

## H3N2 亚型禽流感病毒及猪流感病毒感染人肺腺癌细胞后增殖的差异性变化

崔梦一, 梁佳, 黄晓量, 劳婷婷, 王伊玲, 王晋, 高灵茜, 樊晓晖\*

(广西医科大学微生物学教研室, 广西南宁 530021)

**摘要:**人肺腺癌细胞 A549 被 H3N2 亚型禽流感病毒和猪流感病毒感染后, 探讨不同毒株跨种属感染人呼吸道组织的可能性和趋势性。通过观察病毒感染 A549 细胞后的细胞病变(CPE)、血凝试验(HA)和 50%组织细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)来比较不同毒株感染细胞后的复制差异和毒力改变, 发现同一亚型不同来源的流感病毒对 A549 细胞感染和复制能力有较大差异, 哺乳动物来源的病毒更有感染人呼吸道细胞的趋势, SW/GX/NS2783/2010 有潜在的感染人细胞的能力。感染过程中的细胞因子变化和病毒基因组组成特点是进一步研究的方向, 应重点关注具有跨种属感染趋势的流感病毒及其特殊分子决定簇的组成和特点。

**关键词:**H3N2 亚型流感病毒; 猪流感病毒; 禽流感病毒; 人肺腺癌细胞

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2017.04.007

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2017)04-0035-06

流行性感冒病毒又称流感病毒, 根据宿主和感染特性不同, 又分为人流感病毒、禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)和猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)等。其中禽流感病毒和猪流感病毒跨种属感染人的威胁越发明显, 遗传进化分析表明, H3N2 亚型流感病毒在水禽中存在时间较长, 但是检出率一直偏低, 检出的 H3N2 亚型禽流感病毒的基因序列是否形成了变异重组型毒株, 其跨种属感染人的可能性如何, 至今都是研究热点。同样的, 猪流感病毒跨种属感染人的情况也不容乐观, 最近出现的一次流感大流行发生在 2009 年, 由新甲型 H1N1 流感病毒(2009 pandemic H1N1 virus, pdm/09)引起。pdm/09 是由人流感病毒、禽流感和猪流感病毒经过重配后形成的病毒<sup>[1-2]</sup>, 它不仅能感染人, 而且在人群流行之后很快回传至猪群, 与 SIV 发生重组<sup>[3-4]</sup>。前期研究中筛查出的 H3N2 亚型猪流感病毒已经开始出现了重组的趋势, 并开始重组 pdm/09 内部基因片段<sup>[5-6]</sup>。通过遗传进化分析, 发现广西病毒株(SW/GX/NS2783/2010, 2783)可能来自越南, 而且已具备了感染人的能力<sup>[7]</sup>。但是关于 2783 毒株对于人细胞的感染能力目前还未知。

A549 细胞来源于人的肺泡癌细胞, 相关文献表明<sup>[8]</sup>, A549 已经在体外进行了连续多年的增殖培养(多于 1 000 代), 多用于研究人的呼吸道上皮细胞生态<sup>[7]</sup>。而且 A549 细胞有着 II 型肺泡上皮细胞的

特征性形态。有研究证实, 该细胞系可以作为研究 II 型肺泡上皮细胞的标准细胞模型<sup>[9]</sup>。A549 细胞的分子结构以及感染后细胞因子的分泌更接近活体感染试验, 可以成为替代模拟人呼吸道感染的良好模型, 弥补流感病毒研究过程中缺乏人体真实模型的缺点。

综上所述, 选用人肺腺癌上皮细胞 A549 细胞作为模拟人体呼吸道的模型, 将分离得到的 H3N2 亚型禽流感病毒和猪流感病毒毒株接种感染细胞, 通过血细胞凝集试验(HA)和 50%组织细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)来检测不同流感病毒对于 A549 细胞的感染能力, 以及病毒的复制能力, 进而进一步观察和讨论这些病毒对人呼吸道感染的可能性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 毒株与细胞 5 株 H3N2 亚型禽流感病毒及猪流感病毒株(表 1), 本实验室从 2004 年开始与香港大学合作开展的华南流感病毒监测网中采集, 所有毒株分离后接种 7 日龄~9 日龄无特定病原体级鸡胚(SPF 级鸡胚)和狗肾细胞(MDCK 细胞), 测序分析确定其型别后保存于-80℃。A549 细胞, 香港大学馈赠, 传代至第 9 代, 由广西医科大学微生物学实验室保存。

收稿日期: 2016-09-13

基金项目: 广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2014027); 广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF201525)

作者简介: 崔梦一(1990-), 女, 陕西西安人, 硕士, 主要从事病毒分子生物学研究。\* 通讯作者

表1 5株不同H3N2亚型流感病毒毒株原始滴度及TCID<sub>50</sub>(MDCK)Table 1 Original HA titers and TCID<sub>50</sub> of 5 different H3N2 influenza virus strains(MDCK)

名称 Name	HA	TCID <sub>50</sub> /mL	地区 Location	来源 Source
DK/ST/493/2008(493)	256	5×10 <sup>-6.3</sup>	汕头 Shantou	鸭 Duck
DK/ST/7250/2008(7250)	2048	5×10 <sup>-6.5</sup>	汕头 Shantou	鸭 Duck
DK/ST/2442/2009(2442)	256	5×10 <sup>-7</sup>	汕头 Shantou	鸭 Duck
DK/ST/6708/2010(6708)	512	5×10 <sup>-7</sup>	汕头 Shantou	鸭 Duck
SW/GX/NS2783/2010(2783)	128	5×10 <sup>-6.5</sup>	广西 Guangxi	猪 Swine

1.1.2 主要试剂 MEM 细胞培养基、FBS 胎牛血清和 TPCK-胰酶, Gibco 公司产品; 双抗(青霉素-链霉素), Sigma 公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 5株 H3N2 亚型流感病毒在 A549 细胞中连续传代 按标准操作复苏 A549 细胞, 并将细胞接种 6 孔板, 每孔接种细胞液 1 mL~1.5 mL, 细胞浓度大约 1×10<sup>5</sup> 个/mL。37℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后, 40 倍倒置显微镜观察细胞形态, 选取长满约 80% 的 A549 细胞进行操作, 弃去细胞生长液, 并用 PBS 清洗细胞 3 次, 将 1 MOI 的病毒 500 μL 接种到细胞上, 每个病毒接种 2 个复孔, 另设一孔加入 PBS 作为阴性对照, 置 37℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养吸附 2 h 后清洗细胞, 再补加 2.5 mL 病毒维持液(含有 1 μg/mL TPCK-胰酶和 1 000 μg/mL 双抗的 MEM 培养基)继续培养, 每日观察接毒细胞病变情况。当细胞病变(变圆并脱落)达 80%~90% 时, 停止培养, 吸取病毒培养液, 4℃、8 000 r/min 离心, 收取的上清即为代病毒生长液, 置 -80℃ 保存备用。病毒液在 -80℃ 冻融 1 次后继续接种 A549 细胞, 如此重复, 在 A549 连续传代 5 次, 每代不同时间点(0、12、24、36、48、60、72 h)取病毒生长液分别做血凝试验(HA)和 TCID<sub>50</sub> 试验。

1.2.2 血凝试验(HA) 按照《全国流感监测技术指南》进行, 采用 96 孔板法, 红细胞凝集滴度的判定以出现完全凝集的最高稀释为终点, 以其稀释度得导数为病毒的红细胞凝集滴度。

1.2.3 5株不同 H3N2 亚型流感病毒株 A549 细胞生长动力学检测 半数组织感染量(TCID<sub>50</sub>): 调整 A549 细胞浓度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL, 100 μL/孔接种至 96 孔细胞培养板中, 体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养。约 24 h 后细胞长至单层, 密度为 80%~90%。将在 A549 细胞上连续传代的不同毒株相应的病毒生长液接种 96 孔细胞培养板, 分别检测其在 A549 细胞中的 TCID<sub>50</sub>, 具体方法见 www.virapur.com, 利用血凝活性试验记录试验结果, 并用 Karber

法计算病毒滴度。

## 2 结果

### 2.1 细胞病变效应(CPE)

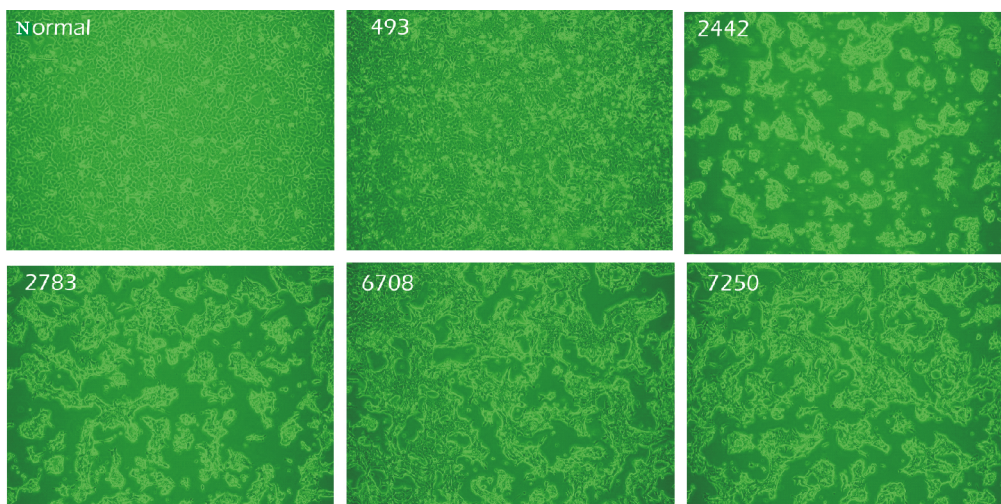
在不同毒株感染 A549 细胞后的各时间点(0、12、24、36、48、60、72 h)观察细胞的状态, 感染后 24 h 开始出现细胞病变, 继续培养至 48 h, 各毒株引起的细胞病变更加明显, 其中毒株 2442 和 2783 的 CPE 大于 75%, 毒株 6708 和 7250 达到 50%~70%, 毒株 493 亦达到了大于 25%。正常 A549 细胞呈现上皮细胞形态, 细胞呈梭形或者纺锤形, 贴壁生长, 出现细胞病变时可见细胞间隙变大, 细胞固缩。48 h 时各毒株所引起的病变和死亡细胞明显增多, 其中毒株 2442 的 CPE 最明显, 呈现出典型的细胞病变形态(图 1)。从图 1 可以看出, 不同病毒感染 A549 细胞后致使细胞发生病变的时间点不同, 同一时间上细胞病变的程度也有较大差异。

### 2.2 血凝试验(HA)结果

病毒在第 1 次接种 A549 后不同时间血凝试验 HA 结果见图 2。由图 2 可知, 毒株 2442、493 和 7250 血凝效价最高值出现在感染后 48 h, 与 CPE 结果成正相关。说明病毒此时对细胞的杀伤力最强, 病毒数量最高(活病毒和死病毒的总数)。6708 毒株的血凝效价随着感染时间的增加呈下降趋势, 但其细胞的 CPE 却基本可以达到 70%~75%, 说明 HA 滴度的数值与 CPE 的出现及程度并不完全相关, 即有 CPE 不一定出现 HA 滴度, 且 CPE 与 HA 滴度并不成相关性增长, 毒株 2783 在 48 h 才出现血凝现象, 即出现 HA 滴度。在 24 h 与 36 h 时, HA 结果均呈阴性, 进一步验证 HA 滴度与 CPE 的相关性不强。

### 2.3 半数组织感染(TCID<sub>50</sub>)结果

对每株病毒感染细胞后不同时间, 测定的 TCID<sub>50</sub> 作图(图 3, 493 在整个感染过程中 TCID<sub>50</sub> 一直呈阴性, 未作图), 应用 SPSS 17.0 软件对所有数据进行统计学处理。试验重复 3 次, 试验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示, 使用单因素方差分析计算。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。



493. DK/ST/493/2008; 2442. DK/ST/2442/2009; 2783. SW/GX/NS2783/2010; 6708. DK/ST/6708/2010; 7250. DK/ST/7250/2008; Normal. 正常细胞对照  
 493. DK/ST/493/2008; 2442. DK/ST/2442/2009; 2783. SW/GX/NS2783/2010; 6708. DK/ST/6708/2010; 7250. DK/ST/7250/2008; Normal. Standard control

图 1 不同流感病毒感染 A549 细胞 48 h 后的 CPE

Fig. 1 CPE of A549 cells infected with different influenza viruses after 48 hours

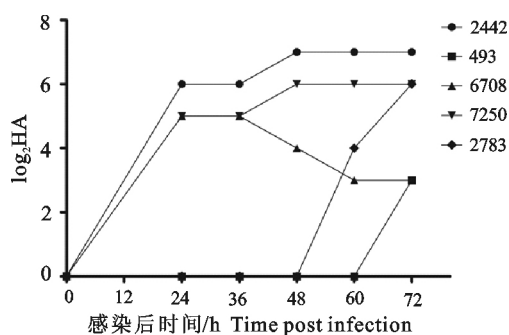


图 2 5 株流感病毒在 A549 细胞中不同时间段的 HA 滴度

Fig. 2 HA titers of A549 cells infected with 5 influenza virus strains at different time

由图 3 可见, 毒株 2442、6708 和 2783 的 TCID<sub>50</sub> 随着感染时间延长有递减趋势, 而且与 24 h 组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果显示, 这 3 种毒株感染人肺腺癌细胞 A549 的毒力伴随着时间增加而逐渐增强。此外, 毒株 7250 感染的 TCID<sub>50</sub> 值则表现出另外一种情况, 其结果伴随时间增加而递增, 而且 48 h 组和 72 h 组与 24 h 组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。由图 4 可知, 病毒在 A549 细胞中的增殖过程中, 毒株 2442 在感染 24 h TCID<sub>50</sub> 出现峰值, 说明在此时其毒力最强, 而毒株 2783 则是在感染 48 h 时出现峰值, 可见不同病毒感染后毒力达到最强的时间不同。

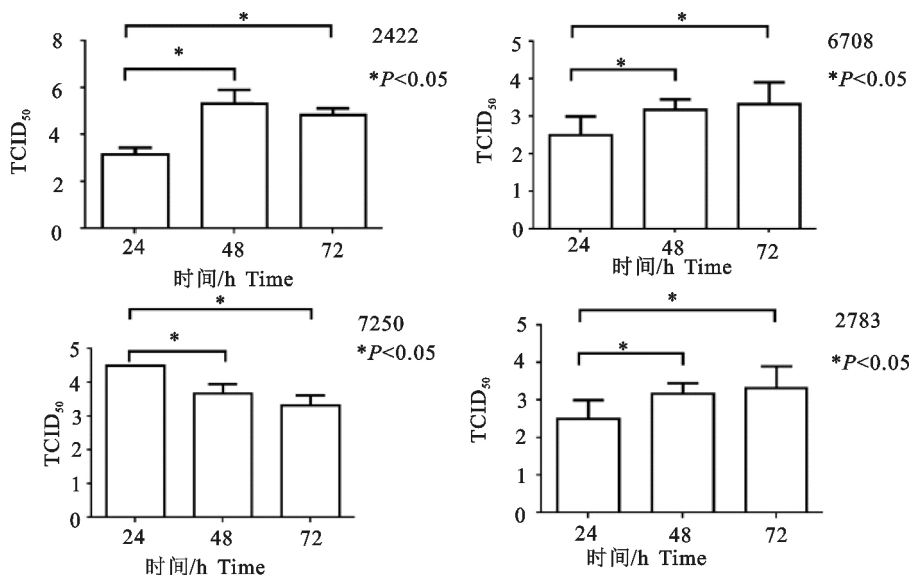


图 3 病毒感染细胞后不同时间段的 TCID<sub>50</sub>

Fig. 3 TCID<sub>50</sub> of A549 cells after infection with different influenza viruses at different time points

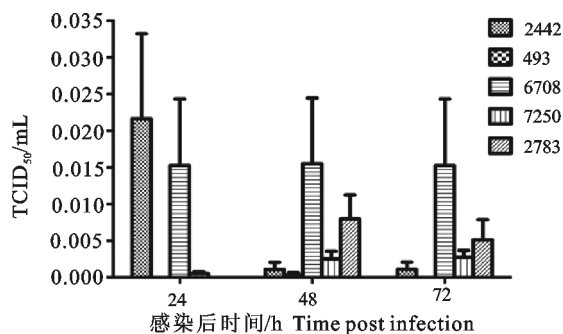


图4 5株流感病毒分别感染A549细胞后不同时间段的TCID<sub>50</sub>均值

Fig. 4 Average TCID<sub>50</sub> of A549 cells after infection with 5 influenza viruses at different time points

表2 493与2783两株流感病毒阴性感染结果(HA和TCID<sub>50</sub>)比较

Table 2 Comparison of two negative infections with 493 influenza virus and 2783 influenza virus (HA and TCID<sub>50</sub>)

代次 Generation	493 TCID <sub>50</sub>			2783 TCID <sub>50</sub>			493 HA	2783 HA
	24	48	72	24	48	72		
1	$5 \times 10^{-6.5}$	$5 \times 10^{-6.5}$	$5 \times 10^{-6.5}$	—	—	—	1:8	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	$5 \times 10^{-2.5}$	$5 \times 10^{-3.5}$	$5 \times 10^{-3.5}$	—	1:64
4	—	—	—	$5 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3.5}$	—	1:128
5	—	—	—	$5 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3.5}$	$5 \times 10^{-3.5}$	—	1:128

注:“—”表示结果为阴性。

Note: “—” Means negative.

物宿主增殖、复制效率极低,反之亦然。其主要原因为受体结合特异性限制,流感病毒通过其表面HA与宿主细胞表面唾液酸受体特异性结合而感染宿主,禽流感病毒与唾液酸 $\alpha$ -2,3半乳糖(Gal)受体结合,而人流感病毒与唾液酸 $\alpha$ -2,6Gal受体结合<sup>[12-14]</sup>。一般认为,水禽类宿主肠道上皮仅存在唾液酸 $\alpha$ -2,3Gal受体<sup>[14]</sup>,人气管上皮仅存在唾液酸 $\alpha$ -2,6Gal受体<sup>[15]</sup>,故禽流感病毒很难跨种属传递直接传染给人;反之,人流感病毒也不能直接感染禽类,禽流感病毒直接传递给人极其罕见。1997年,随着H5N1亚型高致病禽流感病毒直接从禽类传播给人,这种情况发生了变化。发生于1968年H3N2亚型的中国香港大流感,是由源自禽类HA和PB1基因片段和其他人流感病毒基因片段组成<sup>[8]</sup>,新表面抗原的获得使这些病毒逃避了人的免疫反应而形成大流行<sup>[10]</sup>。2009年由新甲型H1N1流感病毒引起的流感世界大流行,更是将新现重组流感病毒的跨种属感染能力推向新的高峰,因此对于新现重组病毒跨种属感染人呼吸道的能力和适应性变化成为研究重点。本试验主要采用观察CPE及HA和TCID<sub>50</sub>的方法来观察不同禽流感病毒及猪流感病毒的H3N2亚型对A549细胞的感染情况,并比较感染后复制能力的变化。这3种方法互

## 2.4 493与2783感染A549的比较TCID<sub>50</sub>结果

感染试验中发现,493和2783的感染情况出现特殊的变化,其中493的感染试验中,发现其第1代的复制能力和感染能力都较强,但是第1代以后便失去了复制和感染能力(表2)。而2783则出现不同变化,前两代均不能较好的复制增殖,但从第3代开始,出现了适应性的感染变化,推测出现了有利于跨种属感染的点突变。

## 3 讨论

甲型流感病毒可从人类和各种动物(包括禽类、马、猪、海洋哺乳动物海豹和鲸、猫科类动物猫和老虎等)中分离出<sup>[3,6,10-11]</sup>。但禽流感病毒在灵长类动

相弥补,从细胞形态、蛋白功能、血清学等方面综合评价病毒的感染能力。

研究结果发现,在5株不同的H3N2亚型流感病毒中,除毒株493外均能在A549细胞中增殖,毒株2442和7250在A549细胞上增殖的血凝效价逐渐增高,均达到64~128,而毒株6708则逐渐降低到1:8,毒株2783的血凝效价出现较晚但有不断升高的趋势。比较明显的显示出不同流感病毒在A549细胞中的感染增殖能力有较大区别。有的病毒在逐步适应该细胞,有适应性感染人呼吸道细胞的趋势;而一些病毒则表现出对该细胞的非适应性感染,提示其感染人呼吸道的能力可能有限。毒株2442、7250、2783、6708在A549细胞中增殖过程中均产生明显的CPE,其中毒株2442最明显,而493未出现明显的细胞病变,且血凝效价呈阴性(虽在72h时出现了较低的HA滴度,但不排除为微量感染或者污染导致,结合HA相对粗放的检测能力,基本不能认为其在A549细胞中存在有效的复制和感染),说明其在A549细胞的复制和增殖能力较弱。复制能力的差异可能是与病毒识别特异性受体有关,不同病毒对于A549细胞的容量性感染能力有差异,可能与A549细胞中的唾液酸 $\alpha$ -2,3Gal受体和唾液酸 $\alpha$ -2,6Gal受体的分布及数量差别有

关<sup>[16]</sup>。一般来讲,由于 A549 细胞中的唾液酸  $\alpha$ -2, 3Gal 受体数量要多于唾液酸  $\alpha$ -2, 6Gal 受体,所以禽类病毒相对更容易感染 A549 细胞,但不同禽类病毒的感染能力也有差别(毒株 493 几乎不能在 A549 细胞中复制增殖),提示流感病毒跨种属传播不仅依赖于不同流感病毒(人流感病毒、禽流感病毒、猪流感病毒)的重组<sup>[17]</sup>,而且其自身在宿主内复制过程中其潜在的变异也可能起了重要作用,如结构蛋白氨基酸位点的突变、病毒与非特异性免疫机制的相互作用以及和宿主间的接触方式和程度等等,但这仍需进一步试验证实。值得注意的是猪流感病毒 2783 的 HA 滴度及 TCID<sub>50</sub> 均显示其在 A549 细胞中复制扩增的病毒数量出现逐步适应的过程,说明该病毒有倾向结合人呼吸道细胞分布较广的唾液酸  $\alpha$ -2, 6Gal 受体,出现进一步感染人的能力和趋势。除此,流感病毒只有当其血凝素(HA)为裂解状态时,其病毒颗粒才具有感染性,HA 能否被蛋白酶裂解为 HA1 和 HA2 是病毒感染细胞的必要条件,但是病毒自身并不具备裂解 HA 的蛋白酶,是在宿主细胞的蛋白酶的作用下裂解。因此宿主细胞 A549 是否有裂解 5 种不同 H3N2 亚型病毒株 HA 的蛋白酶以及其裂解的能力的强弱,又成了影响病毒复制增殖的一个原因。

毒株 493 和 2783 出现的不同感染情况,可能是由于原始毒株是在 MDCK 细胞中扩增的,而大量的研究证明,MDCK 是流感病毒的易感细胞,所以毒株在 MDCK 细胞中的复制能力和感染能力均相对较好,故第 1 代毒株 493 仍保存着复制能力和感染能力,而在接下来的传代中,推测 A549 细胞通过分泌一系列的细胞因子影响该毒株的复制和感染能力,导致第 1 代以后的 HA 和 TCID<sub>50</sub> 都呈现出阴性结果。而毒株 2783 的适应性感染能力的增强,除了体现为不同病毒复制能力和复制峰值不同,更加确认病毒的复制和跨种属感染能力可能与病毒的某些特殊分子位点有关,导致蛋白合成时间不同。而毒株 2442 虽能在 A549 细胞中有效的复制,但毒力却呈下降趋势,对 A549 的适应能力较弱。毒株 6708 则在感染细胞的过程中保持相对稳定的感染能力和复制能力。

综上所述,同一亚型的不同流感病毒对人肺腺癌细胞 A549 的感染能力不同,其在细胞中的复制能力有显著差异,提示不同病毒可能感染人呼吸道的能力也有很大不同,同一病毒感染后不同时间段的毒力和产生活病毒的复制转录能力也有差别。A549 细胞在作为临床感染活体试验的替代品有一

定的意义,分析不同流感病毒对该细胞的感染能力和复制趋势的不同除了细胞耐受和易感的因素之外,还需要关注病毒刺激细胞后一些细胞因子的变化,以及病毒本身基因组的组成和特殊分子位点复制表达的情况,这些研究方向将成为流感病毒跨种属感染的潜在热点,以及基础研究中病毒感染后免疫调节机制的重要组成部分。

#### 参考文献:

- [1] Moreno A, Trani L D, Faccini S, et al. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 149(3-4): 472-477.
- [2] Starick E, Lange E, Fereidouni S, et al. Reassorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany[J]. *J Gene Virol*, 2011, 92(5): 1184-1188.
- [3] Kirisawa R, Ogasawara Y, Yoshitake H, et al. Genomic reassortants of pandemic A (H1N1) 2009 virus and endemic porcine H1 and H3 viruses in swine in Japan[J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(11): 1457-1470.
- [4] Kitikoon P, Vincent A L, Gauger P C, et al. Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A(H3N2)v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011[J]. *J Virol*, 2012, 86(12): 6804-6814.
- [5] Guan Y, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. The emergence of pandemic influenza viruses[J]. *Protein Cell*, 2010, 1(1): 9-13.
- [6] Zhu H, Zhou B, Fan X, et al. Novel reassortment of Eurasian avian-like and pandemic/2009 influenza viruses in swine: infectious potential for humans[J]. *J Virol*, 2011, 85(20): 10432-10439.
- [7] Foster K A, Oster C G, Mayer M M, et al. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism[J]. *Exper Cell Res*, 1998, 243(2): 359-366.
- [8] Couceiro J N S S, Paulson J C, Baum L G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity[J]. *Virus Res*, 1993, 29(2): 155-165.
- [9] Fouchier R A M, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-headed gulls[J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-2822.
- [10] Murphy B R. *Orthomyxoviruses: Field Virology*[M]. Lippincott-Raven Publishers: New York, 1996: 1397-1445.
- [11] Wan H, Perez D R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses[J]. *Virology*, 2006, 346(2): 278-286.
- [12] Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(8): 591-600.
- [13] Kim J A, Ryu S Y, Seo S H. Cells in the respiratory and intestinal tracts of chickens have different proportions of both human and avian influenza virus receptors[J]. *J Microbiol*, 2005,

## 禁食、急性冷暴露和外源性注射 Ghrelin 对羔羊生理指标的影响

王 琴<sup>1△</sup>, 赵红琼<sup>1△\*</sup>, 许 琴<sup>2</sup>, 侯 宇<sup>1</sup>, 卡力比夏提·艾木拉江<sup>1</sup>,

闫书平<sup>1</sup>, 姚 刚<sup>1</sup>, 刘江伟<sup>2</sup>, 张 丹<sup>1</sup>, 王丽芳<sup>1</sup>

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 2. 新疆军区总医院实验动物科, 新疆乌鲁木齐 830000)

**摘 要:** 为了探究禁食、急性冷暴露和注射外源性生长激素释放肽 Ghrelin 对羔羊生理指标的影响, 本研究监测了室温禁食 24 h 后继续禁食并冷冻(-24.7 °C ± 0.2 °C) 2 h 羔羊基本生命体征、血液生理指标和血糖浓度的变化, 同时探究了外源性 Ghrelin 对于冷冻的禁食羔羊以上指标的影响。结果显示, 在禁食后 8、16、24 h 羔羊呼吸频率、心率和血糖浓度均较禁食前显著降低( $P < 0.05$ ), 在禁食后 16 h 和 24 h 直肠温度均较禁食前极显著降低( $P < 0.01$ ), 而血液生理指标变化不明显( $P > 0.05$ ); 在冷冻 1.5 h 和 2.0 h 后羔羊呼吸频率较保温组显著减慢( $P < 0.05$ ), 心率和血糖浓度在冷冻后 1.0、1.5、2.0 h 显著增加( $P < 0.05$ ), 冷冻过程中羔羊直肠温度差异不显著( $P > 0.05$ ); 冷冻 2 h 后颈静脉一次性注射 Ghrelin 未发现对羔羊以上指标的影响( $P > 0.05$ )。以上研究结果提示, 羔羊在禁食和低温情况下可通过调整自身活动, 以维持机体稳态, 并且 Ghrelin 可能并未参与该调整过程。

**关键词:** 禁食; 冷暴露; 生长激素释放肽; 羔羊; 血糖

中图分类号: S852.21

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2017)04-0040-06

养羊业在我国西北畜牧业中占有重要地位, 一般分为农区集中舍饲模式和牧区散养放牧模式。对

收稿日期: 2016-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560684; 31201872)

作者简介: 王 琴(1989-), 女, 新疆塔城人, 硕士研究生, 主要从事动物生理学研究。△同等贡献作者。\* 通讯作者

\*\*\*\*\*

43(4): 366-369.

Science, 2012, 337(6091): 199-204.

[14] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals[J]. J Virol, 2000, 74(18): 8502-8512.

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

[15] Jagger B W, Digard P. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response[J].

[17] Vijaykrishna D, Poon L L M, Zhu H C, et al. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine[J]. Science, 2010, 328(5985): 1529-1529.

## Replication Diversity of H3N2 Avian Influenza Virus and Swine Influenza Virus after Infecting A549 Cells

CUI Meng-yi, LIANG Jia, HUANG Xiao-liang, LAO Ting-ting, WANG Yi-ling,

WANG Jin, GAO Ling-xi, FAN Xiao-hui

(Department of Microbiology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**Abstract:** To discuss the possibility and trend of the infection in human respiratory tissues with different strains of H3N2 influenza virus, CPE, HA and TCID<sub>50</sub> were compared after A549 cells were infected with the H3N2 avian influenza virus and swine influenza virus. The results showed that the infection and replication abilities of different sources of H3N2 viruses had more diversities. Mammal-origin viruses had more tendencies to infect the human respiratory tract cells, SW/GX/NS2783/2010 had the potential ability to infect humans. Further studies are needed to explore the characteristics and composition of viral genome and the changes of cytokines in the infection process, especially some special molecular determinants of influenza virus.

**Key words:** H3N2 influenza virus; Swine influenza virus; Avian influenza virus; A549 cell