H1N1 流感病毒对小鼠胚胎发育表型的影响

王 珩，史 艳，岳树盛，朱泽曙，李亚欢，吴秀山，莫小阳*，王跃群*

（省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室，湖南师范大学生命科学学院，长沙 410081）

摘 要：H1N1 流感病毒属于常见的致病性病毒。流行病学调查研究表明，新生儿表型缺陷与流感病毒感染有关，但是具体机制还不明确。为了探讨 H1N1 流感病毒对胚胎发育的影响，本文通过流感病毒感染孕母鼠来构建流感病毒宫内感染的动物模型，分别在胚胎发育至 E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5 d 以及出生 1 d 后测量各胚胎的体长，并在体视镜下观察胚胎体表各血管和器官来分析胚胎外表发育的情况，然后采用阿尔新蓝-茜素红染色法观察各发育时期胚胎骨骼发育的情况。结果表明，流感病毒感染的小鼠胚胎的体长明显降低。外部器官发育的差异性可体现在眼、耳等器官，攻毒组成型稍晚，尾部异常卷曲更为严重。各骨骼发育攻毒组较对照组更迟缓，但没有出现长短肢或骨骼缺失等严重异常表型。本研究首次构建了流感病毒宫内感染的动物模型，探究了 H1N1 流感病毒对小鼠胚胎表型发育的影响。

关键词：H1N1 流感病毒；小鼠胚胎；表型

中图分类号：Q593 + .4；R373.1^{+}3　　**文献标志码**：A　　**DOI**：10.3969/j.issn.1007-7146.2019.06.010

Effect of H1N1 Influenza Virus on the Phenotype of Mouse Embryo Development

WANG Heng, *SHI Yan*, *YUE Shusheng*, *ZHU Zheshu*, *LI Yahuan*, *WU Xiushan*, *MO Xiaoyang**, *WANG Yuequn**

(State Key Laboratory of Development Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The H1N1 influenza virus is a common pathogenic virus. Epidemiological analyses have shown that influenza viruses are associated with neonatal phenotypic defects, however the specific mechanisms are still unclear. In order to verify the effect of H1N1 influenza virus on embryonic development, an animal model of intrauterine infection of influenza virus was constructed by infecting pregnant mouse with influenza virus, and the embryos were developed to E14.5 days, E15.5 days, E16.5 days, respectively. The body length of each embryo were measured on E17.5 days, E18.5 days, and one day after birth. The blood vessels and organs of the embryo body were observed under a stereoscopic microscope to analyze the development of the embryo's appearance, and then Alxin Blue-Alizarin red staining was used to observe the development of embryonic bones at various developmental stages. The results showed that the body length of the mouse embryos in the transfecting group was significantly shortor than that in the control group, especially at the 17.5th and 18.5th days of development. The differences in the development of external organs can be reflected in the late anatomy of the eyes, ears and other organs, and the abnormal curling of the tail is more serious. The skeletal development

收稿日期：2019-05-13；**修回日期**：2019-06-26。

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81670288，31572349，31872315）。

作者简介：王珩，硕士研究生。

* **通讯作者**：莫小阳，教授，主要从事环境因子与先天性心脏病学研究。E-mail：moxiaoyang@ailyun.com；王跃群，教授，主要从事心脏发育的基因控制和信号转导调控研究。E-mail：yuequnwang@hunnu.edu.cn。

was slower than the control group, but there were no serious abnormal phenotypes such as long legs or bone loss. In this research, an animal model of intrauterine infection of influenza virus was constructed for the first time, and the effect of H1N1 influenza virus on mouse embryo phenotype development was explored.

Key words: H1N1 influenza virus; mouse embryo; phenotype

出生缺陷管理系统鉴定表明,先天性出生畸型病例数量处于上升的趋势[1]。在各类出生缺陷中,主要的结构缺陷有先天性心脏病、唇腭裂、多并指(趾)、21-三体尿道下裂和脊柱裂,但是其发病的机制不明[1,2]。

先天性出生畸形由两种因素导致,第一种是由于基因的突变,导致基因本身活性的降低或与之相互作用的蛋白功能异常,引发下游基因的表达发生变化,导致一系列连锁反应,从而引起出生缺陷[3,4];第二种是由于孕期母体环境因素的改变,在特定时期引起关键基因突变,导致出生缺陷。引起孕期母体环境改变的因素有电离辐射、宫内感染病毒、药物、酒精、吸烟等[5-10]。如吸烟可能导致胎儿早产、流产等。有资料显示饮酒可能导致胎儿酒精综合症、神经发育迟滞、面部畸形和先天性心脏异常[9]。而孕期母体感染病毒会通过胎盘将病毒传染给胎儿,造成胚胎发育缺陷,如胎儿感染巨细胞病毒(cytomegalo virus,CMV)可能导致多胎出生缺陷,孕早期感染风疹病毒(rubella virus,RUV)可能引起胚胎异常[11]。但更多出生缺陷病是基因突变与环境改变共同作用的结果[12]。

流感病毒作为侵害人类健康的常见传染病病原体,每年造成全球约 5%~10% 的成年人和 20%~30% 的儿童感染,流感病毒还曾多次造成世界范围的大流行,给人类的健康产造成了极大的危害[13]。流行病学研究和 Meta 分析,母体在怀孕的第一阶段感染流感病毒后会导致胎儿或者新生儿先天性心脏病、神经缺陷等疾病,唇腭裂、脐膨出、尿道下裂、肢体变短等外形缺陷也与孕期感染流感病毒相关[14-16]。以上是通过调查分析得到的数据,但暂时还没有利用动物模型来研究流感病毒对胚胎发育影响相关内容,所以本研究填补了这一空缺,利用小鼠模型探究了流感病毒对胚胎发育表型的影响。

本文利用实验室前期建立的流感病毒宫内感染模型,在小鼠的第一孕周期(胚胎 E7.5 d)时感染流感病毒,检测小鼠胚胎 E11.5 d 之后的体长及表型,观察宫内感染流感病毒是否会导致肢体缺陷、骨骼缺陷及唇腭裂等先天性的缺陷疾病。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠

昆明(KM)品系小鼠购买于湖南景达斯莱克实验动物中心。

1.1.2 H1N1 流感病毒

流感病毒株为 H1N1(A/PR/8/34),由湖南师范大学生命科学学院分子病毒实验室提供。

1.1.3 试剂

PBS(1×),10% 的水合氯醛,乙醇,阿尔新蓝酒精(70%)溶液,茜素红 S 酒精(95%)溶液,丙酮,冰醋酸,氢氧化钾,甘油。

1.1.4 试验器材

体视显微镜 SZX16 购自日本 OLYMPUS 公司。

1.2 方法

1.2.1 检查胎龄

购买两月龄小鼠,养殖到性成熟。晚上将雌雄小鼠合笼交配,于第二天早上查看雌鼠阴道塞,如出现乳白色的阴道塞,可以初步认定该雌鼠为受孕小鼠,单独饲养该雌鼠且记录日期为小鼠胚胎发育的 E0.5 d。本试验共攻毒 25 只母孕鼠,其中4 只母孕鼠 E14.5 d 取材 60 只胚胎、5 只母孕鼠 E15.5 d 取材 46 只胚胎(2 只孕鼠流产,死胎共23 只)、5 只母孕鼠 E16.5 d 取材 52 只胚胎(1 只孕鼠流产,死胎 10 只)、3 只母孕鼠 E17.5 d 取材 34 只胚胎、3 只 E18.5 d 母孕鼠取材 31 只胚胎以及取5 只孕鼠生下的出生 1 d(P1)的 51 只小鼠。共取小鼠胚胎 307 只,其中可用活胎 274 只。

1.2.2 母孕鼠攻毒

使用 H1N1 流感病毒感染怀孕时长为 7.5 d 的受孕母鼠。将小鼠腹腔注射一定剂量的 10% 水合氯醛(4.5 μL/g),使小鼠进入深度麻醉状态。左手固定小鼠,小鼠轻微仰头以保证其呼吸道畅通,右手用移液枪吸取病毒,逐滴滴入小鼠鼻腔,需在它自动吸入液滴并听到湿啰音后放平小鼠,待其自动苏醒。

1.2.3 骨骼染色

标本固定与脱脂:取出胚胎后用 95% 酒精的整体固定。固定 4~8 h 后,需小心去除全身皮肤和内

脏,继续固定 3~5 d(按形态大小调节固定的时长)。固定后的丙酮脱内脂 1~3 d,之后用 70% 酒精浸泡,并在浸泡期间勤换酒精以达到置换标本中丙酮的目的。

骨骼染色:用 70% 酒精将体积相同的 0.15%~0.3% 阿尔新蓝酒精(70%)溶液及冰醋酸稀释至 20 倍,将固定好的标本浸泡其中,37 ℃环境下,浸泡1~3 d。用 70% 酒精洗去标本浮色后浸入用 70% 酒精稀释至 20 倍的 0.1% 茜素红 S 酒精(95%)溶液,37 ℃环境下,浸泡 1~2 d。期间可摇晃标本数次。

观察:染色后的胚胎标本用蒸馏水浸洗至无浮色,浸入 0.5%~2% 氢氧化钾溶液 3~4 h。当染色效果为硬骨呈玫红色,软骨呈蓝色,即可在体视镜下拍照观察。

1.2.4　数据处理

试验数据用平均值 ± 标准差(mean ± SD)表示。采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)$P<0.05$ 为差异显著水平。

2　结果与分析

2.1　感染流感病毒对小鼠胚胎体长的影响

小鼠胚胎在 E14.5 d 到 E18.5 d 是生长发育的旺盛时期,在这个时期小鼠的体长有显著增长,便于表型观察。在母孕鼠攻毒后,分别取受孕天数为 E14.5、E15.5、E16.5、E17.5 以及 E18.5 d 的攻毒组和对照组的母孕鼠。将母孕鼠处死后取出胚胎,用 PBS 洗去血污后吸干表面水分并进行编号,在体视镜下测量各胚胎的体长,发现攻毒组小鼠各时期胚胎的体长较短,并在 E17.5 d 和 E18.5 d 这两个时期出现显著差异(图 1),通过体视镜观察可以发现在 E17.5 d 时,对照组的背部皮肤起皱而且背的前端是直的(图 2a,红色箭头所指区域),所以胚胎的长度增加了,而攻毒组小鼠的背部还保持微微弯曲的状态(图 2b,红色箭头所指区域),说明攻毒组的胚胎发育的状态较对照组迟缓,也可以推测脊椎的发育也相对较慢。而 E17.5 和 E18.5 这两个时期属于小鼠胚胎发育的后期,在这段时间出现显著差异表明,流感病毒对胚胎发育的影响存在滞后性。攻毒组小鼠胚胎发育受到抑制,小鼠胚胎外部发育状态要弱于对照组。

2.2　感染流感病毒对小鼠胚胎表型发育的影响

在体视镜下观察各时期小鼠胚胎的外观可以发现在 E14.5 时期对照组小鼠胚胎的外耳郭开始发育并向前生长覆盖了约一半的外耳道(图 2c,蓝色箭头所指区域),这时的胚胎张开的眼睑慢慢发育至融合,角膜上覆盖有一层透明的上皮覆盖层(图 2c,白色箭头所指区域)。有的胚胎脐疝已经消失,有的呈愈合状态。耳发育至 E17.5 时,耳郭完全遮盖外耳道耳片。胚胎眼睑的融合增厚,脐疝完全消失(图 2a)。而攻毒组小鼠胚胎发育 E14.5 时,耳郭只形成了一个与头部成直角的波峰(图 2d,蓝色箭头所指区域),眼睑大多是没有完全融合的,脐疝也没有愈合(图 2d,白色箭头所指区域)。攻毒组发育至 E17.5 时,耳廓和眼睑的发育差异减小,但是仍有不少胚胎的脐疝没有愈合消失。试验结果表明,攻毒组小鼠胚胎较对照组的外部器官发育是要更迟缓的,尤其是在耳廓、眼睑和脐疝等处比较明显。

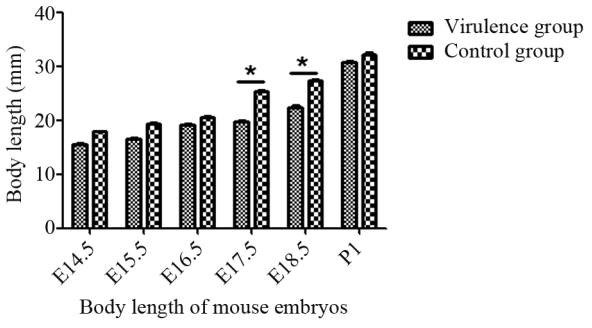


图 1　H1N1 流感病毒对小鼠胚胎体长的影响

Fig. 1　Effect of H1N1 influenza virus on body length of mouse embryos

* 代表 $P<0.05$

* represents $P<0.05$

2.3　感染流感病毒对小鼠胚胎骨骼发育的影响

观察阿尔新蓝-茜素红染色骨骼发现,攻毒组和对照组相比,在骨骼发育上的情况大体一致,即在 E15.5 时大部分骨骼开始有从软骨矿化成硬骨的转换,所以在 E14.5 时期染色能得到的阿尔新蓝染成蓝色的软骨,只有在下颌骨等处出现茜素红染成的红色硬骨(图 3a,白色箭头所指区域)。在 E15.5 和 E16.5 这两个重要的胚胎骨骼发育的节点,颅骨和椎骨的矿化日益明显并有沿着中轴线向两边蔓延的趋势。在 E17.5 时,可以发现颅骨的发育出现雏形,额骨、顶骨和枕骨已经大致成型。椎骨的发育是纵向沿着脊椎逐渐矿化,同时肋骨也从脊椎横向矿化形成。髋骨的发育稍迟,此时的坐骨髂骨和耻骨都没有出现硬骨化。位于四肢的各长骨也有了不同程度的矿化,肩胛冈和肱骨处的硬骨出现并开始沿一

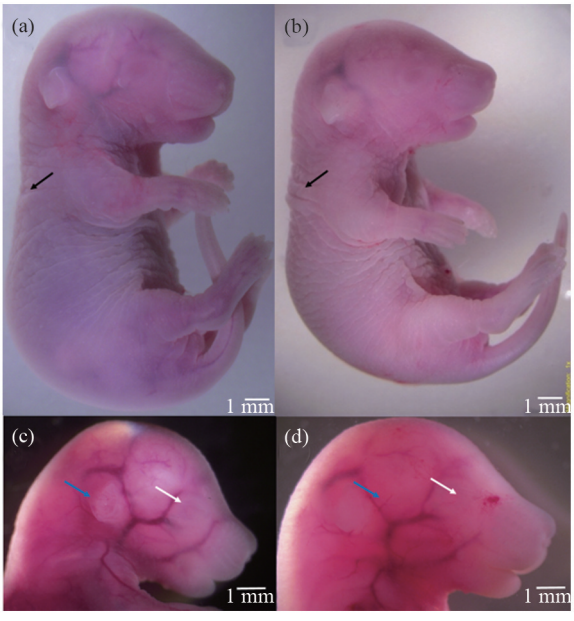


图 2 H1N1 流感病毒对小鼠胚胎外部器官发育的影响

Fig. 2 Effects of H1N1 influenza virus on the development of mouse embryo external organs

(a) E17.5 时期正常组的胚胎小鼠整体外观。背部竖直,脐疝消失;(b) E17.5 时期攻毒组小鼠胚胎的整体外观。背部略弯曲,脐疝没有愈合消失;(c) E14.5 时期正常组小鼠胚胎的头部器官发育情况。耳郭良好,眼睑正在发育;(d) E14.5 时期攻毒组小鼠胚胎的头部器官发育情况,耳郭发育迟缓,眼睑没有发育。比例尺:1 mm

(a) The overall appearance of the embryos of the normal group during E17.5 period. The back is erect, the umbilical hernia disappearsed; (b) The overall appearance of the mouse embryos in the virulence group. The back is slightly curved, and the umbilicus is not healed; (c) During the E14.5 period, the development of the head organs of the normal mouse embryos. The auricle is good, the eyelids are developing; (d) E14.5 period, the development of the head organs of the mouse embryos. The development of the auricles, the eyelids No development. Scale bar: 1 mm

定弧度延长、增粗。桡骨和尺骨、胫骨和腓骨开始出现骨干,并且显现出明显的两根骨的形态。但是就 E14.5 时期来说(图 3a ~ 3d),可以发现攻毒组小鼠尾部出现了异常的弯曲(图 3b,红色箭头所指区域),肩胛冈较对照组略窄(图 3d,黑色箭头所指区域),指骨的发育较迟缓(图 3d,黄色箭头所指区域)。随着小鼠胚胎的发育,骨化面积增大,在E17.5 时期攻毒组和对照组间的差异变小,只在椎骨的椎体处出现轻微的发育迟缓(图 3e、3f,红色箭头所指区域)。总而言之攻毒组小鼠除了大多数小鼠都出现了尾部弯曲异常,还有少量胚胎的某些骨骼发育迟缓的情况以外,基本上还是和正常的小鼠胚胎的骨骼发育情况保持一致的。流感病毒对于小鼠胚胎骨骼发育的影响并不是异常显著的。

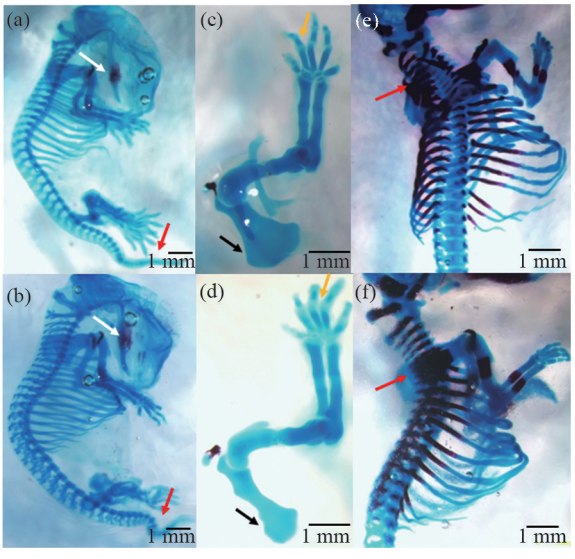


图 3 H1N1 流感病毒对小鼠胚胎骨骼发育的影响

Fig. 3 Effects of H1N1 influenza virus on mouse embryonic bone development

(a) 在 E14.5 时期正常组小鼠胚胎骨骼整体外观;(b) 在 E14.5时期攻毒组小鼠胚胎骨骼整体外观。尾部出现异常弯曲;(c) 在 E14.5 时期正常组小鼠胚胎前肢骨骼情况;(d) 在 E14.5时期攻毒组小鼠胚胎前肢骨骼情况。肩胛冈略窄,指骨发育较迟缓;(e) 在 E17.5 时期正常组小鼠胚胎的椎骨和肋骨的发育情况;(f) 在 E17.5 时期攻毒组小鼠胚胎的椎骨和肋骨的发育情况。椎体处发育迟缓。比例尺:1 mm

(a) The overall appearance of the mouse embryonic bone in the normal group during the E14.5 period; (b) The overall appearance of the embryonic skeleton of the mouse in the E14.5 period. The abnormal bending of the tail; (c) The normal mouse embryo in the E14.5 period forefoot bone condition; (d) In the E14.5 period, the embryonic forelimb bone condition of the mouse in the virulence group. The scapula is slightly narrow, and the phalanx development is slow; (e) The development of the vertebrae and ribs of the mouse embryo in the normal group during the E17.5 period; (f) During the E17.5 period, the development of the vertebrae and ribs of the mouse embryos in the virulence group. The development of the vertebral body was slow. Scale bar: 1 mm

3 讨论

流感病毒引起的流行性感冒,起病急、畏寒高热、全身酸痛和明显乏力,有时还伴有鼻塞、流涕和咳嗽。鉴于流感病毒的广普性、易传染性、易突变性和对生物造成的不利影响,世界各国的科研工作者都投入了极大的精力来研究流感病毒。由于阐明胚

胎发育致畸因素对提高人类健康和优化未来人口素质至关重要。因此,关于流感病毒对胚胎的健康发育是否会有影响也值得我们关注。在查阅了与胚胎发育相关的流行病学分析的文献资料后,得出流感病毒的大爆发与出生缺陷相关。有了前人对调查数据做出的分析,接下来则应是通过动物试验证明流感病毒对胚胎发育有一定影响,而目前还没有研究涉及此区域,因此,本文首次通过构建流感病毒感染孕鼠胚胎模型来分析流感病毒对胚胎发育的影响。在本文中,选取的小鼠胚胎是胚胎发育的 14.5 ~ 18.5 d,该时期是生长发育的旺盛时期,在这个时期小鼠的体长和体重有显著的增长,便于表型观察。首先在第一孕期,即 E7.5 d 对孕鼠进行攻毒,并分别监测胚胎 E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5 d 以及出生 1 d 时胚胎的体长,并在体视镜下观察胚胎体表各血管和器官来分析胚胎外型发育及急性情况;然后采用阿尔新蓝-茜素红染色法得到各时期胚胎骨骼发育的情况。结果显示:在小鼠怀孕的第一周期,感染孕鼠,使得胚胎的发育相对迟缓,具体体现在,相比对照组,攻毒组的小鼠胚胎在体长方面的数据都要更低,尤其在试验组发育到第 17.5 天和第 18.5 天时,接近对照组第 16.5 天和第 17.5 天的数据。但是出生的新生鼠的体长没有显著变化,可能原因是感染的小鼠发育迟缓,且孕周期也比野生型长 1 ~ 2 d,在此时期,感染的小鼠发育到正常值后才出生[17]。宫内感染了流感病毒的小鼠胚胎,外部器官发育有所推迟,具体体现在部分小鼠眼睑发育缓慢、脐疝愈合缓慢。但是不会导致小鼠的唇腭裂、肢体短小等严重的先天缺陷表型。骨骼染色结果表明:感染流感病毒对小鼠骨骼发育的影响并不严重,只是攻毒组大多数小鼠都出现了指骨、肩胛冈发育迟缓和尾部异常弯曲,总体而言,流感病毒造成小鼠胚胎骨骼硬化迟缓,但未出现长短肢和骨骼残缺等严重异常。同时流行病学调查发现,母鼠怀孕期间的抗感染免疫应答,例如氧化应激水平的升高,肿瘤坏死因子-α、白介素-6、胎盘细胞因子等的增多,母体与胎儿通过胎盘进项物质交换时,这些炎症介质也会经由胎盘进入胎儿体内,这可能是应对宫内病毒感染的一种保护机制[18,19]。所以,流感病毒感染小鼠胚胎后对胚胎发育的影响可能受到了来自于母体免疫系统的保护,从而使得感染的胚胎只是出现轻微的发育迟缓,但是在最后阶段,发育归于正常后出生。但是在试验过程中出现了母孕鼠流产的现象,这一现象提示我们,流感病毒在某些情况下可能引起严重的终止妊娠表型。所以我们在孕期对流感病毒的防范不能掉以轻心,还需对流感病毒影响胚胎发育的分子机制进行进一步探讨后,才能从根本上分析流感导致胚胎发育迟缓的原因,进而判断这种发育迟缓对小鼠后续的生长有何影响。

参考文献(References):

[1] PIERPAOLO M, ALICE M, EMANUELE L, *et al*. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the international perinatal database of typical oral clefts (IPDTOC)[J]. Cleft Palate Craniofac Journal, 2011, 48(1): 66-81.

[2] 凌寒. 卫生部发布《中国出生缺陷防治报告(2012)》[J]. 中国当代医药, 2012, 23(39): 3693-3693.
LING Han. The ministry of health issued the "China birth defect prevention report (2012)"[J]. Chinese Contemporary Medicine, 2012, 23(39): 3693-3693.

[3] TONG Y F. Mutations of NKX2.5 and GATA4 genes in the development of congenital heart disease[J]. Gene, 2016, 588(1): 86-94.

[4] AGUAYO GOMEZ A, ARTEAGA VAZQUEZ J, SVYRYD Y, *et al*. Identification of copy number variations in isolated tetralogy of fallot[J]. Pediatr Cardiol Journal, 2015, 36(8): 1642-1646.

[5] SREETHARAN S, THOME C, THARMALINGAM S, *et al*. Ionizing radiation exposure during pregnancy: effects on postnatal development and life[J]. Radiat Research, 2017, 187(6): 647-658.

[6] 柴慧琴, 邱红. 孕妇巨细胞病毒感染对胚胎及胎儿的影响[J]. 中国乡村医药, 2010, 17(08): 25.
CAI Qinhui, QIU Hong. The effect of cytomegalovirus infection on embryos and fetuses in pregnant women[J]. Chinese Rural Medicine, 2010, 17(08): 25.

[7] 刘彦慧, 黎丽芬, 吴亚敏, 等. 病毒感染与早期流产胚胎组织细胞染色体着丝粒点变异的关系[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(02): 216-218.
LIU Yanhui, LI Lifen, WU Yamin, *et al*. Relationship between viral infection and chromosome centromere variation in early aborted embryonic tissue cells[J]. Journal of Practical Medicine, 2009, 25(02): 216-218.

[8] 刘彦慧. 单纯疱疹病毒感染与早期胚胎组织着丝粒点及染色体变异[C]. 昆明:遗传学进步与人口健康高峰论坛, 2007.
LIU Yanhui. Herpes simplex virus infection and centromere and chromosomal variation in early embryonic tissues[C]. Kunming: Genetic Progress and Population Health Summit Forum, 2007.

[9] CAPUTO C, WOOD E, JABBOUR L. Impact of fetal alcohol exposure on body systems: a systematic review[J]. Birth Defects Research, 2016, 108(2): 174-180.

[10] ABRAHAM M, ALRAMADHAN S, INIGUEZ C, *et al*. A systematic review of maternal smoking during pregnancy and fetal measurements with meta-analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e170946.

[11] JENKINS K J, CORREA A, FEINSTEIN J A, *et al*. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the american heart association council on cardiovascular disease in the young: endorsed by the american academy of pediatrics[J]. Circulation, 2007, 115(23): 2995-3014.

[12] ZALC A, RATTENBACH R, AURADE F, *et al*. Pax3 and Pax7 play essential safeguard functions against environmental stress-induced birth defects[J]. Developmental Cell, 2015, 33(1): 56-66.

(下转第 555 页)