

H5N1 亚型禽流感病毒感染番鸭引起肺损伤和脑损伤的机制探索

李奇^{1,2,3#}, 叶昱^{5#}, 佟铁铸^{6#}, 刘洁^{1,2,3}, 刘杨^{1,2,4}, 章震^{1,2,4},
苗配思^{1,2,4}, 高应棋^{1,2,4}, 张娇^{1,2,4}, 樊惠英^{1,2,3,4*}, 廖明^{1,2,3,4*}

(1. 华南农业大学 兽医学院, 广州 510642; 2. 人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室, 广州 510642;
3. 农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广州 510642; 4. 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642;
5. 江西农业大学 动物科技学院, 南昌 330045; 6. 惠州出入境检验检疫局, 惠州 516006)

摘要: 旨在初步探讨 H5N1 禽流感病毒引起番鸭肺和脑组织损伤的潜在机制。采用两株 H5N1 禽流感病毒 DK383 (A/Duck/Guangdong/383/2008) 和 DK212 (A/Duck/Guangdong/212/2004) 分别感染番鸭, 于感染后 1、2 和 3 d 取肺、脑组织, 进行病理学观察, 并检测病毒复制水平及损伤相关因子的变化情况。结果表明, DK383 株感染番鸭后, 引起明显的呼吸困难和神经症状, 致死率为 70%, DK212 株则无明显临床症状。病理组织学变化显示, DK383 感染番鸭后造成了肺损伤和脑损伤, 大脑组织神经元发生广泛性变性、坏死, 肺淤血出血严重; 而 DK212 组和空白组未见明显病理变化。与 DK212 株相比, DK383 株在肺和脑组织内的病毒复制水平更高, 激活 TLR-TRIF-TRAF6 通路的能力更强, 诱导了更强的免疫反应。本研究提示, DK383 在番鸭肺和脑组织高水平复制, 引起番鸭产生过度的先天免疫应答反应, 从而造成肺和脑组织损伤。

关键词: 禽流感病毒; H5N1 亚型; 调控; 损伤

中图分类号: S858.325.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)05-0962-08

The Mechanism of Lung Injury and Brain Injury in Muscovy Ducks Infected with H5N1 Avian Influenza Virus

LI Qi^{1,2,3#}, YE Yu^{5#}, TONG Tie-zhu^{6#}, LIU Jie^{1,2,3}, LIU Yang^{1,2,4}, ZHANG Zhen^{1,2,4},
MIAO Pei-si^{1,2,4}, GAO Ying-qi^{1,2,4}, ZHANG Jiao^{1,2,4}, FAN Hui-ying^{1,2,3,4*}, LIAO Ming^{1,2,3,4*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonosis Prevention and Control, Guangzhou 510642, China;
3. Key Laboratory of Animal Vaccine Development, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China;
4. Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China;
5. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
6. Huizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Huizhou 516006, China)

Abstract: This experiment was conducted to preliminarily investigate the mechanisms of lung injury and brain injury in duck infected with avian influenza virus. Ducks were intranasally infected with DK383 virus (A/Duck/Guangdong/383/2008) and DK212 virus (A/Duck/Guangdong/212/

收稿日期: 2015-10-22

基金项目: 广东省自然科学基金(2014A030313462); 广东省 H7N9 禽流感科技发展专项(20140224); H7N9 联合研究专项[(2014) No. 1046]

作者简介: 李奇(1991-), 男, 河南长垣人, 硕士生, 主要从事动物传染病的研究, E-mail: liqi19910705@126.com; 叶昱(1986-), 男, 湖南长沙人, 助理研究员, 主要从事动物传染病的研究, E-mail: yy6157832@163.com; 佟铁铸(1979-), 男, 辽宁沈阳人, 兽医师, 硕士; # 对本文贡献相同, 同为第一作者

* 通信作者: 廖明, 男, 教授, E-mail: mliao@scau.edu.cn; 樊惠英, 教授, E-mail: fanhy@scau.edu.cn

2004), respectively. The lung and brain were collected at 1, 2, and 3 days post infection (dpi) for pathological observation, RNA extraction and detection of the proliferation of virus. The expression of several genes mRNA were detected by RT-PCR. DK383 was highly pathogenic with high mortality rate of 70% and severe neurological sign. The histopathological observation of duck infected with DK383 showed extensive neuronal degeneration and necrosis occurred in the brain tissue, severe acute congestion and hemorrhage in the lung. Compared to DK212, DK383 replicated more efficiently in the lung and brain and activated TLR-TRIF-TRAF6 signaling more strikingly. The improper regulation of DK383-induced immune response and the viral replication competent are correlated with the severity of the disease.

Key words: avian influenza virus; H5N1 subtype; regulate; injury

水禽是禽流感病毒的自然宿主,是流感病毒重组的供体片段来源和散播病毒的重要传染源^[1],在流感病毒生态系统中扮演重要角色。鸭种群数量众多和特有的水稻种植方式使其与人有机会频繁接触^[2],进而增加禽流感病毒跨物种传播的概率,同时也加大了人感染禽流感的风险。因此,加快禽流感病毒对家鸭的致病性研究显得尤为重要。

病毒感染后,宿主免疫反应被激活,造成细胞因子的分泌紊乱,形成细胞因子风暴,导致宿主组织和细胞的损伤,是高致病性禽流感病毒(highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV)引起动物发病和死亡的重要原因。研究证实 H5N1 亚型 HPAIV 感染能够激活 TLR4-TRIF-TRAF6 信号通路,启动下游分子的级联反应,小鼠肺内的活性氧含量增加,导致严重的致死性肺损伤(acute respiratory distress syndrome, ADRS)。而 TLR4 基因缺失小鼠可以耐受药物诱发的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)^[3]。

H5N1 亚型禽流感病毒在作为水禽的家鸭内是否存在类似致病或者损伤机制? 哪些宿主因子可能参与肺损伤或脑炎的致病进程? 不同毒力毒株感染后宿主反应是否存在差异? 这些问题的答案目前还尚不得知。因此,作者检测了两株鸭源 H5N1 亚型 AIV 感染番鸭后,肺和脑组织的病毒载量以及 TLR3、TLR4、TRIF、TRAF6 等致病关键因子变化情况,在活体组织水平分析和探索潜在的流感病毒致病或损伤机制。

1 材料与方法

1.1 病毒和动物

DK383 (A/Duck/Guangdong/383/2008) 和 DK212 (A/Duck/Guangdong/212/2004) 均为鸭源

H5N1 亚型禽流感病毒^[4],由农业部兽用疫苗创制重点实验室保存。9 日龄 SPF 鸡胚购自新兴大华农有限公司,1 日龄非免疫的健康番鸭购自广州三水番鸭场,经血清学检测为禽流感病毒抗体阴性。有关病毒感染及相关试验均在华南农业大学动物生物安全三级(Animal biosafety level 3, ABSL-3)实验室中进行。

1.2 主要试剂和仪器

QuantiNova™ SYBR® Green PCR 试剂盒为 Qiagen 公司产品, RNA 抽提试剂盒 Direct-zol™ RNA MinPrep 为 Zymo research 公司产品。PrimeScript™ 逆转录试剂盒为 TaKaRa 公司产品。ABI7500 Real Time PCR system(美国 Applied Biosystems 公司),冷冻离心机(Eppendorf 5430R),Elix100 纯净水装置(美国 Millipore 公司),电子分析天平(德国 Sartorius 公司),YJ-1450SA 型超净工作台(苏州市净化设备厂)。

1.3 试验分组及感染

取 21 日龄番鸭 60 只,平均分成三组,以点眼和滴鼻途径分别接种 200 μ L 10^6 EID₅₀ 病毒液或 PBS,连续观察 14 d,详细地记录番鸭的临床症状和死亡情况。攻毒后第 1、2 和 3 天,每组随机选取 3 只番鸭进行剖杀,分别采集脑和肺两种脏器,用于病毒分离、组织标本固定和相关基因检测。

1.4 病理组织标本制备

将肺和脑新鲜病料用 4% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,制备 5 μ m 厚切片,HE 染色,光学显微镜观察。

1.5 病毒在番鸭体内脏器中复制水平的测定

称取 1 g 采集的各组织样品研磨,经抗生素处理,将各脏器匀浆上清液按 10 倍比连续稀释,每个稀释度分别经尿囊腔途径接种 3 枚 9~10 日龄非免

疫鸡胚(0.1 mL·枚⁻¹),收集鸡胚尿囊液,测定血凝价,利用 Reed-Muench 法分别计算两株病毒在番鸭体内脏器复制水平。

1.6 RNA 抽提

取 1 g 肺、脑组织样品,研磨至粉碎,根据 Direct-zol™ RNA MiniPrep 说明书提取总 RNA;取 0.5 μg 按照 PrimeScript™ 逆转录试剂盒进行反转录合成 cDNA。

表 1 本研究所用荧光定量引物

Table 1 Primers used for real-time PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence		基因查询号 GenBank accession number
	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	
<i>TLR3</i>	GAGTTTCACACAGGATGTTTAC	GTGAGATTTGTTTCCTTGCAG	XM_005008981.1
<i>TLR4</i>	TTGATGCCCTGAGAGAAGCA	TCTGTTGACCTGTAGCCCTG	JN048668.1
<i>TNF-α</i>	ATGAACCCTCCTCCGTACAC	TCTGAACTGGGCGGTCATAA	EU375296.1
<i>IL-6</i>	TGCGAGAAGTTCACCGTCTG	GCATTTCTCCTCGTCGAAGCC	JQ728554.1
<i>TRAF6</i>	AGAGGAATGAACTGGCACG	GAAGAGGGCAGGCTCAAATG	XM_005011330.1
<i>TRIF</i>	CTGTCAGCCAACCTGTTGAA	GAACAGGCTGAAGTGGAAGC	KJ466051.1
<i>NF-κB</i>	ATGTGGGAAGGCTTTGGAGA	AGGCTGGCTTTGTGATGTTG	XM_005017681.1
<i>GAPDH</i>	ATGTTCTCGTGATGGGTGTGAA	CTGTCTTCGTGTGTGGCTGT	AY436595.1

1.8 统计学分析

依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算各个待测目基因与内参基因(*GAPDH*)的比值。荧光定量的数据导入 GraphPad Prism 5 软件(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)统计和分析标准偏差(*s*)和差异水平。

2 结果

2.1 两株 H5N1 亚型 AIVs 感染后番鸭的临床症状和死亡率

感染后第 1、2 天,DK383 组番鸭表现正常,无明显临床症状,剖检各组织脏器,无肉眼可见的病理变化。感染后第 3 天,DK383 组 14 只番鸭扎堆现象明显,精神沉郁,对外界刺激不敏感,采食量减少。3 只(3/14)番鸭出现神经症状,歪脖和甩头明显,共济失调,并伴有急促张口呼吸。剖检发现,鸭喙出血,脾肿大发黑,脑出血轻微,呈浅红色,小肠出血。从感染后第 4 天开始,DK383 组陆续有番鸭死亡,至第 14 天存活 3 只。DK212 组与 PBS 组鸭群无死亡现象发生,无明显异常,剖检未见明显病理变化。结果表明,DK383 对番鸭具有高致病性,DK212 对

1.7 荧光定量分析目的基因转录量

利用在线设计软件([http://bioinfo. ut. ee/ primer3/](http://bioinfo.ut.ee/primer3/))设计荧光定量引物,引物信息如表 1 所示。PCR 反应程序:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 5 s;60 °C 退火加延伸 32 s,共 40 个循环。反应完成后启动熔解曲线分析:95 °C 变性 15 s,以 55 °C 为起点,缓慢升温至 100 °C,每个温度间隔维持 30 s,程序结束后系统自动生成各个样品的 *C_t* 值和产物的 *T_m* 值。

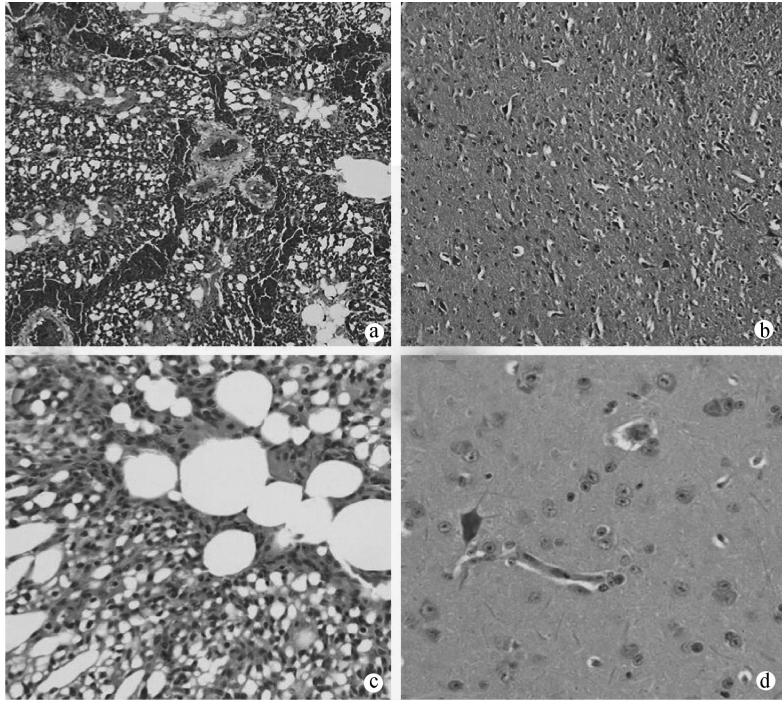
番鸭致病性较弱。

2.2 病理组织学变化

组织学检查发现,DK383 感染番鸭后,肺出血严重(图 1a);大脑神经元广泛性变性、坏死,神经元周围胶质细胞增生(图 1b),DK212 组(图 1c、d)和空白组未见明显上述病理变化。病理组织学变化显示,DK383 感染后第 3 天导致了番鸭肺损伤和脑损伤。

2.3 病毒在番鸭肺和脑组织器官中复制水平

病毒的致病性与病毒复制能力有关^[4],为比较两株禽流感病毒在番鸭体内复制能力的差异,分别于感染后第 1、2 和 3 天,检测番鸭肺和脑组织的病毒复制水平(表 2)。DK383 病毒感染番鸭后第 1 天,即可在肺和脑组织检测到流感病毒,DK212 感染番鸭后第 1 天,只在肺检测到病毒。两株病毒感染后第 2、3 天,肺和脑组织病毒滴度均有升高,DK383 组肺和脑组织的病毒滴度显著高于 DK212 ($P < 0.05$)。PBS 组番鸭肺和脑组织均未检测到病毒。结果表明,与弱毒 DK212 相比,DK383 在番鸭肺和脑组织复制能力更强。



a. DK383 感染后第 3 天, 番鸭肺组织, 200 \times ; b. DK383 感染后第 3 天, 番鸭脑组织, 200 \times ; c. DK212 感染后第 3 天, 番鸭肺组织, 400 \times ; d. DK212 感染后第 3 天, 番鸭脑组织, 400 \times

a. The lung of the 3rd day from DK383-infected group, 200 \times ; b. The brain of the 3rd day from DK383-infected group, 200 \times ; c. The lung of the 3rd day from DK212-infected group, 400 \times ; d. The lung of the 3rd day from DK212-infected group, 400 \times

图 1 番鸭的病理组织学变化 (HE)

Fig. 1 Histopathological lesions of infected duck (HE)

表 2 禽流感病毒感染后在番鸭肺和脑组织的复制情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Virus titers in lung and brain of Muscovy ducks post infection ($\bar{x} \pm s$)

毒株 Virus	肺 Lung			脑组织 Brain		
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天
	The 1st day	The 2nd day	The 3rd day	The 1st day	The 2nd day	The 3rd day
DK383 株	2.75 \pm 0.71	4.94 \pm 0.09*	5.69 \pm 0.27*	2.13 \pm 0.18	3.25 \pm 0.71*	4.88 \pm 0.18*
DK212 株	2.88 \pm 1.24	3.13 \pm 0.18	4.75 \pm 0.36	ND	2.13 \pm 0.18	3.25 \pm 1.77
PBS	ND	ND	ND	ND	ND	ND

组织的病毒滴度以 $\log_{10} \text{EID}_{50} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示, 由平均数 \pm 标准差计算得出; ND. 未检测到病毒; * . $P < 0.05$

Virus titers are expressed as means \pm standard deviation in $\log_{10} \text{EID}_{50} \cdot \text{g}^{-1}$ of tissue; ND. Not detected; * . $P < 0.05$

2.4 病毒感染肺组织后 TLR4-TRIF-TRAF6 通路相关因子的转录

病毒在宿主体内的前期复制与病毒感染宿主后诱导宿主产生的先天免疫反应, 及过度的促炎性细胞因子的表达有关^[4]。为了研究肺流感病毒的持续复制是否引起了过度的天然免疫应答, 在病毒感染后第 1、2 和 3 天, 采用荧光定量 PCR 技术检测肺组织中 TLR4-TRIF-TRAF6 通路相关因子的 mRNA 转录水平(图 2、3)。与空白对照组相比, 病毒感染番鸭后引

起了肺 TLR4、TRIF 和 TRAF6 mRNA 的上调, 在感染后第 2 天达到峰值。DK383 诱导 TLR4、TRIF 和 TRAF6 mRNA 的转录能力显著强于 DK212。

为了比较病毒感染后肺 TLR4-TRIF-TRAF6 通路激活水平的不同对细胞因子造成的影响, 使用荧光定量 PCR 的方法检测了肺 IL-6 和 TNF- α mRNA 转录情况。结果显示(图 3), 与空白组相比, 两株病毒感染后, 引起番鸭肺 IL-6 和 TNF- α mRNA 转录量上调。DK383 组肺 IL-6 和 TNF- α

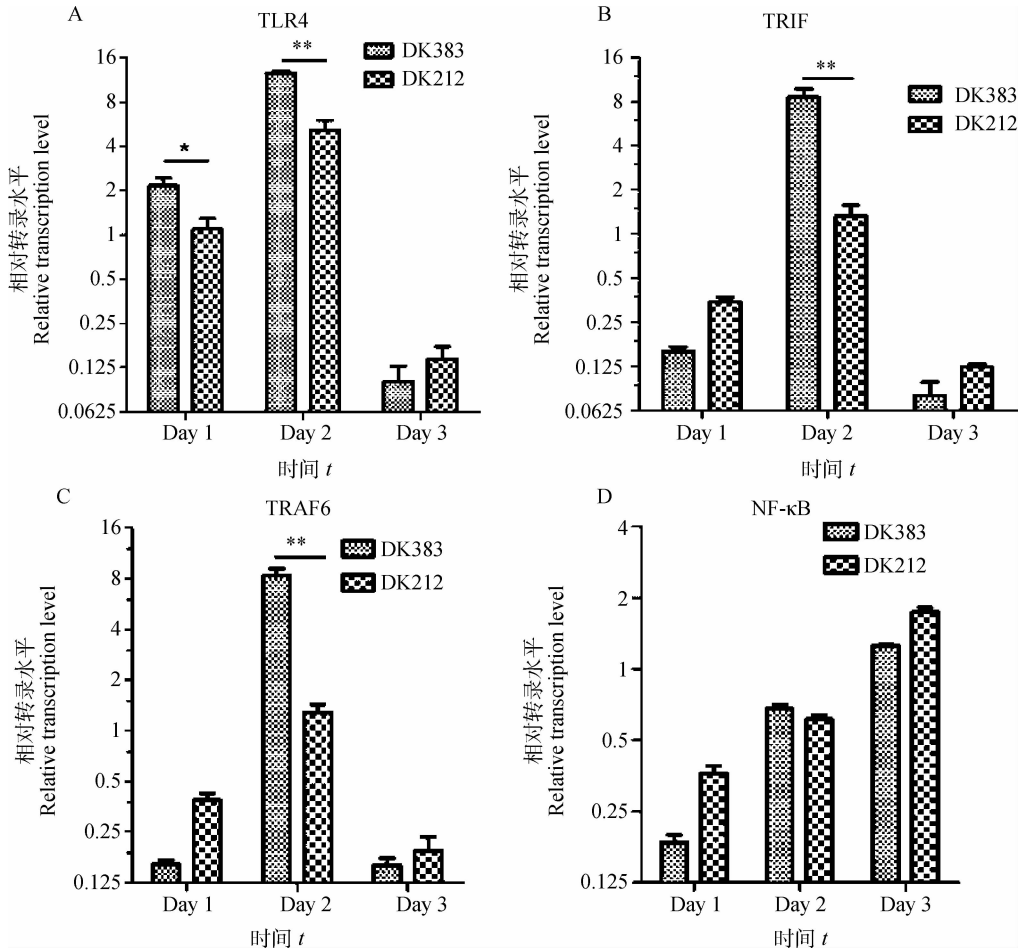
mRNA 的转录量显著高于 DK212 组。

结果表明,与弱毒 DK212 相比,DK383 感染番鸭后,激活肺 TLR4-TRIF-TRAF6 通路的能力更强,诱导了肺 *IL-6* 和 *TNF- α* mRNA 转录增加。

2.5 病毒感染脑组织后 TLR3-TRIF-TRAF6 通路

相关因子的转录

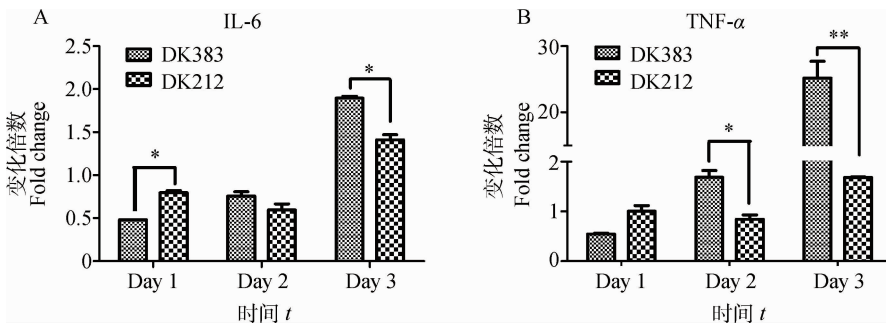
为了研究禽流感病毒感染番鸭后的持续复制是否也引起了脑组织的先天免疫反应,分别检测了感染后第 1、2 和 3 天脑组织中 TLR3 信号通路相关因子的转录水平(图 4)。



* 和 * * 代表不同的差异水平分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$
* indicate $P < 0.05$, * * indicate $P < 0.01$

图 2 荧光定量 PCR 分析两毒株感染肺组织后 TLR4 信号分子转录情况

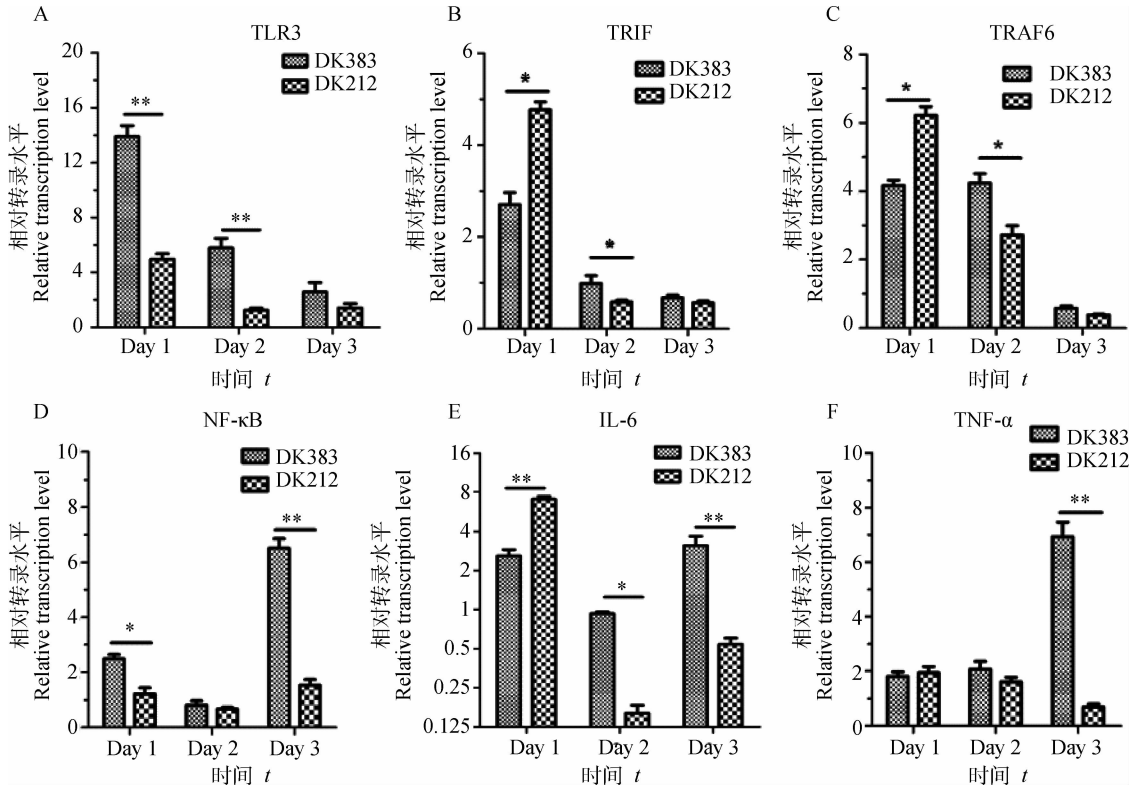
Fig. 2 qPCR expression analysis of TLR4 signaling in the lungs of infected duck with the two HPAIVs



* 和 * * 分别代表差异水平为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$
* and * * indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

图 3 荧光定量 PCR 分析 DK383 和 DK212 感染肺组织后细胞因子转录情况

Fig. 3 qPCR expression analysis of cytokines in the lung tissues infected with DK383 and DK212



* 和 * * 代表不同的差异水平分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

* indicate $P < 0.05$, * * indicate $P < 0.01$

图 4 荧光定量 PCR 分析两毒株感染脑组织后 TLR3 信号分子转录情况

Fig. 4 qPCR expression analysis of TLR3 signaling in the brains of infected duck with the two HPAIVs

与空白对照组相比,两株病毒感染后均引起脑组织 *TLR3*、*TRIF*、*TRAF6* 和 *NF-κB* mRNA 转录量的上调,且 DK383 组 *TLR3* 和 *NF-κB* mRNA 的转录水平显著高于 DK212 组。结果显示,流感病毒感染番鸭后,激活了脑组织 TLR3 信号通路相关因子的转录。

通过对番鸭脑组织细胞因子转录情况的检测,发现流感病毒感染番鸭后引起了脑组织 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 的大量转录。感染后的第 2 天和第 3 天,DK383 引起脑组织 *TNF-α* 和 *IL-6* mRNA 的转录水平都显著高于 DK212 组。

结果表明,禽流感病毒感染番鸭后,激活了脑组织中 TLR3 信号通路,诱导了 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 的大量转录。与弱毒 DK212 相比,DK383 感染番鸭后激活脑组织 TLR3 通路的能力更强,诱导脑组织 *IL-6* 和 *TNF-α* mRNA 的转录水平更高,诱导番鸭脑组织产生过度的先天免疫反应。

3 讨论

通过感染试验发现,两株病毒对番鸭的致病性

差异显著。DK383 对番鸭具有高致病性,感染后引起 70% 的番鸭死亡,临床上表现明显的呼吸道症状和神经症状。剖检发现脾肿大,脑组织与小肠出血。DK212 感染番鸭后,仅少数番鸭出现斜颈等症状,但不会导致番鸭死亡,剖检未见明显病理变化。病理组织学变化显示,DK383 感染番鸭后导致了肺损伤和脑损伤,大脑组织神经元发生广泛性变性、坏死,肺淤血、出血严重,而 DK212 组和空白组未见明显病理变化。结果表明 DK383 病毒感染番鸭后引起的多组织损伤是造成番鸭死亡的主要原因,因此进一步研究 DK383 致番鸭肺和脑组织损伤的机制有重要的意义。

目前研究认为,禽流感病毒感染后可以引起广泛的免疫病理损伤,病毒的持续复制诱导宿主产生过度的先天免疫反应是介导病理损伤的主要原因^[5]。

禽流感病毒的毒力及其复制力是造成组织损伤的主要因素之一^[6]。毒力较强的毒株感染后,病毒在感染部位持续复制,而高病毒载量和持续复制导致了炎症反应的持续存在,并最终导致了进行性的

组织损伤^[7-8]。Y. Hatta 等将两株不同毒力的 H5N1 亚型禽流感病毒感染小鼠后,发现病毒的致病性与复制速率相关,高致病性毒株迅速增殖,获得稳定的高滴度水平,并可以通过快速增殖的方式调控宿主的免疫应答反应。限制流感病毒的复制,感染小鼠发病率和死亡率就会下降,急性感染时的肺损伤情况也得以减轻^[9]。本试验中,与弱毒株 DK212 相比,DK383 在番鸭肺和脑组织的病毒载量更高,这说明 DK383 也有可能通过快速增殖调控宿主免疫应答反应,进而引起组织损伤,导致机体死亡。

流感病毒感染过程中,机体的免疫应答对病毒的有效清除十分重要,但过度的免疫应答又是介导免疫损伤的主要原因。流感病毒感染后,在宿主细胞内大量复制,进而在转录水平调控宿主细胞内 TLR、NF- κ B 等信号通路,最终导致 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 等细胞因子的过度表达。TNF- α 水平的增高与高致病流感病毒的发病和病死率相关,IL-6 水平也与流感病理损伤呈现出强相关性^[6]。

有研究指出,肺急性损伤与 TLR4 信号通路依赖的炎症反应直接相关,H5N1 高致病性流感病毒可以通过 ROS-TLR4-TRIF-TRAF6-NF- κ B-Cytokine storm 通路导致严重炎症的发生^[10]。抑制 TLR4 的表达,能够抵抗流感病毒的致死性感染,减少肺组织的病理损伤和细胞因子以及氧化物的产量,甚至可以降低病毒的复制滴度,证实了该通路在哺乳动物急性肺损伤中的重要作用^[11]。本试验中,在两株禽流感病毒感染过程中,番鸭肺的 TLR4-TRIF-TRAF6 信号通路同样被激活,而且强毒 DK383 激活能力显著高于 DK212,诱导的 IL-6 和 TNF- α 的转录量也要显著高于 DK212 组,说明该通路的激活与番鸭急性肺损伤有关。

TLR3 信号通路与病毒感染后突破血脑屏障有关,敲除该基因后,可以降低宿主的炎症反应,减少 IL-6 和 TNF- α 等细胞因子的分泌以及病毒的脑组织载量,减轻神经的病理损伤^[12]。脑脊液中 TNF- α 水平升高与 HIV-1 感染后血脑屏障的损伤直接相关,还可以诱发脑组织神经的炎症反应^[13]。DK383 感染后,激活了番鸭脑组织的 TLR3 信号通路,并诱导了 TNF- α 、IL-6 的大量转录,这与前期的研究结果相符,的确会引起番鸭的脑组织损伤。

4 结论

在禽流感病毒感染过程中,番鸭存在与哺乳动

物类似的脑组织、肺损伤机制。DK383 感染番鸭后,通过在脑组织和肺的持续复制,激活了番鸭 TLR-TRIF-TRAF6-NF- κ B 通路,诱导肺和脑组织 IL-6 和 TNF- α mRNA 转录量大幅上调,从而引起番鸭肺和脑组织损伤。

参考文献 (References):

- [1] KIDA H, YANAGAWA R, MATSUOKA Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response[J]. *Infect Immun*, 1980, 30(2):547-553.
- [2] GILBERT M, XIAO X, PFEIFFER D U, et al. Mapping H5N1 highly pathogenic avian influenza risk in Southeast Asia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(12):4769-4774.
- [3] IMAI Y, KUBA K, NEELY G G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury[J]. *Cell*, 2008, 133(2):235-249.
- [4] SUN H, JIAO P, JIA B, et al. Pathogenicity in quails and mice of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from ducks[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 152(3-4):258-265.
- [5] 郭亚丽, 刘建, 刘燕梅, 等. 流感病毒感染后固有免疫病理损伤机制的探讨[J]. *世界中医药*, 2015, 10(10):1476-1479, 1482.
GUO Y L, LIU J, LIU Y M, et al. Mechanism of innate immune pathological damage after influenza virus infection[J]. *World Chinese Medicine*, 2015, 10(10):1476-1479, 1482. (in Chinese)
- [6] 吕进. 甲型流感病毒(H1N1)感染介导的小鼠肺免疫损伤机制研究[D]. 北京:军事医学科学院, 2010.
LV J. Pulmonary immunopathology on mice medicated by influenza A virus (H1N1) infection[D]. Beijing: Academy of Military Medical Science, 2010. (in Chinese)
- [7] TO K K, HUNG I F, LI I W, et al. Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(6):850-859.
- [8] DE JONG M D, SIMMONS C P, THANH T T, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia[J]. *Nat Med*, 2006, 12(10):1203-1207.
- [9] HATTA Y, HERSHBERGER K, SHINYA K, et al. Viral replication rate regulates clinical outcome and CD8 T cell responses during highly pathogenic H5N1

- influenza virus infection in mice[J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(10): e1001139.
- [10] LMAI Y, KUBA K, NEELY G G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury[J]. *Cell*, 2008, 133(2): 235-249.
- [11] EVERITT A R, CLARE S, PERTEL T, et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza[J]. *Nature*, 2012, 484(7395): 519-523.
- [12] 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.
- [13] SHARIEF M K, CIARDI M, THOMPSON E J, et al. Tumour necrosis factor-alpha mediates blood-brain barrier damage in HIV-1 infection of the central nervous system[J]. *Mediators Inflamm*, 1992, 1(3): 191-196.

(编辑 白永平)

勘误

《畜牧兽医学报》2016 年第 1 期插页,“2015 年《畜牧兽医学报》审稿专家名单”,名单的第 11 行第 1 列专家曹军平,由于我方掌握信息较为陈旧,错排作者职称为“副教授”,现更正如下:曹军平 江苏农牧科技职业学院 博士 教授。特此说明,并向曹军平教授致歉。