

韩雨秀,赵良鑫,杜宝香,等. 流感病毒-金黄色葡萄球菌共感染小鼠模型建立及达菲的干预作用研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 463-470.

Han YX, Zhao LX, Du BX, et al. Establishment of a mouse model by influenza virus-*Staphylococcus aureus* co-infection and intervention effect of Tamiflu [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(4): 463-470.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.04.006

流感病毒-金黄色葡萄球菌共感染小鼠模型建立及达菲的干预作用研究

韩雨秀¹,赵良鑫¹,杜宝香¹,孙启慧^{1,5},杨勇^{2,3,4,5*},容蓉^{1,5*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 济南 250355; 3. 中医药经典理论教育部重点实验室, 济南 250355; 4. 中医药基础研究山东省重点实验室, 济南 250355; 5. 山东省中医药抗病毒工程研究中心, 济南 250355)

【摘要】目的 模拟临床常见的流感病毒+金黄色葡萄球菌(金葡菌)共感染建立小鼠模型,评价达菲干预后的药效及对淋巴细胞和炎症因子调控作用。**方法** (1)通过筛选不同滴度的PR8流感病毒、金葡菌,建立共感染小鼠模型。(2)选用雄性BALB/c小鼠,随机分为6组。第0天滴鼻流感病毒(0.25 TCID_{50} ,每只 $20\text{ }\mu\text{L}$),第3天滴鼻感染 $2.5\times 10^7\text{ CFU}$ 金葡菌 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。感染病毒24 h后灌胃给药达菲,连续7 d。末次给药24 h后处死,计算脏器指数,RT-qPCR检测流感病毒M基因相对表达量,流式细胞术检测 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ T淋巴细胞含量及IL-6等13种炎症因子的分泌水平,以气泡图的形式显示每组促炎平均值和促炎细胞因子之和。**结果** (1) 0.25 TCID_{50} 的流感病毒感染后体重下降相对平缓,小鼠没有出现死亡;(2) $2.5\times 10^7\text{ CFU}$ 的金葡菌共感染后半数致死,体重下降相对平缓,作为后续共感染组的剂量;(3)共感染组小鼠体重下降较大,胸腺指数明显下降($P<0.05$),肺指数明显升高($P<0.05$)。与流感组相比,共感染组M基因表达量显著升高($P<0.05$);与金葡组相比,细菌载量显著升高($P<0.05$);与流感组和金葡组相比,小鼠淋巴细胞绝对含量明显降低($P<0.05$),炎症因子含量显著增加($P<0.05$)。达菲及时干预共感染小鼠后延缓了体重的下降,显著升高了胸腺指数($P<0.05$),降低了肺指数($P<0.05$);显著降低了M基因的表达和细菌载量($P<0.05$);淋巴细胞含量显著升高($P<0.05$);显著降低炎症因子的表达($P<0.05$)。气泡图显示共感染组小鼠体内促炎因子的平均值以及促炎因子之和均远远高于其他各组,达菲及时干预后有较好的回调作用。**结论** 本研究建立了符合临床特征的共感染小鼠模型,采用达菲干预治疗,可以减轻后续继发病毒-细菌混合感染对机体的损伤。

【关键词】 甲型H1N1流感病毒;金黄色葡萄球菌;流感病毒-金黄色葡萄球菌共感染;炎症因子调控;T淋巴细胞;达菲

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)04-0463-08

Establishment of a mouse model by influenza virus-*Staphylococcus aureus* co-infection and intervention effect of Tamiflu

HAN Yuxiu¹, ZHAO Liangxin¹, DU Baoxiang¹, SUN Qihui^{1,5}, YANG Yong^{2,3,4,5*}, RONG Rong^{1,5*}

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81873220),山东省自然科学基金项目(ZR2021LZY012),济南市科学技术局自主培养创新团队(2021GXRC028)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81873220), Natural Science Foundation of Shandong Province(ZR2021LZY012), Jinan Science and Technology Bureau Independently Cultivated an Innovation Team(2021GXRC028).

【作者简介】 韩雨秀,女,在读硕士研究生,研究方向:中药及复方活性成分与药理作用。Email: 879197761@qq.com

【通信作者】 容蓉,女,教授,博士,研究方向:中药及复方活性成分与质量控制。Email:rosierong@163.com;

杨勇,男,教授,博士,研究方向:中药抗病毒药效和机制。Email:yy7204@163.com。

* 共同通信作者

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China. 2. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Jinan 250355. 4. Shandong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Basic Research, Jinan 250355. 5. Shandong Antiviral Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

Corresponding author: RONG Rong. E-mail: rosierong@163.com; YANG Yong. E-mail: rosierong@163.com

【Abstract】 Objective A mouse model of influenza and *Staphylococcus aureus* co-infection was established to evaluate the efficacy of Tamiflu and its regulatory effect on lymphocytes and inflammatory factors. **Methods** (1) An influenza-*Staphylococcus aureus* co-infection mouse model was established by screening different titers of influenza A H1N1/PR8 virus and *Staphylococcus aureus*. (2) Male BALB/c mice were selected and randomly divided into six groups. On day 0, mice were inoculated intranasally with 20 μL of influenza virus H1N1/PR8 at a dose of 0.25 TCID₅₀. On day 3, mice were inoculated intranasally with 20 μL of *Staphylococcus aureus* at a dose of 2.5×10^7 CFU. Twenty-four hours after infection with influenza virus, mice were given Tamiflu by gavage once daily for 7 days, and body weight changes were recorded every day. Mice were necropsied 24 h after the last dose. The organ index was calculated; the expression of influenza virus M gene was detected by RT-qPCR; and the contents of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T lymphocytes were assessed. The levels of 13 inflammatory factors, including IL-6, were detected. The average and total pro-inflammatory values of inflammatory cytokines in each group were displayed in the form of bubble charts. **Results** (1) Weight loss in mice infected with 0.25 TCID₅₀ influenza virus was relatively subtle, and the mice survived. Mouse body weight decreased steadily after co-infection with 2.5×10^7 CFU, and half of the group died; (2) thus 2.5×10^7 CFU was used as the dose for the subsequent co-infection group. In co-infected mice, body weight and thymus index decreased significantly ($P < 0.05$), and lung index increased significantly ($P < 0.05$). (3) Compared with the influenza group, the co-infection group had significantly higher M gene expression ($P < 0.05$). Compared with the *Staphylococcus aureus* group, the co-infection group's bacterial load was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the influenza group and *Staphylococcus aureus* group, the absolute content of lymphocytes was significantly lower, and the content of inflammatory factors significantly increased ($P < 0.05$). Tamiflu treatment delayed weight loss and significantly increased the thymus index ($P < 0.05$), and M gene expression and bacterial load were significantly decreased, while lymphocyte content significantly increased ($P < 0.05$). The expression of inflammatory factors was significantly decreased ($P < 0.05$). A bubble diagram showed much higher average and total amounts of proinflammatory factors in the co-infection group than the other groups, and Tamiflu had a good effect after timely intervention. **Conclusions** In this study, we established a co-infection mouse model that conformed to the clinical characteristics of the mixed virus-bacteria infection, and Tamiflu intervention reduced subsequential damage to the body.

【Keywords】 influenza A H1N1 virus; *Staphylococcus aureus*; influenza-*Staphylococcus aureus* co-infection; regulation of inflammatory factors; T lymphocytes; Tamiflu

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

流感是急性呼吸道感染疾病^[1]。研究发现,流感病毒感染导致的死亡与流感病毒流行期间继发性金黄色葡萄球菌等感染密切相关。1918 年的“西班牙流感”是历史上最严重的流感大流行,近 5000 万患者死亡,Morens 等^[2]研究发现其中 90% 以上患者存在细菌共感染,主要为流感嗜血杆菌、肺炎链球菌及金黄色葡萄球菌。流感与金黄色葡萄球菌合并感染会引起坏死性支气管炎、肺炎等严重疾病,甚至引起死亡^[3]。在新型冠状病毒肺炎大流行期间,继发性感染或合并感染也被认为是重症和死亡的主要因素^[4]。目前针对流感或金黄色葡萄球菌

感染的研究大多为单一致病因素研究^[5-7],有少量文献开展病毒-细菌共感染模型研究,但采用了较大甚至致死滴度的流感病毒感染^[8-9],这将影响继发细菌感染对宿主的损伤评价。因此,选择合适的病毒感染滴度及继发感染的细菌浓度,对建立符合临床多发特征的共感染模型十分关键。本文对共感染模型中流感病毒滴度及金黄色葡萄球菌的浓度进行了系统探索,筛选出了合适的流感-金黄色葡萄球菌共感染模型,并采用达菲干预研究,评价其对共感染模型的治疗作用,为共感染模型的建立和药物防控提供基础研究证据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 7 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 96 只, 体重 (19 ± 1) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养期间各组小鼠自由饮水, 饲喂普通维持饲料由济南朋悦实验动物繁育有限公司【SCXK(鲁)2018-0003】提供。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度 $22 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 饲养于山东中医药大学抗病毒协同创新中心【SYXK(鲁)2017-0022】。所有操作均经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会审查通过(SDUTCM20220908001)。

1.1.2 主要试剂与仪器

动物组织总 RNA 提取试剂盒、FastKing cDNA 第一链合成试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂(天根公司); 多因子试剂盒(Mouse Inflammation Panel with Filter Plate, 美国 Biolegend); 流式 APC-CD3⁺/FITC-CD4⁺/PE-CD8⁺ 抗体(美国 Biolegend); DNA 引物(生工生物工程(上海)股份有限公司); 甲型流感病毒 H1N1/PR8 株, 测定血凝效价为 1:320, CPE 法检测的病毒滴度为 1×10^5 TCID₅₀/0.1 mL, 金黄色葡萄球菌, 保存于山东中医药大学抗病毒协同创新中心; 达菲(上海罗氏制药有限公司, 批号: M1050)。

超微量分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司, 型号: NanoDrop One, 中国), 荧光定量 PCR 仪(伯乐公司, 型号: CFX Connect, 美国), 呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: R583S, 中国), 组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号: SCIENTZ-48, 中国), 流式细胞仪(BD 公司, 型号: Accuri C6, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

(1) 共感染模型中 H1N1/PR8 流感病毒滴度筛选: 将小鼠按体重随机分成 5 组, 分别为正常组、0.125 TCID₅₀ 组、0.25 TCID₅₀ 组、0.5 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组, 每组 6 只。正常组小鼠在第 0 天经滴鼻途径给生理盐水每只 20 μL , 其余组小鼠经滴鼻途径给相应滴度的 H1N1/PR8 流感病毒液每只 20 μL 。感染后每日观察小鼠状态, 称重并记录。

(2) 共感染模型中金黄色葡萄球菌浓度筛选:

将小鼠按体重随机分成 5 组, 分别为正常组、0.25 TCID₅₀ + 1.25×10^7 CFU 组、0.25 TCID₅₀ + 2.5×10^7 CFU 组、0.25 TCID₅₀ + 5×10^7 CFU 组、0.25 TCID₅₀ + 1×10^8 CFU 组, 每组 6 只。正常组小鼠在第 0 天经滴鼻途径给生理盐水每只 20 μL , 其余组小鼠经滴鼻途径给 0.25 TCID₅₀ H1N1/PR8 流感病毒液每只 20 μL 。第 3 天其余组小鼠经滴鼻途径给相应浓度的金黄色葡萄球菌每只 20 μL 。感染后每日观察小鼠状态, 记录体重。

(3) 达菲干预 H1N1/PR8-金黄色葡萄球菌共感染小鼠: 将小鼠适应性喂养 3 d 后, 按体重随机分为正常组、金葡组、流感组、共感染组、流感+达菲组、共感染+达菲组, 共 6 组, 每组 6 只。第 0 天正常组和金葡组经滴鼻途径给生理盐水每只 20 μL , 其余组小鼠经滴鼻途径给 0.25 TCID₅₀ H1N1/PR8 流感病毒液每只 20 μL , 第 3 天金葡组和共感染组滴鼻途径给 2.5×10^7 CFU 金黄色葡萄球菌每只 20 μL 。达菲组在感染流感病毒后 24 h 灌胃给药(达菲, 19.5 mg/kg), 每天 1 次, 连续 7 d, 其余组灌胃等量的超纯水。

期间测量小鼠的体重和生存率, 末次给药 24 h 后取肝素钠抗凝血待用, 异氟烷麻醉后, 脱颈椎处死小鼠, 解剖取肺、脾、胸腺组织, 计算脏器指数(脏器鲜重/小鼠体重 $\times 100\%$), 取部分肺组织保存在 RNA Store Reagent 中, 检测流感病毒 M 基因的相对表达量。

1.2.2 qPCR 检测肺组织中 H1N1/PR8 流感病毒 M 基因的表达

15 ~ 20 mg 肺组织加入 300 μL RL 裂解液, 研磨成匀浆, 按照动物组织总 RNA 提取试剂盒方法操作, 测定总 RNA 浓度, 反转录得到 cDNA。建立 20 μL 的 RT-qPCR 反应体系, 放入荧光定量 PCR 仪中扩增, 95°C 预变性 15 min, 95°C 变性 10 s, 40 个循环, 66°C 退火/延伸 32 s, 40 个循环。实验后记录 Ct 值, 通过计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 得到 mRNA 的相对表达量。流感病毒 M 基因引物序列 F: 5'-CTTCTAACCGAGGTCTGAAAC-3', R: 5'-CGTCTACGCTGCAGTCCTC-3', 产物长度 227 bp。内参基因 PPIA 引物序列: F: 5'-CGCTTGCTGCAGCCATGGTC-3', R: 5'-CAGCTCGAAGGAGACGCGGC-3', 产物长度 86 bp。

1.2.3 流式细胞术检测淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 含量

取 100 μL 抗凝全血, 加入红细胞裂解液, 避光

孵育 10 min, 清洗两次 (PBS), 重悬。加入 2 μL APC-CD3⁺, 0.5 μL FITC-CD4⁺, 1.2 μL PE-CD8⁺, 室温避光孵育 20 min, 清洗 2 次 (PBS), 重悬, 200 目滤网过滤, 采用流式细胞仪检测, 根据光散射设门, 以淋巴细胞门内收集 2×10^4 个细胞为检测终点。

1.2.4 流式细胞术检测炎症因子含量

将小鼠抗凝血以 4000 r/min 离心 10 min, 收集血浆。将标准品设置 8 个浓度 (按 1:4 比例稀释), 加入捕获抗体的微球: 反应缓冲液: 稀释标准品 (25 μL :25 μL :25 μL), 用于描绘标准曲线; 构建 75 μL 的反应体系: 加入捕获抗体的微球: 反应缓冲液: 样品 (25 μL :25 μL :25 μL), 室温避光震荡孵育 2 h, 清洗 (Assay Buffer) 重悬。加入检测抗体, 室温

避光震荡孵育 1 h, 加入 PE 染料室温避光震荡孵育 30 min, 清洗重悬后采用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学分析

各样本数据均以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, 用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析及 LSD 组间比较。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 H1N1/PR8 流感病毒感染滴度的筛选

正常组和 0.125 TCID₅₀ 组小鼠体重稳定上升; 其余组小鼠体重下降, 蜷卧懒动、毛色黯淡, 其中 0.25 TCID₅₀ 组体重下降趋势相对平缓, 无死亡现象 (图 1), 选择其为后续实验流感病毒感染滴度。

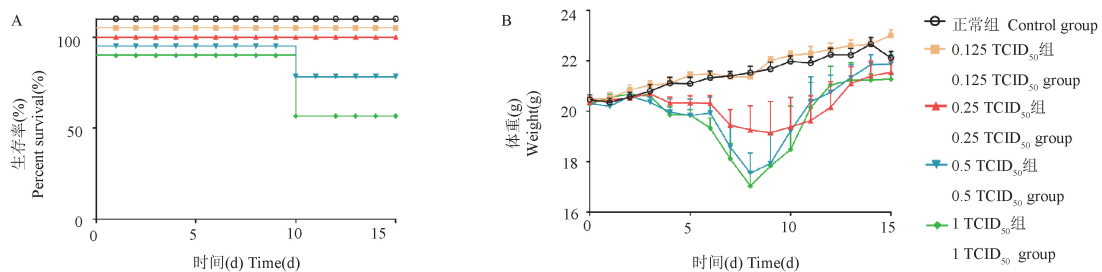


图 1 各组小鼠的生存率和体重变化

Figure 1 Changes in survival rate and body mass of mice in each group

2.2 共感染小鼠模型中金黄色葡萄球菌浓度的筛选

除正常组外其余组小鼠体重下降趋势明显, 其

中 0.25 TCID₅₀ + 2.5×10^7 CFU 组内小鼠体重下降相对平缓, 死亡率为 50% (见图 2), 选择其做为后续共感染模型病毒和细菌条件。

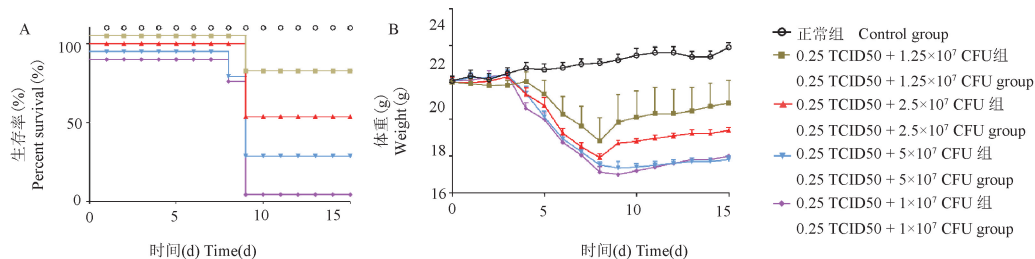


图 2 各组小鼠的生存率和体重变化

Figure 2 Changes in survival rate and body mass of mice in each group

2.3 达菲对 H1N1/PR8-金黄色葡萄球菌共感染小鼠干预作用

2.3.1 各组小鼠体重和存活率比较

在实验过程中, 正常组和金葡组小鼠反应灵敏, 毛发光滑有光泽, 饮食、饮水、排便正常, 粪便呈麦粒状, 体重呈持续上升; 共感染组和流感组分别在染毒第 4 天和第 6 天平均体重开始下降; 共感染组小鼠体重下降趋势更明显, 第 8 天体重仅为第 0

天的 87.26%, 死亡率为 83.33%; 流感组小鼠体重、竖毛现象、饮食饮水量明显好于共感染组, 第 8 天体重均值为第 0 天的 96.57% (见图 3)。

2.3.2 各组小鼠脏器指数比较

于感染第 8 天处死解剖小鼠, 称肺、脾、胸腺质量, 计算脏器指数, 具体结果见图 4。与正常组比较, 共感染组小鼠胸腺指数显著下降 ($P < 0.05$), 流感组和金葡组轻微升高, 差异无显著性; 共感染组

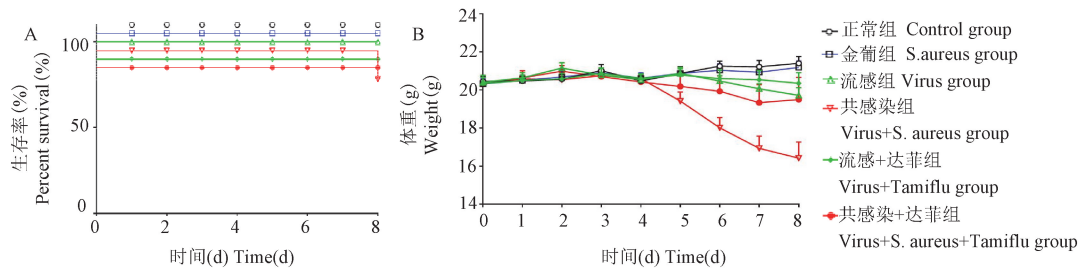
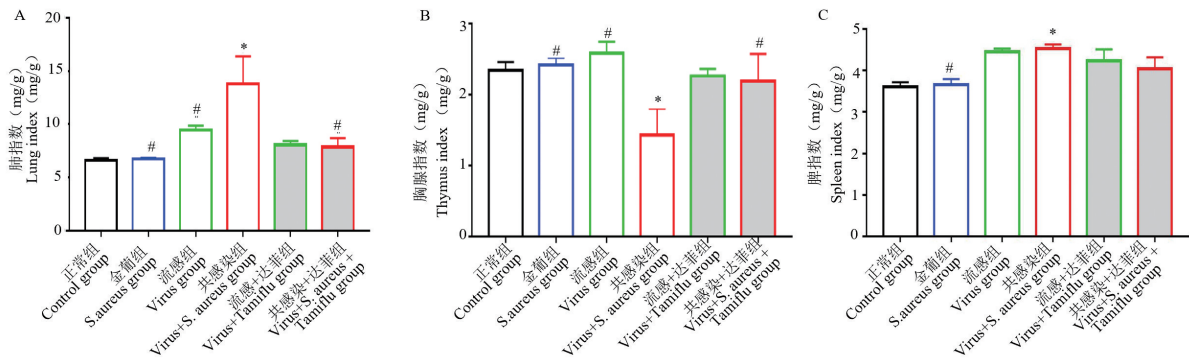


图3 各组小鼠的生存率和体重变化

Figure 3 Changes in survival rate and body mass of mice in each group



注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与共感染组相比, # $P < 0.05$ 。(下同)

图4 各组小鼠的脏器指数变化

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the Virus + S. aureus group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Changes of organ index of mice in each group

小鼠胸腺指数显著低于流感组和金葡组 ($P < 0.05$),共感染+达菲组与共感染组相比显著升高 ($P < 0.05$);不同组间肺指数变化与胸腺指数趋势相反,共感染组显著高于正常组 ($P < 0.05$),且显著高于流感组和金葡组,达菲干预共感染后肺指数显著降低 ($P < 0.01$);共感染后脾指数上升,显著高于正常组和金葡组 ($P < 0.05$) (见图4)。

2.3.3 各组小鼠肺组织流感病毒 M 基因的相对表达量和细菌载量比较

M 基因的相对表达量结果显示,共感染组显著高于流感组 ($P < 0.05$),达菲干预共感染后,显著降低了 M 基因的表达 ($P < 0.05$)。细菌载量变化与 M 基因的相对表达量类似,与金葡组相比,共感染组细菌载量显著升高 ($P < 0.05$),达菲干预共感染后细菌载量显著降低 ($P < 0.05$),提示与感染单一病原体相比,共感染上述滴度病毒和金黄色葡萄球菌后,小鼠抗病毒和抗菌能力下降, M 基因的相对表达量和细菌载量均显著升高,及时的达菲干预可以显著抑制上述趋势 (见图5)。

2.3.4 各组小鼠淋巴细胞含量比较

为了探究达菲干预流感感染和流感+金黄色葡

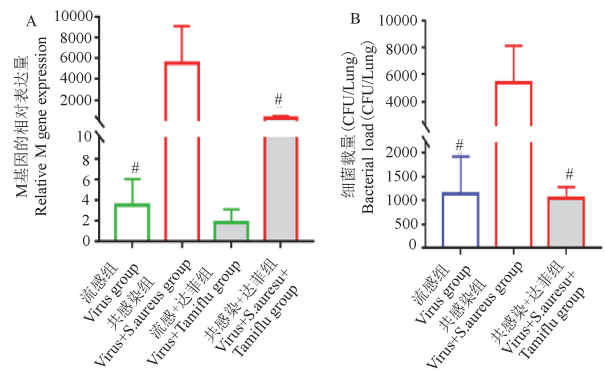


图5 各组小鼠的 M 基因的相对表达量和细菌载量变化

Figure 5 Change of relative expression and bacterial load of M gene in mice of each group

萄球菌共感染小鼠免疫应答水平,对淋巴细胞亚群的绝对含量进行检测。结果显示,感染流感病毒后, $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 绝对含量轻微升高,提示较小滴度流感感染后淋巴细胞升高,免疫应答增强;共感染后,小鼠全血 T 淋巴细胞 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 绝对含量显著降低 ($P < 0.05$),可推测流感+金黄色葡萄球菌共感染后毒力强,杀伤免疫细胞,特异性免疫应答减弱;达菲干预共感染后 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、

CD8⁺绝对含量显著回升($P < 0.05$),提示达菲干预后,缓解了病毒对机体的损伤,从而缓解了免疫细胞的含量的降低,特异性免疫应答升高,机体的恢复能力增强(见图6)。

2.3.5 各组小鼠炎症因子表达比较

实验结果显示,共感染组小鼠炎症因子(白介素类(见图7)、干扰素、趋化因子和集落刺激因子(见图8)含量明显增加,与正常组小鼠相比差异具有显著性($P < 0.05$),流感组和金葡组炎症因子含量同样呈增加趋势,但明显低于共感染组($P < 0.01$);与共感染组相比,共感染+达菲组血浆中炎症因子含量差异具有显著性($P < 0.05$)。

共感染后小鼠体内存在较强的免疫抵抗作用,

机体的炎症损伤明显;单一感染流感和金黄色葡萄球菌小鼠机体炎症反应强度低,对机体炎症损伤较小,达菲干预共感染后降低了病毒对机体的损伤,使机体炎症因子分泌水平显著降低,降低了机体的炎症损伤,从而延缓了体重的下降,提高存活率。

对每组 10 个炎症细胞因子(除 IL-10、IL-27、GM-CSF 之外)进行几何平均值计算,得到每组促炎细胞因子平均值(Y轴),X轴是促炎细胞因子之和。气泡图结果显示,共感染组小鼠体内促炎因子的平均值以及促炎和都远远高于其他各组,表明宿主存在较严重的炎症反应,达菲及时干预后可以有较好的回调;流感组和金葡组小鼠染毒后机体炎症反应强度很低(见图9)。

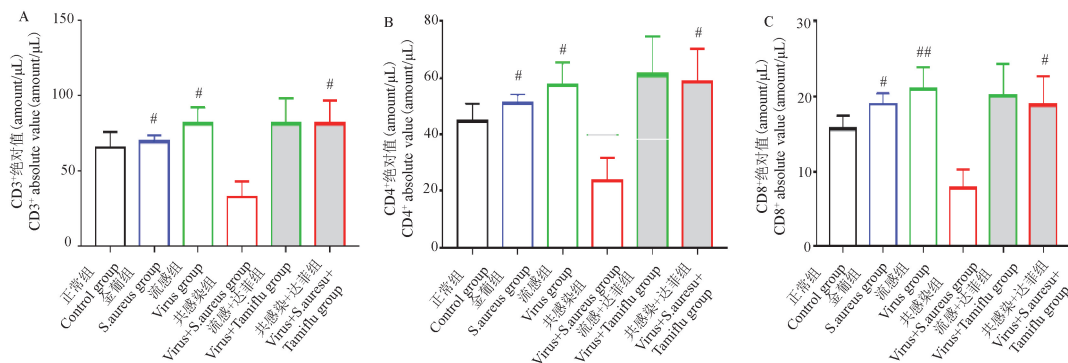


图6 各组小鼠的淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 含量比较

Figure 6 Comparison of lymphocyte CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ contents of mice in each group

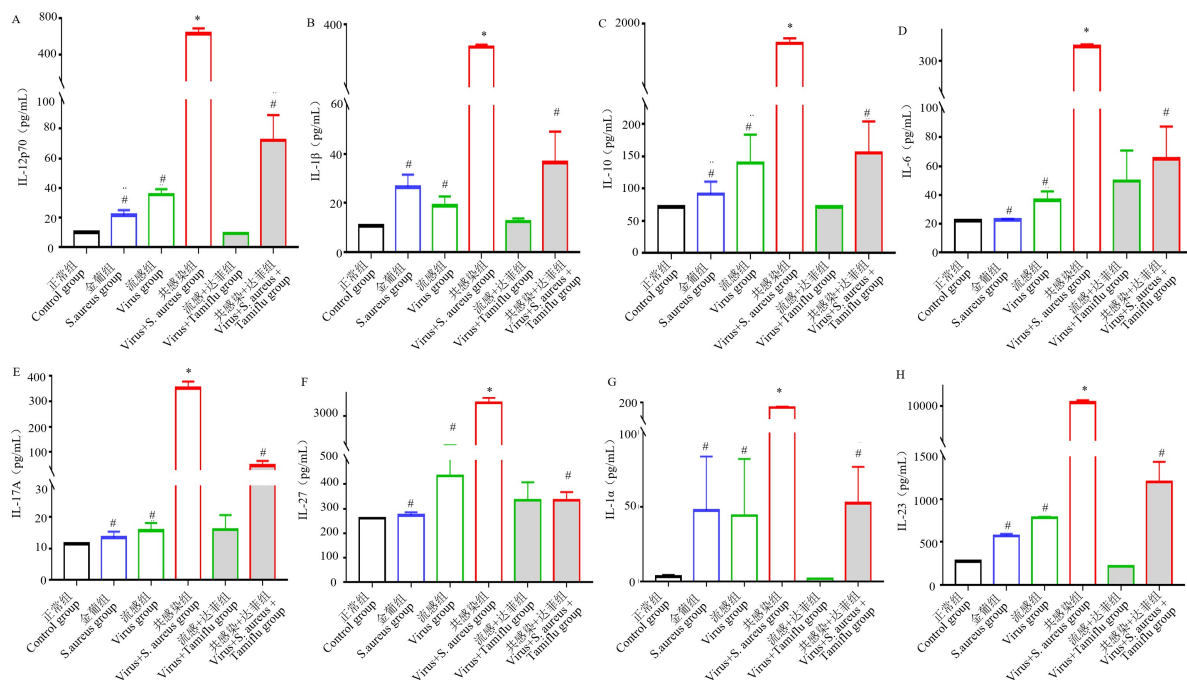


图7 各组小鼠白介素类细胞因子比较

Figure 7 Comparison of interleukin cytokines in mice of each group

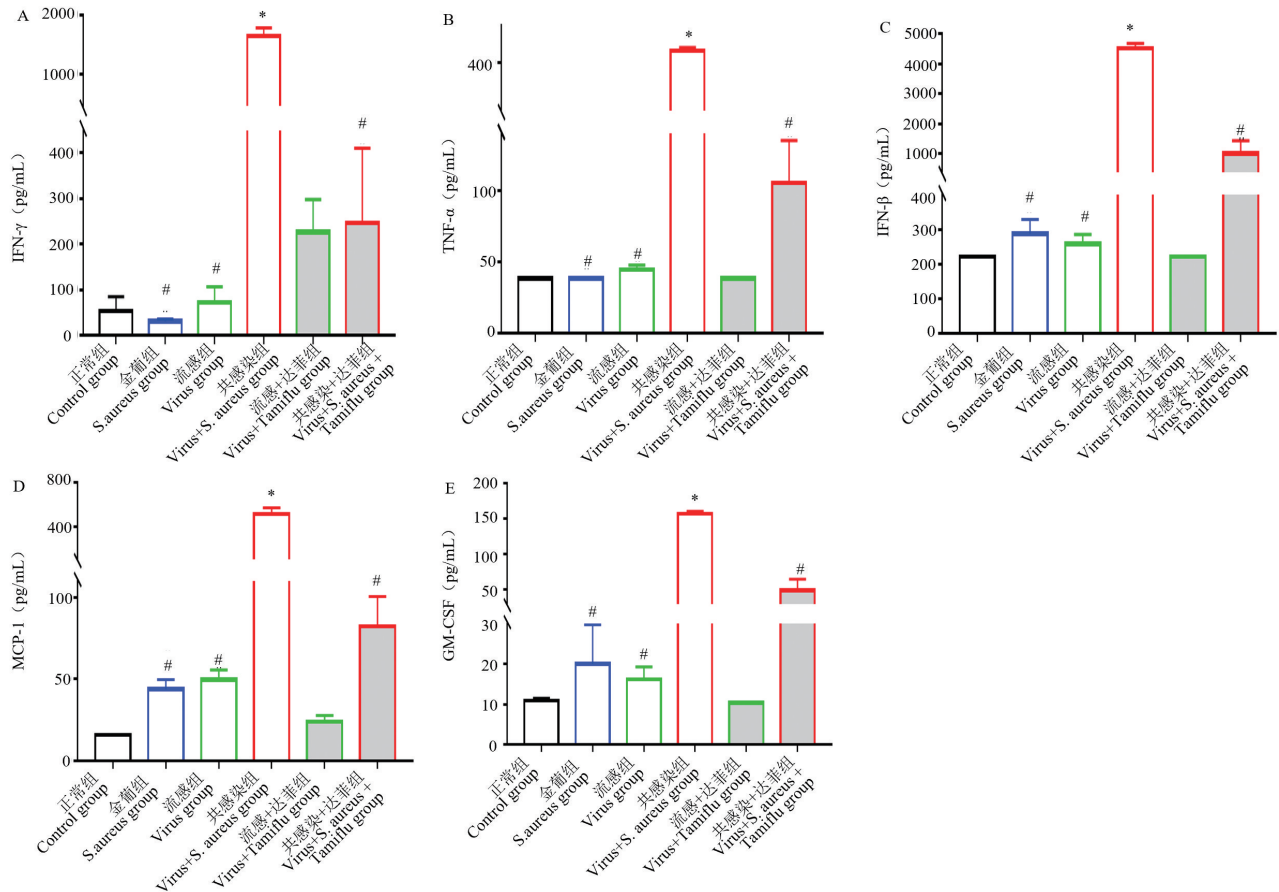


图 8 各组小鼠干扰素、趋化因子及集落刺激因子比较

Figure 8 Comparison of interferon cytokines, MCP-1 and GM-CSF in mice of each group

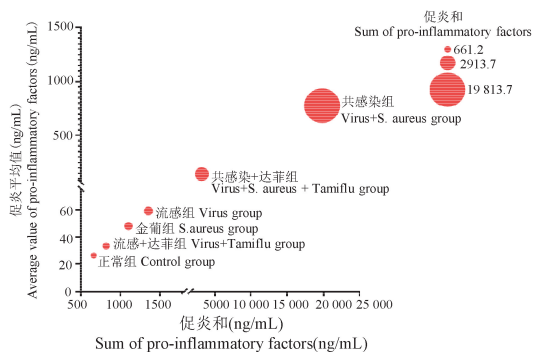


图 9 各组小鼠促炎因子综合比较

Figure 9 Comprehensive comparison of proinflammatory factors of mice in each group

3 讨论

每年约有 25 万 ~ 50 万人死于流感病毒感染^[10], 研究表明, 继发性感染被认为是重症和死亡的主要因素。目前针对流感-金葡共感染模型研究较少, 文献报道的共感染研究采用的流感滴度多为重症和死亡滴度^[8-9], 与临床常见的共感染状况存在差异。本研究在小鼠感染较小滴度流感病毒后

第 3 天又感染金黄色葡萄球菌, 建立流感-金葡共感染模型。结果表明, 单一小滴度流感、金葡感染损伤均较轻, 符合临床上多发的普通、轻症流感。与单一流感或金葡模型相比, 共感染组胸腺指数明显降低, 肺指数、病毒载量、细菌载量明显升高, 机体炎症损伤情况更为严重, 符合临床上感染轻症流感后又感染低毒的金葡症状迅速恶化出现危重症的共感染状况。

共感染后的炎症因子大量分泌是引起机体病理损伤的主要因素之一。小鼠的巨噬细胞被感染后, 分泌 $\text{TNF-}\alpha$, 从而引起血管壁损伤^[11]。同时 $\text{TNF-}\alpha$ 可诱导巨噬细胞产生 $\text{IL-1}\beta$, 并诱导 IL-6 的生成^[12]。过量的 IL-6 可激活机体的单核/吞噬细胞系统, 进一步导致 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 等释放增多, 加重血管内皮细胞变性坏死^[13]。通过 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 等级联反应, 使各种炎症因子的分泌大量增加, 维持并进一步加重共感染引起的机体炎症损伤, 甚至产生细胞因子风暴, 危及生命^[14]。本研究发现, 共感染组小鼠肺组织内流感病毒 M 基因相对表达量

较高,全血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺ 的绝对值较低,免疫系统对病毒的清除作用更弱,IL-6、IFN- γ 、IFN- β 等促炎性细胞因子水平急剧升高,推测其体内可能出现细胞因子风暴现象。肺、胸腺、脾组织损伤明显,体重下降趋势明显,死亡率较高,推测是由于免疫系统的失衡导致过度炎症反应,从而造成了对组织器官的损伤,导致较高的死亡率。

达非是一种神经氨酸酶抑制剂,能阻断病毒间的聚集,并有效抑制病毒脱离被感染细胞,从而阻止病毒增殖^[15]。临床上达非常用于治疗流行性感冒,但对于混合感染模型的研究较少。本研究对共感染小鼠模型在滴鼻感染流感病毒 24 h 后及时灌胃达非干预,结果发现,在病毒感染的早期就应用达非,可以及时减少病毒的增殖及后续继发的金黄色葡萄球菌感染,降低机体的整体损伤,提高全血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 绝对含量,减轻促炎细胞因子的过度诱导,从而减轻对组织器官的损伤,提高小鼠的存活率。本研究提示,在流感爆发季节及早地采用达非干预治疗,可以减轻后续继发病毒-细菌混合感染对机体的损伤。

综上所述,本研究使用较小滴度的 A 型 H1N1/PR8 毒株和金黄色葡萄球菌感染 BALB/c 小鼠,成功建立符合临床多发的流感-金黄色葡萄球菌共感染模型,并证明及早地采用达非干预对共感染模型有较好的干预作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Brody H. Influenza [J]. Nature, 2019, 573(7774): S49.
- [2] Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness [J]. J Infect Dis, 2008, 198(7): 962-970.
- [3] Takahashi S, Nakamura M. Necrotizing tracheobronchitis caused by influenza and *Staphylococcus aureus* co-infection [J]. Infection, 2018, 46(5): 737-739.
- [4] Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2 [J]. IUBMB Life, 2020, 72(10): 2097-2111.
- [5] 刘通,徐红日,王成祥,等.白头翁抗流感病毒 FM₁ 所致肺炎炎症损伤的网络药理学分析及实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5867-5876.
- Liu T, Xu HR, Wang CX, et al. Network pharmacological analysis and experimental study of *Pulsatilla chinensis* against inflammatory injury caused by pneumonia in mice infected with influenza virus FM₁ [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(22): 5867-5876.
- [6] 魏文扬,万海同,虞立,等.麻黄汤体外抗甲型 H1N1 流感病毒作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 563-570.
- Wei WY, Wan HT, Yu L, et al. Effect and mechanism of Mahuang Tang against influenza A/H1N1 virus *in vitro* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(3): 563-570.
- [7] 王德成,王星,周文江,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠菌血症感染模型的建立与评估 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(7): 603-607.
- Wang DC, Wang X, Zhou WJ, et al. Establishment and evaluation of a bacteremia model in mice after infection with an isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2010, 30(7): 603-607.
- [8] Zhao J, Wang Y, Huang X, et al. Liu Shen Wan inhibits influenza virus-induced secondary *Staphylococcus aureus* infection *in vivo* and *in vitro* [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 277: 114066.
- [9] 梁媛.补体在流感病毒/金黄色葡萄球菌共感染致小鼠严重肺炎中的致病机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学; 2017.
- Liang Y. Research on the action mechanism of complement in severe pneumonic flu-S. aureus coinfection [D]. Nanning: Guangxi Medical University; 2017.
- [10] 孙惠惠,邓巍,占玲俊,等.板蓝根颗粒对甲型流感病毒小鼠的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(7): 53-56, 96.
- Sun HH, Deng W, Zhan LJ, et al. Effect of Banlangen Granule on mice challenged with A/California/7/2009 [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(7): 53-56, 96.
- [11] Tsay TB, Chang WH, Hsu CM, et al. Mechanical ventilation enhances *Acinetobacter baumannii*-induced lung injury through JNK pathways [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 159.
- [12] Monteerarat Y, Sakabe S, Ngamururt S, et al. Induction of TNF-alpha in human macrophages by avian and human influenza viruses [J]. Arch Virol, 2010, 155(8): 1273-1279.
- [13] Wan ZY, Sun Z, Song F, et al. Downregulated interleukin 37 expression associated with aggravation of intervertebral disc degeneration [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(2): 656-662.
- [14] 欧利,秦克,杨子宵,等.双氢青蒿素对甲型流感病毒 H1N1 诱导人支气管上皮细胞 TNF- α 和 IL-6 表达的影响及机制研究 [J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(2): 171-177.
- Ou L, Qin K, Yang ZX, et al. The effects and mechanisms of dihydroartemisinin on influenza A virus H1N1 induces TNF- α and IL-6 expression in bronchial epithelial cells [J]. J Sichuan Univ (Med Edit), 2020, 51(2): 171-177.
- [15] 蒋虹,金光,丛喆,等.奥司他韦、利巴韦林和盐酸金刚乙胺对甲型 H1N1 流感病毒的抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(2): 23-25.
- Jiang H, Jin G, Cong Z, et al. Antiviral activity of oseltamivir phosphate, ribavirin and rimantadine hydrochloride on influenza A/H1N1 virus *in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(2): 23-25.