



研究报告

一株人感染高致病性禽流感(H5N1)病毒基因组分子特征分析

雍玮 乔梦凯 石利民 王璇 何敏 丁洁*

南京市疾病预防控制中心 江苏 南京 210003

摘要:【背景】H5N1 禽流感病毒可以感染人类导致重症呼吸道感染,致死率高。【目的】研究我中心确认的一例人感染高致病性禽流感 H5N1 病毒 A/Nanjing/1/2015 的可能起源及基因组分子特征。

【方法】对病人痰液样本中的 H5N1 病毒进行全基因组测序,使用 CLC Genomics Workbench 9.0 对序列进行拼接,使用 BLAST 和 MEGA 5.22 软件进行同源性比对和各片段分子特征分析。【结果】该株禽流感病毒属于 H5 亚型的 2.3.2.1c 家系,其 8 个片段均与江浙地区禽类中分离的病毒高度同源,未发现明显的重配。分子特征显示,该病毒血凝素(Hemagglutinin, HA)蛋白裂解位点为 PQRERRRR/G,受体结合位点呈现禽类受体特点,但出现 D94N、S133A 和 T188I 氨基酸置换增强了病毒对人类受体的亲和性。神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)蛋白颈部在 49–68 位缺失 20 个氨基酸,非结构蛋白 1 (Non-structure protein, NS1)存在 P42S 置换和 80–84 位氨基酸的缺失。其他蛋白中也存在多个增强病毒致病力和对人类细胞亲和力的氨基酸突变。对耐药位点分析发现存在对奥司他韦的耐药突变 H274Y,病毒对金刚烷胺仍旧敏感。【结论】人感染高致病性禽流感 H5N1 病毒 A/Nanjing/1/2015 属于 2.3.2.1c 家系,禽类来源,关键位点较保守,但仍出现了多个氨基酸的进化与变异使其更利于感染人类。H5N1 禽流感病毒进化活跃,持续动态监测不能放松。

关键词: 禽流感病毒, H5N1 亚型, 序列分析

Genomic molecular characterization of a highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus

YONG Wei QIAO Meng-Kai SHI Li-Min WANG Xuan HE Min DING Jie*

Nanjing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210003, China

Abstract: [Background] H5N1 influenza virus can cause severe respiratory infection in human with high fatality. [Objective] To analyze the virus A/Nanjing/1/2015, a human infected highly pathogenic avian influenza virus H5N1 confirmed in our laboratory, and to investigate its possible origins and genomic molecular characterization. [Methods] Whole genome sequencing was performed on the samples of patient's sputum. CLC Genomics Workbench 9.0 was used for sequence assembly. Genome homology and genetic molecular characterization were analyzed by BLAST and MEGA 5.22 software. [Results] The virus belonged to H5 subtype clade 2.3.2.1c. The 8 segments were highly homologous with those viruses

Foundation item: Nanjing Medical Science and Technology Development Foundation (YKK17196)

*Corresponding author: E-mail: yu2an2002@163.com

Received: 17-07-2019; **Accepted:** 20-08-2019; **Published online:** 25-09-2019

基金项目: 南京市医学科技发展课题(YKK17196)

*通信作者: E-mail: yu2an2002@163.com

收稿日期: 2019-07-17; **接受日期:** 2019-08-20; **网络首发日期:** 2019-09-25

isolated from domestic poultry in Jiangsu and Zhejiang area and no re-assortment was observed. Molecular characterization analysis revealed that the amino acid sequences of hemagglutinin (HA) protein cleavage site were PQRERRRR/G. The Receptor Binding Sites (RBS) was in avian type, however, D94N, S133A and T188I substitutions enhanced the affinity to human receptors. A 20 amino acid deletion at position 49–68 in neuraminidase (NA) stalk, and a deletion at position 80–84 together with a P42S mutation in the non-structural protein 1 (NS1) were observed. Several amino acid mutations enhancing virulence and affinity to human cells in other proteins were also found in the present strain. Analysis on drug resistance sites revealed the presence of oseltamivir resistant mutation H274Y, and the virus remained sensitive to amantadine. **[Conclusion]** The human infected highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus A/Nanjing/1/2015 belonged to clade 2.3.2.1c and was avian in origin. The key sites in the present strain were relatively conservative; however, there were still several amino acid evolution and mutations to make it more favorable for infecting human. H5N1 avian influenza virus is evolving actively and continued surveillance is warranted.

Keywords: Avian influenza virus, H5N1 subtype, Sequence analysis

禽流感病毒 H5N1 亚型是属于正黏病毒科流感病毒属的 A 型禽流感病毒。病毒基因组为单股负链 RNA, 分为 8 个节段, 为高致病性禽流感病毒。H5N1 病毒于 1996 年在我国广东省的病鹅体内首次被发现^[1]。1997 年 H5N1 毒株 A/Hong Kong/156/97 在我国香港的活禽养殖业内引发了严重的疫病和病禽的高死亡率, 随后跨种传播传染给了人类, 导致 18 人感染, 其中 6 人死亡, 这也是全球首次 H5N1 感染人类的报道^[2]。自此以后, 高致病性禽流感病毒 H5N1 开始在亚洲和北非地区散发, 尤其是在中国、越南、印度、印度尼西亚、柬埔寨和埃及等地多见, 并且不断有人感染病例的报道^[3]。截至 2019 年 6 月 24 日, 全球共有 861 人感染 H5N1 禽流感病毒, 其中死亡 455 人, 死亡率高达 52%^[4]。我国内陆首例确诊的人感染 H5N1 患者于 2006 年在湖南被发现^[5], 此后陆续有人感染病例的报道^[6]。

2015 年 1 月 22 日, 我中心确诊一例人感染 H5N1 病例, 这是江苏省被确诊的第 3 例 H5N1 人感染病例, 之前的两位患者为 2007 年确诊的一例家庭聚集性病例^[7]。为进一步了解该病毒的特点, 为人感染 H5N1 禽流感病毒的防控提供数据, 考虑到病毒分离培养后得到的子代病毒可能会与亲代

病毒在遗传特点上产生差异, 本研究直接对病人原始呼吸道样本中的 H5N1 病毒 A/Nanjing/1/2015 进行全基因组序列测定, 并对其分子特征进行分析和阐述。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2015 年 1 月南京市疾病预防控制中心收到一例快速进展的急性重症呼吸道感染病人痰液样本。患者为女性, 年龄 37 岁。

1.2 主要试剂和仪器

病毒 RNA 小提试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit), QIAGEN 公司; 甲型/乙型流感病毒核酸检测试剂盒、流感 H1N1 亚型核酸检测试剂盒、禽流感 H7N9 亚型核酸检测试剂盒、禽流感 H5N1 亚型核酸检测试剂盒, 江苏硕世生物科技有限公司; 普通 DNA 产物纯化试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; Nextera XT DNA 文库制备试剂盒, Illumina 公司。MiSeq 测序仪, Illumina 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 荧光定量仪, QIAGEN 公司。

1.3 病毒核酸检测

取 4 mL D-Hank's 液稀释痰液样本, 剧烈振荡 30 s, 取 140 μ L 稀释后的痰液标本上清, 按照

试剂盒说明书手工进行核酸抽提,抽提结束后以 60 μ L 洗脱液溶解核酸。各取 RNA 提取液 5 μ L,使用荧光 PCR 法对病毒核酸进行甲型/乙型流感、甲型 H1N1 亚型、禽流感 H7N9 亚型和 H5N1 亚型检测。

1.4 测序文库构建及高通量测序

使用流感病毒逆转录引物 Uni12 (M)^[8] (江苏省疾控中心提供)将病毒 RNA 反转录成单链 cDNA,再通过甲型流感病毒通用引物扩增流感病毒 8 个片段,PCR 产物纯化后用荧光定量仪进行定量。纯化后的 DNA 作为测序模板按照 Nextera XT DNA 文库制备试剂盒说明构建测序文库,使用 MiSeq 测序仪进行全基因组序列测定。

1.5 序列分析及进化树构建

测序所得原始序列数据使用 CLC Genomics Workbench 9.0 进行质控、拼接,所得序列使用 NCBI BLASTn 进行相似性检索,在 MEGA 5.22 中使用邻近归并法(Neighbor-Joining)构建系统进化树并分析重要氨基酸位点的变异情况,进化树用 Bootstrap 重复抽样 1 000 次进行验证。

2 结果与分析

2.1 病毒基因组序列基本特征和遗传进化特征分析

对 A/Nanjing/1/2015 病毒进行全基因组测序,序列整理并拼接后获得 8 个基因片段(PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M、NS)的全长序列,长度分别为 2 280、2 274、2 151、1 704、1 497、1 350、982、823 bp。此 8 个片段的基因序列已经在线提交至 GenBank,序列号分别为 PB2 (MF598576)、PB1 (MF598577)、PA (MF598578)、HA (MF598579)、NP (MF598580)、NA (MF598581)、M (MF598582)、NS (MF598583)。

在 NCBI 中对 H5N1 禽流感病毒 8 个基因片段进行检索,使用 MEGA 5.22 软件对 A/Nanjing/1/2015 病毒和 GenBank 中下载的病毒序列构建进化树(图 1)。通过和分属不同家系的 H5 亚型血凝素

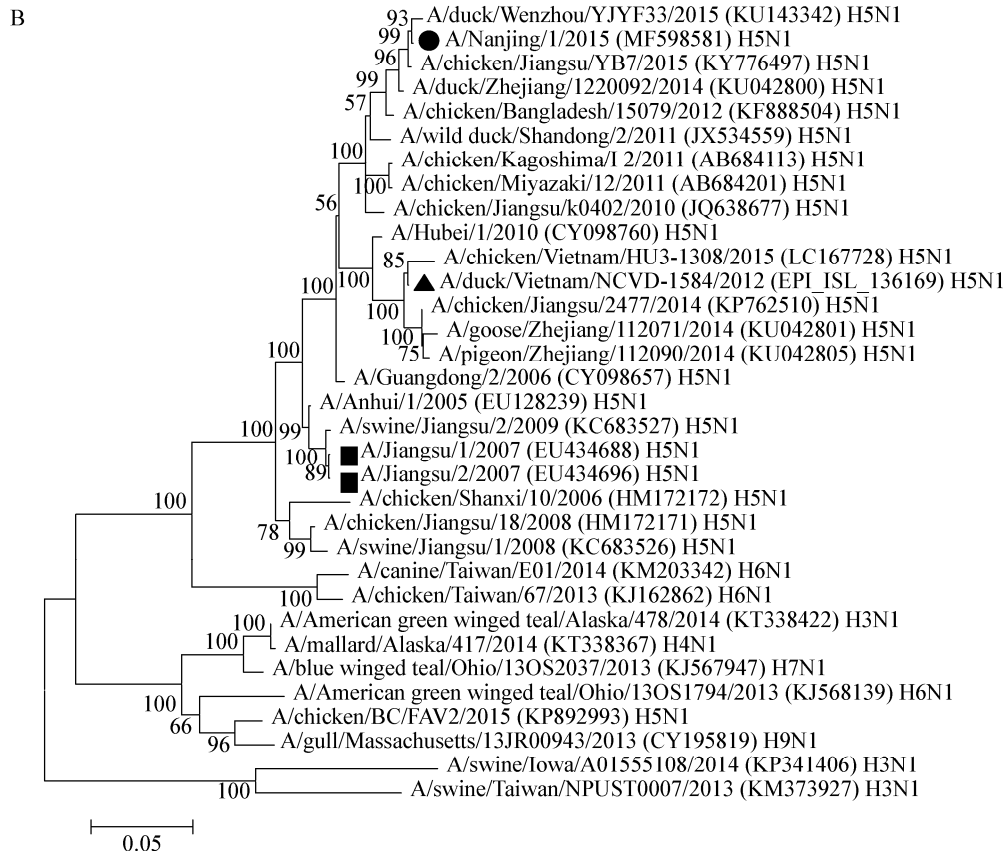
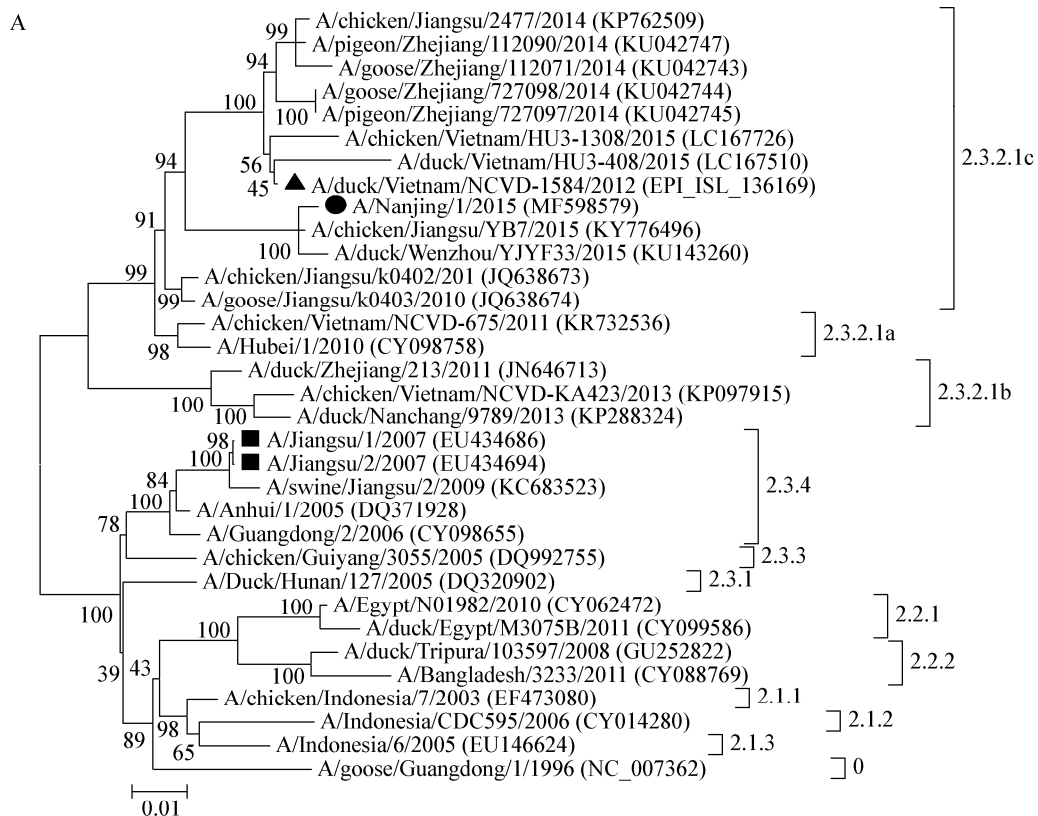
HA 基因进行聚类分析发现(图 1A), A/Nanjing/1/2015 病毒的 HA 基因属于 H5 的 2.3.2.1c 家系,2007 年江苏发现的两例人感染 H5N1 病毒的 HA 基因属于 2.3.4 家系。A/Nanjing/1/2015 病毒的 HA 基因在进化树上同江苏 H5N1 分离株 A/chicken/Jiangsu/YB7/2015 和温州 H5N1 分离株 A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015 的遗传距离最近,形成一个紧密的独立分支,而同时期分离的 2.3.2.1c 家系里的其他毒株则聚类成另一个大的分支。神经氨酸酶 NA 基因与温州 H5N1 分离株 A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015 的遗传距离最近。其余的 6 个基因也是与江苏 H5N1 分离株 A/chicken/Jiangsu/YB7/2015 和/或温州 H5N1 分离株 A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015 的亲缘关系最近。

2.2 血凝素 HA 蛋白中氨基酸位点对致病性的影响

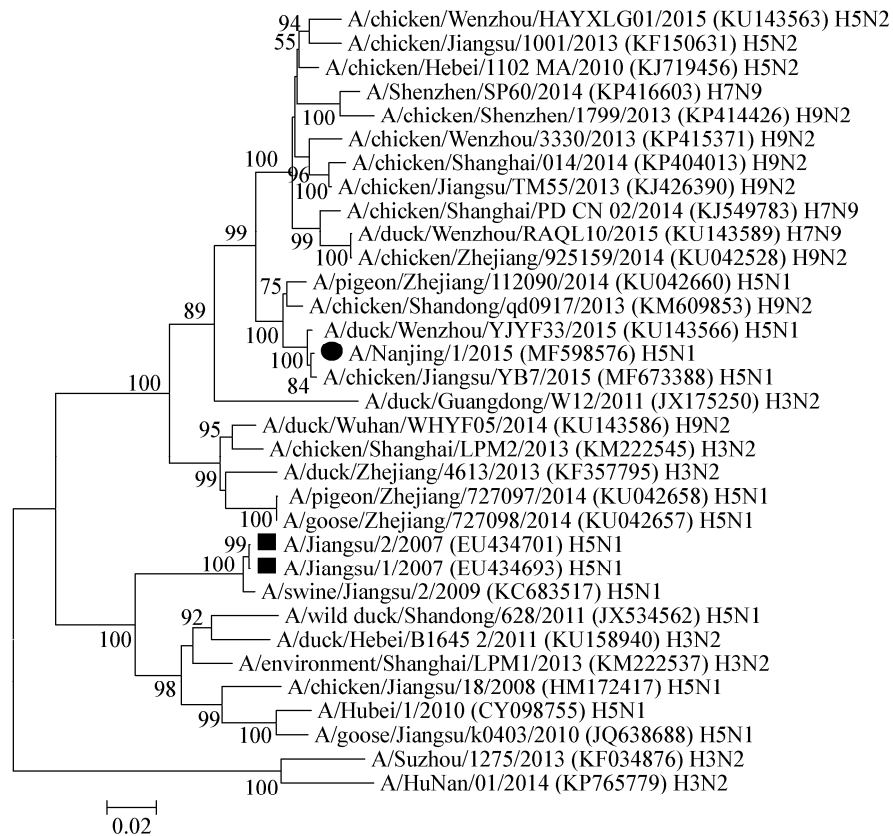
A/Nanjing/1/2015 病毒的 HA 裂解位点氨基酸序列为 PQRERRRR/G (图 2),与另外 5 株同属 2.3.2.1c 家系的 H5 病毒株序列一致。在裂解位点处存在连续 4 个碱性氨基酸精氨酸(R),符合高致病性禽流感病毒特征^[9]。

如图 3 所示,HA 蛋白受体结合位点第 222 位(H5 亚型编号)氨基酸为 Q,第 224 位为 G,未发生突变,保持禽类受体特征^[10]。HA 蛋白 94 位点出现 D→A 突变,133 位点出现 S→A 突变,188 位点出现 T→I 突变,这些突变被认为可以增加禽流感病毒的毒力和对人类受体的结合能力^[11-12]。此外,在 HA1 氨基酸序列中,有 6 个潜在的 N 型糖基化位点,可能成为流感病毒逃脱宿主免疫的重要因素^[13]。

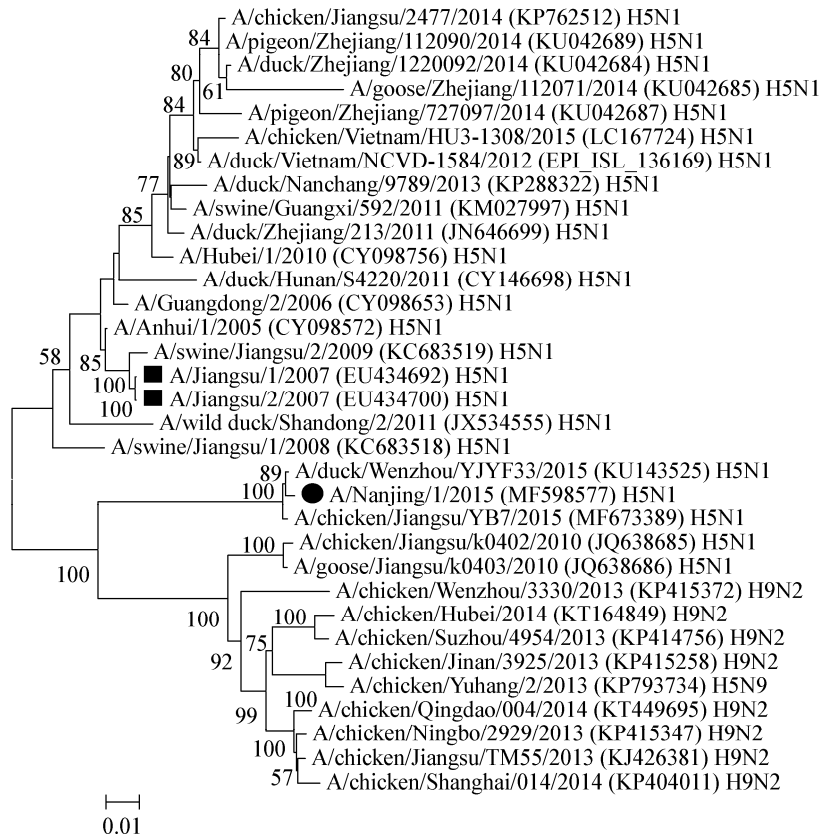
与 H5N1 病毒 2.3.2.1c 家系的疫苗株 A/duck/Vietnam/NCVD-1584/2012 相比,两者在树图上分属两个较大的分支(图 1 HA),并且该病毒 HA1 蛋白中存在 16 个氨基酸置换的位点(L66W、T71I、A86V、D88G、L129K、V131G、N140K、D154N、N155D、A156T、G163D、I174V、E184K、



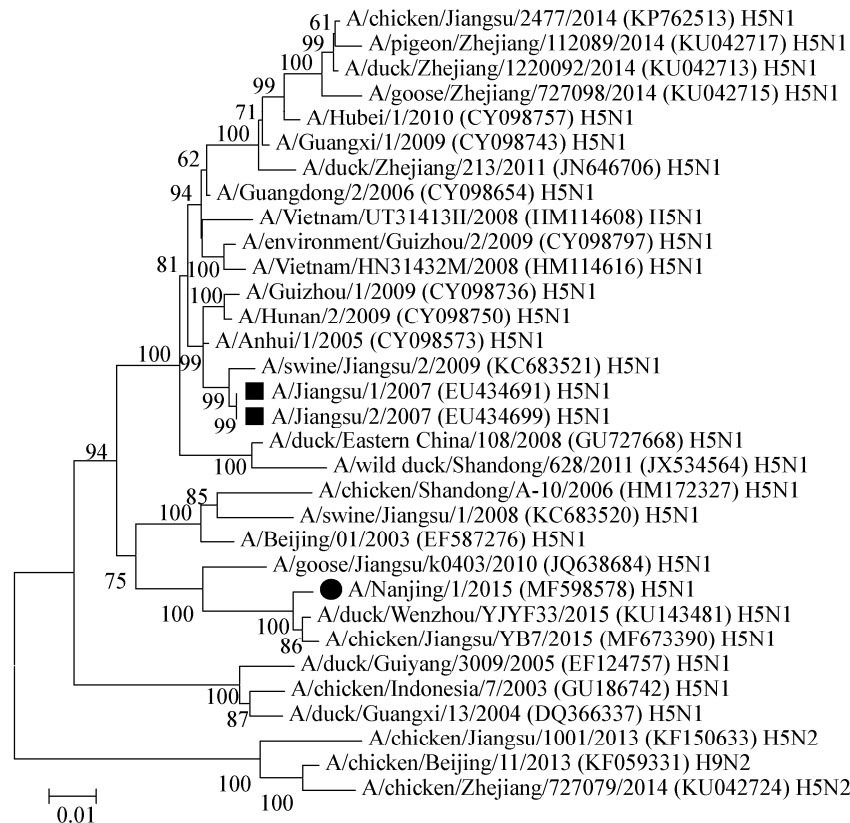
C



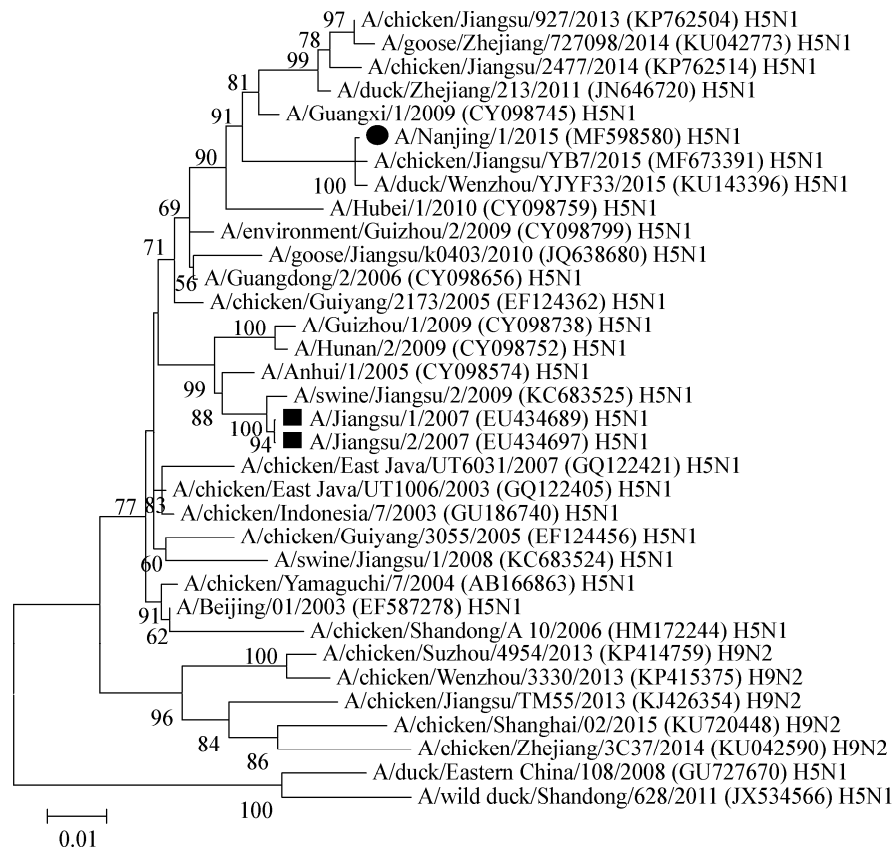
D



E



F



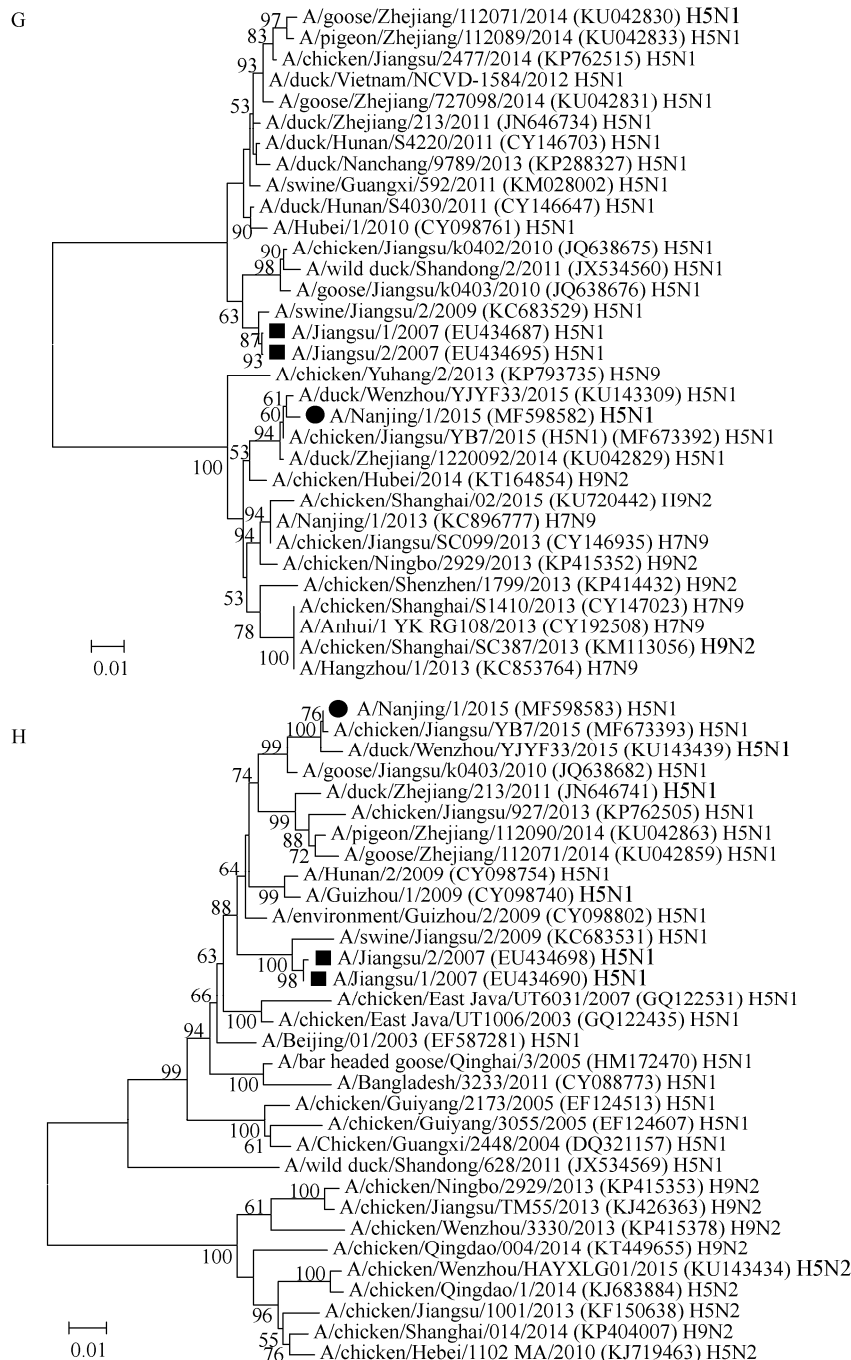


图 1 A/Nanjing/1/2015 病毒基因系统进化树

Figure 1 Phylogenetic trees of A/Nanjing/1/2015 virus

注: A: HA; B: NA; C: PB2; D: PB1; E: PA; F: NP; G: M; H: NS. “●”标注的为本研究中的 A/Nanjing/1/2015 病毒; “■”标注的为 2007 年江苏分离到的两株人感染 H5N1 毒株; “▲”为 H5 亚型 2.3.2.1c 家系的疫苗株; 括号内为 GenBank 序列号, 疫苗株为 GISAID 数据库序列号; 分支节点上的数字表示构建系统树时在 1 000 次计算中推算出此节点的百分比; 标尺长度代表进化距离。
Note: A: HA; B: NA; C: PB2; D: PB1; E: PA; F: NP; G: M; H: NS. “●” indicates the present strain A/Nanjing/1/2015; “■” indicates the H5N1 strains isolated from Jiangsu in 2007; “▲” indicates the vaccine strain of H5 subtype clade 2.3.2.1c; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers, and the vaccine strain accession number was obtained from GISAID database; The bootstrap values (%) located on the nodes are inferred from 1 000 replications; The scale bars indicate the evolutionary distance.

病毒株 Strains	裂解位点 Cleavage site												家系 Clade
	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	↓	G	
A/Goose/Guangdong/1/96													0
A/Duck/Hunan/127/2005	-	-	.	.	.	2.3.1
A/chicken/Guiyang/3055/2005	-	-	.	.	.	2.3.3
A/Jiangsu/1/2007	.	L	-	-	.	.	.	2.3.4
A/Jiangsu/2/2007	.	L	-	-	.	.	.	2.3.4
A/swine/Jiangsu/2/2009	.	L	-	-	.	.	.	2.3.4
A/duck/Hunan/S4030/2011	-	-	.	.	.	2.3.2.1a
A/Hubei/1/2010	-	-	.	.	.	2.3.2.1a
A/duck/Nanchang/9789/2013	.	.	I	R	2.3.2.1b
A/duck/Zhejiang/213/2011	.	.	I	R	2.3.2.1b
A/chicken/Jiangsu/2477/2014	-	-	.	.	.	2.3.2.1c
A/goose/Jiangsu/k0403/2010	-	-	.	.	.	2.3.2.1c
A/pigeon/Zhejiang/727097/2014	-	-	.	.	.	2.3.2.1c
A/duck/Vietnam/NCVD-1584/2012	-	-	.	.	.	2.3.2.1c
A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015	-	-	.	.	.	2.3.2.1c
A/Nanjing/1/2015	-	-	.	.	.	2.3.2.1c

图 2 不同进化支 H5N1 病毒 HA 裂解位点比较
Figure 2 Comparison of HA protein cleavage sites of H5N1 in different clades

注：“.”表明该位点上的氨基酸与 A/Goose/Guangdong/1/96 一致；“-”表明与 A/Goose/Guangdong/1/96 相比该位点上的氨基酸缺失。
Note: “.” indicates that the amino acid in the present position is consistent with A/Goose/Guangdong/1/96; “-” indicates the deletion of amino acid in the present position compared with A/Goose/Guangdong/1/96.

T188I、R189T、I282V)，提示其相对于疫苗株来说已经发生了较大的进化和变异(图 3)。

2.3 神经氨酸酶 NA 蛋白中氨基酸位点对致病性和传播性的影响

NA 蛋白颈部的长度与病毒的传播和致病力相关。A/Nanjing/1/2015 病毒的 NA 蛋白颈部在 49–68 位缺失 20 个氨基酸，更易于表现出高致病性^[9,14]。在 NA 蛋白中出现了神经氨酸酶类抗病毒药物耐药性突变 H274Y^[15]。其他常见的耐药位点中，116 位为 V，150 位为 K，222 位为 I，并未发生突变。

2.4 其他蛋白重要氨基酸位点分析

禽流感病毒内部基因的某些关键位点对病毒

的致病性、传播能力和耐药性也有着重要影响。在 A/Nanjing/1/2015 病毒的 PB2 蛋白中，第 627 位氨基酸为 E，未发生突变，但是 PB2 蛋白中出现了 L89V、G309D、T339K、R477G 和 I495V 置换；PB1 蛋白第 598 位出现 P→L 突变，622 位出现 S→G 突变；NS1 蛋白中 80–84 位的氨基酸缺失，同时存在 P42S 置换；M1 蛋白中出现 N30D 和 T215A 突变。这些突变均能在一定程度上增强病毒的毒力和致病性(表 1)。此外，NS1 蛋白中第 149 位为丙氨酸时提示该病毒拮抗干扰素生成的能力较强；M2 蛋白第 31 位氨基酸为 S，未发生耐药突变。

Strain												Clade
A/Goose/Guangdong/1/96	DQICIGYHAN	NSTIEQVDTIM	EKNVTYTHAQ	DILEKTHNGK	LCDLNGVKPL	ILRDCSVAGW	LLGNPMCDEF	INVPEWSYIV	EKASPANDLC	YPGDFNDYEE	[100]	0
A/Jiangsu/1/2007					D				N	N	[100]	2.3.4
A/swine/Jiangsu/2/2009					D				N	N	[100]	2.3.4
A/Duck/Hunan/127/2005					D				N.V	N	[100]	2.3.1
A/chicken/Guiyang/3055/2005					D				N	N	[100]	2.3.3
A/Hubei/1/2010	H					K			N	N	[100]	2.3.2 1a
A/duck/Nanchang/9789/2013	H					K		D	TN	S	[100]	2.3.2 1b
A/chicken/Jiangsu/2477/2014	H					K		L	T	S	[100]	2.3.2 1c
A/goose/Jiangsu/k0403/2010	H					K		L	N	N	[100]	2.3.2 1c
A/duck/Vietnam/NCVD-1584/2012	H					K		L	T	N	[100]	2.3.2 1c
A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015	H					K		W	N.V.G	N	[100]	2.3.2 1c
A/Nanjing/1/2015	H					K		W	N.V.G	N	[100]	2.3.2 1c
A/Goose/Guangdong/1/96	LKHLLSRTNH	FEKIQIPKS	SWSNHDASSG	YSSACPYHGR	SSFFRNVVWL	IKKNSAYPTI	KRSYNNINQE	DLLVLWGIHH	PNDAAEQTKL	YQNPTTIVISV	[200]	0
A/Jiangsu/1/2007	I		D.E		Q.T.P	NT		N.I	S	I	[200]	2.3.4
A/swine/Jiangsu/2/2009	I		D.E		Q.T.P	NT		N	S	I	[200]	2.3.4
A/Duck/Hunan/127/2005	I		D.E		Q.K	N	I		RI		[200]	2.3.1
A/chicken/Guiyang/3055/2005	I		D.E		Q.K	N					[200]	2.3.3
A/Hubei/1/2010	I	N	D.E.L	A.S.Q.K		DN	KG		E	R	[200]	2.3.2 1a
A/duck/Nanchang/9789/2013	I	R.QD	PD.E.L	A.S.Q.N		L.D.I	TK	K	I	IR	[200]	2.3.2 1b
A/chicken/Jiangsu/2477/2014	I		D.E.L	A.S.Q.N		DN	KG	R	I	E	[200]	2.3.2 1c
A/goose/Jiangsu/k0403/2010	I		D.E.L	A.S.Q.N	P	DN	I	KG		R	[200]	2.3.2 1c
A/duck/Vietnam/NCVD-1584/2012	I		D.E.L	A.S.Q.N		DN		KG	R	I	[200]	2.3.2 1c
A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015	I		D	D.E.M	A.S.Q.K		DT	Y	R	K	[200]	2.3.2 1c
A/Nanjing/1/2015	I		D	D.E.K	G.A.S.Q.K		DT	KD	R	K	[200]	2.3.2 1c
A/Goose/Guangdong/1/96	GISTLNQLRV	PEIATRPKVN	QSGSRMEFFW	TILKPNDAIN	FESNGNFIAP	EYAYKIVKEG	DSAIMKSELE	YGNCNTEKQT	PMGAINSSMP	FHNHPLTIG	[300]	0
A/Jiangsu/1/2007		K.S		D			V		I		[300]	2.3.4
A/swine/Jiangsu/2/2009		K.S		D			V		I		[300]	2.3.4
A/Duck/Hunan/127/2005		K.S		D			V				[300]	2.3.1
A/chicken/Guiyang/3055/2005	I	K.S		D			V				[300]	2.3.3
A/Hubei/1/2010		K.S.I		ID	H		T.V	R	I		[300]	2.3.2 1a
A/duck/Nanchang/9789/2013		R.S		ID			T.R.V	S.R			[300]	2.3.2 1b
A/chicken/Jiangsu/2499/2014		K.T.S.I		ID	H		T.R.V	R	I		[300]	2.3.2 1c
A/goose/Jiangsu/k0403/2010		K.S.I		ID	H		T.V	R	I		[300]	2.3.2 1c
A/duck/Vietnam/NCVD-1584/2012		K.S.I		ID	H		T.R.V	R	I		[300]	2.3.2 1c
A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015		K.S.I		ID	H		T.R.V	R	V		[300]	2.3.2 1c
A/Nanjing/1/2015		K.S.I		ID	H		T.R.V	R	V		[300]	2.3.2 1c
A/Goose/Guangdong/1/96	ECPKYVKSNR	LVLATGLRNT	PQRERRRKKR	GLFG							[334]	0
A/Jiangsu/1/2007		K		S.L	--						[334]	2.3.4
A/swine/Jiangsu/2/2009		K		S.L	--						[334]	2.3.4
A/Duck/Hunan/127/2005		K		S	--						[334]	2.3.1
A/chicken/Guiyang/3055/2005	DK		S	--							[334]	2.3.3
A/Hubei/1/2010		K		S	--						[334]	2.3.2 1a
A/duck/Nanchang/9789/2013		K		S	I.R						[334]	2.3.2 1b
A/chicken/Jiangsu/2477/2014		K		S	--						[334]	2.3.2 1c
A/goose/Jiangsu/K0403/2010		K		S	--						[334]	2.3.2 1c
A/duck/Vietnam/NCVD-1584/2012		K		S	--						[334]	2.3.2 1c
A/duck/Wenzhou/YJYF33/2015		K		S	--						[334]	2.3.2 1c
A/Nanjing/1/2015		K		S	--						[334]	2.3.2 1c

图 3 血凝素 HA1 蛋白氨基酸序列比对结果

Figure 3 Comparison of amino acids sequences in HA1 protein

注：灰色底纹表示关键性的氨基酸置换位点，下划线表示潜在糖基化位点。“.”表明该位点上的氨基酸与 A/Goose/Guangdong/1/96 一致；“--”表明与 A/Goose/Guangdong/1/96 相比该位点上的氨基酸缺失。

Note: Grey shade indicates the positions of key amino acids substitution; Underlines indicate the potential glycosylation sites. "." indicates that the amino acid in the present position is consistent with A/Goose/Guangdong/1/96; "--" indicates the deletion of amino acid in the present position compared with A/Goose/Guangdong/1/96.

3 讨论与结论

本研究采用高通量测序技术对一株人感染 H5N1 禽流感病毒 A/Nanjing/1/2015 进行全基因组测序。有研究显示，流感病毒在分离培养过程中，其关键性的氨基酸位点会发生选择性变异，子代病毒往往会丢失一些亲代病毒的特征或出现新的突变^[23-24]。因此在本研究中，用于测序的模板是患者痰液样本中直接提取的病毒核酸，病毒没有经过人

工的分离培养过程，能够更加直接准确地反映其遗传特点。

经测序分析，A/Nanjing/1/2015 病毒属于 H5 亚型禽流感病毒 2.3.2.1c 家系。H5 亚型禽流感病毒 2.3.2.1c 家系自 2009 年起在我国和日本、韩国等国家流行^[25]。2013 年该家系在北美首例人感染 H5N1 病毒中发现新的重组，其 PB2 基因片段来源于 H9N2 病毒，其余片段来源于 H5N1 病毒，此病

表 1 其他蛋白中影响 A/Nanjing/1/2015 病毒致病性和传播的重要氨基酸位点
Table 1 Important amino acid sites in other proteins affecting pathogenicity and transmission ability of A/Nanjing/1/2015 virus

蛋白 Protein	关键位点 Key sites	作用 Function
PB2	L89V	增强聚合酶活性和病毒毒力 ^[16]
	G309D	Enhancing polymerase activity and virus virulence ^[16]
	T339K	
	R477G	
	I495V	
PB1	P598L	在没有发现 PB2 蛋白 E627K 突变的 H5N1 病毒中修复 PB2 在人类细胞中的聚合酶活性, 使其仍易于感染人类细胞 ^[17] Repairing the polymerase activity of H5N1 PB2 protein without E627K mutations in order to keep it easy to infect human cells ^[17]
NS1	S622G	增强病毒致病性 ^[18] Enhancing the pathogenicity of the virus ^[18]
	P42S	增强病毒毒力 ^[19-20] Increasing virus virulence ^[19-20]
	80-84 deletion	
M1	149A	149 位为丙氨酸的重组病毒拮抗干扰素生成的能力较强 ^[21] Recombinant viruses with 149A have a strong ability to antagonize interferon production ^[21]
		这两者的累加效应是 H5N1 病毒对哺乳动物高致病力所必需 ^[22]
	N30D T215A	The cumulative effect of the two mutations is necessary for H5N1 virus to be highly pathogenic to mammals ^[22]

患者发病前曾到过中国旅游^[26]。随后, 这一新的重组病毒在中国山东株和河南三门峡野鸟疫情中均被检测到^[27]。随着鸟类迁徙, 该病毒在中国、亚洲其他国家、西非以及欧洲的野鸟及家禽中被传播, 并在印度的家禽中引起了数次禽流感的暴发, 提示这一亚型的 H5N1 病毒传播广泛, 致病力较强。本研究中的 A/Nanjing/1/2015 病毒 8 个片段均来自于江浙地区的 H5N1 病毒, 但在其 PB2 树图中仍可看到, 该片段与 2013-2014 年间江浙地区 H9N2 病毒 PB2 片段的同源性很高, 高度提示这一病毒的 PB2 片段初始来源可能为 H9N2 病毒, 并且这一重组病毒已成为江浙地区禽类中流行的主要病毒类型。

在禽流感病毒中, HA 蛋白受体结合部位 (Receptor-binding site, RBS) 的氨基酸序列对病毒的宿主特异性、致病力、复制能力和传播能力有着重要的影响。H5N1 禽流感病毒的 RBS 由 3 个二级结构元件组成: 190 螺旋(184-196)、130 环(129-133)和 220 环(217-224)^[28], 其中位于 220 环的两个重要突变 Q222L 和 G224S 是禽流感病毒能够跨种传播感染哺乳动物的关键性因素^[29]。对

A/Nanjing/1/2015 病毒的分子特征分析表明, 该病毒 HA 蛋白中受体结合决定性位点 Q222 和 G224 没有发生突变, 仍保持着与禽类唾液酸 α -2,3 型受体结合的特点。但是, 该病毒同时出现了 D94N、S133A 和 T188I 的氨基酸置换, 其中 D94N 可以降低病毒对禽类唾液酸 α -2,3 型受体的亲和性而增强对人型唾液酸 α -2,6 半乳糖受体的结合^[11], 而 S133A 和 T188I 的双位点突变也能使病毒对唾液酸 α -2,6 半乳糖受体的亲和性增强^[12], 从而增强病毒从禽类向人传播的能力。此外, 在病毒 HA1 氨基酸序列中还存在 6 个 N 型糖基化位点。糖基化是病毒可以逃脱宿主免疫的一个重要方式, 它能够帮助病毒遮蔽抗原表位、抑制宿主的体液免疫应答, 从而使病毒逃避宿主免疫系统的识别和清理^[30]。

另一个禽流感病毒跨种传播的决定性突变, 位于 PB2 蛋白中的 E627K, 在 A/Nanjing/1/2015 病毒中也未被发现。有研究表明, H5N1 病毒 PB1 蛋白中的 P598L 置换可以在未出现 E627K 突变的病毒株中增强病毒聚合酶的活性, 修复病毒在人类细胞中的复制能力, 使之仍然易于感染人类

细胞并增殖^[17]。A/Nanjing/1/2015 病毒 PB1 蛋白中存在 P598L 置换,增强了该毒株感染人类的致病力。同时, PB1 蛋白中的 S622G 位点, PB2 蛋白中的 L89V、G309D、T339K、R477G 和 I495V 突变, NS1 蛋白中的 P42S 置换和 80–84 位的氨基酸缺失以及 M1 蛋白中的 N30D 和 T215A 置换,这些突变均被报道可以在一定程度上增强病毒的毒力和致病性,提高了该病毒从禽类传播给人的概率。

在对 A/Nanjing/1/2015 病毒耐药位点的分析中发现, NA 蛋白中存在神经氨酸酶抑制剂类抗病毒药物关键的耐药性突变 H274Y,说明病毒已对奥司他韦产生耐药^[15]。不过, M2 蛋白第 31 位氨基酸仍为 S,未发生耐药突变,提示该病毒对 M2 离子通道抑制剂类抗病毒药物金刚烷胺仍然敏感^[31]。

自 1997 年 H5N1 禽流感病毒感染人以来,该亚型一直在通过重配来进行活跃的基因进化。H5 基因片段会与多个不同的 NA 片段进行重配组合,产生不同亚型的多种禽流感病毒,如 H5N2、H5N5、H5N6 和 H5N8 等,在禽鸟中广泛传播^[32]。自人感染 H5N1 以来,2014 年 5 月四川又出现了全球第一例人感染 H5N6 病例,随后在广东、福建、江西等地散发现 H5N6 感染病例,病死率高达 50%^[6]。卫生部门对活禽养殖、屠宰及交易等场所的外环境禽流感病毒监测发现, H5 亚型长期存在于活禽体内和禽类环境中,并存在多种 NA 亚型的组合,如 H5N1、H5N6 等^[7]。这些病毒常会在养殖家禽中引起大规模的疫情,仅 2015 年农业部就报告了 30 多起 H5N6 疫情。虽然近年来国家已在家禽养殖业中开展禽流感疫苗注射,但禽流感疫情仍是家禽养殖的巨大威胁,如 2018 年 11 月扬州家禽 H5N6 高致病性禽流感疫情^[33]、2019 年 2 月辽宁新民家禽 H5N1 禽流感疫情^[34]、2019 年 5 月新疆霍尔果斯市家禽 H5N6 亚型禽流感疫情^[35]等,扑杀家禽均以万计。家禽携带病毒的增多,在一定程度上加大了病毒跨种传播给人类的风险。因此,有必要持续

强化对外环境中禽流感病毒的监测,加强对禽流感病毒分子进化趋势的分析和动态监测,及早发现新的重组型别,及时提出流行预警,为防控策略的制定提供依据。

REFERENCES

- [1] Xu XY, Subbarao, Cox NJ, et al. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong[J]. *Virology*, 1999, 261(1): 15-19
- [2] Claas ECJ, de Jong JC, van Beek R, et al. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection[J]. *Vaccine*, 1998, 16(9/10): 977-978
- [3] Dhingra MS, Artois J, Robinson TP, et al. Global mapping of highly pathogenic avian influenza H5N1 and H5Nx clade 2.3.4.4 viruses with spatial cross-validation[J]. *eLife*, 2016, 5: e19571
- [4] WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2019[EB/OL]. (2019-06-24). https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2019_06_24_tableH5N1.pdf?ua=1
- [5] Yu HJ, Shu YL, Hu SX, et al. The first confirmed human case of avian influenza A (H5N1) in Mainland China[J]. *The Lancet*, 2006, 367(9504): 84
- [6] Wan XF, Dong LB, Lan Y, et al. Indications that live poultry markets are a major source of human H5N1 influenza virus infection in China[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(24): 13432-13438
- [7] Wang H, Feng ZJ, Shu YL, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China[J]. *The Lancet*, 2008, 371(9622): 1427-1434
- [8] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Archives of Virology*, 2001, 146(12): 2275-2289
- [9] Xu XL, Bao HM, Chen HL, et al. Research progress on key amino acid sites affecting pathogenicity and transmission of avian influenza virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(2): 165-168 (in Chinese)
徐晓龙, 包红梅, 陈化兰, 等. 影响禽流感病毒致病性和传播的关键氨基酸位点的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(2): 165-168
- [10] Zhou JF, Wang DY, Gao RB, et al. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 500-503
- [11] Su Y, Yang HY, Zhang BJ, et al. Analysis of a point mutation in H5N1 avian influenza virus hemagglutinin in relation to virus entry into live mammalian cells[J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(12): 2253-2261
- [12] Yang ZY, Wei CJ, Kong WP, et al. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity[J]. *Science*, 2007, 317(5839): 825-828
- [13] Wu CL, Lu X, Wang X, et al. Clinical symptoms, immune factors, and molecular characteristics of an adult male in

- Shenzhen, China infected with influenza virus H5N1[J]. *Journal of Medical Virology*, 2013, 85(5): 760-768
- [14] Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. *Nature*, 2004, 430(6996): 209-213
- [15] Yusuf M, Mohamed N, Mohamad S, et al. H274Y's effect on oseltamivir resistance: what happens before the drug enters the binding site[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2016, 56(1): 82-100
- [16] Li JW, Ishaq M, Prudence M, et al. Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2[J]. *Virus Research*, 2009, 144(1/2): 123-129
- [17] Xu C, Hu WB, Xu K, et al. Amino acids 473V and 598P of PB1 from an avian-origin influenza A virus contribute to polymerase activity, especially in mammalian cells[J]. *Journal of General Virology*, 2012, 93(3): 531-540
- [18] Feng XX, Wang Z, Shi JZ, et al. Glycine at position 622 in PB1 contributes to the virulence of H5N1 avian influenza virus in mice[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(4): 1872-1879
- [19] Jiao PR, Tian GB, Li YB, et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(3): 1146-1154
- [20] Trapp S, Soubieux D, Marty H, et al. Shortening the unstructured, interdomain region of the non-structural protein NS1 of an avian H1N1 influenza virus increases its replication and pathogenicity in chickens[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(6): 1233-1243
- [21] Li ZJ, Jiang YP, Jiao PR, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(22): 11115-11123
- [22] Fan SH, Deng GH, Song JS, 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
- [23] Takemae N, Ruttanapumma R, Parchariyanon S, et al. Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs[J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91(4): 938-948
- [24] Gambaryan AS, Robertson JS, Matrosovich MN. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses[J]. *Virology*, 1999, 258(2): 232-239
- [25] Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, et al. Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in the 2010-2011 winter season in Japan[J]. *Journal of General Virology*, 2012, 93(3): 541-550
- [26] Pabbaraju K, Tellier R, Wong S, et al. Full-genome analysis of avian influenza A (H5N1) virus from a human, North America, 2013[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(5): 887-891
- [27] Wang HM, Chen ZQ, Zhang ZJ, et al. Continuing spread and evolution of clade 2.3.2.1c H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in China[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2016, 11(2): 97-102, 115 (in Chinese)
王海明, 陈占强, 张振杰, 等. 2.3.2.1c 家系 H5N1 禽流感病毒在我国的持续传播与进化[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(2): 97-102, 115
- [28] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 531-569
- [29] Herfst S, Schrauwen EJA, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1534-1541
- [30] Abe Y, Takashita E, Sugawara K, et al. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(18): 9605-9611
- [31] Wang J, Wu YB, Ma CL, et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(4): 1315-1320
- [32] Jung MA, Nelson DI. Outbreaks of avian influenza A (H5N2), (H5N8), and (H5N1) among birds—United States, December 2014–January 2015[J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2015, 64(4): 111
- [33] Sina Jiangsu. An epidemic of H5N6 highly pathogenic avian influenza occurred in Yangzhou and more than 30,000 poultry were culled [EB/OL]. (2018-11-23). <http://news.sina.com.cn/c/2018-11-23/doc-ihpevhck2514268.shtml> (in Chinese)
新浪江苏. 扬州发生 H5N6 亚型高致病性禽流感疫情 三万余家禽被扑杀[EB/OL]. (2018-11-23). <http://news.sina.com.cn/c/2018-11-23/doc-ihpevhck2514268.shtml>
- [34] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. An outbreak of highly pathogenic H5N1 avian influenza in poultry occurred in Xinmin city, Liaoning Province[EB/OL]. (2019-04-02). http://www.moa.gov.cn/gk/yjgl_1/yqfb/201904/t20190402_6177777.htm (in Chinese)
中华人民共和国农业农村部. 辽宁省新民市发生一起家禽 H5N1 高致病性禽流感疫情[EB/OL]. (2019-04-02). http://www.moa.gov.cn/gk/yjgl_1/yqfb/201904/t20190402_6177777.htm
- [35] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. An outbreak of highly pathogenic H5N6 avian influenza in poultry occurred in Horgos, Xinjiang[EB/OL]. (2019-05-30). http://www.moa.gov.cn/gk/yjgl_1/yqfb/201906/t20190603_6316030.htm (in Chinese)
中华人民共和国农业农村部. 新疆霍尔果斯市发生一起家禽 H5N6 亚型高致病性禽流感疫情[EB/OL]. (2019-05-30). http://www.moa.gov.cn/gk/yjgl_1/yqfb/201906/t20190603_6316030.htm