

孙海伟,史馨瑾,陈艳艳,等. A 型流感病毒感染 BALB/c 小鼠炎症模型的建立[J].中国实验动物学报, 2019,27(5):571-576.
Sun HW, Shi XJ, Chen YY, et al. Establishment of a BALB/c mouse model of influenza A virus-induced inflammation[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5):571-576.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.05.004

A 型流感病毒感染 BALB/c 小鼠炎症模型的建立

孙海伟,史馨瑾,陈艳艳,钟秋萍,张萌,吕璐,王俊,陈鸿军*

(中国农业科学院上海兽医研究所,上海 200241)

【摘要】 目的 用小鼠炎症动物模型分析 A 型流感病毒的致病性。**方法** 三株不同的 A 型流感病毒 A/swine/Jiangsu/C1/08 (H9N2) (H9C1)、A/swine/Shandong/731/2009 (SD731)、A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8),以 1×10^6 TCID₅₀ 经鼻感染 5 周龄 BALB/c 小鼠,观测临床症状,检测肺组织的病毒载量和炎症因子水平。**结果** BALB/c 小鼠致病性实验中,SD731 和 PR8 病毒引起的肺组织的炎症反应水平及病毒的复制显著高于 H9C1,SD731 致死率为 80%,PR8 为 100%;H9C1 病毒感染伴随着体重的减轻,但小鼠无死亡。**结论** 成功建立了流感病毒感染小鼠的炎症模型。

【关键词】 流感病毒;感染;动物模型;BALB/c 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 05-0571-06

Establishment of a BALB/c mouse model of influenza A virus-induced inflammation

SUN Haiwei, SHI Xinjin, CHEN Yanyan, ZHONG Qiuping, ZHANG Meng, LYU Lu, WANG Jun, CHEN Hongjun*

(Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Corresponding author: CHEN Hongjun. E-mail: vetchj@shvri.ac.cn

【Abstract】 Objective The aim of this study was to establish an influenza A virus-induced inflammation model in mice to analyze the pathogenicity of influenza A virus. **Methods** Forty-four 5-week old SPF healthy female BALB/c mice were used in this study. A/swine/Jiangsu/C1/08 (H9N2) (H9C1), A/swine/Shandong/731/2009 (SD731) and A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) influenza viruses were administered by intranasal instillation to BALB/c mice, inoculated in a dose of $50 \mu\text{L } 1 \times 10^6$ TCID₅₀, respectively, 11 mice in each group. The changes of body weight, clinical signs and death of the mice were observed every 24 hours from 1 to 14 dpi (days post inoculation). Blood and lung samples were taken for virus titer and inflammation detection. **Results** Compared with the PBS control group, SD731 and PR8 virus infected mice showed a strong inflammation, and the mortality rate of SD731 virus infected BALB/c mice was 80% and that of the PR8 virus infection was 100%. H9C1 virus infection caused a mild inflammatory response compared to SD731 and PR8 virus infection, and no significant weight loss and no death from 1 to 14 dpi. **Conclusions** In this study, the successfully established mouse model of influenza A virus-infected inflammation provides a strategy for the study of the pathogenesis of influenza virus, and a useful working basis for research of the pathogenesis, drug development, and vaccine evaluation of this disease.

【Keywords】 influenza A virus; inflammation; mouse model; BALB/c mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】国家自然科学基金面上项目资助(31572502)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31572502).

【作者简介】孙海伟(1988—),男,博士研究生,从事流感病毒致病性研究。Email:highwaysun@shvri.ac.cn

【通信作者】陈鸿军(1979—),男,研究员,从事动物流感病毒致病性与免疫机制研究。Email:vetchj@shvri.ac.cn

A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)属于正黏病毒科(Orthomyxoviridae)甲型流感病毒属,由 8 条负链 RNA 片段组成和编码流感病毒蛋白,具有囊膜,除少数流感病毒呈丝状,一般呈球形,直径约为 80~120 nm。IAV 根据血凝素(hemagglutinin, HA)与神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的抗原性,可以将其分为不同亚型。迄今,HA 共有 18 种(H1~H18),NA 共有 11 种(N1~N11)^[1]。

流感病毒感染的宿主广泛,包括人、禽、猪等^[2-5]。其中,H9N2 因其高度接触传染性及其分布广泛性,且为 H5N1、H7N9 及 H10N8 等提供了部分内部基因,造成了其他流感病毒的基因重排,进而产生新的病毒亚型或基因型^[2,6-8],所以 H9N2 危害十分严重^[9-13]。H1N1 病毒能引起家禽发生严重的疾病并可能导致疫情或人类流感大面积传播^[14-15],如 1918 年的“西班牙大流行”的流感病毒(H1N1)就造成了近 5000 万人的死亡^[16],2009 年的 H1N1 大流行造成了近 1.7 万人的死亡^[17-18]。因此,本文将本实验保存的 A/swine/Jiangsu/C1/08 (H9N2) (H9C1)、A/swine/Shandong/731/2009 (H1N1) (SD731)和 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)毒株作为模式病毒进行致病机制研究。

高致病性流感病毒致使动物或者人死亡的一个重要原因是其引起细胞因子风暴以及肺损伤^[19-20]。此外,研究指出流感病毒感染宿主后,IL-6 和 TNF- α 等炎症因子招募巨噬细胞和中性粒细胞到病毒感染的肺部,引起肺部发生急性炎症反应,从而造成肺部急性损伤,增强疾病程度,甚至引起宿主死亡^[21-23]。然而,流感病毒致炎的具体的分子机制至今尚不清楚,建立合适的流感病毒感染动物模型成为阐明其致病机制并开发出有效疫苗和药物的重要工作。本文将对 BALB/c 小鼠进行 H9N2 及 H1N1 致病性实验,建立 BALB/c 小鼠炎症动物模型以分析流感病毒的致病性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

5 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 44 只,体重 15~20 g,购自北京维通利华实验技术有限公司,动物合格证号【SCXK(沪)2016-0002】。动物实验在上海兽医研究所进行,实验许可号【SYXK(沪)2016-

0010】,并通过了研究所实验伦理委员会的审查,批准号:SHVRI-SZ-20131102-02。

1.1.2 毒株

A/swine/Jiangsu/C1/08 (H9N2) (H9C1)、A/swine/Shandong/731/2009 (H1N1) (SD731)和 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)流感毒株由本实验室保存,三株流感毒株均在 9~11 日龄 SPF 鸡胚上繁殖扩增,将扩增的病毒分装至 1.5 mL 离心管中,每管 500 μ L,冻存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.1.3 仪器和试剂

多功能酶标检测仪购自美国 Thermo 公司;Mouse IL-6 及 TNF- α ELISA 试剂盒购自 BD Ebioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

小鼠按照体重随机分成 PBS 对照组、H9C1、SD731 和 PR8 流感病毒感染组,共 4 组,每组 11 只。

1.2.2 攻毒

小鼠用干冰进行麻醉,将 1×10^6 TCID₅₀/50 μ L 的流感病毒液用移液器滴入小鼠鼻腔;对照组小鼠滴入 50 μ L PBS。接毒后的小鼠正常饲养,供给饲料为标准日粮,饮高压灭菌水,足量供给^[24]。攻毒开始前标记为 0 d,攻毒后每天观察记录 1 次,连续观察 14 d,小鼠体重低于接毒前初始体重的 25%即判定为死亡,并给予安乐死处理。在攻毒后的第 1、3 天,每组 3 只经 CO₂ 麻醉静脉放血处以安乐死,采集小鼠肺组织用于检测肺组织的病毒载量和 IL-6、TNF- α 的水平。

1.2.3 小鼠肺组织病毒载量测定

小鼠肺组织病毒载量用 TCID₅₀进行标定,步骤如下:首先称量小鼠肺的重量并记录,加入 1 mL 体积的含 1000 单位双抗的 PBS 缓冲液,进行无菌研磨。将组织匀浆液 5000 r/min 离心 15 min,收获上清。取 100 μ L 上清液用无血清的 DMEM 培养基连续 10 倍倍比稀释,将其接种到 MDCK 细胞板上进行 TCID₅₀的测定,以确定流感病毒在肺中的病毒含量。

1.2.4 ELISA kit 检测小鼠肺组织的 IL-6、TNF- α 水平:

(1)将 Capture 抗体用 100 μ L coating buffer 稀释后加入到 96 孔板中,并 4 $^{\circ}$ C 进行过夜包被;

(2)弃掉 96 孔板中的 coating buffer,并用 250 μ L 的 PBST 洗涤 3 次;

- (3)每个孔中加入 200 μ L 1 $\times$ ELISA 稀释液室温封闭 1 h;
- (4)用 1 $\times$ ELISA 稀释液倍比稀释细胞因子标准品及待检样品,稀释之后每孔加入 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜或常温孵育 2 h;
- (5)250 μ L PBST 洗涤 3 ~ 5 次,每孔加入 100 μ L 1 $\times$ ELISA 稀释液的细胞因子检测抗体,室温孵育 1 h;
- (6)250 μ L PBST 洗涤 3 ~ 5 次,每孔加入 100 μ L 1 $\times$ ELISA 稀释液稀释的 Avidin-HRP 抗体,室温孵育 30 min;
- (7)250 μ L PBST 洗涤 5 ~ 7 次,每孔加入 100 μ L 1 $\times$ TMB 溶液,室温孵育 15 min,孵育后加入 50 μ L 2 M 硫酸溶液终止反应;
- (8)多功能酶标检测仪检测 450 nm 波长下的 OD 值;
- (9)根据测出的 OD 绘制标准曲线,计算目的样品的细胞因子含量。

1.2.5 HI 实验

- (1)96 孔血凝板中加入生理盐水,再加入 25 μ L 收集的血清,进行连续 2 倍倍比稀释;
- (2)每孔中加入 25 μ L/4 个凝集单位的 H9N2 各抗原;
- (3)混匀,室温孵育 30 min,观察血凝结果。

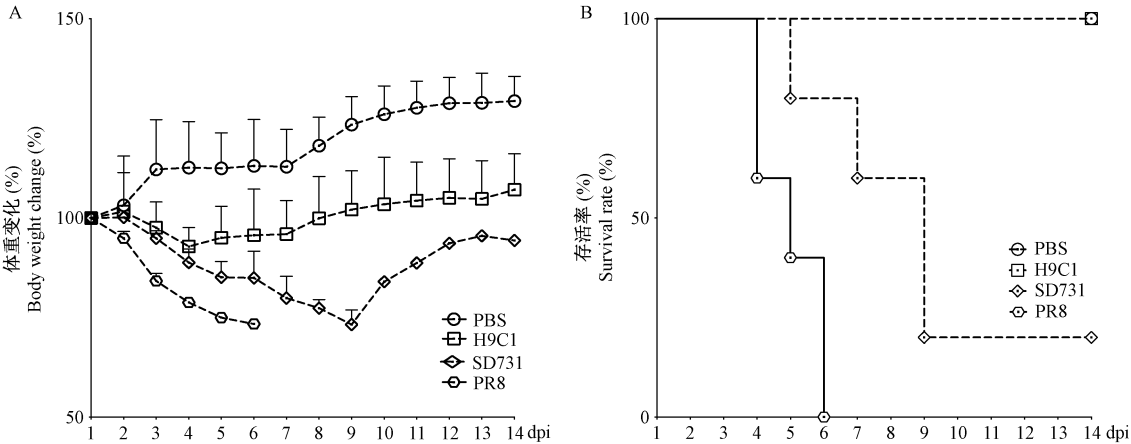
1.3 统计学分析

统计学分析使用 GraphPad 7.0 软件(GraphPad 软件公司, San Diego, CA, 美国)。两两比较使用 *t* 检验。多重比较分析采用双向方差分析(Two-ways ANOVA)。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A 型流感病毒感染 BALB/c 小鼠的症状和体征

为了研究三株 A 型流感毒株对 BALB/c 小鼠的致病性差异,本研究选用 1 $\times$ 10⁶ TCID₅₀ 的接种剂量感染 5 周龄 BALB/c 小鼠,连续观察 14 d,每天记录体重变化及死亡情况,体重变化曲线及死亡曲线分别见图 1A、图 1B。结果显示: BALB/c 小鼠在接种 SD731 和 PR8 病毒的第 2 天体重开始明显减轻,至第 3 天开始出现临床症状,主要表现为精神不振,弓背,蜷缩,竖毛,颤抖、反应差、活动少、扎堆。 PR8 攻毒组小鼠在攻毒第 4 天出现死亡,小鼠体重持续下降,至第 6 天全部死亡。 SD731 攻毒组在第 5 天和第 7 天各死亡 1 只,第 9 天死亡 2 只,至 14 d,死亡 4 只,死亡率达到 80%。 H9C1 攻毒组小鼠体重在第 2 天开始下降,至第 4 天降至最低为 93%,此后小鼠体重逐渐恢复, H9C1 感染期间小鼠临床症状不明显,无小鼠死亡。



注: A. 小鼠滴鼻感染流感病毒后体重变化; B. 小鼠滴鼻感染 H9N2 病毒后存活率。

图 1 小鼠体重变化曲线及死亡曲线

Note. A. Body weight changes of the mice inoculated with influenza A virus. B. Survival rate of the mice inoculated with H9N2 virus.

Figure 1 Body weight changes and survival rate of the mice after virus inoculation

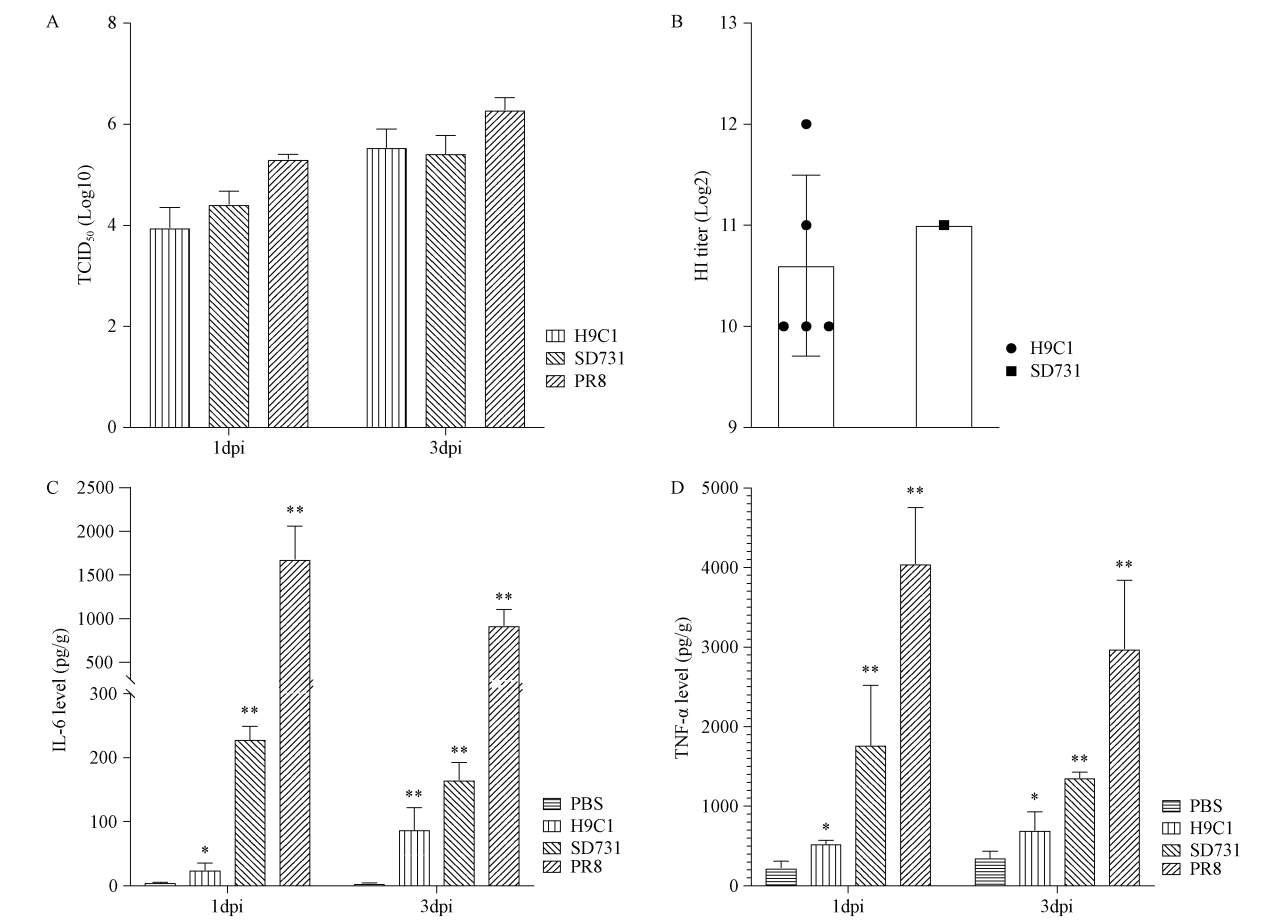
2.2 肺的病毒载量及抗体滴度

为了分析这三株 A 型流感毒株在 BALB/c 小鼠

的致病性的不同,本研究在 BALB/c 感染 IAV 后的第 1、3 天,随机处死 3 只小鼠,解剖收集肺组织研磨

后检测其病毒。结果显示:H9C1、SD731 和 PR8 三株 A 型流感病毒在小鼠肺内均能良好的复制,感染后的第 1、3 天后小鼠肺的病毒载量均超过 9×10^3 TCID₅₀/mL,其中 PR8 的复制能力最好,第 1 天肺病毒载量是 $10^{5.3}$ TCID₅₀/mL,第 3 天为 $10^{6.3}$ TCID₅₀/mL;其次是 SD731,第 1 天肺病毒载量是 $10^{4.4}$ TCID₅₀/mL,第 3 天为 $10^{5.4}$ TCID₅₀/mL;H9C1 病毒感

染的第 1 天肺病毒载量是 $10^{3.9}$ TCID₅₀/mL,第 3 天为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL(图 2A)。感染 14 d 后,将剩余的 BALB/c 小鼠经安乐致死,采集并分离血清,测定 HI 效价。结果显示:H9C1 和 SD731 感染组 HI 效价均在 2^{10} 以上(图 2B),表明经滴鼻途径使 BALB/c 小鼠成功感染流感病毒,PR8 组小鼠全部死亡,故不列入此次统计。



注:A. 在感染病毒的第 1、3 天,采取感染小鼠肺组织($n=3$)进行病毒载量的测定。B. 流感病毒感染 14 d 后,小鼠血清 HI 测定。C. 小鼠肺组织炎症因子 IL-6。D. 小鼠肺组织炎症因子 TNF- α 。流感病毒感染组与 PBS 对照组相比较,显著性为 $*P < 0.05$ 或者 $**P < 0.01$ 。

图 2 A 型流感病毒感染 BALB/c 小鼠

Note. A. Viral titers in the mouse lung tissues at 1 dpi and 3 dpi after inoculation. B. HI titers of rest mice at 14 dpi. C. IL-6 levels in the mouse lung tissues. D. TNF- α levels in the mouse lung tissues. Significance is shown as $*P < 0.05$ or $**P < 0.01$.

Figure 2 BALB/c mice infected with influenza A virus

2.3 肺炎症因子 IL-6、TNF- α 的测定

为了评估小鼠感染 IAV 后,小鼠肺组织的 IL-6、TNF- α 的水平将用评估小鼠感染流感病毒的炎症水平。ELISA 结果显示:对比 PBS 阴性对照,H9C1 病毒感染第 1 ~ 3 天,IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平分别升高 4.21 ~ 22.66 倍和 0.98 ~ 1.32 倍;SD731

病毒感染第 1 ~ 3 天,IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平分别升高 41.74 ~ 47.24 倍和 2.85 ~ 6.78 倍;PR8 病毒感染第 1 ~ 3 天,IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平分别升高 242.11 ~ 354.42 倍和 7.46 ~ 16.82 倍(图 2C、D)。因此,BALB/c 小鼠致病性实验中,SD731 和 PR8 病毒引起的炎症反应水平显著高于 H9C1。

3 讨论

3.1 建立 IAV 感染动物炎症模型动物的选择

鉴于目前流感病毒高变异性,新型抗流感病毒药物及疫苗的研发都需要合适的动物模型进行进一步的评价。因此,合适的动物模型是将理论成果转化到实际应用的必不可少的技术支撑。BALB/c 小鼠作为实验动物用于流感病毒的致病性研究有着独特的优点:① BALB/c 小鼠对流感病毒敏感,有明显的症状和体征^[25];② BALB/c 小鼠的生长周期短,遗传背景明确,伦理问题少,便于操作^[26]。

3.2 建立 IAV 感染动物炎症模型方法的选择

现已确认的促炎细胞因子主要有 IL-6 和 TNF- α 等^[27-28],这些炎症因子在生物损伤和病毒感染的发生、发展的病理过程中扮演重要的角色。因此,本次研究中我们选用 IL-6 和 TNF- α 的水平来评估小鼠感染流感病毒后的炎症反应。本文中,我们以 1×10^6 TCID₅₀ 的 H9C1、SD731 和 PR8 经滴鼻方式感染 BALB/c 小鼠,通过连续观察小鼠体重变化及死亡情况,感染第 1、3 天小鼠肺组织病毒载量及炎症因子的水平来跟踪流感病毒感染对小鼠的致病性。本实验所得结果显示:SD731 和 PR8 的致病性要显著高于 H9C1,SD731 致死率达到 80%,PR8 致死率达到 100%,而 H9C1 感染不致死小鼠;同时,SD731 和 PR8 病毒引起的肺组织的炎症反应水平显著高于 H9C1。该结果进一步证实了流感病毒的致病性强弱与炎症反应以及病毒的复制呈正相关。

3.3 建立 IAV 感染动物炎症模型方法的意义

本研究建立的小鼠炎症模型,在临床表现、体重变化、死亡率、病毒复制及炎性反应等指标方面都能达到 A 型流感病毒疾病模型的造模要求。此模型的建立对研究 A 型流感病毒的致病机制、评价药物和疫苗治疗效果等具有一定的参考意义。

参 考 文 献 (References)

[1] 章倩云, 刘丹丹, 焦永军, 等. 人季节性流感病毒 H1、H3、B 型 PCR-ELISA 分型检测方法的建立及应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(3): 177-181.
Zhang QY, Liu DD, Jiao YJ, et al. Establishment and application of a PCR-ELISA assay for the detection of seasonal influenza A virus subtypes H1 and H3 and influenza B virus [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2016, 36(3): 177-181.

[2] Guo YJ, Li JW, Cheng X. Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus [J]. Chin J Exp Clin Virol, 1999, 13(2): 105-108.

[3] Li S, Zhou Y, Zhao Y, et al. Avian influenza H9N2

seroprevalence among pig population and pig farm staff in Shandong, China [J]. Virol J, 2015, 12: 34.

[4] Mancera Gracia JC, Van den Hoecke S, Saelens X, et al. Effect of serial pig passages on the adaptation of an avian H9N2 influenza virus to swine [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175267.

[5] Mancera Gracia JC, Van den Hoecke S, Richt JA, et al. A reassortant H9N2 influenza virus containing 2009 pandemic H1N1 internal-protein genes acquired enhanced pig-to-pig transmission after serial passages in swine [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1323.

[6] Lee CW, Song CS, Lee YJ, et al. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96 [J]. Avian Dis, 2000, 44(3): 527-535.

[7] Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity [J]. Virology, 2001, 281(2): 156-162.

[8] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2 [J]. Lancet, 1999, 354(9182): 916-917.

[9] Li C, Yu K, Tian G, et al. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China [J]. Virology, 2005, 340(1): 70-83.

[10] Kang W, Pang W, Hao J, et al. Isolation of avian influenza virus (H9N2) from emu in China [J]. Ir Vet J, 2006, 59(3): 148-152.

[11] Wei D, Xie LF, Wang CL, et al. A mouse model of swine influenza virus H9N2 infection with acute lung injury [J]. Acta Virol, 2012, 56(3): 227-233.

[12] Chen Q, Huang S, Chen J, et al. NA proteins of influenza A viruses H1N1/2009, H5N1, and H9N2 show differential effects on infection initiation, virus release, and cell-cell fusion [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54334.

[13] Ku KB, Park EH, Yum J, et al. Transmissibility of novel H7N9 and H9N2 avian influenza viruses between chickens and ferrets [J]. Virology, 2014, 450-451: 316-323.

[14] Zeng X, Liu M, Zhang H, et al. Avian influenza H9N2 virus isolated from air samples in LPMS in Jiangxi, China [J]. Virol J, 2017, 14(1): 136.

[15] Pan Y, Cui S, Sun Y, et al. Human infection with H9N2 avian influenza in northern China [J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(3): 321-323.

[16] Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus [J]. Science. 2005, 310(5745): 77-80.

[17] Louie JK, Jean C, Acosta M, et al. A review of adult mortality due to 2009 pandemic (H1N1) influenza A in California [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18221.

[18] Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza, Bautista E, Chotpitayasunondh T, et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection [J]. N Engl J Med, 2010,

- 362(18): 1708–1719.
- [19] Garcia-Sastre A. Influenza virus receptor specificity: disease and transmission [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(4): 1584–1585.
- [20] Garcia-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente [J]. *Science*, 2006, 312(5775): 879–882.
- [21] Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(4): 1371–1376.
- [22] Woo PC, Tung ET, Chan KH, et al. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(3): 346–353.
- [23] Dai J, Gu L, Su Y, et al. Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenza pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF-kappaB pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 177–187.
- [24] 李志东, 刘忠华, 刘香梅, 等. 禽流感 H5N1 亚型病毒感染 ICR 小鼠的动物模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(02): 91–94.
- Li ZD, Liu ZH, Liu XM, et al. Study of an ICR mouse model infected with avian influenza A H5N1 viruses [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2008, 16(02): 91–94.
- [25] Dybing JK, Schultz-Cherry S, Swayne DE, 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(3): 1443–1450.
- [26] Min FG, Zhang Y, Liu XM, et al. Model-based evaluation of 5 Chinese medicine recipes in the treatment of H5N1 influenza virus infection in BALB/c mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2016.
- [27] Wilson MR, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(4): L599–607.
- [28] 卞建民, 王书奎, 江滨, 等. 多种细胞因子监测对严重感染患者的意义 [J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(6): 353–355.
- Bian JM, Wang SK, Jiang B, et al. Clinical significance of changes in cytokine levels in patients with severe abdominal infection [J]. *Chin Crit Care Med*, 2002(06): 353–355.

[收稿日期] 2019-08-06