57BL/6

小鼠的病毒载量显著高于 ICR 小鼠 ($P < 0.05$);第 7 天 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠的病毒载量高于 ICR 小鼠,但差异无显著性;第 14 天,三个品系小鼠的病毒载量无差异(见图 4)。

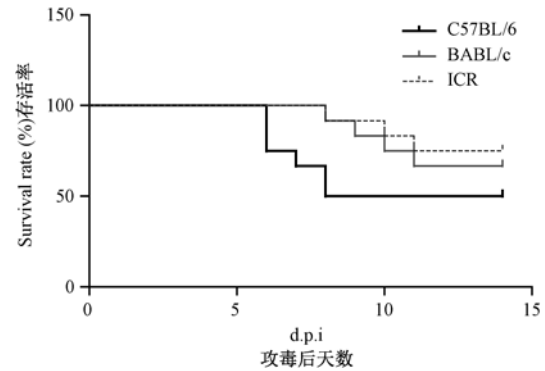
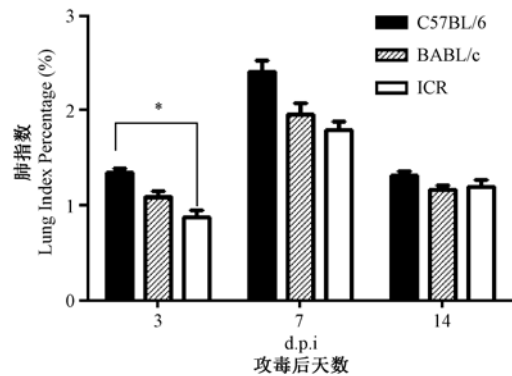


图 2 攻毒后小鼠存活率

Fig. 2 Survival rates of the mice after virus inoculation

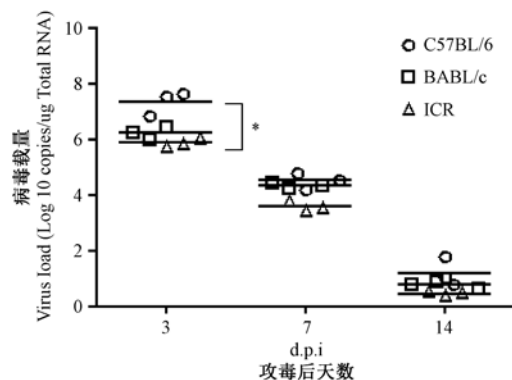


注:组间比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 攻毒后小鼠肺指数

Note. Comparison among groups, * $P < 0.05$.

Fig. 3 Lung index percentage of the mice after virus inoculation



注:组间比较,* $P < 0.05$ 。

图 4 攻毒后小鼠病毒载量

Note. Comparison among groups, * $P < 0.05$.

Fig. 4 Viral load in the mice after virus inoculation

2.3 感染小鼠病理组织学观察

C57BL/6 小鼠肺脏的病理变化:肉眼可见感染后第 3 天小鼠肺脏的病变范围为 20% ~ 50%,从肺根部向外扩散,镜下观察发现主要是在肺泡间隔有一定量中性粒细胞和淋巴细胞等炎细胞的浸润;肉眼可见感染后第 7 天小鼠肺脏的病变范围为 70% ~ 90%,镜下观察发现主要是在肺泡间隔及肺泡内有大量的炎细胞的浸润,并可见一些纤维细胞,肺间隔增宽,出现间质性肺炎,在部分肺泡腔内有渗出液,出现了肺水肿;肉眼可见感染后第 14 天小鼠肺脏的病变范围为 60% ~ 70%,镜下观察发现炎细胞浸润较第 7 天减少,但局部仍可见大量炎细胞,肺泡壁毛细血管扩张充血出血,肺泡腔内有渗出液,出现了肺水肿(见图 5)。BALB/c 小鼠肺脏的病理表现:肉眼可见感染后第 3 天小鼠肺脏的病变范围为 15% ~ 30%,主要集中在肺根部,镜下观察发现主要是在肺泡间隔有一定量的中性粒细胞和淋巴细胞等炎细胞的浸润,较 C57BL/6 小鼠炎细胞少;肉眼可见感染后第 7 天小鼠肺脏的病变范围为 80% ~ 95%,镜下观察发现主要是在肺泡间隔及肺泡内有

大量的炎细胞的浸润,较 C57BL/6 小鼠炎细胞少;部分区域形成了间质性肺炎,在部分区域肺泡内可见渗出液,出现了肺水肿;肉眼可见感染后第 14 天小鼠肺脏的病变范围为 50% ~ 70%,镜下观察发现炎细胞浸润较第 7 天减少,但局部可见大量肺充血及肺水肿(见图 5)。ICR 小鼠肺脏的病理改变:肉眼可见感染后第 3 天小鼠肺脏的病变范围为 5% ~ 20%,主要集中在肺根部,镜下观察发现主要是在肺泡间隔有一定量的中性粒细胞和淋巴细胞等炎细胞的浸润,较 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠炎细胞少;肉眼可见感染后第 7 天小鼠肺脏的病变范围为 50% ~ 75%,镜下观察发现主要是在肺泡间隔及肺泡内有大量的炎细胞的浸润,较 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠炎细胞少,部分区域形成了间质性肺炎;肉眼可见感染后第 14 天小鼠肺脏的病变范围为 40% ~ 60%,炎细胞浸润较第 7 天减少,但局部仍可见大量炎细胞浸润(见图 5)。三个品系小鼠感染病变进程相似,三个品系小鼠都出现了间质性肺炎,肺水肿,肺充血等典型病变。但病变严重程度为 C57BL/6 > BALB/c > ICR。

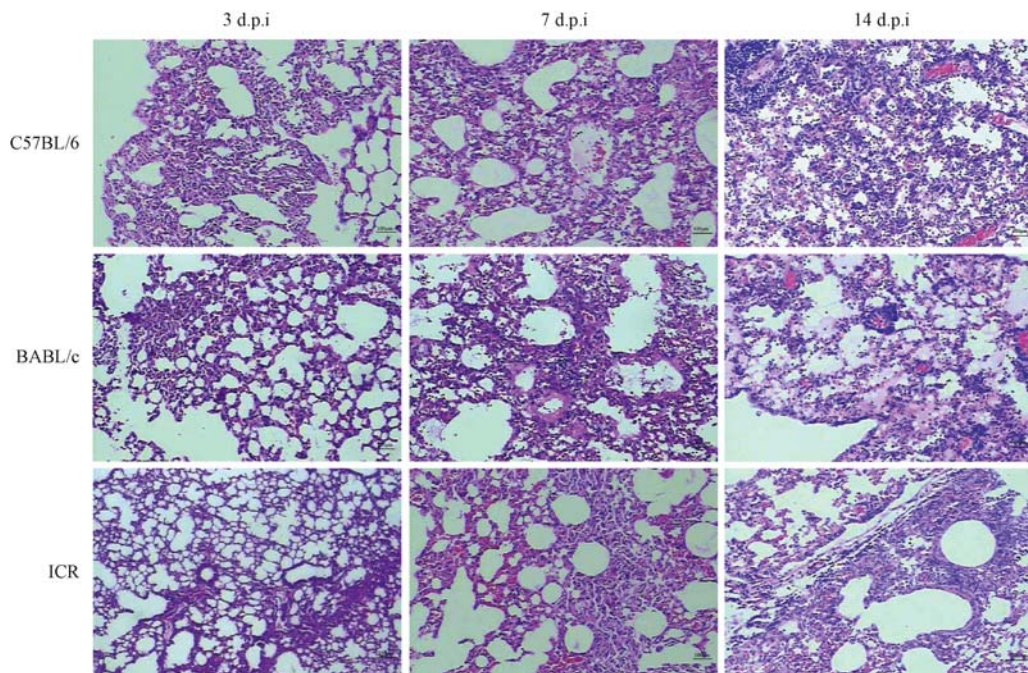


图 5 攻毒后小鼠肺脏的病理改变(HE 染色 $\times 10$, 标尺 = 100 μm 。)

Fig. 5 Pathological changes in the mice after virus inoculation(HE staining, $\times 10$, scale bar = 100 μm .)

3 讨论

在流感病毒的研究过程中,建立合理的动物模型对于研究流感病毒和宿主相互作用的致病机制,

评价相关药物和疫苗的抗流感病毒效果以及本身的安全性至关重要,而选择合适的动物和感染方式是模型建立成败的关键。

现已知人类流感的感染方式主要有三种:气溶

胶、大液滴和污染接触鼻黏膜。国内外学者曾采用口腔接种和灌胃等方法来构建流感动物模型^[4],但这两种方法都是通过消化道进行感染,与人类的感染方式存在很大差异,不能模拟人类流感的感染和发病过程。滴鼻方式是被广泛采用的实验方法,其模拟人类大液滴和感染污染接触鼻黏膜方式,主要是将病毒直接滴入鼻腔,但此方法无法切断感染途径,在流感的预防感染研究方面存在缺陷。Tellier^[5]证实在人类流感传染过程中气溶胶传染方式起主要作用,故气溶胶感染方法可模拟人类流感的自然感染途径。

近年来,流感动物模型的研究取得了较大的进展,动物选择的范围也逐渐广泛,主要包括非人灵长类、雪貂、猪、豚鼠、大鼠和小鼠等^[6]。但研究发现在建立流感模型过程中这些动物大都存在一定的局限性。如:一些流感病毒株在大鼠体内不能复制^[7];豚鼠只对个别毒株敏感^[8];猪对流感病毒敏感,但动物饲养和感染均存在困难^[9];非人灵长类对流感病毒易感,且与人类最为接近,但由于价格和伦理问题,不能被普遍应用;雪貂对流感病毒最敏感,但由于价格昂贵,饲养环境要求过高,不利于模型动物的推广应用^[10]。小鼠对流感病毒同样易感,且小鼠的遗传学背景研究得比较详尽,价格低廉,操作简单,可广泛推广应用^[11],因此小鼠是目前建立流感病毒感染模型最常用的动物。

本研究选用近交系 C57BL/6、BALB/c 和远交群 ICR 三个品系的小鼠,采用气雾攻击的方法对其进行感染,结果发现三个品系小鼠均可成功建立流感气溶胶小鼠模型,但三个模型各有其特点。综合分析三个品系小鼠流感模型的感染特点,提示 C57BL/6 小鼠模型可用于流感急性期和重症流感的发病机制的研究;BALB/c 小鼠模型可考虑用于流感疫苗和药物的研究;ICR 小鼠模型可用于一些新流感病毒的初次建立模型或用于研究个体对流感敏感性的研究。

实验小鼠在不断地开发和培育中建立的品系越来越多,目前在中国医学科学院医学实验动物研究所建立的实验动物品系数据库可查到的小鼠品系约有 21 596 种^[12]。选用不同品系小鼠建立同一种疾

病模型时,所建立的小鼠疾病模型会呈现出不同的感染特点,因此通过对不同品系小鼠建立的疾病模型进行比较研究,可以选择出更适合的疾病模型;同时由于各品系小鼠的遗传背景比较清晰,可以用于疾病发病机制的研究。本文只是对常见的三个小鼠品系进行了初步研究,若想选择出合适的小鼠流感模型及了解流感发病机制,还需进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Dushoff J, Plotkin JB, Viboud C, et al. Mortality due to influenza in the United States — an annualized regression approach using multiple-cause mortality data [J]. *Am J Epidemiol*, 2006, 163(2): 181–187.
- [2] Carrillo-Santistevan P, Ciancio BC, Nicoll A, et al. The importance of influenza prevention for public health [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(1): 89–95.
- [3] 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: 1888–1897.
- [4] Jerome L. Schulman, MD. The use of an animal model to study transmission of influenza virus infection [J]. *Influenza Virus Infection*, 1968, 58(11): 2092–2096.
- [5] Tellier R. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies [J]. *J Royal Soc Interface*, 2009, 6: 783–790.
- [6] 刘崇海, 蒋利萍, 魏钰书. 流感病毒感染动物模型的研究进展 [J]. *国际病毒学杂志*, 2006, 13(1): 9–12.
- [7] Daniels MJ, Selgrade MK, Doerfler KL, et al. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains [J]. *Comp Med*, 2003, 53(3): 293–298.
- [8] Barnard DL. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy [J]. *Antiviral Res*, 2009, 82: 110–122.
- [9] Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, et al. Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus. A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals [J]. *Arch Virol*, 2006, 151: 1267–1279.
- [10] Munster V, de Wit E, van-den-Brand J, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus in ferrets [J]. *Science*, 2009, 325 (5939): 481–483.
- [11] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice [J]. *Science*, 2009, 325(5939): 484–487.
- [12] 孔琪, 夏霞宇, 秦川. 实验动物品系数据库的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25 (4): 78–83.

[收稿日期] 2015-09-02