甲型流感病毒诱导急性呼吸窘迫综合征的研究进展

何莎莎　赵京霞　徐霄龙　崔煦然　郭玉红　刘清泉
（中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室，首都医科大学附属北京中医医院，北京市中医研究所，北京，100010）

摘要　急性呼吸窘迫综合征（ARDS）是一个致命的甲型流感病毒感染并发症。ARDS 发生的一个主要原因是肺泡上皮-内皮屏障损伤。本综述探讨了肺泡上皮细胞、内皮细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞在甲型流感病毒诱导肺泡上皮-内皮屏障损伤中发挥的作用，为防治甲型流感诱导的 ARDS 提供理论依据。

关键词　急性呼吸窘迫综合征；甲型流感病毒；肺泡上皮-内皮屏障

Research progress of influenza A virus-induced acute respiratory distress syndrome

He Shasha, Zhao Jingxia, Xu Xiaolong, Cui Xuran, Guo Yuhong, Liu Qingquan
(*Beijing Key Laboratory of Basic Research with Traditional Chinese Medicine on Infectious Diseases*, *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University*, *Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing* 100010, *China*)

Abstract　Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a fatal complication of influenza A virus infection. One of the main causes of ARDS is alveolar epithelial and endothelial barrier injury. The review discusses the role of pulmonary epithelial cells, endothelial cells, neutrophils, and macrophages in the pathogenesis of influenza A virus-induced alveolar epithelial and endothelial barrier injury, and provides a theoretical basis for the prevention and treatment of influenza A virus-induced ARDS.

Key Words　Acute respiratory distress syndrome; Influenza A virus; Alveolar epithelial and endothelial barrier
中图分类号：R373.1+3　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.004

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。1918 年西班牙爆发的甲型 H1N1 流感在全球范围内大流行造成超过 4000 万人死亡[1]。2009 年爆发的甲型 H1N1 流感在第一年传播中造成了 151 700～575 400 人死亡[2]。由于新型甲流病毒（如禽源 H5N1 和 H7N9 病毒）能够在人类获得高效遗传性，严重影响了全球人类的健康[3-4]。人感染甲型 H1N1 流感病毒后的主要临床症状为急性呼吸道感染，部分患者会发展成急性肺损伤（ALI），甚至更为严重的急性呼吸窘迫综合征（ARDS）。因此，深入了解甲型流感诱导 ALI/ARDS 的致病机制非常重要。

肺泡上皮-内皮屏障是由肺泡上皮细胞层、基膜和肺泡内皮细胞层形成的半选择性通透屏障，可以调控液体及大分子物质的转运，同时也是肺泡内气体与血液内气体分子交换的场所[5]。肺泡上皮-内皮屏障损伤会导致肺泡腔内出现大量含有纤维蛋白、红细胞和炎性细胞的蛋白质水肿液，进一步导致肺泡气体交换量减少，最终引起严重的呼吸衰竭，其中以 ARDS 患者最为明显[6]。因此，为进一步明确甲型流感病毒诱发 ARDS 的致病机制，我们针对肺上皮细胞、内皮细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞在流感病毒诱导上皮-内皮屏障损伤过程中所发挥的作用进行探讨，旨在进一步了解其致病机制，为临床上防治流感病毒诱发 ARDS 提供理论依据。

1　肺泡上皮细胞

甲型 H1N1 流感病毒进入肺泡后首先感染的是肺泡上皮细胞[7]。肺泡上皮细胞包括 I 型和 II 型肺泡上皮细胞。I 型肺泡上皮细胞为扁平细胞，约占肺泡表面积的 95%，其主要作用是允许肺泡腔和毛细血管血液内的气体交换。II 型肺泡上皮细胞为立方形细胞，主要通过分泌表面活性剂减少肺表面张力。紧密连接将相邻的肺泡上皮细胞联系在一起，其主要功能是调节细胞旁通透性和确保屏障的完整性。紧密连接由跨膜蛋白、胞质蛋白和细胞骨架蛋白构成，Claudins、occludin 是紧密连接的主要跨膜蛋白，ZO-1、ZO-2、ZO-3 是主要胞质蛋白，其将跨膜蛋白和细胞骨架蛋白连接在一起[8]。超过

基金项目：北京市医院管理局重点医学专业发展计划专项（编号：ZYLX201611）；北京市科委绿色通道专项项目（编号：Z141100006014056）
作者简介：何莎莎（1990.03—），女，博士，研究实习员，研究方向：黏膜免疫，E-mail：hss_sara@126.com
通信作者：刘清泉（1965.11—），男，大学本科，主任医师/教授，首都医科大学附属北京中医医院院长，研究方向：中西医结合诊治危重病，E-mail：liuqingquan2003@126.com

90% 的跨肺泡上皮-内皮屏障的蛋白质转运阻力都来自于肺泡上皮细胞[9]。因此，维持肺泡上皮细胞屏障渗透压，限制蛋白质转运，能够有效地防止肺水肿。

肺泡上皮细胞维持肺泡腔内无流液的第二种机制是通过离子通道和膜蛋白作用，其中包括阿米洛利敏感性上皮钠通道（ENaC），囊性纤维细胞跨膜传导调节因子和许多不同的水通道蛋白。在肺中最具特征离子通道是 ENaC，其存在于 I 型和 II 型肺上皮细胞的顶面。肺泡腔 Na^+ 通过肺泡上皮细胞顶面的 ENaC 进入肺泡上皮细胞，再由基底膜的钠泵（Na^+-K^+-ATPase）排出到肺循环中，同时伴随水的被动吸收，防止肺水肿的发生[10-11]。

肺泡上皮细胞不仅是上皮-内皮屏障的重要组成部分，还是甲型流感病毒感染的主要靶细胞。甲型流感病毒通过将病毒血凝素连接到细胞表面上的唾液糖上而结合其靶细胞。不同的肺泡上皮细胞的唾液糖表达存在差异：I 型肺泡上皮细胞主要表达 α-2，6-连接的唾液酸糖，通常人流感病毒优选，而 II 型肺肺泡上皮细胞主要表达 α-2，3 连接的唾液酸糖，通常由禽类优选[12-13]。死于 H5N1 流感病毒的患者的尸体解剖显示 H5N1 病毒抗原是最突出的 II 型肺泡上皮细胞，与禽流感病毒对 α-2，3 连接的唾液酸糖趋向性一致[14]。

肺泡上皮细胞在甲型流感病毒感染诱导 ARDS 病理过程中发挥的作用如下：1）甲型流感病毒直接抑制肺泡上皮细胞钠离子通道（ENaCs）的钠离子转运，降低肺泡液体清除能力，导致肺泡腔液体聚集[10,15]。2）诱导肺泡上皮细胞凋亡和坏死，破坏上皮细胞层完整性，损伤上皮-内皮屏障[16]。3）诱导上皮细胞产生大量细胞因子（CCL2，CCL5，CXCL8，CXCL10，IL-6，IL-8，TNF-α）[17-18]，促进肺内皮细胞黏附分子表达上调，损伤上皮-内皮屏障[19]。4）上皮细胞损伤和细胞因子的产生会破坏上皮细胞间紧密连接[20]，同时一些 H5N1 流感病毒菌株感染也能直接破坏细胞间连接[21]，使得屏障通透性增加。最终，上述变化导致的肺泡内蛋白质液体聚集成为 ARDS 的病理基础。

2 肺微血管内皮细胞

肺微血管内皮细胞是肺脏中最丰富的细胞类型，占细胞总量的 30%。在肺泡中，内皮细胞在肺泡壁中形成毛细血管网络。在内皮细胞顶侧，与循环血液直接接触，形成招募炎性细胞的附着环境。适当激活后，内皮细胞表达细胞黏附分子，其结合到它们在白细胞上的同源配体并介导白细胞外渗[22]。在细胞基底侧，内皮细胞与上皮细胞基底膜紧密接触甚至融合[23]，这种紧密接触表明内皮细胞很大程度受到从肺泡上皮细胞和肺泡腔中的炎性细胞释放的信号（IFN-β-TRAIL、Stat1、HGF/c-Met、TGF-α/EGFR）和病毒颗粒（H1N1、H5N1、H7N9）的影响[24-26]。这些信号和病毒颗粒诱导内皮细胞激活对于介导对抗甲型流感的有效免疫应答是必须的。然而，内皮细胞的过度激活也会诱导上皮-内皮屏障损伤和促进肺水肿。

内皮细胞在甲型流感病毒感染诱导 ARDS 病理过程中发挥的作用如下：1）流感病毒感染激活内皮细胞，诱导黏附分子（E-选择素、P-选择素、ICAM1、VCAM1）表达上调，从而招募白细胞进入肺泡[27-28]，大量嗜中性粒细胞和巨噬细胞的存在可通过各种机制诱导肺泡上皮-内皮屏障损伤[29]。2）诱导内皮细胞产生“细胞因子风暴”（CCL2，CCL5，CXCL2，CXCL10，IL-1α，IL-6，IFN-γ）[30]，过量的细胞因子产生一方面能够直接损伤内皮细胞，另一方面会招募嗜中性粒细胞和巨噬细胞诱导肺泡上皮-内皮屏障损伤[31-32]。3）甲型流感病毒能通过直接感染内皮细胞，诱导内皮细胞死亡，损伤肺上皮-内皮屏障，从而引发肺水肿[33]。由于内皮细胞仅构成跨上皮-内皮屏障蛋白质转运的 10% 的阻力，因此，单独的内皮细胞损伤不是肺水肿的关键原因，内皮细胞激活诱导的“细胞因子风暴”比内皮细胞直接感染对肺泡上皮-内皮屏障损伤更重要。

3 嗜中性粒细胞

嗜中性粒细胞在流感病毒感染 24 h 内从血液外渗至肺泡腔[29]。嗜中性粒细胞外渗具有以下几个步骤：沿着内皮细胞滚动，附着到内皮细胞上的选择蛋白和黏附素，通过内皮和上皮细胞层迁移到肺泡腔[34]。这种迁移可以导致上皮-内皮屏障暂时损伤，但不足以引起肺水肿。

嗜中性粒细胞在进入肺泡腔后，在局部存在的细胞因子和病原体刺激下而被激活。活化的嗜中性粒细胞可吞噬病原体，所得的吞噬体可与胞质内一级，二级和三级颗粒融合，其含有各种毒性化合物以杀死吞噬的病原体[35]。除了吞噬作用之外，嗜中性粒细胞可以通过形成嗜中性粒细胞胞外陷阱（组蛋白，染色质和抗微生物化合物组成的胞外 DNA）来捕获和杀死病原体[36]。

嗜中性粒细胞在甲型流感病毒感染诱导 ARDS 病理过程中发挥的作用如下：1）激活状态下的嗜中

性粒细胞在 NADPH 氧化酶的作用下能够广泛性产生活性氧(ROS),ROS 的产生不仅能杀死流感病毒等病原体,也会损伤肺泡和上皮-内皮屏障[37-38]。2)流感病毒感染触发嗜中性粒细胞产生细胞因子(CXCL2,CXCL10,IL-8),将大量的嗜中性粒细胞募集到感染部位,间接损伤上皮-内皮屏障[39]。3)流感病毒感染产生嗜中性粒细胞胞外陷阱,损伤上皮和内皮细胞,破坏上皮-内皮屏障[40]。

4　肺泡巨噬细胞

肺泡巨噬细胞与嗜中性粒细胞一样,是机体对抗流感病毒感染的固有免疫应答的重要组成部分。肺泡巨噬细胞主要分布在肺泡腔肺泡膜表面的一层衬液中,其数量占肺泡常驻细胞的 80%,是体内唯一能与空气接触的细胞群,组成肺组织的第一道防线。肺泡巨噬细胞能够吞噬病原体、感染和凋亡细胞,然后通过呼吸爆发,产生活性氧物质和一氧化氮杀死吞噬的病原体[38]。巨噬细胞也可以产生广泛的促炎性反应细胞因子和抗炎性反应细胞因子。在肺泡内有 2 种类型的巨噬细胞:第一种是常驻肺泡巨噬细胞,通常表达可选择的活化表型使得对无害病原体的炎性反应最小化,同时保护肺部免受更强病原体的侵袭[41]。第二种类型的巨噬细胞是最近招募的巨噬细胞,通常具有经典激活表型,其在诱导肺泡上皮-内皮屏障的损伤中发挥重要作用。

巨噬细胞在甲型流感病毒感染诱导 ARDS 病理过程中发挥的作用如下:1)流感病毒感染诱导巨噬细胞表达肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL),其与死亡受体 5(DR5)相互作用(DR5 是流感病毒感染中在上皮细胞中上调的蛋白质),诱导上皮细胞凋亡,损伤上皮-内皮屏障[25]。2)巨噬细胞在促炎因子刺激下诱导一氧化氮合酶(NOS2)表达,产生 NO。NO 与过氧化物结合形成过氧硝酸盐,可以杀死病原体和损伤细胞,诱导肺损伤和高死亡率[42-43]。3)诱导大量的细胞因子产生(CCL2,CCL5,CXCL10,IFN-β,TNF-α,IL-6 等),损伤肺上皮-内皮屏障[44-46]。

5　结语

甲型流感病毒诱发 ARDS 的一个主要原因是损伤肺泡上皮-内皮屏障,以往有关 ARDS 损伤上皮-内皮屏障的认识大多来源于对细菌性败血症的研究,并且首先损伤的是内皮细胞。但这个模型并不适用于流感病毒,因为流感病毒首先感染的是上皮细胞。本综述探讨了肺泡上皮细胞、内皮细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞在甲型流感病毒诱导肺泡上皮-内皮屏障损伤中发挥的作用及其机制,为防治甲型 H1N1 流感病毒诱导 ARDS 提供理论依据。

参考文献

[1] Johnson N P, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic[J]. Bull Hist Med, 2002, 76(1): 105-115.

[2] Dawood F S, Iuliano A D, Reed C, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(9): 687-695.

[3] Webster R G, Peiris M, Chen H, et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(1): 3-8.

[4] Horby P, Tatem A J, Huang Z, et al. H7N9 is a virus worth worrying about[J]. Nature, 2013, 496(7446): 399.

[5] Lucas R, Verin A D, Black S M, et al. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(12): 1763-1772.

[6] Matthay M A, Ware L B, Zimmerman G A. The acute respiratory distress syndrome[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2731-2740.

[7] Short K R, Kasper J, van der Aa S, et al. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions[J]. Eur Respir J, 2016, 47(3): 954-966.

[8] Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions[J]. Annu Rev Physiol, 2013, 75: 551-567.

[9] Gorin A B, Stewart P A. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux[J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979, 47(6): 1315-1324.

[10] Folkesson H G, Matthay M A. Alveolar epithelial ion and fluid transport: recent progress[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 35(1): 10-19.

[11] Berthiaume Y, Matthay M A. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2007, 159(3): 350-359.

[12] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. Nature, 2006, 440(7083): 435-436.

[13] van Riel D, Munster V J, de Wit E, et al. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract[J]. Science, 2006, 312(5772): 399.

[14] Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, et al. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam[J]. Mod Pathol, 2013, 26(3): 357-369.

[15] Chen X J, Seth S, Yue G, et al. Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(2): L366-L373.

[16] Uiprasertkul M, Kitphati R, Puthavathana P, et al. Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A(H5N1) virus in humans[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(5): 708-712.

[17] 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[J]. Respir Res, 2005, 6: 135.

[18] Veckman V, Osterlund P, Fagerlund R, et al. TNF-alpha and IFN-alpha enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells[J]. Virology, 2006, 345(1): 96-104.

[19] Wyble C W, Hynes K L, Kuchibhotla J, et al. TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway[J]. J Surg Res, 1997, 73(2): 107-112.

[20] Mullin J M, Snock K V. Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability[J]. Cancer Res, 1990, 50(7): 2172-2176.

[21] Golebiewski L, Liu H, Javier R T, et al. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions[J]. J Virol, 2011, 85(20): 10639-10648.

[22] Chen M, Geng J G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis[J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz), 2006, 54(2): 75-84.

[23] Maina J N, West J B, Orgeig S, et al. Recent advances into understanding some aspects of the structure and function of mammalian and avian lungs[J]. Physiol Biochem Zool, 2010, 83(5): 792-807.

[24] Ito Y, Correll K, Zemans R L, et al. Influenza induces IL-8 and GM-CSF secretion by human alveolar epithelial cells through HGF/c-Met and TGF-alpha/EGFR signaling[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(11): L1178-L1188.

[25] Hogner K, Wolff T, Pleschka S, et al. Macrophage-expressed IFN-beta contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(2): e1003188.

[26] Ramana C V, DeBerge M P, Kumar A, et al. Inflammatory impact of IFN-gamma in $CD8^+$ T cell-mediated lung injury is mediated by both Stat1-dependent and-independent pathways[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(7): L650-L657.

[27] Zeng H, Pappas C, Belser J A, et al. Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection[J]. J Virol, 2012, 86(2): 667-678.

[28] Ocana-Macchi M, Bel M, Guzylack-Piriou L, et al. Hemagglutinin-dependent tropism of H5N1 avian influenza virus for human endothelial cells[J]. J Virol, 2009, 83(24): 12947-12955.

[29] Perrone L A, Plowden J K, 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 Pathog, 2008, 4(8): e1000115.

[30] Teijaro J R, Walsh K B, Cahalan S, et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection[J]. Cell, 2011, 146(6): 980-991.

[31] Armstrong S M, Darwish I, Lee W L. Endothelial activation and dysfunction in the pathogenesis of influenza A virus infection[J]. Virulence, 2013, 4(6): 537-542.

[32] Cheung C Y, Poon L L, Lau A S, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A(H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease[J]. Lancet, 2002, 360(9348): 1831-1837.

[33] Armstrong S M, Wang C, Tigdi J, et al. Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and claudin-5[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47323.

[34] Huber D, Balda M S, Matter K. Transepithelial migration of neutrophils[J]. Invasion Metastasis, 1998, 18(2): 70-80.

[35] Jaeschke H, Smith C W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury[J]. J Leukoc Biol, 1997, 61(6): 647-653.

[36] von Kockritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps[J]. J Mol Med(Berl), 2009, 87(8): 775-783.

[37] Amulic B, Cazalet C, Hayes G L, et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 459-489.

[38] Fang F C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(10): 820-832.

[39] Wang J P, Bowen G N, Padden C, et al. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus[J]. Blood, 2008, 112(5): 2028-2034.

[40] Narasaraju T, Yang E, Samy R P, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1): 199-210.

[41] Holt P G. Down-regulation of immune responses in the lower respiratory tract: the role of alveolar macrophages[J]. Clin Exp Immunol, 1986, 63(2): 261-270.

[42] Perrone L A, Belser J A, Wadford D A, et al. Inducible nitric oxide contributes to viral pathogenesis following highly pathogenic influenza virus infection in mice[J]. J Infect Dis, 2013, 207(10): 1576-1584.

[43] Zablockiene B, Ambrozaitis A, Kacergius T, et al. Implication of nitric oxide in the pathogenesis of influenza virus infection[J]. Biologija, 2012, 58(1): 15-25.

[44] Osterlund P, Pirhonen J, Ikonen N, et al. Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons[J]. J Virol, 2010, 84(3): 1414-1422.

[45] Yu W C, Chan R W, Wang J, et al. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses[J]. J Virol, 2011, 85(14): 6844-6855.

[46] Geiler J, Michaelis M, Sithisarn P, et al. Comparison of pro-inflammatory cytokine expression and cellular signal transduction in human macrophages infected with different influenza A viruses[J]. Med Microbiol Immunol, 2011, 200(1): 53-60.

(2017-03-17 收稿 责任编辑:洪志强)