

虎源 H5N1 亚型禽流感病毒感染小鼠模型的建立*

杨松涛¹, 高玉伟¹, 王承宇¹, 邹啸环¹, 苏建青¹, 孙贺廷¹,
常爽², 郑晓一³, 王铁成¹, 王化磊¹, 冯娜¹, 夏咸柱^{1**}

(1.军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 2.吉林大学农学部, 吉林长春 130062; 3.吉林大学生命科学院, 吉林长春 130012)

Mice as a Model for Studying the Avian H5N1 Influenza

Virus in Mammals

YANG Song-tao¹, GAO Yu-wei¹, WANG Cheng-yu¹, ZOU Xiao-huan¹, SU Jian-qing¹, SUN He-ting¹,
CHANG Shuang², ZHENG Xiao-yi³, WANG Tie-cheng¹, WANG Hua-lei¹, FENG Na¹, XIA Xian-zhu^{1**}

(1. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China; 2. Division of Agricultural Sciences, Jilin University, Changchun 130062; 3. Life Science Academy of Jilin University, Changchun 130012)

Abstract: The rationale of this study was to elucidate the etiological agent characteristics and pathogenic mechanisms of the Avian H5N1 influenza virus in mammals, and to offer a platform for evaluating vaccines and drugs against AIV. Male BALB/c mice (18~20g) were anesthetized by inhalation of ether and inoculated intranasally with 0.05mL of infectious virus (A/Tiger/Harbin/01/2002) isolating from a tiger. The dose lethal to 50% of mice (MLD₅₀) was determined by infecting groups of ten with serial 10-fold viral dilutions. Mice were observed daily for 14 days for clinical signs of infection and day of survival. The mice showed the typical clinical symptoms, pathological changes and death rates. The MLD₅₀ was about 10^{-7.1}/0.05mL. The data demonstrate that infecting BALB/c mice with the avian H5N1 could serve as a successful model to assess viral infectivity.

Key words: Tiger; Influenza virus; H5N1; BALB/c mice; Model

摘要: 为研究 H5N1 亚型禽流感病毒的病原特性、致病机理及其疫苗与救治药物效果评价提供平台, 利用本室分离鉴定的虎源 A/Tiger/Harbin/01/2002 株 (简称 HAB/01) H5N1 亚型禽流感病毒进行连续 10 倍稀释后, 对 4~6 周龄雄性 BALB/c 小鼠经乙醚麻醉后进行滴鼻攻毒, 每个稀释度接种 10 只实验小鼠, 测定其 MLD₅₀, 检测小鼠感染、致病等多项指标, 观察期为 14d。结果感染小鼠呈现出规律的以肺炎为主的临床症状、病理变化及病死率; 测得该病毒对小鼠的 MLD₅₀ 为 10^{-7.1}/0.05mL。成功建立了虎源 H5N1 亚型禽流感病毒感染 BALB/c 小鼠的实验模型。

关键词: 虎; 流感病毒; H5N1; 小鼠; 模型

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0353-05

禽流感(Avian influenza)是由禽流感病毒(Avian influenza virus)引起的一种禽类烈性传染病, 鸡、鸭、鹅等家禽及野鸟、水禽等均被感染^[1, 2]。世界上许多国家或地区曾暴发过禽流感, 致使大批家禽死亡, 给养禽业造成巨大经济损失^[3]。在自然状态下, 流感病毒可以感染人、猪、马和禽类(鸡、火鸡、鸭)等多种动物^[4]。但不同亚型的流感病毒

对宿主往往具有种间特异性^[5, 6]。但是, 由于流感病毒的高变异性, 已使禽流感病毒突破种间屏障, 获得了对哺乳动物的感染力和高致病性。我国自 2003 年起先后从发病虎和狮等病料中分离出 15 株 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒^[7]。事实表明, 禽流感病毒不仅可以感染多种哺乳动物, 而且已经能够直接感染人类。1997 年香港暴发的 H5N1 亚型禽

收稿日期: 2006-02-13, 修回日期: 2006-04-10

* 基金项目: 全军医学科研“十五”计划第二批课题(04Z016); 吉林省农业重大科技专项课题(20040202-3-1)。

作者简介: 杨松涛(1961-), 女, 辽宁建昌籍, 博士, 研究方向为分子病毒学。Tel: 86-431-6985518; E-mail: yst610223@yahoo.com.cn

** 通讯作者: 夏咸柱(1939-), 男, 江苏建湖籍, 中国工程院院士。Corresponding author. Tel: 0431-6758799; E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn

流感造成 18 人感染, 6 人死亡, 成为首次发生的禽流感病毒直接感染人的事件^[8]。2004 年至今在东南亚一带暴发了 H5N1 亚型禽流感, 截止到 2006 年 1 月 5 日已经有 144 人感染, 76 人死亡。这些严峻的事实告诉人们, 禽流感病毒感染人并且在人群中流行随时可能发生, 急需贮备相应的疫苗和救治药物^[9, 10], 及早做好应对准备。

本研究选用本室分离的虎源 H5N1 亚型禽流感病毒 A/Tiger/Harbin/01/2002(HAB/01 株)对 BALB/c 小鼠进行人工感染试验, 以期建立哺乳动物流感病毒感染小鼠模型, 为探索哺乳动物禽流感病毒的病原特性、致病机理、药物筛选及其疫苗评价提供研究平台。同时, 为进一步防控禽流感在人间暴发流行提供必要的实验参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

虎源 A/Tiger/Harbin/01/2002 株 (简称 HAB/01) H5N1 亚型禽流感病毒为本实验室分离鉴定, 其 HA 效价为 1:64; TCID₅₀ 为 10^{-7.38}/0.05mL; EID₅₀ 为 10⁻⁸/0.2mL。SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 4~6 周龄 (体重 18~20g), 由长春生物制品研究所提供 (许可证号: SCXK-2005-0001)。犬肾 MDCK 传代细胞系引自中国兽药监察所, 按常规方法传代培养。0.01M pH 7.2 PBS 配制成 0.5% 的鸡红细胞悬液, 4℃ 保存。RVC-II 型独立送风隔离笼具购自苏州市冯氏实验动物设备有限公司; SP 免疫组化试剂盒购自武汉博士得公司; 经典 RNA 提取试剂盒购自上海生物工程公司; AMV 反转录酶及 RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司; Taq plus DNA 聚合酶及 dNTP 购自 TaKaRa 公司。

1.2 小鼠的感染性

实验在本所的 BSL-3 实验室中进行。将 100 只 4~6 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 1 个对照组和 9 个实验组。每组 10 只, 分 2 笼, 每笼 5 只。标记后分别称重。病毒液用 MEM 液 10× 连续稀释, 标记为 10⁻¹、10⁻²、……、10⁻⁹。将小鼠乙醚吸入麻醉后, 通过滴鼻途径接种小鼠, 每只小鼠的接种剂量为 50μL, 对照组小鼠经鼻腔滴入等量的生理盐水。独立送风隔离笼具中正常饲养。实验的观察期为 14d。实验重复 3 次, 按 Reed-Muench 方法计算该病毒对小鼠的 MLD₅₀^[2]。

1.3 临床观察和取样

每日观察记录小鼠的活动状态及临床表现、称量体重。小鼠死亡后立即无菌采集各脏器, 置 -20℃ 保存备用。称量每只死亡小鼠的体重及肺脏湿

重, 计算其肺指数 (肺脏湿重/小鼠体重)。

1.4 光镜和电镜观察

无菌取濒死小鼠的肺、脑等脏器, 一部分用甲醛固定、石蜡包埋、常规 HE 染色, 光镜下观察其病理变化; 另一部分用 2.5% 戊二醛固定, 制备成超薄切片, 透射电镜下进行超微结构观察。将肺脏加 2% MEM 液研磨, 悬液 5000r/min 离心 30min, 取上清, 透射电镜下进行磷钨酸负染观察。

1.5 免疫组化试验

多聚甲醛固定濒死小鼠脏器, 采用 SP 免疫组化试剂盒, 按说明书操作。用本室制备的鼠抗 H5N1 亚型流感病毒单克隆抗体为一抗, 生物素标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗进行免疫组织化学染色, 切片中出现棕色或棕黄色颗粒为阳性反应, 无此反应则为阴性反应。

1.6 死亡小鼠脏器病毒滴度的测定

用 MEM 液按 1:10 (M/V) 将死亡小鼠脏器研磨成乳剂, 5000r/min 离心 10min, 上清液加双抗 (青霉素、链霉素各 1000IU/mL) 4℃ 过夜, 7000r/min 离心 20min, 取上清, -70℃ 保存。各脏器上清液 10× 连续稀释至 10⁻¹⁰, 接种于单层培养 MDCK 细胞的 96 孔细胞培养板上, 每个稀释度接种 4 个重复孔, CO₂ 培养箱中 37℃ 静止培养, 观察记录各孔细胞病变 (CPE) 情况, 连续观察 5~7d。按照 Reed-Muench 方法计算感染小鼠脏器病毒的 TCID₅₀。

1.7 PCR 检测

根据 GenBank 中公布的 H5N1 亚型禽流感病毒核蛋白基因的保守序列设计一对引物:

P1: AGTCCTGCTTGCCTGCTT;

P2: AGAGCGACCATTATGGCG,

扩增片段的大小为 464bp。常规方法提取 RNA, 并进行反转录。将反转录产物 1.5 μL, 加至 25 μL PCR 反应体系中, 瞬时离心后置 PCR 仪进行扩增。扩增条件: 30~35 循环, 95℃ 180s 预变性, 95℃ 30s 变性, 56℃ 30s 退火, 72℃ 50s 延伸, 72℃ 延伸 10min。取阳性标准品及 PCR 产物各 10μL 在 2.5% 的琼脂糖凝胶上电泳约 20min, 观察电泳条带大小并照相。

1.8 HI 试验

对耐过存活小鼠于接毒后第 18d 摘眼球采血, 制备血清, 4℃ 存放。按常规 HI 试验方法测定各存活小鼠 H5N1 亚型禽流感病毒 HI 抗体效价。

1.9 数据统计方法

小鼠的体重变化用体重百分比表示, 即以小鼠当天体重减去其前 1d 体重的差值作分子, 以其前 1d 的体重作分母, 记录为平均体重变化百分比 ± 标准差 (SEs), 数值采用每组的平均数。小鼠的平均存

活天数 (MSD) 按照公式: $MSD = \sum [f(d-1)]/n$ 计算, 其中 d 为天数, f 为第 d 天幸存的小鼠数目 (第 14d 的数目也被计算在内), n 为每组的小鼠数目。

2 结果

2.1 HAB/01 株对小鼠感染性的测定结果

人工感染后第 3d, $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 组小鼠体重就开始

下降, 如体重下降持续 3~4d 不能回转的小鼠最终死亡; 如小鼠体重在下降后 2~4d 后开始恢复, 则最终耐过。病毒感染小鼠的潜伏期为 3~4d, 病程为 4~7d。通常小鼠在感染后第 6d 开始死亡, 平均存活天数依接种病毒的浓度由 7d 到 14d。对照小鼠正常。依据 3 次测得的结果, 得出该病毒对小鼠的半数致死量 MLD_{50} 为 $10^{-7.1}/0.05mL$ (表 1)。

表 1 小鼠 HAB/01 流感病毒感染结果
Table.1 Infected result of mice infected HAB/01 virus

Virus	Dose	Death/total	Mortality (%)	Weigh (%)				Survival days (MSD±SD)
				3 rd day	6 th day	9 th day	12 th day	
	$10^{-1} \sim 10^{-5}$	150/150	100	-4.92±0.5	-20.3±0.3	—	—	7.0±0.2
A/Tiger/H	10^{-6}	27/30	90	-3.7±0.7	-18.6±0.6	-13.6±0.2	-8.3±0.1	7.9±0.4
Harbin/	10^{-7}	12/30	40	-1.2±0.7	-14.3±0.5	-7.6±0.3	-5.3±0.2	10.5±0.3
01/2002	10^{-8}	6/30	20	2.0±0.4	-0.7±0.8	1.5±0.3	7.5±0.6	12.3±0.2
	10^{-9}	0/30	0	3.5±0.7	4±0.3	19±0.8	30±0.1	14
Negative control		0/30	0	3.6±0.6	4.1±0.4	19.6±0.6	30±0.6	14

Note: “-” all death today; “MSN” the days of average survival.

2.2 临床症状

感染小鼠早期表现出精神沉郁、反应迟钝、食欲减退、消瘦、眼半闭、眼周围有分泌物; 后期出现呼吸急促、咳嗽、被毛逆立、弓背等临床症状。部分小白鼠出现后肢或前肢麻痹、盲目转圈、翻滚等神经症状。濒死小鼠尾多不同程度的呈紫黑色。

2.3 肺脏湿重和肺指数变化

感染小鼠平均肺重为 $0.3 \pm 0.02g \sim 0.6 \pm 0.01g$; 同一攻毒剂量组死亡小鼠的平均肺指数为 $0.01 \pm 0.002g \sim 0.04 \pm 0.005$ 。死亡小鼠的肺脏湿重增加明显, 和对照比差异极显著 ($P < 0.01$)。死亡小鼠的肺指数也相应增高, 和对照比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 感染小鼠病理变化和电镜观察结果

剖检可见感染小鼠肺脏有明显充血和水肿, 肺体积变大, 肺组织表面有局部轻度实变, 呈斑点状充血。有神经症状的小白鼠死亡后可见脑膜出血、脑软化等病变。肝脏偶有肿大, 其它脏器未见明显异常。肺部病理组织学光镜观察, 可见感染早期肺上皮细胞破坏, 后期有肺炎和间质性炎症。血管周围炎性细胞浸润; 支气管内充血, 部分管壁细胞坏死、脱落; 肺泡腔内有大量巨噬细胞浸润和少量蛋白样浆液渗出 (图 1)。电镜超微结构观察, 在小鼠肺泡扁平上皮细胞表面和肺泡腔中可见到短杆型和圆型的流感病毒样粒子, 有个别病毒尚未从肺泡上皮细胞上分离下来 (图 2)。肺悬液上清液及其感染细胞培养物中可见到典型的流感病毒样颗粒。病毒颗粒直径 80-120nm, 呈圆形、椭圆形或长杆形, 囊膜表面有纤突 (图 3)。

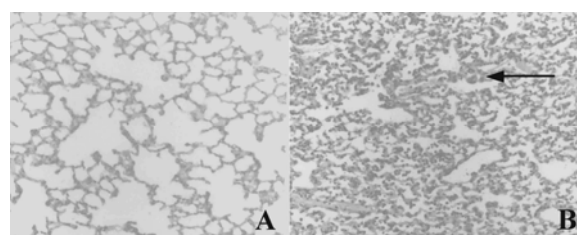


图 1 小鼠肺脏 HE 病理组织切片
Fig.1 HE pathological section of mice
A: Normal mice lung; B: Infected mice lung

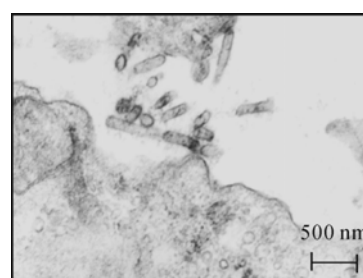


图 2 感染小鼠肺脏标本的超微结构观察
Fig.2 The ultramicrostructure of the lung

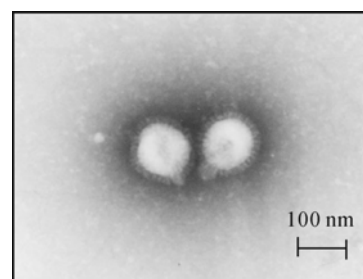


图 3 鼠肺悬液的电镜负染结果
Fig.3 EM of various in infected lungs

2.5 感染小鼠脏器免疫组化试验结果

对鼠肺标本的免疫组织化学试验, 结果在支气管上皮细胞和少数肺泡巨噬细胞的胞浆中见到该病毒的抗原阳性染色颗粒(图 4 箭头所示)

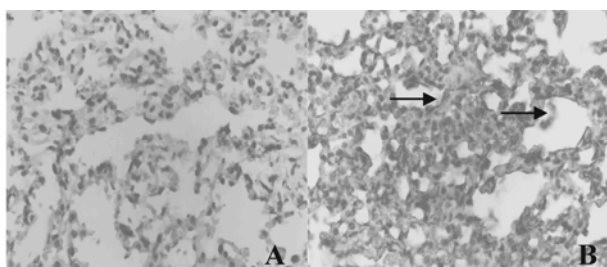


图 4 小鼠肺脏 SP 免疫组化检测

Fig.4 Immunohistochemistry SP of Mice lung
A: Normal mice lung. B: Infected mice lung

2.6 感染小鼠脏器病毒滴度的测定

用 Reed-Muench 法计算死亡小鼠不同脏器内病毒含量(TCID₅₀/0.05mL), 结果肺脏的平均病毒滴度最高, 脑的病毒滴度次之, 其次是肝脏和肾脏(表 2)。

表 2 感染小鼠脏器的 TCID₅₀ 结果

Table 2 TCID₅₀ of organs infected mice

Organs	Lung	Brain	Liver	Kidney
TCID ₅₀	10 ^{-4.5}	10 ^{-1.67}	10 ^{-1.5}	10 ^{-1.33}

2.7 感染小鼠脏器的 PCR 检测结果

随机抽取死亡小白鼠的各脏器样品进行流感病毒 RT-PCR 扩增, 结果在肺、肝、肾、脑组织与感染细胞培养物中均扩增到与理论值 464bp 相符的核酸条带(图 5), 但各脏器流感病毒 RT-PCR 检测的阳性率不尽相同, 由高到低依次为肺、脑、肝、肾(表 3)。

表 3 死亡小鼠 PCR 检测统计结果

Table 3 The statistics result of PCR detection

Organs	Sum	Positives	Positive rate (%)
Lung	39	33	84.62
Brain	26	18	69.23
Liver	26	15	57.69
Kidney	20	8	40

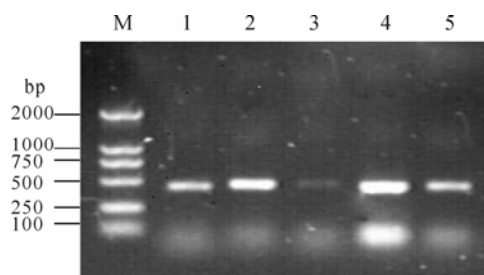


图 5 死亡小白鼠各脏器 RT-PCR 扩增结果

Fig.5 Results of RT-PCR on organs of mice

M, Marker DL2000; 1, HAB/01 Positive control; 2, Liver; 3, Kidney; 4, Lung; 5, Brain.

2.8 HI 抗体检测结果

3 次重复实验共存活小鼠 41 只, 其血清 H5N1 亚型流感病毒 HI 抗体效价为 1:2~1:8。其中 10⁻⁶ 组存活 4 只小鼠的 HI 抗体效价: 2 只为 1:2, 2 只为 1:4; 10⁻⁷ 组存活 14 只小鼠的 HI 抗体效价: 5 只为 1:2, 9 只为 1:4; 10⁻⁸ 组存活 23 只小鼠的 HI 抗体效价: 9 只为 1:2, 11 只为 1:4, 3 只为 1:8; 对照组抗体效价为阴性。

3 讨论

利用小鼠模型能够进行流感病毒感染、免疫和抗流感病毒药物作用等方面的研究^[11-13]。国外已经有人禽流感病毒感染小鼠模型研究的报道^[14, 15]。由于小鼠和人的亲缘关系较近, 遗传学背景清楚, 具价廉、实验周期短、易于饲养和操作等优点, 许多疾病可以此为动物模型进行相关研究。

实验结果显示, HAB/01 株虎源 H5N1 亚型禽流感病毒可以感染 BALB/c 小鼠, 并且对小鼠表现出高感染率和致死率。攻毒小鼠脑、肝、肺和肾等病料中均分离到该病毒, 脏器悬液上清接种 MDCK 细胞后, 致细胞病变的速度和程度以肺悬液上清出现的最快、最严重, 其次依次是脑、肝和肾, 其他脏器上清液未见明显致细胞病变作用。说明该病毒能够侵染小鼠的肺、脑、肝、肾等多种器官并造成神经系统感染, 这与目前感染人的流感病毒毒株具有共同的特性^[11, 12]。相关研究已经证实, 从 1997 年分离的香港感染人流感病毒到 2005 年分离的越南感染人流感病毒已经发生了变异, 对人的毒力在逐渐增强, 主要表现为病毒在组织器官间传播和在脑内复制能力的增强^[16]。本研究中, 接种病毒小鼠脑中发现有流感病毒且临床出现神经症状, 可能与病毒引起神经系统感染有关。

小鼠的临床症状出现的早晚和严重程度与接毒量有关, 接毒量大的实验鼠体重下降快, 症状出现早, 存活时间短, 死亡快, 且死亡率高; 随接毒量减少症状出现渐晚, 存活时间延长, 死亡减缓, 且死亡率下降。因此, 有理由推断, 即使 H5N1 亚型禽流感在人间大流行, 因个体差异和接触病毒量的差别, 其致病性也会有所差异。数据统计发现, 小鼠的体重变化和小鼠的预后相关。发病的小鼠呈体重降低趋势, 高剂量攻毒小鼠在感染后第 3d 即出现体重下降, 多数呈直线下降趋势, 体重下降通常维持 3~4d, 最终死亡。通常小鼠在感染后第 6d 开始死亡; 耐过小鼠体重在下降后 2~4d 开始恢复。因此, 体重下降可以作为该流感病毒感染的一个重要临床指标。

正常小鼠肺湿重 $0.1 \pm 0.03\text{g} \sim 0.2 \pm 0.01\text{g}$, 死亡小

鼠的肺脏湿重随病程的延长而明显增加,与对照相比,二者差异极显著 ($P<0.01$);同时,死亡小鼠的肺指数也相应增高,与对照比差异显著 ($P<0.05$)。但攻毒剂量的大小和肺指数高低无明显的相关性。肺湿重及肺指数的增高表明发病小鼠的肺部发生了相应的炎性反应,肺部充血、水肿,体积增大,且随病程的延长,炎性反应加强。本室利用此小鼠感染模型开展了肺炎致病机理的研究,并得到有价值的结果^[17]。

通常只有当小鼠体内的 HI 抗体效价大于 1:40 时才能够保护小鼠抵抗致死性感染^[17]。实验结果发现,有些耐过小鼠没有产生 HI 抗体或 HI 抗体效价很低,这与 Yen HL 等的文献报道相一致,该研究者用 2005 年分离的 AIV 越南病毒株感染小鼠,感染后存活 8 只小鼠中有 4 只没有检测到 HI 抗体^[18]。Lu 等用 AIV 作疫苗免疫小鼠,产生的 HI 抗体效价很低,不能提供对小鼠的保护,但加入明矾佐剂后,HI 效价则明显提高了^[12]。本研究发现存活小鼠血清抗体效价的高低与接毒浓度无明显的相关性,提示小鼠体内可能存在某些其它因子对流感病毒抗体的产生在起作用。

毒种的纯净度、病毒毒力是本实验的关键,毒种应利用 SPF 鸡胚繁殖,无菌,HA 效价应在 1:64 以上。此外,小鼠的品系、基础体重、性别、麻醉与否及攻毒途径、接种剂量等对实验的准确程度均有影响。因此,应保证实验动物数量,同时设立对照组,尽量避免实验误差。

BALB/c 小鼠对该虎源 H5N1 亚型禽流感病毒呈现出规律的与人类感染流感病毒相似的以肺炎为主的临床症状、典型的病理变化和高致死率。为此, BALB/c 小鼠可以作为哺乳动物 H5N1 亚型禽流感病毒相关研究的良好模型动物。

References

- [1] De, Jong J C, Claas E C J, Osterhaus A D VIE, *et al.* A pandemic: warning [J]. *Nature*, 1997, 389: 554.
- [2] Yin Z, Liu J H. (殷震, 刘景华). *Animal Virology (动物病毒学)* [M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [3] Ferguson N M, Fraser C, Donnelly C A, *et al.* Public health risk from the avian H5N1 influenza epidemic [J]. *Science*, 2004, 304: 968-969.
- [4] Gao P, Watanabe S, Ito T, *et al.* Biological heterogeneity including systemic replication in mice of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong [J]. *Virology*, 1999, 73: 3184-3189.
- [5] Judd A K, Sanchez A, Bucher D J, *et al.* In vivo anti-influenza virus activity of a zine peptide [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 687.
- [6] Sidwell R W, Huffman J H, Barnard D L, *et al.* Inhibition of influenza virus infections in mice by GS4104, an orally effective influenza virus neuraminidase inhibitor [J]. *Antiviral Res*, 1998, 37: 107.
- [7] Xia X Z, Gao Y W, Hu R L, (夏咸柱, 高玉伟, 扈荣良) *et al.* The first finding of tiger Influenza by virus isolation and specific gene amplification [J]. *Chin J Vet Sci. (中国兽医学报)*, 2003, 23: 107-110.
- [8] Fouchier R A, Schneeberger P M, Rozendaal F W, *et al.* Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (5): 1356-1361.
- [9] Herlocher M L, Elias S, Truscon R, *et al.* Ferrets as a transmission model for influenza: sequence changes in HA1 of type A (H3N2) virus [J]. *Infect Dis*, 2001, 184: 542-546.
- [10] Fan J, Liang X, Horton M S, *et al.* Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 2993-3003.
- [11] Gubareva L V, Mc Cullers J A, Bethell R C, *et al.* Characterization of influenza A/Hongkong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of Zanamivir on H5N1 infection in mice [J]. *J Infect Dis*, 1998, 178: 1592.
- [12] Lipatov A S, Krauss S, Guan Y, *et al.* Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001 [J]. *Virology*, 2003, 77: 3816-3823.
- [13] Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, *et al.* Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2503-2510.
- [14] Sun H T, Xia X Z, Gao Y W, (孙贺廷, 夏咸柱, 高玉伟) *et al.* Construction a mice model and LD₅₀ for studying the avian H5N1 influenza virus isolated from tiger [A]. The compilation of the new studying of the prevention for zoonoses (人畜共患传染病防治研究新成果汇编), 2004.
- [15] Lu X H, Cho D, Hall H, *et al.* Pathogenesis of and immunity to a new influenza A (H5N1) virus isolated from duck meat [J]. *Avian Dis*, 2003, 47: 1135-1140.
- [16] Rimmelzwaan G F, Kuiken T, van Amerongen G, *et al.* A primate model to study the pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection [J]. *Avian Dis*, 2003, 47: 931-933.
- [17] Zhao H X, Xia X Z, Lu J R, (赵宏霞, 夏咸柱, 鲁继荣) *et al.* Roles of ICAM-1 and its receptors in HPAIV pneumonia [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 2006, 21: 38-42.
- [18] Yen H L, Arnold S M, Robert G W, *et al.* Virulence may determine the necessary duration and dosage of Oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus in Mice [J]. *J Infect Dis*, 2005, 192: 665-672.