

流感病毒感染介导的免疫病理损伤研究进展*

吕 进 王希良**

(军事医学科学院微生物流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要 流感病毒感染(如暴发性流行或高致病性禽流感 H5N1 感染)可以造成广泛的病理损伤及严重的并发症, 其肺部病理损伤以肺水肿及广泛的炎性渗出为特点, 并伴有大量的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞浸润及促炎因子和趋化因子的产生。组织学及病理学研究表明, 过度的宿主应答反应是介导病理损伤的主要原因之一, 而这些在流感病毒感染过程中介导组织损伤的免疫分子与细胞, 在病毒的有效清除过程中同样至关重要。主要对甲型流感病毒感染过程中免疫系统的多种效应成分如何引发及加重病理性损伤等有害方面加以综述。为深入了解流感病毒感染防御机制及寻找并设计出既无害又能有效地治疗流感病毒感染的策略提供理论指导。

关键词 流感病毒, 免疫病理损伤, 免疫防御

学科分类号 R373.1+3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00785

流感病毒是呼吸道感染的重要病原体, 在全球范围内呈年度内和年度间周期流行。甲型流感病毒属正粘病毒, 为分节段反义单链 RNA 病毒, 根据其表面糖蛋白 HA 与 NA 的不同分别有 16 个与 9 个亚型, 可以同时感染哺乳动物及鸟类。水鸟类是所有亚型的天然宿主, 其中只有三种 HA 亚型(H1、H2 和 H3)和两种 NA 亚型(N1, N2)可以感染人类。当流感病毒基因节段的替换引起主要抗原 HA 与 NA 基因发生抗原性转换与抗原性漂移时, 均可导致人群对新出现毒株缺乏免疫力, 进而引起流感病毒的爆发流行。呼吸道上皮细胞是流感病毒侵犯的首要部位, 主要通过凋亡的方式死亡, 而上皮细胞则经历坏死性死亡, 细胞的凋亡/坏死可以引发免疫应答, 并产生细胞因子(TNF- α , IL-1 等)与趋化因子[MCP-1(单核细胞趋化蛋白 1)、RANTES、MIP-1 α/β 、IP-10(干扰素诱导蛋白 10)及 IL-8]。体外感染实验证实, 呼吸道上皮细胞可以上调这些促炎调节因子的表达量^[1]。甲型流感病毒特别是高致病性 H5N1 病毒感染后, 体内被感染的肺上皮细胞及肺泡巨噬细胞(AMs)初始释放的炎症调节因子可能导致大量的巨噬细胞、中性粒细胞浸润, 并招募外周血中的大量 T 细胞穿过上皮细胞内屏障渗透至感染的肺组织, 造成早期的炎症性病理损伤, 加重疾病的严重程度。本文主要阐述人及动物模型感

染流感病毒后免疫应答的不同组分在介导免疫性损伤中的作用。

1 多种分子参与流感病毒感染损伤

流感病毒主要感染上呼吸道及支气管的上皮细胞, 感染通常局限在气道和支气管, 但严重时可蔓延至支气管和肺泡, 引起组织间隙性肺炎。呼吸道感染过程中, 肺泡中出现大量的中性粒细胞、淋巴细胞及浆细胞浸润, 引起严重的病理损伤。在高致病性禽流感感染病例中还可引起严重的并发症, 如广泛的肺水肿和急性呼吸窘迫综合症, 以大量的肺内单核细胞浸润及肺泡出血为特点^[2]。重症病例可发生淋巴细胞减少及以肾和心脏功能失调为代表的多器官功能衰竭。高致病性病毒在非呼吸道器官复制的证据很少, 所以, 多器官的累积预示着免疫应答的失调^[3]。1918 年的流感大流行高死亡率主要发生在 15~34 岁的健康青壮年, 进一步证实产生免疫介导的病理损伤。1918 流感大流行与 H5N1 感染的病例, 其突出及严重的现象是一种单核吞噬细

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2009CB522102)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66948678, E-mail: xiliangw@126.com

收稿日期: 2009-02-19, 接受日期: 2009-04-22

胞系统的功能失调而引发的反应性血细胞吞噬作用增强^[4,5],以组织细胞增殖,过度吞噬红细胞、白细胞、血小板和它们的前体细胞为特点^[6]。这种病理现象与严重病例的多器官衰竭有关。目前认为,血细胞吞噬是一种细胞因子驱动的过程,此过程中升高的可溶性 IL-2r、IL-6、IFN- γ 和 TNF- α 与疾病程度的加重及不良预后有关。

1.1 促炎性因子介导的免疫病理损伤作用

长期以来,普遍认为细胞因子及趋化因子在高致病性流感病毒感染所致的严重病理变化中起着重要作用。无论是 1918 年的流感大流行还是 H5N1 禽流感病毒均可引起“细胞因子风暴”效应,以炎性细胞因子的过度产生及功能失调为特点,这些细胞因子与广泛的肺组织水肿、单纯与二重感染性肺炎及急性支气管肺炎的肺泡出血等症状相关。而趋化因子则可以使单核细胞及 T 淋巴细胞由外周血通过血管上皮细胞迁移至感染部位。近期的研究显示,采用反向遗传学技术构建的表达 1918 年流感大流行病毒 HA 和 NA 的突变病毒感染小鼠后,肺中可以检测到高水平的 IFN- γ 、TNF- α 、MIP-2、MIP-1 α 、MCP-1、MIP-2 β 、MIP-3 α 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-18 与 G-CSF^[7]。1997 年香港 H5N1 感染的患者血清中可以检测到高水平的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 及 sIL-2R。而在 2003~2005 年间,同非流感病毒感染的患者相比,感染患者血清中可以检测到高浓度的趋化因子 IP-10、MCP-1 和 IFN- γ 诱导产生的单核因子(MIG)^[8]。同 H3N2、H1N1 相比,H5N1 能更有效地诱导促炎细胞因子的产生,特别是 TNF- α 、IFN- β 、IP-10、MCP-1 和 MIG,还可以产生高水平的趋化因子,在严重的病例中还可以检测到中性粒细胞趋化因子 IL-8。2003 年,H5N1 感染的致死性病例出现了异常高水平的 IP-10 及 MIG。另有一些研究亦强调 IL-6、INF- α 和 TNF- α 水平与疾病的严重程度之间的密切相关性。这些结果支持细胞因子及趋化因子的急剧升高是人感染流感病毒后疾病病变的标志性特征这一观点。

动物模型的研究有助于阐明流感病毒感染后特殊的细胞因子及趋化因子在介导肺病理损伤中的作用。尽管 IFN- γ 在诸如痘病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒及淋巴细胞脉络丛脑炎病毒等其他病毒系统感染中发挥着保护性作用,但多项研究显示,流感病毒感染小鼠后缺乏功能性的 IFN- γ ,表明该细胞因子对于病毒的有效清除及免疫应答的有效激发不是必需的。但是,关于 IFN- γ 在流感病毒感染引

起的免疫病理损伤中作用的研究很少,一项采用野生型流感病毒感染的模型中,将 IFN- γ -/-HA 特异性的 CD8⁺T 细胞输注给病毒感染的小鼠,结果显示 IFN- γ 确实可以改善肺部损伤及炎症的严重程度。相反,另一项呼吸道合胞病毒感染的动物模型实验证实,IFN- γ 的缺失可以明显减低肺部病理损伤,但却延缓了病毒的清除^[9]。TNF- α 在流感病毒感染相关的肺部病理损伤中的作用已有明确的阐述^[10]。大量的 TNF- α 可以诱发一系列的临床及病理学异常,这些异常改变与白细胞及呼吸道上皮细胞、下丘脑-轴引起的发热及心肌活动的抑制等急性炎症性应答有关。流感病毒感染的小鼠实验证实,支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 峰值水平与肺大体及组织学损伤的严重程度直接相关。两项独立研究证实,流感病毒感染的小鼠给予 TNF- α 中和抗体治疗,可以降低肺部炎症浸润,减轻病理变化,同时延长存活时间。有趣的是,同其他参与流感病毒感染免疫损伤的感染介导因子不同,TNF- α 的中和作用对肺部病毒载量及病毒的清除速率并无有害的影响。流感病毒感染特别是高致病性毒株感染常常伴发二重细菌感染,其 IFN- γ 和 TNF- α 在肺病理损伤中的作用可能是通过间接方式介导的。Zhang 等^[11]的研究表明,同单独服用 SEB 相比,给流感病毒感染的小鼠服用葡萄球菌肠毒素 B(SEB)会增加细胞因子的产量,从而使死亡率明显上升,其原因可能直接归于 IFN- γ 与 TNF- α 的作用。

流感病毒感染 MIP-1 α 基因断裂的小鼠模型(是肺 AMs 产生的趋化因子,参与人病理损伤)显示,其炎性细胞浸润和肺部损伤明显降低,但 MIP-1 α -/-小鼠体内病毒的清除延迟,说明这种细胞因子在致病及病毒的有效清除之间存在竞争作用,推测与肺中 T 细胞招募的程度有关。IL-6 在流感病毒感染过程中发挥着双重作用。流感病毒感染患病小鼠疾病行为的生理学分析揭示,同野生型小鼠相比,IL-6-/-的小鼠其病毒载量相关的体温及泵活性明显减弱,且在被感染人的血清及鼻通道盥洗液中 IL-6 水平与疼痛症状及体温值密切相关。细胞因子 IL-1 α 和 IL-1 β 是通过 IL-1R1 发挥作用的重要的促炎症调节因子。研究显示,流感病毒感染 IL-1R-/-小鼠,感染早期可以观察到轻微的病理改变,明显减弱的早期细胞浸润及组织裂解^[12],但病毒清除延迟,死亡率增加。通过感染受体缺陷小鼠,研究趋化因子受体 CCR5(MIP-1 α 、MIP-1 β 及 RANTES)和 CCR2(MCP-1 的主要受体)的功能,结果表明,

尽管病毒滴度相对正常, CCR5-/-小鼠呈现出广泛的炎症应答反应和肺部损伤及很低的存活率。相反, CCR2-/-小鼠则显示病毒载量明显升高, 肺部浸润及肺损伤程度降低, 同时病死率减低。因此, 流感病毒引起的病死率与病毒载量并无必然联系, 突出了疾病过程中免疫介导的病理损伤作用。

1.2 流感病毒结构促进细胞因子引发的免疫病理损伤作用

病毒毒力增强可以引起病毒载量增加, 进而直接放大炎症应答, 放大的炎症应答反过来会导致细胞因子产生过度。与此相一致, 升高的细胞因子水平与病毒载量及致病性密切相关。然而, 已经证实多种病毒成分影响着病毒的毒力, 如 HA(结合肺上皮细胞), NA(酶切释放被感染细胞内的子代病毒)及 PB2(复制功能)^[13], NS1 蛋白则可以直接影响宿主对流感病毒感染的免疫应答反应。1918 年流感病毒的 NS 基因比毒力相对较弱的 H1N1 病毒的 NS 基因能更有效地阻断 IFN- 相关基因的表达。高致病性 H5N1 流感病毒对 IFN 和 TNF- α 抗病毒效应的抵制力与 92 位为谷氨酸的 NS1 蛋白的表达直接相关。有趣的是, 在两项不同的研究实验中, 无论是用表达 H5N1 NS 基因的 H1N1 病毒感染人巨噬细胞的体外实验, 还是感染小鼠的体内实验均证实, 1997 年 H5N1 病毒的 NS 基因可以明显上调细胞因子及趋化因子的表达^[14]。因此, NS1 基因抵抗宿主免疫应答的能力是很明显的, 一方面通过降低对特定细胞因子的敏感性, 另一方面也可能导致细胞因子产量的广泛上调, 最终导致典型的免疫应答介导的病理损伤。

1.3 一氧化氮和氧自由基介导的免疫病理损伤

除了激发很强的促炎性应答, 病毒感染的巨噬细胞还通过释放大量的活性氮介质(NO, NO₂, HNO₂ 等)及活性氧簇(ROS, O₂⁻, OH, H₂O₂⁻)诱导肺部的病理损伤。氮介质与 ROS(活性氧簇)均具有针对一系列病原体的潜在的、非特异性的抗微生物活性, 当过量分泌时会引起广泛的组织损伤。一氧化氮代谢产物作为正常免疫应答的一部分, 由巨噬细胞分泌, 只有在分泌过量时才会对组织造成损伤。活化的巨噬细胞表达高水平的可诱导性一氧化氮合酶, 该酶催化一氧化氮代谢产物的分泌, 可诱导的 NOS2 基因清除后可以防止流感病毒诱导的致死性肺部病理损伤的发生, 没有出现立即的 T 细胞应答, 这些研究直接证实了一氧化氮代谢产物在流感病毒诱导的免疫病理损伤中的作用。NO 在流

感病毒诱导的肺炎中的病理损伤性作用, 表现在流感病毒感染的肺中 NOS 酶活性及可诱导的 NOS mRNA 表达明显增加。采用特异的抗硝基酪氨酸抗体进行深入的免疫组化分析显示, 小鼠肺部过氧化亚硝酸盐的产生是由 NO(AMs 产生)与 O₂⁻(肺泡吞噬细胞产生)相互反应介导的, 是流感病毒诱导的肺部损伤的主要因素。

同样, 流感病毒感染的巨噬细胞产生的 ROS 可以导致明显的肺免疫病理损伤。前期研究表明, 小鼠模型中 ROS 是流感病毒诱导产生肺炎的主要致病分子。Cybb tm1 型(缺少功能性吞噬细胞 NADPH 氧化酶)或用特异性的阻遏剂(MnTE2-Pyp)预处理的小鼠模型中, ROS 的减少可以将感染局限在呼吸道, 降低肺实质的细胞浸润, 从而改善流感病毒感染的预后^[15]。ROS 的减少同样可以降低巨噬细胞表面 CD220 的表达(凋亡细胞的表面标志), 而 ROS 的损伤性效应很可能是通过巨噬细胞凋亡产生的炎性信号介导的^[16]。因此, 采用降低 ROS 的治疗方法可以导致炎性巨噬细胞应答的降低, 而保留 T 细胞应答, 从而限制流感病毒的复制, 降低肺组织的损伤程度。事实上, 抗氧化剂治疗与致死性甲型流感病毒感染的保护率相关。

2 免疫细胞在感染过程中的免疫病理损伤作用

2.1 单核/巨噬细胞与流感病毒免疫性病理损伤的关系

单核/巨噬细胞对流感病毒均易感。单核/巨噬细胞招募至肺实质及肺泡部位是获得性免疫初始激活的关键点。此时, 上皮细胞内病毒的复制仍在发生, 子代病毒扩散至归巢的巨噬细胞。尽管被感染的巨噬细胞支持病毒蛋白的新生合成, 但这一过程在复制第一周期之前被中断, 因此同上皮细胞相比, 由单核细胞和巨噬细胞新生成的病毒非常少, 病毒感染 24~48 h 后, 被感染的单核/巨噬细胞将发生凋亡而死亡, 对于病毒的扩散不发挥关键作用。尽管凋亡发生早, 被感染的单核/巨噬细胞通过转录和快速产生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6, IFN- α / β 等促炎因子及趋化因子的方式促进宿主的应答^[17]。体外研究表明, 甲型流感病毒感染原代单核细胞后即可诱导大量细胞因子的快速产生, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IFN- α / β 的 mRNA 在感染后 2 h 即可检测到, 几小时后, 培养上清中同时可以检测到细胞因子产物, 这一过程主要是由 NK- κ B 和 AP-1

等转录因子介导的。同刚吸附的病毒不同,活病毒对于促炎因子的产生显得更重要,UV 灭活的病毒可以减少 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的产生,但不影响 IFN 的产生。尽管单核细胞与巨噬细胞浸润至感染的肺组织是宿主防御及恢复必不可少的,但这些炎性细胞的大量出现会加重病情、引发严重的呼吸道功能失调及致死性的肺部病理损伤。被病毒感染的单核/巨噬细胞产生的促炎性细胞因子可以通过诱导包括 T、B 细胞在内的相关的血液单核细胞的活化并迁移至感染部位而促进肺部病理损伤。另外,IL-1 β 、TNF- α 及 IFN- α/β 等促炎性细胞因子可以促进 MCP-1、MCP-3 与 IP-10 等趋化因子的上调,导致炎性因子/趋化因子信号的放大及单核/巨噬细胞和 T 淋巴细胞进一步归巢至感染局部。

大量事实表明,巨噬细胞在加剧的细胞因子产生过程中发挥着主要作用。同 H1N1 与 H3N2 亚型流感病毒感染相比,1997 年分离的人 H5N1 感染人原代巨噬细胞后,可以产生更多的促炎性因子,如 TNF- α 。同样,与 H1N1 病毒相比,用 H3N2 病毒感染猪可以引发 AMs 部位 TNF- α 的表达急剧上升。人老年组 H3N2 感染后 TNF- α 生成增加与增高的致死率相关^[8]。采用带有 1918 年 HA 和 NA 糖蛋白的高致病性 H1N1 流感病毒(1918HA/NA: Tx/91)的研究进一步证明了巨噬细胞诱导的细胞因子与肺部病理损伤之间的关系。1918HA/NA: Tx/91 感染小鼠的高致死性与肺组织中病毒复制增加、中性粒细胞与 AMs 的集聚及细胞因子与趋化因子表达上调密切相关。然而,清除巨噬细胞与中性粒细胞并不能阻止免疫病理损伤的发生,却导致病毒载量增加、更高的死亡率及更严重的疾病^[9]。在中性粒细胞清除的模型中,只有一小部分死于亚致死剂量的 1918HA/NA: Tx/91 病毒感染,而在 AMs 缺乏的模型中,致死率高达 100%。这些结果表明,局部的 AMs 与中性粒细胞浸润在流感病毒感染的总体致病中发挥作用,同时,它们在控制病毒生长及促进病毒清除的过程中也发挥着至关重要的作用。因此,在高致病性流感病毒感染过程中,AMs 与浸润的中性粒细胞可以增加细胞因子的产生,进而加重肺部的炎症并趋化相关的单核/巨噬细胞及 T 淋巴细胞至肺组织。尽管这些将导致严重的病理损伤,但这些反应也可能防止宿主发生流感病毒诱导的死亡。此外,LPS 结合共受体-CD14 在流感病毒感染过程中亦发挥着重要作用。CD14 缺陷的巨噬细胞模型显示可以降低病毒诱导细胞因子/趋化

因子的产生。CD14^{-/-}小鼠模型中 CD14 依赖的细胞因子的产生,在流感病毒相关的肺部病理损伤中的作用还没有明确阐述。

甲型流感病毒感染的单核/巨噬细胞可以迅速产生 CC 家族趋化因子(如 RANTES、MIP-1 α 和 MCP-1),以及 CXC 家族趋化因子(IP-10)。相反,中性粒细胞特异的趋化因子如 IL-8 与 GRO- α 的分泌则受抑制,提示这种不同的调控与特异的趋化因子表达主要发挥招募单核细胞与淋巴细胞至病毒感染部位的作用。体外试验显示,甲型流感病毒感染单核细胞将导致快速和明显的 CC 趋化因子的产生,如 MCP-1、MIP-1 α 与 RANTES,这些趋化因子分别在感染后 4 h(MCP-1, MIP-1 α)和 8 h(RANTES)被检测到,16 h 达高峰。流感病毒感染的单核细胞产生趋化因子的数量与非感染性、LPS 诱导的对照组相似。使用热灭活(56 $^{\circ}\text{C}$,破坏病毒聚合酶,停止病毒复制)及 UV- 灭活(破坏病毒的基因)的甲型流感病毒仍可以诱导趋化因子的产生,说明病毒的复制对于一些趋化因子(包括 MIP-1 α 与 MCP-1)的产生并不是必需的,同时也解释了如此快速地分泌趋化因子的可能。提示病毒被单核/巨噬细胞吸附、吞噬、融合的过程足以启动一些 CC 趋化因子产生所需的信号级联反应。相反,当单核细胞感染 UV- 灭活的流感病毒时 IP-10 的分泌量会减少,提示完整的病毒片段对于这些趋化因子的产生是必不可少的。显然,单核/巨噬细胞产生不同的趋化因子的能力依赖于甲型流感病毒的感染性及病毒 RNA 的完整性。CCR5 与 CCR2 缺陷的小鼠模型证实(见细胞因子/趋化因子与动物模型的免疫病理损伤),巨噬细胞在介导流感病毒感染的免疫应答及随后的肺部病理损伤中非常重要,趋化因子受体通常表达于活化的巨噬细胞表面。甲型流感病毒感染 CCR5^{-/-}小鼠,由于巨噬细胞招募增加及严重的肺炎而导致死亡率增加,而 CCR2^{-/-}小鼠则表现为与巨噬细胞聚集延迟相关的存活率增加,由此可以防止流感病毒感染早期的病理性损伤症状。这些研究表明,单核/巨噬细胞如何通过特异性趋化因子的产生改善流感病毒的感染后果,转换宿主抗病毒应答的平衡。然而,大量的细胞被招募至感染部位可以导致免疫损伤甚至死亡。

2.2 CD8⁺T 细胞引起免疫病理损伤中的作用机制

CD8⁺T 细胞对于有效控制流感病毒感染非常重要,无论是在感染的早期(3 天)还是感染的晚期,即 CD8⁺T 细胞应答的峰值期(9~10 天),CD8⁺T 细

胞的出现与病毒的清除同步, 其作用方式为直接裂解被感染细胞或释放 IFN- γ 和 TNF- α 等促炎性细胞因子, 同时构成了炎性细胞渗出的主要成分. 事实证明, CD8⁺T 这些作用机制同样可以引起肺损伤. T 细胞缺陷(nu/nu 或照射过)小鼠感染后肺病理损伤的发展和死亡过程明显延迟, 证实了 CD8⁺T 细胞在免疫性病理损伤中的作用. 通过转基因小鼠流感病毒特异性的 TCR 分析表明, 病毒的感染剂量明显影响着 CD8⁺T 细胞的作用, 低剂量病毒感染时, CD8⁺T 细胞具有保护作用, 当采用高剂量病毒感染时, CD8⁺T 细胞与严重的病理损伤和致死有关. 事实上, 当 CD8⁺T 细胞应答不能有效地控制病毒载量时出现最明显的免疫病理损伤. CD8⁺T 细胞应答的这种剂量效应在老年与壮年小鼠实验中亦可得到证实. 有趣的是, 低剂量病毒感染时, 壮年小鼠可以有效地控制病毒载量, 而用更强的毒株感染时, 可以产生更明显的致死以及病理损伤, 淋巴细胞渗透及 CTL 活性不断增强. HA 特异性的 T 细胞被动转移给小鼠可以在其肺中表达 HA 蛋白, 这种转基因系统可以用来评价肺特异性抗原诱导的 CD8⁺T 细胞在肺病理损伤的特殊作用. 这些小鼠呈现出更严重的肺部渗出, 初始包括转移的 T 细胞, 进而发展为大量的单核吞噬细胞累积. CD8⁺T 细胞介导的病理损伤是严重的、致死性的, 但仅限于肺组织而对外周组织没有损伤.

CD8⁺T 细胞来源的 IFN- γ 介导流感病毒相关的免疫损伤是不确定的. 一项研究表明, CD8⁺T 细胞产生的 IFN- γ 可以增强肺部的病理损伤, 而另一项研究则显示可以减缓肺部的损伤^[20]. 当用表达 H5 的树突细胞刺激人 CD8⁺T 细胞将抑制穿孔素的产生, 增加 CD8⁺T 细胞产生 IFN- γ , 推测这种延长的 IFN- γ 产生将间接加剧免疫损伤, 此种免疫损伤由增强的噬血细胞吞噬作用为主的巨噬细胞介导^[21]. HA 转基因小鼠模型研究显示, CD8⁺T 细胞产生的 TNF- α 在肺损伤中的介导作用也是很重要的. 将 TNF- α -/-HA 特异性的 T 细胞转移给肺上皮细胞表达 HA 的小鼠, 并不能引发由 TNF- α /+介导的肺部浸润及损伤. 此过程中 TNF- α 介导的病理损伤主要通过直接裂解被感染的细胞、肺泡上皮细胞产生趋化因子 MCP-1 和 MIP-2, 及随后招募巨噬细胞而产生^[22]. 体外系统实验证实, CD8⁺T 细胞起源的 TNF- α 可以杀伤肺泡上皮细胞, 在无穿孔素的存在下, CD8⁺T 细胞的细胞毒效应的发挥主要是通过 TNF- α 介导的. 这对于 H5N1 禽流感病毒感

染有重要的指导意义, 因为其感染主要通过 CD8⁺T 细胞抑制穿孔素的产生. 流感病毒特异性的 CD8⁺T 细胞的激活及随后的病理性损伤可能依赖于 T 细胞表面的 OX40 与抗原递呈细胞表面上的 OX40 受体之间的相互作用. OX40 是 TNF 受体超家族的成员之一, 表达于活化的 T 细胞、B 细胞、DC 细胞及血管内皮细胞, 是一种共刺激分子, 参与 T 细胞的迁移、增殖和细胞因子的产生. 通过 OX40-Ig 阻止 OX40-OX40L 之间的相互作用导致肺组织内 CD8⁺/CD4⁺T 细胞及中性粒细胞的浸润, 同时引起 CD8⁺T 细胞产生 TNF- α 减少^[23]. 这些与感染动物体重降低及疾病程度的减轻密切相关. 目前的事实表明, CD8⁺T 细胞的病理损伤作用很大程度上是由内源性细胞因子产生失调介导的, 这通常发生在病毒清除延迟时, 由此延长 CD8⁺T 细胞活化及细胞因子的产生, 这些效应将促进肺上皮细胞直接杀伤作用与单核细胞的浸润.

2.3 CD4⁺T 细胞在甲型流感病毒感染的免疫病理损伤中的作用

CD4⁺T 细胞通过放大 CD8⁺T 细胞及 B 细胞应答, 在甲型流感病毒的清除过程中发挥着重要作用^[24]. 定量免疫 CD8⁺T 细胞(β M-/-)或 B 细胞(μ MT)缺陷, 并清除 CD4⁺mAb 的小鼠, 可以显著延迟病毒清除时间, 增加病死率. 然而, 由于流感病毒感染后 CD4⁺T 细胞数量少(Bal 中的 CD4⁺T 细胞数量较 CD8⁺T 细胞低 30%~50%)及缺乏相应试剂, 其研究受到很大阻碍. MHC- I 类分子四聚体可以有效地定量 CD8⁺T 细胞应答, 而 MHC- II 类分子多聚体亲和力低, 且在应用过程中遇到很多问题, 所以在流感病毒感染的小鼠模型中关于 CD4⁺T 细胞的表位不很明确, 其在免疫病理损伤中的作用一直没有深入研究. 众所周知, CD4⁺T 细胞分泌细胞因子参与免疫应答的调控, 并根据分泌细胞因子的种类不同分为 T_H1 和 T_H2 亚群. 伴随甲型流感病毒感染, CD4⁺T 细胞分泌一系列细胞因子包括 IL-2、IL-10 与 IFN- γ . 尽管 IFN- γ 是流感病毒感染后 CD4⁺T 细胞释放的主要细胞因子, 但该因子在介导免疫损伤中的作用还不清楚. CD4⁺T 细胞来源的 IFN- γ 可能起到促进抗体亚型(IgG2A)转换的作用, 进而减轻免疫性病理损伤. 被动转移实验证实, 抗原特异性的 CD4⁺T 细胞 T_H1 克隆(分泌 IFN- γ 和 IL-2)可以同时保护 BALB/C 小鼠免于潜在的致死性流感病毒感染, 并降低免疫病理性损伤. 组织切片分析显示肺内炎性病灶很少, 而被动

转移 CD4⁺T 细胞 T_H2 克隆(分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10)并不能引起任何保护性应答,相反却与病毒清除延迟与严重的肺淤血有关. IL-4 与 IL-5 均参与加重的免疫病理损伤,被动转移 T_H2 T 细胞克隆可以观察到肺部嗜酸性粒细胞明显增多. 因此, CD4⁺T 细胞可能介导肺组织的免疫病理损伤. 尽管 CD8⁺T 细胞应答裂解流感病毒感染的上皮细胞引起免疫病理损伤已有明确阐述,但体内 CD4⁺T 细胞能否发挥溶细胞作用仍然是个有争议的问题. Lukacher 等生产的一株流感病毒特异性的 CD4⁺T 细胞克隆,对表达转染的 MHC II 基因产物的靶细胞有直接的溶细胞活性,且该活性在加入 CD4⁺T 细胞单抗之后消失. β 2m 基因缺陷小鼠脾与肺来源的流感病毒特异性 CD4⁺T 细胞可以观察到同样的溶细胞效应,当加入 CD4⁺T 细胞单抗时这种活性亦消失. 有趣的是,流感病毒特异的 CD4⁺T 细胞裂解靶细胞的能力在骨髓嵌合体中不能发挥. 因此, CD4⁺T 效应细胞并不是直接靶向呼吸道被感染上皮细胞(缺少 MHC-II 抗原),而是通过基于抗体或细胞因子机制介导的病毒清除机制发挥作用. 流感病毒 H4N2 感染后 CD4⁺T 细胞表面的 OX40 载体介导免疫病理损伤的作用亦有论述. OX40Ig 融合蛋白免疫的小鼠,其疾病程度及体重减轻的缓解与肺中 CD4⁺T 细胞浸润下降相关. 这些被认为是 CD4⁺T 细胞增殖减少及凋亡增加的反应. 总之,试验性研究发现,流感病毒感染激发的 CD4⁺T 细胞既可以加重也可以减轻肺部免疫病理损伤,但其在自然发生的疾病中的作用需要深入研究.

3 结 语

综上所述,机体产生的对甲型流感病毒的免疫力是多层面的、高度复杂的、涉及宿主应答的多个系统,所有这些对病毒的有效清除都是必需的. 加剧其中任何一种应答因素将会导致严重的免疫病理损伤. 有的研究已经明确显示这种免疫介导的病理损伤确实存在,目前对于这些效应在临床干预治疗中的可能机制还没有明确的了解. 除了其他的考虑之外,现有的数据显示几乎所有病例中(除了 TNF- γ),肺和系统性病理的介导因子对于病毒的清除都是非常重要的. 任何如类固醇类药物等能够激发流感病毒特异性的免疫应答的治疗手段都应该具有高度精密性,能够确保在免疫系统的正面与负面效应之间达到最佳平衡. 并且,已有研究明确显示,任何严重的免疫性病理损伤都是不能有效清除

病毒感染的结果,控制免疫性病理应答的关键可能在于机体控制病毒载量的能力.

参 考 文 献

- 1 Chan M C, Cheung C Y, Chui W H, *et al.* Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res*, 2005, **6**(1): 135~141
- 2 Hsieh Y C, Wu T Z, Liu D P, *et al.* Influenza pandemics: past, present and future. *J Formos Med Assoc*, 2006, **105**(1): 1~6
- 3 de Jong M D, Simmons C P, Thanh T T, *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 2006, **12**(10): 1203~1207
- 4 Peiris J S, Yu W C, Leung C W, *et al.* Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*, 2004, **363**(9409): 617~619
- 5 To K F, Chan P K, Chan K F, *et al.* Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol*, 2001, **63**(3): 242~246
- 6 Mou S S, Nakagawa T A, Riemer E C, *et al.* Hemophagocytic lymphohistiocytosis complicating influenza A infection. *Pediatrics*, 2006, **118**(1): 216~219
- 7 Kobasa D, Takada A, Shinya K, *et al.* Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 2004, **431**(7009): 703~707
- 8 Korteweg C, Gu J. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *Am J Pathol*, 2008, **172**(5): 1155~1170
- 9 Ostler T, Davidson W, Ehl S. Virus clearance and immunopathology by CD8(+) T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *Eur J Immunol*, 2002, **32**(8): 2117~2123
- 10 Bruder D, Srikiatkachorn A, Enelow R I. Cellular immunity and lung injury in respiratory virus infection. *Viral Immunol*, 2006, **19**(2): 147~155
- 11 Zhang W J, Sarawar S, Nguyen P, *et al.* Lethal synergism between influenza infection and staphylococcal enterotoxin B in mice. *J Immunol*, 1996, **157**(11): 5049~5060
- 12 Schmitz N, Kurrer M, Bachmann M F, *et al.* Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J Virol*, 2005, **79**(10): 6441~6448
- 13 Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis*, 2006, **12**(6): 881~886
- 14 Lipatov A S, Andreansky S, Webby R J, *et al.* Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol*, 2005, **86**(Pt 4): 1121~1130
- 15 Snelgrove R J, Edwards L, Rae A J, *et al.* An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *Eur J Immunol*, 2006, **36**(6): 1364~1373

- 16 Rosenblum M D, Olasz E, Woodliff J E, *et al.* CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood*, 2004, **103**(7): 2691~2698
- 17 Kaufmann A, Salentin R, Meyer R G, *et al.* Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology*, 2001, **204**(5): 603~613
- 18 Seo S H, Webby R, Webster R G. No apoptotic deaths and different levels of inductions of inflammatory cytokines in alveolar macrophages infected with influenza viruses. *Virology*, 2004, **329**(2): 270~279
- 19 Tumpey T M, García-Sastre A, Taubenberger J K, *et al.* Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol*, 2005, **79**(23): 14933~14944
- 20 Wiley J A, Cerwenka A, Harkema J R, *et al.* Production of interferon-gamma by influenza hemagglutinin-specific CD8 effector T cells influences the development of pulmonary immunopathology. *Am J Pathol*, 2001, **158**(1): 119~130
- 21 Hsieh S M, Chang S C. Insufficient perforin expression in CD8⁺ T cells in response to hemagglutinin from avian influenza (H5N1) virus. *J Immunol*, 2006, **176**(8): 4530~4533
- 22 Small B A, Dressel S A, Lawrence C W, *et al.* CD8 (+) T cell-mediated injury *in vivo* progresses in the absence of effector T cells. *J Exp Med*, 2001, **194**(12): 1835~1846
- 23 Humphreys I R, Walzl G, Edwards L, *et al.* A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *J Exp Med*, 2003, **198**(8): 1237~1242
- 24 Brown D M, Román E, Swain S L. CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol*, 2004, **16**(3): 171~177

Immunopathology Mediated by Influenza Virus Infection*

LÜ Jin, WANG Xi-Liang**

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract Pathogen infection could induce specific immune response which will results in immunopathology when overreacted. Severe complications arising from influenza virus infection (pandemic influenza or the highly pathogenic avian H5N1 viruses) are often associated with rapid, massive inflammatory cell infiltration, acute respiratory distress, reactive hemophagocytosis and multiple organ involvement. Histological and pathological studies show that a critical role for an excessive host response in mediating this pathology. Generally, the same inflammatory factors mediating tissue damage during the anti-influenza immune response are also essential for efficient elimination of virus. It was discussed how various effector arms of immune system can act deleteriously to initiate or exacerbate pathological damage in this viral infection. It will be helpful to understand the protective mechanism of influenza virus infection and a significant challenge in the design of harmless yet effective therapeutic strategies for tackling influenza virus.

Key words influenza virus, immunopathology, protective immunity

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00785

*This work was supported by a grant from The National Basic Research Program of China (2009CB522102).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66948678, E-mail: xiliangw@126.com

Received: February 19, 2009 Accepted: April 22, 2009