

我国与韩国禽流感 H9N2 病毒血凝素分子特性的区别

刘金华¹, 吴清民¹, 史为民¹, 陈福勇¹, 郭玉璞¹, Hiroshi Kida²

(1. 中国农业大学农业部预防兽医学重点开放实验室, 北京 100094; 2. 日本北海道大学兽医学部)

摘要: 中国与韩国都发生了 H9N2 亚型禽流感, 且都对养禽业造成了严重损失。国际上有不少学者认为韩国的 H9N2 亚型流感是由中国通过禽肉及其相关产品的输入而引起。本研究针对这一情况对从中国大陆分离的 H9N2 病毒和自 GeneBank 读取的韩国 H9N2 病毒的血凝素核苷酸序列进行了比较分析, 结果表明两者属于不同的进化分支。所有中国 H9N2 病毒的血凝素裂解位点都为 -RSSR/G-, 而韩国 H9N2 病毒的血凝素裂解位点为 -ASVR/G-, -ASYR/G- 或 -ASGR/G-。韩国 H9N2 病毒血凝素的受体结合位点的氨基酸在第 183、190 和 226 位点分别 H、E 和 Q; 而中国毒株的变异较大, 在第 183 位点全部为 N, 190 位点为 A、T 或 V, 第 226 位点为 L 或 Q。因此, 中韩两国的 H9N2 病毒血凝素分子特性显著不同。

关键词: 禽流感; H9N2; 血凝素; 系统进化分析

中图分类号: S852.65⁺

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)01-0079-04

我国自 1992 年在广东省首次发生 H9N2 亚型禽流感以来^[1], 陆续在其它各省区有该病发生的报道^[2], 业已对我国的养禽业造成了严重损失。1996 年与我国相邻的韩国也在数个肉种鸡场发生了临床特征与我国 H9N2 亚型禽流感相似的病情, 分离病原经鉴定为 H9N2 病毒, 也为低致病力毒株^[3]。从表面上看, 我国与韩国的 H9N2 病毒似乎有共同的起源, 因此, 在国际上有不少学者尤其是韩国的一些学者认为韩国的 H9N2 亚型禽流感由中国传播而来, 其原因有三: (1) 中国 H9N2 亚型禽流感的发生早于韩国, 病毒亚型相同, 临床发病特征相似。(2) 中韩之间的经贸频繁, 中国每年向韩国出口大量的禽肉及其相关产品。(3) 因特殊的地理条件及环境特点, 中国的华南地区被国际流感界学者认为是新型流感病毒的发生中心。为了证明中国与韩国 H9N2 亚型禽流感病毒的区别与联系, 我们进行了两国 H9N2 病毒血凝素分子特性分析, 结果表明两国的禽流感 H9N2 病毒属于不同的系统进化分支, 而且在其裂解位点和受体结合位点都存在着明显的差异。

1 材料与方法

1.1 病毒 10 株 H9N2 亚型禽流感病毒由本实验

室自广东、山东、河南、河北、北京和辽宁等省区的发病鸡或死亡鸡分离鉴定而来。韩国 H9N2 病毒血凝素序列自 GeneBank 下载读取, 本研究中用于分析的韩国毒株为 A/chicken/Korea/MS96/96 (Ck/Kor/MS96/96), A/chicken/Korea/25232-96006/96 (Ck/Kor/006/96), A/chicken/Korea/38349-p96323/96 (Ck/Kor/323/96), A/chicken/Korea/99029/99 (Ck/Kor/029/96)。同时在本研究序列系统进化分析中, 也包含了我国其他学者及国外学者发表于 GeneBank 中的 H9N2 病毒血凝素的基因序列。

1.2 RNA 的提取、PCR 和测序 采用酚-氯仿、乙醇沉淀方法自尿囊液中提取 RNA^[4], 用 Uni 12: AGCAAAGCAGG 作为反转录引物进行反转录反应, 之后按常规法进行 PCR 反应。依据 GeneBank 发表的 H9N2 序列用软件 Oligo4.0 设计 PCR 引物, 设计引物序列如下: HAF: GGCCACCAGTCAA-CAAACTC, HAR: ACATGGCCCAGAACAAGAAG; 扩增长度为 1579 bp。PCR 产物经纯化后, 采用直接法以 dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit 进行测序反应, 然后用 ABI Model377 DNA 测序仪进行测序。

1.3 序列分析 测序结果经 AutoAssembler 软件编辑整理, DNASIS 软件推导氨基酸序列, Genetyx 软件进行核苷酸及氨基酸序列的比较分析。系统进化分析采用 PHYLIP 软件在 Internet 网上分析处理 (<http://spiral.gene.nig.ac.jp/homology/clustalw>), 分析结果用 TreeView 软件绘制系统进化树。

收稿日期: 2003-01-21

作者简介: 刘金华(1966-), 男, 山东省冠县人, 博士, 副教授, 从事动物分子病毒学研究工作。

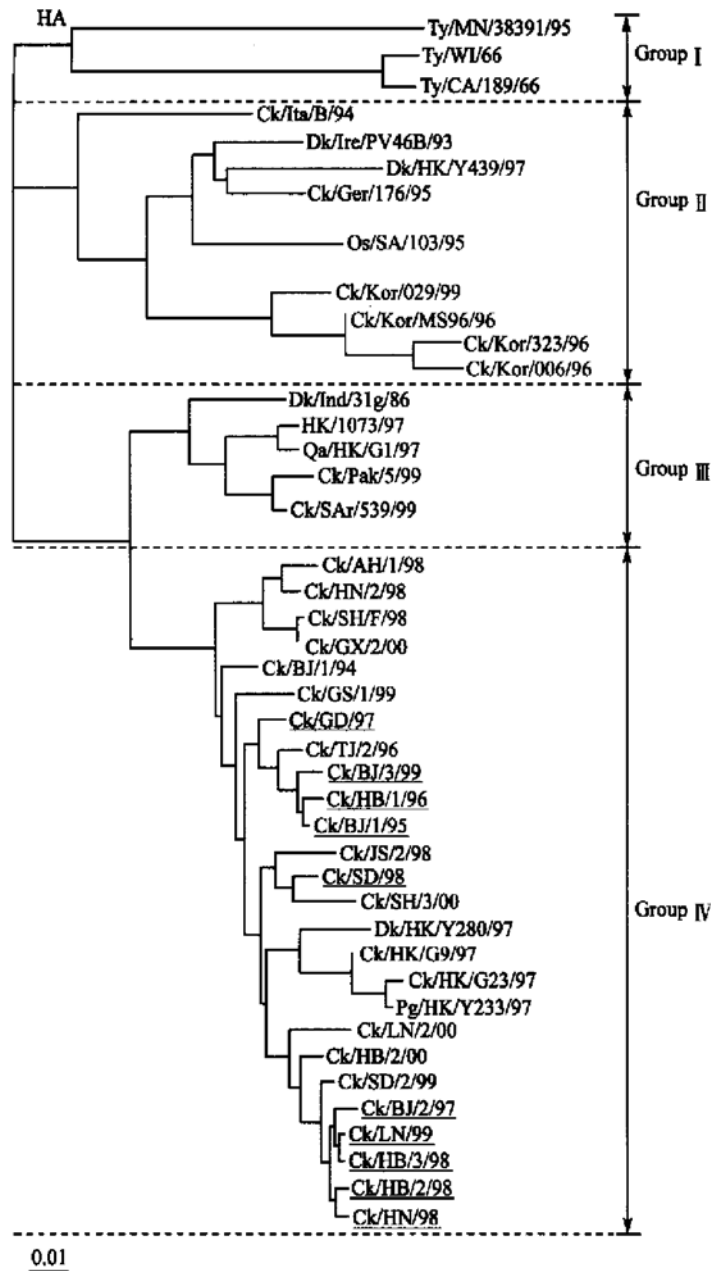


图 H9HA 亚型流感病毒血凝素系统进化树。血凝素核苷酸 128 - 1590bp(1463bp)范围内的碱基用于该分析,带有下划线的病毒为本试验中的测序病毒。

Fig. Phylogenetic tree for the H9HA gene of influenza viruses. The nucleotide sequence of HA genes based on nucleotides 128 - 1590(1463bp). Viruses sequenced in the study are underlined.

2 结果与分析

2.1 血凝素裂解位点的氨基酸序列分析 流感病毒的血凝素切割位点的氨基酸序列目前被 OIE 确定为鉴定流感病毒致病力的一个指标。根据测序结果及来自 GenBank 的核苷酸序列,将其推导为氨基酸序列。中国与韩国 H9N2 病毒血凝素裂解位点的氨基酸序列符合低致病力毒株的特点,但其裂解位点的氨基酸序列却有差异。所有来自中国大陆的鸡

只的 H9N2 病毒的裂解位点序列都为 - RSSR/G - ,而韩国病毒 Ck/ Kor/ 006/ 96 的裂解位点为 - ASVR/G - , Ck/ Kor/ 323/ 96 和 Ck/ Kor/ MS96/ 96 的为 - ASYR/G - , Ck/ Kor/ 029/ 96 的为 - ASGR/G - 。因此,尽管两国的 H9N2 病毒都为低致病力病毒,但其裂解位点有着明显的不同。

2.2 血凝素受体结合位点的相关氨基酸分析 流感病毒血凝素的受体结合位点呈袋状,位于头部末端,这一袋状结构的氨基酸很保守。自野鸭分离到

的所有亚型流感病毒,其血凝素受体结合部位在第 183、190、226 位点的氨基酸都分别为 H、E、Q,高度保守^[5]。本研究中氨基酸序列分析也表明来自韩国的 4 株 H9N2 病毒在 183、190、226 位点都分别为 H、E、Q。而来自中国的 H9N2 病毒受体结合部位的第 183 位都为 N,在第 190 位为 A、V 或 T,在第 226 位为 L 或 Q。该结果表明了中韩两国 H9N2 病毒血凝素受体结合位点的重要氨基酸差异较大。韩国的 H9N2 病毒更保留了野鸭流感病毒的特性,受体结合部位的重要氨基酸未发生变异,暗示该病毒可能由野鸭直接传入鸡群。而中国分离的 H9N2 病毒的血凝素受体结合部位的氨基酸变异较大,可能是病毒经过中间宿主时发生了变异。

2.3 系统进化分析 通过对本试验 10 株病毒血凝素基因测序结果与我国其他学者及国外学者发表于 GeneBank 中的 H9N2 的血凝素基因序列进行系统进化分析,结果如图所示。系统树分析结果表明, H9N2 病毒分为 4 个不同的组:第 1 组主要包括北美地区的 H9N2 毒株,韩国分离株全部属于第 2 组,第 3 组是以人源为代表的 H9N2 毒株,所有来自中国大陆鸡群分离的 H9N2 病毒都属于第 4 组。本结果清楚地说明了中国与韩国的 H9N2 病毒属于不同的系统进化分支。

3 讨论

到目前为止, H9N2 亚型禽流感在世界许多国家及地区都有发生的报道^[6]。在 1997 年的香港 N5H1 事件发生中, H9N2 病毒也是除 H5N1 病毒外自活鸡分离最多的一个亚型^[7]。1996~2000 年间,我国 H9N2 亚型禽流感占感染鸡群的 93.89%,为影响我国养禽业的主要亚型^[8]。韩国自 1996 年起发生 H9N2 亚型禽流感,鸡群死亡率通常在 10%~30% 左右,也造成了严重损失。中国与韩国不仅毗邻,而且经贸频繁往来,中国在韩国的禽肉市场上占有相当大的份额,因此,有许多学者认为韩国的 H9N2 亚型禽流感由中国传播而来。本研究表明,两国的 H9N2 病毒血凝素分子存在较大的差异。据报道, H9N2 病毒的欧亚分支有 3 个分支^[9],其代表株为 A/quail/Hong Kong/G1/97, A/duck/Hong Kong/Y280/97, A/duck/Hong Kong/Y439/97。研究表明,所有自中国大陆的鸡源 H9N2 病毒分离株都属于 Y280-like 分支,并且在流感家族中稳定保存,而韩国毒株都属于 Y439-like 分支。因此,在系

统进化上,两国的 H9N2 病毒有着显著差异。

病毒血凝素裂解部位的氨基酸与病毒的致病力相关^[10]。我们的分析结果表明,我国的 H9N2 病毒血凝素裂解位点都为 -RSSR/G-,裂解部位不含有多个碱性氨基酸,具备低致病力毒株的特征,尽管这些毒株来自不同省地、不同年代,在裂解位点和系统进化方面而言,较为保守,未发生变异,相反韩国毒株在裂解部位的氨基酸变异较大。

流感病毒血凝素受体特异性决定病毒入侵宿主的范围^[11]。据报道,所有野鸭禽流感病毒血凝素受体结合部位的氨基酸为 183H, 190E, 226Q,我们的分析表明,韩国的 H9N2 病毒保留了这一特性,未发生变异,而中国的 H9N2 病毒在这 3 个位点的变异较大,这也清楚地表明了两国 H9N2 的差异。应当引起我们注意的是,我国的 H9N2 病毒血凝素在第 226 位点为 L,据研究该位点为 L 的流感病毒对人的易感性增高^[5]。鉴于 H9N2 病毒已经在我国人体中分离出,并且与禽源株有很高的同源性^[12]。因此,对我国鸡源 H9N2 病毒分子流行病学调查与研究一定要给予高度重视。

总之,中国与韩国的 H9N2 病毒在临床发病特点上尽管有相似之处,但在病毒血凝素分子特性上存在着显著差异,不存在两地交互传播。

参考文献:

- [1] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌.禽流感研究 I.鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J].中国兽医杂志,1994,10:3~5.
- [2] 甘孟侯主编,禽流感(第二版)[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [3] Lee C W, Song C S, Lee Y J, et al. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolates MS96[J]. Avian Dis, 2000, 44: 527~535.
- [4] Bean W J, Sriram G, Webster R G. Electrophoretic analysis of iodine-labeled influenza virus RNA segments[J]. Anal Biochem, 1980, 102: 228~232.
- [5] Matrosovich M N, Krauss S, Webster R G. H9N2 influenza viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity[J]. Virology, 2001, 281: 156~162.
- [6] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species[J]. Vet Microbiol, 2000, 74: 3~13.
- [7] Shortridge K F. Poultry and influenza N5N1 outbreaks in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation[J]. Vaccine, 1999, 17: 26~29.
- [8] 唐秀英,田国斌,于康震,等. H9 亚型禽流感的流行与

- 防制. 中国畜牧兽医学会禽病学分会第十次学术研讨会论文集[C]. 浙江杭州, 2000, 125~ 127.
- [9] Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, et al. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the internal genes of N5N1 viruses in Hong Kong? [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1999, 96: 9363~ 9367.
- [10] Kawaoka Y, Webster R G. Sequence requirement for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1988, 85: 324~ 328.
- [11] Weis W, Brwn J H, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus hemagglutinin complex with its receptor sialic acid [J]. Nature, 1988, 333: 426~ 431.
- [12] Guo Y J, Krauss S, Senne D A, et al. Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus [J]. Chin J Exp Clin Virol, 1999, 15: 105~ 108.

The Difference of the Hemagglutinin of H9N2 Chicken Influenza Viruses Isolated in China and Korea

LIU Jin-hua, WU Qing-min, SHI Wei-min, CHEN Fu-yong, GUO Yu-pu, Hiroshi Kida
(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The phylogenetic relationships among the hemagglutinin(HA) genes of China isolates and those of Korea H9N2 viruses from the database were analyzed. The results showed that China H9N2 isolates and Korea isolates fell into a different lineage. Amino acid sequence at the cleavage site of the HA of China H9N2 viruses possessed a - RSSR/G- motif. However, Korea isolates possessed - ASVR/G-, - ASYR/G- or ASGR/G-. Amino acids at positions 183, 190, and 226 in the receptor-binding sites of Korea isolates had H, E and Q respectively. These contrast with those of China isolates that had N-183, A, T, or V at position at 190, L or Q at position 226. The present results indicate that the molecular characters of hemagglutinin of Korea H9N2 viruses are different from those of China isolates.

Key words: Avian influenza; H9N2 virus; Hemagglutinin; Phylogenetic analyses