

姜静,吕琦,李枫棣,等. 应用季节性流感病毒 H3N2 鼠适应株建立小鼠模型[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 22 - 26.
Jiang J, Lyu Q, Li FD, et al. Establishment of a mouse-adapted seasonal H3N2 virus-infected murine model [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 22 - 26.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.004

应用季节性流感病毒 H3N2 鼠适应株建立小鼠模型

姜 静, 吕 琦, 李枫棣, 戚菲菲, 王顺意, 王冠澎, 徐艳峰, 鲍琳琳*

(中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 应用季节性流感病毒 H3N2 鼠适应株建立小鼠模型,并阐述适应株致病力变化的分子机制。**方法** A/Aichi/2/68(H3N2)(WT)在小鼠体内多次适应获得鼠适应株(MA-7),MA-7经鼻感染 BALB/c 小鼠,根据临床症状、体重下降率、病毒复制和组织病理等关键指标判断小鼠模型构建成立,分析适应株致病力变化的分子机制。**结果** 小鼠感染 WT 后无明显症状且未检测到病毒复制。MA-7 感染后小鼠 9 d 内全部死亡,体重下降率超过 30%,多组织内均能检测到病毒复制,肺组织中滴度高达 $10^{5.5}$ TCID₅₀并出现间质性肺炎。基因比对发现 MA-7 在 HA、NA、PA 和 NP 基因上有 5 个位点发生突变。**结论** 成功建立了 H3N2 适应株小鼠模型,可用于研究 H3N2 流感病毒发病机制及其药物、疫苗、抗体评价等,其适应株致病力增强可能与 5 个突变位点有关。

【关键词】 季节性流感病毒 H3N2;小鼠模型;鼠适应株;分子机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0022-05

Establishment of a mouse-adapted seasonal H3N2 virus-infected murine model

JIANG Jing, LYU Qi, LI Fengdi, QI Feifei, WANG Shunyi, WANG Guanpeng, XU Yanfeng, BAO Linlin*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse-adapted influenza H3N2 virus-infected murine model and investigate the molecular mechanism as well as the pathogenic changes of the mouse-adapted virus strain. **Methods** Mouse-adapted strain (MA-7) was obtained by continuous passage of the A/Aichi/2/68(H3N2) virus in mouse lungs. BALB/c mice were infected intranasally to establish the model. Clinical signs, body weight loss rate, virus load in tissues and histopathology were observed and the DNA sequences of MA-1 and wild-type stains were analyzed. **Results** Mice infected with A/Aichi/2/68(H3N2) showed no obvious changes in symptoms and no virus replication was detected. However, all mice infected with MA-7 died within 9 days post-infection and the weight loss rate was greater than 30%. Virus replication was detected in multiple tissues, especially the lung tissues ($10^{5.5}$ TCID₅₀), which caused interstitial pneumonia. Genome sequencing and alignment indicated five mutations in the HA, NA, PA and NP genes. **Conclusions** A mouse-adapted seasonal H3N2 virus-infected murine model is successfully established, and can be used to study its pathogenesis and to evaluate drugs and vaccines. Moreover, the increased virulence of the adaptive virus strain may be related to five mutations in the virus genes.

【Keywords】 Seasonal H3N2 virus; Murine model; Mouse-adapted virus stain; Molecular mechanism

[基金项目] 十三五科技重大专项—重大及突发传染病动物模型研制及关键技术研究(2017ZX10304402-001-003);创新工程项目—CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(2016-I2M-1-014, 2016-I2M-006)。

[作者简介] 姜静(1993—),女,硕士研究生,研究方向:H3N2 流感病毒动物模型的建立。E-mail: jing_jing_jiang@163.com

[通信作者] 鲍琳琳(1979—),女,副研究员,博士生导师, E-mail: blmlsl@aliyun.com

流感病毒(influenza virus)是引起人和动物传染病流行最重要的病原体之一,目前已经在世界上导致五次人群中的大规模流行。自 1918 年西班牙 H1N1 流感大流行后,1957 年亚洲 H2N2、1968 年香港 H3N2、1977 年俄罗斯 H1N1 及 2009 年墨西哥 H1N1 流感大流行相继出现,造成人力、物力等资源的巨大损失,其中仅在 1968~1969 年香港 H3N2 流感大流行中就有约 100 万人被夺去了生命^[1-3]。H3N2 自 1968 年香港大流行以来,几乎每年均以季节性流感的形式在我国频繁出现^[4-6],是我国季节性流感的主要病毒株,已成为疫苗备选株的重要筛选对象。随着 H3N2 亚型流感病毒在人群中不断的进化、变异,预防流感或流感严重并发症的疫苗至今也已更新三十余次^[7-9]。与以往相比,近年来 H3N2 发生了较大变异,导致被感染人的数量显著增多、症状明显加重^[10-13],亟需开展研发相应的治疗药物、疫苗等流感疫情应对工作。

BALB/c 小鼠是流感病毒致病性与疫苗研究常用的动物模型之一^[14-16]。季节性流感病毒 H3N2 并不能直接感染小鼠,国际上大多采用建立鼠适应株、反向遗传学技术构建整合毒株的方式建立小鼠模型^[17-23],目前国内还未建成 H3N2 流感病毒适应株^[24-25]。面对国内目前不断出现突变的 H3N2 流感病毒,新型疫苗株筛选、有效性评价急需 H3N2 动物模型。本文通过筛选合适的 H3N2 流感病毒株建立 H3N2 鼠适应株,并应用其建立小鼠模型,将为疫苗株筛选、疫苗和抗体有效性评价提供合适的研究工具,为季节性流感防控提供有力的实验室支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 60 只,4~6 周龄,体重 13~15 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。所有的感染实验均在动物生物安全二级实验室(ABSL-2)中进行,所有操作经中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所伦理委员会审核并批准(BLL18004)。实验动物的使用遵循 3R 原则。

季节性流感病毒 A/Aichi/2/68(H3N2)(WT),由香港大学陈鸿霖教授惠赠。H3N2 鼠适应株(MA-7)由本实验室在 BALB/c 小鼠体内 7 次适应获得。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组

4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 2 组,每

组 30 只,设立 WT 组(对照组)和 MA-7 组(实验组),分别用 A/Aichi/2/68(H3N2)WT 和鼠适应株(MA-7)滴鼻感染小鼠,感染剂量为每只 10^6 TCID₅₀。在感染后第 1、2、3、5、7 和第 9 天,每个时间点处死 3 只小鼠,取肺、心、肝、脾、肾、肠、脑、眼、气管组织,用于病理检查、病毒载量和病毒滴度的检测。

1.2.2 病毒载量测定

提取组织的总 RNA,进行探针法荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测。上、下游引物序列为:InfA-Fwd 5'-GACCGATCCTGTCACCTCTGAC-3', InfA-Rev 5'-AGGGCATTCTGGACAAAGCGTCTA-3', InfA-Prb5' FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1-3'。Real-time PCR 反应条件为:50℃ 30 min;95℃ 15 min;94℃ 15 s,60℃ 45 s,35 个循环。

1.2.3 滴度测定

将组织匀浆接种于单层 MDCK 细胞中,37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 1 遍,补充等体积的病毒培养液,72 h 后收集细胞上清,加入火鸡血进行复检。利用 Reed-Munch 公式计算组织细胞半数感染量(TCID₅₀)。

1.2.4 组织病理学检查

将小鼠的肺、心、肝、脾、肾、肠、脑、眼、气管组织进行标本制备,制备方法采用甲醛固定、石蜡包埋、切片,H.E 和免疫组织化学染色。免疫组化使用 NP 单克隆抗体(1:1000 稀释),4℃ 过夜,PBS 洗;加二抗(1:1000 稀释),室温孵育,PBS 洗;DAB 显色,苏木素衬染后脱水、透明、中性树胶封片。

1.2.5 基因组测序和比对

合成流感病毒 8 个基因片段的 PCR 引物,对 WT 和 MA-7 的 8 个基因片段进行高保真 PCR 扩增。PCR 产物纯化和测序后使用 DNASTar 软件包进行序列拼接及比对。

2 结果

2.1 小鼠一般状态和死亡情况

WT 组小鼠感染后,无明显症状变化,14 d 内无小鼠死亡。MA-7 组小鼠感染后,出现弓背、竖毛、活动迟缓、体型消瘦,第 4 天开始出现死亡,直至第 9 天全部死亡。具体死亡情况见图 1。

2.2 小鼠体重变化

WT 组小鼠感染后,小鼠体重持续上升,体重上升率最高可达 14%。MA-7 组小鼠感染后第 1 天体重下降,一直持续至感染第 9 天(小鼠全部死亡)逐渐下降,体重下降率峰值达到 30%。小鼠感染后体重变化率见图 2。

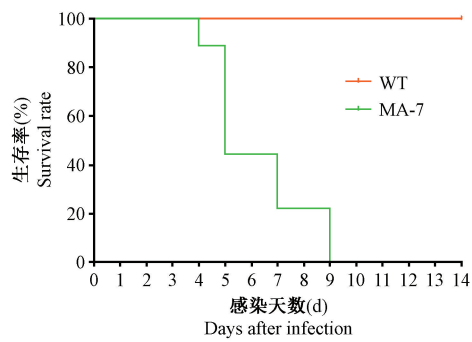


图1 鼠肺适应株小鼠模型的死亡情况($n=10$)

Figure 1 The survival rate in the mice inoculated with WT and MA-7 virus

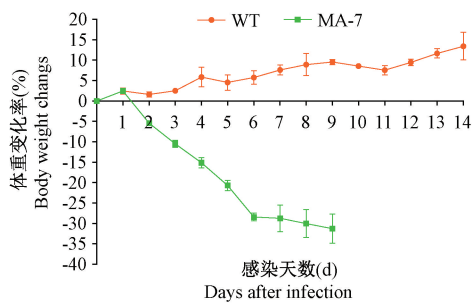


图2 鼠肺适应株小鼠模型的体重变化($n=10$)

Figure 2 The loss of body weight in the mice inoculated with WT and MA-7 virus

2.3 病毒在各组织中复制动态变化

在小鼠感染后第1~9天,检测MA-7组小鼠的肺、心、肝、脾、肾、肠、脑等组织内的病毒复制情况,用于明确病毒复制的组织器官,并监测其复制动态变化,确定复制高峰期。结果显示,肺、气管、心、肝、肾均能检测到病毒复制,其中以气管和肺组织为主。MA-7组小鼠感染后,在第1~9天均可在肺

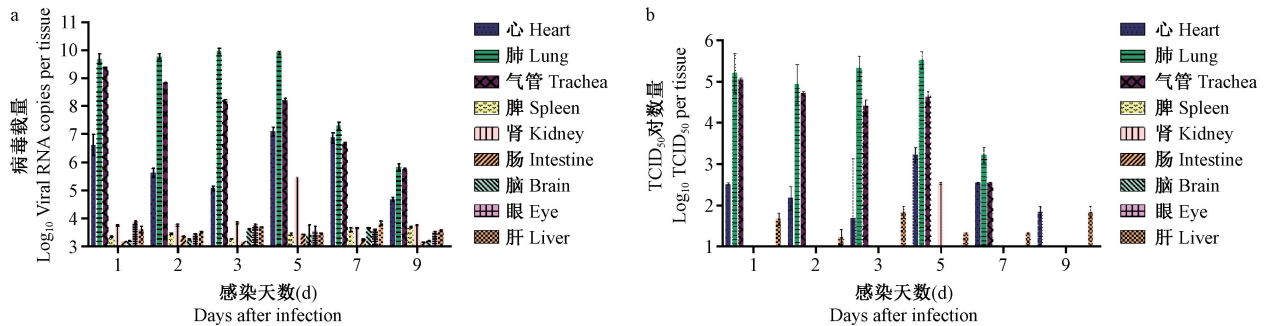
组织内检测到病毒复制,第2~5天为复制高峰期,最高可达到 $10^{5.5}$ TCID₅₀。病毒在气管中的复制能力低于肺组织,最高可达 $10^{5.2}$ TCID₅₀,其可能与两者的细胞表面受体分布特点相关。心、肝、脾、肾、肠、脑、眼组织均能检测到病毒RNA,肝、肾组织在小鼠感染后第1~9天间断性地检测到有病毒复制,其余组织均检测不到。以上结果说明H3N2病毒复制只发生在呼吸系统中。具体结果如图3所示。

2.4 小鼠模型的肺组织病理变化

MA-7组小鼠感染后可在肺、气管、心、肝、肾组织内可检测到病毒复制,因此进一步比对病毒入侵的这些组织脏器中引起的病理改变。检测结果显示,气管、心、肝、肾组织均无明显的病理变化。肺组织HE结果显示,在感染后第1~5天内,随着感染天数增加,肺组织病变严重程度增大。在感染后第1天,局部肺泡间隔轻度增宽,少数支气管上皮细胞变性坏死;在感染后第3天,肺泡间隔明显增宽,支气管上皮细胞变性坏死,肺泡内可见少量炎细胞渗出,血管周围水肿,少量出血;在感染后第5天,肺组织呈现病毒性间质肺炎,肺泡间隔增宽程度增加,部分区域肺泡腔消失,炎细胞浸润,肺泡内可见较多的炎细胞及浆液纤维素渗出,支气管上皮细胞变性坏死,血管扩张充血;在感染后第7天,肺组织病变略有减轻。免疫组织化学结果显示,在感染后第1~5天内,抗原颗粒随着感染天数呈现增加的趋势。

2.5 基因比对

测序分析结果显示,MA-7基因序列共检出5个突变位点,分别位于第1891、550、1447、868及1192位,其中2个突变发生在HA蛋白中(P162Q、



注:(a)图中9组bar依次代表小鼠感染鼠肺适应株(MA-7)后心、肺、气管、脾、肾、肠、脑、眼、肝的病毒载量;(b)图中9组bar依次代表小鼠感染鼠肺适应株(MA-7)后心、肺、气管、脾、肾、肠、脑、眼、肝的病毒滴度。

图3 鼠肺适应株小鼠模型各组织的病毒复制($n=3$)

Note. (a) The viral load in tissues of the mice infected with MA-7 virus. (b) The viral titer in tissues of the mice infected with MA-7 virus.

Figure 3 Viral replication curves in tissues of the mice infected with MA-7 virus

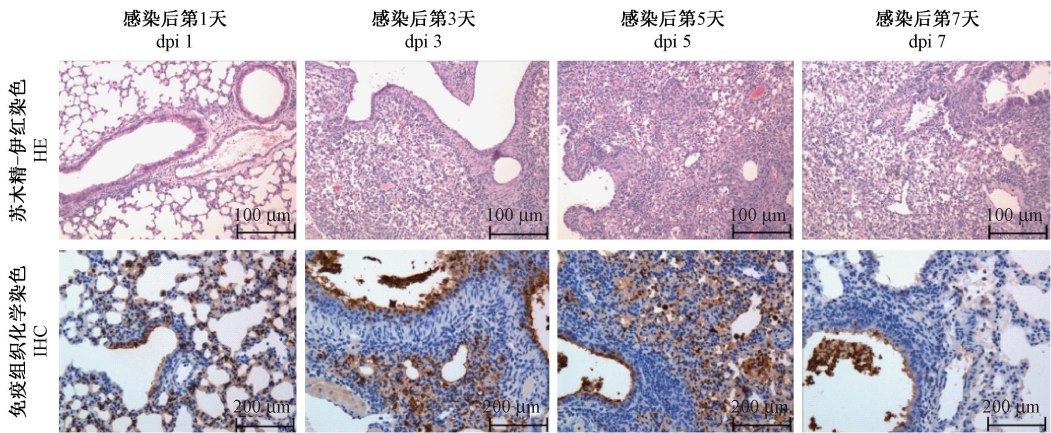
N483P),3 个突变分别发生在 NA、PA、NP 蛋白中 (V398I、G631S、D290 N),引起氨基酸残基序列改变。具体结果如表 1 所示。

3 讨论

抗流感病毒的药物、疫苗和抗体评价以及新发流感病毒的致病性方面的研究都需要合适的动物模型,流感动物模型是药物转化应用的必不可少的技术支撑。而近年来 H3N2 流感病毒不断变异产生新的毒株,疫苗保护效果不理想,需要不断提供新的疫苗株,同时也需要更有效的抗病毒药物;而 H3N2 流感病毒,野生毒株不能直接感染小鼠^[24-26],没有合适的动物模型对于进行一些疫苗评价和药物评价是一个巨大的问题。本研究是应用 H3N2 流感病毒小鼠适应株建立相应的模型。前期曾应用 5 株病人分离到的 H3N2 流感病毒建立小鼠适应株,经过 20 代左右适应,但病毒不能在小鼠体内复制。另外其他研究机构^[27]将 H3N2 流感病毒(A/Anhui/137/2008)在 BALB/c 小鼠体内传代 40 次,也未能构建 H3N2 的适应株。本次实验应用毒株 A/Aichi/

2/68(H3N2),通过在 BALB/c 小鼠体内多次适应,期间通过不断优化组织的处理、病毒的富集方法,连续传至 7 代后获得敏感的鼠适应株(MA-7),并在此基础上成功建立了小鼠模型。以上结果说明并不是所有 H3N2 流感病毒通过多次循环能够获得小鼠适应性,并在小鼠体内复制。本次构建的 H3N2 适应株小鼠模型可用于 H3N2 流感病毒发病机制及其相应的药物、疫苗、抗体评价等方面的研究。

MA-7(H3N2 适应株)可导致小鼠在感染后 9 天内死亡,与野生毒株相比致病力显著提升。实验人员进行序列分析发现这种致病力的差异来自于病毒分子序列的改变。结果显示,MA-7 在 HA、NA、PA、NP 蛋白中出现了 5 个氨基酸突变,其中 2 个突变发生在 HA 蛋白中(P162Q、N483P),3 个突变分别发生在 NA、PA、NP 蛋白中(NA-V398I、PA-G631S、NP-D290 N),各位点的突变均未有报道。初步分析 MA-7 的基因多态性突变是致病力发生显著性提升的分子基础。上述突变位点的功能确认还需通过反向遗传学构建相应的突变毒株,逐个鉴定其功能。



注:上行显示的是 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠在感染鼠适应株后肺组织 HE(100 倍)染色结果;下行显示的是 BALB/c 小鼠在感染鼠适应株后肺组织 IHC(200 倍)染色结果。

图 4 流感病毒小鼠肺组织病理切片(HE,IHC)(n=3)

Note. The upper line shows the results of the lung tissue HE staining of mice at 1,3,5 and 7 days after infection with MA-7 virus. The upper line shows the results of the lung tissue IHC staining of mice at 1,3,5 and 7 days after infection with MA-7 virus.

Figure 4 Histological analysis of the lung tissues of the mice infected with MA-7 virus(HE,IHC staining)

表 1 H3N2 病毒野生株与鼠适应株的序列比对结果
Table 1 Sequence alignment of wild-type and mouse-adapted seasonal H3N2 A/Aichi/2/68 viruses

	PB2	PB1	PA		HA		NP		NA		M2&M1	NEP&NS1		
病毒			nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa				
Virus			1891	631	550	162	1447	483	868	290	1192	398		
WT	–	–	G	Gly	C	Pro	A	Asn	G	Asp	G	Val	–	–
MA-7	–	–	A	Ser	A	Gln	G	Asp	A	Asn	A	lle	–	–

注:WT: 野生株;MA-7: 鼠适应株; nt, 碱基;aa, 氨基酸。
Note. WT, wild-type. MA-7, mouse-adapted. nt, nucleotide. aa, amino acid.

综上所述,本次研究成功建立了季节性流感病毒 H3N2 适应株小鼠模型,并发现 HA (P162Q、N483P)、NA (V398I)、PA (G631S)、NP (D290 N) 5 个氨基酸位点突变与其鼠适应株的致病力增强相关,为进一步研究流感病毒鼠肺适应的分子机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wan Z, Garcia SC, Liu J, et al. Alternative strategy for a quadrivalent live attenuated influenza virus vaccine [J]. J Virol, 2018, 92(21): e01025.
- [2] Westgeest KB, Russell CA, Lin X, et al. Genomewide analysis of reassortment and evolution of human influenza A (H3N2) viruses circulating between 1968 and 2011 [J]. J Virol, 2014, 88(5):2844 - 2857.
- [3] Becker AC, Gannage M, Giese S, et al. Influenza A virus induces autophagosomal targeting of ribosomal proteins [J]. Mol Cell Proteomics, 2018, 17(10):1909-1921.
- [4] Mills CE, Robins JM, Lipsitch M. Transmissibility of 1918 pandemic influenza [J]. Nature, 2004, 432(7019):904 - 906.
- [5] Potter CW. A history of influenza [J]. J Appl Microbiol, 2010, 91(4):572-579.
- [6] Koelle K, Rasmussen DA. The effects of a deleterious mutation load on patterns of influenza A/H3N2's antigenic evolution in humans [J]. Elife, 2015, 4(4): e07361.
- [7] Zhu H, Hughes J, Murcia PR. Origins and evolutionary dynamics of H3N2 canine influenza virus [J]. J Virol, 2015, 89(10): 5406-5418.
- [8] Jeoung HY, Lim SI, Shin BH, et al. A novel canine influenza H3N2 virus isolated from cats in an animal shelter [J]. Vet Microbiol, 2013, 165(3-4):281-286.
- [9] Li X, Yang J, Liu B, et al. Co-circulation of H5N6, H3N2, H3N8, and emergence of novel reassortant H3N6 in a local community in Hunan Province in China [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25549.
- [10] Garten R, Blanton L, Alabi N, et al. Update: influenza activity in the united states during the 2017-18 season and composition of the 2018-19 influenza vaccine [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2018, 67(22):634-642.
- [11] Wei D, Yu DM, Wang MJ, et al. Genome-wide characterization of the seasonal H3N2 virus in Shanghai reveals natural temperature-sensitive strains conferred by the I668V mutation in the PA subunit [J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 171.
- [12] Saha S, Chadha M, Shu Y, et al. Divergent seasonal patterns of influenza types A and B across latitude gradient in Tropical Asia [J]. Influenza Other Respir Viruses, 2016, 10(3): 176-184.
- [13] Yu H, Alonso WJ, Feng L, et al. Characterization of regional influenza seasonality patterns in China and implications for vaccination strategies: spatio-temporal modeling of surveillance

- data [J]. PLoS Med, 2013, 10(11): e1001552.
- [14] 赵化阳, 刘金华, 刘云才. H1N1 流感病毒感染小鼠在免疫学研究中的初步应用[J]. 实验动物科学, 2016, 33(1): 24-28.
- [15] Zhao G, Liu C, Kou Z, et al. Differences in the pathogenicity and inflammatory responses induced by avian influenza A/H7N9 virus infection in BALB/c and C57BL/6 mouse models [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92987.
- [16] Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology [J]. J Immunol Methods, 2014, 410:60-79.
- [17] Narasaraaju T, Sim MK, Ng HH, et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis [J]. Microbes Infect, 2009, 11(1):2-11.
- [18] Mewhite CD, Meyer AG, Wilke CO. Sequence amplification via cell passaging creates spurious signals of positive adaptation in influenza virus H3N2 hemagglutinin [J]. Virus Evol, 2016, 2(2):pii:vew026.
- [19] Parker L, Wharton SA, Martin SR, et al. Effects of egg-adaptation on receptor-binding and antigenic properties of recent Influenza A (H3N2) vaccine viruses [J]. J Gen Virol, 2016, 97(6): 1333-1344.
- [20] Wu NC, Wilson IA. A perspective on the structural and functional constraints for immune evasion: insights from influenza virus [J]. J Mol Biol, 2017, 429(17):2694-2709.
- [21] Lee HK, Tang JW, Kong DH, et al. Comparison of mutation patterns in full-genome A/H3N2 influenza sequences obtained directly from clinical samples and the same samples after a single MDCK passage [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79252.
- [22] Medina RA, Garcíasastre A. Influenza A viruses: new research developments [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(8):590-603.
- [23] de Graaf M, Fouchier RA. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis [J]. EMBO J, 2014, 33(8):823-841.
- [24] Ramakrishnan MA, Wang P, Abin M, et al. Triple reassortant swine influenza A (H3N2) virus in waterfowl [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(4):728-730.
- [25] Fonville JM, Fraaij PL, de Mutsert G, et al. Antigenic maps of influenza A(H3N2) produced with human antisera obtained after primary infection [J]. J Infect Dis, 2016, 213(1):31-38.
- [26] Kim JI, Lee I, Park S, et al. Phylogenetic relationships of the HA and NA genes between vaccine and seasonal influenza A (H3N2) strains in Korea [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0172059.
- [27] 黄保英, 王秀平, 谭文杰, 等. 季节性流感病毒 H1N1 和 H3N2 在 BALB/c 小鼠中的传代适应与分子机理研究[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(3): 316-320.