

## 甲型流感病毒PR8感染小鼠早期记忆T淋巴细胞的改变及其意义

徐昆<sup>1</sup>, 田晶<sup>2</sup>

(1. 锦州医科大学附属第一医院心脏康复中心, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州医科大学基础医学院免疫教研室, 辽宁 锦州 121000)

**[摘要]** **目的:** 探讨早期记忆T淋巴细胞( $T_M$ )在甲型流感病毒(H1N1)PR8感染小鼠后的变化情况, 并阐明其意义。**方法:** 将32只C57BL/6小鼠随机分为对照组和流感病毒(PR8)组, 每组16只。对照组小鼠鼻滴30  $\mu$ L 无菌磷酸盐缓冲液(PBS), PR8组小鼠给予鼻滴2 LD<sub>50</sub> PR8病毒液。于第10天处死小鼠, 收集支气管肺泡灌洗液(BALF)、肺组织和淋巴结用于后续实验。HE染色观察2组小鼠肺组织病理形态表现, 血凝试验、实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法和免疫荧光法检测小鼠肺组织病毒感染情况, 流式细胞术检测2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中T淋巴细胞、效应性T淋巴细胞、中央型 $T_M$ 淋巴细胞( $T_{CM}$ )和效应性 $T_M$ 淋巴细胞( $T_{EM}$ )及核蛋白(NP)/聚合酶酸性蛋白(PA)特异性 $T_{EM}$ 淋巴细胞百分率。**结果:** 与对照组比较, PR8组小鼠肺组织出现明显的病理损伤, 且肺组织病毒效价和NP蛋白表达水平均明显升高( $P < 0.01$ )。与对照组比较, PR8组小鼠BALF和肺组织中 $CD4^+$ T淋巴细胞、 $CD8^+$ T淋巴细胞、效应性 $CD4^+$ T淋巴细胞、效应性 $CD8^+$ T淋巴细胞、 $CD4^+$  $T_{EM}$ 淋巴细胞和 $CD8^+$  $T_{EM}$ 淋巴细胞百分率均明显升高( $P < 0.01$ )。与对照组比较, PR8组小鼠BALF和肺组织中 $CD4^+$  $T_{CM}$ 、 $CD8^+$  $T_{CM}$ 、 $CD4^+$  $T_{EM}$ 、 $CD8^+$  $T_{EM}$ 及NP/PA特异性 $CD4^+$  $T_{EM}$ 和 $CD8^+$  $T_{EM}$ 淋巴细胞百分率均明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 淋巴结中 $CD8^+$  $T_{CM}$ 淋巴细胞百分率明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:** 流感病毒感染可诱导机体T淋巴细胞增殖分化为效应性T淋巴细胞, 在呼吸道黏膜局部早期建立保守表位NP/PA的特异性 $T_M$ 淋巴细胞。

**[关键词]** 流感病毒; 记忆T淋巴细胞; 中央型记忆T淋巴细胞; 效应型记忆T淋巴细胞; 保守表位

**[中图分类号]** R392 **[文献标志码]** A

## Changes of early memory T lymphocytes in mice infected with influenza A virus PR8 and its significance

XU Kun<sup>1</sup>, TIAN Jing<sup>2</sup>

(1. Cardiac Rehabilitation Center, First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**[收稿日期]** 2025-01-08 **[录用日期]** 2025-02-12

**[基金项目]** 辽宁省教育厅基本科研面上项目(LJKMZ20221239); 辽宁省科技厅联合计划面上项目(2025-MSLH-250)

**[作者简介]** 徐昆(1982-), 女, 辽宁省大连市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事呼吸道病毒对心肌损伤方面的研究。

**[通信作者]** 田晶, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: tianjing@jzmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

**ABSTRACT Objective:** To discuss the changes of early memory T lymphocytes ( $T_M$ ) in the mice infected with influenza A virus (H1N1) PR8, and to clarify its significance. **Methods:** A total of 32 C57BL/6 mice were randomly divided into control group and influenza virus (PR8) group, with 16 mice in each group. The mice in control group were intranasally administered 30  $\mu$ L of sterile phosphate buffered saline (PBS), and the mice in PR8 group were intranasally administered 2 LD<sub>50</sub> PR8 virus solution. The mice were sacrificed on the 10 th day, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung tissue, and lymphnodes were collected for subsequent experiments. HE staining was used to observe the pathomorphology of lung tissue in the mice in two groups; hemagglutination assay, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method, and immunofluorescence method were used to detect the viral infection in lung tissue of the mice; flow cytometry was used to detect the percentages of T lymphocytes, effector T lymphocytes, central memory T lymphocytes ( $T_{CM}$ ), effector memory T lymphocytes ( $T_{EM}$ ), and nuclear protein(NP)/polymerase acidic protein (PA)-specific  $T_{EM}$  lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymphnodes of the mice in two groups. **Results:** Compared with control group, the lung tissue of the mice in PR8 group showed significant pathological damage, and the lung tissue virus titer and NP protein expression level were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the percentages of  $CD4^+$  T lymphocytes,  $CD8^+$  T lymphocytes, effector  $CD4^+$  T lymphocytes, effector  $CD8^+$  T lymphocytes,  $CD4^+$   $T_{EM}$  lymphocytes, and  $CD8^+$   $T_{EM}$  lymphocytes in BALF and lung tissue of the mice in PR8 group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the positive percentages of  $CD4^+$   $T_{CM}$ ,  $CD8^+$   $T_{CM}$ ,  $CD4^+$   $T_{EM}$ ,  $CD8^+$   $T_{EM}$ , and NP/PA-specific  $CD4^+$   $T_{EM}$ ,  $CD8^+$   $T_{EM}$  lymphocytes in BALF and lung tissue of the mice in PR8 group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the percentage of  $CD8^+$   $T_{CM}$  lymphocytes in the lymph nodes was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Influenza virus infection can induce the proliferation and differentiation of T lymphocytes into effector T lymphocytes, leading to the early establishment of virus-specific  $T_M$  lymphocytes targeting the conserved NP/PA epitopes in the respiratory mucosa.

**KEYWORDS** Influenza virus; Memory T lymphocyte; Central memory T lymphocyte; Effector memory T lymphocyte; Conserved epitope

流行性感胃是由流感病毒引起的传染性强、传播速度快的急性呼吸道传染病, 季节性流感导致每年 300~500 万重症病例和 29~65 万患者死亡<sup>[1-2]</sup>。流感病毒通过抗原漂移和抗原转化导致中和抗体识别表位构象发生变化, 使其能够逃避自然感染和传统疫苗接种引起的群体体液免疫<sup>[3]</sup>。针对病毒亚型中高度保守的病毒蛋白区域血凝素 (hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶 (neuraminidase, NA)、基质蛋白 2 胞外域 (extracellular domain of matrix protein 2, M2e) 和核蛋白 (nucleoprotein, NP) 作为潜在靶抗原, 研发通用疫苗对预防不同型流感病毒株及其引起的全球大流行意义重大<sup>[4-5]</sup>。

记忆 T 淋巴细胞 (memory T lymphocyte,  $T_M$ ) 提供长期保护、增强二次免疫应答效率、确保免疫反应特异性以及维护免疫系统平衡等多种作用, 现已成为研发通用疫苗的关键靶标<sup>[6-8]</sup>。 $T_M$  淋巴细胞分化的经典模式为初始的 T 淋巴细胞受抗原刺激分

化为效应性 T 淋巴细胞后, 约 10% 效应性 T 淋巴细胞分化为  $T_M$  淋巴细胞,  $T_M$  淋巴细胞谱系的建立需要约 30 d<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10-11]</sup>显示: 在抗原刺激或接种疫苗情况下, 初始  $CD4^+$  T 淋巴细胞能直接、快速且持续分化为长期效应性细胞和  $T_M$  淋巴细胞。研究<sup>[12-13]</sup>表明: 流感病毒初次感染 4 周, 再次感染数周后, 靶向识别流感病毒内部保守蛋白的  $T_M$  淋巴细胞比例明显升高, 与多种流感病毒亚型发生交叉反应, 提供异型保护作用。本研究检测流感病毒感染小鼠早期  $T_M$  淋巴细胞的变化情况, 探讨流感病毒诱导的  $T_M$  淋巴细胞是否可以由初始 T 淋巴细胞直接分化, 及  $T_M$  淋巴细胞在呼吸道黏膜早期抗感染免疫中的作用, 为研发靶向  $T_M$  淋巴细胞的流感通用疫苗提供基础数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、流感病毒 PR8、主要试剂和仪器

SPF 级 6~8 周雌性 C57BL/6 小鼠由锦州医科大

学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2019-0003, 实验动物使用许可证号: SYXK(辽)2019-0007, 在锦州医科大学基础医学院病原学生物安全二级(ABSL-2)实验室进行饲养, 本实验所有动物操作均经锦州医科大学动物伦理委员会批准, 伦理号2022016。甲型流感病毒A/Puerto Rico/8/34(H1N1; PR8)由国家疾病预防控制中心传感所惠赠, 经锦州医科大学基础医学院病原学实验室鸡胚传代增毒,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。RNeasy小量提取试剂盒购自德国Qiagen公司, 一步法SYBR<sup>®</sup>PrimeScript<sup>™</sup>逆转录PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司, 多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(peridinin-chlorophyll-protein complex, PerCP)-花菁染料5.5(Cyanine5.5, Cy5.5)标记的CD8抗体、亮紫421(Brilliant violet 421, BV421)标记的CD4抗体、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的CD44抗体、别藻蓝蛋白(allophycocyanin, APC)标记的CD62L抗体和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的干扰素 $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )抗体购自美国BioLegend公司, 固定/渗透溶液、固定/渗透缓冲液、布雷非德菌素A、佛波醇酯和离子霉素购自美国BD公司, 甲型流感病毒PR8株的NP第366~374位氨基酸(NP<sub>366-374</sub>)和聚合酶酸性蛋白(polymerase acidic protein, PA)第224~233位氨基酸(PA<sub>224-233</sub>)购自美国AnaSpec公司, 胶原酶IV、Dnase酶和Percoll细胞分离液购自北京索莱宝科技有限公司, 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。RT-qPCR仪(型号: QuantStudio 7 Flex)购自美国ABI公司, 流式细胞分析仪(型号: FACS Canto Celesta)购自美国BD公司。

**1.2 小鼠流感病毒PR8感染诱发急性肺损伤模型的制备和分组** 将32只C57BL/6小鼠随机分为对照组和流感病毒(PR8)组, 每组16只。对照组小鼠鼻滴30  $\mu\text{L}$  无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), PR8组小鼠鼻滴2 LD<sub>50</sub> PR8病毒液。于感染后的第10天取材, 每组各8只小鼠, 处死后完整取出右肺, 置于10%甲醛中固定, 用于石蜡切片及HE染色。左肺分别置于含1 mL PBS缓冲液的EP管中, 冰上匀浆后离心, 上清用于血凝实验, 并置于EP管中 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存, 用

于RT-qPCR检测。无菌分离小鼠腋下及腹股沟淋巴结, 置于含有3 mL PBS缓冲液平皿内, 用于流式细胞术检测。每组各8只小鼠分离气管并插管, PBS缓冲液冲洗获得支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 离心后细胞沉淀, 用于流式细胞术检测。所有操作需无菌、低温和快速。

### 1.3 HE染色观察2组小鼠肺组织病理形态表现

小鼠左肺经固定、脱水、透明、浸蜡和包埋后切成6  $\mu\text{m}$ 厚的切片, 切片在 $65^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烤2~4 h, 常规HE染色, 中性树脂封片。光学显微镜下观察肺组织病理形态表现关键指标: ①组织间隙浸润。肺泡间隔、血管周围和支气管周围区域是否有中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞等炎性细胞的聚集。②肺实变情况: 是否为充气的空腔结构, 实变区域肺泡结构是否消失。③气管和细支气管上皮细胞坏死及炎性细胞浸润程度: 气道上皮细胞是否排列整齐、完整, 是否有细胞坏死、脱落及黏膜下层炎性细胞浸润。

### 1.4 血凝试验检测肺2组小鼠组织病毒滴度

小鼠肺组织匀浆后, 离心后将上清液加入U型板孔中, 依次做倍比稀释, 稀释度为1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024和1:2048。每孔加入50  $\mu\text{L}$  1%红细胞悬液, 室温静置30 min, 观察孔底红细胞形态表现。阳性结果(有血凝): 红细胞均匀铺于孔底, 形成一层红色薄膜, 边缘可能不整齐或呈锯齿状。阴性结果(无血凝): 红细胞未交联, 沉降到孔底中心形成一个致密、边缘光滑的红色圆点。以能引起完全血凝的病毒样本的最高稀释度的倒数为血凝效价, 血凝单位为每孔50  $\mu\text{L}$ 。血凝效价是病毒滴度的半定量指标。

### 1.5 RT-qPCR法检测2组小鼠肺组织流感病毒RNA水平

提取对照组和PR8组各8只小鼠肺组织中总RNA, 采用SYBR荧光染料一步法进行RT-qPCR检测。引物序列: PR8 F 5'-GACCGAT-CCTGTACCTCTGAC-3', R 5'-AGGGCATTC-TGGACAAAGCGTCTA-3'。PCR反应条件:  $42^{\circ}\text{C}$ 、5 min,  $95^{\circ}\text{C}$ 、10 s,  $95^{\circ}\text{C}$ 、3 s,  $60^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共40个循环;  $95^{\circ}\text{C}$ 、15 s,  $60^{\circ}\text{C}$ 、1 min,  $95^{\circ}\text{C}$ 、15 s。使用标准品进行PCR扩增, 记录Ct值, 以Ct值为纵坐标, lg基因拷贝数为横坐标, 绘制标准曲线。检测样本的病毒拷贝数(copy $\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 应用标准曲线计算流感病毒RNA水平。

### 1.6 免疫荧光法检测 2 组小鼠肺组织中流感病毒 NP 蛋白表达水平

小鼠肺组织切片脱蜡和梯度乙醇脱水, 抗原修复后, 滴加一抗 NP (1:200), 4 °C 过夜。PBS 缓冲液洗涤, 滴加 FITC 标记的荧光二抗, PBS 缓冲液洗涤, 在组织上滴加含 DAPI 的抗淬灭封片液封片, 荧光显微镜下观察病毒感染水平, NP 阳性信号为 FITC 标记的绿色荧光。采用 Image J 软件计算每张切片 3 个视野的绿色荧光像素数量, 计算 NP 蛋白表达水平。NP 蛋白表达水平 = 平均绿色荧光像素数量 / 实际组织总面积, 单位为 pixel/area。

**1.7 小鼠 BALF 的制备** 对照组和 PR8 组小鼠各 8 只, 采用颈椎脱臼处死, 暴露气管, 用注射器吸取 1 mL 预冷 PBS 缓冲液, 针头插入气管约 1.5 cm, 以 1 mL PBS 缓冲液反复抽吸 3 次冲洗肺部, 将 BALF 转至离心管中, 再重复灌注 2 次。用吸管将 3 次收集的 BALF 分次通过 200 目无菌尼龙滤网, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 预冷 PBS 缓冲液重悬细胞。

**1.8 2 组小鼠肺组织中淋巴细胞的提取** 对照组和 PR8 组小鼠各 8 只, 无菌分离小鼠肺组织, 置于 EP 管内匀浆, 用 5 mL 消化液将组织移至离心管中, 37 °C 摇床 90 min。用 200 目筛网过滤组织悬液, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 1640 培养基重悬后用 25% Percoll 分离淋巴细胞, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 0.4% 台盼蓝溶液染色后, 细胞计数板计数, 根据计数情况用 PBS 缓冲液将细胞密度调至每毫升 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞。

**1.9 2 组小鼠淋巴结中淋巴细胞的提取** 对照组和 PR8 组小鼠各 8 只, 无菌分离鼠腹股沟和腋下淋巴结, 玻片磨砂面研磨淋巴结, 用 200 目筛网过滤悬液, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 用 2 mL PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 0.4% 台盼蓝溶液染色后, 细胞计数板计数, 根据计数情况用 PBS 缓冲液将细胞密度调至每毫升 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞。

**1.10 流式细胞术检测 2 组小鼠淋巴细胞中 CD4、CD8、CD44 和 CD62L 阳性细胞百分率** 将小鼠 BALF、肺组织和淋巴结中提取的细胞悬液分至 1.5 mL EP 管中, 每管中含 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 离心后重悬细胞, 加入佛波醇酯 20 μL、离子霉素 8 μL、NP<sub>366-374</sub> 或 PA<sub>224-233</sub> 2 μL, 混匀转移至 96 孔细胞培养板培养 1 h, 加入布雷非德菌素 A 每孔 1 μL, 培养

4 h; 收集 96 孔细胞培养板细胞, 加入 CD4、CD8、CD44 和 CD62L 抗体各 2 μL, 孵育 20 min; PBS 缓冲液重悬细胞, 离心; 细胞沉淀加入 100 μL 固定或渗透溶液, 孵育 20 min; 细胞洗涤后加入 IFN-γ 抗体 4 μL, 孵育 20 min; 细胞重悬用 300 目筛网过滤细胞, 待上机。细胞阳性百分率以 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> 和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN-γ<sup>+</sup> 细胞数/上机总细胞数的百分率表示。

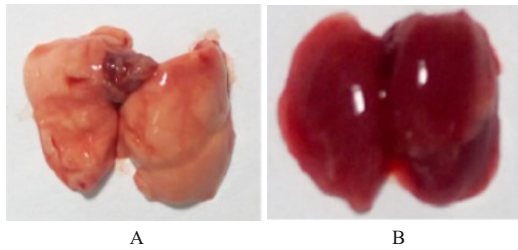
**1.11 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。2 组小鼠肺组织中病毒滴度、NP 蛋白表达水平、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞、效应性 T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>效应性 T<sub>M</sub> 淋巴细胞 (effector T<sub>M</sub> lymphocyte, T<sub>EM</sub>)、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>中央型 T<sub>M</sub> 淋巴细胞 (central T<sub>M</sub> lymphocyte, T<sub>CM</sub>)、和 NP/PA 特异性 CD4<sup>+</sup>T<sub>M</sub> 淋巴细胞百分率均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间样本均数比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2 组小鼠肺组织大体形态和病理形态表现

对照组小鼠肺组织呈淡粉红色, 质地柔软、表面光滑湿润, 富有弹性且无实变感。PR8 组小鼠肺组织发生明显病变, 肺组织体积弥漫性肿大, 表面颜色呈暗红色, 有片状出血灶, 肺实质质地变实, 表面附有少量血性渗出物。见图 1。HE 染色结果显示: 对照组肺泡结构清晰, 形态规则, 肺泡间隔薄而均匀, 支气管上皮完整, 肺内动、静脉血管结构正常, 管壁厚度均匀, 无增生、水肿或炎性细胞浸润。PR8 组小鼠肺组织架构广泛破坏, 可见多灶性至弥漫性实变区域, 小支气管和细支气管受累显著, 管壁黏膜层可见大量炎性细胞浸润, 肺泡间隔因充血、水肿和炎性细胞浸润而呈弥漫性增生。见图 2。

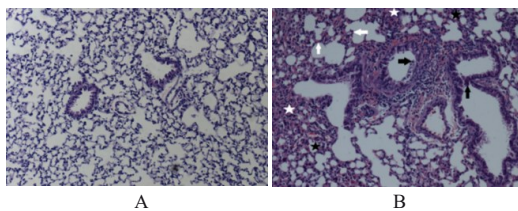
**2.2 2 组小鼠肺组织病毒感染情况** 血凝试验检测结果显示: 与对照组比较, PR8 组流感病毒 HA 效价明显升高 (*P* < 0.01)。见图 3。RT-qPCR 法分析小鼠肺组织病毒感染情况, 对照组小鼠无流感病毒感染, PR8 病毒基因拷贝数为 0, 而 PR8 组病毒基因拷贝数为 2.1 × 10<sup>4</sup> copy·mL<sup>-1</sup>。免疫荧光检测结果显示: 与对照组 (1.3 × 10<sup>2</sup> pixel/area) 比较, PR8 组小鼠肺组织中 NP 蛋白表达水平 (6.9 × 10<sup>4</sup> pixel/area) 明显升高 (*P* < 0.01)。见图 4。



A: Control group; B: PR8 group.

图1 2组小鼠肺组织大体形态表现

Fig. 1 Gross morphology of lung tissue of mice in two groups



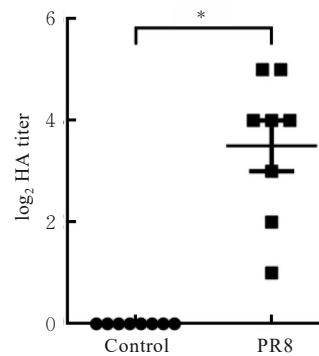
A: Control group; B: PR8 group. Black arrow pointed to the necrosis of the bronchiolar epithelium, white arrows pointed to alveolar damage, alveolar edema and inflammatory cell infiltration, black star indicated thickening of the alveolar wall, and white star indicated extensive tissue consolidation.

图2 2组小鼠肺组织病理形态表现(HE, ×200)

Fig. 2 Pathomorphology of lung tissue of mice in two groups (HE, ×200)

2.3 2组小鼠淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率

与对照组比较, PR8组



\* $P < 0.01$  vs control group.

图3 2组小鼠肺组织HA效价散点图

Fig. 3 Scatter plot of HA titers in lung tissue of mice in two groups

小鼠BALF和肺组织淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与对照组比较, PR8组小鼠淋巴结中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图5和6。

2.4 2组小鼠淋巴细胞中效应性T细胞阳性百分率

与对照组比较, PR8组小鼠BALF和肺组织淋巴细胞中效应性CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和效应性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率明显升高 ( $P < 0.01$ )。与对照组比较, PR8组小鼠淋巴结中效应性CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和效应性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图7和8。

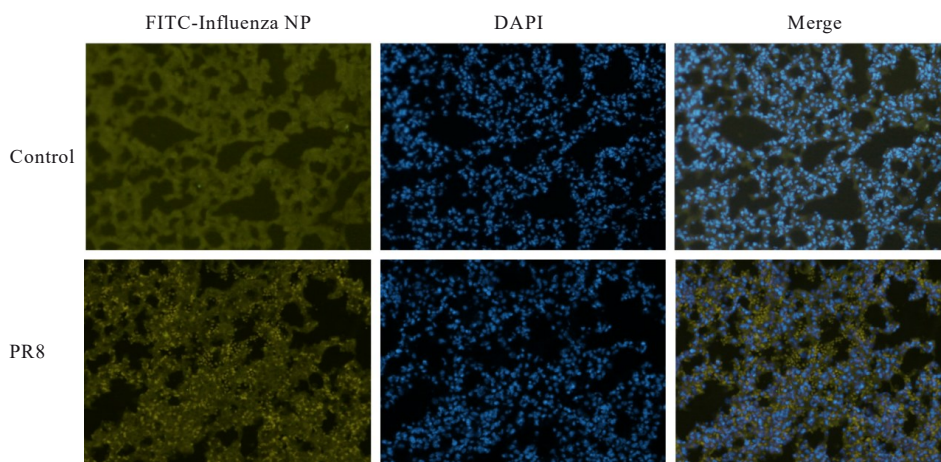


图4 免疫荧光法检测2组小鼠肺组织中NP蛋白表达情况

Fig. 4 Expressions of NP protein in lung tissue of mice in two groups detected by immunofluorescence assay

2.5 2组小鼠淋巴细胞中T<sub>M</sub>淋巴细胞阳性百分率

与对照组比较, PR8组小鼠BALF和肺组织淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>和CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞

百分率均明显升高 ( $P < 0.01$ )。对照组比较, PR8组小鼠淋巴结中CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>和CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞百分率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与对照组比

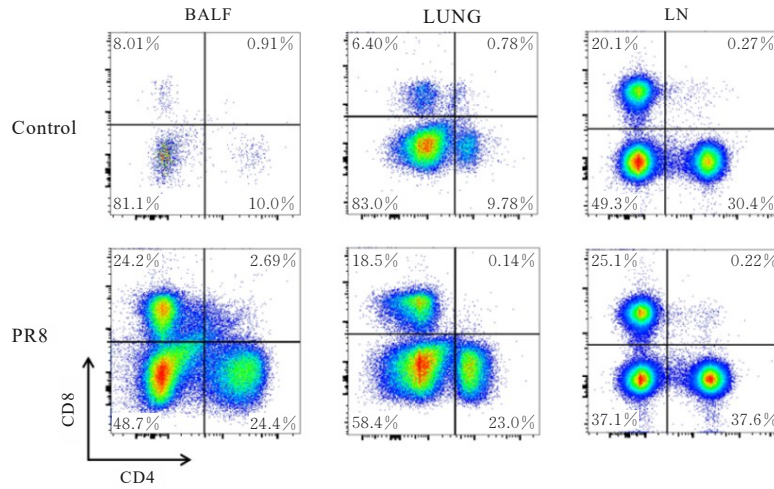
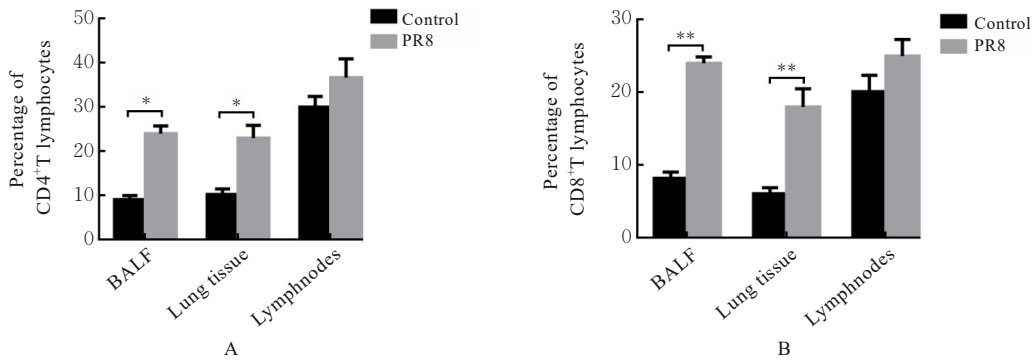


图5 流式细胞术检测2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率

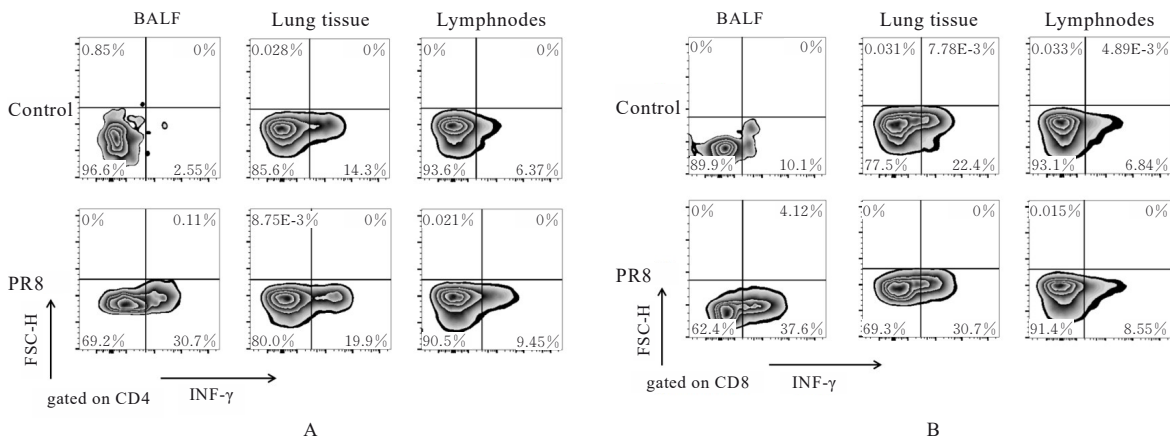
Fig. 5 Percentages of CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in BALF, lung tissue and lymphnodes of mice in two groups detected by flow cytometry



A: CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; B: CD8<sup>+</sup>T lymphocytes. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 compared with control group.

图6 2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率

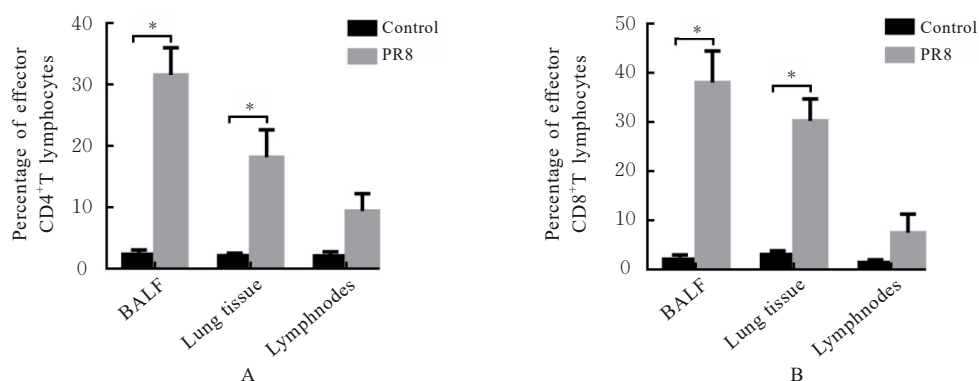
Fig. 6 Percentages of CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymphnodes of mice in two groups



A: Effector CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; B: Effector CD8<sup>+</sup>T lymphocytes.

图7 流式细胞术检测2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中效应性CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和效应性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率

Fig. 7 Percentages of effector CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymphnodes of mice in two groups detected by flow cytometry



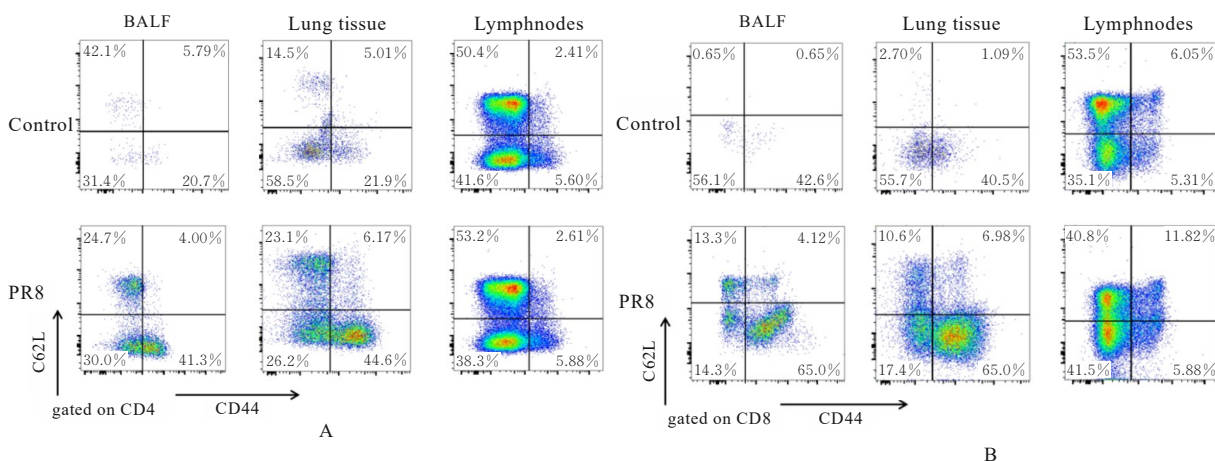
A: Effector CD4<sup>+</sup>T lymphocytes; B: Effector CD8<sup>+</sup>T lymphocytes. \* $P < 0.01$  compared with control group.

图8 2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中效应性CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞和效应性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞百分率

Fig. 8 Percentages of effector CD4<sup>+</sup>T and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups

较, PR8组小鼠BALF和肺组织淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>淋巴细胞及淋巴结淋巴细胞中CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>淋巴细胞百分率均明显升高

( $P < 0.05$ )。与对照组比较, PR8组小鼠淋巴结淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>淋巴细胞百分率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图9和10。



A: CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes and CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> lymphocytes; B: CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes and CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> lymphocytes.

图9 流式细胞术检测2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>、CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>、CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>和CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>淋巴细胞百分率

Fig. 9 Percentages of CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>, CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>, CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>, and CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups detected by flow cytometry

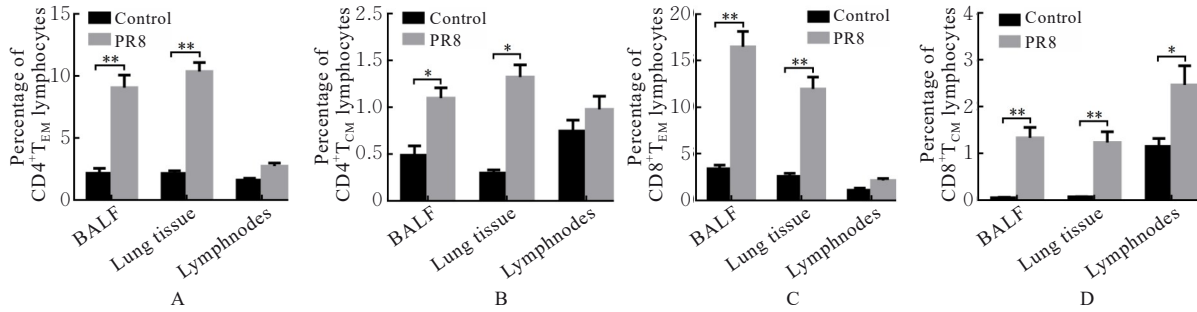
## 2.6 2组小鼠淋巴细胞中NP/PA特异性T<sub>EM</sub>淋巴细胞阳性百分率

与对照组比较, PR8组BALF和肺组织淋巴细胞中CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞、NP/PA特异性CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞及CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞百分率明显升高 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见图11~14。

## 3 讨论

近年研究<sup>[14-15]</sup>表明: 新型通用型疫苗更侧重于诱导针对病毒特异性的细胞免疫, 而细胞毒性

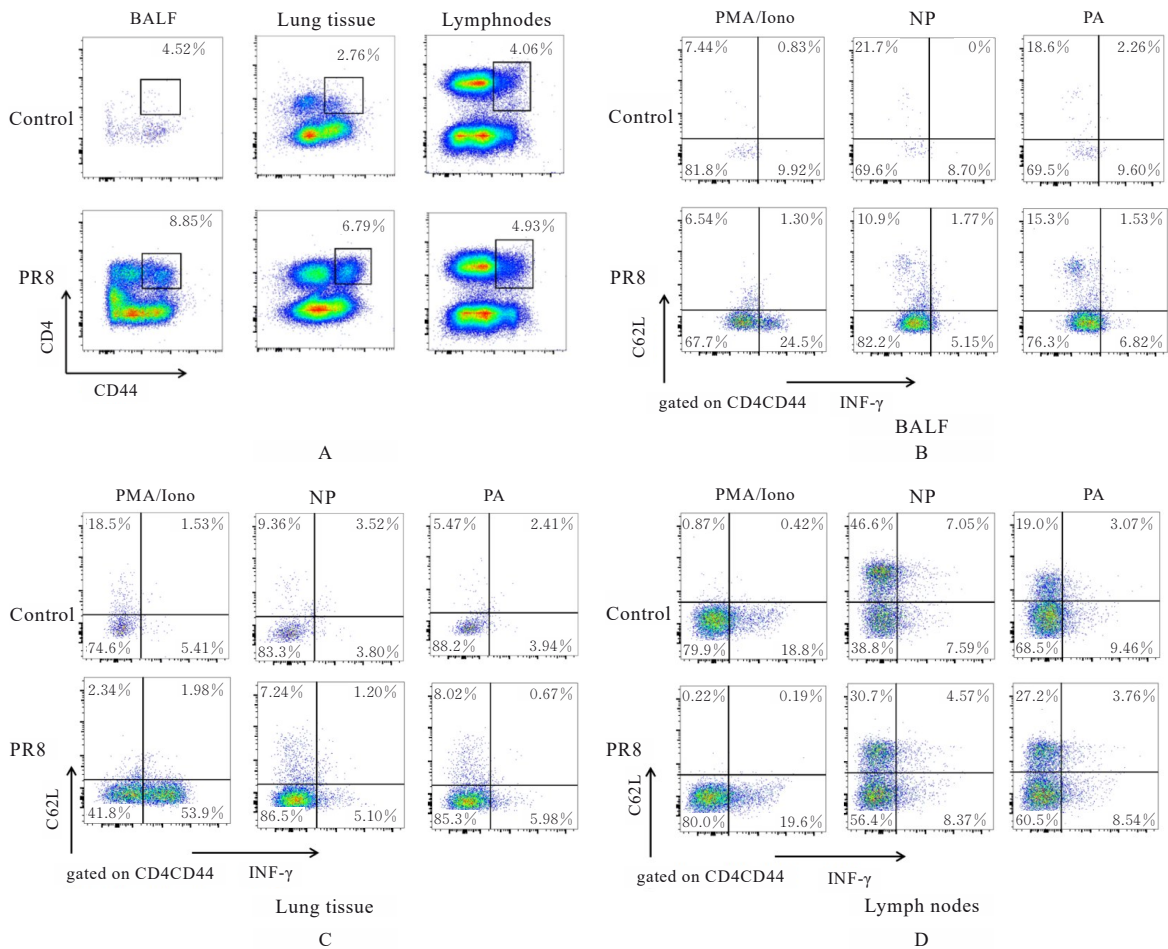
T淋巴细胞 (cytotoxic T cell, CTL) 成为诱导交叉保护效应的核心环节。流感病毒内部NP、PA、聚合酶碱性蛋白1 (polymerase basic protein 1, PB1) 和聚合酶碱性蛋白2 (polymerase basic protein 2, PB2) 基因高度保守, 经抗原提呈给T淋巴细胞后, 分化的效应性T淋巴细胞对感染病毒的细胞进行针对性破坏, 诱导广泛和持久的保护性免疫, 降低疾病发生和流感病毒传播的可能性<sup>[16-18]</sup>。本研究结果显示: 流感病毒PR8感染后小鼠BALF和肺组



A: CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes; B: CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> lymphocytes; C: CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes; D: CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> lymphocytes. \*P<0.05, \*\*P<0.01 compared with control group.

图 10 2组小鼠 BALF、肺组织和淋巴结中 CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>、CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>、CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> 和 CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> 淋巴细胞百分率

Fig. 10 Percentages of CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>, CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>, CD4<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> and CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups



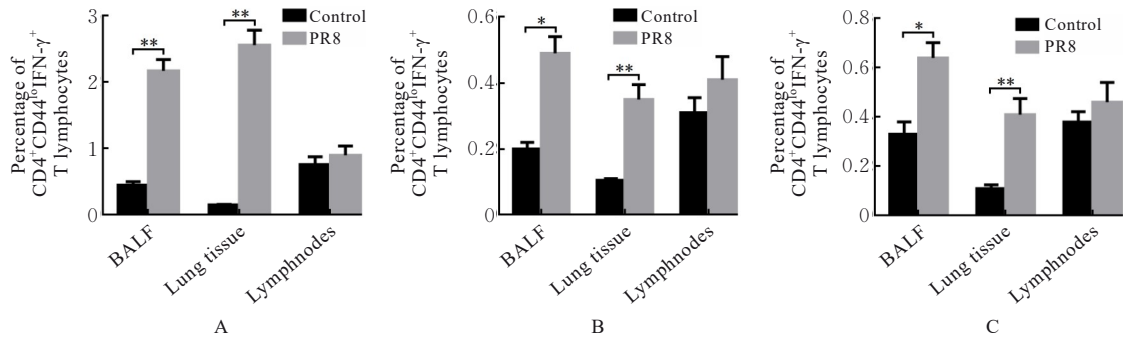
A: Gating strategy for CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>T lymphocyte populations; B: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN-γ<sup>+</sup>T lymphocytes in BALF; C: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN-γ<sup>+</sup>T lymphocytes in lung tissue; D: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN-γ<sup>+</sup>T lymphocytes in lymph nodes.

图 11 流式细胞术检测 2 组小鼠 BALF、肺组织和淋巴结中 CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> 和 NP/PA 特异性 CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> 淋巴细胞百分率

Fig. 11 Percentages of CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> and NP/PA-specific CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups detected by flow cytometry

织淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>IFN-γ 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup>IFN-γ 淋巴细胞百分

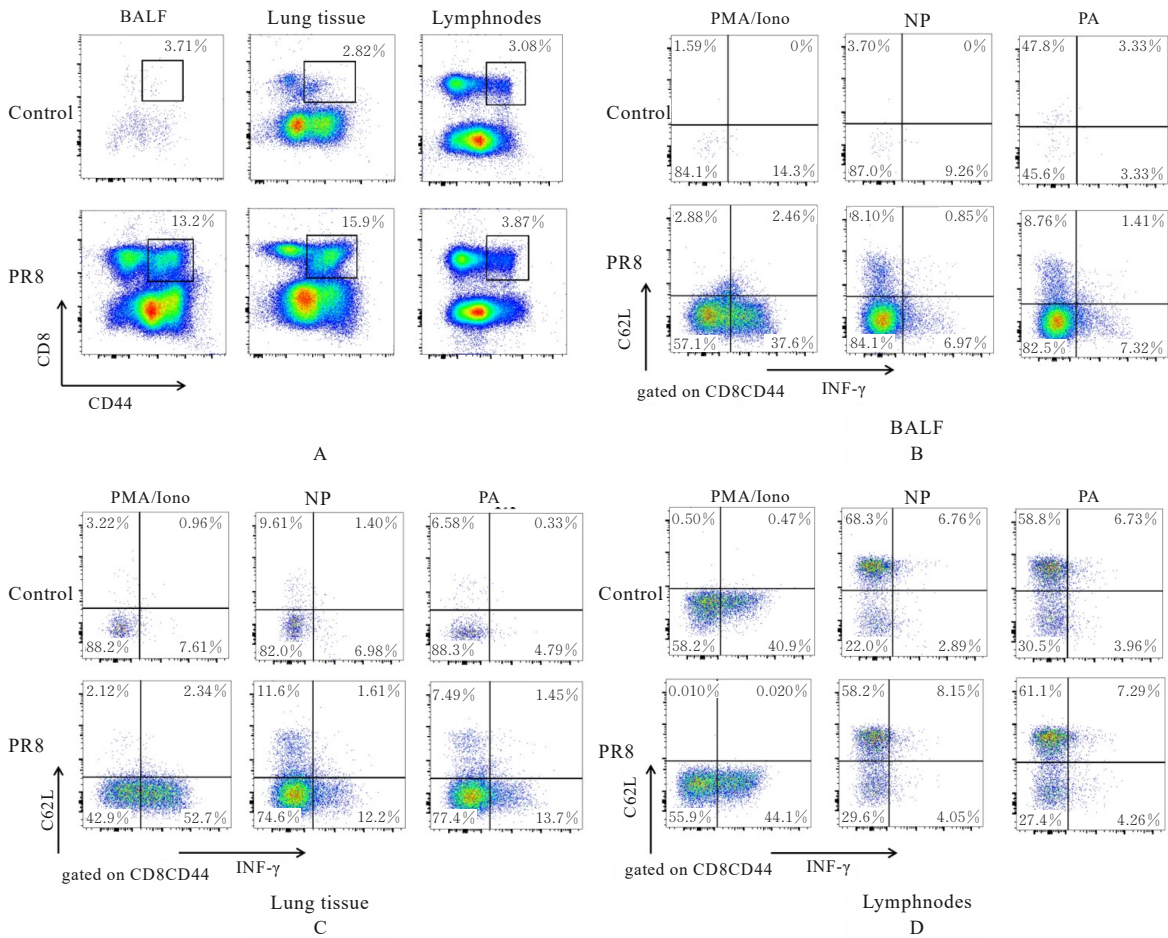
率升高, 提示机体感染病毒后诱导 T 淋巴细胞明显增殖, CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞经历病毒抗原的识别、细



A: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes by PMA/Iono; B: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes by NP; C: CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes by PA. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 compared with control group.

图12 2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>和NP/PA特异性CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞百分率

Fig. 12 Percentages of CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> and NP/PA-specific CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups



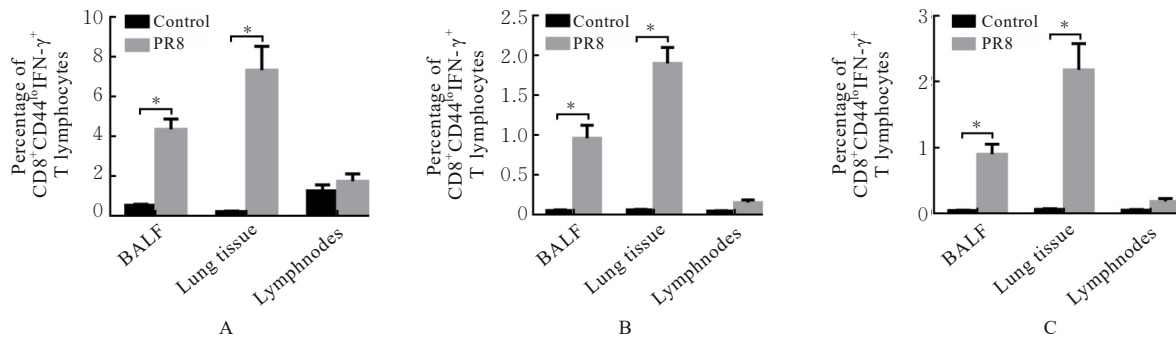
A: Gating strategy for CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> T lymphocytes populations; B: CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes in BALF; C: CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes in lung tissue; D: CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T lymphocytes in lymph nodes.

图13 流式细胞术检测2组小鼠BALF、肺组织和淋巴结中CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>和NP/PA特异性CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>淋巴细胞百分率

Fig. 13 Percentages of CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> and NP/PA-specific CD8<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups

胞活化和增殖过程，分化为CTL直接释放毒性物质诱导感染细胞的凋亡。CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞分化为辅

助性T淋巴细胞(T helper cell, Th)，通过细胞因子诱导并促进CTL清除病毒感染的靶细胞。



A:  $CD8^+CD44^{hi}CD62L^{lo}IFN-\gamma^+$  T lymphocytes by PMA/Iono; B:  $CD8^+CD44^{hi}CD62L^{lo}IFN-\gamma^+$  T lymphocytes by NP; C:  $CD8^+CD44^{hi}CD62L^{lo}IFN-\gamma^+$  T lymphocytes by PA. \* $P < 0.01$  compared with control group.

图 14 2组小鼠 BALF、肺组织和淋巴结中  $CD8^+T_{EM}$  和 NP/PA 特异性  $CD8^+T_{EM}$  淋巴细胞百分率

Fig. 14 Percentages of  $CD8^+T_{EM}$  and NP/PA-specific  $CD8^+T_{EM}$  lymphocytes in BALF, lung tissue, and lymph nodes of mice in two groups

机体受到病毒感染, 免疫系统不仅通过活化的效应性细胞清除感染, 同时向  $T_M$  淋巴细胞分化而建立起对病毒的长期免疫记忆。在呼吸道感染和黏膜免疫方面, 呼吸道周围和肺部的  $T_M$  淋巴细胞尤为重要, 其能提供快速、持久的局部免疫反应。 $CD8^+T_M$  淋巴细胞通过产生  $IFN-\gamma$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,  $TNF-\alpha$ )、白细胞介素 2 (interleukin-2,  $IL-2$ ) 等细胞因子和细胞毒性分子快速清除病毒<sup>[19]</sup>。 $CD4^+T_M$  淋巴细胞位于呼吸道周围以及肺部的特殊淋巴组织结构内, 辅助  $CD8^+T_M$  淋巴细胞的发育和抗体的产生<sup>[20]</sup>。本研究结果显示: 小鼠感染流感病毒后 BALF 和肺组织中  $CD4^+T_{EM}/T_{CM}$  淋巴细胞、 $CD8^+T_{EM}/T_{CM}$  淋巴细胞及淋巴结中  $CD8^+T_{CM}$  淋巴细胞百分率升高, 可见流感病毒经由呼吸道感染后诱发呼吸道周围和支气管相关淋巴组织内显著的黏膜免疫记忆。此外, 在流感病毒感染的第 10 天小鼠 BALF、肺组织和淋巴结中  $CD4^+T_M$  及  $CD8^+T_M$  淋巴细胞比例明显高于传统意义中约 10% 的效应性细胞群转化为  $T_M$  细胞, 支持 KEDZIERSKA 等<sup>[21]</sup> 的观点, 即在流感感染后,  $T_M$  淋巴细胞早期建立 (感染第 1 周内),  $T_{CM}$  和  $T_{EM}$  淋巴细胞谱系从原发性抗原暴露时间开始即建成, 而非传统意义的效应 T 淋巴细胞群约 10% 转化为  $T_M$  淋巴细胞。 $T_{EM}$  淋巴细胞检测结果显示: 小鼠感染后效应性  $CD4^+T_{EM}$ 、 $CD8^+T_{EM}$  及针对流感保守表位 NP/PA 的特异性  $CD4^+T_{EM}$ 、 $CD8^+T_{EM}$  淋巴细胞百分率均升高。可见, 小鼠感染 PR8 后产生针对于保守表位的特异性  $CD4^+T_{EM}$  和  $CD8^+T_{EM}$  淋巴细胞, 对同型或异型流感感染具有交叉保护效应, 有利于再次感染时高效清除流感病毒。

综上所述, 流感病毒感染诱导机体 T 淋巴细胞增殖分化为效应性 T 淋巴细胞, 启动  $T_M$  淋巴细胞和针对流感保守表位 NP/PA 特异性的  $T_M$  淋巴细胞在呼吸道黏膜局部早期建立, 本研究结果为靶向  $T_M$  淋巴细胞的通用疫苗研发提供了数据支持。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

徐昆参与实验操作、数据分析和论文撰写, 田晶参与实验数据分析和论文审阅。

#### [参考文献]

- [1] LI J L, ZHANG Y F, ZHANG X L, et al. Influenza and universal vaccine research in China [J]. *Viruses*, 2022, 15(1): 116.
- [2] LIANG Y Y. Pathogenicity and virulence of influenza[J]. *Virulence*, 2023, 14(1): 2223057.
- [3] KOSTOLANSKÝ F, TOMČÍKOVÁ K, BRIESTENSKÁ K, et al. Universal anti-influenza vaccines based on viral HA2 and M2e antigens[J]. *Acta Virol*, 2020, 64(4): 417-426.
- [4] SAYEDAHMED E E, ELSHAFIE N O, DOS SANTOS A P, et al. Development of NP-based universal vaccine for influenza a viruses [J]. *Vaccines*, 2024, 12(2): 157.
- [5] SUN X Y, MA H W, WANG X J, et al. Broadly neutralizing antibodies to combat influenza virus infection[J]. *Antiviral Res*, 2024, 221: 105785.
- [6] CEN L Q, ZHANG Z, SUN Y, et al. Efficacy of MAGE-A4 long peptide as a universal immunoprevention cancer vaccine [J]. *Cancer Cell Int*,

- 2024, 24(1): 232.
- [7] CORRADO M, PEARCE E L. Targeting memory T cell metabolism to improve immunity[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(1): e148546.
- [8] ZHOU J L, UDDBACK I, KOHLMEIER J E, et al. Vaccine induced memory CD8<sup>+</sup> T cells efficiently prevent viral transmission from the respiratory tract[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1322536.
- [9] ESSER M T, MARCHESE R D, KIERSTEAD L S, et al. Memory T cells and vaccines[J]. *Vaccine*, 2003, 21(5/6): 419-430.
- [10] DEEP D, GUDJONSON H, BROWN C C, et al. Precursor central memory versus effector cell fate and naïve CD4<sup>+</sup> T cell heterogeneity[J]. *J Exp Med*, 2024, 221(10): e20231193.
- [11] GANNON P O, BAUMGAERTNER P, HUBER A, et al. Rapid and continued T-cell differentiation into long-term effector and memory stem cells in vaccinated melanoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3285-3296.
- [12] WELTEN S P M, ODERBOLZ J, YILMAZ V, et al. Influenza- and MCMV-induced memory CD8 T cells control respiratory vaccinia virus infection despite residence in distinct anatomical niches [J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14(3): 728-742.
- [13] MALOULI D, TIWARY M, GILBRIDE R M, et al. Cytomegalovirus vaccine vector-induced effector memory CD4<sup>+</sup> T cells protect cynomolgus macaques from lethal aerosolized heterologous avian influenza challenge[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 6007.
- [14] FENG L, GAO Y Y, SUN M W, et al. The parallel presentation of two functional CTL epitopes derived from the O and Asia 1 serotypes of foot-and-mouth disease virus and swine SLA-2\*HB01: implications for universal vaccine development[J]. *Cells*, 2022, 11(24): 4017.
- [15] LIU X J, ZHAO T Y, WANG L L, et al. Strategies targeting hemagglutinin cocktail as a potential universal influenza vaccine[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1014122.
- [16] MCGEE M C, HUANG W S. Evolutionary conservation and positive selection of influenza A nucleoprotein CTL epitopes for universal vaccination[J]. *J Med Virol*, 2022, 94(6): 2578-2587.
- [17] KIM S H, ESPAÑO E, PADASAS B T, et al. Influenza virus-derived CD8 T cell epitopes: implications for the development of universal influenza vaccines[J]. *Immune Netw*, 2024, 24(3): e19.
- [18] HASSAN M S H, SHARIF S. Immune responses to avian influenza viruses in chickens [J]. *Virology*, 2025, 603: 110405.
- [19] PARK S C, WIEST M J, YAN V, et al. Induction of protective immune responses at respiratory mucosal sites[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2024, 20(1): 2368288.
- [20] SCHREINER D, KING C G. CD4<sup>+</sup> memory T cells at home in the tissue: mechanisms for health and disease[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2394.
- [21] KEDZIERSKA K, VENTURI V, FIELD K, et al. Early establishment of diverse T cell receptor profiles for influenza-specific CD8<sup>+</sup>CD62L(hi) memory T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(24): 9184-9189.