

流感病毒受体结合与抗原性改变的分子基础

冯安林¹, 涂镇波¹, 张增峰^{2*}, 樊晓晖^{2*}

(1. 广西医科大学免疫学教研室, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学微生物学教研室, 广西南宁 530021)

摘要: 流感病毒的血凝素(HA)与宿主细胞表面糖链末端唾液酸(SA)的结合对流感病毒感染宿主起着至关重要的作用。禽流感病毒对 SA α 2-3Gal β 糖链以及人流感病毒对 SA α 2-6Gal β 糖链的结合特异性使跨种属传播受阻, 但不同的流感病毒在猪和陆地家禽等中间宿主体内发生基因重配作用后, 可使部分禽流感病毒获得适应性感染人的能力, 另一方面, 流感病毒自身的基因突变, 尤其是受体结合部位周围的特定位点, 可导致流感病毒受体结合特异性发生转变, 而病毒的变异伴随着自身糖修饰和抗原表位的改变, 使机体对其免疫识别结合的能力也随之发生变化。这些分子水平的改变都将对病毒相关的宿主受体结合和免疫应答反应产生影响。

关键词: 流感病毒; 受体结合; 抗原性; 基因重配; 基因突变

中图分类号: Q931

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2012)11-0123-04

A 型流感病毒属于正黏病毒科, 有 8 个片段的反义 RNA 链, 编码 11 个蛋白, 包括结构蛋白和一些非结构蛋白。流感病毒膜表面有 2 种重要的糖蛋白, 即血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)蛋白, 包括 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型^[1], 任何一种 HA 和 NA 均可组成一种血清型。水禽类是所有 16 种 HA 亚型的 A 型流感病毒宿主, 而人一般是 H1、H2 和 H3 亚型的流感病毒的宿主^[2]。

进入 20 世纪以来, 曾出现过几次大的流感部分暴发, 比如 1918 年的西班牙流感、1957 年的亚洲流感和 1968 年的香港流感^[3], 被认为来源于禽类的流感病毒^[2]。为什么会发生这种禽流感病毒跨种属传播到人, 流感病毒又是依靠什么变异来突破这种屏障? 随着目前关于流感病毒科研的进展, 人们对流感病毒这类跨种属传播所需具备的分子变化基础也越来越清楚。

1 HA 蛋白和唾液酸受体的结合特性

HA 蛋白是 A 型流感病毒膜上的一个重要的糖蛋白, 在病毒感染的初始阶段, 它负责与宿主呼吸道或消化道上皮细胞膜末端带唾液酸的糖链结合^[4], 是 A 型流感病毒接触和进入宿主细胞的关键。表观上的结构显示, HA 在毒粒表面呈柱状刺突, 由一个纤维状杆部和 3 个球状顶部组成, 3 个顶端各有

一个“浅袋状”结构, 这个浅袋状结构正好可以装入宿主细胞膜上糖链末端的唾液酸分子^[5]。HA 上的三个球状顶部是三聚体结构, 每一个单体都是以多肽链 HA0 的前体形式合成, 而 HA0 可被宿主细胞内的胰蛋白酶分解成 HA1 和 HA2 两个亚单位, 球部主要是 HA1 单位, 杆部主要由 HA2 和 HA1 的 N、C 末端组成, 其中作为受体结合部位(receptor binding domain, RBD)的浅袋状结构位于 HA1 亚单位上, 一般来说, 位于 RBD 周围的氨基酸残基相对其它部位更易变异, 而杆部的氨基酸则相对保守^[6]。

唾液酸(sialic acid, SA), 全称 N-乙酰神经氨酸, 为一种单糖, 细胞高尔基体内的唾液酸转移酶负责转移一分子的唾液酸至新的糖基受体, 而流感病毒可以识别并结合这些细胞膜上的糖链^[7]。唾液酸 α 2-3 半乳糖(SA α 2-3Gal β)和唾液酸 α 2-6 半乳糖(SA α 2-6Gal β)均以 C 连接方式最常见, 一般来说, 人流感病毒结合在 SA α 2-6Gal β 糖链上, 而禽类流感病毒主要结合在 SA α 2-3Gal β 糖链的受体上, 所以如果发生一个种属到另一个种属的传播只会优先出现在这个种属的宿主兼有这两种受体分布的情况下^[8], 有趣的是, 猪流感病毒能同时结合在两种受体上, 或主要结合在 SA α 2-6Gal β 序列的受体上^[9], 正是这种流感病毒结合偏好的不同导致了异种间直接传播的障碍。进一步研究发现 SA α 2-6Gal β 受体具有两种构象, Chandrasekaran A 等^[10]用激光解吸电

收稿日期: 2012-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960345); 广西医学科学实验中心开放基金项目(KFJJ2010-29)

作者简介: 冯安林(1987-), 男, 浙江温州人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。*通讯作者

离飞行时间质谱分析发现,上呼吸道纤毛细胞具有很多长链结构的 SA α 2-6Gal β ,可以根据结构分型出两种拓扑构型即圆锥和伞形。SA α 2-3Gal β 和短链的 SA α 2-6Gal β 呈圆锥形,而长链的 SA α 2-6Gal β 呈伞形,后者扩大了与血凝素 RBD 的结合。随后的数据分析表明 H1N1 和 H3N2 可与伞形糖链结合,而 H5N1 只能结合圆锥形糖链,即便是最近变异的 H5N1 具有了与短链 SA α 2-6Gal β 的结合,仍不能有效感染上呼吸道纤毛上皮,以致很难实现人与人之间传播。

2 流感病毒的基因重配作用

其他种类的流感病毒要想适应性改变获得感染人的能力,必须通过基因突变(抗原漂移)或基因重配(抗原转变),前者是病毒在宿主体内的适应性改变,而后者则是一个宿主细胞内感染了多种流感病毒,发生病毒基因片段的重配产生新的毒株^[11]。自然界中有些动物可以同时感染人流感和禽流感病毒,它们被称之为中间宿主,猪最先被认为是中间宿主。Ito T 等^[12]用凝集素结合试验来观察鸭结肠和猪气管的唾液酸受体的分布情况,结果发现鸭结肠对 MAA(特异性结合 SA α 2-3Gal β)凝集素呈强结合特性,几乎不结合 SNA(特异性结合 SA α 2-6Gal β)凝集素,而猪气管对这两种凝集素都有结合,提示猪能同时结合禽类和人流感病毒。这两种病毒都可在猪上皮细胞同时复制增殖,其可能原因为基因片段的重配,使得禽流感病毒选择性地获得人流感病毒相类似的结合特性,Hass J 等^[13]比对了 469 株分离自人、鸟和猪的 H1N1 亚型流感病毒的基因信息,并建立了进化树,同时在贝叶斯概率框架里推断出大部分跨种属传播的 H1 亚型流感病毒来源于猪,所以猪可以被看成制造基因重组流感病毒的“混合容器”^[2]。事实上,通过基因比对和进化分析表明,2009 年暴发的 H1N1 亚型流感病毒是一个三重排的 A 型流感病毒,来自禽类、猪和人的流感病毒在猪体内的重新整合,进一步验证了猪是“基因混合器”的这一说法^[14]。

同样,确定人体内的唾液酸受体分布对了解流感病毒的结合感染起着至关重要的作用。Zhang Z F 等^[15]通过类似的凝集素结合试验发现人上呼吸道,如气管和支气管多为 SA α 2-6Gal β 受体分布,而 SA α 2-3Gal β 受体只有零星分布,但是在细支气管和气泡里 SA α 2-3Gal β 受体明显增多。随后用 H5N1 亚型禽流感病毒和人 H3N2 亚型流感病毒去感染各个截断的组织切片进行体外感染试验,发现其病毒结合部位与唾液酸分布特点基本吻合。这些试验结

果一方面说明了禽流感病毒不易导致人感染的原因,另一方面又提示大剂量的禽流感病毒导致人感染,可能是通过结合了下呼吸道上的 SA α 2-3Gal β 受体^[16]。

但是,从 1997 年和 1999 年在香港暴发的禽流感 H5N1 和 H9N2 却是直接从禽类感染人,从那以后,整个亚洲对检测禽类体内的高致病性禽流感病毒的监督力度开始加大^[17],Duan L 等^[18]根据从家禽体内分离到的 318 株 H5N1 亚型流感病毒的全基因组信息,得到了 44 种不同的重组体,它们的 HA 和 NA 基因都来自一株 A/Goose/Guangdong/1/1996 的 H5N1 亚型流感病毒,推测家禽也可能起着基因整合的作用。Yu J E 等^[19]的试验表明除水禽类鸭只有少量分布的 SA α 2-6Gal β 受体外,陆禽类的鸡、鹌鹑和野鸡的呼吸道均表达较多的 SA α 2-6Gal β 以及 SA α 2-3Gal β 受体,这些常见的陆地禽类动物在重组流感病毒基因片段中起着一定作用,使得中间宿主这一概念得到进一步的拓宽。

3 流感病毒自身的基因突变

流感病毒可以通过基因重组或基因突变两种形式来适应性的结合在人呼吸道上皮细胞上,而后者可以通过特定氨基酸的改变引起病毒结合特性的改变,明晰这种变化对理解病毒结合特异性改变的原理和相关的预防监测都十分重要。Connor R 等^[20]用 56 株来自禽类、马和人体内分离到的 H2、H3 型流感病毒做唾液酸多糖链结合特异性的测定,结果表明具有人结合特性,即能结合到 SA α 2-6Gal β 糖链上的血凝素的氨基酸残基 226 和 228 位分别是 Leu 和 Ser,而来自禽类和马的 226 位和 228 位分别是 Gln 和 Gly,这种 L226Q 和 S228G 变换了的病毒几乎只结合 SA α 2-3Gal β 糖链,只有很微弱的人结合特性,这种氨基酸残基的双重差异彻底改变了 H2 和 H3 亚型流感病毒血凝素的结合特异性。事实上,H2 血清型流感病毒的 HA 晶体结构表明,它的 RBD 周围环绕着 4 个二级结构,即 190 螺旋(残基 190 到 198)、220 环(221 到 228)、130 环(134 到 138)和一个 155 位的 Thr,以及一些保守的芳香族氨基酸残基,如 98 位的 Tyr 和 153 位的 Trp 等围成^[21]。Leu²²⁶ 的侧链疏水力排斥着 Tyr⁹⁸ 的苯环,同时 Ser²²⁶ 与 Tyr⁹⁸ 上的羟基之间的范德瓦尔斯力促使 Tyr⁹⁸ 离开环 220 一定距离,延长了 H2 病毒 HA 的 RBD 区域。人上呼吸道长链伞形构象的 SA α 2-3Gal β 更易于和在 226,228 位点替换了的病毒结合,突变造成了能在人与人之间传播的流感病毒。相类似的序列差异也出现在 H3 亚型禽流感病毒和 H3

亚型人流感病毒中,主要是人细胞受体上的 Gal 单位与 HA 上 Leu²²⁶ 的疏水作用为 H3 亚型流感病毒提供了适度的结合亲和力^[22],病毒通过这 2 个位点的突变能有效地适应性感染人。

H1 病毒也可以发生相类似的变异,Matrosovich M 等^[23]利用反向遗传学技术置换了一株在家畜流行的 H1N1 亚型禽流感病毒 HA 上的特定氨基酸残基,通过 Glu190Asp (E190D), Gly225Glu (G225E) 的置换使病毒与唾液酸糖链结构特性从 SA α 2-3 变为 SA α 2-6。到目前为止,只有 H1、H2 和 H3 这 3 种流感病毒亚型可以通过 2 个位点的突变完全改变结合特性,这种发现更深入理解了流感病毒的跨种属传播所具备的结构基础。

H5N1 亚型流感病毒属于高致病性禽流感,因为它的高死亡率,所以需监测防止其大规模感染人。Stevens J 等^[6]观察 H5N1 病毒共晶体结构发现具有类似的 190 螺旋、130 和 220 环,以及保守的芳香族氨基酸,但是做同样的类似 H1 的 E190D、G225E 变换或类似 H2、H3 的 Q226L、G228S 变换却不能观测到相类似的结合特异性的改变,只能降低 SA α 2-3 的结合能力,却没能显著增加 SA α 2-6 的结合。Yang Z Y 等^[24]用 S137A 和 T192I 的置换同时改变了 H5 病毒 HA 的 130 环和 190 螺旋,发现能够增加对 SA α 2-6 的结合能力,但未能等同于上面 H1 和 H3 病毒类似的改变,可能是因为其结构更复杂,不能单纯地依靠改变 RBD 周围的氨基酸而产生作用。其它种类的禽类流感病毒还未发现这种依靠碱基适应性变异成人流感病毒的例子,但是这种增加与人结合能力的突变仍值得关注 and 监测。

4 抗原性的改变

流感病毒的抗原性随着变异而改变,它的抗原位点变异主要集中在 RBD 周围的区域,相对于这个区域,球状头部以下的杆状部分多为保守的氨基酸,其为介导细胞融合的关键。但是,机体免疫系统通常把目标定位在多变性的头部,因此只能中和免疫的病毒和相近的毒株,如何让宿主免疫集中应答在这些保守的抗原表位上,成了制造更广泛有效流感疫苗的主要障碍^[21]。

HA 上的糖修饰影响着机体对病毒的免疫结合,例如从 2004 年—2005 年里分离到的 H5N1 里都有变异 Ala160Thr(A160T),其引入了一个新的 N-糖基化位点 Asn158,这个新引入的糖链对 HA 上的一个抗原表位产生位阻效应^[6],使宿主不能有效地对这些病毒进行识别和免疫攻击,对病毒起着

掩盖的作用。Wang C C 等^[25]通过缩减 HA 上的所有糖基化位点,使只剩下最后一个 N-乙酰葡萄糖胺,发现它的结合特异性减小,但却增加了 SA α 2-3 的结合力,可能是 HA 上的糖链的位阻效应产生了受体结合特异性,这种相对非特异性的病毒容易结合到人肺部的其他形式的多糖上,虽然加剧了受感染的危险,消失的糖链却暴露了 HA 杆部的保守序列,可以引起针对它的更强烈的免疫反应,这可以为制造更有效且广泛的病毒疫苗提供新的方法。

5 小结

近年,禽类流感病毒跨种属传播到人的事件越显频繁,而隐藏在下面的分子机制则十分复杂,目前的研究主要集中在 HA 和宿主表皮的唾液酸受体的结合特异性上。通过凝集素组化和分子进化树的方法,发现了越来越多的可以同时感染人流感和禽流感病毒的中间宿主,它们起着“基因混合器”的作用,其具有产生适应性感染人的重组病毒的潜在威胁。而另一种威胁则来自病毒自身的基因突变,如 H1、H2 和 H3 血清型的禽流感病毒均可通过在 RBD 周围两个氨基酸的突变来适应性感染人,虽然这种变换形式在 H5N1 亚型等其他禽流感病毒中尚未发现,但是类似的增加 SA α 2-6 结合能力的突变还是值得关注和监测。HA 的变异同样可以引起流感病毒抗原性的改变,主要是由自身的糖修饰的改变所引起的,而根据这种变异的特性可以为制造更广泛有效的流感疫苗提供一个方向。但是,关于流感病毒结合特性仍有诸多问题尚未明了,比如 H5N1 亚型流感病毒能不能完全适应人,需要怎样的分子置换,还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus [J]. *Nature*, 2009, 459(7249): 931-939.
- [2] Liu D, Liu X L, Yan J H, et al. Interspecies transmission and host restriction of avian H5N1 influenza virus [J]. *Sci China Series C: Life Sci*, 2009, 52(5): 428-438.
- [3] 于志君,朱晓文,刘红,等. A 型流感病毒跨种传播和致病性相关蛋白研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(11): 90-94.
- [4] Gamblin S J, Skehel J J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins [J]. *J Bio Chem*, 2010, 285(37): 28403-28409.
- [5] 徐桂云. 糖链在流感病毒侵袭细胞中的作用 [J]. *化学通报*, 2000, 63(6): 31-34.
- [6] Stevens J, Blixt O, Tumpey T M, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus [J]. *Science*, 2006, 312(5772): 404.

- [7] 王亚娟, 邢国文. 唾液酸酶和唾液酸糖基转移酶的结构, 功能与催化反应研究进展 [J]. 有机化学, 2011, 31(8): 1157-1168.
- [8] Nicholls J M, Lai J, Garcia J M. Investigating the interaction between influenza and sialic acid: making and breaking the link [R]. *Influenza Virus Sialidase: A Drug Discovery Target*, 2012:31-45.
- [9] Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses [J]. *Bio Pharmaceut Bull*, 2005, 28(3): 399-408.
- [10] Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 107-113.
- [11] Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H. Reassortment between swine influenza A viruses increased their adaptation to humans in pandemic H1N1/09 [J]. *Infect Gene Evol*, 2010, 10(4): 569-574.
- [12] Ito T, Couceiro J N, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential [J]. *J Virol*, 1998, 72(9): 7367.
- [13] Hass J, Matuszewski S, Cieslik D, et al. The role of swine as "mixing vessel" for interspecies transmission of the influenza A subtype H1N1: A simultaneous Bayesian inference of phylogeny and ancestral hosts [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(2): 437-441.
- [14] 寇 铮, 胡松年, 李天宪. 甲型 H1N1 流感病毒流行株基因组进化分析 [J]. *科学通报*, 2009, 54(12): 1652-1656.
- [15] Zhang Z F, Fan X H, Li K S, et al. Prevalence of avian influenza virus receptor in human respiratory tract [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2008, 35(12): 1387-1393.
- [16] Varki N M, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations; implications for biology and disease [J]. *Lab Invest*, 2007, 87(9): 851-857.
- [17] Negovetich N J, Feeroz M M, Jones-Engel L, et al. Live bird markets of Bangladesh: H9N2 viruses and the near absence of highly pathogenic H5N1 influenza [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19311.
- [18] Duan L, Bahl J, Smith G, et al. The development and genetic diversity of H5N1 influenza virus in China, 1996 - 2006 [J]. *Virology*, 2008, 380(2): 243.
- [19] Yu J E, Yoon H, Lee H J, et al. Expression patterns of influenza virus receptors in the respiratory tracts of four species of poultry [J]. *J Vet Sci*, 2011, 12(1): 7.
- [20] Connor R, Kawaoka Y, Webster R, et al. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates [J]. *Virology*, 1994, 205(1): 17.
- [21] Xu R, McBride R, Paulson J C, et al. Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic [J]. *J Virol*, 2010, 84(4): 1715-1721.
- [22] Sawada T, Fedorov D, Kitaura K. Role of the key mutation in the selective binding of avian and human influenza hemagglutinin to sialosides revealed by quantum-mechanical calculations [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(47): 16862-16872.
- [23] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals [J]. *J Virol*, 2000, 74(18): 8502-8512.
- [24] Yang Z Y, Wei C J, Kong W P, et al. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity [J]. *Science*, 2007, 317(5839): 825-828.
- [25] Wang C C, Chen J R, Tseng Y C, et al. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response [J]. *Proceed Natl Acad Sci*, 2009, 106(43): 18137-18142.

Molecular Base of Influenza Virus Receptor Binding and Antigenicity Changes

FENG An-lin¹, TU Zhen-bo¹, ZHANG Zeng-feng², FAN Xiao-hui²

(1. Department of Immunology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China;

2. Department of Microbiology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

Abstract: The binding of influenza hemagglutinin and sialic acid which's at the terminal of glycan on host cells' surface plays a significant role in the infection of influenza virus to the host. Avian influenza virus mainly binds to SA $\alpha 2-3\text{Gal}\beta$ glycan, and human influenza virus mainly binds to SA $\alpha 2-6\text{Gal}\beta$ glycan, this difference leads to a barrier of interspecies transmission, but intermediate host like pig and terrestrial bird et al. can provide a place for diverse flu viruses to gene reassort, and help part virus get adaptation to infect human, on the other hand, the gene mutation of virus itself, especially in receptor binding domain results in changes of receptor binding specificity, however, the mutation in virus can also make the sugar modified and antigenic determinant altered, which could change the immune recognition and binding capacity of the virus. All these changes in molecular level can affect the virus receptor binding and immune response.

Key words: Influenza virus; receptor binding; antigenicity; gene reassortment; gene mutation