

A型流感病毒非结构蛋白的功能及临床应用

孙进华 吴明福 邢明伟 靳 淼 王君伟*

(东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030)

摘要 NS1 蛋白作为 A 型流感病毒的非结构蛋白, 最初的研究着重于它对宿主细胞蛋白质合成的抑制作用方面考虑. 随着研究的深入, 对其基因的进化、蛋白质的抗原性作了详细的研究, 同时发现流感病毒的 NS1 蛋白与流感病毒所诱导的细胞凋亡之间存在一定的联系, 其对凋亡的调节作用与流感病毒感染的细胞是否产生干扰素及其所感染的细胞系直接相关. NS1 蛋白能够抑制病毒感染细胞干扰素的产生, 在流感病毒拮抗干扰素的抗病毒效应中发挥了重要的作用, 许多研究表明, 这种干扰素拮抗作用可能与流感病毒的毒力有关. 由于传统疫苗的广泛应用, NS1 蛋白在临床应用中作为鉴别诊断免疫禽和自然感染禽的检测抗原具有广阔的前景.

关键词 流感病毒, 非结构蛋白, 临床应用

学科分类号 S852.65

A型流感病毒是分节段的 RNA 病毒, 其内部基因由 8 个分节段的 RNA 所组成. 流感病毒 NS 基因是其基因组中最小的基因片段, 它转录成的线性 mRNA 共编码两种蛋白质即 NS1 和 NS2 蛋白 (核转出蛋白). 早期的研究表明: 这两种蛋白质仅存在于被流感病毒感染的细胞中, 所以称为非结构蛋白 (nonstructural protein). 随着研究的进一步深入, 发现 NS2 蛋白在成熟的病毒粒子中少量存在^[1]. 所以 NS1 蛋白是流感病毒唯一的非结构蛋白^[2]. 人类和禽类的 A 型流感病毒 NS1 基因全序列为 890 个核苷酸, 有两个编码区. 第一个编码区编码含 202~237 个氨基酸的 NS1 蛋白, 在不同病毒株系间有差异. 第二个编码区编码含 121 个氨基酸的 NS2 蛋白, 其 5' 端有 56 个核苷酸与 NS1 相同, 整个 mRNA 包含一个中断的含 473 个核苷酸的区域. NS1 蛋白含有 2 个核定位区, 其中 34~38 位氨基酸残基处的信号区非常保守, 在所有 A 型流感病毒中都相同, 其氨基酸排列顺序为: -Asp-Arg-Leu-Arg-Arg-. 第二个信号区在 203~230 位氨基酸残基处, 在大多数 A 型流感病毒中都有这一序列^[3]. 在某些流感病毒的分离毒株中, NS1 蛋白的羧基端有氨基缺失现象. 不同亚型毒株的 NS1 在带电性和磷酸化方面有很大差异. NS1 负责磷酸化的世代交替. NS1 蛋白在细胞质中合成后很

快转移至核内, 并积聚在病毒感染早期的胞核内, 在感染后期则聚积于核仁中, 形成致密的晶体样包涵体. A 型流感病毒已经从包括人类、猪、马、海生哺乳动物和鸟类等多种动物中分离到. 随着禽流感在我国及东南亚地区的爆发, 以及禽流感感染事件的发生, 人们对 A 型流感病毒更加重视. 为了给研究 NS1 蛋白的生物学功能提供理论参考, 从而更加深入地研究 A 型流感病毒, 更好地预防和控制禽流感的蔓延, 下面就近年来对 A 型流感病毒 NS1 蛋白的功能及临床应用简要综述.

1 A 型流感病毒 NS1 基因的进化及基因同源性分类的研究

Nakajima 等^[4]在研究动物流感病毒 NS 基因的遗传亲缘关系时, 比较了人、猪、禽、马等 13 种动物流感的 NS 基因碱基序列的同源性, NS 基因之间的同源性为 87% 以上, 他们构建了一个流感 NS 基因的进化树模型, 用 modified Farris method, 进行人、禽病毒 NS1 基因的比较, 估计出禽流感 NS 基因核苷酸替代速度, 研究表明, NS1 基因核

* 通讯联系人.

Tel: 0451-55191385, E-mail: Jwwang@mail.neau.edu.cn

收稿日期: 2006-03-10, 接受日期: 2006-04-30

苷酸替代大致是保守的, 即使突变也不是连续性的. AIV 的 NS 基因突变率是人流感的 1/3~1/4, 因此, A 型流感病毒的 NS1 基因在进化过程中是保守的, 禽流感病毒的 NS1 基因比人流感的 NS1 基因更为保守. 同时他们还推测出了在进化过程中 AIV 和人流感 NS 基因的分离时期. 比较人、禽、马流感 NS 蛋白氨基酸序列, 发现氨基酸置换与核苷酸置换的比率是 27%~45%, 表明在进化过程中 NS1 蛋白的改变存在着约束, 在 30~50 氨基酸之间有一个高保守区域, 羧基端氨基酸残基 165 处是一个持续改变的高变区域. 在以后的许多研究表明: 高保守区域为 NS1 蛋白的功能区, 而高变区则存在于不同的流感亚型之中.

根据 NS 基因序列的同源性可将 NS 基因分为 A 和 B 两群, Treanor 等^[5]研究发现, A 型流感病毒中基因群 A 的流感病毒可存在于感染的禽类和哺乳动物中, 而基因群 B 的流感病毒仅在禽类中发现. 群内基因的同源性较高, 80% 以上; 群间的序列同源性较低, 只有 60% 左右. Suarea 等^[6]对不同来源的 106 株 A 型流感病毒的 NS 基因进行比较, 把基因群 A 的进化树分为 5 个分支: (1) 人-猪群; (2) 美洲禽-马群; (3) 欧亚禽-猪群; (4) 独特鸥群; (5) 仅有一个成员的 A/马/Prague/56. 而 NS 基因群 B 则分为两个分支: 美洲禽群和欧亚禽-马群. 在对 NS1 蛋白的基因进行比较后发现, 美洲禽与欧亚禽的流感毒株之间的区别已经不明显, 因此 NS1 蛋白基因的亚型与 NS 基因的 5 个 A 亚群和 2 个 B 亚群相比减少为 4 个 A 亚群和 1 个 B 亚群.

2 NS1 蛋白质与流感病毒结构蛋白及宿主细胞蛋白合成的关系

Enami 等^[7]将纯化的病毒核衣壳 (ribonucleoprotein, RNP) 与一定的 cDNA 一起孵育, 可以与目的基因片段进行杂交, 形成 RNA-DNA 杂交体, 由此产生的 RNP 中不含目的 vRNA, 把这种 RNP 再与人工产生的含目的基因的 vRNP 混合, 可得到含目的基因的病毒子. 用这个系统产生重组流感病毒, 预先对 NS1 基因 N 端或 C 端区进行了删除, 结果含有突变 NS1 基因的重组病毒均致弱, 删除 NS1 N 端的病毒所有蛋白质的合成水平均降低, 删除 NS1 C 端的病毒其 M1 合成水平下降, NP 的表达则没有影响, 这一研究结果说明 NS1 具有刺激 M1 翻译的功能^[8].

NS1 蛋白与宿主细胞核蛋白相互作用, 抑制细

胞核内 mRNA 的输出^[9]. 因此 NS1 蛋白可以提高细胞的前 mRNA 在细胞核内的浓度与寿命. 因为病毒的帽依赖性内切酶能从细胞前 mRNA 上将多聚腺苷酸帽子切下来并用来作为合成病毒 RNA 的引物, 所以细胞前 mRNA 在细胞核内的积累有利于病毒 mRNA 的合成. NS1 蛋白的这种功能对于减少细胞 RNA 和病毒 RNA 在利用细胞翻译系统的竞争中也是有益的. 流感病毒的 NS1 蛋白可以通过增强病毒 mRNA 的翻译水平来加强病毒蛋白的表达. 而且有研究表明, NS1 蛋白可以加强某些病毒基因的转录, 有助于病毒蛋白的高效表达. 在人流感病毒 NS1 蛋白功能的研究中, 为了直接证明 30 ku CPSF 蛋白 (cleavage and polyadenylation specificity protein) 与 NS1 蛋白间的相互作用, Noah 等^[10]将一株重配病毒株 NS1 蛋白上以 186 位氨基酸为中心的 5 个氨基酸被其他氨基酸所置换, 因此 NS1 蛋白不能结合 30 ku 的 CPSF 蛋白. 结果, 重配病毒株的复制能力大大减弱, 提示 NS1 蛋白上的 CPSF 结合位点对于流感病毒的有效复制是必不可少的.

NS1 蛋白对宿主细胞蛋白合成主要起到抑制作用. 每个 NS1 蛋白分子的苏氨酸残基与磷酸基团共价连接, 磷酸化的 NS1 蛋白可调节病毒复制过程. NS1 蛋白可以通过以下方式抑制宿主细胞蛋白的合成: a. 结合宿主细胞发生多聚腺苷酸化的 mRNA 并抑制宿主细胞 mRNA 的核输出; b. 与小核 RNA (small nuclear RNA) 结合, 阻断前 mRNA 的剪接过程; c. 抑制宿主细胞 mRNA 的多聚腺苷酸化; d. 与宿主细胞内的多种蛋白质相互作用. NS1 蛋白的 RNA 结合活性是因为 NS1 蛋白的两个功能区: 一个是位于蛋白质氨基端 19~38 位氨基酸的 RNA 结合区, 能结合 mRNA 的多聚 A 序列; 另一个功能区称为效应区, 位于 134~161 位氨基酸区, 能与细胞内蛋白质相互作用, 抑制 mRNA 的核输出. NS1 蛋白的这两个功能区高度保守, 说明 NS1 蛋白在结构上是相对保守的. 流感病毒 NS1 蛋白既能抑制细胞 mRNA 的多聚腺苷酸化, 又可以抑制细胞 mRNA 的剪接过程. 在流感病毒感染过程中, 宿主蛋白合成的终止被认为主要与 NS1 蛋白阻止细胞 mRNA 的处理过程有关. NS1 蛋白能与多聚腺苷酸的特异性切割蛋白质相结合. 在体外及流感病毒感染感染的细胞内, 多聚腺苷酸特异性切割蛋白, 能识别前 mRNA 中的多聚腺苷酸信号序列 AAUAAA. NS1 与细胞 RNA 以及细胞蛋白质的相互作用能抑制多聚腺苷酸化和剪接反应^[10].

3 NS1 蛋白与宿主细胞凋亡的关系

Schultz-Cherry 等^[11]对流感病毒 NS1 蛋白的功能研究发现, NS1 蛋白能诱导 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 细胞和 HeLa 细胞凋亡. 他们用 NS1 基因突变株进行进一步研究发现: NS1 蛋白的 RNA 结合区在诱导细胞凋亡中起了关键性作用. 根据上述研究结果推测, NS1 基因突变病毒株诱导细胞凋亡可能是通过活化干扰素诱导的 PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) 而发挥作用的. 在病毒感染时, PKR 通过 dsRNA (double-stranded RNA) 被激活, 从而导致诱导细胞凋亡转录因子的连锁激活效应. NS1 蛋白通过上调表达 PKR 细胞内抑制物的浓度来抑制 PKR 的激活, 或是通过直接结合 PKR 和抑制 IRF-3 (IFN regulatory factor 3), 来抑制 PKR 的激活. Takizawa 等^[12]的实验表明 PKR 参与了流感病毒诱导的细胞凋亡. 流感病毒 NS1 基因突变株不能通过 dsRNA 来抑制 PKR 的活化, 因此导致 PKR 的自主磷酸化和干扰素水平的升高, 从而使被感染细胞发生凋亡.

Stasakova 等^[13]研究表明, 突变 NS1 基因变异株的流感病毒可以通过激活 caspase-1 (半胱天冬酶-1) 而诱导巨噬细胞迅速凋亡, 同时释放出大量的 IL-1 和 IL-8 (白介素 1、8). Zhirnov 等^[14]的研究表明, 流感病毒 NS1 蛋白可以下调被感染细胞的细胞凋亡. 通过对野生型(WT)流感病毒株 A/PR/8/34 及其缺失了 NS1 基因的突变病毒株, 对被感染细胞诱导凋亡作用的比较发现, 对于能产生干扰素的宿主细胞, 例如 MDCK 细胞、鸡成纤维细胞、7 日龄的鸡胚, NS1 基因缺失突变株诱导的细胞凋亡比野生型病毒株更迅速和有效^[15]. 他们还观察到, NS1 基因缺失病毒株对鸡胚的毒力比野生型病毒株更强. 相反, 对于不能产生干扰素的宿主细胞, 例如 Vero 细胞, 野生型病毒株与 NS1 基因缺失突变株两者所诱导的细胞凋亡作用无明显差别. 因此, 可以认为流感病毒 NS1 蛋白能下调细胞凋亡, 并且 NS1 蛋白的抗凋亡作用具有干扰素依赖性. NS1 蛋白可能通过作用于其特定的靶目标, 例如 PKR、IRF-3、NF- κ B (nuclear factor κ B) 来激活干扰素所诱导的连锁反应. 研究显示, PKR 与 IRF-3 可通过活化“死亡诱导信号复合物”来促进细胞凋亡, 试验证明, NS1 蛋白通过抑制 PKR 和 IRF-3 来抑制 NF- κ B 的活化, 这样 NS1 蛋白通过上调“凋亡阈

值”来延迟被感染细胞发生凋亡.

国内的相关研究比较少, 孙博兴^[16]利用体外表达技术, 将 NS1 基因在 HeLa 细胞中表达, 并检测出 NS1 蛋白具有诱导 HeLa 细胞凋亡的作用. 有证据显示, 流感病毒的下调被感染细胞的程序性死亡, 是与流感病毒的其他蛋白质共同作用的结果. 例如流感病毒基质蛋白 M1 也被认为有潜在的抗凋亡作用. 因此, 进一步研究流感病毒诱导的细胞凋亡, 是有利于病毒的复制还是有利于宿主细胞限制病毒复制的, 可以使我们对流感病毒的致病机制有更为深入的理解.

4 NS1 蛋白的干扰素及肿瘤坏死因子的拮抗作用

干扰素及肿瘤坏死因子在感染的早期被诱导产生, 作为抗病毒反应的第一防线, 流感病毒的清除是与循环中干扰素(主要是 IFN- α/β)和 TNF- α 的浓度密切相关的. IFN- α/β 的产生需要 IRF-3、AP-1、NF- κ B 等多种调节因子在转录水平调节 IFN 基因 mRNA 的合成. A 型流感病毒的 NS1 蛋白是一种 RNA 结合蛋白, NS1 拮抗干扰素特性主要与 NS1 蛋白的双链 RNA (dsRNA) 结合区有关. NS1 蛋白与 dsRNA 的结合可以阻止 dsRNA 活化的抗病毒信号传导通路机制、阻止 IFN- α/β 的合成^[17]. NS1 蛋白也可以阻止抗病毒活性的 PKR 和 2'-5' 合成酶 (2'-5' oligoadenylate synthetase) 的激活. 关于 NS1 蛋白功能的研究, Lu 等(1995 年)首次报道了 NS1 蛋白抑制体外细胞 dsRNA 介导的 PKR 激活, 然后通过 eIF-2 α 的磷酸化使蛋白质的翻译过程终止. 1998 年, 流感病毒 NS1 基因缺失病毒株的产生, 使得人们对于 NS1 蛋白功能的研究又更深了一步. Garcia 等发现, 这株 NS1 基因缺失病毒株在能产生干扰素的宿主细胞内, 例如 MDCK 细胞、10 天的鸡胚中, 增殖与复制的能力减弱. 相反, 缺失了 NS1 基因的流感病毒在不能产生 I 型干扰素的宿主细胞中能有效地增殖与复制, 例如 Vero 细胞、7 天的鸡胚. 而且, 缺失了 NS1 基因的流感病毒能导致 STAT1^{-/-} (signal transducer and activators of transcription) 基因缺失小鼠的死亡. 上述实验结果说明, 流感病毒 NS1 蛋白是通过抑制 I 型干扰素而发挥作用的. 但是 NS1 蛋白是通过何种机制拮抗干扰素及肿瘤坏死因子的抗病毒活性呢? 可能的机制是流感病毒 NS1 蛋白结合 dsRNA, 导致病毒复制时 dsRNA 的量减少. 因此导致 dsRNA 激活的信

号传导通路被抑制. PKR 在细胞抗病毒效应中起了重要的作用. PKR 的抗病毒效应可能是通过下列不同效应综合作用的: 通过活化 IRF-1 和 NF- κ B 通路激活 I 型干扰素的合成、使 STAT1 的丝氨酸磷酸化、作为 eIF-2 α 激酶而发挥翻译抑制作用. 另外, 由 Katze 等的研究表明, A 型流感病毒抑制 PKR 介导的 eIF-2 α 的磷酸化可以通过另外一种机制, 被流感病毒感染的细胞可以产生一种 PKR 抑制蛋白 P58^{PK}, P58^{PK} 与 I-P58^{PK} 蛋白组成非活性复合体. 在被流感病毒感染的细胞内, 这种复合体被破坏, 释放出的 P58^{PK} 可与 PKR 相互作用, 通过阻止 PKR 的双聚化过程而抑制其激酶活性. Ludwig 等^[18]的研究发现, 流感病毒 NS1 蛋白能够抑制 JNK (Jun N-terminal kinase) 和 AP-1 转录因子的激活. JNK 又被称为应激激活蛋白激酶, 它的激活可以上调并且磷酸化转录因子 AP-1. JNK 的激活对于机体在急性病毒感染时的初始免疫应答是非常关键的, 因为 JNK 依赖的 AP-1 因子能转录活化多种抗病毒和炎性细胞因子的基因. 另外, AP-1 的异源二聚体 C-JUN::ATF-2 与转录因子 NF- κ B 和 IRF (interferon related factor) 协同作用能转录激活 IFN- β 基因. 他们还观察到 NS1 蛋白能下调 AP-1 依赖的基因表达. 此外, NS1 蛋白还能抑制 dsRNA 介导的 JNK 活化. Geiss 等利用 DNA 微阵列技术比较了野生型病毒株与 NS1 基因突变病毒株对被感染细胞基因表达的影响. 他们发现, NS1 基因缺失突变株诱导宿主细胞产生的干扰素及其他抗病毒相关基因的数目与表达量都较野生型病毒株有明显的提高. 此外, 他们还对比重配病毒株 A/WSN/33 对干扰素相关基因的抑制作用进行了观察, 这株重配病毒株的 NS1 基因来自于 1918 年世界性大流感的病毒株, 研究发现, 这株重配病毒株比起亲本病毒株能更有效地抑制干扰素相关基因的表达. 通过以上结果可以证明, 流感病毒 NS1 基因在抑制干扰素、细胞因子和 NF- κ B 通路中发挥了关键性作用.

在国内, 李先茜等^[19]应用了定点突变技术, 对流感病毒 NS1 基因节段的第 38 位和第 41 位氨基酸残基进行突变, 然后将突变的 NS1 基因节段与流感病毒其余 7 个基因节段进行包装, 形成新的有缺陷的流感病毒. 将原流感病毒的 8 个基因节段同时包装成无缺陷的流感病毒. 然后利用缺陷的流感病毒与无缺陷的流感病毒进行 NS1 蛋白功能的研究, 结果表明, 流感病毒 NS1 蛋白可以对抗或阻止 PKR 调解干扰素的抗病毒效应.

在禽流感 NS1 基因的研究中, Seo 等^[20]研究表明, H5N1 亚型流感病毒 NS1 基因具有抑制 IFN 和 TNF- α 的功能, 其拮抗作用主要是通过以下机理作用的: a. 流感病毒的 NS1 蛋白在体外抑制双链 RNA 蛋白激酶(PKR)的活性, 包括真核启动因子 2a 磷酸化, 同时抑制蛋白质的转移 (Lu 等 1995 年). b. 抑制 INF 调节因子 (INF-3) 的活性 (Talin 等 2000 年). 同时, A/B 型流感病毒能够有效地诱导 IFN、TNF 等在宿主中的表达, 用这些细胞因子预处理细胞可以阻碍病毒的复制. NS 基因通过阻止未知的抗病毒蛋白降解来逃逸宿主的抗病毒反应. 这些未知抗病毒蛋白在宿主细胞中是被结合的、无活性的, 当病毒侵入机体时, 抗病毒蛋白被激活, 这些抗病毒蛋白能够降解循环中的 NS 基因, 从而使剩余的其他病毒基因也失活. NS1 蛋白抗干扰素的功能不是稳定的特征, 禽流感病毒的自由包装和 NS1 基因的功能可能暂时抑制干扰素的活性^[21], AIV 在鸡和鹌鹑细胞中的活跃生存曲线表明: 同一种病毒粒子中的 40%~60% 对于干扰素的抑制作用具有高度的敏感性, 然而剩余的几乎比前者的敏感度降低了 50%~100%, 这种干扰素的抑制作用是暂时的、不稳定的特征. 从噬斑中生长出来的病毒粒子, 在 50~800 U/ml 干扰素存在的情况下, 病毒粒子数量可以缓慢增长, 干扰素对病毒粒子起到抑制作用且较敏感, 如果 AIV 在 IFN 存在的情况下被连续传几代之后, 暂时抑制 IFN 的 AIV 粒子增多, 其生长曲线呈上升趋势, 并且在他们设计的试验模型中, 存活的病毒粒子的细胞中, NS1 的表达量明显增高, 易于接受 2-氨基嘌呤 (一个已知的 PKR 抑制因子). 然而, 并不是每种亚型的 NS1 蛋白都具有抗干扰素的功能, 第 92 位谷氨酸的存在是决定该功能的关键因素^[22]. 反向遗传系统试验证明, H5N1/97、H5N1/00 病毒株能抵抗机体的抗病毒反应, 尤其抑制了 IFN 和 TNF 介导的抗病毒反应, 该反应过程与流感病毒 NS1 基因有关, 且需要 92 位谷氨酸 (Glu) 的存在. 蛋白质的活性可能依赖空间构象, 不能排除 NS 其他氨基酸也涉及到抑制细胞因子抗病毒反应的可能性. 然而 NS1 蛋白 92 位谷氨酸 (Glu) 的存在对于 NS1 蛋白拮抗 IFN 和 TNF 介导的抗病毒反应具有决定性的作用.

5 NS1 蛋白在禽流感鉴别诊断中的应用

目前, A 型流感病毒 NS1 蛋白的临床应用主要集中在禽流感的预防和诊断中. 传统方法的流感

疫苗, 是用未经纯化的尿囊液在油为基础的佐剂中乳化而生产出来的, 虽然流感疫苗已经成功地提供了保护, 抑制临床症状和死亡, 但在国外它们没有被作为控制 LPAI 和 HPAI 病毒感染而常规应用, 主要是担心在禽和禽产品上的商业禁令, 感染禽的隔离和捕杀是首选的措施. 对于控制流感一个额外的限制, 是传统的流感疫苗能够干扰血清学监测, 因此这些疫苗诱导的抗体与活毒感染是不可分的, 商业 ELISA 测定法、血凝试验, 琼脂扩散实验被认为是禽中流感血清学诊断的国际标准检测手段. 然而这些检测方法并不能准确区分出感染禽和免疫禽, 给 AI 预防和监控带来了很大的阻力.

目前, 我国主要采用灭活苗和重组基因工程活载体苗, 对家禽进行免疫的方法来控制在禽流感的发生, 但是由于疫苗的使用, 增加了禽流感的监测难度. 目前尚未建立起一种有效可行的区分方法. 由于技术条件等各方面的原因, 依然只能采用疫苗免疫和扑杀相结合的方法控制动物流感的发生. 难以区分疫苗免疫动物与自然感染病毒动物, 对我国的畜禽出口造成巨大的损失, 因此, 建立一种可以鉴别诊断禽流感人工免疫与自然感染动物的方法已成为当务之急. NS1 蛋白由于自身的特点, 在鉴别诊断灭活疫苗免疫动物与自然感染病毒动物方面有着广阔的应用前景. 首先, NS1 蛋白结构上是相对保守的, 用多克隆抗血清对 NS1 的抗原性进行研究. 结果发现, 不同亚型毒株之间存在明显的交叉反应, 用单克隆抗体对 A / WSN / 33(HINI)株的 NS1 进行研究, 发现在该蛋白质分子上有 3 个重叠的抗原位点. 从人、猪、马分离的 A 型流感病毒, 其 NS1 的抗原性非常相似, 一般方法难以区分, 同时 NS1 蛋白可以刺激病毒感染的机体产生相应抗体. 另外, NS1 蛋白为非结构蛋白, 只存在于病毒感染的细胞中, 而在病毒粒子内不存在 NS1 蛋白成分. 因此在血清学方面, 即使应用灭活疫苗免疫的动物不会产生针对非结构蛋白的抗体, 或产生抗体的滴度很低, 而野毒感染动物中 NS1 蛋白抗体的滴度很高, 从而可以将其区分为免疫动物群和感染动物群, 进行鉴别诊断. 目前已有多种病毒应用其非结构蛋白来鉴别诊断人工免疫与自然感染病毒动物. 例如, 非结构蛋白已经分别作为丙型肝炎病毒^[23]和口蹄疫病毒^[24]感染的一个重要标记. Birch-Marchin 和 Ozaki 等^[25]成功应用 ELISA 技术检测 NS1 非结构蛋白抗体来区别流感自然感染马与疫苗免疫马. Terrence 等^[26] (2005 年) 已经利用 NS1 蛋白建立了

免疫禽和感染禽的诊断方法. 即使应用非纯化的灭活苗免疫的禽, 其血清中 NS1 蛋白的抗体滴度也不相同, 研究中发现: 感染禽 NS1 的抗体滴度最高, 其次是非纯化疫苗的免疫禽, 最低的是经梯度纯化疫苗免疫的禽, 几乎检测不到抗体. 应用 ELISA 检测方法可以准确地区分感染禽和免疫禽.

6 结 语

对于流感病毒 NS1 蛋白的功能研究经历了一个逐渐深入的过程, 尤其是近年来对于流感病毒 NS1 蛋白作为干扰素拮抗剂的研究取得了较大的进展. 这将有助于更好地理解流感病毒与宿主细胞之间的相互关系, 以及采取何种方式来逃避机体细胞干扰素的抗病毒效应. 更为重要的是, 这也将有助于我们对流感病毒的 NS1 蛋白与其致病力之间的关系有更为深刻的理解, 并将其应用到临床当中, 为更好地预防和控制流感的传播及避免人畜之间的交叉感染奠定分子生物学基础.

参 考 文 献

- 1 Akarsu H, Burmeister W P, Petosa C. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J*, 2003, **22** (18): 4646~4655
- 2 Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol*, 2001, **14** (1): 129~149
- 3 Greenspan D, Palese P, Krystal M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, 1988, **62** (8): 3020~3026
- 4 Nakajima K, Nobusawa E, Nakajima S. Evolution of the NS genes of the influenza A viruses. II. The genetic relatedness of the NS genes of animal influenza viruses. *Virus Genes*, 1990, **4** (1): 15~26
- 5 Treanor J J, Snyder M H, London W T, *et al.* The B allele of the NS gene of avian influenza viruses, but not the A allele, attenuates a human influenza A virus for squirrel monkeys. *Virology*, 1989, **171** (1): 1~9
- 6 Sureau D L, Perdue M L. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res*, 1998, **54** (1): 59~69
- 7 Enami M. Improved technique to genetically manipulate influenza virus. *International Conference on Negative Strand Viruse*, Dublin, Ireland, 1997
- 8 Enami T, Takeshi A, Enami M. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol*, 1994, **68** (3): 1432~1437
- 9 Bucher E, Hemmes H, de Haan P, *et al.* The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol*, 2004, **85** (Pt 4): 983~991
- 10 Noah D L, Twu K Y, Krug R M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein *via* its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*, 2003,

- 307 (2): 386~395
- 11 Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, *et al.* Influenza virus Ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, 2001, **75**: 7875~7881
 - 12 Takizawa T, Ohashi K, Nakanishi Y. Possible involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in cell death by influenza virus infection. *J Virol*, 1996, **70** (11): 8128~8132
 - 13 Stasakova J, Ferko B, Kittel C, *et al.* Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol*, 2005, **86** (Pt 1): 185~195
 - 14 Zhirnov O P, Konakova T E, Wolff T, *et al.* NS₁ protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*, 2002, **76** (4): 1617~1625
 - 15 Quinlivan M, Zamarin D, Garcia-Sastre A, *et al.* Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J Virol*, 2005, **79** (13): 8431~8439
 - 16 孙博兴. H9N2 亚型禽流感非结构蛋白 NS1A 基因的克隆、表达及其诱导 HeLa 细胞凋亡的研究: [学位论文]. 长春: 吉林大学, 2005
Sun B X. H9N2 avian influenza virus and inducing apoptosis in HeLa cells: [Thesis]. Changchun: Jilin University, 2005
 - 17 Solórzano A, Webby R J, Lager K M, *et al.* Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs. *J Virol*, 2005, **79** (12): 7535~7543
 - 18 Ludwig S, Wang X Y, Ehrhardt C, *et al.* The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*, 2002, **76** (21): 11166~11171
 - 19 李先茜, 杜培革, 傅桂莲, 等. 应用定点突变技术进行流感病毒 NS1 蛋白功能的研究. 北华大学学报, 2004, (8): 316~320
Li X Q, Du P G, Fu G L, *et al.* Journal of Beihua University, 2004, (8): 316~320
 - 20 Seo S H, Hoffmann E, Webster R G. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Research*, 2004, **103** (1~2): 107~113
 - 21 Sekellick M J, Carra S A, Bowman A, *et al.* Transient resistance of influenza virus to interferon action attributed to random multiple packaging and activity of NS genes. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, **20** (11): 963~970
 - 22 Basler C F, Reid A H, Dybing J, *et al.* Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** (5): 2746~2751
 - 23 Inoue Suzuki R, Matsuura Y. Expression of the amino-terminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection and antibody to the expressed protein in patients with liver disease. *J Gen Virol*, 1992, **73** (Pt8): 2151~2154
 - 24 Nietzert E, Beck E, Ke Mello P A, *et al.* Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and tissue with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infection. *Virology*, 1991, **184** (2): 799~804
 - 25 Ozaki H, Sugiura T, Sugita S, *et al.* Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS 1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses. *Vet Microbiol*, 2001, **82** (2): 111~119
 - 26 Tumpey T M, Alvarez R, David R A, *et al.* Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, **43** (2): 676~683

The Function and Clinical Application of The Non-structural Protein of The Type A Influenza Virus

SUN Jin-Hua, WU Ming-Fu, XING Ming-Wei, JIN Miao, WANG Jun-Wei*

(College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract The first research on the NS1 protein as the non-structural protein of the type A influenza virus was emphasized on the considering of its depressant effect on the composition of the protein of host cell. And now, with deep research, the evolution of its genes and the antigenicity of its protein have been explained. The NS1 protein of influenza virus has the association with the apoptosis induced by the influenza virus, the regulating function of apoptosis has the direct correlation with possibility of producing interference and the cell line infected by influenza virus. The NS1 protein restrained to producing the interferon by infected cell. The NS1 protein plays an important role on the host anti-viral cytokine responses, it possesses negative regulation for interferon's antiviral activity, most observation indicated negative regulation might associate with the virulence of influenza virus. Furthermore NS1 protein as an inspection antigen to differentiate and diagnose the poultry which was immunized or naturally infected has a very wide prospect, because the traditional vaccine was used extensively.

Key words influenza virus, nonstructural protein, clinical application

*Corresponding author. Tel: 86-451-55191385, E-mail: Jwwang@mail.neau.edu.cn

Received: March 10, 2006 Accepted: April 30, 2006