

杜宝香,于钦辉,孙启慧,等. 甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型的建立及验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 27-33.

Du BX, Yu QH, Sun QH, et al. Establishment and validation of a pneumonia-enteritis model in mice infected with influenza H1N1 virus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 27-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.004

甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型的建立及验证

杜宝香,于钦辉,孙启慧,王立清,杨 勇*,容 蓉*

(山东中医药大学,济南 250355)

【摘要】 目的 建立稳定的 H1N1 流感病毒肺炎-肠炎小鼠模型,为胃肠型流感的病理基础及抗病毒药物研究提供工具和手段。**方法** BALB/c 小鼠随机分为 4 组($n=6$),10 倍半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose, 10 TCID₅₀)组、1 TCID₅₀ 组、0.1 TCID₅₀ 组和对照组。除对照组外,其他 3 组小鼠滴鼻感染不同剂量的 H1N1 流感病毒。感染病毒后,每天测量小鼠的肛温、体重,观察小鼠皮毛及精神状态等,连续 7 d。处死后测定小鼠脏器指数、RT-PCR 检测肺组织中甲型流感病毒 H1N1 M 基因及小肠组织中视黄酸受体相关孤儿受体 γ t (retinoid-related orphan nuclear receptor, ROR- γ t) 的 mRNA 表达量。对筛选出的最佳感染剂量进行实验验证。**结果** 与对照组小鼠相比,模型组小鼠 10 TCID₅₀ 组和 1 TCID₅₀ 组体重呈显著下降趋势,肺指数明显升高($P<0.01$),胸腺指数明显降低($P<0.01$ 、 $P<0.05$),肺部病毒载量及小肠组织中 ROR- γ t 的 mRNA 表达量显著升高,出现背弓佝偻、精神不振、呼吸急促等现象,两个组的死亡率分别为 67%和 17%。0.1 TCID₅₀ 组小鼠指标虽有相似趋势,但无显著性差异。对 1 TCID₅₀ 感染剂量进行实验验证,与对照组相比,病理切片结果显示,模型组小鼠肺及小肠组织出现严重病理损伤,肺组织中白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 17A(IL-17A)及小肠组织中粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和 IL-2 显著升高,但肠组织中 IL-6 和白细胞介素 33(IL-33)显著降低。**结论** 1 TCID₅₀ 病毒感染为建立小鼠肺炎-肠炎模型的最佳浓度,且经过后期多批次的建模实验,证实该模型建立方法稳定、可靠,为抗病毒研究提供良好的病理模型。

【关键词】 小鼠;模型;流感;肺炎;肠炎

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0027-07

Establishment and validation of a pneumonia-enteritis model in mice infected with influenza H1N1 virus

DU Baoxiang, YU Qinhui, SUN Qihui, WANG Liqing, YANG Yong*, RONG Rong*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable mouse model of pneumonia enteritis caused by H1N1 influenza virus, and provide tools and means for study of the pathological basis of gastrointestinal influenza and antiviral drugs. **Methods** Experimental mice were randomly divided into four groups ($n=6$): 10 TCID₅₀, 1 TCID₅₀, 0.1 TCID₅₀ and control. All

【基金项目】 国家自然科学基金(81873220, 81774167);山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2020CXGC010505)。

【作者简介】 杜宝香(1993—),女,博士研究生,研究方向:中药活性成分发现与质量控制研究。E-mail: dubaoxiang1209@163.com

【通信作者】 杨勇(1972—),男,博士,副教授,博士研究生导师,研究方向:中药抗病毒的药效和机制以及经方的现代研究。

E-mail: yy7204@163.com

容蓉(1970—),女,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药活性成分发现与质量控制研究。E-mail: rosierong@163.com

* 共同通信作者

mice except the control group were intranasally infected with different doses of H1N1 influenza virus. After infection with the virus, the anal temperature and body weight of mice were measured every day, and their fur and mental state were observed for 7 consecutive days. After death, the organ index of mice was measured and mRNA expression of the H1N1 M gene of influenza virus in lung tissue and ROR- γ t in small intestine were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the body weight of model group mice in 10 TCID₅₀ and 1 TCID₅₀ groups decreased significantly, the lung index increased significantly ($P < 0.01$), the thymus index decreased significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), and mRNA expression of the H1N1 M gene of influenza virus and ROR- γ t in small intestine increased significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). The mortality of 10 TCID₅₀ and 1 TCID₅₀ groups were 67% and 17%, respectively, while the other groups were 0. Although there were similar trends in indexes of the 0.1 TCID₅₀ group, there was no significant difference. An infection dose of 1 TCID₅₀ was verified. Compared with the control group, the result of histological sections displayed serious pathological injuries in the lung and small intestine of the model group. Moreover, relative expression of IL-2, IL-6, IFN- γ and IL-17A in the lung tissue, as well as GM-CSF and IL-2 in small intestine, was significantly increased; in contrast, IL-6 and IL-33 in intestine were significantly decreased. **Conclusions** 1 TCID₅₀ virus infection was the best concentration for establishing a mouse pneumonia enteritis model. The establishment method of this model is stable and reliable, providing a good pathological model for antiviral research.

【Keywords】 mice; model; influenza; pneumonia; enteritis

现代药理研究发现,流感病毒感染肺组织并在内大量增殖,会造成严重的肺部炎症损伤^[1]。临床数据表明,甲型 H1N1 流感患者早期表现与普通流感相似,包括发热、咽痛、咳嗽、全身酸痛,部分病例表现为呕吐、腹泻^[2]。Dogra^[3]发现,与普通流感比较,甲型 H1N1 流感患者的腹泻、呕吐等胃肠道症状较为多见。缪媛媛等^[4]曾对 1200 例普通流感与 513 例甲型 H1N1 流感患者的临床症状进行比较研究,结果表明,甲型 H1N1 流感患者出现胃肠道症状者明显增多。且甲型 H1N1 确诊病例中腹泻、呕吐等胃肠炎症状多为呼吸道系统的伴随症状。

目前对于小鼠 H1N1 病毒模型的建立多为单独的肺炎模型^[5-6],对于肺炎-肠炎模型的研究报道甚少。本文以 BALB/c 雄性小鼠为实验动物,滴鼻感染不同浓度的 H1N1 病毒,筛选出造模的最佳感染浓度,并对其进行多次验证,建立了稳定的肺炎-肠炎模型,为抗 H1N1 病毒药物的研究提供更加全面的病理模型。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 36 只(4 周龄,15~18 g),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2021-0006]。动物实验在山东中医药大学抗病毒协同创新中心进行[SYKX(鲁)2017-0022],饲养温度(22±2)℃,相对湿度 40%~60%,本研究实验方案合理,经本院伦理委员会批准

(DWSY202003013),符合实验动物的“3R”原则研究。

1.1.2 病毒

甲型流感病毒 H1N1/PR8 株,-80℃保存于山东中医药大学抗病毒协同创新中心,使用前在 9 日龄 SPF 鸡胚中扩增得到尿囊液,测定血凝效价。使用 Reed-Muench 法测定病毒毒力,-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液(辰欣药业股份有限公司,批号:D18216041);RNA store 样品保存液-DP408、动物组织总 RNA 提取试剂盒-DP431(RNAPrep Pure Tissue Kit)、cDNA 反转录试剂盒-KR106、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒-FP205 均购自天根公司。

ND-one 超微量分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司);荧光定量 PCR 仪(CFX Connect Real-time System,美国伯乐公司);R583 S、R540IE 型呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司);生物安全柜(上海立申科学仪器有限公司,型号:HF safe-1500);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司,型号:ST-16R)。

1.3 实验方法

1.3.1 流感病毒鸡胚扩增

9~11 日龄鸡胚放置 37℃孵育箱种孵育 1 d,定时翻动鸡胚。选择生长良好鸡胚,于生物安全柜内,画出气室边界和胎位,在胚胎面与气室交角边缘约 1 mm 处做标记。然后用消毒后的镊子尖头对

准鸡胚尿囊腔端打破蛋壳。取病毒液用流水冲浸融化,用生理盐水稀释成不同的浓度,每只鸡胚接种 0.1 mL。接种后用无菌棉胶带封口,置于 37℃ 继续孵育 48 h。用无菌吸管通过绒毛尿囊膜进入尿囊腔,吸取鸡胚尿囊液,3000 r/min 4℃ 离心 15 min,取上清于-80℃ 冰箱保存。用 0.5% 的鸡红细胞测定其血凝效价为 1:320。

1.3.2 Reed-Muench 法测定病毒毒力

采用半对数稀释法稀释病毒,稀释的病毒接种于 96 孔 MDCK 细胞板,待细胞病变停止后,根据 Reed-Muench 方法对病毒滴度进行计算,计算出病毒每 0.1 mL 的 TCID₅₀,经测定病毒 TCID₅₀ = 1×10⁵/0.1 mL。

1.3.3 流感小鼠模型的建立

BALB/c 小鼠按照体重和肛温随机分成 4 组(*n* = 6):对照组、流感模型组(10 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组、0.1 TCID₅₀ 组)。3 个模型组,按照组别分别滴鼻感染 10 TCID₅₀、1 TCID₅₀、0.1 TCID₅₀ 不同浓度的流感病毒,每只 20 μL,对照组小鼠滴鼻接种等量的生理盐水,每天记录小鼠体重、肛温变化,观察小鼠的精神状态、发病及死亡情况。处理后第 7 天处死小鼠进行取材。

1.3.4 造模指标观察

(1)生理状态观察

接种病毒后,每日观察小鼠肛温、体重变化、大便形状、隐血情况,连续 7 d。并参照文献^[7] 标准,进行 DAI 评分,评分标准见表 1。

(2)死亡率

计算每组动物的死亡率:死亡率 = 死亡动物(只)/动物总数(只)×100%

(3)脏器指数

实验结束后,摘取各组动物肺、胸腺、脾等脏器,准确称量并计算脏器指数。

(4)RT-PCR 检测肺组织中甲型流感病毒 H1N1

M 基因及肠组织中 ROR-γt 的 mRNA 表达

使用 RT-PCR 检测肺组织中甲型流感病毒 H1N1 M 基因及肠组织中 ROR-γt 的 mRNA 表达。根据小鼠死亡率、肺部病毒载量及肠道组织中 ROR-γt 的 mRNA 相对表达量确定最佳的染毒剂量。实验所需引物均由生工生物有限公司进行设计并合成。引物序列碱基见表 2。严格按照试剂盒说明书完成总 RNA 的提取、RNA 纯度及浓度测定、RNA 逆转录为 cDNA 及相关细胞因子基因相对表达量的检测。

1.3.5 造模结果验证

BALB/c 小鼠按照体重和肛温随机分成 2 组(*n* = 6):对照组、模型组。根据 1.3.2 项方法,对模型组小鼠滴鼻感染 H1N1 病毒,感染剂量为上述实验筛选出的最佳病毒剂量。取小肠及肺组织,进行 HE 染色。利用 RT-PCR 技术检测肺组织中 IL-2、

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI score standard

评分 Score	体重下降(%) Weight lost	粪便粘稠度 Stool consistency	隐血或血便 Occult or gross bleeding
0	0	正常 Normal	无 None
1	1%~5%	软便 Loose stool	/
2	5%~10%	黏液样便 Mucinous stool	便潜血 Feces occult blood
3	10%~20%	/	/
4	>20%	稀液样便 Dilute stool	肉眼血便 Bloody stool

注:正常粪便:成形颗粒粪便;软便:半成形大便,不黏附于肛门;黏液样便:大便不成形,粪便里及肛门周围有肉眼可见的黏液;稀液样便:可黏附于肛门的稀水样粪便。DAI = (体重下降分值+粪便粘稠度分值+便血分值)/3。

Note. Normal stools, Well-formed pellets. Loose stool, Pasty stools which do not stick to the anus. Mucinous stool, Stools are not formed, and there is mucus visible to the naked eye in the feces and around the anus. Dilute stool, Liquid stools that stick to the anus. DAI = (combined score of weight lost, stool consistency and bleeding)/3.

表 2 基因序列

Table 2 Sequences of the primers

cDNA	F	R
Ppia	5'-CGCTTGCTGCAGCCATGGTC-3'	5'-CAGCTCGAAGGAGACGCGGC-3'
H1N1	5'-CTTCTAACCAGGTCGAAAC-3'	5'-CGTCTACGCTGCAGTCCTC-3'
ROR-γt	5'-TGTCCTGAGATGCTGTCAAGTTTG-3'	5'-TCCTGTTGCTGCTGCTGTTGC-3'
GM-CSF	5'-TTCAAGAAGCTAACATGTGTGC-3'	5'-GGTAACTTGTGTTTCACAGTCC-3'
IL-2	5'-GCAGCTCGCATCCTGTGTAC-3'	5'-CTGCTGTGCTTCCGCTGTAGAG-3'
IL-6	5'-GCTACCAAACTGGATATAATCAGGA-3'	5'-CCAGGTAGCTATGCTACTCCAGAA-3'
IL-17A	5'-CCAGGGAGAGCTTCATCTGT-3'	5'-CTTGGCCTCAGTGTGTTGAC-3'
IL-33	5'-GCTGCGTCTGTTGACACATT-3'	5'-CACCTGGTCTTGTCTTGGT-3'
IFN-γ	5'-CTTGAAAGACAATCAGGCCATC-3'	5'-CTTGGCAATACTCATGAATGCA-3'

IL-6、IFN- γ 、IL-17A 及肠组织中 GM-CSF、IL-2、IL-6 和 IL-33 的 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA) LSD 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 造模实验结果

2.1.1 流感模型小鼠造模指标检测

小鼠滴鼻感染流感病毒后,与对照组小鼠相比,小鼠 10 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组体重在接种病毒后第 3 天开始呈下降趋势(图 1),出现背弓佝偻、精神不振和软便等现象,在第 6 天开始两组小鼠出现黏液状粪便,平均 DAI 评分分别为(2.00 $\pm$ 0.00)分和(1.50 $\pm$ 0.12)分。而 0.1 TCID₅₀ 组小鼠体重直到第 7 天才出现下降趋势,且粪便状态一直正常。各组小鼠肛温变化不明显。

2.1.2 各组小鼠死亡率、脏器指数及肺组织中 H1N1 的 M 基因 mRNA 表达

接种病毒后,对照组、0.1 TCID₅₀ 组小鼠无死亡现象,10 TCID₅₀ 组小鼠、1 TCID₅₀ 组小鼠均出现不同数量的死亡。10 TCID₅₀ 死亡率为 67%,1 TCID₅₀

组死亡率为 17%。与对照组相比,各模型组小鼠肺指数明显升高,胸腺指数明显下降,脾指数无显著性差异。以 Ppia 为管家基因,分析目的基因的相对表达。与对照组小鼠相比,各模型组小鼠甲型流感病毒 H1N1 mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.05$) (见表 3)。

2.1.3 各组小鼠肠组织 ROR- γ t mRNA 相对表达量

与对照组相比,10 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组小肠组织 ROR- γ t 相对表达量显著升高($P < 0.05$),0.1 TCID₅₀ 组虽有升高趋势,但是无显著性差异(图 2)。综合各组模型小鼠体重、死亡率、脏器指数、肺部病毒载量及肠道 ROR- γ t 的 mRNA 相对表达量筛选出最佳染毒剂为 1 TCID₅₀。

2.2 造模验证结果

2.2.1 小鼠肺与肠组织病理学指标检测

HE 染色结果见图 3。结果显示对照组小鼠肺组织呈正常形态,黏膜上皮无变性坏死脱落,管壁及周围组织无炎性细胞浸润、肺泡间隔无增厚。模型组小鼠肺组织见坏死细胞及大量渗出物,周围肺组织结构不清晰,嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润,肺泡壁增厚;小肠组织同样出现小肠绒毛萎缩断裂,淋巴细胞浸润等明显的组织病理学改变,说明小鼠肺及肠道组织出现严重的炎症损伤。

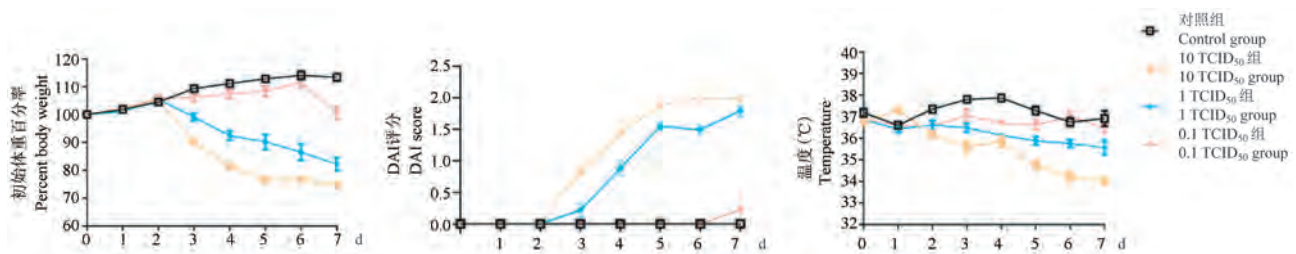


图 1 各组小鼠体重、肛温和 DAI 评分图

Figure 1 Body weight, rectal temperature DAI score in each groups

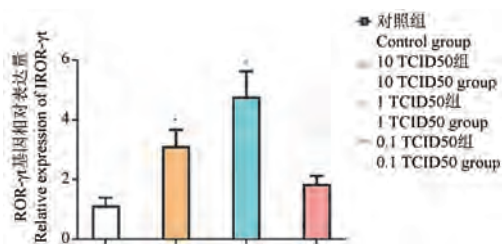
表 3 各组小鼠死亡率、脏器指数和病毒载量

Table 3 The mortality, organ index and viral load of different mice in each group

组别 Groups	死亡率(%) Mortality rate	肺指数 Lung index	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index	病毒载量 Viral load
对照组 Control group	0	6.75 $\pm$ 0.54	2.6 $\pm$ 0.24	4.79 $\pm$ 0.97	0
10 TCID ₅₀ 组 10 TCID ₅₀ group	67	19.95 $\pm$ 4.86 **	1.03 $\pm$ 0.32 **	4.03 $\pm$ 0.53	37.79 $\pm$ 20.27 **
1 TCID ₅₀ 组 1 TCID ₅₀ group	17	13.02 $\pm$ 3.62 **	1.77 $\pm$ 1.27 *	4.74 $\pm$ 0.85	1.42 $\pm$ 1.05 **
0.1 TCID ₅₀ 组 0.1 TCID ₅₀ group	0	8.85 $\pm$ 1.08 **	2.84 $\pm$ 0.22	4.17 $\pm$ 0.59	1.58 $\pm$ 2.34 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 2 各组小鼠 ROR- γ t 基因相对表达量

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

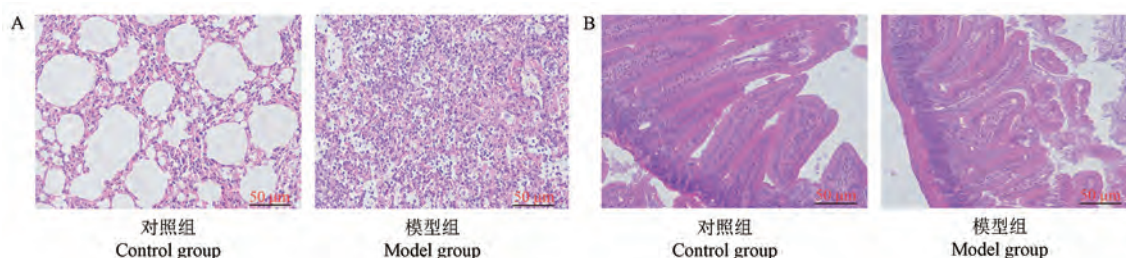
Figure 2 The mRNA expression of ROR- γ t in four groups

2.2.2 小鼠肺组织细胞因子的基因表达

与对照组相比,模型组小鼠肺组织中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-17A、IFN- γ 的相对表达量均显著升高,表明小鼠肺炎模型建立成功(图 4)。

2.2.3 小鼠肠组织细胞因子的基因表达

与对照组相比,模型组小鼠肠组织中细胞因子 GM-CSF、IL-2 的相对表达量显著升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$),表明小鼠肠炎模型建立成功,但 IL-6 和 IL-33 的表达量显著降低(图 5)。

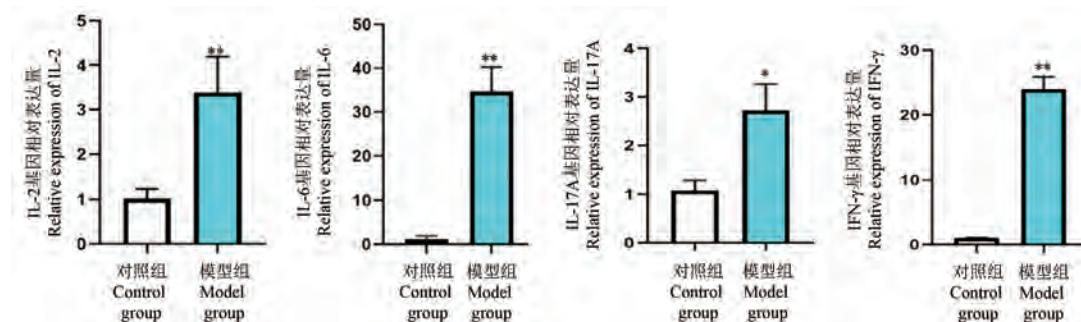


注:A:肺组织;B:小肠组织。

图 3 各组小鼠组织病理形态观察

Note. A, Lung tissue. B, Intestine tissue.

Figure 3 Histopathological changes of different mice tissues in each groups

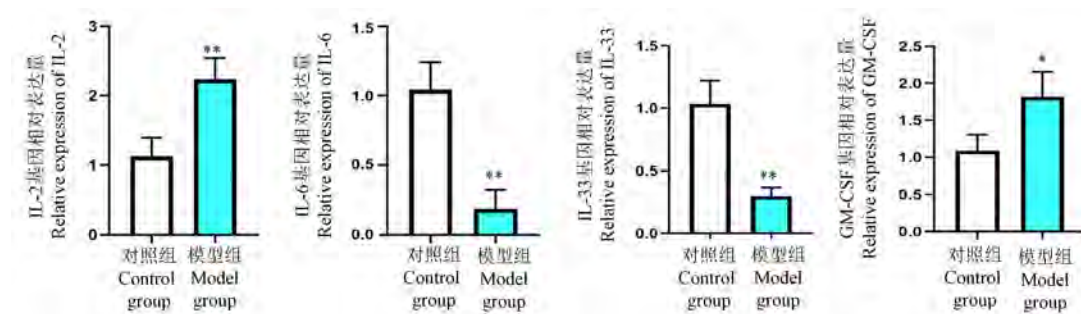


注:与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 4 各组小鼠肺组织细胞因子相对表达量

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Relative expression of lung cytokines in different mice of each group



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 各组小鼠小肠组织细胞因子相对表达量

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Relative expression of intestine cytokines in different mice of each group

3 讨论

造模过程中,我们通过小鼠肺和小肠组织的炎症损伤及 DAI 指数来评估小鼠胃肠型流感的严重程度。为了评估该模型是否建立成功,在本研究中,肺指数、肺部病毒载量以及肺组织中炎症因子被用作肺炎模型的评价指标。DAI 评分、小肠组织病理损伤及肠道炎症因子的表达量被用作肠炎模型的评价指标。与对照组相比,若感染 H1N1 小鼠肺指数、肺部病毒载量以及肺和小肠中炎症因子升高,DAI 指数升高,且出现明显的组织病理损伤,表明小鼠肺炎-肠炎模型成功建立。

造模过程中,模型组小鼠的体重呈现持续性下降趋势,且小鼠出现精神萎靡、呼吸急促等现象,感染病毒后 7 d,1 TCID₅₀ 和 10 TCID₅₀ 组小鼠体重明显低于对照组,但肛温变化不明显;小鼠肺、胸腺等脏器指数出现显著性差异,但是脾指数变化不明显;孙启慧^[8]以肺指数及 H1N1 基因相对表达量为指标成功建立流感模型,小鼠感染流感模型后,肺指数变大,肺组织 H1N1 基因相对表达量显著升高 ($P<0.01$),因此肺部病毒载量及肺指数可以作为评估流感模型的一个重要指标。与对照组相比,1 TCID₅₀ 和 10 TCID₅₀ 组小鼠肠组织变细、变短,肠道细胞因子 ROR- γ t 显著升高 ($P<0.05$),而 ROR- γ t 作为 Th17 细胞等淋巴细胞的转录因子,当其表达升高时会诱导 Th17 细胞过度分泌 IL-17、IL-22、GM-CSF 等炎症因子,致使肠道免疫失调,造成炎症损伤^[9],因此选定 ROR- γ t 的基因相对表达量为流感所致肠道炎症损伤的指标。

各检测数据显示,小鼠滴鼻感染 10 TCID₅₀、1 TCID₅₀ 浓度病毒后,造模结果较理想,但是,10 TCID₅₀ 组小鼠死亡率过高,不利于实验取材,且 1 TCID₅₀ 组小鼠 ROR- γ t 基因相对表达量更高,综合流感模型小鼠死亡率及肠道细胞因子表达情况确定感染剂量为 1 TCID₅₀。

对 1 TCID₅₀ 病毒感染剂量进行验证,病理切片显示模型组小鼠肺组织见坏死细胞及大量渗出物,周围肺组织结构不清晰,炎性细胞浸润,肺泡壁增厚。RT-PCR 结果显示,肺部炎症因子 IL-2、IL-6、IFN- γ 及 IL-17A 显著升高。IL-17 是 T 细胞诱导炎症反应的早期启动因子,可以通过促进释放前炎性

细胞因子来放大炎症反应,IL-17 与受体结合后,导致 NF- κ B 靶基因及 MAPK 的激活,与 IFN- γ 产生协同作用,激活 C/EPB,动员、募集及活化中性粒细胞,从而介导肺部组织炎症^[10-11]。

小肠病理切片显示,模型组小鼠出现绒毛萎缩断裂,淋巴细胞浸润等病变,肠道炎症因子 GM-CSF 和 IL-2 显著升高,IL-6 与 IL-33 显著降低。IL-6 是一种多效性细胞因子,在不同的组织及微环境中显示出不同的作用,在炎症方面,既具有促进炎症的功能,也具有抵抗炎症的作用。当 H1N1 病毒通过呼吸道传播进入肺组织后,刺激宿主调动巨噬细胞活化免疫系统,使 IL-6 分泌增加,IL-6 可通过募集单核细胞至抗原感染部位,诱导炎症细胞黏附、聚集,抑制 Treg 细胞分化及抑制 T 细胞凋亡,导致肺血管的通透性增加,引起肺间质水肿,发挥促炎作用。在肠道组织中,IL-6 可通过信号转导,激活转录激活因子 3 (STAT3),促进上皮细胞增殖,抑制其凋亡,从而达到抗炎效果。Cao 等^[12]研究发现与正常小鼠相比,IL-6^{-/-}小鼠促进了葡聚糖磷酸钠盐诱导的结肠炎的发生。Ye 等^[13]发现,与 IL-10 缺陷小鼠相比,IL-6 与 IL-10 双重缺陷的小鼠可通过抑制 Treg/CTLA-4、促进 IL-1 β /Th2 通路显著加重了肠道炎症,展现出更早的疾病发作,且会诱导全身炎症。同时,也有一些肠炎模型中,IL-6 表现出升高的趋势^[14-16]。因此,IL-6 在肠道炎症中的作用存在较大争议,是我们今后研究的重点。

与 IL-6 类似,IL-33 参与多种自身免疫性疾病的发生和进展,但其在不同自身免疫性疾病中的作用和机制不尽相同(甚至各异),提示其作用的多样性。例如:通过诱导 Th2 免疫应答而缓解 Th1/Th17 介导的 EAE^[17];通过作用于肥大细胞,可促进 Th1/Th17 免疫应答来参与类风湿关节炎发生^[18]。段利华等^[19]的研究发现,体外给予小鼠 IL-33 可缓解 TNBS 诱导的肠炎,其机制可能与上调 Treg 相关。因此,与正常对照组相比,本研究模型组小鼠肠组织中 IL-33 显著性降低是正常情况,但其具体机制有待于进一步研究。

综上所述,甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型造模成功,最佳感染剂量为 1 TCID₅₀,该造模方法稳定、可靠,胃肠型流感的病理基础及抗病毒药物研究提供工具和手段。

参考文献:

- [1] 孙世惠, 吴小红, 刘晨风, 等. 人 H7N9 禽流感病毒与 H1N1 流感病毒感染小鼠病理学损伤的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 103-104.
- [2] 范运峰, 曲萍, 田克恭. A/H1N1 流感-世界关注的焦点 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 241-244.
- [3] Dogra S. Emergence of swine origin influenza (H1N1 Virus) [J]. JK Science, 2009, 11(4): 167.
- [4] 缪媛媛, 张志强, 刘刚, 等. 以急性胃肠炎为首表现的重症甲型 H1N1 流感一例报告 [J]. 中国全科医学, 2010, 3(6): 584-584.
- [5] 胡秋萍, 戴卫平, 刘建兴, 等. 流感病毒致小鼠急性肺损伤模型建立及利巴韦林干预作用研究 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(6): 244-249.
- [6] 顾立刚, 周芸, 景珊, 等. 流感病毒 FM1 感染对小鼠肺损伤的作用机制及毒热平注射液的干预作用 [A]. 2008 中华中医药学会全国中医体质学术研讨会暨国际传统医药创新与发展态势论坛论文汇编 [C]; 2008.
- [7] 齐宇, 王开, 伊淑帅, 等. 产肠毒素大肠杆菌 K88 诱发 BALB/c 鼠肠炎模型的建立及评价 [J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(1): 19-22.
- [8] 孙启慧. 麻黄细辛附子汤治疗肾阳虚外感证小鼠代谢组学研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [9] Tibarewala D, Roy S, Majumder P. Novel interleukin 17 antibody quickly reduces psoriasis and also its role in immunity and inflammation [J]. J Pharm Innov, 2016, 5(5): 14.
- [10] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 763-776.
- [11] Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH. The IL-17 family of cytokines in psoriasis: IL-17A and beyond [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1682.
- [12] Cao Q, Lin Y, Yue C, et al. IL-6 deficiency promotes colitis by recruiting Ly6C^{hi} monocytes into inflamed colon tissues in a CCL₂-CCR₂-dependent manner [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 904: 174165.
- [13] Ye M, Joosse ME, Liu L, et al. Deletion of IL-6 exacerbates colitis and induces systemic inflammation in IL-10-deficient mice [J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(6): 831-840.
- [14] 张凯, 邓子辉, 薛辉, 等. 溃疡性结肠炎患者血清中 Leptin 与炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平及意义 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(4): 386-388.
- [15] 范文涛, 王攀红, 王倩. 马齿苋多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠组织 IL-6/STAT3 及 NF- κ B 的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(3): 263-267.
- [16] 毛婧, 朱莹, 周瑾, 等. 溃结宁膏穴位敷贴对实验性溃疡性结肠炎大鼠 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(7): 4.
- [17] 赖林. IL-33 敲除加重实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 疾病 [A]. 第十一届全国免疫学学术大会论文汇编 [C]; 2016.
- [18] 黄鹤卿, 李忆农. IL-33 与类风湿关节炎相关性 [J]. 医学综述, 2010, 16(11): 1614-1617.
- [19] 段利华, 石桂秀. IL-33 通过诱导 AAM 缓解小鼠实验性肠炎 [A]. 第二届免疫学博士生论坛论文汇编 [C]; 2013.

[收稿日期] 2022-02-11

《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!