

王超,刘洋,秦波音,等. 甲型流感病毒 H1N1 pdm09 与 PR8 感染 C57BL/6 小鼠诱生特异性 CD8⁺T 细胞免疫应答的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 561-570.

Wang C, Liu Y, Qin BY, et al. Comparative study on immune responses of specific CD8⁺T cells induced by influenza A virus H1N1 PR8 and pdm09 in C57BL/6 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5): 561-570.

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2019. 05. 003

甲型流感病毒 H1N1 pdm09 与 PR8 感染 C57BL/6 小鼠诱生特异性 CD8⁺T 细胞免疫应答的比较研究

王超, 刘洋, 秦波音, 任晓楠, 谭丹, 杨华, 李顺, 周晓辉*

(复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201508)

【摘要】 目的 比较甲型流感病毒 H1N1 两亚型毒株 A/Shanghai/37T/2009 (H1N1) (pdm09) 临床分离株和 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) 标准株感染 C57BL/6 小鼠后, 其病理状态的改变及诱生特异性 CD8⁺T 细胞的免疫反应。**方法** ①用 9.85×10^6 半数组织细胞感染剂量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 的 PR8 和 pdm09 病毒分别滴鼻感染野生型 C57BL/6 小鼠, 每日 (连续 14 d) 观察其状态并记录死亡情况。于感染后第 1、3 天处死小鼠, 取其肺称重计算肺指数; 左叶肺经 4% 多聚甲醛固定后进行 H&E (hematoxylin-eosin staining) 染色, 观察感染后肺的病理变化; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肺病毒载量。②用 0.25 倍半数致死量 (lethal dose 50%, LD50) 的 PR8 和 pdm09 分别滴鼻感染小鼠, 每日称重连续观察。于感染后第 8 天解剖取肺和脾, 通过 H&E 染色比较肺部病理改变; 通过流式细胞术 (FACS) 检测脾病毒特异性 CD8⁺T 细胞数量比例, 以及 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、granzyme B 等细胞因子和免疫抑制检查点分子 PD-1、LAG-3、Tim-3、CTLA-4 的表达情况。**结果** ①以相同 TCID₅₀ 流感病毒感染后, 两组小鼠均出现疾病状态。PR8 组小鼠感染第 5 天全部死亡, 死亡率显著高于 pdm09 组 ($P < 0.01$); 第 1、3 天肺指数和病毒载量的结果 PR8 组均显著高于 pdm09 组; H&E 染色结果显示 PR8 组病理损伤严重, 肺泡壁增厚, 出现肺实质化, 血细胞渗出增多, 而 pdm09 组小鼠肺组织病理损伤较轻, 炎症浸润少; ②以相同 LD50 流感病毒感染后, PR8 组小鼠的体重损失和肺组织病理损伤均比 pdm09 组严重; 流式结果显示 PR8 组诱生的病毒特异性 CD8⁺T 细胞比例高于 pdm09 组, 但是 PR8 组中活化的 CD8⁺T 细胞 (CD8⁺CD44^{High}) 表达的 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 显著低于 pdm09 组; 检测该群细胞免疫功能耗竭分子, 发现其表达了更多的免疫抑制分子 PD-1 和 LAG-3。**结论** PR8 相对于 pdm09 能够小鼠造成更严重的损伤, 可能是由于其活化的特异性的 CD8⁺T 细胞出现功能耗竭导致特异的免疫保护力受损, 抵抗和清除病毒的能力下降, 故而造成更严重的病理损伤。

【关键词】 甲型流感病毒; 特异性 CD8⁺T 细胞; 免疫应答; 功能耗竭

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 05-0561-10

Comparative study on immune responses of specific CD8⁺T cells induced by influenza A virus H1N1 PR8 and pdm09 in C57BL/6 mice

WANG Chao, LIU Yang, QIN Boyin, REN Xiaonan, TAN Dan, YANG Hua, LI Shun, ZHOU Xiaohui*

【基金项目】 国家重点研发计划 (2016YFD0500208); 国家十三五传染病重大专项 (2017ZX10304402-001-012, 2017ZX10304402-001-006); 国家自然科学基金 (31601908, 81471397); 上海市公共卫生临床中心院内项目 (KY-GW-2018-48, KY-GW-2019-19)。

Funded by the National Major Projects for Science and Technology (2016YFD0500208), National Major Special Program on Infectious Diseases in the 13th Five-Year Plan (2017ZX10304402-001-012, 2017ZX10304402-001-006), the National Natural Science Foundation of China (31601908, 81471397) and Shanghai Public Health Clinical Center Hospital Project (KY-GW-2018-48, KY-GW-2019-19).

【作者简介】 王超 (1992—), 男, 在读硕士研究生。Email: 584264751@qq.com

【通信作者】 周晓辉 (1973—), 男, 研究员, 研究方向: 新发传染病动物模型构建与免疫机制研究。Email: zhouxiaohui@shphc.org.cn

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

Corresponding author: ZHOU Xiaohui. E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

[Abstract] Objective To compare the pathogenicity of two subtypes of influenza A virus A/Shanghai/37T/2009 (H1N1) (pdm09) and A/PuertoRico/8/34 (H1N1) (PR8) and the immunogenicity of those two subtypes of influenza A virus to induce antigen specific CD8⁺T cells in C57BL/6 mice. **Methods** ①The wild type C57BL/6 mice were infected with 50% tissue infection dose (TCID₅₀) of PR8 and pdm09 respectively. The situations of the infected mice were observed daily (14 days), and the death rate was recorded. The mice were sacrificed at 1 and 3 days (days post infection, d.p.i), the lungs were collected to weigh and the lung indexes were calculated, and the left lobes of lung were fixed by 4% paraformaldehyde and stained with H&E to observe the pathological changes of the lung after infection. The viral load in lung tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). ② The mice were intranasally infected with 0.25 times lethal dose (lethal dose 50%, LD50) of PR8 and pdm09, respectively. The infected mice were weighed every day and monitored continuously for 14 days. The splenocytes were isolated on the 8 d.p.i. The percentages of influenza viral antigen specific CD8⁺T cells, the expression levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, granzyme B and immunosuppressive checkpoint molecules PD-1, LAG-3, Tim-3 and CTLA-4 were detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS). **Results** ①After the same TCID₅₀ influenza virus infections, the mice in both groups were morbid. All the mice in the PR8 group died on the 5th day after infection, and the mortality rate in the PR8 group was significantly higher than that in the pdm09 group on the 1st and 3rd day ($P < 0.01$), and the lung index and viral load on the 1st and 3rd day in the PR8 group were significantly higher than those in the pdm09 group. The result of H&E staining showed that the pathological injury of lung tissue was mild and the inflammatory infiltration was less in the pdm09 group. ② After the same LD₅₀ influenza virus infection, the weight-loss and pathological changes in the lung tissues in the PR8 group were significantly more serious than in the pdm09 group. The result of flow cytometry showed that the proportion of virus-specific CD8⁺T cells in the PR8 group was higher than that in the pdm09 group, but the productions of IFN- γ , TNF- α and IL-2 by activated CD8⁺T cells in the PR8 group were significantly lower than that in pdm09 group. Further detection of exhaustion makers on the activated CD8⁺T cells revealed that the cells of the PR8 group express more immunosuppressive molecules PD-1 and LAG-3 than those cells of the pdm09 group. **Conclusions** Influenza A virus PR8 can cause more serious damage in mice compared with pdm09, which may be due to the functional exhaustion of activated antigen specific CD8⁺T cells, resultsing in lower protective immunity against influenza viral infection and more severe pathological injury than pdm09 infection.

[Keywords] influenza A virus; specific CD8⁺T cells; immune response; functional depletion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)几乎每年都会发生一定范围的流行,是引起人类和动物急性呼吸道传染病的主要病原体之一。由于流感病毒基因组的分节段结构,使其之间交换遗传物质成为可能,而且HA(血凝素)和NA(神经氨酸酶)具有高突变性,因此可能产生高流行性潜力的新病毒株^[1]。2009年源自人类、猪和禽类的流感病毒发生基因重组产生的新病毒,获得了感染人类并在人群中传播的能力并引起了21世纪的第一次流感大流行^[2-4]。该流感病毒对人类的致死率相对较低,其主要的感染群体为年轻人和中年人(18~59岁),可引起感染者严重的肺炎。鉴于IAV是危害人类健康和生命的重大公共卫生威胁之一,深入研究其致病与免疫机制以及开发相应的防治策略至关

重要。

研究表明,CD8⁺T细胞在流感入侵宿主后所激活的免疫应答对保护宿主和清除流感病原体发挥着重要的作用^[5-6]。CD8⁺T细胞能够分泌细胞因子如IFN- γ 、TNF- α 、IL-2等,它们能够促进NK细胞和细胞毒T淋巴细胞(CTL)的增殖分化;此外,CD8⁺T细胞还能够直接分泌穿孔素(perforin)和颗粒酶(granzyme)直接杀伤感染的靶细胞^[7-8]。机体通过这些分子机制实现抑制流感病毒扩增并清除病毒的功能。

目前,对于CD8⁺T细胞在pdm09的感染免疫中尚不清楚^[9]。本研究在比较了pdm09和PR8感染C57BL/6小鼠后其致病性、肺组织病理学变化和病毒载量的基础上,初步分析了两种病毒感染后效应

阶段的 CD8⁺T 细胞的免疫应答的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验选用 SPF 级 8 周龄 C57BL/6 小鼠,体重 18 ~ 20 g,均为雌性,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0006】,饲养于上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心实验动物部 SPF 区域【SYXK(沪)2015-0008】中。在实验前 3 d 将小鼠转移到生物安全二级实验室进行分组、标记、称重。实验共分为两部分,第一部分分为两大组:生存曲线组和解剖组。生存曲线组共 20 只(PR8 组 10 只,pdm09 组 10 只),解剖组共 30 只(PR8 组 15 只,pdm09 组 12 只,对照组 3 只),第二部分只有解剖组共 23 只(PR8 组 10 只,pdm09 组 10 只,对照组 3 只),分笼后正常饲养。所有操作均符合上海市公共卫生临床中心实验动物伦理要求(公卫伦审 2018-A60-02 号)。

1.1.2 病毒

H1N1 病毒株 A/Puerto Rico/8/34(PR8),为上海兽医研究所李泽君研究员惠赠,本实验室扩增保存。A/Shanghai/37T/2009(H1N1)(pdm09)为本院临床分离株,流感病毒经鸡胚和 MDCK 细胞培养滴定后,分装于 1.5 mL EP 管中,-80℃ 冰箱储存备用。所有病毒感染及取材等实验操作均在上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心实验动物部生物安全二级实验室(ABSL-2)中开展(注册备案号:金字第 022006005 号)。

1.1.3 实验试剂

四聚体 Flu.NP₃₆₆[ASNENMETM,H-2D(b)](广州好芝生物科技有限公司,HG08T7030),异氟烷(上海雅培制药有限公司,B506),Total RNA 抽提试剂盒(Qiagen GmbH,52906),One-Step TB Green PrimeScript™ PLUS RT-PCR kit(Perfect Real Time,RR096 A),DMEM 培养液(Gibco,1868707),多聚甲醛固定液(武汉谷歌生物科技有限公司,163307),流式抗体(上海优宁维科技生物股份有限公司,Biolegend),BD Cytotfix/Cytoperm Plus 固定破膜试剂盒(BD,555028)。

1.1.4 实验仪器

微量移液枪(Eppendorf,德国),博日 LineGene 9600 Plus 荧光定量 PCR 仪(FQD-96,BIOER,杭州

博日科技有限公司,中国),流式细胞仪(LSR Fortessa,BD 公司,美国),CO₂ 培养箱(3111,Thermo,美国),冷冻离心机(Micro 17R,Thermo,美国),精密高温干燥箱(DHG-9070C,上海之信仪器有限公司,中国),超微量分光光度计(K5600,北京凯奥科技发展有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 感染方案及样本制备

感染方案分为两部分,两部分用到的病毒量不同。第一部分两株病毒都用 9.85×10^6 TCID₅₀ 的病毒量攻毒,该部分可得到生存曲线、肺指数、肺组织病理切片、病毒载量的数据。第二部分进行 CD8⁺T 细胞的功能实验,均用 0.25 倍 LD50 的病毒量攻毒。

小鼠经异氟烷气麻,当其尾巴自然下垂静止不动后,用移液枪吸取相应剂量的病毒,缓慢滴入到小鼠鼻腔中,尽量避免小鼠吞咽和喷嚏,以保证攻毒量,攻毒完成后将小鼠放入独立送风隔离笼具(IVC)中正常饲养。之后每日观察小鼠状态,记录体重和生存情况。第一部分实验分别在第 1 天和 3 天解剖小鼠,取其肺称重,左叶肺用 4% 甲醛固定,剩余部分分装后速冻于液氮中,后转移到-80℃ 冰箱储存备用。第二部分实验在感染后第 8 天解剖小鼠取脾,制备单细胞,后续进行流式实验。

1.2.2 肺组织病理检测

取小鼠肺左叶,经 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,H&E 染色后,扫描全片,使用 CaseViewer 软件进行数据处理。

1.2.3 qRT-PCR 检测肺病毒载量

按照 0.01 g 肺组织/100 μL PBS 的比例匀浆。按照说明书使用 Total RNA 抽提试剂盒(QIAGEN,德国)抽提肺组织中总 RNA,提取的 RNA 用超微量分光光度计(K5600,中国)检测其浓度和吸光度值($A_{260/280}$ 为 2.0 ~ 2.24)。将提取的样本 RNA 的浓度稀释为 100 ng/μL,使用 One-Step TB Green PrimeScript™ PLUS RT-PCR kit 进行肺病毒载量检测。扩增体系为 20 μL:TB Green 10 μL,Ex Taq HS Mix 1.2 μL,Plus RTase Mix 0.4 μL,上下游引物各 0.8 μL(10 μmol/L),RNA 模板 1 μL,水(无 RNA 酶)5.8 μL,按照该体系加样后放入荧光定量 PCR 仪中进行扩增。扩增程序为:42℃ 5 min;95℃ 10 s;95℃ 5 s;60℃ 30 s,40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算肺组织总 RNA 中的相对病毒载量。

表 1 本实验中所用引物

Table 1 Primers used in this experiment	
引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
pdm09-F	5'-GCTGATTACAGCATCGGTCTCAC-3'
pdm09-R	5'-CGTAGTGCTAGCCAGCACCATTTC-3'
PR8-F	5'-AAGACCAATCCTGTACCTCTGA-3'
PR8-R	5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3'
GAPDH-F	5'-AGGTCGGTGAACGGATTTC-3'
GAPDH-R	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

1.2.4 流式细胞术(FACS)检测细胞因子表达

流感感染小鼠第 8 天解剖小鼠取其脾,制备单细胞。每个样本表面染色用 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞,染色抗体包括 CD8-FITC、CD44-APC-Cy7、Flu. NP₃₆₆-PE、CCR7-BV421、PD-1-Percep-cy5.5、Tim-3-PE-cy7、LAG3-APC、CTLA4-BV605,4℃避光染色 45 min,PBS 清洗 2 次,200 μL 染色 buffer 重悬后等待上机;细胞内细胞因子染色时细胞铺 96 孔板,每孔 2×10^6 个细胞,将制备好的单细胞与流感肽段 NP₃₆₆₋₃₇₄(ASNENMETM)和 PA₂₂₄₋₂₃₃(SSELENFRAYV)按照各 2.5 μg/mL 的浓度与之混匀,按照 1 mL/μL 的比例加入高尔基体阻断剂,37℃细胞培养箱中放置 5 h,按照各抗体以及 BD Cytotfix/Cytoperm Plus 固定破膜试剂盒使用说明书的建议进行染色,流式抗体包括 CD4-APC、CD8-FITC、CD44-APC-cy7、TNF-α-PE-cy7、IFN-γ-PE、Granzyme B-PB、IL-2-BV605。染色结束后 PBS 清洗 2 次,200 μL 染色 buffer 重悬细胞,过滤后等待上机。后续实验数据通过 Flowjo (V10) 软件进行分析。

1.3 统计学分析

所有数据采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示,使用软件 GraphPad Prism 7 进行数据统计分析,两组数据统计比较采用非配对 *t* 检验统计分析,生存实验用 log-rank (Mantel-Cox) 分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具有显著性。

2 结果

2.1 pdm09 和 PR8 流感感染后对小鼠生存率变化的影响

用 9.85×10^6 TCID₅₀ 的 PR8 和 pdm09 分别滴鼻感染 C57BL/6 小鼠,两组小鼠各 10 只。感染后第 2 天 PR8 组小鼠较 pdm09 组体重下降明显;第 3 天两组小鼠均出现活动量减少,精神萎靡的症状,且伴随食量下降,竖毛蜷缩等现象;攻毒后第 4 天 PR8 组小鼠开始出现死亡且到第 5 天小鼠全部死亡,而 pdm09 组小鼠则第 7 天开始出现小鼠死亡(图 1);持续观察至第 14 天,pdm09 组小鼠生存率

(67%)显著高于 PR8 组小鼠(0%)($P < 0.01$)。

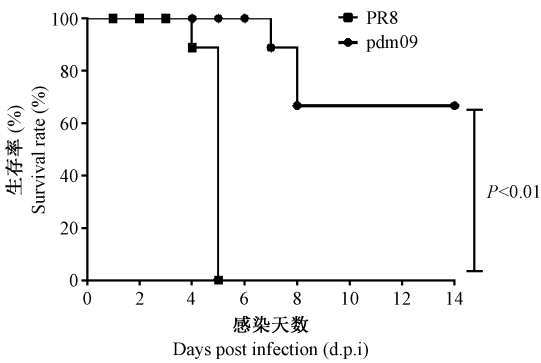


图 1 9.85×10^6 TCID₅₀ 的 PR8 和 pdm09 攻毒后小鼠生存曲线

Figure 1 Survival curves of the mice after 9.85×10^6 TCID₅₀ PR8 and pdm09 challenge

2.2 pdm09 和 PR8 流感感染后对小鼠肺指数和病毒载量的影响

在流感感染后第 1 天和第 3 天分别对两组小鼠进行解剖取材。取小鼠整肺测得肺指数,用肺匀浆上清提取病毒 RNA 进行病毒载量测定(图 2)。肺指数结果显示,与对照组相比,感染后的小鼠肺指数均有升高,且第 3 天较第 1 天肺指数均升高明显($P < 0.01$),提示第 3 天的炎症较第 1 天严重。感染第 1 天肺指数,PR8 组(1 ± 0.061)%,与 pdm09 组(0.68 ± 0.055)%相比显著升高($P < 0.01$)。同样,感染第 3 天肺指数,PR8 组(1.5 ± 0.22)%,相比 pdm09 组(0.92 ± 0.095)%,也显著升高($P < 0.01$)。病毒载量的结果显示,PR8 组在第 1 天和第 3 天的病毒载量均高于 pdm09 组($P < 0.05$)。综上结果提示,感染相同的病毒量情况下,PR8 相比 pdm09 可能在小鼠肺中造成更严重的炎症,且 PR8 的复制速度快于 pdm09 或者宿主能够更有效的抑制 pdm09 的复制。

2.3 pdm09 和 PR8 流感感染后 H&E 染色观察小鼠肺部的病理损伤

在流感病毒感染后第 1 天和第 3 天分别对两组小鼠进行解剖取材,解剖时肉眼可见其肺组织出现不同程度的病理改变,尤其 PR8 组小鼠,肺充血明显。感染后第 1 天,pdm09 组小鼠无明显病变,PR8 组小鼠病变面积达 15%;感染后第 3 天,两组小鼠肺充血现象较第 1 天明显加重,PR8 组小鼠病变面积已达 60% ~ 70%,而 pdm09 组病变仅 10% ~ 15% 左右。H&E 染色后镜下观察(图 3),两组小鼠第 3 天的病变程度均比第 1 天严重,肺间隔增宽增厚,炎症浸润加重,血细胞渗出变多。相同取材时间点,PR8 组小鼠肺病理损伤程度比 pdm09 组严重,表现在感染后第 1 天,PR8 组肺泡壁增厚,炎症浸润增

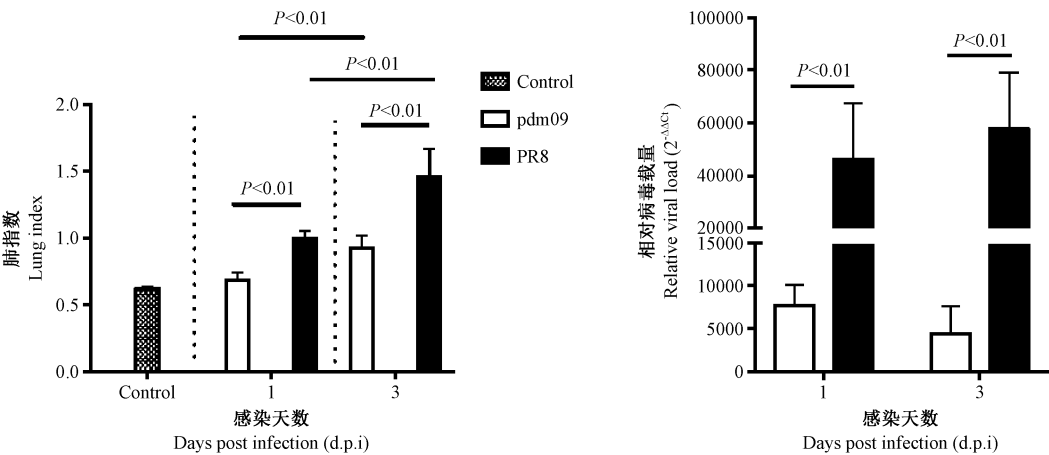


图 2 9.85 × 10⁶ TCID₅₀ 的 PR8 和 pdm09 攻毒 1 天和 3 天小鼠的肺指数和相对病毒载量

Figure 2 Lung index and relative viral load of the mice after 9.85 × 10⁶ TCID₅₀ PR8 and pdm09 challenge on the 1st day and 3rd day

加;感染第 3 天,PR8 组肺泡壁进一步增厚,肺泡结构完全破坏,发生肺实质化,气体交换功能严重受损,炎症细胞浸润加重,血管扩张,血细胞渗出增多。组织病理结果显示,PR8 与 pdm09 相比可在小鼠肺部造成更加严重的病理损伤。

2.4 相同 LD50 的 pdm09 和 PR8 流感感染后小鼠的体重变化及肺部病理损伤

为进行免疫应答分析,本研究继而用相同的 LD50 量(0.25 倍 LD50)的 pdm09 和 PR8 分别滴鼻感染 C57BL/6 小鼠。感染后每天固定时间观察小鼠状态并进行称重,持续观察 14 天,制作体重变化曲线(图 4)。从感染后第 3 天开始,两组小鼠体重均开始明显下降,此前二者体重变化并无显著差异,但是第 4 天开始至第 13 天,对比每天两组小鼠体重下降率发现,PR8 组小鼠体重下降率均显著高于 pdm09 组,第 8 ~ 9 天两组小鼠体重开始回升。攻毒后 8 天对两组小鼠进行解剖,取其肺进行病理检测,通过 H&E 染色可以发现 PR8 组相对 pdm09 组小鼠发生了更严重的病理损伤:肺泡壁增厚发生实质化,炎症浸润明显,这也和小鼠的体重变化具有一致的趋势。提示相同 LD50 病毒量的 PR8 相比 pdm09 能够对小鼠造成更严重体重损失和肺部病理损伤。

2.5 相同 LD50 的 pdm09 和 PR8 流感感染小鼠后比较两株病毒诱生病毒特异性 CD8⁺T 细胞的能力

用相同 LD50 量的两病毒分别对小鼠进行滴鼻感染,攻毒后第 8 天解剖取其脾制备成脾细胞悬液,通过流式细胞术检测其中病毒特异性 CD8⁺T 细胞的比例(图 5)。对 CD8⁺T 细胞亚群设门分析,PR8 组诱生的病毒特异性 CD8⁺T 细胞的比例(0.6 ± 0.3)%,显著高于 pdm09 (0.1 ± 0.07)%(P < 0.05)。结果显示,相对于 pdm09 感染组,PR8 流感

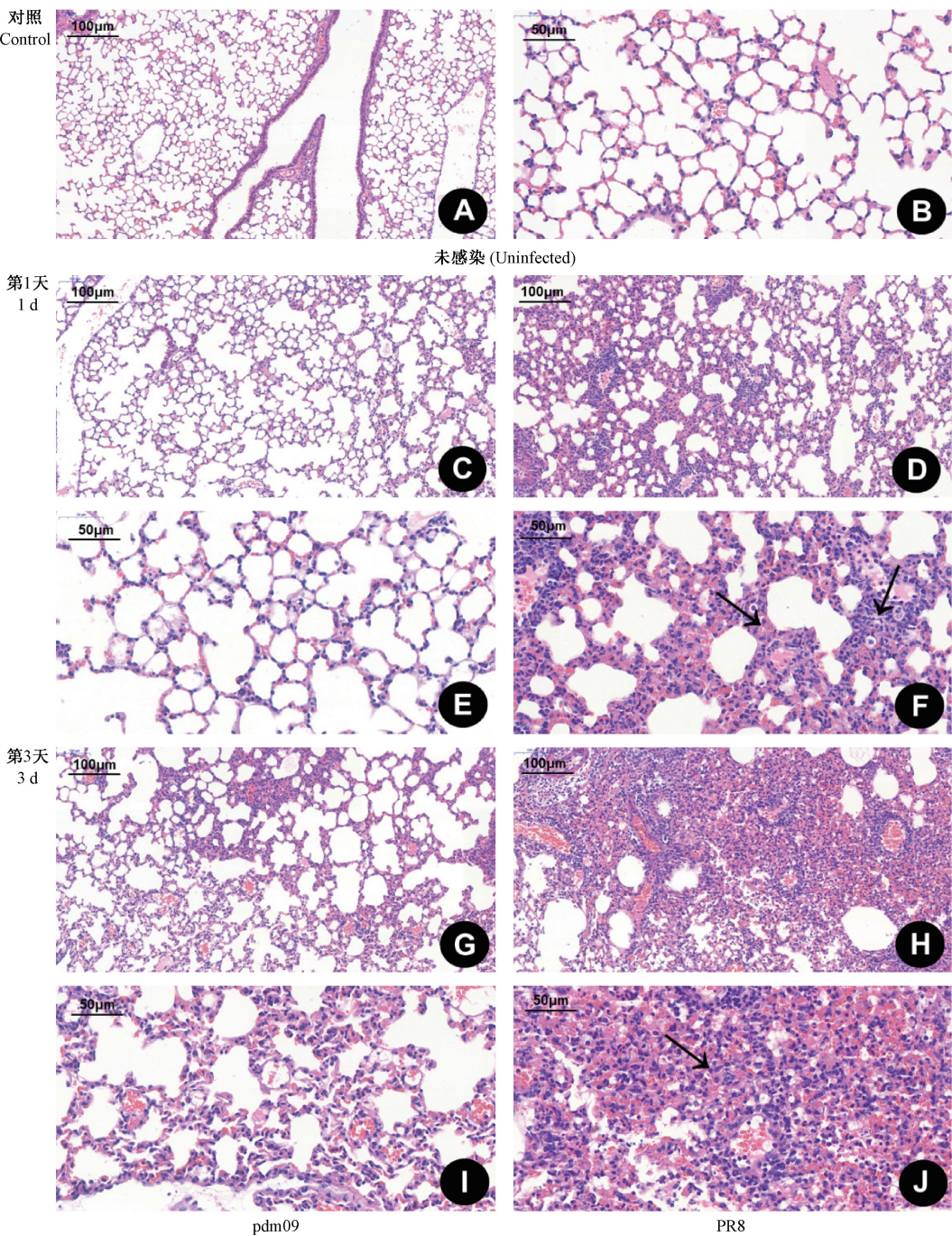
病毒感染小鼠后其脾能够诱生较高比例的病毒特异性 CD8⁺T 细胞。

2.6 两株病毒感染小鼠后比较 CD8⁺T 细胞分泌细胞因子的能力

在两株病毒感染小鼠后第 8 天分离脾细胞,通过流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞中效应性细胞 CD8⁺CD44^{High}T 亚群分泌 IFN-γ、IL-2 和 TNF-α 的比例(图 6)。IFN-γ 属于 II 型干扰素,其主要功能是参与免疫调节,可增强中性粒细胞的吞噬作用和 NK 细胞的细胞毒作用。本实验中,pdm09 组小鼠活化的 CD8⁺T 细胞分泌 IFN-γ 的比例(5.75 ± 1.24)%显著高于 PR8 组(1.44 ± 0.582)%(P < 0.01)。IL-2 可活化巨噬细胞,诱导 CTL 增殖分化,促进杀伤细胞分泌 IFN-γ、TNF-α 等,是免疫系统中重要的细胞生长因子,结果显示 pdm09 组 IL-2 的比例(1.95 ± 0.623)%显著高于 PR8 组(0.344 ± 0.0859)%(P < 0.01)。TNF-α 对于免疫反应的调控和炎症的诱导等起着重要作用,pdm09 组 CD8⁺T 细胞产生的 TNF-α 的比例(1.92 ± 0.519)%,虽然与 PR8 组(1.81 ± 0.394)%相比无显著差异,但是其平均值仍略高于 pdm09 组,可见 pdm09 攻毒后活化的 CD8⁺T 细胞能够产生较多的细胞因子来抵御病毒。

2.7 两株病毒感染小鼠后比较 CD8⁺T 细胞分泌颗粒酶的能力

当流感病毒感染宿主后,CD8⁺T 细胞在保护机体的过程中除了分泌细胞因子促进免疫细胞增殖分化和表达 FasL 诱导靶细胞凋亡外,还会通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤靶细胞。因此我们检测了 granzyme B 的表达情况(图 7)。从 CD8⁺CD44^{High}亚群进行画门得到 granzyme B 阳性的细胞,结果显示 pdm09 组颗粒酶(granzyme B)的比例(6.02 ±



注: F 图箭头表示肺间隔增厚,炎症细胞浸润;J 图箭头表示肺实质化。

图 3 9.85×10^6 TCID₅₀ 的 PR8 和 pdm09 攻毒 1 天和 3 天后小鼠肺部的病理损伤

Note. F. Arrows indicate thickening of pulmonary septum, infiltration of inflammatory cells. J. The arrow indicates consolidation of pulmonary parenchyma.

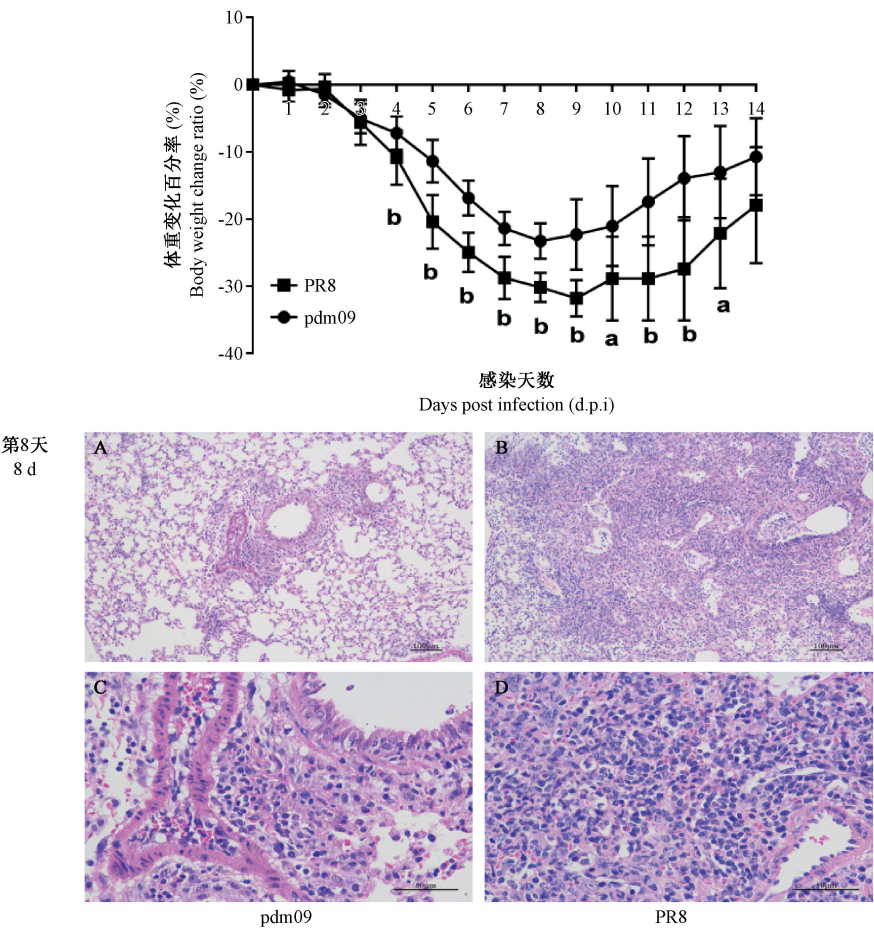
Figure 3 Pathological changes in the lung tissues of mice after challenge with 9.85×10^6 TCID₅₀ PR8 and pdm09 on the 1st day and 3rd day

1.11)%和 PR8 组(3.88 ± 2.28)%虽然无显著差异,但是仍然呈现出 pdm09 组高于 PR8 组的趋势。

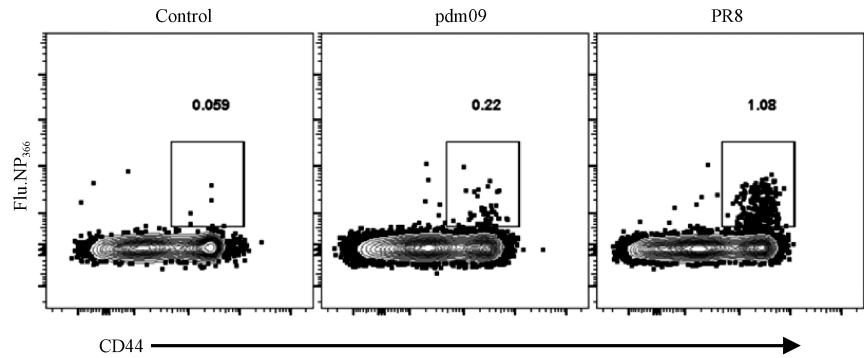
2.8 两株病毒感染小鼠后比较 CD8⁺T 细胞耗竭指标的表达差异

从前面的结果中,我们看到流感病毒特异性

CD8⁺T 细胞的比例 PR8 组高于 pdm09 组,理论上其适应性免疫更具优势,但是效应性细胞因子的表达总体上是 pdm09 组较多,所以我们对 pdm09 组和 PR8 组中 CD8⁺CD44^{High}亚群表达的耗竭分子进行比较(图 8),结果发现 PR8 组表达 PD-1 的比例(15.4

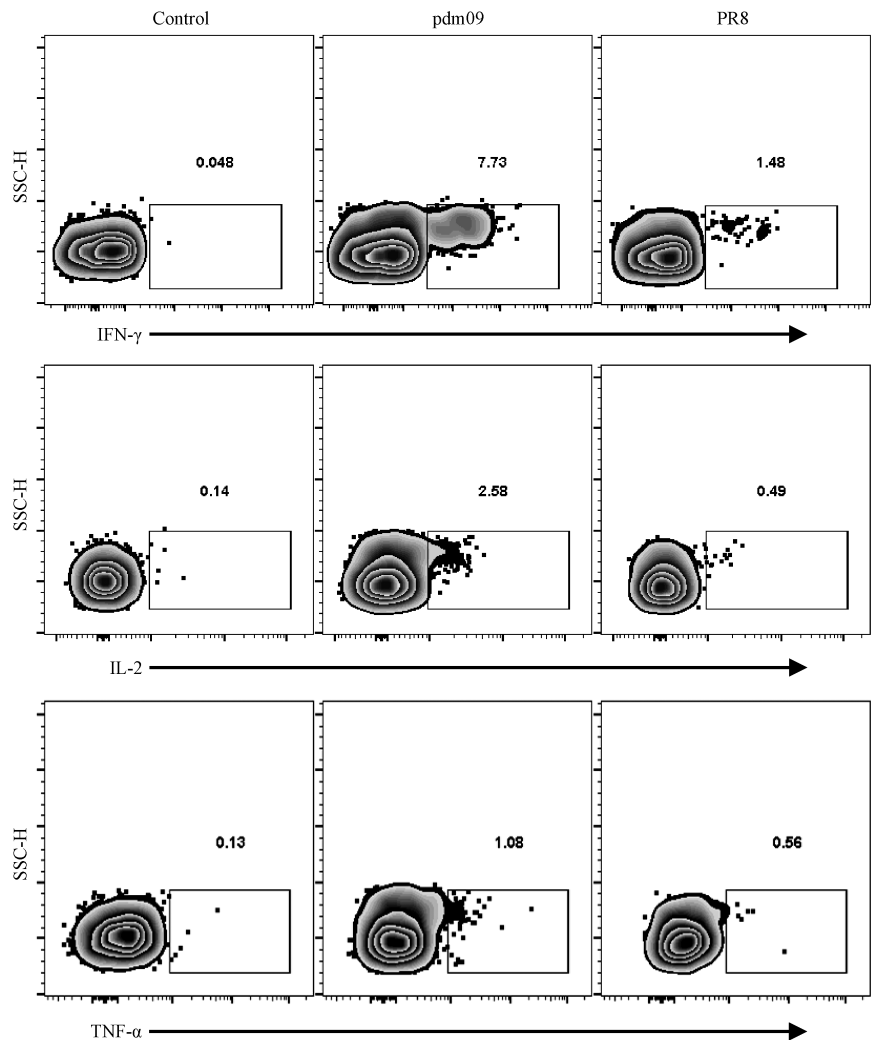


注：a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$. A, C: pdm09 感染后. B, D: PR8 感染后。
图 4 0.25 倍 LD50 攻毒后小鼠体重变化和肺部病理改变
Note. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$. A, C: After pdm09 infection. B, D: After PR8 infection.
Figure 4 Changes of body weight and pathological changes in lung tissues after 0.25 times LD50 challenge



注：数据圈门于 CD8⁺T 细胞群。
图 5 0.25 倍 LD50 攻毒 8 天小鼠脾中病毒特异性 CD8⁺T 细胞数量比较
Note. Data gated on CD8⁺T cell population.
Figure 5 Comparison of the numbers of virus-specific CD8⁺T cells in mouse spleen tissues at day 8 after 0.25 times LD50 challenge

± 1.33)% 显著高于 pdm09 组 (9.39 ± 1.93)% ($P < 0.05$), 同时 LAG-3 的表达上, PR8 组 (8.6 ± 0.741)% 也是显著高于 pdm09 组 (4.85 ± 1.63)% ($P < 0.05$)。结果表明, 相对于 pdm09 感染组, PR8 感染组小鼠其活化的 CD8⁺T 细胞 (CD8⁺CD44^{High} 亚群) 会出现更高功能耗竭分子表达, 显示其效应性免疫力呈现耗竭状态。



注:数据圈门于 CD8⁺CD44^{High} T 细胞群。
图 6 0.25 倍 LD50 攻毒 8 天小鼠脾中 CD8⁺CD44^{High} 亚群分泌 IFN-γ、TNF-α、IL-2 比较
Note. Data gated on CD8⁺CD44^{High} T cell population.

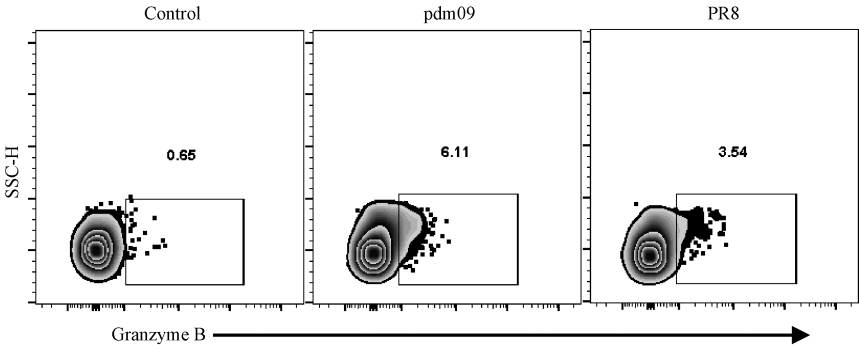
Figure 6 Comparison of IFN-γ, TNF-α, IL-2 secretion by CD8⁺ CD44^{High} T cell subpopulation in mouse spleen tissues at day 8 after 0.25 times LD50 challenge

3 讨论

A(H1N1)pdm09 病毒与季节性流感相似之处是造成的死亡率相对较低,然而不同在于大约 64% 的严重病例发生在年轻人和中年人的群体中,而非免疫力比较弱的孩子和老年人^[2]。虽然其中具体的致病机制尚不清楚,但是各种流感病毒对机体造成损伤的原因无外乎包括两方面:病毒特有的毒力因子和宿主对感染的免疫应答能力。

当病原体入侵机体时需要突破皮肤黏膜屏障、天然免疫屏障和特异性免疫应答三道防线。对于流感病毒而言,第三道防线中的特异性细胞免疫应答在保护机体和清除病毒中发挥至关重要的作用^[10]。机体尚未接触流感病毒时,初始 T 细胞

(naïve T cells) 富集在次级淋巴器官(如脾、淋巴结等)通过血液循环和淋巴循环执行免疫监视功能^[11]。流感病毒入侵机体后,树突状细胞(dendritic cell, DC)在感染部位吞噬抗原,迁移至淋巴结,通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)提呈抗原短肽段,与 T 细胞抗原受体(TCR)第一信号和共刺激分子第二信号协同刺激激活 T 细胞^[12-13]。活化后的 T 细胞不断增殖,进入效应阶段,产生效应 T 细胞(effector T cells),然后迁移到感染部位执行功能,迁移过程受到多种趋化因子(如 CCL5 和 CXCL10)和自身受体的严格调控^[14]。本实验研究 CD8⁺T 细胞功能于感染后第 8 天取材,即处于效应阶段。随着流感抗原被效应 T 细胞不断清除,其增殖达到高峰,T 细胞开始进入收



注:数据圈门于 CD8⁺CD44^{High} T 细胞群。
图 7 0.25 倍 LD50 攻毒 8 天小鼠脾中 CD8⁺CD44^{High} 亚群分泌 granzyme B 的比较
Note. Data gated on CD8⁺CD44^{High} T cell population.

Figure 7 Comparison of the granzyme B secretion by CD8⁺CD44^{High} T cell subpopulation in mouse spleen tissues at day 8 after 0.25 times LD50 challenge

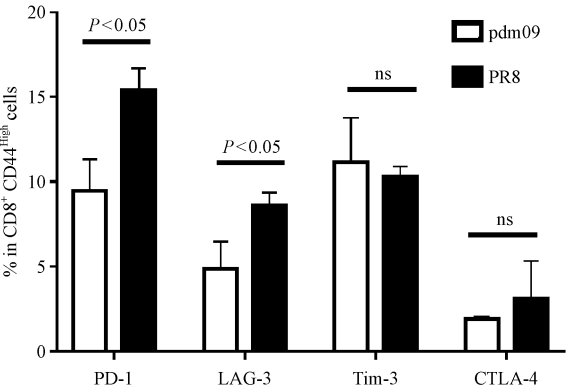


图 8 0.25 倍 LD50 攻毒 8 天小鼠脾中 CD8⁺CD44^{High} 亚群免疫抑制检查点分子表达比较
Figure 8 Comparison of molecular expression of CD8⁺CD44^{High} T cell subpopulation immunosuppressive checkpoints in the mouse spleen tissues at day 8 after 0.25 times LD50 challenge

缩期^[15]。此时绝大多数的特异性效应 T 细胞发生凋亡,只有 5% ~ 10% 的效应细胞作为记忆 T 细胞 (memory T cells) 长期存活^[16-18]。研究表明,当流感入侵宿主后所诱生的特异性 CD8⁺T 细胞免疫应答是保护宿主和清除流感病原体的关键^[19]。

Meunier 等^[9] 将大流行病毒的人类分离株 H1N1/A/California-like/2009 在小鼠上进行适应得到其小鼠适应株 (MAP2009), 用 10PFU 的 MAP2009 和 PR8 分别滴鼻感染 18 ~ 20 g 的 C57BL/6 小鼠。结果显示,MAP2009 组与 PR8 组相比具有高死亡率和高病毒载量^[20-21], 表明 MAP2009 病毒具有更高的致病性和复制能力;同时他们也发现在小鼠肺中病毒特异性 CD8⁺T 细胞的数目 MAP2009 组显著低于 PR8 组,但是在脾中无显著差异,表明 MAP2009 组感染后适应性免疫可能受到损伤。Lv 等^[22] 研究者用 5 × 10⁵ PFU 的 H1N1/A/

Beijing/501/2009 (BJ501) 临床株和 PR8 分别滴鼻感染 6 ~ 8 周的 BALB/c 小鼠,结果显示其存活率和体重没有显著差异,但是 PR8 组的病毒载量显著高于 BJ501 组,提示 BJ501 病毒的复制效率低于 PR8;ELISPOT 实验检测到感染后第 8 天 BJ501 组肺中 IFN-γ 的比例显著高于 PR8 组,IL-2 表达无显著差异,总之 PR8 对小鼠造成的损伤比 BJ501 更加严重。

实验动物本身的性质 (性别、年龄、品系及来源厂商) 及其生物学效应的复杂性、病毒株本身性质的差异等原因,均可能造成不同实验室的动物实验结果的差异。Meunier 等^[9] 使用的毒株是在小鼠肺中经过培养的适应株,而 Lv 等^[22] 及本研究使用的是临床分离株,攻毒剂量也存在差异,取材的组织也不尽相同,所以得到的结果也存在一定的差异。实际上,研究表明 A (H1N1) pdm09 病毒的不同临床分离株造成的发病率和死亡率也是各不同^[23-24]。

本研究用 9.85 × 10⁶ TCID₅₀ 的 pdm09 和 PR8 滴鼻感染 C57BL/6 小鼠, pdm09 组小鼠较 PR8 组呈现死亡率低、肺部病理损伤轻微、病毒载量较低特性;当用 0.25 倍 LD50 的 pdm09 和 PR8 分别攻毒小鼠后呈现出相同的趋势, pdm09 组小鼠体重损失程度和肺病理损伤较 PR8 组缓和。我们的研究结果与 Lv 等^[22] 的报道基本一致,但我们进一步对两种病毒感染后 CD8⁺T 的耗竭状态作了比较分析。

pdm09 组虽然感染后脾中病毒特异性 CD8⁺T 细胞的数量少,但是由于活化的 CD8⁺T 细胞表达免疫抑制性分子 PD-1 和 LAG-3 少,所以其分泌 IFN-γ 和 IL-2 的能力强于 PR8 组,促进了 CD8⁺T 细胞的增殖分化,有利于病原体的清除。反之, PR8 组可能是由于功能耗竭的原因导致适应性免疫受损,从

而缺乏快速有效的 T 细胞应答,因此导致病毒载量增加、肺部病理严重和高死亡率。当然,T 细胞功能耗竭是一个复杂的现象,可能涉及多个抑制受体、共刺激受体的协同调节,甚至可能存在其他未知的机制,许多病毒已经发展出许多干扰适应性免疫并导致 T 细胞耗竭的策略^[25]。流感病毒感染后的 CD8⁺T 细胞耗竭的具体分子机制,还有待进一步深入的研究探索。

鉴于解除病毒特异性 CD8⁺T 细胞的耗竭状态可挽救特异性 T 细胞免疫功能^[26],这一策略在肿瘤性疾病的临床治疗实践中已被应用。本研究结果提供的线索提示,在严重的甲型流感病毒感染的情况下,逆转 CD8⁺T 细胞的耗竭状态也可能是未来的一个新的潜在治疗靶标。

参 考 文 献 (References)

- [1] Mostafa A, Kanrai P, Ziebuhr J, et al. The PB1 segment of an influenza A virus H1N1 2009pdm isolate enhances the replication efficiency of specific influenza vaccine strains in cell culture and embryonated eggs [J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(3): 620-631.
- [2] Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation; a modelling study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(9): 687-695.
- [3] Neumann G, Kawaoka Y. Predicting the next influenza pandemics [J]. *J Infect Dis*, 2019, 219 (Supplement_1): S14-S20.
- [4] Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce De Leon S, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(7): 680-689.
- [5] Hillaire ML, Rimmelzwaan GF, Kreijtz JH. Clearance of influenza virus infections by T cells: risk of collateral damage? [J]. *Curr Opin Virol*, 2013, 3(4): 430-437.
- [6] Hamada H, Bassity E, Flies A, et al. Multiple redundant effector mechanisms of CD8⁺T cells protect against influenza infection [J]. *J Immunol*, 2013, 190(1): 296-306.
- [7] Macintyre CR, Chughtai AA, Barnes M, et al. The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza A (H1N1) pdm09 [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 637.
- [8] La Gruta NL, Turner SJ. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control [J]. *Trends Immunol*, 2014, 35(8): 396-402.
- [9] Meunier I, Morisseau O, Garneau É, et al. Infection with a mouse-adapted strain of the 2009 pandemic virus causes a highly severe disease associated with an impaired T cell response [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138055.
- [10] Brodin P, Davis MM. Human immune system variation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 17(1): 21-29.
- [11] Roberts AD, Ely KH, Woodland DL. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(1): 123-133.
- [12] Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8⁺T cell differentiation during viral infection [J]. *Immunity*, 2007, 27(3): 393-405.
- [13] Kohlmeier JE, Woodland DL. Immunity to respiratory viruses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(1): 61-82.
- [14] Fujiwara H, Hamaoka T. Coordination of chemokine and adhesion systems in intratumoral T cell migration responsible for the induction of tumor regression [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1(4): 613-623.
- [15] Haring JS, Badovinac VP, Harty JT. Inflaming the CD8⁺T cell response [J]. *Immunity*, 2006, 25(1): 19-29.
- [16] Jabbari A, Harty JT. Secondary memory CD8⁺T cells are more protective but slower to acquire a central memory phenotype [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(4): 919-932.
- [17] Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺T cell differentiation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(11): 749-761.
- [18] Strutt TM, Mckinsty KK, Marshall NB, et al. Multipronged CD4⁺T - cell effector and memory responses cooperate to provide potent immunity against respiratory virus [J]. *Immunol Rev*, 2013, 255(1): 149-164.
- [19] Grant EJ, Quinones-Parra SM, Clemens EB, et al. Human influenza viruses and CD8⁺T cell responses [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 16: 132-142.
- [20] Li CC, Wang L, Eng HL, et al. Correlation of pandemic (H1N1) 2009 viral load with disease severity and prolonged viral shedding in children [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(8): 1265-1272.
- [21] Gao R, Bhatnagar J, Blau DM, et al. Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(4): 1258-1268.
- [22] Lv J, Wang D, Hua YH, et al. Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice [J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14(1): 197.
- [23] Safronetz D, Rockx B, Feldmann F, et al. Pandemic swine-origin H1N1 influenza A virus isolates show heterogeneous virulence in macaques [J]. *J Virol*, 2011, 85(3): 1214-1223.
- [24] Meunier I, Embury-Hyatt C, Stebner S, et al. Virulence differences of closely related pandemic 2009 H1N1 isolates correlate with increased inflammatory responses in ferrets [J]. *Virology*, 2012, 422(1): 125-131.
- [25] Wherry EJ. T cell exhaustion [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(6): 492-499.
- [26] Balkhi MY, Ma Q, Ahmad S, et al. T cell exhaustion and interleukin 2 downregulation [J]. *Cytokine*, 2015, 71(2): 339-347.

[收稿日期] 2019-08-05