

神经氨酸酶、碱性聚合酶 2 及非结构蛋白 1 影响 A 型流感病毒致病力的分子机制研究进展

顾敏, 彭大新, 刘秀梵*

扬州大学兽医学院, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009

摘要:随着研究的不断深入, 血凝素(HA)之外的其他蛋白在影响 A 型流感病毒的致病力甚至宿主特异性方面的重要作用逐渐受到关注。本文对神经氨酸酶(NA)、碱性聚合酶 2(PB2)及非结构蛋白 1(NS1)的相关进展作了综述, 以期进一步阐明流感病毒的致病分子基础, 并藉此探讨可能的宿主范围限定因素。

关键词: 流感病毒, NA, PB2, NS1, 致病力, 宿主范围, 综述

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 01-0007-07

流感病毒属于正黏病毒科(Orthomyxoviridae)的流感病毒属, 依据内部核蛋白(NP)与基质蛋白(MP)的抗原性差异, 可被分为 A、B、C 三个型。危害最为严重的当属 A 型流感病毒, 可自然感染人、畜、禽等多种动物, 并引起流行或大流行^[1]。其中, HPAI (Highly Pathogenic Avian Influenza) H5N1 病毒能够突破种间障碍直接从禽类传播到人甚至造成死亡, 不仅给许多国家的养禽业带来了沉重打击, 同时也向全人类的健康提出了新的严峻挑战。A 型流感病毒的基因组由 8 个节段的单股负链 RNA 构成, 编码包括 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1、NS2 及 PB1-F2 等在内的至少 11 种蛋白。由于 HA (Hemagglutinin, 血凝素) 蛋白能够与宿主细胞表面的唾液酸受体特异性结合, 促进病毒吸附并穿透细胞膜进行感染, 被认为是流感病毒表面最重要的糖蛋白之一, 在影响病毒的致病力及宿主嗜性方面发挥关键作用^[1-2]。但近年来, 多数研究更倾向认同以下观点, 即流感病毒的致病力由多基因联合作用

决定。HA 之外的其它蛋白在病毒的感染、复制、传播及毒力等方面具有的功能也逐渐受到关注, 而研究较为深入的为 NA、PB2 及 NS1 蛋白。本文就上述 3 个蛋白在影响流感病毒致病力方面的研究进展作简要综述, 以期进一步了解相关的分子机制并探讨可能的宿主范围限定因素。

1 NA 蛋白 (Neuraminidase)

NA 是流感病毒囊膜上除 HA 之外的另一种重要糖蛋白, 呈蘑菇状, 以 4 个亚基组成同源四聚体的形式存在, 一级结构包括氨基端胞浆尾、非极性跨膜区、茎部及头部。其中头部具有水解酶活性, 能够从 α -糖苷键上切割病毒表面以及感染细胞的唾液酸, 这种水解作用不仅破坏了宿主细胞膜上的特异性受体, 促使新生病毒粒子从感染细胞表面释放; 同时可以防止子代病毒的相互聚集, 允许病毒进一步扩散并增强感染能力^[3]。

许多研究认为, NA 茎部的长短可能对流感病

基金项目: 国家“973 项目”(2011CB505001, 2011CB505003); 国家科技重大专项(2008ZX100042013)

* 通信作者。Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 顾敏(1983-), 女, 江苏江都人, 博士研究生, 主要从事禽流感病毒分子流行病学研究。

收稿日期: 2010-06-25; **修回日期:** 2010-09-06

毒的致病力产生影响。Castrucci 等^[4]在研究 A/WSN/33 的 NA 基因时发现,NA 茎长在 0 - 52 个氨基酸之间变化时,重组病毒在组织培养上的繁殖性能与母本病毒无差异;但在鸡胚中病毒的 NA 茎部越长,复制能力越强,茎部完全缺失后病毒只能局限于呼吸器官中进行复制,因此 NA 茎部长度可能影响流感病毒的组织范围。序列分析发现,GenBank 中 N1 亚型的 A 型流感病毒依据不同的茎部氨基酸模式可分为 6 个群:茎部不存在任何氨基酸缺失的 A/Gs/GD/1/96/H5N1-like;茎部第 57 - 72 位缺失 16 个氨基酸的 A/WSN/33/H1N1-like;茎部第 63 - 77 位缺失 15 个氨基酸的 A/PR/8/34/H1N1-like;茎部第 54 - 72 位缺失 19 个氨基酸的 A/HK/156/97/H5N1-like;茎部第 54 - 75 位缺失 22 个氨基酸的 A/Chicken/Italy/1067/99/H7N1-like 以及茎部第 49 - 68 位缺失 20 个氨基酸的 A/Chicken/Hubei/327/2004/H5N1-like (NA-wt)^[5]。NA-wt 于 2000 年首次在 H5N1 病毒中发现,此后 2000 - 2007 年间 H5N1 病毒中 NA-wt 的分离率呈现逐年增长的趋势,且 2004 - 2007 年分离的所有 173 株人源 H5N1 病毒均为 NA-wt;此外,含有 NA-wt 模式的重组病毒对鸡和小鼠均为高致病性,而其它茎部模式的重组病毒毒力相对较弱,说明茎部缺失 20 个氨基酸可能与 2000 年后某些 H5N1 分离株的毒力增强相关^[6]。为了进一步阐明此缺失的生物学意义,Munier 等^[7]利用反向遗传学方法构建了全禽源的重组病毒 MZ 以及 NA 茎部缺失 20 个氨基酸的突变株 MZ-delNA 来对比研究。结果发现,MZ-delNA 在禽类细胞的组织培养上更具生长竞争优势,在肺脏、肝脏、肾脏的病毒繁殖能力以及产生间质性肺炎的病变程度均强于 MZ 组;感染 MZ-delNA 病毒的鸡肺部编码 IL-6、TGF-beta4、CCL5 等细胞因子的 mRNA 水平以及肝脏内细胞凋亡的发生频率亦显著高于 MZ 组,从而表明 NA-wt 类 H5N1 病毒更易于表现高致病性,且这种缺失模式的短茎 NA 可能是水禽流感病毒传播到陆生家禽并对其逐渐产生适应性的一个重要分子标记。

由于流感病毒从感染细胞表面释放需要 NA 蛋白对唾液酸受体进行切割,因此 HA 同细胞受体的结合与 NA 对细胞受体的破坏是一对平衡力,HA 与 NA 之间的这种相互制约,也被认为与流感病毒的毒力相关。研究发现,一些 H5 与 H7 亚型的流感病

毒通过增加 HA 基因的糖基化位点和/或缺失 NA 茎部的氨基酸而不断进化。Baigent 等^[8]曾以 HA 蛋白的第 158 位糖基化与否结合 NA 茎部的长短变化,构建了一系列具有不同 HA/NA 组合的重组病毒。其中,当 HA 第 158 位被糖基化时与短茎 NA 匹配的重组病毒具有很高的繁殖性能,而第 158 位不存在糖基化位点时与长茎 NA 进行组合效率最佳,由此说明 HA 与 NA 活性的相互平衡对于病毒的释放与再感染过程极为关键。近期又有类似的研究将 HA 蛋白的第 131、158、169 位是否被糖基化以及 NA 茎部是否存在缺失作为依据,配对形成不同的 HA/NA 组合来探讨 H5N1 病毒对小鼠的致病性^[9]。该项结果指出,与长茎 NA 相比,短茎重组病毒的红细胞解脱效率明显降低且对小鼠的致病力增强;而 HA 糖基化位点的增加对于病毒毒力的影响则不及 NA 茎部长度变化所产生的效应。

2 PB2 蛋白 (Polymerase basic protein 2)

流感病毒的 RNA 聚合酶由 PB2、PB1 及 PA 3 个亚单位构成,通过与病毒 RNA 及核衣壳蛋白组装形成 vRNP 复合体来介导病毒基因组的转录与复制,被认为与宿主嗜性存在一定的关系。Subbarao 等^[10]曾在 1993 年就提出 PB2 的 627 位可能是 A 型流感病毒宿主范围的重要决定位点之一,该研究以人源病毒 A/LosAngeles/2/87 作为骨架,用禽源病毒 A/Mallard/NY/78 的 PB2 进行替换,发现重组病毒虽能在禽类的组织培养中有效繁殖却不能在 MDCK 细胞上形成空斑,而该现象可能与 PB2 的 627 位密切相关。分析数据还显示,当时所搜集到的所有人源流感病毒 PB2 的 627 位均为 K,禽源流感病毒则均为 E,因此推测 PB2 的 627 位与宿主范围相关,可惜的是这一发现在当时未能引起足够的重视。到了 2001 年,Hatta 等^[11]的研究再次表明了 PB2 的 627 位能够明显影响 HPAI H5N1 病毒对小鼠的致病性,对小鼠致病力强的病毒在该位点为人源病毒特征性的 K,但致病力弱的病毒则为禽源病毒特征性的 E。2003 年荷兰 H7N7 暴发期间,一名死于肺炎的兽医体内分离到的 H7N7 病毒,其 PB2 627 位是 K,而存活下来的患者体内分离的病毒则 627 位为 E^[12]。此外,不少感染 H5N1 的病人体内也分离到 PB2 627 位为 K 的病毒^[13-15]。关于 PB2 的 627 位氨基酸决定流感病毒对哺乳动物高致病力

的分子机制,有报道指出是 PB2 的 627K 能够大大提高 H5N1 病毒在小鼠体内的复制能力,并非改变了病毒的细胞嗜性^[16]。Fornek 等^[17]为了进一步明确 PB2 的 627 位如何影响病毒与宿主的相互作用,用 627 位是 K 或 E 的 H5N1 病毒分别感染 BALB/c 小鼠。与 627 E 组相比,627 K 组的小鼠脾脏及肺实质的病变更为严重,肺部的细胞凋亡现象亦更为明显,且血氧饱和度呈现下降趋势;攻毒后第 2 天小鼠肺部 T 细胞受体的活化就受到了影响,炎症反应异常激烈且一直持续到攻毒后第 4 天;在脾脏,与免疫应答相关的一些效应机制包括 NK 细胞毒作用以及抗原提呈作用均显著增强,这些结果表明上述病理现象不仅与此类 H5N1 病毒在肺部的繁殖能力相关还与病毒感染早期就引起的不健全免疫应答有关。

然而,也有学者对 PB2 627 位 K 决定 H5N1 病毒对哺乳动物的高致病性这一观点提出质疑。Maines 等^[18]从 2004 年感染 H5N1 病毒的同患者体内分离到仅存在 8 个氨基酸变异的两株病毒,其中一株病毒的 PB2 627 位是 K,另一株是 E,两者的对比研究显示 E627 病毒对小鼠的毒力仅表现略微下降而对雪貂仍是高致病性,表明 K627E 突变不是影响 H5N1 病毒对小鼠及雪貂致病力的唯一决定因素。而近来 Li 等^[19]的一项实验结果也支持了上述论点,他们将对小鼠不致病的 H5N1 病毒在小鼠体内进行了 15 次连续传代,产生的鼠适应变异株对小鼠的毒力得到了明显增强,经序列比对后发现,第一代鼠适应株仅在 PB2 的 627 位由 E 突变为 K;第 5 代病毒除了 E627K 变异外,还在 PB2 的其它两个位点出现了氨基酸替换;而第 15 代变异株与第 5 代相比,PB2 627 位却又发生了 K→E 的回复突变。2009 甲型 H1N1 大流感期间,虽然此类病毒所有分离株的 PB2 第 627 位均为禽源病毒特征性的 E,但该病毒却可以在人群间复制和进行有效地传播。对此,Mehle 等^[20]进行研究后指出,2009 甲型 H1N1 病毒在 PB2 的第 590-591 位非常保守,分别为 S 与 R,而这种 SR 模式在 2009 年之前的人流感病毒中非常罕见;并且 SR 模式几乎与 E627 同时存在,同源建模结果也显示彼此在空间结构上非常接近,可能存在协同效应,因此推测该相互作用可能是禽源或猪源流感病毒突破种间屏障感染人的另一种机制。

与 PB2 的 627 位氨基酸类似,701 位氨基酸也被认为与流感病毒在哺乳动物体内进行有效繁殖相

关。Li 等^[21]对分离的两株基因组构成极为相似但对小鼠致病力却截然不同的两株 H5N1 禽流感病毒进行研究时发现,以高致病性的 Dk/GX/35 为骨架,替换不致病的 Dk/GX/22 的 PB2 基因得到的重组病毒对小鼠的毒力明显下降;反之,以 Dk/GX/22 为骨架,替换 Dk/GX/35 的 PB2 基因产生的重组病毒能够获得感染小鼠并对其致病的能力,而这种差异可能是缘于 PB2 蛋白第 701 位的 D→N 突变。近期,以豚鼠为实验模型的两篇报道也分别指出 PB2 的第 701 位 N 可以部分抵消 K627E 产生的效应^[22],或在 HA 蛋白第 158 位不被糖基化的前提下,仍能够使病毒在哺乳动物间进行有效传播^[23]。

此外,Gabriel 等^[24,25]通过对 HPAI H7N7 病毒的研究还提出 PB2 第 714 位发生 S→R 突变可以使聚合酶的活性得到增强,从而提高对小鼠的致病性,且 S714R 替换也在不少 H5N1 病毒中存在。同时,Tarendeau 等^[26,27]借助结构生物学的方法对 PB2 蛋白的第 701 及 714 位氨基酸进行了空间定位,证实其处于 C 端结构域(NLS-domain,第 678-759 位)的一个双向核定位序列中,NMR(Nuclear Magnetic Resonance,核磁共振)图也进一步显示出 PB2 第 627、701 及 714 这 3 个氨基酸位点均位于蛋白质三维结构的外表面,从而表明这些位点在 PB2 与宿主蛋白的相互作用过程中可能具有重要作用。

3 NS1 蛋白(Nonstructural protein 1)

NS1 蛋白是流感病毒唯一的非结构蛋白,在感染细胞的早期大量表达,被认为具有拮抗宿主细胞干扰素的作用,是流感病毒突破宿主细胞第一道防线的重要利器。近年来,越来越多的 H5N1 分离株在 NS1 蛋白的第 80-84 位存在 5 个氨基酸的缺失,且第 92 位氨基酸出现 D→E 突变,不少学者认为这可能是 H5N1 病毒在进化过程中特有的遗传标志^[5,28]。根据对 1997 年香港致人感染的 H5N1 病毒进行的研究,Seo 等^[29]提出当 NS1 蛋白第 92 位是 E 时,用该片段替换人流感 H1N1 病毒所产生的重组病毒对猪的致病力明显强于野生型人源 H1N1 病毒。此后,Lipatov 等^[30]再次强调了 NS1 蛋白及第 92 位 E 在影响 H5N1 病毒毒力方面的关键作用。该小组发现含有 HK/97 NS 基因的重组病毒对小鼠具有高毒力,能够提高 IL1 α 、IL1 β 、IL16 及 IFN- γ 等促炎细胞因子与趋化因子 KC 在肺组织中的含量,

同时抑制抗炎细胞因子 IL10 的浓度,使得肺部的排毒时间相对延长;而含有 E92D 突变的重组病毒对小鼠的致病性则有所下降且肺部的病毒滴度也较低。Long 等^[31]又进一步以 A/WSN/33 为骨架构建了 2 对病毒来探讨 NS1 蛋白缺失与否的生物学意义,第一对病毒中 rWSN-SD 含有全长的 NS1 基因,而 rWSN-mSD 的 NS1 人工缺失了第 80 - 84 位的 5 个氨基酸;第二对病毒中 rWSN-YZ 的 NS1 天然就在第 263 - 277 位缺失 15 个核苷酸,而 rWSN-mYZ 的 NS1 人工添加了 15 个核苷酸。结果显示, rWSN-mSD 与 rWSN-YZ 的 IVPI 值以及感染小鼠组织内的病毒滴度均显著高于相应的对照病毒,由此表明当 NS1 蛋白第 80 - 84 位缺失 5 个氨基酸以及由此位移产生的 D92E 突变能够增强 H5N1 病毒对鸡与小鼠的致病力。对于相关的分子机制, Li 等^[32]认为一方面 NS1 蛋白存在缺失的 H5N1 病毒抵抗 TNF- α 应答的能力得到了增强,另一方面 D92E 氨基酸替换却削减了 NS1 蛋白对 IFN 的拮抗作用,这两者虽然未显著影响宿主细胞的凋亡但均对抑癌基因 p53 的转录活性产生了抑制。

然而, H5N1 病毒的 NS1 蛋白似乎还存在其它的缺失模式。Zhu 等^[33] 2003 年从猪体内分离到了 1 株对鸡不致病的 H5N1 病毒 SW/FJ/03, 发现其 NS 基因的第 612 - 626 位缺失了 15 个核苷酸, 导致第 191 - 195 位缺失 5 个氨基酸; 以该病毒的 NS1 基因替换高致病力毒株后产生的重组病毒对鸡的毒力明显下降且不能拮抗干扰素; 而以 SW/FJ/03 为骨架替换非缺失病毒的 NS 片段构建的重组病毒却能够致死鸡并抵抗干扰素作用, 结果表明 NS1 第 191 - 195 位的缺失可能是 SW/FJ/03 对鸡低致病性的一个重要因素。

此外, NS1 蛋白的第 149 位及第 42 位氨基酸也被认为与 H5N1 病毒的致病力相关。Li 等^[34] 对仅存在 5 个氨基酸位点差异却在鸡上表现不同致病性的两株 H5N1 病毒进行研究时指出, 以高致病力的 Gs/GD/1/96 为骨架病毒替换无致病力的 Gs/GD/2/96 的 NS1 基因产生的重组病毒对鸡的致病力明显下降; 而以 Gs/GD/2/96 为骨架替换 Gs/GD/1/96 的 NS1 基因产生的重组病毒获得了在鸡体内复制的能力, 并能造成鸡的发病甚至死亡。进一步的分析认为, 这种差异可能与 NS1 蛋白上第 149 位单个氨基酸的变异相关, 第 149 位为 A 的重组病毒能够

在 CEF 细胞上表现拮抗干扰素的效应, 而第 149 位是 V 的重组病毒却不能。采用类似的研究方法, Jiao 等^[35] 又推测 NS1 蛋白的第 42 位氨基酸在宿主细胞的抗病毒免疫应答过程中也可能发挥重要作用, S42 能够促进 NS1 蛋白拮抗宿主细胞干扰素的生成以及阻止双链 RNA 介导的 NF- κ B 与 IRF-3 细胞通路的激活, 对小鼠表现高致病性; 而当该位点突变为 P 时, H5N1 病毒对小鼠的毒力就显著降低。

还有研究认为, NS1 蛋白可以与宿主细胞中的某些信号转导蛋白结合从而干扰相应的生理代谢过程, 可能是其影响流感病毒毒力的另一条通路。Obenauer 等^[36] 依据大规模的序列分析指出, 禽流感病毒 NS1 蛋白的 C 末端存在一个 PDZ 结构域的配体基序。PDZ 结构域是一种最常见的蛋白间相互作用模块, 其名称取自最早发现含有该结构域的 3 个蛋白质的首字母: PSD-95 (post-synaptic density protein-95), DLG-A (discs-large protein; *Drosophila* tumor suppressor) 及 ZO-1 (Zonula occludens 1), 广泛存在于各种生物体内, 在蛋白质定位、信号转导及蛋白复合体的装配等方面具有重要功能^[37]。PDZ 结构域的一个突出特点是能够特异性地识别并结合配体 C 末端的 4 个核心氨基酸残基。禽流感病毒 NS1 蛋白的 PDZ 配体 (PL) 基序通常由第 227 - 230 位的 ESEV 或 EPEV 构成, 可以与人体内多达 30 种含 PDZ 结构域的蛋白质相结合, 而大多数人流感病毒却不能, 可能由于其在常规的 PL 基序之后还存在 7 个额外的氨基酸残基, 且禽源病毒特征性的 PL 基序也很少在人源病毒中发现^[36, 38]。Jackson 等^[39] 为了进一步研究 PL 基序的功能, 应用反向遗传学方法构建了含有 HPAI H5N1 或 1918 H1N1 的 PL 基序的重组病毒。小鼠实验显示, 与野生型 A/WSN/33 相比, 重组病毒的毒力显著增强, 病毒在感染小鼠的整个肺部呈弥散型分布, 表现严重的炎症与出血, 因此推测 NS1 蛋白的 C 末端可能通过与 PDZ 结合蛋白的相互作用来破坏相应的细胞信号通路, 进而对病毒的致病性造成改变。

4 结语

流感病毒的致病分子基础一直是研究的热点之一, 尤其近年来, HPAI H5N1 病毒可以不经中间宿主, 直接感染包括人在内的多种哺乳动物并导致高致死率, 使得相关的跨种属传播机制更是备受关

注。而病毒的感染是多基因参与的过程,通过单基因上氨基酸残基的替换来研究流感病毒的毒力甚至感染的宿主范围存在一定的局限性,有可能忽略了特定的毒株遗传背景。基因之间的协同作用研究并辅以结构生物学的方法将有助于进一步阐明基因间的相互作用,早日揭开流感病毒跨种间感染机制的神秘面纱!

参考文献

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*, 1992, 56(1) : 152-179.
- [2] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 2000, 69 : 531-569.
- [3] McKimm-Breschkin JL. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors-a review. *Antiviral research*, 2000, 47(1) : 1-17.
- [4] Castrucci MR, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *Journal of virology*, 1993, 67(2) : 759-764.
- [5] Zhou H, Jin M, Chen H, Huang Q, Yu Z. Genome-sequence analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in China in 2004. *Virus genes*, 2006, 32(1) : 85-95.
- [6] Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, Zhu J, Li Y, Zhang A, Yu Z, Ye Z, Chen H, Jin M. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. *PloS one*, 2009, 4(7) : e6277.
- [7] Munier S, Larcher T, Cormier-Aline F, Soubieux D, Su B, Guigand L, Labrosse B, Cherel Y, Quere P, Marc D, Naffakh N. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens. *Journal of virology*, 2010, 84(2) : 940-952.
- [8] Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus research*, 2001, 79(1-2) : 177-185.
- [9] Matsuoka Y, Swayne DE, Thomas C, Rameix-Welti MA, Naffakh N, Warnes C, Altholtz M, Donis R, Subbarao K. Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. *Journal of virology*, 2009, 83(9) : 4704-4708.
- [10] Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *Journal of virology*, 1993, 67(4) : 1761-1764.
- [11] Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science (New York, N. Y.)*, 2001, 293(5536) : 1840-1842.
- [12] Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(5) : 1356-1361.
- [13] de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, Hoang DM, Chau NV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha do Q, Guan Y, Peiris JS, Chinh NT, Hien TT, Farrar J. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature medicine*, 2006, 12(10) : 1203-1207.
- [14] Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying PC, Sangsiriwut K, Pooruk P, Boonnak K, Khanyok R, Thawachsupa P, Kijphati R, Sawanpanyalert P. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *The Journal of general virology*, 2005, 86(Pt 2) : 423-433.
- [15] Smith GJ, Naipospos TS, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JS, Guan Y. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology*, 2006, 350(2) : 258-268.
- [16] Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology*, 2004, 320(2) : 258-266.
- [17] Fornek JL, Gillim-Ross L, Santos C, Carter V, Ward JM,

- Cheng LI, Proll S, Katze MG, Subbarao K. A single-amino-acid substitution in a polymerase protein of an H5N1 influenza virus is associated with systemic infection and impaired T-cell activation in mice. *Journal of virology*, 2009, 83(21) : 11102-11115.
- [18] Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM, Tumpey TM. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *Journal of virology*, 2005, 79(18) : 11788-11800.
- [19] Li J, Ishaq M, Prudence M, Xi X, Hu T, Liu Q, Guo D. Single mutation at the amino acid position 627 of PB2 that leads to increased virulence of an H5N1 avian influenza virus during adaptation in mice can be compensated by multiple mutations at other sites of PB2. *Virus research*, 2009, 144(1-2) : 123-129.
- [20] Mehle A, Doudna JA. Adaptive strategies of the influenza virus polymerase for replication in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(50) : 21312-21316.
- [21] Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *Journal of virology*, 2005, 79(18) : 12058-12064.
- [22] Steel J, Lowen AC, Mubareka S, Palese P. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627E/701N. *PLoS pathogens*, 2009, 5(1) : e1000252.
- [23] Gao Y, Zhang Y, Shinya K, Deng G, Jiang Y, Li Z, Guan Y, Tian G, Li Y, Shi J, Liu L, Zeng X, Bu Z, Xia X, Kawaoka Y, Chen H. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS pathogens*, 2009, 5(12) : e1000709.
- [24] Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(51) : 18590-18595.
- [25] Gabriel G, Abram M, Keiner B, Wagner R, Klenk HD, Stech J. Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *Journal of virology*, 2007, 81(17) : 9601-9604.
- [26] Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nature structural & molecular biology*, 2007, 14(3) : 229-233.
- [27] Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ. Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS pathogens*, 2008, 4(8) : e1000136.
- [28] Zohari S, Gyarmati P, Thoren P, Czifra G, Brojer C, Belak S, Berg M. Genetic characterization of the NS gene indicates co-circulation of two sub-lineages of highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype in Northern Europe in 2006. *Virus genes*, 2008, 36(1) : 117-125.
- [29] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature medicine*, 2002, 8(9) : 950-954.
- [30] Lipatov AS, Andreamsky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG, Sangster MY. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. *The Journal of general virology*, 2005, 86(Pt 4) : 1121-1130.
- [31] Long JX, Peng DX, Liu YL, Wu YT, Liu XF. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene [J]. *Virus genes*, 2008, 36(3) : 471-478.
- [32] Li W, Wang G, Zhang H, Xin G, Zhang D, Zeng J, Chen X, Xu Y, Cui Y, Li K. Effects of NS1 variants of H5N1 influenza virus on interferon induction, TNFalpha response and p53 activity. *Cellular & molecular immunology*, 2010.
- [33] Zhu Q, Yang H, Chen W, Cao W, Zhong G, Jiao P, Deng G, Yu K, Yang C, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *Journal of virology*, 2008, 82(1) : 220-228.
- [34] Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, Wang X, Yu K, Bu Z, Chen H. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *Journal of virology*, 2006, 80(22) : 11115-11123.
- [35] Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu

- Z, Kawaoka Y, Chen H. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Journal of virology*, 2008, 82(3): 1146-1154.
- [36] Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, Xu X, Wang J, Ma J, Fan Y, Rakestraw KM, Webster RG, Hoffmann E, Krauss S, Zheng J, Zhang Z, Naeve CW. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science (New York, N. Y.)*, 2006, 311(5767): 1576-1580.
- [37] Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J. PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta biochimica Polonica*, 2003, 50(4): 985-1017.
- [38] Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology*, 2008, 89(Pt 10): 2359-2376.
- [39] Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. A new influenza virus virulence determinant; the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(11): 4381-4386.
- [37] Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J. PDZ domains -

Research progress in molecular determinants of neuraminidase, polymerase basic protein 2 and nonstructural protein 1, related to virulence of influenza A virus-A review

Min Gu, Daxin Peng, Xiufan Liu*

Animal Infectious Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: It is gradually recognized that host specificity and pathogenicity of influenza A virus could also be affected by proteins other than hemagglutinin (HA) due to its polygenic nature. In this review, detailed description was focused mainly on neuraminidase (NA), polymerase basic protein 2 (PB2) and nonstructural protein 1 (NS1), especially their molecular determinants associated with virulence and host range restriction of influenza A virus.

Keywords: Influenza A virus, NA, PB2, NS1, Virulence, Host range

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB505001 and 2011CB505003) and by the Important National Science & Technology Specific Projects (2008ZX10004-013)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 25 June 2010 / Revised: 6 September 2010