

邢燕茹, 祝宇翔, 范春燕, 等. 6株 H9N2 亚型禽流感病毒分子特征及遗传演化分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (2): 89-97.

XING Y R, ZHU Y X, FAN C Y, et al. Molecular characterization and genetic evolution of six H9N2 subtype avian influenza virus strains [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (2): 89-97.

## 6株 H9N2 亚型禽流感病毒分子特征及遗传演化分析

邢燕茹<sup>1</sup>, 祝宇翔<sup>1</sup>, 范春燕<sup>1</sup>, 于海<sup>2\*</sup>, 汪秀会<sup>1\*</sup>

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056038;

2. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241)

**摘要:** 为了解 H9N2 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 的分子变化特征及其跨物种传播的可能性, 对实验室保存的 6 株 H9N2 亚型 AIV 的 8 个基因片段进行了序列测定及遗传演化分析, 并且对 6 株病毒与选取的代表毒株进行了 HA 和 NA 同源性及关键氨基酸位点分析。结果显示, 分离的 6 株病毒均为欧亚系, 其中 3 株为 G57 基因型; 4 株病毒的 HA 蛋白发生了 Q226L 突变, 2 株病毒的 HA 发生了 A190V 突变。HA 和 NA 均有增加或缺失的潜在糖基化位点。6 株病毒的 NA 茎部均有 62~64 位的缺失, 红细胞结合位点 431~433 较为保守, 而 368 和 369 位变化较大。综上, 6 株病毒为低致病性 AIV, HA 和 NA 均含有哺乳动物适应性突变, 增大了其跨宿主传播的风险。研究结果为我国 H9N2 亚型 AIV 的进化提供了参考依据, 为其综合防控提供了理论指导。

**关键词:** 禽流感病毒; H9N2 亚型; 分子特征; 遗传进化

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)02-0089-09

## Molecular characterization and genetic evolution of six H9N2 subtype avian influenza virus strains

XING Yanru<sup>1</sup>, ZHU Yuxiang<sup>1</sup>, FAN Chunyan<sup>1</sup>, YU Hai<sup>2\*</sup>, WANG Xiuhui<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China;

2. Shanghai Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** In order to understand the molecular characteristics of H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) and the possibility of cross-species transmission, 8 gene fragments of 6 strains of AIV preserved in the laboratory were sequenced, and their genetic evolution was analyzed. The homology of HA and NA and the key amino acid sites between 6 strains and selected representative strains were analyzed. The results showed that all the 6 strains belonged to the Eurasian lineage, and three of them were of the G57 genotype. 4 strains had Q226L mutation in HA, and 2 strains had A190V mutation in HA. Both HA and NA had increased or decreased potential glycosylation sites. 62-64 sites were absent in the NA stalk of all the 6 strains, and the hemadsorbing sites 431-433 were conserved, while the 368 and 369 sites had significant changes. In conclusion, the 6 strains were low pathogenic avian influenza viruses with mammalian adaptive mutations in both HA and NA, which increased the risk of cross-species transmission. This study supplies reference for the evolution of H9N2 subtype AIV in China, and provides theoretical guidance for comprehensive prevention and control of the virus.

**Keywords:** avian influenza virus; H9N2 subtype; molecular characteristics; genetic evolution

禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV), 属于

收稿日期: 2023-03-03; 修回日期: 2023-12-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31970175); 中国农业科学院创新工程“猪病毒性繁殖障碍疫病防控技术团队”项目; 河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目 (19422011008-45); 河北省自然科学基金资助项目 (C2020402010)

第一作者: 邢燕茹, 女, 硕士研究生

\*通信作者: 汪秀会, 讲师, 主要从事动物传染病的研究, E-mail: wxhyklhh@126.com; 于海, 研究员, 主要从事猪病毒分子流行病学、基因工程疫苗研制及分子致病机制等方向的研究, E-mail: haiyu@shvri.ac.cn.

正黏病毒科甲型流感病毒属, 是一种人畜共患病原体, 禽类是其天然的宿主。流感病毒基因组由 8 段单链 RNA 组成, 具有很高的原位重组潜力<sup>[1]</sup>。其中, H9N2 亚型 AIV 属于低致病性禽流感病毒 (low pathogenic avian influenza virus, LPAIV), 也是目前世界上传播最广泛和最具破坏性的 AIV<sup>[2]</sup>。H9N2 亚型 AIV 与其他亚型 AIV 在家禽和野生鸟类间广泛传播, 加上疫苗广泛接种的压力, 促使流感病毒不断进化, 为新型变异毒株和重组毒株的产生创造了有利条件<sup>[3-4]</sup>。H9N2 亚型 AIV 可由家禽直接或间接传播给哺乳动物, 包括人类<sup>[5-6]</sup>, 对公共卫生安全具有一定

的威胁<sup>[7]</sup>。许多学者认为 H9N2 亚型 AIV 是造成人类流感大流行的潜在风险因素<sup>[8]</sup>。目前 H9N2 亚型 AIV 是我国鸡群中流行最为广泛的病毒亚型<sup>[2]</sup>，一旦获得跨种传播的能力，很有可能对人类的生命安全造成威胁和挑战<sup>[9]</sup>。因此，要加强 H9N2 亚型 AIV 的监测和防控，对潜在的流行病学提供早期预警，以降低人类流感大流行的风险<sup>[4,10]</sup>。

为了解 H9N2 亚型 AIV 的分子变化特征及其跨物种传播的可能性，本研究对实验室保存的 6 株 H9N2 亚型 AIV 的 8 个基因片段进行序列测定和遗传进化分析，并且进一步对 6 株分离株与 6 株 H9N2 亚型 AIV 代表毒株的血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 同源性和关键氨基酸位点进行了对比分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

在河南、山东、四川等地区采集肺组织病料中分离到 6 株 AIV，分别为 A/chicken/Henan/HN1/2011 (H9N2)，A/chicken/Henan/HN2/2011 (H9N2)，A/chicken/Shandong/SD-B40/2014 (H9N2)，A/chicken/Sichuan/SC-B44/2014 (H9N2)，A/chicken/Shandong/SD-3297/2016 (H9N2)，A/chicken/Shandong/SD-3220/2016 (H9N2)，由本实验室保存。

9~11 日龄的 SPF 鸡胚，购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司；病毒 RNA 提取试剂盒，购自 Qiagen 公司；LA Taq 预混酶、反转录酶和 pMD-18T 载体，购自 TaKaRa 公司；胶回收试剂盒，购自 Omega 公司；DL2000 DNA Marker，购自全式金公司。

### 1.2 病毒扩增

6 株病毒分别接种至 5 枚 9~11 日龄 SPF 鸡胚的尿囊腔中大量增殖，除去 24 h 内死亡的鸡胚，在 37 °C 孵化箱中孵育 72 h 后将鸡胚放入 4 °C 冰箱过夜，用针管吸出鸡胚尿囊液。对鸡胚中吸出的尿囊液进行血凝检测，将血凝阳性的尿囊液保存于 -80 °C 冰箱，用于后续病毒基因组的提取，进一步分析毒株的基因序列。

### 1.3 病毒 RNA 的提取及反转录

分别提取 6 株病毒的总 RNA，将提取好的病毒 RNA 反转录为 cDNA，放入冰箱保存，温度为 -20 °C。

### 1.4 8 个基因片段 PCR 扩增及序列测定

分别以 6 株病毒的 cDNA 为模板，使用流感病毒通用引物分别对 6 株病毒的 8 个基因片段进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为：LA Taq 预混酶 25 μL，上游引物 2 μL，下游引物 2 μL，cDNA 2 μL，ddH<sub>2</sub>O

19 μL。PCR 扩增反应程序为：预变性 94 °C 3 min；变性 94 °C 30 s，退火 53 °C 30 s，延伸 72 °C 2 min 30 s，35 个循环；终延伸 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，切下与目的基因片段大小一致的片段，胶回收纯化。将含有 8 个基因片段的 PCR 产物分别连接到 pMD-18T 载体上，转化进入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，送至上海擎科生物科技有限公司进行测序。

### 1.5 HA 及 NA 同源性分析

利用 DNASTar 中的 SeqMan 软件对测序得到的各基因片段序列进行拼接，再利用 EditSeq 软件对结果进行整理，获得 6 株病毒完整的 HA 和 NA 基因序列，并翻译为氨基酸序列。从 NCBI 数据库中下载各谱系代表毒株的核苷酸和氨基酸序列，6 株代表毒株分别为 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 (H9N2)，A/Duck/Hong Kong/Y439/97 (H9N2)，A/quail/Hong Kong/G1/1997 (H9N2)，A/Chicken/Hong Kong/G9/97 (H9N2)，A/Chicken/Beijing/1/94 (H9N2)，A/Chicken/ShangHAI/F/98 (H9N2)。利用 MegAlign 7.1 软件分析 6 株分离株与 6 株代表毒株 HA 和 NA 序列的同源性。

### 1.6 8 个基因片段遗传进化分析及系统进化树的构建

从 NCBI 上下载 19 株代表毒株的 8 个基因片段序列，同时将 6 株病毒的 8 个基因片段序列提交到 NCBI 数据库上的 BLAST 模块进行比对，将同源性最高的序列作为参考序列，将分离到的 6 株病毒与 19 株代表毒株的 8 个基因片段序列利用 MEGA 7.0 软件分别进行遗传进化分析，并完成系统进化树的构建。

### 1.7 HA 和 NA 蛋白关键氨基酸位点分析

从 NCBI 数据库下载 H9N2 亚型 AIV 的 6 株代表毒株 (同 1.5) HA 和 NA 蛋白的氨基酸序列，将分离到的 6 株病毒与 6 株代表毒株的 HA 和 NA 蛋白氨基酸序列一起导入 MegAlign 7.1 软件，比较分析关键氨基酸位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒扩增

将实验室保存的 6 株病毒接种于 SPF 鸡胚，收取尿囊液后通过血凝检测鉴定病毒的分离情况，收取的 6 株病毒鸡胚尿囊液均可使 1% 鸡红细胞凝集，说明 6 株病毒均获得扩增。后续对这 6 株病毒进行病毒 RNA 提取、RT-PCR 扩增及序列测定。

将 6 株病毒分别接种至 SPF 鸡胚的尿囊腔中大量增殖，用针管吸出鸡胚尿囊液，进行血凝试验。6 株病毒鸡胚尿囊液均有较高的血凝活性，其中 SD-

B40 和 HN2 毒株为 1 : 512; HN1 和 SD-3220 毒株为 1 : 1 024; SC-B44 和 SD-3297 毒株为 1 : 2 048, 血

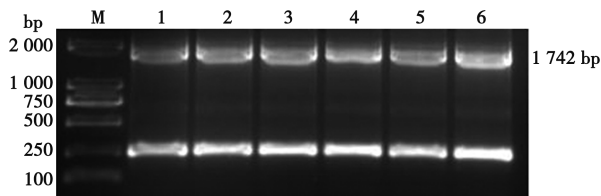
凝活性最高。具体结果见表 1。

表 1 分离株详细信息

毒株	简称	地点	时间	血凝效价
A/chicken/Shandong/SD-B40/2014 (H9N2)	SD-B40	潍坊寿光	2014	1 : 512
A/chicken/Sichuan/SC-B44/2014 (H9N2)	SC-B44	四川都江堰	2014	1 : 2 048
A/chicken/Henan/HN1/2011 (H9N2)	HN1	河南	2011	1 : 1 024
A/chicken/Henan/HN2/2011 (H9N2)	HN2	河南	2011	1 : 512
A/chicken/Shandong/SD-3297/2016 (H9N2)	SD-3297	山东	2016	1 : 2 048
A/chicken/Shandong/SD-3220/2016 (H9N2)	SD-3220	山东	2016	1 : 1 024

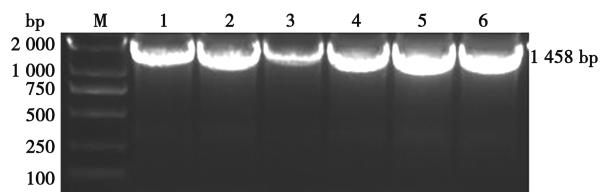
## 2.2 病毒的 8 个基因片段扩增及序列测定

提取 6 株分离株的 RNA, 将 RNA 反转录为 cDNA, 通过 PCR 对 6 株病毒的 8 个基因片段进行 PCR 扩增, 所有扩增的片段大小均与预期相符, 如图 1 为 HA 基因片段, 图 2 为 NA 基因片段, 均连接到 pMD-18T 载体上, 送至公司测序。



M. DL2000 DNA Marker; 1. SD-B40 毒株; 2. SC-B44 毒株; 3. HN1 毒株; 4. HN2 毒株; 5. SD-3297 毒株; 6. SD-3220 毒株。

图 1 6 株病毒 HA 基因片段扩增



M. DL2000 DNA Marker; 1. SD-B40 毒株; 2. SC-B44 毒株; 3. HN1 毒株; 4. HN2 毒株; 5. SD-3297 毒株; 6. SD-3220 毒株。

图 2 6 株病毒 NA 基因片段扩增

## 2.3 HA 和 NA 同源性分析

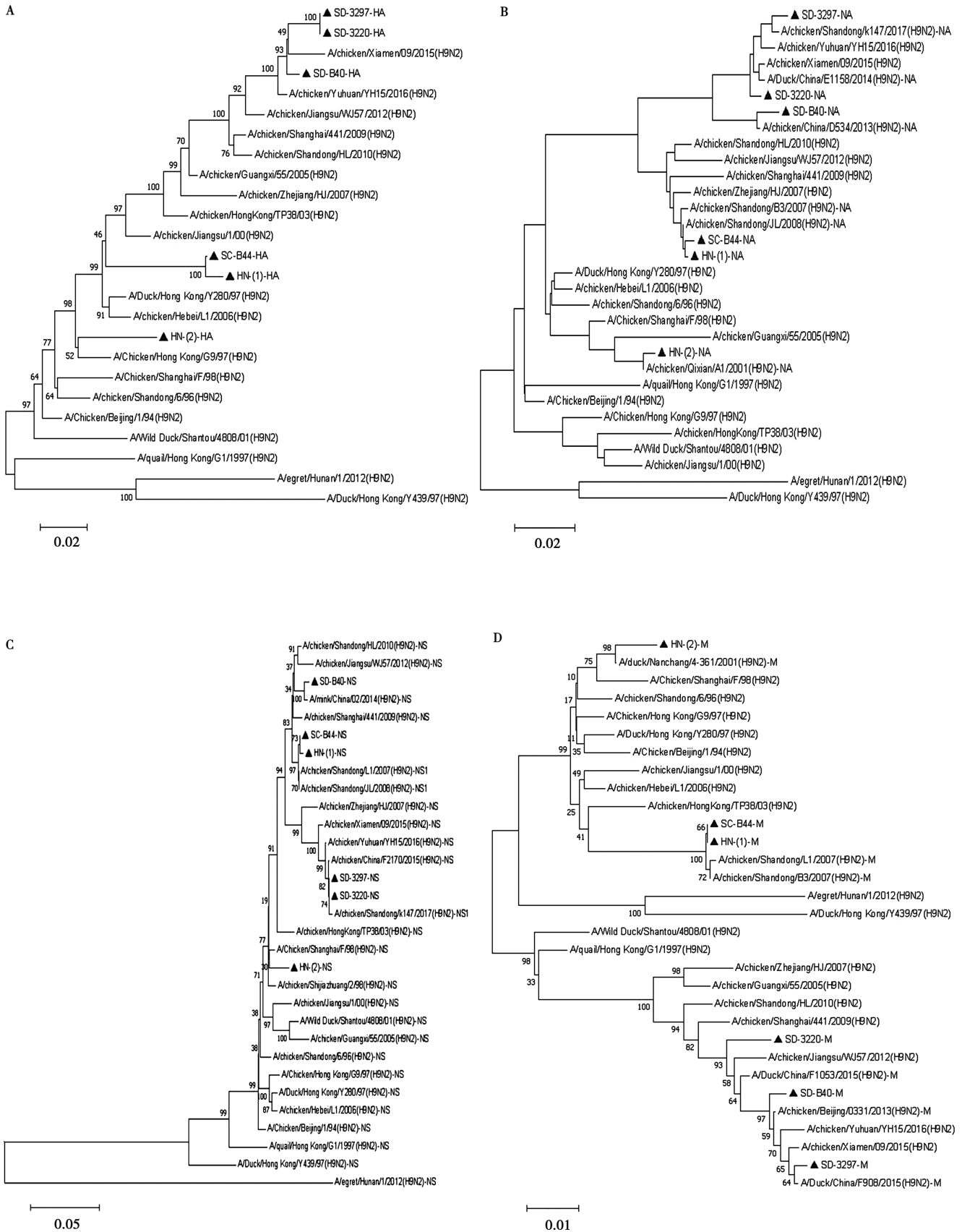
将分离到的 6 株病毒分别与 NCBI 数据库下载的 6 株代表毒株的 HA 和 NA 序列进行同源性对比分析, 结果发现, SD-3220、SD-3297、SD-B40、HN1、SC-B44 毒株的 HA 核苷酸和氨基酸序列均与 Y280 毒株同源性最高, HN1 分别为 93.9% 和 95%, SD-3220

为 89.9% 和 91.2%, SD-3297 为 89.9% 和 91.2%, SD-B40 为 90.7% 和 93%, SC-B44 为 94.6% 和 96.4%; 而 HN2 毒株核苷酸和氨基酸序列与 G9 毒株同源性最高, 为 95.7% 和 95.1%。6 株病毒与 Y439 毒株的 HA 核苷酸和氨基酸序列同源性最低, 分别为 80.6%~84.5% 和 84.8%~88.5%, 说明 6 株病毒与 Y439 谱系遗传距离较远。

NA 序列同源性分析结果显示, SD-B40、SC-B44、HN1、SD-3297 和 SD-3220 毒株 NA 核苷酸序列与 Y280 毒株同源性最高, 分别为 91%、94.5%、94.7%、90.5% 和 91.5%, HN2 毒株与 F/98 毒株同源性最高。SC-B44、HN1、SD-3297 和 SD-3220 毒株 NA 氨基酸序列与 Y280 和 F/98 毒株同为最高, 分别为 96.4%、96.4%、91.4% 和 92.3%; SD-B40 毒株与 Y280 毒株同源性最高, 为 93.2%; HN1 毒株与 F/98 毒株同源性最高, 为 97.6%。

## 2.4 8 个基因片段遗传进化分析及系统进化树的构建

对 6 株病毒及其同源性较高的毒株和各谱系代表毒株进行遗传进化分析, 同时构建了 8 个基因的系统发育进化树。结果显示 (如图 3、图 4), 这 6 株病毒均属于欧亚系, 其 HA 基因属于 Y280/G9-like 谱系, NA 基因均属于 Y280-like 谱系; 6 株病毒的 PB1、PA、NP 和 NS 基因均属于 F/98-like 谱系; 在 M 基因和 PB2 基因来源上有些差异, SC-B44、HN1 和 HN2 毒株的 M 基因和 PB2 基因均属于 F/98-like 谱系, 而 SD-B40、SD-3297 和 SD-3220 毒株的 M 基因和 PB2 基因均属于 G1-like 谱系。因此, SD-B40、SD-3297 和 SD-3220 毒株的 8 个基因来源符合 G57 基因型 (S 基因型)。



▲表示本研究分离株。下同。

图 3 HA (A)、NA (B)、NS (C) 和 M (D) 基因片段系统进化树

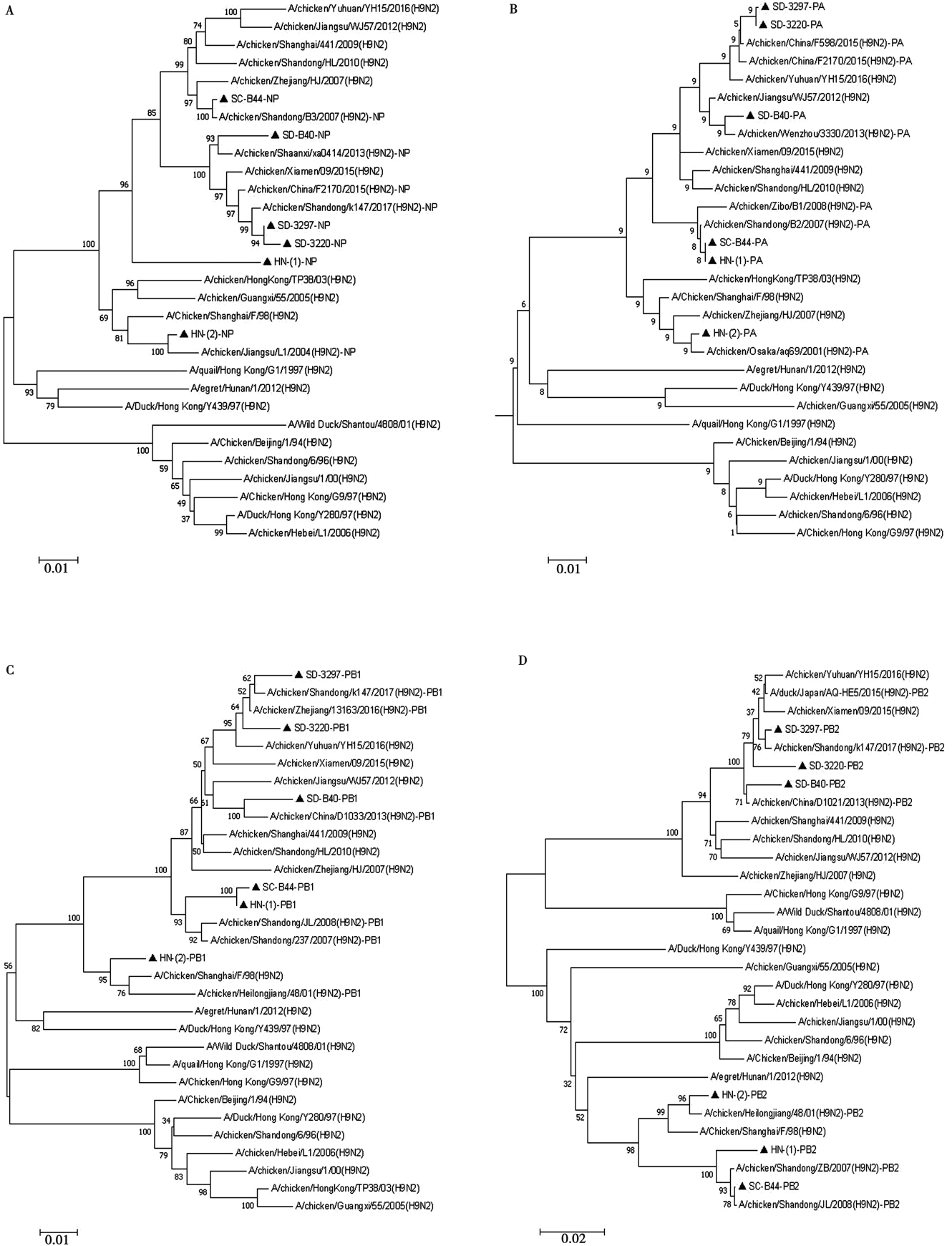


图 4 NP (A)、PA (B)、PB1 (C) 和 PB2 (D) 基因片段系统进化树

## 2.5 HA 和 NA 蛋白关键氨基酸位点分析

### 2.5.1 HA 蛋白裂解位点及受体结合关键位点分析

将 6 株病毒的核苷酸序列翻译为氨基酸序列，与 6 个代表毒株 HA 氨基酸关键位点进行对比分析，结果见表 2。HN1、SC-B44 毒株的 HA 蛋白裂解位点为 PARSSR↓GL，SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株的裂解位点为 PSRSSR↓GL，与早期各谱系代表毒株相比，第 2 位发生了由 A 变为 S 的突变，只有 HN2 毒株裂解位点为 PAKSSR↓GL，第 3 位发生了由 R 变为 K 的突变，6 株病毒的裂解位点均为非连续性碱性氨基酸，符合低致病性毒株特点。SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株受体结合位点左沿为 NGLMGR，HN1 和 SC-B44 毒株受体结合左沿为 NGQQGR，HN2 毒株受体结合左沿为 NGLQGR，与早期代表毒株相比，SD-3220、SD-3297、SD-B40、HN2 毒株发生了 Q226L 突变，可能使得这些毒株对人型 α-2，6 唾液酸受体更具有亲和性。228 位均为 G，未发生突变。SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株受体结合位点右沿为 GTSTA，HN1、HN2 和 SC-B44 毒株受体结合位点右沿为 GTSKA，与早期代表毒株相比，SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株发生了 K/A141T 突变。

表 2 HA 蛋白裂解位点、受体结合位点左沿和受体结合位点右沿分析

病毒株	裂解位点 (327~333)	受体结合位点左沿 (224~229)	受体结合位点右沿 (138~142)
F/98*	PARSSR↓GL	NGQQGR	GTSKA
BJ/94*	PARSSR↓GL	NGQQGR	GTSKA
Y280*	PARSSR↓GL	NGLQGR	GTSKA
Y439*	PAASNR↓GL	NDQQGR	GTSRA
G1*	PARSSR↓GL	NDLQGR	GTSRA
G9*	PARSSR↓GL	NGLQGR	GTSKA
SD-3220	PSRSSR↓GL	NGLMGR	GTSTA
SD-3297	PSRSSR↓GL	NGLMGR	GTSTA
SD-B40	PSRSSR↓GL	NGLMGR	GTSTA
HN1	PARSSR↓GL	NGQQGR	GTSKA
HN2	PAKSSR↓GL	NGLQGR	GTSKA
SC-B44	PARSSR↓GL	NGQQGR	GTSKA

注：\* 表示各谱系代表毒株。下同。

HA 蛋白受体结合关键位点分析结果显示（如表 3），在本试验中的 6 株病毒的 HA 蛋白受体结合关键位点第 153、183、194、220 位较为保守，均为 WNLR；第 190 和 226 位变动较大，其中 SD-3220、SD-3297 和 SD-B40 毒株发生了 A190T 突变，HN1 和 SC-B44 毒株发生了 A190V 突变。6 株病毒的 155 位均为 T，这可能会使病毒获得与人型 α-2，6 唾液酸受体结合的能力。

表 3 HA 蛋白受体结合关键位点分析

病毒株	受体结合关键位点									
	153	155	183	190	194	220	226	228	281	381
F/98*	W	T	N	A	L	R	Q	G		
BJ/94*	W	T	N	V	L	R	Q	G	K	
Y280*	W	T	N	T	L	R	L	G	K	
Y439*	W	T	H	E	L	R	Q	G	K	
G1*	W	T	H	E	L	R	L	G	K	
G9*	W	T	N	A	L	R	L	G	K	
SD-3220	W	T	N	T	L	R	L	G	K	
SD-3297	W	T	N	T	L	R	L	G	K	
SD-B40	W	T	N	T	L	R	L	G	K	
HN1	W	T	N	V	L	R	Q	G	K	
HN2	W	T	N	A	L	R	L	G	K	
SC-B44	W	T	N	V	L	R	Q	G	K	

### 2.5.2 HA 蛋白潜在糖基化位点分析

将分离的 6 株病毒与代表毒株的 HA 蛋白潜在糖基化位点进行比较分析，结果显示（如表 4），6 株病毒的第 21、105、133、290、484、543 位点较为保守，6 株病毒均有该位点。HN1 和 SC-B44 毒株共有 8 个潜在糖基化位点，SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株共有 7 个潜在糖基化位点，HN2 毒株 HA 的潜在糖基化位点仅有 6 个。相对于代表毒株，HN1 和 SC-B44 毒株发生了 137 位由 S、T 或 D 变为 N 的突变，增加了这一糖基化位点；SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株发生了 P307S 突变，增加了这一糖基化位点；SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株发生了 T212I 位突变，缺失了这一糖基化位点；HN2 毒株发生了 S299R 突变，缺失了这一糖基化位点。

表 4 HA 蛋白潜在糖基化位点分析

病毒株	潜在糖基化位点									
	21	105	133	137	210	290	297	305	484	543
SD-3220	NST	-	NVS	-	-	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
SD-3297	NST	-	NVS	-	-	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
SD-B40	NST	-	NVS	-	-	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
HN1	NST	-	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	-	NGT	NGS
HN2	NST	-	NVS	-	NRT	NTT	-	-	NGT	NGS
SC-B44	NST	-	NVS	NGT	NRT	NTT	NVS	-	NGT	NGS
F/98*	NST	-	NVS	-	NRT	NTT	NVS	-	NGT	NGS
BJ/94*	NST	-	NVT	-	NRT	NTT	NVS	-	NGT	NGS
Y280*	NST	-	NVS	-	NRT	NTT	NVS	-	NGT	-
Y439*	NST	-	NVT	-	NRT	NTT	NVS	-	NGT	-
G1*	NST	NGT	NVT	-	NRT	NTT	NVS	-	NGT	NGS
G9*	NST	-	NVS	-	NRT	NST	NIS	-	NGT	NGS

注：-表示此位点缺失。下同。

### 2.5.3 NA 蛋白关键氨基酸位点分析

对 H9N2 亚型 AIV 的 6 株代表毒株和 6 株分离株的 NA 蛋白关键氨基酸位点及潜在糖基化位点进行了对比分析，结果发现（如表 5），6 株分离株均有 62~64 位氨基酸的缺失，在 6 株代表毒株中，Y280 和 F/98 毒株有 62~64 位氨基酸的缺失。这 2 个毒株所代表的谱系在我国近 20 年的流行中占主要地位。6 株

分离株与代表毒株相比，部分 NA 糖基化位点较为保守，SD-B40、SD-3297 和 SD-3220 增加了 368 这一糖基化位点；除了 HN2 毒株，其余毒株失去了 402 这一糖基化位点。NA 蛋白的红细胞结合位点分析结果显示，6 株病毒的 431~433 位均为 PQE；368 和 369 位氨基酸变化较大，SD-B40 发生了 D401G 突变。

表 5 NA 蛋白关键氨基酸位点分析

病毒株	茎部缺失位点	潜在糖基化位点												红细胞结合位点		
	62~64	44	61	69	70	86	146	155	200	234	306	368	402	366~373	399~401	431~433
SD-B40	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	NGS	-	IKNGSRSG	DSG	PQE
SC-B44	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	-	IKSDSRSG	DSD	PQE
SD-3220	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	NGS	-	IKNGSRSG	DSD	PQE
SD-3297	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	NGS	-	IKNGSRSG	DSD	PQE
HN1	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	-	IKSDSRSG	DSD	PQE
HN2	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	NWS	IKEDSRSG	DSD	PQE
F/98*	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	NWS	IKKDSRSG	DSD	PQE
BJ/94*	TEI	-	NIT	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	NWS	IKKDSRSG	DSD	PQE
Y280*	-	-	-	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	NWS	IKEDSRSG	DSD	PQE
Y439*	TEI	-	NIT	NNT	NTT	NWS	NGT	NRT	NAT	NGT	NMT	-	NWS	ISKDSRSG	DNN	PQE
G1*	TEI	-	NIT	NNT	NTT	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	NRS	IKKDSRSG	DSD	PQE
G9*	TEI	NSS	NIT	NST	-	NWS	NGT	-	NAT	NGT	-	-	NSS	IKKDSRSG	DSD	PKE

## 3 讨论

H9N2 亚型 AIV 自 1992 年在我国广东省首次分离后，成为目前我国禽类中分布最广泛且流行率最高

的 AIV 亚型<sup>[11-12]</sup>。H9N2 亚型 AIV 容易将内部基因重新组合到其他亚型的流感病毒中，成为变异病毒基因组的供体<sup>[13]</sup>。新型重组毒株可能在家禽与家禽之间、家禽与哺乳动物之间、哺乳动物与哺乳动物之间

进行传播,对家禽业的健康发展和公众健康安全造成极大威胁<sup>[14-15]</sup>。近年来,我国人感染 H9N2 亚型 AIV 的病例逐渐增多,血清学监测显示,人类对 H9N2 亚型 AIV 的易感程度高于 H5 和 H7 亚型 AIV。因此,加强对 H9N2 亚型 AIV 的监测具有重要意义。

在我国 H9N2 亚型 AIV 流行的谱系分为几个阶段,在 2000 年之前主要为 BJ/94-like 谱系,随后逐渐被 F/98-like 谱系取代,从 2010 年开始 F/98-like 谱系逐渐被 Y280-like 谱系取代,直到现在我国普遍流行的谱系仍然为 Y280-like。本研究中的 6 株病毒均属于欧亚系,其 HA 和 NA 基因均属于 Y280/G9-like 谱系,现有的人类感染的 H9N2 亚型 AIV 数据显示, Y280/G9-like 谱系是大多数人类病例的来源<sup>[16]</sup>。6 株病毒的 PB1、PA、NP 和 NS 基因均属于 F/98-like 谱系,其中 SD-B40、SD-3297 和 SD-3220 毒株的 M 基因和 PB2 基因均属于 G1-like 谱系,因此,SD-B40、SD-3297 和 SD-3220 毒株的 8 个基因来源符合 G57 基因型。该基因型在 2007 年出现并逐渐在鸡群中稳定下来,成为当前 H9N2 亚型 AIV 流行的最主要基因型<sup>[17]</sup>。该基因型的 HA 和 NA 基因均来源于 BJ/94-like 谱系 (Y280-like 谱系)<sup>[18]</sup>,内部基因 PB1、PA、NP 和 NS 以 F/98-like 谱系作为骨架, PB2 基因和 M 基因由 F/98-like 谱系转变为 G1-like 谱系。而 SC-B44、HN1 和 HN2 毒株的 M 基因和 PB2 基因来源于 F/98-like 谱系,这可能与这些毒株分离年份较早有关。

HA 蛋白介导流感病毒附着在细胞唾液酸受体上并与宿主细胞膜融合<sup>[11]</sup>,HA 裂解位点氨基酸序列不同,可影响病毒的组织趋向性、扩散性、致病性。HPAIV 的 HA 裂解位点存在连续 4 个以上碱性氨基酸 (-RRRR-),可被宿主不同组织细胞中广泛存在的多种蛋白酶裂解,引起宿主全身感染<sup>[19-20]</sup>。LPAIV 的 HA 裂解位点一般只有单一的碱性氨基酸 (-R-)<sup>[21]</sup>,只有特异蛋白酶才能识别出这种结构的 HA 蛋白并使之发生裂解,所以病毒的增殖仅限于呼吸道和消化道等<sup>[20]</sup>。本试验所分离的 6 株病毒的 HA 裂解位点均为非连续性碱性氨基酸,符合 LPAIV 毒株特点。

当前 H9N2 亚型 AIV 的 HA 蛋白已获得优先与人型  $\alpha$ -2,6 唾液酸受体结合的能力<sup>[14]</sup>,其中 Q226L 和 G228 突变发挥了关键作用,是跨物种传播的先决条件<sup>[1,22-23]</sup>。在 2016—2020 年我国流行的 H9N2 亚型 AIV 中,99.5% 毒株 HA 蛋白 226 位为 L,表明当前我国流行毒株普遍增加了病毒跨宿主感染哺乳动物的风险<sup>[24]</sup>。本研究中 SD-3220、SD-3297、SD-B40、HN2 毒株的 HA 蛋白发生了 Q226L 突变,推测可能

具有感染人的潜在风险,但 6 株病毒的 228 位并未发生突变。有研究表明, A190V 突变可以增强病毒对宿主细胞膜的吸附能力及在小鼠体内的复制能力<sup>[10]</sup>。HA 蛋白的 A190V 突变不影响病毒与受体结合特异性,但会增强与小鼠和人类肺组织细胞受体结合的亲和力,190V 对人类具有高度亲和力,190T 次之,190A 最低。同时,HA 蛋白的 A190V 突变也是 H9N2 亚型 AIV 跨越物种屏障感染哺乳动物的重要决定因素之一<sup>[10,25]</sup>。在本研究中,SD-3220、SD-3297 和 SD-B40 的 190 位为 T。SC-B44 和 HN1 毒株的 HA 蛋白发生了 A190V 突变,病毒与小鼠和人肺组织细胞受体结合的亲和力较强,存在引起流感大流行的风险。

HA 蛋白的糖基化对防止病毒蛋白被水解、阻碍宿主抗体识别、维持蛋白三维结构的稳定性等方面发挥着重要作用<sup>[5,21,26]</sup>。本研究中 HN1 和 SC-B44 毒株的 HA 蛋白发生了 S/D137N 突变,增加了这一糖基化位点,可能导致毒力增强及抗原变异<sup>[27]</sup>。本研究中所有毒株均有 133 位糖基化位点,可以增强病毒对 SPF 鸡的毒力、组织脏器复制能力、病理损伤及体外排毒<sup>[28]</sup>,SD-3220、SD-3297、SD-B40 毒株拥有 305 位糖基化位点,但 210 位糖基化位点缺失。HA 蛋白 305 位和 210 位糖基化位点的增加可以提高病毒与宿主受体的结合能力<sup>[29]</sup>。HA 蛋白第 210 位糖基化位点的缺失降低了病毒结合鸡红细胞的能力,提高了病毒 HA 蛋白的热稳定性及病毒对鸡胚的致死性<sup>[30]</sup>。

NA 蛋白茎部的氨基酸缺失可扩大 H9N2 亚型 AIV 的宿主范围,对小鼠更易感,还可以影响病毒的毒力<sup>[31]</sup>。本研究中的 6 株病毒的 NA 均有 62~64 位氨基酸的缺失,这也可能是我国 H9N2 亚型 AIV 在我国广泛流行传播的原因之一。NA 茎部缺失可能是 H9N2 亚型 AIV 适应性突变其中的一种。SD-B40、SD-3297 和 SD-3220 增加了 368 这一糖基化位点。除了 HN2 毒株,其余毒株失去了 402 这一糖基化位点,2 个糖基化位点对病毒的影响需要进一步研究。根据红细胞结合位点分析,6 株病毒的 431~433 位点较为保守,而 368 和 369 位氨基酸变化较大。在亚洲分离的 H9N2 亚型 AIV 的红细胞结合位点一直处于特定的选择压力下,因此会产生累积突变,从而提高了病毒的适应性<sup>[25]</sup>。

随着对 H9N2 亚型 AIV 研究的深入,发现了 H9N2 亚型 AIV 的宿主范围不断扩大,其具有内部基因较高的相容性,从而致使其在哺乳动物中的致病性和传播性都在不断增强<sup>[23]</sup>。本研究的 6 株 H9N2 亚型 AIV 均为 LPAIV,其 HA 和 NA 蛋白发生了哺乳动物适应性突变,增强了对哺乳动物甚至对人的易感

性。因此,我们需要对 H9N2 亚型 AIV 的跨物种传播的能力保持充分警惕,并采取更多预防措施来防止 H9N2 亚型 AIV 的传播,减少对家禽及人类的威胁。

## 参考文献:

- [1] CAUSEY D, EDWARDS S V. Ecology of avian influenza virus in birds [J]. *J Infect Dis*, 2008, 197 (Suppl 1): S29-S33.
- [2] GU M, XU L, WANG X, et al. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China [J]. *Vet Res*, 2017, 48 (1): 49.
- [3] LIU D, SHI W, GAO G F. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses [J]. *Lancet*, 2014, 383 (9920): 869.
- [4] IQBAL M, YAQUB T, REDDY K, et al. Novel genotypes of H9N2 influenza A viruses isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (6): e5788.
- [5] LLOREN K K S, LEE T, KWON J J, et al. Molecular markers for interspecies transmission of avian influenza viruses in mammalian hosts [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (12): 2706.
- [6] HOSSAIN M J, HICKMAN D, PEREZ D R. Evidence of expanded host range and mammalian-associated genetic changes in a duck H9N2 influenza virus following adaptation in quail and chickens [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (9): e3170.
- [7] RAHIMIRAD S, ALIZADEH A, ALIZADEH E, et al. The avian influenza H9N2 at avian-human interface: a possible risk for the future pandemics [J]. *J Res Med Sci*, 2016, 21: 51.
- [8] 张官婷, 梁丹, 李安安, 等. 人感染 H9N2 禽流感相关研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2022, 38 (10): 1359-1363.
- [9] QI Y, GUO W, LIU C, et al. Seroprevalence of influenza A (H9N2) virus infection among humans in China: a meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2021, 155: 104881.
- [10] TENG Q, XU D, SHEN W, et al. A single mutation at position 190 in hemagglutinin enhances binding affinity for human type sialic acid receptor and replication of H9N2 avian influenza virus in mice [J]. *J Virol*, 2016, 90 (21): 9806-9825.
- [11] NAGY A, METTENLEITER T C, ABDELWHAB E M. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa [J]. *Epidemiol Infect*, 2017, 145 (16): 3320-3333.
- [12] ROWELL J, LO C Y, PRICE G E, et al. The effect of respiratory viruses on immunogenicity and protection induced by a candidate universal influenza vaccine in mice [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (4): e0215321.
- [13] PU J, YIN Y, LIU J, et al. Reassortment with dominant chicken H9N2 influenza virus contributed to the fifth H7N9 virus human epidemic [J]. *J Virol*, 2021, 95 (11): e01578-20.
- [14] JIN X, ZHA Y, HU J, et al. New molecular evolutionary characteristics of H9N2 avian influenza virus in Guangdong Province, China [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 77: 104064.
- [15] HAO X, WANG J, HU J, et al. Internal gene cassette from a genotype S H9N2 avian influenza virus attenuates the pathogenicity of H5 viruses in chickens and mice [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1978.
- [16] SONG W, QIN K. Human-infecting influenza A (H9N2) virus: a forgotten potential pandemic strain? [J]. *Zoonose Public Hlth*, 2020, 67 (3): 203-212.
- [17] PUSCH E A, SUAREZ D L. The multifaceted zoonotic risk of H9N2 avian influenza [J]. *Vet Sci*, 2018, 5 (4): 82.
- [18] GU M, CHEN H, LI Q, et al. Enzootic genotype S of H9N2 avian influenza viruses donates internal genes to emerging zoonotic influenza viruses in China [J]. *Vet Microbio*, 2014, 174 (3/4): 309-315.
- [19] STEINHAUER D A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus [J]. *Virology*, 1999, 258 (1): 1-20.
- [20] 徐晓龙, 包红梅, 陈化兰, 等. 影响禽流感病毒致病性和传播的关键氨基酸位点的研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (2): 165-168.
- [21] BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER E, LU Y, MEYER D, et al. Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections [J]. *Vaccine*, 2012, 30 (51): 7374-7380.
- [22] PAPPAS C, VISWANATHAN K, CHANDRASEKARAN A, et al. Receptor specificity and transmission of H2N2 subtype viruses isolated from the pandemic of 1957 [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (6): e11158.
- [23] 张琳. 2019—2020 年我国部分地区 H9N2 亚型禽流感病毒免疫原性分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [24] 孙华鹏, 崔新鑫, 潘亮奇, 等. 中国 H9N2 亚型禽流感病毒的流行现状 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52 (5): 1218-1229.
- [25] MATROSOVICH M N, KRAUSS S, WEBSTER R G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity [J]. *Virology*, 2001, 281 (2): 156-162.
- [26] BI Y, LU L, LI J, et al. Novel genetic reassortants in H9N2 influenza A viruses and their diverse pathogenicity to mice [J]. *Virol J*, 2011, 8: 505.
- [27] 陈陆, 郑鹿平, 赵军, 等. H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白 S145N 变异株致病性及抗原特性 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43 (1): 82-89.
- [28] 严雅瑶. HA 蛋白 133、158 位糖基化及其联合 T126K、S145P 对 H7N9 亚型禽流感病毒生物学特性的影响 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [29] 于海英. H9N2 亚型禽流感 G57 基因型病毒血凝素糖基化模式的生物学效应研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [30] 廖昌韬, 曾凡桂, 严专强, 等. H9N2 亚型禽流感病毒糖基化位点突变株的构建与生物学特性研究 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39 (7): 18-22.
- [31] PARK S, IL KIM J, LEE I, et al. Adaptive mutations of neuraminidase stalk truncation and deglycosylation confer enhanced pathogenicity of influenza A viruses [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 10928.