

一、项目名称：

禽流感等病毒气溶胶传染及其宿主天然免疫应答机制

二、申报奖种

山东省自然科学奖

三、提名者及提名意见

提名者：山东农业大学

提名意见：我单位认真审阅了该项目推荐书及其附件材料，确认真实有效，相关栏目符合填写要求。按照要求，我单位及完成人所在单位均进行了公示，确认完成人、完成单位排序无异议。该项目建立了病毒气溶胶传染模型，揭示了 H9N2 亚型禽流感、H1N1 亚型猪流感、马立克氏病、猪繁殖与呼吸综合征等病毒气溶胶的发生、传播及感染机制，国际上首次在养猪场圈内、外环境空气收集到新甲流 H1N1（2009）病毒气溶胶；发现了决定禽流感病毒气溶胶形成及其气源性传染的关键位点（NA 表面蛋白）等，采用分子病毒学反向遗传技术，经过对其关键位点的基因突变、重组、构建新质粒和拯救病毒，验证了其基因序列对流感病毒致病力和气源性传染能力的影响；在国际上首次证实 H9N2 AIV 的蛋白结构决定了其传播传染方式和能力，阐明了病毒气源性传染机制及跨种传播的危害性；采用病毒气溶胶等途径感染机体后，宿主首先启动天然免疫反应抗感染，表现在相关受体、细胞因子、功能蛋白的表达上升，并逐步过渡到获得性免疫。诠释了宿主天然免疫反应在病原微生物感染早期发挥的重要作用。

该研究取得了多项理论创新，在国际著名学术刊物如《*Veterinary Research*》、《*Veterinary microbiology*》、《*Virology Journal*》、《*Frontiers in Microbiology*》、《*Frontier in Immunology*》、《*Scientific Reports*》等发表了几十篇高水平论文，具有重要的科学价值，得到了国内国际同行的认可。

提名该项目为山东省自然科学奖二等奖。

四、项目简介

针对病毒性传染病的气源性传染问题和重大人兽共患病禽流感、新甲流 H1N1 (2009) 即猪流感导致的公共卫生危害，受国家国际项目资助开展系列研究。本项目创新性地建立了病毒气溶胶传染模型，揭示了病毒气溶胶的发生、传播及感染的过程及规律，尤其气溶胶的发生及浓度的衰减，指出其有效控制的关键节点，并国际上首次在养猪场圈内、外环境空气监测收集到新甲流 H1N1(2009) 气溶胶；通过跟踪研究，探明了 H9N2 亚型禽流感病毒（*Avian Influenza Virus, AIV*）从上世纪 90 年代以来的演变过程，确认了其致病力、传染力和跨种传染能力的提高；进而采用分子病毒学反向遗传技术等揭示了其关键位点的氨基酸决定了 AIV 气源性传染能力，国际上首次证实流感病毒的蛋白结构决定了其传播传染方式和能力；进一步阐明病毒气溶胶等途径感染机体后，宿主天然免疫反应抗感染机制。

从事该领域 30 余年，有 53 名博、硕士研究生参与，发表 SCI 相关论文 48 篇。本项

目 8 篇代表性 SCI 论文总影响因子 32.27，他人引用 30 次。

1. 构建了新甲流 H1N1(2009)、马立克氏病、蓝耳病等病毒气溶胶的发生、传播及感染模型。使其能够检测到病毒气溶胶的发生时间点、浓度衰减过程，为该病的传播防控奠定基础；该模型设计能够对攻毒（组）、直接接触（组）、飞沫传染（组）和气溶胶被动感染（组）动物即不同途径的感染状况做出评估，是评定病毒气溶胶研究的最佳模式。

2. 跟踪研究阐明了 H9N2 AIV 等在自然界与人、家禽和哺乳动物体频繁接触、繁殖和宿主交换，其跨种传染和气源性传染力不断增强。从 1994 年分离株不能气源性传染，到近年来分离株的气源性传染，适应哺乳动物后引起接触传染，与 H1N1 重组后感染能力增强，探明了其多年来的演变过程。

3. 确认了影响 H9N2 亚型 AIV 气源性传染的 NA 蛋白关键氨基酸位点，并揭示病毒逐渐适应哺乳动物后基因重组导致病毒跨种传染的能力增强。采用分子病毒学反向遗传技术，经过基因突变、重组和拯救新病毒，验证了 NA 蛋白四个氨基酸位点(D368E, S370L, E313K 和 G381D)是影响其在家禽间气源性传染的关键位点。H9N2 亚型 AIV 与 H1N1 基因重组后，对豚鼠感染能力增强，虽未能引起气源性传染，但检测到病毒气溶胶，足够量的气溶胶能够引起感染。

4. 确定了 H9 亚型 AIV 等感染早期宿主天然免疫系统模式识别受体 (PRRs) 和一系列细胞因子发挥的重要作用以及引起的免疫应答机制。研究发现，禽流感病毒等在感染机体组织过程中，TLR-3 等三种模式识别受体，IL-1 β 等细胞因子，Mx 等抗病毒蛋白，IL-8 等趋化因子明显上调，说明感染后诱导的天然免疫反应激活，阐明了病毒感染宿主后的天然免疫应答过程及其机制。

5. 发现含有禽流感病毒的 PM_{2.5} 气溶胶能够加重小鼠肺部损伤，引起肺部免疫应答炎性反应，与宿主的相互作用后引起机体功能蛋白表达量的上调和下调。建立小鼠慢性和急性气溶胶感染模型，TLR2 等受体，起主要效应的细胞因子和趋化因子在感染组中的表达量均显著升高，且慢性感染高于急性感染；肺部组织病理和质谱分析看出，PM_{2.5} 和 PM₁₀ 能够加重小鼠的肺部损伤程度。结果显示，活禽市场产生的微生物气溶胶对访客和周边居民形成健康风险或危害。

五、客观评价

(一) 第三方评价：证明材料见附件 19-文献检索证明。

经 CALIS 查收查引系统查询，本项目 8 篇被科学引文索引 (SCI-Expanded) 收录的论文，在科学引文索引 (SCI-Expanded) 中他引 27 次，在 Web of Science 核心合集中他引 30 次。

(二) 国家自然科学基金项目结题：证明材料见附件 17、18

2018 年 12 月 26 日受国家自然科学基金委的要求，面上项目 H9N2 亚型禽流感病毒气源性传染及跨种传播分子机制研究 (项目号 31470258) 提交结题报告：

本研究采用 8 质粒反向遗传操作系统，对气源性传染能力不同的 H9N2 AIV (Avian Influenza Virus) 毒株 NA 蛋白氨基酸位点突变，拯救病毒株。将 SPF 鸡带入气溶胶发生、传播和感染模型，验证 AIV 突变株的气源性传染力，阐明了氨基酸位点的突变对其传染的影响。应用生物信息学技术，模拟 AIV 突变前后 NA 蛋白三维结构，分析其与气溶胶传播的关系。为评估 AIV 在哺乳动物体适应后的危害，将 AIV 在豚鼠体内传代后，对其全基因序列分析，揭示其适应后的变异，展示传代前后模拟的 HA 和 PB2 蛋白结构差

异，揭示变异株蛋白结构对其跨种传播的影响。据此结果，反向遗传操作对原代毒株基因定点突变，使人工突变毒株与传代株具有相同特性，再带入豚鼠模型予以验证，确定 H9N2 AIV 在哺乳动物间传播的重要的基因位点，阐明变异株蛋白结构对其跨种传染的影响。本研究对评估该亚型流感病毒对哺乳动物及人的危害风险及大范围流行的趋势，采取合适的防控措施，减少畜牧业的损失和公共卫生风险具有重要指导意义。

本项目成果主要有：(1)发表 SCI 论文 11 篇，中文核心 1 篇。揭示了 H9N2 病毒致病性和跨种传染能力在增强、获得了形成气溶胶及其传播感染能力。该亚型禽流感病毒将对公共卫生产生更大的危害风险，值得密切关注和跟踪研究，采取积极的防控措施。(2)培养 1 名博士后、1 名博士生、4 名硕士。(3)国际合作，邀请了德国柏林自由大学 Prof.U.Roesler, T.Alter, A.merle, M.Baumann 于 2017 年 6 月 15 至 7 月 10 日来我校讲学。(4)主持成立畜牧兽医学会'动物福利与健康养殖分会'。(5)主持举办国家级国际会议"在食物链和环境中的兽共患病病原-全球性挑战（中德双边研讨会，中德科学中心批准资助）"；主持举办全国性学术会议"中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会成立大会暨首届规模化健康与福利养猪高峰学术论坛"、"农场动物福利与畜牧业可持续性发展暨中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会第一届第二次家禽福利高效养殖研讨会"等。

2019 年 3 月 26 日国家自然科学基金委对本项目审核完毕，准予结题。

六、代表性论文专著目录（不超过 8 篇）

序号	论文专著名称	刊名（出版社）	发表时间	作者（按刊物发表顺序）	通讯作者（含共同）	第一作者（含共同）	影响因子	SCI 他引次数	他引总次数	第一完成人是否参与
1	Amino acid substitutions in the neuraminidase protein of an H9N2 avian influenza virus affect its airborne transmission in chickens.	Veterinary Research	2015.4.18	Jing Lv, Liangmeng Wei, Yan Yang, Bingxiao Wang, Wei Liang, Yuwei Gao, Xianzhu Xia, Lili Gao, Yumei Cai, Peiqiang Hou, Huili Yang, Airon Wang, Rong Huang, Jing Gao* and Tongjie Chai	Tongjie Chai, Jing Gao	Jing Lv, Liangmeng Wei	3.290	4	5	是
2	Generation, transmission and infectivity of chicken MDV aerosols under experimental conditions.	Veterinary microbiology	2014.6.3	Haiyu Hao, Chao Li, Yuyu Qiu, Fangshan Wang, Wenhao Ai, Jing Gao, Liangmeng Wei, Xiaoxia Li, Lingyu Sun, Jie Wu, Guiping Qin, Rong Li, Jiyuan Liu, Jing Lv, Rong Huang, Hairong Wang*, Tongjie Chai*	Tongjie Chai, Hairong Wang	Haiyu Hao	2.870	1	1	是
3	Airborne spread and infection of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus.	Virology Journal	2013.6.22	Hongna Zhang, Xin Li, Ruihua Ma, Xiaoxia Li, Yufa Zhou, Hongliang Dong, Xinxian Li, Qinglei Li, Mingliang Zhang, Zhihao Liu, Baozhi Wei, Mingchao Cui, Hao Wang, Jing Gao, Huili Yang, Peiqiang Hou, Zengmin Miao* and Tongjie Chai*	Tongjie Chai, Zengmin Miao	Hongna Zhang, Xin Li	2.354	5	6	是
4	The mRNA and proteins expression levels analysis of TC-1 cells immune response to H9N2 avian influenza virus.	Frontiers in Microbiology	2016.6.30	Jiyuan Liu, Ning Li, Dan Meng, Mengchan Hao, Liangmeng Wei*, and Tongjie Chai*	Tongjie Chai, Liangmeng Wei	Jiyuan Liu, Ning Li	4.526	1	1	是
5	Response profiles of cytokines and chemokines against avian H9N2 influenza virus within the mouse lung	Medical microbiology and immunology	2013.12.11	Rong Huang, Jiyuan Liu, Wei Liang, Airon Wang, Zhihao Liu, Yan Yang, Jing Lv, Ying Bao, Yanxia Gao, Zengmin Miao, Tongjie Chai	Tongjie Chai, Zengmin Miao	Rong Huang	3.005	7	7	是
6	Proteomic Analysis of Differential Expression of Cellular Proteins in Response to Avian H9N2 Virus	Frontier in microbiology.	2016.12.15	Guanliu Yu, Wei Liang, Jiyuan Liu, Dan Meng, Liangmeng Wei, Tongjie Chai * and Yumei Cai *.	Tongjie Chai, Yumei Cai	Guanliu Yu, Wei Liang	4.526	4	4	是
7	Immunity-Related Protein Expression and Pathological Lung Damage in Mice Poststimulation with Ambient Particulate Matter from Live Bird Markets.	Frontier in Immunology	2016.6.27	Kai Meng, Bo Wu, Jing Gao, Yumei Cai, Meiling Yao, Liangmeng Wei and Tongjie Chai*	Tongjie Chai, Liangmeng Wei	Kai Meng, Bo Wu	5.849	2	3	是
8	Cherry Valley ducks mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) mediated signaling pathway and	Frontiers in Immunology	2016.12.21	Ning Li, Tianqi Hong, Rong Li, Yao Wang, Mengjiao Guo, Zongxi Cao, Yumei Cai, Sidang Liu, Tongjie Chai*, and Liangmeng Wei*.	Tongjie Chai, Liangmeng	Ning Li	5.849	3	3	是
合计							32.269	27	30	8

补充说明（视情填写）：

承诺：知识产权归国内所有且无争议。以下情况和规定已向所有未列入项目主要完成人的作者明确告知并征得同意：上述论文专著用于提名 2020 年山东省自然科学奖；②国家科学技术奖、山东省及其他省（市）科学技术奖获奖项目所用论文专著不得再次参评。其中，未列入项目主要完成人的第一作者、通讯作者（含共同第一作者、共同通讯作者）已出具知情同意书面签字意见，与其他作者的有关知情证明材料均存档备查。因未如实告知上述情况而引起争议，且不能提供相应存档备查的证据，本人愿意承担相应责任，并接受处理。

第一完成人签名：

七、主要完成人情况表

姓名	柴同杰	性别	男	排 名	1	国 籍	中国
技术职称	教授			最高学历	研究生	最高学位	博士
通讯地址	泰安市岱宗大街 61 号					邮政编码	271000
工作单位	山东农业大学			行政职务	-		
二级单位	动物科技学院、动物医学院					党 派	中国共产党
完成单位	山东农业大学					所 在 地	山东泰安
						单位性质	高等院校
参加本项目的起止时间	2005.01 至 2018.12						
对本项目主要学术贡献： 本人是该推荐书所列的科技计划项目的主持人，负责项目的全面工作，从项目的设计起草与申请到项目的具体实施、中期考核和结题验收，发表论文，总结报告等；指导并参加了全部三项‘重要科学发现’的工作，有创新性的贡献，即是所列的8篇代表性论文的通讯作者，是主要学术思想的提出者。 本人作为项目负责人对全部三项科学发现均有贡献。支持材料是附件目录的 1-8 项，即代表性论文的通讯作者。							
曾获省级以上科技奖励情况： 1. “魏氏梭菌类毒素疫苗与抗毒素血清制备研究”，证书号：FM2007-3-1-1，获得山东省人民政府科技发明三等奖，2008 年4 月，排名第一。 2. “鸡舍环境微生物气溶胶发生及其传播模式研究”，证书号：Z2002-3-12-1，获得山东省人民政府自然科学三等奖，2002.9 月，排名第一。							

姓名	吕静	性别	女	排 名	2	国 籍	中国
技术职称	主管技师			最高学历	研究生	最高学位	博士
通讯地址	山东泰安长城路 33 号					邮政编码	271000
工作单位	泰安市疾病预防控制中心					行政职务	无
二级单位	无					党 派	中共党员
完成单位	泰安市疾病预防控制中心					所 在 地	山东
						单位性质	事业单位
参加本项目的起止时间	2009.06 至 2018.12						
对本项目主要学术贡献： 研究发现了影响 H9N2 亚型 AIV 在家禽间气源性传染的关键氨基酸位点。通过流感病毒 8 质粒反向遗传系统和基因定点突变及基因重组技术对流感毒株基因进行操作，转染 MDCK 和 293T 混合培养的细胞来拯救病毒，获得重组突变株，动物实验等研究发现病毒株 NA 片段的 4 个位点（D368E, S370L, E313K 和 G381D）突变后，使病毒失去了在家禽间能够气源性传染的能力，NA 片段的 4 个位点对于病毒在家禽之间的气源性传播具有关键作用，为继续深入研究基因突变对毒株气源性传染的影响和探讨病毒气源性传染的分子机制奠定了基础。 对第（一）（二）项科学发现有贡献；是 SCI 代表论文 1 的第一作者。支持材料是附件 1。							

曾获省级以上科技奖励情况：
无

姓 名	韦良孟	性别	男	排 名	3	国 籍	中国
技术职称	副教授		最高学历	研究生		最高学位	博士
通讯地址	山东省泰安市泰山区岱宗大街 61 号					邮政编码	271018
工作单位	山东农业大学					行政职务	无
二级单位	动物科技学院					党 派	中国共产党
完成单位	山东农业大学					所 在 地	山东泰安
						单位性质	高等院校
参加本项目的起止时间		2014.1 至 2018.12					
<p>对本项目主要学术贡献：</p> <p>在本项目中，负责病原微生物与宿主天然免疫反应的互作研究，并逐步建立了以启动子萤火虫荧光素酶报告基因系统为基础对信号通路中转录调节因子（NF-κ B 和 IRF-7）和 IFN-β 进行分析的技术平台，同时建立了通过荧光定量 PCR 方法检测细胞因子的方法。</p> <p>对第（二）（三）项科学发现有贡献，是 SCI 代表论文 1 的并列第一作者，论文 4、7、8 的共同通讯作者。支持材料是附件 1、4、7、8。</p>							
<p>曾获省级以上科技奖励情况：</p> <p>获 2015 年山东高等学校优秀科研成果奖（三等，排名第四位）。</p>							

姓 名	李宁	性别	男	排 名	4	国 籍	中国
技术职称	副教授		最高学历	研究生		最高学位	博士
通讯地址	山东省泰安市泰山区岱宗大街 61 号					邮政编码	271018
工作单位	山东农业大学					行政职务	无
二级单位	动物科技学院					党 派	无
完成单位	山东农业大学					所 在 地	泰安市
						单位性质	高等院校
参加本项目的起止时间		2013.06 至 2018.12					

<p>对本项目主要学术贡献：</p> <p>在本项目中负责微生物感染后天然免疫研究，率先克隆了鸭线粒体抗病毒蛋白（MAVS），该蛋白在鸭体内多种组织中广泛表达，通过过表达和干扰试验，发现鸭 MAVS 在 IFN-β 的激活过程中发挥重要作用，进一步的抗病毒试验显示鸭 MAVS 能显著抑制鸭坦布苏病毒、新型鸭呼肠孤病毒和鸭瘟病毒的复制，具有较为广谱的抗病毒活性。研究结果对于深入理解水禽天然免疫系统的组成、功能具有重要的科学意义，同时还能天然抗病毒因子或潜在抗病毒药物的筛选和研发奠定基础。</p> <p>对第（三）项科学发现有贡献；是 SCI 代表论文 8 的第一作者，论文 4 的并列第一作者。支持材料是附件 4、8。</p>
<p>曾获省级以上科技奖励情况：</p> <p>无</p>

姓 名	王海荣	性别	女	排 名	5	国 籍	中国
技术职称	副教授		最高学历	研究生		最高学位	博士
通讯地址	山东省泰安市岱宗大街 61 号山东农业大学动科院				邮政编码	271018	
工作单位	山东农业大学				行政职务		
二级单位	动物科技学院				党 派	中共党员	
完成单位	山东农业大学				所 在 地	泰安	
					单位性质	高等院校	
参加本项目的起止时间	2009.1 至 2018.12						
对本项目主要学术贡献：	<p>在本项目中建立了 MDV 气溶胶在家禽间发生、传播及感染模型，动态监测自然排毒、气溶胶形成及传染，证实 MDV 能形成气溶胶并感染邻近的鸡群。</p> <p>对第（一）项科学发现有贡献；是 SCI 代表论文 3 的通讯作者。支持材料是附件 3。</p>						
曾获省级以上科技奖励情况：	<p>1998 年获山东省农牧业科技进步二等奖，禽脑脊髓炎病原分离及特异性病理诊断的研究，第四位。</p> <p>2015 年获山东省高等学校优秀科研成果奖三等奖，养殖与医院环境微生物气溶胶包括携带耐药基因细菌的发生、传播与感染机制，第二位。</p>						

八、完成人合作关系说明

在“禽流感等病毒气溶胶传染极其宿主天然免疫应答机制”项目研究与实施过程中，完成人之间的合作关系说明如下：

柴同杰：主要负责项目的总体设计，确定技术路线及项目的实施。指导并参加了全部三项“重要科学发现”的工作，有创新性的贡献，即是所列的8篇代表性论文的通讯作者。

吕静：项目的主要完成者，第一完成人是其博士、博士后导师，在本项目中负责影响 H9N2 AIV 在家禽间气源性传染的关键氨基酸位点的研究。参与第一完成人主持的国家自然科学基金项目“H9N2 亚型禽流感病毒气源性传染及跨种传播分子机制研究”的研究工作，本项目中发表学术论文《Amino acid substitutions in the neuraminidase protein of an H9N2 avian influenza virus affect its airborne transmission in chickens》。

韦良孟：项目的主要完成者，第一完成人是其博士后导师，本项目中负责主持国家重点实验室开放研究基金项目“H9N2 AIV 气溶胶形成及其向哺乳动物传染机理研究”，参与发表学术论文《Amino acid substitutions in the neuraminidase protein of an H9N2 avian influenza virus affect its airborne transmission in chickens》，是《The mRNA and proteins expression levels analysis of TC-1 cells immune response to H9N2 avian influenza virus.》等3篇学术论文的共同通讯作者。

李宁：项目的主要完成者，第一完成人是其博士导师，参与国家重点实验室开放研究基金项目“H9N2 AIV 气溶胶形成及其向哺乳动物传染机理研究”，在此项目中发表学术论文《Cherry Valley ducks mitochondrial antiviral-signaling protein mediated signaling pathway and antiviral activity research.》等2篇

王海荣：项目的主要完成者，第一完成人是其博士导师，为学术论文《Generation, transmission and infectivity of chicken MDV aerosols under experimental conditions.》的共同通讯作者。

完成人合作关系情况汇总表

序号	合作方式	合作者	合作时间	合作成果	证明材料	备注
1	论文合著、共同立项	柴同杰 吕静 韦良孟	2009-2018	SCI 论文 1 篇: Amino acid substitutions in the neuraminidase protein of an H9N2 avian influenza virus affect its airborne transmission in chickens; 国家自然科学基金: H9N2 亚型禽流感病毒气源性传染及跨种传播分子机制研究	附件 1 附件 17 附件 18	结题证书, 结题报告
2	论文合著	柴同杰 韦良孟	2014-2018	SCI 论文 1 篇: The mRNA and proteins expression levels analysis of TC-1 cells immune response to H9N2 avian influenza virus 等	附件 7	
3	论文合著	柴同杰 李宁 韦良孟	2013-2018	SCI 论文 2 篇: Cherry Valley ducks mitochondrial antiviral-signaling protein mediated signaling pathway and antiviral activity research 等	附件 4 附件 8	
4	论文合著	柴同杰 王海荣	2003-2018	SCI 论文 1 篇: Generation, transmission and infectivity of chicken MDV aerosols under experimental conditions.	附件 2	