

炎症因子风暴对老年小鼠感染免疫应答的影响

袁松华¹, 何涌泉¹, 徐建青^{1,2}, 张晓燕^{1,2*}

(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 高致病性禽流感感染小鼠后, 肺内检测出过量表达的炎症因子, 即炎症因子风暴。老年感染者体内更加常见高水平的炎症应答。本文探讨了炎症风暴对老年宿主肺内抗感染免疫应答的影响。**方法** 采用老年小鼠(18~24月龄)以流感病毒 H9N2 攻毒, 建立了老年小鼠感染模型。对照组为 H9N2 感染的成年小鼠(6~8周)。分别定量分析了 H9N2 感染的老年小鼠肺原位和外周血中炎症因子的表达, 并在感染的急性期内, 收集的小鼠肺组织, 分别制备成切片和消化为单细胞悬液。其中, 肺组织切片用于免疫组化原位定量分析免疫细胞分布; 从细胞悬液中分选出 T 细胞, 进行染色计数。**结果** 与成年小鼠相比, 老年小鼠感染 H9N2 病毒后, 体重下降显著, 生存率仅为 50%。但是, 与成年小鼠感染后肺组织很少检出炎症因子相比, 老年小鼠肺内出现炎症因子风暴, 炎症因子 IL-6 和趋化因子 MCP-1 异常高表达, 且在感染后第 2 天达到峰值(超过 4000 pg/mL), 是成年对照小鼠的 100~1000 倍。老年小鼠感染 H9N2 病毒后, 与成年对照相比, 其肺巨噬细胞应答更低, 肺中性粒细胞的迁徙能力更弱, 感染后第 3~7 天内更多地滞留在肺内。此外, 老年小鼠感染 H9N2 后第 7 天, 肺内 CD8⁺ T 细胞数量显著下降, CD4⁺ T 细胞数量与比例则维持正常。**结论** 老年小鼠感染 H9N2 病毒后肺组织出现炎症因子风暴。参与抗感染免疫应答的细胞种类虽然与成年小鼠无显著差异, 但是免疫细胞的迁徙能力降低, 参与应答的获得性细胞免疫强度也显著降低。

【关键词】 老年小鼠; 免疫应答; 炎症因子风暴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.001

Effect of a cytokine storm on immune responses against viral infection in aged mice

YUAN Songhua¹, HE Yongquan¹, XU Jianqing^{1,2}, ZHANG Xiaoyan^{1,2*}

(1. Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China;

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

【Abstract】 Objective A cytokine storm occurs during infection by highly pathogenic viruses such as avian influenza virus. Higher levels of inflammatory responses are more commonly observed in the elderly, associated with worse clinical outcomes. In this study, we investigated the effect of inflammatory responses on the immune response against viral infection in the lung of aged mice. **Methods** Aged mice (18–24 months old) were infected with influenza virus H9N2 to establish an infection model. Adult mice (6–8 weeks old) were used as the control. After infection, we quantitatively analyzed the expression of inflammatory cytokines in the lung and periphery blood. During the acute infection, murine lung tissues were collected and subjected to in situ analysis of the distribution of recruited immune cells by

【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, 专业: 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@shphc.org.cn

immunohistochemistry, and pulmonary T cells were counted among digested single cells of lung tissue. **Results** Compared with the adult mice infected with H9N2, aged mice showed significant weight loss and a low survival rate of 50%. Inflammatory cytokines were rarely detected in the infected adult mice, but were highly detected in the lungs of aged mice. Among them, IL-6 and chemokine MCP-1 were significantly high, which reached peaks of more than 4000 pg/mL and were 100 – 1000 times higher than those in the adult control mice at day 2 post-infection. Additionally, the pulmonary macrophage response and migration of neutrophils were weaker. On day 7 post-infection, the number of CD8⁺ T cells decreased significantly in the aged lung, while the number and proportion of CD4⁺ T cells remained normal. **Conclusions** An inflammatory cytokine storm is found in the lung of aged mice infected with low pathogenic influenza virus H9N2. Compared with adult mice, the migration ability of immune cells is decreased, and the acquired cellular immunity intensity is reduced significantly.

[Keywords] aged mice; immune response; cytokine storm

高致病性流感病毒 H5N1^[1]、H7N9^[2]感染研究均提示重症流感样感染的重要特征是宿主体内免疫应答失调,出现肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白介素 6(interleukin 6, IL-6)等炎症因子以及白介素 8(interleukin 8, IL-8), C-C 型趋化因子配体 (C-C chemokine ligand 2, CCL2) 等趋化因子过度表达,免疫学上定义为炎症因子风暴^[3]。出现炎症风暴的宿主临床症状表现为持续发热,下调淋巴细胞,出现重症肺炎、肺重症损伤等严重的呼吸道症状,是临床转归不佳的重要因素^[4]。从免疫机制来说,炎症风暴是调节免疫应答的关键因素^[5],主要诱发组织局部炎症,直接损伤肺毛细血管粘膜,促使肺泡水肿和表面活性蛋白失活。失控的炎症风暴会进一步弥散炎症和肺泡结构的破损造成机体肺血氧不足,最终发展为急性呼吸窘迫症 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[6-7]。

现有研究发现炎症风暴尽管不是呼吸道病毒感染特异性的,但与宿主感染病毒后高致死率显著正相关^[8]。团队前期研究发现老年感染者炎症应答过度,以 IL-6, IL-8 为主要的炎症、趋化因子高表达,肺内灌洗液 (bronchoalveolar lavage, BAL) 内的炎症因子浓度近乎外周 1000 倍以上^[9]。另外通过老年感染者肺组织病理染色发现,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,造成多处不可逆损伤。成年小鼠的流感病毒 (H1N1) 感染模型已经证实^[10],流感病毒感染可有效诱发 I 型干扰素的迅速上调,炎症因子前体的分泌进一步刺激了其他炎性因子表达上调,继而激活树突状细胞、巨噬细胞、上皮细胞等。多种固有免疫细胞迅速被动员,参与抗病毒的炎症应答,级联放大炎症应答。在流感病毒感染过程中,炎症风暴如何影响老年感染者肺内免疫细胞应答的机制

尚且没有得到解析。因此,本课题组拟利用老年小鼠感染 H9N2 病毒的免疫模型,重现肺内炎症风暴,从组织学和细胞学角度解析,对肺巨噬细胞、肺中性粒细胞等主要免疫细胞应答的影响,为回答流感病毒感染引发的炎症风暴如何影响老年宿主临床转归的科学问题提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 流感病毒

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)。

1.2 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 月龄小鼠 (22 ~ 24 g) (每种小鼠各 30 只) 均购于上海西普尔-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)。

1.3 实验方法

1.3.1 老年小鼠流感病毒感染方案

研究对象: 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 μ L 1% 戊巴比妥钠溶液全身麻醉, 5×10^6 EID₅₀ H9N2 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 石蜡切片免疫组化染色

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 $^{\circ}\text{C}$ 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,在柠檬酸盐缓冲液沸水浴中抗原修复 5 min, PBS 溶液洗涤 3 次,血清室温封闭 20 min,加入相应的一抗 anti-Macrophage (1:100 使用,克隆号:11H3,货号:GTX53120)或 Anti-Neutrophil Antibody (1:100 使用,克隆号:NIMP-R14,货号:LS-C139871),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,PBS 溶液洗去一抗后,室温加入二抗孵育(HRP 抗体)30 min,PBS 溶液再次洗去二抗后,DAB 溶液染色 3~10 min,显微镜下观察终止染色。自来水冲洗切片后,苏木素溶液复染 30 s,自来水再次洗去染液,晾干切片,封片。全部切片由奥地利 TissueGnostics 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 $^{\circ}\text{C}$,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,每管终体积为 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 T 淋巴细胞染色

收集感染后第 7 天的小鼠肺组织,含 10% FBS 的 1640 培养液洗涤 2 次,每只小鼠取 2 g 组织,无菌眼科剪处理成小于 1 mm^3 组织小块。消化液(含 1% I 型胶原酶和 0.5% 的 DNase)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内处理 3~5 h,组织完全消散。将细胞悬液经 100 $\mu\text{mol/L}$ 无菌滤网获得最终单细胞悬液。每个标本选取 10^6 单细胞悬液,anti-CD4 (2D4)、anti-CD8 (11C) 室温避光染色 10 min,含 10% FBS 的 PBS 染色缓冲液洗涤 1 次,500 r/min 离心 5 min,弃去上清,每管终体积为 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。

1.4 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,数据表现形式为平均值 $\pm$ 标准误

($\bar{x} \pm s_x$)。两组之间数据统计学差异分析采用 Student *t* 检验方法,相关性分析选用非参数 Spearman 方法,概率统计采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

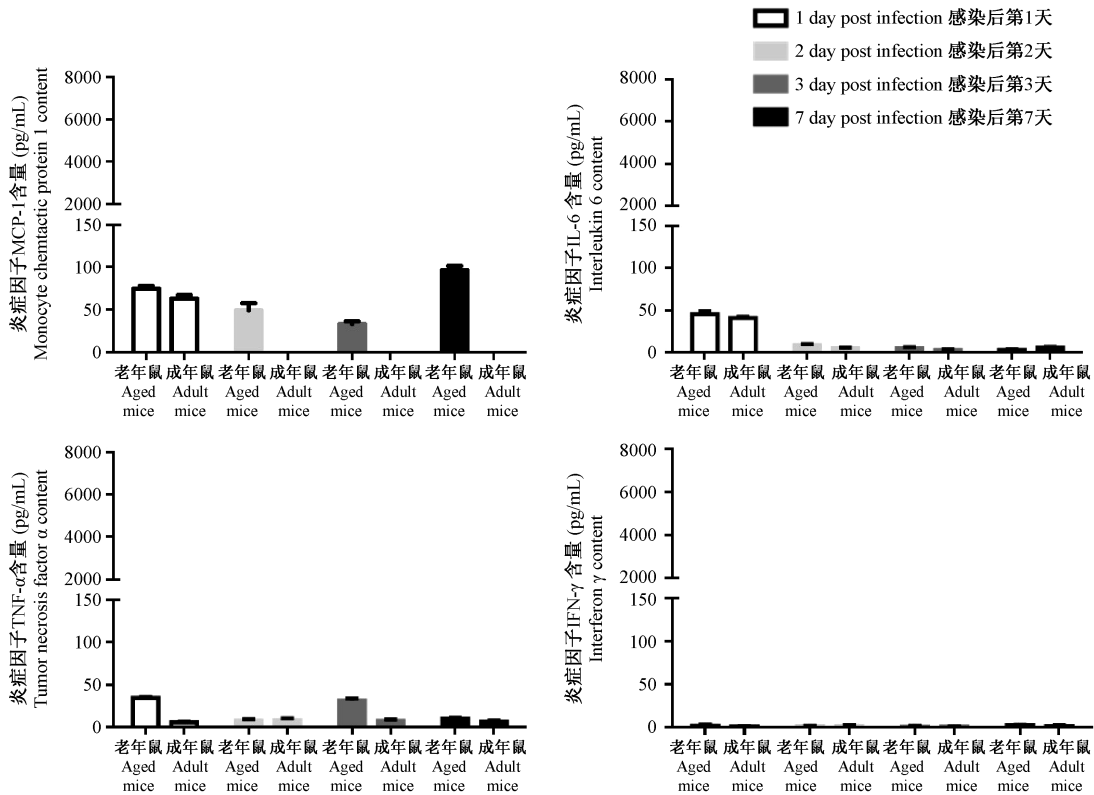
2 结果

2.1 感染 H9N2 病毒后,老年小鼠出现炎症风暴,且集中在肺内局部

收集小鼠感染 H9N2 病毒后第 1、2、3、7 天共计四个时间点的外周血。图 1a 定量检测了血浆中炎症因子(IL-6, TNF- α)趋化因子 MCP-1 和干扰素 IFN- γ 在血清中表达,除 MCP-1 表达量为 100 pg/mL,其余因子均低于 50 pg/mL。流感病毒 H9N2 是经鼻腔由呼吸道入侵宿主,因此进一步收集了收集小鼠感染 H9N2 病毒后第 1、2、3、7 天共计四个时间点的肺泡灌洗液。动态分析结果显示老年感染鼠肺内的炎症因子 IL-6 和趋化因子 MCP-1 异常高表达,在感染后第 2 天达到峰值,超过 4000 pg/mL,是成年对照峰值表达量的 100~1000 倍(图 1b)。另外,在肺内,不管是老年小鼠还是成年对照,均表达相近水平的炎症因子 TNF- α (峰值约 1000 pg/mL),且动态变化趋势也一致,是两组不同月龄小鼠感染 H9N2 病毒后共性的炎症应答。本课题组还发现干扰素 IFN- γ 在老年小鼠感染后第 7 天内表达上调,而成年对照则无应答。

2.2 感染 H9N2 病毒后,老年小鼠肺巨噬细胞应答不足,中性粒细胞应答滞后

利用免疫组化技术分析了急性感染期内(第 1、2、3 和 7 天)肺巨噬细胞的动态变化,带有蓝色细胞核灰褐色小圆型细胞样结构被判定为阳性细胞。切片应用组织类流式定量细胞分析仪(奥地利, Tissue Gnostics 公司)进行定量分析,测定每个视野下(图 2a,图 3a)免疫阳性细胞密度(单位为每平方毫米的细胞计数)。统计结果显示发现 H9N2 感染后,老年小鼠的肺内巨噬细胞(图 2b)在感染后第 1 天迅速趋化,增殖,但是显著弱于成年小鼠。感染后时间动态变化提示,肺内巨噬细胞在感染后第 1 天达到峰值,第 2、3 和 7 天逐渐减少。同时观察免疫组化染色肺内原位中性粒细胞的应答情况。小鼠感染 H9N2 病毒后,肺内中性粒细胞(图 3b)在第 1、2 天增加,第 2 天达到峰值,然后在感染后第 3 至第 7 天逐渐减少。与巨噬细胞不同的是,老年小鼠在感染第 1、2 天显著低于成年对照,而在感染后第



注:收集小鼠感染 H9N2 病毒后第 1,2,3,7 天共计四个时间点的外周血。检测血浆中炎症因子 (IL-6, TNF-α) 趋化因子 MCP-1 和干扰素 IFN-γ。

图 1a 老年小鼠感染 H9N2 病毒后,外周血中炎症-趋化因子的表达情况

Note. Peripheral blood of mice infected with H9N2 virus was collected for the first 1, 2, 3, and 7 days. Chemokines (IL-6 and TNF-α), MCP-1, and IFN-γ were detected in plasma.

Figure 1a Expression of inflammatory cytokines in the periphery blood of aged mice infected with H9N2 virus

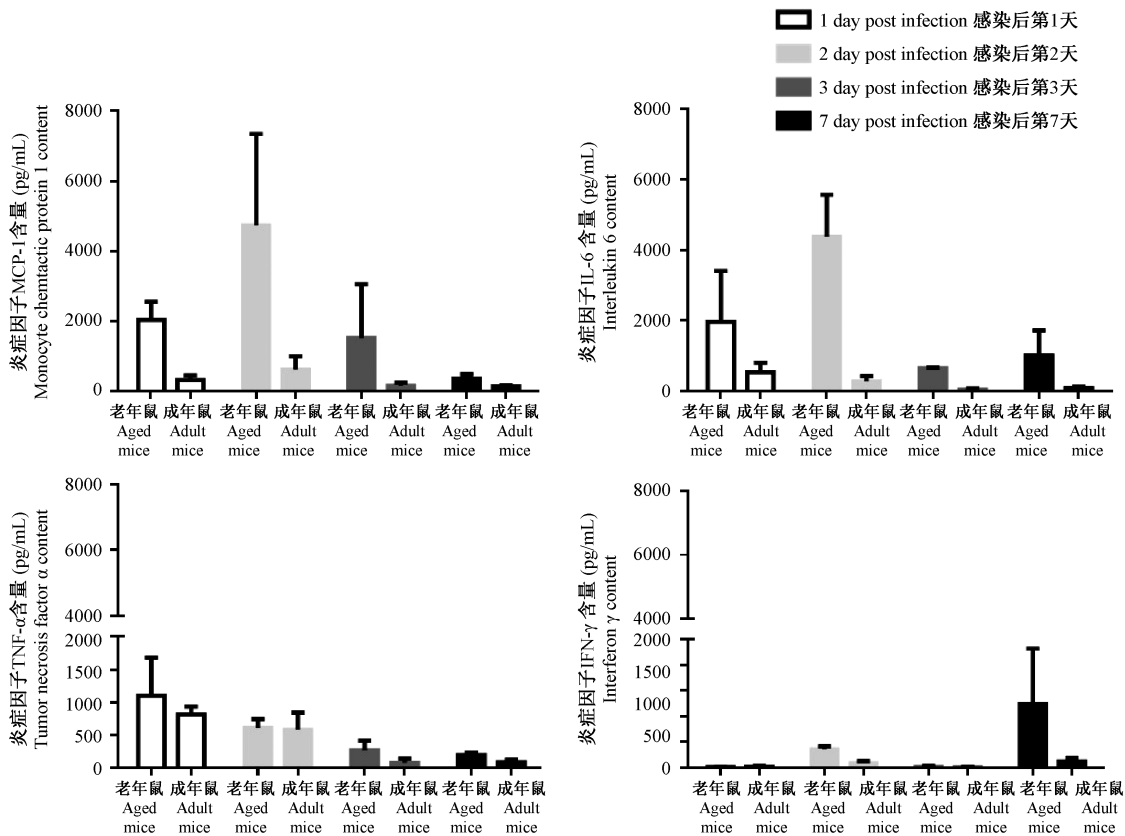
3 至第 7 天却显著高于成年对照。这样的实验现象提示,与成年对照相比,感染 H9N2 病毒的老年小鼠肺巨噬细胞应答不足,而肺中性粒细胞感染急性早期应答同样不足,但在急性后期却在肺内大量滞留。

2.3 感染 H9N2 病毒后第 7 天,老年小鼠肺内 CD8⁺T 淋巴细胞数量显著减少。

在感染后第 7 天收集小鼠肺脏,肺脏在 I 型胶原酶消化液中解离成单个细胞悬液,对于肺内总细胞进行计数。分别使用 StemCell™ CD4 或 CD8 阴性磁珠分选试剂盒分选出对应的 T 淋巴细胞,分别进行计数。取其中部分细胞分别在表面染色标记 CD4-FITC/CD8-PE,结果显示阳性率大于 95% (数据未展示)。统计结果(图 4)显示未感染条件下,与成年对照相比,老年小鼠肺内 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞的数量和比例无显著性差异。感染 H9N2 病毒后第 7 天,CD4⁺T 淋巴细胞的数量和比例以及 CD8⁺T 淋巴细胞的比例则依然维持不变,而老年小鼠肺内 CD8⁺T 淋巴细胞的数量则显著降低。

3 讨论

本团队前期临床研究发现 H7N9 的老年感染者主要过量上调炎症因子 IL-6、趋化因子 IL-8,另一种重要的炎症因子 TNF-α 等却没有发现其表达上调。重症感染后,免疫稳态的失衡,宿主体内产生炎症风暴^[9]。但 IL-6、IL-8 的分泌占据大部分的比例,是否抑制了其他炎症通路的活化或是其他通路活化的负反馈,促进 IL-6、IL-8 因子的高表达。IL-10 是一种通常意义的负向调控因子,主要功能是调节免疫平衡,防止免疫应答过度活化^[11]。临床研究中三名危重病人肺内灌洗液中检出很少的 IL-10 因子表达,肺内炎症因子选择性暴增的机制目前没有得到解析。老年小鼠感染 H9N2 病毒后,炎症因子 IL-6、趋化因子 MCP-1 同样在小鼠肺内过量表达,老年小鼠肺内炎症风暴主要以炎症因子 IL-6 和趋化因子 MCP-1 为主,峰值表达超过 4000 pg/mL,而成年小鼠肺内炎症因子 TNF-α、IL-6 表达上调,峰值表达



注:收集小鼠感染 H9N2 病毒后第 1,2,3,7 天共计四个时间点的肺灌洗液。检测灌洗液 (BAL) 中炎症因子 (IL-6, TNF-α) 趋化因子 MCP-1 和干扰素 IFN-γ。

图 1b 老年小鼠感染 H9N2 病毒后,肺内炎症-趋化因子的表达情况

Note. Lung lavage fluid of mice infected with the H9N2 virus was collected on the first 1, 2, 3, and 7 days. Chemokines (IL-6 and TNF-α), MCP-1, and IFN-γ were detected in BAL.

Figure 1b Expression of inflammatory cytokines in the lung of aged mice infected with H9N2 virus

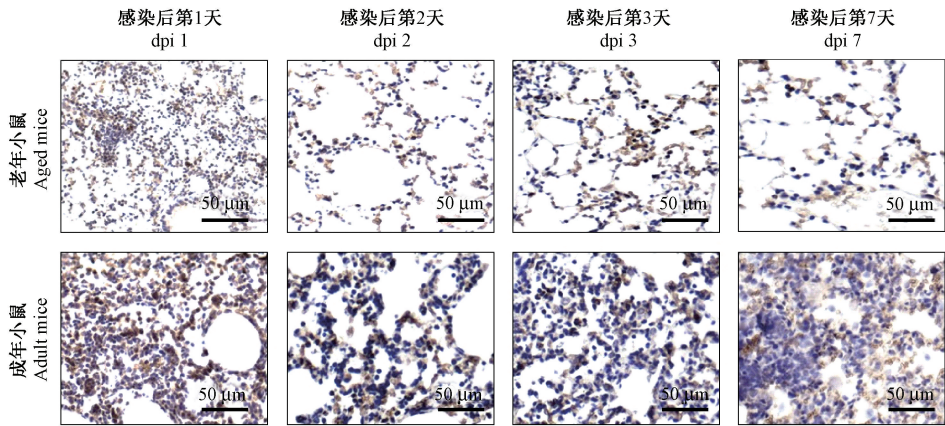


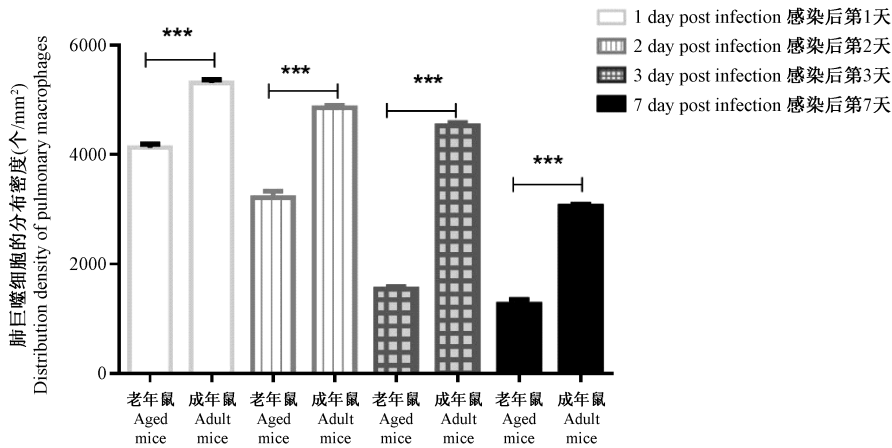
图 2a 老年小鼠感染 H9N2 病毒后,肺内巨噬细胞的动态变化 (×200)

Figure 2a Dynamic changes in alveolar macrophages of the aged mice infected with H9N2 virus

500 ~ 1000 pg/mL。有意思的是,本课题组在感染后症状轻微的成年小鼠肺内灌洗液中检测出负调控因子 IL-10 上调 (数据未显示)。老年小鼠感染 H9N2 后,与成年被感染小鼠相比,体重下降显著,

死亡率仅为 50%。因此,高水平的炎症因子风暴对应了重症的临床转归情况,与本团队 2013 年度 H7N9 感染者临床现象相符。

肺巨噬细胞是一群定居在肺组织内固有免疫



注:组织类流式定量细胞分析仪(奥地利,Tissue Gnostics 公司)进行图像定量分析,每只小鼠肺组织切片标本随机选取 3 张,每张切片随机选取 10 个高倍镜视野,测定每个视野下免疫阳性细胞密度(单位为每平方毫米的细胞计数)。与成年对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 2b 老年小鼠感染 H9N2 病毒后,肺内巨噬细胞的定量分析

Note. Quantitative analysis was performed with a tissue flow quantitative cell analyzer (Austrian Tissue Gnostics). Three specimens of mouse lung tissue biopsies were randomly selected for observation at $\times 10$ magnification. Positive cell density (cell count per mm^2) was determined in each field. Compared with adult mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 2b Quantitative analysis of alveolar macrophages in aged mice infected with H9N2 virus

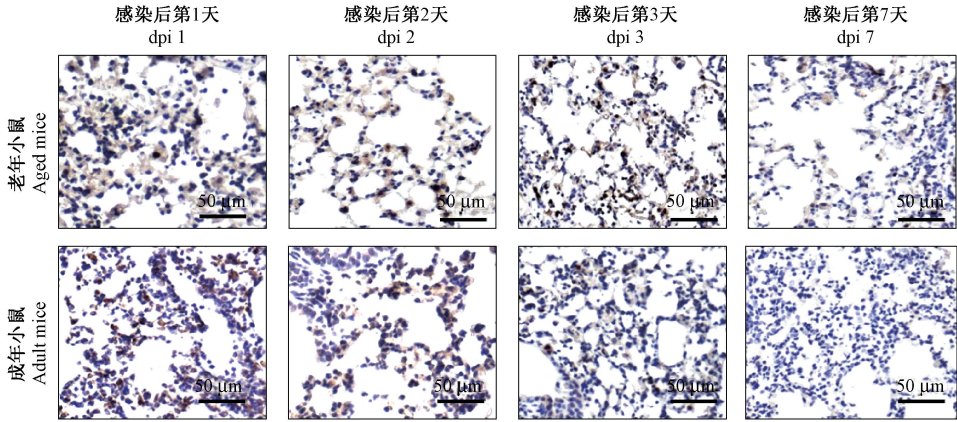
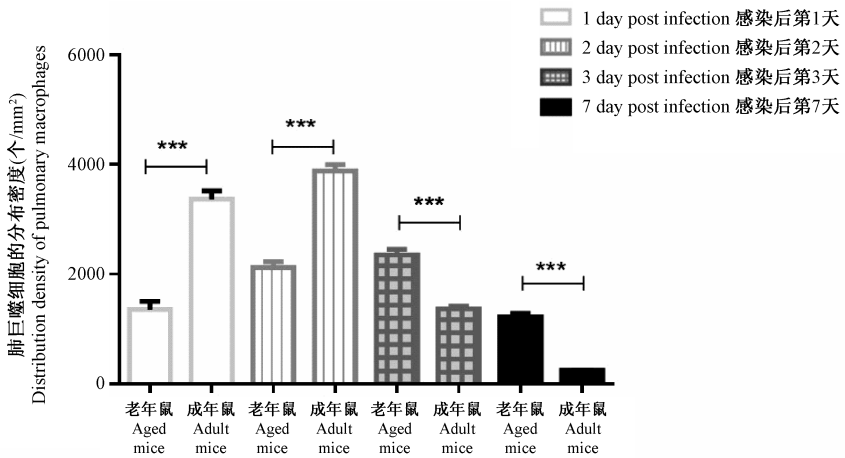


图 3a 老年小鼠感染 H9N2 病毒后,肺内中心粒细胞的动态变化($\times 200$)

Figure 3a Dynamic changes of pulmonary neutrophils in the aged mice infected with H9N2 virus

细胞,对于维持肺组织免疫稳态具有关键作用^[12]。与其他类型巨噬细胞明显不同,肺巨噬细胞在原位自我更新^[13],而不是从迁徙来的单核细胞分化更新^[14]。肺巨噬细胞主要参与静息状态下肺组织的损伤修复、宿主抵御系统性抗病毒或细菌的感染。小鼠感染 H9N2 流感病毒后,肺巨噬细胞结合出现凋亡的靶细胞且降解处理,其分子机制已经在体外细胞模型中报道,肺巨噬细胞表面高水平表达的 CD204 分子,是重要的肺内清除功能受体^[15]。另外有报道发现衰老的肺巨噬细胞表面的 CD204 分子表达下降,与清除凋亡细胞功能的下降呈正相关^[16]。本课题组的研究发现老年小鼠感染 H9N2

病毒后,肺巨噬细胞上调显著低于成年对照。呼吸道感染过程中,肺巨噬细胞主要是通过分泌 I 型干扰素招募炎症单核细胞^[17]。肺巨噬细胞不是唯一的肺内具有免疫吞噬功能的固有免疫细胞,树突状细胞以及被招募的单核淋巴细胞同样承担一系列的免疫吞噬能力。相对于年轻对照,感染 H9N2 病毒的老年小鼠肺内中性粒细胞的滞留更加严重。大量的中性粒细胞的富集在肺组织局部,进一步恶化了肺内炎性环境,造成更严重的肺损伤。肺内的高炎性环境招募中性粒细胞的浸润,大量的中性粒细胞在肺内长时间滞留,又进一步上调炎症因子,最终造成肺损伤。因此,老年小鼠感染 H9N2

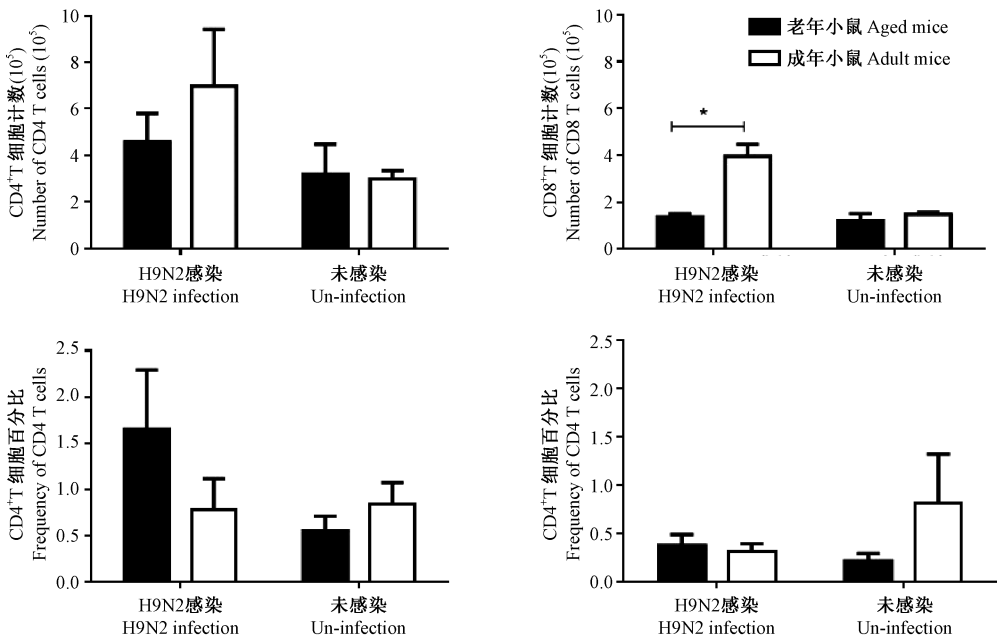


注:组织类流式定量细胞分析仪(奥地利,Tissue Gnostics 公司)进行图像定量分析,每只小鼠肺组织切片标本随机选取 3 张,每张切片随机选取 10 个高倍镜视野,测定每个视野下免疫阳性细胞密度(单位为每平方毫米的细胞计数)。与成年对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3b 老年小鼠感染 H9N2 病毒后,肺内中性粒细胞的定量分析(×200)

Note. Quantitative analysis was performed with a tissue flow quantitative cell analyzer. Three specimens of mouse lung tissue biopsies were randomly selected for observation at ×10 magnification. Positive cell density (cell count per mm²) was determined in each field. Compared with the adult mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 3b Quantitative analysis of pulmonary neutrophils in the aged mice infected with H9N2 virus



注:收集小鼠感染 H9N2 病毒后第 7 天的肺组织,消化成单细胞,计数肺内总细胞数量。阴性分选肺内 CD4⁺T 淋巴细胞和 CD8⁺T 淋巴细胞。分别计数后,计算 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞占肺内总细胞的比例。与成年对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 老年小鼠感染 H9N2 病毒后第 7 天,肺内 T 淋巴细胞的数量和比例

Note. Lung tissue of mice infected with H9N2 virus was collected at day 7, digested into single cells, and the total number of cells was counted. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were negatively sorted. After counting, the ratio of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes to the total cells in the lung was calculated. Compared with adult mice, * $P < 0.05$ 。

Figure 4 Number and proportion of pulmonary T cells in the aged mice at day 7 post-infection

病毒后,肺内参与抗感染的固有免疫应答细胞种类没有发生改变,但值得注意的是,巨噬细胞在肺内的数量出现显著下降,中性粒细胞的迁徙能力同样发生显著减弱。

在流感病毒感染免疫过程中,相对于固有免疫应答,获得性免疫应答是抗原特异的,由专职的抗原递呈细胞进行抗原处理加工,因此免疫应答的发生时相要晚于非特异应答。在感染免疫应答期,感染 H9N2 的老年小鼠肺内辅助性 T 细胞的比例和数量,与成年小鼠相当。但有报道指出在致死性流感模型中,老年小鼠肺间质中定居的 CD69⁺ CD8⁺ T 细胞数量显著下降^[18],这群特殊的细胞发现具有长时间生存能力,同时是抗流感病毒感染的重要 T 细胞亚群。本课题组研究同样确认了重症感染流感病毒的老年小鼠肺内 CD8⁺ T 细胞的显著减少,证实感染后特异性细胞杀伤应答的强度显著降低,但具体属于哪类亚群还需要进一步确认。

与其他年龄对照组相比,老年人群在重症流感感染过程中有合并下呼吸道感染的风险。临床上肺部听诊、C 反应蛋白以及胸部射线检查均提示老年流感重症感染者具有较高的肺部感染发生率。本课题组前期建立的老年小鼠感染流感免疫模型已经确认老年宿主感染流感病毒后预后不佳。感染流感病毒后,老年小鼠肺内炎症因子的异常高水平上调,导致肺巨噬细胞的应答下降,中性粒细胞迁徙能力减弱,过量表达的炎症进一步下调了老年小鼠肺内 CD8⁺ T 细胞,削弱了抗感染的细胞毒杀伤应答。因此,高水平的炎症风暴直接或间接导致老年小鼠出现重症的临床转归,但肺内炎症风暴如何调控肺内固有免疫细胞应答的分子学相关机制还有待于后续的研究。

参考文献:

- [1] Zeng H, Belser JA, Goldsmith CS, et al. A (H7N9) virus results in early induction of proinflammatory cytokine responses in both human lung epithelial and endothelial cells and shows increased human adaptation compared with avian H5N1 virus [J]. *J Virol*. 2015, 89(8): 4655–4667.
- [2] Zhou J, Guo X, Fang D, et al. Avian influenza A (H7N9) viruses isolated from patients with mild and fatal infection differ in pathogenicity and induction of cytokines [J]. *Microb Pathog*. 2017, 111: 402–409.
- [3] de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia [J]. *Nat Med*. 2006, 12(10): 1203–1207.
- [4] Abdel-Ghaffar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans [J]. *N Engl J Med*. 2008, 358(3): 261–273.
- [5] Guo X, Zhu Z, Zhang W, et al. Nuclear translocation of HIF-1 alpha induced by influenza A (H1N1) infection is critical to the production of proinflammatory cytokines [J]. *Emerg Microbes Infect*. 2017, 6(5): e39.
- [6] Chi Y, Zhu Y, Wen T, et al. Cytokine and chemokine levels in patients infected with the novel avian influenza A (H7N9) virus in China [J]. *J Infect Dis*. 2013, 208(12): 1962–1967.
- [7] Bian JR, Nie W, Zang YS, et al. Clinical aspects and cytokine response in adults with seasonal influenza infection [J]. *Int J Clin Exp Med*. 2014, 7(12): 5593–5602.
- [8] Sordillo PP, Helson L. Curcumin suppression of cytokine release and cytokine storm. A potential therapy for patients with Ebola and other severe viral infections [J]. *In Vivo*. 2015, 29(1): 1–4.
- [9] 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 USA*. 2014, 111(2): 769–774.
- [10] Liu JX, Zhang Y, Hu QP, et al. Anti-inflammatory effects of rosmarinic acid-4-O-beta-D-glucoside in reducing acute lung injury in mice infected with influenza virus [J]. *Antiviral Res*. 2017, 144: 34–43.
- [11] Aziz M, Holodick NE, Rothstein TL, et al. The role of B-1 cells in inflammation [J]. *Immunol Res*. 2015, 63(1–3): 153–166.
- [12] Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context [J]. *Nat Rev Immunol*. 2014, 14(2): 81–93.
- [13] Hashimoto D, Chow A, Noizat C, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes [J]. *Immunity*. 2013, 38(4): 792–804.
- [14] Guillemins M, De Kleer I, Henri S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF [J]. *J Exp Med*. 2013, 210(10): 1977–1992.
- [15] Kelley JL, Ozment TR, Li C, et al. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease [J]. *Crit Rev Immunol*. 2014, 34(3): 241–261.
- [16] Wong CK, Smith CA, Sakamoto K, et al. Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice [J]. *J Immunol*. 2017, 199(3): 1060–1068.
- [17] Goritzka M, Makris S, Kausar F, et al. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes [J]. *J Exp Med*. 2015, 212(5): 699–714.
- [18] Zhou AC, Wagar LE, Wortzman ME, et al. Intrinsic 4-1BB signals are indispensable for the establishment of an influenza-specific tissue-resident memory CD8 T-cell population in the lung [J]. *Mucosal Immunol*. 2017, 10(5): 1294–1309.