

2017 东润丘成桐科学奖 (生物)

参赛队员姓名: 陆浩然 张露萱

中 学: 广东实验中学

省 份: 广东省

国家 /地区: 中国/南区

指导教师姓名: 谢青梅 陈义虎

论文 题目: H9N2 亚型禽流感病毒促进小
鼠肠道菌群易位的机理研究

病毒与肠道微生物的秘密

——H9N2 亚型禽流感病毒促进小鼠肠道菌群易位的机理研究

陆浩然 张露萱

(广东实验中学, 广东广州)

摘 要

H9N2 亚型禽流感病毒 (H9N2 AIV) 感染动物后临床症状不明显, 动物常常因为继发细菌 (大肠杆菌、葡萄球菌、沙门氏菌等) 感染而出现发病或死亡, H9N2 AIV 感染后继发细菌感染的问题也一直困扰着许多学者和专家。本论文以 BALB/c 小鼠为模型, 研究呼吸道感染 H9N2 AIV 后, 宿主肠道菌群结构、黏膜屏障、黏膜炎症反应和肠道细菌易位等情况, 揭示了肠道内细菌发生易位与 H9N2 AIV 导致继发细菌感染的密切关系。结果表明: (1) H9N2 AIV 经呼吸道感染 BALB/c 小鼠后, 导致宿主肠道菌群紊乱。攻毒后小鼠主要有条件性致病菌如葡萄球菌属、链球菌属和 *Corynebacterium-1* 极显著增加 ($p < 0.01$), 而乳杆菌属等有益菌极显著降低 ($p < 0.01$); (2) IFN- γ 基因缺失小鼠感染 H9N2 AIV 后, 肠道中的假单胞菌属和乳杆菌属极显著上调 ($p < 0.01$), 而由 H9N2 AIV 诱发可导致异常增加的葡萄球菌属等菌群极显著下调 ($p < 0.01$)。表明促炎因子 IFN- γ 是 H9N2 AIV 感染后葡萄球菌属菌群丰度急剧增高的重要因素。(3) H9N2 AIV 感染小鼠后, 肠道黏膜屏障被破坏, 促炎因子 IFN- γ 、IFN- β 等极显著高表达 ($p < 0.01$), 上皮细胞中的 ZO-1 等紧密连接蛋白则明显下调 ($p < 0.05$), 造成肠壁通透性增强, 肠道菌群 (葡萄球菌、大肠杆菌等) 可以穿过肠道屏障易位到肺、肝和肠系膜等组织器官; (4) 研究还表明藿香正气液中药复方制剂能抑制肠道内葡萄球菌属、埃希氏菌属等的异常增加, 有效地阻止 H9N2 AIV 诱发的肠道细菌易位。

本研究初步探讨了 H9N2 AIV 促进肠道条件性致病菌易位的作用机理, 研究成果创新性地发现 H9N2 AIV 感染与肠道菌群有密切关系, 利用藿香正气液等复方中药可以有效阻止细菌易位。研究成果具有重要的理论和实践指导意义。

关键词: H9N2 AIV; 肠道菌群; 易位; IFN- γ ; 藿香正气液

Spy on the secret between virus and intestinal microflora

—Study on the mechanism of intestinal microflora translocation in AIV-infected mice

Haoran Lu, Luxuan Zhang

(Guangdong experimental high school, Guangzhou, Gaungdong, 510145)

Abstract: Animals often resulted in high morbidity and mortality associated with secondary bacterial infection (*E. coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, etc.) after avian influenza virus subtype H9N2 (H9N2 AIV) infection, but there were no typical clinical symptoms in a sterile environment when H9N2 AIV infection. Scholars and experts have been puzzled by the underlying secondary mechanisms after H9N2 AIV infection.

In order to address the mysterious relationship between the secondary mechanisms and intestinal bacterial translocation after H9N2 AIV infection, we studied the microbiota composition, intestinal barrier, mucosal inflammation and bacterial translocation using BALB/c mice infected with H9N2 AIV in this paper. The results showed that H9N2 AIV infected BALB/c mice via the respiratory tract, leading to intestinal microbiota disorder. The conditional pathogens *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Corynebacterium-1* were increased highly significantly ($p < 0.01$) in the ileum of mice after infection, but the beneficial bacteria like *Lactobacillus* decreased highly significantly ($p < 0.01$). The *Pseudomonas* and *Lactobacillus* in the ileum of *Ifng^{tm1Ts/J}* mice were highly significantly up-regulated ($p < 0.01$), however, the strains of *Staphylococcus* which expected to increase abnormally induced by H9N2 AIV were highly significantly up-regulated ($p < 0.01$). Indicating that proinflammatory cytokine IFN- γ is an important factor in the rapid increase of staphylococcal bacteria abundance after H9N2 AIV infection. After H9N2 AIV infected BALB/c mice, the expression of proinflammatory cytokines IFN- γ and IFN- β were highly significantly up-regulated ($p < 0.01$) causing the intestinal mucosal barrier was destroyed. The expression of tight junction protein ZO-1 in epithelial cells was highly significantly

down-regulated ($p < 0.01$) resulting in permeability of intestinal wall increased, eventually, intestinal microbiota (*Staphylococcus*, *E. coli*, etc.) can pass through the intestinal barrier to the lung, liver and mesentery and other tissues and organs. The study also showed that traditional Chinese medicine Huoxiangzhengqi Ye (HXZQY) could inhibit the abnormal increase of *Staphylococcus* and *Escherichia*, and effectively prevent intestinal bacterial translocation induced by H9N2 AIV. In this study, we investigated the mechanism of promoting the translocation of conditional intestinal bacterial pathogens after H9N2 AIV infection. The results found that secondary bacterial infection and intestinal flora are closely related after H9N2 AIV infection, the use of traditional Chinese medicine HXZQY can effectively prevent bacterial translocation. The research results have important theoretical and practical significance.

Key words: H9N2 AIV; intestinal microbiota; translocation; IFN- γ ; Huoxiangzhengqi Ye

目 录

1 前 言	1
1.1 科学问题和研究意义.....	1
1.2 H9N2 亚型禽流感病毒.....	1
1.3 肠道黏膜屏障.....	2
1.4 肠道微生物与疾病研究进展.....	3
1.5 H9N2 AIV 对 SPF 鸡肠道菌群结构和屏障功能的研究进展	3
1.6 研究目的和意义.....	4
1.7 技术路线.....	4
2 试验材料及方法	5
2.1 试验材料.....	5
2.1.1 毒株、菌株.....	5
2.1.2 试验动物.....	5
2.2 动物实验.....	5
2.2.1 动物试验分组与设计	5
2.2.2 IFN- γ 缺失小鼠试验设计与分组	6
2.2.3 试验样品的采集.....	6
2.2.4 病毒分离鉴定.....	6
2.2.5 细菌分离.....	6
2.2.6 肠道切片及绒毛情况.....	6
2.2.7 肠道相关基因的检测.....	7
2.3 肠道菌群 16s rRNA 的 V4 区域扩增子测序	7
2.4 数据分析.....	7
3 结果与分析	8
3.1 排毒检测.....	8
3.2 H9N2 AIV 改变小鼠肠道菌群结构.....	8
3.3 H9N2 AIV 对小鼠肠道屏障结构的影响.....	9
3.4 IFN- γ 促进 H9N2 AIV 攻毒后小鼠肠道内葡萄球菌属菌群增殖	12

3.5 H9N2 AIV 促进小鼠肠道细菌易位.....	13
3.6 H9N2 AIV 促进了小鼠肠腔内标记细菌 Neogreen 易位	13
3.7 藿香正气液抑制 H9N2 AIV 引起的肠道菌群混乱.....	15
3.7.1 藿香正气液减轻 H9N2 AIV 引起的肠道黏膜损伤.....	15
3.7.2 藿香正气液有效阻止 H9N2 AIV 攻毒后引起的肠道细菌易位.....	16
3.7.3 藿香正气液有效阻止 H9N2 AIV 攻毒后引起的肠腔 Neogreen 易位	17
4 讨论	17
4.1 H9N2 AIV 感染影响小鼠的肠道菌群结构.....	17
4.2 H9N2 AIV 感染破坏肠道屏障结构.....	18
4.3 H9N2 AIV 感染促进肠道致病菌易位.....	18
4.4 IFN- γ 促进肠道内菌葡萄球菌属等菌群增殖.....	19
4.5 藿香正气液可以改善 H9N2 AIV 引发的肠道菌群紊乱.....	19
五、结论	19
六、研究创新点	20
致 谢	21
团队成员和指导老师的简介	22
参考文献	24
附件 1 实验动物许可证	26
附件 2 论文发表情况	27

1 前言

1.1 科学问题和研究意义

H9N2 AIV 感染动物后缺乏特征性的临床症状和病变, 可以从气管、肺、脑、脾、胰、泄殖腔(肠道)等分离到病毒, 感染 3-5 天宿主开始出现炎症和肠道问题, 常常因为继发细菌(大肠杆菌、葡萄球菌、沙门氏菌等)感染而出现发病或死亡。比如鸡感染 H9N2 AIV 后会出现全身不适, 特别是感染后 5-7 天, 出现腹泻、气管粘液增多、支气管堵塞, 时间越长炎症越严重, 严重时还会出现腹膜炎、肝周炎和心包炎(俗称三炎)等。人感冒后也会头晕脑胀、咽喉肿胀、粘液增多、咳痰、呼吸困难、腹泻或便秘。细菌继发感染的问题也一直困扰着许多学者和临床从医人员, 同时给禽流感的防控带来很大的困难。为什么动物感染流感病毒后会出现严重的细菌继发感染现象? 这些细菌又是从哪里突破机体的黏膜屏障进入体内? 值得深入研究。

肠道是机体最大的免疫器官, 黏膜屏障和微生物菌群平衡被破坏后容易发生肠道疾病。禽流感病毒感染动物后可以在肠道上皮细胞中复制, 并引发炎症因子大量表达, 出现肠道炎性损伤。临床上多用抗生素来进行治疗。抗生素可以抑杀细菌, 但由于其广谱性也会造成肠道有益菌群的破坏, 加重机体肠道损伤。大量研究表明中草药在调理肠道方面有很好的效果, 藿香正气液能刺激肠道上皮 PKG 和 PKA 信号通路调整胃肠动力功能、调理肠道菌群、修复受损黏膜、提高消化酶活性等功能^[1,2]。临床发现中药复方藿香正气液治疗胃肠型感冒效果显著^[3,4]。围绕这些问题, 本项目在前期研究的基础上, 以 BALB/c 小鼠为动物模型, 用低致病性的 H9N2 AIV 进行感染, 探讨 H9N2 AIV 促进小鼠肠道有细菌易位的作用机理、肠道细菌易位与 H9N2 AIV 继发细菌感染的密切关系以及复方中药制剂抑制肠道菌群易位防治继发感染的可行性。

本论文从肠道微生物角度探讨禽流感病毒致病机理, 研究肠道菌群对病毒感染后作出的反应及其作用, 科研成果具有重要的理论和实践指导意义, 为人畜抗击禽流感等病毒感染提供新的思路。

1.2 H9N2 亚型禽流感病毒

禽流感病毒粒子从外到内依次为包膜、基质蛋白和核衣壳。囊膜位于病毒粒子最外层, 由 12-14 nm 长呈放射状的神氨酸酶(NA)、血凝素蛋白(HA)和基质

蛋白(M2)组成(图1)^[5]。根据其外膜 HA 和 NA 抗原性分型, 已有 18 个 H 亚型和 11 个 N 亚型。H9N2 亚型是其中一个血清型, 属于温和型、低致病性流感, 感染动物后临床症状不明显, 易继发细菌感染, 导致生产性能下降^[6, 7]。

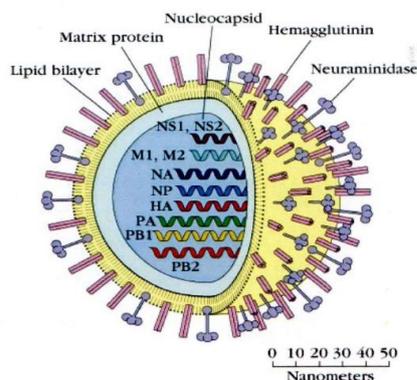


图1 禽流感病毒结构图^[8]

1.3 肠道黏膜屏障

微生物屏障由相对稳定的菌群组成, 且绝大多数为专性厌氧菌; 机械屏障由大量黏液蛋白、肠绒毛上皮组织细胞及其紧密连接蛋白等组成, 能够阻止病原微生物和其它有害物质穿过上皮细胞进入宿主体内。化学屏障由肠上皮细胞表面的抗菌物质、分泌型 SIgA 等共同构成, 抗菌肽等抗菌物质能够抑制有害菌在肠道上皮的粘附和定植^[9]。免疫屏障主要作用是维持对肠道共生菌的免疫耐受, 当遭到致病菌感染时, 有害菌可通过分泌毒力因子破坏黏膜屏障, 引起肠道黏膜组织的主动免疫应答, 及时清除有害菌的威胁^[10]。这四大屏障共同组成肠道黏膜屏障, 各屏障间结构上相对独立, 功能上密切联系, 发挥协同作用共同维护机体健康(图2)。

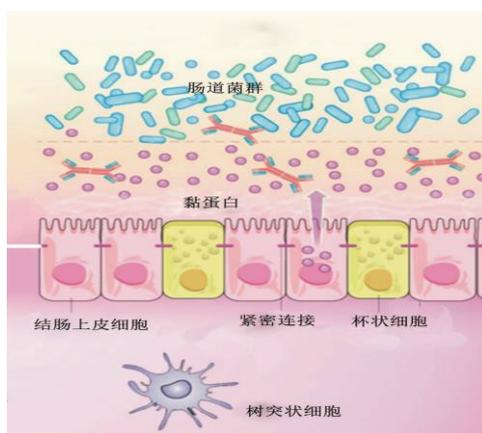


图2 肠道屏障结构图^[11]

1.4 肠道微生物与疾病研究进展

健康个体肠道内含有大量且动态的菌群, 这些动态菌群对维持肠道正常的形态、生理生化功能密切相关^[12]。很多疾病的发生与肠道菌群结构破坏密切相关, 发病时往往伴有特定的菌群结构特征。在胃肠道疾病患者中, 如炎症性肠病 (IBD) 患者, 肠道菌群的数量及多样性减少且病原菌增加等^[13, 14]; 肠易激综合征 (IBS) 患者粪便中 γ -变形菌丰度显著增多, 更明显的特征是副流感嗜血杆菌丰度急剧增加^[15]。营养性疾病中, 肥胖病患者体内分离到的阴沟肠杆菌 B29 可激活合成脂肪相关的基因^[16]; 糖尿病患儿体内产丁酸盐类细菌普遍丰度下降, 而多种条件致病菌显著增加^[17]。

近年来, 微生物研究越来越热, 随着研究的深入, 人们发现微生物不仅与胃肠道疾病、营养性疾病等息息相关, 与多种病毒性疾病的关系也逐渐引起关注, 特别是感染后造成的细菌性继发感染问题, 如 H1N1 甲型流感、人类免疫缺陷 (HIV) 和急性呼吸综合征 (SARS) 等病毒致病与并发细菌感染有很大关系^[18]。本世纪初爆发了严重 SARS 疫情, 在重症或死亡的病患中普遍出现细菌性继发感染现象, 在观察研究的 44 例重症患者中, 有 27 例继发了以细菌为主的感染^[19]。艾滋病病毒 (HIV) 患者有个共同点是肠道菌群失调, 铜绿假单胞菌、大肠埃希菌等多种引发炎症的细菌增多^[20]。感染 H9N2 AIV 后发生继发大肠杆菌感染现象更是普遍^[21]。因此, 病毒感染后发生的继发感染是多种病毒性疾病高死亡率的关键原因之一, 病毒感染后造成免疫系统失调, 肠道菌群紊乱, 肠道有害菌易位到全身引发炎症有关。

1.5 H9N2 AIV 对 SPF 鸡肠道菌群结构和屏障功能的研究进展

本研究团队前期研究发现 H9N2 AIV 感染后肉鸡肠道的微生物组成显著改变, 肠道菌群出现紊乱, 攻毒后第 5 天和 12 天埃希氏菌属、梭菌属、韦永氏球菌属均极显著上调 ($p < 0.01$), 而产乳酸类微生物如乳杆菌属、肠球菌属等细菌出现不同程度的显著下调。定量检测发现: 大肠杆菌在 H9N2 AIV 感染后 5 天开始出现极显著上调 ($p < 0.01$), 丰度均超过 40%。与大肠杆菌毒素受体密切相关的小酸含量也明显提高 ($p < 0.05$)。攻毒后回肠肠道上皮细胞绒毛和隐窝遭受不同程度的损伤, 胃肠黏膜分泌三叶太蛋白 TFF2、粘蛋白 MUC2、胞浆蛋白 ZO-1 等均显著降低 ($p < 0.01$), 表明黏液层结构和紧密连接在攻毒后遭受到一定程度的破

坏。病理切片发现攻毒后 5d、12d 肠道黏膜均出现了炎症病变。IFN- α 、IFN- γ 、IL-22、IL-17A 等促炎因子在攻毒后均极显著增加($p < 0.01$)。表明 H9N2 AIV 感染后, 破坏了肉鸡肠道菌群结构组成, 激发了炎症反应, 促进大肠杆菌增殖, H9N2 AIV 感染后丁酸含量增加, 上皮细胞通透性改变, 进一步促进大肠杆菌增殖及其毒素转移, 造成机体多种组织器官的炎症发生。(数据未发表)

1.6 研究目的和意义

H9N2 AIV 是一种低致病性病毒, 诱发宿主继发细菌性疾病造成机体发病或死亡。本研究创新性地研究 H9N2 AIV 感染与肠道菌群结构的密切关系。主要研究 H9N2 AIV 感染动物 (BALB/c 小鼠和 B6.129S7-*Ifng^{tm1Ts/J}* 缺失小鼠) 后肠道菌群、黏膜结构、免疫分子和细菌易位情况, 并用“标记细菌”模拟肠道细菌易位到肠系膜、肺脏和肝脏等组织器官情况, 探索 H9N2 AIV 促进小鼠肠道细菌易位的作用机理, 为控制 H9N2 AIV 引发的细菌继发感染提供新的思路。

1.7 技术路线

本研究的技术路线如图 3。

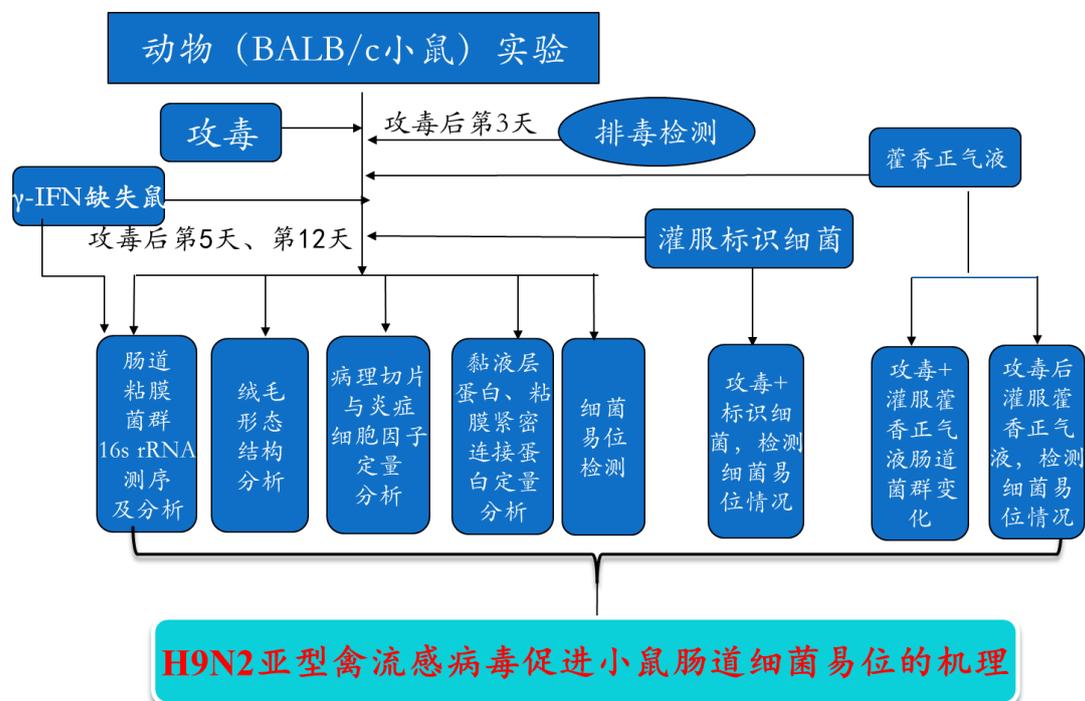


图 3 技术路线图

2 试验材料及方法

2.1 试验材料

2.1.1 毒株、菌株

H9N2 AIV 毒株 A/ferret/ SD/1406 (H9N2) 分离于雪貂, 病毒效价为 $10^{6.1} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$, 华南农业大学养禽与禽病防治研究室保存。Neongreen 特定标记的大肠杆菌 (有 Amp 抗性) 为山东大学微生物技术国家重点实验室惠赠。藿香正气液 (无酒精) 购自药店 (太极集团)。

2.1.2 试验动物

BALB/c 小鼠 (8 周龄) 购于南方医科大学比较医学研究所。IFN- γ 缺失小鼠 (B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts/J}) 由广东省实验动物监测所郭鹏举博士惠赠。实验小鼠均饲养于华南农业大学实验动物中心。

2.2 动物实验

2.2.1 动物试验分组与设计

选取同性别 80 只健康、体重相近的 8 周龄 BALB/c 鼠, 适应性饲养 1 周龄后随机分成六组, 每组 10 只, 分组及处理见表 1。

表 1 试验分组与设计

试验	组别	处理
攻毒试验	空白组	用 PBS 滴鼻, 300ul /只
	攻毒组	用 H9N2 AIV 滴鼻, 300ul /只
	Neongreen 组	PBS 滴鼻后 3 天, 灌服标识细菌
	攻毒+Neongreen 组	攻毒后 3 天, 灌服标识细菌
标识细菌示踪试验	HXZQY+ Neongreen 组	用 PBS 滴鼻后 2 天, 灌服 HXZQY, 第 3 天灌服标识细菌
	攻毒+ HXZQY+ Neongreen 组	攻毒后 2 天, 灌服 HXZQY, 第 3 天灌服标识细菌;
藿香正气液处理试验	HXZQY 组	用 PBS 滴鼻后 3 天, 灌服 HXZQY
	攻毒+HXZQY 组	攻毒后 2 天, 灌服 HXZQY

注: 攻毒指 H9N2 AIV 滴鼻, 300ul /只; 灌服 HXZQY 指灌服藿香正气液 1 ml / 100 g 体重; 灌服标识细菌指灌服 Neongreen 标识细菌 200ul /只; 病毒效价为 $10^{6.1} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 。

2.2.2 IFN- γ 缺失小鼠试验设计与分组

选取同性别纯合的 20 周龄 IFN- γ 缺失小鼠 (B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts/J}, 文中称 *Ifng*^{tm1Ts/J} mice) 6 只, 适应性饲养一周后, 实验组 (3 只) 用 H9N2 AIV 滴鼻, 300ul /只, 对照组 (3 只), 用 PBS 300ul /只滴鼻。攻毒后第 12 天在无菌环境下采集回肠内容物经液氮速冻后于-80℃保存, 送深圳华大基因科技服务有限公司进行 16s rRNA 基因的 V4 区域测序。

2.2.3 试验样品的采集

在 H9N2 AIV 攻毒后 3 天分别采集小鼠的泄殖腔与咽拭子做病毒分离检测。在攻毒后 5 天和 12 天, 取回肠后段 2 cm, 冲洗干净后取 1cm 立即放入液氮速冻后于-80℃保存, 用于肠道相关分子的检测; 另外 1 cm 放入切片固定液保存, 以备制作病理切片和组织切片。在无菌环境下采集回肠内容物经液氮速冻后于-80℃保存, 送深圳华大基因科技服务有限公司进行 16s rRNA 测序。无菌采集实验动物的肝、肺等组织置于无菌离心管中, 用于细菌的分离。

2.2.4 病毒分离鉴定

拭子洗脱液抽提总 RNA, 采用 RT-PCR 方法检测, 体系为 20ul, 包括 2×1 Step Buffer 10 ul, 上下游引物各 0.5 ul (F: CAAGATGGAAGTAGTATCACT, R: TTGCCAATTATATACAAATGT), RNA 2.0 ul, 1 Step Enzyme Mix 1.0 ul, 用 ddH₂O 补至 20 ul。反应程序: 50℃反转录 30 min; 94℃预变性 5 min; 30 个循环: 94℃变性 10 s, 55℃退火 15 s; 72℃延伸 90 s; 72℃后延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 法国 VL 凝胶成像系统记录结果。

2.2.5 细菌分离

无菌采集小鼠肝、肺、肠系膜和肠腔内容物等样品组织, 加 500ul 无菌生理盐水, 充分匀浆研磨, 吸 100ul 均匀涂布于 LB 平板上, 37℃培养 48 h, 记录细菌生长情况并拍照。

2.2.6 肠道切片及绒毛情况

肠道切片送至武汉赛维尔生物科技公司进行制作。肠道组织切片制作好后, 通过显微镜 (40×) 观察, 取 10 根结构完整的绒毛, 分别测量隐窝深度、绒毛长度 (Image Processing and Analysis 软件), 计算绒毛长度/隐窝深度 (V/C) 的比值。

2.2.7 肠道相关基因的检测

将超低温冻结的小鼠回肠样品剪取一小段置于 DEPC 水处理过的匀浆管中, 然后加入 1ml 的 RNAiso plus, 抽提总 RNA。反转录后用于荧光定量 PCR (qPCR) 检测。各基因定量 PCR 特异性引物如表 2。

表 2 qPCR 的引物序列

基因名称	上下游引物(5'-3')
GDPAH	F: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA R: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
ZO-1	F: GAGCGGGCTACCTTACTGAAC R: GTCATCTCTTTCCGAGGCATTAG
Occludin	F: TGAAAGTCCACCTCCTTACAGA R: CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG
Claudins-1	F: AGCACCGGGCAGATACAGT R: GCCAATTACCATCAAGGCTCG
IFN- γ	F:TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA R: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
IFN- α	F: GGATGTGACCTTCCTCAGACTC R: ACCTTCTCCTGCGGGAATCCAA
IFN- β	F: CCTATGGAGATGACGGAGAAGAT R: TGGAGAGCAGTTGAGGACAT
IL-22	F: CGATCTCTGATGGCTGTCCT R: CACAGGGCAATGAGAAGCAG

2.3 肠道菌群 16s rRNA 的 V4 区域扩增子测序

将采集的肠道内容物做 16s rRNA 的 V4 区域测序 (深圳华大基因)。

2.4 数据分析

所有数据均用 Excel 2016 整理计算, 并用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 差异显著性检验采用 DUNCAN 多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著, 试验数据用平均值 \pm 标准差形式表示。

3 结果与分析

3.1 排毒检测

攻毒后第 3 天采集泄殖腔拭子和肠道组织, 抽提核酸, 用 RT-PCR 检测 H9N2 AIV 的 HA 基因, 电泳结果表明小鼠攻毒后均有排毒 (图 4)。

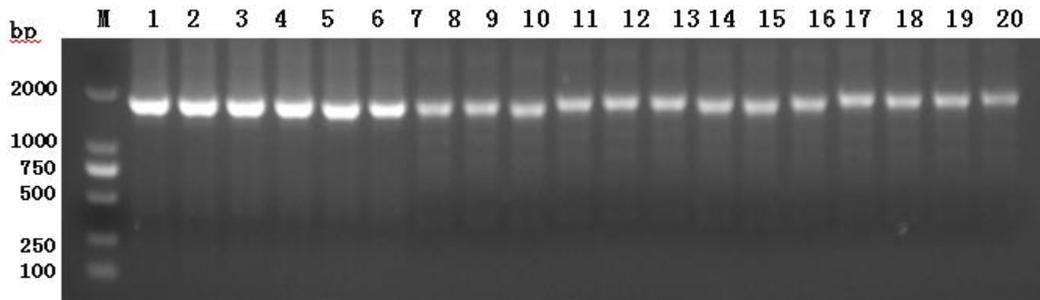


图 4 H9N2 AIV HA 基因 RT-PCR 检测结果

M: 2000 Marker, 1-20 为样品。

3.2 H9N2 AIV 改变小鼠肠道菌群结构

如图 5A 和 5B 所示, 由空白组可知, 对照组个体回肠内主体菌群为: 厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*), 攻毒后第 5 天, 回肠内的变形菌门菌群极显著下调 ($p < 0.01$), 在第 12 天极显著增加, 放线菌门在第 12 天极显著上调 ($p < 0.01$)。其他菌未发生明显的变化。从图 5 C 中可以看出, 攻毒感染后第 5 天, 链球菌属 (*Streptococcus*) 出现极显著下调 ($p < 0.01$), 而葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 则极显著上调 ($p < 0.01$); 图 5 D 可知, 攻毒后第 12 天, 链球菌属、葡萄球菌属和 *Corynebacterium-1* 极显著上调 ($p < 0.01$), 而乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 极显著下调 ($p < 0.01$), 其他变化不显著。结果表明: 小鼠感染 H9N2 AIV 后, 其回肠内的菌群发生显著变化。

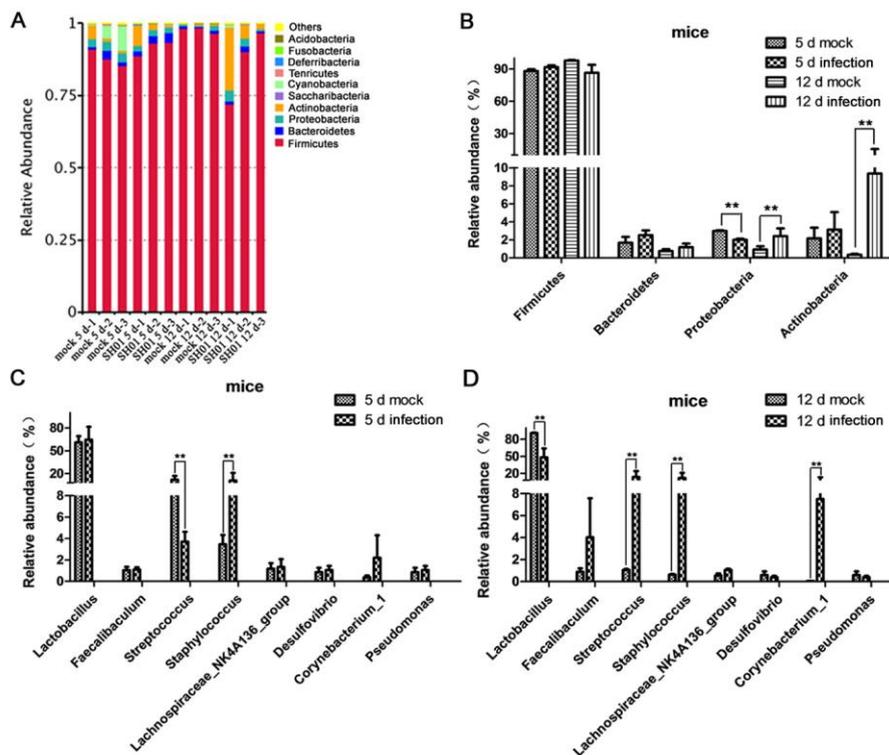


图 5 小鼠肠道菌群的组成变化

A: 回肠菌群在门水平的相对丰度; B: 四种主要菌群门水平丰度变化; C: H9N2 AIV 感染后 5 天回肠菌群属水平丰度变化; D: H9N2 AIV 感染后 12 天回肠菌群属水平变化。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

3.3 H9N2 AIV 对小鼠肠道屏障结构的影响

3.3.1 H9N2 AIV 破坏小鼠绒毛结构

图 6 所示为攻毒组和空白组的小鼠回肠病理学切片图, 与空白组相比, 攻毒后第 5 天和第 12 天的回肠绒毛上皮细胞均有出现局部坏死脱落, 固有层水肿; 局部肠腺萎缩, 肠腺周围结缔组织水肿疏松, 有明显炎症细胞浸润。图 7 所示, 攻毒后 5 天绒毛长度/隐窝深度 (V/C) 比值显著小于空白组 ($p < 0.05$); 攻毒后第 12 天绒毛长度明显小于空白组 ($p < 0.05$), 隐窝深度极显著大于空白组 ($p < 0.01$), 且 V/C 极显著小于空白组 ($p < 0.01$)。综合以上表明感染 H9N2 AIV 导致小鼠回肠绒毛结构受损。

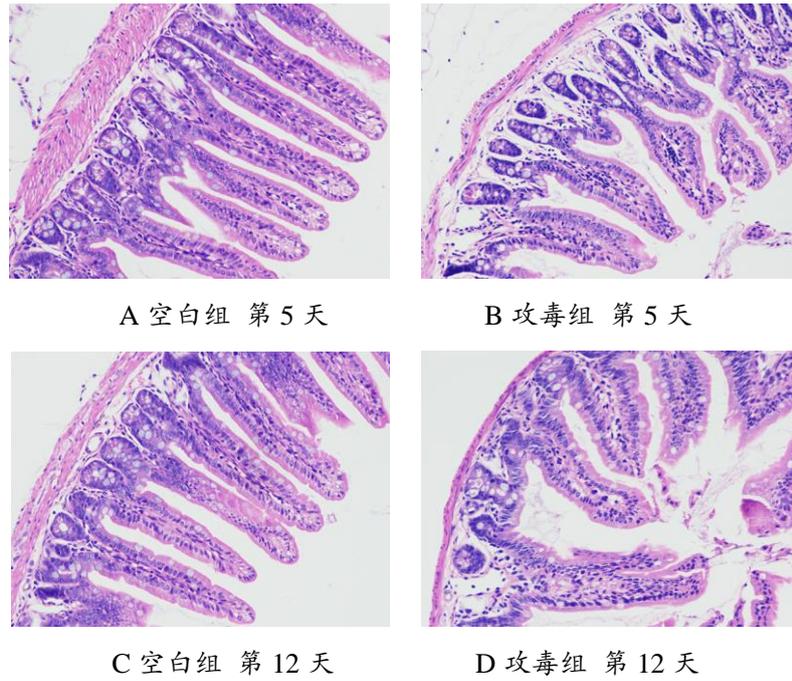


图 6 回肠绒毛病理切片 (200×)

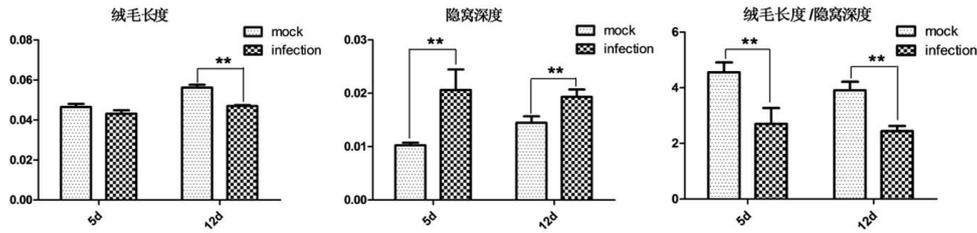
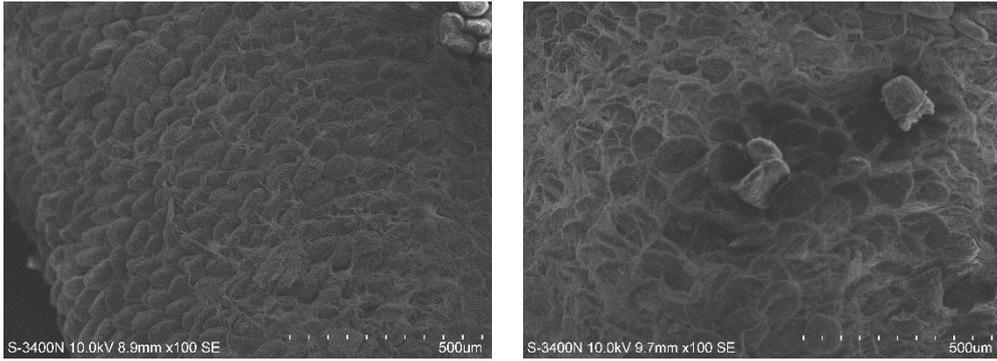


图 7 回肠绒毛长度、隐窝深度、绒毛长度/隐窝深度 (V/C)

mock: 空白组, infection: 攻毒组; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

3.3.2 H9N2 AIV 破坏小鼠肠道绒毛形态

从图 8 可以看出, 空白组的绒毛排列紧密, 形态饱满, 而攻毒组的绒毛在形态上呈现干瘪状态, 排列也较稀疏, 有明显的损伤萎缩形态。表明 H9N2 AIV 对小鼠肠道绒毛形态造成一定的损伤。



A 对照组

B 攻毒组

图 8 小鼠回肠肠道微绒毛扫描电镜图 (100×)

3.3.3 H9N2 AIV 降低了小鼠肠道结构蛋白 mRNA 表达量

从图 9 可知, 在攻毒感染后第 12 天, Claudin-1 和 Occludin 蛋白的 mRNA 表达水平极显著下调 ($p < 0.01$), 而且 ZO-1 蛋白的表达量水平也显著下降 ($p < 0.05$), 表明小鼠回肠黏膜结构出现一定程度的损伤, 导致肠道紧密连接疏松, 增加病原侵袭机体的机率。

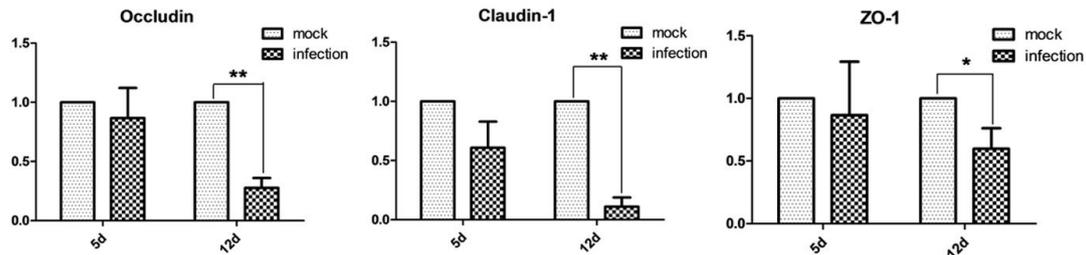


图 9 回肠黏膜结构蛋白 mRNA 表达量

mock: 空白组, infction: 攻毒组, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

3.3.4 H9N2 AIV 显著增加肠道上皮组织促炎性细胞因子 mRNA 表达量

由图 10 可知, α 干扰素 (IFN- α) 在攻毒后第 5 天极显著增加 ($p < 0.01$), β 干扰素 (IFN- β)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 在攻毒后第 5 天和第 12 天均极显著增加 ($p < 0.01$); 白细胞介素 22 (IL-22) 攻毒后无显著变化。表明 H9N2 AIV 感染小鼠后也可导致肠道炎症反应, 与肠道组织形态观察结果相符合。

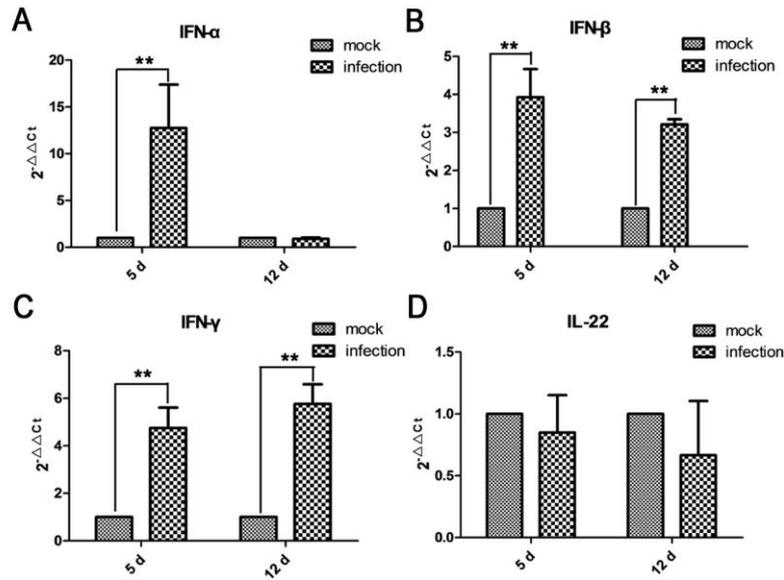


图 10 H9N2 AIV 感染对促炎性细胞因子 mRNA 表达的影响
 mock: 空白组, infection: 攻毒组, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

3.4 IFN- γ 促进 H9N2 AIV 攻毒后小鼠肠道内葡萄球菌属菌群增殖

IFN- γ 缺失小鼠 (B6.129S7-*Ifng*^{tm1Ts/J}) 攻毒后第 12 天回肠肠道内变形菌门 (*Proteobacteria*) 菌群极显著上调 ($p < 0.01$), 其他门菌未发生明显的变化 (图 11A)。从图 11 B 看出, 攻毒后第 12 天 IFN- γ 缺失小鼠肠道内的乳杆菌属和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌群丰度极显著增加 ($p < 0.01$), 而葡萄球菌属菌群则极显著下调 ($p < 0.01$)。表明 IFN- γ 在促进肠道内葡萄球菌属菌群增殖过程中扮有重要作用。

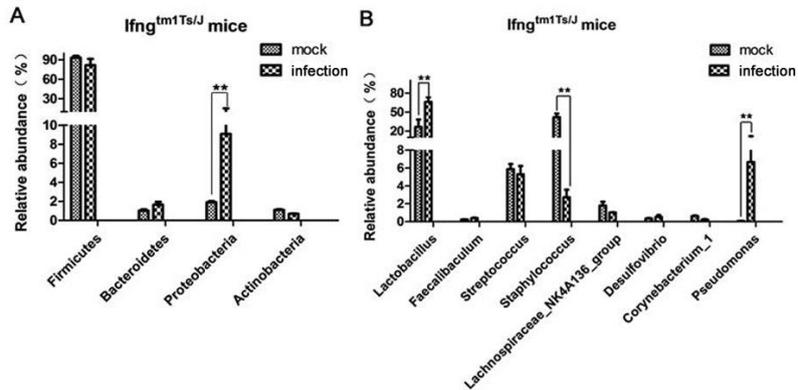


图 11 IFN- γ 缺失小鼠肠道菌群组成的而变化

A: 四种主要菌群门水平丰度变化; B: H9N2 AIV 感染后 12 天回肠菌群属水平丰度变化。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

3.5 H9N2 AIV 促进小鼠肠道细菌易位

从图 12 和表 3 可知, 感染 H9N2 AIV 后 5 天和 12 天, 小鼠的肝、肺组织研磨液均能分离到细菌。分离的细菌经测序分析, 分离的细菌大部分为葡萄球菌属细菌, 少量的大肠杆菌。

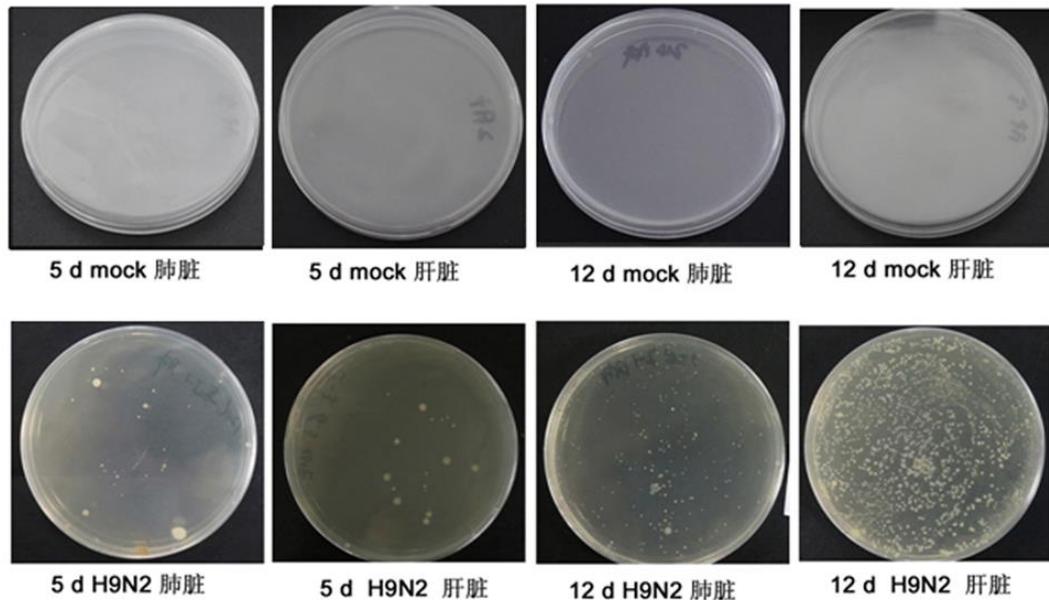


图 12 小鼠感染 H9N2 AIV 后内脏器官细菌分离情况

表 3 小鼠感染 H9N2 AIV 后内脏器官细菌分离情况

天龄	组织	对照组	攻毒组
5 d	肝	- (4/4) ^a	+ (4/4)
	肺	- (4/4)	+ (4/4)
12 d	肝	- (4/4)	+ (4/4)
	肺	- (4/4)	+ (4/4)

注: “-”表示未分离到细菌, “+”表示有分离到细菌。^a括号内数字, 分母表示共有 4 只小鼠, 分子表示分离到细菌的小鼠只数。下同。

3.6 H9N2 AIV 促进了小鼠肠腔内标记细菌 Neongreen 易位

通过灌服标记细菌 Neongreen 后, 于特定时间点对小鼠的肠腔、肝、肺和肠系膜组织进行细菌分离, 其细菌鉴定的 LA 平板如图 13 所示, 分离情况如表 4。从细菌分离的结果看来, 灌服标记细菌到肠腔后, 所有小鼠肠腔均能分离到目的细菌。灌服后 36 h 在小鼠的肠系膜能分离到大量的标记细菌, 而空白组的肠系

膜没有分离到, 表明小鼠在灌服标记细菌后, 肠道内的细菌从肠腔内透过肠上皮组织转移到了肠系膜等组织部位。灌服后 24 h 在攻毒组的肺部均有分离到标记细菌, 而对照组 36 h 以前没有分离到细菌, 但在 36 h 后也能分离到标记细菌, 可能是标记细菌排出到环境后, 可以呼吸进入肺脏的原因。综合上述, 表明攻毒后 H9N2 AIV 能够导致引起细菌从肠腔转移到肺脏、肠系膜和肝脏。

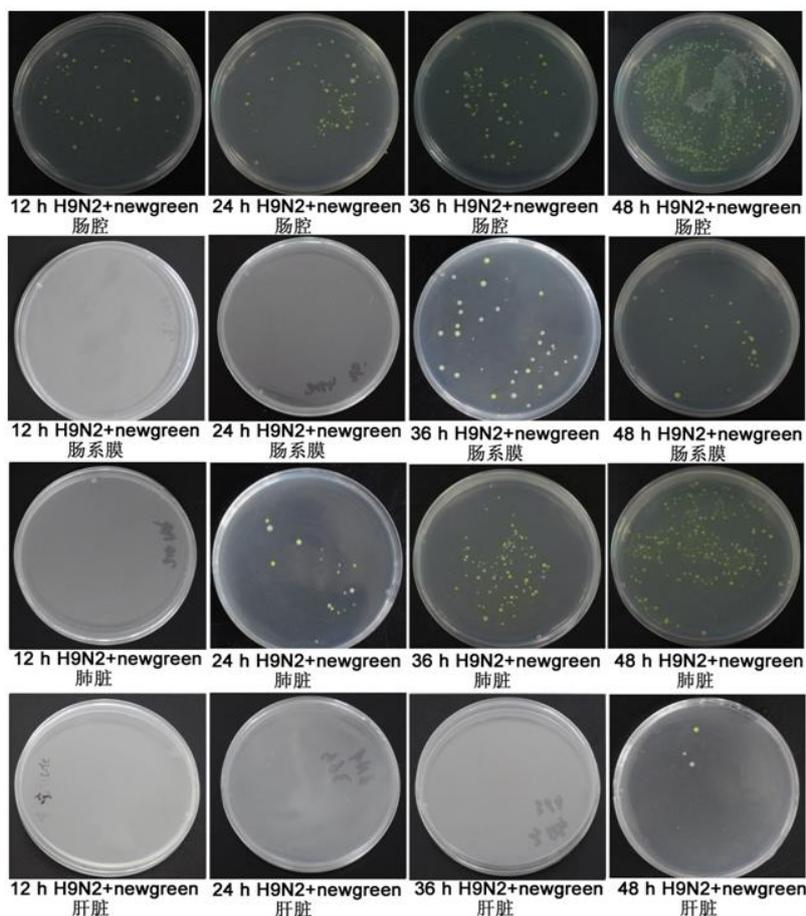


图 13 不同组织标识细菌 newgreen 分离情况

表 4 标识细菌 newgreen 分离情况

组织	Neongreen 细菌灌服组				攻毒+Neongreen 细菌组			
	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h
肠腔	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)
肺	-(3/3)	-(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	-(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)
肠系膜	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	+(3/3)	+(3/3)
肝脏	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	+(1/3)

3.7 藿香正气液抑制 H9N2 AIV 引起的肠道菌群混乱

如图 14 A 和 14 B 所示, 由藿香正气处理组可知, 小鼠个体回肠内主要菌群没有明显变化。攻毒后中药处理组的回肠内的拟杆菌门在第 12 天极显著上调 ($p < 0.01$)。其他菌门未发生明显的变化。从图 14 C、14 D 中可以看出, 藿香正气液处理组和攻毒+藿香正气液处理组的主要菌属均未有显著性变化。表明藿香正气液调整了小鼠肠道内的菌群组成, 抑制了 H9N2 AIV 引起的菌群混乱。

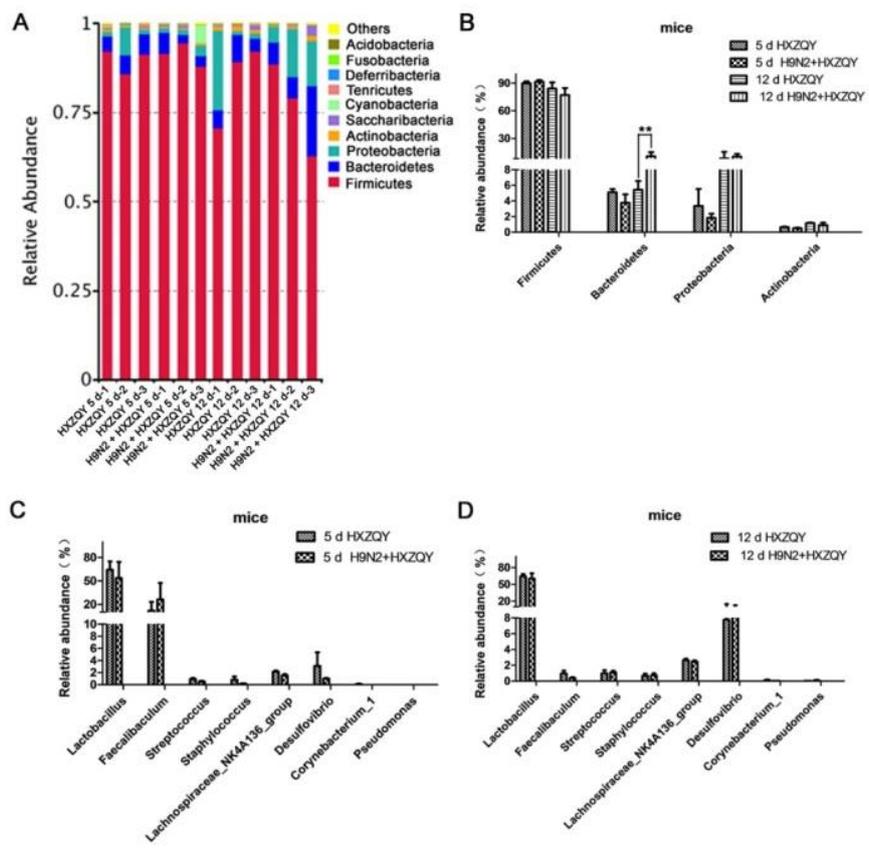


图 14 小鼠回肠肠道菌群的组成

A: 回肠菌群在门水平的相对丰度; B: 四种主要菌群门水平丰度变化; C: H9N2 AIV 感染后 5 天回肠菌群属水平丰度变化; D: H9N2 AIV 感染后 12 天回肠菌群属水平变化。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

3.7.1 藿香正气液减轻 H9N2 AIV 引起的肠道黏膜损伤

图 15 所示为藿香正气液组和攻毒+藿香正气液组的小鼠回肠病理学切片图, 可知, 藿香正气液组在 5 天、12 天检测均表现正常, 而攻毒+藿香正气液组在攻毒后 12 天检测可发现少量绒毛上皮细胞坏死或溶解。因此说明藿香正气液在一

定程度上可以有效的缓解改善 H9N2 所导致的肠绒毛坏死或水肿，减轻流感病毒感染引起的肠黏膜损伤。

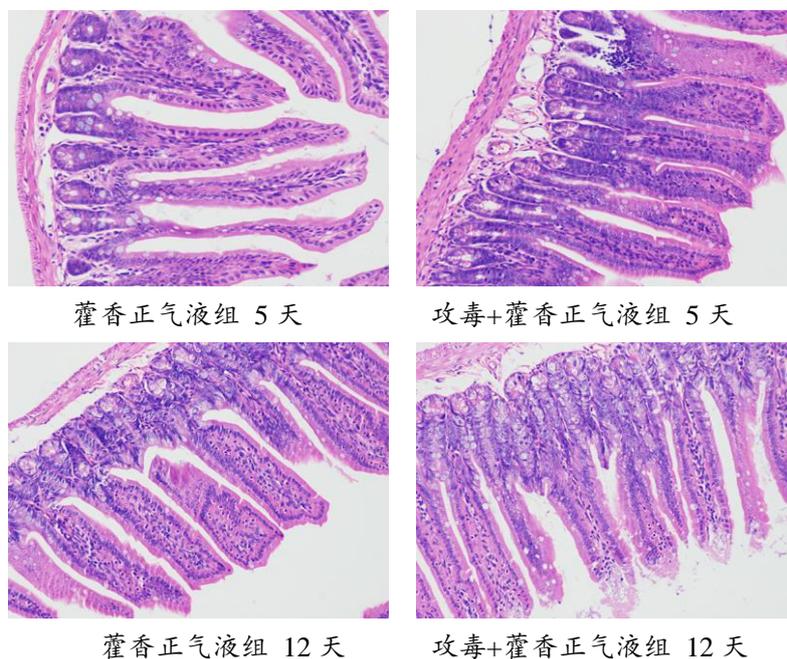


图 15 回肠病理切片 (200×)

3.7.2 藿香正气液有效阻止 H9N2 AIV 攻毒后引起的肠道细菌易位

从图 16 和表 5 可知，攻毒后用藿香正气液 (HXZQY) 治疗，小鼠的肝、肺组织研磨液很少分离到细菌 (12 天 H9N2 攻毒+HXZQY 组肝脏 1 只分离到)。以上结果表明 H9N2 AIV 能够引起细菌易位到肝和肺等组织，而 HXZQY 可以有效阻止细菌易位到肝和肺等组织。

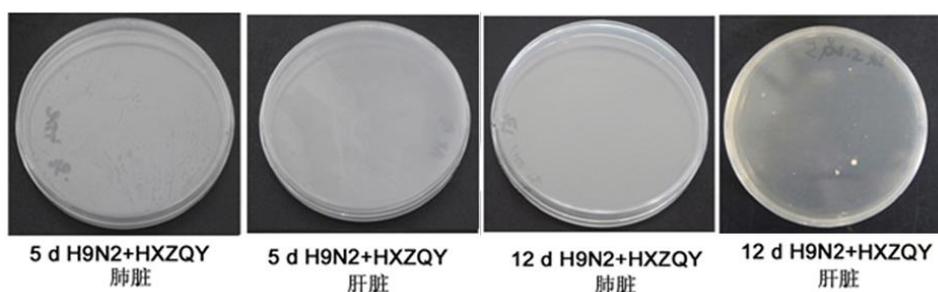


图 16 小鼠感染 H9N2 AIV+藿香正气液治疗后内脏器官细菌分离情况

表 5 不同组细菌分离情况

天龄	组织	HXZQY 对照组	攻毒组	H9N2 攻毒 +HXZQY
5 d	肝	- (4/4)	+ (4/4)	- (4/4)
	肺	- (4/4)	+ (4/4)	- (4/4)
12 d	肝	- (4/4)	+ (4/4)	<u>+ (1/4)</u>
	肺	- (4/4)	+ (4/4)	- (4/4)

3.7.3 藿香正气液有效阻止 H9N2 AIV 攻毒后引起的肠腔 Neongreen 易位

由表 6 可知, 攻毒后用藿香正气液 (HXZQY) 治疗, 再灌服标记细菌 Neongreen 后, 小鼠的肝、肺和肠系膜组织均分离不到标记菌, 表明 H9N2 AIV 能够导致引起 Neongreen 标记细菌从肠腔转移到肺脏、肠系膜和肝脏, 而 HXZQY 可以有效阻止 Neongreen 标记细菌的易位, 对肠道有比较好的保护作用。

表 6 标识细菌 Neongreen 分离情况

组织	Neongreen 细菌灌服组				攻毒+Neongreen 细菌组			
	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h
肠腔	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)	+(3/3)
肺	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)
肠系膜	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)
肝脏	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)	-(3/3)

4 讨论

4.1 H9N2 AIV 感染影响小鼠的肠道菌群结构

H9N2 AIV 广泛存在于家禽、飞禽和哺乳动物中。虽是一种低致病力病毒, 但由于易诱发多种呼吸道和胃肠道问题而造成养禽业损失惨重。H9N2 AIV 对呼吸道的研究很多, 但对胃肠道的研究几乎没有。本文通过 Illumina 测序技术、扫描电镜、病理切片、微生物分离培养、荧光定量 PCR 等技术分析 H9N2 AIV 感染肠道菌群结构、肠道屏障、菌群易位和中草药调节作用的影响。

16s rRNA 测序结果显示, 正常小鼠回肠以厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门

和放线菌门为主。当机体健康状态时, 它们能共生相互依赖达到动态平衡, 共同维护肠道健康。而当微生物菌群失衡时, 便会引发一系列病症^[22]。H9N2 AIV 感染肉鸡后第 5 天开始体内乳杆菌属等有益菌大量减少, 条件致病菌增加, 特别是条件致病菌埃希氏菌属丰度超过 40% (数据未发表)。与鸡不同, H9N2 AIV 感染小鼠对菌群变化的幅度相对小很多, 引发菌群变化所需时间相对长些, 主要导致变形菌门和放线菌门菌群丰度增加。感染后 12 天, 有益的乳杆菌属显著下调, 链球菌属、葡萄球菌属和 *Corynebacterium-1* 显著上调。胃肠道疾病与肠道菌群特征的病原学关系是相对固定的^[23, 24], H9N2 AIV 感染导致小鼠肠道菌群结构破坏, 可能是菌群环境趋向或临界与病理状况。

4.2 H9N2 AIV 感染破坏肠道屏障结构

肠道形态结构和生理功能的稳定是肠道健康的基础。绒毛越短、隐窝越深, 肠道功能越差。V/C 比值越大, 肠道越健康; 反之黏膜可能出现了受损^[2]。本试验中小鼠在感染 H9N2 AIV 后第 5 天和第 12 天回肠绒毛长度变短、隐窝变深, 比值明显下调, 表明小鼠感染 H9N2 流感病毒后肠道绒毛结构都会受损, 营养吸收功能受损。通过扫描电镜可直接观察到感染小鼠绒毛发生改变, 排列稀疏并且发生萎缩症状, 进一步做病理切片分析发现小鼠感染 H9N2 AIV 后回肠发生局部绒毛上皮细胞坏死脱落, 部分肠绒毛固有层水肿, 同时还出现局部肠腺萎缩, 肠腺周围结缔组织水肿疏松等病理症状。综合上述, H9N2 感染后能破坏肠道屏障结构, 破坏宿主的肠道消化吸收能力, 进一步可能影响机体的免疫能力。

紧密连接蛋白是肠道黏膜屏障的重要结构组成部分, 具有选择通过功能, 能够调控水分子和营养物质的吸收, 阻止有害物质的侵袭作用。这种紧密连接结构由跨膜蛋白 (Occludin 和 Claudins) 和胞浆蛋白 (ZO-1、ZO-2 和 ZO-3) 组成^[25, 26]。本研究发现攻毒后, 在小鼠回肠黏膜中, ZO-1, Claudin-1 和 Occludin 蛋白在第 12 天时表达量显著下降 ($p < 0.05$), 表明肠道的紧密连接结构受损、物质通透性增强, 屏障遭受破坏, 此时机体容易受肠腔内细菌和病原体的侵袭。

4.3 H9N2 AIV 感染促进肠道细菌易位

H9N2 感染后改变了肠道菌群结构, 小鼠肠道主要有益菌均显著下调, 条件致病菌葡萄球菌属等显著增加, 肠道屏障结构被破坏, 增加了肠道的通透性, 条件致病菌有可能达到致病条件发生病变。H9N2 AIV 感染后分菌实验发现, 小

鼠感染后肝和肺组织均能分离到细菌, 通过肠道菌群变化分析猜测, 分离到的细菌大部分为葡萄球菌, 少部分为大肠杆菌, 细菌可能来源于小鼠肠道菌群易位。

进一步用含有标记基因和抗氨苄基因的标记细菌 (Neogreen) 灌服小鼠, 小鼠体内特定标记细菌分离显示小鼠感染 H9N2 AIV 后灌服标记细菌能够从肠道的肠腔内先后易位到肺脏、肠系膜和肝脏, 很大原因是肠腔内的细菌穿过了机械屏障后易位到其他组织器官。表明 H9N2 AIV 感染促进小鼠肠道致病菌易位, 进一步通过体液循环或食道等方式转移到小鼠肺等组织从而导致细菌感染。

4.4 IFN- γ 促进肠道内葡萄球菌属等菌群增殖

小鼠上活化的 Th1 亚群产生 IFN- γ , 在肠上皮组织中, 可以通过刺激细胞产生活性氮和活性氧来发挥抗菌抗病毒作用^[8]。活性氧和活性氮不稳定很容易形成硝酸盐, 释放到肠腔中, 而肠腔中的很多变形门细菌可以利用硝酸盐进行氮呼吸, 可能产生一些有害物质从而创造出某些有利于条件致病菌和其他类型细菌生存环境, 葡萄球菌属等细菌可能适应这类型环境而快速增殖。这些细菌活动特性可能是在生物进化过程中不断的调整适应形成的, 暗示人类需要在病原菌斗争过程中不断探索发现, 并减少创造条件病原菌恶化的条件。

4.5 藿香正气液可以改善 H9N2 AIV 引发的肠道菌群紊乱

H9N2 AIV 感染后肠道结构破坏, 诱发肠道菌群紊乱, 导致条件致病菌丰度增加、有益菌丰度减少。中草药制剂藿香正气液被证实能够增加鸡体的乳酸杆菌和双歧杆菌菌群数量^[27], 且能调节鼠伤寒沙门氏菌等导致的腹泻^[18]。我们的试验也证明灌服藿香正气液能够显著改善 H9N2 AIV 感染诱发的菌群紊乱, 抑制感染诱发的葡萄球菌、*Corynebacterium-1* 等异常增加, 保护肠道健康。进一步研究中草药制剂服用的剂量、服用时间或调整中草药的配方来改善治疗效果。我们的研究为 H9N2 AIV 继发细菌感染的防治提供一个有效方向。

五、结论

- 1、H9N2 AIV 感染 BALB/c 小鼠后, 可诱发肠道菌群紊乱, 主要是乳杆菌属显著下调 ($p < 0.01$), 葡萄球菌属、链球菌属和 *Corynebacterium-1* 极显著上调 ($p < 0.01$)。IFN- γ 是促进肠道内葡萄球菌属菌群增殖的重要因素。
- 2、H9N2 AIV 感染 BALB/c 小鼠后, 回肠黏膜屏障被破坏, 肠壁通透性增加, 小

鼠肠道条件性致病菌如葡萄球菌、大肠杆菌易位, 分别从肠腔易位到了肝脏、肺脏和肠系膜等组织器官。

- 3、藿香正气液能抑制 H9N2 AIV 感染诱发的葡萄球菌属细菌、大肠杆菌等的异常增加, 有效地抑制 H9N2 AIV 诱发的细菌易位。

六、本论文的创新之处

- 1、本论文创新性地研究 H9N2 AIV 感染与肠道菌群的密切关系。证实了小鼠经呼吸道途径感染 H9N2 AIV 病毒后, 可以引起肠道菌群紊乱, 粘膜屏障损伤, 且肠腔内细菌可以易位到内脏各组织器官。
- 2、本论文从肠道健康的角度提出了防治 H9N2 AIV 感染引发细菌继发感染的新策略。维护肠道菌群平衡和肠道屏障完好可以有效控制 H9N2 AIV 引发的肠道细菌易位。

致 谢

本论文是在谢青梅教授和陈义虎老师的悉心指导下的完成,衷心感谢两位老师在学习过程中给予我们细心的指导,使我们学习和懂得了科学研究中的技术方法,也让我们浅尝到生命科学的奥妙!

在论文研究过程中,在老师的指导下,我们认真完成了每一个试验,分析了所有的试验数据,有些试验经过多次重复才完成,我们体会很深,感触颇多,学习到了很多的生物学知识。实验过程中的动物饲养试验在华南农业大学实验动物中心完成,由专门的实验动物饲养员刘老师负责,我们参与了喂养、攻毒和采样等工作;肠道微生物菌群的 16s rRNA 测序是送到深圳华大基因科技服务公司完成的,我们分析了数据并作图;肠道切片等是送到武汉赛维尔生物科技有限公司完成的,我们处理了图片;免疫分子的定量检测是指导老师和研究生哥哥的帮助下完成的。研究报告的撰写由谢青梅老师给我们讲解写作的方法,并给我们一本《华南农业大学学位论文撰写规范》,要求我们查阅资料先写出初稿,我们写论文初稿时很艰难,我们有分工也有合作,比如陆浩然主要负责查资料、分析数据、写前言、结果分析等,张露萱主要负责写材料方法、结果分析和参考文献等等。初稿最后交由两位指导老师多次修改并形成正式稿。该项目研究是在华南农业大学实验动物中心和基因工程实验室完成,衷心感谢华南农业大学提供的研究平台,感谢基因工程实验室老师和同学的热心帮助,衷心感谢陈义虎和谢青梅老师的耐心指导!

团队成员和指导老师的简介

陆浩然，男，2000年11月出生于广州，现就读于广东实验中学。

张露萱，女，2001年3月出生于广州，现就读于广东实验中学。

陈义虎：男，广东实验中学生物老师。生物竞赛主教练，广东省骨干教师培养对象。

谢青梅：女，华南农业大学动物科学学院副院长、教授、博士生导师、珠江学者；广东省家禽产业技术体系首席专家，中国畜牧兽医学学会动物微生态学常务理事。承担国家863计划、国家自然科学基金等课题57项，近年来发表学术论文191篇，SCI收录论文70篇（以第一作者或通讯作者发表SCI论文47篇，累计影响因子：142.235）。申请国家发明专利15件，授权专利10件。获科研成果奖9项、教学成果奖5项。曾获“全国巾帼建功标兵”、“广州市优秀女科技工作者”等称号。

学术诚信声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知,除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处,本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员: 陆浩然 张露萱

指导老师: 陆浩然 陈红霞

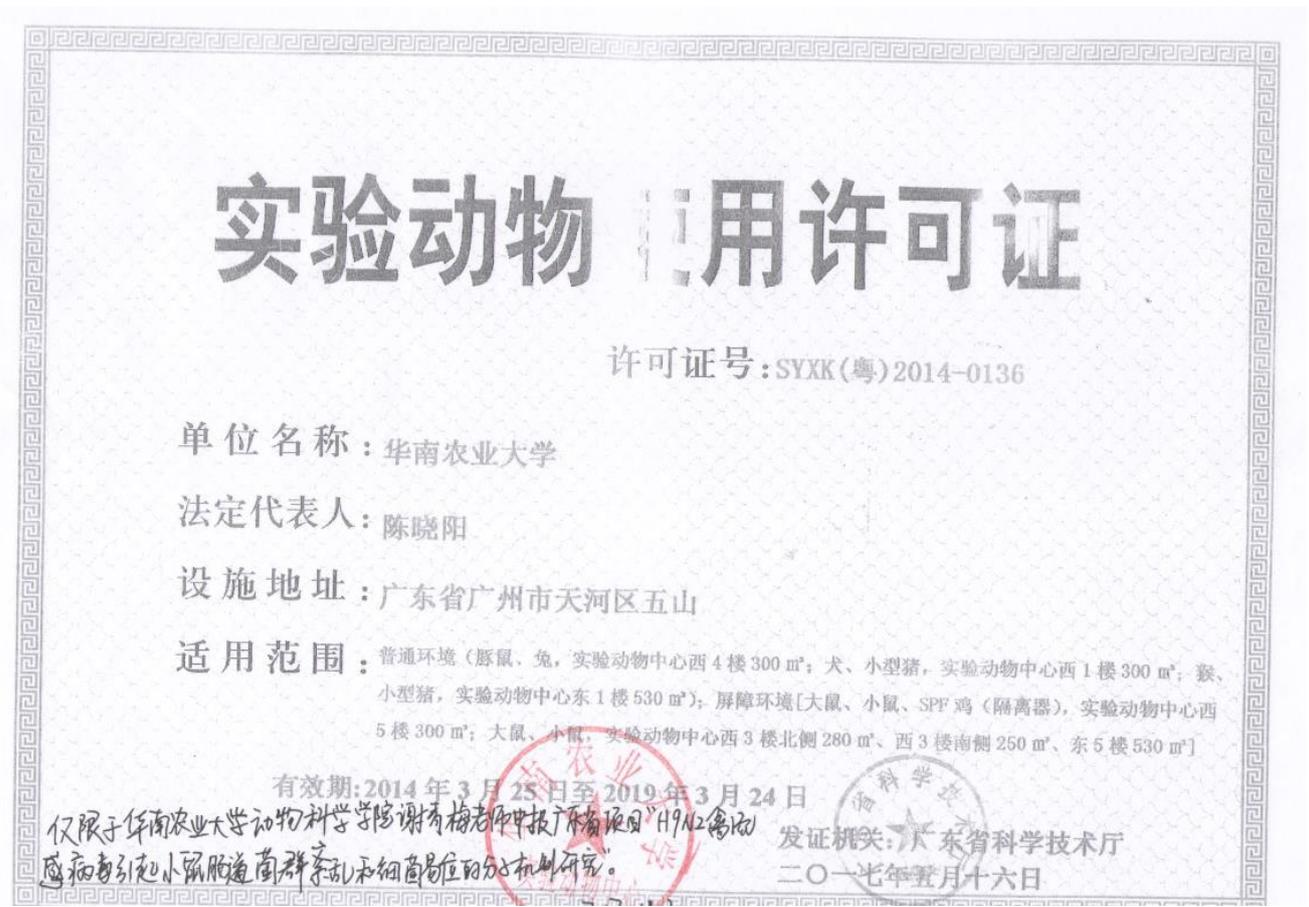
2017 年 9 月 12 日

参考文献

- [1] 何颖辉, 罗晓健, 钱星文, 等. 藿香正气胶囊对菌群失调小鼠黏膜免疫的影响[J]. 中国中药杂志, 2007(22): 2397-2400.
- [2] 翟宏丽. 藿香正气提取物改善胃动力障碍的临床与基石出研究[D]. 天津医科大学, 2005.
- [3] 席亚静. 藿香正气汤剂治疗暑湿型胃肠感冒60例临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2017(03): 39-40.
- [4] 张轶鹤. 藿香正气水(丸)治疗胃肠型感冒验案浅析[J]. 实用中医内科杂志, 2005(19): 381.
- [5] 周长海, 段晓翔, 陈洪影, 等. 饲料中添加葡萄糖酸钠对肉鸡肠绒毛结构变化的影响[Z]. 中国河南郑州: 2014, 1.
- [6] 邹云峰. 肉鸡温和型禽流感的诊治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013(04): 160.
- [7] Qi X, Liu C, Li R, et al. Modulation of the innate immune-related genes expression in H9N2 avian influenza virus-infected chicken macrophage-like cells (HD11) in response to Escherichia coli LPS stimulation[J]. Research in Veterinary Science, 2017, 111: 36-42.
- [8] Magalhaes Andrade De Goes A C, Baroni De Moraes M T, Silveira W D C, et al. Development of a rapid and sensitive latex agglutination-based method for detection of group A rotavirus[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 148(1-2): 211-217.
- [9] Schnoor M, Betanzos A, Weber D A, et al. Guanylate-binding protein-1 is expressed at tight junctions of intestinal epithelial cells in response to interferon-gamma and regulates barrier function through effects on apoptosis[J]. Mucosal Immunology, 2009, 2(1): 33-42.
- [10] 王克勤, 马恩陵, 温泉, 等. 肠道免疫屏障中上皮层内淋巴细胞的特点及影响因素[J]. 中国临床营养杂志, 2003(01): 54-60.
- [11] Srikanth C V, McCormick B A. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk[J]. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2008, 2008: 626827.
- [12] Baumler A J, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut[J]. Nature, 2016, 535(7610): 85-93.
- [13] 张迎娣, 张红杰. 肠道菌群在肠道稳态和炎症性肠病中的研究进展[J]. 胃肠病学, 2015(03): 184-187.
- [14] 冯云, 刘玉兰. 炎症性肠病的肠外表现的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015(06): 631-640.

- [15] 贺国华, 冀文茹, 陆江阳. 严重创伤感染致肠道免疫屏障损伤的研究进展[J]. 疾病监测与控制, 2009(06): 383-384.
- [16] Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice[J]. ISME Journal, 2013, 7(4): 880-884.
- [17] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. Nature, 2012, 490(7418): 55-60.
- [18] 任志林. MERS冠状病毒主蛋白酶与N3抑制剂复合物的结构功能研究及SARS冠状病毒解旋酶的晶体学研究[D]. 南开大学, 2014.
- [19] 许田, 张培培, 姜玉梅, 等. 流行病传播模型与SARS[J]. 自然杂志, 2004(01): 20-25.
- [20] Vujkovic-Cvijin I, Dunham R M, Iwai S, et al. Dysbiosis of the Gut Microbiota Is Associated with HIV Disease Progression and Tryptophan Catabolism[J]. Science Translational Medicine, 2013, 5(193ra91193).
- [21] Saldana Z, Erdem A L, Schueller S, et al. The Escherichia coli Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic E. coli[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(11): 3451-3461.
- [22] Deriu E, Boxx G M, He X, et al. Influenza Virus Affects Intestinal Microbiota and Secondary Salmonella Infection in the Gut through Type I Interferons[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(e10055725).
- [23] Garrett W S, Lord G M, Punit S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system[J]. Cell, 2007, 131(1): 33-45.
- [24] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [25] Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013, 70(4): 631-659.
- [26] Kolodziej L E, Lodolce J P, Chang J E, et al. TNFAIP3 Maintains Intestinal Barrier Function and Supports Epithelial Cell Tight Junctions[J]. PLoS one , 2011, 6(e2635210).
- [27] 封宇昊. 益生菌联合藿香正气水对肉鸡生长性能及肠道菌群的影响[J]. 科技风, 2016(24): 17-18.

附件 1 实验动物许可证



附件 2 论文发表情况

1、H9N2 AIV对小鼠肠道菌群结构及黏膜屏障功能的影响研究. 中国家禽, 2017, 39(20):18-22.

中国家禽 2017年第39卷第20期

China Poultry Vol.39, No.20.2017

实验研究

doi:10.16372/j.issn.1004-6364.2017.20.004

H9N2 AIV对小鼠肠道菌群结构 及黏膜屏障功能的影响研究

谢青梅^{1*}, 陆浩然², 张露萱², 陈义虎²
(1.华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642;
2.广东实验中学, 广东广州 510375)

摘要:为研究H9N2亚型禽流感病毒(H9N2 AIV)继发细菌感染的作用机制,以BALB/c小鼠为模型,研究呼吸道感染H9N2 AIV后,宿主肠道菌群结构、黏膜屏障、黏膜炎症反应等情况。结果显示:H9N2 AIV经呼吸道感染BALB/c小鼠后,小鼠肠道菌群紊乱。攻毒后小鼠体内的葡萄球菌属、链球菌属和棒状杆菌属极显著增加($P<0.01$),而有益菌为主的乳杆菌属等极显著降低($P<0.01$);H9N2 AIV感染小鼠后,肠道黏膜屏障被破坏,促炎因子IFN- γ 、IFN- β 等极显著高表达($P<0.01$),上皮细胞中的ZO-1等紧密连接蛋白则明显下调($P<0.05$),造成肠壁通透性增强。研究表明小鼠感染H9N2 AIV后,其肠道微生物菌群失衡、黏膜屏障功能被破坏、出现炎症反应等。

关键词:H9N2 AIV;小鼠;肠道菌群;黏膜屏障功能
中图分类号:S855.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-6364(2017)20-18-05

Intestinal Flora and Mucosal Barrier Function in Mice Infected with Subtype H9N2 AIV

XIE Qingmei^{1*}, LU Haoran², ZHANG Luxuan², CHEN Yihu²
(1.College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642;
2.Guangdong Experimental High School, Guangzhou, Guangdong 510375)

Abstract: In order to address the mechanisms of underlying secondary bacterial infection after avian influenza virus subtype H9N2 (H9N2 AIV) infection, the flora composition, intestinal barrier and mucosal inflammation of BALB/c mice infected with H9N2 AIV were studied. The results showed that H9N2 AIV infected BALB/c mice via the respiratory tract, leading to intestinal flora disorder. The *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Corynebacterium-1* were increased highly significantly in the ileum of mice after infection ($P<0.01$), but the beneficial bacteria like *Lactobacillus* decreased highly significantly ($P<0.01$). After H9N2 AIV infected BALB/c mice, the expression of proinflammatory cytokines IFN- γ and IFN- β were highly significantly up-regulated causing the intestinal mucosal barrier was destroyed ($P<0.01$). The expression of tight junction protein, such as ZO-1, in epithelial cells was highly significantly down-regulated resulting in permeability of intestinal wall increased ($P<0.01$). The results indicated that H9N2 AIV infection could cause intestinal flora and mucosal barrier function disorder in mice.

Key words: H9N2 AIV; mice; intestinal flora; mucosal barrier function

收稿日期:2017-09-19;修回日期:2017-10-17

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-41);广东省现代农业产业技术体系建设专项资金(2016LM1112)

作者简介:谢青梅,女,教授,博士生导师,主要从事禽流感病毒致病机制的研究,E-mail:qmx@scau.edu.cn

*通讯作者