

H5N1亚型禽流感病毒对鸡的致病性研究进展

廖明*, 曹伟胜*, 罗开健, 任涛, 张桂红, 徐成刚, 辛朝安

(农业部养禽与禽病防治重点开放实验室, 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 对鸡感染 H5N1 亚型禽流感病毒 (AIV) 后的临床表现、大体病变、病理组织学、生理生化指标、细胞免疫功能、病毒的组织分布和细胞凋亡的研究进展进行概述, 探讨了该病毒对鸡高致病性的分子基础。

关键词: 禽流感病毒; H5N1 亚型; 致病性

中图分类号: S858.3; R184; 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)03-0001-05

Advances in Pathogenicity of H5N1 Subtype Avian Influenza Virus to Chicken

LIAO Ming, CAO Wei-sheng, LUO Kai-jian, REN Tao, ZHANG Gui-hong, XU Cheng-gang, XIN Chao-an

(Key Laboratory of Poultry Feeding & Diseases Control, Ministry of Agriculture;

College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The clinical behavior, gross lesions, histopathological changes, pathophysiological changes, cellular immunity, virus distribution in tissues and apoptosis induced after chickens were infected by H5N1 AIV were reviewed. The molecular basis of highly pathogenicity of H5N1 AIVs to chicken was also discussed.

Key words: avian influenza virus; H5N1 subtype; pathogenicity

禽流感是由 A 型流感病毒引起的一种家禽和野禽的感染和/或疾病综合征。A 型流感病毒可分为多个亚型, 目前已经鉴定出的血凝素 (HA) 有 H1 ~ H16^[1]、神经氨酸酶 (NA) 有 N1 ~ N9 亚型。其不同 HA 和 NA 亚型组合的流感病毒的致病性可以是显著不同的。按照 A 型流感病毒对鸡的致病性, 可分为高致病性禽流感病毒 (HPAIV) 和低致病性禽流感病毒 (LPAIV)。由 HPAIV 引起的禽流感是世界动物卫生组织 (OIE) 和我国农业部法定的动物 A 类传染病。到目前为止, 所有高致病性禽流感均是由 H5 或 H7 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 引起的。

H5N1 亚型禽流感在 1959 年首先报道发生于英格兰的发病鸡群^[2]。第 2 次爆发是在 1991 年英格兰的一个火鸡群^[2]。历史上的第 3 起 H5N1 HPAI 则于

1997 年发生在中国香港, 不仅引起大批感染鸡的死亡和淘汰, 而且导致 18 人受感染, 其中 6 人死亡^[3]。由此, H5N1 亚型 HPAI 引起全世界的关注, 而在这以后的近 7 年时间里, H5N1 亚型 AIV 不仅屡次造成养禽业的巨大损失^[4-8], 而且自 2004 年以来该病毒频频突破种间屏障, 致使越南、泰国、柬埔寨、印尼、中国、伊拉克、土耳其、阿塞拜疆等国家有近 200 人感染, 100 多人死亡^[9-12]。另外 H5N1 亚型禽流感病毒正以惊人的速度传播, 现已经跨越欧亚大陆, 进入欧洲 (如法国、德国、意大利、匈牙利、奥地利、俄罗斯、斯洛文尼亚、罗马尼亚、乌克兰、克罗地亚、土耳其、保加利亚、以色列、波兰、瑞典、瑞士、希腊和丹麦等国家), 甚至非洲的尼日利亚、埃及和喀麦隆也有爆发 H5N1 禽流感的报道^[13]。以至于世界卫生组织 (world health organization, WHO) 不断发出警告, 将流

收稿日期: 2006-03-26

作者简介: 廖明 (1968-) 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30100136, 30471291); 国家科技攻关计划项目 (2004BA519A12, 2004BA519A19, 2004BA519A35-加强, 2004BA519A46)

* 对本文的贡献相同

感大流行的警示级别提高到3级,人类可能正面临新的高致死性流感病毒的袭击. 由于H5N1亚型HPAIV的天然宿主是鸡,所以该病毒对鸡的致病性及致病机理一直是兽医界和医学界密切关注的问题之一,揭开这一谜底对了解H5N1亚型HPAIV的跨宿主传播机制具有十分重要的意义,本文就此进行简要综述.

1 鸡感染H5N1亚型HPAIV后的临床表现

H5N1亚型HPAIV感染鸡后主要表现为精神萎靡,羽毛蓬乱,食欲下降,嗜睡,呼吸困难,拉黄白、黄绿色稀粪,并有震颤、扭脖等神经症状,死亡一般发生在感染后2~7 d,死亡率可高达100%^[2,14-15].

2 鸡感染H5N1亚型HPAIV后的大体病变

HPAIV对鸡的感染是系统性的. Acland等^[16]对1983年美国流行的H5N2亚型HPAIV对鸡与火鸡进行人工发病,发现大体剖检病变主要有严重的肺充血、水肿,脾脏肿胀、出血,坏死性胰腺炎,心肌呈白色条索状坏死,消化道出血等. Kobayashi等^[17]的研究也得到类似的结果. Perkins等^[18]研究发现A/Chicken/Hongkong/220/1997(H5N1)毒株感染鸡后的大体病变主要表现为脾脏肿胀,肺充血、水肿,肠道粘膜、骨骼肌及肠道淋巴结出血. 罗开健^[19]对H5N1亚型HPAIV的研究发现病死鸡鼻腔黏液增多,鼻黏膜潮红出血,按压鼻孔有带血鼻液;颈部及胸部皮下充血、出血,腿部、胸部肌肉出血;喉头、气管充血、出血,气管、支气管有大量黏液;肺淤血、出血;食道与腺胃交界处、腺胃乳头、腺胃黏膜、腺胃与肌胃交界处、肌胃角质膜下有出血点或出血斑;胰腺呈小斑点状出血或黄白色坏死点;脾脏肿胀,部分病鸡可见有白色小坏死点;十二指肠、回肠充血、出血;肾脏淤血、出血;胸腺、法氏囊不同程度萎缩;部分鸡心脏可见白色条纹状坏死,脑膜充血、水肿. 可见,多器官的出血和坏死是H5N1亚型HPAIV系统性感染的显著特点.

3 鸡感染H5N1亚型HPAIV后的病理组织学变化

Kobayashi等^[17]对2株H5亚型HPAIV对鸡的组织病理学研究发现:病毒主要造成全身性微血管内皮细胞肿胀、出血,血管周围淋巴样细胞增生与微血管内血栓形成. Perkins等^[18]研究发现A/Chicken/

Hongkong/220/1997(H5N1)毒株感染鸡后的组织病理学变化主要为多器官的渗出、出血、坏死、炎症,其中尤其以肺、心、脑、脾、肾上腺最易受到侵害. 罗开健^[18]的报道表明:鸡感染H5N1亚型HPAIV后24 h,心脏、肝脏、肾脏、胰腺、肺、大脑等器官开始出现病理变化. 感染后40 h,病变已非常明显和典型. 其中心肌纤维间隙扩张、出血,肌纤维坏死、溶解,淋巴样细胞浸润,结缔组织增生,呈典型的病毒性心肌炎征象. 胰腺血管扩张充血,腺泡上皮细胞变性、坏死、溶解,坏死灶内腺泡结构模糊,属于典型的坏死性胰腺炎. 肝脏血窦扩张淤血,肝细胞肿胀、颗粒变性、坏死、溶解,汇管区附近淋巴细胞增生,呈现急性病毒性肝炎的变化. 肾脏发生急性肾小球肾炎、肾小管变性坏死和间质性肾炎. 大脑出现坏死性、非化脓性脑炎变化,脑膜水肿,毛细血管周隙扩张、水肿,血管充血形成微血栓,胶质细胞增生,神经元变性、坏死. 脾脏发生坏死性脾炎,红髓与白髓充血、出血,脾小体淋巴细胞大量坏死、缺失,脾脏正常结构消失. 胸腺充血、出血,淋巴细胞严重坏死、崩解、缺失,网状上皮细胞增生,胸腺萎缩,皮质减少、髓质增生. 法氏囊间质淤血,淋巴小结内淋巴细胞变性、坏死、崩解,史丹纽氏细胞扩张,形成许多囊泡. 肺脏主要表现为出血性、卡他性和支气管间质性肺炎的变化,三级支气管和呼吸毛细管有大量红细胞和大量含蛋白的渗出液,肺间质淤血、水肿,部分呼吸毛细管代偿性扩张形成肺气肿,肺支气管旁及肺间质淋巴样细胞增生. 以上重要实质器官在病毒感染后短时间内发生严重损伤是造成鸡只迅速大量死亡的重要原因.

4 鸡感染H5N1亚型HPAIV后血清生化指标的变化

HPAIV感染后可引起鸡一些血清成分发生明显的变化. 罗开健^[19]对鸡感染H5N1亚型HPAIV后血清中一些酶的变化情况进行了检测,结果发现天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酐(Cre)、尿酸(UA)、乳酸脱氢酶(LDH)、乳酸脱氢酶-I(LDH-I)、肌酸激酶(CK)和肌酸激酶同工酶-MB(CK-MB)等呈显著升高的趋势,而胆碱酯酶(ChE)则呈显著下降趋势,表明感染鸡的心肌、肝脏及肾脏受到病理损伤. 其中LDH、LDH-I、CK及CK-MB在攻毒后第2~5 d极显著升高,表明心肌损伤是该病毒感染鸡的一个重要病理特征之一. Hien等^[20]发现越南10例确诊的H5N1流感病毒感染患者刚入院治疗时血检指标也有异常,表现在丙氨酸转氨酶和天门冬氨酸转氨酶升高(5/6);血糖升高(3/4).

5 鸡感染 H5N1 亚型 HPAIV 后细胞免疫机能变化

机体在抗病毒初次感染的早期免疫应答中主要依赖特异性 T 淋巴细胞免疫反应,因此,通过对 CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 等细胞亚群变化的检测,可以敏感地反映机体在感染早期的免疫应答状态. 罗开健^[19]利用鼠抗鸡 CD3 (FITC 标记)、CD4 (R-PE 标记)和 CD8 (R-PE 标记)单克隆抗体对感染 H5N1 亚型 HPAIV 的实验鸡的外周血 T 淋巴细胞进行了标记,并用流式细胞仪检测了 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞亚群的动态变化情况. 结果发现攻毒后第 2~5 d 外周血中 CD3⁺T 淋巴细胞亚群和 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞亚群占淋巴细胞的比例显著低于对照组,而攻毒后第 3~4 d CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞亚群也表现出同样的变化规律,这表明鸡只感染 H5N1 亚型 HPAIV 后,机体的细胞免疫机能迅即显著下降. Hien 等^[20]报道了越南 10 名确诊病例在刚入院治疗时的几项实验室血检指标:总白细胞数平均为 $2.1 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ (变化范围为 $1.2 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$);总淋巴细胞数平均为 700 mm^{-3} (变化范围为 $250 \sim 1\,000 \text{ mm}^{-3}$);CD4⁺:CD8⁺ 比率平均为 0.7 (变化范围为 0.59~1.08;血小板的平均数为 $7.5 \times 10^4 \text{ mm}^{-3}$ (变化范围为 $4.5 \times 10^4 \sim 1.74 \times 10^5 \text{ mm}^{-3}$). 可见实验室血检指标中有以下几个显著特征:①淋巴细胞明显减少(正常值为 $4.0 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^5 \text{ mm}^{-3}$);②血小板明显减少(正常值为 $1.5 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^5 \text{ mm}^{-3}$);③CD4⁺:CD8⁺ 的细胞比率显著倒转(正常值为 1.4~2.0). 其中 2 位幸存者的淋巴细胞和 CD4⁺:CD8⁺ 细胞比例恢复正常. CDC-USA^[21]和 WHO^[22]也报道了泰国 5 名患者中有 4 名患者的淋巴细胞减少. 由此可见,H5N1 AIV 感染后对人的免疫防御系统造成很大的损伤,促进了病程的发展.

6 H5N1 亚型 HPAIV 感染鸡后的病毒分布特点

6.1 免疫组化法检测病毒抗原分布

高致病性禽流感病毒侵入鸡体后,可在其体内迅速繁殖,利用免疫组化可以定位病毒的靶器官及病毒分布状况. Perkins 等^[18]利用免疫组织化学方法检测了鸡感染 H5N1 亚型毒株后病毒核蛋白抗原的分布情况,结果发现在肺、呼吸道上皮、脾脏、肝脏、胸腺、胰腺、羽毛囊、脑、心脏、法氏囊等多种组织器官中均有阳性信号. 罗开健^[19]进一步利用免疫组织

化学 S-P 法对病毒感染试验鸡后核蛋白抗原的分布进行了动态检测,发现在攻毒后 12 h,试验鸡的肝细胞、肝枯否氏细胞、胰腺腺泡上皮细胞、肾小管上皮细胞、心肌纤维细胞的细胞浆中即出现明显的阳性信号. 大脑则偶尔可在锥体细胞胞浆检测到阳性信号. 但其研究也发现法氏囊、脾脏、胸腺、肺脏在接种后各时间点上所取的样品都检测不到阳性信号. 这与 Perkins 等^[18]的报道不同,其原因尚不明确. Muro-moto 等^[23]将反向遗传重组技术获得的一株 H5N1 HPAIV 经静脉注射途径感染鸡,攻毒后 12 h 时在脾、肺、心、鸡冠、脑、肝和肾等器官均可检测病毒抗原,此时外周血以及脾脏中的单核细胞和巨噬细胞均为流感病毒抗原阳性细胞. 由此可见,H5N1 亚型 HPAIV 感染后可在短时间内复制并分布到各个组织器官,形成系统性感染.

6.2 原位 RT-PCR 方法检测病毒 RNA 分布

与免疫组化检测抗原的原理不同,原位 PCR 的设计思路是将 PCR 的高效率扩增与原位杂交的细胞定位相结合,从而在组织细胞原位检测微量拷贝的靶 DNA 或者靶 RNA 序列. 由于原位检测信号得到放大,所以该方法的检测敏感度较高^[24]. 曹伟胜^[25]利用自行建立的原位 RT-PCR 方法检测了 1 株 H5N1 亚型 HPAIV 感染鸡后侵染重要实质器官的动态情况. 结果表明:攻毒后 24 h,即可从心脏、肝、肾、肺、小肠和胰腺检测到病毒 RNA,其中心脏、肾、肺和小肠首次检出时间还要更早一些(攻毒后 12 h),且针对病毒 RNA 的检测信号主要位于各个脏器的实质细胞,如肾小管上皮细胞、血管内皮细胞和心肌细胞,这提示病毒在这些重要实质细胞内进行了大量复制. 虽然与 Saif 等^[2]的报道略有不同,但均反映出心脏、肝、肾、小肠、肺、胰腺等实质器官是病毒相对早期的靶器官,攻毒后 12~24 h 是病毒在体内复制和传播的关键时期. 病毒的复制会严重影响实质细胞的功能,甚至发生细胞凋亡和坏死,从而促进病程的恶性发展.

7 H5N1 亚型 HPAIV 感染鸡后诱导多种组织细胞凋亡

体外试验已经证实:不同来源(禽源、猪源、马源和人源)的 A 型流感病毒均可以诱导多种细胞培养物发生细胞凋亡^[26-31]. Mori 等^[32]发现 A 型流感病毒可以引起小鼠体内细胞的凋亡. Ito 等^[33]报道了 H5N1、H5N2 和 H7N7 亚型 AIV 经鼻内途径感染 SPF 鸡后诱导细胞凋亡的现象. 其中,H5N1 亚型病毒在接种后第 3 d 即可诱导肝脏、肾脏和大脑组织出现明

显的细胞凋亡 TUNEL 阳性信号. 曹伟胜^[25]将 1 株 H5N1 亚型 HPAIV 经点眼滴鼻途径感染 4 周龄非免疫石岐杂雏鸡后 36 h, 在心、肝、脾、肺、肾、法氏囊、胸腺和胰腺等组织器官发现了细胞凋亡 TUNEL 信号, 其中以法氏囊、胸腺的细胞凋亡最为明显. 法氏囊是 B 细胞发育和分化的主要场所, 也是免疫球蛋白基因分化及基础抗体库形成和扩展所必需的场所, 在体液免疫应答中起着举足轻重的作用, 并兼有外周免疫器官的功能. 胸腺则是淋巴干细胞增殖分化为成熟 T 细胞的主要场所, 直接影响机体的细胞免疫功能. 显然这些重要免疫器官出现明显的细胞凋亡将严重影响机体的体液免疫和细胞免疫功能, 造成机体抗感染能力和免疫调节能力严重下降. 因此, 诱导多器官发生明显的细胞凋亡很可能是 H5N1 亚型 AIV 高致病性的一种重要表现形式.

8 H5N1 亚型 HPAIV 对鸡高致病性的分子基础

在禽流感病毒编码的 11 种蛋白中, HA 基因编码的血凝素对病毒的致病性起着决定性作用, 尤其是 HA 裂解位点的氨基酸组成对病毒的致病性起主要作用^[2,23]. 目前的绝大多数 H5N1 亚型分离株其 HA 蛋白裂解位点均含有连续 4、5 或 6 个碱性氨基酸^[3-8,10,34], 这样的结构除了易被呼吸道和/或消化道上皮细胞中的丝氨酸蛋白酶裂解外, 还易被广泛存在于鸡多种组织细胞中的蛋白酶(如 Furin/PAGE、PC5/PC6 等)所裂解, 因此病毒一旦感染便可迅速突破器官屏障, 引起机体全身性的感染, 导致高致死性疾病. 除此之外, 研究者还发现 HA 切割位点附近的寡糖侧链结构^[34]、HA 蛋白的受体位点结构^[3,10]、NA 蛋白茎部氨基酸是否发生缺失^[3,36]、NS1 蛋白 92 位氨基酸 D→E 的点突变^[37]、PB2 蛋白 627 位氨基酸 D→K 的点突变^[10,38]和 PB2 蛋白 701 位 D→N^[39]点突变均与 AIV 的致病性有某种联系, 这表明 H5N1 亚型 HPAIV 的致病力是多种基因产物共同作用的结果.

总之, H5N1 亚型 HPAIV 的发生和流行不仅给世界养禽业带来灾难性的损失, 而且对人类健康也构成严重威胁. 探索 H5N1 亚型 HPAIV 对鸡的致病机理将有利于揭示其高致病性的基础, 为进一步做好禽流感和人流感的防控工作有重要意义. 目前有关 H5N1 亚型 HPAIV 对鸡致病性的研究虽已取得明显进展, 但距离全面准确阐述其病理损伤机制、变异机制和跨宿主传播机制等问题可能还有很长的路要走.

参考文献:

- [1] 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]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2 814-2 822.
- [2] SAIF Y M. Diseases of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003: 135-160.
- [3] 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 [J]. *Science*, 1998, 279(5 349): 393-396.
- [4] CHEN H, DENG G, LI Z, et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(28): 10 452-10 457.
- [5] GUAN Y, POONM L L, CHEUNG C Y, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21): 8 156-8 161.
- [6] VISESHAKUL N, THANAWONGNUWECH R, AMONSIN A, et al. The genome sequence analysis of H5N1 avian influenza A virus isolated from the outbreak among poultry populations in Thailand [J]. *Virology*, 2004, 328(2): 169-176.
- [7] WAN X F, REN T, LUO K J, et al. Genetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in southern China during the 2003-04 avian influenza outbreaks [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(6): 1 257-1 266.
- [8] KWON Y K, SUNG H W, JOH S J, et al. An outbreak of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 in broiler breeders, Korea [J]. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(11): 1 193-1 196.
- [9] WHO. Avian influenza [J]. *Weekly Epidemiological Record*, 2005, 88(27): 233-240.
- [10] GOVORKOVA E A, REHG J E, KRAUSS S, et al. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004 [J]. *J Virol*, 2005, 79(4): 2 191-2 198.
- [11] WHO. Avian influenza [J]. *Weekly Epidemiological Record (WER)*, 2006, 81(1-7): 1-68.
- [12] YU Hong-jie, SHU Yue-long, HU Shi-xiong, et al. The first confirmed human case of avian influenza A (H5N1) in Mainland China [J]. *Lancet*, 2006, 367(9 504): 84.
- [13] OIE. Update on avian influenza in animals (type H5) [EB/OL]. [2006-03-24]. http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm.
- [14] 辛朝安. 禽病学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 47-57.
- [15] SWAYNE D E, PANTIN-JACKWOOD M. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry [J]. *Dev Biol (Basel)*, 2006, 124: 61-67.

- [16] ACLAND H M, SILVERMAN-BACHIN L A, Eckroade R J. Lesions in broiler and layer chicken in a virus infection [J]. Vet Pathol, 1984, 21: 564-569.
- [17] KOBAYASHI Y, HORIMOTO T, KAWAOKA Y, et al. Neuropathological studies of chickens infected with highly pathogenic avian influenza viruses [J]. J Comp Pathol, 1996, 114(2): 131-147.
- [18] PERKINS L E, SWAYNE D E. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species [J]. Vet Pathol, 2001, 38(2): 149-164.
- [19] 罗开健. 不同宿主来源 H5N1 亚型 AIV 致病机理与遗传变异研究 [D]. 广州: 华南农业大学兽医学院, 2005.
- [20] HIEN T T, LIEM N T, DUNG N T, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam [J]. N Eng J Med, 2004, 350(12): 1 179-1 188.
- [21] CDC-USA. Cases of influenza A (H5N1)-Thailand [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2004, 53(5): 97-100.
- [22] WHO. Avian influenza A (H5N1) [J]. Weekly Epidemiological Record, 2004, 79(7): 65-76.
- [23] MURAMOTO Y, OZAKI H, TAKADA A, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens [J]. Microbial Immunol, 2006, 50(1): 73-81.
- [24] 苏慧慈, 刘彦仿. 原位 PCR [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 39-162.
- [25] 曹伟胜. H5N1 亚型 AIV 的基因变异分析与发病机制研究 [D]. 广州: 华南农业大学兽医学院, 2004.
- [26] HINSHAW V S, OLSEN C W, DYBDAHL-SISSOKO N, et al. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses [J]. J Virol, 1994, 68(6): 3 667-3 673.
- [27] TAKIZAWA T, MATSUKAWA S, HIGUCHI Y, et al. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells [J]. J Gen Virol, 1993, 74 (11): 2 347-2 355.
- [28] STRAY S J, AIR G M. Apoptosis by influenza viruses correlates with efficiency of viral mRNA synthesis [J]. Virus Res, 2001, 77(1): 3-17.
- [29] HORNICKOVA Z. Different progress of MDCK cell death after infection by two different influenza virus isolates [J]. Cell Biochem Funct, 1997, 15(2): 87-93.
- [30] BRYDON E W, SMITH H, SWEET C. Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits pro-inflammatory cytokine release [J]. J Gen Virol, 2003, 84 (9): 2 389-2 400.
- [31] LI Hong, XIAO Li-ying, LI Hua-lin, et al. Apoptosis in Raji cell line induced by influenza A virus [J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116 (9): 1 321-1 324.
- [32] MORI I, KOMATSU T, TAKEUCHI K, et al. *In vivo* induction of apoptosis by influenza virus [J]. J Gen Virol, 1995, 76 (11): 2 869-2 873.
- [33] ITO T, KOBAYASHI Y, MORITA T, et al. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens [J]. Virus Res, 2002, 84(1-2): 27-35.
- [34] KEAWCHAROEN J, AMONSIN A, ORAVEERAKUL K, et al. Characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of recent influenza virus isolates from different avian species in Thailand [J]. Acta Virol, 2005, 49 (4): 277-280.
- [35] HULSE D J, WEBSTER R G, RUSSELL R J, et al. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens [J]. J Virol, 2004, 78(18): 9 954-9 964.
- [36] MATROSOVICH M, ZHOU Nan-nan, KAWAOKA Y, et al. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties [J]. J Virol, 1999, 73 (2): 1 146-1 155.
- [37] SEO S H, HOFFMANN E, WEBSTER R G. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses [J]. Virus Res, 2004, 103: 107-113.
- [38] SHINYA K, HAMM S, HATTA M, et al. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice [J]. Virology, 2004, 320(2): 258-266.
- [39] GABRIEL G, DAUBER B, WOLFF T, et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (51): 18 590-18 595.

【责任编辑 柴 焰】