www.scichina.com

life.scichina.com



1996~2004 年中国福建省甲 3 亚型流感病毒 (H3N2)的分子进化

修文琼, 翁育伟, 沈晓娜, 谢剑锋, 杨式芹, 吴冰珊, 王美爱

福建省疾病预防控制中心, 福州 350001

E-mail: wqshiu@hotmail.com

收稿日期: 2007-12-05; 接受日期: 2008-01-07

摘要 对 1996~2004 年甲 3 亚型流感病毒的 *HA1* 基因在中国南方福建省的变异特点与流行特征进行研究. 对 25 株(其中 11 株基因序列来自 GenBank)甲 3 亚型流感病毒 *HA1* 基因进行种系发生学分析. 研究表明在约 8 个流感流行季节中, *HA1* 基因在不断进行着点突变, 期间可能发生了 4 次抗原性漂移. 氨基酸突变的位点主要位于 *HA1* 分子抗原决定簇 A~E 内及附近和某些受体结合位点. 其中, 抗原位点 B, A 和受体结合位点 226 位的突变对于抗原漂移至关重要, 但随着流感病毒的进化, 抗原位点和与抗原漂移有关的关键密码子也会发生改变. 因此, 在亚洲南部监测甲 3 亚型流感病毒 *HA1* 基因阳性选择密码子的突变是很重要的.

关键词 流感病毒 H3N2 亚型 基因 序列分析 漂移

甲型流感病毒是负链RNA病毒,所引起的发病率和死亡率较大,每年影响全球约 1/5 的人口. 甲型流感病毒根据病毒表面蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的不同,分成不同的亚型. 流感病毒外膜蛋白HA是人类免疫系统最重要的目标, 其变异通常导致甲型流感病毒亚型不同变异株的出现, 改变病毒抗原特性来逃避机体已有的免疫保护, 从而不断导致流感的流行. HA基因的逐渐突变产生的新的毒株被称为抗原漂移(drift)变异株. 而以在人类中长时间未出现的新的HA亚型取代原有的,被称为抗原性转变(shift). 大的抗原性转变可引起流感的大流行. 在上个世纪,与抗原漂移相关的每年的流行所产生的累积的影响甚至比 3 次与重组事件相关的,每二、三十年出现一次的抗原性转变而造成大流行对人类所产生的影响更大山.

HA蛋白含有HA1 和HA2 两条链, 分别含 329 和

220 残基. 研究人员通过分析自然和实验室选择的抗 原变异株, 确定了H3N2 HA分子的 5 个抗原位点(即 抗体结合位点或表位),它们位于HA三维结构的球状 头部上[2~5]. 因碱基的取代导致HA氨基酸的改变几乎 完全限制于HAI基因, HAI是HA蛋白的主要亚单位, HA2 形成了HA茎部的大部分. HA1 血凝素的 329 个 氨基酸中的 131 个位于A, B, C, D, E 5 个决定簇[3.5]内 或附近. 在A和B两个抗原决定簇内或附近的 41 个密 码子的突变与抗原漂移有关^[5]. HA的表位残基比非 表位残基展示更大的可变性并且进化更快速60. 宿主 受体结合位点(RBS)和抗原决定簇区位于长纤维螺旋 HA2 上的球状头部HA1 重链区[4]. 6 个高度保守的残 基组成RBS口袋状的表面(Tyr98, Trp153, Glu190, Leu194, His183 和Thr155), 并与 134~138 残基和 224 ~ 228 残基, 分别形成口袋的右壁和左壁^[7]. 其中含 有 5 个阳性选择密码子及与抗体结合位点相关的某

些密码子^[6]. 探讨甲型流感病毒HA1 区的变异规律, 跟踪其变异过程, 对于流感的预 测、流感疫苗的筛 选具有重要的参考意义.

A/Fujian/411/2002 样毒株在 2003 年导致流感在世界范围内的流行.通常认为新的甲型流感病毒亚型多起源于亚洲,每种亚型中的新毒株(即漂移株)也常起源于中国[8.9],然后传播到全球.我们报道在1996~2004年间中国南部福建省甲3亚型流感病毒(H3N2)的分子进化,从分子生物学角度对 1996年以来甲3亚型流感病毒在福建省某些地区人群中的流行情况进行分析,并结合流行病学资料,弄清毒株变异与暴发流行的分子生物学基础,论证与抗原漂移有关的某些关键密码子.

1 材料与方法

1.1 标本采集、处理及毒株来源

14 株标本有的分离自福州的监测点医院,有的采自福建省各地的暴发点,保存在福建省疾病预防控制中心.每周从监测医院采集流感患者咽拭子标本10份左右,加双抗处理.每份标本按常规双腔接种鸡胚和MDCK细胞,收获后用豚鼠红细胞检查血凝活性^[10,11].

1.2 分离物鉴定

凡收获的细胞维持液或羊水和尿囊液,红细胞凝集阳性的测定其 HA 滴度, HA 滴度过低者再传 2,3 代后进行鉴定. 用红细胞凝集抑制法(HI)进行初步鉴定(鉴定血清来自中国国家流感中心)后,将阳性标本

送国家流感中心复核鉴定.

1.3 病毒粒 RNA 提取

采用德国 Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit, 按其手册所提供的方法提取病毒 RNA.

1.4 RT-PCR 一步法

采用德国 Qiagen 公司的 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, 进行逆转录 cDNA 合成及聚合酶链式反应(PCR)扩增 HA1 基因, 其引物为: (+)5'-AGCAAAA-GCAGGGGATATTCT-3', (-)5'-ATGGCTGCTTGAGTGCT-3', 引物由宝生物(大连)有限公司合成.

1.5 产物纯化与序列测定

采用德国 Qiagen 公司 的 QIAquick Gel Extraction Kit, 按其手册所提供的方法纯化 RT-PCR 产物. 核苷酸序列测定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成. 这些序列在 GenBank 登录号为 AY963783~AY963786, AY963788~AY963796.

1.6 核苷酸序列分析

除本文测定的一些序列外,在 GenBank 或 ISD (Influenza Sequence Database)中收录的甲 3 亚型流感病毒一些具有代表性的毒株的 *HA1* 区的序列被下载下来参与分析比较(表 1). 采用 ClustalX1.81 进行序列比对,分析采用 PHYLIP3.65 软件,用解靴法(Bootstraping),距离法(Distance)和邻位相连法(Neighbor-joining)构建进化树.

寿 1	参与分析的甲	3(H3N2)亚型流感病毒株

病毒株名称	简称	GenBank 登录号	病毒株特性
A/Wuhan/359/1995	WH/359/95	AF008722	1997~1998 甲 3 亚型流感疫苗组分株
A/Sydney/5/1997	SYD/5/97	AF180584	1998~2000 甲 3 亚型流感疫苗组分株/国际代表株
A/Moscow/10/1999	MOS/10/99	ISDN13277	2000~2004 甲 3 亚型流感疫苗组分株(北半球)
A/Panama/2007/1999	PA/2007/99	ISDNCDA008	2000~2004 甲 3 亚型流感疫苗组分株/国际代表株(南半球)
A/Fujian/151/2000	FJ/151/00		2001~2004 国内代表株
A/Fujian/411/2002	FJ/411/02	ISDN38157	2003~2004 南半球甲 3 亚型流感疫苗组分类似株
			2004~2005 北半球甲 3 亚型流感疫苗组分类似株
A/Wyoming/03/2003	WYO/03/03	ISDN38155	抗原类型福建样,但可在鸡胚中复制
A/Wellington/1/2004	WEL/1/04	ISDN64773	2004~2005 南半球甲 3 亚型流感疫苗组分推荐株
A/California/7/2004	CAL/7/04	ISDN110648	2005~2006 北半球甲 3 亚型流感疫苗组分推荐株

2 结果

2.1 流感病毒甲 3 亚型毒株血凝素 *HA1* 基因核苷酸序列分析

取 1999~2004 年分离的共 14 株毒株,对其HAI 基因进行核苷酸序列分析,为便于分析比较,将所测出的核苷酸序列推导出相应的氨基酸序列. 1996 年分离出的 2 株和 2002 年分离出的 1 株查自ISD. 2000 年分离的 1 株A/Fujian/151/2000 查自参考文献[12]. 14 株测定的甲 3 亚型流感病毒其HA1 蛋白分子上均含有 328 个氨基酸,它们的重链(HA1)和轻链(HA2)连接处仅含有一个精氨酸. 信号肽都含有 16 个氨基酸,一1 位除漳州分离出的 1 株(ZhZ/51/99)为S外,其他均为A.

(1) 差异位点比较(表 2). 流感病毒甲 3 亚型血凝素 HA1 区氨基酸各位点的序号是从信号肽之后开始起算的. 与 A/Wuhan/359/1995 相比,福建 1996 年的两株各有 3,4 个位点的差异,基本相似. 与 A/Sydney/5/1997 相比,1999 年 3 株各有 3,4,5 个位点的差异,只涉及一个抗原决定簇,相差不大. 与 1996 年的毒株相比,1999年的毒株大约有 14 个氨基酸的差异,涉及两个抗原决定簇,发生了抗原漂移.虽然同是 1999年的毒株,与 A/Panama/2007/1999 相比,1999年福建分离的 3 株有 8,9 个位点的差异,这些差异都涉及 A,B 两个抗原决定簇,甚至 RBS 226 位.与 A/Moscow/10/1999 相比,1999年福建分离的 3 株有 4,5 个位点的差异,差异相对小,但也涉及两个抗原决定簇或一个 B 抗原决定簇和 RBS.

A/Fujian/151/2000 与 1999 年福建分离的毒株相比,约有 10 个位点的差异,至少涉及两个抗原决定簇及 RBS;与 A/Sydney/5/1997 和 A/Moscow/10/1999相比,有 9 个位点的差异,分别涉及 2,3 个抗原决定簇区;与 A/Panama/2007/1999相比,有 8 个位点的差异(S21P, R50G, K92R, M168I, E172D, L183H, S219Y, V226I),因此可以认为相对而言 A/Fujian/151/2000与A/Panama/2007/1999较近.

A/Fujian/411/2002 与 A/Fujian/151/2000 相比有 16 个位点的差异, 分别是 L25I, H75Q, E83K, R92K, A131T, H155T, Q156H, I168M, D172E, S186G, V202I, Y219S, W222R, G225D, I226V, H233Y, 涉及 3 个抗原 决定簇及RBS 226位;与A/Moscow/10/1999相比,有17个位点的差异,也涉及3个抗原决定簇及226位;与A/Panama/2007/1999相比,有13个位点的差异,同样涉及3个抗原决定簇及RBS;因此,2003~2004年A/Fujian/411/2002取代A/Moscow/10/1999和A/Panama/2007/1999在全球占主导地位.与A/Fujian/411/2002相比,2003年福建分离的4株只有2,3个位点的差异.另一株A/Fujian/555/2003与之相比,有4个位点的差异(K92T, S189N, S227P, K292R, Y308C).

A/Wellington/1/2004 与 A/Fujian/411/2002 相比, 有 3 个位点的差异(Y159F, S189N, S227P), A/Wellington/1/2004 取代 A/Fujian/411/2002 为南半球 2004~ 2005 年甲 3 亚型流感疫苗推荐株. 与 A/Wellington/1/ 2004 相比, A/Fujian/555/2003 有 3 个位点的差异(K92T, F159Y, Y308C), A/Fujian/4/2004 有 4 个位点的差异, A/ Fujian/52/2004 有 5 个位点的差异(K145N, R208G, V226I, P227S, K326T), 厦门 2004年3株各有7~9个位 点差异. 而与 A/California/7/2004 相比, A/Fujian/4/ 2004有12个位点的差异, A/Fujian/52/2004有6个位点 的差异(S138A, N188D, T196V, R208G, P227S, K326T), 厦门 2004 年 3 株各有 12~15 个位点差异. 所以, 除 A/ Fujian/52/2004 外, 福建 2004 年分离的毒株与 A/Wellington/1/2004 更接近, 而毒株 A/Fujian/52/2004 介于 A/Wellington/1/2004 与 A/California/7/2004 之间. A/ California/7/2004 被世界卫生组织(WHO)推荐为 2005~ 2006 年北半球流感疫苗组分株, 它与 A/Wellington/1/ 2004 相比, 有 5 个位点的差异(A138S, K145N, D188N, A196T, V226I), 涉及两个抗原决定簇及 226 位.

在流感病毒HA1区,差异位点137,138位既位于抗原决定簇A区,也属受体结合部位的前臂[10];155,183,194位既位于抗原决定簇B区,也属受体结合部位的后臂;225,226,227位属受体结合部位的左侧臂.

(2) 潜在的糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)的分析比较. 在所测序的福建分离的14株中,除 A/Xiamen/80/2004(少 122 位), A/Fujian/134/1999(少 144 位), A/Zhangzhou/51/1999(少 144 位)有 10 个潜在糖基化位点,A/Fujian/137/1999 只有 9 个潜在糖基化位点(少133,144 位)外,其余都有11 个潜在糖基化位点(8,22,38,63,122,126,133,144,165,246,285). 从网上资源

表 2 1995~2004 年间 25 株 H3N2 分离株 HA1 基因的变异比较 a)

															/\. L														
分离株 -	50	57	62	75	79	83	85	88	92	121	124	128	131		位点 137	138	140	1/12	144	1/15	152	155	156	158	150	160	168	172	183
WH/359/95		R	K	H	F	E	D	V	K	T	G	T	A	D	Y	A	K	G	V	K	N	Н	K	E	Y	K	M	D	H
FJ/47/96	_	-	-	_	-	_	-	-	_	_	_	_	-	_	_	_	_	-	_	_	_	_	-	_	_	_	_	_	_
FJ/133/96	_	-	-	_	-	_	_	-	_	N	S	_	-	N	-	_	_	-	_	_	_	_	-	_	_	_	_	_	_
SYD/5/97	_	_	Е	-	_	_	_	-	_	-	_	_	-	_	-	_	_	S	Ι	_	_	_	Q	K	_	_	-	_	_
MOS/10/99	_	Q	-	-	_	_	_	-	_	_	_	-	-	_	S	-	_	R	_	_	_	_	-	-	_	R	-	_	_
FJ/134/99	_	-	_	_	_	_	_	-	Е	_	_	_	-	_	-	_	_	S	_	_	_	_	-	_	_	_	_	_	_
FJ/137/99	_	_	_	_	_	_	-	_	-	-	_	-	_	S*	_	-	-	R	_	_	_	-	_	_	-	_	-	_	-
ZHZ/51/99	_	_	_	_	_	_	-	_	K	-	_	-	_	N	_	-	-	_	_	_	_	-	_	_	-	_	-	_	-
PA/2007/99	_	_	_	_	_	_	_	_	-	-	_	-	_	_	-	-	-	_	N	_	_	-	_	_	-	K	-	Е	L
FJ/151/00	G	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I^*	D	Н
FJ/411/02	-	-	-	Q	-	K	-	-	K	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	Н	-	-	-	M	E	-
WYO/3/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ/182/03	_	_	_	_	_	_	-	_	-	-	_	T	_	_	_	-	-	_	_	_	_	-	_	_	-	_	-	_	-
FJ/219/03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ/258/03	-	-	-	-	_	-	-	-	-	-	_	-	-	-	-	-	-	-	_	_	-	-	_	-	-	_	-	_	-
FJ/292/03	-	-	-	-	-	-	-	I^*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ/325/03	-	-	-	-	_	-	V^*	V-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	_	_	-	-	_	-	-	_	-	_	
FJ/555/03	-	-	-	-	-	-	D	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WEL/1/04	-	-	-	-	_	-	-	-	K	-	_	-	-	-	-	-	-	-	_	_	-	-	_	-	F	_	-	_	-
FJ/4/04	-	-	-	-	L^*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$\mathbf{Q}^{\scriptscriptstyle\triangle}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XM/70/04	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S^*	-	-	-	-	-	-	-	-
XM/80/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R^*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-
XM/181/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ/52/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAL/7/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
八字钟															/). L														
														- 1	ロ 点														
分离株 -	186	188	189	192	193	194	196	198	202	204	208	219	222		<u>位点</u> 226	227	229	233	252	275	276	278	292	298	308	326			
分為休 - WH/359/95	186 S	188 D	189 S	192 T	193 S	194 I	196 V	198 A	202 V	204 V	208 R	219 S	222 W			227 S	229 R	233 Y	252 I	275 G	276 N	278 N	292 K	298 N	308 Y	326 K			
WH/359/95 FJ/47/96														225	226														
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96					S	I								225	226					G									<u> </u>
WH/359/95 FJ/47/96					S R*	I L								225	226					G D*									
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99					S R*	I L	V - -							225	226			Y - -		G D*	N - -								
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99					S R*	I L	V - - A							225	226			Y - - H		G D*	N - -								
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99					S R*	I L	V - - A T							225	226			Y - - H		G D*	N - -								
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99					S R*	I L	V - - A T							225	226		R S*	Y - - H		G D*	N - -								
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99					S R*	I L	V - - A T							225	226		R	Y - - H		G D*	N - -	N							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00	S				S R*	I L	V - - A T					S Y		225	226		R S*	Y - - H		G D*	N - -	N S*							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02	S G				S R*	I L	V - - A T					S Y S		225	226 I V I - V -		R S*	Y - - H Y - -		G D*	N - -	N S*							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03	S				S R* S - - - -	I L	V - - A T					S Y	W	225 G	226 I - V I - - V - I		R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03	S G				S R*	I L	V - - A T					S Y S	W	225 G	226 I - V I - - V - I		R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/219/03	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T					S Y S Y	W	225 G	226 I - V I - - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T					S Y S Y	W	225 G	226 I - V I - - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*							
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/29/03	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T					S Y S Y	W	225 G	226 I - V I - - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K						
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/292/03 FJ/325/03	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T					S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K R^△						
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T					S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K						
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03 WEL/1/04	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T	A				S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K R^△		Y	K			
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03 WEL/1/04 FJ/4/04	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T			V		S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K		Y C*	K			
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03 WEL/1/04 FJ/4/04 XM/70/04	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T	A				S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K R^△		Y C*	K			
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03 WEL/1/04 FJ/4/04	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T	A	V	V		S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K		Y C*	K R^△			
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03 WEL/1/04 FJ/4/04 XM/70/04 XM/80/04 XM/181/04	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T	A	V	V	R	S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K	N	Y C*	K R^			
WH/359/95 FJ/47/96 FJ/133/96 SYD/5/97 MOS/10/99 FJ/134/99 FJ/137/99 ZHZ/51/99 PA/2007/99 FJ/151/00 FJ/411/02 WYO/3/03 FJ/182/03 FJ/258/03 FJ/258/03 FJ/255/03 WEL/1/04 FJ/4/04 XM/70/04 XM/80/04	S G V				S R* S - - - -	I L	V - - A T	A	V I	V		S Y S Y	W	225 G	226 I V I - V - I	S	R S*	Y - - H Y - - - H		G D*	N - -	N S*	K R^ K K R^ △	N D*	Y C*	K R^△			

a) 与 WH/359/95 株相比, 其他毒株氨基酸的不同用单字母表示. -示氨基酸与上面一行的相同; *示福建分离株的株特异性差异; △ 示福建省分离株氨基酸的地区性差异

分析, A/Fujian/133/1996 有 10 个潜在糖基化位点(少 144 位), A/Fujian/47/1996 只有 8 个潜在糖基化位点(少

122, 133, 144 位), 122, 133, 144 位分别位于A抗原决定簇的A1, A2, A3 区^[13]. A/Fujian/151/2000 和A/Fujian/

411/2002 都有 11 个潜在糖基化位点.

(3) 关键位点变异情况. 流感病毒甲 3 亚型血凝素 HA1 区氨基酸序列比对结果表明,在所测序的14株中,氨基酸未发生任何改变的大约占82%. 特别易变的多位于抗原决定簇和受体结合部位 RBS 附近,占改变的88%以上. 所有差异中没有一个是发生在半胱氨酸 C 位点上,表明不同病毒株 HA1 蛋白分子上双硫键均相同. 多数的改变发生在抗原决定簇 A,B,C,D,E及其附近. 其中位点124,133,142,144,156,186,227,326改变了两次,位点92,193,194,196,226,233,275为易变点,它们发生3次或以上改变.位点160,193,196,202,219,226,227为回变点,尤其是位点226在Ile和Val间反复回变多次. 位点92改变了许多次,在2004年又回变到Lys.

2.2 HA1 基因进化树分析

对所测定的本省 14 株甲 3 亚型流感病毒及从

GenBank或ISD中收录的11株甲3亚型流感病毒代表 性毒株的 HA1 区的氨基酸序列进行基因进化树分析。 分析采用 PHYLIP 软件, 用解靴法、距离法和邻位相 连法构建进化树(图 1). 由于所测的本省的甲 3 亚型毒 株有的年份是优势株、较多、有的年份少、有的年份 未分离出,显然这不是一个很完整的一段时间的进化 树. 但大致可以看出, HA1 基因进化基本延着一个主 干(trunk)进行,在主干和顶端(tip)之间,有一些分支 (twig). 结合与各个年代流感病毒甲3亚型代表株或疫 苗株氨基酸序列的分析比较, 在本研究中大致可将这 些毒株分为6组、第一组为福建1996年的2株与代表 株WH/359/95、第二组为1999年的3株与疫苗株SYD/ 5/97 及 MOS/10/99, 第三组为国内代表株 FJ/151/00 与 国际代表株 PA/2007/99, 第四组为疫苗株 FJ/411/02 与 WYO/3/03 及 2003 年的 5 株(除 FJ/555/03 外). 第 五组为 FJ/555/03, 2004 年的 4 株及 WEL/1/04, 第六 组为 CAL/7/04 和 FJ/52/04.

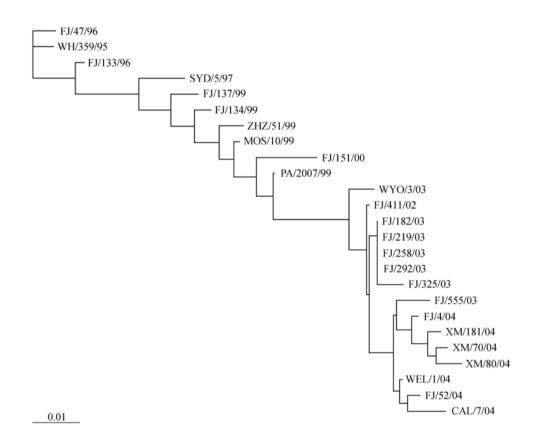


图 1 流感病毒甲 3 亚型毒株(H3N2)HA1 基因进化树

水平距离为 HA1 氨基酸序列差异数

3 讨论

流感病毒血凝素HA1 基因较易突变, 原因之一 是RNA病毒本身纠错能力差,导致核苷酸快速变异; 二是受人群自然选择的压力; 其他原因有待进一步 研究. 近来一般认为, 作为一个具有代表性的甲 3 亚 型新变种, 它必须在其HA1区蛋白分子上有4个以上 氨基酸序列发生替换,而且替换必须涉及到2~3个抗 原决定簇位点, 并且, 在HA1 三维结构上, RBS周围 如 226 位氨基酸发生替换要比其他位置发生替换重 要得多. 因RBS周围多为抗原决定簇所在处, 它们的 改变会造成RBS结构的改变,这样易造成HA蛋白发 生抗原性变异[10]. A/Fujian/411/2002 之所以取代北半 球的 A/Moscow/10/1999 和南半球的 A/Panama/ 2007/1999 在全球于 2003~2004 季占主导地位, 是因 为它们有 13 个以上位点的突变、涉及 3 个抗原决定 簇, 明显发生了抗原漂移, 在传统理论的基础上, 最 近的研究提出了一些新的观点,如Jin等人[14]用反向 遗传技术(reverse genetics)进行实验, 研究认为血凝 素HA1 两个位点的改变(H155T, Q156H)与抗原从A/ Panama/2007/1999 漂移到A/Fujian/411/2002 有关, 其 他位点的改变不影响病毒的抗原性但影响病毒在鸡 胚中复制的有效性. 位点 155 和 156 位于B抗原决定 簇. A/Wyoming/03/2003 与A/Fujian/411/2002 相比, 有 4 个位点的差异(T128A, G186V, S219Y, V226I), 其抗 原性与A/Fujian/411/2002 相似, 但可在鸡胚中复制. A/Wellington/1/2004 与A/Fujian/411/2002 虽然只有 3 个位点的差异(Y159F, S189N, S227P), 但两个位于B 抗原决定簇,一个位于RBS左侧臂,这导致南半球 A/Wellington/1/2004 样病毒取代 2003~2004 占主导地 位的A/Fujian/411/2002 样病毒. Daum等人[15]认为密 码子K145N和V226I的改变对甲 3 亚型流感病毒在北 半球从A/Fujian/411/2002 漂移到A/California/7/ 2004 至关重要. 位点145位于A抗原决定簇. Sato等人[16]提 出血凝素B1 抗原地区的突变可能引发甲 3 亚型流感 病毒漂移株的出现. 可见对于抗原漂移而言, 关键位 点(如抗原决定簇B区和受体结合部位 226 位)的改变 似乎比氨基酸数目的改变更为重要. 显然位点 226 很 重要、Weis等人[□]提出相对于通过α(2,3)连接而言、谷 氨酰胺取代亮氨酸(L226Q)减少了HA通过α(2,6)连接 对唾液酸的亲和性. 亲和性的不同似乎源于突变型 和野生型甲 3 亚型流感病毒蛋白构象的不同. Nobusawa和Nakajima^[17]论证了H1N1 流感病毒血凝素 226 位氨基酸的取代影响受体结合活性而非融合活性. Lu 等人^[18]表明与A/Fujian/411/2002 抗原相关, 但在鸡胚中可以很好复制的毒株A/Wyo- ming/03/2003, 与原型病毒A/Fujian/411/2002 比, HA1 区有 4 个氨基酸的不同. 若要提高A/Fujian/411/2002 在鸡胚中的复制能力,可通过改变最少两个HA残基 (G186V和V226I)以增加HA受体结合能力,或通过改变最少两个NA残基 以降低 NA 酶 结合活性. 或者,重组的A/Fujian/411/2002 通过HA分子两个氨基酸 (H183L和V226A)的取代,增加HA受体结合的能力,可适应在鸡胚中生长. 通过HA或NA的改变,虽然提高了A/Fujian/411/2002 在鸡胚中的复制能力,但对这些重组病毒的抗原性没有太大影响.

有人推测糖基化的作用是稳定HA的三维结构, 防止HA蛋白被水解以及阻碍抗体的识别[10]. 这有一 定的道理. 比如A/Aichi/2/68 毒株HA1 上只有 6 个潜 在糖基化位点(8, 22, 38, 81, 165, 283 位), A/Wuhan/ 431/95 有 8 个潜在糖基化位点(少 81, 多 63, 126, 285 位), A/Moscow/10/1999 有 10 个潜在糖基化位点, A/Panama/2007/1999 已有 11 个潜在糖基化位点. 2000 年以后的毒株都有 11 个潜在糖基化位点, 多 122 位 (A1区)、133位(A2区)和144位(A3区)[13]. 可见甲3 亚型流感病毒在从1968年到2004年漫长的进化过程 中, 在人群免疫压力的选择下, 为了生存和发展, 糖 基化位点逐渐增加也有所改变. 一般认为, 糖基化位 点的增加或减少对病毒的抗原性及其他生物特性均 有一定的影响. 糖基化位点的改变如果发生在抗原 决定簇, 就会妨碍特异抗体对病毒粒的识别和清除, 而造成抗原性漂移. XM/80/04 这株与 2004 年其他株 相比少 122 位(A1 区), 少了一个潜在糖基化位点, 作 者认为这株不是进化的主流, 在进化的过程中将被 淘汰. 福建 2000 年后分离的毒株至少比 1999 年以前 的多 133 位或 144 位潜在糖基化位点, 这也是造成抗 原性漂移的原因之一.

最早Both 等人^[19]通过分析 1968~1980 年甲 3 亚型流感病毒株,提出主要能够致病的病毒株至少在 4 个抗原位点各有一个突变,并且必须避免抗体中和. Plotkin等人^[11]提出当甲 3 亚型流感病毒从一个簇

(cluster)跳跃到另一个簇时,每一个簇都受控于不同的表位.这种簇间的跳跃证实和量化了Wilson和Cox^[5]提出的标准,即新的漂移变异株要求 4 个以上氨基酸突变,并涉及两个以上抗原位点. Plotkin和Dushoff^[9]指出HA1的表位残基比非表位残基处于更强大的压力下,因此产生的多样化足以逃避现有的抗体而不改变其立体化学的结构或功能. 这种多样化的倾向反映了这样的事实,即某些基因和这些基因内的某些残基,经历频率决定的选择以改变,而其他基因经历纯化选择保持稳定. 序列比对表明 22%的HA1 绝对保守. 研究发现严格保守的氨基酸位于每个被提议的抗原位点的侧面. 在抗原漂移过程中,HA的三维结构保持不变,大概因此HA的生物学功能得以维持.

Wilson和Cox^[5]及Plotkin等人^[1]也报告了在最近 甲 3 亚型流感病毒流行株中若干抗原位点已有改变. 在自然分离株中氨基酸的改变不破坏HA的活性. 普 遍使用的HA抗体结合位点的定义[3.4.6]是基于已经解 决的 1968 年甲 3 亚型流感毒株的分子结构. 但是 1968 年后HA已相当进化. 事实上, 通过对HA1 序列 的分析表明, 在过去的多年中, 抗原决定簇□的 130 个经典位点之外的位点, 发生了日益增加的更多的 取代. 这些结果意味着HA三聚体上的抗原决定簇已 经发生了改变. Plotkin和Dushoff^[9]论证根据标准遗传 密码子的特性, 生存能力事实上是密码子的遗传特 性. 多数残基要么功能保守或同义置换, 要么功能可 塑并显示氨基酸的变化. 多样化的选择发生于抗原 区, 但中立的改变占优势(包括结构上重要的位点). 流感病毒为了在人体生存不断发生变异, 因此随着 病毒的快速进化, 抗原位点也可能改变, 与抗原漂移 有关的关键密码子也可能改变.

阳性选择被定义为有意义的过多的突变所导致的氨基酸的取代[6]. Bush等人[6]提出人甲 3 亚型流感病毒血凝素的HA1 区至少有 18 个密码子在阳性选择压力下改变它们编码的氨基酸. 本研究证实了这 18 个密码子中的12个密码子,它们分别是121,124,133,138,142,145,156,158,186,193,194 和 275. 阳性选择密码子与抗体结合位点A,B或唾液酸受体结合位点有关. Fitch等人[8]总结 6 个高度可变的密码子(138,145,156,186,193 和 226)比其他可变密码子的进化速度快 7 倍. 但本研究发现在 1996~2004 年间密码子

138 和 145 位没有发生多次改变.

总而言之、结合福建省流感病毒甲3亚型毒株历 年的流行情况, 探讨HA1 区氨基酸变异与暴发流行 的关系, 将对预测福建省及全球流感流行提供一些 有益的参考. 在福建省 1996 年流感病毒甲 3 亚型是 优势株, 1997 年甲 1 亚型和乙型流感病毒占优势, 1998年甲3亚型重占优势, 1999年甲3亚型和乙型占 优势. 2000年和2001年甲3亚型活动明显减弱、都是 甲1亚型占优势, 2002年甲3亚型和乙型占优势, 2003 年和 2004 年上半年甲 3 亚型是优势株, 甲 1 亚型和 乙型在全球的大部分地区呈低水平传播, 甲3亚型在 亚洲、欧洲及北美洲等国家和地区呈暴发状态, 在其 他地区也有流行的报告, 多数甲 3 亚型流感病毒与 A/Fujian/411/2002 抗原漂移变异株类似. A/Fujian/ 411/2002 这一株是 2002 年 8 月 10 日, 采自福州一儿 童监测点患流感的一位两岁半女童. 本省的暴发情 况是从2003年4月13日,采自同一儿童监测点一位 8 岁女孩(FJ/182/03), 到 5 月 20 日莆田暴发流感(FJ/ 325/03), 在这一个多月内福建省 4 个地方(另有中部 沙县FJ/219/03, 南部厦门FJ/292/03)相继发生流感暴 发, 其毒株均类似于A/Fujian/411/2002, 只有 1, 2 个 氨基酸的差异. 可见这一流感毒株用8个月的时间在 人群中稳定并传播. 而人群对这一较大甲3亚型变异 株缺乏免疫力. 2003 年 8 月 23 日福建省光泽县司前 乡大规模暴发流感, 其毒株(FJ/555/03)更类似A/Wellington/1/2004, 但比A/Wellington/1/2004 早. 此后 2004年1月4日在福州监测点分离出类似的FJ/4/04. 2004年3月2日厦门流感暴发(XM/70/04, XM/80/04) 及半年后的另一株, XM/181/04, 也类似A/Wellington/1/2004. 另 2 月 15 日在福州儿童监测点分离的一 株FJ/52/04, 与同年本省其他毒株不同, 其他毒株类 似A/Wellington/1/2004, 与A/California/7/2004 不同, 而这株既类似A/Wellington/1/2004, 也与A/California/ 7/2004 差别不太大. A/Fujian/52/2004 与A/Fujian/411/ 2002 相比, 有 6 个位点的差异, 分别是K145N, Y159F, S189N, R208G, V226I和K326T. 舒跃龙等人^[20]认为 2004 年我国出现与A/Fujian/411/2002 和A/Wellington/1/2004 不同的新的变异株, 并逐步占有流行优势, 有意义的突变为K145N, Y159F, S189N, V226I, A/ Fujian/52/2004 与之大致相似. 总之, 在中国尤其南

方地区流行的流感毒株及其变异情况需引起世界各国流感监测人员的高度重视,在某个地区突然出现的新的流行毒株可能在其他地区已经流行过.由于

甲型流感病毒呈现累积性向前演变的趋势, 所以若某一毒株发生较大的非回复性变异, 它们可能会引起流感新的较大的流行, 需引起高度警惕.

参考文献

- 1 Plotkin J B, Dushoff J, Levin S A. Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (9): 6263—6268 [DOI]
- 2 Underwood P A. Mapping of antigenic changes in the haemagglutinin of Hong Kong influenza (H3N2) strains using a large panal of monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1982, 62: 153—169 [DOI]
- 3 Wiley D C, Wilson I A. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. Nature, 1981, 289 (29): 373—378 [DOI]
- 4 Wilson I A, Skehel J J, Wiley D C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A resolution. Nature, 1981, 289 (29): 366—373 [DOI]
- 5 Wilson I A, Cox N J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. Annu Rev Immunol, 1990, 8: 737—771 [DOI]
- 6 Bush R N, Bender C A, Subbarao K, et al. Predicting the evolution of human influenza A. Science, 1999, 286 (3): 1921—1925 [DOI]
- Weis W, Brown J H, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. Nature, 1988, 333 (2): 426—431 [DOI]
- Fitch W M, Bush R M, Bender C A, et al. Long term trends in the evolution of H(3) human influenza type A. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 7712—7718 [DOI]
- 9 Plotkin J B, Dushoff J. Codon bias and frequency-dependent section on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (12): 7152—7157 [DOI]
- 10 郭元吉,程晓雯. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京: 三峡出版社,1997
- 11 Xiu W Q, Yang S Q, Lv S F, et al. Influenza surveillance of some surveillance sites in Fujian Province, China from January 2001 to December 2002. ELSEVIER International Congress Series, 2004, 1263: 255—258 [DOI]
- 12 张烨,温乐英,李梓,等. 2000~2002年我国流行的甲3(H3N2)亚型流感病毒抗原性及其基因特性的研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(1):16—19
- Nakajima K, Nobusawa E, Tonegawa K, et al. Restriction of amino acid change in influenza A virus H3HA: comparison of amino acid changes observed in nature and *in vitro*. J Virol, 2003, 77 (18): 10088—10098 [DOI]
- Jin H, Zhou H, Liu H, et al. Two residues in the hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like influenza viruses are responsible for anti-genic drift from A/Panama/2007/99. Virology, 2005, 336 (1): 113—119 [DOI]
- 15 Daum L T, Shaw M W, Klimov A I, et al. Influenza A (H3N2) outbreak, Nepel. Emerg Infect Dis, 2005, 11 (8): 1186—1191
- Sato K, Morishita T, Nobusawa E, et al. Amino-acid change on the antigenic region B1 of H3 haemagglutinin may be a trigger for the emergence of drift strain of influenza A virus. Epidemol Infect, 2004, 132 (3): 399—406 [DOI]
- Nobusawa E, Nakajima K. Amino acid substitution at position 226 of the hemagglutinin molecule of influenza (H1N1) virus affects receptor binding activity but not fusion activity. Virology, 1988, 167: 8—14 [DOI]
- 18 Lu B, Zhou H, Ye D, et al. Improvement of influenza Λ/Fujian/411/02 (H3N2) virus growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neuraminidase activities, using reverse genetics. J Virol, 2005, 79 (11): 6763—6771 [DOI]
- Both G W, Sleigh M J, Cox N J, et al. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. J Virol, 1983, 48 (1): 52—60
- 20 舒跃龙,张烨,温乐英,等. 2004 年中国甲3亚型流感病毒(H3N2)抗原性及基因特性研究. 中华实验和临床病毒学杂志,2005,19(4):362—365