

H7N9 禽流感病毒对人类致病的分子基础分析

于玉凤, 郭晓兰, 王 颖, 周俊梅, 方丹云, 曾谷城, 晏辉钧, 江丽芳*

(1.中山大学中山医学院微生物学教研室;2.中山大学热带病防治研究教育部重点实验室,广东 广州 510080)

摘要:【目的】了解 H7N9 禽流感病毒对人类致病的分子特征,为更好地预防与治疗 H7N9 人禽流感提供科学依据。【方法】从 GISAID 数据库中下载中国 2013 年分离的所有 H7N9 禽流感病毒株的基因及蛋白序列,并从 NCBI 数据库中下载其他相关的流感病毒序列,运用生物信息学软件分析 H7N9 禽流感病毒基因的系统进化特征、受体结合位点、宿主特异位点、飞沫传播关键氨基酸位点、致病及毒力相关位点、耐药性位点及潜在糖基化位点等的变异情况。【结果】2013 年中国流行的 H7N9 禽流感病毒为四源重组病毒,所有基因片段均来源于禽类,不含任何人流感病毒基因;病毒 HA 的受体结合位点发生了 2 个关键氨基酸的变异(G186V 和 Q226L);在与飞沫传播有关的关键氨基酸位点中,个别氨基酸已发生了变异(T160A、Q226L);该病毒具有 8 个毒力增强位点;所有分离株的 M2 均发生了 S31N 变异;分离株 A/Shanghai/1/2013 的 NA 的耐药位点发生了 R294K 变异;所有毒株的潜在糖基化位点均相对保守。【结论】H7N9 禽流感病毒为四源重组的新型禽流感病毒。该病毒具有与人呼吸道上皮细胞 SAa-2,6 Gal 受体结合的分子基础,但目前尚未获得经飞沫传播的充分条件,人传人的可能性不大。该病毒具有低致病性禽流感病毒的分子特征,表明对禽类致病性不强,但其对人类呈高致病性,这可能与其毒力位点的特征有关。所有分离毒株均发生了对离子通道抑制剂金刚烷胺类药物的耐药性突变,个别毒株已发生了对神经氨酸酶抑制剂奥司他韦(达菲)的耐药性突变。

关键词: H7N9 禽流感病毒;致病性;分子基础;生物信息学

中图分类号: R373.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)05-0657-09

Analysis of Molecular Basis about Pathogenicity of Avian Influenza A H7N9 Virus to Human

YU Yu-feng, GUO Xiao-lan, WANG Yin, ZHOU Jun-mei, FANG Dan-yun, ZENG Gu-cheng,
YAN Hui-jun, JIANG Li-fang*

(1.Department of Medical Microbiology, Zhongshan Medical College; 2.Key Laboratory of Tropical Diseases Control, Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To understand the potentially molecular mechanism about pathogenicity of the avian influenza A H7N9 virus, to provide the scientific foundation for the prevention and treatment of avian influenza A H7N9. 【Methods】 All the gene and protein sequences of avian influenza A H7N9 virus isolated in China in 2013 were downloaded from GISAID. The sequences using for the homologous analysis were downloaded from NCBI. Then the origins and the sites related to the receptor binding property, host specificity, droplet transmissibility, virulence and drug resistance of the avian influenza A H7N9 virus were analyzed by a variety of bioinformatics software. 【Results】 The avian influenza A H7N9 virus epidemic in China in 2013 was evolved from four origins, all genes were of avian origin and none was of human origin. Mutations G186V and Q226L at the receptor binding sites in the HA were found in almost all isolates; Two mutation sites (T160A/Q226L) were identified at the sites associated with droplet transmission; eight virulence enhanced sites were found; mutation S31N was found in the M2 in all isolates; mutation R294K was only found in NA of A/Shanghai/1/2013; All potential glycosylation motifs were relatively conservative. 【Conclusions】 The avian influenza A H7N9 virus

收稿日期:2013-06-13

基金项目:国家自然科学基金(81071367);广东省高等学校自然科学研究重点项目(GXZD0901)

作者简介:于玉凤,硕士在读,研究方向:流感病毒致病与免疫机制, E-mail: yuyufeng.good@163.com; *通信作者:江丽芳,教授,博士生导师, E-mail: jianglf@mail.sysu.edu.cn

was a novel avian influenza virus with four origins. The virus had the molecular basis of binding the human receptor SAa-2,6 Gal on the epithelial cells in the upper respiratory tract, but was not rendered the sufficient conditions to confer droplet transmission between mammals, so was less likely to be transmitted human-to-human. The Low pathogenic property of the virus could be attributed to the weak pathogenicity to avian. The high pathogenicity to human might have a relationship with the property of virulence sites. All isolates showed ion channel inhibitors(amantadine) resistance and individual isolate showed resistance mutations with neuraminidase inhibitors (oseltamivir).

Key words: avian influenza A H7N9 virus; pathogenicity; molecular basis; bioinformatics

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(5):657-665]

在病毒分类学上禽流感病毒与人流感病毒同属于正粘病毒科甲型流感病毒属,是分节段的单负链 RNA 病毒,基因组由 8 个基因片段组成,分别编码碱性聚合酶 1(basic polymerase 1,PB1)、碱性聚合酶 2(basic polymerase2,PB2)、酸性聚合酶 (acidic polymerase,PA)、神经氨酸酶 (neuraminidase,NA)、血凝素 (hemagglutinin,HA)、基质蛋白 1 (matrix protein1,M1)、基质蛋白 2 (matrix protein2,M2)、非结构蛋白 1(nonstructural protein1,NS1)、非结构蛋白 2 (nonstructural protein2,NS2)、核蛋白 (nucleoprotein, NP) 及 PB1-F2 蛋白等 11 种蛋白^[1]。根据 HA 和 NA 的抗原性不同,甲型流感病毒可分为若干个亚型,迄今已发现有 16 个 HA 亚型 (H1~H16)^[2],9 个 NA 亚型(N1 ~ N9),任何一对 HA 和 NA 均可形成一个亚型,所有的 HA 亚型和 NA 亚型均可在禽类中分离到。人禽流感是由禽流感病毒(avian influenza virus,AIV)的某些亚型所致的人类急性呼吸道传染病。自 1997 年 H5N1 禽流感病毒 H5N1 在香港首次跨越种属屏障引起人类的感染和死亡以来,已发生过 H7N7、H7N2、H7N3 和 H9N2 等禽流感病毒感染人类的事件。2013 年 2 月 19 日,中国出现首例人感染 H7N9 禽流感病毒病例,截止到 6 月初,仅 3 个多月时间已发现 131 人感染,37 人死亡^[3]。迄今,对禽流感病毒跨越种属屏障感染人类的遗传及致病机制尚不清楚。在 H7N9 人禽流感爆发之际,了解病毒来源、变异和致病的分子特征,对防控 H7N9 人禽流感显得尤为重要。本研究利用生物信息学方法,结合相关文献报道,研究了 H7N9 禽流感病毒基因组的来源和基因重配的可能情况,探讨了病毒在人间传播的可能性,并分析了病毒的致病特征及耐药

性变异,旨在为进一步监测和防控 H7N9 人禽流感提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

从全球禽流感共享数据库 (the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data ,GISAID) 中下载截止到 2013 年 5 月中旬上传的中国 2013 年分离的所有 20 余株 H7N9 禽流感病毒各基因及蛋白序列。从 NCBI 中下载与 H7N9 禽流感病毒对应序列同源性高的其他流感病毒序列。

1.2 同源性 及 变 异 分 析

运用 NCBI 中的 BLAST 对 H7N9 禽流感病毒的八个基因片段分别进行同源性搜索,从搜索结果显示的 100 条序列中下载前 20 条(不包括已从 GISAID 下载的 H7N9 禽流感病毒基因序列)序列,共 160 条序列用于后续分析。应用 MEGA 5.1 程序中的 Clustal W 软件对获取的基因序列进行合并比对,使用 Neighbor Joining 法中的 p-distance 法绘制遗传进化树,其中 Bootstrap 值选为 1 000 次重复^[4]。运用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对各基因序列相似性值进行计算。

采用与上述相同的方法,从 NCBI 中下载与 H7N9 禽流感病毒各蛋白序列相似性高的蛋白序列共 200 条,病毒蛋白包括 HA、NA、NP、M1、M2、NS1、PB2、PB1、PA 及 PB1-F2。与从 GISAID 数据库下载的 H7N9 禽流感病毒蛋白序列合并,比对分析各蛋白序列中关键位点氨基酸的突变及缺失特征。

将 PubMed 检索出的权威文献已报道的流感病毒变异位点定义为关键位点,并按照原文献分析将其划分为受体结合位点、宿主特异性位点、飞

沫传播关键氨基酸位点、毒力位点、耐药位点。运用 Sequon Finder 1.0 预测 HA 与 NA 氨基酸序列中的潜在糖基化位点位置及数目^[5]。

2 结果

2.1 同源性分析

结合进化树(本文未列图)及序列同源性分析,得出 H7N9 禽流感病毒 8 个基因片段的可能来源(表 1)。由表 1 可见中国 2013 年流行的 H7N9 禽流感病毒主要由三个亚型禽流感病毒通过基因重配而成,不含任何人类流感病毒基因片段。其中 HA 基因来源于中国江浙地区 2011 年在鸭群中流行的 H7N3 亚型,NA 基因来源于韩国 2011 年在野鸟中流行的 H7N9 亚型,其他 6 个内部基因(MP、NS、NP、PA、PB1、PB2)均来源于 H9N2 亚型。但追溯 H9N2 亚型病毒的来源,发现并不单一,相关的 H9N2 亚型病毒可分为两种,第一种为 2011 年在江浙地区鸡群中流行的 H9N2 亚型病毒,第二种为 2012 年在北京地区花雀中流行的 H9N2 亚型病毒。其中 MP、NS、NP 来源于第一种,PA、PB1、PB2 来源于第二种。综上所述,H7N9 禽流感病毒为四源重组病毒。此外,本研究分析了所有毒株的 8 个基因片段的变异情况,发现除 PB2、NS 相对保守之外,其余各基因在流行过程中均存在抗原性漂移现象。

2.2 受体结合位点分析

流感病毒感染宿主细胞是由病毒包膜表面糖蛋白 HA 与细胞表面的唾液酸(sialic acid, SA)受体共同介导的。唾液酸通常与糖链 N 末端倒数第

二个糖基——主要是半乳糖(galactose, Gal)以 $\alpha 2,3$ 或 $\alpha 2,6$ 糖苷键连接,从而形成唾液酸 $\alpha-2,6$ 半乳糖(SA $\alpha-2,6$ Gal)和唾液酸 $\alpha-2,3$ 半乳糖(SA $\alpha-2,3$ Gal)两种不同类型的受体。SA $\alpha-2,6$ Gal 受体主要存在于人上呼吸道上皮细胞表面,而 SA $\alpha-2,3$ Gal 受体主要存在于禽类肠上皮细胞和人类肺泡上皮细胞表面,因而人类一般不易感染禽流感病毒。HA 受体结合位点的变化与病毒的宿主特异性直接相关。HA 受体结合位点包括 180-螺旋(178 ~ 185 位氨基酸)、210-环(211 ~ 219 位氨基酸)、120-环(123 ~ 128 位氨基酸),以及 4 个保守的氨基酸(88Tyr、143Trp、174His、186Tyr)^[6]。这些受体结合位点中某些关键氨基酸的改变会直接导致受体特异性转变,从而影响病毒对不同宿主的感染性^[7]。从表 2 可见,流感病毒 HA 至少存在 10 个受体结合关键氨基酸位点,其中 Q226L 最为重要^[8]。本研究结果显示,H7N9 禽流感病毒 HA 发生了 2 个关键氨基酸位点的变异,其中包括最关键的 Q226L 变异,从而使 H7N9 禽流感病毒获得与人上呼吸道上皮细胞 SA $\alpha-2,6$ Gal 受体结合的分子基础。

2.3 宿主特异性分析

宿主细胞受体和 HA 结合位点的结构是决定流感病毒宿主特异性的主要因素^[18],此外,PB2 中的相关位点在宿主特异性中也起到重要作用。当 PB2 含 627K 时,可在人体中有效行使病毒蛋白合成的功能,而含 627E 会限制其在人体内的功能^[19-20]。2009 流行的 H1N1 猪流感病毒 PB2 中 G590S/Q591S 变异起到了等同 E627K 变异的作用^[21]。D701N 和

表 1 H7N9 禽流感病毒同源性分析

Table 1 The Homology analysis of avian influenza A H7N9 virus

Gene	% Nucleotide identity ¹⁾	Homologous strains	% Nucleotide identity ²⁾
HA	98.8% ~ 100%	A/duck/Zhejiang/12/2011(H7N3)	95.7% ~ 96.8%
NA	98.9% ~ 100%	A/wild bird/Korea/A14/2011(H7N9)	94.4% ~ 94.8%
MP	97.8% ~ 100%	A/chicken/Zhejiang/607/2011(H9N2)	98.4% ~ 99.1%
PA	97.3% ~ 100%	A/brambling/Beijing/16/2012(H9N2)	98.2% ~ 99.3%
PB1	98.5% ~ 100%	A/brambling/Beijing/16/2012(H9N2)	96.7% ~ 99.4%
PB2	99.1% ~ 100%	A/brambling/Beijing/16/2012(H9N2)	99.0% ~ 99.6%
NS	99.0% ~ 100%	A/chicken/Dawang/1/2011(H9N2)	98.7% ~ 99.2%
NP	96.9% ~ 100%	A/chicken/Zhejiang/611/2011(H9N2)	98.1% ~ 99.1%

1) The range of identity percent was between the avian influenza H7N9 viruses. 2) The range of identity percent was between avian influenza H7N9 viruses and the homologous strains.

L714R 变异会导致禽流感病毒在小鼠中扩增能力增强^[22]。由表 3 可知,在 18 株 H7N9 禽流感病毒中,有 10 株 PB2 发生 E627K 变异,且均为分离自人的病毒株 2 株发生 D701N 变异,且发生在分离自人的带有 627E 的病毒株。据此推测,H7N9 禽流感病毒突破宿主屏障,传播人类可能与受体结合位点中 G186V 和 Q226L 变异及 PB2 中 E627K 变异有关。

2.4 飞沫传播位点分析

流感病毒与人上呼吸道上皮细胞 SA α -2,6 Gal 受体结合并非其可飞沫传播的唯一条件,还取决于是否能在人上呼吸道中有效增殖。研究 H5N1 禽流感病毒发现 158D/224K/226L、110Y/160A/226L/228S、196R/226L/228S 的突变组合能够使 H5N1 在上呼吸道有效增殖并通过飞沫在雪貂间传播^[8,12,23],因而上述组合可能是导致病毒飞沫传播的重要条件。本研究发现,在 H7N9 禽流感病毒 HA 中并未出现其中任何一个组合,故从分子基础

上分析,该病毒目前尚未获得经飞沫传播的充分条件,出现人传人的可能性较小,相应位点见表 4。而从作用机制上分析,N158D 与 T160A 的替换均可使 158 位的糖基化位点丢失,从而有可能增强 HA 与人上呼吸道上皮细胞 SA α -2,6 Gal 受体的结合能力。本研究在 H7N9 禽流感病毒的 HA 中发现了 T160A 和 Q226L 变异,根据上述组合,提示必须密切监测其他飞沫传播关键氨基酸位点的变异情况,以便及时预测和评估该病毒的流行与传播趋势。

2.5 毒力位点分析

研究表明,HA 裂解位点含多个碱性氨基酸时表现高致病性特征,含 1~2 个碱性氨基酸时表现低致病性特征^[24]。对 H7N9 禽流感病毒 HA 切割位点进行分析,发现本研究中所有的 H7N9 禽流感病毒株 HA 裂解位点均为 PEIPKGRG,仅含有两个碱性氨基酸,为低致病性特征。

除 HA 裂解位点,流感病毒毒力相关位点分

表 2 受体结合位点中的关键位点

Table 2 The pivotal sites in receptor binding sites

H3 numbering	G186V	E190D	Q192H/R	N224K	G225D	Q226L	S227N	G228S	A134V/T	A138S
H7 numbering	177 ^[9]	181 ^[10]	182 ^[11]	215 ^[12]	216 ^[13]	217 ^[14]	218 ^[8]	219 ^[15]	125 ^[16]	128 ^[17]
A/Shanghai/3/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Shanghai/4664T/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Shanghai/2/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Shanghai/4/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Anhui/1/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Zhejiang/1/2013	V	E	Q	N	G	I	S	G	A	A
A/Hangzhou/1/2013	V	E	Q	N	G	I	S	G	A	A
A/Hangzhou/2/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Zhejiang/01/2013	V	E	Q	N	G	I	S	G	A	A
A/chicken/Jiangsu/K27/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/chicken/Jiangsu/K89/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/chicken/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	V	E	Q	N	G	Q	S	G	A	A
A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Hangzhou/3/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Environment/Shanghai/S1088/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Zhejiang/2/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Chicken/Shanghai/S1053/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Environment/Hangzhou/34/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Fujian/1/2013	V	E	Q	N	G	L	S	G	A	A
A/Shanghai/1/2013	G	E	Q	N	G	Q	S	G	A	S

表 3 PB2 蛋白序列中与宿主特异性相关的位点
Table 3 Sites associated with the host specificity in the PB2 amino acids

Avian influenza A H7N9 virus	Collection date	G590S	Q591R	E627K	D701N	S714R
A/Anhui/1/2013	2013-Mar-20	G	Q	K	D	S
A/Hangzhou/1/2013	2013-Mar-24	G	Q	K	D	S
A/Hangzhou/2/2013	2013-Mar-25	G	Q	K	D	S
A/Hangzhou/3/2013	2013-Apr-02	G	Q	K	D	S
A/Environment/Hangzhou/34/2013	2013-Apr-04	G	Q	E	D	S
A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013	2013-Apr-02	G	Q	E	D	S
A/Shanghai/1/2013	2013-Feb-26	G	Q	K	D	S
A/Shanghai/2/2013	2013-Mar-05	G	Q	K	D	S
A/Shanghai/3/2013	2013-Feb-27	G	Q	K	D	S
A/Shanghai/4/2013	2013-Mar-09	G	Q	E	D	S
A/Shanghai/4664T/2013	2013-Mar-05	G	Q	K	D	S
A/Chicken/Shanghai/S1053/2013	2013-Apr-03	G	Q	E	D	S
A/Environment/Shanghai/S1088/2013	2013-Apr-03	G	Q	E	D	S
A/Zhejiang/01/2013	2013-Mar-25	G	Q	K	D	S
A/Zhejiang/1/2013	2013-Mar-24	G	Q	K	D	S
A/chicken/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	2013-Apr-01	G	Q	E	D	S
A/Zhejiang/2/2013	2013-Apr-03	G	Q	E	N	S
A/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	2013-Apr-03	G	Q	E	N	S

表 4 飞沫传播的相关位点

Table 4 Sites associated with droplet transmission

H3 Numbering	H110Y	N158D	T160A	Q196R	N224K	Q226L	G228S
H7 Numbering	100Q	149N	151A	187G	215 N	217L	219G

布于流感病毒各蛋白上(表 5)。其中 NS1 蛋白序列中“218 -230 缺失”会导致病毒毒力减弱,其他位点氨基酸的替换均会导致病毒毒力增强。由表 5 可知,在 17 个毒力相关位点中,H7N9 禽流感病毒含 8 个毒力增强位点,1 个毒力减弱位点。

2.6 耐药性位点分析

NA 保守的唾液酸结合位点为 119R、120E、152D、153R、200N、226R、229E、245D、276H、278E、279E、294R、332D、351K、427E (N9 numbering),这些位点氨基酸的变异,特别是 E120G、R153K、H276Y、R294K 的变异^[35],可能会导致流感病毒对神经氨酸酶抑制剂耐药性的改变^[36]。由表 6 可知,在 NA 耐药位点中,A/Shanghai/1/2013 毒株已发生了 R294K 变异,使其具有对神经氨酸酶抑制剂

耐药的分子基础,提示该毒株可能对奥司他韦等神经氨酸酶抑制剂产生了耐药性。而在 M2 中,若出现 L26F、V27A、A30T、S31N、G34E 中任何一个位点氨基酸的变异,都可能会导致流感病毒对离子通道抑制剂类药物产生耐药性^[37]。本研究所有的 H7N9 禽流感毒株的 M2 均出现了 S31N 变异,说明 H7N9 禽流感病毒可能对离子通道抑制剂类药物不敏感。

2.7 潜在糖基化位点分析

糖基化位点对于流感病毒的致病性及宿主特异性均有重要意义^[5]。分析发现本研究中的 H7N9 禽流感病毒的 HA 均含有 5 个保守的潜在糖基化位点,分别为 30 NGTK、46 NATE、249NDTV、421 NWTR、493NNTY; NA 均含有 3 个保守的潜在糖基化位点,分别为 87NLTK、147NGTI、202NASA。H7N9 禽流感病毒的 HA 与 NA 潜在糖基化位点与其同源病毒株相比,均未发生位置及数目的变化,所以推测糖基化位点改变在此次流行的 H7N9 禽流感病毒致病性及宿主特异性改变上发挥作用较少。

表 5 流感病毒毒力相关位点

Table 5 Virulence sites of influenza virus

	HA ¹⁾		NA ²⁾		M1			PA		PB1		PB1-F2	PB2		NS1		
	D225 G 216 ^[25]	A316 S 308 ^[26]	S315 N 316 ^[25]	Stalk deletion 69-73 ^[26]	N30 D ^[27]	T139 A ^[28]	T215 A ^[27]	A36 T ^[29]	K353 R ^[30]	H99 Y ^[4]	I368 V ^[4]	90aa ^[31]	L89 V ^[4]	H357 N ^[29]	P42 S ^[32]	D92 E ^[33]	Deletion 218-230 ^[34]
A/Anhui/1/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Chicken/Shanghai/S1053/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/chicken/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	-	V	H	S	D	Deletion
A/Environment/Hangzhou/34/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Environment/Shanghai/S1088/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Fujian/1/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Hangzhou/1/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Hangzhou/2/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Hangzhou/3/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	-	V	H	S	D	Deletion
A/Shanghai/1/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	I	90	V	H	S	D	Deletion
A/Shanghai/2/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Shanghai/3/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Shanghai/4/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Shanghai/4664T/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	-	V	H	S	D	Deletion
A/Zhejiang/01/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Zhejiang/1/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Zhejiang/2/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	90	V	H	S	D	Deletion
A/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	G	A	S	deletion	D	T	A	A	K	H	V	-	V	H	S	D	Deletion

1); H3 numbering(upper), H7 numbering (lower); 2): N2 numbering (upper), N9 numbering (lower).

表 6 流感病毒耐药位点分析

Table.6 Sites about resistance to medicine

	NA(N9 Numbering)				M2				
	E120G	R153K	H276Y	R294K	L26F	V27A	A30T	S31N	G34E
A/Anhui/1/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Chicken/Shanghai/S1053/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/chicken/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Environment/Hangzhou/34/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Environment/Shanghai/S1088/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Fujian/1/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Hangzhou/1/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Hangzhou/2/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Hangzhou/3/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Shanghai/1/2013	E	R	H	K	L	V	A	N	G
A/Shanghai/2/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Shanghai/3/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Shanghai/4/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Shanghai/4664T/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Zhejiang/01/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Zhejiang/1/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Zhejiang/2/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G
A/Zhejiang/DTID-ZJU01/2013	E	R	H	R	L	V	A	N	G

3 讨 论

在 H7N9 人禽流感疫情发生以后, Gao 等^[4]率先报道 H7N9 禽流感病毒为三源重组病毒, 系统进化分析表明 HA 基因和 NA 基因分别与 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3) 和 A/wild bird/Korea/A14/2011(H7N9)同源, 其他 6 个内部基因片段则与 A/brambling/Beijing/16/2012 (H9N2) 同源。随后 Liu 等^[38]研究发现 H7N9 禽流感病毒至少为四源重组病毒, HA 与 NA 同源性分析与 Gao 等^[4]分析结果相同, 发现虽然 PB2、PB1 及 PA 与 A/brambling/Beijing/16/2012 (H9N2) 同源, 但是并未与其他的北京或北方省市分离出的毒株处于进化树的同一分枝, 最后得出 6 个内部基因除 NS 可能来源于江浙地区的 H9N2 禽流感病毒外, 其余均来源于上海及其周边地区的 H9N2 禽流感病毒。本研究发现, 虽然 NA 基因在进化树中与 A/wild bird/Korea/A14/2011(H7N9)处于同一分支, 但是其基因及蛋白序列均与 A/mallard/Czech Republic/13438-29K/2010 (H11N9) 相似性值最高。6 个内部基因中 MP、NS、NP 基因均与江浙地区的 H9N2 禽流感病毒株同源, 虽然 PB1 基因与 A/brambling/Beijing/16/2012(H9N2)在进化树中处于同一分支, 而与其相似性值最高的是 A/chicken/Jiangsu/Q3/2010(H9N2)病毒株(相关数据未列出), 与 Kageyama 等^[39]的研究结果相似。以上提示 H7N9 禽流感病毒为新型的多源重组病毒。迄今对 H7N9 禽流感病毒的溯源研究还未终止, 需更多数据进一步确认。

目前, 感染人类的禽流感病毒有 H5N1、H9N2、H7N7、H7N2 和 H7N3 等亚型, 其中 H5N1 因其对人类的高致病性及高致死率而备受瞩目, 据 WHO 统计, 从 2003 年开始至 2013 年 6 月初, 人感染 H5N1 禽流感确诊病例为 630 例, 其中死亡 375 人^[40]。此次流行的 H7N9 禽流感病毒对人类致死率虽不及 H5N1, 但其对人类具有更高的感染性, 截至六月初, 仅 3 个多月时间, 我国共报告 131 例人感染 H7N9 禽流感确诊病例。本研究推测, 该病毒对人类的高感染率至少与下述两个因素有关: 其一, 该病毒的受体结合位点和宿主特异

性位点发生了变异, 使病毒更易于与人上呼吸道上皮细胞 SA α -2, 6 Gal 受体结合; 其二, 该病毒是在自然界从未出现过的新型重组禽流感病毒, 人类及其他动物对该病毒完全缺乏免疫力, 使病毒易于在自然界传播。此外, 该病毒具有 8 个高毒力位点, 这可能与其对人类的高致病性有关。在治疗方面, 由于所有毒株均发生了对 M2 离子通道抑制剂的耐药性变异, 而绝大部分毒株对神经氨酸酶抑制剂仍敏感, 所以应在发病早期及时使用神经氨酸酶抑制剂治疗。目前流行病学虽未发现该病毒有人传人的证据, 但本研究发现该病毒在流行过程中持续发生抗原性漂移、飞沫传播关键氨基酸位点出现了变异以及个别毒株出现了神经氨酸酶抑制剂的耐药性突变等, 因此, 当前亟需加强对 H7N9 禽流感病毒的病原学监测, 及时跟踪和了解病毒对人类的适应性变异, 掌握病毒在流行过程中的演变方向, 为 H7N9 禽流感的有效防治提供科学依据。

致谢: 感谢 GISAID 为本研究中提供的所有 H7N9 禽流感病毒各基因及蛋白序列, 感谢哈尔滨兽医研究所、杭州疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、中国动物卫生与流行病学中心、WHO 中国流感中心等无私共享 H7N9 禽流感病毒数据。

参考文献:

- [1] 龙北国, 江丽芳. 高级医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 366-369.
Long BG, Jiang LF. Advanced medical microbiology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 366-369.
- [2] Tong S, Li Y, Rivaviller P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(11): 4269-4274.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 5月20日-5月27日人感染 H7N9 禽流感疫情信息[EB/OL] (2013-05-27) [2013-05-27]. <http://www.moh.gov.cn/mohwsyjbg/s3578/201305/516e13d5c10e49d81118a5556e8a735.shtml>. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Epidemic Situation of H7N9 Avian Flu from May 20 to

- May 27[EB/OL] (2013-05-27)[2013-05-27]. <http://www.moh.gov.cn/mohwsyjbg/s3578/201305/516e13d5c10e49dd81118a5556e8a735.shtml>.
- [4] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20): 1888-1897.
- [5] Sun S, Wang Q, Zhao F, et al. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A (H1N1) viruses [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22844.
- [6] Yang H, Carney PJ, Donis RO, et al. Structure and receptor complexes of the hemagglutinin from a highly pathogenic H7N7 influenza virus[J]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8645-8652.
- [7] Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin[J]. *Virology*, 1983, 127(2): 361-373.
- [8] Chen LM, Blixt O, Stevens J, et al. In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity[J]. *Virology*, 2012, 422(1): 105-113.
- [9] Yang H, Chen LM, Carney PJ, et al. Structures of receptor complexes of a north american H7N2 influenza hemagglutinin with a loop deletion in the receptor binding site[J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(9): e1001081.
- [10] Glaser L, Stevens J, Zamarin D, et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity[J]. *J Virol*, 2005, 79(17): 11533-11536.
- [11] Watanabe Y, Ibrahim MS, Ellakany HF, et al. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in egypt[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(5): e1002068.
- [12] Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets[J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 420-428.
- [13] Zhang W, Shi Y, Qi J, et al. Molecular basis of the receptor binding specificity switch of the hemagglutinins from both the 1918 and 2009 pandemic influenza A viruses by a D225G substitution[J]. *J Virol*, 2013, 87(10): 5949-5958.
- [14] Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, et al. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity[J]. *Nature*, 1983, 304(5921): 76-78.
- [15] Chen Z, Zhou H, Kim L, et al. The receptor binding specificity of the live attenuated influenza H2 and H6 vaccine viruses contributes to vaccine immunogenicity and protection in ferrets[J]. *J Virol*, 2012, 86(5): 2780-2786.
- [16] Naughtin M, Dyason JC, Mardy S, et al. Neuraminidase inhibitor sensitivity and receptor-binding specificity of cambodian clade 1 highly pathogenic H5N1 influenza virus[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5): 2004-2010.
- [17] Das P, Li J, Royyuru AK, et al. Free energy simulations reveal a double mutant avian H5N1 virus hemagglutinin with altered receptor binding specificity [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(11): 1654-1663.
- [18] Zhang W, Shi Y, Lu X, et al. An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level[J]. *Science*, 2013, 340(6139): 1463-1467.
- [19] Hatta M, Hatta Y, Kim JH, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(10): 1374-1379.
- [20] Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets [J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1534-1541.
- [21] Mehle A, Doudna JA. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(50): 21312-21316.
- [22] Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model[J]. *J Virol*, 2005, 79(18): 12058-12064.
- [23] Russell CA, Fonville JM, Brown AE, et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host [J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1541-1547.
- [24] Suguitan AL Jr, Matsuoka Y, Lau YF, et al. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic a/vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals[J]. *J Virol*, 2012, 86(5): 2706-2714.
- [25] Pascua PN, Song MS, Lee JH, et al. Virulence and transmissibility of H1N2 influenza virus in ferrets imply

- the continuing threat of triple-reassortant swine viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(39): 15900–15905.
- [26] Sun Y, Tan Y, Wei K, et al. Amino acid 316 of hemagglutinin and the neuraminidase stalk length influence virulence of H9N2 influenza virus in chickens and mice[J]. *J Virol*, 2013, 87(5): 2963–2968.
- [27] Fan S, Deng G, Song J, et al. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice [J]. *Virology*, 2009, 384(1): 28–32.
- [28] Smeenk CA, Brown EG. The influenza virus variant A/FM/1/47-MA possesses single amino acid replacements in the hemagglutinin, controlling virulence, and in the matrix protein as well as growth[J]. *J Virol*, 1994, 68(1): 530–534.
- [29] Zhu W, Zhu Y, Qin K, et al. Mutations in polymerase genes enhanced the virulence of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33383.
- [30] Hu J, Hu Z, Song Q, et al. The PA-gene-mediated lethal dissemination and excessive innate immune response contribute to the high virulence of H5N1 avian influenza virus in mice [J]. *J Virol*, 2013, 87(5): 2660–2672.
- [31] Tscherne DM, Garcia-Sastre A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 6–13.
- [32] Jiao P, Tian G, Li Y, et al. A single amino acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice [J]. *J Virol*, 2008, 82(3): 1146–1154.
- [33] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host antiviral cytokine responses [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 950–954.
- [34] Dundon WG, Milani A, Cattoli G, et al. Progressive truncation of the non-structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry[J]. *Virus Res*, 2006, 119(2): 171–176.
- [35] Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase[J]. *Nature*, 1983, 303(5912): 41–44.
- [36] Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(12): 3403–3408.
- [37] Hayden FG. Amantadine and rimantadine—clinical aspects[M]. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1996: 59–77.
- [38] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: Phylogenetic, structural, and coalescent analyses[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1926–1932.
- [39] Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A (H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013 [J]. *Euro Surveill*, 2013, 18(15): 20453–20467.
- [40] WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO [EB/OL] (2013-6-4) [2013-6-9]. http://www.who.int/influenza/human_animal_inter-face/EN_GIP_20130604_Cumulative Number H5N1 cases.pdf.

(编辑 孙慧兰)