

# 猴腺病毒研究进展

张荣建, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**【摘要】** 猴腺病毒(simian adenovirus, SAdV)是猴类呼吸道和消化道的常在病毒之一,可引起肺炎、咽炎、肠胃炎、结膜炎等以粪口途径传播为主,主要感染猕猴、非洲绿猴、黑猩猩和狒狒等<sup>[1]</sup>属腺病毒科,哺乳动物腺病毒属。有学者认为SAdV感染有严格的种属特异性<sup>[1]</sup>,也有报道认为其种间交叉传播在非人灵长类中可能普遍发生,是动物传染病似的感染<sup>[2,3]</sup>。SAdV是否感染人类尚未见报道,但已从猴的分泌物中发现了可能和人腺病毒(human adenovirus, HAdV)发生重组的新型腺病毒<sup>[4]</sup>。SAdV与HAdV亲缘关系很近,感染引起的临床症状也相似,是人腺病毒研究的理想模型。目前已经制定了研发猴腺病毒模型的目标,用于研究感染机制,促进腺病毒基因治疗和疫苗开发进程<sup>[3]</sup>。但猴腺病毒自然感染流行情况的研究依然很少。本文将就SAdV的发现与分类、生物学特性、感染特点及检测方法做一综述,为研究者提供一些有用参考。

**【关键词】** 猴腺病毒;生物学特性;PCR

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0071-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.016

## The Research Progress of Simian Adenovirus

ZHANG Rong-jian, HE Zheng-ming

(National Institutes of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**【Abstract】** Simian adenovirus(SAdV), as common viral agent persistent in respiratory and gastrointestinal tract of non-human primates, can cause pneumonia, gastroenteritis and conjunctivitis and spread mainly by fecal-oral way. SAdV can infect macaques, chimpanzees, baboons, et al belonging to genus Mastadenovirus. Some researchers argued that SAdV had strict species specificity. Other reports suggested that cross species transmission may be a common occurrence and is zoonotic transmission. No report says SAdV can infect human, but found a novel adenovirus serotype that may be recombination with a human adenovirus. SAdV and HAdV are close, causing similar clinical symptoms, which make it a good model for adenovirus research. To date, the goal of developing a non-human primate adenovirus model has been made to study the mechanisms of infection and promote progress on gene therapies and genetic vaccines with adenovirus vector. However, little is known about the prevalence of adenovirus infection in non-human primates. This article reviewed discovery and classification, biological characterization, and detection of SAdV so as to provide some useful insights for researchers.

**【Key words】** Simian adenovirus; Biological characteristics; PCR

### 1 猴腺病毒的发现及分类

猴腺病毒(simian adenovirus, SAdV)是1956年

Hull等<sup>[1]</sup>人在美国用东南亚猴的肾细胞制造和检定小儿麻痹症疫苗时,首次分离获得的。随后Hoffer<sup>[5]</sup>等人也在猴子中检测到这些病毒。SAdV中许多是在脊灰疫苗生产和检定过程中从猴细胞

[作者简介]张荣建(1986-),男,免疫学硕士。研究方向:实验动物病毒学。

[通讯作者]贺争鸣(1957-),男,研究员,博士。研究方向:实验动物微生物学。

培养物中分离得到的<sup>[6]</sup>。目前,根据血清学分类至少有 25 种猴腺病毒(SAdV-1 ~ 25),SAdV-1 ~ 20 血清型来自猕猴、食蟹猴、绿猴、狒狒等旧大陆猴,SAdV-21 ~ 25 源自黑猩猩、大猩猩等新大陆猴。根据血凝性将灵长类腺病毒分为人的 HAdV-A ~ G 七个亚群和猴的一个亚群 SAdV-A,其中 HAdV-E (HAdV-4、SAdV-22 ~ 25)、HAdV-G (HAdV-52、SAdV-1、SAdV-7)亚群中多数为猴腺病毒,还有一些分支的 SAdV 簇尚未被分类<sup>[7]</sup>。

早期对 SAdV 的基因组学研究很少,直到近年来替代载体系统的发展,人们才对非人灵长类腺病毒的研究兴趣日趋浓厚。SAdV-21 ~ 25、SAdV-1、SAdV-3 等毒株相继被测序,并解析了其基因组结构。SAdV-1 (34450 bp) 与 SAdV-3 (34425 bp) 大小相似,比 HAdV-40 (34214 bp)、HAdV-12 (34125 bp) 大,这四种病毒在灵长类腺病毒的巨大基因组中以基因组最小为特征<sup>[6]</sup>。系统发生分析表明,感染黑猩猩、大猩猩的 SAdV 和 HAdV-B \ E 亚群高度同源而与感染恒河猴等旧大陆猴的 SAdV (它们看起来与 HAdV-A \ F 亚群关系较近) 进化发生距离较远<sup>[8,20]</sup>。有报道认为感染恒河猴的 SAdV 为灵长类腺病毒进化早期的分支,可能与 HAdV 有共同祖先<sup>[8]</sup>。利用 Megalign 软件比对 5 种旧大陆猴 SAdV 六邻体一段序列,建立进化树(如图 1)。

由图 1 知,可查到序列的 5 株旧大陆猴 SAdV 中有两个较大的分支,一簇为 SAdV-1、7、20,代表 HAdV-G \ F 亚群,另一簇为 SAdV-3、6 代表 SAdV-A 亚群。目前感染恒河猴、食蟹猴的主要为 HAdV-G、SAdV-A 亚群<sup>[7]</sup>。

## 2 猴腺病毒的生物学特性

### (1) 形态结构

电镜下,SAdV 呈二十面体球形,无囊膜,直径

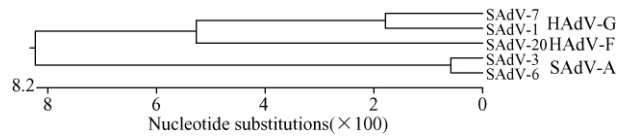


图 1 五株旧大陆猴 SAdV 的进化发生树 (Megalign 软件比对六邻体基因一段序列 (346nt) 建立进化树,序列来自 GenBank 中)

Fig. 1 Phylogenetic tree of five old world monkeys adenovirus strains. (The tree was reconstructed from an alignment of the part sequence of hexon gene (346nt) by Megalign, all sequence form GenBank)

70 ~ 80 nm。衣壳外有宽 2 nm,长约 10 ~ 31 nm 的纤维突起,内含线状双链 DNA 和核心蛋白形成的髓芯。衣壳由 252 个壳粒组成,这些壳粒呈棱柱状排列在三角形的面上,每边六个,其中 240 个为六邻体,12 个为五邻体基底。每个五邻体基底上结合着一根纤维突起,纤维顶端的球形区在感染细胞时与细胞受体结合。病毒粒子在感染细胞核内常呈晶格状排列<sup>[9,10]</sup>。

### (2) 基因组结构及转录

SAdV 的基因组大小差异较大,其中恒河猴腺病毒较小约 34kb,而黑猩猩腺病毒较大约 36 kb,与人的相近。SAdV 具有哺乳动物腺病毒属的一般基因组特征(结构如图 2)<sup>[6]</sup>,两端为 40 ~ 200 bp 的末端反向重复序列(ITR),内部分为 5 个早期转录单位(E1A、E1B、E2、E3、和 E4)、两个即早期转录单位(pIX 和 Iva2) 以及一个晚期转录单位(L1 ~ L5)。此外,病毒基因组中还存在一个或两个 VA-RNA 基因<sup>[9,11]</sup>。VA-RNA 基因数量、E3 和 E4 区在不同腺病毒亚群间变化较大<sup>[8]</sup>。多数恒河猴腺病毒有一个 VA-RNA 基因,而猩猩腺病毒有两个<sup>[11]</sup>。

ITR 序列长度不一,因不同株型而异,是病毒 DNA 复制起始子和一些顺式激活序列所在区域。基因组左端载有包装信号,ITR 和包装信号是腺病毒

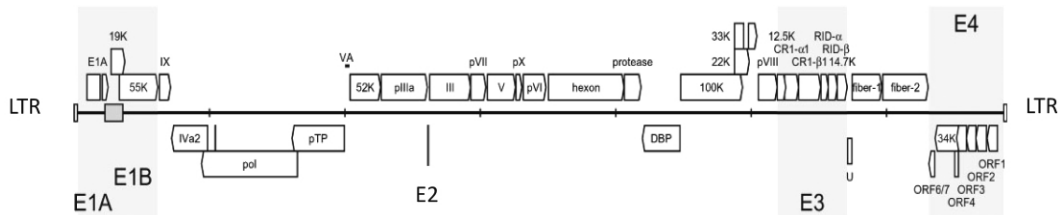


图 2 SAdV-1 基因组结构(每一刻度为 5 kb,阴影示 E1A、E1B、E3 和 E4 区,选自 Ga'bor M. Kova'cs ,etal. /Journal of General Virology)

Fig. 2 Genetic content of SAdV-1. (The genome is depicted as a central horizontal line marked at 5 kbp intervals, with the E1A, E1B, E3 and E4 regions shaded, form Ga'bor M. Kova'cs ,etal. /Journal of General Virology)

毒基因组复制和病毒包装必不可少的顺式作用元件。5'端有共价结合的末端蛋白(TP),可作为引物启动病毒基因组的复制,且与病毒的感染有关,含TP的DNA感染性可提高100倍<sup>[10]</sup>。发生在病毒复制前的转录称为早期转录,表达大量早期蛋白来调整细胞状态为病毒复制提供有利微环境(主要涉及E1A、E1B产物功能),抑制宿主细胞抗病毒的防御体系(以E3和VA-RNA为主)<sup>[9]</sup>,并激活晚期启动子表达结构蛋白,为病毒组装和成熟做准备。复制后,晚期基因由主要晚期启动子(MLP)起始,转录出长达20 kb的原初转录物,后根据腺苷酰化位点的差异,经过剪切加工最终形成18种不同的mRNA。根据剪切方式和终止位点的不同,可分为5组:L1(52K、pIIIa);L2(III、pVII、V);L3(pVI、hexon、protease);L4(100K、33K、pVIII);L5(Fiber1、Fiber2)<sup>[9、10、12]</sup>,如图2。SAdV-1有两个Fiber基因与HAdV40\41相似,而SAdV-3只有1个。

晚期基因编码病毒包装所需结构蛋白,基因结构较稳定。其中hexon基因部分序列进化上高度保守,常被用于系统进化分析,也是PCR检测引物设计的常用序列。此外,pol、DBP、ptp基因进化上也比较保守。

### (3) 衣壳蛋白结构与抗原性

衣壳蛋白主要包括六邻体(hexon)、五邻体(penton)、纤维蛋白(fiber)等。六邻体蛋白是病毒颗粒中最丰富的结构蛋白,为同源三聚体,单体的中部和C端较保守,有7个高变区(HVR),HVR2~5和HVR6位于蛋白分子表面。六邻体蛋白能够刺激机体产生中和抗体以及群和型特异性抗体<sup>[9]</sup>。对六邻体而言,型特异性表位位于表面,而内部保守的抗原,对衣壳结构形成至关重要,因此有很广泛的群特异性。群特异性六邻体抗体已作为一般腺病毒诊断试剂被广泛应用<sup>[13]</sup>。六邻体蛋白的Loop1、Loop2是较好的中和抗原决定簇,因此对这段基因的克隆、表达、纯化,有利于其免疫学研究。但也有研究表明,存在于血清中的抗体仅与三聚体六邻体反应,而不结合六邻体多肽链<sup>[14]</sup>。

纤维蛋白也为同源三聚体,它的结构可分为尾、杆及球形区3部分,N端尾部与五邻体基底相连,较保守;杆端一般由多个含15个氨基酸残基的重复亚单位构成<sup>[10]</sup>;球形区为功能区,可与宿主细胞受体结合,血凝素也位于球形区。纤维蛋白远端具有型特异性而尾部有亚群特异性。五邻体基底,

是多肽Ⅲ的五聚物,与三聚体纤维蛋白结合形成五邻体复合物,封闭衣壳上的12个顶点,具有群特异性<sup>[1、10、15]</sup>。首先,纤维蛋白的球形区与细胞受体结合使病毒粘附到细胞上,再通过五邻体基底与细胞表面整合蛋白的相互作用,触发细胞膜通透性使病毒内化进入宿主细胞<sup>[13、15]</sup>。

### 3 猴腺病毒的感染特点

SAdV具有明显组织嗜性和细胞依赖性,易产生细胞病变(CPE),感染猴多为隐性感染,可时常从粪便中检出感染性的SAdV<sup>[2]</sup>。少数毒株引起呼吸道疾病,腹泻、肺炎、结膜炎等。宿主以体液免疫应答为主,产生anti-Hexon、anti-Fiber和anti-penton3种中和抗体<sup>[13]</sup>。一些SAdV毒株接种新生仓鼠可引起肿瘤<sup>[7]</sup>。

组织培养研究表明,SAdV对宿主动物源性的细胞最为敏感,可在猴肾原代或传代细胞中增殖,一般不感染异种动物细胞。但猩猩腺病毒与人腺病毒关系亲密,可能源自同一祖先,也可感染人的细胞系。病变特征为细胞变圆,并形成葡萄串状团聚块,核内出现许多小的嗜酸性包涵体,出现于上毒后3~4d<sup>[11]</sup>。有文献报道,SAdV在猩猩和恒河猴健康种群中普遍流行,粪便中检出率高,相比之下人粪便中则很少见<sup>[2]</sup>。猴免疫应答以体液免疫为主,产生的中和抗体亲和力高于人的,而细胞免疫则没有人的精细高效,SAdV可能通过E3的调控机制逃避免疫。SAdV可能感染猴小肠上皮细胞,造成SAdV慢性感染并由肠道持续向外排毒,而人腺病毒则被抑制在很低的水平。另外,在感染SIV的长尾猴中SAdV的检出率明显提高,SIV-SAdV协同感染在SIV阳性猴中很普遍,相似报道也出现在人中,免疫不完全的人群HAdV的检出率更高<sup>[3]</sup>。

SAdV在猩猩种群中的高度流行及与HAdV十分相近的亲缘关系,表明存在由猩猩传染给人的潜在风险。但经过对50位动物工作者血清的检测未发现SAdV中和抗体。尽管恒河猴SAdV的感染率更高,但与人的进化距离远,不太可能传染给人<sup>[2]</sup>。尽管如此,已从肠胃炎病人中分离出来一株类似恒河猴SAdV-1的毒株<sup>[2]</sup>,全基因组一致性高达97%,但其抗体不能中和SAdV-1。

目前感染恒河猴、食蟹猴的主要为HAdV-G、SAdV-A亚群,据文献报道腹泻猴粪便样本中,腺病

毒抗原阳性约占 21% ,PCR 阳性占 46%<sup>[7-18]</sup> ,也有调查显示新鲜粪便中 ,SAdV PCR 阳性率高达 67%<sup>[2]</sup> 。血清学检测我国云南某地区野生成年恒河猴群中 ,抗体阳性率甚至高达 80.8%<sup>[16]</sup> 。非人灵长类中腺病毒的高感染率表明可利用非人灵长类作为腺病毒感染动力学研究的模型 ,并用于检测腺病毒疫苗临床前的有效性和安全性<sup>[3]</sup> 。此外在猴源性生物制品的检定中 SAdV 污染应引起我们的注意。

#### 4 猴腺病毒的检测

加强实验用猴和猴源性生物制品的病毒检测不仅可以保证疫苗等生物制品的安全性 ,提高实验用猴质量 ,同时也减少了人类感染动物源性病毒的潜在风险。传统 SAdV 的检测方法是收集标本进行病原分离培养 ,应用凝集抑制、免疫荧光、放射免疫、限制性内切酶分析等方法<sup>[4-6]</sup> ,不仅费时费力 ,其结果准确性也不高。目前还没有检测 SAdV 的 ELISA 商业化试剂盒 ,为了研究非人灵长类中腺病毒的感染流行情况 ,检测人肠道腺病毒 (HAdV-40 \ 41) 的 ELISA 试剂盒被应用于研究 ,并首次在橄榄色狒狒、长尾猴中检测到腺病毒 ,感染率分别为 52.9%、48.9%<sup>[3]</sup> 。ELISA 简便、快捷 ,提高了检测的准确性。但 SAdV 与 HAdV 的抗原结构和免疫应答不尽相同且血清型多 ,因此可能漏检。目前 ,国内外建立了一系列高敏感度的对人腺病毒 (HAdV) 的检测方法和分型方法 ,如 Nested-PCR、荧光定量 PCR、多重 PCR 等<sup>[17]</sup> ,这对检测动物 SAdV 感染情况以及分析猴源性生物制品 (如减毒活疫苗) 的 SAdV 污染情况具有一定的借鉴意义。

在最近的一些研究中 ,为了更精确的检测 SAdV 的流行情况运用了 PCR 技术。K. Ba'nyai<sup>[7]</sup> 等人特异性针对 hexon 保守序列设计引物 ,扩增产物大小约 300 bp 并通过测序和系统进化分析所扩增片段描述了一些 SAdV 的分子生物学特征。结果表明在中国一个大的灵长类栖息地发现了不寻常的高流行率和 SAdV 的基因多样性 ,并分离了一些新的 SAdV 毒株 ,是否代表新的 SAdV 亚群需进一步确定。而 Soumitra Roy<sup>[2]</sup> 等人特异性针对 pol 保守序列设计了嵌套引物 ,用于特异性的诊断由肠道脱落的 SAdV ,提高了敏感度 ,检出率高达 67% ,比一般 PCR 检出率高。国外文献报道中 ,还应用了透射电子显微术 ,免疫荧光检测、核酸杂交等方

法<sup>[18-19]</sup> ,在分析动物 SAdV 感染状况和检测生物制品 SAdV 污染时 ,适当的联合运用各种检测方法对 SAdV 的综合评估非常重要。随着快速敏感、简便准确的 SAdV 检测方法的建立 ,将会发现更多新的 SAdV 毒株。

#### 5 总结

近年来随着猴腺病毒替代载体系统的发展 ,SAdV 在实验用猴中的感染流行情况开始受到关注。最新调查发现 ,SAdV 在非人灵长类中高度流行 ,可能存在由人到猩猩传播感染<sup>[2,4]</sup> 。猕猴群中感染率更高 ,且曾在生产用猴肾细胞和脊灰减毒疫苗检定中分离出一些 SAdV 毒株<sup>[1,6]</sup> 。不断探索敏感性更高、特异性更好的 SAdV 检测方法 ,对于监控 SAdV 传播和保证猴源性生物制品安全具有深远意义。

#### 参考文献:

- [1] 殷震. 刘景华. 动物病毒学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社. 1997: 1104 - 1113.
- [2] Soumitra R, Luk HV, Sergey K, et al. Isolation and Characterization of Adenoviruses Persistently Shed from the Gastrointestinal Tract of Non-Human Primates [J]. PLoS Pathogens 2009, e1000503.
- [3] Mwenda JM, Nyachio A, Langat DK, et al. Serological detection of adenoviruses in non-human primates maintained in a colony in Kenya [J]. East African Medical Journal 2005, 82: 371 - 375.
- [4] Suxiang T, Jatinder S, Susan R, et al. Short Report: Identification of Adenoviruses in Fecal Specimens from Wild Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Western Tanzania [J]. Am J Trop Med Hyg 2010, 82(5): 967 - 970.
- [5] Hoffert WR, Bates ME, Cheever FS. Study of enteric viruses of simian origin [J]. Am J Hyg, 1958, 68: 15 - 30.
- [6] Gabor MK, Balazs H, Alexander N, et al. Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes [J]. Journal of General Virology, 2005, 86: 1681 - 1686.
- [7] Banyai K, Esona MD, Liu A, et al. Molecular detection of novel adenoviruses in fecal specimens of captive monkeys with diarrhea in China [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 142: 416 - 419.
- [8] Gabor MK, Andrew JD, Alexander N, et al. Analysis of the first complete genome sequence of an Old World monkey adenovirus reveals a lineage distinct from the six human adenovirus species [J]. Journal of General Virology 2004, 85: 2799 - 2807.
- [9] 金奇, 毕胜利, 董关木等. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社. 2001. 692 - 708.

(上转第 70 页)

插管仍然是目前建立家兔人工气道值得推荐的首选方法。

本实验结果提示,在目前有限的条件下建立家兔人工气道首选经口盲探气管插管。同时也提示我们,可以开发适用于家兔的专用插管器械<sup>[6]</sup>,例如类似于人的可视喉镜或者纤维支气管喉镜等,从而简化建立家兔人工气道的过程,使得这一过程可控性更强,发生并发症的机会更少,帮助研究者们集中精力于后续实验中。

#### 参考文献:

- [1] Schuyt HC, Leene W. An improved method of tracheal intubation in the rabbit [J]. *Lab Anim Sci*, 1977, 27: 690 - 693.
- [2] Kobler H, Regenfuss P. [A simple technique for orotracheal intubation in the rabbit] [J]. *Z Gesamte Exp Med*, 1971, 154: 325 - 327.
- [3] Morgan TJ, Glowaski MM. Teaching a new method of rabbit intubation [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2007, 46: 32 - 36.
- [4] Schuyt HC, Leene W. An improved method in rabbit intubation and thymectomy [J]. *Eur Surg Res*, 1978, 10: 362 - 372.
- [5] Stephens Devalle JM. Successful management of rabbit anesthesia through the use of nasotracheal intubation [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2009, 48: 166 - 170.
- [6] O'Roark TS, Wilson RP. Use of the BAAM Mark VI for blind oral intubation in the rabbit [J]. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 1995, 34: 87 - 89.
- [10] 戴志红, 谢磊, 赵耘. 腺病毒的生物学特性 [J]. *中国兽药杂志*. 2007. 41:36 - 39.
- [11] Kidd AH, Garwicz D, Oberg M. Human and simian adenoviruses: Phylogenetic Inferences from Analysis of VA-RNA Genes [J]. *Virology*, 1995, 207: 32 - 45.
- [12] Soumitra R, Guangping G, David SC, et al. Complete nucleotide sequences and genome organization of four chimpanzee adenoviruses [J]. *Virology* 2004, 324: 361 - 372.
- [13] Russell WC. Update on adenovirus and its vectors [J]. *Journal of General Virology* 2000, 81: 2573 - 2604.
- [14] 金玉霞. 腺病毒六邻体蛋白的免疫学研究进展 [J]. *国外医学免疫学分册* 2002, 25: 172 - 173.
- [15] W. C. Russell. Adenoviruses: update on structure and function [J]. *Journal of General Virology* 2009, 90: 1 - 20.
- [16] 周亚敏, 李绍东, 段幸生. 云南省野生恒河猴三种病毒血清抗体的初步调查 [J]. *云南大学学报 (自然科学版)*, 1998, 20: 145 - 147.
- [17] 李文贵, 俞乃胜. 核酸扩增技术在人腺病毒诊断检测的研究进展 [J]. *中国人兽共患杂志* 2001, 17: 78 - 81.
- [18] Yuhuan W, Xinming T, Charles H, et al. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea [J]. *J Med Primatol*, 2007, 36: 101 - 107.
- [19] Kim CS, Sueltenfuss EA, Kalter S. Isolation and characterization of simian adenoviruses isolated in association with an outbreak of pneumoenteritis in vervet monkeys [J]. *Adenoviruses and ver付 pneumonitis*. 292 - 300.
- [20] Soumitra R, Guangping G, David SC, et al. Complete nucleotide sequences and genome organization of four chimpanzee adenoviruses [J]. *Virology* 2004, 324: 361 - 372.

(修回日期)2011-01-06

(下接第 74 页)

(修回日期)2010-01-18