

西尼罗病毒研究进展*

刘卫滨, 梁国栋**

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

Advances in Research of West Nile Virus

LIU Wei-bin, LIANG Guo-dong**

(State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese CDC, Beijing 100052, China)

关键词: 黄病毒; 西尼罗病毒; 脊髓灰质炎样综合症; 脑炎; 流行病学;

中图分类号: R373

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0092-05

西尼罗病毒 (*West Nile virus*, WNV) 首先在 1937 年乌干达的西尼罗地区的 Omogo 镇的一位发热病人血液中分离到, 从而得名^[1]。西尼罗病毒属于黄病毒科黄病毒属。黄病毒科病毒共有 70 余种成员组成, 其中黄病毒属大多属于经蚊虫、蜱等媒介传播的虫媒病毒 (Arbovirus, Arthropod-borne-virus), 包括黄热病病毒、登革病毒、日本脑炎病毒、蜱传森林脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒和墨雷谷脑炎病毒等。黄病毒科病毒所致的疾病是能够导致严重的公共卫生问题: 一方面, 所致疾病可以通过蚊或蜱等吸血媒介传播, 大多为人畜共患病; 另一方面, 所致疾病大多缺乏有效的治疗、预防和控制措施, 给疾病控制提出了严峻的挑战。以登革病毒、日本脑炎病毒以及西尼罗病毒等为代表黄病毒疫源地的扩大, 造成了新的全球性公共卫生问题^[2,3]。登革病毒从亚洲的热带地区播散到全球的大部分热带地区; 乙型脑炎病毒 1998 年在澳大利亚北海岸附近的蚊虫中分离到, 并且有相应的病例出现; 西尼罗病毒 1999 年登陆美洲大陆, 这是首次在西半球分离到西尼罗病毒, 在连续的四年内西尼罗病毒的流行地区正在扩大; 有证据表明该病毒已经在美洲大陆建立了稳定的生存系统。西尼罗病毒在最近的 20 年之内全球范围内人畜间的暴发流行, 造成了严重的经济损失。以上这些资料警示人们投入更大的精力进行虫媒病毒病以及新发或者复发的传染性疾病 (Emerging or Reemerging Infectious

Disease) 研究。

1 西尼罗病毒病原学研究

西尼罗病毒属于黄病毒科黄病毒属, 具有黄病毒成员的典型特征^[4-6]。西尼罗病毒是有包膜 RNA 病毒, 电镜下病毒颗粒为直径大约在 40~60nm 左右的球形结构; 脂质双分子膜包裹着一个直径在 30nm 左右的二十面体的核衣壳。西尼罗病毒有三种结构蛋白, 核衣壳蛋白 (C)、包膜蛋白 (E) 和膜蛋白 (prM/M); 包膜蛋白和膜蛋白镶嵌在包膜中, 是主要的病毒抗原型结构蛋白, 可能与病毒的毒力以及亲嗜性相关; 七种非结构蛋白分别是 NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b 和 NS5, 是病毒复制过程中所必需的一些酶类, NS5 为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶。病毒基因组为单股、正链、不分节段 RNA, 11Kb 左右。基因组 5' 端含有帽子结构 m⁷G5' ppp5' A, 3' 端缺少多聚腺苷酸尾 (poly A)。其中 5' 端含有 100nt 左右的非编码区, 3' 端含有 400~700nt 左右的非编码区; 两端的非编码区能够形成保守的二级结构, 在病毒基因组的复制以及病毒的增殖过程中具有重要作用。编码区含有一个开放读码框 (ORF), 前 1/3 区段编码三种结构蛋白, 后 2/3 编码非结构蛋白。西尼罗病毒在细胞内的复制繁殖过程中, 病毒基因组首先翻译为一个多聚蛋白, 从 N 端到 C 端依次为 C-prM/M-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5; 然后经病毒自身编码

收稿日期: 2003-07-31, 修回日期: 2003-10-14

* 基金项目: 国家高新技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA215017)

作者简介: 刘卫滨 (1978-), 男, 山东滨州籍, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者: 梁国栋 (1951-), 男, 北京籍, 研究员, 博士生导师, 研究方向为分子病毒学及病毒基因工程。

Corresponding author: Tel: 010-63510124, E-mail: gdliang@hotmail.com

的蛋白酶和宿主细胞的蛋白酶切割成为成熟形式的病毒蛋白。核衣壳蛋白(C), 为一个碱性蛋白能够结合到病毒基因组并形成二十面体结构; prM 是成熟病毒颗粒中 M 蛋白的前体形式, 在病毒释放前, 胞浆内的病毒颗粒中含有 prM。prM 有助于 E 蛋白在内质网膜中的定位以及空间构象的形成, 并且防止 E 蛋白在细胞浆中被蛋白酶切割。病毒颗粒出芽前, prM 蛋白被高尔基复合体上的费林蛋白(Furin)特异性切割为 pr+M 两段, pr 部分被分泌至细胞外^[6]; M 部分嵌合在病毒的脂质双分子层中。PrM 蛋白在病毒释放过程中切割不完全, 病毒包膜中残留有未切割的 prM。E 蛋白(55kDa)以同源二聚体的形式并通过一定的结构锚定在病毒包膜中。E 蛋白是西尼罗病毒的主要抗原性结构蛋白, 具有血凝素活性, 能够诱导机体产生中和抗体^[6]; E 蛋白参与病毒与宿主细胞亲和、吸附以及细胞融合过程, 是病毒亲嗜性以及毒力的主要决定蛋白。根据 E 蛋白基因绘制的分子进化树见图 1。

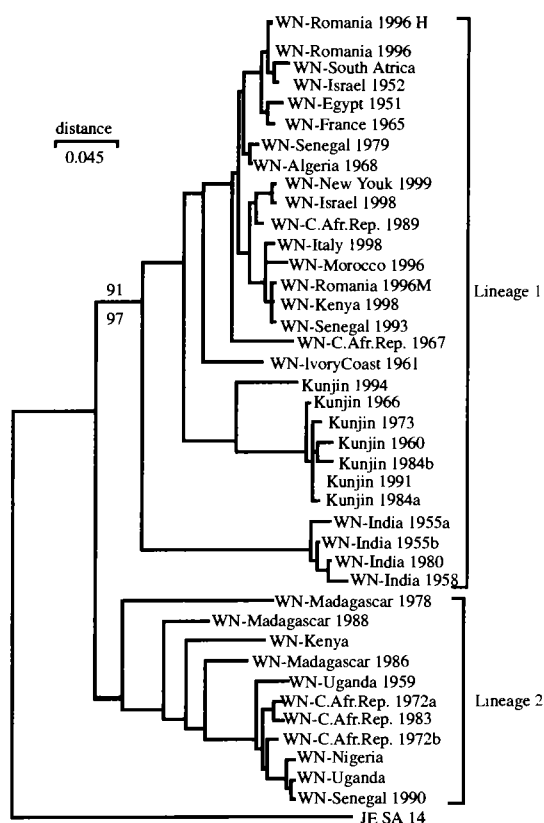


图 1 根据 E 蛋白基因绘制的西尼罗病毒分子进化树^[9]

Fig.1 Phylogenetic tree based on E-glycoprotein nucleic acid sequence

2 西尼罗病毒相关疾病

西尼罗病毒能够导致严重的人畜共患病。人感染西尼罗病毒, 通常主要表现为西尼罗热、西尼罗病毒性脑炎; 极少数病例还可表现为严重的胰腺炎、肝炎、心肌炎等^[1,4-6]。最新报道西尼罗病毒能够导致类似脊髓灰质炎样的疾病, 临床上称为脊髓灰质炎样综合症。多种动物(包括鸟类以及马、牛等哺乳动物)对西尼罗病毒敏感, 可以导致脑炎、心肌炎、流产以及死亡等。西尼罗病毒感染人群与感染鸟类的病理过程不同, 从而表现出所致疾病的不同。人群感染西尼罗病毒, 经外周血西尼罗病毒扩增繁殖, 有一个短暂的病毒血症的过程, 然后病毒侵入外周淋巴结以及中枢神经系统等靶器官, 导致疾病。而鸟类感染西尼罗病毒后, 病毒血症持续时间较长, 主要侵犯心肌, 中枢神经系统等。下面就西尼罗病毒相关疾病的临床特征以及诊断方法做简要介绍:

2.1 脊髓灰质炎样综合症

Jonathan. D、A Artuex Leis 等于 2002 年分别报道数例脊髓灰质炎样综合征病例, 经实验室检测确定为西尼罗病毒感染所致^[7, 8]。临床上表现为: 高热 39℃ 以上, 前期表现为头痛、倦怠、亦有寒战、盗汗、肌痛以及意识混乱等; 严重的肌无力也是常见症状, 双侧或单侧上肢肌无力呈渐进性发展, 下肢无力甚至瘫痪; 膀胱功能失调, 急性呼吸窘迫亦有报道。物理检查发现: 深部腱反射迟缓或消失, 肌神经呈现脱髓鞘样改变; 脊髓灰质部分是西尼罗病毒感染的靶位点, 在人与动物中相似。脑脊液检测可以发现急性期、恢复期抗西尼罗病毒抗体 4 倍以上增高。治疗主要为支持治疗, 辅助机械呼吸、物理降温等。主要伴发症为格林-巴利综合征。

2.2 西尼罗病毒性脑炎

大约有 1/300~1/150 西尼罗病毒感染者可发展为无菌性脑膜炎、脑炎或脑膜脑炎, 一般统称为西尼罗病毒性脑炎^[4-6]; 西尼罗病毒性脑炎潜伏期大约为 2~14d, 临床上表现为发热, 头痛, 抽搐, 意识障碍和脑膜刺激征等脑炎或脑膜脑炎症状; 严重的神经系统症状较少见, 病变主要集中于丘脑、中脑和脑干等部位, 西尼罗脑炎病人多发于老年人和免疫力低下或者免疫损害以及心脑血管疾病、糖尿病等患者。愈后良好, 几乎完全恢复, 残余的乏力以及记忆损失可以在几周内恢复正常。儿童恢复迅速, 年龄越大愈后越差。西尼罗病毒性脑炎病死率在 3%~15%, 主要为老年病人或者免疫抑制病人。

血清学检测发现 1999 年纽约市西尼罗病毒暴发流行仅有 <1% 的感染者出现中枢神经系统疾病。1999 年纽约西尼罗病毒性脑炎病例的平均年龄是 81.5 岁。

2.3 西尼罗热

西尼罗病毒感染者的典型症状表现为西尼罗热^[4-6], 大约占感染者的 1/3。潜伏期一般在 1~6d, 临床上表现为发热、头痛、倦怠、乏力、嗜睡、疲劳感加重, 有或无前驱症状突然发病, 1/3 以上的病人发热可达到 38.3℃~40℃。部分病人还可出现严重的眼痛、结膜水肿、充血和肌肉酸痛等症状; 80% 左右的病人呈自限性, 持续 3~5d。在西尼罗河地区, 人群感染率很高, 青壮年的西尼罗病毒抗体阳性率达到 61%, 儿童大约在 22%^[6]。儿童期病人普遍出现不明显的发热或不明原因的发热。有研究表明亚历山大地区的发热儿童住院病例中有 14.6% 为西尼罗病毒感染所致^[6], 病后可产生终生免疫力。

2.4 西尼罗病毒相关的动物源性疾病

蚊虫是西尼罗病毒的主要传播媒介^[1, 5, 9], 主要感染野生鸟类, 偶尔感染人、马等哺乳动物。鸟类的感染率及其敏感程度随其种类的不同而有所差异, 最高可达 100% (如美国乌鸦), 病死率也接近 90%。美国乌鸦感染西尼罗病毒而导致其数量急剧下降。鸟类感染主要病理过程为心肌炎, 因此通常导致大量鸟类死亡。马感染西尼罗病毒主要表现为马脑炎、孕马流产等。

2.5 西尼罗病毒相关疾病的诊断

西尼罗病毒病的诊断主要在血清学诊断和分子生物学诊断两个方面。血清学方面, 利用 IgM 免疫捕获的方法检测病人血清以及脑脊液中 IgM, 疾病的早期 IgM 的交叉反应较轻, 能够鉴别黄病毒属病毒感染。作为血清学回顾调查, 常检测西尼罗病毒 IgG 抗体。由于黄病毒属成员间的抗原性交叉较为严重, 常常检测多组病毒抗原, 相应抗体滴度高者可高度怀疑为该种病毒感染。最终病原体的确诊需要用中和试验和/或血凝抑制试验来判定。

用病人的血清、脑脊液以及病死的鸟类脑组织进行分离病毒也可以作为一种诊断方法。有报道仅在 37% 的病人的血中分离到西尼罗病毒, 因为西尼罗病毒在感染人时病毒血症持续时间只有 5d 左右。分离病毒的敏感性与采集标本的时间存在密切的联系, 上述分离到病毒的标本中 77% 的标本是在发病的第一天采集的。在病死的鸟脑组织分离病毒的成功率较高。

分子生物学诊断方面, 主要是利用设计特异引

物, 进行 RT-PCR 扩增目的片段经过特异探针或者测序比对进行病原体的检测; 具有灵敏、快速、简洁的特点, 其缺点是有假阳性, 病人标本的采集时间会对检测效率有影响。病人标本采集时间越早, 检测阳性率越高。也可以通过 Realtime PCR 灵敏的特异的检测病人标本以及采集的蚊虫、动物标本中西尼罗病毒的有无。

3 西尼罗病毒流行的新特征

3.1 流行区域的扩张^[1, 4, 9, 13]

回顾近十年来西尼罗病毒相关的病例, 地理上主要分布是在 1999 年以前广泛分布在东半球, 包括: 非洲、亚洲、中东以及欧洲的大部分地区。1999 年以后, 西半球开始出现西尼罗病毒的流行。1999 年 8 月美国纽约市首次出现西尼罗病毒脑炎病例, 其后数百人染病, 其中 7 人死亡, 同时出现乌鸦不明原因大量死亡, 经过多次采样分离到西尼罗病毒。这是首次在西半球分离到该病毒。2000 年美国又出现西尼罗病毒致人死亡的病例, 而科研人员在越冬的蚊子体内分离到西尼罗病毒, 从而证实病毒已在美国存活下来, 西尼罗病毒已经在美国稳定存在。

3.2 传播途径的增加

西尼罗病毒经蚊-鸟循环进行传播。库蚊是重要的传播宿主, 其中美洲大陆的尖音库蚊在美洲主要的传播媒介; 鸟类和禽类普遍易感, 鸟禽类感染西尼罗病毒存在病毒血症过程, 能够通过蚊虫叮咬进行传播, 所以是重要的中间宿主。人和马等哺乳动物只是偶然宿主, 病毒血症期较短且血中病毒滴度低, 作为中间宿主的意义不大。先前报道未发现人传人的现象, 但最近有报道, 一位器官移植的供者提供心脏、肾脏和肝脏器官。接受器官移植的受体均出现西尼罗病毒感染, 怀疑西尼罗病毒可以通过血液制品以及器官移植的方式传播^[9, 10]。因此而发了美国对血液制品使用安全性的担忧, 并制定了相应的筛检措施。另外, 西尼罗病毒也可能通过哺乳途径以及垂直方式传播^[11]。

3.3 其它流行特征的改变

1)、人和哺乳动物暴发流行的频率升高: 罗马尼亚 (1996) 俄罗斯 (1999)、美国 (1999-2002) 以色列 (1999、2000) 导致数百人的严重的神经系统疾病; 1996 年摩洛哥, 1998 年意大利, 1999-2001 年美国, 2000 年法国都出现了西尼罗病毒在马中的暴发流行。1994 年阿尔及利亚, 1996-1997 年罗马尼亚, 大约 400 病例; 1997 年捷克共和国, 1998

年刚果共和国, 1999 年俄罗斯, 2000 年以色列, 1999-2002 年美国都出现了西尼罗病毒在人群中的暴发流行。2)、对人致病的严重性升高: 美国 1999 年应西尼罗病毒感染导致死亡病例 62 例, 2000 年 21 例, 而 2002 年死亡病例达到 284 例。以色列曾暴发的疫情共有 417 个病例, 其中 35 人死亡。3)、与人群暴发流行相伴随的禽类感染西尼罗病毒的病死率增加。以色列、美国西尼罗病毒暴发流行时均伴有家禽(鹅)和鸟类的暴发流行以及死亡。从 1999 年起, 美国乌鸦的数量大大降低。4)、病毒进化分析显示主要致病病毒株全部为基因 I 型。根据西尼罗病毒的 prM, E, NS5 等基因区段对现有的西尼罗病毒进行进化分析得到相似的结果, 参见附图。根据分子进化树分析结果显示: 西尼罗病毒可以分为 2 个基因型, 其中澳大利亚的 Kunjin 病毒属于西尼罗病毒的一个亚型, 属于基因 I 型。从近几年西尼罗病毒爆发流行病原学分子生物学研究表明, 导致疾病的西尼罗病毒分离株主要为 I 型。

据纽约 1999 年分离株 NY99 测序结果分析, WN-NY99 与以色列 Israel-1998 分离株在序列上有 99% 的同源性; 研究人员推断 WN-NY99 可能由以色列传入, 进一步利用分子生物学手段, 选取西尼罗病毒经蚊虫传播, 所以病例主要集中于夏、秋季节, 多发病于 7、8 月份; 在热带地区全年均可有发病。在美国从 1999 年到 2002 年的流行趋势看, 每年的 7 月份开始出现, 到 12 月份均有病例出现, 而大多集中在 8、9 月份。

西尼罗病毒致病性以及疫源地的改变可能归结于以下几个因素: 病毒毒力的改变; 气候变暖; 自然环境的改变, 人类活动范围的扩大; 鸟类的迁徙; 贸易往来以及国际交流的频度增加; 人群年龄结构的改变, 以及其他慢性病的影响如糖尿病、高血压心脑血管疾病以及 HIV 感染等增加。

4 西尼罗病毒疫苗研究进展

目前, 应用预防西尼罗病毒病的疫苗主要为灭活疫苗^[13], 仅应用于马, 有一定的免疫保护效果尚有待进一步评价。澳大利亚研究人员利用传统方式研究灭活西尼罗病毒疫苗; 美国 Acadmis 公司的 Monath.T.P. 等^[13, 14]借鉴乙型脑炎/黄热病嵌合疫苗的成功经验, 利用反向遗传学系统将西尼罗病毒的 prM、E 基因替换黄热病 17D 减毒活疫苗株相关基因, 构建嵌合疫苗, 已于 2002 年进入临床试验。西尼罗病毒/黄热病嵌合疫苗将成为一种极有潜力的预防西尼罗病毒感染的有效措施。已有研究人员

构建了西尼罗病毒与登革热病毒 4 型的嵌合病毒, 通过试验研究表明其神经毒性以及外周毒性降低, 而仍然具有良好的免疫原性以及保护效率。

核酸疫苗以及亚单位疫苗, 仅停留在实验室研究阶段。将西尼罗病毒的 prM、E 段基因克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 构建 DNA 疫苗, 在小鼠模型中保护率在 80%~90%。将上述重组质粒转染哺乳动物细胞重组表达的西尼罗病毒 prM、E 蛋白可以组装成非感染性亚病毒颗粒发展亚单位疫苗, 后者也被用于血清学诊断用抗原, 在小鼠动物模型中具有一定的免疫保护效果。

1999 年起, 美国政府以及卫生部门投入大量的人力财力进行西尼罗病毒感染的预防与控制, 主要致力于西尼罗病毒疫苗方面的探讨研究和传播媒介的控制等工作。灭蚊是切实有效的预防措施^[1, 9]; 对于个人预防, 在蚊虫出没的高峰期使用驱蚊剂、着长袖衣衫有一定的预防作用。

5 展望

在上个世纪 20 年代, 研究人员通过建立小鼠感染黄病毒的动物模型, 发现小鼠对西尼罗病毒的敏感性不同并且这种敏感性或者耐受性呈现显性遗传特性^[15]。黄病毒敏感基因簇定位于小鼠的 5 号染色体^[16, 17]分别命名为 *Flv^r*, *Flv^s*。敏感基因为点突变导致提前终止, 其表达产物缺失 C 末端 30% 的氨基酸, 其中 P-茎环结构中 4 个氨基酸的缺失属于 RNA 结合的保守区^[15]。2002 年 Andrey A. 等人定位克隆了 *Flv* 中的 22 个基因, 其中 10 个为寡聚腺苷酸合成酶 (OAS) 基因。Oas1b 基因与黄病毒感染的敏感性差异密切相关。黄病毒抗性或者敏感基因的定位以及深入研究必定推动西尼罗病毒相关疾病的预防与控制的进展。

参考文献

- [1] Petersen L R, Roehrig J T. West Nile virus: a reemerging global pathogen[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(4): 611-4.
- [2] Gubler D J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems[J]. *Arch Med Res*, 2002, 33(4): 330-42.
- [3] Gubler D J. Human Arboviral Infections Worldwide[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 951: 13-24.
- [4] Petersen L R, Roehrig J T, Hughes J M. West Nile virus encephalitis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(16): 1225-6.
- [5] Campbell G L, Marfin A A, Lanciotti R S, et al. West Nile virus. *Lancet Infect Dis*[J], 2002, 2(9): 519-29.
- [6] Lindenbach Brett D, Rice, C M. *Fields Virology*[M], 4th ed New York: Raven Press, 2001.

- [7] Leis A A, Stokic D S, Polk J L, *et al.* Winkelmann M. A poliomyelitis-like syndrome from West Nile virus infection[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(16): 1279-80.
- [8] Glass J D, Samuels O, Rich M M. Poliomyelitis due to West Nile virus[J]. *N Engl J Med*. 2002, 347(16): 1280-1
- [9] Lanciotti R S, Roehrig J T, Deubel V, *et al.* Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States[J]. *Science* 1999, 286: 2333-37.
- [10] Stephenson J. Medical News & Perspectives: Investigation Probes Risk of Contracting West Nile Virus via Blood Transfusions[J]. *JAMA*. 2002, 288(13): 1573-4.
- [11] [No author listed] Centers for Disease Control and Prevention Update: Investigations of West Nile virus infections in recipients of organ transplantation and blood transfusion[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002, 51(37): 833-6.
- [12] [No author listed] Centers for Disease Control and Prevention. Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002, 51(39): 877-8.
- [13] Monath T P, Arroyo J, Miller C. West Nile virus vaccine[J]. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2001, May; 1(1): 37-50.
- [14] Monath T P. Prospects for Development of a Vaccine against the West Nile Virus[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 951: 1-12.
- [15] Charles E. Samuel Host genetic variability and West Nile virus susceptibility[J] *PNAS* 2002, 99: 11555-11557.
- [16] Mashimo T, Lucas M, Simon-Chazottes D, *et al* A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice *PNAS* 2002, 99: 11311-11316.
- [17] Andrey A. Perelygin, Svetlana V. Scherbik, Igor B Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene *PNAS* 2002, 99: 9322-9327.