

# H9N2 亚型猪流感病毒诱导小鼠肺急性损伤模型的研究

徐明举, 王存连, 魏东, 利凯, 崔红玉, 张瑞华, 李寸欣, 徐彤\*

(河北北方学院动物科技学院, 宣化 075131)

**摘要:** 本试验采用 100  $\mu$ L/A/swine/HeBei/012/2008/(H9N2)猪流感病毒(H9N2 SIV)经鼻腔接种 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠, 通过定时称量小鼠的采食量和体质量、观察肺病理组织学变化以及测量肺系数、肺湿质量/干质量、动脉血气和支气管肺泡灌洗液内炎性细胞等拟建立 H9N2 SIV 感染诱导小鼠急性肺损伤模型。结果显示:(1)感染后第 2 天试验组小鼠出现精神沉郁、被毛松乱、采食量和体质量下降。感染后的第 3 天开始感染小鼠采食量和体质量显著下降( $P<0.01$ );(2)试验组小鼠在感染后的第 3 天末出现死亡, 死亡率约为 62.5%, 剖检可见肺部明显水肿、出血, 肺泡内有大量的炎性细胞渗出;肺系数和湿质量/干质量比显著增加( $P<0.01$ );(3)与对照组相比感染组小鼠动脉血中氧分压从第 2 天开始降低, 第 4 天出现明显的差异( $P<0.01$ ), 第 6 天最低时仅为(6.79 $\pm$ 1.27) kPa, 呈现严重的低氧血症, 同时, 二氧化碳分压显著上升;(4)支气管灌洗液(BALF)内炎性细胞在感染后第 4~8 天增加显著, 尤其以肺泡巨噬细胞和多核型白细胞增加最为明显( $P<0.01$ )。本研究证实采用 A/swine/HeBei/012/2008/(H9N2)病毒感染小鼠引起肺组织弥漫性急性渗出性炎症为主的病理过程和严重的低氧血症, 表明成功建立了 H9N2 SIV 诱导小鼠的肺损伤模型, 为进一步研究其对哺乳动物肺损伤的致病机理奠定基础。

**关键词:** H9N2 亚型猪流感病毒;急性肺损伤;小鼠;动物模型

中图分类号:S852.659.5

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)06-0838-07

## Study on the Model of Acute Lung Injury Induced by Swine Influenza H9N2 in Mice

XU Ming-ju, WANG Cun-lian, WEI dong, LI Kai, CUI Hong-yu, ZHANG Rui-hua, LI Cun-xin, XU tong\*

(Department of Animal Science, Hebei North University, Xuanhua 075131, China)

**Abstract:** Six to eight weeks old BALB/c mice were inoculated intranasally with A/swine/HeBei/012/2008/(H9N2) (100  $\mu$ L) swine influenza virus diluted in sterile saline. The clinical signs and body loss were observed in group of eight infected mice, which was viewed as a measure of morbidity. Meanwhile, at the indicated time points after infection, lung histopathology, lung coefficient, lung wet weight/dry weight, arterial blood gas, inflammatory cells in bronchial alveolar lavage fluid (BALF) were viewed as the index of acute lung injury, which predicated to establish animal model of acute lung injury. The results showed: (1) Experimental mice in the first 2 days after infection appeared depression, ruffled fur, feed intake reduction and weight loss, while for the first three days after infection, food intake and weight reduced significantly ( $P<0.01$ ) compared with control group. (2) After the first three days of infection, infected mice began to die, and the mortality rate is about 62.5% (5/8). At the same time, pulmonary edema, hemorrhage, and a number of inflammatory cells exuding from the alveolar were observed in lung of infected mice. Lung coefficient and wet weight/dry weight ratio increased significantly. (3) In the first 2 days af-

收稿日期:2010-11-28

基金项目:河北省自然科学基金(C2009001028)

作者简介:徐明举(1977-),男,河南台前县人,讲师,硕士,主要从事动物流感病毒肺损伤机理研究, E-mail: xumingju12345@yahoo.com.cn

\* 通讯作者:徐彤, E-mail: xutong1969@sohu.com

ter infection, arterial partial pressure of oxygen for infected mice began to reduce compared with that of uninfected mice, which showed significant difference in the first four days, only  $6.79 \text{ kPa} \pm 1.27 \text{ kPa}$ . Infected mice appeared serious hypoxemia, moreover, carbon dioxide separate pressure rose significantly. (4) Inflammatory cells in BALF increased significantly, especially the alveolar macrophage and polymorphonuclear leukocytosis, and from 4-8 days after infection showed extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) compared with that of control group. The results showed that a mouse model of acute lung injury with H9N2 virus infection characterized by diffuse alveolar damage, severe hypoxia, and inflammation cell infiltration was established successfully in this study, which might benefit further investigation into the pathogenesis of human ALI/ARDS induced by H9N2-SIV infection.

**Key words:** H9N2 swine influenza virus; acute lung injury; mice; animal model

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种以弥漫性肺细胞损伤为基础,肺水肿和微肺不张为病理特征,并可迅速影响气体交换功能为临床特点的肺部炎症和通透性增加综合征,多见于机体遭受严重感染、创伤、休克、毒物中毒(包括吸入有毒气体)等因素导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤,造成弥漫性肺间质及肺泡水肿,导致急性低氧性呼吸功能不全<sup>[1-2]</sup>。研究认为 ALI/ARDS(急性呼吸窘迫综合征)的死亡率高达 40%~60%<sup>[3-4]</sup>。近年来由于严重急性呼吸综合征(SARS)病毒以及人禽流感病毒均引起严重的肺部感染,诱导急性肺损伤,甚至发展成急性呼吸窘迫综合征而引起高的死亡率,因此感染性因素尤其是病毒性感染已经成为引起 ALI/ARDS 的潜在的重要原因之一,引起世人的关注。

H9N2 亚型流感病毒是引起家禽发病的主要病毒亚型之一。在 1999 年和 2003 年, H9N2 病毒在中国的香港和大陆引起人类感染并出现轻微的呼吸道疾病症状<sup>[5-6]</sup>。基因分析显示 H9N2 病毒具有与 1997 年在香港引起人类死亡的 H5N1 病毒相似的部分基因信息<sup>[5]</sup>。进一步的研究发现流行的 H9N2 毒株具有与人类呼吸道上皮细胞受体相结合的特异性(即在 226 位点具有亮氨酸)<sup>[7]</sup>。此外,目前证实 H9N2 病毒已从陆地家禽到哺乳动物(例如猪)的种间传播,且在我国猪群中具有较高的阳性率<sup>[8-10]</sup>。同时, H9N2 亚型病毒与人源性 H3N2 亚型病毒在猪群中同时传播<sup>[11]</sup>, 这样为 H9N2 亚型病毒的进一步重组创造了条件。因此,在猪体内循环传播的 H9N2 亚型病毒具有引起人类新型流感流行的潜在威胁。H9N2 猪流感病毒(H9N2 SIV)的公共卫生意义引起人们的广泛关注,加强 H9N2 SIV 对哺乳动物致病机理尤其是肺损伤机理的研究对于预防和

治疗将来潜在人类感染将具有重要意义。

尽管 H9N2 SIV 分离株对猪致病力较弱,同时文献中已经报道 H9N2 SIV 能够引起小鼠出现以肺部损伤为主的严重感染或致死性感染<sup>[12]</sup>,但是有关 H9N2 SIV 对哺乳动物致病的机理及其肺损伤动物模型的研究却未见报道。鉴于上述原因,本试验采用 H9N2 SIV 感染建立小鼠急性肺损伤的动物模型,为进一步开展 H9N2 SIV 对哺乳动物肺损伤机理的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 H9N2 亚型猪流感病毒和实验动物

SI A/swine/HeBei/012/2008/(H9N2) 病毒(本实验室分离,经中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物流感重点开放实验室鉴定,其部分基因序列号为 Y063662、CY063663、CY063664 和 Y063665。将该病毒经 10 日龄 SPF 鸡胚(北京实验动物中心提供)盲传 3 代,收集死亡的鸡胚感染性尿囊液,分装后于  $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,待用。

6 日龄 SPF 鸡胚  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  继续孵化至 10 日龄,待用;80 只 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,均购于北京梅里亚通实验动物中心。

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物分组与感染 80 只 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠随机分成 2 组,每组 40 只。试验组用灭菌生理盐水 5 倍稀释的含有 H9N2 SIV 的鸡胚尿囊液经鼻腔接种小鼠,接种剂量为每只 0.1 mL(约含  $1 \times 10^3 \text{ MLD}_{50}$ )。对照组小鼠采取相同途径接种 0.1 mL 的经灭菌生理盐水 5 倍稀释的正常鸡胚尿囊液。接种后的小鼠隔离饲养于二级生物安全实验室,采取自由饮水和采食。每组内各

取8只小鼠,每天定时称量体质量、采食量,同时观察小鼠的临床症状和统计死亡率。

**1.2.2 小鼠肺组织病理变化的动态观察** 在感染后的第2、4、6、8、14天,每组处死4只小鼠,取左肺的一部分固定于10%的甲醛液内,经石蜡包埋,做成4  $\mu\text{m}$ 的切片,HE染色,观察组织学变化。

**1.2.3 感染后小鼠肺系数和肺湿质量与肺干质量比变化的动态观察** 在感染后的第2、4、6、8、14天,每组各取4只小鼠,分别称量体质量,处死,称量全肺湿质量;称量右侧肺湿质量后,置于80  $^{\circ}\text{C}$ 温箱中,直至质量不再变化为止,称量右肺的干质量,然后分别计算肺系数和湿质量与干质量比值,衡量肺水肿的严重程度<sup>[13]</sup>。

**1.2.4 血气分析** 参照Fagan等描述的方法稍加改进进行,即在感染后的第2、4、6、8、14天,每组取4只小鼠轻微麻醉,进行仰卧固定(注意确保小鼠呼吸不受影响),采用26号针经皮肤刺入左心室,采取肝素抗凝血0.4 mL,注射器针头抽出后立即插入小橡皮塞内,用手轻轻搓动注射器,使肝素与血液充分混合。使用IL/1620型全自动血气分析仪立即测定血气指标<sup>[14]</sup>。

**1.2.5 小鼠肺泡灌洗液内炎性细胞变化的观察**

在感染后的第2、4、6、8、14天,将试验组和对照组小鼠经断颈方法处死。参照London等描述的方法收集支气管肺泡灌洗液(BALF),即处死小鼠后立即剥离气管,气管插管后分2次注入4  $^{\circ}\text{C}$ 的灭菌生理盐水,进行支气管肺泡灌洗,每次注入0.5 mL。反复灌洗3~4次,抽吸后注于1.5 mL EP管中,每只小鼠BALF的回收率应大于80%<sup>[3]</sup>。

取BALF 0.1 mL,用白细胞稀释液作1:5倍稀释,在血细胞计数板上进行白细胞总数计数。然后以1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,获得细胞沉渣,涂片、固定,常规瑞氏染色,光学显微镜(油镜)下计数至少200个细胞,并进行淋巴细胞、肺泡巨噬细胞和多型核白细胞分类计数。

### 1.3 试验数据统计分析

试验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,SPSS13.0统计软件包进行 $t$ 检验(Independent sample  $t$  test), $P < 0.05$ 判为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 临床症状和大体病理学观察

试验组小鼠在接种病毒后的第2天开始出现轻

微的精神沉郁,采食量下降,活动减少,被毛粗乱。在接种后的第3天大部分小鼠出现高度的精神沉郁,蜷缩于鼠笼一隅,被毛粗乱,弓背,呼吸频率加快,显示出现极度呼吸困难,呼吸音明显;采食量明显减少,体质量下降,约为正常小鼠体质量的80%,体质量变化趋势见图1。随着时间的延长,上述症状更为明显,至接种后的第3天末小鼠出现死亡,试验期内8只小鼠中有5只死亡,死亡率为62.5%。剖检可见肺部明显水肿、淤血和出血,体积增大;支气管内流出大量的血色泡沫样的液体。肝、心、脾、脑和肾未见明显的肉眼变化。对照组小鼠各器官未见异常。

### 2.2 肺病理组织学变化

感染小鼠病理组织学变化以肺部最为明显。感染后的第2天,试验组小鼠主要表现为细支气管和小血管周围间质水肿、疏松,有少量炎性细胞渗出,尤以肺边缘最为明显。肺泡腔内有以嗜中性细胞为主的炎性细胞、红细胞和大量的粉红色的蛋白渗出物和水肿液(图2B);在感染后的第4天肺泡壁水肿、增厚,肺泡腔变小,肺间质增宽,出现间质性肺炎病变;血管和细支气管周围的间质明显疏松水肿,支气管部分黏膜上皮细胞坏死,脱落;肺组织出血明显,在肺泡腔和间质内有大量的红细胞(图2C)。在感染后的第6天,炎症进一步发展,大量的炎性细胞渗出,形成细支气管性肺炎(图2D)。对照组小鼠肺组织未见异常变化(图2A)。其他肺外器官的组织学变化表现为不同程度的充血、出血和炎性细胞渗出。

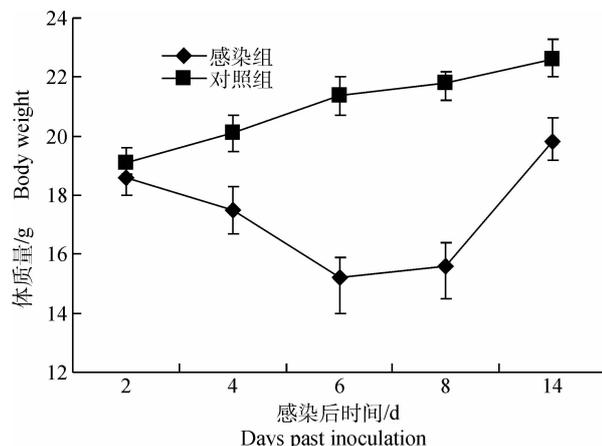
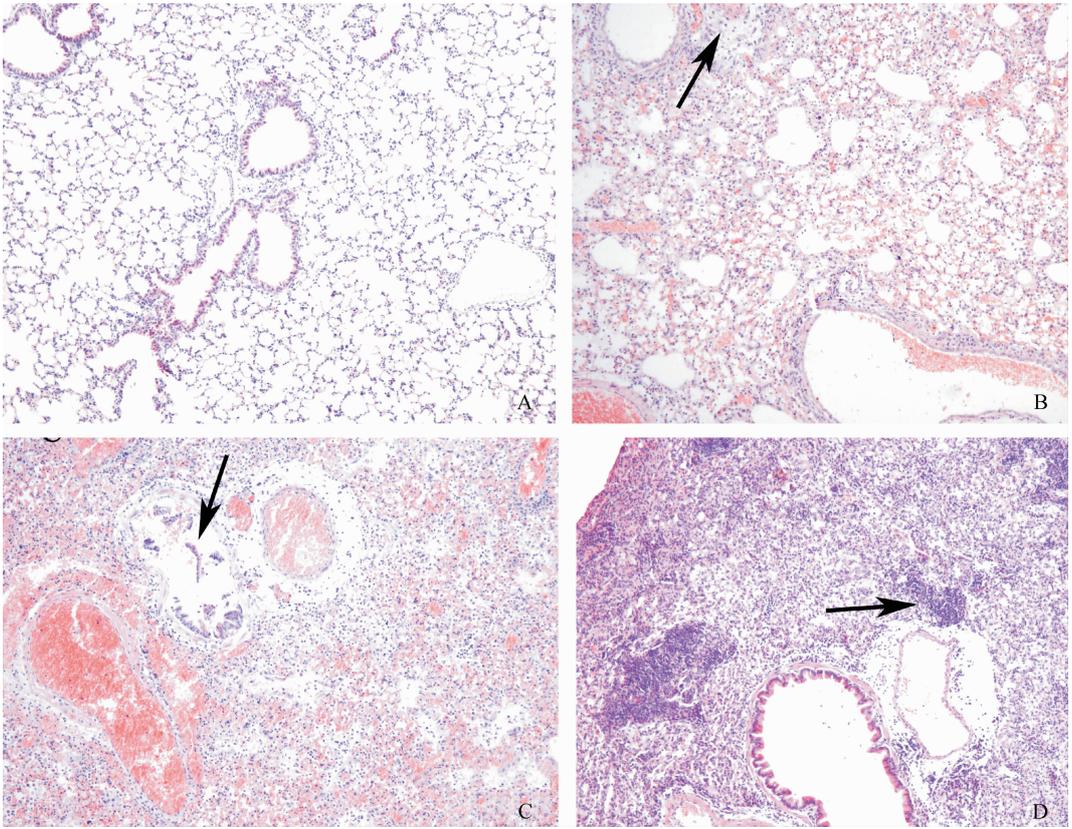


图1 H9N2 SIV感染小鼠后的体质量变化

Fig. 1 Weight change of H9N2 SIV infected mice



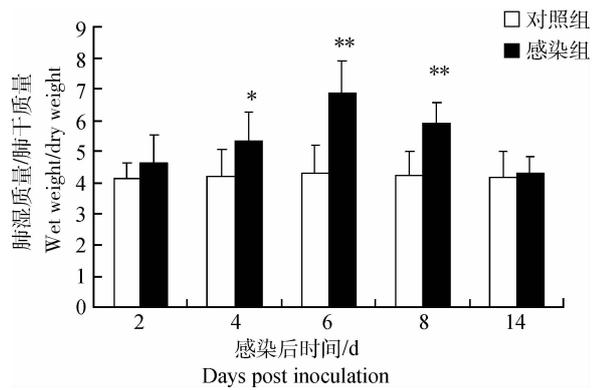
A 为对照组小鼠肺组织; B、C 和 D 分别为第 2、4 和 6 天感染组小鼠肺组织  
 Fig. A showed the lung of control group; Fig. B、C and D showed the lungs of 2, 4 and 6 days after inoculation of infected group

图 2 H9N2 病毒感染后小鼠肺组织学变化 (HE 染色, 100×)  
 Fig. 2 The changes of lung histopathology of H9N2 SIV infected mice (HE, 100×)

### 2.3 肺水肿的评估

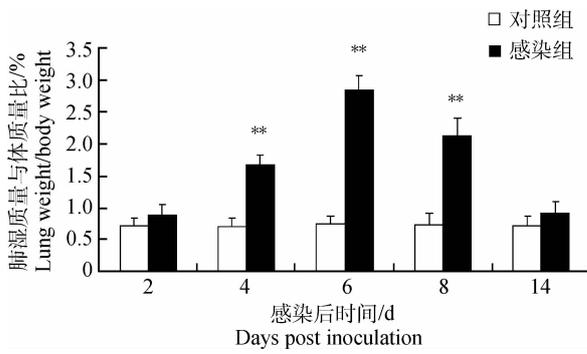
2.3.1 病毒感染后肺湿质量与干质量比 (W/D) 变化 从感染后的第 2 天, 试验组与对照组相比, 肺湿质量出现轻微的增加, 但是 W/D 并没有统计学意义上的变化。然而至感染后的第 4 天, 试验组小鼠的肺湿质量明显增加, 与对照组相比 W/D 显著差异 ( $P < 0.05$ ); 至感染后的第 6 天, 肺湿质量进一步增加, W/D 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 感染后的第 8 天开始小鼠逐渐恢复, W/D 呈下降的趋势, 但与对照组相比仍差极显著 ( $P < 0.01$ ); 至感染后的第 14 天已基本接近正常, 详见图 3。

2.3.2 肺系数变化 由图 4 可见, 在感染后的第 2 天, 试验组小鼠的肺系数与对照组相比无显著差异, 但是至感染后的第 4 天, 与对照组相比, 试验组小鼠的肺系数显著增加 ( $P < 0.01$ ); 从接种后的第 6 天开始至第 8 天, 试验组小鼠的肺系数明显增加, 显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。至感染后 14 天, 试验组小鼠肺系数与对照组小鼠相比已无明显差异 ( $P > 0.05$ )。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$   
 图 3 H9N2 SIV 感染小鼠后肺湿质量与干质量比 (W/D)  
 Fig. 3 Lung wet weight/dry weight (W/D) of H9N2 SIV infected mice

2.3.3 血气分析结果 感染后第 2 天, 试验组小鼠的动脉血氧分压 ( $PaO_2$ )、血氧饱和度 ( $SaO_2$ ) 开始降低, 二氧化碳分压 ( $PaCO_2$ ) 升高 ( $P < 0.05$ ), 血液



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图 4 H9N2-SIV 感染小鼠后肺湿质量与体质量比

Fig. 4 Lung wet weight/ weight of H9N2-SIV-infected mice

pH 下降,此时试验组小鼠临床观察未见呼吸异常;在感染后的第 6 天,试验组小鼠 PaO<sub>2</sub> 和 SaO<sub>2</sub> 明显降低,与对照组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ),此时 PaCO<sub>2</sub> 显著升高,血液 pH 下降,临床上试验组小鼠也出现明显的呼吸急促、腹式呼吸以及呼吸音。到感染后的第 8 天,基本与第 6 天相似,只是 PaO<sub>2</sub> 和 SaO<sub>2</sub> 下降更明显,仅为正常小鼠的 1/2,PaCO<sub>2</sub> 升高幅度更大。到感染后 14 天存活小鼠以上指标基本接近正常,与对照组相比已无显著差异。血气分析结果见表 1。

表 1 H9N2 猪流感病毒感染后小鼠的血气分析结果

Table 1 Blood-gas analysis of H9N2-SIV-infected mice

时间 Time	氧分压/kPa PaO <sub>2</sub>		二氧化碳分压/kPa PaCO <sub>2</sub>		pH		氧饱和度/% SaO <sub>2</sub>	
	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>	A <sup>†</sup>	B <sup>†</sup>
	第 2 天 The 2 <sup>nd</sup> day	11.6 ± 1.08	12.39 ± 1.23	5.56 ± 0.31	5.28 ± 0.43	7.39 ± 0.035	7.36 ± 0.071	89.3 ± 1.83
第 4 天 The 4 <sup>th</sup> day	9.38 ± 1.45 *	12.17 ± 1.46	5.98 ± 0.26	5.27 ± 0.31	7.26 ± 0.079	7.34 ± 0.052	84.1 ± 2.14 *	93.2 ± 0.95
第 6 天 The 6 <sup>th</sup> day	6.79 ± 1.27 * *	12.51 ± 0.84	7.45 ± 0.87	5.16 ± 0.82 *	7.23 ± 0.065	7.35 ± 0.027	78.3 ± 3.78 * *	92.6 ± 1.52
第 8 天 The 8 <sup>th</sup> day	8.85 ± 1.42 * *	12.36 ± 1.28	7.39 ± 0.43	5.21 ± 0.30 *	7.31 ± 0.086	7.36 ± 0.043	86.4 ± 2.19 * *	91.9 ± 1.74
第 14 天 The 14 <sup>th</sup> day	11.4 ± 1.31	12.38 ± 1.74	5.62 ± 0.85	5.29 ± 0.76	7.35 ± 0.047	7.37 ± 0.067	90.1 ± 2.34	93.4 ± 2.82

† A 为 H9N2 病毒感染组, B 为非感染性尿囊液模拟感染对照组, 与对照组相比 \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。下表同

† A represented the group of infected mice; B represented the group of mock-infected mice inoculated with noninfectious allantoic fluid. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . The same as below

### 2.4 支气管肺泡灌洗液中炎性细胞的变化

试验组与对照组相比,感染小鼠的 BALF 中炎性细胞总数从第 2 天即出现增加,至感染后的第 4 天明显增加 ( $P < 0.05$ );在感染后的第 6—8 天显著增加 ( $P < 0.01$ )。从感染后的第 2 天, BALF 中多型核白细胞、淋巴细胞所占比例开始增加,尤其多型

核白细胞的数量增加明显 ( $P < 0.01$ ),与之相比,肺泡巨噬细胞所占比例略有下降;这种变化在 6 天达到最高,此时与对照组相比差异显著;从感染后的第 8 天开始淋巴细胞和多型核白细胞的数量呈下降的趋势,但与对照组相比差异仍然显著;至感染后的第 14 天,与对照组小鼠无明显差异。

表 2 支气管肺泡灌洗液中白细胞总数及分类计数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The sum and differential counts of leukocytes in BALF

时间 Time	组别 Group	白细胞总数/ $(1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1})$ WBC Summary	分类计数/% WBC Count		
			巨噬细胞 Macrophages	淋巴细胞 Lymphocytes	多型核白细胞 PMNs
第 2 天	A <sup>†</sup>	2.89 ± 0.37 *	46.26 ± 4.73 *	45.12 ± 3.75 *	2.96 ± 1.43 **
The 2 <sup>nd</sup> day	B <sup>†</sup>	1.47 ± 0.36	65.9 ± 8.51	32.37 ± 6.69	0.98 ± 0.63
第 4 天	A <sup>†</sup>	4.18 ± 0.32 **	37.7 ± 6.37 **	56.39 ± 4.27 **	6.04 ± 2.31 **
The 4 <sup>th</sup> day	B <sup>†</sup>	1.89 ± 0.61	73.74 ± 4.69	21.64 ± 5.12	2.87 ± 0.33
第 6 天	A <sup>†</sup>	12.69 ± 2.13 **	25.12 ± 3.54 **	47.37 ± 3.76 **	21.64 ± 4.47 **
The 6 <sup>th</sup> day	B <sup>†</sup>	1.74 ± 0.41	82.23 ± 2.47	18.32 ± 5.54	1.42 ± 0.39
第 8 天	A <sup>†</sup>	9.38 ± 3.95 **	28.25 ± 1.62 **	42.42 ± 4.73 **	18.43 ± 6.27 **
The 8 <sup>th</sup> day	B <sup>†</sup>	1.48 ± 0.62	87.52 ± 3.65	10.75 ± 3.19	0.92 ± 0.34
第 14 天	A <sup>†</sup>	2.21 ± 0.84	64.34 ± 4.28	36.53 ± 3.32	2.15 ± 0.38
The 14 <sup>th</sup> day	B	1.38 ± 0.25	88.78 ± 1.62	9.21 ± 1.75	0.91 ± 0.42

PMNs . Polymorphonuclear leukocytes; WBC. White blood cell.

### 3 讨论

猪作为禽流感和人流感病毒的中间宿主,在人类流感的流行过程中起着十分重要的作用。H9N2 猪流感病毒是目前引起猪流感发生最主要的病毒亚型之一,而且目前已经发现了人-禽-猪流感病毒组成的重组毒株,如果这种毒株具有与人类细胞表面受体结合的能力,那么人类就将面临 H9N2 猪流感流行的威胁。

**3.1** 本试验采用 A/swine/HeBei/012/2008 (H9N2) 病毒感染 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,感染后表现为精神沉郁,采食量减少,体质量轻微下降。在感染后的第 3~8 天小鼠表现为呼吸频率增加,呼吸窘迫,62.5% 的小鼠死亡。剖检变化肺部呈暗红色淤血和出血,明显水肿,支气管内有大量的血红色的泡沫样液体流出。同时,感染小鼠的肺系数显著增加。这些变化说明肺组织有大量水分渗出,引起肺湿质量与干质量比显著增加,但是其变化程度不如肺系数明显,提示除了大量的水分渗出到肺部外,同时有大量的炎性细胞或蛋白渗出,引起肺干质量的增加。组织病理学观察证实 H9N2 猪流感病毒感染引起弥漫性急性渗出性炎症为特征的病毒性肺炎,即表现为肺泡、间质明显水肿,肺泡腔内及间质内有大量的炎性细胞渗出,形成间质性肺炎;细支气管周围以及管腔内有大量的炎性细胞,红细胞

以及脱落的黏膜上皮碎片,呈现支气管肺炎。我们的试验结果基本与 ALI/ARDS 的病理组织学特征相一致。因为在其它动物模型研究表明 ALI/ARDS 的肺部病理变化的特征:(1)肺泡上皮和血管内皮细胞损伤;(2)弥漫性的炎性细胞集聚;(3)肺泡血管对血浆蛋白的通透性增加导致间质炎性水肿;(4)在肺泡腔内有高含量蛋白成分的水肿存在;同时,这些变化与 London 等用呼肠孤 1/L 病毒株感染 CBA/J 系小鼠诱导 ALI/ARDS 的发生过程中的病理组织学变化相似,即感染后以最初的细支气管片状肺炎进而发展为滤泡性支气管炎和血管周围淋巴滤泡炎为特征<sup>[3]</sup>。此外,邓光存、乔健等利用禽源性 H9N2 病毒研究对小鼠肺损伤时也发现了与本试验结果相类似的病理过程<sup>[15]</sup>。因此,我们用 A/swine/HeBei/012/2008(H9N2) 病毒经鼻腔接种小鼠,感染小鼠肺部的病理变化特征符合 ALI 的特征,即首先出现片状肺炎-病毒性肺炎-ALI/ARDS 的过程。

**3.2** 严重的低氧血症是急性呼吸窘迫综合征的又一显著特征。具有通气功能肺泡的数量、肺泡-毛细血管之间的厚度均可影响肺泡中吸入的氧气与血液中红细胞交换<sup>[16]</sup>。研究表明导致肺泡上皮和血管内皮细胞损伤的病毒感染可以增加肺泡-毛细血管膜的厚度,影响氧的交换,导致低氧血症的发生<sup>[17]</sup>。在 A/swine/HeBei/012/2008(H9N2) 病毒感染导致肺部出现严重的病理组织学的损伤,为了证实病

毒感染过程是否发生了低氧血症,本研究测定了病毒感染过程中动脉血气的变化。结果表明,感染后小鼠的动脉血氧分压和血氧饱和度明显下降,二氧化碳分压显著升高,显示小鼠出现严重的低氧血症( $\text{PaO}_2$ 为 $6.79\text{ kPa}\pm 1.27\text{ kPa}$ ,低于 $8\text{ kPa}$ , $\text{PaCO}_2$ 为 $7.45\text{ kPa}\pm 0.87\text{ kPa}$ ,高于 $6.67\text{ kPa}$ )。此时小鼠的肺组织学的相应变化表现弥漫性肺泡损伤,影响小鼠肺泡和毛细血管之间的换气功能,因而造成渐进性的低氧血症发生,临床上小鼠表现呼吸频率加快,出现呼吸窘迫和衰竭。这些结果表明在A/swine/HeBei/012/2008(H9N2)病毒感染过程中导致了小鼠发生了渐进性的严重的低氧血症的发生。

本研究通过鼻腔接种 $100\ \mu\text{L}$  A/swine/HeBei/012/2008(H9N2)病毒,小鼠表现出急性发病、呼吸急迫和呼吸困难;病理组织学变化特征以弥漫性肺泡损伤为主;气体交换发生渐进性的低氧血症等均符合于ALI/ARDS的临床和病理生理变化特征。因此,我们使用A/swine/HeBei/012/2008(H9N2)猪流感病毒成功诱导小鼠急性肺损伤的发生,建立了H9N2猪流感病毒诱发BALB/c小鼠ALI动物模型。此外,Herfst等利用新型甲型H1N1病毒感染食蟹猴,发现该病毒也是引起以弥漫性肺泡损伤为主的肺部病理变化<sup>[16]</sup>,这种变化与H9N2 SIV感染小鼠的发展过程具有相似之处。因此,本试验建立的H9N2 SIV感染小鼠的肺损伤模型为今后预防和治疗H9N2 SIV的感染以及探讨新型甲型H1N1病毒诱导人类急性肺损伤的治疗研究具有一定的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] BERNART G R. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172: 798-806.
- [2] BERNART G R, ARTIGAS A, BRIGHAM K L, et al. The american-european consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 149: 818-824.
- [3] LONDON L, MAJESKI E I, PAINTLIA M K, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of diffuse alveolar damage: A model of acute respiratory distress syndrome [J]. *Exp Mol Pathol*, 2002, 72: 24-36.
- [4] HUDSON L D, STEINBERG K P. Epidemiology of acute lung injury and ARDS [J]. *Chest*, 1999, 116: 74-82.
- [5] LIN Y P, SHAW M, GREGORY V, et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 9654-9658.
- [6] BUTT K M, SMITH G J, CHEN H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 5760-5767.
- [7] WAN H, PEREZ D R. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells [J]. *J Virol*, 2007, 81: 5181-5191.
- [8] CONG Y L, PU J, LIU Q F, et al. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China [J]. *J Gen Virol*, 2007, 88: 2035-2041.
- [9] YU H, HUA R H, WEI T C, et al. Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 131: 82-92.
- [10] CONG Y L, WANG C F, YAN C M, et al. Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004 [J]. *Virus Genes*, 2008, 36: 461-469.
- [11] PEIRIS J S, GUAN Y, MARKWELL D, et al. Co-circulation of avian H9N2 and contemporary "human" H9N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: Potential for genetic reassortment? [J]. *J Virol*, 2001, 75: 9679-9686.
- [12] 李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 部分省市猪群猪流感的血清学调查及猪流感病毒的分离与鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2003, 67-72.
- [13] MAJESKI E I, PAINTLIA M K, LOPEZ A D, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of intraluminal fibrosis, a model of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, is dependent on T lymphocytes [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 1467-1479.
- [14] FAGAN K A, FOUTY B W, TYLER R C, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: 291-299.
- [15] DENG G, BI J, KONG F, et al. Acute respiratory distress syndrome induced by H9N2 virus in mice [J]. *Arch Virol*, 2010, 155: 187-195.
- [16] HERFST S, VAN DEN BRAND J M, SCHRAUWEN E J, et al. Pandemic 2009 H1N1 influenza virus causes diffuse alveolar damage in cynomolgus macaques [J]. *Vet Pathol*, 2010, 47: 1040-1047.
- [17] HEADLEY A S, TOLLEY E, MEDUEI G U. Infection and inflammatory response in acute respiratory distress syndrome [J]. *Chest*, 1997, 111: 1306-1321.