

雪貂感染 H7N9 禽流感病毒动物模型的建立

邓巍, 许黎黎, 鲍琳琳, 朱华, 陈霆, 吕琦, 李枫棣, 袁静, 向志光,
高凯, 徐艳峰, 黄澜, 李彦红, 刘江宁, 姚艳丰, 于品, 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 建立雪貂感染 H7N9 禽流感病毒动物模型。方法 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 禽流感病毒经鼻吸入感染雪貂, 观察动物临床症状和体征, 上呼吸道排毒情况及组织病理学变化。结果 雪貂感染后出现体重下降、活动减少以及打喷嚏的临床表现, 上呼吸道、心脏、肝脏及嗅球可检测到活病毒, 上呼吸道排毒的峰值出现在感染后的第 3~5 天。血清抗体滴度最高达到 1280, 外周血淋巴细胞数量减少、粒细胞数量增加。组织病理学显示动物肺脏呈局灶性间质性肺炎及肺泡炎改变, CT 显示肺内片状阴影。结论 成功建立雪貂感染 H7N9 禽流感病毒的动物模型, 模型的建立为 H7N9 禽流感发病机制研究、药物及疫苗的评价奠定了实验基础。

【关键词】 H7N9 禽流感病毒; 雪貂; 模型; 动物

【中图分类号】 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2014) 01-0068-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.001.016

The ferret models for studying the novel avian-origin human influenza A (H7N9) virus

DENG Wei, XU Li-li, BAO Lin-lin, ZHU Hua, CHEN Ting, LV Qi, LI Feng-di, YUAN Jing, XIANG Zhi-guang,
GAO Kai, XU Yan-feng, HUANG Lan, LI Yan-hong, LIU Jiang-ning, YAO Yan-feng, YU Pin, 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 establish ferret models for the novel avian-origin H7N9 influenza virus. **Methods** A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus was administered by intranasal instillation to groups of ferrets. Clinical signs, virus shedding from respiratory tract and pathological analyses were recorded. **Results** Inoculated ferrets developed typical clinical signs including body weight loss and sneezing. Peak virus shedding from respiratory tract was observed on 3 - 5 days post inoculation (d. p. i.). Virus could also be detected in heart, liver, and olfactory bulb from inoculated ferrets. The inoculation of H7N9 could elicit seroconversion titers up to 1280. Leukopenia, significantly reduced lymphocytes but increased neutrophils were also observed in ferret models. **Conclusion** Collectively, the ferrets models enables detailed studies of the pathogenesis of this illness and lay foundation for relative drug or vaccine evaluation.

【Key words】 H7N9 virus; Ferret; Model, animal

[基金项目] 科技部应急专项 (KJYJ-2013-01-04); 国家科技重大专项 (2012ZX10004-404, 2012ZX10004-501)。

[作者简介] 邓巍 (1975 -), 男, 助理研究员, 研究方向: 感染性疾病病理研究。

[通讯作者] 秦川, 女, 研究员, 博士生导师。Email: qinchuan@pumc.edu.cn。

2013 年 3 月在中国东部地区爆发了 H7N9 禽流感疫情,患者的主要表现为进行性重度肺炎和呼吸困难^[1]。截止至 8 月 6 日,全国 10 省市发生人感染 H7N9 禽流感病例 132 例,其中死亡 43 人。因此在疫情不断发展的情况下,迅速建立该疾病的实验动物模型,为 H7N9 禽流感发病机制研究、疫苗及药物的评价提供实验基础是必要而迫切的。自 1933 年以来雪貂因其对人和禽流感病毒易感,就一直被用作流感模式动物^[2]。感染流感病毒后,雪貂的呼吸道症状以及肺部病变与人类十分相似^[3]。本实验利用雪貂 (*Mustela putorius furo*) 成功建立了 H7N9 感染的实验动物疾病模型。

1 材料与方法

1.1 病毒

流感病毒 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 来自于第 3 例确诊的 H7N9 患者,接种 9~11 d SPF 鸡胚,然后在 MDCK 细胞上传代一次。

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 (MEM, Invitrogen),培养基内加入 10% 的胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素,培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 。

1.3 动物感染及标本采集

9 只 SPF 级雪貂购自中国医学科学院医学实验动物研究所,6~12 月龄,所有动物血清对流行的流感病毒的血凝抑制 (HI) 试验检测结果均为阴性。雪貂分 2 组,第一组 3 只,每只动物滴鼻感染 400 μL 10^8 TCID₅₀ 的 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 病毒,每天进行 CT 肺部扫描;第二组 6 只动物,每只动物滴鼻感染 400 μL 10^6 TCID₅₀ 的 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 病毒,在感染后的第 3、第 7 天分别随机安乐死 1 只动物,对其气管、肺、脑、心脏、肝脏、脾、肾、胃、十二指肠以及嗅球进行病理及病毒学检测。所有 9 只雪貂每天记录临床症状及体重,分别在感染后第 1,3,5,7,9 天采集感染雪貂的鼻拭子和咽拭子,保存于 1 mL PBS 中,并接种于 MDCK 细胞,测定病毒滴度。

本实验由北京协和医学院医学实验动物研究所动物使用和伦理委员会批准 (ILAS-PC-2013-009)。所有的实验都按照 WHO 指导原则在 ABSL-3 实验室内进行 (许可证号: ABSL3-021, CANS BL0010)。

1.4 病毒滴度

本实验采用 MDCK 细胞测定病毒的滴度。10 倍系列稀释的各组织匀浆、鼻拭子、咽拭子接种于单层 MDCK 细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,用 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 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 1 $\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶),接种后第 3 天,收集被感染细胞上清,用火鸡血测定凝血活性,以此判定细胞是否被感染。利用 Reed-Muench 计算组织细胞半数感染量 (TCID₅₀)^[4]。

1.5 组织病理和免疫组化

根据标准操作规程进行动物尸检,组织置于 10% 福尔马林中固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,苏木精-伊红 (H&E) 染色,光学显微镜检查。免疫组化使用抗甲型流感病毒核蛋白的单克隆抗体 (1:200 稀释,IRR 公司,货号: FR-51) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (1:5 000 稀释, Sigma 公司,货号: PV-9002),加入 3-3-二氨基联苯胺 (DAB),光学显微镜观察。

1.6 血细胞分析

采集每只动物外周血保存于肝素抗凝管内,利用 ACT TM (贝克曼公司,美国) 血常规仪对血样本进行血细胞计数分析。

1.7 Micro-CT 扫描

使用 Micro-CT 扫描仪 (西门子医疗公司,德国) 观察雪貂肺部情况,感染雪貂麻醉后平躺在 CT 床上,保持呼吸通畅。管电压为 70 kV,电流为 400 mA,曝光时间为 800 ms,扫描范围 (FOV) 为 72.44 mm \times 71.31 mm。通过单球管/探测器 CT 系统以步进 1 度旋转 360 度以获得图像投影。使用市售的滤波反投影技术成像软件 (COBRA Exxim, v6.3) 进行图像重建。

1.8 血凝抑制试验 (HI)

使用 0.5% 的火鸡血进行雪貂血清的血凝抑制试验实验。采集雪貂外周血,分离血清,按照 WHO 颁布的标准 HI 测定方法测定收集的血清对 H7N9 病毒的血凝抑制价^[5]。

1.9 统计分析

雪貂的体重、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*-test 进行分析。 $P < 0.05$ 时,两者之间存在显著性差异。

2 结果

2.1 症状和体征

两个感染剂量组的雪貂均表现出发热,体重下降,打喷嚏,流鼻涕,嗜睡(封底图 1A 和 1B,表 1),食欲下降。在感染后 14 d 的观察期内, 10^8 剂量组的雪貂体温最高可达到 40.0°C (感染后第 2 天) 体重降低程度最高可达 10.7% (感染后第 7 天), 10^6 剂量组的雪貂则分别为 40.1°C (感染后第 4 天) 和 9.3% (感染后第 5 天)(图 2A 和 2B)。

此外, 10^8 剂量组的 3 只雪貂 CT 扫描结果显示,感染后第 6~14 天,在肺的左上叶、右上叶以及右中叶可见片状炎症阴影(封底图 1C)。

2.2 血液学变化

临床报道感染 H7N9 病毒的患者白细胞数量下

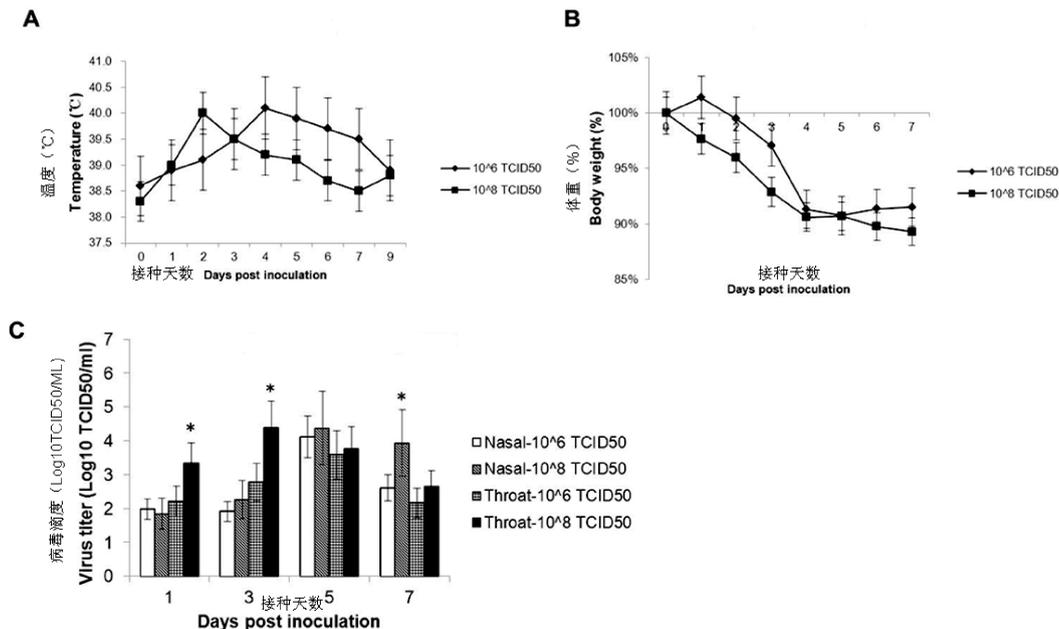
降^[1,6-7]。在感染后第 7 天雪貂外周血检测发现雪貂淋巴细胞明显减少,而中性粒细胞增加明显($P < 0.05$) (表 2)。

2.3 动物排毒情况

感染后第 1,3,5,7,9 天采集感染雪貂的鼻拭子和咽拭子,接种 MDCK 细胞进行病毒滴度的测定。感染后第 1 天两个剂量感染雪貂均开始排毒,一直持续到感染后第 7 天。两个剂量上呼吸道排毒的峰值分别出现在感染后第 3 天的咽拭子(10^8 剂量组),滴度到达 $10^{4.38}$ TCID₅₀/mL,以及感染后第 5 天的鼻拭子(10^6 剂量组),滴度为 $10^{4.11}$ TCID₅₀/mL (图 2C)。

2.4 解剖及病理学变化

感染后第 3 和第 7 天随机安乐死一只感染 10^6 TCID₅₀ H7N9 禽流感病毒的雪貂,对其气管、肺、脑、



注:图 A、B、C 分别为雪貂感染后平均体温、平均体重、及上呼吸道排毒平均水平。

图 2 感染 H7N9 禽流感病毒雪貂体温、体重及上呼吸道排毒情况

Note: Figure A, B, and C represents average temperature, average weight, and upper respiratory tract virus shedding level of inoculated ferrets with H7N9 virus respectively.

Fig. 2 Virus shedding, body temperature and weight loss changes of inoculated ferrets with H7N9 virus

表 1 雪貂感染 H7N9 禽流感病毒后的临床症状以及各组织病毒复制情况

Tab.1 Clinical signs and replication of H7N9 virus in ferrets

临床症状 Clinical signs			感染天数	病毒滴度 Virus titer (Log ₁₀ TCID ₅₀ /tissue)									
体重下降	打喷嚏	病死	Euthanized time	气管	肺	脑	心	肝	脾	肾	肠	嗅球	
Weight loss (%)	Sneezing	Lethality	(d. p. i.)	Trachea	Lung	Brain	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Intestine	Olfactory bulb	
9/9	9/9	0/9	3	4.92	2.59	-	2.82	-	-	-	-	5.41	
(10.7/9.3) ^a			7	4.11	2.87	-	-	2.16	-	-	-	-	

注:^a感染 10^8 TCID₅₀ H7N9 禽流感病毒组雪貂体重平均下降 10.7% , 感染 10^6 TCID₅₀ H7N9 禽流感病毒组雪貂体重平均下降 9.3% 。

Note: ^a 10.7% for animals inoculated with 10^8 TCID₅₀ of H7N9 virus, and 9.3% for animals inoculated with 10^6 TCID₅₀ of H7N9 virus.

表 2 雪貂感染 H7N9 禽流感病毒后的血像变化情况

Tab.2 Impact of viral infection on the ferret lymphocyte populations in whole blood

感染天数 (d. p. i.)	WBC($10^9/l$)	% LY ^a	% NE ^a
-1 ^b	15.9	64.8	17.9
7	8.4*	38.8*	57.6*
14	13.4	55.1	37.7*

注:^a% LY:淋巴细胞百分比;% NE:中性粒细胞百分比;^b-1 d. p. i.:感染前;* 与感染前相比具有统计学意义, $P < 0.05$ 。

Note: ^a Mean percentage of leukocytes that are lymphocytes (LY) or neutrophils (NE) from 3 ferrets per group; ^b -1 d. p. i.: the day before inoculation; * Statistical significance; * $P < 0.05$ compared to the values of -1 d. p. i.

心脏、肝脏、脾、肾、胃、十二指肠以及嗅球进行病理及病毒学检测。组织病理学分析显示雪貂肺组织于感染后第 3 天出现多病灶的轻度间质性肺炎,感染后第 7 天肺组织可见局灶性间质性肺炎及肺泡炎样改变,病灶出现增大、融合的现象(封底图 3C 和 3D)。另外,免疫组化结果显示 H7N9 禽流感病毒可同时感染雪貂支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞(封底图 3A 和 3B)。

2.5 病毒在体内分布情况

将感染后第 3、7 天的雪貂各组织匀浆,接种 MDCK 细胞,测定病毒滴度。结果显示在感染后第 3 天肺、气管、心脏、嗅球可检测到活病毒,而在感染后第 7 天肺、气管、肝脏可检测到活病毒(表 1)。H7N9 禽流感病毒可在神经系统(嗅球)复制的特性与高致病性禽流感 H5N1, H7N7 相似^[8-10]。

3 讨论

综上, H7N9 禽流感病毒可感染雪貂,引起动物出现典型的打喷嚏、发热等临床症状和体征,可检测到上呼吸道排毒及肺、气管、嗅球等组织内的病毒复制情况,组织病理学变化可见肺组织炎性改变。雪貂感染 H7N9 禽流感病毒后的变化与人感染后的变化是相似程度较高^[11-13],说明雪貂可作为 H7N9 感染模型动物之一。雪貂感染 H7N9 模型动物的建立可为 H7N9 致病机制研究、治疗药物和疫苗的评价提供科学的动物模型基础。

参考文献:

- [1] 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):1888-1897.
- [2] Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients [J]. Lancet 1933, 222:66.
- [3] Maher JA, DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus [J]. Lab Anim (NY) 2004, 33(9):50-53.
- [4] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. The American Journal of Hygiene 1938, 27(3):493-497.
- [5] World Health Organization Gsn. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [M]. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2011:140.
- [6] Chang SY, Lin PH, Tsai JC, et al. The first case of H7N9 influenza in Taiwan [J]. Lancet 2013, 381(9878):1621.
- [7] Chen Y, Liang W, Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome [J]. Lancet 2013, 381(9881):1916-1925.
- [8] Blisard KS, Davis LE. The sequence of changes in liver and brain in the influenza B virus mouse model of Reye's syndrome [J]. J Neuropathol Exp Neurol. 1990, 49(5):498-508.
- [9] Hodgson NR, Bohnet SG, Majde JA, et al. Influenza virus pathophysiology and brain invasion in mice with functional and dysfunctional Mx1 genes [J]. Brain Behav Immun. 2011, 26(1):83-89.
- [10] Shinya K, Suto A, Kawakami M, et al. Neurovirulence of H7N7 influenza A virus; brain stem encephalitis accompanied with aspiration pneumonia in mice [J]. Arch Virol. 2005, 150(8):1653-1660.
- [11] Belser JA, Gustin KM, Pearce MB, et al. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice [J]. Nature. 2013, 501(7468):556-559.
- [12] Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans [J]. Nature. 2013, 501(7468):551-555.
- [13] Zhu H, Wang D, Kelvin DJ, et al. Infectivity, transmission, and pathology of human H7N9 influenza in ferrets and pigs. Science 2013, 341(6142):183-186.

[修回日期]2013-12-09