

# 人 H7N9 禽流感病毒、高致病 H5N1 禽流感病毒 及 H1N1 流感病毒感染小鼠特征分析

刘晨风<sup>1,2</sup>, 吴小红<sup>2</sup>, 赵光宇<sup>2</sup>, 高同同<sup>2</sup>, 曾扬<sup>2</sup>, 唐健<sup>2</sup>, 于虹<sup>2</sup>, 孙世惠<sup>2</sup>, 周育森<sup>1,2</sup>

(1. 安徽医科大学北京微生物流行病学研究所, 合肥 230032;  
2. 北京微生物流行病学研究所病原微生物与生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

**【摘要】** 目的 对比分析人高致病 H5N1 禽流感病毒、H7N9 禽流感病毒及 H1N1 流感病毒分别感染 BALB/c 小鼠后的机体反应特征。方法 分别以 H7N9 病毒、H5N1 病毒和 H1N1 病毒滴鼻感染 BALB/c 小鼠, 观察小鼠存活率、体征变化及感染后肺组织病理损伤差异, 检测小鼠感染流感病毒后肺组织增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达并观察小鼠感染后修复状况。结果 H7N9 病毒、H5N1 病毒和 H1N1 病毒均感染 BALB/c 小鼠, 小鼠存活率依次为 H7N9 > H1N1 > H5N1, 肺组织病理损伤严重程度依次为 H5N1 > H1N1 > H7N9, PCNA 表达水平依次为 H7N9 > H1N1 > H5N1。结论 H7N9 病毒感染后宿主炎症反应较小, 感染后小鼠肺组织自我修复能力较强; H5N1 病毒感染 BALB/c 小鼠后的机体反应最为强烈, 感染后恢复能力差, 致死率高。

**【关键词】** 流感病毒; 急性肺损伤; 恢复; 增殖核细胞抗原

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 01-0008-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.01.002

## Characterization of lung damages and restoration in mice after H7N9 virus, H5N1 virus or H1N1 virus infection

LIU Chen-feng<sup>1,2</sup>, WU Xiao-hong<sup>2</sup>, ZHAO Guang-yu<sup>2</sup>, GAO Tong-tong<sup>2</sup>, ZENG Yang<sup>2</sup>,  
TANG Jian<sup>2</sup>, YU Hong<sup>2</sup>, SUN Shi-hui<sup>2</sup>, ZHOU Yu-sen<sup>1,2</sup>

(1. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Anhui Medical University, Hefei, 230032;  
2. State Key Laboratory and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing, 100071)

**【Abstract】 Objective** To analyze the pathological damages of the lung and restoration of BALB/c mice infected by H7N9 virus, H5N1 virus or H1N1 virus. **Methods** SPF BALB/c mice were challenged with H7N9 virus, H5N1 virus or H1N1 virus, respectively. The survival rate and clinical symptoms of mice were evaluated, while the pathological lesions of the lung were analyzed after H&E staining. Furthermore, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immunohistochemistry to evaluate the restoration after virus infection. **Results** The BALB/c mice were successfully infected by the three strains of influenza viruses. The survival rate was presented H7N9 > H1N1 > H5N1, but a opposite tendency was found in the pathological changes, and the highest expression level of PCNA after H7N9 infection was detected among the three strains of viruses. **Conclusions** Lighter lesion with an increased restoration is found in the lung of mice infected after the novel H7N9 virus. There is an excessive immunologic reaction and a high mortality in mice infected with the H5N1 virus.

**【Key words】** Influenza virus; Acute lung injury; Restoration; Proliferating cell nuclear antigen; Mice

[基金项目] 人感染 H7N9 禽流感科技应急防控研究专项, 国家科技重大专项 [2012ZX10004502], 国家自然科学基金 [81371805]。

[作者简介] 刘晨风 (1988 -), 男, 研究生。E-mail: chenfengliu0607@163.com

[通讯作者] 孙世惠, 副研究员, E-mail: sunsh01@163.com; 周育森, 研究员 E-mail: yszhou@bmi.ac.cn

2013 年 3 月底,在中国上海、安徽等地发现一种人感染新型 H7N9 禽流感病毒。截止到 2013 年 8 月 13 日,已经确认 135 例感染,死亡 44 例,病死率达 32.6%<sup>[1]</sup>。由于该病毒为一种新型的禽流感病毒,人体内无预存抗体,且在病人中已发现耐药株,因而该病毒有可能对人类的生命及健康造成巨大威胁。

流感病毒(avian influenza virus, AIV)属正黏病毒科,一般都能够感染禽类;一些亚型也可以感染猪、马、海豹和人等哺乳类动物。但是流感病毒自身变异能力较强,能够跨越种群屏障而感染人类或其他动物<sup>[2-3]</sup>。特别是近年来,许多国家和地区都出现禽流感病毒跨种间传播人类的报道并具有较高的病死率。例如自 1997 年香港首次发现 H5N1 禽流感病毒感染人类病例来,至今已经确认 620 例感染患者,病死率高达 60%<sup>[4]</sup>;从 1999 年发现 H9N2 禽流感病毒能够自然感染到人<sup>[5]</sup>,到 2013 年新发的 H7N9 禽流感病毒,加上 H1N1 流感病毒造成的几次世界大流行等可以看出,人感染流感病毒造成的高病死率已经成为全球范围内的公共卫生问题。

目前流感病毒致人死亡的致病机制较为复杂,至今仍未清楚。对 H7N9 死亡患者的统计调查发现,死亡患者多数为患有基础病并且免疫力低下的老年人,而青壮年患者多数在治疗后痊愈<sup>[6-7]</sup>,这又引起了研究者对流感病毒感染后机体的耐受、免疫和自身恢复的重新深思。尽管研究者通过各种方法建立流感病毒感染小鼠模型以阐述病毒在机体内的复制、迁移以及复杂的致病机制,但是通过小鼠模型对不同流感病毒进行对比分析还为之较少,并且不同流感病毒感染后宿主自身的恢复机制还未被详细阐述。

为此,本实验分别使用 H7N9、H5N1 禽流感病毒和 H1N1 流感病毒感染 BALB/c 小鼠,通过观察小鼠存活率和肺组织病理损伤的监测以及对增殖细胞核抗原的检测,系统的评价不同病毒感染后的机体反应及肺组织的损伤修复状况,以期为评价流感病毒的毒力和致病性,监测病毒变异规律,明确流感病毒致病机制,预防和控制新发流感病毒提供积极的参考意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂与耗材

HE 染色用苏木素和伊红,免疫组化用山羊封

闭血清、HRP 标记山羊抗兔第二抗体及 DAB 显色试剂盒均购自中国北京中衫金桥生物有限公司。兔抗增殖细胞核抗原(PCNA)多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 公司(sc-7907)。尼康正置显微镜为日本 Nikon 80i。其余试剂均为国产分析纯,由国药(北京)化工集团有限公司提供。

#### 1.1.2 病毒株

所有涉及人可感染禽流感病毒的操作均在生物安全三级实验室中进行。病毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/Beijing/501/2009(H1N1)和 A/Anhui/1/2013(H7N9)由病原微生物生物安全国家重点实验室保存。病毒接种 10 日龄鸡胚,37℃ 温箱中孵育 48h 后收取鸡胚尿囊液,离心后病毒上清分装 -80℃ 保存,并测定病毒 TCID<sub>50</sub> 以备。

#### 1.1.3 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2007-0001],实验前在 SPF 级屏障室内饲养,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。所有动物感染实验均在病原微生物生物安全国家重点实验室生物安全 3 级实验室进行。

## 1.2 方法

### 1.2.1 不同流感病毒感染小鼠模型的建立

所有涉及到人感染流感病毒的操作均在生物安全三级实验室中进行。其中 H5N1 病毒感染实验于 2007 年完成,H1N1 病毒感染实验于 2010 年完成,与 H7N9 病毒感染实验结果进行比较。进行病毒感染的小鼠使用氯胺酮(80mg/kg)麻醉后,通过滴鼻 20μL,每侧鼻孔 10μL。感染小鼠的 H5N1 病毒、H1N1 病毒和 H7N9 病毒滴度均为 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL。模型小鼠除观察生存率外,分别在流感病毒感染小鼠后第 1 天( $n=3\sim6$ )、第 3 天( $n=3\sim6$ )、第 5 天( $n=3\sim6$ )随机处死 3 只小鼠取肺组织保存,第 7 天( $n=3$ )、第 14 天( $n=3$ )收集 H7N9 病毒感染后肺组织,进行组织病理学检查。

### 1.2.2 病毒感染小鼠体征变化检测及存活率分析

H5N1 病毒、H1N1 病毒、H7N9 病毒分别滴鼻感染小鼠,以 PBS 滴鼻小鼠作为阴性对照。感染后每天观察记录小鼠体征变化及活动状态,记录小鼠死亡状况统计存活率。

### 1.2.3 肺组织病理学检查

小鼠肺组织 10% 中性福尔马林固定,常规梯度酒精脱水、二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,切片厚

度为  $4\mu\text{mol/L}$ , 使用 HE 染色技术对石蜡组织切片进行染色, 光镜下观察肺组织病理改变。

#### 1.2.4 肺组织增殖细胞核抗原检测

使用肺组织石蜡切片进行 PCNA 免疫组织化学检测, 染色前切片  $60^{\circ}\text{C}$  烘烤过夜, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 枸橼酸钠溶液中微波加热进行抗原修复, 切片自然晾至室温后, PBS 洗三遍 (每次 5 min, 下同) 后, 加入 0.3% 过氧化氢封闭内源性过氧化氢酶, PBS 洗三遍后进行血清封闭, 封闭后分别滴加 PCNA 抗体 (1:200)  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日, PBS 洗三遍后, 分别加入 HRP 标记的抗山羊抗兔二抗,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 40 min, PBS 洗三遍后, DAB 显色, 苏木素衬染, 盐酸酒精分化, PBS 返蓝, 依次使用梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光镜下观察棕黄色颗粒为阳性结果。

#### 1.2.5 统计学分析

数据处理采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

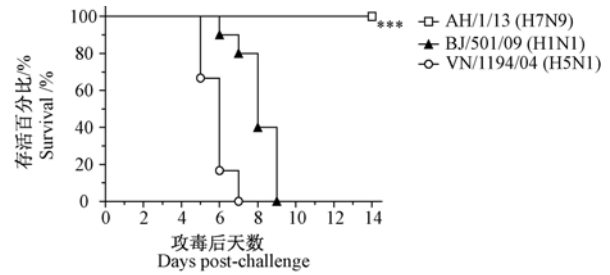
## 2 结果

### 2.1 流感病毒感染小鼠存活率及体征分析

为分析不同流感病毒对小鼠的致病性, 我们对病毒感染后小鼠的存活率及体征变化进行了比较分析。研究发现 H5N1 病毒与 H1N1 病毒在感染后第 3 天即表现出倒毛、弓背、活动力减弱等体征变化, 而 H7N9 病毒感染后小鼠并未表现出活动力减弱等体征变化。生存率分析结果表明 H7N9 病毒感染小鼠 ( $n=10$ ) 全部存活; 但 H5N1 病毒感染后小鼠 ( $n=6$ ) 在 7 d 时出现大量死亡, 存活率仅为 10%, 9 d 时全部死亡; H1N1 病毒感染后小鼠 ( $n=10$ ) 在 7 d 时开始死亡, 但集中死亡时间为第 8 天至第 9 天, 该结果显示, H5N1 病毒和 H1N1 病毒的致死率为 100%, 且 H5N1 病毒感染后小鼠存活时间更短, 毒性更强; H7N9 病毒致死率低 (图 1)。以上研究结果表明 H5N1 病毒对宿主致病性最强, 而 H7N9 病毒对小鼠的致病性较轻。

### 2.2 病毒感染小鼠早期肺组织病理损伤特征分析

组织病理的观察能够准确的反应病毒对机体造成的损伤, 以及病毒感染小鼠后的机体反应, 所以我们对比观察了在病毒感染早期的肺组织变化。结果显示, 除 H5N1 病毒感染小鼠肺组织观察到肺泡间隔增宽外, 三种病毒感染早期对小鼠肺组织的损伤



\*\*\*: 与 BJ/501/09 (H1N1) 和 VN/1194/04 (H5N1) 相比  $P < 0.001$

图 1 H7N9 病毒、H1N1 病毒和 H5N1 病毒感染小鼠存活率比较

Fig. 1 Survival analysis of mice infected with H7N9 virus, H1N1 virus and H5N1 virus

差异无显著性, 均表现为支气管上皮细胞的脱落、变性和坏死, 支气管腔和血管腔周围有少量的炎症细胞浸润 (图 2, 彩插 4)。

### 2.3 病毒感染小鼠后期肺组织病理损伤特征分析

三种流感病毒感染后第 5 天肺组织病理损伤差异显著, H7N9 病毒感染的小鼠肺组织受损的支气管上皮细胞脱落至支气管腔中, 周围间质伴随有炎症细胞浸润, 肺间质增宽, 远端肺组织无明显病理学改变, 具有肺动脉炎的病理学特征 (图 2C)。而 H5N1 病毒和 H1N1 病毒感染小鼠肺组织表现为弥漫性肺损伤并伴有明显水肿, 肺泡上皮细胞大量坏死, 肺泡腔完全塌陷, 间隔明显增宽, 间质充血, 并伴有大量的炎症细胞浸润及灶性出血, 从病理损伤特征分析可以看出, H5N1 病毒感染对肺组织损伤的程度更高, 肺组织发生实质性病变, 肺不张等 (图 2F, 2I)。通过病理学观察对比分析说明 H1N1 病毒感染对小鼠肺组织的损伤严重于 H7N9 病毒感染的小鼠肺组织, 在未死亡的 H7N9 病毒感染实验组中, 我们继续观察了感染后 7d 和 14d 的肺组织病理变化, 可发现, 在 H7N9 病毒感染的后期, 在损伤区域出现了大量的增殖能力较强的细胞 (图 4A, B), 提示 H7N9 病毒感染后宿主的损伤修复能力较强 (图 2 见彩插 4)。

### 2.4 病毒感染小鼠肺组织 PCNA 表达水平变化

我们采用免疫组化的方法检测了 PCNA 在病毒感染后肺组织的表达变化, 分析了三种流感病毒感染宿主后的肺组织损伤修复情况。结果表明, 感染 1 d 后, 均发现增殖细胞增多, 但是在感染后 3 d 和 5 d, 相比于 H5N1 病毒和 H1N1 病毒, H7N9 病毒感染后肺组织增殖细胞明显增多 (图 3, 彩插 5), 提示小鼠可能是通过代偿性的细胞增殖缓解了病毒介导的

肺组织病理损伤,这可能是 H7N9 病毒感染小鼠存活的重要原因之一,为了进一步验证这一推测,在感染 7 d 和 14 d 时,同样发现肺组织中产生大量的增殖细胞(图 4C,D,彩插 5),提示 H7N9 病毒感染小鼠存活率高的原因之一可能是基于自身较强的细胞增殖修复能力。

### 3 讨论

A 型流感病毒宿主范围非常广泛,例如各种禽类、猪、马、猫、狗、雪貂、海豹和人类等<sup>[3]</sup>。根据流感病毒的血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶蛋白(NA)可将病毒分成不同的亚型,所有 HA 亚型和 NA 亚型均可在禽类中分离到,所以一直被认为水禽及野鸟被认为是所有禽流感病毒的病毒库,而在人类主要存在 3 种 HA 亚型(H1、H2、H3)和 2 种 NA 亚型(N1、N2),比如 H1N1 病毒造成的世界大流行<sup>[2-3]</sup>。而近年来,由 H5、H7、H9 亚型的禽流感病毒通过多种变异机制获得了新的宿主适应能力,跨越种间屏障感染人甚至引起死亡,给全球的公共卫生造成了巨大威胁。临床研究发现,多数死亡患者的肺组织呈现急性呼吸窘迫综合症和多器官功能障碍综合症的临床特征<sup>[2,3,6-8]</sup>,但是到目前为止,无论是甲型 H1N1 流感病毒,还是人感染的禽流感病毒(例如 H7N9 病毒和 H5N1 病毒)介导的急性呼吸窘迫综合症的致病机制都未得到详细的阐述,目前仅发现流感病毒的致病性与病毒受体分布、机体的免疫反应等因素有关<sup>[9-11]</sup>。

探索流感病毒毒力和致病机制的一个关键因素在于建立有效的动物感染模型,目前已知的流感病毒感染动物模型有雪貂模型、猕猴模型、小鼠模型等,其中小鼠模型操作方便、遗传背景比较清晰,适合于研究流感的致病性等优点,是最为常用的流感病毒动物模型。尽管国内外已经通过使用小鼠建立了众多的流感小鼠模型,但是通过小鼠模型对不同流感病毒毒力和致病性的评价依然较少,同时,流感病毒感染后机体的免疫反应和恢复机制也未得到明确阐述。为此我们使用 BALB/c 小鼠分别建立了 H7N9 病毒、H5N1 病毒、H1N1 病毒感染模型,对比分析在同一剂量感染后小鼠的存活率和体征变化,观察了小鼠在病毒感染后肺组织的病理损伤和自我恢复状况。

研究发现,H5N1 病毒感染的小鼠 7 d 基本全部死亡,H1N1 病毒感染的小鼠 7~9 d 陆续死亡,而本

次 H7N9 病毒感染的小鼠全部存活,提示 H7N9 病毒对小鼠的损伤较轻,而 H5N1 病毒和 H1N1 病毒对小鼠损伤严重,即使在低剂量的病毒感染下也出现严重的急性肺损伤和全身器官功能障碍(结果未显示)<sup>[12]</sup>。为了进一步明确不同流感病毒对宿主的致病性,我们观察了病毒感染后小鼠的体征及体重变化对比分析三者之间的差异,结果显示,在 H5N1 病毒感染小鼠后第 5 天时体重明显低于 H7N9 病毒感染小鼠,临床症状明显,结果进一步验证了小鼠对 H5N1 病毒较为敏感,对 H7N9 病毒的耐受力较强,推测一方面与不同病毒之间不同的毒力有关,另一方面机体在对抗病毒时激发的免疫反应和自身修复能力也不尽相同。

为了进一步观察病毒对机体的损伤,我们观察了在感染后不同时间点的肺组织病理损伤情况。结果发现,在感染早期未观察出三种病毒对小鼠肺组织的损伤差异,仅有病毒本身感染和复制造成的细胞脱落坏死。提示早期三种病毒的感染、复制应处于相同水平,后期的免疫组化检测抗原实验验证了这一猜想(数据未显示)。而三种病毒感染后第 5 天肺组织损伤差异显著,H7N9 病毒感染小鼠仅具有肺脉管炎特征;而 H5N1 病毒和 H1N1 病毒感染小鼠肺组织表现为弥漫性肺损伤,并且 H5N1 病毒感染后损伤的程度更高。造成损伤差异的原因在于病毒由毒力不同所介导宿主的免疫反应和恢复能力的不同,毒力更强的病毒介导了过激的免疫反应,对机体产生二次损伤,抑制了机体的自我恢复功能,可能是引起组织弥漫性损伤和患者死亡的主要原因<sup>[13-14]</sup>。

PCNA 是一种相对分子质量为  $3.6 \times 10^4$  的酸性蛋白质,是 DNA 聚合酶的一种辅助蛋白,能参与 DNA 的合成,其含量随细胞的增殖而变化。在静止期细胞中其量很少,DNA 合成前期晚期开始增加,DNA 合成期达到高峰,DNA 合成后期 + 分裂期明显下降。所以增殖细胞核抗原可作为评价机体自我增殖恢复状态的指标<sup>[15-16]</sup>。近年研究表明,支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞的凋亡与坏死是急性肺损伤的病理基础。急性肺损伤后机体调动自身修复系统,在病灶和坏死区域诱导细胞增殖,这有助于替代坏死和凋亡的细胞,可能是肺组织结构重建和功能恢复的物质基础<sup>[15-16]</sup>。本研究中,流感病毒感染后小鼠呈现出急性肺损伤的病理特征,损伤早期已经观察到 PCNA 的表达增多,提示病毒感染刺激后,机

体应激性的激活自身修复系统。对比分析发现, H7N9 病毒感染后小鼠的 PCNA 表达明显高于其余两种病毒,提示 H7N9 病毒感染后小鼠自身修复系统的能力较强,是 H7N9 感染后小鼠肺组织损伤较轻的重要原因之一。通过对 H7N9 病毒感染后肺组织 7 d 和 14 d 的 PCNA 表达分析发现 PCNA 显著增高,该结果进一步说明了机体自身修复能力明显增强。研究发现,患有基础病的患者同时伴随自身免疫力低下和自身修复能力衰退等免疫缺陷<sup>[6,8,17]</sup>,因此也在一个方面解释了临床患有基础病的 H7N9 病毒感染者死亡率较高可能与自身损伤修复机制减弱密切相关。

我们通过对比较观察了 H7N9 禽流感病毒和 H5N1 禽流感病毒以及 H1N1 流感病毒感染小鼠后的存活率和体征变化,评价了不同流感病毒在感染后的肺组织病理损伤,以及在感染后机体自身修复状况,详细的阐述了不同流感病毒的致病性、病理损伤特点及宿主的损伤修复能力。该研究不仅明确了流感病毒的毒力和致病性及机体自身恢复机制,同时通过对不同流感病毒的对比分析,研究病毒的毒力变化及变异规律,为应对和预防新发和突发新型流感病毒都具有良好的参考意义。

(本文图 2 见彩插 4,图 3、4 见彩插 5)。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] World Health Organization. Number of confirmed human cases of avian influenza A (H7N9) reported to WHO Report 9—data in WHO/HQ as of 12 August 2013, 14:45GMT + 1. [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/09\\_ReportWebH7N9Number.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/09_ReportWebH7N9Number.pdf)(2013).
- [ 2 ] Webster RG, Govorkova EA. H5N1 influenza—continuing evolution and spread [J]. *N Engl J Med*. 2006; 355 (21):2174 – 2177.
- [ 3 ] Yen HL, Webster RG. Pandemic influenza as a current threat [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009; 333 (1):3 – 24.
- [ 4 ] Zhu QY, Qin ED, Wang W, et al. Fatal infection with influenza A (H5N1) virus in China [J]. *N Engl J Med*. 2006; 354(25): 2731 – 2732.
- [ 5 ] Guo YJ, Li X, Cheng M. Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus [J]. *Chin J Exp Clin Virol*. 1999; 13 (2): 105 – 108.
- [ 6 ] Li Q, Zhou L, Zhou M, et al. Preliminary report; epidemiology of the avian influenza A (H7N9) outbreak in China [J]. *N. Engl. J. Med*. 2013 Apr 24. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1304617>.
- [ 7 ] Gao HN, Lu HZ, Cao B et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection [J]. *N Engl J Med*. 2013; 368 (24):2277 – 2285.
- [ 8 ] Guan Y, Farooqui A, Zhu H, et al. H7N9 Incident, immune status, the elderly and a warning of an influenza pandemic [J]. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 7(4):302 – 307.
- [ 9 ] Peiris JS, Cheung CY, Leung CY, et al. Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe? [J]. *Trends Immunol*, 2009; 30 (12):574 – 584.
- [ 10 ] 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]. *Nature Med*. 2006; 12 (10): 1203 – 1207.
- [ 11 ] Sun S, Zhao G, Xiao W, et al. Age-related sensitivity and pathological differences in infections by 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus [J]. *Virol J*. 2011; 8:52 – 62.
- [ 12 ] To KF, 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.
- [ 13 ] Perrone LA, Plowden JK, Garcia-Sastre A, et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice [J]. *PLOS Pathogens*. 2008; 4(8):e1000115.
- [ 14 ] Szretter KJ, Gangappa S, Xuihua Lu, et al. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice [J]. *J Virol*. 2007; 81(6): 2736 – 2744.
- [ 15 ] Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase  $\delta$  [J]. *Nature*. 1987; 326 (6112):515 – 517.
- [ 16 ] Bravo R, Macdonald BH. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites [J]. *J Cell Biol*. 1987; 105(4): 1549.
- [ 17 ] Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD81 cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity [J]. *Am J Pathol*. 2007;171 (3):767 – 776.

[收稿日期] 2013-10-15