

金亮子,吴芳芳,邓伟,等. H1N1 流感病毒树鼯模型生物学特性的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 223-229.

Jin LZ, Wu FF, Deng W, et al. Biological characteristics of a tree shrew model infected with H1N1 influenza virus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 223-229.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.010

# H1N1 流感病毒树鼯模型生物学特性的研究

金亮子<sup>1,2#</sup>, 吴芳芳<sup>3#</sup>, 邓伟<sup>1</sup>, 奎秀莹<sup>1</sup>, 罕园园<sup>1</sup>, 孙晓梅<sup>1</sup>, 仝品芬<sup>1</sup>,  
李娜<sup>1</sup>, 王喜军<sup>3\*</sup>, 代解杰<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118; 2. 昆明医科大学, 昆明 650500;  
3. 广西壮族药用植物园, 西南濒危药材资源开发国家工程中心, 南宁 530023)

**【摘要】** 目的 建立 H1N1 流感病毒感染树鼯模型, 探讨流感病毒动力学变化和在呼吸系统组织中的分布特征。方法 选择 3 ~ 3.5 周岁成年树鼯 (*Tupaia Belangeri Chinensis*) 24 只, 雌雄各半, 随机分为空白组 (B 组) 和模型组 (M 组) 各 12 只, 使用 H1N1 流感病毒每只 600  $\mu$ L ( $1 \times 10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL) 经鼻腔感染 M 组树鼯, 在 -3 ~ 10 d 期间每天早晨测量肛温, 同时采集咽拭子、鼻拭子和血液样本测定病毒载量。并测定 2、4、7 d 血液中抗流感的中和抗体。2、3、5、10 d 随机处死 3 只树鼯, 采集鼻甲、气管、咽部和肺组织进行病毒载量检测, 取 3、5、10 d 组织进行病理学检测。结果 M 组的树鼯表现为被毛蓬乱、食欲不振、运动迟缓、体温升高和鼻咽分泌物增加等临床症状; 感染后 1 d 开始可以在呼吸道中检测到病毒载量, 3 d 血液中出现病毒载量; 病理结果显示鼻甲、咽、气管和肺组织中均有一定程度的病理改变。结论 树鼯感染流感病毒后出现的临床症状与人类极为相似, 所建立的流感树鼯模型对研究流感的发病机制与抗流感药物评价提供了有重要价值的工具。

**【关键词】** 流感; H1N1 A/PR8/34 病毒; 树鼯; 感染; 动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0223-07

## Biological characteristics of a tree shrew model infected with H1N1 influenza virus

JIN Liangzi<sup>1,2#</sup>, WU Fangfang<sup>3#</sup>, DENG Wei<sup>1</sup>, KUI Xiuying<sup>1</sup>, HAN Yuanyuan<sup>1</sup>, SUN Xiaomei<sup>1</sup>,  
TONG Pinfen<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, WANG Xijun<sup>3\*</sup>, DAI Jiejie<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China. 2. Kunming Medical University, Kunming 650500. 3. National Engineering Laboratory for the Development of Southwestern Endangered Medicinal Materials, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023)

Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn; WANG Xijun. xijunw@sina.com

**【基金项目】** 云南省科技人才和平台计划项目 (2017HC019), 昆明市科技创新团队 (2019-1-R-24483), 云南省基础研究项目 (202101AT070288), 云南省基础研究项目 (202001AT070145), 广西科技基地和人才专项《民族药药效物质基础研究方法创新人才培养示范基地建设》(桂科 AD18126013), 中央引导地方科技创新基地建设类项目《广西特色药用资源开发科技创新基地建设》(桂科 ZY21195044)。

Funded by Yunnan Province Science and Technology Talents and Platform Plan Project (2017HC019), Kunming Science and Technology Innovation Team (2019-1-R-24483), Yunnan Fundamental Research Projects (202101AT070288), Yunnan Fundamental Research Projects (202001AT070145), Scientific and Technology Development Program of Guangxi (AD18126013), the "Ba Gui Scholars" Program of Guangxi, and the Central Government Guides Local Science and Technology Development Fund Projects (ZY21195044).

**【作者简介】** 金亮子 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 人类疾病动物模型的建立及疾病机理研究。Email: jlz0518@qq.com;

吴芳芳 (1982—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药质量标准, 有效性研究及健康产品开发研究。Email: wfftn@163.com。

#共同第一作者

**【通信作者】** 代解杰 (1961—), 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型的建立与应用。Email: dj@imbcams.com.cn;

王喜军 (1961—), 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究。Email: xijunw@sina.com。

\* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To establish a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection and to explore the dynamics of the influenza virus and its distribution in respiratory tissues. **Methods** Twenty-four 3 to 3.5-years-old adult tree shrews (*Tupaia Belangeri Chinensis*), with equal numbers of males and females, were randomly divided into a blank group (group B) and a model group (group M) of 12 tree shrews each. H1N1 influenza virus 600  $\mu\text{L}/\text{bird}$  ( $1 \times 10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL) were inoculated into M group tree shrews through the nasal cavity; the rectal temperature was measured every morning from 3 d before until 10 d after inoculation, and throat swabs, nasal swabs, and blood samples were collected to determine the viral load. Blood levels of neutralizing antibodies against influenza were determined on days 2, 4, and 7. Three tree shrews were randomly sacrificed on days 2, 3, 5, and 10, turbinate, trachea, pharynx, and lung tissues were collected for viral load detection, 3, 5, and 10 days of tissue were taken for histopathology. **Results** Tree shrews in group M showed clinical symptoms such as a disheveled coat, loss of appetite, slow movement, increased body temperature, and increased nasopharyngeal secretion, and their blood viral load appeared. There were some pathological changes to the turbinate, pharynx, trachea, and lung tissue of group M. **Conclusions** The clinical symptoms of tree shrews infected with influenza virus were very similar to those of humans. The established influenza virus tree shrew model provides a valuable tool for studying the pathogenesis of influenza and evaluating anti-influenza drugs.

**【Keywords】** influenza; H1N1 A/PR8/34 virus; tree shrew; infection; animal model

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

流行性感冒简称流感,是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。流感病毒是一种正黏病毒科负链 RNA 病毒,包含 8 个具有负极性的单链 RNA 分子。该科的 5 个属包括甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、索戈托病毒和伊萨病毒(传染性鲑鱼贫血病毒)<sup>[1]</sup>。甲型流感病毒感染最为常见和严重,它在短时间内迅速传播并影响大地理区域的人口,在 1918 年至 1919 年的流感大流行期间,估计有三分之一的世界人口、受到感染并患有临床症状明显的疾病<sup>[2]</sup>。

流感病毒不断变异,流感大流行随时可能爆发,合适的动物模型可以研究流感感染特性及传播特性,为流感的防控、药物筛选及疫苗的研究提供工作基础。动物模型用于模拟复杂的生物现象和人类疾病特征,多年来,动物模型已成功用于疾病机理、药物发现、靶点验证和临床前试验<sup>[3]</sup>。流感动物模型提高了我们对疾病发生发展机理和病理生理学的理解,是阐明流感发病机制的关键<sup>[4]</sup>。小鼠和雪貂常用于流感病毒研究,但也有一定的局限性<sup>[5]</sup>。小鼠体型较小,不易观察到疾病的表现,许多流感毒株需要提前适应才能成功感染小鼠<sup>[6]</sup>。雪貂模型由于价格高、大小不均、抗体反应性差<sup>[7]</sup>,有必要寻求新的流感动物模型,开展疾病的发生机制研究具有重要的科学意义。树鼯与灵长类动物的亲缘关系比与啮齿类动物的亲缘关系更近,具有体型小、易于繁殖、成本低等优点,成为研究人类疾病的理想对象<sup>[8]</sup>。从传染病的角度来看,树鼯容易感染人类病原体,并表现出类似于人类感染的临床

症状<sup>[9]</sup>。因此,本研究通过流感病毒感染树鼯,探讨流感病毒在不同组织中的病毒动力学及其在各组织中的分布规律,为其疾病的发病机制和药物研发提供一种有科学价值新的动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

H1N1 流感病毒血清抗体阴性、3 ~ 3.5 岁普通级树鼯(中缅树鼯滇西亚种)24 只,雌雄各半,体重 105 ~ 150 g。来源于中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心【SCXK(滇)K2018-0002】,饲养于中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心负压独立通风树鼯笼具(IVC)中【SYXK(滇)K2018-0002】,饲养环境温度控制在 20 ~ 25℃,湿度控制在 40% ~ 70%,人工光照每天 12 h,换气次数每小时大于 15 次。所有操作均符合中国医学科学院医学生物学研究所伦理要求(编号:DWSP202004001)。

#### 1.1.2 细胞

犬肾上皮细胞(MDCK 细胞)购于北纳生物。

#### 1.1.3 病毒及感染途径

H1N1 A/Puerto Rico/8/1934(A/PR/8)流感病毒株由中国医学科学院医学生物学研究所刘龙丁教授惠赠。经普通级鸡胚增殖后收集病毒尿囊液,病毒滴度为  $1 \times 10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL, -80℃冰箱储存备用,实验均在中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心 BSL-2(生物安全 II 级)实验室

中进行。

保定树鼩待稳定 5 min 后,用每只 600  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL) 病毒液通过滴鼻的方式感染树鼩。

#### 1.1.4 主要试剂与仪器

PBS (Hyclone, 美国), 病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, 德国), One Step Prime Script TM RT-PCR Kit (TaKaRa, 日本), 4% 多聚甲醛固定液 (美伦生物, 中国), 普通级 1% 鸡红细胞, 血凝板 (Nunc, 丹麦), 台式高速离心机 (Hitachi, CT15RE, 日本), 实时定量荧光 PCR 仪 (BIO-RAD, CFX-96, 美国), 生物安全柜 (Forma, A/B3, 美国), 切片机 (徕卡, 中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及实验干预

树鼩随机分为空白组 (B 组) 和模型组 (M 组), 每组 12 只, 感染后观察 10 d。M 组用 H1N1 A/PR/8/34 滴鼻方式感染树鼩, B 组用 PBS 滴鼻处理树鼩。

#### 1.2.2 体温的测定

每天上午 8:30 保定树鼩后保持 5 ~ 10 min, 待动物稳定后测定肛温。

#### 1.2.3 病毒载量的测定

每天采树鼩的鼻拭子、咽拭子, 用尾静脉采血法采集外周血样 0.3 mL, 使用实时定量荧光 PCR (RT-PCR) 绝对定量测定法研究了甲型 H1N1 A/PR/8/34 流感病毒在感染后 1 ~ 10 d 的病毒载量的变化情况<sup>[10]</sup>, 引物及探针序列见表 1。

表 1 H1N1 A/PR/8/34 引物序列

Table 1 H1N1 A/PR/8/34 primer sequence

引物及探针 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
上游 Forward	5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3'
下游 Reverse	5'-GGTGACAGGATTGCTCTGTCTTTA-3'
探针 Probe	5'-FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-TAMR-3'

#### 1.2.4 特异性抗体检测

分别测定感染后 2、4、7 和 10 d 血清样品。首先标记 96 孔微量滴定板, 然后用高碘酸钾 ( $\text{KIO}_4$ ) 处理血清以去除非特异性凝集原。每孔加入 25  $\mu\text{L}$  生理盐水, 第 1 个空孔加入 25  $\mu\text{L}$  处理过的血清样品, 稀释至最后一孔, 丢弃最后一孔的最后 25  $\mu\text{L}$ 。每孔 (1:1) 加入等体积 (25  $\mu\text{L}$ ) 含有 4 个血凝单位病毒的生理盐水, 最后加入 1% 鸡红细胞悬液 50

$\mu\text{L}$ 。小心地敲击滴定板的 4 个侧面进行混合。在室温下放置 30 min 后读取抗体滴度<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.5 病理学检测

腹腔注射 0.4 mL (3% 戊巴比妥钠) 安乐死树鼩, 采集鼻甲、咽、气管和肺组织, 4% 多聚甲醛固定液固定, 石蜡包埋切片, HE 染色镜下观察拍照。

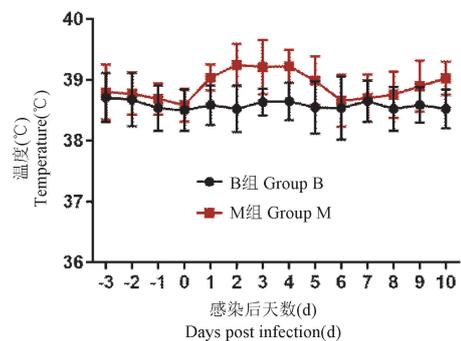
### 1.3 统计学分析

数据表示为平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。两组间的数据采用独立样本 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, 组间比较用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为具有显著性差异。 GraphPad Prism 7.0 用于绘图和数据分析。

## 2 结果

### 2.1 树鼩的体征及温度变化

所有树鼩 0 d 的临床体征均正常, 感染后 1 ~ 7 d, M 组树鼩出现活动迟缓、被毛蓬乱、食欲减退和鼻咽分泌物增加等的临床体征, 并在 9 d 逐渐消失。M 组树鼩在接种流感病毒株后体温有所升高, 2 d 到达最高为 39.2 $^{\circ}\text{C}$ 。与 B 组相比, M 组温度显著性升高 ( $P < 0.05$ ), 差异具有统计学意义 (见图 1)。



注: 与 B 组相比,  $*P < 0.05$ 。

图 1 H1N1 病毒感染树鼩后的体温变化

Note. Compared with group B,  $*P < 0.05$ .

Figure 1 Body temperature of tree shrews infected with H1N1 virus

### 2.2 树鼩体内的流感病毒复制

感染后 1 ~ 10 d 收集树鼩咽拭子、鼻拭子和血液样品。鼻拭子中的病毒载量在 1 ~ 2 d 达到峰值后开始下降, 10 d 略有增加。咽拭子和鼻拭子的病毒载量趋势大致相同。血液中的病毒载量在 3 d 开始出现, 5 d 到达最高, 且可持续至 10 d (见图 2)。

感染后 2 d 鼻甲、咽部、气管和肺部组织可检测到病毒载量 (约  $1 \times 10^{2-3}$  copies/mL), 一直持续到 10, 5 d 有明显的峰值, 以肺组织病毒载量表达最高 (见图 3)。

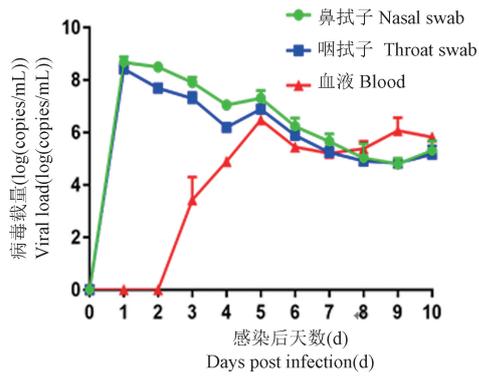


图 2 H1N1 感染树鼯后鼻拭子、咽拭子和血清中的病毒载量变化情况

Figure 2 Changes on viral load in nasal swabs, pharyngeal swabs and serum of tree shrews infected with H1N1 virus

2.3 血清病毒载量及特异性抗体

感染后 3 d 血液中可检测病毒到载量,在 5 d 达到峰值。感染后 2 d 开始产生血清抗体,并一直呈上升趋势,表明病毒感染树鼯后在体内可复制,呈持续性感染状态后不断产生血清抗体(见图 4)。

2.4 树鼯组织的病理变化

在感染后 3,5 和 10 d 取鼻甲、咽、气管和肺组织进行病理检查(见图 5)。病理结果显示,B 组树鼯的鼻甲、咽、气管和肺组织未见明显病理改变(图 5a,5b,5c,5d)。M 组树鼯的鼻甲 3 d 有一定程度的

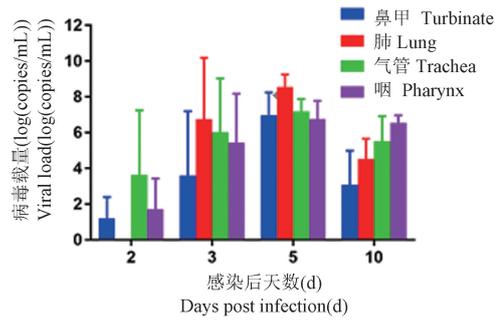


图 3 H1N1 病毒感染树鼯后不同时间鼻甲、咽、气管和肺组织的病毒载量变化

Figure 3 Changes of viral load in turbinate, pharynx, trachea and lung tissues during different time after infection with H1N1 virus infection in tree shrews

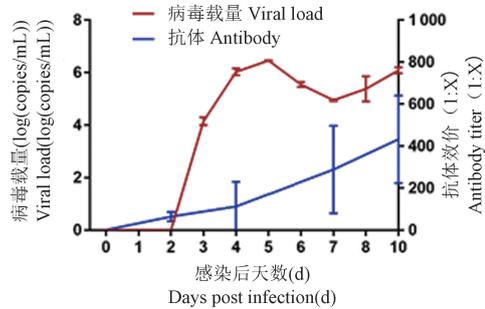


图 4 血液中病毒载量及抗体水平

Figure 4 Viral load and antibody levels in blood

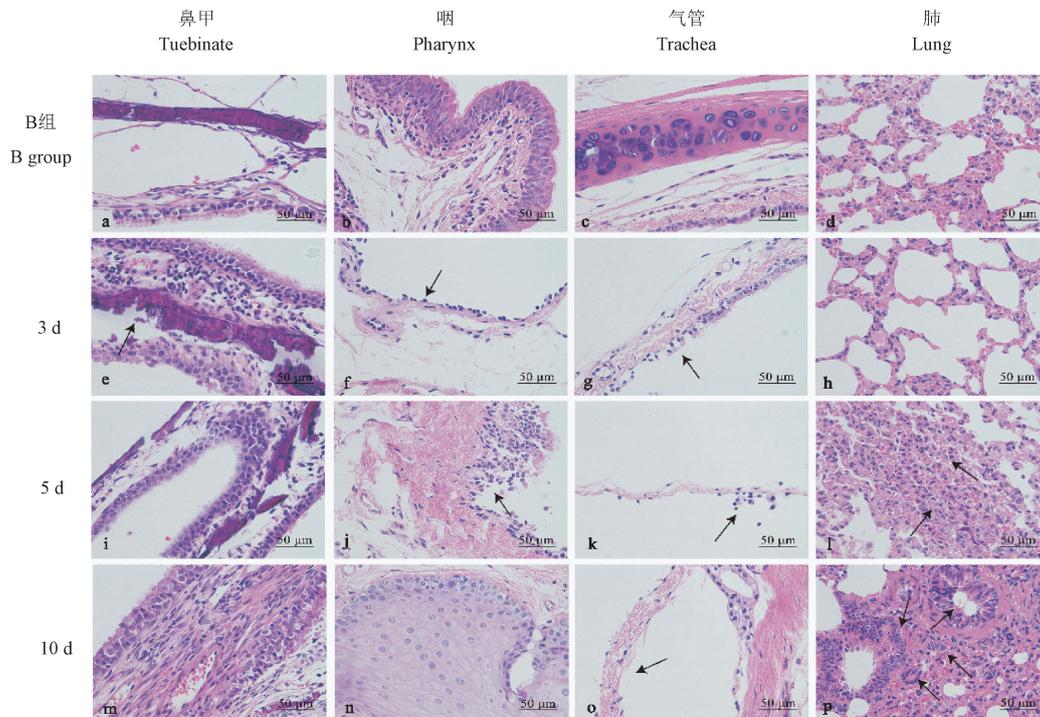


图 5 H1N1 感染树鼯后不同时间点鼻甲、咽、气管和肺组织的病理变化

Figure 5 Pathological changes of turbinate, pharynx, trachea and lung tissues of tree shrews infected with H1N1 during different time

损伤(图 5e), 5 d 和 10 d 没有明显的病理改变(图 5i, 5m)。3, 5 d 咽组织上皮细胞坏死、脱落(图 5f, 5j), 10 d 未见明显病理改变(图 5n)。感染后 3、5、10 d 气管组织均出现上皮细胞坏死和脱落(图 5g, 5k, 5o), 随着感染天数的增加, 损伤逐渐加重。3 d 肺组织无明显病理变化(图 5h), 5 d 肺泡壁出现小面积增厚(图 5l), 伴有少量的炎性细胞浸润, 10 d 肺泡壁大面积增厚(图 5p), 伴有少量的炎性细胞浸润。

组织病理结果提示, 流感病毒经上呼吸道感染先损害鼻甲和咽, 并逐渐蔓延至气管和肺, 最后导致肺部感染, 引起肺组织的病理实质性改变。

### 3 讨论

抗流感病毒药物和疫苗的研发都需要合适的动物模型。理想的流感动植物模型, 需要比较全面的模拟流感疾病的临床表现及病理变化<sup>[12]</sup>。目前常用于建立流感模型动物有雪貂、小鼠和非人灵长类等。雪貂和人类在肺生理学、细胞受体分布和感染临床症状方面有相似之处<sup>[13]</sup>, 并且易感, 主要用于传播力方面的研究及致病机制研究, 但个体差异较大, 价格较贵, 商品化试剂少。小鼠成本较低, 但小鼠个体较小, 不易观察到疾病的表现, 并且许多流感毒株需要提前经过适应之后, 才能成功感染小鼠。恒河猴、食蟹猴等其他非人灵长类动物不易操作, 价格昂贵, 存在一定的伦理方面的制约<sup>[14]</sup>。本研究选择树鼩来建立流感动植物模型, 在动物出现流感样的临床症状、血清病毒复制及抗体和病理变化上进行有益的探索。树鼩是一种小型的非灵长类哺乳动物, 树鼩与人类在生理学、分类学、基因组学及免疫学等生理生化特性方面的相似性高于常用的雪貂、小鼠等实验动物。我们的研究表明, H1N1 A/PR8/34 流感病毒在树鼩呼吸道能够有效复制, 在下呼吸道表现出典型的流感症状和病理变化, 如急性支气管炎和肺炎<sup>[15]</sup>。

人流感的临床症状主要以流涕、咳嗽、肌肉酸痛等为主要表现<sup>[16]</sup>。本研究中发现流感病毒感染树鼩后, 树鼩表现主要以鼻腔分泌物增加、流涕为主, 也存在被毛蓬乱及精神萎靡; 恒河猴及食蟹猴等非人灵长类动物模型临床表现为流涕, 打喷嚏, 还有呼吸困难等症状<sup>[17]</sup>; 小鼠模型表现反应迟钝, 竖毛, 弓背, 食欲减退甚至出现死亡; 雪貂模型出现

厌食、体重减轻、昏睡等症状<sup>[18]</sup>。相比而言, 树鼩模型表现的临床症状与非人灵长类动物甚至人的表现和程度更为相似。

病毒载量及抗体可以反映病毒复制与自我防御机制之间的相互作用<sup>[19]</sup>, 高峰通常出现在出现症状时<sup>[20]</sup>。树鼩感染流感病毒后, 鼻、咽拭子在 1 d 和 2 d 达到高峰, 可以达到  $1 \times 10^8$  copise/mL, 这与人类感染流感病毒后出现的病毒载量高峰相似<sup>[21]</sup>, 与恒河猴感染流感病毒的趋势相似但有些许不同。恒河猴感染流感病毒后, 在 1 d 和 2 d 达到高峰, 5 d 和 6 d 再次上升<sup>[22]</sup>。小鼠感染流感病毒后肺部可能出现肺炎症状<sup>[23]</sup>, 病毒载量也可以检测到, 但未发现与人类相似的峰值<sup>[24]</sup>, 并且小鼠的临床症状与人类不相似, 更容易死亡<sup>[25]</sup>, 这是由于小鼠呼吸道中的受体分布及蛋白质的相互作用与人类不同所导致的<sup>[26]</sup>。这从另一个方面反映出树鼩作为流感动植物模型比大鼠和小鼠更接近灵长类动物。根据临床的回顾性研究, 病毒载量可以在人呼吸道中长期存在<sup>[27]</sup>, 这和我们的结果相一致, 在 10 d 依然可以鼻甲、咽、气管及肺中检测到流感的病毒载量。H1N1 流感病毒的主要感染为气管支气管炎, 大量病毒附着于气管和支气管<sup>[28]</sup>。因此, 我们还检测了鼻甲、气管、咽和肺组织中的病毒载量。发现 2 d 即可在鼻甲、气管、咽组织中测出病毒载量, 5 d 达到峰值, 最高可达到  $1 \times 10^9$  copise/mL, 各组织病毒载量趋势一致。说明病毒在次日开始复制, 并逐渐扩散至下呼吸道。流感病毒通过直接病毒感染或免疫系统反应造成的损害影响呼吸道<sup>[29]</sup>。肺组织病毒载量在 5 d 达到高峰, 同时出现病理损伤。表明流感病毒随着时间的推移逐渐从上呼吸道传播到下呼吸道, 感染组织器官。之后, 病毒载量缓慢下降, 因为流感病毒可以感染肺内皮细胞并造成损伤, 但提示不能在肺内皮细胞中进一步复制<sup>[30]</sup>。而小鼠肺的病毒载量高峰则在 3 d<sup>[31]</sup>。10 d 各组织中病毒载量仍可以检测到, 有动物实验表明, 肺中的病毒载量一般要 25 d 才能完全清除<sup>[32]</sup>。

从病理结果可以看出, 树鼩感染流感病毒 3 d 后, 首先在鼻甲中进行复制并产生损伤, 然后是咽部, 随着时间的推移, 病毒逐渐扩散并在肺组织中复制, 气管损伤持续存在, 肺泡出现弥漫性的增厚, 说明存在炎性病变, 这与感染病人的尸检报告一致, 人感染后可出现气管和支气管炎<sup>[33]</sup>, 支气管壁

的上皮细胞出现细胞脱落和坏死,肺出现了弥漫性间质性肺炎<sup>[34]</sup>。树鼯感染流感病毒表现的症状和人类似的症状是由于受体分布和人类似<sup>[5]</sup>,可能更能模拟人感染流感病毒的病理变化情况。

在之前的报道中,流感病毒可以在没有适应的情况下感染树鼯<sup>[5]</sup>,这说明有新的流感病毒流行的时候,树鼯可以作为一种快速替代模型。这项研究的结果表明,甲型流感可以感染树鼯并引起肺炎。树鼯的症状与人类高度相似,有体温升高、流涕等临床症状<sup>[35]</sup>。在鼻咽拭子中,可以连续检测血液和组织中的病毒载量,并诱导血清中特异性抗体的形成。树鼯能较好地模拟流感病毒感染后的病毒复制和病理变化,是很好的流感动物模型。树鼯的优势是存在与人类相似的唾液酸受体,基因组与人类相似。流感病毒无需适应即可感染树鼯。饲养方便、体型小、价格低也是树鼯的优点。本研究建立的树鼯感染模型在临床表现、病毒复制和病理变化等方面均能满足 H1N1 流感病毒疾病模型的建模要求,此模型可以对开展甲型流感病毒的作用机制、药物评价及疫苗学研究有较好的参考意义。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(6): 440-451.
- [ 2 ] Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(1): 15-22.
- [ 3 ] Rosner M, Reithofer M, Fink D, et al. Human embryo models and drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 637.
- [ 4 ] Liang GB, He ZH. Animal models of emphysema [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(20): 2465-2475.
- [ 5 ] Yang ZF, Zhao J, Zhu YT, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus [J]. *Virol J*, 2013, 10: 111-120.
- [ 6 ] Zhu Z, Yang Y, Feng Y, et al. Infection of inbred BALB/c and C57BL/6 and outbred institute of cancer research mice with the emerging H7N9 avian influenza virus [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2013, 2(8): 1-7.
- [ 7 ] Maher JA, DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus [J]. *Lab Anim (NY)*, 2004, 33(9): 50-53.
- [ 8 ] Jiang LM, Lu CX, Sun QM. Tree shrew as a new animal model for the study of dengue virus [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 621164.
- [ 9 ] Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection [J]. *Exp Anim*, 2014, 63(4): 367-374.
- [ 10 ] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1559-1582.
- [ 11 ] Kaufmann L, Syedbasha M, Vogt D, et al. An Optimized Hemagglutination Inhibition (HI) assay to quantify influenza-specific antibody titers [J]. *J Vis Exp*, 2017, 130: 55833. 1-10.
- [ 12 ] 朱华, 许黎黎, 鲍琳琳, 等. H7N9 禽流感病毒小鼠感染动物模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(1): 18-21. Zhu H, Xu LL, Bao LL, et al. Establishment of an animal model of H7N9 avian influenza virus infection in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(1): 18-21.
- [ 13 ] Belser JA, Barclay W, Barr I, et al. Ferrets as models for influenza virus transmission studies and pandemic risk assessments [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(6): 965-971.
- [ 14 ] O'donnell CD, Subbarao K. The contribution of animal models to the understanding of the host range and virulence of influenza A viruses [J]. *Microbes Infect*, 2011, 13(5): 502-515.
- [ 15 ] Johnston SL. Anti-influenza therapies [J]. *Virus Res*, 2002, 82(1-2): 147-152.
- [ 16 ] 周望展, 何卫, 胡云双. 甲型流感和乙型流感患者的临床症状、白细胞计数、C-反应蛋白的差异分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(10): 1215-1218. Zhou WZ, He W, Hu YS. Difference analysis of clinical symptoms, white blood cell count and C-reactive protein between influenza A and influenza B patients [J]. *Chin J Health Lab Tec*, 2021, 31(10): 1215-1218.
- [ 17 ] Moncla LH, Ross TM, Dinis JM, et al. A novel nonhuman primate model for influenza transmission [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78750.
- [ 18 ] Belser JA, Eckert AM, Tumpey TM, et al. Complexities in ferret influenza virus pathogenesis and transmission models [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 733-744.
- [ 19 ] Li IW, Hung IF, To KK, et al. The natural viral load profile of patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) and the effect of oseltamivir treatment [J]. *Chest*, 2010, 137(4): 759-768.
- [ 20 ] To KK, Chan KH, Li IW, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus [J]. *J Med Virol*, 2010, 82(1): 1-7.
- [ 21 ] Myers MA, Smith AP, Lane LC, et al. Dynamically linking influenza virus infection kinetics, lung injury, inflammation, and disease severity [J]. *Elife*, 2021, 10: e68864.
- [ 22 ] Shinya K, Gao Y, Cilloniz C, et al. Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque [J]. *J Virol*, 2012, 86(11): 6055-6066.
- [ 23 ] Bao LL, Xu LL, Zhu H, et al. Transmission of H7N9 influenza virus in mice by different infective routes [J]. *Virol J*, 2014, 11: 185.
- [ 24 ] Zhang SP, Hu B, Xu JF, et al. Influenza A virus infection induces liver injury in mice [J]. *Microb Pathog*, 2019,

- 137: 103736.
- [25] Margine I, Krammer F. Animal models for influenza viruses: implications for universal vaccine development [J]. *Pathogens*, 2014, 3(4): 845-874.
- [26] Kamal RP, Katz JM, York IA. Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 385: 243-274.
- [27] Rodrigues Guimarães Alves V, Perosa AH, de Souza Luna LK, et al. Influenza A(H1N1)pdm09 infection and viral load analysis in patients with different clinical presentations [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2020, 115: e200009.
- [28] van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(4): 1215-1223.
- [29] Kalil AC, Thomas PG. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology [J]. *Crit Care*, 2019, 23(1): 258.
- [30] Han T, Lai Y, Jiang Y, et al. Influenza A virus infects pulmonary microvascular endothelial cells leading to microvascular leakage and release of pro-inflammatory cytokines [J]. *Peer J*, 2021, 9: e11892.
- [31] 刘国星, 黄元铭, 程森, 等. 甲型 H1N1 流感病毒感染对小鼠肺损伤及肠道菌群的影响 [J]. *疾病监测*, 2021, 36(7): 689-695.
- Liu GX, Huang YM, Cheng M, et al. Effects of influenza A (H1N1) virus infection on lung injury and intestinal flora in mice [J]. *Dis Sur*, 2021, 36(7): 689-695.
- [32] Alsuwaidi AR, George JA, Almarzooqi S, et al. Sirolimus alters lung pathology and viral load following influenza A virus infection [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 136.
- [33] Kuiken T, Taubenberger JK. Pathology of human influenza revisited [J]. *Vaccine*, 2008, 4: 59-66.
- [34] 齐晶, 吕福东, 段雪晶, 等. 新甲型 H1N1 流感重症死亡病例呼吸道及外周免疫器官病理形态学及免疫细胞的变化 [J]. *首都医科大学学报*, 2015, 36(5): 761-767.
- Qi J, Lyu FD, Duan XJ, et al. Pathological morphology change of respiratory and peripheral immune organ and the change of immune cells [J]. *J Capit Med Univ*, 2015, 36(5): 761-767.
- [35] Gaitonde DY, Moore FC, Morgan MK. Influenza: diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2019, 100(12): 751-758.

[收稿日期] 2022-02-10