

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.012

三株交叉反应性的流感病毒 HA 抗体与 H1N1 流感病毒的致病机制分析*

李慧瑾^{1,2} 孙丽君² 孙晶莹² 赵向绒² 梁导艳² 李元² 胡军²

(1 陕西省缺血性心血管疾病重点实验室, 西安医学院基础与转化医学研究所 陕西 西安 710021;

2 陕西省人民医院中心实验室 陕西 西安 710062)

摘要 目的:结合临床甲型流感病例分析流感病毒可能的致病机理。**方法:**收集 87 份陕西省 2009 年甲型 H1N1 流感重症,危重症及死亡病例的血常规参数,对其淋巴细胞、红细胞和血小板三个指标分析。制备针对甲型 H1N1 的单克隆抗体,采用抗体亚类鉴定试剂盒分析其抗体轻链和重链的亚型,通过血凝活性实验检测三株抗体的血凝抑制活性,通过 ELISA 检测三株抗体与人和小鼠的血红蛋白、红细胞、白细胞膜和血小板膜的反应,通过免疫组化分析三株流感病毒抗体与正常小鼠肺组织的结合。**结果:**流感病毒感染后的死亡病例中淋巴细胞、红细胞和血小板均明显降低。三株抗体与人和小鼠的淋巴细胞、红细胞和血小板均有不同程度的交叉反应;免疫组化结果同时也证实三株 HA 抗体与小鼠的肺组织有不同的结合力。**结论:**流感病毒致病的原因可能与流感病毒感染机体后产生的抗体可与血液和组织中的成分结合有关。

关键词:H1N1 流感病毒;血凝素;红细胞;淋巴细胞;血小板

中图分类号:R-33;R373.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3068-05

Pathogenic Mechanism of Three Cross Reactive Influenza Virus HA Antibodies and H1N1 Influenza Virus*

LI Hui-jin^{1,2}, SUN Li-jun², SUN Jing-ying², ZHAO Xiang-rong², LIANG Dao-yan², LI Yuan², HU Jun²

(1 Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease, Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710021, China;

2 Center Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710062, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the possible pathogenesis of influenza virus based on clinical influenza A cases and three mAbs against H1N1-HA. **Methods:** The binding sites of the two antibodies with HA were analyzed by phage display library. Polypeptide synthesis based on the selected antigenic sites and HA sequence, monoclonal antibodies prepared by immunization mice with two polypeptide, light chain and heavy chain variable region of four antibodies were obtained by means of molecular cloning. Moreover, the binding domain of antibodies and antigen was predicted by computer simulation. Blood routine parameters of 87 severe, critical and fatal cases of influenza A (H1N1) in Shaanxi Province in 2009 were collected and their lymphocyte, erythrocyte and platelet indices were analyzed. Three mAbs against H1N1-HA were prepared by our lab, the subtypes of light and heavy chains of antibodies were analyzed by antibody subclass identification kit. The hemagglutination inhibition of the three antibodies was tested by hemagglutination activity test. The reactions of the three antibodies with human and mouse hemoglobin, erythrocyte, leukocyte and platelet membranes were detected by ELISA. The binding of three influenza virus antibodies to normal mice lung tissue was analyzed by immunohistochemistry. **Results:** The lymphocytes, red blood cells and platelets in the death cases were significantly decreased in after influenza virus infection. ELISA results showed that the three antibodies had different cross-reactivity with human and mouse lymphocyte, erythrocyte and platelet. The three antibodies had different cross-reactivity with human and mouse lymphocytes, erythrocytes and platelets. The results of immunohistochemistry also confirmed that the three HA antibodies had different binding capacity with mouse lung tissue. **Conclusions:** The pathogenesis of influenza virus may be related to the combination of antibodies produced by influenza virus infection with blood and tissue components.

Key words: H1N1 influenza virus; Hemagglutinin; Red blood cell(RBC); Lymphocytes; Platelet(PLT)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R373.13 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2019)16-3068-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81202373);陕西省教育厅 2018 年度重点科学研究计划项目(18JS103);

西安医学院 2017 博士启动基金项目(2017DOC02);西安医学院 2018 年国家基金培育项目(2018GJFY09);

陕西省科技厅一般项目-社会发展(2017SF-270)

作者简介:李慧瑾(1984-),博士,讲师,主要研究方向:流感病毒致病机理,肿瘤及心血管病因学;

电话:029-86132859, E-mail: 187085591@qq.com

(收稿日期:2019-03-07 接受日期:2019-03-30)

前言

流感病毒感染所致的急性呼吸道传染病称流行性感冒。在甲型、乙型和丙型三种流感中,甲型流感给人的危害最严重^[1,2]。目前,甲型流感的预防手段仍以疫苗接种为主。流感病毒表面的刺突包括血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(nueraminidase, NA),其中,HA具有较强的抗原性和免疫原性。人接种流感疫苗HA后,机体可产生保护性抗体^[3,4]。20世纪,至少已在人群中发生了3次由甲型流感病毒引起的世界范围流感大流行^[5]。2009年4月,甲型H1N1流感在墨西哥和美国爆发。随后,疫情迅速蔓延到美洲、欧洲、亚洲多个国家,并且其警戒级别上升为流感大流行最高级,严重威胁人民健康^[6]。因此,研究甲型H1N1流感病毒可能的致病机理有助于为流感病毒的预防和感染提供新的实验依据。

先前已有关于H1N1感染后严重病例甚至死亡的几种可能机制:(1)过度免疫反应有关:Taronna等报道2009年H1N1流感病毒在肺组织中滴度相比季节性H1N1病毒接种的雪貂显著升高^[7]。(2)“细胞因子风暴”:Mauad等对21名感染2009 H1N1的巴西患者尸检,发现肺部有Toll样受体, γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)和CD8⁺T细胞的表达^[8,9]。(3)免疫复合物的形成:Monsalvo等研究发现由免疫复合物介导的人补体片段4d(Complement Fragment 4d, C4d)沉积存在于致命病例的肺组织中^[10,11]。这三种解释均与免疫反应有关,但目前尚无阐明甲型流感病毒致病的明确机理。本研究收集了陕西省87例甲型流感重症、危重症及死亡病例的病历,对其血常规参数中的淋巴细胞、红细胞和血小板的数值进行了统计分析,并以实验室获得的三株异嗜性的单克隆抗体作为研究对象,进行ELISA和免疫组化分析,以期为H1N1流感病毒的预防、诊断及治疗奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2009年甲型H1N1流感病毒裂解疫苗购自华兰生物疫苗有限公司;4株单克隆抗体由本实验室制备;HRP标记的山羊抗小鼠二抗由中杉金桥公司提供。SBA小鼠单克隆抗体分型试剂盒(HRP标记)购自Southern biotech公司;2009年H1N1感染病例问卷均来自陕西省医院卫生厅甲型H1N1流感临床研究项目的严重病例,所有人体样本均按照陕西省人民医院机构审查委员会的政策使用。

1.2 血常规检测

采集病人静脉血2~5 mL,血常规参数中的淋巴细胞、红细胞和血小板的数值通过血常规分析仪检测。

1.3 红细胞、白细胞膜及血小板膜的制备

① 红细胞(Red blood cell, RBC)的制备:将人外周血用0.9%盐水洗涤3~5次,并用双蒸水裂解,在2000 rpm下离心1 h后收集沉淀物并用双蒸水洗涤3~5次,并将沉淀重悬于0.9%盐水中。② 白细胞膜的制备:用淋巴细胞分离培养基从外周血中分离白细胞,通过2500×g离心10 min吸出,用0.9%盐水洗涤三次,然后冷冻和解冻三次以获得白血细胞膜。③ 制备血小板膜:洗涤人血小板(由西安血液中心提供)并用0.9%盐水

裂解。

1.4 抗体的制备

将抗原与弗氏佐剂充分乳化混匀,经皮下免疫BALB/c小鼠,每只注射抗原20~25 μ g。免疫3周后,采用首次免疫相同的方法和剂量加强免疫1~2次,融合前的3天用不含佐剂的抗原,经腹腔追加免疫1次。细胞融合方法见文献^[12],采用间接ELISA法检测并筛选获得分泌抗体的阳性细胞,阳性细胞通过96孔板进行有限稀释法筛选亚克隆,获得稳定的杂交瘤细胞系。

1.5 抗体的鉴定

抗体的Ig亚类鉴定按照SBA Clonotyping System/HRP抗体亚类鉴定试剂盒说明书操作。

1.6 血凝抑制活性的鉴定

血凝效价测定:在96孔U型底的微孔板中按2倍梯度倍比稀释流感病毒抗体100 μ L,加入等量的0.5%的鸡红细胞,37℃孵育1 h,检测病毒的血凝效价。血凝抑制效价测定:4倍血凝效价的病毒和2倍梯度倍比稀释的单克隆抗体各50 μ L混匀后加至96孔U型底的微孔板,加入等量的0.5%的鸡红细胞,37℃作用1 h后检测病毒的血凝抑制效价。血凝和血凝抑制效价按红细胞凝集比例计算,凝集100%、75%、50%和25%分别用++++、+++、++和+表示。

1.7 酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

将抗原(2.5 μ g/ml)包被在96孔板中,在4℃下孵育过夜,用0.1 mol/L PBS洗涤三次。将抗体加入96孔板中并在37℃下孵育1 h。弃去上清液后,将最佳抗原浓度在37℃下孵育1 h。再次洗涤三次后,向每个孔中加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和H₂SO₄,并在室温下温育15~30 min。通过ELISA板读数器检测450 nm处的吸光度。

1.8 免疫组化检测

切片脱蜡水化后,60℃烘烤20 min后,二甲苯透明,酒精梯度水化;3%H₂O₂室温避光10 min灭活内源性酶,将切片浸入0.01 M柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中,微波炉中火6 min,4次修复抗原。以1:10稀释兔血清封闭液室温封闭20 min,1:10比例稀释HRP标记的一抗,4℃孵育过夜,充分洗涤后二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色。苏木精复染4 min,1%盐酸酒精分化5 s,水中返蓝10~15 min,脱水透明,中性树脂封片。

1.9 统计学分析

所有实验数据均采用SPSS18.0软件分析,计算资料采用means $\pm$ SEM表示,多组差异比较采用one-way ANOVA分析,两组间比较采用t检验,以P<0.05表示有显著差异,P<0.01表示极显著差异。

2 结果

2.1 甲型流感重症、危重症及死亡病例的血常规分析

本研究共纳入87例2009年大流行性H1N1流感病例,包括13例死亡病例,16例危重症H1N1流感患者和58例重症流感。我们从病例问卷中分析了常规血液检查的结果,包括以下指标:淋巴细胞、红细胞和血小板,然后以各血常规的参考值作

为对照,计算低于正常值、正常值和高于正常值的病例数各占的比例。如图 1 所示,死亡病例的淋巴细胞和红细胞均值均小于重症组 (图 1A 和 B), 血小板均值小于危重症和重症组 (图 1C)。如表 1 所示,死亡病例中淋巴细胞、红细胞和血小板低于正常值的比例为 81.8%、66.7%和 76.9%,危重症病例中淋巴细

胞、红细胞和血小板低于正常值的比例分别为 80%, 50% 和 37.5%, 而重症病例中三株低于正常值的比例分别为 26%、13.5%和 11.3%(表 1)。这些结果表明 H1N1 流感病毒可能与死亡和危重的 H1N1 流感患者中的不同血液成分发生交叉反应。

表 1 87 例甲型 H1N1 流感重症、危重症及死亡病例中各组血常规参数比例

Table 1 Comparison of the proportion of blood routine value among 87 H1N1 influenza case questionnaires

category (case)	lymphocytes			RBC			PLT		
	L	N	H	L	N	H	L	N	H
Death (13)	9/11 (81.8%)	2/11 (18.2%)	0/1 (0%)	8/12 (66.7%)	3/12 (25%)	1/12 (8.3%)	10/13 (76.9%)	3/13 (23.1%)	0/13 (0%)
critically ill (16)	12/15 (80%)	3/15 (20%)	0/13 (0%)	8/16 (50%)	7/16 (43.7%)	1/16 (6.3%)	6/16 (37.5%)	4/16 (25%)	6/16 (37.5%)
severe cases (58)	13/50 (26%)	34/50 (68%)	3/50 (6%)	7/52 (13.5%)	41/52 (78.8%)	4/52 (7.7%)	6/53 (11.3%)	31/53 (58.5%)	16/53 (30.2%)

Note: RBC: Red blood cell; PLT: platelet; L: The value is below the normal range; N: The value is in the normal range; H: The value is greater than the normal range.

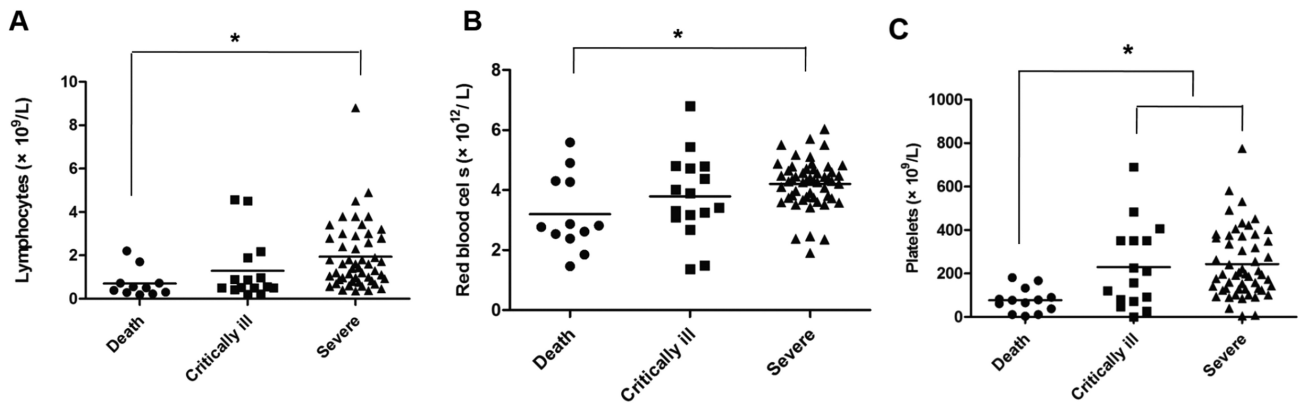


图 1 87 例甲型 H1N1 流感病例的血常规参数均值比较

(A: 流感重症、危重症及死亡病例的淋巴细胞数值; B: 流感重症、危重症及死亡病例的红细胞数值;
C: 流感重症、危重症及死亡病例的血小板数值)

Fig.1 Blood routine examination of 87 H1N1 influenza case questionnaires

(A: lymphocytes in deaths, critically ill and severe cases; B: Red blood cells in deaths, critically ill and severe cases;
C: platelets in deaths, critically ill and severe cases. Significant levels were analyzed by one-way ANOVA, * $P \leq 0.05$.)

2.2 抗体特性鉴定

我们从既往制备的 84 株 H1N1 单克隆抗体中选取具有交叉反应的抗体 A1-10、H1-13 和 H1-15 进行后续的分析。对制备的单克隆抗体进行了与 2009 年 H1N1 流感病毒的结合活性、Ig 亚类及血凝抑制活性进行了测定,结果如表 2 所示。其中,抗

体 Ig 亚类鉴定结果显示 3 株抗体的轻链均为 κ 链, H1-13 重链为 IgG1 型, A1-10 和 H1-15 重链均为 IgM。A1-10 和 H1-15 的血凝抑制活性为 1+, 即血凝抑制活性约 25%, H1-13 抗体无血凝抑制活性。

表 2 H1N1-HA 的三株单克隆抗体的特征鉴定

Table 2 Characterization of antibodies against H1N1-HA

Monoclonal antibodies	Binding activity with H1N1	Ig typing		HI activity
		Light chain	Heavy chain	
A1-10	4+	κ	IgM	1+
H1-13	3+	κ	IgG1	-
H1-15	2+	κ	IgM	1+
A1-6	4+	κ	IgG1	1+

Note: HI activity: Hemagglutination Inhibition activity.

2.3 三株流感病毒单克隆抗体与不同血液成分的结合力

为了分析机体感染 H1N1 流感病毒后血常规参数变化的可能原因,我们分别从健康人和小鼠的血液中提取红细胞、白细胞膜和血小板膜,分析血液中的何种成分可以与 3 株 mAb 结合。ELISA 检测三株抗体 A1-10、H1-13 和 H1-15 与血红蛋白、

RBC、白细胞膜和血小板膜的交叉反应,结果显示三株流感病毒抗体均可与人和小鼠的红细胞和血红蛋白反应;只有 H1-13 和 H1-15 可与膜白细胞和血小板反应,并且与人和小鼠的反应特性基本一致(图 2A 和 2B)。从图 2A 和 2B 中所示的结果可见三株抗体可不同程度地与人和小鼠血液成分有交叉反应。

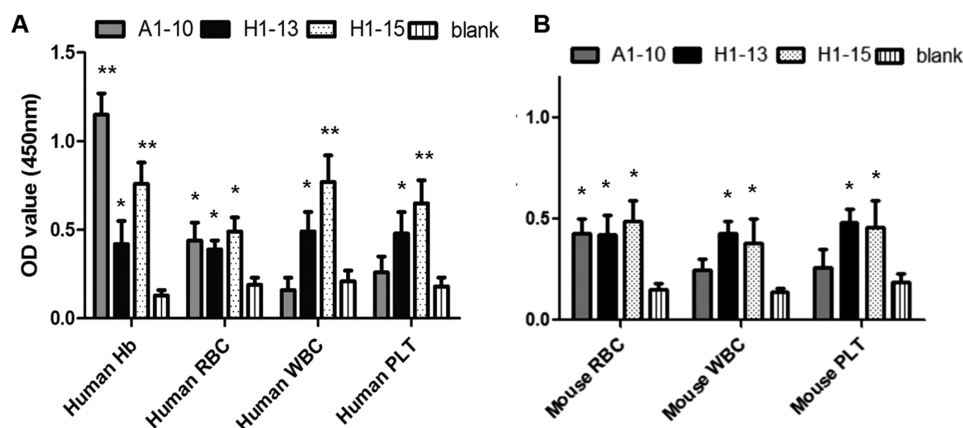


图2 三株流感病毒抗体与人和小鼠的血液成分的反应性

(A:三株交叉反应抗体与人不同血细胞成分的反应性; B:三株交叉反应抗体与小鼠不同血细胞成分的反应性)

Fig.2 The reactivity of three mAbs with human and mouse blood components

(A: The reactivity of three mAbs with human blood component; B: The reactivity of three mAbs with human blood component.

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. blank group))

2.4 免疫组化分析三株流感病毒抗体与小鼠肺组织的结合情况

为进一步检测三株流感病毒抗体与组织的结合情况,我们将正常小鼠的肺组织进行固定包埋,制备石蜡切片后进行免疫组化检测。为了实验的方便,我们首先将 A1-10、H1-13 和 H1-15 三株抗体用 HRP 进行标记。正常小鼠肺部组织切片的免疫酶染色可见:酶标的 A 1-10 免疫组化染色可见红细胞、红

细胞碎片和部分正常肺部细胞的胞浆均与 A1-10 抗体结合(图 3A),酶标的 H1-13 单抗免疫组化染色可见 H1-13 单抗与肺部不同组织发生较强结合(图 3B),H1-15 酶标单克隆抗体仅与红细胞结合(图 3C)而对照抗体 A1-6 与肺部切片无结合(图 3D)。该结果进一步验证了这三株流感病毒抗体与机体具有交叉反应性。

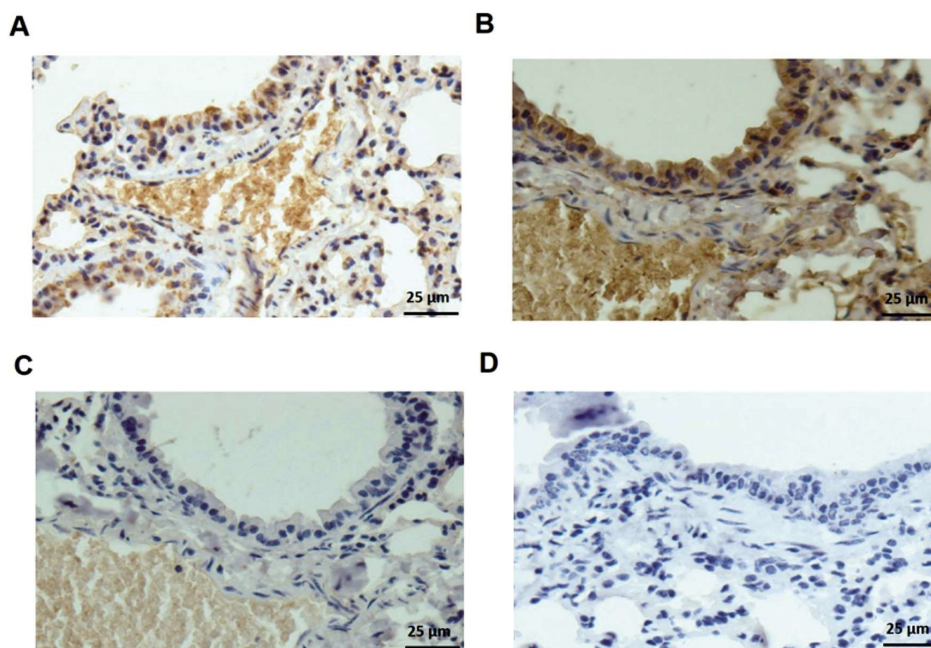


图3 三株 HRP 标记的交叉反应的抗体与小鼠肺部组织的免疫组化结合

(A:A1-10;B:H1-13;C:H1-15;D:空白对照)

Fig. 3 The immunohistochemistry staining of three mAbs with healthy mouse lung tissues

(A: A1-10; B: H1-13; C: H1-15; D: blank)

3 讨论

预防流感病毒感染的最主要手段仍是接种流感疫苗^[13,14],但甲型流感疫苗注射后的不良反应使其安全性受到质疑^[15,16],从而影响了其广泛推广及应用。流感病毒表面的糖蛋白血凝素HA具有较强的免疫原性,机体接种后可产生保护性抗体^[13,14]。20世纪,至少已在人群中发生了3次由甲型流感病毒引起的世界范围流感大流行^[15],1918-1919年的西班牙流感、1957-1958年的亚洲流感及1968-1969年的香港流感,对人类的生命造成了严重的威胁。因此,研究甲型H1N1流感病毒可能的致病机理有助于为流感防控提供更丰富的理论依据和实验数据。

关于H1N1感染后机体产生严重反应的机制有多种解释,如过度免疫反应、细胞因子风暴、免疫复合物的形成等等,这三种机制均从免疫角度出发,但目前尚无系统地解释其作用机制。关于流感疫苗接种后不良反应的研究也有诸多报道,其中也不乏和免疫反应相关,比如接种疫苗后出现嗜睡症^[17]、肺泡出血^[18]、自然流产^[19]及神经系统不良反应等^[20]。本研究对陕西省87例甲型流感重症、危重症及死亡病例的血常规参数中的淋巴细胞、红细胞和血小板的数值进行了统计分析,结果提示在死亡病例中淋巴细胞、红细胞和血小板均低于流感重症患者。我们还对死亡和危重症流感病例的临床诊断进行了分析,发现有部分患者出现了血小板减少性紫癜、再生障碍性贫血等症状,这也和我们统计的红细胞、血小板的数值明显减小有关。进而我们分析了死亡、危重症和重症流感病例中淋巴细胞、红细胞和血小板的均值比例,死亡病例中三者中低于正常值的比例均为81.8%、66.7%和76.9%,危重症病例中三者低于正常值的比例分别为80%、50%和37.5%,而重症病例中三株低于正常值的比例分别为26%、13.5%和11.3%,这提示H1N1流感病毒HA与人体多种血液成分可能有交叉反应。其次,我们结合实验室制备的具有交叉反应性的三株流感病毒HA抗体特性,通过ELISA检测,发现三株抗体可以不同程度地与人和小鼠的红细胞、白细胞和血小板发生交叉反应,这也进一步证实了临床病例分析得出流感病毒与血液成分反应的结论。进而,我们取正常小鼠的肺组织,通过免疫组化分析,提示三株抗体均不同程度与肺组织和红细胞结合。

综上,研究结果提示流感病毒致病的原因可能与流感病毒感染机体后产生的抗体可与机体血液和组织中的成分结合有关,这为流感病毒致病机制研究提供了实验数据和新的研究策略。

参考文献(References)

- [1] Huang SS, Banner D, Fang Y, et al. Comparative Analyses of Pandemic H1N1 and Seasonal H1N1, H3N2, and Influenza B Infections Depict Distinct Clinical Pictures in Ferrets [J]. PLoS One, 2011, 6(11): 1-14
- [2] Fedson DS. Influenza, evolution, and the next pandemic [J]. Evol Med Public Health, 2018, 2018(1): 260-269
- [3] Sanina N, Davydova L, Chopenko N, et al. Modulation of Immunogenicity and Conformation of HA1 Subunit of Influenza A Virus H1/N1 Hemagglutinin in Tubular Immunostimulating Complexes[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): E1895
- [4] Lansbury LE, Smith S, Beyer W, et al. Effectiveness of 2009 pandemic influenza A (H1N1) vaccines: A systematic review and meta-analysis [J]. Vaccine, 2017, 35(16): 1996-2006
- [5] Nelson MI, Viboud C, Simonsen L, et al. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(2): e1000012
- [6] CDC. Update: swine influenza A /H1N1 infections-California and Texas, April 2009[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009, 58(16): 435-437
- [7] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice[J]. Science, 2009, 325(5939): 484-487
- [8] Mauad T, Hajjar LA, Callegari GD, et al. Lung pathology in fatal novel human influenza A (H1N1) infection[J]. Am J Resp Crit Care, 2010, 181(1): 72-79
- [9] Itoh Y, Shinya K, Kiso M, et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses [J]. Nature, 2009, 460(7258): 1021-1025
- [10] Weissler KA, Garcia V, Kropf E, et al. Distinct modes of antigen presentation promote the formation, differentiation, and activity of foxp3+ regulatory T cells in vivo [J]. J Immunol, 2015, 194(8): 3784-3797
- [11] Fudala R, Krupa A, Stankowska D, et al. Anti-interleukin-8 autoantibody: interleukin-8 immune complexes in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Clin SCI, 2008, 114(6): 403-412
- [12] Jin Boquan. Cell and molecular immunology experimental techniques [M]. First Edition. Xi'an: Fourth Military Medical University Press, 2002: 45-46
- [13] Jing-Xia G, Yu-Liang Z, Jin-Feng L, et al. Safety and effectiveness assessment of 2011-2012 seasonal influenza vaccine produced in China: a randomized trial[J]. Postgrad Med, 2017, 129(8): 907-914
- [14] Baxter D. Evaluating the case for trivalent or quadrivalent influenza vaccines[J]. Hum Vaccin Immunother, 2016, 12(10): 2712-2717
- [15] Duffy J, Lewis M, Harrington T, et al. Vaccine Safety Datalink. Live attenuated influenza vaccine use and safety in children and adults with asthma[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2017, 118(4): 439-444
- [16] Johansen K, Brasseur D, MacDonald N, et al. Where are we in our understanding of the association between narcolepsy and one of the 2009 adjuvanted influenza A (H1N1) vaccines?[J]. Biologicals, 2016, 44(4): 276-280
- [17] Lundgren B. Narrating narcolepsy--centering a side effect [J]. Med Anthropol, 2015, 4(2): 150-165
- [18] Ide Y, Imamura Y, Ohfuji S, et al. Immunogenicity of a monovalent influenza A (H1N1)pdm09 vaccine in patients with hematological malignancies[J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(8): 2387-2394
- [19] Donahue JG, Kieke BA, King JP, et al. Association of spontaneous abortion with receipt of inactivated influenza vaccine containing H1N1pdm09 in 2010-11 and 2011-12 [J]. Vaccine, 2017, 35(40): 5314-5322
- [20] Wiwanitkit V. Pandemic Influenza A: H1N1 2009 Vaccine: A Concern on Neurological Adverse Effect [J]. Indian J Community Med, 2012, 37(3): 203-204