

# 1988-2005 年甲 3 亚型流感流行株 与疫苗株的 HA1 区差异探讨

卢亦愚 严菊英 孙朝英 徐昌平 冯燕 莫世华

**【摘要】** 目的 从基因层面探讨 18 年来我国及欧美国家甲 3 亚型流感流行株与当时 WHO 疫苗推荐株之间的差异。方法 收集 1988-2005 年间我国以及欧美国家的甲 3 亚型流感流行株与疫苗株的血凝素重链(HA1)区域的氨基酸序列,用 BioEdit 生物软件进行比较,分析其与当时疫苗推荐株在 HA1 以及 HA1 抗原决定簇区域的氨基酸差异。结果 在 HA1 区以及 HA1 区抗原决定簇位点,我国甲 3 亚型流感流行株与当年疫苗株之间的差异,均大于它与下一轮疫苗株之间的差异,且已达到十分显著的程度( $P < 0.01$ )。而欧美国家甲 3 亚型流感流行株与当年疫苗株之间的差异,虽然稍大于它与下一轮疫苗株之间的差异,但尚不显著( $P > 0.05$ )。此外,使用多年的疫苗株,无论在我国还是欧美,随着疫苗使用年数的增加,流行株与疫苗株之间的差异不断增大。结论 WHO 推荐的甲 3 亚型疫苗株与我国甲 3 亚型流行株之间,从基因层面进行分析,存在明显的滞后现象。

**【关键词】** 流感病毒;甲 3 亚型;疫苗株;流行株;差异

**Study on the differences on HA1 regions between epidemic strains and vaccine strains of influenza virus subtype A3 from 1988 to 2005** LU Yi-yu, YAN Ju-ying, SUN Chao-ying, XU Chang-ping, FENG Yan, MO Shi-hua. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, 310009 Hangzhou, China

Corresponding author: LU Yi-yu, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

**【Abstract】** Objective To study the differences between epidemic strains of influenza virus subtype A3 circulated in China and Occident in past 18 years, in genetic level, and vaccine strains recommended by WHO in corresponding time. Methods Amino acid sequences of HA1 regions of the epidemic strains, which circulated in China and Occident from 1988 to 2005, and the vaccine strains of influenza virus subtype A3 were compared by BioEdit and analyzed on the differences of HA1 and it's antigen determinants. Results Differences between epidemic strains and vaccine strains recommended in corresponding year, both in HA1 and it's antigen determinant regions, were obviously greater than that between epidemic strains and vaccine strains recommended in next round ( $P < 0.01$ ). However, differences between epidemic strains in Occident and vaccine strains recommended in corresponding year were slightly greater than that between epidemic strains and vaccine strains recommended in next round and it was not marked ( $P > 0.05$ ). In addition, differences between epidemic strains and vaccine strains which being used for several years, whether in China or in Occident, constantly increased accompanying the used time prolonged. Conclusion There was an obvious lag between vaccine strains recommended by WHO, analyzed in genetic level, and epidemic strains of influenza virus subtype A3 circulated in China.

**【Key words】** Influenza virus; Type A3; Vaccine strains; Epidemic strains; Difference

我国是世界上公认的流感多发地甚至发源地,其机理至今尚不清楚<sup>[1]</sup>。对于预防流感来讲,最可靠的方法是进行疫苗免疫接种。然而,由于流感病毒的易变性,流感疫苗株必须及时更替,为此,WHO 每年对全球 120 多个国家与地区流感网络实

验室上送的流感毒株进行分析研究,并推荐下一年度的疫苗株供世界各国使用。WHO 推荐的疫苗株是针对世界上大多数国家与地区的,而我国作为流感的多发地,疫苗株与实际流行株之间的符合性究竟如何,这直接影响到当时疫苗的免疫效果。流感病毒的血凝素(HA),是流感病毒表面的糖蛋白,具有诱导机体产生保护性中和抗体的作用,也是流感病毒发生抗原变异的分子基础,HA1 区域特别是 HA1 区抗原决定簇的氨基酸发生替换,均会引起流

基金项目:浙江省自然科学基金重点资助项目(Z303909)

作者单位:310009 杭州,浙江省疾病预防控制中心病毒研究所

通讯作者:卢亦愚,Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

感病毒抗原性的漂移与改变<sup>[2,3]</sup>,因此,我们收集 1988-2005 年间 WHO 推荐的北半球甲 3 亚型疫苗株以及中国和欧美国家的甲 3 亚型流感流行株,进行了 HA1 区域的差异比较与分析,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 样本来源:从 NCBI 的 GenBank 等基因库上选择 1988-2005 年间中国与欧美国家的甲 3 亚型流感病毒株 89 株,其中我国 41 株,国外 48 株,每年选取 2~3 株。2000 年与 2001 年在 GenBank 上无我国甲 3 亚型流感毒株的登录序列,因此应用了我国公开发表文章中报道的资料<sup>[4]</sup>,同时收集了 WHO 1988-2005 年间公布的北半球甲 3 亚型流感疫苗推荐株。对上述毒株下载其在 HA1 区域的氨基酸序列。

2. 序列比较:采用 BioEdit (Version 5.0) 软件对各类甲 3 亚型流感毒株的氨基酸序列进行分析处理。参照参考文献[1],分析 HA1 区的 5 个抗原决定簇区,其中 A 区为 140~146 与 133~137 位氨基酸,B 区为 156~160 与 187~198 位氨基酸,C 区为 52、53、54、275、277 和 278 位氨基酸,D 区为 207 与 174 位氨基酸,E 区为 63、78、81 与 83 位氨基酸。比较各毒株与 WHO 推荐的当年以及下一轮疫苗株之间,在流感病毒主要抗原部位 HA1 区域以及 HA1 区抗原决定簇的氨基酸差异状况。

3. 统计学分析:根据序列分析得到的资料构建数据库,采用 SPSS 11.0 统计软件分析,分别比较不同年代间中国、欧美国家的甲 3 亚型流感流行株与 WHO 推荐的当年及下一轮疫苗株的差异,并作显著性分析。

结 果

1. WHO 的甲 3(H3N2)亚型疫苗推荐株更替时 HA1 区的氨基酸差异:1988-2005 年间,WHO 共推荐了北半球的甲 3(H3N2)亚型疫苗株 12 株,其中有 8 株来自我国,在疫苗更替时,前后二轮疫苗株在 HA1 区域及 HA1 区抗原决定簇上的氨基酸差异见表 1。在 WHO 推荐的甲 3 亚型疫苗株更替中,HA1 区与 HA1 区抗原决定簇位点的氨基酸差异最大的是在莫斯科/10/99 与福建/411/02 之间,其差异数分别 17 个与 7 个;疫苗株更替中氨基酸差异最小的是四川/2/87 与上海/11/87 之间(来自我国同一年

内的分离株),差异数仅为 3 个与 1 个。1988-2005 年间 11 次疫苗更替中,HA1 区域氨基酸差异的平均数为 8.8 个,HA1 区抗原决定簇的氨基酸差异的平均数为 4.3 个。

表1 1988-2005 年间 WHO 的甲 3 亚型疫苗推荐株更替时的 HA1 区域比较

WHO 当时疫苗推荐株	WHO 下一轮疫苗推荐株	氨基酸差异数	抗原决定簇区氨基酸差异数
列宁格勒/360/86	四川/2/87	9	4
四川/2/87	上海/11/87	3	1
上海/11/87	贵州/54/89	9	3
贵州/54/89	北京/353/89	5	4
北京/353/89	北京/32/92	10	6
北京/32/92	山东/9/93	4	3
山东/9/93	约翰内斯堡/33/94	7	2
约翰内斯堡/33/94	武汉/359/95	13	5
武汉/359/95	悉尼/5/97	12	6
悉尼/5/97	莫斯科/10/99	8	5
莫斯科/10/99	福建/411/02	17	7
福建/411/02	加利福尼亚/7/04	8	5
平均差异数		8.8	4.3

2. 我国甲 3 亚型流感流行株与 WHO 推荐疫苗株在 HA1 区域的比较:从 1988-2005 年的 18 年间,我国每年甲 3 亚型流感流行株与 WHO 当时的疫苗推荐株相比,二者间在 HA1 区氨基酸的差异平均为 11.1 个,抗原决定簇区的氨基酸差异平均为 5.4 个;而甲 3 亚型流感流行株与 WHO 下一轮疫苗推荐株相比,二者间在 HA1 区的氨基酸差异平均为 6.2 个,抗原决定簇区氨基酸的差异平均为 2.8 个。显示在绝大多数年份(除 1995、2000 与 2004 年外)我国甲 3 亚型流感流行株与 WHO 当年疫苗推荐株之间在 HA1 区域的氨基酸差异,要大于我国流感流行株与 WHO 下一轮疫苗推荐株之间的氨基酸差异;在抗原决定簇的差异上,也有相同的现象(除 1990 年外)。从总体上分析,上述差异均已达到十分显著的程度( $P < 0.01$ )(表 2)。

3. 欧美国家甲 3 亚型流感流行株与 WHO 疫苗推荐株在 HA1 区域的比较:如表 3 所示,欧美国家甲 3 亚型流感流行株与 WHO 当时疫苗推荐株相比,二者间在 HA1 区的氨基酸差异平均为 9.3 个,抗原决定簇氨基酸的差异平均为 4.2 个;而与 WHO 下一轮疫苗推荐株相比,二者间在 HA1 区以及 HA1 区抗原决定簇上,氨基酸的差异平均分别为 8.2 个与 3.3 个。显示在大多数年份(除 1992、1997、2000、

2001、2002 和 2004 年外), 欧美国家的甲 3 亚型流感流行株与 WHO 当年疫苗推荐株之间在 HA1 区域的氨基酸差异也要大于它与 WHO 下一轮疫苗推荐株之间的氨基酸差异, 且 HA1 的抗原决定簇区在多数年份(除 1990、1992、1996、1997、2000 和 2004 年外)也有相同的现象。虽然从总体上看, 欧美国家的甲 3 亚型流感流行株与 WHO 当年疫苗推荐株之间的差异要稍大于它与 WHO 下一轮疫苗推荐株之间的差异, 但经 *t* 检验分析, 二者间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

4. 同一疫苗推荐株在不同使用年份与流感流行株的差异比较: WHO 推荐的甲 3 亚型疫苗株, 有的仅使用 1 年, 也有部分是使用 2-3 年以上的, 在这 2-3 年中, 使用的疫苗株固定不变, 而甲 3 亚型流感流行株一直处于变化状态, 这些疫苗株随着使用年数的增加, 它与流感流行株之间的差异见表 4(表中各年的差异都为平均数)。对疫苗使用 1-3 年间与流行株的差异分别求平均值得到, 上述 4 株疫苗株在我国使用的第一年, 第二年, 第三年与各年流行株氨基酸差异的平均值分别为 5.1、10.7 和 11.2; 在欧美国家使用的第一年, 第二年, 第三年与各年流行株氨基酸差异的平均值分别为 5.7、7.5 和 9.2。在使用年限内, 随着使用年数的增加, 无论在我国还是在欧美, WHO 的甲 3 亚型疫苗推荐株与流感流行株之间的氨基酸差异不断增大, 且我国的变异要大于欧美。

### 讨 论

流感疫苗对人体的免疫保护效果, 取决于所免疫疫苗株的抗原性是否与当时的流感流行株相匹配, 二者匹配程度越高, 效果就越好。然而, 一旦当疫苗株与流行株之间存在较大差异时, 无疑将会使流感疫苗的保护效果大大减弱。

WHO 依据全球流感监测网络, 掌握了全球流感流行的状况与流行趋势, 同时根据对各地流感流行毒株的分析, 推荐新一轮的流感疫苗株供各地使用<sup>[5,6]</sup>。基于我国近些年来发生流感暴发与大流行的均为甲 3 亚型毒株, 我们对甲 3 亚型流感的疫苗推荐株与流行株之间的差异进行了研究。从 1988-2005 年, WHO 共推荐了甲 3 亚型流感疫苗 12 株, 其中有 8 株来自我国, 说明我国使用的甲 3 亚型流感疫苗株中, 有 2/3 来自本土, 在我国已经有过流行。流感流行后, 感染者普遍会产生针对该流行株的相应抗体, 由于人群免疫压力的影响与流感病毒的易变性, 再次流行的毒株将会产生一定的变异, 也就是说, 当 WHO 推荐的疫苗株在我国使用时, 我国当时的实际流行株有可能已经出现了新的变异。

据报道, 作为一个具有代表性的流感病毒新变种要存在一定的抗原性差异; 同时, 在其 HA1 区要有 4 个以上的氨基酸发生变化, 且这些氨基酸的变化还必须涉及 2~3 个抗原决定簇(甲 3 亚型流感病毒的 HA1 区上有 5 个抗原决定簇)<sup>[7,8]</sup>。从近几年

表2 我国 1988-2005 年甲 3 亚型流感流行株与 WHO 疫苗推荐株的氨基酸差异

氨基酸区域	年 份																		
	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	平均
当时疫苗株																			
HA1 区	7.0	7.7	11.5	8.0	10.0	14.7	11.0	9.5	17.7	10.3	14.0	10.3	8.5	12.0	14.3	19.0	6.7	7.0	11.1
抗原决定簇区	2.0	3.7	5.0	7.0	7.0	8.7	4.0	4.5	8.7	5.7	8.0	4.0	4.0	5.0	5.0	8.0	3.7	4.0	5.4
下轮疫苗株																			
HA1 区	2.0	7.0	10.5	4.0	2.0	6.3	9.0	9.5	8.0	6.3	7.0	5.0	11.5	5.0	4.0	2.0	6.7	5.0	6.2
抗原决定簇区	1.0	2.7	6.0	4.0	1.0	3.0	3.0	2.5	5.3	3.0	3.0	1.7	3.3	2.0	2.0	1.0	3.3	3.0	2.8

注: 表中的差异值均为毒株间平均数

表3 欧美国家 1988-2005 年甲 3 型流感流行株与 WHO 疫苗推荐株的氨基酸差异

氨基酸区域	年 份																		
	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	平均
当时疫苗株																			
HA1 区	10.7	6.7	6.7	8.7	7.3	11.0	8.0	11.3	10.5	5.3	14.7	10.7	9.3	10.5	9.0	18.5	3.0	6.0	9.3
抗原决定簇区	3.7	2.7	2.0	6.3	4.3	7.0	2.5	5.0	3.0	2.3	8.3	3.7	3.3	4.0	4.0	11.0	1.0	3.0	4.2
下轮疫苗株																			
HA1 区	7.7	6.7	5.7	4.0	8.7	8.3	7.0	9.0	5.5	15.0	8.0	8.3	15.3	13.5	12.7	1.5	6.0	3.5	8.2
抗原决定簇区	1.7	2.3	3.0	2.7	5.0	4.7	1.5	3.0	4.0	7.3	3.7	3.0	4.7	4.0	3.7	0.0	3.5	2.0	3.3

注: 表中的差异值均为毒株间平均数

表4 4株WHO的甲3亚型疫苗推荐株在不同使用年份与当时流行株在HA1区的氨基酸差异

	使用时间 (年)	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
北京/353/89	3					
中国		4.0	10.0	14.7		
欧美		4.0	7.3	11.0		
约翰内斯堡/33/94	2					
中国		9.5	17.7			
欧美		9.0	10.5			
莫斯科/10/99	5					
中国		5.0	8.5	12.0	14.3	19.0
欧美		8.3	9.3	10.5	9.0	18.5
福建/411/02	3					
中国		2.0	6.7	7.0		
欧美		1.5	3.0	6.0		

甲3亚型流感毒株抗原性比较的资料来看,1998、1999、2002、2004年的甲3亚型流感流行株沪/1/98、浙江/6/99、广东/448/01及江西/424/04与当时推荐疫苗株之间的抗原比分别为16、2、4与4,也从血清学上证实了疫苗株与流行株之间存在的抗原性差异<sup>[9,10]</sup>。

由于我国缺少毒株之间系统的血清抗原比较资料,因此本次研究选择了流感病毒血凝素基因HA1区域作为研究的基础,以HA1区域及HA1区域抗原决定簇的氨基酸差异数作为标准进行比较与分析,结果显示我国甲3亚型流感流行株与WHO推荐的当年的疫苗株之间平均的差异,已超过了疫苗株更替时株间的平均差异;我国的甲3型流感流行株与WHO推荐的当年疫苗株以及下一轮疫苗株之间的差异,前者大,后者小,即我国的甲3亚型流感流行株与WHO推荐的下一轮疫苗株符合性较好,提示WHO推荐的甲3亚型流感疫苗株,在我国呈现出明显的滞后现象。

另一方面,甲3亚型流感疫苗株与欧美国家的流行株相比,虽然也有滞后趋势,但尚未达到显著水平( $P>0.05$ )。即从基因层面对WHO推荐的疫苗株进行分析表明,虽然甲3亚型疫苗株在中国和欧美国家都有滞后现象,但在我国,这种现象已经十分显著,甚至可能直接影响我国流感疫苗的使用效果,应该引起我们的关注。我国国土辽阔,人口众多,地

理环境复杂,又是新型流感的多发地,WHO不可能为我国制订专门的疫苗推荐株,因此,我国应该按照WHO的流感疫苗株更替原则,从我国实际情况出发,逐步推出自己的流感疫苗株。

此外,研究发现,WHO推荐的甲3亚型流感疫苗株,使用年数大约在1-5年,而随着使用年数的增加,流行株与疫苗株之间的氨基酸差异进一步增大( $P<0.05$ )。如甲3亚型疫苗株莫斯科/10/99株,在2003年时已使用4年,就我国而言,该疫苗株与当年流行株在HA1区域的氨基酸差异已达到19个,远远超过了疫苗更替时的氨基酸差异程度。也就是说,该疫苗的免疫保护效果随使用年份的增加而逐年降低,这表明WHO推荐的疫苗株,使用的年限不宜过长,必须及时进行更替。

#### 参 考 文 献

- 1 郭元吉,程小雯. 流行性感及其实验技术. 北京:中国三峡出版社,1997.16-24.
- 2 Bernardn. Fields Fundamental Virology (third edition) Lippincott Williams & Wilkins,1996.605-648.
- 3 金奇. 医学分子病毒学. 北京:科学出版社,2001.633-644.
- 4 张焯,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基因特性的研究. 中华实验和临床病毒学杂志,2004,18:16-19.
- 5 Andrea VP, Elsa GB, Ana MC, et al. Antigenic and genomic relation between human influenza A(H3N2) viruses circulating in Argentina during 1998 and the H3N2 vaccine component. Rev Panam Salud Publica,2001,4:246-253.
- 6 Robin MB, Walter MF, Catherine AB, et al. Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. Mol Biol Evol,1999,11:1457-1465.
- 7 Bush RM, Bender CA, Subbarao K, et al. Predicting the evolution of human influenza A. Science,1999,286:1921-1925.
- 8 朱汝南,钱渊,王芳,等. 北京市1998-2004年婴幼儿A3型流感病毒分离株HA1基因序列分析. 中华流行病学杂志,2006,27:241-244.
- 9 严菊英,周敏,卢亦愚,等. 浙江省近年来流感病毒株的抗原性及人群免疫状况分析. 中国公共卫生,2001,17:625-627.
- 10 舒跃龙,张焯,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. 中华实验与临床病毒学杂志,2005,19:362-365.

(收稿日期:2006-04-27)

(本文编辑:王多春)