



模型动物在动物流感病毒传播机制研究中的应用

高玉伟^{1,2}, 桑晓宇^{1,2,3}, 夏咸柱^{1,2}

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062; 2. 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130062; 3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

【摘要】 动物流感(influenza)不仅会对畜禽养殖业造成巨大的经济损失,而且可以跨越种间障碍进入人群,引发全球性的公共卫生危机和灾难性后果。模型动物是研究流感传播机制的重要基础。模型动物的使用有助于我们对流感病毒传播机制的深入了解。本文从流感病毒的宿主范围、常用模型动物的宿主限制因素和模型动物在流感病毒跨种传播机制中的选择与应用等三个方面进行了综述。

【关键词】 动物流感; 传播机制; 模型, 动物

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10、11-0117-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10、11.027

The Use of Animal Model in the Study of Transmissibility of Animal Influenza Virus

GAO Yu-wei^{1,2}, SANG Xiao-yu^{1,2,3}, XIA Xian-zhu^{1,2}

(1. Institute of Military Veterinary, AMMS, Changchun 130062, China;

2. Key laboratory of Jilin province for zoonosis prevention and control Changchun 130062, China;

3. Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

【Abstract】 Animal influenza not only can cause huge economic damage to livestock and poultry breeding business, but also cause public health crisis and pandemic in human by crossing the species barrier. Using animal model could help us to understand the transmissibility of influenza virus. We reviewed the influenza A virus host ranges, host restriction factors, and the use of animal model in the study of transmissibility of animal influenza virus.

【Key words】 Animal influenza; Transmissibility; Model, animal

2003 以来, A 型高致病性 H5N1 亚型禽流感病毒直接突破种间障碍, 造成 546 人感染, 330 人死亡。2009 年 4 月猪源三重 A 型 H1N1 亚型流感病毒在人间水平传播, 引发大流行^[1]。动物流感病毒特别是 A 型流感病毒的跨种传播问题引起了人们的高度关注。A 型流感病毒包括 16 个血凝素亚型(HA)和 9 个神经氨酸酶亚型(NA), 理论上可以组合成 144 种 A 型流感病毒。依据宿主来源可将流感分为人流感、禽流感、马流感和猪流感等。在自然界中, 水禽是 A 型流感病毒的天然储

存库, 几乎所有亚型都可以在水禽中分离到。人流感病毒亚型主要有 H1N1、H2N2 和 H3N2。马流感病毒只有两个抗原性不同的亚型: H7N7 和 H3N8。猪流感病毒至少有七种不同血清亚型(H1N1、H1N2、H1N7、H3N2、H3N6、H4N6 和 H9N2), 其中占绝大多数的是古典型猪 H1N1、类禽型 H1N1 和类人型 H3N2 三种毒株。在过去的研究中发现禽流感病毒很难感染人, 同样人流感病毒也无法有效感染禽类, 这表明不同物种来源的 A 型流感病毒具有相对严格的种属特异性。但

[作者简介] 高玉伟, 副研究员, 博士, 主要从事病毒学研究。E-mail: gywtext@yahoo.com.cn。

近年来发现,越来越多的自然感染事件表明流感病毒能够跨越种间屏障。例如,禽流感和猪流感对人的跨种传播,马流感 H3N8 对狗的跨种传播^[2]。A 型流感病毒跨种传播取决于病毒因适应性变异导致的宿主范围变化、宿主自身的限制性因素和环境因素的变化。

1 A 型流感病毒的宿主范围

A 型流感病毒对宿主的吸附能力、复制能力以及从宿主细胞内的释放能力决定了病毒感染宿主的宿主范围。流感病毒对宿主的吸附能力主要取决于其血凝素蛋白(HA)对宿主细胞唾液酸受体(SA)的结合,而流感病毒的内部蛋白影响流感病毒在宿主体内的复制能力。流感病毒神经氨酸酶(NA)的主要功能是将子代病毒从宿主细胞表面释放出来。

病毒的受体结合特异性主要决定了病毒对宿主细胞的吸附能力与感染能力。不同种属的宿主或同一宿主的不同组织和细胞的唾液酸受体(SA)的分布具有特异性。流感病毒吸附宿主首先需要血凝素蛋白(HA)与宿主细胞表面的唾液酸受体(SA)结合。宿主细胞表面的唾液酸受体(SA)末端的糖链的类型(α -2,6 糖苷键或 α -2,3 糖苷键)影响了流感病毒对宿主的结合能力和感染能力。人流感病毒倾向结合于主要表达在上呼吸道细胞和非纤毛细胞表面的 SA α 2,6 受体,而禽流感病毒倾向结合主要表达于禽的肠上皮细胞和人的下呼吸道细胞的 SA α 2,3 受体。具有 SA α 2,3 受体特性的高致病性禽流感病毒(HPAIV)对禽类具有较强的毒力,引起急性病毒性肺炎并且有可能进一步发展成急性呼吸窘迫症(ARDS)以及多器官衰竭。多数研究者认为这与其具有下呼吸道细胞组织嗜性有一定的关系。H3 系流感病毒的血凝素蛋白(HA)的受体结合位点(RBS)第 226 位和第 228 位氨基酸对于流感病毒的宿主范围和致病力都具有关键的作用,其主要原因是这两个位点决定受体结合特性。研究发现,禽流感病毒血凝素蛋白(HA)第 226 位氨基酸通常是谷氨酰胺(Gln),其特异结合 SA α 2,3 受体;而人 H2 和 H3 流感病毒血凝素蛋白(HA)第 226 位氨基酸位点通常是亮氨酸,倾向结合 SA α 2,6 受体。在大多数人流感病毒中,HA 蛋白第 226 位氨基酸是亮氨酸的同时第 228 位氨基酸通常是色氨酸(Ser);而禽流感中,HA 蛋白的第 226 位和第 228 位氨基酸通

常是谷氨酰胺(Gln)和甘氨酸(Gly)。从人或猪体内分离到的 H1 亚型流感病毒的 HA 倾向结合 SA α 2,6 受体,其 HA 的第 190 位氨基酸通常是天冬氨酸(Asp)并且伴随着第 225 位氨基酸是谷氨酸(Glu)或天冬氨酸(Asp);从禽体内分离到的 H1 亚型流感毒株的这两个位点分别是谷氨酸(Glu)和甘氨酸(Gly),其 HA 易于结合 SA α 2,3 受体^[3]。H5N1 亚型高致病性禽流感病毒只识别 SA α 2,3 受体,但我们发现当 HA 的 160 位氨基酸为丙氨酸(A)时,H5N1 病毒可同时识别 SA α 2,3 受体和 SA α 2,6 受体。如果将该位氨基酸由 A 突变为苏氨酸(T)时病毒就会只识别 SA α 2,3 受体,进一步的分析发现 A160T 变异可导致 HA 增加一个糖基化位点,从而影响了病毒受体结合特性^[4]。除受体结合特性外,流感病毒的复制能力同样影响着病毒的跨种传播能力。流感病毒需要利用宿主细胞的复制系统帮助其复制。研究人员发现 A 型流感病毒的多聚酶蛋白 PB2、PA 和基质蛋白 M1、M2 均会影响到流感病毒的复制能力。

2 模型动物的宿主限制性

宿主限制性是造成流感病毒具有不同宿主范围的因素之一。选择模型动物时首先要考虑实验动物的宿主限制性,宿主的限制性包括病毒受体和抗病毒天然免疫。

2.1 小鼠

小鼠是用于评估流感感染最常用的哺乳动物模型。大多数实验用小鼠的呼吸道表面具有 SA α 2,6 和 SA α 2,3 两种唾液酸受体^[5],因而对人、禽流感病毒都易感。但不同的小鼠分布也不完全相同。BALB/c 小鼠的多数器官都表达 SA α 2,6 和 SA α 2,3 受体,包括气管、肺、小脑、脾、肝和肾,而 C57BL/6J 小鼠的肺中缺乏 SA α 2,6 受体,SA α 2,3 则被证明存在纤毛孔和肺泡上皮 II 型细胞上。虽然实验小鼠可同时表达两种受体,但人 A 型流感病毒(H1、H2 和 H3)一般要经过在小鼠上适应性传代才能有效复制,而一些低致病性和高致病性禽流感如 H5N1、H2、H6 和 H7 病毒则不需要适应性传代即可感染。从而可以推断仅由受体分布并不能完全决定流感病毒的宿主范围。另一个宿主限制性因素是 Mx1 蛋白,Mx1 蛋白属于干扰素诱导蛋白家族,可以通过干扰 mRNA 合成阻断流感病毒复制。大多数近交系小鼠因携带缺陷的 Mx1 等位基因,对鼠适应流感病毒高度易感^[6]。

2.2 雪貂

雪貂一直被视为流感研究的理想动物模型。雪貂对许多种人和禽流感病毒都易感,并且与人在临床表现、肺功能、气道形态、呼吸道细胞种类等方面有许多相似性。雪貂的呼吸道表面具有 SA α 2,6 和 SA α 2,3 两种受体,SA α 2,6 受体分布于呼吸道,SA α 2,3 受体主要分布在下呼吸道末梢呼吸道细支气管^[7]。人 H3N2 流感病毒的吸附和复制主要在上呼吸道进行,然而禽流感病毒的感染和复制主要在下呼吸道。人流感病毒吸附在呼吸道纤毛上皮细胞表面和雪貂 I 型肺泡细胞,主要引起上呼吸道疾病偶尔也导致支气管肺炎。禽流感病毒吸附在 II 型肺泡细胞和细支气管,这可以解释了禽流感引起肺部的严重病变而气管和细支气管所受影响很少的原因。雪貂的其它宿主限制性因素研究的还相对较少。有趣的是,人们通过比较发现自然感染雪貂的鼻洗液中淋巴细胞应答能力比鼻内接种感染的雪貂弱^[8]。淋巴细胞诱导减少和细胞免疫的暂时性损伤均会导致流感病毒对雪貂的感染能力增强。

2.3 非人灵长类动物

各种各样的非人灵长类动物,包括旧大陆猴(恒河猴和猕猴)和新大陆猴(卷尾猴)都已用于流感病毒感染研究。与雪貂不同,流感病毒在非人灵长类动物吸附模式和在人呼吸道具有显著的不同;猕猴感染 H3N2 病毒后,病毒吸附不发生在气管、支气管或细支气管。这就可以解释为什么猕猴感染 H3N2 病毒后临床症状不明显。部分非人灵长类动物对季节性流感病毒的敏感性降低归因于非人灵长类动物和人类的受体分布不同。我们 H5N1 高致病性流感感染研究中发现,只有经气管内接种,才会造成病毒性肺炎^[9],单纯的经鼻腔接种通常只会形成一过性的感染。

2.4 豚鼠

豚鼠是近年才开始应用于流感传播研究的新模型。豚鼠的鼻腔的呼吸道上皮细胞的唾液酸受体类型为 SA α 2,6 和 SA α 2,3,但以 SA α 2,6 为主,而嗅部为 SA α 2,6 受体。气管上皮细胞表面同时具有 SA α 2,6 和 SA α 2,3 类型的受体。肺上皮细胞表面为 SA α 2,3 受体^[4]。

3 实验动物在 A 型流感病毒哺乳动物间水平传播机制研究中的应用

雪貂是最早应用于 A 型流感病毒传播机制研

究的模型动物。但由于雪貂价格较贵并且饲养条件要求高,应用并不广泛。一些研究者试图用小鼠作为评价模型,但绝大多数流感病毒都不能在小鼠中传播,甚至 1918H1N1 也未能引起传播。2006 年, Peter Palese^[10] 发现豚鼠适合研究流感病毒的传播。人流感病毒在豚鼠中可以高效传播(包括接触性传播和非接触性传播)。体积较小、价格低廉的豚鼠成为研究流感病毒传播又一个重要的哺乳动物模型,但和雪貂不同,感染的豚鼠临床症状并不明显,即使是 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒对豚鼠也不具有明显的致病性。

近些年来,通过使用模型动物,已发现了一些影响流感病毒对哺乳动物的跨种感染和传播的分子机制。Gao 等^[11] 用豚鼠模型发现并证明 PB2 基因 701 位点的天冬酰胺是 H5N1 亚型禽流感病毒在哺乳动物中水平传播的必需前提;并发现 HA 基因的 160 氨基酸由 T 突变为 A,导致 158-160 位糖基化位点缺失,可使 H5N1 病毒结合人的 SA α 2,6 受体,并获得在哺乳动物间的水平传播能力。Hoeven 等^[12] 研究发现,对于 H1N1 亚型流感病毒而言,血凝素蛋白(HA)的受体结合位点(RBS)的第 190 位和 225 位氨基酸对于不同来源的 H1N1 流感病毒在雪貂群中空气传播能力影响很大。第 190 位和第 225 位均为天冬氨酸的人源 H1N1 可以在雪貂群中高效的发生空气传播,进一步研究还发现 1918H1N1 “西班牙流感”病毒 PB2 蛋白的第 627 位氨基酸影响其在雪貂中的传播能力,该点为赖氨酸的 1918H1N1 流感病毒能够在雪貂群中高效传播;当该位点突变为谷氨酸时,突变的 1918 H1N1 流感病毒在雪貂群中的传播能力明显减弱。Steel 等^[13] 在研究 PB2 蛋白氨基酸位点对于流感病毒传播能力的影响时发现,将一株人季节性流感 H3N2 的 PB2 蛋白第 627 位氨基酸由赖氨酸突变为谷氨酸,突变后的流感病毒与其母本相比,在豚鼠间的空气传播能力明显减弱。除病毒自身的因素外,温度和相对湿度对于生物气溶胶的传播影响较大。Palese 等^[14] 利用豚鼠模型研究环境温度和相对湿度对于流感病毒在豚鼠间传播能力的影响时发现,低温(5℃)有利于流感病毒在豚鼠间的空气传播而高温阻碍传播。当环境温度为 20℃ 时,低相对湿度有利于流感病毒在豚鼠间空气传播;研究者认为不同的相对湿度影响了流感病毒气溶胶在空气中的衰减速度和传播距

离。Hemmes 等^[15]用直径在 5 ~ 6 μm 的流感病毒气溶胶研究生物半衰期时发现,相对湿度小于 40% 时流感病毒气溶胶的衰减速度最慢,并且其衰减速度随着相对湿度的升高而加快。不仅如此, Schaffer 等^[16]发现相对湿度对于流感病毒气溶胶的稳定性有一定影响,流感病毒气溶胶在相对湿度为 20% 时粒子稳定性最高;在相对湿度为 50% ~ 60% 之间时稳定性最差;而在高相对湿度时居中。Lowen 等^[17]用豚鼠模型证明了高温 (30 $^{\circ}\text{C}$) 可以阻断流感病毒气溶胶在任何相对湿度下的空气传播,但是并不能阻断流感病毒在豚鼠间的接触性传播或飞沫传播。研究者认为,流感病毒在热带地区和亚热带地区的反复不定期流行的一个原因可能是发生在此地区的流感病毒主要是以接触性传播或飞沫传播为主,而温带地区的流感主要以空气传播为主,因此更易发生季节性流感。

4 结语:

通过使用模型动物,人们对流感病毒传播机制的认识和理解在逐渐加深。但现有的模型还不能完全满足传播机制研究的需要,还需要更广泛的选用模型。如雪貂因对流感过于敏感而在实验中难于控制,豚鼠感染流感后不表现临床症状而无法全面模拟病毒在人与人之间传播的现象。此外,目前发现的一些影响传播的病毒氨基酸并不具有普遍的代表性,说明病毒的传播受多基因和多因素的影响,还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] WHO, WHO. <http://www.who.int/en/>, 2011.
- [2] Yamanaka, T., et al., *Interspecies transmission of equine influenza virus (H3N8) to dogs by close contact with experimentally infected horses* [J]. *Vet Microbiol*, 2009. 139(3-4): p. 351-5.
- [3] Ge, S. and Z. Wang, *An overview of Influenza A virus receptors* [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011. 37(2): p. 157-65.
- [4] Gao, Y., et al., *Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host* [J]. *PLoS Pathog*, 2009. 5(12): p. e1000709.
- [5] Ning, Z. Y., et al., *Detection of expression of influenza virus receptors in tissues of BALB/c mice by histochemistry* [J]. *Vet Res Commun*, 2009.
- [6] Salomon, R., et al., *Mx1 gene protects mice against the highly lethal human H5N1 influenza virus* [J]. *Cell Cycle*, 2007. 6(19).
- [7] Thongratsakul, S., et al., *Avian and human influenza A virus receptors in trachea and lung of animals* [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2010. 28(4): p. 294-301.
- [8] Herlocher, M. L., et al., *Ferrets as a transmission model for influenza: sequence changes in HA1 of type A (H3N2) virus* [J]. *J Infect Dis*, 2001. 184(5): p. 542-6.
- [9] Fan, S., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates* [J]. *PLoS Pathog*, 2009. 5(5): p. e1000409.
- [10] Lowen, A. C., et al., *The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006.
- [11] Gao, Y., et al., *Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host* [J]. *PLoS Pathog*, 2009. 5: p. e1000709.
- [12] Van Hoeven, N., et al., *Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(9): p. 3366.
- [13] Steel, J., et al., *Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N* [J]. *PLoS Pathog*, 2009. 5(1): p. e1000252.
- [14] Lowen, A. C., S. Mubareka, and J. Steel, *Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature* [J]. *PLoS Pathogens*, 2007. Volume 3(Issue 10): p. 1470-1476.
- [15] Hemmes, J., K. Winkler, and S. Kool, *Virus survival as a seasonal factor in influenza and poliomyelitis* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1962. 28(1): p. 221-233.
- [16] Schaffer, F., M. Soergel, and D. Straube, *Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, and composition of spray fluids* [J]. *Archives of Virology*, 1976. 51(4): p. 263-273.
- [17] Lowen, A. C., J. Steel, and S. Mubareka, *High Temperature (30 $^{\circ}\text{C}$) Blocks Aerosol but Not Contact Transmission of Influenza Virus* [J]. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2008. Vol. 82, (No. 11): p. 5650-5652.

(修回日期) 2011-09-15