

A 型流感病毒逃避免疫应答的策略*

赵 朴¹⁾ 郑玉妹^{1)**} 乔传玲²⁾ 贾贝贝¹⁾ 刘兴友¹⁾

(¹⁾河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003; (²⁾中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室, 哈尔滨 150001)

摘要 综述了 IAV 逃避抗病毒免疫策略的最新进展。A 型流感病毒(IAV)感染是人和多种动物呼吸系统疾病的主要原因, 然而不管是 IAV 引起的季节性流感暴发还是周期性的全球流感大流行, 主要归因于 IAV 逃避宿主免疫反应的策略。越来越多的证据表明, IAV 已经进化出高超的策略克服宿主的抗病毒信号, 如抗原变异和编码辅助蛋白(NS1 和 PB1-F2)。深入理解 IAV 逃避宿主免疫的策略, 有助于揭示 IAV 感染的机制和发现针对 IAV 的抗病毒药物的靶标。

关键词 A 型流感病毒, 免疫逃避, 抗原变异, NS1, PB1-F2

学科分类号 Q939.9, R392

A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)是有囊膜负链 RNA 病毒, 其基因组由 8 个节段的负链 RNA(HA, NA, NP, M, PB2, PB1, PA 和 NS)组成, 编码 11 种蛋白质^[1], 其中血凝素(hemagglutinin, HA)是 IAV 最重要的表面糖蛋白, 它能特异性结合宿主细胞表面的病毒受体唾液酸- α -2, 6- 半乳糖和 / 或唾液酸- α -2, 3- 半乳糖, 介导病毒吸附敏感细胞, 针对 HA 的抗体具有中和活性^[2]。神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是另外一种重要表面糖蛋白, 它能水解细胞表面唾液酸, 释放病毒粒子^[2], 针对 NA 的抗体虽没有中和活性, 但可以抑制病毒复制, 降低疾病的严重程度。核蛋白(nucleoprotein, NP)和基质蛋白(matrix, M)在 IAV 中比较保守, 具有型特异性, 是病毒特异性细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)重要靶标^[3], 另外, M2 作为离子通道在 HA 合成过程中控制高尔基体内的 pH 值, 在病毒脱壳时酸化病毒粒子内部环境, 是抗 IAV 药物的重要靶标。每个病毒 RNA 片段与 NP 及 3 个聚合酶亚基 PB2、PB1 和 PA 相互作用形成核糖核蛋白复合物——转录和复制病毒 RNA 的最小单位^[4], 由于其缺乏校正活性, 是病毒抗原变异的重要原因。非结构蛋白 1(nonstructural protein, NS)和近来发现的 PB1 基因可变阅读框编码的 PB1-F2 具有多种调节活性^[5], 在 IAV 免疫逃避中发挥重要作用。

在与宿主长期共进化的过程中, IAV 发展了种

种策略来逃避宿主的免疫反应, 从而在宿主群体中持续存在, 并不时造成疾病的流行或大流行, 不仅给畜禽养殖业造成重大的经济损失, 而且对人类健康构成严重威胁。IAV 对宿主致病性的强弱在很大程度上与其逃避宿主免疫反应能力的高低相关, 因此, 深入理解 IAV 逃避宿主免疫防御反应的策略, 不仅有助于揭示 IAV 致病的机制, 而且有助于发现药物设计的靶标, 从而为 IAV 感染的预防和治疗奠定基础。

1 抗原变异

IAV 的基因组由 8 个节段的负链 RNA 组成, 复制时由病毒的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP)催化, 由于 RDRP 缺乏校正活性, 大约每合成 10^4 个核苷酸就会掺入一个突变。另外, 病毒亚型由表面糖蛋白 HA 和 NA 决定, 到目前为止, HA 已有 16 个亚型, NA 也有 9 个亚型^[6], 不同的 HA 和 NA 的组合就能形成新的病毒亚型, 并且亚型间的交叉保护较差, 因此抗原变异是 IAV 的重要特征。根据病毒蛋白的位置不同, 可分为表面蛋白变异和内部蛋

* 河南科技学院博士启动基金资助项目(6002)。

** 通讯联系人。

Tel: 0373-3040718, E-mail: yszheng2003@163.com

收稿日期: 2008-01-21, 接受日期: 2008-03-03

白变异.

1.1 表面蛋白变异

HA 和 NA 是 IAV 最重要的表面抗原, 针对 HA 的抗体具有中和作用, 对病毒感染和疾病发生有很好的保护作用, 针对 NA 的抗体能降低疾病的严重程度. 由于 RNA 病毒基因组复制时保真度较低, HA 或 / 和 NA 的抗体结合位点内突变积累能导致一些抗体结合能力丧失, 如抗原漂移. 因此, 针对早先毒株的抗体不能有效抑制突变病毒, 从而导致突变病毒易于在部分免疫群体中传播开来. 在 1943/1944 和 1944/1945 流感季节有效的疫苗, 在 1947 年完全丧失免疫预防作用, 进一步研究发现, 1943 年病毒株和 1947 年病毒株在 HA 和 NA 抗原性及其氨基酸序列方面存在显著差异^[7]. 最近, Humberd 等研究表明, 感染野鸡后 41 天分离病毒的抗原性不同于其亲本 H10 病毒, 在 HA 和 NA 中有相应的突变. 进一步分析发现, 在亲本 H10 和突变 H10 病毒间存在 10 个氨基酸差别, 其中 4 个位于 HA 分子的潜在抗原位点, 并且抗原变异株感染鸡散毒时间延长. 另有研究表明, 家禽普遍免疫接种后会导致 IAV 抗原性漂移^[8]. 这说明不管是在自然条件下, 还是在免疫接种条件下, IAV 都能通过抗原漂移逃避宿主的免疫反应.

IAV 抗原变异的另一种形式是抗原性转变, 它是指通过不同毒株间的基因重排产生带有“新”HA 或 / 和 NA 亚型的流感毒株, 这种抗原性变异较大的重组毒株甚至能引起全球性流感大流行, 并且相关病死率显著增加. 有记载的好几次流感大流行都与 IAV 的抗原性转变有关^[9]. 1957 年的亚洲流感含有 H2 HA, 1968 年香港流感大流行由 H3 HA 流感病毒引起, 1977 年俄罗斯流感大流行是 H1 HA 流感病毒在较年轻人群中的再现.

1.2 内部蛋白变异

CD8⁺ CTL 通过识别病毒感染细胞上主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子呈递的病毒抗原肽, 在清除病毒感染的保护性免疫反应中发挥重要作用. 病毒逃避 CTL 的重要策略就是在 CTL 表位或这些表位侧翼序列中引入氨基酸突变. 这些侧翼序列对病毒蛋白在细胞质中加工成 CTL 表位 (通常是 9 个氨基酸的肽) 非常重要, 而表位序列本身对结合 MHC I 类分子和病毒特异性 CTL 识别都很关键^[10], 因此, CTL 表位内部或 CTL 侧翼序列突变可能伴随 CTL 介导靶细胞裂解能力降低.

就 IAV 来说, NP 和 M 是病毒特异性 CTL 反应的主要靶标. 至今已经鉴定的大多数 CTL 表位比较保守, 然而, 近来已经证明 NP 中氨基酸变异与病毒逃避特异性 CTL 有关. 1993/1994 流感季节中, 病毒株 HLA-B*2705 限制性表位 NP_{383~391} (SRYWAIRTR) 和 HLA-B*08 限制性表位 NP_{380~388} (ELRSRYWAI) 的锚定残基 NP₃₈₄, 发生突变 R384G, 导致变异株完全替换了携带野生型表位的病毒株, 并且完全逃避了特异性 CTL 的识别^[10, 11].

Berkhoff 等^[12]进一步研究发现, 在体外 R384G 突变严重影响了流感病毒特异性 T 细胞反应. 另外一个流感病毒 CTL 表位变异的例子是 HLA-B*3501 限制性 CTL 表位, 分析表明, 这一优势免疫表位内出现广泛的氨基酸序列变异, 变异株以年代次序出现, 而且对较早变异株特异的 CTL 不能识别较近的 IAV 病毒株^[13], 表明变异株逃避了 CTL 免疫. 最近, 在 NS1 中发现一个氨基酸替换导致流感病毒逃避 CTL 的 HLA-A*0201 限制性表位 NS1_{122~130}^[14].

由此不难看出, IAV 既能通过表面糖蛋白的突变逃避宿主的体液免疫反应, 而且能通过内部蛋白质的突变逃避宿主的 CTL 反应.

2 编码辅助蛋白

在和宿主的长期共进过程中, IAV 除了通过抗原变异来逃避宿主的免疫反应外, 还通过编码辅助蛋白 (NS1 和 PB1-F2) 干扰宿主的抗病毒免疫反应, 从而达到免疫逃避的目的.

2.1 NS1

IAV NS1 含有 N 端的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 结合功能域和 C 端的效应功能域, 是对抗细胞抗病毒活性的多功能蛋白和毒力因子, 不仅能干扰天然免疫反应, 而且能干扰宿主获得性免疫反应.

2.1.1 干扰宿主天然免疫反应. IFN- α/β 系统是宿主防御病毒感染的第一道防线. 研究表明, IAV NS1 能从多个水平干扰 I 型 IFN 的抗病毒功能: a. 转录水平, 维甲酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene I, *RIG-I*) 产物是胞质溶胶中识别病毒双链 RNA 诱导 IFN- β 的感知元件 (sensor), NS1 能结合 RIG-I, 并抑制下游干扰素调节因子-3 激活, 从而阻止 IFN- β 转录激活^[15]; b. mRNA 转录后加工及运输, 一方面 NS1 通过结合切割与多腺苷酸化特异因子 (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF) 30-kDa 亚基阻断 IFN- β

mRNA 的转录后加工^[16], 另一方面, NS1 能靶向 mRNA 输出结构和核孔复合物, 导致 mRNA 核输出障碍, 并且下调促进 IFN 表达的核孔蛋白 98^[17]; c. 抑制抗病毒效应分子活性, NS1 N 端 dsRNA 结合结构域通过抑制 IFN- α/β 诱导的 2'-5' 寡腺苷酸合成酶 (oligo (A) synthetase, OAS) /RNase L 活性来保护病毒避免 IFN- β 诱导的抗病毒状态^[18]. 双链 RNA 激活蛋白激酶 PKR 是 IFN 诱导的重要抗病毒效应分子, 激活形式的 PKR 能通过磷酸化真核起始因子 eIF-2 α 阻断病毒蛋白合成. 另外, NS1 能直接结合 PKR N 端并抑制其激活^[19], 从而逃避 PKR 的抗病毒效应.

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是宿主细胞天然抗病毒反应. Tompkins 等(2004 年)研究表明, IAV 核蛋白或酸性聚合酶保守区域的特异小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)能不依赖于 IFN 抗病毒反应, 广谱抑制 H5 和 H7 亚型禽流感病毒在小鼠体内复制, 显著降低了感染小鼠肺内的病毒滴度, 并能保护小鼠抵抗致死性攻毒. 与此相对应, RNAi 途径关键成分 Dicer 失活引起流感病毒产量增加, 病毒感染细胞凋亡加速. 值得注意的是, 在 Vero 细胞和产生 IFN 肺泡上皮细胞 A549 中, IAV 在 mRNA 水平和蛋白质水平靶向干扰 Dicer 功能^[20], 这说明 IAV 与宿主细胞在 RNAi 途径存在着“对抗”. 已有研究表明, HIV-1 Tat 能废除 Dicer 将前体 dsRNA 加工成 siRNA 而阻断细胞的 RNAi 抗病毒反应^[21]. 最近发现, NS1 能代替 HIV-1 Tat RNA 沉默抑制子, 帮助 Tat 缺失 HIV-1 变异株复制^[22], 这说明 NS1 可能是 IAV 抵抗宿主 RNAi 的功能性 RNA 沉默抑制子.

2.1.2 干扰宿主获得性免疫反应. 树突状细胞 (dendritic cell, DC)是连接天然免疫和获得性免疫反应的桥梁, 在参与天然免疫应答、提取、加工并提呈抗原、调节 B 细胞功能及 T 细胞亚群的分化等方面发挥重要作用. 最近, Fernandez-Sesma 等^[23]对携带或不携带 NS1 基因的重组流感病毒进行研究, 发现, NS1 能特异性抑制 DC 成熟、迁移和 T 细胞刺激活性的诱导, 弱化 DC 成熟和 DC 诱导 T 细胞反应的能力, 从而导致 IAV 感染的人 DC 具有较低的激活 Th1 细胞能力. 因此, NS1 能通过抑制 DC 成熟帮助 IAV 逃避宿主的获得性免疫反应.

2.2 PB1-F2

PB1-F2 是近来发现的新毒力因子, 它由 IAV

PB1 基因的第二个开放读码框编码, 由其 C 端两亲 α 螺旋介导^[24, 25], 定位于病毒感染细胞的内、外线粒体膜, 并能促进病毒感染细胞的凋亡, 尤其是肺泡巨噬细胞的凋亡^[4]. 而肺泡巨噬细胞位于肺中空气 - 组织界面, 是与吸入的微生物和颗粒性抗原相互作用的初始细胞, 一方面作为天然免疫的一部分发挥免疫监视功能, 不断从感染组织和器官清除外源抗原, 另一方面作为抗原提呈细胞, 将入侵抗原呈递给 CD4⁺ 辅助性 T 细胞而诱导获得性免疫. 因此, 肺泡巨噬细胞的大量凋亡不仅损害了宿主天然免疫, 而且损害了宿主的获得性免疫, 从而妨碍了宿主有效清除感染病毒. 这也得到了试验的进一步证实. PB1-F2 敲除 IAV 和野生型 IAV 感染小鼠后 3 天在肺中复制水平相似, 表明 PB1-F2 敲除没有损害病毒复制. 5 天后 PB1-F2 敲除病毒被清除, 然而, 鼠肺中野生型病毒的检测能达到 7 天, 并且野生型病毒感染鼠肺中的病毒滴度较高、对小鼠的致病性较强^[26].

3 结 语

IAV 引起人和多种动物的呼吸系统疾病, 不仅造成重大的经济损失, 而且对人类健康构成重大威胁, 但是目前对 IAV 感染的预防和治疗方法还很有限, 而 IAV 感染难以控制的重要因素就是它对宿主强大免疫系统的逃避作用. 因此, 深入理解 IAV 逃避宿主免疫反应的策略, 不仅有助于我们认识它免疫逃避的作用机理, 揭示其致病机制, 而且有助于发现新的预防和治疗靶标, 从而为有效控制 IAV 感染奠定基础. 在这方面也取得了喜人的进展. 针对 IAV 基因组的易变性, Zhou 等^[27]以 M 和 NP 为靶点的 siRNA 有效地抑制了不同亚型 IAV (包括 H5N1 高致病性禽流感病毒分离株)复制. 另有研究表明, NS1 能通过它的两个锌指结构 F2F3 结合细胞 CPSF30, 抑制细胞 mRNA 前体 (包括 IFN- β)加工, 突变失活 NS1 结合位点显著致弱病毒, 并且细胞核内表达 F2F3 的 MDCK 能通过阻断 NS1 结合 CPSF30 而抑制 IAV 的复制^[28], 这说明 NS1 的 CPSF30 结合位点是开发针对 IAV 抗病毒药物的潜在靶标. 最近, Baskin 等^[29]用 NS1 截短的致弱流感病毒通过呼吸道免疫猕猴, 同源病毒攻毒后, 与传统的甲醛灭活全病毒疫苗相比, 前者激发更多 IFN 敏感基因表达, 在免疫后即产生了坚强的天然免疫反应, 接着产生了更全面的攻毒后免疫反应——有力的流感病毒特异性 CD4⁺ T 细胞增殖,

IgG 产生及肺组织中 T 细胞和 B 细胞途径的转录诱导.

参 考 文 献

- Chen W, Calvo P A, Malide D, *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 2001, **7**(12): 1306~1312
- Kash J C, Basler C F, García-Sastre A, *et al.* Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus. *J Virol*, 2004, **78**(17): 9499~9511
- Heiny A T, Miotto O, Srinivasan K N, *et al.* Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS ONE*, 2007, **2**(11): e1190
- Muramoto Y, Takada A, Fujii K, *et al.* Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol*, 2006, **80**(5): 2318~2325
- Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, *et al.* Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*, 2005, **1**(1): e4
- Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, **79**(5): 2814~2822
- Kilbourne E D, Smith C, Brett I, *et al.* The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(16): 10748~10752
- Lee C W, Senne D A, Suarez D L. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J Virol*, 2004, **78**(15): 8372~8381
- Both G W, Sleight M J, Cox N J, *et al.* Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol*, 1983, **48**(1): 52~60
- Voeten J T, Bestebroer T M, Nieuwkoop N J, *et al.* Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*, 2000, **74**(15): 6800~6807
- Rimmelzwaan G F, Boon A C, Voeten J T, *et al.* Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*, 2004, **103**(1~2): 97~100
- Berkhoff E G, Boon A C, Nieuwkoop N J, *et al.* A mutation in the HLA-B*2705-restricted NP383-391 epitope affects the human influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte response *in vitro*. *J Virol*, 2004, **78**(10): 5216~5222
- Boon A C, de Mutsert G, Graus Y M, *et al.* Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Virol*, 2002, **76**(5): 2567~2572
- Boon A C, de Mutsert G, Fouchier R A, *et al.* The hypervariable immunodominant NP418-426 epitope from the influenza A virus nucleoprotein is recognized by cytotoxic T lymphocytes with high functional avidity. *J Virol*, 2006, **80**(12): 6024~6032
- Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo Y M, *et al.* Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*, 2007, **81**(2): 514~524
- Noah D L, Twu K Y, Krug R M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*, 2003, **307**(2): 386~395
- Satterly N, Tsai P L, van Deursen J, *et al.* Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(6): 1853~1858
- Min J Y, Krug R M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(18): 7100~7105
- Li S, Min J Y, Krug R M, *et al.* Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*, 2006, **349**(1): 13~21
- Matskevich A A, Moelling K. Dicer is involved in protection against influenza A virus infection. *J Gen Virol*, 2007, **88**(Pt 10): 2627~2635
- Bennasser Y, Le S Y, Benkirane M, *et al.* Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, 2005, **22**(5): 607~619
- Haasnoot J, de Vries W, Geutjes E J, *et al.* The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog*, 2007, **3**(6): e86
- Fernandez-Sesma A, Marukian S, Ebersole B J, *et al.* Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein. *J Virol*, 2006, **80**(13): 6295~6304
- Gibbs J S, Malide D, Hornung F, *et al.* The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol*, 2003, **77**(13): 7214~7224
- Yamada H, Chounan R, Higashi Y, *et al.* Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Lett*, 2004, **578**(3): 331~336
- Zamarin D, Ortigoza M B, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol*, 2006, **80**(16): 7976~7983
- Zhou H, Jin M, Yu Z, *et al.* Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Res*, 2007, **76**(2): 186~193
- Twu K Y, Noah D L, Rao P, *et al.* The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target. *J Virol*, 2006, **80**(8): 3957~3965
- Baskin C R, Bielefeldt-Ohmann H, García-Sastre A, *et al.* Functional genomic and serological analysis of the protective immune response resulting from vaccination of macaques with an NS1-truncated influenza virus. *J Virol*, 2007, **81**(21): 11817~11827

Strategies Exploited by Influenza A Virus for Evading Immune Responses*

ZHAO Pu¹⁾, ZHENG Yu-Shu^{1)**}, QIAO Chuan-Ling²⁾, JIA Bei-Bei¹⁾, LIU Xing-You¹⁾

¹⁾*Department of Animal Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;*

²⁾*Harbin Veterinary Research Institute of The Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Animal Influenza Laboratory of The Ministry Agriculture, Harbin 150001, China)*

Abstract Influenza A virus(IAV) infection is a major cause of respiratory disease in human and many kinds of animals, however, either seasonal “flu” outbreaks or periodic world-wide pandemics caused by IAV is mainly attributed to strategies exploited by IAV for evading antiviral immune responses of the host. There is growing evidence that IAV has evolved highly sophisticated strategies to overcome the antiviral signaling, such as antigen variation and encoding accessory proteins(NS1 and PB1-F2). A better understanding of the strategies exploited by viruses for evading the immunity is helpful for us to reveal the pathogenesis of IAV infection and discover targets for the development of antiviral reagents directed against IAV. Therefore, the latest progress on strategies exploited by IAV for evading antiviral immunity are reviewed.

Key words IAV, immune escape, antigen variation, NS1, PB1-F2

*This work was supported by a grant from Doctoral Found of Henan Institute of Science and Technology(6002).

**Corresponding author.

Tel: 86-373-3040718, E-mail: yszheng2003@163.com

Received: January 21, 2008 Accepted: March 3, 2008