

# 我国部分禽流感病毒 H5N1 之 HA 序列变异演化分析

张继荣<sup>①</sup> 雷富民<sup>②\*</sup>

(①宁夏医科大学基础学院 银川 750004; ②中国科学院动物研究所 北京 100101)

**摘要:** 从 GenBank 上获得我国人(*Homo sapiens*)、家禽和野鸟 42 株 H5N1 亚型禽流感病毒的 HA 基因核酸序列, 利用 DNASTar 分析 HA 蛋白关键位点氨基酸残基的变化, 比较 HA 基因核苷酸序列同源性, 构建遗传进化树。探讨我国部分人、家禽和野鸟 H5N1 病毒基因的遗传进化关系。序列分析结果表明: 禽流感病毒 H5N1 亚型的 HA 基因持续地发生着变异, 但并非以均一速度进行, 时间间隔愈长, 核苷酸同源性愈低; 我国同一地区或临近地区, 当年或前后两年发生的人及家禽感染的禽流感病毒高度同源。推测我国部分人发生的禽流感可能是通过家禽感染的; 候鸟的迁徙在传播病毒过程中所起的作用有待深入探讨。

**关键词:** 禽流感 H5N1 病毒; HA 基因; 变异

中图分类号: Q751 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)06-10-07

## Analysis of HA Gene's Variation and Evolution in Some Avian Influenza Viruses from China

ZHANG Ji Rong<sup>①</sup> LEI Fu Min<sup>②\*</sup>

(① Ningxia Medical University Basic Medical Science School, Yinchuan 750004;

② Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** After collecting the HA gene sequences of 42 strains of avian influenza viruses (AIV) H5N1 isolated from human (*Homo sapiens*), poultry and wild birds by searching the GenBank of NCBI, we analyzed the transformation of the amino acid residues at key sites and constructed the phylogenetic tree using DNASTar and compared the homology and evolutionary relationship of these HA genes. The results suggest that HA genes of these AIV H5N1 viruses varies persistently at different rates. Within the same area or neighboring areas in China, the nucleotides are more homologous in the same year or between the continuous two years, indicating that some human AIV diseases may have been caused by the H5N1 viruses infection from poultry. And more researches concerning the role of wild birds are needed.

**Key words:** Avian influenza H5N1; HA gene; Variation

由禽流感病毒引起的禽类感染和/或疾病综合症即为禽流感。1997 年香港首次发生高致病性禽流感病毒 H5N1 感染人类<sup>[1, 2]</sup>, 此后该亚型病毒引起我国多起疫情并造成多人死亡, 仅 2008 年第一季度就发生 3 例人感染病毒死亡事件\*\*。

禽流感病毒基因组的 8 个不同片段中编码

基金项目 中国科学院三期创新领域前沿项目 (No. KSCXZ YW-N-063), 国家科技部十一五平台课题 (No. 2006BAD06A01), 美国 NIH、USDA 以及加拿大 IDRC 的项目部分资助;

\* 通讯作者, E-mail: leifm@ioz.ac.cn;

第一作者介绍 张继荣, 女, 副教授; 研究方向: 人类健康与动物疫病; E-mail: zhangjr982@163.com.

\*\* <http://www.moh.gov.cn/meru/news/C602.htm>

收稿日期: 2008-05-19, 修回日期: 2008-09-05

血凝素 (hemagglutinin, HA) 的 HA 基因变异最大, 不同亚型或同一亚型的不同毒株之间 HA 基因序列存在明显差异<sup>[3]</sup>。HA 蛋白在决定病毒浸染宿主范围、受体结合特性、致病力强弱等方面起着关键作用。HA 基因变异可直接改变宿主的特异性<sup>[4]</sup>。H5N1 亚型强毒力和快速变异的特性对人类的生命已经产生了巨大的威胁。本文选取已登录公布的我国部分人感染禽流感 H5N1 病毒的 HA 基因序列, 与其发生有时间、地域相关性的家禽和野鸟的 HA 基因序列进行进化关系研究, 分析我国部分人发生高致病性禽流感的可能渊源及 HA 基因序列变异进化的

特点, 以便为人禽流感防控工作提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 材料 通过 Internet 登陆美国国立生物技术信息中心 (NCBI), 查询已公布的禽流感 H5N1 病毒 HA 核酸序列, 搜索已公布的我国 (包括香港) 自 1997 年至目前所有人感染禽流感 H5N1 病毒的 HA 基因序列 (14 条); 以及与上述发生感染的人所在地、所在时段有关联性的部分野鸟、家禽感染的 H5N1 病毒 HA 基因序列 (28 条), 所选 H5N1 病毒 HA 基因序列的宿主来源、病毒发现地、时间等信息列于表 1。

表 1 研究选用 H5N1 亚型禽流感病毒株种类、来源\*

Table 1 The types and origins of the H5N1 avian influenza subtype used in the research

登录号 Accession	病毒宿主/地点/时间 Organism/ Location/ Time	登录号 Accession	宿主宿主/地点/时间 Organism/ Location/ Time	登录号 Accession	宿主宿主/地点/时间 Organism/ Location/ Time
NC_00736	A/Goose/Guangdong/1/96	DQ095618	A/Bar headed Goose/QH/6/2005	DQ842489	A/Guangzhou/1/2006
AF036356	A/HK/156/97	DQ320921	A/migratory duck/JX/2300/2005	DQ992841	A/chicken/HK/947/2006
AF364334	A/Goose/Guangdong/3/97	DQ366338	A/duck/Guangxi/13/2004	DQ993117	A/Goose/Guangxi/532/2006
AF509023	A/Pigeon/HK/SF215/2001	DQ371928	A/Anhui/1/2005	DQ997182	A/chicken/Jiangsu/cz/2002
AY575869	A/HK/212/2003	DQ371929	A/Anhui/2/2005	DQ997218	A/mallard/Guangxi/w/2004
AY585360	A/duck/Guangdong/01/2001	DQ371930	A/Guangxi/1/2005	DQ997410	A/duck/Zhejiang/bj/2002
AY585362	A/duck/Guangdong/22/2002	DQ520855	A/chicken/Zhejiang/24/2005	DQ997513	A/duck/Guangxi/xs/2001
AY585363	A/duck/Guangxi/07/1999	DQ643809	A/human/Zhejiang/16/2006	EF137706	A/Shenzhen/406H/2006
AY585374	A/duck/Guangdong/40/2000	DQ822563	A/Bar headed Goose/QH/F/2006	EF587277	A/Beijing/01/2003
AY585377	A/duck/Zhejiang/52/2000	DQ835313	A/China/GD01/2006	EF624256	A/China/2006
AY651361	A/tree sparrow/HK/864/2002	DQ842487	A/goose/Guangzhou/471/2006	EU263353	A/duck/Guangxi/27/2003
AY737296	A/chicken/GD/178/2004	DQ992734	A/chicken/Guangxi/4989/2005	EU263981	A/human/China/GD02/2006
AY950235	A/WD/Guangdong/314/2004	DQ992839	A/common magpie/HK/645/2006	EU434686	A/Jiangsu/1/2007
DQ320924	A/grey heron/HK/837/2004	AY651373	A/black headed gull/HK/12.1/2003	EU434694	A/Jiangsu/2/2007

\* 流感病毒命名规则为: 流感病毒类型/宿主名称/病毒发现地名/编号/时间, 宿主如为人则不写或写 human。

\* The rules of naming influenza virus are type/host/site of discovery/serial number/time. If the host is a human then the host will be left blank or written as human.

Goose: 鹅 *Anser* sp.; Pigeon: 鸽子 *Columba* sp.; duck: 鸭 *Anatidae*; tree sparrow: 树麻雀 *Passer montanus*; black headed gull: 红嘴鸥 *Larus ridibundus*; chicken: 鸡 *Gallus gallus*; WD: Wild Duck 野鸭 *Anas* sp.; Bar-headed Goose: 斑头雁 *Anser indicus*; migratory duck: 迁徙鸭 *Anatidae*; common magpie: 喜鹊 *Pica pica*; mallard: 绿头鸭 *Anas platyrhynchos*; grey heron: 苍鹭 *Ardea cinerea*; human: 人 *Homo sapiens*. HK: Hong Kong; JX: Jiangxi; GD: Guangdong; QH: Qinghai.

1.2 方法 用 DNASTar 7.1 软件包中的 Editseq 和 MegAlign 软件对所选样本的 HA 核苷酸序列进行编辑, 逐一比对, 并翻译出 HA 糖蛋白氨基酸序列, 比较 HA 裂解位点插入的碱性氨基酸、糖基化位点及受体特异性; 然后用 Clustal W Method (软件默认参数) 对所选的 HA 核苷酸和

推导的氨基酸序列进行同源性比较, 绘制基于 HA 基因核苷酸序列的遗传进化树状图, 并进行分析。

## 2 结果

### 2.1 H5N1 受体结合位点氨基酸序列 禽流感

病毒 HA 受体结合位点氨基酸残基高度保守, 决定受体特异性的氨基酸位点主要为 HA1 的 226Gln, 227Ser, 228Gly (以人 H3 亚型流感病毒的 HA 蛋白氨基酸序列作为参照), 即 QSG 氨基酸序列<sup>5,6</sup>。比较所选样本的氨基酸序列, 其中, A/HK/212/2003 在其受体结合区的氨基酸残基为 QNG, A/Anhui/2/2005 的为 RSG, 其余样本均为 QSG 氨基酸残基。

**2.2 糖基化位点** 表 1 所列样本中, 2005~2007 年间人、家禽 H5N1 病毒样本的糖基化位点共 7 个, 均为 NST/NVT/NNT/NNT/NPT/NSS/NGT。1996~2004 年期间, 只有 A/Beijing/01/2003 的糖基化位点与上述位点相同; A/Pigeon/HK/SF215/2001、A/chicken/Jiangsu/cz1/2002、A/WD/Guangdong/314/2004 和 A/mallard/Guangxi/wt/2004 均有 NST/NVT/NST/NNT/NPT/NSS/NGT 7 个糖基

化位点, 但其第三个糖基化位点的氨基酸残基为 NST, 不同于 2005~2007 年的 NNT; A/duck/Guangxi/27/2003 为 NST/NVT/NNT/NPT/NSS/NGT, 较 2005~2007 年样本少一个糖基化位点 (NNT), 且第四位点氨基酸有所不同; 其余 1996~2004 年间的样本均为 NST/NVT/NNT/NPT/NSS/NGT, 较 2005~2007 年样本少一个糖基化位点 (NNT)。

**2.3 裂解位点碱性氨基酸序列** 禽流感病毒的 HA 蛋白由 HA1 和 HA2 两部分组成。病毒感染宿主时, 需将 HA1 和 HA2 裂解, 裂解开的 HA2 能够融合宿主细胞膜形成通道, 使病毒核酸得以侵入宿主细胞。HA1 和 HA2 裂解的难易与裂解位点插入的碱性氨基酸密切相关。比较表 1 中各样本裂解位点插入的氨基酸序列, 发现有表 2 中的特点。

表 2 研究选用 H5N1 病毒 HA 裂解位点附近的碱性氨基酸

Table 2 Alkaline amino acid near the proteolytic cleavage site of H5N1 virus used in the research

病毒名称 Name of the sample virus	碱性氨基酸 Alkaline amino acid	病毒名称 Name of the Sample Virus	碱性氨基酸 Alkaline amino acid
A/Goose/Guangdong/1/96	RRRKKR	2005~2007 年人、家禽样本*	RRRKR
A/Goose/Guangdong/3/97	RRRKKR	A/chicken/GJ/178/2004	RRRKR
A/HK/156/97	RRRKKR	A/duck/Guangxi/07/1999	KRRKKR
A/HK/212/2003	RRRKKR	A/duck/Guangdong/01/2001	RRRKR
A/Pigeon/HK/SF215/2001	RRRKKR	A/grey heron/HK/837/2004	RRRKR
A/black headed gull/HK/12/1/2003	RRRKKR	A/duck/Guangxi/13/2004	RRKKR
A/WD/Guangdong/314/2004	RRRKKR	A/duck/Zhejiang/52/2000	RRRKR
A/mallard/Guangxi/wt/2004	RRRKKR	A/Beijing/01/2003	RRRKR
A/duck/Zhejiang/bj/2002	RRRKKR	A/bar-headed goose/QH/F/2006	RRRKR
A/duck/Guangxi/xa/2001	RRRKKR	A/migratory duck/JX/2300/2005	RRRKR
A/duck/Guangxi/27/2003	RRRKKR	A/Bar-headed Goose/QH/61/2005	RRRKR
A/chicken/Jiangsu/cz1/2002	RRRKKR	A/duck/Guangdong/22/2002	RRRKR
A/duck/Guangdong/40/2000	RRRKKR	A/tree sparrow/HK/864/2002	RRRKR

\* 2005~2007 年人、家禽样本包括 The human and poultry samples during 2005 to 2007 include: A/Anhui/1/2005, A/Anhui/2/2005, A/Guangxi/1/2005, A/China/2006, A/Shenzhen/406H/2006, A/China/GD01/2006, A/Guangzhou/1/2006, A/human/China/GD02/2006, A/human/Zhejiang/16/2006, A/Jiangsu/1/2007, A/Jiangsu/2/2007, A/chicken/Zhejiang/24/2005, A/chicken/Guangxi/4989/2005, A/chicken/HK/947/2006, A/goose/Guangxi/532/2006, A/goose/Guangzhou/471/2006, A/Common magpie/HK/645/2006.

**2.4 我国部分人、野鸟、家禽所感染的 H5N1 病毒 HA 基因的遗传进化树** 将表 1 中各样本的 HA 基因序列用 DNASTar 7.1 软件编辑、比对, 绘制基于 HA 基因核苷酸序列的遗传进化树状图 (图 1)。

**2.5 部分样本 HA 基因核苷酸和氨基酸相似性** 将表 1 中部分样本 HA 基因的核苷酸和推导的氨基酸序列进行同源性比较, 比较的相似性以百分比表示 (表 3)。

表 3 部分人、家禽和野鸟 H5N1 病毒之 HA 的核苷酸、氨基酸相似性(%)

Table 3 HA nucleotides and amino acids comparison of H5N1 subtype

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
A	***	97.3	96.3	96.3	96.5	96.7	96.5	96.4	96.7	96.3	96.3	94.5	96.3	96.3	96.4	96.7	96.6	96.8	97.3	97.1
B	97.5	***	97.5	96.8	97.6	97.3	97.2	97.2	97.4	97.1	96.5	95.7	97.1	97.3	97.1	97.2	97.1	97.6	100.0	97.7
C	96.6	97.2	***	96.8	99.9	96.0	96.1	96.0	96.3	96.2	95.4	94.8	96.3	96.4	95.9	96.5	96.2	96.7	97.5	97
D	96.4	96.2	97.9	***	98.6	96.5	96.2	96.2	96.4	92.4	95.5	88.4	88.3	96.4	96.1	95.9	96.2	95.0	96.8	97.2
E	96.8	97.3	99.6	97.9	***	96.0	96.2	96.2	96.5	96.2	95.5	94.8	96.3	96.4	96.1	96.5	96.2	96.7	97.6	97.2
F	96.2	96.4	95.7	96.4	95.7	***	99.6	99.6	99.6	95.4	98.9	91.0	91.4	99.4	99.2	98.7	99.2	97.9	97.3	98.1
G	96.3	96.5	95.9	96.2	96.1	99.6	***	99.5	99.3	99.1	98.7	97.4	99.5	99.2	99.1	99.2	99.0	99.4	97.2	98.1
H	96.0	96.1	95.6	96.1	95.8	99.4	99.1	***	99.2	99.0	98.7	97.4	99.3	99.2	99.0	99.1	99.0	99.3	97.2	98
I	96.3	96.5	95.9	96.2	96.1	99.6	99.5	99.1	***	99.0	98.6	97.5	99.4	99.3	99.4	99.3	99.4	99.8	97.4	98.2
J	96.0	96.2	95.8	92.3	95.8	95.7	99.5	98.9	99.3	***	98.4	97.2	99.1	96.8	100.0	99.1	96.9	99.5	97.1	97.9
K	95.6	95.8	95.2	95.5	95.4	98.8	98.8	98.4	98.8	98.5	***	96.7	98.6	98.5	98.4	98.5	98.3	98.7	96.5	97.5
L	93.6	93.8	93.4	87.1	93.4	90.5	97.0	96.6	97.0	96.6	96.4	***	99.3	92.4	97.2	97.5	91.4	97.6	95.7	96.4
M	93.6	95.6	95.3	87.6	95.3	91.6	99.5	99.1	99.5	99.1	99.1	99.1	***	91.1	99.1	99.1	91.0	99.5	97.1	97.9
N	95.3	96.0	95.6	96.0	95.6	99.4	99.2	99.0	99.2	96.8	98.5	92.0	90.9	***	99.1	99.4	99.0	99.4	97.3	98.1
O	95.8	96.1	95.6	96.1	95.8	99.4	99.3	98.8	99.1	100.0	98.4	96.6	99.1	99.0	***	99.2	99.2	99.5	97.1	97.9
P	96.0	96.6	96.3	95.9	96.3	99.2	99.6	99.3	99.6	99.3	98.9	97.4	99.5	99.6	99.3	***	98.9	99.4	97.2	98.1
Q	96.5	96.6	96.2	96.6	96.2	100.0	99.8	99.6	99.8	97.3	99.0	91.4	91.6	99.4	99.6	99.8	***	99.5	97.1	97.9
R	96.5	96.8	96.4	94.9	96.4	98.3	99.8	99.5	99.8	99.5	99.1	97.2	99.8	99.4	99.5	99.8	100	***	97.6	98.4
S	96.6	99.8	97.2	96.2	97.3	96.4	96.5	96.1	96.5	96.2	95.8	93.8	95.6	96.0	96.1	96.6	96.6	97.8	***	97.7
T	97.0	96.7	96.3	96.6	96.5	97.6	97.5	97.2	97.5	97.3	96.8	94.9	97.0	97.1	97.2	97.7	97.7	97.9	96.7	***

表中\*\*\*表示隔开,上三角内为核苷酸百分比,下三角内为氨基酸百分比。The“\*\*\*” in the table indicates division. The upper triangle of the division reveals the percentage of nucleotide, while the lower is the percentage of amino acid.

A= A/duck/Guangxi/13/2004; B= A/mallard/Guangxi/w/2004; C= A/Bar-headed Goose/QH/61/2005; D= A/bar headed goose/QH/F/2006; E= A/migratory duck/JX/2300/2005; F= A/chicken/Zhejiang/24/2005; G= A/Anhui/1/2005; ; H= A/Anhui/2/2005; I= A/Guangxi/1/2005; J= A/Shenzhen/406H/2006; K= A/Jiangsu/1/2007; L= A/China/GD01/2006; M= A/human/Zhejiang/16/2006; N= A/Guangzhou/1/2006; O= A/human/China/GD02/2006; P= A/goose/Guangxi/532/2006; Q= A/goose/Guangzhou/471/2006; R= A/chicken/Guangxi/4989/2005; S= A/WJ/Guangdong/314/2004; T= A/chicken/Guangdong/178/2004

### 3 讨论

**3.1 病毒唾液酸结合位点分析** 禽流感病毒 HA 特异受体结合位点氨基酸残基高度保守,由 Gln、Ser、Gly 组成(QSG),具有与唾液酸 $\alpha$ 2,3 半乳糖受体结合的特异性,而人流感病毒优先结合唾液酸 $\alpha$ 2,6 半乳糖受体。比较所选样本的氨基酸序列,除 A/HK/212/2003 的受体结合区氨基酸残基为 QNG, A/Anhui/2/2005 为 RSG 外,其余包括人和家禽的病毒样本受体结合区氨基

酸残基均为 QSG,仍然是对禽类细胞表面唾液酸 $\alpha$ 2,3 半乳糖受体有高亲和力的禽源流感病毒。A/HK/212/2003 和 A/Anhui/2/2005 H5N1 所发生的受体位点氨基酸的改变,是否从根本上改变该流感病毒的禽源性还需进一步的研究。

**3.2 HA 裂解位点氨基酸序列、糖基化位点变异和毒力变化分析** 流感病毒的毒力是受多个基因决定的,但是一般认为病毒粒子 HA 基因起主导作用。禽流感病毒毒力高低与 HA 裂解位点氨基酸的性质及组成序列有关<sup>[7,8]</sup>。

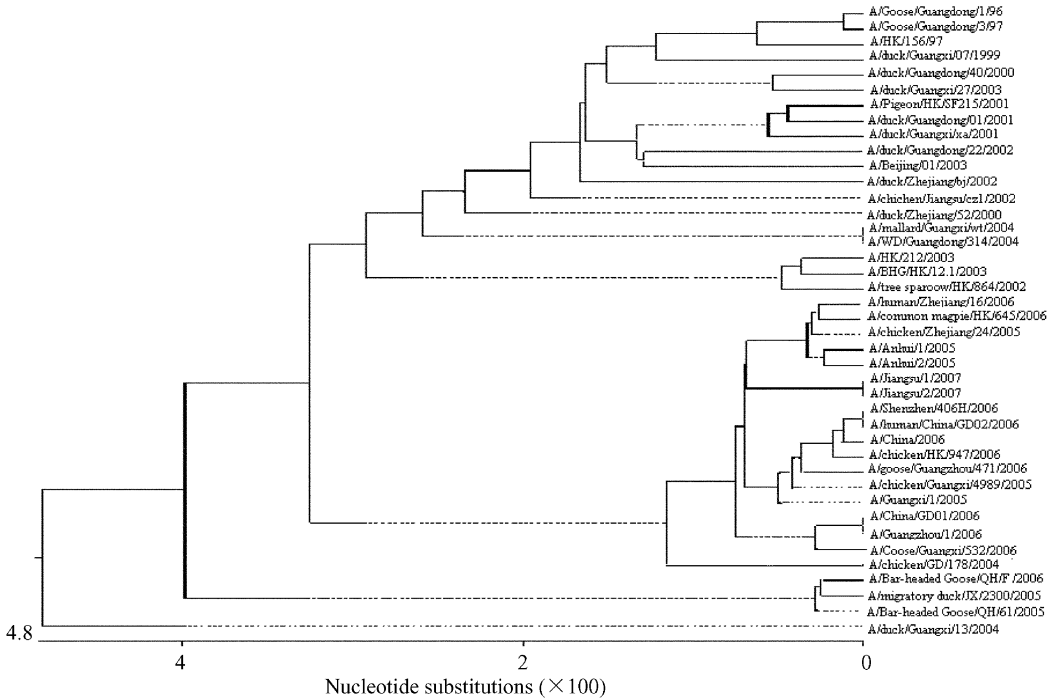


图 1 部分人、家禽及野鸟 H5N1 病毒 HA 基因核苷酸遗传进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of HA genes in H5N1 viruses from humans, poultry and wild birds

图中各样本为表 1 中列出的样本,物种名称及登录号见表 1。平均长度表示法对树中不同祖先间的距离取平均值,点线表示由于取平均值造成的长度缩短,实线表示正常长度。树下的标识表明 DNA 的碱基替换数目。

The samples in the figure are those listed in Table 1. Refer to Table 1 for the names of the species and accessions. Balanced branches (phenogram) averages the distances between ancestors in the tree. Dotted lines indicate a negative branch length, which may result from averaging, while lines indicate a positive branch length. The scale below the tree reveals the number of "Nucleotide Substitutions" for DNA sequences.

BHG= black headed gull; QH= Qinghai; GD= Guangdong; HK= Hong Kong; JX= Jiangxi; WD= Wild Duck.

1996~ 2004 年间大多数样本 HA 裂解位点氨基酸序列与 A/Goose/Guangdong/1/96 的碱性氨基酸序列 RRRKCR 相同,但有些样本在第 1 位上发生改变,如样本 A/Beijing/01/2003 换成 G, A/duck/Guangxi/07/1999 换为 K, A/duck/Zhejiang/52/2000 换为 I, A/duck/Guangdong/01/2001 则在第 5 位上变换成 R; A/duck/Guangxi/13/2004 发生一个氨基酸的缺失。2005 年后,所有的人和家禽样本 HA 裂解位点碱性氨基酸没有差异,均为 RRRKR。这个比较的结果表明,1999~ 2004 年间,多个禽流感 H5N1 亚型毒株的 HA 基因序列发生变异,从而导致多个毒株的 HA 糖蛋白上裂解位点氨基酸序列发生改变,最终产生 2005

年后稳定的且普遍存在于人、家禽中的 RRRKR 序列。这种变化同样也出现在青海湖野鸟样本,即 2005 年青海湖样本的 RRRKCR 到 2006 年样本变为 RRRKR。纵观近几年 H5N1 禽流感病毒引起的广泛疫情、家禽死亡数量的增多,以及多位人感染死亡事件,碱性氨基酸组成的改变可能从根本上影响了 HA 裂解的难易,对人和家禽均有了更强的毒力,推进了 H5N1 亚型对宿主感染性及毒力的进程,这与我国发生禽流感的趋势是一致的。

HA 上的糖基化位点可能是另一个影响流感病毒毒力的因素。受体结合位点的糖基会影响流感病毒和宿主细胞受体的结合水平<sup>[2]</sup>。对

比本文所选样本, 1996~ 2004 年间大多数样本有 6 个糖基化位点, 分别位于 HA1 上的第 27~ 29、39~ 41、181~ 183、209~ 211、302~ 304 位, 及 HA2 的 154~ 156 位, 个别样本如 A/Pigeon/HK/SF215/2001、A/chicken/Jiangsu/cz1/2002、A/WD/Guangdong/314/2004 和 A/mallard/Guangxi/wt/2004 多出一个糖基化位点。而 2005~ 2007 年期间, 感染家禽和人的 H5N1 毒株样本与 1996~ 2004 年间大多数毒株样本有相同的 6 个糖基化位点外, 还均在 170~ 172 位增加一个糖基化位点, 糖基化位点为 7 个, 增加的糖基化位点对禽感染的毒株和人感染的毒株的影响是相同的。HA 上糖基化位点的增加可能引起空间结构的改变, 干扰泛在性蛋白酶进入裂解位点对 HA 前体蛋白的裂解, 从而影响病毒毒力。

**3.3 HA 基因进化特点分析** 从遗传进化树上看, 香港 1997 年样本与 A/Goose/Guangdong/1/96 禽流感病毒株最为接近, 核苷酸序列的相似性达 99%, 其 HA 蛋白序列中只有 8 个氨基酸的区别, 两株病毒的 HA 裂解位点具有相同的氨基酸序列 (RERRRKKR), 推测香港 1997 年的病毒可能来自广东<sup>[9]</sup>。香港 2002 年和 2003 年样本遗传距离非常近, 2003 年出现的人禽流感毒株与 1997 年毒株存在较大的差异<sup>[10]</sup>; 2004 年以后的样本在另一个大的分支里, 较 2002、2003 年样本遗传距离更远, 毒株发生了较大的变异, 随着时间的推移, HA 序列在进化树上反映出有较明显的变异<sup>[11]</sup>。我国广东各年毒株的关系也具有相同规律, 从进化树自上向下, 广东 1996 年样本位于树最上端, 其余各年样本随着年份增加逐渐向下方分布, 离 1996 年样本渐远。总体上, 1996~ 2003 年样本位于一个较大分支内, 2005~ 2007 年样本位于另一个较大分支内, 从进化树上同样反映出随时间推进 HA 基因发生了较明显的变异。

香港不同年的毒株与 Goose/Guangdong/1/96 样本在 HA 核苷酸相似性上, 分别为 A/HK/156/97 (99%)、A/Pigeon/HK/SF215/2001 (98.1%)、A/tree sparrow/HK/864/2002 (96.9%)、A/HK/212/2003 (96.8%)、A/black headed gull/HK/12.1/2003

(97.1%)、A/grey heron/HK/837/2004 (96%) 和 A/chicken/HK/947/2006 (95.9%)、A/Common magpie/HK/645/2006 (95.6%) (表 3 中未列出), 表明香港样本的 HA 基因在持续地发生着变异。从核苷酸相似性百分比和各样本在进化树上所处的位置可以看出, 这种变异并非以一个平均的速度进行, 具有时间间隔愈长, 核苷酸、氨基酸的同源性愈低的趋势, HA 基因变异越明显, 新毒株距离最初的祖先基因型越来越远, 差异性越来越大。这个结果与 Li 等<sup>[12]</sup>对近几年东亚禽流感病毒变异监测的结果是一致的, 与世界卫生组织对禽流感病毒基因随时间进行重排的研究结果相一致。

**3.4 我国部分人感染的 H5N1 禽流感病毒的可能来源** 本文对比结果显示, 2005、2006 年我国青海湖样本与所选人样本分属两个大分支, 核苷酸相似性在 88.3%~ 96.4% 之间, 氨基酸相似性在 88%~ 96%。2005~ 2007 年我国所有人和家禽样本聚在一个较大的分支内, 这些样本之间的核苷酸和氨基酸相似性均在 96% 以上。在一些相同或相近地区, 同一年内人和家禽的核苷酸及氨基酸的相似性高达 99% 以上, 如 A/Guangxi/1/2005、A/Anhui/1/2005、A/Shenzhen/406H/2006、A/Zhejiang/16/2006、A/Jiangsu/1/2007、A/Jiangsu/2/2007、A/Guangzhou/1/2006 和 A/China/GD02/2006 与 A/chicken/Guangxi/4989/2005、A/goose/Guangxi/532/2006 核苷酸和氨基酸相似性达 99% 以上。2005~ 2007 年人感染的 H5N1 禽流感病毒与 2005 年和 2006 年广西家禽样本高度相似, 所感染病毒 HA 的关键位点核苷酸和氨基酸未发生变异, 与 2004 年之前家禽感染的 H5N1 的 HA 相比, 在关键位点发生变异, 但相同的变异在 2005 年家禽感染的病毒中也同样存在。因此, 推测 2005~ 2007 年人感染的 H5N1 禽流感病毒更可能是来自家禽的传播。

2005 年青海湖样本与 2005 年江西迁徙野鸭样本基因序列同源性高达 99.9%, 裂解位点插入碱性氨基酸相同, 可能属同一毒株来源; 毒株 A/WD/Guangdong/314/2004 和毒株 A/mallard/Guangxi/wt/2004 核苷酸相似性 100%, 氨基酸相

似性 99.8%, 属同一毒株来源, 但分属两个省份, 宿主来源分别为绿头鸭和野鸭。说明存在通过野鸟迁徙等飞行活动将病毒散播到地理位置相隔较远的地域的可能<sup>[13]</sup>, 由此给人类带来新的风险。

本文通过对我国部分人、禽、野鸟感染 H5N1 亚型禽流感病毒事例分析显示, 在我国东南地区的同省或临近省内, 当年或前后两年人及家禽感染的禽流感病毒 HA 核苷酸和氨基酸具高度相似性, 而家禽发生禽流感次数多、范围广, 推测由家禽感染人的几率较高。因此, 人类在高致病性禽流感爆发时依然面临着极大的风险, 提醒我们追溯病毒的来源, 经常性检测家禽体内禽流感病毒的变异情况, 研究变异对病毒生物学特性的影响, 加强监测野鸟活动, 以便及时准确地研发、制备相应的疫苗, 更好地预防禽流感的爆发。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Subbarao K, Klimov A, Katz J, *et al.* Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, **279**: 393~ 396
- [ 2 ] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, *et al.* The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology*, 1999, **73**(2): 1 146~ 1 155
- [ 3 ] Wood G W, McCauley J W, Bashiruddin J B, *et al.* Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Archives of Virology*, 1993, **130**( F 2 ): 209~ 217
- [ 4 ] Webster R G, Guan Y, Peiris M, *et al.* Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. *Journal of Virology*, 2002, **76**( 1 ): 118~ 126
- [ 5 ] Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, *et al.* Comparison of complete amino acid sequences and receptor binding properties among 13 serotypes of hemagglutinin of influenza A viruses. *Virology*, 1991, **182**( 2 ): 475~ 485.
- [ 6 ] Gambaryan A, Tuzkov A, Pazynina G. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology*, 2006, **344**( 2 ): 432~ 438.
- [ 7 ] Jody K, Stacey S, David E, *et al.* Distinct pathogenesis of Hong Kong origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *Journal of Virology*, 2000, **74**( 3 ): 1 443~ 1 450.
- [ 8 ] Yoshihiro K, Ann N, Dennis J, *et al.* Molecular analyses of the hemagglutinin genes of H5 influenza viruses: Origin of a virulent turkey strain. *Virology*, 1987, **158**( 1 ): 218~ 227.
- [ 9 ] Xu X, Subbarao K, Cox N J, *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. *Virology*, 1999, **261**( 1 ): 15~ 19.
- [ 10 ] 黄平, 柯昌文, 邹丽容等. 广东地区人禽流感 H5N1 血凝素基因特征与进化. *中国公共卫生*, 2007, **23**( 4 ): 390~ 392
- [ 11 ] 李佳, 张智俊, 田兴军. H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因核酸序列的变异分析. *生物信息学*, 2006, **3**( 4 ): 109~ 112
- [ 12 ] Li K S, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 2004, **430**( 6 996 ): 209~ 213.
- [ 13 ] 雷富民, 赵德龙. 野生鸟类对禽流感爆发与传播的影响. *中国科学院院刊*, 2005, **20**( 6 ): 466~ 470.