

## · 综述 ·

## 登革热分子流行病学研究概况

方美玉 赵文忠 刘建伟

登革热(dengue fever, DF)是一种急性虫媒传染病,其病原体为登革病毒(dengue virus, DV),属于黄病毒科黄病毒属,分为4种血清型(DV 1~4)。DV可引起人类一系列疾病:隐性感染、登革热和登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF),严重的还可导致登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)。

1. 登革热的流行概况:1779年在雅加达首次发生DF流行,此后波及几十个国家和地区。我国最早是1873年在厦门有DF报告,1940~1945年,本病的流行更加严重。此后30多年未发生流行,直至1978年在广东佛山再次发生本病的流行,随后在广东、广西和海南三省间断性流行至今。据统计,患者总共达68万余例,死亡500多例。DV 1~4型在我国均发生过流行:DV 4型于1978年在广东佛山流行后,11年后于1990年在广州又出现流行;DV 3型1979年10月从海南岛儋县北部白马镇开始沿西海岸向南北蔓延,波及湛江、佛山、广州、汕头、韶关等地区以及广西的北海、合浦,连续流行3年;DV 1型1979年在广东流行后5年,于1985年又形成较大范围的流行,此后于1991、1995、1997、1999及2000年又在广东爆发流行;DV 2型1985年9月从海南岛儋县北部开始流行,1986年蔓延全岛,波及广州和广西北海,一直流行至1988年,1993、1998年广东发生流行,1999年福建省流行,在1993年有少数病例合并感染DV 4型,这是我国少见的合并感染病例<sup>[1-4]</sup>。

近年来DF及DHF在亚洲、太平洋群岛及中美洲、南美洲许多国家都已造成严重威胁。据统计,全世界已有98个国家和地区流行DF和DHF。

2. 登革病毒的基因组结构与功能:DV基因组为单股、正链RNA,长约11 kb,病毒RNA具感染性。目前DV 1~4型的基因序列均已清楚<sup>[5-8]</sup>。cDNA序列分析表明,病毒RNA只含有一个长的开放读码框架,约96%的核苷酸在此框架内。病毒基因组分为两个区段:5'端1/4编码病毒3个结构蛋白,3'端3/4编码7个非结构蛋白。基因组的5'端和3'端均有一段非编码区。整个基因的编码顺序为:5'-I型帽子结构-非编码序列-AUG-C蛋白(核衣壳蛋白)基因-M蛋白(膜蛋白)基因-E蛋白(包膜蛋白)基因-NS1基因-NS2a基因-NS2b基因-NS3基因-NS4a基因-NS4b基因-NS5基因-非编码序列。

作者单位:510507 广州,广州军区联勤部军事医学研究所微生物研究室

(1)E蛋白:全长494个氨基酸,相对分子质量( $M_r$ )近 $60 \times 10^3$ ,是毒粒的主要包膜蛋白。根据E基因序列分析及带二硫键的不同抗原决定簇的结构特性,国外学者提出了一种E蛋白结构模型<sup>[9]</sup>。这个模型主要由3个不重叠的抗原区A、B和C组成。E蛋白的A、B两区存在有诱导中和抗体产生以及和血凝作用有关的抗原表位,它能诱导宿主产生保护性的中和抗体和血凝抑制抗体,并且可能会引起抗体依赖的增强感染作用(ADE),而ADE尚可导致DHF和DSS<sup>[10-12]</sup>。

(2)C蛋白、PrM及M蛋白:C蛋白是核衣壳蛋白, $M_r$ 约为 $13.5 \times 10^3$ ,病毒基因组的翻译起始于衣壳蛋白。在C蛋白之后的PrM蛋白是一种糖蛋白,为M蛋白的前体,在病毒成熟过程中PrM糖蛋白经特异性酶切后形成一个 $M_r$ 约为 $8.5 \times 10^3$ 的M蛋白,它能导致病毒感染增强,并形成毒粒的表面结构<sup>[13]</sup>。

(3)NS1~NS5非结构蛋白:NS1~NS5在病毒复制过程中的作用目前尚不十分清楚,但已有资料表明,NS1和NS3在病毒免疫反应中起重要作用。NS1是一种糖蛋白, $M_r$ 为 $48 \times 10^3$ ,免疫小鼠后,能诱导产生针对同型DV的致死性攻击具有保护作用的抗体<sup>[14]</sup>。NS3是一种 $M_r$ 为 $70 \times 10^3$ 左右的亲水蛋白,它可能同时具有两种酶活性<sup>[15]</sup>。NS3与NS1一样既具有反应原性,又具有免疫原性,用NS3免疫小鼠后同样可诱导产生具有保护作用的抗体。

3. 登革热的分子流行病学:目前有关DF分子流行病学的研究国内刚刚兴起,报道较少。根据国内外学者的研究初步分析,主要是通过DV的结构蛋白或非结构蛋白基因序列同源性比较和基因系统树分析来探讨DV基因变化与致病性的关系、DV的基因分型、不同地方株的亲缘关系以及推测传染的来源等。

(1)登革病毒基因系统树的构建<sup>[16]</sup>:基因系统树的构建首先必须选择目的基因片段,在DV的研究中采用的基因序列有结构蛋白和非结构蛋白的基因,如E基因全序列,NS1, E/NS1, PrM/M的某一段基因。根据目前国内外研究的初步结果来看,选用不同区段构建的基因系统树会有一些的差异,但基因情况是一致的。其次是构建方法,目前构建方法及其计算机分析软件种类越来越多,主要有三类:①简约法;②距离法;③似然法。最后是分型界限,目前以多少核苷酸的差异作为基因型的分界值还没有统一标准。国外研究者多以核苷酸的差异在6%以上作为基因型的分型标准,其基本原则是能把不同地理区域的分离株分开。

(2)登革病毒的基因分型:从构建DV的基因系统树来分

析,在 DV 4 个血清型之间核苷酸序列差异很大,其差异在 35% 左右,而型内之间的差异较小,因此型内之间又可分为不同的基因型:① DV 1 型的基因分型:Rico-Hesse<sup>[17]</sup>选择 E/NS1 这一基因区段,对 40 株不同地理区域的 DV 1 型的核苷酸同源性进行了分析,将 DV 1 型分为 5 个基因型(I~V):I:美洲、非洲、东南亚株;II:斯里兰卡株;III:日本 1943 年的一个分离株;IV:东南亚、南太平洋、澳大利亚、墨西哥株;V:台湾、泰国株。② DV 2 型的基因分型:Thant 等<sup>[18]</sup>根据 E/NS1 结合区序列将 52 株不同地理株 DV 2 型分成 5 个基因型(I~V):I:加勒比、南太平洋、中美洲及拉丁美洲株;II:亚洲及西太平洋株;III:亚洲及加勒比株;IV:亚非地区株;V:非洲株。Lewis 等<sup>[19]</sup>通过对 33 株 DV 2 型 E 基因全序列分析,将其分为 5 个基因型(I~V):I:新几内亚原型、斯里兰卡株;II:菲律宾、台湾株;III:牙买加、泰国、马来西亚、巴西株;IV:印度尼西亚、斯里兰卡、塞舌尔、布基纳法索、索马里株;V:波多黎各、特立尼达、汤加、印度株。③ DV 3 型的基因分型:Lanciotti 等<sup>[20]</sup>根据 PrM/M-E 基因序列分析,将 23 株 DV 3 型分为 4 个基因型(I~IV):I:印度尼西亚、马来西亚、菲律宾、南太平洋株;II:泰国株;III:斯里兰卡、印度、非洲、萨摩亚群岛株;IV:波多黎各、塔希提岛 1965 株。④ DV 4 型基因分型:Lanciotti 等<sup>[21]</sup>通过采集自世界各地的 19 株 DV 4 型毒株的 E 基因进行了序列和种属分析,将其划分为 2 个基因型(I,II):I:菲律宾、泰国和斯里兰卡的毒株;II:印度尼西亚、塔希提岛、加勒比群岛及中南美洲毒株。

DV 的基因分型目前尚无一个标准的分型方法,这是因为:同一血清型而不同地理株的 DV 基因序列虽存在差异,但其遗传变异不显著;另外,不同作者选取比较的基因序列不同,因此构建的基因系统树会有差异。

(3) 登革病毒基因变化与致病性的关系:基因变化与致病性的关系以及与病毒毒力之间的相关性都是目前研究的热点。杨佩英等<sup>[22]</sup>对 1985 年从海南省 DF 病人血清中分离的 DV 04 株(D2-04)和 1987 年从广西病人血清中分离的 DV 2 型 43 株(D2-43)对乳鼠致病性的差异与基因变化的关系进行了研究,结果表明:D2-43 株对乳鼠致病,D2-04 株对乳鼠不致病,D2-43 株和 D2-04 株 C 基因到 NS 基因的读码框架基本相同,均由 3 381 个核苷酸组成,编码氨基酸总数为 1 127 个,包含 3 个结构蛋白 C、PrM(M)、E 和一个非结构蛋白 NS1。该两株病毒核苷酸序列同源性为 93.8%,氨基酸的同源性为 91.3%。C 和 E 基因同源性为 95.0%~95.8%,NS1 基因为 92.2%,M 基因为 86.7%,两株之间核苷酸序列的主要差异存在于 M 基因。两株病毒的 C-NS1 基因与国际参考株比较,主要差异也在 M 基因,因此推测,对乳鼠致病性的差异可能与 M 基因变化有关。

Thant 等<sup>[18]</sup>报道,1993 年在泰国北部 Nakhon Phanom 省 DF 流行时,从不同临床表现患者体内分离到 4 株 DV 2 型,并对其 E/NS1 基因结合区的序列进行比较分析表明:4 个泰国株在氨基酸序列上无差异,但核苷酸序列有差异,2 株 DHF

患者分离株(ThNH-28/93 和 ThNH-52/93)与 DSS 患者分离株(ThNH-7/93)相比,核苷酸序列上有一个变异,而 DF 患者分离株(ThNH-P11/93)与 DSS 患者分离株相比,则有 6 个核苷酸的变异,说明病毒核苷酸变异与病毒毒力间可能存在一定的相关性。

类似的关系在泰国 1980 年分离株与马来西亚 1989 年分离株核苷酸和氨基酸序列的比较中表现更为明显,DSS 患者分离株与 DF 患者分离株之间的变异明显多于 DSS 患者分离株与 DHF 患者分离株之间的变异。因此他们认为:在同一年同一地区的病毒株中,核苷酸及氨基酸的变异越大,病毒感染者的临床表现差异越明显。由于研究的靶基因的长度及样本的大小有限,上述结果尚待进一步研究。

(4) 登革病毒不同地方株的相互亲缘关系及推测传染的来源:在 DV 4 个血清型中,DV 1 型和 DV 3 型亲缘关系最近,DV 4 型最远。Lewis 等<sup>[19]</sup>通过对 33 株 DV 2 型 E 基因全序列分析,构建了一个最大的基因系统分析树,显示 DV 2 型间的相互亲缘关系和进化的种系图,确定了 5 个基因型,从 NGC-1994 和 2 个 1968~1969 年分离的斯里兰卡病毒间的密切关系,提示在斯里兰卡基因 I 型持续了至少 24 年,以后才被基因 4 型代替。1957 年分离的 1 株印度 DV 2 型属于基因 5 型(V)与南太平洋地区的分离株属同一基因型。推测这些地区之间的频繁旅游和贸易交往导致病毒的传入。

我们对 1991、1993、1995、1997、1998 年在广东省流行的 5 次 DF 进行了初步的分子流行病学研究<sup>[23,24]</sup>,对 5 株 DV 的 NS1 基因部分序列与相应的国际参考株作了分析比较研究。3 株 DV 1 型与从国际基因库(GENEBANK)中的 5 株 DV 1 型国际参考株相应 NS1 部分基因序列比较发现,核苷酸的差异广泛分布在整个序列中,1991 年流行毒株(GD03/91)与 1995 年流行毒株(GD23/95)有 14 个核苷酸的差异,其同源性为 97%,GD03/91 株与 1997 年流行毒株(GD14/97)有 28 个核苷酸的差异,其同源性为 93%,GD23/95 与 GD14/97 株有 26 个核苷酸的差异,其同源性也是 93%,这表明 GD03/91 与 GD23/95 株较之与 GD14/97 株有更近的亲缘关系。8 株 DV 1 型的 NS1 部分基因的氨基酸序列比较发现,在整个序列中仅有个别氨基酸的差异,其同源性均在 96% 以上,这表明 NS1 部分基因所编码的氨基酸序列相对保守。基因系统树分析提示:GD03/91 和 GD23/95 株可能来源于东南亚或太平洋诸岛;GD14/97 株可能来源于新加坡。

广东省 1993 年 DV 2 型流行株(GD06/93)和 1998 年 DV 2 型流行株(GD01/98)的 NS1 部分基因序列与 6 株 DV 2 型国际参考株和国内流行株的相应序列比较分析表明,核苷酸同源性为 90%~98%,氨基酸同源性为 94%~100%。GD01/98 与 GD06/93 株核苷酸(氨基酸)的同源性为 94%(96%),其间有 23 个核苷酸的差异;GD01/98 与 04 株核苷酸(氨基酸)的同源性为 93%(94%),其间有 28 个核苷酸的差异;GD06/93 与 04 株核苷酸(氨基酸)的同源性为 93%(97%),其间有 27 个核苷酸的差异;GD01/98 与泰国 ThNH-P28/93 株的核苷酸

(氨基酸)同源性为 98%(100%),其间仅有 4 个核苷酸的差异。基因系统树分析表明 GD01/98、GD06/93 和 04 株分属不同的基因型。其中 GD01/98 株与泰国 ThNH-P28/93 株的共享序列非常接近,且两者核苷酸(氨基酸)的同源性为 98%(100%)因此推测 GD01/98 株可能来源于泰国。上述结果提示:1998 年广东省南海市流行的 DV 2 型毒株与 1993 年广东省佛山市流行的 DV 2 型毒株及 1985 年海南省流行的 DV 2 型毒株是来自不同的疫源地。

姚海军等从基因水平对 1978 年和 1990 年国内分离的 DV 4 型流行毒株的 NS2a-NS2b 基因序列进行了分析,结果发现,1990 年从白纹伊蚊体内分离株 GDA63 与流行前、中、后期的病人体内分离株具有同样的核苷酸序列,说明蚊体株与人体株很可能归属于一个毒株。1990 年的 DF 流行是由一个毒株引起。1990 年的 DV 4 型地方株与国际参考株 DV4 型 H241、814669(加勒比株)和 1978 年分离的 DV 4 型(7856B2 株)的核苷酸(氨基酸)的同源性分别为 96%(98%)、92%(96%)和 93%(98%);1978 年的 7856B2 株与 DV4 型 H241、814669 株的核苷酸(氨基酸)同源性分别为 93%(98%)、96%(97%)。若以 6% 的核苷酸离散率为临界值,则 1990 年的毒株与 DV 4 型 H241 株应属同一个基因型,与 814669 株和 GD7856B2 株则分属不同的基因型;GD7856B2 株与 DV 4 型 H241 株分属不同的基因型,与 814669 株则属同一个基因型。根据 Lanciotti<sup>[21]</sup>等对 19 株 DV 4 型毒株的 E 基因进行序列分析,发现 DV 4 型可划为两个基因型,DV 4 型 H241 株是 1956 年分离自菲律宾的毒株,属于 I 基因型。鉴于 1990 年毒株与其有 96% 的基因同源性,故推测 1990 年的毒株可能来源于 I 基因型的某个地区,而 1978 年分离的 7856B2 株因为与 1981 年分离自加勒比地区的 814669 株有 96% 的基因同源性,我们推测该毒株可能来源于 II 基因型的某个地区。上述结果提示:1990 年分离的毒株和 1978 年分离的毒株是来自两个不同的疫源地。1990 年的毒株并不是 1978 年毒株潜伏后的再次出现,广东省 DF 的来源地是多疫源地的。

国外学者在分子流行病学研究分析中还发现,DV 的毒力决定簇可能由病毒颗粒的三维空间结构决定<sup>[25]</sup>。因此,应进一步研究病毒株的分布、进化特征、完整 E 基因序列、病毒的三维结构等,将基因型和表型的变化与毒力变化相关联,对于深入分析靶抗原表位的变异性来设计抗流行株的有效疫苗具有重要的现实意义。

#### 参 考 文 献

- 1 自登云,陈伯权,俞永新,主编.虫媒病毒及虫媒病毒病.昆明:云南科技出版社,1995.164-166.
- 2 杨佩英,秦鄂德,主编.登革热和登革出血热.北京:人民军医出版社,1998.6-20.
- 3 赵治国.我国登革热和登革出血热流行概况及防制.中华流行病学杂志,1997,18:475-476.
- 4 李刚,姚集鲁,彭文伟,等.两型登革病毒混合感染八例分析.中华医学杂志,1995,75:38.
- 5 Mason PM, Meada PC, Mason TL, et al. Sequence of the Dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. Virology, 1987, 161:262-267.
- 6 Deubel V, Kinney RM, Trent DW. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of Dengue type 2 virus, jamaica genotype: Comparative analysis of the full-length. Virology, 1988, 165:234-244.
- 7 Osatomi K, Sumivoshi H. Complete nucleotide sequence of Dengue type 3 virus genome RNA. Virology, 1990, 176:643-647.
- 8 Mackow E, Makino Y, Zhao B, et al. The nucleotide sequence of Dengue type 4 virus: Analysis of genes coding for nonstructural proteins. Virology, 1987, 159:217-228.
- 9 Mandl CW, Gurakho F, Holzmann H, et al. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using Tick-Borne encephalitis virus as a model. J Virol, 1989, 63:564-571.
- 10 Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. J Gen Virol, 1985, 66:1969-1982.
- 11 Gollins SW, Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by antiviral antibody. Nature, 1986, 321:244-246.
- 12 Kimura T, Ohshima A. Association between the pH-dependent conformational change of west nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion. J Gen Virol, 1988, 69:1247-1254.
- 13 Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of Flavivirus PrM protein. Virology, 1990, 174:450-458.
- 14 Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. J Gen Virol, 1987, 68:853-857.
- 15 Bazen JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. Virology, 1989, 171:637-639.
- 16 赵卫,杨佩英.登革病毒的系统发生树.微生物学免疫学进展,2000,28:91-94.
- 17 Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. Virology, 1990, 174:479-493.
- 18 Thant KZ, Morita K, Igarashi A. Sequences of E/NS1 gene junction from four Dengue-2 viruses of northeastern thailand and their evolutionary relationships with other Dengue-2 viruses. Microbiol Immunol, 1995, 39:581-590.
- 19 Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, et al. Phylogenetic relationships of Dengue-2 viruses. Virology, 1993, 197:216-224.
- 20 Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. J Gen Virol, 1994, 75:65-75.
- 21 Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. J Gen Virol, 1997, 78:2279-2286.
- 22 杨佩英,司炳银,徐品芳,等.中国登革 2 型病毒分离株乳鼠致病性差异与基因变化关系的研究.中华微生物学和免疫学杂志,1994,14:296-302.
- 23 方美玉,赵文忠,刘建伟,等.登革病毒 2 型广东分离株的鉴定及 NS1 基因序列分析.中华传染病杂志,2001,19:23-26.
- 24 方美玉,赵文忠,蒋廉华,等.广东省登革病毒的分子流行病学研究.中华微生物学和免疫学杂志,2001,21:326-329.
- 25 Deubel V, Nogueira RM, Drouot MT, et al. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue-2 viruses. Arch Virol, 1993, 129:197-210.

(收稿日期:2001-10-28)  
(本文编辑:杨莲芬)