

H5 亚型禽流感病毒分离株对金刚烷胺耐药性的鉴定

曹伟胜, 徐成刚, 任涛, 罗开健, 张桂红, 廖明

(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1株H5亚型禽流感病毒(AIV)分离株进行了金刚烷胺耐药性的鉴定. 应用RT-PCR获得了AIV 178株的M基因, 序列分析显示M2蛋白有S31N的点突变; 动物试验发现该毒株对200 mg/L金刚烷胺饮水途径给药仍有抗性. 结果表明AIV 178分离株具有对金刚烷胺的耐药性, 而且M2蛋白的第31位氨基酸突变可能与此有关.

关键词:禽流感病毒; H5N1亚型; 金刚烷胺耐药性

中图分类号: S858.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2006)04-0082-04

The Identification of Amantadine-Resistance of an H5 Subtype Avian Influenza Virus Isolate

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

(Key Lab of Poultry Feeding & Diseases Control, Ministry of Agriculture,

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

Abstract: The amantadine-resistance of an H5 subtype avian influenza virus (AIV) isolate was characterized. The M gene of AIV 178 isolate was obtained by RT-PCR, and sequence analysis showed that M2 protein contained S31N substitution. Animal trial revealed that the isolate was resistant to the treatment of 200 mg/L amantadine via drinking water. The results suggested that AIV 178 isolate was amantadine resistant, and the position 31 amino acid point mutation in M2 protein may confer the resistance.

Key words: avian influenza virus; H5N1 subtype; amantadine-resistance

近年来, 禽流感(avian influenza, AI), 尤其是H5亚型高致病性禽流感, 屡屡给养禽业造成严重的危害, 其公共卫生意义也日渐凸显^[1]. 其病原禽流感病毒(AIV)的基因组是由8个单股负链的RNA片段组成, 经常发生抗原漂移或抗原漂变等突变, 还出现与金刚烷胺耐药性有关的基因突变, 这种突变主要位于M基因^[2-3]. 金刚烷胺(amantadine)和金刚乙胺(rimantadine)是A型流感病毒的离子通道抑制剂, 目前常作为人流感病毒的治疗药物^[4]. 因此各国一般都禁止在养禽业中使用这类抗流感药物来防控禽流感, 我国也于2005年出台了相关管理规定. 2004年我国多个省份爆发了H5N1亚型AI的流行^[5], 我们在疫情普查时, 曾分离到多株H5N1亚型AIV, 其

中一株编号为AIV 178毒株的分离地区曾违规使用过金刚烷胺, 故本研究拟分别从基因序列分析、细胞试验和动物试验验证该毒株对金刚烷胺是否有抗性, 及分析其作用机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 H5亚型禽流感病毒A/Chicken/Guangdong/178/2004(H5N1)(简称AIV 178株)和A/Goose/Guangdong/1/1996(H5N1)(简称AIV Go株)由华南农业大学禽病研究室分离、纯化和保存, 其鸡胚半数感染量(EID₅₀)分别为10^{8.3}和10^{6.1}; 新城疫病毒(NDV)及AIV的阳性血清均由华南农业大学

收稿日期: 2006-04-20

作者简介: 曹伟胜(1975—), 男, 讲师, 博士; 通讯作者: 廖明(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金(5300835); 国家科技攻关计划课题(2004BA519A12、2004BA519A19、2004BA519A35 - 加强、2004BA519A46); 广东省自然科学基金创新团队项目(5200638)

禽病研究室提供。

1.1.2 试验动物 9~11 d SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通公司。1 日龄石岐杂雏鸡购于华南农业大学动物科学院试验养禽场,在华南农业大学禽病研究室 ABSL3 实验室负压隔离器饲养至 25 d,期间不做任何免疫,HI 血清学检测禽流感抗体为阴性者用于本研究。

1.1.3 $\varphi = 1\%$ 鸡红细胞悬液 参照 GB/T 18936—2003^[6] 的方法,从隔离饲养的无禽流感病毒抗体的健康成年公鸡心脏采血,最后配成 $\varphi = 1\%$ 的红细胞悬液。

1.1.4 细胞及培养液 犬肾(madin-darby canine kidney, MDCK)细胞由华南农业大学禽病研究室保存。细胞营养液:用 Dulbecco's MEM(GIBCO BRL)配制。细胞维持液:含 $\varphi = 2\%$ 小牛血清的 Dulbecco's MEM 营养液。

1.1.5 其他试剂 E. Z. N. A.® HP Viral RNA Kit 为美国 Omega 公司产品,Reverse Transcriptase XL (AMV)和 TaKaRa Ex Taq™ DNA 聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品;反转录引物及扩增全长 M 基因片段的引物(上游引物 Ms: 5' AAG ATG AGT CTT CTA ACC GAG GTC 3',下游引物 Mx: 5' TTA CTC CAG CTC TAT GTT GAC AAAA 3')由华南农业大学禽病研究室提供。

1.1.6 药物 金刚烷胺:浙江康裕制药有限公司,批号 KY-AH-N20050829。金刚烷胺储存液:将金刚烷胺用灭菌蒸馏水配成 10 mg/mL,无菌过滤后,4℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 M 基因的 RT-PCR 扩增与序列分析 病毒 RNA 的提取参照 E. Z. N. A.® HP Viral RNA Kit 说明书进行,cDNA 第一链的合成参照 Reverse Transcriptase XL (AMV)使用说明书进行;RT 产物的 PCR 扩增按宝生物工程(大连)有限公司 TaKaRa Ex Taq™ DNA 聚合酶的说明书进行;将 RT-PCR 扩增产物直接送上海博亚生物技术有限公司用 ABI 公司 3730 型自动序列测定仪进行测序。将测序结果用 DNASTAR 基因分析软件进行序列分析。

1.2.2 金刚烷胺对 MDCK 细胞生长的安全浓度测定 用细胞维持液将金刚烷胺倍比稀释为 8.0×10^{-3} 、 1.6×10^{-2} 、 3.1×10^{-2} 、 6.2×10^{-2} 、0.125、0.250、0.500、1.000、2.500、5.000 和 10.000 mg/mL。用加有不同稀释度金刚烷胺的细胞培养液于 37℃ 含 $\varphi = 5\%$ CO₂ 条件下培养 MDCK 细胞 72 h,观察药物对细胞的影响。另设不加任何药物的正常 MDCK 细胞为

对照。最终以能维持细胞正常生长的最高稀释浓度作为该药物对细胞的安全浓度。

1.2.3 金刚烷胺对病毒生长的影响 待 96 孔细胞培养板中的 MDCK 细胞基本长成单层后,用 PBS 平衡盐溶液洗 2 次,将 $100 \mu\text{L } 10^{-1} \sim 10^{-10}$ 倍稀释的 AIV 178 株接种于 MDCK 细胞中,每个稀释度各 7 孔,然后等量加入安全浓度的金刚烷胺溶液,每个稀释度的第 8 孔只加病毒,不加金刚烷胺溶液,作为产生细胞病变的阳性对照;另选 8 个孔只加金刚烷胺溶液,不加病毒,观察药物对细胞的影响;最后 8 孔为细胞正常对照,培养 48 h 后,检测每一孔的 HA 效价,按 Reed-Muench 法计算 AIV 178 株的组织细胞半数感染量(TCID₅₀)。

1.2.4 毒株对金刚烷胺敏感性的动物试验 将 100 只 1 日龄石岐杂雏鸡隔离饲养到 25 日龄,期间不做任何免疫,随机分成 5 组,每组 20 只。第 1、2、3 组为药物试验组,从 26 日龄起开始给药,分别经饮水途径给予 50、100 和 200 mg/L 的金刚烷胺,连用 7 d。用药 3 d 后,将 AIV 178 株尿囊液稀释 1 000 倍,通过肌肉注射途径进行攻毒,每只鸡 0.2 mL。第 4 组为攻毒不给药对照组,攻毒剂量及途径与第 1、2、3 组相同。第 5 组为不攻毒不给药对照组。各组隔离饲养,自由采食饮水。攻毒后观察 14 d,每日记录鸡只的临床症状和死亡数,剖检发病死亡鸡以及试验结束时扑杀的存活鸡只,观察病变并做病毒分离鉴定。

2 结果与分析

2.1 M 基因的 RT-PCR 扩增与基因序列分析

利用 1 对 M 基因引物从 AIV 178 株毒株的 cDNA 中扩增出约 1.0 kb 的基因片段,与预期扩增长度相符;测序结果表明所获得的 M 基因长度为 1 027 bp;其中包括 2 个编码框(ORF) M1 和 M2;M1 的 ORF 是连续的,长度为 759 个核苷酸,可编码 252 个氨基酸组成的 M1 蛋白;而 M2 的 ORF 是非连续的,编码 M2 蛋白基因 5'端的前 26 个核苷酸与编码 M1 蛋白基因的 5'端相同,紧接着长达 688 个核苷酸的间隔区,然后紧接此间隔区的 268 个核苷酸构成编码 M2 基因的另一部分编码序列,其 ORF 长度为 294 个核苷酸,预计编码由 97 个氨基酸组成的 M2 蛋白。对 M2 蛋白的推导氨基酸序列分析表明:AIV 178 毒株与一些 H5N1 亚型 AIV 参考毒株相比^[1,7],在第 31 位氨基酸发生了 S31N 的点突变(图 1),根据已报道金刚烷胺耐药性产生的分子特征^[2,3],AIV 178 株 M2 蛋白 S31N 点突变提示了该分离株可能具有对金刚烷胺的耐受性。

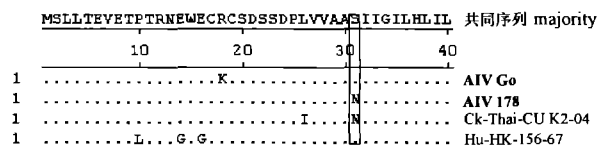


图1 H5N1亚型AIV M2蛋白的部分氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparison of partial amino acid sequence of M2 protein of H5N1 AIVs

2.2 金刚烷胺对MDCK细胞生长的影响

结果显示,金刚烷胺质量浓度不同,对细胞的影响也不同,质量浓度越大,对细胞的毒性也越大.当金刚烷胺的质量浓度 $> 2.500 \text{ mg/mL}$ 时,与单层MDCK细胞接触2 h后,即可引起细胞成片脱落;当金刚烷胺质量浓度降低到 $3.1 \times 10^{-2} \sim 2.500 \text{ mg/mL}$ 时,则只有部分细胞脱落,形成网状或游离于单层细胞表面.金刚烷胺的质量浓度 $\leq 1.6 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$ 时,未发现MDCK细胞的生长有异常表现,与不加药物的对照组细胞生长一致.因此 $1.6 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$ 可定为金刚烷胺对MDCK细胞的安全浓度.

2.3 金刚烷胺对病毒生长的影响

AIV 178株在MDCK细胞的TCID₅₀为 $0.1 \times 10^{-3.5} \text{ mL}$,而加入 $1.6 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$ 金刚烷胺后的TCID₅₀为 $0.1 \times 10^{-2.5} \text{ mL}$.结果显示,在对MDCK细胞安全浓度下,A型流感病毒特异性药物金刚烷胺使AIV 178分离株的生长滴度下降了10倍,但AIV 178株在金刚烷胺药物的作用下在MDCK细胞上仍生长良好,引起细胞病变.

2.4 动物试验

除第5组外,其他各组均在攻毒后2~3 d出现典型的临床症状,表现为精神沉郁,羽毛松乱,呼吸困难,头面部皮肤水肿、发绀,鸡腿部皮肤充血出血,并伴有神经症状,病理变化表现出喉头、气管充血出血,肾肿大出血,胰腺坏死等典型的高致病性禽流感病毒感染症状.攻毒后7~8 d,除第5组外其他各组几乎全部死亡,具体死亡情况见表1.从表1可以看出,50和100 mg/L的金刚烷胺对鸡保护力为零,

表1 不同剂量金刚烷胺对AIV 178株攻毒的保护率

Tab. 1 The protection rate of different concentrations of amantadine to the challenge of AIV 178 strain

组别 group	ρ (金刚烷胺) amantadine /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	死亡鸡数 dead chickens/只	保护率 protection rate/%
1	50	20	0
2	100	20	0
3	200	18	10
4	0	20	0
5	0	0	100

200 mg/L的金刚烷胺也只能产生很低的保护力,即与对照组相比,金刚烷胺作为A型流感病毒的特异性药物作用在试验中未有表现,不能完全抑制AIV 178株在鸡体内的增殖及致病作用.

3 讨论

禽流感病毒的基因组是由8个单股负链的RNA片段组成,包括HA、NA、NP、NS、M、PA、PB1和PB2,编码10或11个蛋白.其中的M片段可分别编码位于病毒囊膜的类型脂双层内侧和核衣壳外侧的M1蛋白及构成流感病毒跨膜离子通道M2蛋白^[2].M2蛋白由24个氨基酸组成的N端胞外域、19个氨基酸组成的疏水区及54个氨基酸组成的胞浆尾组成^[2].M2蛋白形成一个同源四聚体跨膜 α 螺旋束,作为H⁺通道.该离子通道在生理性pH下关闭,当pH ≤ 6.2 时被激活,离子通道的开关与通道孔中的M2蛋白第37位氨基酸组氨酸(H37)有关^[8].M2蛋白H⁺通道活性对流感病毒的复制周期至关重要,主要表现为:(1)在发生流感病毒胞吞作用和内体酸化后,M2蛋白被激活,导致病毒内部的同步酸化.这种酸化削弱了病毒RNA和病毒核衣壳之间的键连接;(2)在病毒释放过程中,M2蛋白H⁺通道活性可确保外来体不被酸化,这样阻止了病毒血凝素最终形成酸化启动的不可逆转的构象变化^[9].因此如果有分子能够阻断M2通道,则该分子将是有效的抗流感药物.金刚烷胺就属于这类分子,可有效封闭M2通道,从而抑制流感病毒的复制^[10].

目前禽流感不仅对全球养禽业构成持续的威胁和危害,且越来越多的人担心禽流感正在演变为人类流感大流行的可能性^[1].曾让许多人庆幸的是,除了严格的生物安全措施之外,还有疫苗可预防和控制禽流感大规模爆发,从而阻断禽流感病毒向人的传播.目前我国已许可的禽流感疫苗有H9N2亚型禽流感灭活疫苗、H5N2亚型禽流感灭活疫苗、H5N1亚型禽流感灭活疫苗以及禽流感-新城疫重组二联活疫苗等.而对于人流感的防治,除了WHO每年发布的流感疫苗外,自从20世纪60年代以来,一些流感病毒特异性药物相继上市,如金刚烷胺、扎那米韦和奥司他韦等,这些药物在流感的治疗中起到非常重要的作用^[3].但是令人关注的是流感病毒耐药性毒株的出现,尤其是对金刚烷胺有耐药性毒株的报道屡见不鲜.如Ilyushina等^[11]发现2000~2004年间,东南亚地区31.1%的H5亚型禽流感病毒分离株和10.6%的H9亚型禽流感病毒分离株具有对金刚烷胺的耐药性;同时期美国有16.4%的H7亚型禽流感病毒分离株也有对金刚烷胺的耐药性.

金刚烷胺耐药性形成的分子基础是构成流感病毒离子通道的 M2 蛋白跨膜区的第 26、27、30 和 31 位氨基酸残基发生了 L26P、V27A、V27T、A30T、A30V、S31N 或者 S31R 中任意一突变^[3,11-12], 这些位点的突变削弱或消除了 M2 离子通道的活性, 形成了金刚烷胺耐药性。Le 等^[13] 从一个接受过药物治疗的越南禽流感女孩患者体内分离到一株具有奥司他韦耐药性的毒株, 且该毒株的 NA 蛋白携带有 H274Y 的点突变。对于这种耐药性产生的原因, 一般认为除了流感病毒本身的 RNA 基因组基因突变累积的结果外, 药物的选择作用也起着重要的作用, 尤其是在饲料中长时间低剂量添加这些抗病毒药物。

从细胞试验看, AIV 178 株与 1.6×10^{-2} mg/mL 金刚烷胺作用 72 h 后, 病毒滴度仅下降了 10 倍; 而 AIV Go 株与相同浓度的金刚烷胺作用 72 h 后, 病毒滴度下降了 1 000 倍以上(将另文发表)。从动物试验来看, 高达 200 mg/L 的金刚烷胺仍然不能有效保护鸡免受 AIV 178 株感染引起的死亡; 而 100 mg/L 的金刚烷胺就能使实验鸡免受 AIV Go 株的侵害, 保护率达 100%。序列分析表明本研究中的 AIV 178 株与 AIV Go 株的 M2 蛋白相比, 在第 31 位氨基酸发生了 S→N 的点突变, 这完全符合金刚烷胺耐药性的分子结构基础^[11-12]。结果提示: AIV 178 株具有对金刚烷胺的耐药性。该毒株的分离地区曾违规长时间使用过金刚烷胺, 其耐药性产生很可能与此有关。值得注意的是, 在鸡饲料或饮水添加金刚烷胺的危险性不仅仅局限于耐药性的产生^[14]。

自从 1997 年香港禽流感事件以来, H5N1 亚型 AIV 就引起了全世界的关注, 不仅屡次造成养禽业的巨大损失, 还频频突破人类的种间屏障, 到目前已经造成 10 多个国家和地区的 200 多人感染和 100 多人死亡^[15]。WHO 为此多次发出做好人类大流行准备的警告, 其中包括疫苗和药物的准备。因此无论是具金刚烷胺耐药性 H5 亚型禽流感毒株的出现^[16], 还是具奥司他韦耐药性 H5 亚型禽流感毒株的出现^[13,17] 都给人类预防流感大流行提出了新的课题。尽管本研究结果只是局限于一个国内 H5 亚型禽流感分离株的分析和实验, 但是也可以提醒人们要密切监测国内禽流感毒株的变异和流行趋势, 为禽流感和人流感的防控提供更科学更详实的依据。

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[J]. *Science*, 1998, 279(5349): 393-396.
- [2] SAIF Y M. *Diseases of Poultry*[M]. 11th ed. USA: Iowa State Press, 2003: 135-160.
- [3] 郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 5-47.
- [4] 农业部. 农医发[2005]33 号关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知[J]. *兽药与饲料添加剂*, 2006, 11(1): 25.
- [5] 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): 1257-1266.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18936—2003. 高致病性禽流感诊断技术[S/OL]. (2005-07-20) [2005-08-10]. <http://home0.heima.com/web/Pagel.srf?userid=894603&columnno=5&rowid=22>.
- [7] PUTHAVATHANA P, AUEWARAKUL P, CHAROENYING P C, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(2): 423-433.
- [8] PINTO L H, HOLSINGER L J, LAMB R A, et al. Influenza virus M2 protein has ion channel activity[J]. *Cell*, 1992, 69(3): 517-528.
- [9] ASTRAHAN P, KASS I, COOPER M A, et al. A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug[J]. *Proteins*, 2004, 55(2): 251-257.
- [10] TAKEDA M, PEKOSZ A, SHUCK K, et al. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture[J]. *J Virol*, 2002, 76(3): 1391-1399.
- [11] ILYUSHINA N A, GOVORKOVA E A, WEBSTER R G. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia[J]. *Virology*, 2005, 341(1): 102-106.
- [12] SUZUKI H, SAITO R, MASUDA H, et al. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study[J]. *J Infect Chemother*, 2003, 9(3): 195-200.
- [13] LE Q M, KISO M, SOMEYA K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus[J]. *Nature*, 2005, 437(7062): 1108.
- [14] 李静, 乔健, 赵立红, 等. 金刚烷胺对蛋鸡毒副作用初步观察[J]. *中国兽医杂志*, 2004, 40(3): 42-43.
- [15] WHO. Avian influenza[J]. *Weekly epidemiological record (WER)*, 2006, 81(1-7): 1-68.
- [16] CDC, USA. High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents—United States, 2005-06 influenza season[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2006, 55(2): 44-46.
- [17] ABED Y, GOYETTE N, BOIVIN G. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(2): 556-559.