论著

文章编号:1000-5404(2014)05-0446-04

从乙型流感病毒流行株中筛选获得鼠肺适应株的研究

杨子峰,杨春光,王玉涛,潘思华,江海明,李润峰,关文达 (510120 广州,广州医科大学第一附属医院呼吸疾病国家重点实验室,广州呼吸疾病研究所临床病毒室)

[摘要] **目的** 从乙型流感流行株中筛选获得可在鼠肺中稳定复制的毒株。**方法** 利用免疫抑制剂甘露聚糖分别联合5株乙型流感临床分离株和1株标准株感染BALB/c小鼠,筛选出可稳定在鼠肺中连续感染传代的毒株,并纯化后感染小鼠,检测其致病力与致死率,最后对病毒核酸进行测序,分析分子特征。**结果** 从5株临床分离株中筛选到1株乙型流感病毒,可在小鼠中稳定感染并致死,经测序比对发现适应过程中该株病毒血凝素(HA)发生2个突变:N212Y和E361K,神经氨酸酶(NA)发生1个位点突变S339F,其中HA E361K是裂解位点。**结论** 成功从临床乙型流感分离株筛选适应获得一株鼠肺适应株,为进一步开展药物和发病机制研究提供了可能。

[关键词] 乙型流感病毒;小鼠模型;鼠肺适应

[中图法分类号] R372; R373.13 [文献标志码] A

Screening of mouse-lung adapted strain from clinical influenza B viruses

Yang Zifeng, Yang Chunguang, Wang Yutao, Pan Sihua, Jiang Haiming, Li Runfeng, Guan Wenda (State Key Laboratory of Respiratory Diseases, Department of Clinical Virology, Institute of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510120, China)

[**Abstract**] Objective To screen a stable mouse-lung adapted strain of influenza B virus isolated from clinical obtained strains in recent years. Methods The influenza B viruses were isolated from clinical patients with influenza B virus only. A mouse-adapted variant of influenza B virus was obtained by 7 sequential mouse-lung passages (inoculated with mannan) and was subsequently cloned by 2 sequential plaque purifications in MDCK cells. Mouse-adapted virus was then confirmed by infection in mice and sequencing for its molecular features. Results A stain of mouse-adapted influenza B virus was isolated from 5 clinical strains, and able to infect and kill mice without mannan. Sequencing indicated that there were 2 mutations in hemagglutinin (N212Y and E361K), and 1 in neuraminidase (S339F). Hemagglutinin E361K was identified as cleavage site. Conclusion A mouse-adapted influenza B virus is obtained from adaptation of clinical viruses in mouse, and it might be as a tool for mouse infected model.

[**Key words**] influenza B virus; mouse infected model; mouse adaptation

Supported by the Project of Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical. Co., Ltd (2012), the "Twelfth Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2012BAI05B01), the Producing and Academic Cooperation Project of Science and Technology Innovation Platform of Guangdong Provincial Department of Science and Technology (2010B091000018), the Project of Guangdong Engineering and Technology Research and Development Center of Guangdong Provincial Department of Science and Technology (2010B080100027), the Major Science and Technology Special Project of "Twelfth Five-year Plan" of National Key New Drug Innovation (2013ZX09304102), and the National Natural Science Foundation of China (U1201227). Corresponding author: Yang Zifeng, Tel: 86-20-34282274, E-mail: E-mail: jeffyah@163.com

流感病毒包括甲、乙、丙3个血清型,其中甲、乙型流感病毒是造成人类流行感冒的主要病原体。与甲型流感病毒相比,乙型流感病毒季节性流行高峰期的持续时间较甲型流感病毒长,而且针对乙型流感病毒的研究特别是疫苗的研究落后于甲型流感病毒[1-2],其对人类健康的威胁也不容忽视。

动物模型是流感病毒体内研究的一个重要工具,用于乙型流感病毒研究的动物模型主要有非人灵长类、雪貂和小鼠[3-4],其中小鼠模型使用最为广泛,管理和操作方便且比其他模型廉价,适合常规感染实验室使用。由于人类和小鼠呼吸系统的流感病毒受体存在差异[5-7],人类流感病毒一般不能感染小鼠或者不能在小鼠模型中稳定复制,尤其是乙型流感病毒。因

[基金项目] 石家庄以岭药业股份有限公司资助项目(2012);"十二五"国家支撑计划(2012BAI05B01);广东省科技厅省部产学研结合科技创新平台项目(2010B091000018);广东省科技厅组建广东省工程技术研究开发中心项目(2010B080100027);"十二五"国家科技重大新药创制重大专项(2013ZX09304102);国家自然科学基金(U1201227)

[通信作者] 杨子峰,电话:(020)34282274,E-mail:jeffyah@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1114.016.html(2013-12-20)

此,建立流感病毒小鼠感染模型需要经历病毒适应小鼠的过程。人甲型流感病毒小鼠感染模型的建立是通过病毒连续多代感染小鼠,以使病毒适应新的宿主[8],也有报道其他种属的高致病性甲型流感病毒不需要适应亦可感染小鼠[9]。甲型流感病毒之所以如此容易适应新的宿主,主要是因为病毒的高突变性和高致病性。

相对而言,乙型流感病毒致病性比甲型流感病毒低,不易发生突变。有研究报道乙型流感病毒 B/Lee/40 可用于小鼠模型适应,但需要较高的病毒滴度方能使小鼠出现体质量下降的感染病症,而且不可致死,复制不稳定,难持续传代感染[10]。为了稳定乙型流感病毒在小鼠模型中稳定复制,有相关研究通过添加免疫抑制剂[11]和进行基因敲除[12]的方法降低小鼠固有免疫,提高病毒在小鼠呼吸系统中的复制能力。在免疫抑制剂辅助的报道中,已经适应的病毒株在进行实验时,不添加抑制剂则不能使小鼠致死[11]。基因敲除的小鼠模型虽然稳定,但耗时长,费用高,难以推广普及。此类建模方法只能用于抗病毒的研究,不能应用于免疫调节的研究,特别是具有免疫调节作用的中药体内研究。

为了开发抗流感病毒的药物及进行相关的研究,稳定的体内感染模型是必不可少的。目前乙型流感病毒缺乏稳定且易推广普及的体内感染模型,本研究从野生型人乙型流感病毒中筛选获得一株能在不需要任何辅助的条件下稳定感染小鼠并致死的毒株,并初步证明此毒株可用于抗病毒药物体内试验。比以往报道的以加免疫抑制剂辅助和基因敲除等建立乙型流感病毒感染模型的方法更为方便廉价,更容易推广。但针对鼠肺适应后,毒株作为研究工具的应用,以及基因上的突变产生的影响并未深入探讨,需要进一步开展应用及基因功能方面的研究。

1 材料与方法

1.1 药物

甘露聚糖(Mannan),购自 Sigma(St Louis, Miss, USA),使用前新鲜配制,用 Minimum Essential Medium(MEM)溶解为浓度 50 mg/mL,使用时与病毒液混合,终浓度为 10 mg/mL。

1.2 细胞

狗肾细胞系(madin-darby canine kidney,MDCK),购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。细胞培养使用含 10% 胎牛血清(FBS)的 MEM 培养基,37 ℃、5% CO_2 环境中培养。

1.3 病毒

乙型流感病毒标准株 B/Lee/40,购自 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va, USA)。广州地区 5 株乙型流感病毒临床分离株(编号分别为 2009-39、2012-02、2012-04、2012-05、B/Guangzhou/GIRD08/09,部分毒株未经测序上传),选自呼吸疾病国家重点实验室临床病毒库。病毒于MDCK 细胞上培养及测半数组织感染浓度(50% tissue culture infective dose, $TCID_{50}$),于条件 34℃、5% CO_2、1.5 μg/mL TPCK 胰酶(Sigma 公司)无 FBS 的 MEM 培养2 ~ 3 d。

1.4 临床标本病毒分离

收集 2009 – 2013 年广州流感样患者的鼻咽拭子,于 3 mL 运送培养基(MEM,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL)中振荡离心,上清液与病毒培养基(MEM,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL,TPCK 胰酶 3.0 μg/mL)1∶1混合,接种于 MDCK 细胞上,3 000 r/min 离心 1 h,34 ℃、5% CO_2 环境培养 2 ~ 3 d,进行荧光定量 PCR 和免疫荧光鉴定(D3 Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit, Diagnostic Hybrids, Inc.)。两鉴定方法均显阳性的标本回收保存,从毒库中选取只有乙型流感病毒的标本进行鼠肺适应实验,部分毒株未经测序上传。

1.5 动物适应实验

4 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,购自广东省医学实验动物中心[许可证号:SCXK(粤)2008-0002],购置后实验室饲养 48 h 后进行实验。病毒液与甘露聚糖溶液以 4∶1混合,100 μL/只滴鼻接种乙醚麻醉的小鼠,感染 3 d 后解剖取肺,以肺匀浆液接种下一代小鼠。每一代鼠肺匀浆液进行病毒分离培养、免疫荧光试验鉴定,并于 MDCK 细胞上测 $TCID_{50}$,确认仅为乙型流感病毒标本回收保存。

1.6 空斑纯化

用 MDCK 细胞接种 10 倍系列稀释的病毒,37 ℃吸附 1 ~ 2 h 后,更换为空斑培养基(MEM, DEAE 0.01%, TPCK 胰酶 1.25 μg/mL,琼脂糖 0.8%,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 U/mL)34 ℃、5% CO_2 环境培养 2 ~ 3 d。回收单一克隆病毒斑扩增,重复上述操作再进行一次空斑实验。对纯化后毒株进行测序和动物试验。

1.7 小鼠感染实验

一系列 10 倍稀释的乙型流感鼠肺适应病毒液滴鼻感染 4 周龄 BALB/c 小鼠(50 μL/只)测定适应毒株的半数致死率(LD_{50}),取感染后第 6 天的肺组织做病理检查,观察组织病理变化。

1.8 基因序列分析

对适应株和野生株测基因序列,用 MEGA 软件对两株病毒与 GenBank 上乙型流感病毒代表株(B/Lee/40、B/Ulaanbaatar/1128/2012)进行比对分析。

2 结果

2.1 病毒适应筛选

选取标准株 B/Lee/40 和 5 株广州乙型流感病毒临床分离株联合甘露聚糖感染小鼠,其中 2012-02、2012-04、B/Guangzhou/GIRD08/09 不能感染小鼠,B/Lee/40、2009-39、2012-05 可致小鼠体质量下降,并可从肺组织分离出乙型流感病毒(表 1)。在传代适应过程中,病毒株 B/Lee/40 和 2009-39 需在甘露聚糖辅助下方可感染小鼠,但不能稳定传代,第 2 代开始不能在鼠肺中有效复制;2012-05 可在鼠肺中稳定传代,第 3 代后没有甘露聚糖亦可有效在鼠肺中复制,肺组织病毒量随代数增加而增加(表 2)。在 2012-05 传代适应过程中,第 5 代开始

观察到小鼠感染后第3天出现死亡(第5、6代分别死亡1只,为甘露聚糖联合组;第7代死亡4只,其中3只为甘露聚糖联合组)。因此终止适应实验,以第7代鼠肺分离的毒株(mouse-adapted 2012-05,MA1205)为研究对象,进行空斑纯化后小鼠体内感染验证病毒感染能力。

表1 乙型流感病毒鼠肺适应筛选

病毒	甘露聚糖[a]	感染剂量($lg\ TCID_{50}$)	体质量下降[b]	分离出病毒	肺组织病毒滴度($lg\ TCID_{50}$)
B/Lee/40	+	4.7	+	+	3.5
B/Guangzhou/GIRD08	+	4.7	–	–	–
2009-39	+	3.5	+	+	3.0
2012-02	+	3.5	–	–	–
2012-04	+	4.2	–	–	–
2012-05	+	3.7	+	+	3.8

感染后第3天处死小鼠取肺;a:甘露聚糖与病毒液混合滴鼻感染小鼠,终浓度10 mg/mL;b:"–"体质量降低不超过5%,"+"体质量降低超过20%

表2 乙型流感病毒不同毒株鼠肺适应过程中肺组织病毒滴度($lg\ TCID_{50}$)

病毒传代	有甘露聚糖			无甘露聚糖		
	B/Lee/40株	2009-39株	2012-05株	B/Lee/40株	2009-39株	2012-05株
1	3.5	3.0	3.8	NT	NT	NT
2	–	–	3.5	–	–	–
3	–	–	3.5	NT	NT	3.5
4	NT	NT	5.0	NT	NT	4.5
5	NT	NT	5.0	NT	NT	5.0
6	NT	NT	6.2	NT	NT	6.0
7	NT	NT	6.0	NT	NT	6.3

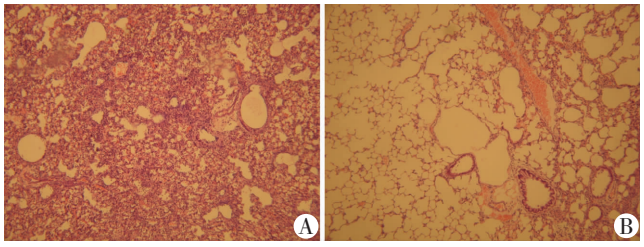
–:没分离出活病毒;NT:没有测试

2.2 体内感染实验

用经空斑纯化后的适应株MA1205感染小鼠,结果显示MA1205无论有无甘露聚糖联合均能对感染小鼠,并致死(表3)。感染后6 d的鼠肺切片显示,肺间质有大量炎症细胞和血红细胞渗出,造成肺泡体积降低,肺泡内无炎症细胞渗出,是明显的病毒感染导致的间质性肺炎(图1)。

表3 乙型流感MA1205病毒感染小鼠后观察15 d的半数致死率

感染病毒的攻击剂量($lg\ TCID_{50}$)	甘露聚糖	存活数/总感染数	死亡时间(d)
4.0	+	0/8	4.9±0.6
4.0	–	0/8	6.6±0.9
3.0	–	0/8	8.1±0.4
2.0	–	0/8	9.6±0.7
1.0	–	8/8	–
0.1	–	8/8	–



A:感染MA1205的小鼠肺组织;B:正常小鼠肺组织

图1 感染乙型流感MA1205病毒小鼠肺组织病理学观察 (HE ×40)

2.3 基因分析

基于B/Ulaanbaatar/1128/2012株的序列分析,经过7代的鼠肺感染,适应株MA1205与野生株2012-05比较,HA蛋白序列发生两个位点的突变,分别是N212Y和E361K,NA发生一个突变点S339F(图2),其他基因鼠肺适应前后没发生突变。适应过程中发现,基因HA突变位点N212Y和NA突变位点S339F在第6代出现,而HA突变点E361K在适应的第7代出现。

HA[a]	209	210	211	212	213	214	……	358	359	360	361	362	363
B/Lee/40	H	S	D	D	K	T		L	L	K	E	R	G
B/Ulaanbaatar/1128/2012	H	S	D	N	E	T		L	L	K	E	R	G
2012-05	H	S	D	N	E	T		L	L	K	E	R	G
MA1205	H	S	D	Y	E	T		L	L	K	K	R	G

NA	336	337	338	339	340	341	342
B/Lee/40	P	C	E	S	N	G	D
2012-05	P	C	E	S	D	G	D
MA1205	P	C	E	F	D	G	D

a:序列顺序按B/Ulaanbaatar/1128/2012(B/Lee/40第178位比现流行株少一个氨基酸残基)

图2 乙型流感病毒基因氨基酸残基突变位点

3 讨论

本研究目的是筛选出可感染小鼠的乙型流感病毒株,根据已有的报道即使是高毒力、高滴度的乙型流感病毒株感染小鼠,从鼠肺分离出的病毒量也很少[11]。为让病毒感染后更有效地复制,本研究参考相关文献使用了一种抑制生物体内胶原凝集素达到降低小鼠固有免疫以增强流感病毒复制的物质甘露聚糖[13]与病毒液联合处理小鼠,并获得一株可直接感染小鼠的乙型流感病毒。与以往文献报道的感染小鼠的乙型流感病毒相比,本研究适应得到的乙型流感病毒不需要其他药物辅助或降低小鼠固有免疫亦可感染小鼠并致死。其次,该株病毒来源于临床患者,是近年流感病毒流行季节分离所得的毒株,作为药物研究对象更有应用意义。该毒株作为流感病毒研究的应用将会在未来的研究中进行并加深。

经测序分析,该株鼠肺适应株与野生株相比,蛋白序列发生了3个位点的突变,分别是血凝素(HA)的N212Y、E361K和神经氨酸酶(NA)的S339F。HA的212位氨基酸位于受体结合部位190螺旋和220环附近,虽然该位点并不直接参与结合受体的功能,但据报道HA 202~221位点是激发固有免疫反应的重要抗原性位点[14],而且受体结合部位附近抗原性位点的突变可能会影响甚至改变HA对受体的亲和性和特异性[15]。但该位点的功能和突变并未被报道过,因此,N212Y突变对病毒的影响并不确定,需深入研究。根据B/Lee/40株HA的序列比对,E361K突变位点为HA1和HA2的裂解位点。经过鼠肺适应,该位点由谷氨酸(Glu,E)突变为赖氨酸(Lys,K),生物体中针对Lys残基的蛋白酶主要有天冬氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶,其中天冬氨酸蛋白酶是生物界分布最广泛的蛋

白酶家族,丝氨酸蛋白酶家族多为非特异性蛋白酶,少数特异性蛋白酶是作用于 Lys 和/或精氨酸(Arg,R)残基,因此,Lys 残基比 Glu 残基更易被蛋白酶裂解。目前亦有大量研究显示,特别是对禽流感病毒 HA 的裂解位点的研究,非致病性的禽流感病毒和人类普通甲型流感病毒 HA 裂解位点一般是一个 Arg 残基,而高致病性禽流感 HA 裂解位点有多个 Arg 和 Lys 残基,使得病毒 HA 裂解活化过程变得非常容易[16-17]。但 MA1205 病毒株 HA 的 E361K 突变是否发挥了提高病毒的致病性这一功能,还需要更深的研究来确认。

NA 的功能是水解唾液酸,使子代病毒从宿主细胞表面释放出去感染附近的细胞。NA 的氨基酸序列包含酶催化活性位点和抗原性位点。甲型流感病毒的研究中,NA 第 339 位氨基酸残基位于抗原性区域[18],尽管遗传学上甲乙型流感病毒的 NA 差异较大,但一些保守位点和蛋白折叠位点的氨基酸残基在序列上基本一致。如序列中半胱氨酸(Cys,C)的位置,近年流行的乙型流感病毒株与报道的位置基本一致[19]。因此,我们有理由相信,MA1205 的 S339F 突变发生在 NA 的抗原相关的区域,但该突变对毒株抗原性是否有影响并未见报道,不能完全确定。

前言提及报道的乙型流感病毒小鼠感染模型,都显示病毒株能感染小鼠,并在药物的辅助下出现体重下降、动脉血氧饱和度下降和死亡等情况,肺部出现炎症并能分离到病毒,但不能适应小鼠。科学家 Thijs Kuiken 的团队基于对流感病毒跨种属传播的研究,在一篇发表于《科学》杂志的报道中讨论流感病毒跨种属传播的几个重要因素:病毒与宿主的相互作用、宿主之间的相互作用(种内和种间)和病毒进化的作用[20]。其中关于病毒进化作用的讨论中认为,病毒的跨种属传播基于病毒在进化过程中产生的突变是否能适应新的物种宿主,当适应新物种的突变逐渐积聚,跨种属传播的可能性也随之增高。对于乙型流感病毒来说,总突变率低,能适应新物种的突变率更低。因此,我们相信,进化程度高的流行株中,更容易找到能适应小鼠并传代的人类乙型流感病毒。本研究所选的病毒株正是近年广州乙型流感流行季节高峰期分离的病毒株,比以往研究使用的病毒株有更高的突变率,这可能是本研究成功获得乙型流感病毒鼠肺适应株的一个原因。

参考文献:

[1] Hoffmann E, Mahmood K, Yang C F, *et al*. Greenberg, and George Kemble, Rescue of influenza B virus from eight plasmids[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(17): 11411-11416.

[2] WHO. Influenza Laboratory Surveillance Information [EB/OL]. [2013-10-20]. http://gamapserver.who.int/gareports/Default.aspx?ReportNo=6, 2013.

[3] Barnard D L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy[J]. Antiviral Res, 2009, 82(2): A110-A122.

[4] Bouvier N M, Lowen A C. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission[J]. Viruses, 2010, 2(8): 1530-1563.

[5] Ibricevic A, Pekosz A, Walter M J, *et al*. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells [J]. J Virol, 2006, 80(15): 7469-7480.

[6] Ning Z Y, Luo M Y, Qi W B, *et al*. Detection of expression of influenza virus receptors in tissues of BALB/c mice by histochemistry[J]. Vet Res Commun, 2009, 33(8): 895-903.

[7] Shinya K, Ebina M, Yamada S, *et al*. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. Nature, 2006, 440(7083): 435-436.

[8] Brown E G. Increased virulence of a mouse-adapted variant of influenza A/FM/1/47 virus is controlled by mutations in genome segments 4, 5, 7, and 8[J]. J Virol, 1990, 64(9): 4523-4533.

[9] Kawaoka Y. Equine H7N7 influenza A viruses are highly pathogenic in mice without adaptation: potential use as an animal model[J]. J Virol, 1991, 65(7): 3891-3894.

[10] Hai R, Mart nez-Sobrido L, Fraser K A, *et al*. Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach[J]. J Virol, 2008, 82(21): 10580-10590.

[11] Smee D F, Wandersee M K, Wong M H, *et al*. Treatment of mannan-enhanced influenza B virus infections in mice with oseltamivir, ribavirin and viramidine[J]. Antivir Chem Chemother, 2004, 15(5): 261-268.

[12] Lai C, Struckhoff J J, Schneider J, *et al*. Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UbE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection[J]. J Virol, 2009, 83(2): 1147-1151.

[13] Reading P C, Morey L S, Crouch E C, *et al*. Collectin-mediated antiviral host defense of the lung: evidence from influenza virus infection of mice[J]. J Virol, 1997, 71(11): 8204-8212.

[14] Hahn Y S, Braciale V L, Braciale T J. Presentation of viral antigen to class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte. Recognition of an immunodominant influenza hemagglutinin site by cytotoxic T lymphocyte is independent of the position of the site in the hemagglutinin translation product[J]. J Exp Med, 1991, 174(3): 733-736.

[15] Gamblin S J, Skehel J J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins[J]. J J Biol Chem, 2010, 285(37): 28403-28409.

[16] Walker J A, Kawaoka Y. Importance of conserved amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus[J]. J Gen Virol, 1993, 74(Pt 2): 311-314.

[17] Perdue M L, Garcia M, Senne D, *et al*. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses[J]. Virus Res, 1997, 49(2): 173-186.

[18] Colman P M, Varghese J N, Laver W G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase[J]. Nature, 1983, 303(5912): 41-44.

[19] Varghese J N, Laver W G, Colman P M. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 A resolution[J]. Nature, 1983, 303(5912): 35-40.

[20] Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, *et al*. Host species barriers to influenza virus infections[J]. Science, 2006, 312(5772): 394-397.

(收稿:2013-10-25;修回:2013-11-29)

(编辑 邓强庭)