

鸡、鸽、虎呼吸道和消化道黏膜上皮细胞 表面流感病毒受体类型的检测

马明¹, 刘月焕², 陈明勇¹, 韩春华², 林健²

(¹ 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; ² 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

摘要: 【目的】检测鸡、鸽和虎体内的流感病毒受体的类型和分布, 以期解释 3 种动物对禽流感病毒易感性差异的机制。【方法】使用地高辛标记的外源性凝集素染色方法检测这些动物的喉头、气管、肺脏和肠道(直肠)的上皮细胞表面 SA α 2, 6Gal 和 SA α 2, 3Gal 连接键的类型。【结果】SPF 鸡的上呼吸道黏膜上皮细胞表面有大量的 SA α 2, 3Gal 和少量的 SA α 2, 6Gal; 肺脏上皮细胞表面只有 SA α 2, 3Gal; 而直肠黏膜上皮中 SA α 2, 6Gal 和 SA α 2, 3Gal 都没有表达。成年鸽的上呼吸道黏膜上皮细胞表面只有 SA α 2, 6Gal, 而没有 SA α 2, 3Gal; 而下呼吸道中 SA α 2, 6Gal 和 SA α 2, 3Gal 都没有; 直肠黏膜上皮细胞只有 SA α 2, 3Gal。虎的呼吸道和消化道(直肠)黏膜上皮细胞表面有大量的 SA α 2, 6Gal 和 SA α 2, 3Gal。【结论】鸡和虎具有禽流感病毒受体, 对禽流感病毒易感, 鸽不具备禽流感病毒受体, 因此, 鸽对禽流感病毒不易感。

关键词: 流感病毒受体; 唾液酸; 鸡; 鸽; 虎

Influenza Virus Receptor Detection on Chicken, Pigeon and Tiger Respiratory and Intestine Tract Epithelium Cells

MA Ming¹, LIU Yue-huan², CHEN Ming-yong¹, HAN Chun-hua², LIN Jian²

(¹ College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193; ² Institute of Animal and Husbandry Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: 【Objective】 To detect the type and distribution of influenza virus receptors in chicken, pigeon and tiger, then find the mechanism to explain the difference of these animals' affectability to avian influenza virus. 【Method】 The type of SA α 2, 6Gal and SA α 2, 3Gal linkage on these animals larynx, trachea, lung and intestine (colon) epithelium cells was detected by digoxigenin-labeled lectin staining. 【Result】 Abundant SA α 2, 3Gal and slight SA α 2, 6Gal on specific-pathogen free chickens upper respiratory tract epithelium cells were observed, the alveolar epithelium cells only express SA α 2, 3Gal, however the colon epithelium cells express neither SA α 2, 6Gal nor SA α 2, 3Gal. Adult pigeon upper respiratory tract epithelium cells only express SA α 2, 6Gal, but not SA α 2, 3Gal. Pigeon lower respiratory tract express neither SA α 2, 6Gal nor SA α 2, 3Gal. Pigeon colon epithelium cells only express SA α 2, 3Gal. There are abundant SA α 2, 6Gal and SA α 2, 3Gal on tiger respiratory and intestine tract epithelium cells. 【Conclusion】 These data have provided a rational explanation for why chickens and tigers are susceptible to avian influenza virus, while pigeons are not.

Key words: influenza virus receptor; sialic acid; chicken; pigeon; tiger

0 引言

【研究意义】流感病毒属于粘液病毒(Orthomyxoviridae)科, 是节段状负链 RNA 病毒。

根据病毒颗粒内部的核蛋白(NP)和基质蛋白(M)的抗原性不同可分为甲、乙、丙 3 型。到目前为止, 甲型流感病毒除人类以外, 还可感染鸟、猪、马、海豚、海鲸等多种动物。搞清流感病毒跨越物种传播的

收稿日期: 2008-10-17; 接受日期: 2009-04-02

基金项目: 北京市自然科学基金(No. 6072011)、国家自然科学基金(No. 30740028)

作者简介: 马明(1983-), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 研究方向为分子病理学。通信作者刘月焕(1969-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 研究员, 博士, 研究方向为动物传染病免疫与病理。Tel: 010-51503475; E-mail: liuyuehuan@baafs.net.cn。并列通信作者陈明勇(1966-), 男, 湖北武汉人, 副教授, 博士, 研究方向为免疫病理及食品卫生。Tel: 010-62733060; E-mail: bjmychen@sohu.com

分子机制, 对于征服流感病毒是非常重要的。病毒颗粒的脂质膜上血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶蛋白(NA)是与病毒感染细胞密切相关的糖蛋白。其中, HA 上由数十个氨基酸位点构成的球形受体结合位点与宿主细胞膜上带有唾液酸残基的细胞膜上的糖蛋白和糖脂相结合附着于细胞表面, 随后细胞膜内陷并逐步包裹病毒颗粒, 通过胞饮作用将病毒吞入, 完成病毒感染细胞的第一步^[1]; NA 能水解糖脂和糖蛋白(包括受体)上的唾液酸, 且与新的病毒颗粒从宿主细胞膜游离出来时密切相关^[2]。唾液酸(sialic acid, SA)存在于细胞膜鞘糖脂的表面, 它是一个含有 9 个碳的酸性氨基糖的总称, 其氨基组分被 N-乙酰基(N-acetyl)或者 N-乙醇酰基(N-glycolyl)取代后, 分别形成 N-乙酰神经氨酸(5-N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac)或 N-羟乙醇酰神经氨酸(5-N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)。唾液酸的末端与半乳糖可以形成两种不同的 α 连接, 连接两个碳原子和糖链, 分别是 SA α 2,3Gal 和 SA α 2,6Gal^[3]。虽然所有的流感病毒识别末端含有唾液酸的受体, 但是不同流感病毒血凝素的受体特异性是不同的。通过研究不同动物体内流感病毒受体的种类和分布可以初步判断其对流感病毒的易感性。【前人研究进展】禽流感病毒和马流感病毒主要识别和结合 SA α 2,3Gal 连接键, 而人流感病毒主要识别和结合 SA α 2,6Gal 的连接键^[4-6]。而在不同动物组织中唾液酸-半乳糖连接键型是不同的。人的呼吸道上皮细胞上有大量的 SA α 2,6Gal; SA α 2,3Gal 在人的 II 型肺泡上皮细胞上被发现^[7]。在成年鸡的气管、肺脏、嗦囊和肠道的上皮细胞膜上存在大量的 SA α 2,3Gal, 但是在呼吸道黏膜的上皮细胞上也有 SA α 2,6Gal^[8]。野鸭的气管、肺脏、嗦囊和肠道黏膜的上皮细胞表面只有 SA α 2,3Gal, 没有 SA α 2,6Gal^[8]。在猪的上呼吸道黏膜细胞上, SA α 2,3Gal 和 SA α 2,6Gal 结合方式的两种唾液酸都存在^[9]。马的气管上皮细胞表面有大量的 SA α 2,3Gal, 而没有 SA α 2,6Gal^[10]。在鹌鹑气管和肠道的上皮细胞表面有 SA α 2,3Gal 和 SA α 2,6Gal^[11]。因此唾液酸-半乳糖连接键型的不同成为了流感病毒在不同宿主间传播的屏障。H5N1 亚型禽流感病毒能感染多种家禽、野禽、候鸟、留鸟(麻雀)和哺乳动物包括虎、狮子、猫等^[12-13], 鸽作为一种与人类密切接触的禽类, 它对禽流感病毒是否易感是值得密切关注。有研究人员证实鸽子对 H5N1 亚型禽流感病毒不易感^[14-15]。H5N1 亚型禽流感病毒能够引起虎的严重肺炎^[16], 2004 年在泰国禽类暴发高致病性禽流感的同时, 动物

园中的老虎由于饲喂了含有 H5N1 亚型禽流感病毒的禽肉而陆续出现死亡病例^[16-17], 并且证实 H5N1 亚型禽流感病毒能够在虎和虎之间传播^[18]。2005 年 6 月, 中国上海的一只动物园老虎在表现高烧和呼吸窘迫后死亡, 从它的肺部组织分离到高致病性 H5N1 亚型禽流感病毒^[19]。【本研究切入点】检测鸡、鸽、虎的流感病毒侵入途径(呼吸道和消化道)中流感病毒受体的类型和分布, 并与检测的对禽流感病毒易感的鸡为对照动物中的流感病毒受体类型和分布进行了对比分析。【拟解决的关键问题】确定使用特异性结合唾液酸受体的地高辛标记外源性凝集素进行免疫组化染色的方法检测动物体内流感病毒受体的类型的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物组织 8 周龄 SPF 鸡和鸽及成年虎的 10% 福尔马林固定组织由北京农林科学院畜牧所动物疫病实验室提供。分别取上述动物的喉头、气管、肺脏、直肠作为检测组织。

1.1.2 试剂 地高辛聚糖鉴别诊断试剂盒(Roche Applied Science); 通用碱性磷酸酶(AP)酶联检测封闭溶液(GMS12107, Genmed); TBS(tris buffered saline)缓冲液 pH 7.5。

1.2 方法

1.2.1 组织取材 分别取 8 周龄鸽和 SPF 鸡的喉头、气管上段(距喉头 3~5 个气管环)、气管中段(距喉头 20 个气管环)、气管下段(支气管上方 3~5 个气管环)、肺脏、直肠。取虎的喉头、气管上段(距喉头第 3 个气管环)、气管中段(距喉头第 15 个气管环)、气管下段(支气管上方第 4 个气管环)、肺脏、直肠, 10% 中性福尔马林固定 24 h 后进行二次固定, 二次固定 12 h 后脱水、包埋、制备 3 μ m 的组织切片。

1.2.2 免疫组化染色 切片正常脱蜡、入水。切片经去离子水和 TBS 缓冲液(pH 7.5)冲洗后, 滴加适量的通用 AP 酶联检测封闭溶液作用; 经 TBS 缓冲液冲洗后, 滴加工作浓度的阻断剂(blocking reagent)作用; 经 TBS 缓冲液冲洗后, 滴加外源凝集素, 其中 SA α 2,6Gal 染色滴加地高辛标记的黑接楸凝集素(sambucus nigra agglutinin, SNA), SA α 2,3Gal 染色滴加地高辛标记的山槐黄柏苷凝集素(maackia amurensis agglutinin, MAA), 阴性对照滴加 TBS 缓冲液; TBS 缓冲液冲洗后, 加碱性磷酸酶标记的抗地高辛的二抗(anti-Digoxigenin-AP)溶液; TBS 缓冲液

冲洗, 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸/硝基蓝四氮唑溶液 (NBT/BCIP) 染色反应。

虎组织切片不复染易于观察结果, 即 NBT/BCIP 染色反应后直接进行显微镜观察, 上皮细胞表面黑色判为阳性。鸡和鸽的组织切片复染易于观察, NBT/BCIP 染色反应后苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 加拿大树胶封片。显微镜下观察, 上皮细胞表面为深蓝黑色判为阳性。

2 结果与分析

MAA 和 SNA 两种凝集素使得唾液酸化的 N-和/或 O-连接的碳水化合物侧链上的唾液酸-半乳糖连接键的类型能被辨别。在本次研究中, 笔者使用这两种凝集素来检测鸡的呼吸道和消化道(直肠)的上皮细胞上的 SA-Gal 连接键的类型(表)。

2.1 SPF 鸡上皮细胞表面唾液酸受体类型 (SA α 2, 6Gal 与 SA α 2, 3Gal) 的检测

如图 1 中所示, 8 周龄 SPF 鸡的喉头、气管上段、气管中段和气管下段与 DIG-MAA 反应后, 裸露的上皮细胞膜染色为近乎黑色的深蓝黑色, 属于强阳性反应; 在与 DIG-SNA 反应后喉头上皮细胞染色为断断续续的蓝黑色, 与阴性对照比较后, 这些组织与 DIG-SNA 反应也为阳性。鸡肺脏的初级支气管的上皮细胞与 DIG-MAA 有反应染成深蓝黑色, 与 DIG-SNA 反应染色为蓝黑色, 两种反应均为阳性; 而鸡肺房上皮细胞只与 DIG-MAA 反应为阳性。鸡的直肠黏膜上皮细胞对 DIG-SNA 和 DIG-MAA 两种反应均为阴性。因此 8 周龄 SPF 鸡的喉头、气管上段、气管中段、气管下段和肺脏初级支气管的黏膜上皮细胞表面具有大量的 SA α 2,3Gal, 同时也有少量的 SA α 2,6Gal; 肺房的

上皮细胞只表达 SA α 2,3Gal; 直肠黏膜上皮细胞 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 都没有表达。

2.2 鸽上皮细胞表面唾液酸受体类型 (SA α 2, 6Gal 与 SA α 2, 3Gal) 的检测

8 周龄鸽的喉头、气管上段、气管中段和气管下段只和 DIG-SNA 有阳性反应, 裸露的上皮细胞膜被染成深蓝黑色; 而与 DIG-MAA 反应后染色, 4 种组织的黏膜上皮细胞表面为较透明的淡蓝色, 与阴性对照一致, 结果为阴性。鸽肺脏初级支气管的上皮细胞只和 DIG-SNA 有反应, 染成深蓝黑色; 而三级支气管和肺房上皮细胞两种反应均为阴性。鸽的直肠黏膜上皮细胞表面在与 DIG-MAA 反应后染成深蓝黑色的阳性, 而与 DIG-SNA 反应染色为阴性(图 2)。因此 8 周龄鸽的喉头、气管上段、气管中段、气管下段和肺脏初级支气管的黏膜层上皮细胞表面只有 SA α 2,6Gal, 而没有 SA α 2,3Gal; 而三级支气管和肺房上皮细胞表面 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 都没有; 鸽直肠黏膜上皮细胞表面只有 SA α 2,3Gal。

2.3 虎的上皮细胞表面唾液酸受体类型 (SA α 2,6Gal 与 SA α 2,3Gal) 的检测

虎的喉头、气管上段、气管中段、气管下段和肺内支气管黏膜上皮细胞与 DIG-SNA 反应后染成黑色, 为强阳性; 这些组织与 DIG-MAA 反应后染色也是黑色, 为强阳性。肺泡壁的上皮细胞与 DIG-SNA 反应为黑色, 为阳性; 与 DIG-MAA 反应后染色也是黑色, 为阳性。虎的直肠黏膜的上皮组织与 DIG-SNA 和 DIG-MAA 反应均为阳性, 上皮细胞表面都染成黑色。因此, 虎的喉头、气管上段、气管中段、气管下段、肺内支气管、肺泡和直肠的上皮细胞表面都有大量的 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal(图 3)。

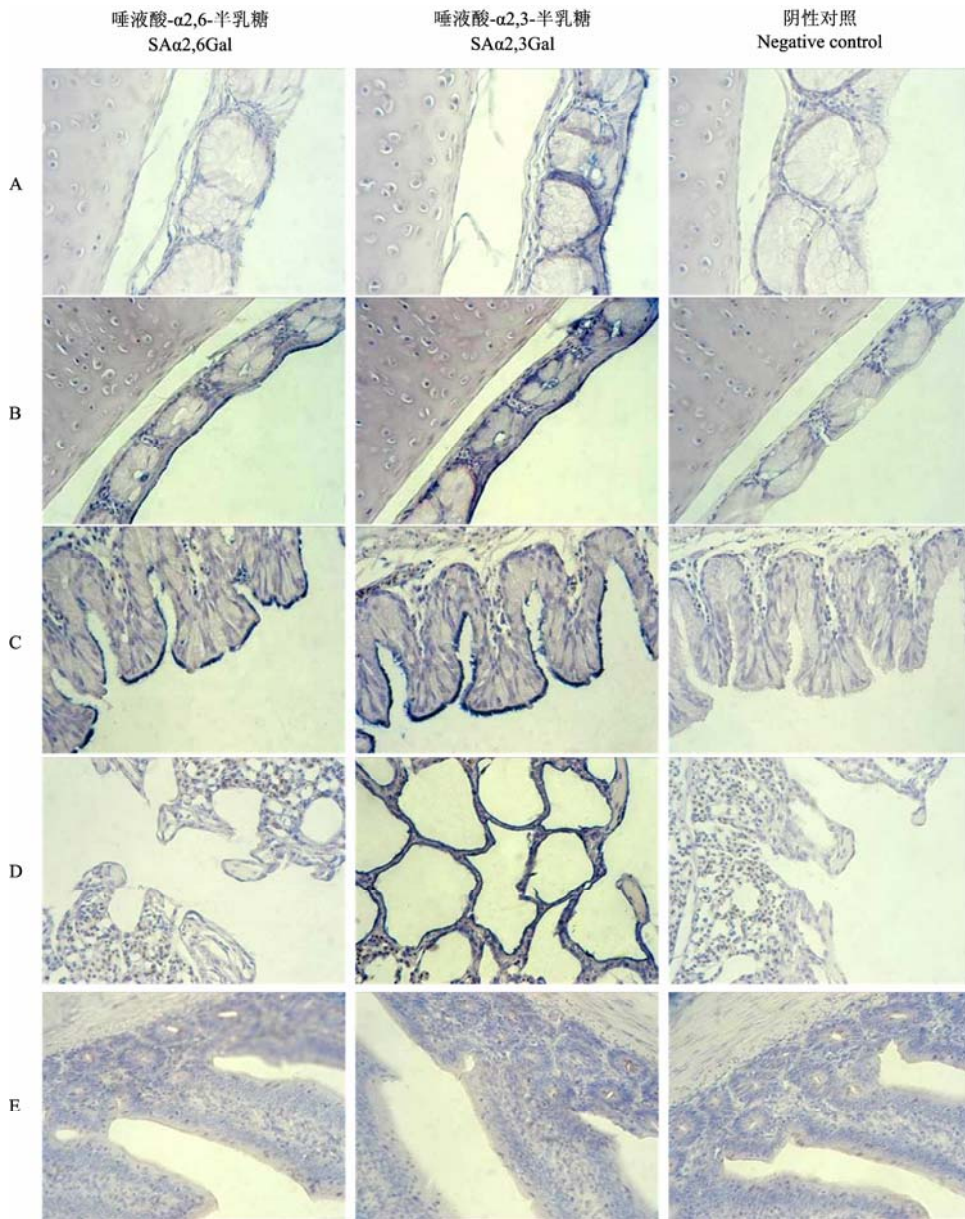
表 鸡、鸽和虎的呼吸道及消化道(直肠)黏膜上皮细胞表面唾液酸受体类型及分布

Table The type and distribution of sialic acid receptor on chicken, pigeon and tiger respiratory tract and intestine (colon) epithelium cells

流感病毒受体		喉头	气管上段	气管中段	气管下段	肺支气管	肺房/泡	直肠
Influenza virus receptor		Larynx	Upper trachea	Middle trachea	Lower trachea	Bronchus	Alveolus	Colon
鸡 Chicken	α 2,6	+	+	+	+	+	-	-
	α 2,3	++	++	++	++	++	+	-
鸽 Pigeon	α 2,6	++	++	++	++	++	-	-
	α 2,3	-	-	-	-	-	-	+
虎 Tiger	α 2,6	++	++	++	++	++	++	++
	α 2,3	++	++	++	++	++	++	++

表中“ α 2,6”代表 SA α 2,6Gal, “ α 2,3”代表 SA α 2,3Gal; “++”代表强阳性; “+”表示阳性稍弱; “-”表示阴性

In the table, α 2,6=SA α 2,6Gal; α 2,3=SA α 2,3Gal; ++=powerful positive; +=weaker positive; -=negative



A: 鸡喉头; B: 鸡气管上段; C: 鸡肺内支气管; D: 鸡肺房; E: 鸡直肠。特异性识别 SA α 2,6Gal 的 DIG-SNA 与鸡喉头、气管上段和肺内支气管结合阳性, 特异性识别 SA α 2,3Gal 的 DIG-MAA 与鸡喉头、气管上段、肺内支气管和肺房反应阳性 (400 \times)

A: Chicken larynx; B: Chicken upper trachea; C: Chicken bronchus; D: Chicken pulmonary alveoli; E: Chicken colon. DIG-labeled SNA specific for SA α 2,6Gal bound to the chicken larynx, upper trachea and bronchus. DIG-labeled MAA specific for SA α 2,3Gal bound to the chicken larynx, upper trachea, bronchus and pulmonary alveoli. The images were observed under a microscope (400 \times)

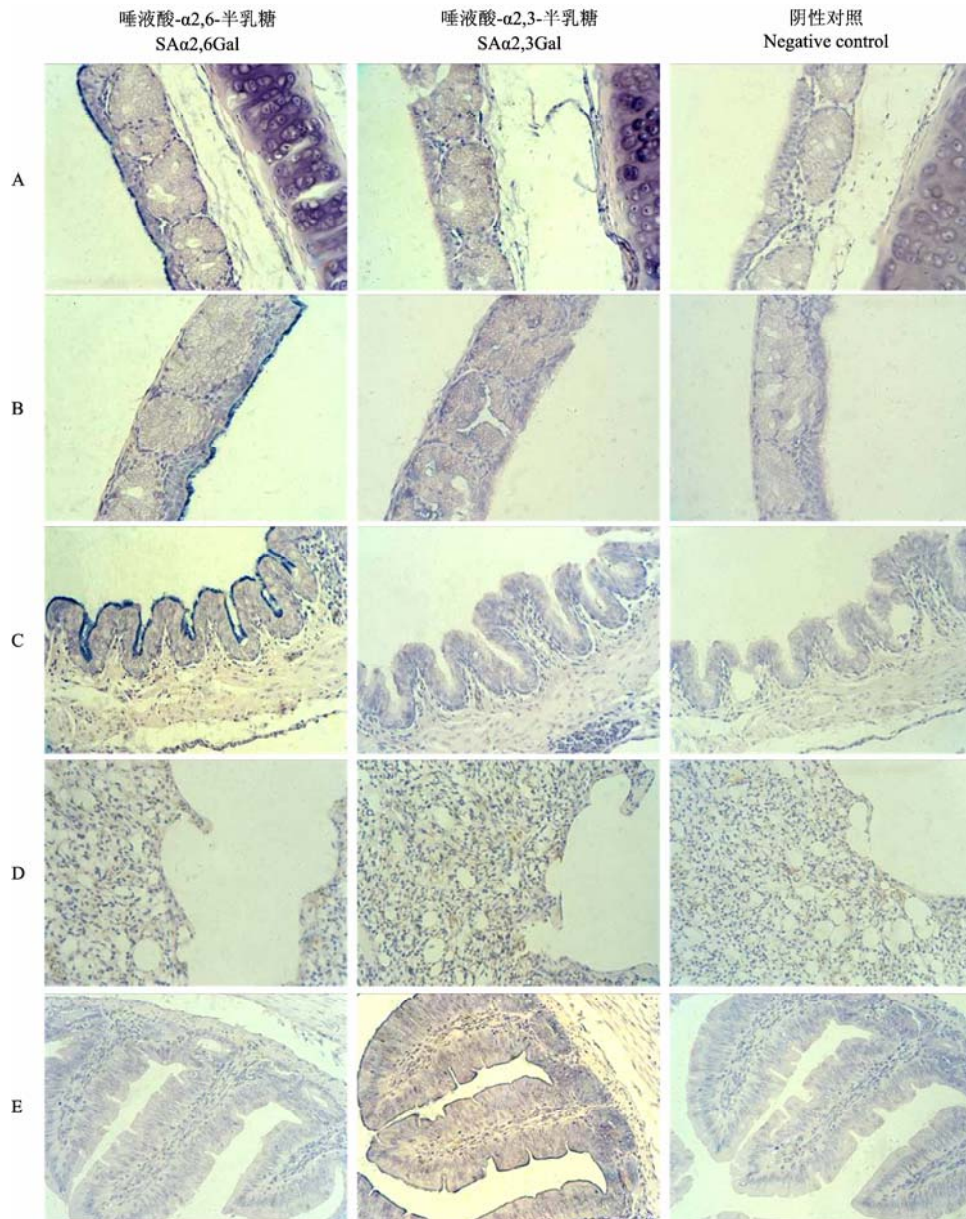
图 1 凝集素染色检测鸡呼吸道及消化道上皮细胞表面 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 受体类型

Fig. 1 Existence of both SA α 2,6Gal and SA α 2,3Gal linkages on chicken respiratory tract and intestine epithelium cells was detected by lectin staining

3 讨论

A 型流感病毒在它们识别宿主细胞膜表面糖蛋白和糖脂中 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 的能力上是不同的,

人流感病毒结合 SA α 2,6Gal, 马流感病毒和禽流感病毒显著的结合 SA α 2,3Gal^[10,20], 猪流感病毒结合 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal, 更倾向结合 SA α 2,6Gal^[21]。因此, 不同动物的细胞表面唾液酸-半乳糖连接键的不



A: 鸽喉头; B: 鸽气管上段; C: 鸽肺内支气管; D: 鸽肺房; E: 鸽直肠。特异性识别 SA α 2,6Gal 的 DIG-SNA 与鸽喉头、气管上段及肺内支气管黏膜的上皮细胞结合阳性, 特异性识别 SA α 2,3Gal 的 DIG-MAA 与鸽直肠黏膜上皮细胞反应阳性 (400 \times)

A: Pigeon larynx; B: Pigeon upper trachea; C: Pigeon bronchus; D: Pigeon pulmonary alveoli; E: Pigeon colon. DIG-labeled SNA specific for SA α 2,6Gal bound to pigeon larynx, upper trachea and bronchus epithelium. DIG-labeled MAA specific for SA α 2,3Gal bound to pigeon colon epithelium. The images were observed under a microscope (400 \times)

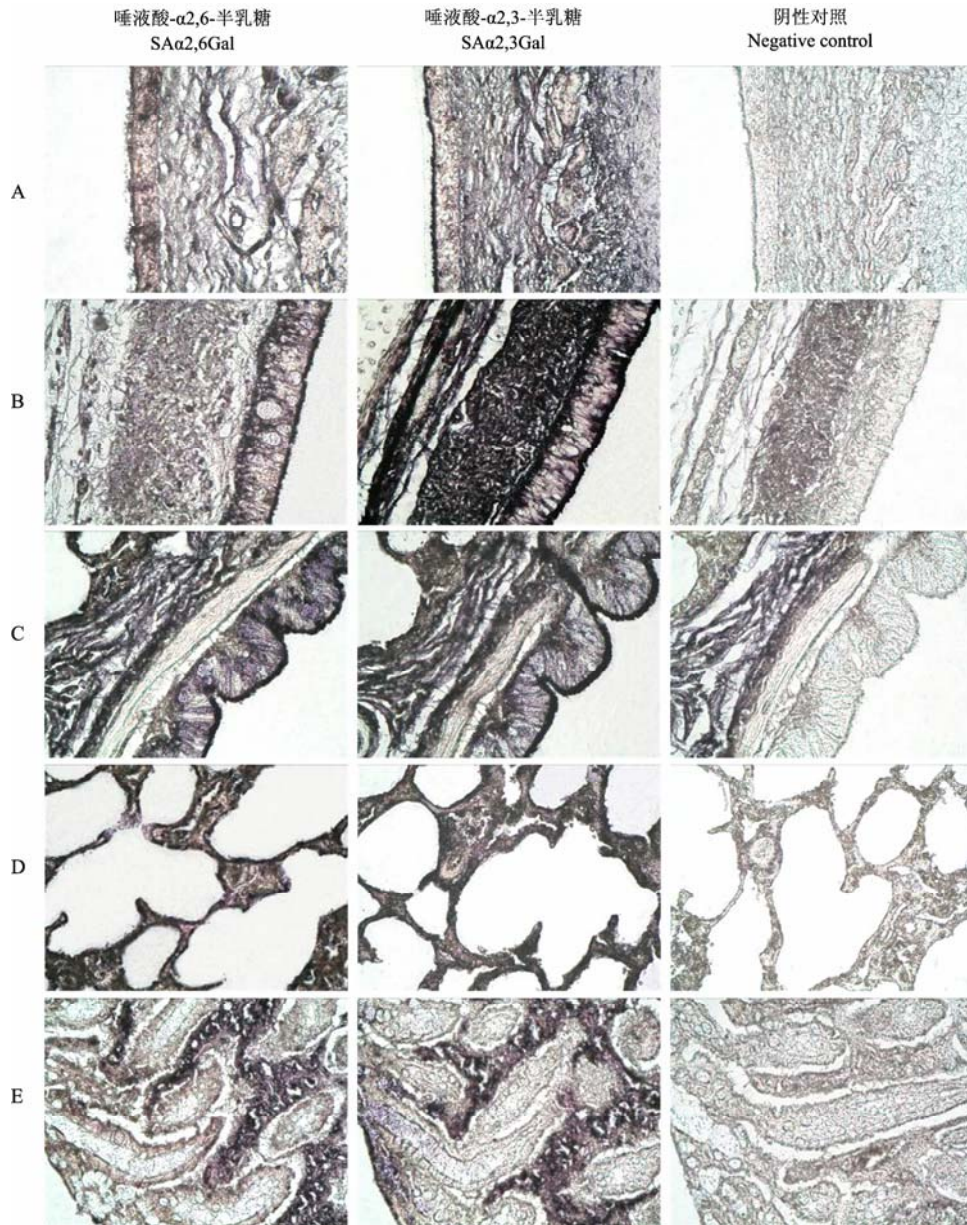
图 2 凝集素染色检测鸽呼吸道及消化道上皮细胞表面 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 受体类型

Fig. 2 Existence of both SA α 2,6Gal and SA α 2,3Gal linkages on pigeon respiratory tract and intestine epithelium cells was detected by lectin staining

同, 是决定 A 型流感病毒宿主范围的一个重要因素。

一些研究细胞表面表达唾液酸类型的试验采用细胞膜组织匀浆抽提唾液酸的方法进行。但是为了解流感的发病机制和大流行的出现, 能在组织学切片上

原位检测 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 分布的方法变得尤为重要。早已经有试验证实 SNA 能够特异性识别 SA α 2,6Gal 序列^[22]; 而 MAA 能够特异性地识别包含 SA α 2,3Gal 末端的低聚糖^[23]。因此笔者决定尝试使用



A: 虎喉头; B: 虎气管下段; C: 虎肺内支气管; D: 虎肺泡; E: 虎直肠。特异性识别 SA α 2,6Gal 的 DIG-SNA 和特异性识别 SA α 2,3Gal 的 DIG-MAA 与虎喉头、虎气下、虎肺内支气管、虎肺泡和虎直肠结合均为阳性 (400 \times)

A: Tiger larynx; B: Tiger lower trachea; C: Tiger bronchus; D: Tiger pulmonary alveoli; E: Tiger colon. Both DIG-labeled SNA lectin specific for SA α 2,6Gal and DIG-labeled MAA lectin specific for SA α 2,3Gal bound to tiger larynx, lower trachea, bronchus, pulmonary alveoli and colon epithelium. The images were observed under a microscope (400 \times)

图 3 凝集素染色检测虎的呼吸道及消化道上皮细胞表面 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 受体类型

Fig. 3 Existence of both SA α 2,6Gal and SA α 2,3Gal linkages on tiger respiratory tract and intestine epithelium cells was detected by lectin staining

地高辛标记的 SNA 和 MAA 免疫组化染色方法检测 SPF 鸡、鸽和虎的呼吸道和消化道黏膜上皮细胞表面 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 的分布。

笔者采用地高辛标记的凝集素检测发现, 8 周龄

SPF 鸡的喉头、气管上段、气管中段、气管下段和肺脏支气管的黏膜层上皮细胞表面都有大量的 SA α 2,3Gal, 但也有少量的 SA α 2,6Gal; 肺房上皮细胞表面只有一定量的 SA α 2,3Gal; 直肠黏膜上皮细胞上

SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal 都没有。鸡呼吸道上皮的检测结果与 Gambaryan^[8]结果一致。Gambaryan 等试验证实人流感病毒都能结合鸡的上皮细胞。Kim^[24]等检测显示 94.91%的鸡呼吸道上皮细胞 SA α 2,3Gal 为阳性, 72.67%的鸡呼吸道上皮细胞检测 SA α 2,6Gal 为阳性, Kim 发现人流感病毒和禽流感病毒均能在鸡肺脏细胞上复制。鸡的呼吸道上皮细胞表面有禽流感病毒受体和人流感病毒受体, 它既能感染禽流感病毒, 又能感染人流感病毒。因此, 鸡在潜在的流感病毒大流行中可能起中间宿主的作用。

Perkins 等^[15]采用 1997 年香港 HPAI 暴发中分离到的毒株, 通过鼻腔接种鹁鹑、家鹅、SPF 鸡和 4 周龄的鸽子。结果显示鸽不但不表现临床症状, 而且病理组织学检查、IHC 检查和病毒的分离均为阴性。本实验室研究通过滴鼻、口服和静脉注射攻毒方法也证实鸽对亚洲系 H5N1 亚型 HPAI 不易感^[14]。本研究发现 8 周龄鸽的呼吸道黏膜上皮细胞表面只有 SA α 2,6Gal, 但鸽直肠黏膜上皮细胞只表达 SA α 2,3Gal。这种结果初步解释了通过滴鼻途径攻毒鸽对 H5N1 亚型禽流感不易感染的机制。鸽喉头、气管、肺内支气管、三级支气管和肺房壁上皮细胞表面都不存在禽流感病毒的受体 (SA α 2,3Gal), 进入鸽呼吸道内的 H5N1 亚型禽流感病毒粒子的 HA 找不到适合的结合受体, 病毒不能吸附在其呼吸道上皮细胞表面, 也就不能进入细胞而感染细胞, 这解释了 H5N1 亚型禽流感病毒进入鸽体内后, 并不能在鸽体内存活、复制和增殖、从而不能够导致鸽发病或者死亡的原因。而对于口服和静脉接种禽流感病毒后鸽的不易感机制仍需进一步研究。

2004 年泰国有 2 个动物园中的虎暴发 H5N1 禽流感, 并导致虎死亡。本研究结果显示虎的喉头、气管上段、气管中段、气管下段、肺内支气管、肺泡和直肠黏膜的上皮细胞表面都有大量的 SA α 2,6Gal 和 SA α 2,3Gal。虎的呼吸道和消化道上皮细胞表面具有禽流感病毒的受体 SA α 2,3Gal, 这也解释了虎为什么对 H5N1 亚型禽流感病毒易感, 并且 H5N1 亚型禽流感病毒能引起虎的致死性病变的原因。

H5N1 亚型禽流感病毒可以通过感染禽和易感动物接触传播或通过气溶胶及与带有病毒的污染物接触而传播。当病毒粒子进入虎的呼吸道或者携带有病毒的禽肉经摄食行为进入虎的消化道后, 由于虎的呼吸道黏膜和肠道黏膜的上皮细胞表面表达有大量的禽流感病毒受体 SA α 2,3Gal, 因此 H5N1 亚型禽流感病毒

的 HA 能与上皮细胞表面的 SA α 2,3Gal 结合, 使病毒附着于细胞表面, 随后通过胞饮作用将病毒吞入, 完成病毒感染细胞的第一步; 禽流感病毒在细胞内完成核苷酸的复制、编码蛋白的合成以及病毒的组装。释放的病毒粒子侵入黏膜下层进入毛细血管, 并通过血液或淋巴液扩散到心、肝、脾、肾和脑等器官与组织, 感染各种细胞并在其中复制。禽流感病毒通过直接在细胞内复制, 导致细胞坏死, 心、肝、肺、肾和脑组织结构改变, 破坏免疫系统, 导致机体抵抗力降低, 病毒复制导致机体组织变性坏死, 使得动物自体中毒。因此 H5N1 亚型禽流感病毒感染虎后能引起患病虎的心、肺、肝、肾和脑功能不全, 从而出现发烧、精神沉郁、采食量下降、呼吸困难和昏迷等临床症状, 并最终导致其死亡。

4 结 论

在鸡、鸽、虎的呼吸道和消化道黏膜上皮细胞表面成功检测出流感病毒的受体类型。初步阐明鸡和虎对禽流感病毒易感, 而鸽对禽流感病毒不易感的可能原因。

References

- [1] 张家淮, 徐 红. 流感/禽流感病毒血凝素的分子遗传特征与其致病性. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(6): 33-37.
Zhang J H, Xu H. Genetic characterization and pathogenicity of the hemagglutinin of influenza/avian influenza virus. *Journal of Public Health and Prevent Medicine*, 2006, 17(6): 33-37. (in Chinese)
- [2] 郭潮潭, 陈 勇. 流感病毒的受体结构与跨越物种传播的分子机制. 国外医学, 流行病学传染病学分册, 2005, 32(2): 80-83.
Guo C T, Chen Y. Structure of the influenza virus receptor and the molecular mechanism of transmission cross species. *Foreign Medical Sciences Epidemiology Lemology*, 2005, 32(2): 80-83. (in Chinese)
- [3] 江经纬, 潘德敏. 流感病毒受体识别以及流感病毒跨宿主感染的分子机理. 广东畜牧兽医科技, 2006, 31(1): 24-27.
Jiang J W, Pan D M. Recognition of the influenza virus receptor and the molecular mechanism of infection spanning species. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2006, 31(1): 24-27. (in Chinese)
- [4] Connor R J, Kawaoka Y, Webster R G, Paulson J C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 1994, 205: 17-23.
- [5] Rogers G N, Paulson J C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolate: differences in receptor specificity of the H3

- hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 1983, 127(2): 361-373.
- [6] Rogers G N, D'Souza B L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology*, 1989, 173(1): 317-322.
- [7] Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, 440: 435-436.
- [8] Gambaryan A, Webster R, Matrosovich M. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken. *Archives of Virology*, 2002, 147: 1197-1208.
- [9] Ito T, Couceiro J N S S, Kelm S, Baum L G, Krauss S, Castrucci M R, Donatelli I, Kida H, Paulson J C, Webster R G, Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of Virology*, 1998, 72(9): 7367-7373.
- [10] Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland R E, J R, Chambers T M, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *Journal of Virology*, 2000, 74(24): 11825-11831.
- [11] Wan H Q, Perez D R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology*, 2006, 346: 278-286.
- [12] Kuiken T, Rimmelzwaan G, Riel D, Amerongen G, Baars M, Fouchier R, Osterhaus A. Avian H5N1 influenza in cats. *Science*, 2004, 306: 241.
- [13] Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang X W, Zhang X L, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao G F. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 2005, 309: 1206.
- [14] Liu Y H, Zhou J, Yang H C, Yao W G, Bu W D, Yang B, Song W P, Meng Y N, Lin J, Han C H, Zhu J J, Ma Z J, Zhao J Y, Wang X Q. Susceptibility and transmissibility of pigeons to Asian lineage highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. *Avian Pathology*, 2007, 36(6): 461-465.
- [15] Perkins L E, Swayne D E. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Diseases*, 2003, 47: 956-967.
- [16] Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier R A M, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theamboonlers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus D M E A, Poovorawan Y. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(12): 2189-2191.
- [17] Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, Thanawongnuwech R, Suradhat S, Pariyothorn N, Tantilertcharoen R, Damrongwattanapokin S, Buranathai C, Chaisingh A, Songserm T, Poovorawan Y. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology*, 2006, 344: 480-491.
- [18] Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwattanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, Nanthapornphiphat K, Ratanamungklanon S, Tunak E, Songserm T, Vivatthanavanich V, Lekdumrongsak T, Kasdangakonwut S, Tunhikorn S, Poovorawan Y. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(5): 699-701.
- [19] Mushtaq M H, Juan H, Jiang P, Li Y F, Li T X, Du Y J, Mukhtar M M. Complete genome analysis of a highly pathogenic H5N1 influenza A virus isolated from a tiger in China. *Archives of Virology*, 2008, 153: 1569-1574.
- [20] Ito T, Suzuki Y, Mitnaul L, Vines A, Kida H, Kawaoka Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology*, 1997, 227: 493-499.
- [21] Suzuki T, Horiike G, Yamazaki Y, Kawabe K, Masuda H, Miyamoto D, Matsuda M, Nishimura S I, Yamagata T, Ito T, Kida H, Kawaoka Y, Suzuki Y. Swine influenza virus strains recognize sialylsugar chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1997, 404: 192-196.
- [22] Shibuya N, Goldstein I J, Broekaert W F, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans W J. The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Bark Lectin Recognizes the Neu5Ac(a2-6)Gal/GalNAc Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(4): 1596-1601.
- [23] Wang W C, Cummings R D. The Immobilized Leukoagglutinin from the Seeds of *Mauckia amurensis* binds with high affinity to Complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal Sialic Acid-linked a-2, 3 to penultimate galactose residues. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(10): 4576-4585.
- [24] Kim J A, Ryu S Y, Seo S H. Cells in the respiratory and intestinal tracts of chickens have different proportions of both human and swine influenza virus receptors. *The Journal of Microbiology*, 2005, 43(4): 366-369.