

## 重症及危重症甲型 H1N1 流感患者发病机制探讨

蒋明彦<sup>1</sup>, 刘国平<sup>1</sup>, 曾建平<sup>1</sup>, 赵子文<sup>2</sup>, 付杰伟<sup>1</sup>, 刘康<sup>1</sup>, 袁光雄<sup>1</sup>

(1 湘潭市中心医院, 湖南湘潭 411002; 2 广州市第一人民医院, 广东广州 510180)

**[摘要]** **目的** 探讨重症及危重症甲型 H1N1 流感(甲流)患者的发病机制。**方法** 分析某院收治的重症及危重症甲流患者外周血细胞在治疗前后的变化, 同时通过流式细胞仪结合单克隆抗体动态观察危重症甲流患者淋巴细胞协同刺激分子与凋亡情况的变化。**结果** 重症及危重症甲流患者治疗前白细胞数为  $(2.55 \pm 0.87) \times 10^9/L$ , 淋巴细胞数为  $(1.02 \pm 0.54) \times 10^9/L$ , 与治疗前白细胞数  $(6.95 \pm 4.36) \times 10^9/L$  及淋巴细胞数  $(2.13 \pm 0.78) \times 10^9/L$  比较, 差异有统计学意义(分别  $t = 3.28, P = 0.01; t = 9.52, P = 0.00$ ); 而治疗前红细胞数  $(4.10 \pm 0.45) \times 10^{12}/L$  与治疗前红细胞数  $(4.14 \pm 0.39) \times 10^{12}/L$  比较, 差异无统计学意义( $t = 0.35, P = 0.73$ )。随着病情的好转, 危重症甲流患者淋巴细胞数逐渐增多, 同时其表面的协同刺激分子 CD28、CD152 表达降低, 患者淋巴细胞的凋亡信号 CD95 也逐渐减低。**结论** 甲流病毒诱导 T 淋巴细胞活化、增殖障碍及过度启动 T 淋巴细胞凋亡可能与淋巴细胞数及白细胞数量下降有关, 这可能在重症及危重症甲流患者的发病机制中起非常重要的作用。

**[关键词]** 流感; 甲型 H1N1 流感; 红细胞; 白细胞; 淋巴细胞; 协同刺激分子; 凋亡

**[中图分类号]** R511.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)05-0326-05

## Investigation on the pathogenesis of severe and critical H1N1 influenza A

JIANG Ming-yan<sup>1</sup>, LIU Guo-ping<sup>1</sup>, ZENG Jian-ping<sup>1</sup>, ZHAO Zi-wen<sup>2</sup>, FU Jie-wei<sup>1</sup>, LIU Kang<sup>1</sup>, YUANG Guang-xiong<sup>1</sup> (1 Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411002, China; 2 Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the pathogenesis of severe and critical H1N1 influenza A. **Methods** Before and after medical treatment, changes in peripheral blood cells of patients with severe or critical H1N1 influenza A were analyzed, and changes in co-stimulatory molecules and apoptosis on lymphocytes of patients with severe or critical H1N1 influenza A were dynamically observed via flow cytometry and monoclonal antibodies. **Results** For patients with severe or critical H1N1 influenza A, the count of leukocytes and lymphocytes before treatment were  $(2.55 \pm 0.87) \times 10^9/L$  and  $(1.02 \pm 0.54) \times 10^9/L$ , respectively, after treatment were  $(6.95 \pm 4.36) \times 10^9/L$  and  $(2.13 \pm 0.78) \times 10^9/L$ , respectively, there was significant difference( $t = 3.28, P = 0.01; t = 9.52, P = 0.00$ ); count of erythrocyte before and after treatment were  $(4.10 \pm 0.45) \times 10^{12}/L$  and  $(4.14 \pm 0.39) \times 10^{12}/L$ , respectively, there was no statistical difference ( $t = 0.35, P = 0.73$ ). During the recovery phase, lymphocyte count increased gradually, the expression of co-stimulatory molecule CD28 and CD152, and the apoptosis signal CD95 of T lymphocytes decreased. **Conclusion** H1N1 influenza virus A can repress the activation and proliferation of T lymphocytes, and induce over-activation apoptosis of T lymphocytes, cause the decrease in lymphocyte and leukocyte count, which may play an important role in the pathogenesis of severe and critical H1N1 influenza A.

**[Key words]** influenza; H1N1 influenza A; erythrocyte; leukocyte; lymphocyte; co-stimulatory molecule; apoptosis

[Chin Infect Control, 2011, 10(5):326-330]

2009 年 6 月, 世界卫生组织(WHO)宣布将甲型 H1N1 流感(甲流)大流行警告级别提升为 6 级, 全球进入流感大流行阶段。此次流感为一种新型呼

吸道传染病, 出现了大量的重症及危重症病例, 甚至是死亡病例<sup>[1-2]</sup>。甲流重症及危重症病例发病机制不详, 从而给治疗带来了非常大的难度。因此, 探讨

[收稿日期] 2011-07-15

[作者简介] 蒋明彦(1979-), 男(汉族), 湖南省益阳市人, 主治医师, 主要从事重症肺炎与免疫病理学研究。

[通讯作者] 曾建平 E-mail: J8283174@SOHU.COM

甲流重症及危重症患者的发病机制显得尤为重要。

## 1 资料与方法

1.1 资料来源 收集 2009 年 8 月—2010 年 7 月本院连续收治的甲流患者病历资料进行分析。

1.2 诊断标准 入选病例均符合我国卫生部 2009 年发布的《甲型 H1N1 流感诊疗方案》(第 3 版)中的甲流诊断标准。出现以下情况之一者为重症病例:持续高热时间 > 3 d; 剧烈咳嗽, 咳脓痰、血痰或胸痛; 呼吸频率快, 呼吸困难, 口唇紫绀; 神志改变; 反应迟钝、嗜睡、躁动、惊厥等; 严重呕吐、腹泻, 出现脱水表现; 影像学检查有肺炎征象; 血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)等心肌酶水平迅速增高; 原有基础疾病明显加重。出现以下情况之一者为危重症病例: 呼吸衰竭; 感染中毒性休克; 多脏器功能不全; 出现其他需进行监护治疗的严重临床情况; 并同时满足血常规白细胞数  $< 4.0 \times 10^9/L$ 。剔除标准: 具有严重心肺功能不全者。

1.3 研究方法 在所有入选的重症及危重症甲流患者资料中, 取在本院第 1 次检查的血常规资料及治疗后出院前复查的一次血常规结果(用 EDTA-K3 抗凝管抽取全血标本 2 mL, 均为本院检验科检测)。其中 1 例危重症患者多次复查血常规, 同时在 EDTA-K3 抗凝血中取全血标本检测 T 淋巴细胞上的协同刺激分子及凋亡信号的变化。向已编号 a 管中加 FITC-IgG1/PE-IgG1/APC-IgG1/PC5-IgG1; b 管中加 FITC-CD28/PE-CD152/APC-CD95/PC5-CD4。每种单克隆抗体 5  $\mu$ L。向试管同型对照管(a)、试验管(b)中分别加入混匀的 100  $\mu$ L 抗凝血, 混匀, 避光, 室温孵育 20 min。溶血: 加入 1  $\times$  溶血液(FACS 溶解液) 1 mL 迅速于混旋器上混匀, 再置

室温暗处孵育 10 min 后, 1 000 r/min 离心 5 min。吸去上清, 留下约 50  $\mu$ L 残液(以免沉淀中细胞丢失)。加入 PBS 2 mL 洗涤, 于混旋器彻底混匀沉淀物后, 以 1 000 r/min 离心沉淀 5 min。吸去上清, 加入 500  $\mu$ L PBS 混匀, 上机检测。检测前用 Flow-Check 和 Flow-Set 校准流式细胞仪的光路和液路, 确定其 CV 值  $< 2\%$ 。将光路调整至最佳, 检测阴性对照; 调整电压和颜色补偿, 收集 10 000 个细胞, 以 PC5-CD4 设门对 CD4 T 淋巴细胞的 CD28、CD152 及 CD95 进行分析。

1.4 统计学处理 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组均数比较采用配对 *t* 检验。所有统计学分析均应用 SPSS 11.5 For Windows 软件进行,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 重症及危重症甲流患者的一般情况 最终有 12 例重症及 1 例危重症甲流患者入选, 均经咽拭子甲流病毒核酸检测阳性确诊。其中男性 6 例, 女性 7 例(1 例危重症); 年龄 3~47 岁。此 13 例重症及危重症甲流患者均给予了磷酸奥司他韦抗病毒治疗以及抗菌药物的治疗, 其中 1 例危重症甲流患者给予气管插管接呼吸机辅助通气治疗。

2.2 重症及危重症甲流患者治疗前后外周血细胞计数变化 重症及危重症甲流患者白细胞数为  $(2.55 \pm 0.87) \times 10^9/L$ , 淋巴细胞数为  $(1.02 \pm 0.54) \times 10^9/L$ , 与治疗前白细胞数  $(6.95 \pm 4.36) \times 10^9/L$  及淋巴细胞数  $(2.13 \pm 0.78) \times 10^9/L$  比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而治疗前红细胞数  $(4.10 \pm 0.45) \times 10^{12}/L$  与治疗前红细胞数  $(4.14 \pm 0.39) \times 10^{12}/L$  比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1、2。

表 1 甲流患者治疗前后外周血细胞的具体变化

Table 1 Detailed data on changes in peripheral blood cells of patients with severe and critical H1N1 influenza A before and after treatment

No. of cases	Sex	Age (years)	State of illness	Before treatment			After treatment		
				Erythrocyte ( $\times 10^{12}/L$ )	Leukocyte ( $\times 10^9/L$ )	Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )	Erythrocyte ( $\times 10^{12}/L$ )	Leukocyte ( $\times 10^9/L$ )	Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )
1	Male	7	Severe	4.42	3.80	2.30	3.93	7.10	3.30
2	Male	3	Severe	4.19	3.60	1.50	4.32	5.70	3.20
3	Male	12	Severe	4.18	3.30	0.90	4.47	3.90	2.10
4	Female	4	Severe	4.47	3.50	0.80	4.19	3.10	2.20
5	Male	6	Severe	4.40	2.90	1.40	4.17	3.70	2.30
6	Female	12	Severe	4.43	2.70	0.90	4.25	3.50	1.90
7	Female	25	Severe	4.05	1.80	0.70	4.28	7.10	1.40
8	Female	21	Severe	3.30	0.90	0.30	3.01	9.90	0.90

续表 1

No. of cases	Sex	Age (years)	State of illness	Before treatment			After treatment		
				Erythrocyte ( $\times 10^{12}/L$ )	Leukocyte ( $\times 10^9/L$ )	Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )	Erythrocyte ( $\times 10^{12}/L$ )	Leukocyte ( $\times 10^9/L$ )	Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )
9	Female	5	Severe	4.17	1.70	0.70	4.20	5.60	1.80
10	Male	7	Severe	4.33	1.90	1.10	4.16	19.9	2.30
11	Female	3	Severe	4.22	2.20	1.00	4.24	8.20	1.50
12	Female	47	Critical	3.00	2.10	0.30	3.89	5.90	1.40
13	Male	4	Severe	4.16	2.80	1.40	4.69	6.80	3.50

表 2 13 例重症及危重症甲流患者治疗前后外周血细胞的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Changes in peripheral blood cells of patient with critical H1N1 influenza A before and after treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

Peripheral blood cells	Before treatment	After treatment	<i>t</i>	<i>P</i>
Erythrocyte( $\times 10^{12}/L$ )	4.10 $\pm$ 0.45	4.14 $\pm$ 0.39	0.35	0.73
Leukocyte( $\times 10^9/L$ )	2.55 $\pm$ 0.87	6.95 $\pm$ 4.36	3.28	0.01
Lymphocyte( $\times 10^9/L$ )	1.02 $\pm$ 0.54	2.13 $\pm$ 0.78	9.52	0.00

2.3 动态观察危重症甲流患者淋巴细胞协同刺激分子及凋亡信号的变化 此例危重症甲流患者随着病情的好转,淋巴细胞数逐渐增多,同时其表面的协

同刺激分子 CD28、CD152 表达降低,而协同刺激分子 CD28 相对 CD152 是增高的;另外,患者淋巴细胞的凋亡信号 CD95 也逐渐减低。见图 1、2。

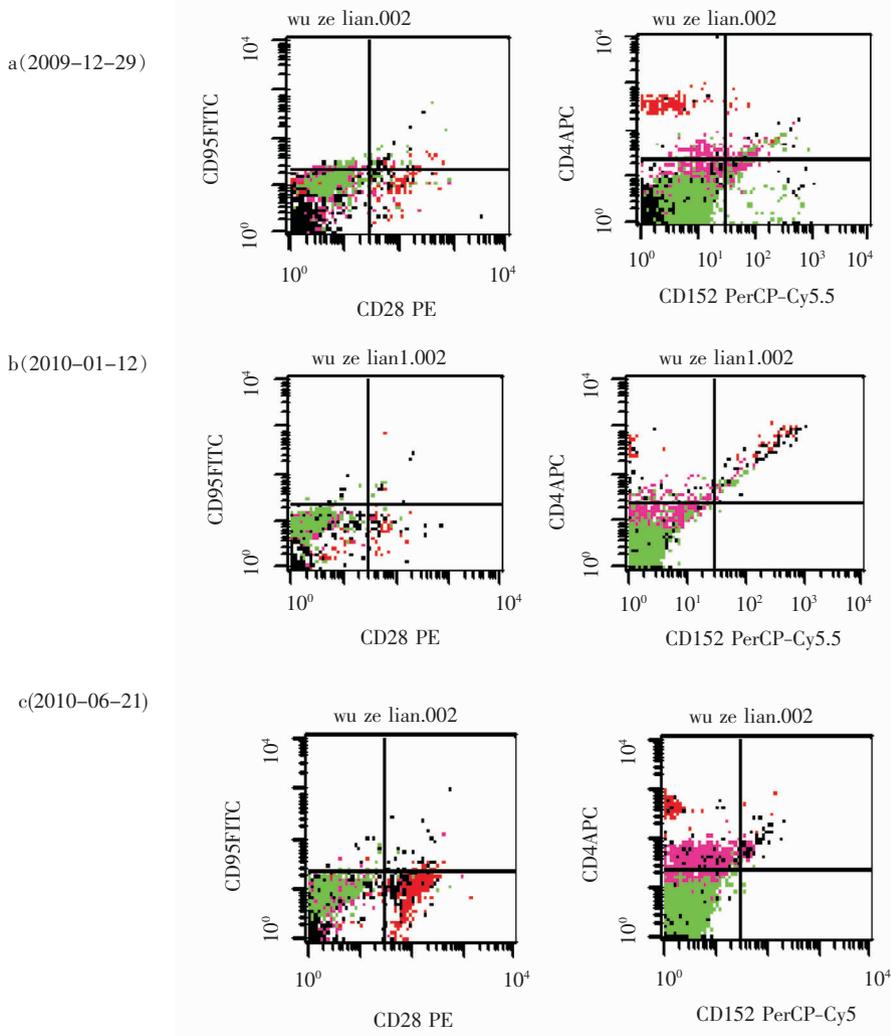


图 1 不同时间点检测危重症甲流患者淋巴细胞表位的变化

Figure 1 Changes in lymphocyte epitope of patient with critical H1N1 influenza A at different time points

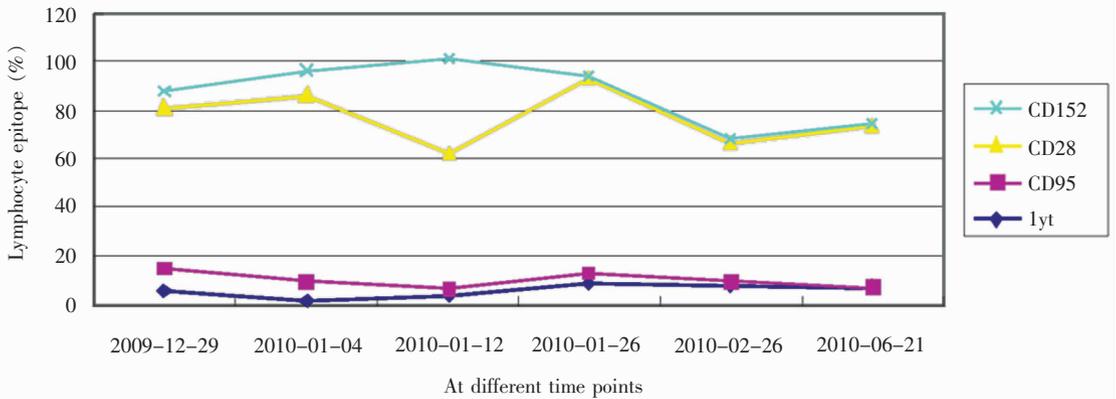


图 2 危重症甲流患者淋巴细胞表位变化

Figure 2 Changes in lymphocyte epitope of patient with critical H1N1 influenza A

### 3 讨论

在本次甲流流行期间,我们曾回顾性研究发现淋巴细胞数减少可能是重症及危重症甲流患者的危险因素。而本组资料亦发现重症及危重症甲流患者外周血淋巴细胞数减少,它可能也是导致白细胞减少的原因。随着重症及危重症甲流患者病情的好转,外周血的淋巴细胞数增加( $P < 0.05$ )。

人类对病毒的免疫反应究竟是个怎样的过程?淋巴细胞又在其中起着怎样的作用?研究<sup>[3]</sup>表明,机体免疫防御机制的启动通常涉及 T 淋巴细胞的活化、增殖、分化。因此,对重症及危重症甲流患者 T 淋巴细胞的活化、增殖、分化的启动研究就显得尤为重要。T 淋巴细胞活化、增殖、分化为效应细胞需要信号刺激。CD28 和 CD152 是一对具有正负调节功能的重要 T 淋巴细胞协同刺激分子,并与相关的 CD80/CD86 结合发挥相反的效应<sup>[4]</sup>。T 淋巴细胞无能 (anergy):是指抗原刺激后,T 淋巴细胞产生的一种主动灭活行为,但仍保持一定时间低反应活力的防御机制。在抗原刺激去除后,T 淋巴细胞的活力和功能可以恢复。缺乏激活型协同刺激分子(如 CD28)或存在过高的表达抑制型协同刺激分子(如 CD152),都能导致 T 淋巴细胞无能<sup>[4]</sup>。重症及危重症甲流患者淋巴细胞数减少是与这些患者淋巴细胞对 H1N1 病毒感染的增殖反应减弱有关,还是与 H1N1 病毒感染诱导了淋巴细胞的过度凋亡有关,目前尚不清楚。国外 Thomas 等<sup>[3]</sup>的研究发现,CD4 阳性 T 淋巴细胞对 H1N1 病毒感染的增殖反应减弱。另外,研究<sup>[5-6]</sup>发现 H1N1 病毒抑制了自

然杀伤细胞的活化,可能将影响自然杀伤细胞信号分子 CD80/CD86 表达,这些都可能影响淋巴细胞的活化、增殖,也许是重症及危重症甲流患者淋巴细胞减少的一个重要原因。

我们对 1 例危重症甲流患者淋巴细胞协同刺激分子的动态观察发现,其外周血中 CD4 阳性 T 淋巴细胞表面的协同刺激分子 CD28、CD152 表达增加,表明患者在抗原作用下,为维持机体内环境的稳定启动了细胞免疫,T 淋巴细胞将活化、增殖、分化为效应细胞。然而,此例危重症甲流患者淋巴细胞数并未增加,而是明显减低;患者的免疫功能处于相对抑制状态。可能有以下原因:(1)由于抗原持续作用,导致 T 淋巴细胞起抑制作用的协同刺激分子 CD152 表达过度增加,使 T 细胞处于“免疫无能”状态。这个过程是可逆的。当抗原刺激清除后,T 淋巴细胞的活化、增殖、分化能力可以恢复。我们观察到本例危重症甲流患者随着病情的好转,淋巴细胞上的协同刺激分子 CD152 表达减少,其淋巴细胞数增加。(2)危重症甲流患者体内的抗原持续刺激可进一步诱导 T 淋巴细胞凋亡,即活化诱导的 T 细胞死亡 (activation-induced cell death, AICD)<sup>[7-8]</sup>,同样将造成淋巴细胞数减少。在我们的观察中,发现危重症甲流患者淋巴细胞上的凋亡信号 CD95 明显增加,但随着病情的好转,淋巴细胞上的凋亡信号 CD95 表达下降。这些都将导致淋巴细胞数减少。研究<sup>[7]</sup>表明,T 淋巴细胞增殖和细胞因子分泌缺陷与感染引起的病死率相关;免疫功能紊乱与大量淋巴细胞凋亡及免疫受抑状态密切相关。甲流病毒引起淋巴细胞的免疫异常可能参与了重症及危重症甲流的发病过程。

综上所述,甲流病毒诱导 T 淋巴细胞活化、增殖障碍及过度启动 T 淋巴细胞凋亡可能与淋巴细胞数及白细胞数量下降有关,这可能在重症及危重症甲流患者的发病机制中起着非常重要的作用。

#### [参考文献]

- [1] Echevarría-Zuno S, Mejía-Aranguré J M, Mar-Obeso A J, *et al.* Infection and death from influenza A H1N1 virus in Mexico: a retrospective analysis [J]. *Lancet*, 2009, 374(9707): 2072 - 2079.
- [2] 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.
- [3] Thomas P G, Brown S A, Morris M Y, *et al.* Physiological numbers of CD4 + T cells generate weak recall responses following influenza virus challenge [J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 1721 - 1727.
- [4] Schwartz R H. T Cell Anergy [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 305 - 334.
- [5] Collins M, Carreno B M. The B7 family of ligands and its receptors: new for costimulation and inhibition of immune responses [J]. *Ann Rev Immunol*, 2002, 20: 29 - 53.
- [6] Mao H, Tu W, Liu Y, *et al.* Inhibition of human natural killer cell activity by influenza virions and hemagglutinin [J]. *J Virol*, 2010, 84(9): 4148 - 4157.
- [7] Felmet K A, Hall M W, Clark R S, *et al.* Prolonged phopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure [J]. *J Immunol*, 2005, 174: 3765 - 3772.
- [8] Green D R, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells [J]. *Immunol Rev*, 2003, 193: 70 - 81.

## · 信息 ·

### 全球人兽共患病流行态势严峻

9月15日在京举行的第三届全国人畜共患病学术研讨会披露,在已知的200多种动物传染病和150多种动物寄生虫病中,至少超过一半为人兽共患病。其中,对人类构成严重危害的有近百种,新的人兽共患病还在不断出现。与会专家呼吁,人兽共患病需多部门联防联控,并加大投入,加强跨学科协作研究,真正实现预防为主、防控关口前移。

根据大会报告,当今新发传染病70%以上都来自于动物。当前全球人兽共患病的一个显著流行趋势是,一些此前已得到控制的疫病死灰复燃,再度成为严重公共卫生问题,其中包括白喉、鼠疫、霍乱等细菌性传染病,狂犬病、登革热、乙脑等病毒性传染病,弓形体病等寄生虫病。最近15年,世界卫生组织已收到全球登革热病例报告60万例,其中2.4万人死亡。

专家指出,人兽共患病也是我国当今面临的重要公共卫生问题。目前,一些人兽共患病疫情仍居高不下,有些还处于上升中;尚未在我国出现的人兽共患病也面临输入风险。会议由中国科学技术协会、中华预防医学会、中国畜牧兽医学学会、中国微生物学会联合召开。

### 防控人畜布病疫情刻不容缓

在日前召开的第三届全国人畜共患病会议上,布病防控科技工作者共同发出建议书,建议将布病临时调整为人间甲类、家畜一类传染病进行管理,强化人、畜布病疫情报告管理,建立卫生和农业系统疫控部门共同防治布病的组织机构,共同展开布病防治。

执笔该建议书的中国疾控中心传染病预防控制所研究员崔步云介绍,布病是由布鲁菌引起的一种人畜共患病,为国家法定人间乙类传染病和动物二类传染病。新中国成立以来,我国全面开展了布病防控,20世纪80年代~90年代初期布病得到控制,1992年全国报告新发病例219例,发病率为0.02/10万,为历史上最低水平。此后,发病率逐年上升,发病区域不断扩大。2010年报告布病达35 043例,发病率达2.63/10万。今年上半年报告布病25 309例,较去年同期增加38.88%。全国布病发病区(县)数由1999年的127个,增加到2010年26个省(市、区)的955个县(区),已经成为严重公共卫生问题。

与会专家指出,人间布病疫情已经很严重,但近年来布病现场课题研究和日常防疫工作中仍发现有50%以上漏报率。由于一些医院的诊断问题,布病治疗归口和实施部门的合法化、规范化治疗、医疗负担以及难以治愈的慢性化问题,至今困扰着越来越多的农牧民及职业人群。

与会专家还就开展布病家畜疫情流行病学调查、布病病原流行病学研究、规范布病治疗机构行医行为等提出了具体建议。

(来源: <http://www.cpmo.org.cn>)