

## 流感病毒识别糖链受体分子机制的研究进展\*

钟耀刚 秦桢楠 孙士生 陈闻天 李 铮\*\*

(西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069)

**摘要** 近年来, 由于流感病毒(influenza virus)不可预测的局部流行和有可能引发全球大流行, 其一直是研究的热点课题之一. 流感病毒表面糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)特异识别宿主细胞表面的糖链受体是流感病毒感染宿主、进而复制并继续传播的生物学基础. 影响流感病毒宿主特异性的两个主要因素是 HA 自身的变化(包括基因突变、重组、糖基化位点数量和糖基化位置的变化)和宿主细胞表面糖链受体的变化(包括糖链受体的类型、分布和分子构象的改变)等. 因此准确掌握这些信息有助于人们进一步加强对流感病毒的防控. 本文主要从糖组学角度概述了流感病毒识别糖链受体的分子机制, 重点介绍流感病毒宿主细胞表面糖链受体的研究进展.

**关键词** 流感病毒, 血凝素, 宿主糖链受体, 受体结合位点, 唾液酸

**学科分类号** Q5

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2011.00618

流感病毒感染宿主细胞是由其表面糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)与宿主细胞表面上的糖链受体唾液酸(sialic acid, SA)共同介导的<sup>[1-2]</sup>, 且流感病毒对糖链受体的识别具有特异性, 人流感病毒 HA 主要识别末端为唾液酸  $\alpha$ 2-6 半乳糖(galactose, Gal, SA $\alpha$ 2-6Gal)的糖链受体, 其存在于人呼吸道上皮细胞表面, 而禽流感病毒 HA 主要识别末端为 SA $\alpha$ 2-3Gal 的糖链受体, 其广泛存在于禽肠胃道的上皮细胞表面<sup>[1,3]</sup>. 近年来, 糖芯片(glycan microarrays)和植物凝集素组化等技术用于宿主细胞表面糖链受体类型及其分布<sup>[1,4]</sup>的研究, 发现人呼吸道和禽肠胃道上皮细胞表面 SA $\alpha$ 2-6Gal 和 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体类型及其分布并非如之前描述得那么精确. 由于 HA 基因突变<sup>[1,5]</sup>、重组<sup>[6]</sup>、糖基化位点数量和糖基化位置的变化<sup>[7]</sup>以及糖链受体的改变<sup>[8]</sup>等原因, 导致流感病毒识别受体的特异性、与受体结合强度以及对宿主免疫抵御能力等方面的改变, 致使流感病毒出现跨宿主传播.

本文通过探讨流感病毒识别糖链受体的分子机制, 重点阐述 HA 自身的变化(包括基因突变、重组、糖基化位点数量和糖基化位置的变化), 宿主细胞表面糖链受体的变化(包括糖链受体的类型、分布和分子构象的改变), 宿主免疫系统对流感病毒识别糖链受体特异性的影响及病毒与宿主范围

间的关系. 进一步认识目前流行的人流感病毒及近年来出现的人禽流感病毒的感染和传播机制. 从而加强对流感病毒的防控以期最大程度上降低流感病毒对人类造成的危害.

### 1 流感病毒 HA 识别糖链受体的分子机制

当流感病毒进入宿主体内后, 病毒感染宿主细胞不可缺少的第一步就是病毒的 HA 要与宿主细胞表面的糖链受体结合<sup>[9]</sup>, 从而导致两者膜融合. HA 三聚体球形头部的受体结合位点(receptor binding site, RBS)就是病毒识别并结合宿主细胞表面糖链受体的部位<sup>[10]</sup>.

#### 1.1 HA 的空间结构和识别糖链受体的位点

HA 由病毒 RNA 片段 4 编码, HA 首先在细胞内质网上合成分子质量约为 76 ku 的前体 HA0<sup>[11-12]</sup>. 随后 HA0 要经过几个切割加工过程后才能发挥其作用, 包括 N 端信号肽的切除及 HA1 (约 47 ku) 和 HA2 (约 29 ku) 的产生, 其中 HA1 氨基酸序列的改变常与流感病毒抗原性变异密切相关, 发生在

\* 科技部国际科技合作计划项目(2009DFA32730).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 029-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-27, 接受日期: 2012-02-28

HA1 RBS 上的氨基酸突变可能会改变病毒的宿主特异性. 同时, HA 可以帮助病毒穿透宿主胞膜从而逃脱宿主免疫系统的监视, 在病毒感染宿主细胞的过程中扮演了重要角色<sup>[5, 12-14]</sup>.

HA0 可分为两部分: 一部分是呈球状的头部, 主要由 HA1 亚单位形成, 含有受体结合位点和抗原表位; 另一部分为柄, 由 HA2 和部分 HA1 片段组成与囊膜相连. 电镜下观察到的 HA0 纤突, 其实是由 3 个相同的亚基组装而成, 其顶端为大的球形, 是病毒与宿主细胞糖链受体结合的部位——RBS<sup>[15-17]</sup>, 如图 1 所示.



Fig. 1 The structure of influenza virus HA

图 1 流感病毒 HA 的空间结构

黄色、橙色和绿色线条分别代表 HA 的 3 个亚基. 其中每个亚基都含有一个 RBS(红色圆圈所示).

RBS 主要由 190 位螺旋(188~194 氨基酸)、130Loop 区(134~138 氨基酸)和 220Loop 区(221~228 氨基酸) 3 个结构域组成, 呈浅口袋状凹陷, 构成这一袋状位点的氨基酸相对比较保守, 如 Tyr98、Trp153、His183 和 Tyr195 等<sup>[18-19]</sup>, 可能与受体结合位点有关, 其中 226、228 位点位于受体结合位点袋状凹陷的底部, 在与宿主细胞表面受体的唾液酸结合过程中发挥重要作用, 不同宿主的流感病毒中该位点氨基酸残基属于保守位点. 但不同亚型病毒受体结合特性不同, 即使相同亚型在与人、猪和禽唾液酸受体结合特性上也存在明显差别, 这主要是由相关氨基酸的突变造成的<sup>[17, 19]</sup>. 每个单体 HA1 都有一个 RBS, 它只能与唾液酸受体发生微弱的结合<sup>[2]</sup>, 但它可以通过形成高密度的 HA0 三聚体来加强与宿主细胞表面糖链受体的结合能

力. 而在某些病毒的 HA 上含有附加 RBS, 如: Yang 等<sup>[18]</sup>对 H7N2 A/New York/107/2003 (NY107) HA 的 RBS 研究发现, 其含有一个 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体的 RBS 和两个 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体的 RBS, 且不同位点对糖链受体的结合强度不同, 用糖芯片技术研究结果揭示出 NY107 以识别 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体为主, 对 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体的识别比较弱.

## 1.2 HA 识别的糖链受体

流感病毒具有严格的糖链受体结合特异性, 与流感病毒结合的宿主细胞表面糖链受体主要是位于细胞膜上的 SA<sup>[20]</sup>. 人流感与禽流感病毒识别不同的糖链受体, 一般认为流感病毒和宿主细胞表面糖链受体的相互作用存在的种类特异性, 被认为是流感病毒在人和禽类之间跨种属传播的主要障碍.

Xu 等<sup>[21]</sup>研究发现, 人流感与禽流感宿主细胞表面糖链受体分子结构形状不同, 分别为伞形(umbrella-like topology) (图 2a)和圆锥形(cone-like topology)(图 2b). 人呼吸道上皮细胞表面糖链受体

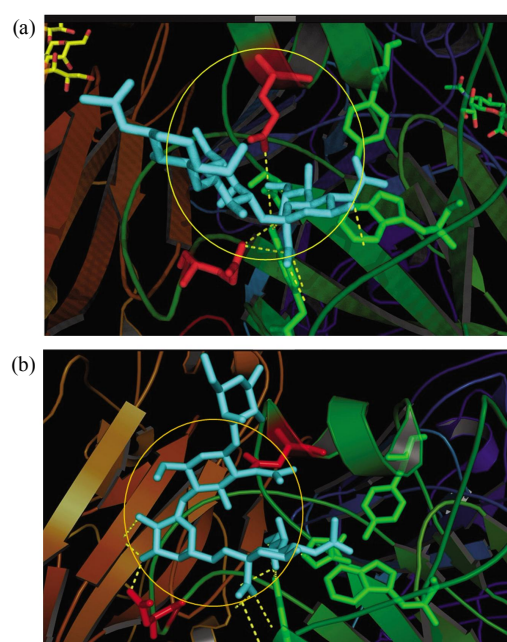


Fig. 2 The interactions of HA with the cone-like(a) and umbrella-like(b) topologies of  $\alpha$ 2-3 and  $\alpha$ 2-6 sialylated glycans

图 2 流感病毒 HA 与 SA $\alpha$ 2-3 和  $\alpha$ 2-6 糖链受体圆锥形(a)和伞形(b)拓扑结构相互作用示意图

绿色棒状部分代表 HA 的 RBS 上保守氨基酸残基(如 95、153、183、195 等位点氨基酸残基), 红色部分代表易变氨基酸残基(如 190、222、225、226、228 等位点氨基酸残基), 黄色间断点为氢键, 靛蓝色为糖链受体. 图 a 中黄色圆圈中所示为禽流感糖链受体的拓扑结构, 呈现圆锥形, 以 SA $\alpha$ 2-3Gal 形式存在; 图 b 中黄色圆圈所示为人流感糖链受体的拓扑结构, 呈伞形, 以 SA $\alpha$ 2-6Gal 形式存在.

亦含有这两种结构形式, 但如果流感病毒要感染人类须与伞形的 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体结合. 有些可以与 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体结合的流感毒株并不能感染人类. 其原因是这些病毒能够与圆锥形 SA $\alpha$ 2-6Gal 受体结合, 但是人类呼吸道上皮细胞表面这种受体的数量远远少于伞形的 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体<sup>[21]</sup>. 也就是说宿主细胞表面糖链受体分子的结构形状(而非单一的连接类型)是这些致命病毒能否感染人类的关键因素之一.

### 1.3 糖链受体的结构及主要功能

SA 是指当神经氨酸的氨基被乙醛基或羟乙酰基取代后所产生的衍生物, 其基本分子结构中含有 9 个碳原子, 是具有吡喃糖结构的酸性氨基糖. SA 广泛存在于脊椎动物、哺乳动物及多种植物组织中, 是流感病毒识别结合的主要糖链受体, 通常以高深缩状态位于糖蛋白或糖脂类物质(神经节苷脂、多糖胺)的链上, 在细胞外可通过糖苷键( $\alpha$ 2-3、 $\alpha$ 2-6 或  $\alpha$ 2-8)与其他糖(Gal、GalNAc 或 GlcNAc)相连<sup>[23]</sup>, 结合在神经节苷脂的 SA 分子主要有 3 种结构, 5-N-乙酰基神经氨酸(N-Acetyl-neuraminic acid, Neu5Ac)、5-N-羟乙酰基神经氨酸(N-glycoloyl-neuraminic acid, Neu5Gc)和 9-O-乙酰-5-N-乙酰基神经氨酸(9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid, Neu5, 9Ac<sub>2</sub>)<sup>[23]</sup>.

在动物体内 SA 以 Neu5Ac 和 Neu5Gc 形式为主, 人体内由于缺乏合成 Neu5Gc 的 92 bp 的 CMP-N-乙酰唾液酸羟化酶基因只能从食物中获取 Neu5Gc<sup>[20, 23]</sup>. 且 Neu5Ac、Neu5Gc 和 Neu5, 9Ac<sub>2</sub> 是流感病毒糖链受体的结构成分, 其中 Neu5Ac 和 Neu5Gc 是甲型和乙型病毒的受体中含有的成分, Neu5, 9Ac<sub>2</sub> 是丙型病毒的受体中必需的结构成分<sup>[20]</sup>. 由于糖链的长短、糖链组成、糖基的连接顺序不同, 加之连接类型不同, 病毒宿主细胞表面糖链受体表现出结构多样性.

## 2 影响糖链受体结合特异性的因素

流感病毒糖链受体在流感病毒跨种属传递中起重要作用, HA 三聚体球形头部的 RBS 处氨基酸残基的变化<sup>[10]</sup>、HA 糖基化位点的增减变化<sup>[7]</sup>、HA 受体结合位点糖的修饰<sup>[24]</sup>、HA 受体结合位点糖类分子构象变化<sup>[20]</sup>及宿主免疫系统<sup>[2, 25]</sup>等都可改变其识别特异性从而改变流感病毒对宿主细胞的嗜性.

### 2.1 RBS 处氨基酸突变

不同亚型、毒力和源性的流感病毒 HA 三聚体

球形头部的 RBS 处氨基酸序列的不同, 致使病毒对不同连接类型的细胞受体 SA $\alpha$ 2-3Gal 与 SA $\alpha$ 2-6Gal 具有不同的识别能力. HA 与某宿主细胞表面受体结合的难易程度是决定流感病毒能否感染该宿主的关键因素之一, 而 RBS 是 HA 受体结合的重要功能区<sup>[14]</sup>. RBS 处氨基酸的变化(有时即使是一个氨基酸的突变)可改变流感病毒的受体结合特异性, 从而改变其宿主细胞嗜性. 如: Tate 等<sup>[10]</sup>通过对 HA 的 RBS 周围氨基酸位点研究发现, RBS 的 145、186、190、193、225、226 和 228 位上的氨基酸对流感病毒 H3 型结合糖链受体起重要作用, 这些氨基酸决定了流感病毒 H3 型识别唾液酸低聚糖链受体的特异性.

通常, 流感病毒 HA 的 RBS 处相应位点的氨基酸残基发生突变, 可使其受体结合特性由 SA $\alpha$ 2-3Gal 转变为 SA $\alpha$ 2-6Gal 连接类型<sup>[20, 26]</sup>, 这可能使禽流感病毒跨越种属屏障而感染人类, 进而形成可在人际间传播的病毒, 这种情况在以前大流行的病毒亚型中已被证实: 在 H2 和 H3 亚型中, HA 受体结合位点的 Gln226 和 Gly228 突变为 Leu226 和 Ser228 就可以使其受体特异性由亲禽型转变为亲人型, 同样在 1918 年的 H1 亚型中 Gln226 和 Gly228 框架仍然存在, 两个氨基酸突变(Glu190Asp, Gly225Asp)可使其由结合 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体转变为结合 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体<sup>[14, 27]</sup>. 而 Pappas 等<sup>[28]</sup>对 1957 年 H2N2 亚型 A/El Salvador/2/57 (ElSalv/57) HA 研究发现, 其 HA 结合位点的 Gln226 和 Gly228 存在时, 病毒能够结合 SA $\alpha$ 2-3Gal 和 SA $\alpha$ 2-6Gal 两种糖链受体, 这时病毒并不能有效地传播, 然而, 当 HA 中出现 Leu226/Gly228 突变时, 增强了病毒对 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体结合特异性, 提高了病毒通过人呼吸道飞沫的传播. Viswanathan 等<sup>[1]</sup>对 H2 亚型的最新研究发现: RBS 中的 137 位和 193 位氨基酸突变连同 226 位及 228 位的变异增强了糖链受体结合特异性, 且病毒可以在不同宿主间传播和重组. 因此了解流感病毒 HA 头部 RBS 上的氨基酸 226 位及 228 位或其他附加位点氨基酸的突变对掌握流感病毒糖链受体结合特异性的改变非常必要.

然而, Stevens 等<sup>[24]</sup>对 1918 年 18SC-KL (A/South Carolina/1/1918) HA 进行双突变 (Glu190Asp, Gly225Asp) 研究, 推测邻位的 Lys222 突变为 Leu222 时, 将会对 Asp190 受体结合位点的形成造成空间位阻的作用, 从而抑制 HA 有效表达. 同

样, 对来自 Viet04 H5(A/Vietnam/1203/2004)亚型病毒 HA 的研究发现, H1 亚型中 Glu190Asp 和 Gly225Asp 的双突变使病毒丧失了结合特异性, 而 H2/H3 亚型中 Gln226Leu 和 Gly228Ser 的双突变并没有显著改变其对  $\alpha$ 2-6 的特异性, 只是减弱了病毒对  $\alpha$ 2-3 受体的亲和力<sup>[17, 20, 29]</sup>, 表现出了保守氨基酸突变后的不同宿主嗜性. 近期, Watanabe 等<sup>[30]</sup>对埃及新型 H5N1 研究表明, 重组 H5N1 的 HA 192 位出现单突变或 129、151 位出现双突变时流感病毒识别感染人下呼吸道细胞而非喉部, 意味着此时氨基酸的突变产生了新的受体特异性.

## 2.2 HA 糖基化位点的增减变化

流感病毒若要跨过物种间障碍从禽传染到人需要改变 HA 的糖链受体特异性, 而这种宿主跨越可以通过 HA 受体结合部位糖基化位点的增减和糖链结构的改变来实现<sup>[7, 26]</sup>(图 3). Sun 等<sup>[7, 31]</sup>通过对 H1N1 流感病毒中的 2770 条血凝素(HA)全长序列的潜在 N-糖基化位点预测, 对糖基化位点的进化和保守性进行分析, 蛋白质 3D 结构同源建模和计算机模拟蛋白质糖基化, 发现不同宿主体内的 H1N1 流感病毒经历不同的蛋白质糖基化变化过程. 人 H1N1 流感病毒进化过程中有两种不同病毒蛋白质糖基化改变模式, 一种是病毒进化前期较高频率的糖基化位点数量的增加, 另一种则是病毒进化后期较低频率的糖基化位点位置的变更. 人流行性 H1N1 流感病毒中 HA 糖基化位点的改变最大,

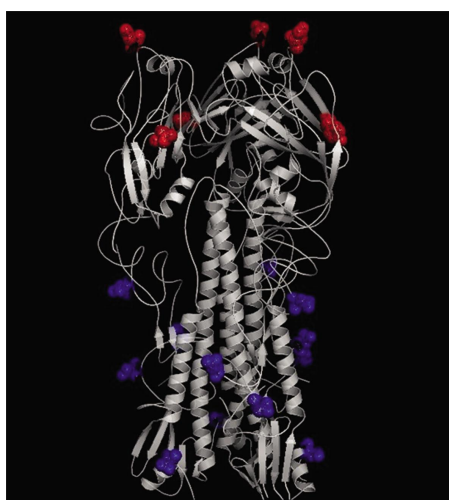


Fig. 3 Glycosylation site of HA(PDB ID: 2IBX) in influenza virus A/VieNamt/1203/2004 (H5N1)

图 3 禽流感病毒 A/VieNamt/1203/2004(H5N1)HA (PDB ID: 2IBX)上糖基化位点示意图

蓝色代表不同亚型流感病毒 HA 上保守的糖基化位点, 红色表示易变糖基化位点.

猪流感病毒中可以变异为糖基化位点的位置最多, 而禽流感病毒保守性最高. 揭示人宿主对病毒的选择性压力最大, 而猪流感病毒最可能变异出高传染性和强毒力的新毒株, 其对人类威胁可能最大. 病毒蛋白质糖基化变化的可能功能有: 屏蔽 HA 上的抗原性位点, 稳定 HA 三聚体的四级结构, 调节 HA 的受体结合活性. 这些结果可对流感病毒的蛋白质糖基化研究和病毒疫苗生产起到一定的指导作用.

Lin 等<sup>[16]</sup>通过对禽易感 H1N1 血凝素结构研究发现, 禽源 H1N1 的 HA 上潜在糖基化位点数与人源 H1N1 病毒 HA 上位点数相同, 但禽源 HA1 的 Asn290 位没有发生糖基化, 这可能就是禽源 H1N1 的 HA 与人源 HA 结构不同、且宿主范围也存在差异的一个重要原因. Wang 等<sup>[32]</sup>使用各种糖苷酶酶切 H5 亚型病毒 HA 上的糖链, 结果表明, 随着 HA 糖链结构复杂程度的逐步降低, HA 对宿主糖链受体的特异性也随之降低但亲和力增强, 说明 HA 上糖链结构与受体的识别对流感病毒宿主的范围有重要影响.

这些发现提示我们: 病毒 HA 糖基化位点及糖链修饰谱等信息可以作为判断病毒糖链受体的特异性及宿主范围的重要参考.

## 2.3 宿主细胞表面 HA 受体结合位点糖链修饰

相关研究表明, 宿主细胞表面 HA 受体结合位点周围的相关糖类分子的修饰作用也会对宿主特异性有重要影响作用. Stevens 等<sup>[24]</sup>利用糖芯片技术不仅明确揭示出 HA 结合 SA $\alpha$ 2-3 和 / 或  $\alpha$ 2-6 低聚糖链受体特性的区别, 而且也能检测出 HA 识别受体特异性方面的细小差别, 例如 HA 对末端三糖的 2 位半乳糖和 3 位 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)或 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)岩藻糖基化、硫酸化和唾液酸化后结合特性的变化. 对两种 1918 HA 的变种(A/SC/1918 和 A/New York/1918)研究发现, 南卡罗莱纳州(SC)HA(蛋白质分子上受体结合部位第 190 位为天冬氨酸(Asp), 第 225 位也为 Asp)具有专一结合  $\alpha$ 2-3 唾液酸低聚糖受体的特性, 而纽约变种 HA(蛋白质分子上第 225 位为甘氨酸(Gly), 所不同的只有一个残基的差别)具有同时结合 SA $\alpha$ 2-6/ $\alpha$ 2-3 低聚糖链受体的特性, 尤其对硫酸化的寡糖结合能力更强. HA 受体结合位点相关的保守氨基酸及糖类分子, 对流感病毒宿主特异性的识别具有极其重要的作用.

Nicholls 等<sup>[20]</sup>利用凝集素组化 (lectin histochemistry) 方法对人流感和禽流感宿主细胞表面糖链受体的研究中发现: 山槲凝集素 (maackia amurensis agglutinin, MAA) 的两种异构体——马鞍树凝集素 (maackia amurensis lectin, MAL) 和多花紫荊凝集素 (maackia amurensis haemagglutinate, MAH) 都能识别 SA $\alpha$ 2-3 唾液酸受体, 区别在于它们结合糖链受体内部结构的不同. MAL (也称作 MAA1 或是 MAL-I) 对 SA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc/Glc 具有较高亲和力, 对 SA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3 (SA $\alpha$ 2-6) GalNAc 亲和力较弱, 同时也能结合非唾液酸残基. 而 MAA2 (商品名称为 MAL-II) 偏嗜结合 SA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(SA $\alpha$ 2-6)GalNAc<sup>[20]</sup>.

#### 2.4 HA 受体结合位点糖类分子构象变化

Jongkon 等<sup>[33]</sup>通过 X- 晶体衍射研究发现, HA 的糖链受体具有一个五糖结构, 依次是唾液酸、半乳糖、N- 乙酰葡萄糖胺、半乳糖和葡萄糖, 如果五糖结构中的前两种糖分子构象发生顺时针扭转则形成  $\alpha$ 2-6 连键, 其形状为伞形, 逆时针扭转则为  $\alpha$ 2-3 连键形式<sup>[33]</sup>其形状为圆锥形. 这说明糖链分子构象的改变可能会引起唾液酸与半乳糖连接键型的不同 ( $\alpha$ 2-3 或  $\alpha$ 2-6), 这种糖链分子的拓扑结构的变化导致病毒对宿主细胞糖链受体识别特异性的改变. 这说明不仅仅末端唾液酸连键类型的改变, 而且糖类分子构象的变化也会导致病毒受体识别的改变.

#### 2.5 宿主免疫系统的影响

免疫系统是防卫病原体入侵的一道防线, 一旦病毒进入宿主细胞后, 它们就利用宿主细胞内的合成机制大量复制自身, 产生的子代病毒破坏细胞而逸出, 有时会杀死细胞而感染其他相邻细胞. 但某些免疫因子的受体 (如  $\alpha/\beta$  干扰素受体), 它能与细胞外的病毒结合, 从而阻止病毒进入细胞或阻止其进入细胞后的复制增殖<sup>[29]</sup>. 近期, Irene 等<sup>[21]</sup>对识别不同糖链受体的重组高致病性禽流感病毒 (HPAIV) 研究发现, 在人的前期树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 中, 识别 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体的病毒入侵人体后炎性细胞因子和  $\alpha/\beta$  干扰素受体等基因表达水平增高, 说明识别 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体的病毒入侵人体后更容易被免疫系统发现, 而识别 SA $\alpha$ 2-6Gal 糖链受体的病毒则较易逃脱免疫系统的监控, 对人类身体健康有重大潜在威胁, 由此可见病毒对糖链受体结合的特异性亦受人体自身免疫系统的影响.

### 3 糖链受体的改变对宿主特异性的影响

目前认为流感病毒的跨宿主传播有两种可能的途径: a. 由于宿主体内出现特异性抗体, 在宿主免疫压力下导致病毒的进化<sup>[6, 10]</sup>. b. 由于识别宿主细胞表面糖链受体发生改变<sup>[1]</sup>, 如糖链受体的类型<sup>[34]</sup>、糖链受体的位置<sup>[35-36]</sup>、糖链受体的偏嗜性结合<sup>[29, 37]</sup>等, 及其他尚不明确的各种因素造成流感病毒的抗原漂移, 使流感病毒变得易于跨越物种间屏障, 造成流感的不断暴发甚至是全球性的流行.

#### 3.1 糖链受体的类型对流感病毒跨宿主传播的影响

糖链受体的类型影响流感病毒对宿主细胞的识别, Suzukia 等<sup>[34]</sup>用荧光 HPLC 方法对各种宿主靶器官的唾液酸分子类型进行了调查研究, 结果发现: 人的呼吸道只有 Neu5Ac 和 Neu5, 9Ac<sub>2</sub> 而没有 Neu5Gc; 马的呼吸道细胞上以 Neu5Gc 为主而 Neu5Ac 很少; 野鸭和家鸡的肠道细胞上以 Neu5Ac 为主而 Neu5Gc 很少; 猪的呼吸道细胞上 Neu5Ac 和 Neu5Gc 二者都存在.

也有相关文献报道<sup>[38]</sup>, 一些具有唾液酸低聚糖功能的树状大分子, 如多聚脂质体、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸的衍生物也是流感病毒能够识别的受体或其能够抑制受体识别, 例如: 聚丙烯酸和聚丙烯酰胺的糖衍生物的功能, 分别被试验证实且广泛用于代替禽流感和人流感识别的糖链受体<sup>[38]</sup>. Rapoport 等<sup>[39]</sup>对 MDCK 和 Vero 细胞上可能存在的其他流感病毒结合因子的研究显示, 流感病毒还可能与半乳糖苷凝集素、甘露糖苷和硫苷脂<sup>[40]</sup>结合. 其中硫苷脂 (sulfatide) 是一种非唾液酸糖脂, 能在人和动物的神经组织、气管和肺中大量表达, 可以与 A 型流感病毒结合并抑制病毒感染<sup>[41]</sup>.

#### 3.2 糖链受体的位置对流感病毒跨宿主传播的影响

近来的研究表明, 一部分人的下呼吸道的上皮细胞表面亦含有 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体, 可以直接感染禽流感病毒, 然而这种 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体主要在人的下呼吸道的肺细胞中表达, 病毒不能通过喷嚏和咳嗽传播, 这种受体表达的位置可能又限制了禽流感病毒在人际间的大范围传播<sup>[42]</sup>. 相关研究证据也显示一些鸟类, 如鹤鹑的气管和肠道上皮细胞表面也同时含有 SA $\alpha$ 2-3Gal 和 SA $\alpha$ 2-6Gal 两种唾液酸类糖链受体. 有报道表明 H9N2 亚型同样能由禽类直接传染给人, 其原因也是它们能同时结合两种糖链受体 (SA $\alpha$ 2-3Gal 和 SA $\alpha$ 2-6Gal)<sup>[35-37]</sup>, 这为某些 H5N1 亚型禽流感病毒能直接感染人提供了最

有力的证据。

Pascal 等<sup>[49]</sup>在凝集素组织化学染色实验中的结果显示：人类和大猩猩呼吸道、肺的上皮细胞间存在明显差异，西洋接骨木凝集素(sambucus nigra agglutinin, SNA)对人的气管及肺上皮细胞表面的 SA $\alpha$ 2-6 唾液酸受体具有高亲和力，但是在猩猩、黑猩猩、大猩猩的呼吸道和肺的上皮细胞中却没有发现 SNA 的染色，小鼠中也发现了类似的情况，所以在没有变异的情况下这些动物都不是人流感的宿主。

### 3.3 糖链受体的连键对流感病毒跨宿主传播的影响

通常情况下，大多数流感病毒对  $\alpha$ 2-3 唾液酸受体具有偏嗜性，有些对  $\alpha$ 2-8 的唾液酸受体也具有偏嗜性，但 A 型 /B 型人流感病毒却是例外，只能够识别结合  $\alpha$ 2-6 唾液酸受体<sup>[20, 22, 24]</sup>。Srinivasan 等<sup>[20]</sup>在雪貂感染试验的研究中发现，引发 1918 年人流感大流行的重组流感病毒 H1N1 (A/South Carolina/1/1918(SC18))尽管在人上呼吸道复制(最初被认为是流感病毒传播的必需条件)，但是这株重组前具有专一结合 SA $\alpha$ 2-3Gal 糖链受体特性的病毒并没有在雪貂之间传播，因为重组株同时获得识别结合 SA $\alpha$ 2-3 和 SA $\alpha$ 2-6 糖链受体特性，只有专一结合 SA $\alpha$ 2-6 的病毒才能有效地传播<sup>[37]</sup>。所以从 SA $\alpha$ 2-3 向 SA $\alpha$ 2-6 亲和力的相对转移并不代表病毒就能在人际间能地传播。关键要看宿主细胞表面的哪种链键的糖链受体占主导地位。

综上所述，流感病毒宿主细胞表面糖链受体在流感病毒跨种属传递中起重要作用，流感病毒对糖链受体有较严格的识别和结合的特异性，是流感病毒不能跨越宿主间传播的天然屏障。一旦流感病毒出现变异，它对受体结构的识别发生改变，这就有可能突破宿主屏障直接感染人而危及人类的安全。

## 4 总结与展望

宿主细胞表面糖链受体是流感病毒感染宿主、复制和传播的生物学基础，其连键类型、种类具多样性，流感病毒表面糖蛋白 HA 自身的变化和宿主细胞表面糖链受体的改变是影响流感病毒宿主特异性的两个主要因素，其中流感病毒对宿主细胞表面糖链受体识别的偏嗜性不同，导致了其识别宿主范围的不同，因此准确把握流感病毒宿主细胞表面糖链受体特异性的情况，对确定宿主的范围及判断是否感染人类等方面都具有十分重要的意义。随着糖组学研究的深入，各种与糖组学相关的技术如糖类

基因芯片、凝集素芯片、糖蛋白分离纯化、糖基化位点分析、糖链结构的解析、糖芯片、糖结合蛋白分离纯化和相关质谱以及生物信息学分析等技术，都将在流感病毒宿主细胞表面糖链受体的研究中发挥着越来越重要的作用。希望能借助这些技术帮助人们进一步了解病毒的病原学、流行病学、感染机制等，从而能及早对流感病毒进行检测、防控，以期最大程度上降低流感病毒对人类造成的危害。

**致谢** 感谢中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽流感研究参考实验室王秀荣研究员对本研究工作的支持。

## 参 考 文 献

- [1] Viswanathan K, Koh X, Chandrasekaran A, *et al.* Determinants of glycan receptor specificity of H2N2 influenza A virus hemagglutinin. PLoS ONE, 2010, **5**(10): e13768
- [2] Irene R, Dabeiba B R, Natasha D, *et al.* Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. J Virology, 2011, **85**(9): 4421-4431
- [3] Yamada S Y, Suzuki Y S, Suzuki T S, *et al.* Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. Nature Letters, 2006, **444**(16): 378-382
- [4] Song X Z, Yu H, Chen X, *et al.* A sialylated glycan microarray reveals novel interactions of modified sialic acids with proteins and viruses. J Biol Chem, 2011, **286**(36): 31610-31622
- [5] Arinaminpathy N, Grenfell B. Dynamics of glycoprotein charge in the evolutionary history of human influenza. PloS ONE, 2010, **5**(12): e15674
- [6] Brian K, Gloria R N, Daniel R P. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. Virology J, 2010, **7**(1): 365
- [7] Sun S S, Wang Q Z, Zhao F, *et al.* Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses. PloS ONE, 2011, **6**(7): 22844
- [8] Wan H Q, Perez D R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. Virology, 2006, **346**(2): 278-286
- [9] Cao Y, Koh X Y, Dong L B, *et al.* Rapid estimation of binding activity of influenza virus hemagglutinin to human and avian receptors. PloS ONE, 2011, **6**(4): e18664
- [10] Tate M D, Brooks A G, Reading P C. Receptor specificity of the influenza virus hemagglutinin modulates sensitivity to soluble collectins of the innate immune system and virulence in mice. Virology, 2011, **413**(1): 128-138
- [11] Tian Z J, Zhou G H, Zheng B L, *et al.* A recombinant pseudorabies virus encoding the HA gene from H3N2 subtype swine influenza virus protects mice from virulent challenge. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006, **111**: 211-218
- [12] Zhang S I, Xiao L Y, Zhou H B, *et al.* Generation and

- characterization of an H5N1 avian influenza virus hemagglutinin glycoprotein pseudotyped lentivirus. *J Virological Methods*, 2008, **154**(1): 99–103
- [13] Liu D B, Si B T, Li C, *et al.* Prokaryotic expression and purification of HA1 and HA2 polypeptides for serological analysis of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *J Virological Methods*, 2011, **172**(1–2): 16–21
- [14] Santis R D, Faggioni G, Ciammaruconi A, *et al.* A FRET based melting curve analysis to detect nucleotide variations in HA receptor-binding site of H5N1 virus. *Mol Cell Probes*, 2010, **24**(5): 298–302
- [15] Abe Y, Takashita E, Sugawara K, *et al.* The effect of the N-glycosylation on the biological activities of influenza A/H3N2 hemagglutinin. *International Congress Series*, 2004, **1263**(2): 214–217
- [16] Lin T, Wang G, Li A, *et al.* The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. *Virology*, 2009, **392**(1): 73–81
- [17] Stevens J, Blixt O, Tumpey T M, *et al.* Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 2006, **312**(5772): 404
- [18] Yang H, Chen L M, Carney P J, *et al.* Structures of receptor complexes of a north american H7N2 influenza hemagglutinin with a loop deletion in the receptor binding site. *PLoS Pathogens*, 2010, **6**(9): e1001081
- [19] Xu R, Wilson I. Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin. *J Virology*, 2011, **85**(10): 5172–5182
- [20] Nicholls J M, Chan R W, Russell R J, *et al.* Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Cell*, 2008, **1**(4): 8
- [21] Xu D, Newhouse E I, Amaro R E, *et al.* Distinct glycan topology for avian and human sialopentasaccharide receptor analogues upon binding different hemagglutinins: A molecular dynamics perspective. *J Mol Biol*, 2009, **387**(2): 465–491
- [22] Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, *et al.* Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nature Biotechnology*, 2008, **26**(1): 107–113
- [23] Byrne B, Donohoe G G, O'Kennedy R. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*, 2007, **12**(7–8): 7–8
- [24] Stevens J, Blixt O, Glaser L, *et al.* Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*, 2006, **355**(5): 1143–1155
- [25] Goodman A G, Zeng H, Proll S C, *et al.* The Alpha/Beta interferon receptor provides protection against influenza virus replication but is dispensable for inflammatory response signaling. *J Virology*, 2010, **84**(4): 2027–2037
- [26] Lee C W, Saif Y M. Avian influenza virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, **32**(4): 301–310
- [27] Maines T R, Chen L M, Hoeven N V, *et al.* Effect of receptor binding domain mutations on receptor binding and transmissibility of avian influenza H5N1 viruses. *Virology*, 2011, **413**(1): 139–147
- [28] Pappas C, Viswanathan K, Chandrasekaran A, *et al.* Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957. *PLoS ONE*, 2010, **5**(6): e11158
- [29] Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, *et al.* Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(8): 2800–2805
- [30] Watanabe Y, Ibrahim M S, Ellakany H F, *et al.* Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in egypt. *PLoS Pathogens*, 2011, **7**(5): e1002068
- [31] 孙士生, 王秦哲, 李 铮. 流感病毒糖蛋白糖链的作用和功能研究进展. *中国科学 B 辑*, 2011, **41**(3): 424–432  
Sun S S, Wang T Z, Li C. *Sci China B*, 2011, **41**(3): 424–432
- [32] Wang C C, Chena J R, Tsenga Y C, *et al.* Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, **106**(43): 18137–18142
- [33] Jongkon N, Mokmak W, Chuakheaw D, *et al.* Prediction of avian influenza A binding preference to human receptor using conformational analysis of receptor bound to hemagglutinin. *BMC Genomics*, 2009, **10**(3): 1–9
- [34] Suzukia T, Horiikea G, Yamazakia Y, *et al.* Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Letter*, 1997, **404**(2–3): 192–196
- [35] Li M Y, Wang B H. Computational studies of H5N1 hemagglutinin binding with SA-a-2, 3-Gal and SA-a-2, 6-Gal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **347**(3): 662–668
- [36] Yu H, Zhou Y H, Li G X, *et al.* Genetic diversity of H9N2 influenza viruses from pigs in China: A potential threat to human health?. *Veterinary Microbiology*, 2011, **149**(1–2): 254–261
- [37] Stevens J, Blixt O, Paulson J C, *et al.* Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *November*, 2006, **4**(2): 857
- [38] Barclay W S, Jones I M, Osborn M I, *et al.* Probing the receptor interactions of an H5 avian influenza virus using a baculovirus expression system and functionalised poly (acrylic acid) ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, **15**(12): 4038–4047
- [39] Rapoport E M, Mochalova L V, Gabius H J, *et al.* Search for additional influenza virus to cell interactions. *Glycoconj J*, 2006, **23**(1–2): 115–125
- [40] Jacqueline P U, Danielle P, Tatsuro I, *et al.* Macrophage receptors for influenza A virus: Role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry. *J Virology*, 2010, **84**(8): 3730–3737
- [41] Takahashia T, Suzukia T, Nishinaka D, *et al.* Inhibition of influenza A virus sialidase activity by sulfatide. *International Congress Series*, 2004, **1263**(3): 43–47
- [42] Chutinimitkul S, Riel D, Munster V, *et al.* *In vitro* assessment of attachment pattern and replication efficiency of H5N1 influenza A viruses with altered receptor specificity. *J Virology*, 2010, **84**(13): 6825–6833
- [43] Pascal G, Monica C, Nancy H Z, *et al.* Human-specific regulation of 2-6-linked sialic acids. *J Biology Chemistry*, 2003, **278** (48): 48245–48250

## New Progress of Glycan as Receptors for Influenza Virus\*

ZHONG Yao-Gang, QIN Yan-Nan, SUN Shi-Sheng, CHEN Wen-Tian, LI Zheng\*\*

(Laboratory for Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract** Influenza virus is one of global constant research highlights, because it can cause the most severe disease in humans and animals as well as the most likely to trigger a pandemic. The surface glycoprotein hemagglutinin (HA) is critical determinants of the host specificity, virulence and infectivity of the influenza virus. The genetic mutations and glycosylation of HA can affect the biological properties of HA. The binding of HA to sialylated glycan receptors on host epithelial cells is the critical initial step in the infection and transmission of the virus. Understanding these components is important in comprehending the infection and the transmission of both existing human influenza viruses and newly emerging avian influenza viruses. This review summarizes studies how influenza virus and receptor components might act as determinants for successful viral replication and transmission and new progress for understanding the role of the structure of sialylated glycan receptors in influenza virus pathogenesis.

**Key words** influenza virus, hemagglutinin(HA), glycan-receptors, receptor binding site (RBS), sialic acid

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2011.00618

---

\*This work was supported by a grant from The International S&T Cooperation Program, The Chinese Ministry of Science and Technology (2009DFA32730).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-29-88303446, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

Received: December 27, 2011 Accepted: February 28, 2012