

# 人 H7N9 禽流感病毒与 H1N1 流感病毒感染 小鼠病理学损伤的比较

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

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

**【摘要】** 目的 比较分析 H7N9 病毒与 H1N1 病毒感染小鼠病理学损伤特点, 初步探讨两种病毒感染致小鼠急性肺损伤的致病机制。方法 H7N9 病毒与 H1N1 病毒分别感染小鼠, 观察不同病毒感染后小鼠生存率, 并于不同时间点取心、肝、脾、肺、肾、脑、肠等组织, 伊红-苏木素染色并进行组织病理学分析, 免疫组化检测病毒抗原分布及中性粒细胞浸润。综合分析肺组织病理损伤与病毒复制、宿主免疫反应之间的关系。结果 H7N9 病毒感染小鼠肺及脾脏损伤较轻, 存活率较高。H1N1 病毒感染的小鼠肺及脾脏损伤较重, 感染后 9 d 全部死亡; 两种病毒抗原主要分布于支气管上皮细胞、少量间质细胞和肺泡上皮细胞, 病毒复制水平无明显差异。但 H1N1 病毒感染后肺及脾脏中均有大量中性粒细胞浸润, 小鼠机体炎症反应明显强于 H7N9 病毒感染后小鼠炎症反应。结论 H7N9 病毒与 H1N1 病毒感染后小鼠病理学损伤特点及程度均不同, 病毒复制是小鼠肺损伤的诱发因素但并非决定因素, 宿主针对病毒感染产生的免疫反应程度与急性肺损伤密切相关。

**【关键词】** H7N9 病毒; H1N1 病毒; 肺损伤; 免疫反应; 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0001-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.001

## Comparison of pulmonary pathological changes in mice infected with H7N9 influenza virus and pandemic H1N1 influenza virus

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

(1. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and  
Epidemiology, Beijing 100071, China;

2. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Anhui Medical University, Hefei, 230032 )

**【Abstract】** **Objective** To analyze and compare the pathological changes of lung tissue in mice infected with the novel H7N9 influenza virus and 2009 pandemic H1N1 influenza virus, respectively, and to preliminarily study the mechanisms of acute lung injury induced by those virus infection. **Methods** SPF 6-week old BALB/c mice (body weight 18 – 20 g, male : female = 1 : 1) (n = 3 in each subgroup) were intranasally infected with H7N9 virus and H1N1 virus, respectively. The behavior and survival time of mice after virus infection were observed and the survival rates were analyzed. The heart, liver, spleen, lung, kidney, intestines, and brain were collected at indicated time points for histopathological examination using H&E staining. The distribution of virus antigen was detected by immunohistochemistry. The neutrophil infiltra-

**【基金项目】** 人感染 H7N9 禽流感科技应急防控研究专项 [KJYJ-2013-01-04]; 国家科技重大专项 [2012ZX10004502]; 国家自然科学基金 [81371805]。

**【作者简介】** 孙世惠 (1968 年 -), 女, 副研究员, 研究方向: 病原感染动物模型。Email: sunsh01@163.com

吴小红 (1967 年 -), 女, 实验师, 研究方向: 实验病理学。Email: bwuxiaohong@aliyun.com

**【通讯作者】** 赵光宇, 副研究员, E-mail: guangyu0525@163.com; 周育森, 研究员 Email: yzhou@bmi.ac.cn

tion was also observed. The correlation of lung injury with virus replication and host immune responses was analyzed. **Results** The lung and spleen injury of mice infected with H7N9 virus was slighter and their survival rate (100%) was higher than those of mice infected with H1N1 virus. The damages of the lung and spleen in H1N1 virus-infected mice were more severe than that in H7N9 virus-infected mice, and all the 10 mice in this group died within 9 days after virus inoculation. The distributions of both the virus antigens were mainly in the bronchial epithelial cells, a few stromal cells and alveolar epithelial cells. The levels of virus replication in the two groups were not significantly different. There were more intense neutrophil infiltration in the lung and inflammatory response in the H1N1 virus-infected mice than those in the H7N9 virus-infected mice. **Conclusions** There are some differences of the pathological characteristics and extent of lung injury in the mice infected with H7N9 virus and H1N1 virus, respectively. The virus replication is a precipitating factor but not the decisive factor of the lung injury, and there is a close relationship between the host immune responses and acute lung injury.

**【Key words】** H7N9 Virus; H1N1 Virus; Lung Injury; Pathology; Immune Response; Mice

H7N9 禽流感病毒是一种新亚型禽流感病毒。自 2013 年 3 月以来,已出现 135 例 H7N9 禽流感确诊人间病例,其中 44 例死亡<sup>[1]</sup>。感染者多因重症肺炎或急性呼吸窘迫综合征而死亡。通过对临床患者的调查发现,死亡病例多为老年患者,且多患有基础性疾病<sup>[2]</sup>。2009 年流行的 H1N1 甲型人流感病毒也可出现突然体温升高甚至继发严重肺炎并发展为多器官功能衰竭而死亡,这些重症患者亦多患有基础性疾病<sup>[3-4]</sup>。

部分研究发现,宿主的唾液酸受体类型、宿主的遗传因素、宿主免疫反应等均可能与流感病毒感染后疾病的发展及转归密切相关<sup>[5-6]</sup>。尽管病毒基因的致病性已有大量研究,但病毒与宿主病理损伤的致病机制仍研究尚少,并且病毒感染后的病理损伤是否由病毒大量复制引起仍不明确,不同流感病毒引起的病理损伤和免疫反应的区别仍未被关注。而目前临床报道的流感病毒感染死亡病例并不仅仅由病毒单一因素造成,多数重症患者患有糖尿病、肺或心脏疾病等基础疾病,如此复杂的临床多因素交联影响不能单一的阐述流感病毒感染后的机体病理损伤变化及免疫反应特征,因而增加了流感病毒特别是新发流感病毒(H7N9)致病机制研究的复杂性;本课题组前期对不同流感病毒感染的小鼠模型研究中发现宿主在病毒感染后机体自身恢复能力与肺损伤的严重程度密切相关<sup>[7]</sup>,但对于不同流感病毒感染后的病毒复制、迁徙及机体免疫反应与急性肺损伤程度的关联仍需探讨。

鉴于此,本研究对 H1N1 病毒及 H7N9 病毒分别感染的 SPF 级近交系 BALB/c 小鼠病毒抗原的分布规律及主要脏器的病理损伤特征进行了对比研究,旨在单一病毒感染的因素下,揭示宿主病理损伤与病毒复制,机体免疫反应之间的关系以及不同流感病毒的

病理损伤与机体炎症反应比较,为进一步探讨 H7N9 流感病毒感染致病机制研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒与细胞

病毒株 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 和 A/Beijing/501/2009 (H1N1) 由病原微生物生物安全国家重点实验室保存。所用病毒为 10 日龄鸡胚尿囊腔接种制备的鸡胚尿囊液,H7N9 亚型禽流感病毒和 H1N1 亚型流感病毒的病毒滴度分别为  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 和  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL。MDCK 细胞由本单位保存。

#### 1.1.2 试剂与仪器

兔抗 H1N1-HA 多克隆抗体(A/California/06/2009, H1N1)购自北京博菲康生物技术有限公司,兔抗 H7N9 HA 多克隆抗体购自 Sino Biological Inc. 公司。neutrophil marker 购自美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 公司。尼康正置显微镜为日本 Nikon 80i。

#### 1.1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 25 只,6~8 周龄,体重 18~20 g 左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2007-0001]。实验前饲养于 SPF 级屏障环境[SYXK(京)2012-0004]。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。25 只小鼠中,10 只用于生存率分析,15 只在 H7N9 病毒感染后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d( $n=3$ )处死取材待用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病毒感染实验

H7N9 病毒和 H1N1 病毒的小鼠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。其中 H1N1 病毒感染实验已于 2010

年完成,与 H7N9 病毒感染实验结果进行比较。进行 H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染实验的小鼠均经腹腔注射氯胺酮(80 mg/kg)麻醉后,以滴鼻方式接种 20  $\mu$ L 病毒液,每侧鼻孔 10  $\mu$ L。感染小鼠的 H1N1 病毒和 H7N9 病毒滴度均为  $10^6$ TCID<sub>50</sub>/mL。

### 1.2.2 生存率分析

H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染组各有 10 只小鼠进行病毒感染后 14 d 存活率的观察和分析,并以相同体积(20  $\mu$ L) PBS 滴鼻小鼠作为阴性对照组。每天观察小鼠体征变化,记录小鼠死亡数量,并进行统计学分析。

### 1.2.3 组织病理学检测

病毒感染后 1 d、3 d、5 d、7 d 及 14 d 处死小鼠( $n=3$ ),取肺、肝、脾、肾、脑、肠等组织,4% 甲醛固定 72 h,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  $\mu$ m,苏木素-伊红(H&E)染色,光镜下观察各脏器组织病理变化。

### 1.2.4 病毒抗原定位检测

石蜡组织切片进行病毒抗原免疫组织化学检测。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,切片回复至室温后,PBS 清洗,加入 0.3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,PBS 洗后血清封闭,分别滴加 Anti-HA (A/California/06/2009, H1N1) (北京博菲康物技术有限公司)或 rabbit polyclonal antibody to H7N9 HA (Sino Biological Inc.), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,PBS 洗三遍后,分别加入 HRP 标记的抗兔二抗和抗大鼠二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min,PBS 洗三遍后,DAB 显色,苏木素衬染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光镜观察并照相。

### 1.2.5 中性粒细胞的检测

石蜡组织切片进行中性粒细胞免疫组织化学检测。方法同病毒抗原免疫组织化学检测方法。不同之处为 neutrophil marker (Santa Cruz) 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。抗大鼠二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min。光镜观察并照相。

### 1.2.6 统计学分析

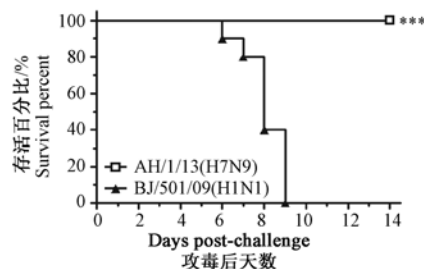
生存曲线经 Kaplan-Meier 生存分析获得,相应各组存活率的差异使用 log-rank 检验进行比较。 $P < 0.01$  时认为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 人 H7N9 禽流感病毒感染小鼠特征分析

人 H7N9 禽流感病毒滴鼻感染小鼠并未表现出

类似于 H1N1 病毒或 H5N1 病毒感染小鼠表现出的弓背、倒毛、活动力减弱等体表特征,感染的 10 只小鼠全部存活,而 H1N1 病毒感染的 10 只小鼠在 9 d 内全部死亡。小鼠以相同剂量的 H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染后的存活率存在显著差异( $P < 0.001$ )(图 1)。提示 H7N9 禽流感病毒对小鼠的致死性显著低于 H1N1 流感病毒。



注:\*\*\*:与 BJ/501/09 (H1N1) 相比  $P < 0.001$ 。

图 1 H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染小鼠存活率比较

Note: \*\*\* $P < 0.001$ , comparison of the AH/1/13 (H7N9)-infection group with BJ/501/09 (H1N1) infection group

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

### 2.2 人 H7N9 禽流感病毒与 H1N1 病毒感染所致肺组织病理损伤特征比较分析

H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染的小鼠肺组织在感染后第 1 天和第 3 天无显著差异,均表现为支气管上皮细胞变性,支气管周围间质轻度炎细胞浸润。感染后第 5 天肺组织损伤差异显著,H7N9 感染的小鼠肺组织主要表现为脉管炎,受损的支气管上皮细胞脱落至支气管腔中,其周围间质较多炎细胞浸润,间质增宽,远端肺组织无明显病理学改变(图 2A)。而 H1N1 病毒感染小鼠肺组织表现为弥漫性肺损伤,肺泡上皮细胞严重受损脱落至肺泡腔中,血管周围组织水肿,肺泡腔中有渗出及炎细胞(图 2B)。通过病理学观察分析说明 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,由于 H7N9 病毒感染小鼠后的不致死性,我们随即观察在 H7N9 病毒感染 14 d 后的小鼠肺组织变化,相对于感染早期,H7N9 病毒感染后 14 d 肺组织再生能力增强<sup>[7]</sup>,可观察到大量再生的肺泡上皮细胞(图 3,图 2,3 见彩插 1)。

### 2.3 H7N9 病毒与 H1N1 病毒分别感染小鼠其他组织脏器病理学观察

H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染小鼠后肝、脑、肠

等脏器未见显著病理学改变。而外周免疫淋巴器官脾脏在 H1N1 病毒感染后受损,感染后第 5 天时病理学观察可见脾脏红髓中网状内皮细胞增生,淋巴细胞减少,且伴随大量中性粒细胞浸润(图 4B),骨髓中亦可见部分死亡的淋巴细胞。H7N9 病毒感染的小鼠脾脏未见显著的病理学损伤(图 4A)。以上研究结果提示 H1N1 病毒感染与 H7N9 病毒感染小鼠肺组织的损伤程度与机体免疫系统的调节密切相关(图 4 见彩插 1)。

#### 2.4 H7N9 病毒与 H1N1 病毒感染小鼠肺组织病毒抗原分布

我们采用免疫组化的方法,对两种 H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染小鼠后病毒抗原在小鼠肺组织的复制、分布和定位进行了研究。结果显示,感染早期(感染后第 1 天)两种病毒抗原在小鼠肺组织的分布主要集中于支气管上皮细胞,细支气管上皮细胞,终末细支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞均少有病毒抗原的分布。感染后第 5 天病毒抗原在肺组织的分布亦较相似,在脱落的支气管上皮细胞、及少量间质细胞中可检测到病毒抗原的分布(图 5)。以上结果说明两种病毒感染小鼠后在肺组织中的复制水平及分布迁徙等均较为相似,无明显差异,提示病毒复制在不同病毒感染所致的急性肺损伤的差异中非决定性因素,而只扮演诱导因素。同时发现两种病毒在小鼠肺组织中的感染和复制水平平均随着时间的推移而降低(图 5 见彩插 2)。

#### 2.5 H7N9 病毒与 H1N1 病毒分别感染小鼠肺组织中中性粒细胞浸润比较观察

H7N9 病毒和 H1N1 病毒感染小鼠后检测肺组织中性粒细胞的浸润,研究结果显示在两种病毒分别感染的小鼠肺组织中早期中性粒细胞均增多,未表现出显著差异,但是在病毒感染中后期 H7N9 病毒感染的肺组织中中性粒细胞数量显著少于 H1N1 病毒感染的肺组织(图 6),但均集中在肺组织受损部位。该研究结果提示不同的流感病毒激发的机体免疫反应不同,这可能与病毒自身的毒性和致病性有关,同时病毒感染早期中性粒细胞的增多与病毒清除有关,病毒感染中后期过多的中性粒细胞的浸润与肺组织病理损伤密切相关(图 6 见彩插 2)。

### 3 讨论

H7N9 禽流感病毒是单股负链 RNA 病毒,是继 H5N1 禽流感病毒感染人类后又一种感染人类的禽

流感病毒<sup>[8,9]</sup>。与 H5N1 病毒及 H1N1 病毒不同, H7N9 病毒具有感染人类的遗传特征,它与  $\alpha$ -2,3 唾液酸受体和  $\alpha$ -2,6 唾液酸受体都具有较强的结合能力,此外,现有的流感疫苗对新发 H7N9 禽流感病毒感染没有保护作用,另外进入秋冬季温度易于病毒存活,以及内地饮食因素等原因,增加了 H7N9 病毒在人际间广泛传播的可能性<sup>[10-11]</sup>。尽管该病毒对奥司他韦和扎那米韦药物敏感,但目前已有患者出现耐药<sup>[12]</sup>。提示一旦病毒发生适应性变异就很容易在人际间传播。因此大力开展 H7N9 病毒感染致病机制等相关研究具有重要临床意义。

临床资料研究表明 H7N9 病毒感染患者及死亡病例中大多数为老年人(>60 岁),且这些患者大多患有基础性疾病如糖尿病,感冒或其他疾病<sup>[13]</sup>。研究表明,老年人及患有基础病的人群等机体免疫反应并非处于正常状态,炎症相关因子及其受体表达上调<sup>[14-17]</sup>。一方面提示此次 H7N9 病毒感染病例临床病理的复杂性,对研究 H7N9 病毒致病机制带来困难;另一方面说明机体免疫反应与病毒感染、疾病转归等均密切相关。SPF 级近交系小鼠具有相同的遗传背景和生理状态,并且在无菌状态下生长,保证了在单一因素下,病毒感染后的组织复制、分布、迁徙及宿主免疫反应等特征变化,为 H7N9 病毒感染致病机制研究提供可靠模型。

H7N9 病毒感染重症患者与 H1N1 病毒感染重症患者具有相似的临床病理学特征,均表现出病毒型重症肺炎的典型特征<sup>[13,18]</sup>。但针对于这两种不同的流感病毒的感染致病机制及宿主免疫反应的区别仍有待研究。为此,我们对两种病毒感染的肺组织及机体炎症反应进行了比较研究。通过对比研究发现,H7N9 病毒感染小鼠全部存活,而 H1N1 病毒感染小鼠在第 9 天几乎全部死亡,病理学研究也显示在 5d 时 H7N9 病毒感染小鼠肺组织病理损伤明显轻于 H1N1 病毒感染的小鼠。该结果一方面表明 H1N1 病毒在小鼠模型中的致病性显著大于 H7N9 病毒感染的小鼠,另一方面提示 H7N9 病毒感染重症病例病情严重程度有可能与患者自身的免疫反应状态更为密切,而病毒复制本身对机体的损伤并非患者死亡的主要因素。

此外,通过对其他主要脏器的对比研究发现, H7N9 病毒感染后小鼠的脾组织损伤较轻,红白髓结构清晰,偶见坏死的脾细胞。而 H1N1 病毒感染的脾组织受损较为严重,脾细胞大量减少并伴随中

性粒细胞的浸润。脾脏是全身最大的免疫器官,脾脏中免疫反应的强弱能够表明机体免疫反应的强弱,本结果说明相比于 H7N9 禽流感病毒,机体针对 H1N1 病毒感染产生较强的免疫反应,并且对脾脏造成一定损伤。推测病毒感染后组织病理损伤的形成与宿主免疫反应密切相关。

为了明确病毒自身复制对机体器官损伤的影响,我们首先对两种病毒 HA 抗原进行检测,研究发现,病毒与受体结合后感染宿主,其中 H7N9 病毒对  $\alpha$ -2,3 唾液酸受体及  $\alpha$ -2,6 唾液酸受体都具有很高的结合能力;而 H1N1 病毒优先结合  $\alpha$ -2,6 唾液酸受体<sup>[10]</sup>。本次实验结果发现两种病毒在感染后 1 d 和 5 d 肺组织中的分布没有显著性的差异,但是 H1N1 病毒感染的肺组织病理损伤却在 5 d 时显著重于 H7N9 病毒感染的小鼠肺组织,伴随大量炎细胞浸润和组织水肿和渗出;H7N9 病毒感染的肺组织仅表现为局灶性的脉管炎,肺间质轻度增宽,并无显著的组织水肿等病理学改变。该结果提示病毒本身的复制并不是造成肺组织严重损伤的决定因素,而感染后的炎症反应程度与病理损伤程度呈正相关,也进一步验证了病毒感染后的宿主免疫反应与病理损伤密切相关。

中性粒细胞是机体抵抗病原微生物感染的重要组成部分。由于其在肺组织毛细血管中的数量远多于外周血液循环中的数量,因此一旦肺部受到病原刺激,肺间质毛细血管中的中性粒细胞即被激活并快速抵达炎症部位,因此,中性粒细胞常被认为是机体抵抗病原感染的第一道防线。Tumpey 等<sup>[19]</sup>研究发现当采用 1918 年流感 HA 与 NA 的重组病毒感染中性粒细胞缺失的小鼠时,小鼠肺组织病理损伤显著减轻。Tate 等<sup>[20]</sup>研究也发现中性粒细胞在限制病毒的复制,降低肺部毛细血管的渗透性以及病毒向肺外组织的扩散等方面起着重要作用。但是中性粒细胞的过度激活可加重炎症对肺组织造成的损伤。因此,中性粒细胞的适度活化在病毒感染中对疾病的转归至关重要。但是中性粒细胞的过度活化对机体可造成损伤。有研究发现在 PR8 H1N1 病毒感染的小鼠模型中降低中性粒细胞的趋化作用,一方面减少了中性粒细胞在肺组织的浸润,伴随肺组织病理损伤的减轻<sup>[21]</sup>。在本研究中 H7N9 病毒与 H1N1 病毒在感染小鼠后早期肺组织中性粒细胞均增多,但是在感染后期 H7N9 病毒感染的小鼠肺组织中性粒细胞数量下降,而 H1N1 病毒感染的小鼠

肺组织则持续增多,提示中性粒细胞在病毒感染的不同时期发挥不同的作用,在病毒感染的早期,中性粒细胞的增多在病毒的控制和清除中起着重要的作用;而在感染后期,中性粒细胞的持续减少可能是 H7N9 病毒感染肺组织损伤较 H1N1 病毒感染损伤轻的原因之一。

本研究表明 H7N9 病毒感染肺组织主要表现为局灶性脉管炎,其他组织未见显著病理学损伤。病毒分布主要集中在支气管上皮细胞和少量肺泡上皮细胞。H1N1 病毒感染肺组织为弥漫性肺损伤。宿主针对病毒感染产生的免疫反应包括中性粒细胞的激活及活化程度与肺损伤密切相关。本研究为进一步解释 H7N9 病毒感染致病机制研究,探索干预治疗新途径提供实验依据。

(本文图 2~4 见彩插 1,图 5,6 见彩插 2)。

#### 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] 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.
- [3] Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection [J]. *N Engl J Med*. 2010, 362(18):1708 - 1719.
- [4] Maritz J, Maree L, Preiser W. Pandemic influenza A (H1N1) 2009: the experience of the first six months [J]. *Clin Chem Lab Med*. 2010, 48 (1):11 - 21.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 刘晨风, 吴小红, 赵光宇, 等. 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研究 [J]. *中国实验动物学报*. 2014, 22(1):8 - 12.
- [8] Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans [J]. *Nature*, 2013, 499 (7459):496 - 499.
- [9] Liu Q, Lu L, Sun Z, et al. Genomic signature and protein sequence analysis of a novel influenza A (H7N9) virus that causes an outbreak in humans in China [J]. *Microbes Infect*. 2013, 15 (6 - 7):432 - 439.

- [10] Zhou J, Wang D, Gao R, et al. Biological features of novel avian influenza A H7N9 virus [J]. *Nature*, 2013, 499(7459):500–503.
- [11] Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans [J]. *Nature*, 2013, Jul 10. 501(7468):551–555.
- [12] Hu Y, Lu S, Song Z, et al. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance [J]. *Lancet*, 2013, 381(9885):2273–2279.
- [13] 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.
- [14] Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells [J]. *Mech Ageing Dev*, 2000, 121(1–3):77–88.
- [15] 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.
- [16] Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002, 165(10):1404–1409.
- [17] Shalekoff S, Gray GE, Tiemessen CT. Age-related changes in expression of CXCR4 and CCR5 on peripheral blood leukocytes from uninfected infants born to human immunodeficiency virus type 1-infected mothers [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1):229–234.
- [18] 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.
- [19] Tumpey TM, García-Sastre A, Taubenberger JK, 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]. *J Virol*, 2005, 79(23):14933–14944.
- [20] Tate MD, Deng YM, Jones JE, et al. Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection [J]. *J Immunol*, 2009, 183(11):7441–7450.
- [21] Sakai S, Kawamata H, Mantani N, et al. Therapeutic effect of antimacrophage inflammatory protein 2 antibody on influenza virus-induced pneumonia in mice [J]. *J Virol*, 2000, 74(5):2472–2476.

[收稿日期] 2013-11-29