

## A型流感病毒跨动物种感染机制的研究进展

朱建国, 华修国, 艾晓杰 (上海交通大学 农业与生物学院, 上海 201101)

关键词: A型流感病毒; 跨种感染; 流行病学; 分子机制; 免疫学机制

中图分类号: S852.65; R535

文献标识码: A

文章编号: 1005-4545(2006)05-0580-03

A型流感病毒(influenza A virus, IAV)可引起广泛的动物感染,特别是禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)能引起禽类以急性致死性为主要特征的烈性传染病,常导致全群覆灭,给养殖业造成毁灭性打击。IAV亚型众多,且在流行中极易发生变异,当不同的IAV混合感染时就可能会发生基因重组。这种基因重组,自然会导致病毒生物学性质的改变,其中最重要的就是病毒致病力的增加以及感染宿主的改变,导致种间感染<sup>[1-2]</sup>。人也能感染高致病性禽流感病毒并也可能致人死亡,特别是近年来暴发于中国及东南亚一些国家,至今仍肆虐的高致病性禽流感,已经造成了多人死亡,上千万只家禽被销毁,引起了新一轮的公共卫生安全恐慌<sup>[3]</sup>。从公共卫生安全的角度讲,问题的焦点集中在流感病毒是如何实现跨动物种间感染的。实际上,有关人感染AIV的机制问题一直备受关注。一般认为,AIV直接感染人的可能性不大,必须通过中间环节才能实现对人的感染。搞清流感病毒跨动物种间感染的流行病学机制一直是该领域的研究热点,现就这方面的研究做一简要综述。

### 1 流行病学研究

很重要的一个方面是对猪的作用研究。大量的研究表明,猪可以成为禽、猪和人流感病毒共同的易感宿主,成为流感病毒不同毒株基因重配,产生新亚型病毒株的活载体和混合器,并在“禽-猪-人”的种间传播链中发挥重要的作用。因此,AIV实现动物种间交叉传播中猪的作用就成了研究的焦点。猪要实现混合器的作用,必须同时对AIV和人流感病毒都敏感。为了验证AIV在猪体内复制的特性,Kida等<sup>[4]</sup>设计了1个实验,评估了42个流感毒株在猪体内的繁殖能力,在其中的38个AIV毒株中,27个毒株不带人流感病毒HA基因的任何成分。结果每个HA亚型中至少有1个毒株在猪的呼吸道中复制5~7d,其复制水平与猪和人的流感病毒相当。结果表明,带或不带人流感病毒HA基因成分的AIV都可以感染猪,这一特性增加了将AIV基因传给人流感病毒的可能性。该研究还证明,感染AIV猪的血清用ELISA和中和试验检测具有较高的抗体滴度,但HI实验却是阴性,提示HI实验检测猪感染AIV是不可靠的。国内Shu等<sup>[5]</sup>为了评估重组流感病毒在华南地区跨种属感染的可能性,检测了南昌市郊20个农场饲养的鸭子和猪,研究采集收集于1992—1993年的咽拭子样品分离病毒,分离到11株流感病毒(鸭5株,人6株),大多数人流感病毒属于H3N2血清型。血清学研究证明感染猪的病毒来自畜家庭成员间循环感染的人流感病毒,80/156的人血清抑制2个鸭分离株的神经氨酸酶活性,说明这些AIV有跨种属感染的可能性。这些发现支持一

种说法,这就是人、禽、猪混居有利于产生新的流感病毒。Liu等<sup>[6]</sup>对在南昌地区市场鸡、鸭、猪及鹌鹑等排泄物分离到的H3N6、H9N2、H2N9、H4N6、H1N1、H3N2和H3N3通过接种试验发现,所有病毒均可在鹌鹑体内复制,而只有25%的病毒能在鸡体内进行有效复制。鹌鹑均是直接以气溶胶的形式排出体内的病毒,说明鹌鹑是改变流感病毒由排泄物转变成气溶胶这一传统感染途径中的调节器,在流感病毒自然发展史中起着重要作用。

### 2 IAV跨种属感染的分子机制

1993年,Blinov就试图阐明流感病毒在更换宿主过程中适应新宿主的分子机制,应用构建鸭、猪、人流感病毒HA RNA异源双链核酸分子的方法,分别得到各种重组体。定向重组产生的猪-人重组体和鸭-猪重组体出现了意想不到的结果:哺乳动物流感病毒的受体结合位点转移给了鸭流感病毒,而人流感病毒的受体结合位点转移给了猪流感病毒。由此产生了一个新的假说即人、鸭、猪流感病毒之间基因定向重组可以产生突破动物种属障碍的重组病毒。Manuguerra等<sup>[7]</sup>研究认为,流感病毒基因组结构的分节段性,使得其极易发生重组,只要将2个病毒在同一个细胞共感染就可能发生重组,因而改变病毒的HA基因,可引起抗原转换。在自然界,类似的重组已被确认很容易发生在同时感染猪的人流感病毒和AIV之间,这也导致了自然界每隔10年到30年就有一次流感病毒抗原转移,从而产生新的感染人的流感病毒血清型。所以每次考虑人流感暴发的原因时,都不应该忽视猪的作用。暴发于1957年和1968年的人流感,尽管比1918年的危害性稍有逊色,但还是造成了美国数万人死亡,这2次的流感病毒均被证明是重组体,这些适应了人体的重组体的表面带有AIV的成分。类似的重组体流行现象还在几处火鸡感染猪流感病毒事件中被发现。Suarez等<sup>[8]</sup>从突然导致产蛋量下降的火鸡中分离到的H1N2病毒,测序结果表明该病毒是一个复杂的基因重组体,基因来源有猪、人和禽的流感病毒。最近报道的由印度尼西亚分离到了猪的流感病毒,其基因片段结构与上述病毒相似,而进一步鉴定该病毒的一些生物学性质如血凝性和神经氨酸酶活性等需要更换常规的实验试剂,这说明流感病毒可跨种属感染,病毒的变异给常规检测方法造成了困难<sup>[9]</sup>。Reid等<sup>[10]</sup>通过分析1918年的人流感病毒表面蛋白质结构,发现该病毒来源于不同的祖先,HA基因可能直接来自AIV,同时,该病毒基因组或者是其中的部分片断很可能在侵害人体之前通过了某个中间途径。Richt等<sup>[11]</sup>报道,1998年以前,在美国分离的猪流感病毒主要是H1N1,此后,在美国农场引起呼吸道症状的流感病毒主要是H3N2,研究证明该H3N2病毒是一个三元重组体,含有来自AIV的(PA和PB2)、猪流感病毒(SIV)的(M、NP和NS)、以及人流

收稿日期:2004-09-13

作者简介:朱建国(1962-),男,副教授,博士。

感病毒的(HA、NA和PB1)基因片断成分。最近测序结果显示这种三元重组体至少从人流感病毒H3获得了明确的3个分子,从而形成3个系统发生基因连锁体(clusters (to))。为此,Richt等<sup>[11]</sup>分别研究和分析了这3个系统发生基因连锁体的抗原特性和致病特性,利用采自猪的血清进行HI和中和试验,证明cluster和cluster病毒含有共同的抗原表位,而cluster仅表现出有限的交叉反应性,致病性也不相同。

### 3 与跨种属感染有关的流感病毒生物学特性

Prokudina等<sup>[12]</sup>研究了感染AIV的细胞中NP寡聚体形成状态,仅仅用SDS-PAGE查到未煮沸样品中的痕量的单体NP,然而,在感染人流感病毒的细胞内,用SDS-PAGE检查未煮沸样品,除了NP寡核聚体,单体NP检出量也很明显。在纯化的人流感病毒和AIV颗粒中,也出现了相应的寡聚体和单体比例,而在含有来自人病毒内部结构蛋白与来自禽病毒糖蛋白的重组体的感染细胞内,也同样显示了上述人病毒感染细胞内的NP寡聚体和单体的比例。结果证明,在感染细胞内A型流感病毒NP形成寡聚体的能力与病毒的宿主来源有关。

### 4 不同种属动物结合病毒受体结构

研究认为,猪既能受人流感病毒,又能被AIV感染,是因为猪上皮细胞表面同时存在着人和禽流感病毒的受体,而所有的血清型的流感病毒HA都识别唾液乳糖丝氨酸酶。Suzuki等<sup>[13]</sup>研究证明,AIV与马流感病毒倾向于结合SA2-3半乳糖相联的结构,而人流感病毒倾向于与SA2-6半乳糖相联的结构结合。SA分布于所有的流感病毒宿主体内,猪的气管中存在着SA2-3半乳糖和SA2-6半乳糖受体,而在马体内,只能识别含2-去氧-N-乙酰基神经氨酸-6-半乳糖(NeuAc2-6Gal)。含2-去氧-N-乙酰基神经氨酸-3-半乳糖(NeuAc2-3Gal)HA的流感病毒,不能在马体内繁殖,马气管上皮细胞富含2-去氧-N-乙酰基神经氨酸-3-半乳糖识别部位,说明能识别2-去氧-N-乙酰基神经氨酸-3-半乳糖,是病毒在马体内繁殖的关键。研究还证明,2-去氧-N-乙酰基神经氨酸-3-半乳糖还与流感病毒在鸭体内繁殖有关。这些结果均是不同动物种类具有不同唾液酸种类的生物学作用的证据。众所周知,流感病毒HA蛋白被宿主裂解是其得以成功感染和复制的关键,然而,没有对人和猪体内的这种裂解酶进行过系统深入的研究。在先前从猪的肺脏中分离到了一种具有处理血凝素能力的32 000蛋白的基础上,Sato等<sup>[14]</sup>2003年又分离到另外一种类似的蛋白。属于胰凝乳蛋白酶TC30,相对分子质量30 000左右,是一个单体。试验证明,TC30可将底物裂解,裂解位点是位于P1位置的精氨酸,而且倾向于裂解含有Ser-Ile-Gln-Ser-Arg片断的底物,这一段与流感病毒(A/PR/8/34HA)的裂解位点序列相似。这种裂解活性可被抑制胰凝乳蛋白酶抑制剂所抑制,其N末端40个氨基酸与鼠和人的类似蛋白酶具有60%以上的同源性,证明TC30是在猪体内新发现的一个HA裂解酶。为了研究鸡体内流感病毒受体与其他动物体内受体的异同点,Gambaryan等<sup>[15]</sup>研究比较了外源血凝素与已知针对鸭、鸡及非洲绿猴上

皮细胞膜和神经节甘脂的黏附素,研究发现鸡的上皮细胞含有2-去氧-N-乙酰基神经氨酸-6-半乳糖末端受体,可被黑接骨木凝集素(sambucus nigra lectin)和人的流感病毒识别。这一发现解释了近年来的H9N2尽管具有人流感病毒受体结合特性,但还能在鸡体内复制的原因。鸭流感病毒可与含有短糖链神经节甘脂结合,鸭肠道内富含这种短链糖段,而人、鸡的流感病毒不与这种含短糖链的神经节甘脂结合。与鸭流感病毒相比,人、鸡的流感病毒与富含长链糖链的神经节甘脂结合紧密,而这种长链糖段在鸡肠道和猴肺内含量较高。鸭流感病毒和鸡流感病毒的不同还表现在它们识别唾液酸2-3半乳糖(Sia2-3Gal)受体末端上的第3糖亚基结构的不同。鸡流感病毒倾向于结合含有合成的唾液酸糖原聚合体的N-乙酰神经氨酸(2-3)半乳糖(1-4)葡萄糖(NeuAc alpha(2-3)Gal beta(1-4)GlcNAc-containing synthetic sialylglyco polymer),而鸭流感病毒则对含有合成的唾液酸糖原聚合体的N-乙酰神经氨酸(2-3)半乳糖(1-3)葡萄糖(NeuAc alpha(2-3)Gal beta(1-3)GlcNAc-containing polymer)的亲和力高。这一结果显示不同AIV毒株唾液酸寡糖的受体不同,在一定程度上解释了鸭流感病毒和鸡流感病毒的HA和NA的差异。Harvery等<sup>[16]</sup>研究了导致AIV H5亚型受体结合特异性改变的HA蛋白在关键位点的氨基酸的突变,结果显示有2处AIV HA蛋白同时发生的突变导致了AIV具有与人流感病毒HA相似的受体结合活性。

### 5 不同IAV在被感染哺乳动物组织的亲嗜性

1997年发生的AIV H5N1由禽直接传给人的事件增加了获得有关AIV感染哺乳动物机制信息的需要。Tanaka等<sup>[17]</sup>2003年将从病人体内分离到的H5N1感染实验动物小鼠,以期通过观察病毒在鼠体内组织分布规律,从而确定病毒毒力和组织亲嗜性变化规律。实验小鼠的主要病变是间质性肺炎和非化脓性脑炎,在小鼠脑部和三叉神经检测到了病毒,而血液中检测结果为阴性。提示病毒是在呼吸道黏膜繁殖后由三叉神经进入脑部的,这一结果暗示H5N1的脑组织亲嗜性是其感染人后获得的新的致病性。为了进一步研究H5N1的致病机制,Bright等<sup>[18]</sup>研究了接种感染后病毒在动物肺部及其他器官的复制以及淋巴细胞衰减的情况,将1997年由人分离到的AIV H5N1对通过鼻腔接种事先没有适应的BALB/c小鼠后表现出2个致病型,致肺型和致神经型,本研究对研究H5N1除肺以外的器官发病情况的具有重要意义。

### 6 IAV跨动物种感染的免疫学机制

从某种意义上讲,动物的先天免疫功能在防止流感病毒感染中发挥了重要作用<sup>[19]</sup>。Van Eijk等<sup>[20]</sup>2003年研究了作为第1道免疫屏障的猪表面活性蛋白D(pSP-D)与流感病毒的相互作用。HI实验证明,pSP-D和IAV的相互作用受位于pSP-D上的糖类识别区域的N-联糖亚基(N-linked carbohydrate moiety)的调节,取决于位于糖类末端唾液酸类型。通过血凝素着色实验和唾液酸酶特异性裂解反应分析,显示碳水化合物pSP-D专一地识别 $\alpha(2,6)$ 相联表面活性蛋白A(SAs),相比而言,表面活性蛋白A却在N-联糖亚基含有-2,3和-2,6连接的SAs,对pSP-D上的SA联接修饰反应表

明,SA 联接的类型对其 HA 活性非常重要,而且与其受体结合活性有关。pSP-D 上的 SAs 尤其对糖基化程度较低的 IAV 毒株特别重要。需要进一步阐明猪体内的 pSP-D 上独特的唾液酸酶构型决定病毒感染宿主范围的程度,以及是否有益于人、禽的流感病毒适应新宿主,从而在猪体内产生新的重组体。

#### 参考文献:

- [1] Capua I, Alexander D J. Human health implications of avian influenza viruses and paramyxoviruses[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, 23(1): 1-6.
- [2] von Grotthuss M, Rychlewski L. Influenza mutation from equine to canine[J]. *Science*, 2005, 310(5 747): 482-485.
- [3] Katz J M. The impact of avian influenza viruses on public health[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(Suppl 3): 914-920.
- [4] Kida H, Ito T, Yasuda J. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(9): 2 183-2 188.
- [5] Shu L L, Zhou N N, Sharp G B. An epidemiological study of influenza viruses among Chinese farm families with household ducks and pigs[J]. *Epidemiol Infect*, 1996, 117(1): 179-188.
- [6] Liu M, Guan Y, Peiris M. The quest of influenza A viruses for new hosts[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(Suppl 3): 849-856.
- [7] Manuguerra J C, Hannoun C. Influenza: interspecies transmissions and viral rearrangement[J]. *Bull Acad Natl Med*, 1997, 181(3): 421-430.
- [8] Suarez D L, Woolcock P R, Bermudez A J. Isolation from turkey breeder hens of a reassortant H1N2 influenza virus with swine, human, and avian lineage genes[J]. *Avian Dis*, 2002, 46(1): 111-121.
- [9] Brown I H. Advances in molecular diagnostics for avian influenza[J]. *Dev Biol (Basel)*, 2006, 124: 93-97.
- [10] Reid A H, Taubenberger J K. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(9): 2 285-2 292.
- [11] Richt J A, Lager K M, Janke B H. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 3 198-3 205.
- [12] Prokudina E N, Semenova N P, Rudneva I A. Avian and human influenza A virus strains possess different intracellular nucleoprotein oligomerization efficiency[J]. *Acta Virol*, 2001, 45(4): 201-207.
- [13] Suzuki Y. Receptor sialylsugar chains as determinants of host range of influenza viruses[J]. *Nippon Rinsho*, 2000, 58(11): 2 206-2 210.
- [14] Sato M, Yoshida S, Iida K. A novel influenza A virus activating enzyme from porcine lung: purification and characterization[J]. *Biol Chem*, 2003, 384(2): 219-227.
- [15] Gambaryan A S, Tuzikov A B, Bovin N V. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hongkong[J]. *Avian Dis*, 2003, (Suppl 3): 1 154-1 160.
- [16] Harvey R, Martin A C, Zambon M. Restrictions to the adaptation of influenza A virus h5 hemagglutinin to the human host[J]. *J Virol*, 2004, 78(1): 502-507.
- [17] Tanaka H, Park C H, Ninomiya A. Neurotropism of the 1997 Hongkong H5N1 influenza virus in mice[J]. *Vet Microbiol*, 2003, 95(1-2): 1-13.
- [18] Bright R A, Cho D S, Rowe T. Mechanisms of pathogenicity of influenza A (H5N1) viruses in mice[J]. *Avian Dis*, 2003, (Suppl 3): 1 131-1 134.
- [19] Hsieh Y C, Wu T Z, Liu D P, et al. Influenza pandemics: past, present and future[J]. *J Formos Med Assoc*, 2006, 105(1): 1-6.
- [20] Van Eijk M, White M R, Batenburg J J. Interactions of Influenza A virus with Sialic acids present on porcine surfactant protein D[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 12(1): 102-107.

(上接 505 页)

## Expression and Identification of *E. acervulina* 3-1E Gene in *Escherichia coli*

WU De-ming<sup>1</sup>, YU Kang-zhen<sup>2</sup>, BI Ying-zuo<sup>1\*</sup>, CAO Yong-chang<sup>1</sup>, MA Jing-yun<sup>1</sup> (1. College of Animal Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2. National Animal Husbandry and Veterinary Service Station, Beijing 100026, China)

**Abstract:** The gene encoding *E. acervulina* protein 3-1E was cloned into pET-32a(+) vector, then transformed into *E. coli* BL21 strain. The 3-1E fusion protein was expressed in the bacteria under induction of 1.0 mmol/L IPTG at 37 °C. The fusion protein band of about 38 500 appeared on SDS-PAGE. Western blot analysis indicated that the recombinant protein could react specifically with anti-3-1E antibody. The content of soluble body was the richest after inducing with 0.5 mmol/L IPTG at 20 °C.

**Key words:** *E. acervulina*; IPTG; Western blot

\* Corresponding author