

# H5N1 亚型禽流感病毒诱导的机体免疫损伤分析

吕 星,王晓辉,吴春利,王 眇,房师松,程小雯,张仁利,彭 博

**摘要:**目的 进一步了解 H5N1 禽流感病毒的致病机制,同时对 H5N1 禽流感病人的临床救治方案提供科学依据。**方法** 采集 2011 年深圳市 1 例 H5N1 禽流感病例病程中多份血液样本,应用流式细胞术和酶联免疫法,检测该病人外周血中各亚群淋巴细胞及细胞因子水平。**结果** H5N1 禽流感患者外周血中各亚群淋巴细胞均出现绝对数量减少,CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 出现倒置。同时发现血清中高水平的 IL-6、IL-10、TNF、IFN-γ、IL-12、IP-10 和 MCP-1。**结论** H5N1 禽流感病毒会对机体的免疫系统造成严重伤害,同时会刺激机体过度表达高水平的细胞因子,从而导致典型的免疫应答介导的病理损伤。

**关键词:** H5N1; 淋巴细胞; 细胞因子; 免疫损伤

中图分类号:R373.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)07-0697-03

## Immune injury induced by H5N1 subtype influenza virus

LU Xing, WANG Xiao-hui, WU Chun-li, WANG Xin, FANG Shi-song,  
CHENG Xiao-wen, ZHANG Ren-li, PENG Bo

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China)

**ABSTRACT:** In order to understand the pathogenic mechanism of avian influenza virus and provide the scientific basis for effective therapeutic strategies, peripheral blood lymphocyte counts and cytokine of a man infected with H5N1 virus in Shenzhen were detected by flow cytometric analysis and ELISA assay. Compared with those of healthy control, the numbers of peripheral B, NK, CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T, and CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T cell in patient infected with H5N1 were significantly decreased, and the inverted ratios of CD<sub>4</sub><sup>+</sup> to CD<sub>8</sub><sup>+</sup> cells was detected. Cytokine analysis showed the high levels of serum IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-12, IP-10, and MCP-1. These findings indicated that H5N1 virus could be the cause of serious damage to body's immune system, including cellular immunity and humoral immunity. Cytokines are essential for efficient elimination of virus. However, hyper-activation of inflammatory cytokines may initiate or exacerbate pathological damage in this viral infection.

**KEY WORDS:** H5N1; lymphocytes; cytokine; immune injury

1997 年,中国香港地区首次报告了 H5N1 亚型禽流感病毒突破种间障碍感染人类的事件,18 例病例中死亡 6 人<sup>[1]</sup>。截止到 2013 年 3 月 12 日,全球共有十余个国家和地区向世界卫生组织(WHO)报道了 622 例实验室确认的人感染 H5N1 病例,其中死亡 371 例,病死率为 59.7%。我国共报告 45 例实验室确认的人感染 H5N1 病例,死亡 30 例,病死率为 66.7%<sup>[2]</sup>。由于人感染 H5N1 禽流感病程进展迅速,病死率高,已经成为严重威胁人类健康的重要传染病。

H5N1 禽流感病毒的发病机制尚不完全清楚,但目前普遍认为由病毒直接引起或诱导产生的免疫损伤起着重要作用<sup>[3]</sup>。本研究采集了深圳市 1 例人

感染 H5N1 禽流感病例的多份血液标本,拟通过观察其外周血淋巴细胞亚群和细胞因子的水平变化,了解 H5N1 禽流感病毒感染后对机体免疫造成的影响,进一步探索禽流感病毒的致病机理,从而为人感禽流感病例的临床治疗策略提供科学数据。

## 1 材料与方法

1.1 病例及样本 病例为深圳市 1 名人感染 H5N1 禽流感病例,39 岁,男性,于 2011 年 12 月 21 日出现发热、乏力等症状,12 月 25 日入院治疗,12 月 29 日被证实感染 H5N1 亚型禽流感病毒。患者因急性呼吸窘迫症及多器官功能衰竭,于 12 月 31 日下午经抢救无效死亡。

本研究的样本采用该病例发病后第 5 d 至第 10 d 的血清标本,用于细胞因子水平检测。病人发病后第 10 d 采集的抗凝血用于淋巴细胞亚群的检测。

同时选取 4 名无发热、咽痛、咳嗽等呼吸道症状、无腹痛、腹泻等消化症状的健康志愿者作为健康对照组,采集血清及抗凝血,用于淋巴细胞亚群计数和细胞因子水平测定。

## 1.2 方法

**1.2.1 淋巴细胞亚群检测** 用 Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)及 MultiTEST TM 6-color 试剂(美国 BD 公司)进行淋巴细胞分类计数,包括 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>、CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup>、CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup>、CD<sub>16</sub><sup>+</sup> CD<sub>56</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>19</sub><sup>+</sup>,并计算 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> / CD<sub>8</sub><sup>+</sup>。

**1.2.2 细胞因子检测** 血清中 IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN-γ 水平用 Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)及 Cytometric Bead Array kit(美国 BD 公司)进行检测。用 ELISA 方法检测 IP-10(中国 Ray Biotech)、IL-12(德国 IBL)、RANTES-1(德国 IBL) 和 MCP-1(德国 IBL) 水平。以上项目均严格按照

试剂盒说明书进行操作。

## 2 结 果

**2.1 外周血淋巴细胞计数** 与健康对照组相比,H5N1 患者外周血中的 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>、CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup>、CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>16</sub><sup>+</sup> CD<sub>56</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>19</sub><sup>+</sup> 淋巴细胞均出现绝对数量的减少,CD<sub>4</sub><sup>+</sup> / CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 的值为 0.64,比例出现倒置(表 1)。

**2.2 细胞因子水平** 通过观察禽流感患者从发病起第 5 d 到第 10 d 血清中细胞因子水平(表 2),发现 IL-6、IL-10、TNF、IFN-γ、IL-12、IP-10 和 MCP-1 均显著高于健康对照组,但是随着病程的发展呈现出不同的变化趋势:IL-12、TNF 和 IFN-γ 逐渐下降,IL-6 水平继续迅速升高,IL-10 在第 7 d 达到顶峰后出现缓慢下降,而 MCP-1 和 IP-10 一直维持在较高水平。IL-4 与 RANTES 的水平则接近健康对照组。

表 1 H5N1 禽流感病人与健康对照组淋巴细胞计数

Tab. 1 Lymphocytes count of patient with influenza A (H5N1) and health controls (cells/mm<sup>3</sup>)

	CD <sub>3</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>3</sub> <sup>+</sup> CD <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CD <sup>3</sup> + CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>16</sub> <sup>+</sup> CD <sub>56</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>19</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> / CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>
Patient with H5N1	401.35	127.61	82.2	9.66	5.22	3.13	0.64
Health controlMean ± SD	1340.78 ± 594.27	409.26 ± 168.25	813.78 ± 400.04	11.38 ± 3.77	473.46 ± 368.44	348.28 ± 163.55	1.78 ± 0.44

表 2 H5N1 禽流感病人与健康对照组血清中细胞因子水平

Tab. 2 Serum cytokine concentrations of patient with influenza A (H5N1) and health controls

	Cytokine (pg/mL)								
	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFN- $\gamma$	IL-12	IP-10	RANTES	MCP-1
Patient with H5N1 course of the disease (d)									
5	und.	49.95	18.71	1.14	63.63	9.91	5927.79	450.26	277.69
6	1.50	91.69	47.03	und.	37.42	3.62	5398.54	136.59	270.03
7	und.	145.69	97.74	und.	21.05	3.34	6266.67	169.07	249.01
8	1.92	102.73	89.59	und.	14.46	5.77	5543.41	267.95	242.72
9	und.	186.79	75.82	und.	26.26	2.15	6134.74	175.95	273.80
10	und.	316.59	61.22	und.	15.14	1.69	4226.42	365.82	275.85
Health control	0.40 ± 0.09	2.32 ± 0.19	1.51 ± 0.13	0.67 ± 0.06	1.08 ± 0.09	1.56 ± 0.44	89.50 ± 0.18	489.97 ± 0.34	7.70 ± 0.17
Mean ± SD									

Note: und--undetected

## 3 讨 论

CD<sub>3</sub><sup>+</sup> 细胞代表外周血中总的成熟 T 细胞,其可以划分为辅助性 T 细胞(Th 细胞)和抑制性 T 细胞(Ts 细胞)两大类,分别用 CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>3</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 作为代表。正常情况下,两者始终保持动态平衡,维护机体正常的免疫应答,调节机体的免疫状态。本文发现 H5N1 禽流感病人外周血中的 T 细胞总数及 Th 细胞、Ts 细胞均表现出绝对数量的减少,同时出

现 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 比例失调,说明 H5N1 禽流感病毒会引起严重的机体免疫功能紊乱。NK 细胞,表现为 CD<sub>16</sub><sup>+</sup> CD<sub>56</sub><sup>+</sup>,是机体非特异免疫中最主要的细胞,在机体早期抗病毒感染免疫过程发挥重要作用。CD<sub>19</sub><sup>+</sup> 可代表 B 淋巴细胞,其主要介导体液免疫应答。本文观察到禽流感病人外周血中的 CD<sub>16</sub><sup>+</sup> CD<sub>56</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>19</sub><sup>+</sup> 水平显著低于健康对照组,表明 NK 细胞和 B 淋巴细胞存在明显损伤,同时提示禽流感病毒会

同时影响机体的细胞免疫和体液免疫。目前,认为禽流感病毒对机体免疫功能损伤的原因可能是:进入免疫活化状态的淋巴细胞在抗病毒过程中出现严重的损伤与凋亡;禽流感病毒直接攻击T淋巴细胞导致其损伤;病毒感染导致血液中的淋巴细胞向组织迁移,引起血液中的检测结果的减少<sup>[4]</sup>。

流感病毒在侵犯呼吸道上皮细胞后,会启动机体的免疫应答,促使MCP-1、RANTES、IL-6、IL-8等一系列细胞因子的产生,对抗病毒感染的免疫过程中起到相应的调节作用<sup>[5]</sup>。例如,IL-12可刺激外周血T细胞、NK细胞分泌IFN-γ从而抑制流感病毒复制。IL-8是主要的炎性细胞因子,对中性粒细胞及T细胞有趋化作用。IL-6可调节机体免疫应答,参与机体抗感染防御<sup>[6]</sup>。细胞因子一方面在机体抗流感病毒免疫调节过程中发挥作用,但值得注意的是,在另一方面,过量表达的细胞因子也会介导机体产生严重的免疫病理损伤。大量炎性细胞因子如IL-6的产生会加重病情,引发严重的呼吸道功能失调及致死性的肺部病理伤害。IL-8、MIP-10可活化中性粒细胞并迁移至感染部位,促进肺部免疫病理的进一步损伤<sup>[7]</sup>。1997年香港H5N1感染患者中发现了这种以炎性细胞因子过度表达及功能失调为特点的“细胞因子风暴”现象,在患者血清中检测到了高水平的IL-6、TNF-α和IFN-γ及sIL-2R<sup>[8]</sup>。越南H5N1禽流感患者的血清中也检测出表达水平显著升高的IP-10,MCP-1,IL-8,IL-6和IL-10<sup>[3]</sup>。

本研究中的H5N1禽流感患者病程第5d的血清中就发现了高水平的TNF、IL-6、IL-8、IL-12、IFN-γ、IP-10及MCP-1,并且随着病程的进展IL-6和IL-10继续升高,MCP-1和IP-10一直维持在较高水平。大量炎症因子及抗炎因子的产生和相互作用造成了广泛的肺组织水肿、感染性肺炎、肺泡出血等症状,使病例发展成急性呼吸窘迫综合征,同时易造成多器官衰竭,这些通常是造成重症禽流感患者死亡的原因<sup>[6]</sup>。提示在禽流感病人的临床治疗过程中应充分考虑这一现象的存在。

综上所述,禽流感病毒能对机体免疫系统造成严重伤害,并能引起细胞因子表达的广泛上调,最终

导致典型的免疫应答介导的病理损伤,但具体的作用机制还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Chan PK. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(S2): S58-S64. DOI: 10.1086/338820
- [2] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2013 [EB/OL]. [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/index.html](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html), 2012-03-12.
- [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. DOI: 10.1038/nm1477
- [4] Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions[J]. J Immunol, 2005, 174(2): 727-734.
- [5] Huang R, Deng SE, Wang Y, et al. Host immune response to avian influenza A H5N1 virus in a BALB/c model[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, 31(5): 406-412. (in Chinese)  
黄韧, 邓少端, 王颖, 等. 禽流感H5N1亚型病毒感染BALB/c小鼠的免疫应答[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2011, 31(5): 406-412.
- [6] Julkunen I, Melén K, Nyqvist M, et al. Inflammatory responses in influenza A virus infection[J]. Vaccine, 2000, 19(S1): S32-S37. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00275-9
- [7] Wang JY, Yu XL, Zhang X, et al. Cytokines profiles post influenza virus infection[J]. J Microbiol Infect, 2012, 7(1): 62-66. (in Chinese)  
王嘉瑜, 俞雪莲, 张曦. 流行性感冒相关细胞因子的研究进展[J]. 微生物与感染, 2012, 7(1): 62-66.
- [8] Lv J, Wang XL. Immunopathology mediated by influenza virus infection[J]. Prog Biochem Biophys, 2009, 36(8): 961-967. (in Chinese)  
吕进, 王希良. 流感病毒感染介导的免疫病理损伤研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(8): 961-967.
- [9] To TF, Chan PK, Chan KF, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus[J]. J Med Virol, 2001, 63(3): 242-246. DOI: 10.1002/1096-9071(200103)63:3<242::AID-JMV1007>3.0.CO;2-N