

研究报告

血液通路在 H5N1 高致病性禽流感病毒入侵小鼠 中枢神经系统中的作用

洪文珊¹ 郑作宜¹ 陈日荣¹ 朱华晨^{1,2} 王嘉^{1,2*}

(1. 汕头大学医学院 广东 汕头 515041)

(2. 香港大学 新发传染性疾病国家重点实验室 香港 999077)

摘要: 【目的】研究血液通路在 H5N1 高致病性禽流感病毒入侵小鼠中枢神经系统中的作用。

【方法】用 3 株 H5N1 病毒滴鼻感染 BALB/c 小鼠, 研究小鼠肺、脑、血中的病毒在感染后不同时间点的复制动态及病理进展, 通过免疫组化和免疫荧光染色显示病毒在脑部血管内皮细胞及血管周围神经组织的感染情况。【结果】小鼠感染后病毒迅速在肺中高效复制, 随即形成病毒血症; 感染后第 6 天病毒在肺中的滴度和在血液样本中的检出率达到峰值, 此时小鼠脑部才开始检测到病毒; 小鼠脑内血管内皮细胞、脑血管周围神经组织的神经元和神经胶质细胞中可检测到流感病毒 NP 蛋白。【结论】血液播散可能是高致病性 H5N1 禽流感病毒进入中枢神经系统的途径之一。

关键词: 甲型流感病毒, H5N1, 中枢神经系统感染, 病毒血症

Role of blood pathway in the invasion of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus into the central nervous system

HONG Wen-Shan¹ ZHENG Zuo-Yi¹ CHEN Ri-Rong¹ ZHU Hua-Chen^{1,2} WANG Jia^{1,2*}

(1. Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China)

(2. State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, the University of Hong Kong, Hongkong 999077, China)

Abstract: [Objective] To investigate the role of blood dissemination in the invasion of the central nervous system by the highly pathogenic H5N1 influenza viruses. [Methods] Three H5N1 strains were intranasally inoculated into BALB/c mice to study the replication and pathogenic kinetics of the viruses in lung, brain, and blood. Infection of the brain vascular endothelial cells and nerve tissue around the blood vessels by the virus was investigated by immunohistochemistry and immunofluorescence staining techniques. [Results] Virus replicated efficiently in lungs, leading to viremia quickly after inoculation. At 6 d post inoculation, both the viral titre in lungs and the detection rate of viremia peaked; concomitantly, the viral NP (Nuclear protein) protein began to be detectable in the central nervous system. Viral NP proteins were observed in the brain vascular endothelial cells and in the neurons and astrocytes around blood vessels. [Conclusion] Blood dissemination could be one of the pathways through which the highly pathogenic H5N1 influenza invades the central nervous system.

*Corresponding author: Tel: 86-754-88900435; Fax: 86-754-88544422; E-mail: j_crystal@163.com

Received: October 27, 2015; Accepted: December 15, 2015; Published online (www.cnki.net): January 06, 2016

*通讯作者: Tel: 86-754-88900435; Fax: 86-754-88544422; E-mail: j_crystal@163.com

收稿日期: 2015-10-27; 接受日期: 2015-12-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-06

Keywords: Avian influenza virus, H5N1, Central nervous system infection, Viremia

甲型流感病毒感染可引起中枢神经系统症状——在过去的数次流感大流行甚至是季节性流感中, 均有流感患者出现脑炎、脑炎后帕金森症或行为异常等现象的报道^[1-4]。虽然, H5N1 高致病性禽流感病毒感染引起人的神经系统感染的报道不多^[5-7], 但多种感染了 H5N1 的动物脑内却常常能检测到病毒, 有些动物甚至可出现肢体抽搐、偏瘫等症状^[8-11]。大量研究表明: 神经通路是流感病毒进入中枢神经系统的一个重要渠道^[12-15], 鼻腔接种的病毒可经嗅球、嗅束上行进入大脑^[13,15], 在其他颅神经和外周神经上也可检测到病毒^[13]。然而, 由于 H5 高致病性禽流感病毒在 HA1-HA2 链接位点上具有多碱性氨基酸, 这使病毒具备了在多种组织中裂解活化的能力, 肺外器官侵袭性成为了 H5N1 病毒致病性的一个重要特征^[16-17]。一个被学界普遍认同的看法是: H5N1 亚型流感病毒对肺外器官的侵袭是通过病毒血症实现的。但是, 目前尚无证据显示, 病毒可以通过血液途径进入中枢神经系统^[12,18]。为此, 我们以 BALB/c 小鼠为动物模型, 分别用 3 株 H5N1 病毒进行接种感染, 从肺、脑、血病毒动力学变化和动态病理性改变入手, 探索病毒通过血液途径进入中枢神经系统的可能性。

1 材料与方法

1.1 病毒

A/Indonesia/5/2005(IDN5)、Bar-headed Goose/Qinghai/65/2005(QH65) 和 Duck/Fujian/668/2006(FJ668) 3 株 H5N1 流感病毒由香港大学李嘉诚医学院新发传染性疾病预防国家重点实验室提供。本研究开展前已通过实验确定 IDN5、QH65 和 FJ668 对 BALB/c 小鼠的半数致死量(Median lethal dose, MLD_{50})分别为 $10^{2.69}$ 、 $10^{2.25}$ 和 $10^{3.42}$ PFU/mL。所有涉及活病毒的实验操作均在生物安全三级实验室中进行。

1.2 动物

85 只 8-9 周龄的雌性 BALB/c 小鼠(购自北京维通利华公司)随机分为 4 组, 其中 3 组为感染组,

每组($n=25$)接种 1 株 H5N1 病毒, 另 1 组为对照组($n=10$), 接种磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)。实验开始前小鼠置于负压小鼠隔离笼及实验室内预适应 5 d。感染时, 实验组小鼠滴鼻接种 25 μ L 含 1 MLD_{50} 病毒剂量的稀释液; 对照组接种等体积 PBS。实验期间每日监测记录小鼠体重及症状。在感染后 2、4、6、8 d, 麻醉剖杀感染组每组 5 只小鼠和对照组 2 只小鼠, 取肺、脑和血液样本做病毒及病理检测。实验过程中体重下降超过 30% 的小鼠予以麻醉剖杀。病亡或低体重处死的小鼠也取样检测。

1.3 主要试剂和仪器: 磷酸盐缓冲液, 武汉博士德生物工程有限公司; 苏木精-伊红, 西格玛奥德里奇中国; NP 蛋白鼠单克隆抗体, 厦门大学夏宁邵教授提供; 生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体, Calbiochem 公司; 抗神经元特异性烯醇化酶羊多克隆抗体, 北京生物合成生物技术有限公司; 抗胶质纤维酸性蛋白兔多克隆抗体, Abcam 公司; 异硫氰酸荧光素标记的鸡抗鼠 IgG 抗体、驴抗羊 IgG 抗体、罗丹明标记的鸡抗鼠 IgG 抗体, Santa Cruz 公司; QIAamp Viral RNA Mini 试剂盒, QIAamp RNA Blood Mini 试剂盒, QIAGEN 公司; SuperScript[®] III Reverse Transcriptase 试剂盒, Invitrogen 公司; AmpliTaq[®] DNA Polymerase, Applied Biosystems 公司; Eclipse 80i 研究级荧光显微镜, 尼康; PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司。

1.4 肺、脑组织病毒量滴定

小鼠左侧肺、脑组织取样后称重并用 1 mL 的 PBS 制备组织匀浆。匀浆上清于 -80°C 冻存, 滴定时整批同时取出融解, 1:10 梯度稀释后以 MDCK 细胞做空斑滴定。每个样本平行滴定 2 次, 空斑滴定检测下限为 12.5 PFU/mL。

1.5 肺、脑组织病理检测

小鼠右侧肺、脑组织取样后立刻用 4% 甲醛固定 24 h, 随后进行脱水、包埋、连续切片。切片经苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色后光镜下

观察病理变化。免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)染色以抗流感病毒 NP 蛋白鼠单克隆抗体 4 °C 孵育过夜后, 涂尽残余未结合一抗, 再以生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗, 经显色处理后光镜下观察表达病毒 NP 蛋白的细胞。脑组织切片先分别以抗神经元特异性烯醇化酶(Neuron specific enolase, NSE)羊多克隆抗体、抗胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)兔多克隆抗体和抗流感病毒 NP 蛋白鼠单克隆抗体 4 °C 共孵育过夜后, 涂尽残余未结合一抗, 再分别以异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的鸡抗兔 IgG 抗体和驴抗羊 IgG 抗体、罗丹明(Rhodamine)标记的鸡抗鼠 IgG 抗体于室温孵育 1 h 后于荧光显微镜下观察。

1.6 病毒血症检测

感染后第 2、4、6、8 天剖杀小鼠时采集全血样本。一份(250 μ L)静置分离血清, 如血量足够, 则另一份(200 μ L)用乙二胺四乙酸二钠(Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA-Na₂)抗凝处理。随后, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取血清中 RNA, 用 QIAamp RNA Blood Mini Kit 提取全血及白细胞中 RNA。上述 RNA 均采用 Oligo (dT)₁₅ 引物和 SuperScript[®] III Reverse Transcriptase 试剂盒按说明合成 cDNA 并用 AmpliTaq[®] DNA Polymerase PCR 扩增 M 基因和 H5 基因。M 基因正向引物: 5'-GCAGGTAGATATTGAAAGATG-3', 反向引物: 5'-GAAACAAGGTAGTTTTTACTC-3'; HA 基因正向引物: 5'-GGGTGAGCTCAGCATGTCCA-3', 反向引物: 5'-CCCTGCCATCCTCCCTCTAT-3'。

2 结果

2.1 小鼠病征

3 株病毒感染的小鼠在滴鼻接种后的 2 d 内均有体重的轻微上升, 然而, 在感染后 3 d, 48% 的小鼠开始出现体重下降(图 1)。在感染后 8 d, 感染组的小鼠平均体重下降 10%, 相比之下, 对照组却有 10% 的体重增加。各感染组小鼠病征表现较

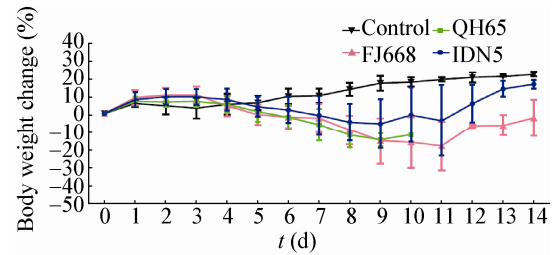


图 1 小鼠接种 H5N1 病毒后体重变化曲线图

Figure 1 Body weight changes of the mice inoculated with the H5N1 viruses

注: 接种病毒后每天监测小鼠体重, 计算各组当天存活小鼠体重变化的平均值和标准差。QH65 组小鼠于感染后 10 d 全部死亡。Note: Body weight changes of the survival mice were monitored daily. The values are means with standard deviation (SD) showed as vertical bars. All mice of the QH65 group died at 10 dpi.

为一致: 大部分的小鼠在感染后 5 d 出现毛发蓬乱、竖起; 8 d 出现弓背、呼吸困难等重症表现。同时, 感染后 8 d, 在 IDN5 和 QH65 组中各有 1 只小鼠、FJ668 组中有 2 只小鼠出现神经症状, 主要表现为偏瘫或后肢瘫痪。从 9 d 开始各组均有小鼠死亡或因体重过低而采取麻醉处死。

2.2 肺部病理改变及病毒滴度的动态变化

自接种后 4 d 起, 小鼠肺中即可观察到典型的急性间质性支气管肺炎的病理表现。炎症在接下来数日内发展迅速, 在 HE 染色的肺部切片中, 可观察到支气管上皮细胞的水肿、肺间质炎性细胞浸润、肺泡间隔增粗等现象。炎症症状在接种后第 6-8 天的鼠肺中表现更为严重(图 2A)。病毒 NP 蛋白于接种后 2 d 即可在小鼠肺中检测到, 主要分布于支气管上皮细胞及气管周边结缔组织。在随后的几天, 病毒迅速扩散至肺内各细胞中(图 2B)。尽管在接种后 8 d 开始有小鼠病重死亡, 但此时肺中检测到的病毒 NP 蛋白量反而不及在接种后 6 d 的样本, 提示病毒在肺中的复制高峰在感染后 6 d 前后; 接种后 14 d 仍存活且无明显病征的小鼠肺中可检测到少量的 NP 蛋白阳性细胞。肺组织样本匀浆滴定结果显示: 肺中病毒滴度自感染后迅速抬升, 在感染后 6 d 达到峰值(10^6 - 10^7 PFU/mL), 该水平一直维持到感染后 8 d。感染后 14 d 存活小鼠的肺部病毒可完全清除(图 3A)。

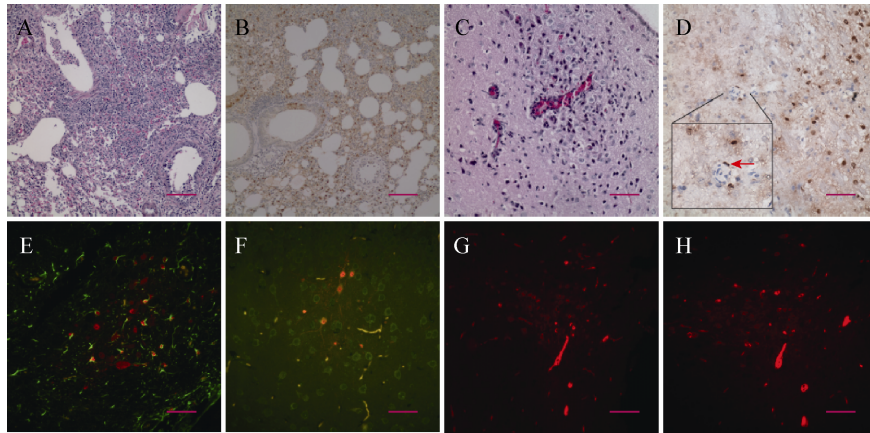


图 2 小鼠肺、脑病理性变化及病毒 NP 蛋白检测

Figure 2 Pathogenic changes and detection of the viral NP protein in mice lung and brain

注: A: 肺组织切片 HE 染色(FJ668 组小鼠感染后 8 d); B: 肺组织切片 NP 蛋白 IHC 染色(IDN5 组小鼠感染后 4 d); C: 脑组织切片 HE 染色(FJ668 组小鼠感染后 8 d); D: 脑组织切片 NP 蛋白 IHC 染色(QH65 组小鼠感染后 8 d), 方框内为局部放大的脑内小血管, 箭头指向血管内皮细胞 NP 蛋白阳性信号; E-F: 脑组织切片免疫荧光双染(E、F 分别为 FJ668 和 IDN5 组小鼠感染后 8 d, FITC 标记 GFAP 和 NSE, 罗丹明标记 NP 蛋白); G-H: 脑组织切片 NP 蛋白荧光染色(IDN5 组小鼠感染后 9 d, 罗丹明标记 NP). 标尺长度分别为 100 μ m (A-B)和 50 μ m (C-H).

Note: A: HE stained lung slice (FJ668, 8 dpi); B: IHC stained NP protein in lung (IDN5, 4 dpi); C: HE stained brain slice (FJ668, 8 dpi); D: IHC stained NP protein in brain (QH65, 8 dpi), a vascular endothelial cell with NP positive signal was indicated by an arrow in the enlarged inset; E-F: Double fluorescence stained brain slice (E: FJ668, 8 dpi and F: IDN5, 8 dpi; FITC-GFAP/NSE, rhodamine-NP protein); G-H: Fluorescence stained brain slice (IDN5, 9 dpi, rhodamine-NP protein). Scale bars indicate: 100 μ m (A-B) or 50 μ m (C-H).

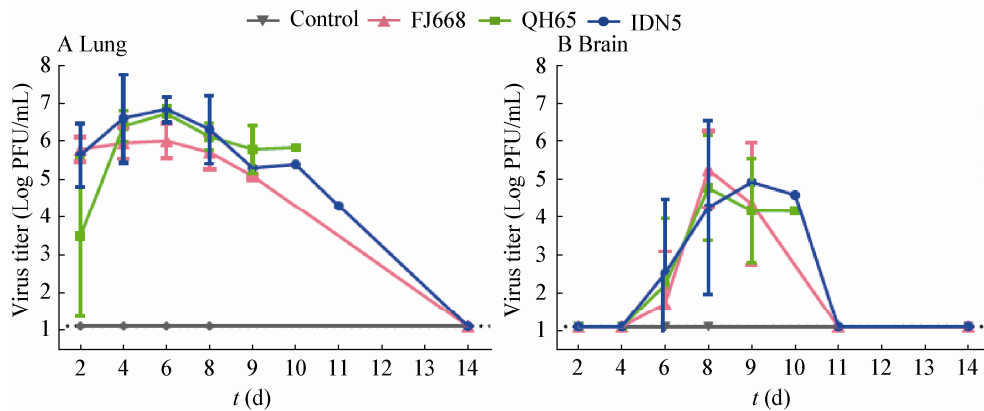


图 3 小鼠感染 H5N1 病毒后肺、脑组织中的病毒滴度

Figure 3 Virus titers in lung and brain tissues of the mice inoculated with H5N1 viruses

注: A: 肺组织病毒滴度; B: 脑组织病毒滴度. 感染后第 2、4、6、8 天, 感染组每组麻醉处死 5 只小鼠, 对照组处死 2 只小鼠. 死亡或体重过低(>30%)处死的小鼠也取样检测. 每只小鼠均采集左侧肺、脑组织, 置于 1 mL 预冷 PBS 中制备匀浆. 匀浆离心后取上清 PBS 1:10 稀释空斑滴定. 每个样本平行检测 2 次, 空斑滴定检测极限: 12.5 PFU/mL(图中横虚线). 曲线上各点为各样本每克组织病毒滴度均值及标准差.

Note: A: Virus titers in lung; B: Virus titers in brain. Five mice in each virus inoculated group and two mice from the control group were sacrificed at 2, 4, 6, 8 dpi. Mice died of severe infection or significant body weight lost (>30%) were also sampled. The left lung and brain tissues were collected and homogenized in 1 mL pre-cold PBS. Tissue homogenates were centrifuged to collect the supernatant, which were 1:10 diluted and titrated with plaque assay. Each sample was titrated in parallel twice. The detected limit of the plaque forming assay is 12.5 PFU/mL (showed in dotted line). All values indicate the mean virus titers of per gram tissue with standard deviation (s).

2.3 脑部病理改变及病毒滴度的动态变化

在感染组的小鼠脑组织中可观察到病毒性脑炎的症状,表现为神经元变性、炎性细胞浸润和血管鞘现象(图 2C)。然而,直至感染后 6 d,在 IDN5 病毒感染组的 1 只小鼠脑干部位才开始出现少量病毒 NP 蛋白(约 10 个 NP 蛋白阳性细胞);到了感染后 8 d,67%的脑组织样本中可检测到分布于大脑皮质中的 NP 蛋白阳性细胞(图 2D)。免疫荧光双染结果显示:病毒既可感染神经元细胞,又可感染神经胶质细胞(图 2E、F)。在小鼠脑内血管内皮细胞上和脑血管周围神经组织中可检测到 NP 蛋白阳性细胞(图 2D、G、H)。脑组织匀浆滴定结果显示:直至感染后 6 d 脑组织中才开始检测到病毒(10^4 – 10^5 PFU/mL),8 d 脑中病毒量继续上升,在 9、10 d 病亡的小鼠脑中也可检测到高滴度的病毒(图 3B)。

2.4 血液中病毒滴度动态变化

在小鼠感染病毒后 2 d, IDN5 组即有一只小鼠的血清可检测到病毒血症(表 1)。感染后 4 d,病毒血症的检出率开始增加:在检测的 7 份全血样品中,有 3 只小鼠(42.9%)出现了病毒血症,病毒基因可从血清(11.1%)和白细胞(14.3%)中检测到。感染后 6 d,病毒血症阳性率明显抬升:9 份全血样本全部检出病毒血症(100.0%)。血清和白细胞中病毒基因的检出率分别为 27.3%和 66.7%。感染后 8 d,血清中已无法检测到病毒基因,但 1 份白细胞样品中仍可检测到病毒基因存在。

3 讨论

本研究结果表明,H5N1 高致病性禽流感病毒感染小鼠后,迅速在肺部高效复制,一方面引起免疫应答和病理变化,一方面引起病毒血症并向肺外器官扩散。病毒在感染早期就可侵入血液,病毒血症的峰值与病毒在肺内复制的高峰几乎同时出现;在肺、血病毒高峰出现时,脑组织中才开始检测到病毒,提示中枢神经系统的感染比肺、血较为延迟。在脑组织血管内皮细胞上,我们检测到了流感病毒的 NP 蛋白,血管周围也有 NP

表 1 病毒血症检测
Table 1 Detection of Viremia

接种后(d) Day post inoculation (dpi)	阳性数/样本数(阳性率) Number of positive/Number of samples (Positive rate)			
	病毒 Virus	全血 Whole Blood	血清 Serum	白细胞 WBC
2	IDN5	0/2	1/2	0/2
	QH65	0/3	0/3	0/3
	FJ668	0/2	0/2	0/2
	小计	0/7	1/7	0/7
	Sub-total	(0.0%)	(14.3%)	(0.0%)
4	IDN5	2/2	1/3	0/2
	QH65	0/2	0/3	0/2
	FJ668	1/3	0/3	1/3
	小计	3/7	1/9	1/7
	Sub-total	(42.9%)	(11.1%)	(14.3%)
6	IDN5	2/2	2/3	2/2
	QH65	4/4	1/5	1/4
	FJ668	3/3	0/3	3/3
	小计	9/9	3/11	6/9
	Sub-total	(100.0%)	(27.3%)	(66.7%)
8	IDN5	0/0	0/3	0/0
	QH65	0/1	0/3	0/1
	FJ668	1/1	0/2	1/1
	小计	1/2	0/8	1/2
	Sub-total	(50%)	(0.0%)	(50.0%)
总计 In total		13/25 (52.0%)	5/35 (14.3%)	8/25 (32.0%)

注:接种病毒后第 2、4、6、8 天麻醉剖杀小鼠取全血,提取血清、全血和白细胞 RNA 合成 cDNA 后 PCR 检测病毒 H5 和 M 基因。病弱未能取得足量血液样本的小鼠只进行血清中的病毒检测。

Note: Mice were anesthetized and sacrificed at 2, 4, 6, 8 dpi to collect blood samples. RNAs from whole blood, serum and white blood cells were extracted for cDNA synthesis. PCR was conducted to detect the H5 and M gene. For those failed to collect enough blood samples, virus gene detections were only conducted on serum samples.

蛋白阳性细胞簇集的现象。上述结果提示:血液通路有可能是 H5N1 高致病性禽流感病毒入侵中枢神经系统的途径之一。

流感病毒进入中枢神经系统的通路一直为学者们所关注。由于神经细胞对流感病毒易感性高及嗅神经嗅球在鼻腔和前脑中的独特分布,具有嗜神经性的呼吸道病毒得以在感染或鼻腔接种的初期便可通过嗅束上行进入颅脑。然而,血液途径在病毒向中枢神经系统的传播一直未能得到证

实。一个可能的原因是脑组织切片常常只能显示小血管的一个横切面, 这增加了寻找脑组织血管内皮细胞感染及病毒通过血循环向脑内神经组织播散的证据的难度。有研究表明, 病毒可在肺血管内皮细胞中复制^[19-21], 这为病毒通过感染血管内皮细胞进、出血液循环系统提供了基础。在本研究中, 病毒血症的出现、脑血管内皮细胞及脑血管周围神经细胞的感染, 以及病毒血症和脑内病毒出现的时间次序均支持 H5N1 病毒有可能通过血液途径传入中枢神经系统的假说。但是, 本研究不排除病毒通过神经通道入脑的可能。小鼠自感染后 6 d 颅内检测到病毒, 随后 2 d 内脑内病毒滴度剧增(100 倍), 感染面积广泛扩散, 神经元和胶质细胞均大面积受累, 均提示中枢神经系统对 H5N1 病毒是高度易感的, 病毒在神经组织中有较好的复制和扩散能力。

在病毒血症的检测实验中, 血清样本中检测到病毒基因是血液中存在游离病毒的有效指标, 首份病毒血症的阳性样本即检出于感染后 2 d 的小鼠血清中。这提示在免疫系统充分激活之前, 病毒能进入血液循环并向外周散播。随着机体免疫应答的启动, 白细胞中病毒检出率也随着上升并逐渐占据主导地位。随后, 血清游离病毒也相应减少, 提示免疫应答对病毒的清除作用。此前已有研究显示培养的人树突状细胞、T 细胞对 H5N1 病毒易感^[22-23], 在 H5N1 感染患者的脾和淋巴结中也能检出病毒^[7], 但这些细胞除了在抗病毒免疫中发挥作用外, 是否能携带病毒并成为其扩散的载体尚待进一步研究。

近 3 年来, 我国仅发生 9 例人感染 H5N1 病毒的案例, 总发病数较 2003-2009 年间显著下降, 但该病毒的致死率仍然很高^[24]。在治疗上, 除了经典的神经氨酸酶抑制剂, 近年来各机构研发的抗 H5N1 人源性单克隆抗体也开始展示出抗病毒感染的乐观前景, 部分人源性单抗在动物模型中已展现出良好的预防和保护作用^[25-27]。由于迄今尚未有药物能阻断病毒经过神经通路的传播, 这些经过血液循环系统发挥作用的药物将有助于血液中病毒的中和、

抑制或清除, 继而在一定程度上减少病毒进入中枢神经系统。

参 考 文 献

- [1] Bental E. Acute psychoses due to encephalitis following Asian influenza[J]. Lancet, 1958, 2(7036): 18-20
- [2] Alakare J, Jurkko R, Kaukonen KM, et al. Viral encephalitis associated with pandemic 2009 (H1N1) influenza A[J]. BMJ Case Reports, 2010: bcr0220102772
- [3] Nakashita Y, Aoki M. Mild brain hypothermia for influenza encephalitis/encephalopathy and its significance[J]. Japanese Journal of Clinical Medicine, 2000, 58(11): 2333-2337
- [4] Okumura A, Nakano T, Fukumoto Y, et al. Delirious behavior in children with influenza: its clinical features and EEG findings[J]. Brain and Development, 2005, 27(4): 271-274
- [5] de Jong MD, van Cam B, Qiu PT, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma[J]. The New England Journal of Medicine, 2005, 352(7): 686-691
- [6] Rajabali N, Lim T, Sokolowski C, et al. Avian influenza A (H5N1) infection with respiratory failure and meningoencephalitis in a Canadian traveller[J]. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2015, 26(4): 221-223
- [7] Gao RB, Dong LB, Dong J, et al. A systematic molecular pathology study of a laboratory confirmed H5N1 human case[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13315
- [8] Bissel SJ, Giles BM, Wang GJ, et al. Acute murine H5N1 influenza A encephalitis[J]. Brain Pathology, 2012, 22(2): 150-158
- [9] Yamamoto Y, Nakamura K, Kitagawa K, et al. Severe nonpurulent encephalitis with mortality and feather lesions in call ducks (*Anas platyrhynchos* var. *domestica*) inoculated intravenously with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus[J]. Avian Diseases, 2007, 51(1): 52-57
- [10] Peng BH, Yun N, Chumakova O, et al. Neuropathology of H5N1 virus infection in ferrets[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156(3/4): 294-304
- [11] Perkins LEL, Swayne DE. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars[J]. Veterinary Pathology, 2003, 40(1): 14-24
- [12] Yamada M, Bingham J, Payne J, et al. Multiple routes of invasion of wild-type Clade 1 highly pathogenic avian influenza H5N1 virus into the central nervous system (CNS) after intranasal exposure in ferrets[J]. Acta Neuropathologica, 2012, 124(4): 505-516
- [13] Park CH, Ishinaka M, Takada A, et al. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice[J]. Archives of Virology, 2002, 147(7): 1425-1436
- [14] Plourde JR, Pyles JA, Layton RC, et al. Neurovirulence of H5N1 infection in ferrets is mediated by multifocal replication in distinct permissive neuronal cell regions[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46605
- [15] Shinya K, Makino A, Hatta M, et al. Subclinical brain injury caused by H5N1 influenza virus infection[J]. Journal of Virology, 2011, 85(10): 5202-5207
- [16] Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential[J]. Avian Diseases, 1996, 40(2): 425-437
- [17] Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus[J]. Journal of Virology, 1994, 68(5): 3120-3128
- [18] Reimacher M, Bonin J, Narayan O, et al. Pathogenesis of neurovirulent influenza A virus infection in mice. Route of entry of virus into brain determines infection of different populations of cells[J]. Laboratory Investigation, 1983, 49(6): 686-692

- [19] Li AC, Chan RW, Hui CF, et al. Replication and innate host response of influenza A virus in lung microvascular endothelial cells: new insights into systemic infection and pathogenesis[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2011, 5(S1): 287-288
- [20] Zeng H, Pappas C, Belser JA, et al. Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(2): 667-678
- [21] Chan MC, Chan RW, Yu WC, et al. Influenza H5N1 virus infection of polarized human alveolar epithelial cells and lung microvascular endothelial cells[J]. *Respiratory Research*, 2009(10): 102
- [22] Thitithanyanont A, Engering A, Ekchariyawat P, et al. High susceptibility of human dendritic cells to avian influenza H5N1 virus infection and protection by IFN- α and TLR ligands[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(8): 5220-5227
- [23] Li YG, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, et al. Higher *in vitro* susceptibility of human T cells to H5N1 than H1N1 influenza viruses[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(3): 484-489
- [24] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2015[EB/OL]. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
- [25] Hu HX, Voss J, Zhang GL, et al. A human antibody recognizing a conserved epitope of H5 hemagglutinin broadly neutralizes highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(6): 2978-2989
- [26] Tan YR, Ng QY, Jia Q, et al. A novel humanized antibody neutralizes H5N1 influenza virus via two different mechanisms[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(7): 3712-3722
- [27] Itoh Y, Yoshida R, Shichinohe S, et al. Protective efficacy of passive immunization with monoclonal antibodies in animal models of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(6): e1004192

2016年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	鼠疫菌生态与遗传研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	3月	100	北京	
2	2016年全国微生物毒素与急危重症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	4月	400	上海	陈德昌 13901674318
3	生物过程优化与放大研讨会	中国微生物学会生化工程模型化与控制专业委员会	4月	260	湖北宜昌	尤舸浩 13908607687
4	第四届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及高效利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5月 13-15日	120	湖北武汉	吴悦 027-87287254
5	第二届噬菌体学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	5月	150	湖北武汉	童贻刚 133611272813
6	第二届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	6月	200	浙江杭州	李永泉 13735591622
7	第七届传染病基础与技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6月	400	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
8	酿造食品的营养化学学术研讨会	中国微生物学会酿造分会	6月	120	浙江杭州	张秀梅 13503213265
9	第十届全国海洋生物技术与创新药物学术讨论会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8月	250	江苏南京	王梁华 13386271017
10	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8月	200	北京	010-53218310
11	第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8月 22-25日	400	内蒙古 呼和浩特	阮志勇 13001101231
12	第二届真菌感染与宿主免疫学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9月	200	浙江宁波	李祥 13811495603