

克隆测序鉴定流感病毒诱导小鼠急性肺炎模型

谢彬 王雪峰 岳志军 南春红

(辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

[摘要] 目的 结合 RT-PCR 病毒载量检测、克隆测序基因比对以及病理改变鉴定甲型流感病毒(influenza virus, IV)鼠肺适应株(FM1株)诱导的小鼠急性肺炎模型,为急性肺炎模型提供科学的鉴定方案。方法 以 FM1 株滴鼻诱导昆明小鼠急性肺炎,分别于第3、5、7天取小鼠肺脏,以 RT-PCR 法检测 IV 病毒载量,并通过质粒克隆测定 cDNA 序列;同时观察小鼠肺脏病理改变。结果 正常组小鼠肺组织的肺泡、肺泡囊和肺泡隔形态完整,周围血管未见炎症细胞浸润;模型组在感染 IV 后第3、5、7天均见肺泡、肺泡囊、肺泡管、肺泡隔等结构破坏,肺泡间隔增厚,细支气管壁增厚,大量炎症细胞浸润,肺泡壁毛细血管扩张,可见大量红细胞。与正常组比较,模型组在不同时间点的病理变化程度均有显著性差异($P<0.01$)。不同时间点模型组小鼠肺组织中均可检测到 IV 病毒核酸,且不同时间点小鼠肺组织的病变程度与病毒载量呈正相关($P<0.01$)。经测序比对发现,IV 感染小鼠肺组织中 RT-PCR 扩增产物与已知 IV cDNA 序列相应片段吻合度高达 99.1%。结论 克隆测序基因比对法可鉴定 FM1 株诱导的小鼠急性肺炎模型。

[中国当代儿科杂志,2013,15(2):145-149]

[关键词] 克隆测序;流感病毒;肺炎模型;小鼠

Identification of mouse acute pneumonia model induced by influenza virus using gene clone and sequence analysis

XIE Bin, WANG Xue-Feng, YUE Zhi-Jun, NAN Chun-Hong. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China (Wang X-F, Email: lnzyxf@163.com)

Abstract: Objective To identify mouse acute pneumonia model induced by influenza virus adapted strains (FM1 strain) using RT-PCR, gene clone and sequence analysis and pathological examination of lung tissues. **Methods** Acute pneumonia was induced by intranasal drip of FM1 strain. The lungs were collected after 3, 5 and 7 days. RT-PCR was used to detect the viral load. Amplified PCR products were cloned and sequenced. Pathological and histological changes to the lungs were observed. **Results** There were no abnormalities in the alveoli, alveolar sacs and alveolar septa and no inflammatory cell infiltration was found in normal mice. In the model group, we found disappearance of alveoli, alveolar sacs, alveolar ducts and alveolar septa, thickening of the alveolar septal and bronchiolar walls, and infiltration of inflammatory cells after 3, 5 and 7 days of influenza virus (IV) infection. Compared with the normal group, pathological changes at various time points were significantly increased ($P<0.01$). Viral nucleic acid can be detected in the lung tissue of the model group at various time points, and the pathological changes of the lung tissue were positively correlated with viral load. Sequence analysis demonstrated that there was 99.1% consistency between RT-PCR products of lung tissues in the model group and the known IV cDNA sequence ($P<0.01$). **Conclusions** Gene clone and sequence analysis may be used to identify acute mouse pneumonia model induced by FM1 strain.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(2):145-149]

Key words: Clone and sequence; Influenza virus; Pneumonia model; Mice

流感病毒(influenza virus, IV)是引起小儿病毒性肺炎(viral pneumonia)的主要病原体之一,严重危害人类健康,世界卫生组织推荐的抗病毒治疗药物为奥司他韦和扎拉米韦^[1],在我国的储备有限,价格昂贵,且已发现耐奥司他韦的 H1N1 流感病毒株^[2]。研究表明,中医药在 IV 的治疗方面具有一定优势^[3-5],因此深入开展中医药防治病毒性肺炎的实验研究,并探讨药物的作用机制具有重要的临床

[收稿日期]2012-07-08;[修回日期]2012-10-17
[基金项目]国家自然科学基金(81072975)。
[作者简介]谢彬,女,博士,副主任医师。
[通信作者]王雪峰,教授。

意义。而稳定、可靠的动物模型就是该工作的前提与基础。

甲型流感病毒 FM1 株为鼠肺适应株,早在 20 世纪 90 年代国内就应用甲型流感病毒 FM1 株建立了急性肺炎动物模型^[6],并用于病理、发病机制和药物疗效观察。目前用于急性肺炎动物模型研究的小鼠主要是 BALB/C 小鼠^[7],且主要从小鼠的一般状态、肺脏的外观、病理学变化等方面进行模型鉴定。但是,通过肺组织的病毒载量和基因比对进行模型鉴定,国内尚未见报道。本研究采用 FM1 株感染昆明小鼠致急性肺炎动物模型,并从肺组织的病理改变、RT-PCR 病毒载量检测、克隆测序基因比对等多方面进行模型鉴定,为中医药防治病毒性肺炎提供实验基础和客观依据,并为研究 IV 感染小鼠后病毒基因变异提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 A/FM1/47(H1N1)为甲型流感病毒鼠肺适应株(中国预防医学科学院病毒研究所提供),冻存于辽宁中医药大学附属医院病毒室,LD₅₀ = 10^{-5.68}。经 9 日龄尼克白种 SPF 级鸡胚(购于辽宁益康生物制品厂)的尿囊腔接种培养传代后为 FM1 M9E2M1E3M2E4M1E5。

1.1.2 动物 清洁级昆明小鼠,雌雄各半,体重 14 ± 2 g,购自中国医科大学实验动物部,许可证号:SCXK(辽)2003-0009。

1.1.3 主要仪器 DNA 测序仪(ABI PRISMTM 377XL);蛋白-核酸分析仪(美国 BECHMAN, DU-600);PCR 仪(美国 PERKIN ELMER, PE-9600);倒置显微镜(德国 LEICA);超薄切片机(LKB-V);电子显微镜(日本 HITACHI H-600);低温高速离心机(德国 HERAEUS, BIOFUGE 28RS);电泳仪及天能凝胶分析系统(上海天能, EPS-300)。

1.1.4 主要试剂 TRIzol 总 RNA 提取试剂(In-vitrogen 公司,批号:1203406);RT-PCR 试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)产品(BcaBEST RNA RCR Kit Ver. 1. 1, 批号: Bk2701);AmpliTaq DNA 聚合酶循环反应试剂盒(PE 公司)。DNA-marker DL2000 为宝生物工程(大连)有限公司

(TaKaRa)产品(批号:CB3301);PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。GAPDH:上游 5'-GACATCAAGAAGTGGTGAAGC-3',下游 5'-TGGAAAT-TGTGAGGGAGATGC-3',产物大小为 336 bp;IV:上游 5'-GAGAAAGAAGTCCTTGTGC-3',下游 5'-TC-TATCATTCAGTCCATCCC-3',产物大小为 530 bp。

1.2 方法

1.2.1 分组与 IV 急性肺炎模型建立 将 60 只昆明小鼠随机分成正常组与 IV 肺炎模型组,每组 30 只。依照文献建立 IV 肺炎模型^[6]:左手将麻醉后的小鼠腹部朝上,右手将注射器对准小鼠鼻孔滴入 15LD50 IV 液 0.05 mL。正常组在同等条件下接种等量生理盐水。

1.2.2 取材 分别在 IV 感染后第 3、5、7 天,各组随机处死 10 只小鼠,取出整个肺脏,其中右肺用 4% 多聚甲醛固定后进行组织病理观察;左肺放入无菌 EP 管中,液氮速冻后置 -80 ℃ 冰箱中保存,用于 RT-PCR 检测及克隆测序基因比对。

1.2.3 光镜下病理组织学观察 将 4% 多聚甲醛固定好的组织包埋成蜡块,切片机切成薄片约 5 μm,苏木精-伊红(HE)染色后在光镜下观察肺组织病理学改变。病理变化程度计分方法^[8]:肺组织正常(-),记 0 分;细支气管周围及肺组织出现炎症细胞浸润,间质毛细血管扩张充血(+),记 1 分;细支气管有大量的炎症细胞浸润,肺泡渗出物较多,部分已实变,间质明显增厚(2+),记 2 分;肺组织大部分实变,细支气管和小动脉等管壁可见破坏(3+),记 3 分。每个标本取 6 张切片,每张切片随机取 3 个视野,用高清晰度 OLYMPUS BX50 系统生物显微镜采集图像,根据上述计分方法进行分析。

1.2.4 RT-PCR 法检测肺组织 IV 病毒载量 取肺组织加 TRIzol 制成匀浆,经超氯仿、异丙醇等分离、沉淀,最后用无 RNase 水溶解 RNA 沉淀,并检测 OD 值计算 RNA 产量。随后将总 RNA 反转录合成第一链 cDNA,反转录条件:65 ℃ 1 min, 30 ℃ 5 min, 15 ~ 30 min 内匀速升温至 65 ℃, 65 ℃ 15 ~ 30 min, 98 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压条件为 5 V/cm,于紫外线下观察特异性条带。

1.2.5 RT-PCR 扩增产物克隆测序 以模型组第 7 天为目的 DNA。(1)回收目的 DNA:切取目的 DNA 片段,加入 NaCl 溶液,加热融化,缓冲液反复洗涤,离心,回收上清液。(2)连接与转化:将 DNA、载体(pMD18)及连接酶混匀,16 ℃ 恒温 1 h;与感受态细胞 JM109 冰浴 1 h;加葡萄糖和 SOB,37 ℃ 摇床 1 h;涂平板,培养过夜。(3)质粒扩增与纯化:将提质粒扩增,并用碱裂解法提取质粒,得到纯化的质粒。(4)序列测定与比较:测序并将结果与 GenBank 已知的 IV cDNA 全序列比较。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件进行数据处理和统计学分析,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料

比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织光镜病理组织学观察

正常组小鼠肺泡、肺泡囊、肺泡隔形态完整,周围血管未见炎细胞浸润。模型组感染 IV 后第 3、5、7 天见肺泡、肺泡囊、肺泡管、肺泡隔等结构消失,肺泡间隔增厚,细支气管壁增厚,大量炎症细胞浸润,肺泡壁毛细血管扩张,可见大量红细胞。模型组在不同时间点的病变程度,与正常组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1,表 1。

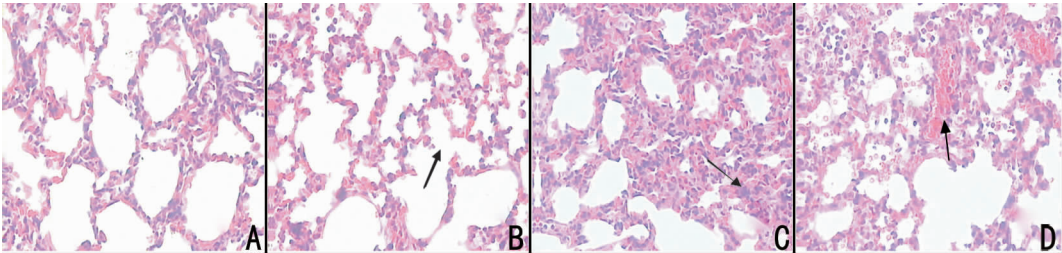


图 1 各组肺组织病理变化(苏木精-伊红染色,×200) A:正常组,可见肺泡、肺泡囊、肺泡隔形态完整,周围血管未见炎症细胞浸润。B:感染 IV 第 3 天模型组,肺泡、肺泡囊、肺泡管、肺泡隔等结构破坏(箭头所示),肺泡间隔增厚。C:感染 IV 第 5 天模型组,肺泡间隔重度增厚,细支气管腔内有炎症细胞浸润(箭头所示)。D:感染 IV 第 7 天模型组,肺泡间隔增厚,可见大量炎症细胞浸润和红细胞(箭头所示)。

2.2 RT-PCR 法检测各组小鼠肺组织 IV 病毒载量

正常组小鼠各时间点肺组织中未检测到 IV 病毒核酸,模型组在感染后 3 ~ 7 d 的肺组织中可发现 530 bp 的扩增片段,其中第 7 天 IV 病毒载量最大(表 1)。且在感染 IV 小鼠的第 3、5、7 天,随着肺组织的病变程度越重,病毒载量越多,呈正相关($P < 0.01$)。提示感染 IV 小鼠肺内病毒载量与肺组织的病变程度相关。

2.3 RT-PCR 扩增产物克隆测序及基因比对

RT-PCR 扩增产物测序结果与 IV cDNA 全序列比较,除第 735、860、886、962、1066 位点的 G、T、T、G、A 与原序列上相应位置的 A、C、C、A、G 不相符外,其余 525 bp 与原序列碱基完全一致。530 bp 的

扩增片段仅有 5 个碱基突变,吻合度高达 99.1% (图 2)。

表 1 小鼠感染 IV 后肺组织的病变程度与病毒载量之间相关关系 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	鼠数	病变程度	IV 病毒载量	相关系数	P 值
正常组*	10	0	0	-	-
模型组					
第 3 天	10	1.83 ± 0.36 ^a	1.89 ± 0.03 ^a	0.910	<0.001
第 5 天	10	2.37 ± 0.33 ^a	1.91 ± 0.04 ^a	0.841	0.002
第 7 天	10	2.80 ± 0.28 ^a	2.13 ± 0.11 ^a	0.828	0.003
F 值		22.047	12.945		
P 值		<0.001	0.001		

注: * 表示正常组小鼠第 3、5、7 天结果相同。a: 与同时点正常组比较, $P < 0.01$ 。

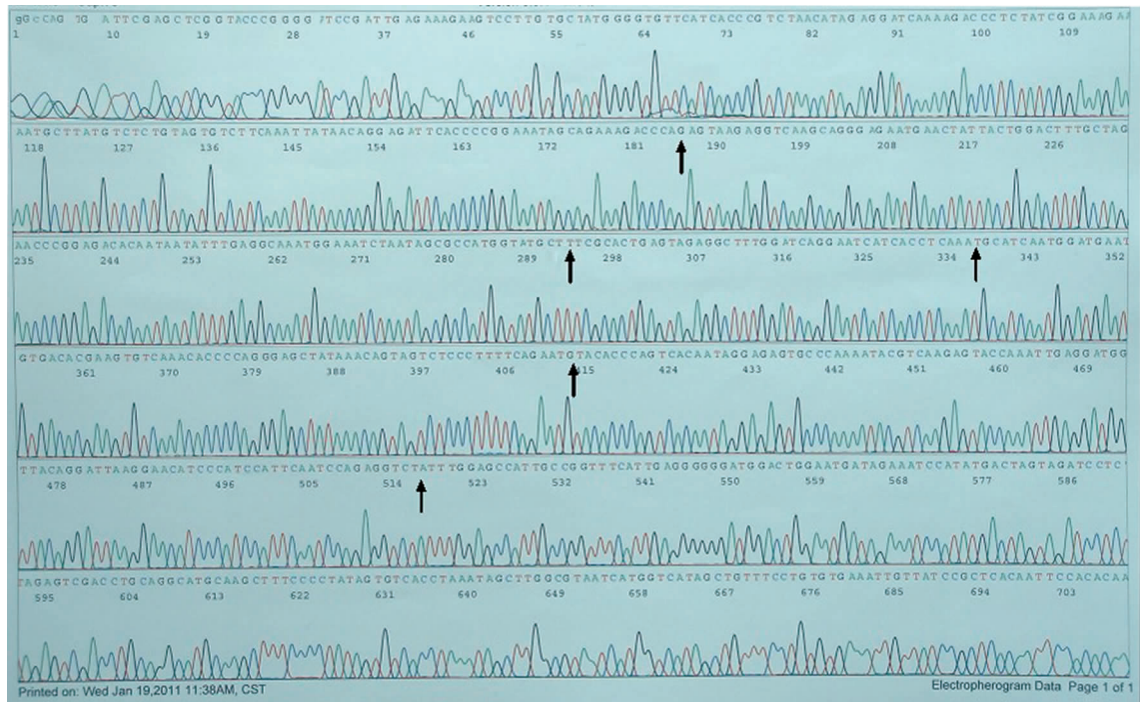


图2 流感病毒 PCR 扩增产物克隆测序结果 RT-PCR 产物经质粒扩增后进行测序,全长为 530 bp,仅有 5 个碱基突变,与 IV cDNA 序列吻合度高达 99.1%。箭头所示为突变位点。

3 讨论

IV 是 RNA 病毒,属于正黏液病毒科,可分为甲型、乙型、丙型,其中甲型 IV 的抗原变异最快。欧美诸国报道,甲型 IV 肺炎的发生率为 5% ~ 38%^[9]。2009 年 4 月,墨西哥和美国等国先后发生甲型 H1N1 流感疫情,并迅速向全球蔓延,已经成为目前超过季节性流感最严重的流感病毒^[10],而我国多地区均有甲型 H1N1 感染病例的报告,其病原为新型甲型 H1N1 流感病毒^[11]。小儿病毒性肺炎是当今医学研究热点之一,而 IV 是引起病毒性肺炎的主要病原体,因此探讨 IV 的有效防治方法,可为临床小儿病毒性肺炎的治疗提供理论依据。因此,研究中医药防治 IV 肺炎任重道远。而动物实验是研究 IV 的重要手段,故而建立合理的 IV 感染动物模型显得尤为重要。

目前用于研究流感的动物模型主要有小鼠、雪貂、猪、灵长类动物等^[12],其中小鼠遗传背景明确,便宜又易饲养,基因改造技术成熟,与人的亲缘性较近,且流感病毒特异性细胞介导的免疫可用作广泛的抗病毒保护的基础最近已在小鼠模型中被证明^[13]。因此,本研究选用昆明小鼠作为研究对象。甲型 IV 容易通过鼠适应传代获得鼠适应株,已经被

证实鼠是人 H1N1、H2N2、H3N2 流感病毒较为理想的哺乳动物模型,但乙型病毒株适应较难。国内常用的鼠适应株有: A/PR/34 (H1N1) 和 A/FM/1/47 (H1N1) [14]。本次实验选择 A/FM/1/47 (H1N1) 感染昆明小鼠复制小鼠流感模型。

本研究参照文献 [6] 以 FM1 株滴鼻感染昆明幼龄小鼠,诱导小鼠 IV 急性肺炎模型。IV 感染途径具有“病从口鼻而入”的基本特点,故在建立疾病模型上,滴鼻感染符合临床的感染途径、发病过程。小鼠感染 IV 后主要表现在下呼吸道感染,肺部的病理学类似于人感染 IV 后的严重病例;即 IV 的重要合并症和死亡原因—IV 肺炎,这恰恰符合研究小儿病毒性肺炎的需要。

至今,IV 感染小鼠致肺炎模型建立是否成功主要以肺组织病毒分离鉴定、病理检查、免疫组织化学分析等方法来评估。但是,以上方法比较复杂、费用较高,且很难判断疾病不同时期 IV 在肺组织中的含量及是否发生基因变异。克隆测序技术是利用核酸分子的可复制性及质粒的高复制性、不相容性,采用分子生物学技术对极微量的特定 DNA 序列进行鉴定的一种方法。该方法快速、价廉、特异,已成功运用于医学的多个领域。

本研究中,模型组小鼠的肺组织中 IV-RNA 的 RT-PCR 扩增产物直接进行 DNA 测序出现重叠峰,

故采用质粒克隆的方法,以实现基因测序鉴定该病毒。实验结果表明,所测定的序列与已知 IV cDNA 全序列的吻合度达 99.1%。从肺组织的病毒载量来看,模型组在不同时间点均检测到 IV 病毒核酸,而且病变程度与病毒载量呈正相关,即病毒载量越多,肺组织的病变程度越重。从 IV 的基因比对结果,以及病毒载量的半定量分析结果,FM1 株感染诱导小鼠急性肺炎模型稳定可靠。因此,应用克隆测序基因比对方法结合 RT-PCR 病毒载量检测、小鼠肺组织的病理改变,是定性结合定量的鉴定 FM1 株感染昆明小鼠急性肺炎模型的有效方案,为进一步研究 H1N1 发病机制及中医药防治病毒性肺炎机制提供了可靠的实验基础;并为研究 IV 感染小鼠后基因变异提供了参考依据。

[参 考 文 献]

[1] Uyeki T. Antiviral treatment for patients hospitalized with 2009 pandemic influenza A (H1N1) [J]. N Engl J Med, 2009, 361 (23): e110.

[2] Baz M, Abed Y, Papenburg J, Bouhy X, Hamelin ME, Boivin G. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis [J]. N Engl J Med, 2009, 361 (23): 2296-2297.

[3] 刘友德,邹志强,郭砚梅,李艳芳,马斌,李刚. 奥司他韦与改良麻杏石甘汤治疗甲型 H1N1 流行性感冒的随机对照研究

[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(9): 565-569.

[4] 吕玉霞,李娜,陈钦慧. 麻杏甘石汤加热毒宁注射液治疗儿童疑似甲型 H1N1 流感的临床疗效评价 [J]. 中医药信息, 2011, 28(2): 51-54.

[5] 王玉光,王晓静,杜宏波. 6 例甲型 H1N1 流感确诊病例中西医结合诊治报告 [J]. 北京中医药, 2009, 28(6): 403-406.

[6] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术 [M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 91.

[7] 张春花,朱丹,刘华钢. 流感病毒感染实验动物模型建立的研究进展 [J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(5): 808-811.

[8] 宋康,骆仙芳,汪玉冠,夏永良,曹羽. 防感煎剂对流感病毒感染小鼠体重以及免疫器官与肺脏的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(2): 239-242.

[9] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity—United States, 2003-2004 season [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2003, 52(49): 1197-1202.

[10] Petrosillo N, Di Bella S, Drapeau CM, Grilli E. The novel influenza A (H1N1) virus pandemic: An update [J]. Ann Thorac Med, 2009, 4(4): 163-172.

[11] 盖建芳,冀滂,姚建宏. 甲型 H1N1 流感重症患儿继发性免疫功能低下 [J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(10): 829-830.

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

[13] Alexander J, Bilsel P, del Guercio MF, Stewart S, Marinkovic-Petrovic A, Southwood S, et al. Universal influenza DNA vaccine encoding conserved CD4⁺ T cell epitopes protects against lethal viral challenge in HLA-DR transgenic mice [J]. Vaccine, 2010, 28: 664-672.

[14] 刘崇海,蒋利萍,魏钰书. 流感病毒感染动物模型的研究进展 [J]. 国际病毒学杂志, 2006, 13(1): 9-12.

(本文编辑:万静)

· 消息 ·

2013 年第四届国际儿科肾脏病学会 (IPNA) 研讨会
暨第 23 届全国儿科肾脏病学习班通知 (第一轮)

由北京大学第一医院儿科主办, 2013 年第四届国际儿科肾脏病学会研讨会暨第 23 届全国儿科肾脏病学习班定于 2013 年 6 月 19 日~6 月 23 日在北京举行。本次研讨会为国家级继续医学教育项目,同时也是国际儿科肾脏病学会 (International Pediatric Nephrology Association, IPNA) 的继续教育项目。

北京大学第一医院儿科自 1983 年开始举办全国儿科肾脏病学习班,至此期学习班正逢 30 周年。本届研讨会将邀请来自韩国、新加坡的 IPNA 国际著名肾脏病专家以及中国台湾儿科肾脏病专家林清渊教授授课,国内有著名的儿科肾脏病专家杨霁云教授、丁洁教授及肖慧捷、姚勇主任医师等共同授课,授课将采用讲座与临床-病理讨论 (CPC) 相结合的形式,重点讲授近年来小儿肾脏病学临床治疗,发病机制及基础研究方面的新进展和新思路。并安排时间欢迎广大医生自带病例参与讨论和交流。结业时授予国家继续教育 I 类学分 8 分。

学习班负责人:肖慧捷
联系人:张琰琴,钟金龙 电话:010-52428195 传真:010-84855358
电子邮件:bdes@htbr.cn

北京大学第一医院 儿(肾)科
国际儿科肾脏病学会 (IPNA)
2012 年 12 月 6 日