

# 浙江省与日本 A<sub>3</sub> 型流行性感冒病毒株的血凝特性及 HA1 序列比较

卢亦愚 严菊英 周敏 姜晓路

**【摘要】** 目的 比较近年来在浙江省与日本流行的 A<sub>3</sub>(H3N2)型流行性感冒(流感)病毒株的血凝特征与血凝素重链(HA1)区域的序列差异。方法 对浙江省不同性状的流感代表株进行了抗原性分析,并与日本同期的毒株作了血凝特性及 HA1 区域的氨基酸序列比较分析。结果 近年在浙江流行的 A<sub>3</sub> 型流行株,其抗原性已发生较大变异,其中绝大部分是对鸡红细胞缺乏凝集特性的 O 相毒株,它与 A/武汉/359/95 株二者在 HA1 区域的氨基酸同源性仅为 94.82%,存在较大差异,这些 O 相毒株可以通过在 MDCK 细胞上的传代而转变为 D 相毒株,日本的同期毒株,其情况也相似。结论 A<sub>3</sub> 型流感病毒在 HA1 区域发生的变异,是近年引起浙江省流感流行的主要因素。

**【关键词】** 流行性感冒;血凝素重链序列;血凝特性

**Comparison of characterization of hemagglutination and HA1 sequence of currently circulating strains of influenza A (H3N2) virus in Zhejiang province and in Japan** LU Yi-yu, YAN Ju-ying, ZHOU Min, JIANG Xiao-lu. Institute of Virology, Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310009, China

**【Abstract】 Objective** To compare the characterization of hemagglutination and the sequence of HA1 region of the influenza A (H3N2) virus in Zhejiang province and Japan in recent years. **Methods** Hemagglutinin antigenic analysis of influenza A (H3N2) viruses which were isolated in Zhejiang province was carried out and to compare their characterization of hemagglutination and the sequence of amino acids in HA1 region with the virus strains from Japan during the same period. **Results** The antigenicity and the amino acid sequence in HA1 region of the virus strains prevalent in Zhejiang in recent years have changed to some extent. Most of the virus strains were lack of hemagglutination reaction to chicken red blood cell and became "O" phase virus strains. The amino acid sequence of HA1 region of the virus strains exhibited only 94.82% of its homology with that of A/Wuhan/359/95 strain. The virus strains of Japan in the same period showed similar characteristics. **Conclusion** HA1 gene variation of influenza A (H3N2) viruses was the main cause leading to the spread of influenza in the last years.

**【Key words】** Influenza; Hemagglutinin 1 (HA1) sequence; Hemagglutination characteristics

1998~1999年浙江省以及邻近省市相继发生了 A<sub>3</sub>(H3N2)亚型流行性感冒(流感)的流行,波及面很广,且对当年含 A/武汉/359/95 株的流感疫苗接种保护效果不理想。在这次流行中,我们分离到两类 A<sub>3</sub> 型毒株,一类是以 A/浙江/6/99 为代表,这类毒株在鸡胚上难以增殖,只能从狗肾传代(madin darby canine kidney, MDCK)细胞上才能分离到,且丧失了对鸡红细胞的血凝特性,这类毒株占分离毒株的 90% 以上,是主要的流行株。另一类毒株以 A/浙江/10/98 为代表,无论在 MDCK 细胞或鸡胚上均能很好增殖,并对鸡与豚鼠红细胞均有凝集活性,但

这类毒株所占的比例很小。为掌握浙江省当地流感流行毒株的变异情况,我们对这两类流感代表株与日本同期的代表株进行了比较,结果报道如下。

## 材料与方 法

1. A<sub>3</sub>(H3N2)亚型毒株:流感 A<sub>3</sub>(H3N2)型病毒株 A/浙江/10/98、A/浙江/6/99 和 A/浙江/12/99 毒株由本实验室分离,并按常规方法用鸡制备免疫血清<sup>[1]</sup>。国内代表株 A/武汉/359/95、A/上海/1/98 及免疫血清(鸡)购自国家流感中心,国外毒株 A/山形/6/99、A/山形/112/99、A/悉尼/5/97、A/大阪/461/98 和免疫血清(鸡)由日本山形大学医学部和 WHO 惠赠。

2. 抗原性分析 :采用常量法交叉血凝抑制试验<sup>[1,2]</sup>。

3. 病毒 RNA 提取 :采用德国 QIAGEN 公司的 Reansy Min Kit ,按试剂盒说明书提取病毒 RNA。

4. 引物 :RT 采用 universal primer 5 'AGCAAA AGCAGG 3 'PCR 引物分别采用 H<sub>3</sub>A 5 'GCAAAAG CAGGGGATAATTC 3 ' ,H<sub>3</sub>B 5 'TCTATGAAACCT GCTATTGC 3 '。上述引物均由日本 GBCOBR L 公司合成纯化<sup>[3]</sup>。

5. RT-PCR 与序列测定 :RT 采用 DEPC 处理的双蒸水 1 μl ,10 × buffer AMV-RT 2 μl ,dNTPmix( 2.5 mmol/L ) 4 μl ,1 μg/μl universal primer 1 μl ,Rnasin( 40 U/μl ) 1 μl ,提取病毒 RNA 10 μl ,AMV-RT( 40 U/μl ) 0.6 μl ,混合后 42℃ 1 h ,95℃ 5 min ,进行逆转录。PCR 采用双蒸水 66.5 μl ,10 × Taq buffer 10 μl dNTPmix( 2.5 mmol/L ) 8 μl ,Taq 酶 0.5 μl ,20 pmol/L sense 与 antisense 引物各 2.5 μl ,逆转录后的 cDNA 10 μl 94℃ 30 s 51℃ 30 s 72℃ 1 min 35 个循环反应后转入 72℃ 9 min 最后转入 4℃。序列测定采用日本 ABI PRISM 公司的 DNA sequencing kit( Dig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction ) ,合成相关引物后采用 per mix 4 μl ,5 × sequencing buffer 2 μl , primer 3.2 pmol ,DNA 50 ng ,补足双蒸水至 20 μl , 96℃ 30 s 预变性 ,然后 96℃ 10 s ,50℃ 5 s ,60℃ 4 min 25 个循环后转入 4℃。最后用 Sephadex G-50 去除多余引物等干扰物质冷冻干燥后上 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer 进行全自动序列测定 ,采用 GENETYX-MAC 软件进行分析处理。

## 结 果

1. A<sub>3</sub> 亚型病毒株间的抗原性分析 :从 A/浙江/10/98、A/浙江/6/99 与国际标准株 A/悉尼/5/97、A/武汉/359/95 及 A/上海/1/98 的抗原性分析结果可以看出 ,A/浙江/10/98 与以往的国际标准株 A/武汉/359/95 的抗原性相似 ,二者的抗原比为 0.7 ,而与 1999 年的国际标准株 A/悉尼/5/97 的抗原性差异较大 ,抗原比为 4.0 ;与之相反 ,A/浙江/6/99 与 A/武汉/359/95 的抗原性差异较大 ,为 22.6 ;而与 A/悉尼/5/97 之间抗原性相似 ,抗原比为 2.0(表 1)。

2. 不同病毒株的血凝特性 :国际标准株 A/武汉/359/95 与 A/悉尼/5/97 无论对鸡或豚鼠红细胞均能产生凝集 ,而浙江省与日本近年分离到的绝大多数毒株 ,在分离的初代均丧失了对鸡红细胞的凝集活性 ,随着毒株在 MDCK 细胞上传代代数的增加 ,恢复了对鸡红细胞的凝集活性(表 2)。

3. 不同流行代表毒株的血凝素重链(HA1)核苷酸序列分析 :对 A/浙江/6/99、A/浙江/10/98、A/浙江/12/99、A/山形/6/99、A/大阪/461/98 5 株毒株的 HA1 区域进行了核苷酸序列测定 ,并与当时 WHO 的 A<sub>3</sub> 型标准株 A/悉尼/5/97、A/武汉/359/95 株的 HA1 序列(该两株序列来自 GenBank)进行了比较 ,在 HA1 基因的核苷酸及其编码的氨基酸序列分析中 ,A/浙江/6/99、A/浙江/12/99、A/浙江/10/98、A/山形/6/99 及 A/大阪/461/98 的 HA1 基因长度均为 984 个碱基 ,没有发现核苷酸的丢失和插入 ,由核苷酸序列推导出的相应氨基酸序列及同源性见图 1 和表 3。

表1 不同 A<sub>3</sub> 型流感病毒株的抗原性分析

病毒抗原	免 疫 血 清				
	A/武汉/359/95	A/悉尼/5/97	A/上海/1/98	A/浙江/10/98	A/浙江/6/99
A/武汉/359/95	2 560(1.0)	640(5.7)	40(16.0)	2 560(0.7)	20(22.6)
A/悉尼/5/97	1 280	10 240(1.0)	5 120(1.4)	1 280(4.0)	1 280(2.0)
A/上海/1/98	640	2 560	2 560(1.0)	320(16.0)	320(2.0)
A/浙江/10/98	5 120	1 280	80	2 560(1.0)	40(22.6)
A/浙江/6/99	640	5 120	5 120	320	2 560(1.0)

注 括号内数字为抗原比

表2 不同 A<sub>3</sub> 型(H3N2)流行株对鸡及豚鼠红细胞的凝集活性

流感毒株	A/浙江/10/98	A/浙江/6/99	A/浙江/12/99	A/山形/6/99	A/山形/112/99	A/大阪/461/98
M <sub>1</sub> 豚鼠红细胞	+	+	+	+	+	+
M <sub>1</sub> 鸡红细胞	+	-	-	-	-	-
M <sub>6</sub> 豚鼠红细胞	+	+	+	+	+	+
M <sub>6</sub> 鸡红细胞	+	+	+	+	+	+

注 :M<sub>1</sub> 为该毒株在 MDCK 细胞上分离第一代 ,M<sub>6</sub> 为该毒株在 MDCK 细胞上传代至第六代

A/悉尼/5/97	J	Q K I P G N D N S T A T L C L G H H A V P N G T L V K T I T N D O I E V T N A T E L V Q S S S T G R I C D S P H R I L D G E N C T L I D A L L G D P H C D G F Q N K E W D L F V E R	90
A/浙江/6/99	I	..... L .....	90
A/浙江/12/99	I	..... L .....	90
A/山形/6/99	I	..... L ..... S .....	90
A/大阪/461/98	I	..... L ..... S Q .....	90
A/武汉/359/95	I	..... L ..... K .....	90
A/浙江/10/98	I	..... L ..... K .....	90
A/悉尼/5/97	91	S K A Y S N C Y P Y D V P D Y A S L R S L V A S S G T L E P N N E S F N W T G V A Q N G T S Y A C K R S S I K S F F S R L N W L H Q L K Y K Y P L A N V T M P N N D K F D K L Y I W	180
A/浙江/6/99	91	..... S .....	180
A/浙江/12/99	91	..... S .....	180
A/山形/6/99	91	..... F .....	180
A/大阪/461/98	91	..... S .....	180
A/武汉/359/95	91	..... T G ..... D ..... G V ..... K E .....	180
A/浙江/10/98	91	..... T G ..... D ..... G V ..... K E .....	180
A/悉尼/5/97	181	G V H H P S T D S D Q T S I Y A Q A S G R V T V S T K R S Q Q T V I P N I G S R P W V R G I S S R I S I H W T I V K P G D I L L I N S T G N L I A P R G Y F K I R S G K S S I M R S	270
A/浙江/6/99	181	..... L .....	270
A/浙江/12/99	181	..... L ..... V .....	270
A/山形/6/99	181	..... L ..... V .....	270
A/大阪/461/98	181	..... I L ..... S ..... V ..... K ..... Y .....	270
A/武汉/359/95	181	..... V .....	270
A/浙江/10/98	181	..... V .....	270
A/悉尼/5/97	271	D A P I G K C N S E C I T P N G S I P N D K P F Q N V N R I T Y G A C P R Y V K Q N T L K L A T G M R N V P E K Q T R	329
A/浙江/6/99	271	.....	329
A/浙江/12/99	271	.....	329
A/山形/6/99	271	.....	329
A/大阪/461/98	271	N .....	329
A/武汉/359/95	271	N .....	329
A/浙江/10/98	271	N .....	329

图1 不同 A<sub>3</sub> 流行株的 HA1 氨基酸序列

表3 不同 A<sub>3</sub> 流行株 HA1 区域的同源性比较

病毒株	同 源 性 (%)						
	A/悉尼/5/97	A/浙江/12/99	A/浙江/6/99	A/山形/6/99	A/大阪/461/98	A/武汉/359/95	A/浙江/10/98
A/悉尼/5/97	100.00	97.56	96.65	97.56	96.34	96.34	96.65
A/浙江/12/99		100.00	99.09	98.48	97.87	95.43	95.12
A/浙江/6/99			100.00	97.56	96.95	94.82	94.51
A/山形/6/99				100.00	96.95	95.43	95.12
A/大阪/461/97					100.00	93.90	93.60
A/武汉/359/95						100.00	99.70
A/浙江/10/98							100.00

4. 不同 A<sub>3</sub> 型病毒株间的进化系统树 将本研究测定的 A/浙江/6/99、A/浙江/12/99、A/浙江/10/98、A/山形/6/99、A/大阪/461/98 等 A<sub>3</sub> 型流感毒株的 HA1 序列和 GenBank 上我国与日本近年的 A<sub>3</sub> 型流感代表株,以及 WHO 的标准株 A/悉尼/5/97、A/武汉/359/95 株的 HA1 序列用 GENETYX-MAC 软件进行了比较分析,建立进化系统树(图 2)。

### 讨 论

A<sub>3</sub> 型流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)基因位于 RNA 基因组的第 4 节段,具有凝集有关红细胞的特性,其重链 HA1 含 328 个氨基酸(第 329 位氨基酸在水解时脱落),具有 5 个抗原决定簇区,起着诱导保护性中和抗体的主要功能<sup>[4]</sup>。在逃避中和抗体的攻击中,HA1 基因的变异尤为活跃。我们从 GenBank 上下载了 30 多年前的流感 A<sub>3</sub> 型标准株 A/

Aichi/2/68 的 HA1 序列,并与我省的 A/浙江/6/99、A/浙江/10/98 毒株的 HA1 序列进行比较,经分析,两者在 HA1 区域的氨基酸差异已达到 14.63% 与 15.24%。A/武汉/359/95 为 WHO 在 1997~1998 年的标准株,与我省的 A/浙江/10/98 株,在 HA 区域比较仅因 HA1 核苷酸序列 697 位上的 T 变成了 C,而引起了在氨基酸 233 位上的一个差异。这二株毒株在我实验室的血清学交叉抗原血凝抑制试验中的抗原比也仅为 0.7,其在 HA1 区域的氨基酸同源性为 99.70%,所以是同一性状的毒株;而它与 1998 年浙江省的主要流行株 A/浙江/6/99 的血清交叉试验中的抗原比为 22.6,在 HA1 区域的氨基酸同源性仅为 95.43%,二者的抗原性已发生了较大的变化。日本同期的流感毒株,从 HA1 区域的同源性分析来看,与 A/浙江/6/99 与 A/浙江/12/99 流行株也较为接近。此外,糖基化位点的增加或减少对流感病毒

的抗原性及其他生物学特性均有一定影响<sup>[7]</sup>,国际标准株 A/悉尼/5/97 在 HA1 区含有 10 个糖基化位点(8 22 38 63 122 126 133 165 246 285),它与 A/浙江/6/99、A/浙江/12/99 及日本同期流感流行株的糖基化位点相一致。与前者相比,A/武汉/359/95 与 A/浙江/10/98 两者在 HA1 区的 122 位与 133 位上少了 2 个糖基化位点,其中 133 位点位于抗原决定簇的 A 区<sup>[1]</sup>。从本文结果看出近年引起浙江省 A<sub>3</sub> 型流感流行的原因也正是由于 HA1 区域的抗原漂变所引起的。

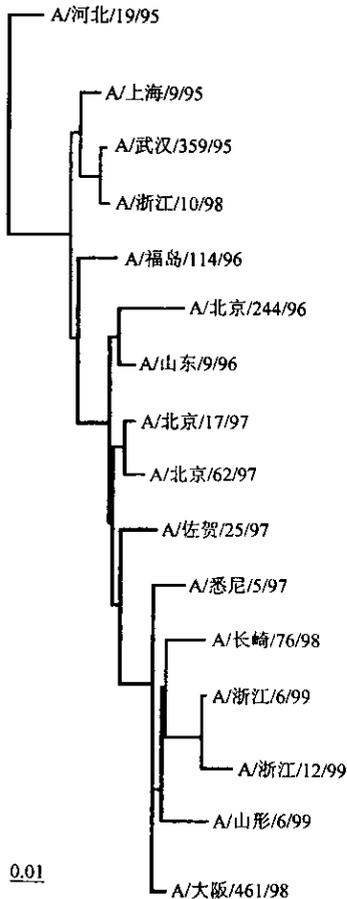


图2 A<sub>3</sub> 型流感毒株的进化系统树

值得注意的是,近年重新出现的对鸡红细胞不

凝集的 O 相(original phase)流感毒株,在我省已占 90% 以上,日本也占 2/3 左右,并有逐年增高的趋势。我们对这些 O 相毒株,经 MDCK 细胞多次传代后,均能转变为对鸡红细胞具有凝集能力的 D 相(derived phase)毒株,再对这些 O 相毒株与 D 相毒株进行病毒蚀斑试验比较,发现在蚀斑大小上并无差异。同时我们对浙江省流行代表株 A/浙江/6/99 在 MDCK 细胞上传至第 2 代的毒株(无鸡红细胞血凝特性)与传代至第 6 代的毒株(鸡红细胞 HA 效价 1:16),分别在 HA1 区域进行序列测定,仅仅在 HA1 第 229 位上的氨基酸从 Arg(AGA)转变为 Arg(AGA)/Ile(ATA)二者的混合体,该毒株在 O 相与 D 相之间仅差了一个氨基酸,即一个碱基。有关 O 相到 D 相变异的机理目前尚不清楚,O 相与 D 相之间在 HA1 区域的氨基酸差异,文献报道也并不完全一致<sup>[5,6]</sup>。有关流感病毒的相变,究竟在病毒变异与免疫逃避上有什么意义,有待通过对大量毒株的性能、核苷酸序列与免疫学方面的研究来作进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京:中国三峡出版社,1997.21-106.
- 2 严菊英,卢亦愚,周敏,等. 近两年浙江省流感病毒的抗原性及人群抗体水平分析. 中国公共卫生,2001,17:625-627.
- 3 Nakajima M. Detection of influenza viral genomes by quantitative PCR. Ann Rep Tokyo Metr Res Lab PH,1997,48:30-37.
- 4 Gunther I. An HI hemagglutinin of a human influenza A virus with a carbohydrate-modulated receptor binding site and an unusual cleavage site. Virus Res,1993,2:147-160.
- 5 Eri Nobusawa. Structure and function of the hemagglutinin of influenza viruses. Japanese Journal of Clinical Medicine,1997,55:64-71.
- 6 Ciappi S, Azzi A, Stein CA. Isolation of influenza A(H3N2) virus with "O"→"D" phase variation. Res Virol,1997,148:427-431.
- 7 金奇. 医学分子病毒学. 北京:科学技术出版社,2001.638-639.

(收稿日期:2002-02-06)

(本文编辑:张林东)

· 网络信息 ·

WISQARS™数据库系统

WISQARS™(Web-based Injury Statistics Query and Reporting System) <http://www.cdc.gov/ncipc/wisqars/> 为美国伤害预防与控制国家中心建立的基于 WEB 的伤害统计查询报告交互式数据库系统。目前,该系统可为科学研究和卫生决策提供 1981~1998 年间与伤害相关的死亡率数据报告。WISQARS 系统包含两部分内容,即致命伤害

数据库与非致命伤害数据库。前者以“致命伤害报告”和“主要死因报告”两种格式提供美国伤害死亡率数据。后者以“非致死伤害报告”和“非致死伤害主要原因报告”两种格式提供在美国医院急救中心治疗的非致死伤害的估测数字。两库中的数据皆可按年代、年龄范围、种族、性别、所在州等进行限制检索。

(黄亚明 刘树春 郭继军 整理)