本文引用:杨明轩,吴绍函,刘铭玉,等. 禽流感病毒研究进展[J]. 新乡医学院学报,2014,31(10):854-858.

【综述】

禽流感病毒研究进展

杨明轩, 吴绍函, 刘铭玉, 邵 强, 李赞东
(中国农业大学生物学院 农业生物技术国家重点实验室,北京 100193)

摘要: 禽流感是由禽流感病毒(AIV)引起的传染性疾病,主要危害禽类呼吸系统、生殖系统和消化系统等。近几年,禽流感病毒呈现明显的跨物种传播趋势,成为威胁全球禽业以及人类健康的重大疾病。本文综述了禽流感病毒结构、病毒与机体免疫系统的反应、禽流感病毒的检测和疫苗研究,旨在推进相关领域的研究。

关键词: 禽流感;病毒;免疫
中图分类号: Q939.47 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)10-0854-05

禽流感是由正黏病毒科 A 型流感病毒——禽流感病毒(avian influenza virus,AIV)引起的主要侵害家禽呼吸系统、生殖系统和消化系统的传染病[1]。AIV 自 1878 年首次分离至今已有 100 多年历史。根据致病性的不同,可以将 AIV 分为高致病性和低致病性[2]。高致病性禽流感(highly pathogenic avian influenza,HPAI)已被世界动物卫生组织(Office International Des Epizooties,OIE)列为Ⅰ类烈性传染病,它给全球的养禽生产造成巨大的经济损失,是养禽业的最大威胁之一[3]。AIV 传播途径多样,如 H5N1-HAV 主要经呼吸道传播,也可以通过密切接触感染家禽的分泌物、排泄物、受病毒污染的物品、水以及直接接触病毒毒株等方式感染。而低致病性禽流感(lowly pathogenic avian influenza,LPAI)因其目前对人类危害不大、相关研究不足等因素,本文并不涉及。即本文后续所提及的禽流感均为 HPAI。

AIV 可以感染多宿主,包括人、猪、马、水貂、一些猫科动物、海洋哺乳动物和禽类[4-5]。研究表明,雁形目和鸻形目等湿地和水栖鸟类是 AIV 主要的天然携带者[6],更有学者证实 AIV 的所有血凝素 HA 和神经氨酸酶 NA 亚型以及多数的 HA/NA 组合在野生鸟类中均存在[7]。

1 AIV 的结构

AIV 形态多样,典型的为球形,直径 8 ~ 10 nm,但同样直径的丝状形态也较常见,长短不一。根据研究者于 2002 年的发现表明,AIV 是由囊膜和核衣壳构成的,其囊膜由纤突、双层类脂质和基质蛋白构成。AIV 的核衣壳呈螺旋对称,核酸为单股负链 RNA,分为 8 个片段[8]。其病毒 RNA 的 8 个片段分别控制编码 11 种蛋白,包括结构蛋白(HA、NA、PA、PB1、PB2、NP、M1、M2)、非结构蛋白(NS1、NS2)以及 PB1-F2 蛋白[9]。

有学者研究中指出,AIV 的表面蛋白(HA、NA、M2)是唯一能够中和抗体和产生保护性免疫应答的抗原,表面糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)蛋白具有高的抗原特异性[3]。研究表明,目前所发现的 AIV 血凝素 HA 属于Ⅰ型糖蛋白,是病毒的主要免疫原性蛋白,可以刺激机体产生抗体,诱发体液免疫和细胞免疫。根据 HA 和 NA 的抗原性差异可分为不同的亚型,到目前为止,已经鉴定了 16 种 H 亚型(H1 ~ H16)和 9 种 N 亚型(N1 ~ N9)[10]。HA 和 NA 的全序列结构得到了分离和测序,基因特性也有所研究。对比总结表明,其任一种 HA 与任一种 NA 结合后即为一种血清亚型。理论上 AIV 至少有 144 个血清亚型,现已从禽类中分离到 81 种,同时还有新的 HA 和 NA 不断被发现。因此 AIV 的多型性给防治禽流感带来很大难度。

研究表明,HA 包含 562 ~ 566 个氨基酸,相对分子质量约为 75 000,是 AIV 主要表面抗原和保护性抗原,HA 与细胞表面受体相互作用,介导病毒吸附和侵入细胞,而其活性依赖 N 末端信号肽的切除及 HA1 和 HA2 的产生。HA 的裂解位点、糖基化位点、受体结合位点等关键氨基酸的突变是病毒抗原性和致病性变异的分子基础之一[11]。同时刘志军等[12]提出,HA 在病毒吸附及穿膜过程中,以及决定病毒致病力方面都起着十分关键的作用,HA 被裂解为 HA1 和 HA2 2 个部分是病毒感染细胞的先决

DOI:10.7683/xxyxyxb.2014.10.025
收稿日期:2014 - 03 - 24
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:J1103520);中国农业大学生物学院本科生创新能力提升计划项目(编号:15052503)
作者简介:杨明轩(1992 -),男,陕西西安人,本科生在读,研究方向:动物病毒学。
通信作者:李赞东(1958 -),女,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:动物胚胎发育生物学。

条件,也是决定病毒致病力的主要因素。病毒毒力的强弱与 HA 被裂解为 HA1 和 HA2 呈正相关。在 AIV 亚型中 H5、H7 、H9 亚型的致病性强,危害极大。尤其如目前在我国大面积发生的 H7N9 HPAI 疫情正是 H7 亚型的一种代表。

流感病毒 H 糖蛋白结构在人流感病毒与 AIV 之间存在差异,这种差异是决定人 AIV 宿主限制性的一种主要因素。人类流感病毒 H 蛋白结合区的第 226 号氨基酸为亮氨酸,而禽和马流感病毒 H 蛋白结合区第 226 号氨基酸为谷氨酰胺,它们分别与 NeuAcα2,6Gal 型受体和 NeuAcα2,3Gal 型受体结合。Suarez[13]的实验表明,不同亚型的病毒在同时感染一个细胞时,病毒的基因组之间会发生节段交换。这种情况在自然界条件下也经常出现。

NP 是特异性抗原,主要决定宿主范围,NP 至少有 3 个互相重叠的抗原区,其中 1 个区在各株流感病毒间均存在[3]。

有学者在对 NS1 的结构进行分析后表示,NS1 蛋白包含 202 ~237 个氨基酸,而不同的病毒株系间 NS1 蛋白序列存在差异。该蛋白有 2 个功能区分别位于 N 端的 RNA 结合区和位于 C 端的效应区。NS1 与 RNA 的结合可以与 polyA 结合,抑制 mRNA 的运输或者与 U6 SnRNA 结合来抑制 Pre-mRNA 的剪接,也可以与 dsRNA 结合,阻断 PKR 的活性[14],与 5′端 UTR 结合,刺激病毒 mRNA 翻译,NS1 蛋白具有诱导细胞凋亡[15-16]和抑制细胞凋亡的双重作用[17]。

2　AIV 与免疫系统的反应

2.1　AIV 对呼吸系统的影响　通过对高致病性 AIV H5N1 亚型感染人后的机体反应发现,H5N1 型禽流感亚型首先侵犯人呼吸系统,引起弥散性肺泡损伤,影响肺气体交换,患者出现低氧血症,进而影响多器官功能,严重者出现多器官功能衰竭、弥漫性血管内凝血等改变,患者最终可因呼吸、循环衰竭死亡。大约半数 H5N1 感染患儿有肺部实变体征,胸部 X 线片显示肺炎表现和胸腔少量积液,部分患儿病情发展迅速,发生急性呼吸窘迫综合征、肺出血、休克和多脏器功能衰竭,病死率可达 30%。同时 Gu[18]、Kofleweg[19]等研究显示 A/H5N1 病毒还可以通过血凝素与宿主受体结合感染,特异性受体是 α-2,3-糖苷唾液酸,它主要分布于下呼吸道肺泡Ⅱ型上皮、肺泡巨噬细胞和部分支气管黏膜上皮细胞中,因此病毒的复制可以引起下呼吸道的损坏。

2.2　AIV 对免疫系统的影响　外周血白细胞计数降低、淋巴细胞降低是人禽流感严重病例的临床特点之一[20]。实验结果显示,人禽流感患者的天门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶异常升高,其中以乳酸脱氢酶升高明显,且发病初期乳酸脱氢酶含量变异较大。于学武等[21]的研究发现,21 日龄雏鸭感染鹅源 H5N1 亚型 AIV 后,其胸腺、法氏囊和脾脏的 T、B 淋巴细胞分别对半刀豆蛋白 A 和脂多糖的增殖反应均不同程度地降低。黄韧等[20]通过实验表明,*BALB/c* 小鼠感染 H5N1 禽流感后,细胞因子的变化表现为:干扰素-α、肿瘤细胞坏死因子-α 水平下降,白细胞介素(interleukin,IL)-4、IL-18、IL-10 水平上升,而 IL-2 水平无明显变化。各种细胞因子组成的复杂的网络关系一直是 H5N1 病毒免疫机制中的难点之一。Seo 等[22]的实验证明了 TNF-α 对 AIV 复制的限制作用并且肿瘤细胞坏死因子-α 水平降低与严重的临床表现一致。但是也有学者认为 TNF-α 等细胞因子的炎症作用是导致免疫病理损害的重要原因[23]。

高致病性 AIV H5N1 感染人体后,病情进展迅速。其病变不仅是 H5N1 病毒直接破坏组织细胞所致,机体对 H5N1 的免疫应答也是非常重要的因素。另外,AIV 可以显著降低 T 细胞的转化能力,可能是胸腺受到侵害造成的,解剖检查变化中胸腺的病变可支持这一结论[24]。AIV 感染雏鸡 T 淋巴细胞增殖功能降低的可能原因包括:雏鸡感染 AIV 后,IL-2 水平降低、AIV 感染引起胸腺损伤,使正在成熟的病毒特异性 T 淋巴细胞被清除,或是发生特异性的免疫耐受,免疫细胞功能减弱。高雪丽等[1]发现雏鸡感染 AIV 后,胸腺严重受损,表现为萎缩、出血、淋巴细胞数量减少等病理变化。同时黄晓媛等[25]通过实验表明,机体是通过介导主要组织相容性抗原-Ⅰ和主要组织相容性抗原-Ⅱ抗原递呈途径,依靠 $CD8^+$ CTL 效应和抗 HA、NA 和 M1 的多种抗体效应直接杀伤病毒及感染的细胞和中和病毒从而抵御同型毒株的攻击。黄韧等[20]的实验结果表明,*BALB/c* 小鼠感染 AIV H5N1 后,外周血和脾脏中的 $CD3^+$T、$CD4^+$T、$CD8^+$T 细胞数量均下降,提示了 AIV 对细胞免疫功能损伤可能是 H5N1 禽流感发病机制中的一个重要因素。高明燕等[2]用小鼠作模型,感染 AIV 后的短时间内,其 T 淋巴细胞亚群的变化不明显,但在感染 12 d 以后,$CD8^+$细胞毒性 T 淋巴细胞所占 T 淋巴细胞的比例明显增高。

高明燕等[2]用 H4 亚型病毒感染犬肾细胞后,发现其能够诱导犬肾细胞的凋亡,并且在一定范围内,随着病毒剂量的增加和感染时间的延长,凋亡细胞的数量逐渐增多,而且只有具有感染性的流感病毒才能诱导细胞凋亡。另外,有细胞周期分析的结

果表明,AIV H4 亚型毒株还可以明显地抑制犬肾细胞的增殖,而且可能是使其阻断在 G_2/M 期[2]。Lam 等[16]研究发现,A/HK/483/97(H5N1)毒株的 NS1 蛋白可以通过活化 Caspase-3、7、8,诱导人的肺上皮细胞凋亡。

2.3 NS1-机体对病毒的免疫调控关键元件 AIV 之所以能够对宿主产生如此大面积、高破坏性的影响,其主要因为 NS1 在入侵初期未能做出有效反馈。根据赵莉霞等[26]的结果显示,NS1 在宿主细胞的表达导致了 mRNA 前体剪接因子的表达上升,提示病毒在抑制宿主蛋白表达的同时,宿主细胞可能通过促进 mRNA 前体剪接因子的表达而对抗病毒入侵造成影响。除此之外,NS1 蛋白在宿主细胞中的表达还能够导致糖代谢和脂肪代谢过程的异常,如参与糖代谢的异柠檬酸脱氢酶和参与脂肪代谢的乙酰辅酶 A 合成酶的表达升高。在动物体中,流感病毒在侵入初期,如果 NS1 蛋白不能有效抵抗宿主 IFN 的抗病毒作用,可能导致病毒在宿主机体内的繁殖与扩散,从而可能降低病毒对动物的致病力。NS1 的主要功能是抑制干扰素-α/β 介导的抗病毒作用:抑制宿主 mRNA 加工和转运,促进病毒基因表达[27]。Stephan 等[28]研究表明,NS1 蛋白可以抑制 JNK 和 AP-1 转录因子的激活从而利于病毒的复制和传播。

除此而外,梁立滨等[29]还发现了 AIV 感染后宿主一些干扰素诱导的免疫反应相关蛋白,包括干扰素诱导蛋白 3、ATP 依赖的干扰素反应蛋白 1、γ 干扰素诱导的 P47 鸟苷三磷酸酶和一些受体蛋白,其在病毒与宿主的相互作用过程中可能发挥重要作用。另外,在 AIV 感染及其疫苗免疫反应中 HI 和 NT 抗体反应也是 2 种重要的体液免疫反应[30]。

3 禽流感疫苗

目前针对禽流感的疫苗主要是通过基因工程设计出的 DNA 疫苗及一部分蛋白疫苗,其中应用较为广泛且防治禽流感最具潜力的是 DNA 疫苗。

由于 DNA 免疫能够诱导机体产生抗体反应和特异性细胞毒性 T 淋巴细胞反应,在克服了灭活疫苗的和普通弧单位疫苗缺点的同时,又避免了重组活载体疫苗免疫反应受母源抗体、循环抗体及细胞免疫记忆干扰的不足及其潜在的突变危险;另外,DNA 免疫还具有高度安全稳定、不受宿主种属特性及免疫状态限制、可反复加强免疫以及可在免疫后迅速启动有效而全面的免疫反应记忆效应、免疫持续期长的突出优点。H5 亚型 DNA 疫苗质粒 pCAG-GoptiHA5 以不同剂量和方法免疫 SPF 鸡后均诱导了高水平的 HI 抗体,有望成为预防 H5 亚型高致病力禽流感的新型基因工程疫苗。同时经过实验目前充分证实 DNA 疫苗 pCAGGoptiHA5 免疫接种 SPF 鸡后能有效激发机体的细胞免疫应答,免疫活性 T 淋巴细胞活化、增殖,当机体受到病毒攻击时,外周血液中 $CD8^+$T 淋巴细胞数量迅速上升,在机体清除病毒中发挥重要作用[31]。采用鸡 β-actin 启动子表达载体 pCAGGS 可显著提高 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗诱导的保护性抗体免疫反应水平,增强免疫保护效果[32]。

禽流感变异株重组病毒(Re-4 株)是禽流感反向遗传操作技术在重组 AIV 灭活疫苗研究中再次成功应用。田国彬等[33]的结果表明该疫苗种毒株对 SPF 鸡胚和 SPF 鸡均无致病性,并且在鸡胚中能够稳定增殖,并且具有良好的抗原针对性。

由 H1N1 流感病毒结构蛋白重组的流感病毒样颗粒(virus-like particle,VLPs),通过鼻腔免疫小鼠和雪貂,可以诱导较高交叉应答的 IgG 和 IgA 抗体水平,可以保护小鼠抵御 1918 H1N1 流感病毒和致命 H5N1 流感病毒的攻击[34]。*BALB/c* 小鼠模型显示,相同剂量的 VLPs 与全病毒的灭活疫苗对同型毒株保护率相同,小鼠脾脏 $CD8^+$T 淋巴细胞分泌的干扰素-γ 细胞因子相比全病毒灭活疫苗和 PBS 免疫小鼠高,表明 VLPs 免疫应答介导更强的细胞毒性 T 淋巴细胞效应[35]。随着 H9 亚型禽流感灭活疫苗单苗或联苗的广泛应用,H9 亚型禽流感疫病已得到了有效的控制。然而,近几年来 H9 亚型禽流感在免疫鸡群中仍时有发生。林绮萍等[36]的研究证实,利用 SS/94 株制备的鸡新支流三联灭活苗仍然具有良好的免疫原性。鸡 γ-干扰素联合疫苗免疫雏鸡后能够提高 T 和 B 细胞增殖功能,进而使 T 和 B 细胞进一步发挥其免疫学功能。

许家荣等[37]用人工合成囊素肽与禽流感(H9N2)油乳剂灭活疫苗同时注射到鸡的皮下,证明囊素肽能够显著提高雏鸡对 H9N2 亚型禽流感油佐剂灭活疫苗的体液免疫反应。有学者发现相比胞壁酰二肽作为佐剂,纳米铝佐剂可以导致更高的抗体滴度。杨忠东等[38]还发现 MF59 作为流感疫苗佐剂具有更好的增强疫苗免疫原性的作用。已有学者证实人参皂甙 Rb1 对禽流感油乳剂灭活苗有较强的免疫增强作用。

值得注意的是通过近期国际上对 AIV 结构的解析,研究者意识到 NA 是重要的抗流感药物靶点,而 2013 年末引发的中国内地禽流感爆发并致人死亡的 H7N9 病毒基因片段说明 AIV 具有多态性。因

此如何针对不同种病毒选择具有针对性的抗病毒药物成为能否有效预防的关键。

总体来说,目前能够对 AIV 起到高效免疫作用的疫苗还未被广泛应用。然而随着其病毒结构的不断被解析及相关感染机制尤其是传播途径的探明,对于疫苗的研发有着极为重要的作用。

4　禽流感的检测

禽流感依据临床表现很难诊断,主要靠病原学诊断,包括血清学、病毒分离和分子生物学方法。动物流感研究中心在近几年相继建立了禽流感琼脂扩散、血凝抑制试验、神经氨酸酶抑制试验、间接酶联免疫吸附试验等血清学诊断技术以及分子诊断技术反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR),满足了我国禽流感流行病学监测及现代诊断与防治的迫切需要。酶联免疫吸附试验、血凝试验、琼脂扩散试验被认为是禽流感血清学诊断的国际标准检测手段,然而这些检测方法并不能准确区分出感染禽和免疫禽,给禽流感预防和监控带来了很大的阻力[8]。另外,一些新的方法不断出现。

刘盛平等[39]采用金黄色葡萄球菌 A 蛋白包被方法制备的压电禽流感生物传感器对禽流感抗原的响应快速,一般在 40 min 内即可对 AIV 抗原做出检测。系统具有灵敏度高、响应速度快、携带方便、价格便宜、使用成本低廉等特点;此外,还有系统硬件模块体积小、重量轻的特点。现有的荧光定量 PCR 检测方法每次只能检测禽流感单个亚型,费时费力,检测成本较高。RT-PCR 是早期诊断 H5N1-HAV 的最佳手段,4 ~ 6 h 内可获结果,但需根据当地病毒基因组学变化,适时更新引物和探针并且阳性率高,一般需要反复检测。秦智峰等[40]开发了 AIV H5 、H7 和 H9 亚型的实时荧光定量 PCR 检测方法和试剂盒,具有针对性强、检测效率高、检测成本低的特点。

另外,还有学者还根据 NS1 蛋白建立了许多鉴别诊断方法。2001 年 Ozaki 等[41]以重组 NS1 蛋白作为抗原建立的 ELISA 诊断法。

5　展望

对于 AIV 的消毒可以有很多种方法,如肥皂、乙醇、漂白粉、碘剂等常用消毒、清洁剂、高温(65 ℃ 30 min;100 ℃ 2 min)、阳光照射 40 ~ 48 h 或者紫外线直接照射均可杀灭 H5N1 病毒[42]。

H5N1 病毒与人类流感病毒的 4 500 个氨基酸中只有 19 个不同,一旦差异性降到 10 个,禽流感就会突变。早发现、早诊断、早治疗是救治成功的前提。从现有的临床报道分析,发现晚、病情重、进展快、病死率高是现阶段人禽流感的特点。分子生物学方法在 AIV 病原学检测、诊断方面有较大优势,但是对试验的硬件条件要求较高,不能在基层完全推广普及。

对于禽流感呈现的跨物种传播,需要对家禽等参与禽流感传播链条的各类商业化物种均应予以防护。然而,目前中国只对禽类实施 H5 疫苗强制免疫,对猪、犬等动物的 H5 免疫防控缺少相关部门的重视。同时,对各类亚型疏于防范的情形还存在,例如,政府相比 H5 亚型禽流感灭活疫苗,H9 亚型禽流感灭活疫苗缺少补贴,一些养殖户往往不太重视,疏于防范。

另外,关于 NS1 作用机制的研究较少,需要加强对流感病毒 NSI 蛋白致病性的研究[27]。AIV 感染人类的机制还不完全清楚,且水生鸟类作为人类新型瘟疫性流感基因库持续存在,构成了对人类的巨大威胁,而当前治疗流感的药物不良反应大,又易产生耐药性。因此,应继续加快新药的开发、疫苗的进程,同时考虑将磷酸奥司他韦等特效药与一些抗病毒药物混合使用,以增强疗效的同时避免病毒产生抗药性变异,以及注意药物的抗毒谱、耐药率以及相关不良反应。

而对于目前禽流感病情尚无针对性有效药物前提下,对疫情的预防在一段时间里仍应为人们所采取的主要防范方式。目前通过对 H7N9 病毒动态重配模式研究表明,其病毒仍处于快速变异期,在人与人之间仍不具备相互传染的条件,因此控制禽到人的传播,做好消毒防卫工作,定期监控家禽市场,均可以有效降低人感染禽流感的风险,从而将病毒感染控制到最低范围。

参考文献:

[1] 高雪丽,郑世民. AIV 感染 7 日龄雏鸡 T 辫色细胞增殖功能变化[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(8):90.

[2] 高明燕,胡茂志,徐步. H4 亚型禽流感毒株的生物学特性[J]. 中国家禽,2007,29(21):55-57.

[3] 褚玲娜,詹勇,许梓荣. 禽流感病毒的致病性和免疫性研究进展[J]. 中国兽药杂志,2005,39(1):28-32.

[4] Olsen B,Munster V J,Wallensten A,*et al*. Globle patterns of influenza A virus in wild birds[J]. *Science*,2006,312(5772):384-388.

[5] Thanawongnuwech R,Amonsin A,Tantilertcharoen R,*et al*. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1[J]. *Emerg Infect Dis*,2005,11(5):699-701.

[6] Kou Z,Li Y D,Yin Z H,*et al*. The survey of H5NI Flu virus in wild birds in 14 provinces of China from 2004 to 2007[J]. *PLoS*

One,2009,4(9):e6926.

[7] Krauss S,Walker D,Pryor S P,*et al*. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*,2004,4(3):177-189.

[8] 贺番,曹瑞兵,郝永清,等. 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的分子生物学特性与功能[J]. 动物医学进展,2007,28(4):89-92.

[9] McAuley J L,Chipuk J E,Boyd K L,*et al*. PBl-F2 proteins from H5N1 and 20th century pandemic influenza viruses cause immunopathology[J]. *PLoS Pathog*,2010,6(7):1-12.

[10] 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):2814-2822.

[11] Wu W L,Chen Y X,Wang P,*et al*. Antigenic profile of avian H5N1 viruses in Asia from 2002 to 2007[J]. *J Virol*,2008,82(4):1798-1807.

[12] 刘志军,王泽霖,何万岭,等. 禽流感病毒分子生物学最新研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2005(4):5-7.

[13] Suarez D L. Evolution of avian influenza viruses[J]. *Vet Microbiol*,2000,74(1/2):15-27.

[14] Li S,Min J Y,Krug R M,*et al*. Binding of the influenza A virus NSl protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA[J]. *Virology*,2006,349(1):13-21.

[15] Schultz-Cherry S,Dybdahl-Sissoko N,Neumann G,*et al*. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells[J]. *J Virol*,2001,75(17):7875-7881.

[16] Lam W Y,Tang J W,Yeung A C,*et al*. Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells[J]. *Virology*,2008,82(2):2741-2751.

[17] Zhirnov O P,Konakova T E,Wolff T,*et al*. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis[J]. *J Virol*,2002,76(4):1617-1625.

[18] Gu J,Xie Z,Gun Z,*et al*. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond:a molecular pathology study[J]. *Lancet*,2007,370(9593):1137-1145.

[19] Kofleweg C,Gu J. Pathology,molecular biology and pathogenesis of avian influenza A(H5N1) infection in humans[J]. *Am J Pathol*,2008,172(5):1155-1170.

[20] 黄韧,邓少嫦,王颖彦,等. 禽流感 H5N1 亚型病毒感染 *BALB/c* 小鼠的免疫应答[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2011,31(5):406-412.

[21] 于学武,郑世民,刘明,等. 雏鸭感染鹅源 H5N1 亚型禽流感病毒后疫器官淋巴细胞增殖功能变化[J]. 中国家禽,2012,34(22):12-15.

[22] Seo S H,Webster R G. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells[J]. *J Virol*,2002,76(3):1071-1076.

[23] Hussell T,Pennyeook A,Openshaw P J. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology[J]. *Eur J lmmunol*,2001,31(9):2566-2573.

[24] 唐建霞,王幼明,黄克和. 实验性感染禽流感病毒抑制鸡的细胞免疫功能[J]. 江苏农业科学,2004(1):75-76,86.

[25] 黄晓媛,施金荣,韩锡鑫,等. H5N1 重组禽流感病毒样颗粒免疫原性研究[J]. 微生物学免疫学进展,2013,41(1):7-11.

[26] 赵莉霞,张莹莹,杨志新,等. 禽流感病毒 NS1 蛋白对细胞的影响[J]. 生物工程学报,2008,24(11):1912-1917.

[27] 董欣宇,张志,卫广森. 禽流感病毒 NS1 蛋白的作用机制研究进展[J]. 中国动物检疫,2008,25(5):46-48.

[28] Stephan L,Wang X Y,Christina E,*et al*. The influenza A virus NSI protein inhibits activation of Jun N-Terminal kinase and AP-I transcription factors[J]. *J Virol*,2002,76(21):11166-11171.

[29] 梁立滨,赵东明,李俊平,等. H5N1 亚型禽流感病毒感染小鼠肺组织蛋白质组分析[J]. 中国预防兽医学报,2011,33(4):261-264.

[30] Tonegawa K,Nobusawa E,Nakajima K,*et al*. Analysis of epitope recognition of antibodies induced by DNA immunization against hemagglutinin protein of influenza A virus[J]. *Vaccine*,2003,21(23):3118-3125.

[31] 张洪波,姜永萍,王全英,等. 禽流感病毒 HA 基因 DNA 疫苗诱导鸡 $CD8^+$ T 细胞的动态变化[J]. 动物医学进展,2006,27(11):54-57.

[32] 姜永萍,张洪波,步志高,等. 表达载体 pCAGGS 显著增强禽流感 DNA 疫苗的免疫保护效果[J]. 中国农业科学,2006,39(4):825-830.

[33] 田国彬,曾显营,钟功勋,等. H5N1 亚型禽流感变异株灭活疫苗种毒 Re-4 株的生物学特性及免疫原性研究[J]. 中国预防兽医学报,2009,31(9):717-720.

[34] 刘胜兵,王从荣. 禽流感与粘膜免疫[J]. 生物学通报,2011,46(3):4-6.

[35] Pushko P,Tumpey T M,Van Hoeven N,*et al*. Evaluation of influenza virus-like particles and nanosome adjuvant as candidate vaccine for avain influenza[J]. *Vaccine*,2007,25(21):4283-4290.

[36] 林绮萍,陈瑞爱,黄文科,等. 鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感(H9 亚型)三联灭活疫苗对禽流感 H9 亚型流行株攻毒的保护作用[J]. 畜牧与兽医,2012,44(1):12-15.

[37] 许家荣,陈闻,李臻兴,等. 囊素肽对禽流感(H9N2)油乳剂灭活疫苗免疫效果的影响[J]. 浙江农业学报,2010,22(3):298-301.

[38] 杨忠东,王石磊,许文婷,等. 禽流感 H5N1 灭活疫苗与不同纳米化佐剂联合免疫研究[J]. 国际生物制品杂志,2011,34(3):126-129.

[39] 刘盛平,陈国明,周奇,等. 多通道压力禽流感快速检测系统及应用研究[J]. 仪器仪表学报,2008,29(8):1583-1587.

[40] 秦智峰,吕建强,肖性龙,等. 禽流感 H5、H7、H9 亚型多重实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 病毒学报,2006,22(2):131-136.

[41] Ozaki H,Sugiura T,Sugita S. Detection of antibodies to the non structural protein(NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses[J]. *Vet Microbiol*,2001,82(2):111-119.

[42] de Jong M D,Hien T T. Avian influenza A(H5N1)[J]. *J Clin Virol*,2006,35(9):2-13.

(本文编辑:王 燕)