

# 生理性衰老小鼠的感染免疫模型建立

袁松华<sup>1</sup>, 傅卫辉<sup>1</sup>, 何涌泉<sup>1</sup>, 徐建青<sup>1,2</sup>, 张晓燕<sup>1,2\*</sup>

(1. 复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

**【摘要】 目的** 生理性衰老导致机体免疫功能下调, 进而使老年人群感染免疫应答能力降低, 针对新发突发传染病的病原体如重症流感病毒的易感性上升, 罹患感染后, 临床症状也更严重, 预后不佳。因此, 本课题组建立一个拟合临床重症流感病毒感染的老年小鼠模型, 用于评价老年宿主感染免疫应答特征。**方法** 采用不同毒力的流感病毒 H7N9 (高致病性)、H9N2 (低致病性) 分别滴鼻感染老年 C57 小鼠 (18~24 月龄), 分析其感染后体重变化和生存情况, 并动态检测肺内病毒的复制, 炎症因子的表达以及肺的病理损伤。**结果** 与成年对照组小鼠 (6~8 周龄) 相比, 老年小鼠感染 H9N2 后 7 天体重下降了 30% (成年对照仅下降 10%), 生存率降低至 50% (成年对照为 100%)。老年小鼠肺内 H9N2 病毒复制更高 ( $P < 0.01$ ), 感染后第 2 天达到峰值 (每克肺内 RNA 病毒拷贝为  $3.2 \times 10^4$ ); 以炎症因子 IL-6、趋化因子 MCP-1 为代表的肺内炎症过量表达, 是成年对照的 100~1000 倍; 肺病理染色提示老年小鼠肺损伤更严重, 感染后修复时间更长。**结论** 成功建立老年小鼠感染模型, 在感染生存、肺病毒复制和炎症损伤等方面可以重现临床感染免疫应答的现象。可应用于深入理解老年宿主感染相关的机制研究与抗感染药物评价。

**【关键词】** 老年小鼠模型; 感染免疫; 流感病毒

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0020-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.004

## Establishment of an immune model of infection in aged mice

YUAN Songhua<sup>1</sup>, FU Weihui<sup>1</sup>, HE Yongquan<sup>1</sup>, XU Jianqing<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaoyan<sup>1,2\*</sup>

(1. Shanghai public health clinical center, Fudan university, Shanghai 201508, China;

2. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan university, Shanghai 200032)

**【Abstract】 Objective** The immune function of older people decreases with increasing age, while immunosenescence confers increased susceptibility to influenza. After infection, the clinical symptoms of elderly patients are particularly serious, associated with a poor prognosis. Therefore, an aged mouse model that reflects clinically severe influenza virus infection should be established to evaluate the immune responses upon elderly host infection. **Methods** For this purpose, aged C57 mice (18–24 months old) were infected with influenza viruses with different levels of virulence, H7N9 (high pathogenicity) and H9N2 (low pathogenicity). We analyzed the weight change and survival after infection. We also dynamically detected viral replication, expression of inflammatory factors, and pathological damage of lung. **Results** In contrast to adult mice (6–8 weeks), aged mice lost 30% of their body weight 7 days after infection with H9N2 (adult controls lost only 10%), and the survival rate was reduced to 50% (that of the adult controls was 100%). H9N2 virus replication in the lung of aged mice was higher ( $P < 0.01$ ) and peaked (RNA virus copy number in each gram of lung reached  $3.2 \times 10^4$ ) on the second day after infection. Inflammatory cytokines (IL-6) and chemokines (MCP-

[基金项目] 国家科技重大专项 (2017ZX10304402002007)。

[作者简介] 袁松华 (1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 病原生物学。E-mail: shy8610@163.com

[通信作者] 张晓燕 (1966—), 女, 研究员, 研究方向: 各类新发与再现感染性疾病免疫应答研究。E-mail: zhangxiaoyan@shaphc.org.cn

1) were excessively expressed and associated with inflammation in the aged lung, at levels 100 to 1000 times those in the adult control. Lung injury of aged mice was more severe and the repair time after infection was longer. **Conclusions** We successfully established a model of aged mouse infection. This can reproduce the immune responses in clinical infection, such as infection survival, lung virus replication, and inflammation injury. This model could be important for understanding the mechanism of aging host infection or for evaluating anti-infective drugs.

**[Keywords]** aged mouse model; infection immunity; influenza virus

美国疾病预防控制中心发布的关于 1976—2007 年度全美流感病例报告显示, 每年 65 周岁及以上的老年人群中每 10 万人的发病人数约为 321.1, 而 18~64 周岁的成年人群里每 10 万人的发病人数仅为 39.9<sup>[1]</sup>。更为严重的是, 因流感及流感样症状死亡的数量每年超过 3.6 万, 其中 89.1% 是 65 周岁及以上老年感染者<sup>[2]</sup>。由此可见, 老年人群是流感病毒感染风险系数最高的年龄组群。与年轻人群相比, 老年感染者的症状更加严重, 诱发慢性肺阻塞性疾病, 充血性心力衰竭, 哮喘以及心肌梗塞等慢性合并症<sup>[3]</sup>。即使体内流感病毒已经清除, 一些重症的老年感染者会部分甚至全部丧失自主的日常生活能力<sup>[4-5]</sup>。因此, 流感病毒感染老年人群引发的经济学和社会学问题, 已经成为威胁公共卫生安全的重要挑战。

在流感病毒感染的极早期, 老年感染者对体温升高重视不够, 因流感样症状收治入院时间相对滞后。另外, 重症流感的老年病患临床特点主要为, 病程进展速度快, 感染后易出现多种并发症, 感染后致死率较高<sup>[6]</sup>。研究标本采集主要集中于外周血和咽拭子等。但肺内原位炎症、病理变化以及淋巴归巢应答研究等更深层次的机制研究, 受标本取材、伦理等因素制约难以收集。此外, 已经获批的特异性针对老年人群的有效流感抗病毒药物、流感疫苗的种类较少, 现有抗病毒药物<sup>[7]</sup>或三价灭活疫苗的保护效果有限<sup>[8]</sup>, 一个科学的用于药物或疫苗有效性评估的动物模型是必需的。以上各种现实挑战亟待一个稳定可靠, 同时具有一定拟合度的动物模型, 用于研究老年流感病毒感染免疫应答。近交系小鼠模型是免疫学研究重要工具, 遗憾的是, 现有的研究关于老龄近交系小鼠流感感染免疫模型报道并不明确。因此本课题组以流感病毒 H9N2 为模式病原, 分别从体重变化、生存曲线、肺内病毒复制、肺内炎症因子表达以及肺的病理损伤情况等几个方面进行全面阐述, 建立老年近交系 C57 小鼠的感染免疫模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验小鼠均选用 SPF 级别雌性 C57 小鼠, 6~8 周龄(18~19 g)和 8 月龄(22~24 g)各 30 只, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2013-0016]。8 月龄小鼠在上海市公共卫生临床中心实验动物部 SPF 区域[SYXK(沪)2015-0008]继续饲养至 18~24 月龄(28~30 g)。

### 1.2 流感病毒

H7N9、H9N2 病毒经 MDCK 细胞和鸡胚培养滴定后, -80℃ 储存备用。实验均在动物生物安全三级实验室(ABSL-3)中进行。[高致病性病原微生物实验室资格证书编号为卫 BSL3-007; 中国合格评定国家认可委员会实验室认可证书编号 NO. CNAS BL0016], 研究方法经过上海市公共卫生临床中心动物伦理委员会审查(编号为:2014 伦审 K007 号)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 老年小鼠流感病毒感染模型

受试小鼠提前 24 h 转入生物安全实验室适应, 分为老年感染组、成年感染组、老年未感染对照组以及成年未感染对照组共计 4 大组, 每组小鼠 10 只。小鼠腹腔注射 100 μL 1% 戊巴比妥钠溶液全身麻醉,  $5 \times 10^6$  EID<sub>50</sub> H9N2 或  $3.5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> H7N9 流感病毒经鼻腔攻击, 记录各组小鼠感染后连续 14 d 的体重变化、生存情况。

#### 1.3.2 石蜡切片苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色

将肺组织在 10% 的福尔马林溶液, 静置固定 24 h, 包埋于石蜡中。蜡块制备为 10 μm 切片(白片)数张备用。60℃ 烤片 1 h, 依此在二甲苯, 无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇依次浸泡脱蜡 3~5 min, PBS 洗涤, 苏木精染色 5 min, 自来水洗去苏木精染液, 0.5% 伊红染液染色 1 min, 自来水洗脱, 85% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯依次脱水 3 min, 晾干, 封片。切片由奥地利 Tissue Gnostics 类流式组织定量细胞分析仪拍摄分析。

### 1.3.3 炎症-趋化因子检测

收集感染急性期内(第 1、2、3、7 天)小鼠肺内灌洗液和外周血,肺灌洗液 4℃,12 000 r/min 离心 5 min,分装上清,将外周血混入抗凝剂(3.8%枸橼酸钠溶液与全血 1:9 混合)重复混匀,3000 r/min 离心 10 min,分装上清。分别取 50 μL 肺灌洗液、血浆和梯度稀释后标准品,依次加入 50 μL 预混多因子磁珠,50 μL PE 标记的荧光染色溶液,室温避光孵育 2 h。200 r/min 离心 5 min,用试剂盒内专用的洗涤缓冲液洗 1 次,最后每管标本终体积为 100 μL。全部标本由美国 BD 公司的 LSR Fortessa 多色流式细胞仪分析获取数据。

### 1.3.4 肺内流感病毒载量测定

分别在感染急性期内(第 1、2、3、7 天)小鼠肺组织,含 10% FBS 的 1640 培养液洗涤 2 次,每只小鼠取 2 g 组织,加入 1 mL Trizol 裂解液、直径 1 mm 小钢珠 2 粒,60 Hz 超声破碎 60 s,超声 2 次,组织悬液 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清后,混入等体积的去离子水,剧烈振荡 15 s,室温静置 10 min。12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入 500 mL 异丙醇,室温静置 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,再次

弃上清,500 mL 75% 乙醇洗涤 1 次,2000 r/min 离心 5 min,再次弃上清,RNA 沉淀溶于 100 μL 的无 RNA 酶的去离子水中。RNA 定量后,取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA 后,使用 SYBR 试剂进行 Real-time PCR 扩增 H9N2、GAPDH 的序列。全部样品由德国 Eppendorf 公司的 Realplex 4 荧光定量 PCR 仪分析获取数据。扩增程序:42℃,10 min;95℃,1 min;95℃,15 s;60℃,45 s;45 个循环。

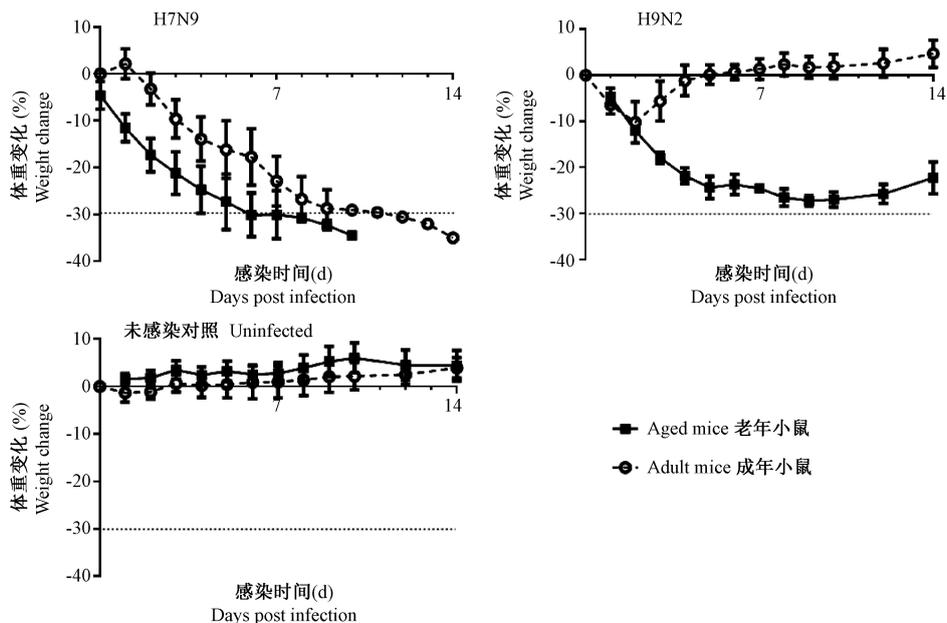
### 1.4 统计学方法

全部统计数据采用 GraphPad Prism 5.1 软件进行展示分析,数据以平均数 ± 标准误( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ )表示。两组之间数据统计学差异分析采用 *t* 检验方法,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 与 H7N9 病毒相比,H9N2 病毒感染老年小鼠体重变化和生存变化

在未感染的条件,两组小鼠体重波动在 14 d 内不超过 5% (图 1),作为环境对照可以确保研究环境是稳定安全的,影响小鼠的体重变化的单一因素是流感病毒的感染。感染 H7N9 流感病毒的老年小



注:图中黑色实线表示老年小鼠感染 H7N9 或 H9N2 流感病毒或者未感染后体重变化,图中虚线表示同等流感病毒感染条件下,成年对照小鼠体重变化。计算依据:体重变化 = (时间点体重-初始体重)/初始体重 × 100%。

图 1 老年小鼠感染流感病毒后,在急性感染期内体重变化( $n = 10$ )

Note. The black line in the figure shows the weight changes of aged mice infected with H7N9 or H9N2 influenza virus. The dotted line in the figure indicates the weight change of adult mice under the same infection. The calculation was based on weight change = (time point weight-initial weight) / initial weight × 100%.

Figure 1 Weight changes of aged mice during acute influenza infection

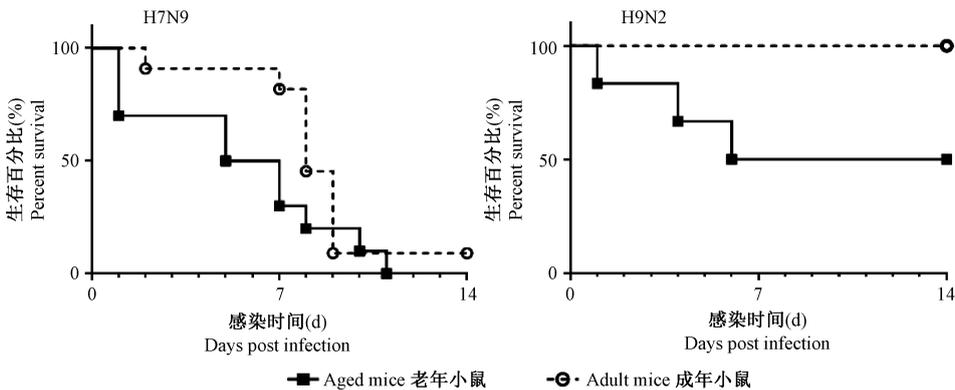
鼠体重下降速率快(图 1),感染后第 7 天体重下降超过 30% (成年对照 22%, 两组曲线无显著性差异),另一组老年小鼠感染 H9N2 流感病毒后前 7 天内迅速下降至 25% 左右,组内成年对照体重下降不超过 10%,具有显著性差异(图 1)。

进一步分析生存情况,感染 H7N9 的老年小鼠第 5 天死亡 50%,第 11 天全部死亡(图 2),而成年对照第 8 天死亡 50%,第 14 天死亡在 90%,两组小鼠的死亡速率和程度相近。H9N2 感染模型生存终点显示,老年小鼠在感染死亡 50%,成年对照无死亡(图 2)。对比老年小鼠在 H7N9 和 H9N2 流感病毒感染过程中体重变化和生存情况,最终认定老年

小鼠感染 H9N2 的流感感染模型更拟合临床感染实际情况。

## 2.2 感染 H9N2 流感的老年小鼠肺内病毒复制失控,肺内炎症表达变化

感染 H9N2 流感病毒后,老年小鼠肺内病毒复制在第 2 天达到峰值(每克肺内 RNA 病毒拷贝为  $3.2 \times 10^4$ ) (图 3),第 3 天至第 7 天,肺内的流感病毒逐渐清除。在感染后第 1、2、3 和 7 天四个时间点,老年小鼠肺的病毒复制情况均显著高于成年对照( $P < 0.001$ )。与成年对照相比,老年小鼠肺内流感病毒复制控制能力更弱。

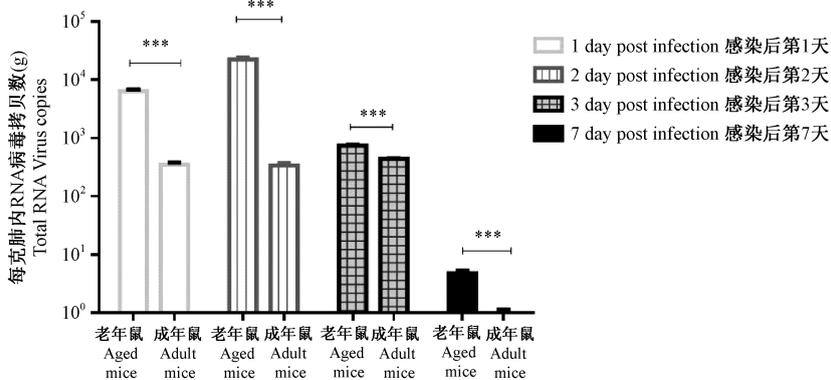


注:图中黑色实线表示老年小鼠感染 H7N9 或 H9N2 流感病毒后生存情况,虚线代表同等感染条件下成年小鼠对照。

图 2 老年小鼠流感病毒感染后,在急性感染期内生存情况 ( $n = 10$ )

Note. The black line in the figure shows the survival of aged mice infected with H7N9 or H9N2. The dotted line represents adult mice under the same infection conditions.

Figure 2 Survival of aged mice during acute influenza infection



注:图中四组 bar 依次代表小鼠感染 H9N2 病毒后第 1、2、3 和 7 天共计 4 个时间点肺内流感病毒相对载量拷贝。与成年对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 3 H9N2 感染后,小鼠肺内流感病毒复制情况 ( $n = 5$ )

Note. The four groups of bars in the figure show influenza virus in the lung at the first, second, third, and seventh days after the mice had been infected with H9N2 virus. Compared with adult mice, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 3 Influenza virus replication in the lung during H9N2 infection

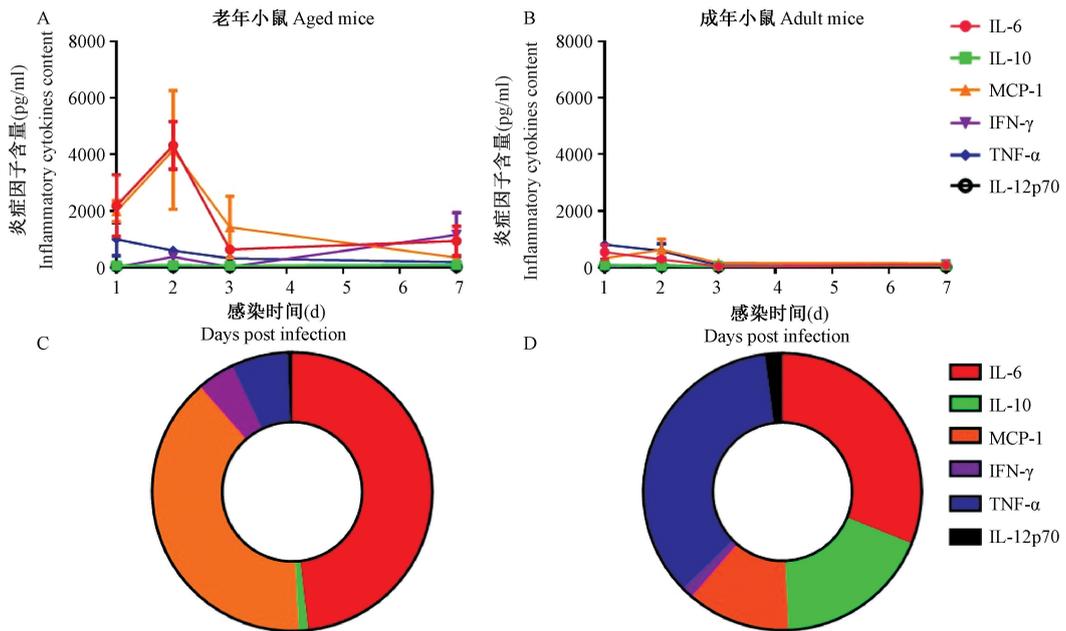
在感染后第 1、2、3 和 7 天四个时间点,收集 100  $\mu\text{L}$  肺泡灌洗液,检测具代表性的 6 类炎症-趋化因子。结果发现老年小鼠肺内炎症因子 IL-6、趋化因子 MCP-1 急剧升高,在感染后第 2 天达到峰值,均超过 4000  $\text{pg}/\text{mL}$ ,第 3 天至第 7 天炎症因子表达逐渐下降(图 4a)。成年对照肺内炎症表达相对适度,峰值均未超过 1000  $\text{pg}/\text{mL}$ ,感染后第 3 天迅速恢复至基线水平(图 4b)。将峰值点的炎症-趋化因子分类分析发现,老年小鼠肺内炎症主要以炎症因子 IL-6 和趋化因子 MCP-1 为主(图 4c),而成年小鼠肺内炎症因子包括炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及负调控因子 IL-10(图 4d)。

### 2.3 感染 H9N2 流感的老年小鼠肺内损伤情况和修复时间

在未感染的条件下,相比与成年对照,老年小鼠的肺泡增大,致密性更低。感染 H9N2 病毒第 1

天,老年小鼠肺内出现大量的炎性细胞,肺泡壁开始增厚,肺泡结构少量出现破损,在第 2、3 天,肺泡结构严重破坏,大量红细胞渗入肺间隙,大量肺泡壁增厚。感染后第 7 天,肺泡结构部分修复,尚有大量的炎性细胞和少量的红细胞滞留在肺间隙内。感染 H9N2 病毒后,成年小鼠肺内出现适量的炎症细胞浸润,但肺泡结果相对完整。感染后第 7 天,肺泡结构修复良好,肺内炎性细胞很少滞留或几乎没有(图 5a)。

根据文献中的评分体系(表 1)<sup>[9]</sup>,对两组小鼠的肺内动态病理损伤情况进行定量分析。统计结果提示老年小鼠感染 H9N2 病毒后第 1、2、3 和 7 天,肺组织损伤评分均显著高于成年对照(图 5b)。感染后第 7 天,老年小鼠肺内损伤没有完全修复,成年小鼠肺内损伤修复良好。



注:图 a、b 依次代表小鼠感染 H9N2 病毒后第 1、2、3 和 7 天共计 4 个时间点肺内灌洗液中多个炎症-趋化因子动态变化。图 c、d 代表感染后第 2 天(炎症表达峰值时间点)肺内炎症-趋化因子的组成比例。左侧图 a、c 为老年小鼠,右侧图 b、d 为成年对照,分别检测了第 0、1、2、3、7 天 5 个时间点。

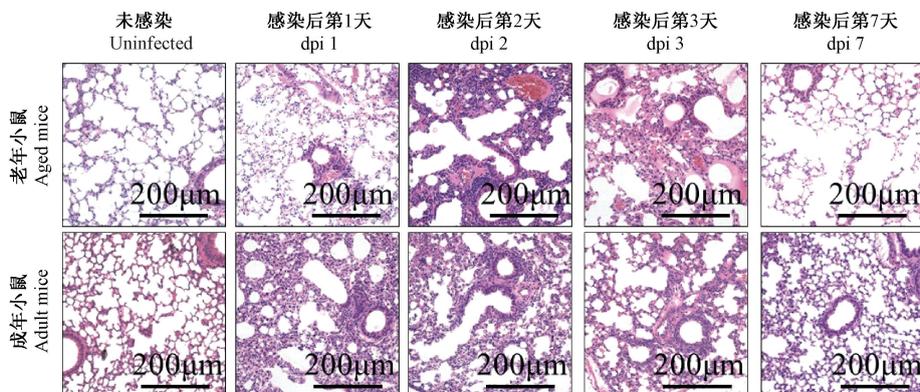
图 4 流感病毒感染后,老年小鼠肺内炎症-趋化因子动态变化和组成( $n=3$ )

Note. Figure parts a and b present the dynamic changes of multiple inflammatory factors or chemokines in the lung lavage on the first, second, third, and seventh days after infection with H9N2 virus in mice. Figure parts c and d present the proportions of inflammatory factors or chemokines in the lung during the second day after infection. Figure parts a and c are for aged mice, while b and d are for adult controls.

Figure 4 Dynamics of inflammation and chemokines during H9N2 infection

**表 1** 肺组织病理检查评分系统  
**Table 1** Scoring system for histopathological examination of lung tissue

参数 Parameter	描述 Interpretation	打分 Score
肺泡细胞数量 Inflammation	无 No inflammatory cells in alveolar	0
	0 ~ 5 个细胞 0 - 5 cells in alveolar	1
	5 ~ 10 个细胞 5 - 10 cells in alveolar	2
	> 10 个细胞 > 10 cells in alveolar	3
	无 Absent	0
肺泡壁水肿程度 Edema	肺泡壁增厚 Increased swelling of alveolar walls	1
	肺泡壁增厚; 纤维蛋白渗出 Increased swelling of alveolar walls and fibrinous	2
	大量肺泡壁增厚; 纤维蛋白渗出 Widespread swelling of alveolar walls and fibrinous	3
	无 Absent	0
红细胞渗出数量 Hemorrhage	< 5 个红细胞 < 5 erythrocytes in alveolar	0
	5 ~ 10 个红细胞 5 - 10 erythrocytes in alveolar	1
	10 ~ 15 个红细胞 10 - 15 erythrocytes in alveolar	2
	> 15 个红细胞 > 15 erythrocytes in alveolar	3
	无 Absent	0
肺泡破损程度 Atelectasis	小面积肺不张 Small atelectasis areas involved	1
	大面积肺不张; 形成 1 ~ 5 小叶 Large atelectasis areas and some lobules involved	2
	形成 > 5 个小叶 Several lobules involved	3

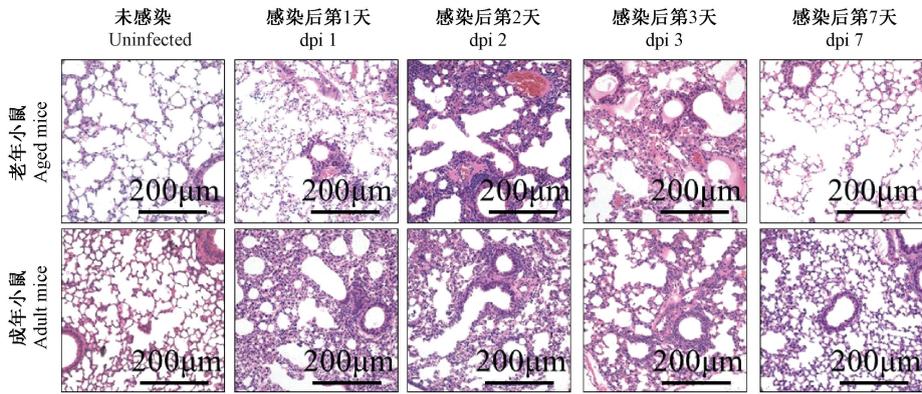


注: 上行显示的是老年小鼠在感染 H9N2 后第 0、1、2、3 和 7 天共计 5 个时间点的肺组织 HE 染色结果, 下行显示的是成年小鼠在 H9N2 感染过程中对应时间点的肺 HE 染色结果。

**图 5a** 老年小鼠感染 H9N2 后, 肺组织病理损伤动态变化 (HE 染色, ×200)

Note: The upper line 1 shows the results of the lung tissue HE staining of aged mice at 0, 1, 2, 3, and 7 days after infection with H9N2. The next line shows the results of lung HE staining at the corresponding time points in adult mice during H9N2 infection.

**Figure 5a** Dynamic pathological changes of lung tissue during H9N2 infection. HE staining



注:根据美国胸科医师协会官方杂志 *Chest* 中关于急性肺损伤模型报道,拟定肺病理损伤的评判标准分为肺泡内外炎性细胞数量,肺泡壁水肿程度,红细胞渗出数量以及肺泡破损严重程度四个方面,每一项目依据损伤的轻重程度,依次计分为 0~3 分。小鼠肺组织损伤最终得分四个项目得分之和,结果得分越高,代表肺损伤越严重。

图 5b 老年小鼠感染 H9N2,肺组织病理损伤变化评分结果( $n=3$ )

Note: According to *Chest*, the official journal of the American College of Thoracic Physicians, the model reports on acute lung injury. The criteria for evaluating lung injury were divided into the number of inflammatory cells inside and outside of the alveoli, the degree of edema in the alveolar wall, the number of erythrocytes, and the severity of alveolar damage. Each item was graded from 0 to 3 according to the severity of injury. Lung tissue injury in mice was defined as the total score of four items. The higher the score, the worse the lung injury.

Figure 5b Score of pathological changes in the lung during H9N2 infection

### 3 讨论

部分研究选用基因组 DNA 片段错误编辑产生的基因型早衰小鼠<sup>[10]</sup>或化学试剂如 D-半乳糖处理产生的诱导型早衰小鼠模型<sup>[11]</sup>,这类模型小鼠的生理学特征是出生后数周内,机体表现出脏器老化、免疫衰老等的老年症状。这些人工促衰老模型,会出现部分共性衰老特征,然而与生理性衰老模型具有显著的区别<sup>[12]</sup>。生理性衰老的宿主具有胸腺输出能力不足、体液抗体分泌能力下调以及免疫细胞表面受体多样性缩减的免疫衰老的特征<sup>[13]</sup>,如果选用人衰老小鼠作为研究对象,不能科学地模拟老年宿主感染现状。因此,本课题组选用的生理性衰老,月龄为国际标准的 18~24 月<sup>[14]</sup>,一直生活于 SPF 级环境的近交系 C57 小鼠。该模型小鼠的主要免疫学特点是体内不含特定病原体,同时免疫性质高度一致,适合免疫学群体的研究和评价。本课题组选用 C57 小鼠感染流感病毒,建立合适的病毒感染模型,主要评价感染后免疫应答,有助于解析老年宿主体内病理学、免疫学相关机制。

从病原学角度分析,H7N9 流感病毒属于 2013 年中国东部出现的新发的高致病性禽流感病毒,其中 6/8 的基因组片段重组来源于东亚地区家禽、水

鸟类中普遍潜伏的野生型低致病性 H9N2 禽流感病毒<sup>[15]</sup>。H7N9<sup>[16]</sup>、H9N2<sup>[17]</sup> 病毒的攻毒剂量标准均参照前期成年小鼠感染模型中同等剂量。高致病性 H7N9 流感病毒感染后,两组不同月龄的小鼠体重下降速率和死亡情况的差异较小,与临床感染情况不符合。本课题组尝试梯度稀释 10 倍,发现老年小鼠感染后,第 7 天开始出现死亡,第 14 天组内小鼠全部死亡,体重下降速率和生存曲线类似,病理症状出现由感染后第 1 天,调整至第 7 天(数据未显示)。老年小鼠感染 H9N2 流感病毒后 7 天内,体重下降 20% 以上,死亡达到 50%,与 6~8 周成年 C57 小鼠有显著区别。因此,本课题组认为 H9N2 流感病毒更适合老年小鼠流感病毒感染模型的原型。

2013 年收治入院的 H7N9 流感病毒感染者临床研究发现,65 周岁以上的老年人占比为 72.2% (13/18),死亡率为 22.2% (4/18),均高于成年人的住院率 27.8% 和死亡率 11.1%<sup>[18]</sup>。年龄和恢复时间进行线性回归统计,结果显示随着年龄越大,感染恢复(住院天数)时间越长,呈显著正相关回归关系( $P=0.0194$ )。另外在感染者血浆炎症动力学分析发现<sup>[19]</sup>,老年感染者外周血中炎症因子 IL-6 ( $> 80 \text{ pg/mL}$ ),趋化因子 IL-8 ( $> 60 \text{ pg/mL}$ )的分泌水平显著高于成年对照( $P=0.003$ , $P=0.03$ ),绝对数

值超过基线水平的 10 倍以上。肺组织病理切片同时清晰提示了 H7N9 老年感染者肺泡细胞壁增厚,肺泡间隙进一步被压缩,更多的炎性淋巴细胞趋化至病灶,肺损伤程度甚于成年。从模型可以看出老年小鼠组的体重下降速率、生存率,前 7 天肺内病毒控制情况,肺灌洗液中炎症因子的表达均显著高于成年对照,更符合临床实际情况。

重症流感的老年感染者临床突出表现为发热、咳嗽、呼吸困难以及上呼吸道感染等,早期诊断主要评价呼吸频率、心率增快,谷丙转氨酶、胆红素为指标的肝功能异常,血小板计数降低等常规生化指标。但是由于老年感染者的临床表现与炎症指标相对不特异,现有临床指标正常值范围均基于健康成年人界定的。本课题组通过 18 ~ 24 月龄的老年 C57 小鼠 H9N2 流感病毒感染模型,在感染期重现了老年宿主发病率、死亡率更高的临床现象。在急性感染期,发现老年宿主肺清除流感病毒的能力更弱,肺内炎症因子 IL-6、趋化因子 MCP-1 更高水平,感染后肺组织损伤程度更为严重。因此,本课题组成功建立老年小鼠感染免疫模型,以肺内炎症因子 IL-6 和趋化因子 MCP-1 为特异性早期免疫指标评估老年宿主感染病毒后肺内病毒清除情况以及肺脏损伤与修复情况。

#### 参考文献:

[ 1 ] Rolles MA, Foppa IM, Garg S, et al. Annual estimates of the burden of seasonal influenza in the United States; A tool for strengthening influenza surveillance and preparedness [ J ]. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018, 12(1): 132 - 137.

[ 2 ] Jefferson T, Di Pietrantonj C, Al-Ansary la, et al. Vaccines for preventing influenza in the elderly [ J ]. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018, 17 (2): 139 - 226.

[ 3 ] Corrales-Medina VF, Alvarez KN, Weissfeld LA, et al. Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease [ J ]. *Jama*. 2015, 313(3): 264 - 274.

[ 4 ] Mcelhaney JE, Kuchel GA, Zhou X, et al. T Cell immunity to influenza in older adults: a pathophysiological framework for development of more effective vaccines [ J ]. *Front Immunol*. 2016, 41(7): 1 - 11.

[ 5 ] Zoster H. Functional decline and herpes zoster in older people: an interplay of multiple factors [ J ]. *Aging Clin Exp Res*. 2015, 27(6): 757 - 765.

[ 6 ] To KK, Chan JF, Yuen KY. Viral lung infections;

epidemiology, virology, clinical features, and management of avian influenza A (H7N9) [ J ]. *Curr Opin Pulm Med*. 2014, 20 (3): 225 - 232.

[ 7 ] Takamatsu K, Marumo S, Fukui M, et al. Safety and efficacy of anti-influenza drugs, intravenous peramivir against influenza virus infection in elderly patients with underlying disease [ J ]. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017, 50(4): 541 - 544.

[ 8 ] Weinberger B. Vaccines for the elderly: current use and future challenges [ J ]. *Immun Ageing*. 2018, 3(15): 1 - 8.

[ 9 ] Torre D, Minoja G, Maraggia D, et al. Effect of recombinant IL-1 beta and recombinant gamma interferon on septic acute lung injury in mice [ J ]. *Chest*. 1994, 105(4): 1241 - 1245.

[ 10 ] Carrero D, Soria-Valles C, Lopez-Otin C. Hallmarks of progeroid syndromes; lessons from mice and reprogrammed cells [ J ]. *Dis Model Mech*. 2016, 9(7): 719 - 735.

[ 11 ] Zhen YZ, Lin YJ, Li KJ, et al. Effects of rhein lysinate on D-galactose-induced aging mice [ J ]. *Exp Ther Med*. 2016, 11 (1): 303 - 308.

[ 12 ] de Renty C, Ellis NA. Bloom's syndrome: Why not premature aging?: A comparison of the BLM and WRN helicases [ J ]. *Ageing Res Rev*. 2017, 33: 36 - 51.

[ 13 ] Jose SS, Bendickova K, Kepak T, et al. Chronic inflammation in immune aging; role of pattern recognition receptor crosstalk with the telomere complex? [ J ]. *Front Immunol*. 2017, 1078(8): 1 - 10.

[ 14 ] Martinez-Jimenez CP, Eling N, Chen HC, et al. Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation [ J ]. *Science*. 2017, 355(6332): 1433 - 1436.

[ 15 ] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [ J ]. *N Engl J Med*. 2013, 368(20): 1888 - 1897.

[ 16 ] Wang X, Fu W, Yuan S, et al. Both haemagglutinin-specific antibody and T cell responses induced by a chimpanzee adenoviral vaccine confer protection against influenza H7N9 viral challenge [ J ]. *Sci Rep*. 2017, 7(1): 1 - 11.

[ 17 ] Yan L, Liu Q, Su X, et al. Pathogenicity of reassortant H9 influenza viruses with different NA genes in mice and chickens [ J ]. *Vet Res*. 2016, 47(1): 1 - 6.

[ 18 ] Wang Z, Zhang A, Wan Y, et al. Early hypercytokinemia is associated with interferon-induced transmembrane protein-3 dysfunction and predictive of fatal H7N9 infection [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111(2): 769 - 774.

[ 19 ] Zhang A, Huang Y, Tian D, et al. Kinetics of serological responses in influenza A (H7N9)-infected patients correlate with clinical outcome in China, 2013 [ J ]. *Euro Surveill*. 2013, 18 (50): 1 - 8.