

不同 H9N2 亚型禽流感病毒分离株致病力研究 及 HA 抗原性变异分析

陈 陆, 刘守川, 赵 军, 王川庆, 王泽霖

(河南农业大学禽病研究所, 郑州 450002)

摘要: 【目的】了解近年来中国H9N2亚型禽流感病毒毒力变化和抗原性变异的特点, 【方法】对分离于1998—2008年间的25株H9N2亚型禽流感病毒分离株进行了EID₅₀、ELD₅₀、MDT、ICPI、IVPI和8周龄SPF鸡人工感染排毒试验,测定了部分分离株与抗H9N2亚型禽流感病毒Hp参考株HA蛋白单抗2A4和F6的血凝抑制(HI)和中和反应特性,对具有不同反应特性分离株的HA基因进行了序列分析。【结果】不同分离株呈现致病力差异,具多态性特征,3#、12#和14#分离株致病力偏强,能引起部分SPF鸡发病和死亡,人工感染8周龄SPF鸡排毒时间更早,排毒期更长。3#和12#分离株与单抗2A4和F6呈现特殊的反应特性,单抗不能抑制3#和12#的血凝特性,也不能中和病毒感染CEF细胞。HA蛋白氨基酸序列分析表明,3#和12#分离株145位氨基酸发生漂变(S→N),导致与单抗的血凝抑制反应特性丢失,说明该位点(S145)为H9N2亚型禽流感病毒HA蛋白的一个抗原表位,是血凝抑制抗体结合位点。S145N的漂变导致在145—147位氨基酸多出一个糖基化位点NGT,可能是分离株毒力增强的原因。【结论】本研究结果表明,H9N2亚型禽流感病毒呈现变异趋势,出现了有致病力和抗原性变异流行毒株。S145为H9N2亚型禽流感病毒HA蛋白的一个抗原表位,但有该位点漂变导致的抗原变异毒株出现,并可逃避免疫作用,对该病的防控提出了新的挑战。

关键词: 禽流感病毒; H9N2亚型; HA蛋白; 致病力; 抗原变异

Characteristics of Pathogenic and HA Antigenic Variation of H9N2 Subtype Avian Influenza Viruses Isolated from 1998 to 2008 in China

CHEN Lu, LIU Shou-chuan, ZHAO Jun, WANG Chuan-qing, WANG Zhe-lin

(Institute of Poultry Disease, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: 【Objective】 The objective of this experiment is to investigate the characteristics of pathogenic and antigenic variation of H9N2 subtype avian influenza viruses isolated from 1998 to 2008 in China. 【Method】 The EID₅₀, ELD₅₀, MDT, ICPI, IVPI and the duration of shedding virus from infected 8-week-old SPF chickens of different H9N2 avian influenza viruses isolates were determined. The HI and VN activity of monoclonal antibody 2A4 and F6 on different H9N2 avian influenza viruses isolates were assayed and the HA genes of different antigenic reactive isolates were sequenced and analyzed. 【Result】 The determined pathogenicity suggested that the virulence of different isolates were different, thereinto, 3#, 12#, and 14# isolates showed higher pathogenicity than the others and could cause the death of SPF chickens. The 8-week-old SPF chickens infected by 3# or 12# isolate shed virus earlier and last for a longer time. 3# and 12# isolates showed specific response properties to monoclonal antibody 2A4 and F6. Monoclonal antibody 2A4 and F6 could inhibit the hemagglutinin activity of 3# and 12# isolates, however it could not neutralize the virus infection on CEF cells. HA sequence analysis showed that there was a single amino acid substitution of Ser (S)-to- Asn(N) at position 145 in the HA protein of 3# and 12# isolates, which led to the loss of reactivity to the monoclonal antibody 2A4 and F6 and the occurrence of a new potential glycosylation site NGT. The change of reactivity to the monoclonal

收稿日期: 2010-04-15; 接受日期: 2011-10-18

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2008GB2D000182)

联系方式: 陈 陆, Tel: 0371-63555340; E-mail: chenluhau@126.com. 通信作者王泽霖, Tel: 13903843061; E-mail: wangzelincn@yahoo.com.cn

antibody 2A4 and F6 suggests that the site (S145) is one of HA protein epitope of the H9N2 subtype avian influenza A virus. The new occurring potential glycoprotein site NGT in the HA protein of 3 # and 12 # isolates may cause the enhancing pathogenicity.

【Conclusion】 The results show that H9N2 subtype avian influenza virus isolates have the tendency to evolve, resulting to the occurrence of mutants which have higher virulence and variable antigenicity. The higher virulent mutants may cause death of chickens and lead to more economic loss. The antigenic mutants may evade the immunity, which pose a new challenge to the immune prevention for the H9N2 avian influenza.

Key words: avian influenza virus; H9N2 subtype; HA glycoprotein; pathogenicity; antigenic variation

0 引言

【研究意义】禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 是危害养禽业和人类健康的重要病原, 已发现有 16 个血凝素 (HA) 亚型^[1]和 10 个神经氨酸酶 (NA) 亚型。H9N2 亚型禽流感病毒最早于 1966 年从火鸡体内分离到^[2], 虽然表现低致病性, 但由于传播广泛、能造成免疫抑制并使宿主容易发生继发感染, 特别是可导致鸡群产蛋下降或完全停止, 对养禽业造成巨大经济损失, 其危害不容忽视。H9N2 亚型禽流感病毒的进化与变异不仅会给目前禽流感的防制带来困难, 而且还有传染给人的潜在威胁, 因此, 加强 H9N2 亚型禽流感病毒变异株的监测和防控措施研究具有重要的现实意义。【前人研究进展】近年来, H9N2 亚型禽流感的流行变得日益频繁, 病毒也进入了一个快速进化阶段, 有可能进一步发生遗传变异而进化出致病力更强的毒株, 或是受体结合位点的突变导致出现具有能结合人和哺乳动物流感病毒受体的特性, 或者抗原性变异后导致免疫失败现象发生^[3-5]。血凝素蛋白 (hemagglutinin, HA) 是 A 型流感病毒主要表面抗原和保护性抗原, 与病毒的感染性、致病性、宿主特异性、在机体内的增殖及组织嗜性有关。但 HA 基因变异频率很高, 其变异直接决定了禽流感病毒的致病性和抗原性变异化, 甚至单氨基酸, 尤其是抗原位点或潜在糖基化位点氨基酸的突变即可影响到病毒抗原性和致病性, 也导致了变异株与单抗呈现独特的反应特性^[6-9]。【本研究切入点】目前, 中国尚没有系统关于 H9N2 亚型禽流感病毒致病力和抗原变异的研究以及与现行制苗毒株抗原相关性的报道。为此, 笔者对分离于 1998—2008 年间的 25 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株参照鸡新城疫病毒致病力评价方法进行了致病力测定, 研究了不同流行毒株与抗 H9N2 亚型参考毒株 Hp 株 HA 蛋白单抗的 HI 和中和反应特性, 并对特殊反应特性分离株的 HA 基因进行序列分析。【拟解决的关键问题】为更好地了解近年来中

国 H9N2 亚型禽流感病毒毒力变化和抗原性变异的特点及可能的机理, 并为该病的防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

本研究是于 2008—2010 年在河南农业大学禽病研究所完成。

1.2 毒株

25 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 (1#—25#), 均由河南农业大学禽病研究所于 1998—2008 年间分离、纯化、鉴定和保存, 其中 13# 分离株经国家流感中心鉴定 (命名为 Hp 株), 是经农业部批准的现行制苗毒株之一, 在本研究中用作参考毒株。不同毒株的背景材料见表 1。

1.3 单抗 2A4 和 F6

单抗 2A4 和 F6 是河南农业大学禽病研究所用 H9N2 亚型禽流感病毒 Hp 株 (13#) 为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 应用杂交瘤技术, 经 HI 方法筛选制备的抗 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的单抗。

1.4 分离株对鸡胚的致病力试验

参照文献[10]介绍的方法测定 25 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株半数鸡胚感染量 (EID₅₀)、半数鸡胚致死量 (ELD₅₀) 和平均鸡胚致死时间 (MDT)。

1.5 部分分离株对 SPF 鸡的致病力试验

1.5.1 1 日龄雏鸡脑内致病指数 (ICPI) 和 6 周龄鸡静脉致病指数 (IVPI) 选择 8 个对鸡胚具有不同致病力的 H9N2 亚型禽流感病毒分离株, 参照文献[10]介绍的方法测定 1 日龄雏鸡 ICPI 和 6 周龄鸡 IVPI。

1.5.2 8 周龄 SPF 鸡人工感染排毒试验 选择 8 个对鸡胚具有不同致病力的 H9N2 亚型禽流感病毒分离株的尿囊液 (10⁷ EID₅₀) 用灭菌 PBS 液作 1:10 稀释, 由静脉接种 8 周龄 SPF 鸡, 每组 5 只, 每只 0.2 mL。从接毒后第 3—10 天采集喉和泄殖腔拭子, 冻融 3 次后, 接种 SPF 鸡胚, 每个拭子样本接种 2 枚, 37℃ 培养 72 h, 收取尿囊液并测定 HA 效价, 同一拭子接种的两枚鸡胚中之一 HA ≥ 2⁴ 即判为病毒分离阳性。

1.6 单抗 2A4 和 F6 对(部分)25 株分离株的 HI 特性测定

按照 GB/T 18936-2003《高致病性禽流感诊断技术》进行,将 25 株灭活的 H9N2 亚型分离株配制成 4 单位抗原,在同一条件下分别与单抗 2A4 和 F6 进行 HI 试验,鉴定单抗对 25 株分离株的 HI 特性。

1.7 单抗 2A4 和 F6 对部分分离株的中和特性测定

利用固定单抗稀释病毒法^[11],测定单抗 2A4 和 F6 对 3#、10#、12#和 17#分离株的中和活性。中和试验在鸡胚成纤维细胞上进行,病毒用含终浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰酶的维持液进行稀释,72 h 时观察细胞病变,记录结果,按 Reed-Muench 公式计算 TCID₅₀ 值。按公式计算中和指数:中和指数=中和组 TCID₅₀/对照组 TCID₅₀。以中和指数 > 50 者判定为中和活性阳性,

10—49 为可疑, < 10 为阴性。

1.8 部分分离株 HA 基因的扩增及推导氨基酸序列分析

选择 6 个不同毒力分离株,用 Trizol LS kit (Invitrogen) 从病毒增殖的第一代尿囊液抽提病毒 RNA,反转录及 HA 基因的 PCR 扩增参照文献[3]进行,PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa) 纯化并测序,序列用 DNASTAR 进行分析,比较 HA 蛋白裂解位点及糖基化位点差异。

2 结果

2.1 分离株对鸡胚的致病力

25 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 EID₅₀、ELD₅₀ 和 MDT 测定结果见表 1。由表 1 可以看出,25 个分

表 1 25 个 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 EID₅₀、ELD₅₀ 和 MDT 测定结果及与单抗 2A4 和 F6 的反应特性

Table 1 Result of EID₅₀, ELD₅₀ and MDT of 25 avian influenza A (H9N2) isolates and HI titer of 2A4 and F6 to different isolates

分离株编号及名称 No. and name of virus isolates	分离年代地点 Isolation time and location	EID ₅₀ (/0.2mL)	ELD ₅₀ (/0.2mL)	MDT (h)	单抗的 HI 效价 (log ₂) HI titer of Mab to different isolates	
					2A4	F6
1# A/Chicken/Henan/A1/98(H9N2)	1998 河南 Henan	10 ^{-6.3}	10 ^{-4.8}	90.6	17	18
2# A/Chicken/Henan/A2/98(H9N2)	1998 河南 Henan	10 ⁻⁶	10 ^{-4.9}	101.7	17	16
3# A/Chicken/Henan/A3/98(H9N2)	1998 河南 Henan	10 ^{-8.8}	10 ^{-8.1}	66.5	0	0
4# A/Chicken/Guangzhou/A1/99(H9N2)	1999 广州 Guangzhou	10 ^{-7.2}	10 ^{-7.0}	96.5	16	16
5# A/Chicken/Henan/A1/99(H9N2)	1999 河南 Henan	10 ^{-6.1}	10 ^{-4.9}	103.2	17	16
6# A/Chicken/Shangqiu/A1/00(H9N2)	2000 商丘 Shangqiu	10 ^{-8.8}	10 ^{-8.7}	70.6	16	15
7# A/Chicken/Changge/A1/00(H9N2)	2000 长葛 Changge	10 ^{-7.0}	10 ^{-6.5}	93.9	18	16
8# A/Chicken/Qixian/A1/00(H9N2)	2000 淇县 Qixian	10 ^{-8.4}	10 ^{-8.3}	71.5	17	15
9# A/Chicken/Sichuan/A1/01(H9N2)	2001 四川 Sichuan	10 ^{-8.4}	10 ^{-8.1}	75.3	16	17
10# A/Chicken/Zhuhai/A1/01(H9N2)	2001 珠海 Zhuhai	10 ^{-8.4}	10 ^{-8.3}	73.1	17	15
11# A/Chicken/Qixian/A1/01(H9N2)	2001 淇县 Qixian	10 ^{-8.4}	10 ^{-7.5}	89.9	17	17
12# A/Chicken/Henan/C4/02(H9N2)	2002 河南 Henan	10 ^{-8.8}	10 ^{-8.7}	69.9	0	0
13# A/Chicken/Henan/A1/02(H9N2)	2002 河南 Henan	10 ^{-7.4}	10 ^{-7.7}	98.4	17	16
14# A/Chicken/Huangdong/A1/03(H9N2)	2003 黄洞 Huangdong	10 ^{-8.7}	10 ^{-7.6}	90	17	15
15# A/Chicken/Xinzhuang/A1/03(H9N2)	2003 新庄 Xinzhuang	10 ^{-8.0}	10 ^{-7.9}	86.6	16	18
16# A/Chicken/Xingzhong/A1/04(H9N2)	2004 邢中 Xingzhong	10 ^{-7.9}	10 ^{-7.0}	87.7	17	17
17# A/Chicken/Qixian/A1/04(H9N2)	2004 淇县 Qixian	10 ^{-7.5}	10 ^{-5.1}	90.5	17	18
18# A/Chicken/Kaifeng/A1/05(H9N2)	2005 开封 Kaifeng	10 ^{-7.2}	10 ^{-5.2}	98.1	16	16
19# A/Chicken/Kaifeng/A2/05(H9N2)	2005 开封 Kaifeng	10 ^{-8.3}	10 ^{-5.3}	96.3	18	16
20# A/Chicken/Henan/A4/06(H9N2)	2006 河南 Henan	10 ^{-6.8}	10 ^{-6.7}	92.4	17	15
21# A/Chicken/Henan/A5/06(H9N2)	2006 河南 Henan	10 ^{-7.4}	10 ^{-5.9}	89.7	16	16
22# A/Chicken/Xuchang/A1/07(H9N2)	2007 许昌 Xuchang	10 ^{-7.4}	10 ^{-7.3}	94.2	17	16
23# A/Chicken/Puyang/A1/07(H9N2)	2007 濮阳 Puyang	10 ^{-7.6}	10 ^{-7.1}	96	17	15
24# A/Chicken/Zhongmou/A1/08(H9N2)	2008 中牟 Zhongmu	10 ^{-7.6}	10 ^{-7.1}	79.2	16	16
25# A/Chicken/Qixian(new)/A1/08(H9N2)	2008 淇县(新)Qixiang (new)	10 ^{-8.8}	10 ^{-7.7}	76.3	18	18

离株间 EID₅₀、ELD₅₀ 和 MDT 有很大差异。其中, 3#、6#、12# 分离株的 EID₅₀ 值最高, 均为 10^{-8.8}/0.2 mL; ELD₅₀ 值分别为 10^{-8.1}/0.2 mL、10^{-8.7}/0.2 mL; MDT 较短, 分别为 66.5 h、70.6 h、69.9 h, 表现出对 SPF 鸡胚较强的致病力和增殖侵袭能力。

2.2 部分分离株对 SPF 鸡致病力

选出不同年份、不同 MDT 的 8 个 H9N2 亚型禽流感病毒分离株测定其 ICPI 和 IVPI, 结果见表 2。由表 2 可以看出, 3#、12# 和 14# 分离株表现出较强的致病力, 可引起部分 SPF 鸡发病或死亡, ICPI 分别为

0.238、0.437、0.338; IVPI 分别为 0.340、0.510、0.170, 而其余分离株均不引起 SPF 鸡死亡, ICPI 和 IVPI 值均为 0。虽然 3#、12#、14# 分离株致病力偏强, 但从 ICPI、IVPI 的结果来看, 尚远未达到高致病力的程度。

8 个 H9N2 亚型禽流感病毒分离株人工感染 8 周龄 SPF 鸡排毒试验结果见表 3。由表 3 可以看出, 3# 和 12# 分离株接种鸡在第 3—9 天能通过泄殖腔排毒, 排毒期为 7 天, 而其余分离株接种的鸡排毒时间大多在第 5—8 天。结果表明, 3# 和 12# 分离株人工感染鸡排毒时间更早, 排毒期更长。

表 2 8 个 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 ICPI 和 IVPI 测定

Table 2 The ICPI and IVPI of 8 avian influenza A (H9N2) isolates

分离株编号 No. of virus isolates	3#	4#	12#	14#	17#	18#	22#	25#
ICPI	0.238	0	0.437	0.338	0	0	0	0
IVPI	0.340	0	0.510	0.170	0	0	0	0

表 3 8 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株人工感染 8 周龄 SPF 鸡排毒试验

Table 3 The results of virus shedding of 8-week-old SPF chickens at the indicated time after challenge with avian influenza A (H9N2) isolates

分离株编号 No. of virus isolates	排毒鸡只数量/攻毒鸡只数量 No. of chickens shedding/total no. of chickens challenged							
	第 3 天 3rd day	第 4 天 4th day	第 5 天 5th day	第 6 天 6th day	第 7 天 7th day	第 8 天 8th day	第 9 天 9th day	第 10 天 10th day
3#	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5
6#	0/5	0/5	4/5	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5
10#	0/5	0/5	2/5	5/5	3/5	3/5	0/5	0/5
11#	0/5	0/5	4/5	4/5	4/5	3/5	2/5	0/5
12#	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5
14#	0/5	0/5	2/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5
17#	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	3/5	0/5	0/5
18#	0/5	0/5	3/5	4/5	4/5	3/5	0/5	0/5

2.3 单抗 2A4 和 F6 对部分分离株的 HI 特性

单抗 2A4 和 F6 与 25 株分离株的 HI 反应特性见表 1。由表 1 可以看出, 单抗 2A4 和 F6 与 25 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株呈现不同的血凝抑制特性, 不与 3# 和 12# 分离株反应。结果表明, 3# 和 12# 分离株 HA 抗原发生变异, 缺失了与单抗 2A4 和 F6 结合的位点。

2.4 单抗 2A4 和 F6 对部分分离株的中和特性

单抗 2A4 和 F6 对 3#、10#、12# 和 17# 分离株的中和指数均小于 10。结果表明, 抗 H_p 参考株 HA 单抗 2A4 和 F6 对 H9N2 亚型分离株均无中和活性, 即不能抑制该病毒在鸡胚成纤维细胞上增殖。

2.5 部分分离株 HA 蛋白推导氨基酸序列分析

测定的 6 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株 HA 蛋白受体结合位点、潜在糖基化位点以及裂解位点

氨基酸序列比较见表 4。从表可以看出, 分离株的裂解位点氨基酸序列出现了 3 种模式: **RSSR↓GLF**、**RLSR↓GLF** 和 **VSSR↓GLF**。高致病力毒株的裂解位点一般有多个碱性氨基酸残基插入, 其模式一般为 **R-X-R/K-R**, 而低致病力毒株的裂解位点没有或仅有 1 个碱性氨基酸。因此, 依据裂解位点的序列特征可判断本试验分析的分离株均为低致病性毒株。

6 个分离株氨基酸序列分析比较发现, 与其它毒

株相比, 3#和 12#共同表现为 145 位氨基酸发生漂变 (S→N), 正是这一位点的氨基酸漂变, 导致与单抗的反应性丢失。说明该位点 (S145) 为 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的一个抗原表位, 是一个具有血凝抑制特性的抗原位点, 但可能不是一个中和表位。巧合的是, 145 位氨基酸的漂变导致在 145—147 氨基酸多出一个糖基化位点 NGT, 该糖基化位点的出现与抗原位点的丢失及变异株毒力增强有一定的联系, 但其机理尚不清楚。

表 4 部分 H9N2 亚型分离株 HA 基因氨基酸序列关键位点的序列比较

Table 4 The comparison of HA amino acid sequence of avian influenza A (H9N2) isolates

毒株 Virus	受体结合位点 Receptor-binding site							潜在糖基化位点 Potential glycosylation site							裂解位点 Cleavage site		
	109	161	163	191	198	202	203	29-21	82-84	141-143	145-147	218-220	298-300	305-307	492-494	551-553	333—341
3#	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF
4#	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	_*	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF
10#	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	_	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF
12#	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARLSR↓GLF
14#	Y	W	T	H	E	L	Y	NST	NPS	NVT	_	NRT	NTT	NIS	NGT	NGS	PAVSSR↓GLF
17#	Y	W	T	N	V	L	Y	NST	NPS	NVS	_	NRT	NTT	NVS	NGT	NGS	PARSSR↓GLF

* “_” 表示相应位置不存在潜在糖基化位点 * “_” show the inexistence of potential glycoprotein site at corresponding positions

3 讨论

HA糖蛋白是A型流感病毒主要表面抗原和保护性抗原。HA糖蛋白的抗原特性直接影响病毒的感染性、致病性、宿主特异性及组织嗜性。但HA基因变异频率很高, 不同位点, 尤其是重要氨基酸位点的变异能导致禽流感病毒的抗原性和致病性变异。A型流感病毒的 16 个HA亚型中, 只有几个亚型HA的结构特征和抗原图谱得以解析, Wiley^[12]最早通过对抗原漂变变异株和免疫逃逸突变株的序列分析, 结合X线晶体衍射技术, 确定了H3 亚型HA分子 3D结构上的抗原表位区域。在此基础上, H1^[13]、H2^[14]、H5^[15]和H9^[16-17]亚型HA蛋白抗原图谱均得以解析, 不同亚型, 甚至同一亚型不同变异株的抗原性存在一定差异。流感病毒HA蛋白序列呈现多态性, 甚至单氨基酸的漂变也导致了变异株与单抗呈现独特的反应特性^[6-9]。因此, 可利用单抗进行HA蛋白抗原性分析和突变株的鉴别诊断。

目前, 很多研究通过测定不同抗HA蛋白单抗与临床分离或人工传代构建的流感变异株和免疫逃逸突变株的反应特性, 比较具有特殊反应特性的病毒株的HA序列差异来确定HA的抗原位点^[14], 免疫逃逸突变株能抵抗单抗的中和作用, 对这些突变株测序分析能预测HA蛋白结构^[18-19], 并对流行毒株进行抗原分群。本研究中, 3#和 12#分离株失去与H9 亚型HA蛋白单抗发生HI反应特性, 呈现出与其它毒株不同的反应特性, 说明其相应的抗原位点已发生变异, 并经过序列分析发现, 3#和 12#共同表现为 145 位氨基酸发生漂变 (S→N), 正是这一位点的氨基酸漂变, 导致 3#和 12#分离株HA抗原发生变异, 缺失了与单抗 2A4 和F6 结合的位点, 与单抗的反应性丢失。从而可以鉴定 S145 为H9N2 亚型禽流感病毒HA蛋白的一个抗原表位, 是血凝抑制抗体作用位点。流感病毒HA蛋白快速抗原漂变导致的抗原性变异是疫苗有效性的最大障碍。作者在对 3#和 12#分离株与H9 制苗用毒株Hp

株进行单因子血清交叉保护中和试验时也发现 3# 和 12# 分离株发生变异, 变异株与制苗用毒株之间抗原性存在一定的差异(另文发表)。结果表明, 由于单位点氨基酸漂变导致的抗原性变异可能导致临床上一些流行的变异株会逃逸现有疫苗诱导抗体的中和作用, 出现免疫失败现象。因此, 流感病毒随机突变和进化成具有不同抗原性的新的亚型的特性对于控制流感感染提出了新的挑战。对目前 H9N2 亚型禽流感病毒抗原性变异毒株的监测对于该病的防控具有重要作用, 本研究中所用单抗可为目前临床上变异株的鉴定和疫苗株的选择提供了基础。

HA 蛋白潜在的糖基化位点也是影响禽流感病毒抗原性的重要因素, 不同位置的寡糖链对 HA 蛋白的生物学功能有截然不同的作用^[20]。抗原位点在糖基化空间上阻止感染抗体的靠近和结合^[21]。本研究中, 3# 和 12# 变异株在抗原位点(S145)的变异导致了该位点抗原性的丢失, 巧合的是, 该位点的氨基酸漂变出现一个潜在的糖基化位点, 该糖基化位点可能利用空间位阻效应屏蔽了抗原决定簇所在区域, 阻止了抗体对抗原的结合, 导致抗原性的改变。有研究证明, 糖基化通过掩蔽蛋白表面比单一氨基酸替换在改变氨基酸抗原性上更有效^[21]。

在免疫压力和自然选择下, H9N2 亚型禽流感有可能发生遗传变异而进化出致病力更强的毒株^[5,24-26]。本试验检测的 3# 和 12# 抗原变异毒株具有较强的致病力, 不仅其 EID₅₀ 值(均为 10^{-8.8}/0.2 mL)、ELD₅₀ 值(分别为 10^{-8.1}/0.2 mL 和 10^{-8.7}/0.2 mL)最高, 鸡胚平均死亡时间也最短(分别为 66.5 h 和 69 h), 而且还能引起 SPF 鸡死亡, ICPI 分别为 0.238 和 0.437, IVPI 分别为 0.34 和 0.51。决定流感病毒致病力的因素较多, HA 裂解位点氨基酸序列是决定禽流感病毒致病力和毒力强弱的因素之一。HA 蛋白裂解位点氨基酸序列表明, 3# 和 12# 分离株 HA 蛋白裂解位点氨基酸没有发生变异, 具有低致病性毒株裂解位点的序列特征, 仍为低致病性流感毒株。

HA 蛋白潜在的糖基化位点也是影响禽流感病毒致病力的因素, 受体结合位点附近的糖基会影响病毒和宿主细胞的结合水平, 裂解位点附近的糖基可能通过干扰蛋白酶进入裂解位点影响蛋白酶对 HA 前体蛋白的裂解。大部分文献报道, HA 蛋白潜在的糖基化位点的出现和增加会使病毒株的毒力下降, H9N2 毒株 T188N 的替换导致一个潜在糖基化位点的获得, 从而使变异株的毒力下降^[22]。Kaverin 等^[23]报道 H5 亚

型 HA 蛋白一个新的糖基化位点的出现导致病毒突变株对小鼠毒力下降。Tsuchiya 等^[20]报道 H2 亚型 HA 糖基化位点的出现在细胞融合和受体结合活性上下降, 从而导致毒力下降。本研究中, 3# 和 12# 变异株 HA 蛋白在 145—147 位出现一个新的潜在糖基化位点, 但同时表现为毒力增强, 这一结果与以往报道有所不同, 作者认为糖基化位点在序列上所处的位置可能是导致这一结果的原因, 因为该糖基化位点刚好处于发生漂变的关键氨基酸位点上。当然, 其中的确切机制和相关性尚有待研究。流感病毒毒力是由多基因控制的, 3# 和 12# 变异株毒力的增加也可能与 HA 以外基因的突变有关。

4 结论

本研究通过对不同年代 H9N2 亚型禽流感病毒分离株的致病力和抗原性测定与分析, 表明目前 H9N2 亚型禽流感病毒呈现变异趋势, 有毒力增强和抗原变异株出现。对不与单抗发生 HI 和中和反应变异株的 HA 蛋白序列分析表明, S145 是 H9N2 亚型禽流感病毒的血凝抑制抗体作用位点。出现的 H9N2 亚型禽流感病毒变异株可能引起家禽死亡, 导致更大的临床危害, 并能逃避现有某些疫苗所诱导抗体的抗感染作用。这使临床防控本病面临的形势更加严峻, 对疫苗株的选择提出了更高的要求, 同时, 也提示需要不断监测 H9N2 亚型禽流感病毒的变异趋势和规律, 更好地为临床防控该病提供依据和指导。

References

- [1] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, Bestebroer T M, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan G F, Olsen B, Osterhaus A D. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*, 2005, 79: 2814-2822.
- [2] Homme P J, Easterday B C. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. *Avian Disease*, 1970, 14: 66-74.
- [3] Zhang P, Tang Y, Liu X, Peng D, Liu W, Liu H, Lu S, Liu X. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5 year period (1998-2002). *Journal General Virology*, 2008, 89, 3102-3112.
- [4] Sun Y, Pu J, Jiang Z, Guan T, Xia Y, Xu Q, Liu L, Ma B, Tian F, Brown E G, Liu J. Genotypic evolution and antigenic drift of H9N2 influenza viruses in China from 1994 to 2008. *Veterinary*

- Microbiology*, 2010, 146(3-4): 215-225.
- [5] Park K J, Kwon H I, Song M S, Pascua P N, Baek Y H, Lee J H, Jang H L, Lim J Y, Mo I P, Moon H J, Kim C J, Choi Y K. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmer. *Journal General Virology*, 2011, 92(1): 36-50.
- [6] Rogers G N, Paulson J C, Daniels R S, Skehel J J, Wilson I A, Wiley D C. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*, 1983, 304: 76-78.
- [7] Xu L, Bao L, Lv Q, Deng W, Ma Y, Li F, Zhan L, Zhu H, Ma C, Qin C. A single-amino-acid substitution in the HA protein changes the replication and pathogenicity of the 2009 pandemic A (H1N1) influenza viruses *in vitro* and *in vivo*. *Virology Journal*, 2010, 7: 32-35.
- [8] Xu Q, Wang W, Cheng X, Zengel J, Jin H. Influenza H1N1 A/Solomon Island/3/06 virus receptor binding specificity correlates with virus pathogenicity, antigenicity, and immunogenicity in ferrets. *Journal of Virology*, 2010, 84: 4936-4945.
- [9] Ping J, Li C, Deng G, Jiang Y, Tian G, Zhang S, Bu Z, Chen H. Single-amino-acid mutation in the HA alters the recognition of H9N2 influenza virus by a monoclonal antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(1): 168-171.
- [10] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽药生物制品质量规程 (2001年版). 北京: 中国农业出版社, 2001.
Agricultural Ministry of the People's Republic of China. *Quality regulations of Veterinary Biologics of the People's Republic of China* (2001 edition). Beijing: China Agricultural Press, 2001. (in Chinese)
- [11] 殷震, 刘景华. 动物病毒学(第二版). 北京: 中国农业出版社, 1997.
Yin Z, Liu JH. *Animal Virology* (2nd edition). Beijing: China Agricultural Press, 1997. (in Chinese)
- [12] Wiley D C, Wilson I A, Skehel J J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*, 1981, 289: 373-378.
- [13] Caton A J, Brownlee G G, Yewdell J W, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin. *Cell*, 1982, 31: 417-427.
- [14] Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, Matsuzaki Y, Muraki Y, Li ZN, Nakamura K. Antigenic structure of the hemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 2475-2484.
- [15] Philpott M, Hioe C, Sheerar M, Hinshaw VS. Hemagglutinin mutations related to attenuation altered cell tropism of a virulent avian influenza A virus. *Journal of Virology*, 1990, 64: 2941-2947.
- [16] Okamatsu M, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N, Kida H. Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Archives of Virology*, 2008, 153(12): 2189-2195.
- [17] Kaverin N V, Rudneva I A, Ilyushina N A, Lipatov A S, Krauss S, Webster R G. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: Analysis of H9 escape mutants. *Journal of Virology*, 2004, 78(1): 240-249.
- [18] Ferreira H L, Lambrecht B, van Borm S, Torrieri-Dramard L, Klatzmann D, Bellier B, van den Berg T. Identification of a dominant epitope in the hemagglutinin of an Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 1 virus by selection of escape mutants. *Avian Disease*, 2010, 54(1): 565-571.
- [19] Wei J, Yan B, Chen Z, Li T, Deng F, Wang H, Hu Z. Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemagglutinin of H5N1 and antigenic investigation of avian influenza H5N1 viruses isolated from China. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(1): 42-48.
- [20] Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, Matsuzaki Y, Muraki Y, Li Z N, Nakamura K. Effect of addition of new oligosaccharide chains to the globular head of influenza A/H2N2 virus hemagglutinin on the intracellular transport and biological activities of the molecule. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 1137-1146.
- [21] Skehel J J, Stevens D J, Daniels R S, Douglas A R, Knossow M, Wilson I A, Wiley D C. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 1984, 81: 1779-1783.
- [22] Schulze I T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176: 24-28.
- [23] Kaverin N V, Rudneva I A, Ilyushina N A, Varich N L, Lipatov A S, Smimov Y A, Govorkova E A, Gitelman A K, Lvov D K, Webster R G. Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 2497-2505.
- [24] 刘红旗, 张评浒, 刘秀梵, 刘文博, 贾立军. 封闭式饲养鸡场 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因在 5 年内的遗传变异. *微生物学报*, 2003, 43 (6): 706-711.
Liu H Q, Zhang P H, Liu X F, Liu W B, Jia L J. Genetic Mutations of hemagglutinin genes of H9N2 subtype influenza A viruses in the field in a five-year period. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43 (6): 706-711. (in Chinese)

- [25] 娄本红, 朱秀同, 孙贝贝, 崔治中. 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的变异. 微生物学报, 2009, 49 (7) : 955-959.
- Lou B H, Zhu X T, Sun B B, Cui Z Z. Mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under selective pressure of antibody. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(7): 955-959. (in Chinese)
- [26] 刘红旗, 黄 勇, 程 坚, 彭大新, 贾立军, 张如宽, 刘秀梵. 在疫苗免疫选择压力下 H9N2 亚型禽流行性感冒病毒 HA 基因的遗传变异. 病毒学报, 2002,18(2): 150-154.
- Liu H Q, Huang Y, Cheng J, Peng D X, Jia L J Zhang R K, Liu X F. Genetic mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under the selective pressure of vaccination. *Chinese Journal of Virology*, 2002, 18(2): 150-154.(in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)