

# 新甲型 H1N1 流感病毒小鼠致死模型的建立

朱云\*, 刘丽琦\*, 周剑芳, 朱闻斐, 秦堃, 于在江, 王大燕, 赵翔,  
李希妍, 蓝雨, 舒跃龙#

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

**摘要:** 建立新甲型 H1N1 流感病毒小鼠致死模型, 为研究致病性、宿主适应性以及疫苗保护性提供动物模型, 并寻找病毒在适应宿主过程中影响毒力和适应性的关键位点。将新甲型 H1N1 流感病毒 A/四川/SWL1/2009 H1N1 在小鼠中连续传 15 代, 各代次毒株均在 MDCK 细胞上增殖后进行测序, 根据序列分析结果选择 6 个传代毒株感染小鼠, 连续监测 14 d 体重和死亡情况; 并对第 14 代和 15 代病毒在噬斑实验纯化后克隆和测序分析。原代病毒不致死 BABL/C 小鼠, 经动物体内连续传代适应宿主动物后, 其毒力增强, 具体表现为所选的 6 个传代毒株中第 7、11、15 代毒株可以 100% 致死试验小鼠; 分析这 6 个传代毒株的全基因组表明这些毒株的部分氨基酸位点发生突变。新甲型 H1N1 流感病毒经小鼠体内连续传代后, 建立了小鼠致死模型, 病毒毒力增强可能与某些氨基酸位点的改变有关。

**关键词:** 新甲型 H1N1 流感病毒; 致死模型; 全基因组分析

中图分类号: R373.1 R446 R511.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2011)02-0103-05

2009 年 4 月暴发于墨西哥的新甲型 H1N1 流感病毒通过有效的人传人方式迅速波及至世界二百多个国家和地区, WHO 也于 2009 年 6 月将流感大流行的警戒水平提升到六级<sup>[1]</sup>, 宣布流感大流行开始; 2010 年 8 月 10 日, 世界卫生组织宣布流感大流行结束。总体来说本次流感大流行是一次比较温和的流行过程。造成此次流感大流行的病毒为四源重组的流感病毒, 其中 PB2 和 PA 基因来源于禽流感病毒, PB1 基因来源于人流感病毒, HA、NP 和 NS 基因来源于古典猪流感病毒, NA 和 M 基因则来源于欧亚系猪流感病毒, 由于它是一种新的重配病毒, 人群普遍缺乏相应的免疫力, 因此该病毒能够在人群中有效地迅速传播<sup>[2]</sup>, 从而导致流感病毒大流行。但是目前为止人们仍然不知道该病毒是在何种宿主中如何产生的, 也不清楚在人群传播之前已经在别的宿主中的流行情况, 研究该新型流感病毒的跨种传播机制将对我们了解病毒的起源具有重要的参考意义。

为建立新甲型 H1N1 流感病毒的小鼠致死模型, 从而为研究病毒的跨种传播机制提供线索, 也为研究流感疫苗和抗流感病毒药物提供合适的小鼠模型, 我们用中国内地首例新甲型 H1N1 流感病毒分离株在小鼠上进行肺传肺的传代后得到了可以 100% 致小鼠死亡的小鼠致死株, 建立了小鼠致死模型, 同时对部分代次的传代毒株进行噬斑纯化和全基因组序列分析, 寻找与小鼠致死性相关的可能原因。

## 材料与方法

**1 实验动物** SPF 级 6~8 周龄雌性 BABL/C 小鼠, 体重均在 16~18g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

**2 病毒和细胞** 本研究中所用的病毒为新甲型 H1N1 流感病毒 A/四川/SWL1/2009 H1N1 (简称 SC/1), 分离自中国内地首例新甲型 H1N1 流感病例, 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家流感中心(下文简称为“国家流感中心”)分离保存。狗肾上皮细胞(Madin-Darby Canine Kidney, MDCK)由国家流感中心保存, 并在 DMEM 培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)中培养。

**3 病毒血凝滴度及 TCID<sub>50</sub>的测定** 新甲型 H1N1 流感病毒 A/四川/SWL1/2009 H1N1 的血凝滴度

收稿日期: 2010-12-24; 修回日期: 2011-02-21

基金项目: 国家 973 课题 2011CB504704

作者简介: 朱云(1984), 男, 甘肃平凉人, 硕士研究生, 主要从事流感病毒的研究, E-mail: yunzhu@cnic.org.cn; 刘丽琦(1975), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 主要从事流感病毒的研究, E-mail: liuliqi@cnic.org.cn。

通讯作者: 舒跃龙, 研究员, E-mail: yshu@cnic.org.cn

朱云和刘丽琦并列为共同第一作者; 舒跃龙为通讯作者。

为 128, 病毒 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>6.95</sup> /mL, 均使用 1% 火鸡红细胞悬液进行检测, 具体实验方法见参考文献<sup>[3]</sup>。

**4 病毒在小鼠中的连续传代** 3 只 6~ 8 周雌性 BALB/C 小鼠用异氟烷轻度麻醉并用 SC/1 流感病毒原液按每只 25μl 滴鼻感染。感染后第 3d 处死小鼠, 取全肺。每个全肺样本用无菌眼科手术剪剪碎, 分别加入 1ml 冷的无菌 PBS 溶液后匀浆, 4℃ 条件下 2 000r/min 离心 5min 后吸取上清液, 合并来自三份样本的上清液, 并将合并的上清液标记为 SC/FMA P1(SC/F-mouse adapted, Passage 1), 取等份量的该上清液以同样的方法感染下一代的 3 只小鼠, 该上清液的其余部分经分装后在 80℃ 冰箱保存。如此操作连续进行 15 次。将收获的每代肺组织匀浆在 MDCK 细胞上扩增 1 代, 分装后 80℃ 冰箱保存。测定各个 SC/FMA P1-P15 共 15 代的 TCID<sub>50</sub> 值。

**5 病毒 RNA 的提取、纯化及测序与分析** 采用德国 Qiagen 公司 RNeasy Mini Kit 从全部病毒提取的病毒 RNA 通过 PCR 使用大连宝生物公司合成的每个片段特异性引物扩增, 并且扩增产物用德国 Qiagen 公司 QIAquick PCR purification kit 纯化并且使用 ABI 公司 3730x1 测序仪由国家流感中心完成测序。使用 DNA Star 软件包的 SeqMan 软件拼接和整理测序结果, 随后利用 BioEdit 软件开展核苷酸序列和氨基酸序列比对。

**6 小鼠致死性实验** 根据序列分析结果选择 SC/

1、SC/FMA P3、P7、P11 和 P15 五株病毒并用冷的无菌 PBS 稀释到 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> /25μL。6~ 8 周雌性 BALB/C 小鼠用异氟烷轻度麻醉后, 以每株病毒滴鼻感染各 4 只, 并设立 PBS 对照组。监测小鼠的感染前及感染后第 1d 至 14 d 的体重, 当小鼠体重低于感染前体重的 30% 时处死小鼠, 或当小鼠死亡, 记做死亡。

**7 SC/FMA P14 代及 P15 病毒的纯化** 将 SC/FMA P14 和 P15 代病毒利用噬斑实验进行纯化, 具体的实验方法见参考文献<sup>[3]</sup>。

## 结 果

### 1 序列分析结果

分析 SC/1、SC/FMA P1 至 P15 共 16 株毒株的全基因组序列表明, 与原代毒株相比, 除 NP、NS 和 M 基因外, 其余五个基因编码的蛋白均存在氨基酸位点的改变, 其中 SC/FMA P3 发生 PB2-E188K、PB1-A566S、PA-I79V、HA-N129S、HA-R223Q 氨基酸突变; SC/FMA P7、P11 和 P15 都出现 HA-K163E、HA-D222G、HA-R223Q、NA-Y56C 氨基酸突变。此外, SC/FMA P15 还出现 HA-G155E 的氨基酸突变。其余毒株的氨基酸位点改变的具体情况见表 1(注: HA 氨基酸编码是以 H1 为标准, 即从 M 开始去掉 17 氨基酸的信号肽后编码)。

表 1 氨基酸突变位点

Table 1 Amino Acid Substitutions Identified in Mouse adapted H1N1 Influenza Virus Mutation pattern of pandemic H1N1 virus after mice lung passage

Virus	Amino acid residue at position no.								
	PB2	PB1	PA	HA			NA		
	188	566	79	129	155	163	222	223	56
SC/1	E	A	I	N	G	K	D	R	Y
P1	E	A	I	N	G	K	D	R	Y
P2	E	A	I	S	G	K	D	Q	Y
P3	K	S	V	S	G	K	D	Q	Y
P4	E	A	I	S	G	K	D	Q	Y
P5	E	A	I	S	G	K	D	Q	Y
P6	E	A	I	S	G	K	D	Q	C
P7	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P8	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P9	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P10	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P11	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P12	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P13	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P14	E	A	I	N	G	E	G	Q	C
P15	E	A	I	N	E	E	G	Q	C

SC/1-MA P14, P15 两株病毒经噬斑实验纯化 1 次后的克隆全基因组分析发现, 与原代毒株相比, SC/1-MA P15-5(P15 的第 5 号克隆, 以下类同) 和 P15-6 发生 PB2-D161 N 的突变; SC/1-MA P14-4 和 P14-5 发生 PB2-H357N 的突变; P15-2 发生 PA-T32 N 的突变; P14-1, 2, 3, 4, 5 以及 P15-1, 2, 3, 4 发生 PA-A36T 的突变; P15-6 发生 PA-I38M 的突变; P14 的 6 个克隆和 P15 的 6 个克隆均出现 HA-G155E、HA-K163E、HA-D222G、HA-R223Q 的突

变; P14-1, 3, 4, 5, 6 和 P15-1, 2, 3, 4 发生 NA-Y56C 的突变; 此外, P14-2、P15-6 和 7 的 NA 片段分别出现 31 个和 32 个核苷酸缺失。P14-4、P15-1、P15-6 发生 M-T167I 的突变。各个克隆具体的突变位点见表 2(注: HA 氨基酸编码是以 H1 为标准, 即从 M 开始去掉 17 氨基酸的信号肽后编码。SC/1-MA P14 病毒纯化后的 6 个克隆依次记做 P14-1, P14-2, ...P14-6; SC/1-MA P15 病毒纯化后的 6 个克隆依次记做 P15-1, P15-2, ...P15-6)。

表 2 纯化的 SC/1-MA P14 和 P15 病毒的氨基酸突变位点

Table 2 Amino Acid Substitutions Identified in Purified Virus Mutation pattern of pandemic H1N1 virus after mice lung passage

Virus	Amino acid residue at position no.											
	PB2		PA			HA					NA	M
	161	357	32	36	38	155	163	202	222	223	56	167
SC/1	D	H	T	A	I	G	K	G	D	R	Y	T
P14	D	H	T	A	I	G	E	G	G	Q	C	T
P14-1	D	H	T	T	I	E	E	G	G	Q	C	T
P14-2	D	H	T	T	I	E	E	G	G	Q	135-166nt deletion	T
P14-3	D	H	T	T	I	E	E	G	G	Q	C	T
P14-4	D	N	T	T	I	E	E	G	G	Q	C	I
P14-5	D	N	T	T	I	E	E	G	G	Q	C	T
P14-6	D	H	T	A	I	E	E	G	G	Q	C	T
P15	D	H	T	A	I	E	E	G	G	Q	C	T
P15-1	D	H	T	T	I	E	E	G	G	Q	C	I
P15-2	D	H	N	A	I	E	E	G	G	Q	C	T
P15-3	D	H	T	A	I	E	E	G	G	Q	C	T
P15-4	D	H	T	T	I	E	E	G	G	Q	C	T
P15-5	N	H	T	A	I	E	E	G	G	Q	135-167nt deletion	T
P15-6	N	H	T	A	M	E	E	W	G	Q	C	I

2 小鼠生存曲线

PBS 组和 SC/1 组的 4 只小鼠在感染后 14 d 内未出现死亡, SC/1-MA P3 组的 4 只小鼠在感染后 14 d 内死亡 3 只; SC/1-MA P7, P11, P15 组的 4 只小鼠均在感染后的 10 d 内 100% 死亡, 各组小鼠具体的死亡情况见图 1。

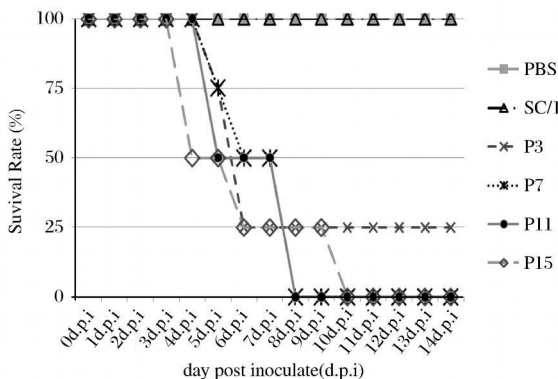


图 1 小鼠生存曲线

Figure 1 Mice survival rate curve

讨 论

季节性流感病毒不能直接感染老鼠, 但是毒株在小鼠中经肺传肺的传代过程后毒力和致病性增强, 从而成为鼠肺适应株甚至致死株, 而一些高致病性的 H5 和 H7 亚型禽流感病毒可以不经过适应而直接对小鼠致病, 因此它常被做为流感病毒致病性研究的哺乳动物模型<sup>[4-5]</sup>。新甲型 H1N1 流感病毒可以不经适应直接感染小鼠, 但不会使老鼠死亡, 通过将人甲型流感病毒在小鼠中连续的肺传代方式可以筛选出一个高毒力株, 这种方法也常常被用来筛选或者验证一些可能与毒力相关的突变位点<sup>[6]</sup>。

目前认为甲型流感病毒的跨种传播主要与血凝素蛋白和聚合酶有关, 其中 HA 与宿主细胞特异性受体结合, 进而介导病毒与宿主细胞之间的膜融合, 聚合酶直接参与病毒在宿主细胞内的复制。已有的研究表明, HA 蛋白的受体结合域中的一些氨基酸

残基相对保守,其中 98, 131~ 134, 136~ 138, 53~ 155, 183~ 190, 194~ 195, 218~ 220, 224 和 226~ 228 位的氨基端残基被认为是构成受体结合域的关键氨基酸残基(依不同亚型位置略有不同)。因此这些位点的突变都可能影响到病毒受体结合特异性,进而影响病毒毒力<sup>[7]</sup>。

本研究中建立的致死模型发现 HA 蛋白中部分氨基酸位点的突变, G155E、D222G、R223Q 等突变,可能与病毒毒力相关。Bin Zhou<sup>[8]</sup> 等人证明 HA-G155E 的突变是新甲型流感病毒以及 H5 亚型禽流感对小鼠致病力的一个决定因子; Liu Y<sup>[9]</sup> 等人证实 HA-D222G 的突变是决定新甲型 H1N1 毒力的关键, HA 蛋白 222 位的天冬氨酸残基在人 H1N1 流感病毒中常见, 222 位的甘氨酸残基则更多的出现在禽流感病毒中。这两个位点的突变株的出现可能会造成目前流行的新甲型 H1N1 流感病毒毒力增强引起更多的重症或死亡病例, 因此需加强对这两个突变位点的监测。

此外, 研究发现 PB2-E627K 的突变能使得拥有禽源性 PB2 的流感病毒在人呼吸道上皮细胞很好的复制, 新甲型 H1N1 流感病毒的 627 位点为禽源的 E (谷氨酸), 但是它却能在人群中很好的传播复制, 因此就有人提出假设, 即 PB2 基因可能在进化选择压力下, 在另一个氨基酸位点发生突变从而代偿 627 位点谷氨酸到赖氨酸突变的作用。随后 Yamada S<sup>[10-11]</sup> 等人研究发现 PB2-Q590R 的突变可以代偿 PB2-E627K 突变的作用并明显的增强 2009 新甲型 H1N1 流感病毒在人群中的适应性。本研究中所有代次毒株的 PB2 蛋白均在 627 位点为 E (谷氨酸) 和 590 位点为 R (精氨酸), 与 2009 新甲型 H1N1 的一致, 即, 这可能也保证了所有毒株能较好的适应小鼠并在其体内有效复制。其次, 相对于表面蛋白 HA 来说, 在本次实验的毒株中病毒聚合酶上的变异相对较少, SC/1-MA P3 毒株 PB2-E188K、PB1-A566S 和 PA-I79V 的突变对病毒聚合酶活性及病毒的复制究竟有没有影响、有多大影响还需要进一步的实验验证。另外, 根据小鼠致死性实验的结果 SC/1-MA P14-5 和 P14-6 的 PB2-H357N 的突变及 SC/1-MA P14-1、2、3、4、5 和 SC/1-MA P15-1、4 PA-A36T 的突变, 可能对于病毒聚合酶活性的影响更大。因为 PB2 蛋白 357 位残基位于 PB2 蛋白的帽结合区, 可能会直接影响到病毒帽结合活性, 进而影响病毒翻译的效率。而 PA 蛋白 36 位 A (丙氨酸) 到 T (苏氨酸) 的突变, 使该位点由疏水性的氨基酸突变

成亲水性的氨基酸, 而且这一位点位于 PA 蛋白的核酸内切酶功能区, 氨基酸极性的改变可能会直接影响病毒核酸内切酶的活性。

纯化后的 3 个克隆(P14-2、P15-6 和 P15-7) 分别在 NA 的 135-166 位核苷酸和 135~167 位核苷酸发生了三十多位的缺失, 缺失的核苷酸位于 NA 的茎部, 可能会影响到病毒在小鼠中的毒力<sup>[12]</sup>。

综上所述, 本研究建立的新甲型 H1N1 流感病毒小鼠致死模型为病毒致病性研究及疫苗保护性研究提供了一个良好的模型, 而且通过序列分析得到的一些氨基酸位点的改变可能会影响到病毒的复制和毒力, 这些突变位点的功能还需要通过进一步的体内体外实验来验证, 从而更好的研究甲型流感病毒的致病性, 为流感病毒的监测工作提供更多的启示。

#### 参考文献:

- [1] Fraser C, Donnelly C A, Cauchemez S, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): Early findings[J]. *Science*, 2009, 324, 5934: 1557-1561.
- [2] Carten R J, Davis C T, Cox N J, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 197-201.
- [3] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 100-102, 97-99.
- [4] Hirst G K. Studies on the mechanism of adaptation of influenza virus to mice[J]. *J Exp Med*, 1947, 86(5): 357-366.
- [5] Ward A C. Virulence of influenza A virus for mouse lung[J]. *Virus Genes*, 1997, 14(3): 187-194.
- [6] Brown E G, Bailly J E. Genetic analysis of mouse adapted influenza A virus identifies roles for the NA, PB1, and PB2 genes in virulence[J]. *Virus Res*, 1999, 61(1): 63-76.
- [7] Matrosovich M N, Klenk H D, Kawaoka Y. Influenza Virology, Current Topics [M]. Norfolk, England: Caister Academic Press, 2006: 95-100.
- [8] Zhou B, Li Y, Wentworth D E, et al. PB2 Residue 158 is a Pathogenic Determinant of Pandemic H1N1 and H5 Influenza A Viruses in Mice[J]. *J Virol*, 2011, 85(1): 357-365.
- [9] Liu Y, Childs R A, Matrosovich M, et al. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus[J]. *J Virol*, 2010, 84(22): 12069-12074.

- [ 10] Mehle A, Doudna J A. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 ( 50): 21312-21316.
- [ 11] Yamada S, Hatta M, Kawaoka Y, et al. Biological and Structural Characterization of a Host-Adapting Amino Acid in Influenza Virus[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(8): e1001034
- [ 12] Mitnaul L J, Matrosovich M N, Kawaoka Y, et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus [J]. J Virol, 2000, 74( 13): 6015-6020.

## Establishment of a Mouse Lethal Model for Pandemic H1N1 Influenza Virus

ZHU Yun, LIU Liqi, ZHOU Jianfang, ZHU Wenfei, QIN Kun, YU Zaijiang,

WANG Deyan, ZHAO Xiang, LI Xiyan, LAN Yu, SHU Yue-long

(Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China)

**Abstract:** To establish the mouse lethal model for pandemic H1N1 influenza virus, provide an animal model for studying the pathogenicity and host adaptation of 2009 pandemic H1N1 influenza virus, and find out the key amino acid mutations which may affect viral virulence and replication. A pandemic H1N1 influenza virus strain, A/Sichuan/SWL1/2009 (H1N1, SC/1) was passaged in mouse lung by 15 cycles with intranasal infection. The passaged viruses were all propagated in MDCK cells and sequenced. Based on the sequencing results, four mice in each group were inoculated with 6 selected viruses and their weight and survival rate were monitored during the following 14 days after infection. Additionally, SC/1-MA P14 and P15 viruses were sequenced after purification by Plaque Assay. Viral virulence was increased after serial passages and the mortality of 100% was detected after 7 passages. Several amino acid residue mutations of passaged viruses which may contribute to the enhanced virulence were observed. The increased virulence of passaged viruses and mammalian host adaptation maybe associated with amino acid mutations in viral functional proteins. Finally, we established a mouse lethal model.

**Key words:** pandemic H1N1 Influenza virus; lethal model; full-length sequence analysis

\* Corresponding author: Coauthor: ZHU Yun, E-mail: yunzhu@cnic.org.cn, LIU Liqi, E-mail: liuliqi@cnic.org.cn

Corresponding author: SHU Yue-long, E-mail: yshu@cnic.org.cn