

禽流感 H9N2 型病毒致 BALB/c 小鼠感染模型的建立与研究

李梨平¹, 邱美珍², 祝兴元¹, 覃亚斌¹, 黎 赛¹, 范丽明¹, 朱纯华¹

(1 湖南省儿童医院儿科医学研究所, 湖南 长沙 410007; 2 湖南省畜牧兽医研究所, 湖南 长沙 410131)

[摘 要] **目的** 建立 H9N2 型禽流感病毒 BALB/c 小鼠模型。**方法** 从江苏某农场新分离得到禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/07/2002(H9N2), 以逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法对该病毒的 HA、NA 基因进行鉴定和测序以确证。病毒经狗肾传代细胞(MDCK)3 次单克隆纯化, 之后肺对肺传代感染 BALB/c 小鼠, 通过体重丢失、死亡率、半数致死量(LD₅₀)评价病毒的感染性和模型的建立。**结果** A/Chicken/Jiangsu/07/2002(H9N2)型禽流感病毒通过肺对肺传代能感染小鼠, 并且毒性逐渐增强, 4 次传代后能使小鼠致死, 10 次传代后病毒的 LD₅₀ 为 10^{-2.17}。**结论** H9N2 型禽流感病毒能在实验条件下感染哺乳类, 并建立了研究禽流感病毒的 BALB/c 小鼠模型。

[关 键 词] 禽流感病毒; H9N2; BALB/c 小鼠; 肺对肺感染; 动物模型

[中图分类号] R511.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2008)06-0372-05

The establishment of H9N2 avian influenza virus model in BALB/c mice

LI Li-ping¹, QIU Mei-zhen², ZHU Xing-yuan¹, QIN Ya-bin¹, LI Sai¹, FAN Li-ming¹, ZHU Chun-hua¹ (1 Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China; 2 Hunan Institute of Animal and Veterinary Science, Changsha 410131, China)

[Abstract] **Objective** To establish H9N2 avian influenza virus model in BALB/c mice. **Methods** An H9N2 avian influenza virus strain (A/Chicken/Jiangsu/07/2002) was isolated from a farm in Jiangsu Province of China. The HA and NA gene of H9N2 were identified and sequenced by RT-PCR. H9N2 was subjected to three cycles of monoclonal purification. Each cycle consisted of infecting the Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) monolayer. BALB/c mice were infected the purified virus by lung-to-lung passages. The confirmation of model in mice was evaluated by lethal rate, the loss of weight and the median lethal dose (LD₅₀). **Results** H9N2 avian influenza virus can adapt to BALB/c mice by lung-to-lung passages, the toxicity of virus in mice was higher as passages, after four passages, it caused the deaths of mice, after ten passages, the LD₅₀ of viruses were 10^{-2.17}. **Conclusion** H9N2 avian influenza virus can infect mammals by experiment. It can be established a model of studying the avian influenza virus in BALB/c mice.

[Key words] avian influenza virus; H9N2; BALB/c mouse; lung-to-lung passages; animal model

[Chin Infect Control, 2008, 7(6): 372-376]

禽流感是人兽共患的呼吸道传染病^[1-2]。禽流感 H9N2 型病毒已造成了禽类、哺乳类甚至人类感染, 表明该病毒有广泛的宿主范围^[3-5]。目前, 从多种宿主(包括人类)分离到 H9N2 型病毒, 提示禽流感病毒在种属之间传播可能会引起基因的突变, 或者人类流感病毒和禽类流感病毒的重组将引起 H9N2 病毒在人与人之间传播, H9N2 禽流感病毒被认为是下一次人类流感暴发最有可能的病毒

株^[1-2]。另外, 有研究表明^[6-7], 禽流感 A/HK/156/97(H5N1)、A/Quail/Hong Kong/G1/97(H9N2)和 A/Chicken/Hong Kong/G9/97(H9N2)未经传代适应能感染 BALB/c 小鼠, 可以小鼠为动物模型来研究禽流感病毒。一般而言, 病毒都不能跨种属感染, 如人流感病毒 H1N1(A/PR/8/34)不能感染小鼠, 但是通过肺对肺传代试验, 该病毒能感染小鼠并且使小鼠致死, 这就是病毒的适应过程, 本实验设

计也是基于该思路。

本实验新分离 A/Chicken/Jiangsu/07/2002 (H9N2) 禽流感病毒, 经狗肾传代细胞 (MDCK) 3 次单克隆纯化。纯化病毒能感染小鼠, 传代后能引起小鼠死亡。这也再次证明 H9N2 型病毒对小鼠的适应性和感染哺乳动物的能力。同时也说明 BALB/c 小鼠可作为研究人—禽流感病毒的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物、病毒和细胞 实验动物: 4~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠 [SPF 级, 购自湖北省预防医学科学院动物中心, 合格证号: SCXK(鄂)2003-0005], 在本研究室 SPF 级动物房进行动物学实验。病毒为 A/Chicken/Jiangsu/07/2002 (H9N2), 经 MDCK 3 次单克隆纯化, 每次纯化都以病毒感染单层 MDCK。纯化后病毒在 BALB/c 雌性小鼠肺部传代大量扩增, 建立小鼠肺适应株。细胞: MDCK, 购自湖北省预防医学科学院。

1.1.2 主要试剂 Trizol, Molecular Research center 生产; RNA PCR kit 试剂盒, TakaRa 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 H9N2 型禽流感病毒的分离与确定 从江苏某农场分离得到禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/07/2002 (H9N2), 病毒 RNA 经逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法构建成 cDNA 文库。以 cDNA 为模板, 用特异性引物 [H9N2 (HA) 引物: 5' - GCTCGAGATGGAACAATATCACTAA - 3', 5' - TCCCGGGTTATATACAAATGTTGCAT - 3'; H9N2 (NA) 引物: 5' - CTCGAGTGAAAATGAATCCAAAT - 3', 5' - TCCCGGGTTTTCTAAAATTGCGAGAGCTT - 3'; 引物均由北京鼎国生物有限公司合成] 扩增 H9N2 型病毒的 HA 和 NA 基因, 并插入表达载体 pCAGGSP7, 得到质粒 pCAGGSP7/HA、pCAGGSP7/NA, 经 ABI 公司 377DNA 测序仪测序证实。

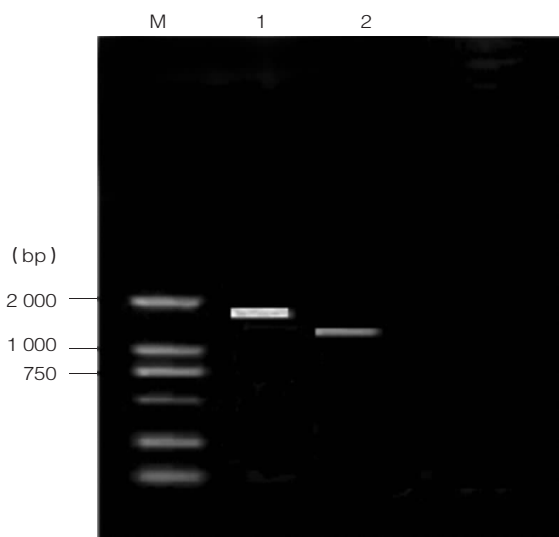
1.2.2 H9N2 型禽流感病毒适应 BALB/c 小鼠 纯化后病毒经滴鼻感染小鼠, 病毒攻击后第 3 天, 将每组 15 只实验小鼠又分为两部分, 其中 3 只处死采血, 取肺洗液攻击另一批小鼠。如此肺对肺感染 10 代。每代攻毒后留 12 只观测 21 d, 测定小

鼠第 7 天的体重变化和第 21 天死亡率。测定第 10 代病毒的小鼠半数致死量 (LD₅₀)。

1.2.3 H9N2 型禽流感病毒对 BALB/c 小鼠的 LD₅₀ 测定 用无菌 PBS 将 A/Chicken/Jiangsu/07/2002 (H9N2) 病毒液从 10⁻¹ 稀释至 10⁻⁵, 冰浴。选取 6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 5 只为一组, 每组小鼠对应一个病毒稀释度。实施麻醉后, 每只小鼠以 17 μL 病毒稀释液滴鼻。攻毒后观察 21 d 并记录小鼠死亡情况。按照 Reed 和 Muench 的方法计算 LD₅₀ [5]。

2 结果

2.1 H9N2 型禽流感病毒 HA、NA 基因的 RT-PCR 鉴定 病毒 RNA 经 RT-PCR 方法构建成 cDNA 文库。以 cDNA 为模板, 用特异性引物扩增 H9N2 型病毒的 HA 和 NA 基因, 分别扩增出一条 1 680 bp 和 1 430 bp 大小的 DNA 片段, 与预期设计相符, 见图 1。



M: DL2000 DNA Marker; 1, 2 分别为 HA、NA 基因扩增结果
图 1 H9N2 型禽流感病毒 HA、NA 基因的 RT-PCR 扩增
Figure 1 RT-PCR of HA and NA genes of H9N2 avian influenza virus

2.2 HA、NA 基因测序鉴定

2.2.1 HA 基因序列 用特异性引物扩增 H9N2 型病毒的 HA 基因, 并插入表达载体 pCAGGSP7, 得到质粒 pCAGGSP7/HA, 经 ABI 公司 377DNA 测序仪测序见图 2。与网上公布的 H9N2 型禽流感病毒的 HA 基因序列进行比较, 与 A/HK/1073/

99、A/HK/1074/99、A/Qa/HK/G1/97、A/SW/ 90.52%、90.34%、87.48%、94.10%、98.39%。
HK/9/98、A/CK/JS/JS-1/2002 的同源性分别为

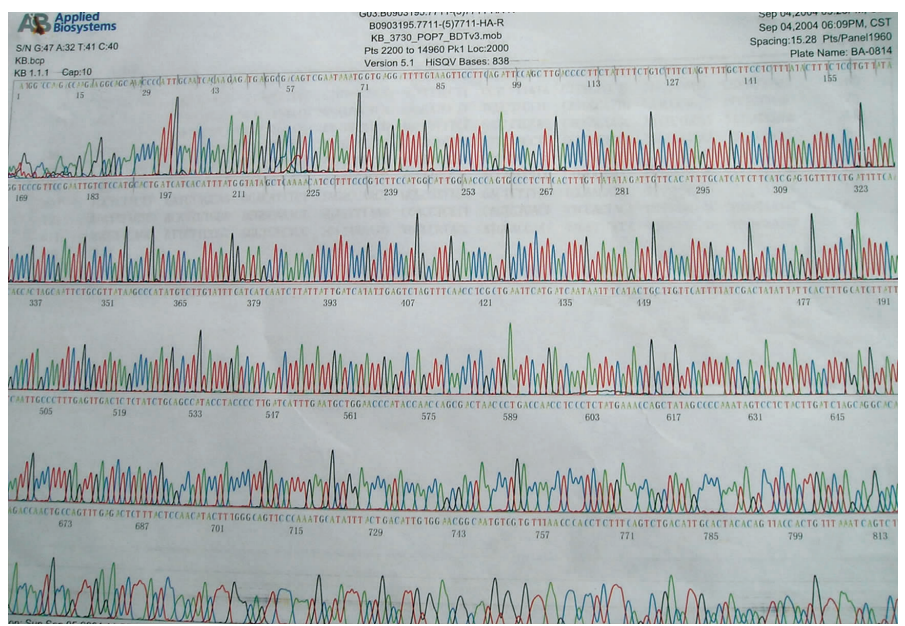


图 2 HA 基因测序
Figure 2 Sequencing result of HA gene

2.2.2 NA 基因序列 用特异性引物扩增 H9N2 型病毒的 NA 基因,并插入表达载体 pCAGGSP7,得到质粒 pCAGGSP7/NA,经 ABI 公司 377DNA 测序仪测序见图 3。与网上公布的 H9N2 型禽流感病毒

的 NA 基因序列进行比较,发现与 A/HK/1073/99、A/HK/1074/99、A/Qa/HK/G1/97、A/SW/HK/9/98 和 A//CK/HK/G9/97 的同源性分别为 90.72%、90.51%、88.76%、92.20%和 91.28%。



图 3 NA 基因测序
Figure 3 Sequencing result of NA gene

2.3 A/Chicken/Jiangsu/07/2002(H9N2)型禽流感病毒能适应 BALB/c 小鼠 从江苏分离到的禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/07/2002(H9N2)经再次鉴定后,观察纯化后病毒感染的 BALB/c 雌性小鼠 21 d,初始病毒感染小鼠虽有体重丢失但不致死;病毒经肺对肺传代后,对小鼠的毒性越来越强,第 4 代病毒能使小鼠 100%死亡,体重丢失也由第 1 代的 2.42%到 17.85%;再经肺对肺传 6 代后,病毒也能使小鼠 100%死亡,且体重的丢失均>20%。见表 1。结果表明,H9N2 型禽流感病毒在小鼠肺部稳定增殖,能适应 BALB/c 小鼠,传 4 代后能使小鼠 100%致死。

表 1 H9N2 病毒第 3 次单克隆纯化攻击小鼠,传代后体重变化及死亡率(%)

Table 1 The rate of weight loss and lethality in mice challenged by virus with three cycles of monoclonal purification(%)

所传代数	体重丢失	死亡率
第 1 代	2.42	0.00
第 2 代	16.44	0.00
第 3 代	14.57	20.00
第 4 代	17.85	100.00
第 5 代	22.56	100.00
第 6 代	24.55	100.00
第 7 代	23.86	100.00
第 8 代	27.22	100.00
第 9 代	25.36	100.00
第 10 代	24.92	100.00

2.4 H9N2 型禽流感病毒适应 BALB/c 小鼠后第 10 代病毒的 LD₅₀ 见表 2。H9N2 型禽流感病毒经传代后能适应 BALB/c 小鼠,并且第 4 代病毒使小鼠 100%致死。再传 6 代后,至第 10 代病毒也能使小鼠致死,测定其 LD₅₀,结果为 10^{-2.17}。

表 2 小鼠经病毒攻击后死亡情况(只)

Table 2 The lethality in mice challenged by virus (case)

病毒稀释度	接种鼠数	活鼠	死鼠	累计总数		死亡率 (%)
				活鼠	死鼠	
10 ⁻¹	5	0	5	0	5	100.00
10 ⁻²	5	2	3	2	3	60.00
10 ⁻³	5	5	0	7	0	0.00
10 ⁻⁴	5	5	0	12	0	0.00
10 ⁻⁵	5	5	0	17	0	0.00

计算 LD₅₀,先按下列公式计算出距离比例:

距离比例=
$$\frac{>50\% \text{的百分数}-50}{>50\% \text{的百分数}-<50\% \text{的百分数}}$$

可见病毒的 LD₅₀ 在 10⁻² (60.00%) 和 10⁻³ (0.00%) 之间,将>50%死亡率稀释度的对数(lg)与距离比例相加,即得具体稀释倍数的对数值。

将表中结果代入公式得稀释倍数的对数值:

$$-(2+\frac{60-50}{60-0})=-(2+0.17)=-2.17$$

因此,该病毒的 LD₅₀ 为 10^{-2.17}。

3 讨论

本实验目的是建立禽流感 BALB/c 小鼠模型,探讨 H9N2 型禽流感病毒对 BALB/c 小鼠的适应性。结果表明,从江苏分离的 H9N2 型禽流感病毒(A/Chicken/Jiangsu/07/2002)经 BALB/c 小鼠肺对肺传代感染,病毒能在小鼠肺部大量扩增并使小鼠致死,适应株病毒 LD₅₀ 为 10^{-2.17}。每一代病毒感染只采用 15 只小鼠样本,大样本实验还有待进一步研究,但经过多次传代,病毒从第 4~10 代都能使小鼠 100%致死。这预示禽流感能在实验条件下增强对哺乳类的感染性,为研究禽流感病毒感染机制和跨种属传播提供实验模型打下了基础。

有报道表明^[3,7],在 1997 年屠宰禽类预防 H5N1 型病毒期间,表现健康的鸡、鹌鹑、鸭、鹅、鸽子体内都能分离到 H9N2 型病毒;1998 年,在猪中也分离得到 H9N2 型禽流感病毒^[4,8];1999 年,在人体内分离到 H9N2 型禽流感病毒^[8-10,11],再一次证实了禽流感病毒有跨种属感染人类的潜能,且 H9N2 型禽流感病毒有着广泛的宿主范围。另有研究报道^[5-6,11],在 150 份人血清样本中有 2%检测到针对 H9N2 的中和抗体,表明禽流感病毒将有可能引起人类流感暴发。同时,人类感染禽流感病毒也可能引起人类流感病毒和禽流感病毒重组产生新的流行病毒株。H9N2 病毒和其他禽流感病毒共同广泛地在家禽传播,还会不断产生变异,感染人的机会增加^[12-14]。甚至有研究表明^[1-2],病毒多次反复入侵人类的免疫系统会增强病毒毒力和致病性;本实验禽流感病毒能经过传代适应小鼠的数据也表明了 H9N2 型禽流感病毒有毒力增强的可能,而且每次传代致死率也会升高,这警示该病毒可能会在人与人之间传播而且毒力增强,将有可能引起全球流感暴发。

[参 考 文 献]

- [1] Wanyne D E, Garcia M, Beck J R. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with are combinant fowlpox vaccine [J]. Vaccine, 2000, 18(11-12):1088-1095.
- [2] Hatta M., Gao P, Halfmann P, *et al.* Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses [J]. Science, 2001, 293:1840-1842.
- [3] Li K S, Xu K M, Peiris J S, *et al.* Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China; a candidate for the next influenza pandemic in humans [J]. J Virol, 2003, 77(12):6988-6994.
- [4] Guo Y J, Li X, Cheng M, *et al.* Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus [J]. Chin J Exp Clin Virol, 1999, 13:105-108.
- [5] Saito T, Lim W, Suzuki T. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong [J]. Vaccine, 2001, 20(1-2):125-133.
- [6] Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses; Were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong [J]. Microbiology, 1999, 96(16): 9363-9367.
- [7] Lu X, Renshaw M, Tumpey T M. Immunity to influenza H9N2 viruses induced by infection and vaccination [J]. J Virol, 2001, 75(10):4896-4901.
- [8] Kaverin N V, Rudneva I A, Ilyushina N A, *et al.* Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants [J]. J Virol, 2004, 78(1):240-249.
- [9] Li K S, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia [J]. Nature, 2004, 430(6996):209-213.
- [10] Campitelli L, Mogavero E, De Marco M A, *et al.* Interspecies transmission of an H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy [J]. Virology, 2004, 323(1):24-36.
- [11] Saito T, Lim W, Tashiro M. Attenuation of a human H9N2 influenza virus in mammalian host by reassortment with an avian influenza virus [J]. Arch Virol, 2004, 149(7):1397-1407.
- [12] Fedson D S. Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development [J]. J Public Health Policy, 2005, 26(1):4-29.
- [13] Katz J M. The impact of avian influenza viruses on public health [J]. Avian Dis, 2003, 47(3 Suppl):914-920.
- [14] Chen H, Subbarao K, Swayne D, *et al.* Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate [J]. Vaccine, 2003, 21(17-18):1974-1979.

欢迎订阅 2009 年《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊,是《中国医学文摘·儿科学》引用的核心期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》和《万方数据—数字化网络期刊》全文收录。已被复旦大学、浙江大学、中南大学和中国医科大学等国内著名大学认定为儿科核心期刊。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、社区医师园地、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊 2009 年起改为月刊,大 16 开本,80 页,亚光铜版纸印刷,每月 15 日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 12 元,全年 144 元。邮发代号:42-188。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免审稿费,审稿周期短(4~8 周)。投稿网址: [http:// www. cjcp. org](http://www.cjcp.org)

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-4327402 传真:0731-4327922 Email: ddek@vip.163.com