

禽流感病毒跨种属感染人的机制研究进展*

李 靖 刘伯华 祝庆余**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要: 禽流感病毒 (avian influenza virus, 简称 AIV) 不仅引起禽类感染和流行, 而且可以打破种属屏障 (species barrier)、引起人或其他哺乳动物感染和传播。近年来对人呼吸道抗禽流感病毒感染的非特异屏障机制、禽流感病毒对人感染的机制研究不断取得新的进展。

关键词: 禽流感病毒, 种属屏障, 跨种属感染机制

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0121-04

Advance in Research into the Infection of Avian Influenza Virus in Humans Crossing the Species Barrier*

LI Jing LIU Bo-Hua ZHU Qing-Yu**

(Institute of Microbiology and Epidemiology, AMMS, Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing 100071)

Abstract: avian influenza virus (AIV) can not only infect avian and cause pandemics, but also result infection and initiate pandemics in humans and other mammal animals, crossing the species barrier. There have been some advance in research into the nonspecific species barrier of human respiratory tract against AIV infection and the mechanism of the infection of AIV in humans in recent years.

Key words: Avian influenza virus (AIV), Species barrier, Mechanism of interspecies infection

禽流感病毒 (AIV) 属于正粘病毒科流感病毒属甲 (A) 型流感病毒, 它是一种有包膜、单股负链、分节段 RNA 病毒。迄今为止, 所发现的甲型流感病毒的 15 个 HA (hemagglutinin, 血凝素) 亚型和 9 个 NA (neuraminidase, 神经氨酸酶) 亚型均可以从禽类分离到。多数 AIV 对禽类和其它动物不致病; 主要对家禽有致病作用的有 H5 及 H7 两个 HA 亚型^[1]。但是, 近几年来不断有 AIV 直接感染人的报道: 在 1997 年香港发生由 H5N1 病毒引起的家禽和人流感局部暴发流行中, 共有 18 例患者罹患禽流感, 其中 6 例死亡^[2]; 2003 年, 荷兰一位兽医因感染高致病性禽流感病毒 H7N7 出现急性呼吸抑制综合征而死亡^[3]; 根据世界卫生组织官方报道, 2003 年到 2004 年在越南、泰国、柬埔寨等亚洲国家相继爆发禽流感, 累计感染病例 34 人, 23 人死亡; 无论从波及范围还是感染人数上讲, 这次禽流感在人群中的流行是近年来最为严重的一次。AIV 对人的直接感染引起了人们对禽流感的高度重视, AIV 对人的感染、尤其是呼吸道的感染受到国内外学者的广泛关注, 并进行了大量研究。

* 国家科技攻关计划资助项目 (No. 2004BA519A31)

Project Granted by Key Technologies R&D Programme (No. 2004BA519A31)

** 通讯作者 Tel: 010-66948624, E-mail: qingyuzh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-08-16, 修回日期: 2004-09-27

1 人呼吸道抗 AIV 感染的非特异种属屏障

一般来说, AIV (包括那些在禽类中具有高致病性的分离株) 很难感染人类、在人类体内有效复制而引起疾病^[2], 因为人与其它哺乳动物有抵御 AIV 感染的种属屏障。

1.1 受体特异性的限制 AIV 对人呼吸道上皮细胞亲嗜性和人流感病毒相似, 主要经病毒体表面包膜蛋白 HA 与呼吸道上皮细胞表面含唾液酸的糖蛋白或糖脂特异性识别、结合而侵袭人的呼吸道; 但两者所识别受体糖蛋白的唾液酸类型不同。Connor R J 等用含 α -2-6 连接的末端唾液酸半乳糖基的人红细胞和含 α -2-3 连接的末端唾液酸半乳糖基的人红细胞进行的血凝和血凝抑制试验发现, 人流感病毒分离株可凝集含 α -2-6 连接的末端唾液酸半乳糖基的人红细胞, 而 AIV 分离株凝集含 α -2-3 连接的末端唾液酸半乳糖基的人红细胞。Matrosovich M N 等通过组织化学染色 (地高辛标记的 MAA 特异结合 α -2-3 连接唾液酸 20 μ g/mL), 地高辛标记的 SNA (特异结合 α -2-6 连接唾液酸 4 μ g/mL) 分析发现, 这两种糖蛋白在人呼吸道上皮皆有表达, 但是, α -2-6 连接唾液酸糖蛋白表达量明显多于 α -2-3 连接唾液酸糖蛋白^[5]。这样, 低密度的 AIV 受体分布使 AIV 颗粒难以感染人呼吸道上皮。

1.2 粘液、SP (表面活性相关蛋白) 等呼吸道和肺泡内分泌物对 AIV 感染的特异性或非特异性抑制作用 在人呼吸道上皮表面覆盖一层粘液, 不仅对吸入呼吸道的尘埃、细菌等微生物有物理阻挡和排除的屏障作用; 而且这种粘液中的一种富含 α -2-3 连接唾液酸的糖蛋白可与禽流感病毒表面 HA 膜蛋白特异地结合而中和病毒的感染力^[5,6]。另外, 在肺泡表面覆盖的液体中含有的 SP 也是一种富含唾液酸的多糖, 有 A、B、C、D 4 型; 其中, SP-A 和 SP-D 能抑制 A 型流感病毒 (包括 AIV) 血凝特性和感染力^[7,8]。这种特异性或非特异性的液体屏障降低了可能吸入呼吸道内的 AIV 的感染上皮细胞的机率。

1.3 禽流感病毒在人呼吸道上皮细胞内复制和播散能力低下 AIV 对人呼吸道上皮的组织亲嗜性不仅取决于细胞表面的受体分布, 还取决于病毒在人呼吸道上皮细胞内的复制和传播能力。病毒在宿主细胞内的复制和细胞间传播是其感染的前提条件之一。Matrosovich M N 等通过流感病毒和唾液酸双染色发现, 人流感病毒首先感染呼吸道上皮的非纤毛细胞, 在感染非纤毛细胞 24h 后, 在非纤毛上皮细胞和纤毛上皮细胞内都有大量的子代病毒颗粒; 而 AIV 首先感染呼吸道上皮的纤毛细胞, 感染纤毛细胞 24h 后, 子代 AIV 只在感染的纤毛上皮细胞内少量出现^[5]。这说明, 与人流感病毒相比, AIV 在人呼吸道上皮内复制和传播能力明显低下; 这可能是由于人呼吸道上皮细胞内酶谱、蛋白质合成及细胞代谢不适合 AIV 的复制。

2 AIV 对人呼吸道的感染机制

虽然人体有多种机制抵御 AIV 的感染, 但 AIV 在动物宿主中不断进化可以产生强感染性、高致病性的毒株; 这些新的毒株在与人群密切接触时就有可能打破种属屏障, 主要经呼吸道侵入人体引起感染; 禽流感病毒在体内复制、扩散, 不仅可以直接损伤组织、细胞, 而且可能诱导机体免疫系统产生病理性免疫反应、间接地导致机体组织、

细胞产生病理损伤。

2.1 病原学 流感病毒基因变异率很高。尤其是表面糖蛋白 HA 和 NA 不断进化而具有更高的识别唾液酸、膜融合或水解唾液酸活性, 达到 HA 与 NA 活性新的平衡, 从而具有更强的感染力、复制力^[9]。AIV 的 HA0 (血凝素前体) 合成后被宿主细胞内一种叫成对碱性氨基酸蛋白酶 (弗林蛋白酶) 切割成 HA1 和 HA2 两个多肽后才具有活性, 所以, 病毒 HA0 被切割的难易程度和这种切割蛋白酶在宿主内的分布是决定病毒细胞亲嗜性和在宿主体内系统播散能力的主要因素, 也是决定其对人致病性 (毒力) 的最重要因素。Subbarao K 等通过对 97 年香港禽流感流行中分离到的对人致病的 A/HongKong/156/97 基因序列和系统发生学分析发现: 与 A/Turkey/England/97 (H5N1, 对人不致病) 相比, HA 序列同源性达 93.5%, 在 HA1 与 HA2 之间的酶切位点有多个碱性氨基酸插入^[2]。另外, 有些学者发现 RNA 聚合酶成分 PB1 和 PB2 也可能与 AIV 对人的感染力有关。AIV 通过变异获得更高的感染力和致病力是其跨宿主感染人群的前提条件和最重要的因素; 而这种感染力和致病力的提高是通过病毒在禽类和其它动物宿主之间传播来实现的。因此, 监测和控制 AIV 在动物宿主群中的传染对预防人类感染 AIV 具有重要意义。

2.2 免疫学 AIV 通过变异和进化具备了侵入人体并在人体内有效复制的能力。病毒在人体内复制除了对人体细胞、组织直接产生形态结构和功能的损伤外, 还可以削弱或逃逸机体抗病毒免疫防御机制而形成感染或诱导免疫功能紊乱、引起病理性免疫反应, 间接地对机体产生损伤作用。Tumpey T M 等为研究 A/Hong Kong/483/97 (HK/483、对鼠有致死性) 与 A/Hong Kong/486/97 (HK/486、对鼠无致死性) 两株病毒对 BALB/c 鼠免疫系统的影响, 对分别感染 (鼻腔注射、100 MID50) 这两株病毒的 BALB/c 鼠进行了外周血细胞计数、细胞因子和趋化因子测定及流式细胞分析等检测。感染 HK483 的小鼠从注射后第 2d 出现淋巴细胞减少, 第 4d 淋巴细胞达最低值, 减少到注射前的 20%, 而且淋巴细胞计数一直没有恢复到原来水平; 感染 HK/486 的小鼠虽然也出现淋巴细胞减少, 但只减少到原来的 70% ~ 80%, 而且在注射后第 6d 恢复到原来水平。分别在感染后第 3、5、7d 用 ELISA 检测肺、脾中细胞因子与趋化因子, 感染 HK/483 的小鼠在感染后第 5 ~ 7d 肺和脾中 IL-1- β (β 型白介素 1) 和 IFN- γ (γ 型干扰素) 水平比感染 HK/486 的小鼠和感染 PR/8 (对照) 的小鼠显著降低^[10]。Cheung C Y 等做了 A/HongKong/486/97、A/HongKong/483/97 两株病毒对单核细胞细胞因子分泌的影响的体外细胞实验。他们先用这两株病毒和 H3N2、H1N1 病毒在体外感染人单核细胞来源的巨噬细胞, 然后用 cDNA 阵列和实时定量 PCR 技术检测细胞因子表达的差异并用 ELISA 检测方法对比巨噬细胞 TNF- α 等细胞因子分泌量。结果发现, 两株 H5N1/97 病毒比 H3N2 或 H1N1 病毒诱导巨噬细胞表达更多的前炎症细胞因子, 尤其是 TNF- α 和 IFN- β (β 型干扰素) 的表达量更多, 在感染这两株病毒的巨噬细胞培养液上清中的 TNF- α 浓度与大肠杆菌脂多糖诱导 (巨噬细胞) 产生的 TNF- α 浓度相当^[11]。这些动物实验和体外细胞实验资料一定程度上反映了 AIV 对动物和人体免疫系统作用的复杂性, 并为阐明 AIV 对人致病机制提供了一些线索。从这些实验结果可以推测, 对人致病性 AIV 感染人体后, 会导致人体免疫系统功能紊乱, 削弱机体免疫防御功能或

产生免疫病理反应,从而进一步加重 AIV 感染、合并细菌感染,并造成组织、器官病理损伤。

2.3 病理学 AIV 感染人体后,经多种方式和机制对机体产生损伤;病理学方面的变化可以直观地显示这种损伤导致机体形态学的改变、病变的性质及严重程度。To K F 等对 97 年禽流感流行中不幸患病并死亡的一位 13 岁的中国籍女孩和另一位 25 岁的菲律宾籍女性的尸体进行了病理学的观察分析:肺部大体解剖上发生了伴弥漫性出血和局部囊样变的肺实变;组织切片显示弥漫性肺泡损伤;间质纤维化、囊样变并有淋巴细胞、浆细胞及有吞噬活性的组织细胞浸润。骨髓中细胞增生减低、髓系细胞与红系细胞比例逆转,组织细胞肥大、吞噬活性增强,淋巴结吞噬血细胞作用增强,并有局部坏死。肝肾也有局部坏死、炎性细胞浸润。但是,在肺脏及其他脏器均没有分离和检测到 AIV 病毒颗粒^[12]。从以上实验结果可以看出,AIV 感染人体后可造成系统性损伤;这可能与病毒造成机体病理性免疫损伤有关。

3 结语

传统观点认为,AIV 不直接感染人,主要通过在中宿主(猪)体内与人流感病毒进行基因片段重组获得识别人流感病毒受体能力而对人致病。从最新的一些实验结果可以看出,人类呼吸道内也存在 AIV 的受体,而且,AIV 可以通过遗传变异不断提高受体结合能力,所以 AIV 可能能够直接感染人呼吸道;病毒以隐性感染或潜伏感染(两者都为非致病性感染形式)的形式感染易感人群(如禽场工作人员),然后在其体内进化而提高其复制能力并获得对人的致病性。通过对不同禽流感病毒株基因同源性比较和系统发生学分析和对不同毒株受体亲和力、复制能力的对比可以了解这种渐进的进化过程;通过对与禽类密切接触的人群血清禽流感病毒抗体检测可以确定禽流感病毒在人群中隐性感染或潜伏感染的存在与否。另外,病毒可以在其它宿主体内进化而直接获得对人的致病性。

参考文献

- [1] 金奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001. 633~690.
- [2] Subbarao K, Klimov A, Katz J, *et al.* *Science*, 1998, (279): 393~396.
- [3] Fouchier R A M, Schneeberge P M, Rozendaal F W, *et al.* *PNAS*, 2004, **101** (5): 1356~1361.
- [4] Connor R J, Kawaoka Y, Webster R G, *et al.* *Virology*, 1994, **205**: 17~23.
- [5] Matrosovich M N, Matrosovich T Y, Gray T, *et al.* *PNAS*, 2004, **101** (13): 4620~4624.
- [6] 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴, 等. 现代组织学. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003. 897~925.
- [7] Benne C A, Kraaijeveld C A, Strijp J A V, *et al.* *Infect Dis*, 1995, **171**: 335~341.
- [8] Hartshorn K L, White M R, Shepherd V, *et al.* *Am J Physiol*, 1997, **273**: L1156~L1166.
- [9] Wagner R, Matrosovich M, Klenk H D. *Rev Med Virol*, 2002, **12**: 159~166.
- [10] Tumpey T M, Lu X H, Morken T, *et al.* *Journal of Virology*, 2000, **74** (13): 6105~6116.
- [11] Cheung C Y, Poon L L M, Lau A S, *et al.* *The Lancet*, 2002, **360**: 1831~1837.
- [12] To K F, Chan P K S, Chan K F, *et al.* *Journal of Medical Virology*, 2001, **63**: 242~246.