

猪与人甲₃型流感病毒的比较研究

I、抗原性及多肽结构分析

*田慕贞 罗群明 严家新 林 乔 冯玲玲

(湖北省医学科学院病毒研究所, 武汉)

提 要

比较1978、81、82年从猪中分离出的甲₃流感病毒与同年代人甲₃流感病毒的抗原性及多肽结构。从血清学、血凝素肽图以及SDS-PAGE电泳图都表明逐年猪甲₃与人甲₃血凝素(HA)及神经氨酸酶(NA)抗原性密切相关。而且膜蛋白与核蛋白也基本相同。更明确表明人的甲₃流感病毒年年不断地极易传给猪。猪中有了甲₃病毒株其NP迁移位置与其它毒株略有不同,文中对此进行了讨论。

用¹²⁵I标记血凝素肽图比较1979、1981、1982、1983年猪与人甲₃毒株,逐年在肽图上都有明显差异,同年不同时间分离的毒株之间,肽图上也略有改变,更进一步表明此法的灵敏性。

早在1930年shop^[1]就已证明猪流感是由病毒引起。1969年在台湾的屠宰场^[2]第一次由猪中分离出人的甲₃(A/香港/1/68)流感病毒。随后在世界各地用分离病毒方法及血清方法都证明甲₃流感病毒广泛存在于猪群中^[3],对其抗原性也做了分析^[4],但逐年将猪群中分离的甲₃流感病毒与人甲₃流感病毒进行抗原性分析比较尚未见报道。本文将1978—1983年从1301份猪咽拭标本中分离到的18株甲₃型病毒选出不同年代,不同批号的病毒进行血凝素(HA)与神经氨酸酶(NA)抗原分析,并应用¹²⁵I标记的肽图分析HA的微细变化。对病毒其他多肽成份也用了SDS-PAGE作了比较。现将结果报告如下:

材 料 与 方 法

1、病毒株:下列甲₃病毒(见表1)用于抗原分析。

2、免疫血清:均为本所自制,用新鲜病毒尿囊液免疫公鸡,静脉注射5毫升,腹腔注射8毫升。第一次用灭活病毒,隔2天后,用活病毒以同样方法与剂量再注射一次,血抑效价达1:160以上放血。

3、交叉血凝抑制试验(HI)与神经氨酸酶抑制试验(NI):参照文献(5)。抗原比按朱氏法计算(6)。

本稿1986年2月18日收到

*已调同济医科大学附属协和医院病毒研究室

表1. 选用于抗原分析的甲₃流感病毒
Table 1. The strains used for antigenic analysis

毒株 (猪) Strain (pig)	分离日期 Isolated date	分离地点 Isolated place	毒株 (人) Strain (human)
79-163	1979, 8, 10	湖北恩施	京科 68-1
81-54	1981, 1, 15	湖北建始	鄂防 72-243
81-56	1981, 1, 15	湖北建始	鄂防 75-8
82-123	1982, 9, 5	湖北肉联	鄂防 77-38
82-199	1982, 11, 10	湖北肉联	京科 79-2
82-231	1982, 11, 25	湖北肉联	汉防 82-135
82-247	1982, 12, 2	湖北肉联	沙防 83-15
82-335	1982, 12, 20	湖北肉联	

- 4、SDS-PAGE 对病毒主要多肽的分析方法。
- 5、HA 的¹²⁵I 标记方法。
- 6、HA 酶解肽图的分离方法。
- 4、5、6 三项方法与文献^[7]完全相同。

结 果

一、抗原分析:

1、HA 抗原分析: 先将由猪中分离到的18株病毒与人 H₃N₂ 毒株京科79-2同时和京科79-2 病毒的免疫血清进行血凝抑制试验, 经鉴定皆为甲₃型流感病毒, 选择不同年代、不同地点、不同日期、不同采样批号, 在同一批号内则取抗体滴度相差较大的毒株进一步做交叉血凝抑制试验。由表 2、3 可看出, 从猪中所分离到的甲₃流感病毒, 其血凝素抗原性皆接近人的京科 79-2 与汉防 82-135 毒株, 与 1977 年以前人的毒株相隔较远。即 3 年所得到的猪甲₃流感病毒皆与同年代人甲₃毒株血凝素抗原性相近。

2、NA 抗原性测定: 对部分毒株进行了定性的交叉 NA 抑制试验。从表 4 可见, 7 株猪甲₃型病毒的血清都可以抑制人京科79-2及汉防 82-135 病毒, 但不能抑制1977年以前人毒株的 NA 活性。人京科 79-2 抗血清可抑制猪 79-163, 81-56 毒株及部分1982年的猪甲₃病毒 NA 活性。人汉防82-135血清却可抑制猪79-163猪81-56及1982年部分猪(82-335除外)猪甲₃毒株 NA 活性, 但猪79-163与81-56与人京科79-2抗原性相近。猪1982年毒株与人1982年毒株抗原性更相近, 猪毒株之间 NA 抗原性并不完全相同, 特别是猪82-335毒株, 其血清可抑制除京科68-1以外人1972-1982年毒株 NA 活性, 但所有人毒株的血清, 甚至1982年的毒株血清都不能抑制猪82-335的 NA 活性, 可能此毒株的 NA 已有些变异, 其 NA 抗原性有待今后进一步分析。

3、流感病毒主要结构蛋白的 SDS-PAGE 比较分析:

表2. 猪与人甲₃流感病毒交叉血凝抑制试验
Table 2. Cross haemagglutination inhibition reaction of H₃N₂ viruses from pigs and humans

血清 Sera	各种病毒的血液抑制度 HI titers to each antigen													
	京科 68-1	粤防 72-243	鄂防 75-8	粤防 77-38	京科 79-2	汉防 82-135	猪 79-163	猪 81-54	猪 81-56	猪 82-123	猪 82-247	猪 82-199	猪 82-231	猪 82-335
京科 68-1	160	20	20	10	20	20	40	10	20	10	20	10	10	10
粤防 72-243	40	160	40	40	40	10	20	40	40	40	10	40	20	40
鄂防 75-8	<10	10	80	20	10	10	<40	<20	<10	<10	<10	<10	<10	10
粤防 77-38	<10	<10	10	160	80	10	40	20	80	10	10	<10	20	<10
京科 79-2	10	<10	10	160	160	20	160	80	160	80	80	20	80	80
汉防 82-135	10	10	<10	40	40	80	80	40	80	40	40	20	40	40
猪 79-163	<10	<10	10	1280	1280	160	1280	320	1280	90	40	80	320	160
猪 81-54	<10	10	40	1280	1280	1280	640	1280	1280	1280	1280	160	640	640
猪 81-56	<10	<10	40	1280	1280	640	1280	320	1280	160	160	40	160	80
猪 82-123	<10	<10	<10	80	40	640	80	80	80	80	160	20	80	20
猪 82-247	<10	<10	10	80	80	320	80	80	80	160	160	40	80	40
猪 82-199	<10	<10	20	80	30	80	80	40	40	40	40	80	40	40
猪 82-231	<10	<10	<10	80	80	160	160	80	160	160	160	40	160	40
猪 82-335	<10	<10	10	320	320	160	160	320	160	160	80	40	160	80

表3. 不同猪甲₃型流感病毒与人甲₃型流感病毒抗原分析
Table 3. The relationship of haemagglutinin antigens between pig and human influenza A (H₃N₂) viruses

血清	病 毒													
	京科 68-1	粤防 72-243	鄂防 75-8	粤防 77-38	京科 79-2	汉防 82-135	猪 79-163	猪 81-54	猪 81-56	猪 81-123	猪 82-247	猪 82-199	猪 82-231	猪 82-335
京科 68-1	1	5.66	8	16	5.66	11.3	22.6	45	32	11.3	8	11.3	16	11.3
粤防 72-243		1	5.7	5.6	11.3	16	32	22.6	22.6	5.6	5.6	5.6	11.3	5.7
鄂防 75-8			1	8	11.3	11.3	32	8	16	8	11.3	5.6	11.3	8
粤防 77-38				1	2	4	2	2.8	1.4	4	4	4	4	2
京科 79-2					1	2.8	1.4	2	1.4	2.5	2	4	2.8	1.4
汉防 82-135						1	1.4	2	1.4	1	0.7	2	1.4	2.8
猪 79-163							1	2.8	1	4	5.6	2	2	2.8
猪 81-54								1	2	1.4	1	4	2	0.7
猪 81-56									1	2.5	2.8	8	2.8	2.8
猪 81-123										1	1	2.8	1	1.4
猪 82-247											1	1	0.7	1.4
猪 82-199												1	2.8	4
猪 82-231													1	1.4
猪 82-335														1

表4. 神经氨酸酶抑制试验
Table 4. Cross neuraminidase inhibition reaction of H₃N₂ viruses from pig and human

病毒 antigen	血清 sera												
	京科 68-1 1/8 1/16	粤防 72-243 1/8 1/16	鄂防 75-8 1/8 1/16	粤防 77-38 1/8 1/16	京科 79-2 1/8 1/16	汉防 82-135 1/8 1/16	猪 79-163 1/8 1/18	猪 51-56 1/8 1/16	猪 82-123 1/8 1/16	猪 82-199 1/8 1/16	猪 82-231 1/8 1/16	猪 82-247 1/8 1/16	猪 82-335 1/8 1/16
京科 68-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
粤防 72-243	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
鄂防 75-8	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
粤防 77-38	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
京科 79-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
汉防 82-135	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
猪 79-163	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
猪 81-56	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
猪 82-123	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
猪 82-199	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
猪 82-231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
猪 82-247	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
猪 82-335	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注: 表内“+”号表示病毒与血清之间不发生抑制反应, “-”号则表示病毒酶活性可被抑制。

“+” = no inhibition reaction

“-” = the activity of neuraminidase inhibited

△ = the dilution of serum



图1: 流感病毒主要结构蛋白
SDS—PAGE图谱 (非还原条件下)

Fig.1 Comparative migration patterns of the main structural polypeptides of pig and human influenza A (H_3N_2) viruses
(Non-reduction condition in SDS-PAGE)

1=82-135	2=82-247	3=82-231
4=82-335	5=82-123	6=82-199
7=81-56	8=79-163	9=79-2

图1表示7株猪甲₃流感病毒和2株人甲₃流感病毒在非还原条件下 SDS-PAGE 系统中的电泳图谱。由图1中可见:

(1) 膜蛋白(MP)的位置在各毒株间基本一致。

(2) 核蛋白(NP)的位置在1982年分离的猪毒株199、123、335、231和247与同一年分离的人病毒82-135之间是基本一致。1979年猪163毒株 HA 的位置稍低,但与同一年分离的人病毒79-2都在同一水平线上。即在同一年分离的病毒,无论来源于人还是猪,其HA电泳迁移率基本相同,而1981年分离的猪病毒81—56毒株其HA位置则介于上述二类病毒之间。

二、不同毒株 HA 的¹²⁵I 标记肽图分析比较:

前已报道^[7], 流感病毒 HA 的¹²⁵I 标记肽图在甲₁, 甲₃和乙型病毒之间,彼此明显不同。在1972—1983年分离的甲₃型不同毒株间既有相似点,又有不同点。各毒株 HA 的变异同各毒株的分离时间间隔有一定关系。将5株猪流感病毒 HA 的¹²⁵I 标记肽图与该文报道的肽图相比较可以发现,这5株病毒与甲₁和乙型病毒完全不相同,而且与较早流行的甲₃型病毒也有明显区别,而比较接近于同年或邻近年份流行的人甲₃型病毒。

peptide maps

diagrams

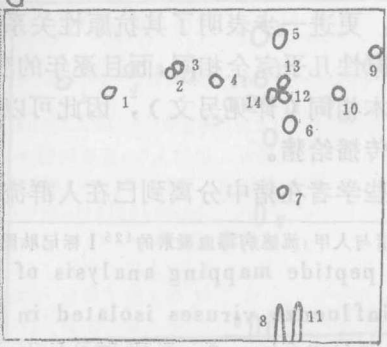
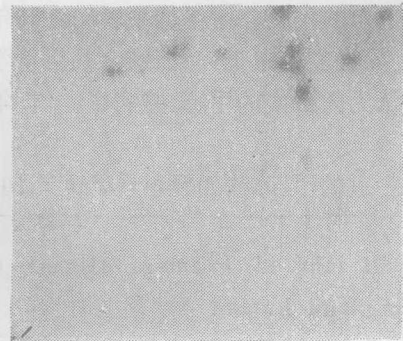
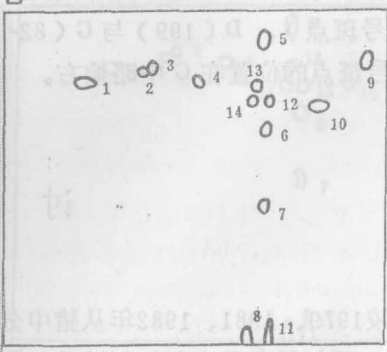
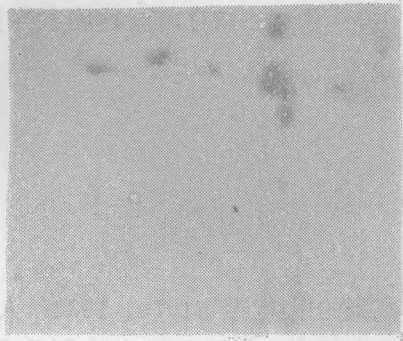
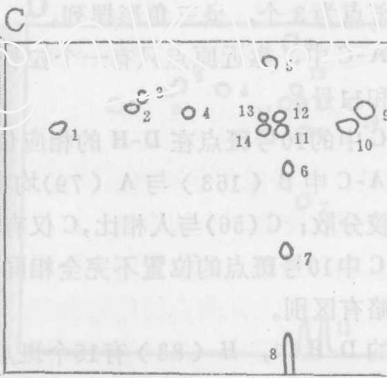
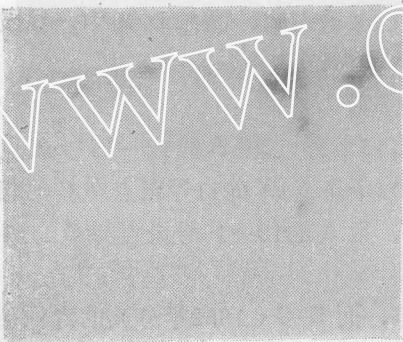
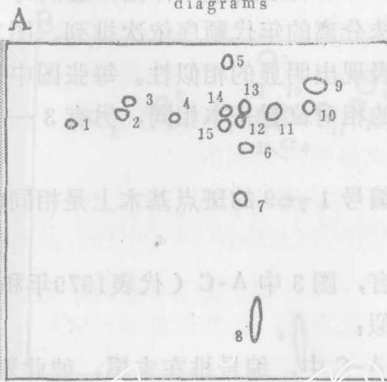
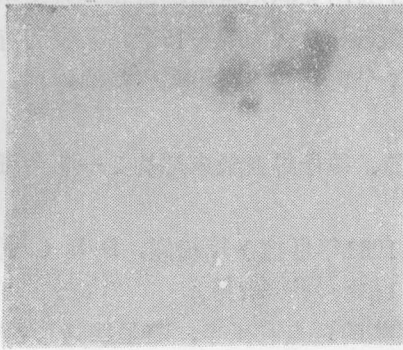


图2 (A-H) 所示为这5株猪流感病毒和3株相关的人流感病毒HA的¹²⁵I标记肽图, 系按毒株分离的年代顺序依次排列。图3为图2的示意图, 这8张肽图中斑点分布的基本格局表现出明显的相似性。每张图中斑点总数都为14—15个, 其中约有11—12个斑点在图中的相对位置基本相同, 另有3—4个斑点则存在不同程度的差别, 具体说明如下:

各图中编号1—9的斑点基本上是相同的, 编号排在最末尾的3—4个斑点彼此聚集在一起。

相对而言, 图3中A-C (代表1979年和1981年毒株) 较相似, D-H (均为1982年毒株) 较相似:

1、在A-C中, 编号排在末尾, 彼此聚集的斑点有4个, 略呈四边形摆列, 而D-H中相应的斑点为3个, 呈三角形摆列。

2、在A-C中, 靠近原点只有一个拉长的8号斑点, 而在D-H中, 相应的斑点有2个; 8号和11号。

3、A-C中的10号斑点在D-H的相应位置不存在。

图3的A-C中B (163) 与A (79) 均有15个斑点, 但B的12—15号斑点比A的相应4个斑点较分散; C (56) 与人相比, C仅有14个斑点, A的11号斑点在C的相应位置不存在, A与C中10号斑点的位置不完全相同, 且A的12—15号斑点与C的11—14号斑点的摆列也略有区别。

在图3的D-H中, H (83) 有15个斑点, 而D-G (1982年分离的毒株) 均为14个斑点, E (231) 与F (247) 基本是相同的。E、F与H的12—14号斑点的当对位置相同 (但H多15号斑点), D (199) 与G (82—135) 的12—14号斑点的相对位置略有不同, 其中13号斑点的位置在G中略偏右。

讨 论

我们比较1979、1981、1982年从猪中分离到的甲₃病毒与1979、1982年人甲₃病毒的抗原性关系, 不仅用交叉血凝抑制试验, 而且应用¹²⁵I标记血凝素肽图及SDS-PAGE电泳图方法, 更进一步表明了其抗原性关系密切的程度。所得结果表明, 同年代毒株二者血凝素抗原性几乎完全相同, 而且逐年的变异程度也完全一致。结合其生物学特性及流行季节都基本相同 (详见另文), 因此可以认为人群中的甲₃流感病毒, 年年不断地、而且极容易传播给猪。

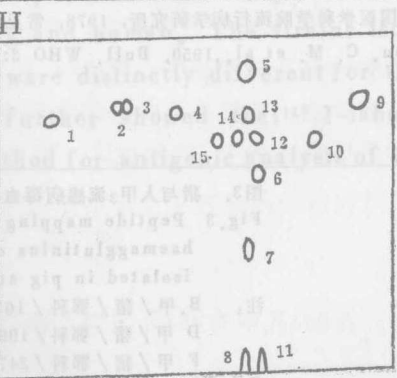
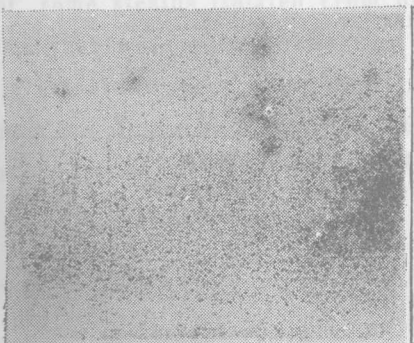
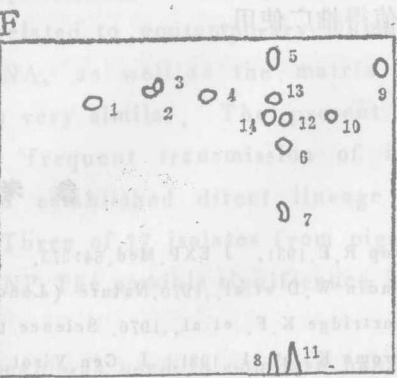
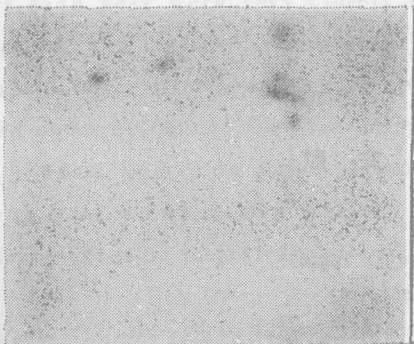
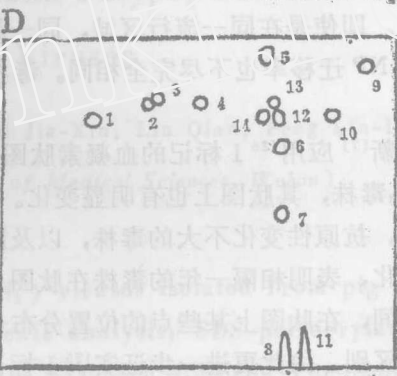
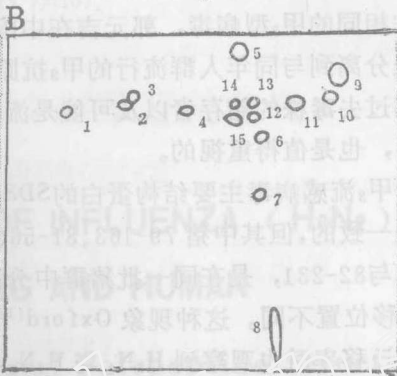
虽然有些学者在猪中分离到已在人群流行过的甲₃毒株如Shortridge^[8] 1976年从香

图2 猪与人甲₃流感病毒血凝素的¹²⁵I标记肽图分析
Fig.2 peptide mapping analysis of ¹²⁵I labeled haemagglutinins of some influenza viruses isolated in pig and human

注: A. 甲/京科/2/79; C. 甲/猪/鄂科/56/80; E. 甲/猪/鄂科/231/82; G. 甲/汉防/135/82.

peptide maps

diagrams



www.cnki.net

港猪中分离到抗原性与1968年相同的甲₃型毒株。Orris 在日本^[9] 1977年分离到与1972年抗原性相同的甲₃型病毒, 郭元吉在中国1977年分离到抗原性与1975年相同的毒株, 但大量是分离到与同年人群流行的甲₃抗原相同的毒株^[10]。因此, 我们认为猪不仅可能是人流感过去毒株的储存者以及可能是流感病毒发生重组的场所, 而猪在人流感传播方面的作用, 也是值得重视的。

对猪甲₃流感病毒主要结构蛋白的SDS-PAGE电泳图分析, 表明同年猪与人甲₃流感毒株基本是一致的, 但其中猪79-163、81-56、82-247其核蛋白(NP)的迁移位置较低。特别是82-247与82-231, 是在同一批猪群中分离出, 而且它们的血凝素肽图非常相似, 但二者NP迁移位置不同。这种现象Oxford^[11]在分析同一亚型内人流感病毒结构蛋白与非结构蛋白迁移率时也观察到H₃N₂与H₁N₁毒株其蛋白迁移率最早发生变化的是NP, 其次是MP。即使是在同一流行区域, 同一暴发点, 所分离出的同一亚型内抗原性相似的毒株, 其NP迁移率也不尽完全相同。毒株之间NP迁移率不同, 其意义如何? 尚待研究。

严家新^[7]应用¹²⁵I标记的血凝素肽图分析比较相隔2—3年的抗原性已有较明显变化的甲₃毒株, 其肽图上也有明显变化。本文用此法分析了1979、1981、1982、1983相隔一年, 抗原性变化不大的毒株, 以及同一年内不同月份, 不同批号之间, 毒株肽图之间的变化, 表明相隔一年的毒株在肽图上已清楚地可看出不同之处。即使在同一年不同批号之间, 在肽图上某些点的位置分布也略有不同。而同一批内的二个毒株, 则几乎分辨不出区别, 由此更进一步证实¹²⁵I标记肽图是分析、鉴别病毒蛋白极为灵敏而简便的方法, 值得推广使用。

参 考 文 献

- [1] Shop R.E., 1931, J EXP. Med, 54:373.
- [2] Kindin W.D et al., 1970, Nature (London) 228:857.
- [3] Shortridge K.F. et al., 1976, Science 196:1454.
- [4] Nerome K. et al., 1981, J. Gen. Virol. 56:441.
- [5] 中国医学科学院流行病学研究所, 1978, 常见病毒实验技术 P33 科学出版社, 北京.
- [6] Chu. C. M. et al., 1950, Bull. WHO 3:187.

图3. 猪与人甲₃流感病毒血凝素的¹²⁵I标记肽图分析
Fig.3 Peptide mapping analysis of¹²⁵I labeled haemagglutinins of some influenza viruses isolated in pig and human

注: B. 甲/猪/鄂科/163/79;
D. 甲/猪/鄂科/199/82;
F. 甲/猪/鄂科/247/82;
H. 甲/沙防/15/83

- [7] 严家新等, 1985, 中华微生物学免疫学杂志 5(3):140.
[8] Orris K, et al., 1982, Archives of Virology 73:103.
[9] Oxford J.S., 1981, J. Gen. Virol., 56:431.

COMPARATIVE STUDIES OF INFLUENZA (H_3N_2) ISOLATED FROM PIG AND HUMAN

I. Analysis of Antigenicity and Polypeptide Structure of H_3N_2 Influenza Viruses

Tian Mu-Zhen, Luo Qun-ming, Yan Jia-Xin, Lin Qian, Feng Lin-lin
(Virology Institute, Hubei Academy of Medical Sciences, Wuhan)

Comparison of influenza A (H_3N_2) viruses isolated from pig and human in 1979—1982 in respect to antigenic analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoreses and haemagglutinin maps has been studied. The isolates from pigs each year were very closely related to contemporary human isolates. The surface antigens, HA and NA, as well as the matrix proteins (MP) and nucleoproteins (NP) were very similar. The present findings provided some evidences for the very frequent transmission of influenza (H_3N_2) from human to pig hosts and established direct lineage between pig virus strains and human strains. Three of 17 isolates from pigs showed some differences at migration rate of NP. The possible significance is discussed.

The method¹²⁵ I-labelled peptide map was used to compare haemagglutinins of some strains isolated from pig and human. The strains isolated at the same year were quite similar but were distinctly different for those isolated in different years. The results further showed that¹²⁵ I-labelled peptide map is a simple and sensitive method for antigenic analysis of influenza viruses.