

综述与专论

禽流感及其免疫防制研究*

段明星** 何宏轩 张强哲

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 禽流感一直是严重危害世界各国养禽业发展的头号大敌, 近期又成为继严重急性呼吸道综合症 (SARS) 后又一严重威胁人类生命安全的重要疾病, 由于禽流感病毒抗原及其致病力的易变性, 这就要求未来的防制策略要采取快速检测, 并用先进的分子生物学技术进行病毒鉴定、检疫及免疫保护等措施, 建立全国性甚至全球性禽流感检测防制网络, 并且搞清禽流感与人类流感的关系, 从而保证人和动物的安全。

关键词 禽流感, 禽流感病毒, 免疫防制

学科分类号 Q7

禽流感即禽流行性感冒 (avian influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的一种烈性传染病。Perroncito 在 1878 年首次报道了意大利鸡群爆发一种严重疾病, 1901 年, Centannic 和 Sarunozzi 认为此病由“可滤过”病原引起, 直到 1955 年才证实此病原为 A 型禽流感病毒。1985 年, 禽流感被我国农业部列为 I 类传染病。目前, 禽流感已经被国际兽疫局 (OIE) 定为 A 类传染病, 并被列入国际生物武器公约动物类传染病名单。禽类感染禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 后, 可引起从亚临床到轻度上呼吸道疾病, 精神萎顿, 食欲减退, 种鸡产蛋量和孵化率下降, 到急性高度致死性疾病综合症, 造成巨大的经济损失。随着集约化养禽业的发展, 禽流感对养禽业威胁更大^[1]。1997 年发现禽流感病毒能感染人, 特别是 2003 年经历 SARS 后, 又在越南等国发现禽流感感染人的事件, 加之禽流感病毒抗原及致病力的易变性, 使得世界范围内的人们都高度重视禽流感^[2]。因此, 本文对禽流感及其免疫防制进行综述, 以期使人们警觉起来, 及早应对与防控流感的流行。

1 禽流感概述

1.1 禽流感病毒的形态与结构

禽流感是由正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起的。正粘病毒科只有一个属, 即流感病毒属。流感病毒根据核蛋白 (NP) 和基质蛋白 (MS) 抗原性质不同分成 A、B 和 C 三种类型, 其中 A 型除可以感染禽类外, 还可感染人类, 以及

马、猪等 (表 1)。

Table 1 Hosts ingested by influenza A virus^[3]
表 1 A 型流感病毒的宿主范围^[3]

HA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
鸟类	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
人	+	+	+		+		+		+						
猪		+		+											
马			+			+									

注: + 表示可以感染。

禽流感病毒具有多形性, 典型的病毒粒子一般为球形, 直径 80~120 nm (图 1)。但也常有同样直径的丝状形态, 长短不一。AIV 由囊膜和核衣壳构成。囊膜表面有 10~12 nm 的密集钉状物或纤突覆盖, 病毒囊膜内有螺旋形核衣壳。两种不同形状的表面钉状物是棒状三聚体的血凝素 (hemagglutinin, HA) 和蘑菇形四聚体的神经氨酸酶 (neuraminidase, NA), 他们可凝集某些动物的红细胞, 对呼吸道系统都有致病性, 特别是其对粘多糖和糖蛋白具有特殊的亲和力, 尤其是对细胞表面含唾液酸的受体具有更强的亲和力。核衣壳呈螺旋对称。核酸类型为负链单股 RNA 病毒, 基因组分为 8 个节段 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、

* 中国博士后基金资助项目。
** 通讯联系人。

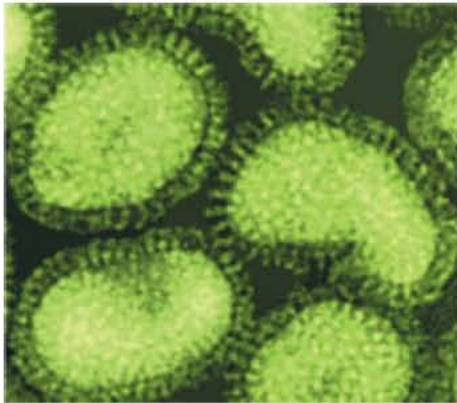


Fig.1 Map of influenza virus virion by EM

图1 流感病毒粒子的电镜照片

引自 <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emiages.html>

M、NS)，编码 10 个蛋白质（PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、NS2）（图 2），PB2、PB1、PA 这 3 个蛋白质组成病毒的 RNA 聚合酶，与 NP、M1 称为病毒的内源蛋白，HA、

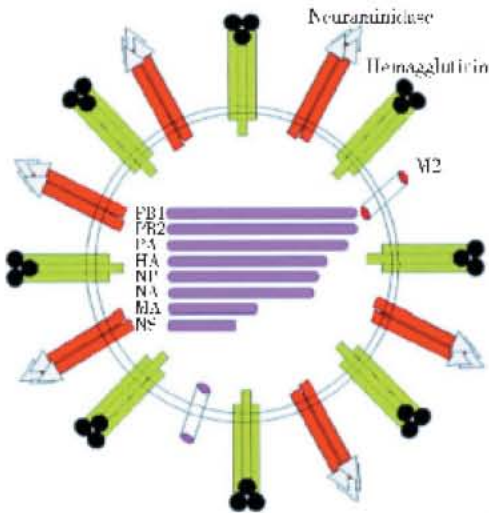


Fig.2 Diagram of AIV^[4]

图2 禽流感病毒粒子模式图^[4]

Table 2 Genome and protein encoded by its gene

表 2 禽流感病毒基因组及其编码的蛋白质

基因片段	基因长度	mRNA 长度	蛋白质名称	蛋白质长度	分子质量	功能
1	2 341	2 320	PB2	759	96 000	三种蛋白质具有 RNA 转录酶活性，并以聚合酶复合体的形式存在于基因组的 3'端。
2	2 341	2 320	PB1	757	87 000	
3	2 233	2 211	PA	716	85 000	
4	1 778	1 575	HA（HA1） （HA2）	566（343） （223）	50 000 30 000	三聚体构成病毒囊膜的纤突，具有凝集活性，与细胞受体结合。
5	1 565	1 540	NP	498	56 106	螺旋排列在病毒 RNA 外构成核衣壳 CTL 抗原
6	1 413	1 392	NA	454	50 087	四聚体构成囊膜的纤突，具有酶活性。
7	1 027	1 005	M1	252	27 861	主要结构蛋白，位于囊膜和核衣壳之间，功能多跨膜蛋白，与病毒的装配有关。
		316	M2	96	11 000	
8	890	868	NS1	230	26 815	非结构蛋白，只存在于感染细胞内，可能与病毒的装配有关。
		395	NS2	121	14 216	

1.2 禽流感病毒的分类与命名

AIV 的毒株分类基于 HA 和 NA 亚型。目前已发现 15 种 HA 和 9 种 NA，所有这些都是从禽流感分离物中以不同的组合鉴定出来的。为了鉴定病毒的 HA 和 NA，要应用一组对不同亚型特异的抗血清，对分离物进行血凝抑制（HI）和神经氨酸酶抑制（NI）试验。如：H5N1 就表示 HA 亚型是 5，NA 亚型是 1 的 AIV。

NA、M2 为外源蛋白，NS1、NS2 为非结构蛋白，虽然 NS1 蛋白在感染细胞中可大量产生，但 NS1 是唯一没有包裹在病毒粒子上的蛋白质。禽流感的基因和蛋白质的详细情况见表 2。

针对 AIV 的命名，1971 年提出了流感病毒命名的标准体系，1980 年又进行了修订。一株流感病毒的名称包括型（A、B 或 C），宿主来源（除人外），地理来源。毒株编号（如果有）和分离的年代，后面及圆括号内附以 HA（H）和 NA（N）的抗原性说明。如：AIV A/Chicken/Henan/1/1999/（H9N2）。

1.3 禽流感的流行与灾害

以 H5、H7 为主的高致病力禽流感常以突然死亡和高死亡率为主要特征，是一种毁灭性疾病，每一次严重爆发都给养禽业造成巨大的经济打击。目前禽流感在美洲、欧洲、亚洲、澳大利亚、非洲等世界上许多国家和地区都发生过。20 世纪 90 年代初之前确定禽流感的大爆发有 8 次，分别是苏格兰的 H5N1（1959 年），英国的 H7N3（1967 年），澳大利亚的 H7N7（1975 年），英国的 H5N2（1979 年），美国的 H5N2（1983 年），冰岛的 H5N8（1983 年），美国的 H7N7（1985 年），冰岛的 H5N1（1991 年）。进入 20 世纪 90 年代以来，国外禽流感的报道频繁。1991 年 10 月至今，公开报道发生高致病力禽流感的国家有澳大利亚（H7N3 和 H7N7），巴基斯坦（H7N3）和墨西哥（H5N2）等。在我国，近年来以 H9 亚型流行为主，曾使局部造成严重危害。

2 禽流感病毒分子致病机理

高致病力禽流感对鸡和火鸡有高达 100% 的致死率，然而它的分子致病机理又是什么呢？研究表明 HA 在病毒入侵过程中起重要作用。当病毒与宿主细胞结合后，HA 会诱导病毒囊膜与细胞膜结

合，使病毒粒子进入细胞。病毒要具有侵染性，必须经过两个过程：a. 宿主蛋白酶将 HA 裂解为 HA1 和 HA2；b. 裂解后的 HA2 暴露出疏水区并与宿主细胞膜脂双层相互结合^[5]。禽流感病毒 HA 裂解为 HA1 和 HA2 是 AIV 致病的重要因素，在病毒入侵细胞及决定病毒致病力方面起着关键作用。低致病力禽流感病毒（low pathogenic avian influenza virus, LPAIV）在 HA 裂解位点上只有一个或两个碱性氨基酸——精氨酸^[6]，这种结构只能被存在于呼吸道和消化道内的精氨酸特异蛋白酶识别并裂解，因此，LPAIV 感染一般只在呼吸道和消化道内局部繁殖。而高致病力禽流感病毒（high pathogenic avian influenza virus, HPAIV）在 HA 裂解位点具有多个碱性氨基酸^[7]，可被机体大多数组织细胞内的蛋白酶识别并裂解，具有广泛的嗜细胞性。所以一旦 HPAIV 进入机体就会迅速全身扩散，导致全身多个组织发病并死亡。总之，HA 碱性氨基酸的多少和宿主体内蛋白裂解酶的分布是决定病毒致病能力及其在机体内扩散能力的主要因素。目前分离到的 HPAIV 均为 H5 和 H7 亚型，在 HA 裂解位点上具有多个碱性氨基酸（表 3），而相当一部分 H5、H7 亚型为 LPAIV，值得注意的是 H5、H7 亚型 LPAIV 感染鸡后很容易突变为

Table 3 Amino acid sequences of the split site in H5 and H7 subtype AIV
表 3 H5 和 H7 亚型 AIV 裂解位点氨基酸序列比较

毒株	亚型	致病力	裂解位点氨基酸序列
A/HongKong/156/97	H5N1	+	PQRERRKKR * GLF
A/Chicken/HongKong/220/97	H5N1	+	PQRERRKKR * GLF
A/Goose/Guangdong/1/96	H5N1	+	PQRERRKKR * GLF
A/Turkey/Ireland/1378/83	H5N8	+	PQR -KRKKR * GLF
A/Turkey/England/91	H5N1	+	PQR -KRKTR * GLF
A/Chicken/Penn/1370/93	H5N2	+	PQ - - -KKKR * GLF
A/Chicken/NY/14009/83	H5N2	-	PQ - - -RKTR * GLF
A/Duck/NY/184/88	H5N3	-	PQ - - -RETR * GLF
A/Gull/MD/1756/78	H5N2	-	PQ - - -RETR * GLF
A/Chicken/Victoria/85	H7N7	+	PEIPKKREKR * GLF
A/Turkey/England/199/79	H7N7	+	PEIPKKREKR * GLF
A/Turkey/England/63	H7N3	+	PETP-KRRRR * GLF
A/FPV/Egypt/45	H7N1	+	PS- -KKRRKR * GLF
A/Pekinrobin/CA/30412-5/94	H7N1	-	PEIP - -KRRR * GLF
A/Chicken/NJ/15086-3/94	H7N3	-	PENP- - -KTR * GLF
A/Turkey/Ireland/1846/89	H7N7	-	PETP- - -KGR * GLF
A/Chicken/NY/13142-5/94	H7N2	-	PENP- - -KTR * GLF

HPAIV. 究竟是什么原因使 LPAIV 变为 HPAIV 的呢? Bashiruddin^[8]发现 H7 亚型 HPAIV A/chicken/Victoria/76 切割位点处较 LPAIV A/duck/Victoria/76 插入了 3 个碱性氨基酸. 1995 年墨西哥禽流感, 早期分离株 A/chicken/Mexico/31381/94 表现为 LPAIV, 而后期分离株 A/chicken/Pueblo/94 和 A/chicken/Querataro/20/95 表现为 HPAIV, 3 株均为 H5 亚型 AIV. Perdue 等^[9]分析它们的序列发现, LPAIV A/chicken/Mexico/31381/94 裂解位点氨基酸序列为 PQRETRG, 而两 HPAIV 分别为 PQRKRKTRG 和 PQRKRKRKTRG, HPAIV A/chicken/Pueblo/94 有一个 P 后的 -3 位 E 残基突变为 K, 同时在 P 后的 -5、-6 位插入 RK 残基, 而 A/chicken/Querataro/20/95 在裂解位点处插入 RKRK 序列. 这样 H5 和 H7 亚型 LPAIV 通过氨基酸突变或直接插入碱性氨基酸, 使其裂解位点处具有 4 个以上的碱性氨基酸而具备 HPAIV 的条件. 此外对美国宾夕法尼亚洲禽流感早期分离株 A/chicken/Pennsylvania/1/83 (LPAIV) 和晚期分离株 A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (HPAIV) 序列分析表明, 两毒株 HA1-HA2 的裂解位点序列完全一致, 最大的差异是 HPAIV 裂解位点附近的一糖基化位点缺失, 导致毒力增高. 因此 HA 切割位点处多个碱性氨基酸的插入和 HA 上糖基化位点的丢失均能使 AIV 的致病性增高^[10].

3 禽流感分子生物学诊断技术

在禽流感的诊断方面, 目前已建立了禽流感琼脂扩散 (AGP)、血凝抑制试验 (HI)、神经氨酸酶抑制试验 (NI)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等血清学诊断技术. 传统的鸡胚接种试验在以往的实践中解决了对禽流感流行病学监测、诊断与防治. 目前, 还分别制备了 H1~H15 和 N1~N9 的标准诊断及分型抗原和血清, 建立了 HI、NI 诊断方法, 保障了禽流感的分离与鉴定的需要. 随着血清学实验技术和生物工程技术的快速发展, 具有高度敏感性和特异性的分子生物学技术已经被用于 AI 的快速诊断^[11].

1986 年, Perdue 用 PCR 诊断禽流感, 从接种鸡胚到出结果仅用 36h. 我国学者崔尚金等建立了逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 诊断只需 8 h. 目前, 我国通过设计合成 AIV 核蛋白 (NP) 基因特异引物, 建立了可以直接从临床病料的感染组织中检测所有亚型禽流感病毒的 RT-PCR 诊断技术.

实验表明, 它可应用于亚型禽流感感染的早期快速诊断, 具有敏感、特异、快速的特点. 目前, 我国还建立了对临床病料或鸡胚接种物中 H5 和 H7 亚型 AIV 进行快速分离检测 RT-PCR 技术, 同时还可根据应用特定引物经 RT-PCR 扩增出的 H5 和 H7 包括裂解位点在内的 HA 基因片段, 经测序推断出氨基酸序列. 判断 H5 和 H7 亚型 AIV 致病性高低, 为禽流感的防治提供了有效的早期快速诊断技术和检测技术^[12~16].

依赖核酸序列的扩增技术 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA), 又称自主序列复制系统 (self-sustained sequence replication, 3SR) 或者再生长序列复制技术, 主要用于 RNA 的扩增、检测和测序, 是 1990 年由 Guatelli 等首先报道的. 该方法特点是操作方便, 不需特殊仪器, 不需温度循环. 整个反应由三种酶控制, 循环次数少, 忠实性高, 其扩增效率高于 PCR, 特异性好. Lau 等^[17,18]建立的方法可以用来检测 H5 和 H7 亚型 AIV 的 HA 部分基因序列, 通过进一步的分析能够检测 AIV 的所有亚型 (H1~H15). 整个核酸分离、扩增和检测仅需 6 h, 用 3 个 AIV 分析, 结果表明测试范围可达 5~7 项, 反应灵敏, 特异性高, 无交叉反应, 也没有假阳性或假阴性, 与鸡胚接种试验结果一致.

Spackman 等^[19]建立了一种用水解探针检测 AIV 及其 H5 和 H7 亚型的 RRT-PCR 方法 (real-time reverse transcriptase/polymerase chain reaction). 所用的 AIV 引物和探针是针对多数 A 型 AIV 保守区序列, 所用的 H5 和 H7 引物和探针是针对北美地区 AIV 的 HA 基因的. 用鸡胚接种试验分析了纽约和新泽西 109 个交易市场的 1 550 个棉拭样品. 用 RRT-PCR 方法检测鸡胚接种试验中 65 个 H7 阳性市场, 结果检测的阳性市场为 61 (93.8%). 用 HI 检测的 58 个 H7 阳性市场再用 RRT-PCR 检测, 阳性市场为 56 (96.5%). 虽然 RRT-PCR 的敏感度不如鸡胚接种试验, 但是它仍是农场和交易市场快速检测 AIV 的方法.

逆转录聚合酶链反应酶联免疫吸附分析技术 (one-tube reverse transcriptase/polymerase chain reaction coupled with an enzyme-linked immunosorbent assay, RT-PCR-ELISA) 也是一种灵敏、特异、精确的定量检测 AIV 技术. 设计两条特异探针, 其序列分别与 AIV 基因的不同区域互补. 其中一条为带有氨基修饰的捕获探针, 可以与微量 DNA 结

合板表面的 NOS 基团共价结合, 另一条为标记生物素的检测探针. 提取样品中 AIV RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 产物热变性后与检测探针一起加入已包被捕获探针的微孔板内进行夹心杂交, 最后加入链亲和素辣根过氧化物酶及底物, 在 450nm 波长处检测吸光度. 该方法灵敏度高、特异性好, 适用于 AIV 的定量检测. Dybkaer 等^[20]用该方法检测了 419 个样品, AIV 阳性 32 个样品, 用鸡胚接种试验仅检出 23 个, 阳性率高出 39%, 32 个鸡胚接种检出的阴性样品, 该方法检测到 2 个阳性样品. RT-PCR-ELISA 方法诊断敏感性和特异性分别为 91% 和 97%.

4 禽流感的免疫防制

尽管目前有特异性的抗流感病毒药物, 如金刚烷胺 (amantadine)、金刚乙胺 (rimantadine)、扎那米韦 (zanamivir) 和奥司他韦 (oseltamivir), 但是就像对付其他传染病一样, 免疫预防是最佳选择. 由于禽流感病毒不断发生变异, 为疫苗研制造成困难. 诱发禽流感病毒发生变异的原因主要为: a. 抗原漂移 (antigen drift), 基因组自发的点突变引起小幅度的变异, 积累到一定程度或正好使抗原决定簇发生改变; b. 抗原转变 (antigen shift), 两种不同亚型病毒共同感染一宿主细胞, 两者的基因片段发生遗传重组; c. RNA 重组, 来自不同宿主的流感病毒在同一宿主体内发生基因交替; d. 缺损性病毒颗粒的产生等. 尽管如此, 疫苗接种仍然是预防禽流感的一种非常有效措施. 下面就禽流感疫苗研制历程作一概括.

4.1 灭活疫苗和亚单位疫苗

现在临床使用的疫苗是失去感染性的灭活疫苗. 应用灭活苗可以预防同一血凝素类型的病毒引起的发病死亡, 传统的灭活疫苗具有良好的免疫保护性, 是禽流感防制的主要措施和关键环节. 我国 H5、H7 亚型禽流感灭活苗已经研制成功, 并取得了良好的免疫保护效果, 经实验表明: 仔鸡免疫 AI 灭活苗 7 天产生免疫力, 其保护率为 80%, 10 天保护率为 95%, 14 天保护率可达 100%. 灭活苗具有安全性好, 没有变异重组的风险. 其抗原便于储备, 紧急应用时可随即配制成本价亚型疫苗, 而且在亚型抗原之间不产生免疫干扰. 但仍有毒力返祖的危险^[21].

1994 年, 运用 HA 基因制备亚单位疫苗已有报道. Kodihalli 等制备了 NP/HA ISCOM 疫苗, 该

疫苗能诱导细胞发生特异性反应, 表现为 T 细胞增殖和出现迟发性超敏反应. 我国已在研制中的应用杆状病毒在昆虫细胞内表达的亚单位疫苗主要刺激针对单种血凝素成分的抗体. 其中, 采用 H5 亚型血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 基因, 经杆状病毒表达, 构建了 H5 亚型基因重组杆状病毒昆虫细胞表达亚单位疫苗, 动物实验初步结果已显示出良好的免疫保护作用.

4.2 重组活载体疫苗

利用重组病毒活载体疫苗防治 AI 也是一种重要途径. 乔传令等^[22,23]将禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) 核蛋白 (NP) 基因亚克隆到禽痘病毒载体 pSY681 从而构建出表达核蛋白基因的重组禽痘病毒转移载体 pSY (NP + LacZ). 应用脂质体介导的方法获得了能高效表达 AIVNP 蛋白的重组禽痘病毒 rFPVNP. SPF 鸡体内的免疫保护试验结果表明, 它能够诱导机体产生较高水平的 NP 特异性抗体, 并对 H5N1 和 H7N1 这 2 种亚型高致病力禽流感病毒的攻击提供一定的保护. Swayne 等^[24]将 (AIV) A/chicken/NY/13142-5/94 (H7N2) 的 H7 基因插入到副粘病毒 NDV 中, 构成重组活载体疫苗 rNDV-AIV-H7 可以同时保护 ND 和 AI.

4.3 核酸疫苗

禽流感核酸疫苗是指将含有流感病毒基因的表 达质粒, 通过肌肉注射、基因枪注射等方法将其导入机体内, 在机体内表达抗原蛋白, 从而激发机体免疫系统产生针对流感病毒编码蛋白的特异性免疫应答反应. 它是继灭活疫苗和亚单位疫苗后, 疫苗学的又一革命, 不仅具有前者的有效性, 同时具有后者的安全性, 既能产生体液免疫反应, 又能诱导细胞免疫作用, 并且能够同时将不同保护性抗原基因构建在一起, 为高致病性和变异性疾病防治开辟新的途径. 1993 年, Ulmer 等发现小鼠肌肉注射编码 A 型流感病毒 (A/PR/8/34) 核蛋白 (NP) 的载体质粒后, 其产生的细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T cell, CTL) 可有效保护小鼠抵抗另一亚型流感病毒 (A/HK/68) 的攻击. 此项研究开辟了核酸疫苗特别是流感病毒核酸疫苗研究的新纪元.

张强哲等^[25]用 PCR 方法扩增 H5 亚型 AIV HA 基因, 将其克隆到质粒 pcDNA4/HisMax 和 pRc/CMV 上得到真核表达质粒 pC4H5 和 pCMVH5. 采用 Tfx™-20、superfect 转染试剂和电转染法转染,

转染后的 HeLa 细胞用蛋白质印迹和血凝试验检测 HA 蛋白及其活性. 结果表明, superfect 转染和电转染均能表达 HA 蛋白并具有生物学活性, 蛋白质印迹检测到分子质量为 76 ku 的 HA 和 HA 裂解的 HA1 (44 ku) 和 HA2 (29 ku), 与 AIV HA、HA1、HA2 分子质量完全一致. Superfect 和电转染得到的 HA 均具有血凝活性, pC4H5 的表达量是 pCMVH5 的 8 倍, 表明 pC4H5 是一高效表达的真核表达质粒. 何宏轩等^[26]根据已发表的 H9 亚型 AIV 的 HA 基因序列, 设计合成了 1 对 H9 HA 特异引物, 以 AIV A/chicken/Henan/1/1999/ (H9N2) 核酸为模板, 通过 RT-PCR 扩增出 1 条 1.6 kb 的 cDNA 片段. 将 HA 基因插入 pVAX1 中, 构建了真核表达质粒 pVAX-H9. 采用活体电击法免疫 3 周龄 SPF 鸡 10 只, 剂量为 50 μ g/只, 3 周后加强免疫一次, 5 周后以 100 倍鸡胚感染剂量 (EID) 的 HA 基因同源病毒对所有鸡进行攻毒. 在此期间每周检测抗体水平变化, 6 周后以棉拭子进行泄殖腔病毒分离. 结果, 攻毒后免疫组鸡 HI 效价为 $9\lg 2 \sim 10\lg 2$, 对照组为 $2\lg 2 \sim 4\lg 2$, 免疫组病毒分离数为 0/10, 对照组为 10/10. 表明所构建的 HA 基因表达质粒可作为基因疫苗诱导鸡产生免疫保护反应.

彭金美等^[27]建立多表位 DNA 疫苗. 它是用表位作免疫原, 这样就比较容易在一个表达载体上克隆病原体的多个抗原基因中具有免疫活性的部分. 该试验以 H5N1 亚型禽流感病毒的 HA 和 NP 基因及其表位为基础构建了 4 个重组质粒: a. pIRES-HA (表达全长的 HA 基因); b. pIRES-tHA (只表达 HA 基因的主要抗原表位区); c. pIRES-tHA-NPep (融合表达 HA 基因的抗原表位区和 NP 基因的 3 个 CTL 表位); d. pIRES-tHA-IFN γ (用鸡的 IFN γ 基因取代质粒 pIRES-tHA-NPep 中的 neo 基因). 分别用这 4 个重组质粒和空载体质粒 pIRES1neo 肌注免疫 30 日龄 SPF 鸡. 免疫 3 次, 间隔为 2 周, 每次每只鸡的剂量为 200 μ g. 第 3 次免疫后两周以高致病性禽流感病毒 H5N1 强毒攻击, 免疫及攻毒前后均采血检测 HI 抗体效价和外周血 CD4⁺、CD8⁺T 细胞的变化. 结果发现, 攻毒前各质粒免疫组均检测不到 HI 抗体, 攻毒后 1 周存活鸡 HI 抗体效价迅速升高到 64 ~ 256. 流式细胞仪检测显示外周血 CD4⁺、CD8⁺T 细胞在疫苗免疫后都有不同程度的升高. 空载体质粒对照组鸡 (10 只) 在攻毒后 3 ~ 8 d 内全部死亡, 其他各重

组质粒免疫组鸡都获得了部分保护, 保护率分别是: pIRES-HA 组为 54.5% (6/11), pIRES-tHA 组为 30% (3/10), pIRES-tHA-NPep 组为 36.3% (4/11), pIRES-tHA-IFN γ 组为 50% (5/10). 这些结果表明构建的多表位 DNA 疫苗能够诱导机体产生特异性免疫应答, 并在同型禽流感强毒攻击时对鸡只提供了一定的保护.

5 禽流感与人流感的关系

最近几年来共有 4 次禽流感感染人的事件被报道, 1996 年从一名患眼结膜炎的英格兰养鸭妇女的眼中分离到一株 H7N7 流感病毒, 此病毒 8 个核酸片段与禽源流感病毒非常接近, HA 与 1995 年爱尔兰火鸡分离的 H7N7 的 HA 同源率大于 98%. 1997 年 5 月, 香港从一死亡的小男孩身上分离出 H5N1 禽流感病毒, 接着此流感病毒继续感染 18 人, 并造成 6 人死亡, 震惊中外. 最近几年 H9 亚型 (通常是 H9N2) 在世界各地广泛爆发, 对养禽业造成严重危害. 1999 年香港在两个患流感样疾病的小女孩体内分离到两株 H9N2 禽流感病毒, 随后中国大陆又从人体内分离到 5 株 H9N2 AIV. 特别是近期越南接连发生 H5N1 感染人事件, 更加引起关注.

禽流感和人流感的病原都属于正粘病毒科的流感病毒, 其中感染禽类的只有 A 型, A 型流感病毒的 15 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型在禽类中均存在, 禽流感除能感染家禽和野鸟外, 还能感染人、猪、马、海洋哺乳动物等. 在人类流感病毒生态学上猪起了重要作用. 由于种间差异, 人和禽细胞膜上的结合位点有很大不同, 人流感病毒多为唾液酸 α -2, 6 半乳糖结合特异性, 禽流感为唾液酸 α -2, 3 半乳糖结合特异性, 由于受体结合的特异性阻碍了 AIV 和人流感的交叉感染, 然而猪气管内含有与 α -2, 3 和 α -2, 6 两种受体结合位点结合的特异性, 这样猪起了中间宿主的作用, 充当了基因重组的混合发生器, 使禽流感和人流感在猪体内发生重组, 获得人流感的特异性受体结合位点, 从而突破种间障碍感染人类. 意大利学者 Castrucci 从商品猪体内分离到人禽流感病毒重组毒株, 后来 Claas 又从儿童身上分离到此毒株. 香港学者 Peiris 从猪身上分离到与禽源猪流感发生内部基因重组的 H3N2 病毒的同时, Lin 等从一患流感的香港儿童身上分离到相似的病毒, 这些都是猪充当混合发生器的很好例证^[28~30].

传统上认为人流感病毒只有 H1、H2、H3 等 3 个亚型,而到目前为止应加上 H5、H7 和 H9 等 3 个新亚型,但大部分人认为他们是禽源病毒感染了人。Webster 认为引起 1918 年西班牙大流感的 H5N1,1957 年亚洲大流感的 H2N2 及 1968 年香港大流感的 H3N2 均为人禽流感重组体。野生水禽被认为是 A 型流感病毒的巨大病毒库,首先由于候鸟的迁移特性,使其具备感染世界各地流感病毒的条件(它们往往是隐性携带而不表现临床症状),感染后将病毒带回传染给家养水禽,由于一些生活习惯的原因(比如我国华南地区常年散养大量的鸡、鸭、鹅等,使鸡、鸭、鹅、猪、人接触频繁),同时华南地区又处于候鸟的迁移路线上,致使野禽容易将流感病毒传染给家禽。野禽病毒和家禽病毒有一个明显的区别是家禽病毒 HA 头部具有一个糖基化位点和 NA 缺少 19 个氨基酸残基,这又被认为是 AIV 由野禽转移到家禽所必需的,家禽又被认为是野禽流感病毒和人流感病毒的中间宿主,这样野禽流感病毒就转移到了家禽。通常认为猪是 AIV 和人流感病毒的中间宿主,AIV 和人流感病毒在猪体内发生重组,获得人特异性结合受体而感染人。香港人源 H9N2 AIV 似乎是经过此途径感染人的,而 HK/97 H5N1 具有明显的 SA α 2,3Gal 受体特异性,并没有人特异性受体,它感染人的机理仍存在许多神秘之处。给人造成灾难性大流行的流感病毒一般具有 3 个基本条件:a. 能在人体内复制,b. 人群缺乏对这种病毒的抗体(病毒是新病毒),c. 在人和人之间的快速传播。HK/97 H5N1 已具有了三个条件的前两个,而 HK/99 H9N2 具备前两个条件的同时还具有了 SA α 2,3Gal 特异性受体,必须引起人们的高度重视^[31,32]。正如 1957 年 H2N2 和 1968 年 H3N2 大流感所显示的,AIV 和人流感病毒重组是人与人之间有效传播所必需的。由于 HK/97 H5N1 和 HK/99 H9N2 具有了感染人的能力,人自身就可以充当混和器。当人共同感染 H5N1(或 H9N2)和 H3N2(或 H2N2,或 H1N1)时,就可能出现新的重组体,当 H5N1 或 H9N2 获得人与人之间的快速传播时,新型的全球性大流感就会爆发,因此应严密监视 H5N1 和 H9N2 的流行情况,防止新型流感病毒的爆发。

自从 1997 年以来,为能够对流感大流行作出迅速确证和应对,世界卫生组织(WHO)在 2001 年开始与流感监控的全球计划,即:加强流感监控;增强对该病了解;增加疫苗使用;加速流感大

流行的防控准备。由于流感在动物和人中不断进化,这种进化又非常复杂,因此必须全面应对。目前列入流感监控的亚型,不仅是 H1、H2、H3,第二个列入的亚型为 H5,第三是 H7 亚型病毒,此外 H6 和 H9 亚型也非常值得关注。

6 小 结

禽流感是一种全球性的烈性传染病,可在宿主中不断发生变异和基因重组,这将是 21 世纪我国养禽业面临的最大的瘟疫性威胁。禽流感可在禽、猪和人中进行传播。AIV 不仅作为人流感的最大基因库而间接威胁人类健康,而且可作为人类的新病毒而直接构成人类的威胁。因此预防禽流感具有重要的公共卫生意义。AIV 的生物学和遗传学特性决定不断面临新的挑战。我们要加大禽流感防治方面的研究力度,采取广泛的国际合作,加强学术交流,不断推广新方法和新技术,从而使禽流感早日得到有效的控制。根据研究现状和疾病发生新特点,以后对禽流感研究应对以下方面加强:

a. 在基础研究中,从基因水平上,阐明 H9N2 和 H5N1 亚型 AIV 从家禽直接向人传播的分子机制,研究 H5 亚型 AIV 突破禽类-人类种间屏障,获得感染哺乳动物的能力,以及对哺乳动物广泛的组织嗜性和迅速致死能力的遗传变异机制,研究 H9N2 亚型 AIV 主要为呼吸道水平传播、效率很高但毒力不强,而 H5N1 亚型 AIV 主要为粪-口途径水平传播、效率不高但毒力很强的分子机制。H9N2 亚型病毒和 H5N1 亚型病毒在家禽体内重组,能否产生呼吸道水平传播效率高而毒力又强的 AIV? 研究 H5N1 亚型禽流感病毒在人体内与人流感病毒(H1、H2 和 H3 亚型)重组产生对人的致死率高,人-人之间传播效率高的病毒的可能性;研究 H9N2 和 H5N1 亚型 AIV 感染猪和其他哺乳动物,通过适应和变化,再传染人,引起人群传播的机理。

b. 在免疫防治中,不仅从机理上入手,还要为将来应用考虑,加强核酸疫苗研制,一方面制备出多价针对多种亚型 AIV 的核酸疫苗,另一方面从表位入手,研制出多价的表位核酸疫苗;利用反向遗传操作技术研究新型活疫苗。

c. RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是一种有广泛应用前景的抗病毒感染的基因治疗方法。已经采用 RNAi 技术对流感病毒^[33]、乙肝病毒、HIV、痘病毒等进行抗感染研究。对于 AIV 来

说, 可以针对保守性强的核蛋白或膜蛋白选择制剂, 既能克服病毒不断变异造成的难以预防, 又能阻止病毒对个体和全体造成的危害。

参 考 文 献

- 1 甘孟侯. 禽流感. 北京: 中国农业出版社, 2002. 1~10
Gan M H. Avian Influenza. Beijing: China Agriculture Press, 2002. 1~10
- 2 Hara C, Dennis J A. Avian influenza and human health. *Acta Tropica*, 2002, **83**: 1~6
- 3 Wang C W, Wang C H. Experimental selection of virus derivatives with variations in virulence. *Avian Dis*, 2003, **47** (4): 1416~1422
- 4 Suarez D L, Schultz-Cerry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, **24** (2~3): 269~283
- 5 Garten W, Klenk H D. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends in Microbiology*, 1999, **7** (3): 99~100
- 6 Capua I, Margaroni S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathology*, 2000, **29** (3): 289~294
- 7 Suarez D L, Perdue M L, Cox N, *et al.* Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J virology*, 1998, **72** (8): 6678~6688
- 8 Bashiruddin J B, Gould A R, Westbury H A. Molecular pathotyping if two avian influenza viruses isolated during the Victoria 1976 outbreak. *Aust Vet J*, 1991, **69**: 140~142
- 9 Perdue M L, Garcia M, Senne D, *et al.* Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res*, 1997, **49**: 173~186
- 10 Vogel G. Sequence offers clues to deadly Flu. *Science*, 1998, **279** (5349): 324
- 11 Naeem K, Naurin M, Rashid S, *et al.* Seroprevalence of avian influenza virus and its relationship with increased mortality and decreased egg production. *Avian Pathol*, 2003, **32** (3): 285~289
- 12 Bulaga L L, Garber L, Senne D, *et al.* Descriptive and surveillance studies of suppliers to New York and New Jersey retail live-bird markets. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1169~1176
- 13 Trock S C, Senne D A, Gaeta M, *et al.* Low-pathogenicity avian influenza virus in live bird markets—what about the livestock area? *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1111~1113
- 14 Kung N Y, Guan Y, Perkins N R, *et al.* The impact of a monthly rest day on avian influenza virus isolation rates in retail live poultry markets in Hong Kong. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1037~1041
- 15 Lu H, Castro A E, Pennick K, *et al.* Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1015~1021
- 16 Lu H. A longitudinal study of a novel dot-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian influenza virus. *Avian Dis*, 2003, **47** (2): 361~369
- 17 Lau L T, Banks J, Aherne R, *et al.* Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313** (2): 336~342
- 18 Suarez D L, Spackman E, Senne D A, *et al.* The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1091~1095
- 19 Spackman E, Senne D A, Bulaga L L, *et al.* Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1079~1082
- 20 Dybkaer K, Munch M, Handberg K J, *et al.* RT-PCR-ELISA as a tool for diagnosis of low-pathogenicity avian influenza. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1075~1078
- 21 Krudsood S, Wilairatana P, Vannaphan S, *et al.* Clinical experience with intravenous quinine, intramuscular artemether and intravenous artesunate for the treatment of severe malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2003, **34** (1): 54~61
- 22 乔传令, 张建林, 贾永清, 等. 禽流感病毒血凝素与核蛋白在重组禽流感病毒中的共表达. *动物医学进展*, 2003, **24** (1): 81~83
Qiao C L, Zhang J L, Jia Y Q, *et al.* Progress on Animal Medicine, 2003, **24** (1): 81~83
- 23 Qiao C L, Yu K Z, Jiang Y P, *et al.* Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol*, 2003, **32** (1): 25~32
- 24 Swayne D E, Suarez D L, Schultz-Cherry S, *et al.* Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against influenza and Newcastle disease. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 1047~1050
- 25 张强哲, 秦曦明, 梁 荣, 等. 禽流感病毒 HA 基因真核表达质粒的构建与表达. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (3): 483~487
Zhang Q Z, Qin X M, Liang R, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30** (3): 483~487
- 26 何宏轩, 秦曦明, 张强哲, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的克隆及其 DNA 疫苗的免疫动物试验. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (2): 163~166
He H X, Qin X M, Zhang Q Z, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31** (2): 163~166
- 27 彭金美, 童光志, 王云峰, 等. 抗禽流感病毒多表位 DNA 疫苗的构建及其免疫效力研究. *生物工程学报*, 2003, **19** (5): 623~628
Peng J M, Tong G Z, Wang Y F, *et al.* Chinese J Biotechnology, 19 (5): 623~628
- 28 Castrucci M R, Donatelli I, Sidoli L, *et al.* Genetic reassortment between avian and human influenza viruses in Italian pigs. *Virology*, 1993, **193**: 503~506
- 29 Claas E C J, Kawaka Y, de Jong, *et al.* Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology*, 1994, **204**: 453~457
- 30 Garten W, Klenk H D. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends in Microbiology*, 1999, **7** (3): 99~100
- 31 Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* 2000, **74**: 3~13
- 32 Spackman E, Senne D A, Davison S, *et al.* Sequence analysis of recent H7 avian influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States. *J Virol*, 2003, **77** (24): 13399~13402
- 33 Ge Q, McManus M T, Nguyen T, *et al.* RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (5): 2718~2723

Progress in Avian Influenza and Its Immune Control*

DUAN Ming-Xing^{**}, HE Hong-Xuan, ZHANG Qiang-Zhe

(State Key Laboratory of Biomembrane & Membrane Biotechnology,
Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Avian influenza is a severe disease in poultry and human all over the world, which become more important after SARS broken. Because of the variability of the avian influenza virus in its antigenicity and pathogenicity, the control strategies for avian influenza should include early detection, the identification of the virus using advanced molecular biological technique, immunization and the establishment of national or international network for the detection of avian influenza.

Key words avian Influenza, avian influenza virus, immune control

* This work was supported by a grant from The Post-doctoral Sciences Foundation in China.

** Corresponding author. Tel: 86-10-62773255, E-mail: duanmx@mail.tsinghua.edu.cn

Received: February 25, 2004 Accepted: February 27, 2004

第三届国际人类蛋白质组大会即将于 2004 年 10 月召开

随着人类基因组计划的完成,蛋白质组研究已成为 21 世纪生命科学发展的先导,成为生命科学乃至自然科学最活跃的学科领域。由国际人类蛋白质组组织(HUPO)发起的国际人类蛋白质组大会是国际蛋白质组领域中规模最大、影响最广、水平最高的世界性会议,每年举办一次。2004 年 10 月 25 日至 27 日,第三届国际人类蛋白质组大会将在北京召开。这将是亚太地区主办的第一次大型国际蛋白质组学大会。若干诺贝尔奖获得者及国际蛋白质组研究领域著名专家将应邀作大会报告。预计 3000 余名代表将出席本次大会。

本届大会的主题是“蛋白质组——解析基因组”。会议的主要议题将包括:蛋白质组学技术;糖蛋白质组学;神经蛋白质组学;微生物蛋白质组学;肝脏蛋白质组学;亚细胞蛋白质组学;蛋白质化学;蛋白质结构;蛋白质生物信息学;疾病蛋白质组学;药物蛋白质组学;植物和动物蛋白质组学等。

会议同期将举办“Ex-HUPO”大型生命科学分析仪器、实验室技术及相关设备展览。会前还将举办“人类蛋白质组计划”系列卫星会。

大会由国际人类蛋白质组组织、中国人类蛋白质组组织、国家生物医学分析中心、北京市科学技术委员会共同主办。

有关参会及参展详细信息请查阅大会网站: www.hupo2004.cn

联系人: 陈宁 电话: 86-10-82327644 传真: 86-10-82802515 E-mail: Beijing2004@newlife.org.cn

通信地址: 北京市海淀区学院路 38 号北京大学医学部会议中心一层 100083 第三届国际人类蛋白质组大会会务组