

深圳市 2005 - 2007 年 H1N1 亚型流感病毒 HA1 基因分子流行病学研究

谷利妞 程小雯 张顺祥 何建凡 胡东生 吕星 吴春利 逯建华 房师松

【摘要】 目的 探讨 2005 - 2007 年深圳市 H1N1 流感病毒 HA1 基因变异特征。方法 选取深圳市 2005 - 2007 年分离的 H1N1 流感病毒株,提取病毒 RNA,用 RT-PCR 扩增 HA1 区基因片段,产物纯化后测序并进行基因序列分析。结果 2005 - 2007 年流感病毒分离率平均为 7.16%, H1N1 流感病毒在 2005 年和 2006 年的分离数占总分离数的比例分别为 56.14% 和 66.03%, 而 2007 年仅占 3.61%。核苷酸同源性和基因进化树结果一致, 2005 年 4 月份之前分离株与 A/New Caledonia/20/1999 为同一分支, 2005 年 5 月份之后的分离株与 A/Solomon Island/3/2006 为一支, 而 2006 - 2007 年分离株又与国家代表株 A/GDLH/219/2006 在一个分支。氨基酸序列分析显示, 绝大多数的毒株均在第 130 位点缺失一个赖氨酸; 2005 年 5 月以后的大部分毒株出现以下氨基酸变异: T82K、Y94H、R146K、R209K、T267N, 2006 年 5 月份之后的毒株在抗原决定簇 B 区发生了 A190T、H193Y、E195D 氨基酸变异, 同时也发生 A 区 R146K 的置换。但所有毒株的潜在糖基化和受体结合位点均比较保守。发现 1 株病毒 A/SZ/68/2007 具特殊性, 经与参照毒株比较, 其 326 个氨基酸中有 50 个发生变化, 其中有 11 个位于抗原决定簇位点, 6 个位于受体结合位点, 且有 4 个氨基酸变化导致糖基化位点丢失。结论 2005 - 2007 年深圳市人群中至少有 3 个类型 HA1 基因不同的 H1N1 流感病毒株; 由于氨基酸变异引起病毒发生抗原漂移, 其代表株为 A/GDLH/219/2006; 发现的 A/SZ/68/2007 病毒毒株具有特殊性, 其抗原特性和流行病学意义还有待探讨。

【关键词】 流感病毒; HA1 基因特性; 分子流行病学

Study on molecular epidemiological characteristics of influenza H1N1 viruses circulating in Shenzhen, China from 2005 to 2007 GU Li-niu*, CHENG Xiao-wen, ZHANG Shun-xiang, HE Jian-fan, HU Dong-sheng, LV Xing, WU Chun-li, LU Jian-hua, FANG Shi-song. *School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China
Corresponding author: ZHANG Shun-xiang. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China. Email: zhangsx@szcdc.net

【Abstract】 Objective To study the genetic and epidemiological characteristics of HA1 of influenza H1N1 viruses circulating in Shenzhen from 2005 to 2007. **Methods** The HA1 region was analyzed by RT-PCR and subsequently sequenced to analyze the HA1 genetic evolution. Phylogenetic analysis was confirmed on the homology of nucleotide comparing with the reference viruses of vaccines recommended by WHO and representative virus confirmed by China CDC. Relationship between isolation rates and genetic evolutions was explored. **Results** The average isolation rate from 2005 to 2007 was 7.16%. Of the isolates, the proportions of influenza H1N1 viruses in 2005, 2006 and 2007 were 56.14%, 66.03%, 3.61%, respectively. Data from HA1 phylogenetic analysis showed that there were at least three clades circulated in Shenzhen. Different viruses isolated during January to April were clustered with A/New Caledonia/20/1999 viruses isolated in the latter months of 2005 clustered with A/Solomon Island/3/2006 and viruses from 2006 to 2007 were in the same clade with A/GDLH/219/2006. Results showed that most viruses had a deletion of lysine at position 130. Compared with A/New Caledonia/20/1999, the virus isolated after May of 2005 occurred T82K, Y94H, R146K, R209K, T267N amino acid substitution, while some virus isolated after May 2006 took place the amino acid substitutions of A190T, H193Y, E195D (located at antigenic site B) and R146K (antigenic site A). The sequences at the receptor-binding sites and glycosylation sites were conserved. Compared with referring viruses, A/SZ/68/2007 had 50 amino acid substitutions in the

作者单位: 450001 郑州大学公共卫生学院(谷利妞、胡东生); 深圳市疾病预防控制中心(程小雯、张顺祥、何建凡、吕星、吴春利、逯建华、房师松)

通讯作者: 张顺祥, Email: zhangsx@szcdc.net

HA1 region. Of these, eleven and six were located at antigenic sites and receptor-binding sites, respectively. Four amino acid substitution resulted in the deletion of glycosylation site. **Conclusion** Three different genetic lineages of influenza H1N1 virus were circulated in the population in Shenzhen during 2005 - 2007. The special virus named A/SZ/68/2007 should be paid further attention on its antigenic and epidemiological characteristics.

[Key words] Influenza virus; HA1 genetic characteristics; Molecular epidemiology

甲型流感病毒血凝素(HA)蛋白在病毒的受体识别和复制中起重要作用,作为产生中和抗体的重要抗原,在流感病原学监测和疫苗选择中备受关注。HA 基因变异最快,尤其是抗原位点和受体结合位点所在的 HA 蛋白重链区(HA1)最为关键。因此,HA1 基因序列分析及其与人群流感流行关系的探讨,是 H1N1 亚型流感病毒基因特性研究的重点。甲型流感病毒主要有 H1N1 和 H3N2 两个亚型,其中 H1N1 为 1918 年世界流感大流行的毒株,至今仍在危害人群健康。深圳市是国家重要的流感监测点之一^[1-3]。本项研究对 2005 - 2007 年深圳市 H1N1 流感病毒株 HA1 基因进行序列测定和分析,以分子生物学技术与病原学监测相结合,探讨流感病毒可能的分子变异及其与人群流行的关系。

资料与方法

1. 毒株来源:所有毒株来源于深圳市流感监测网络 2005 - 2007 年 3 年的运行结果。该监测网络覆盖全市 6 个辖区 8 家市、区级监测医院;对各监测医院有关人员进行专业培训,全年“定时定点定量”开展监测工作:即每周每所监测医院采集流感样病例咽拭子标本 10 份以上(每月 40 份以上)并送往疾病预防控制中心(CDC)进行病毒分离。深圳市 CDC 每年两次对监测医院进行技术督导和质量考核,并定期小结和反馈全市监测结果,确保监测网络的运行质量。

2. 病毒分离及鉴定:流感样病例鼻咽拭子标本按常规方法同时接种狗肾传代细胞(MDCK 细胞)和 9~11 日龄鸡胚^[4]。对血凝实验阳性标本进行型别鉴定,鉴定用血凝抑制实验。标准诊断血清由国家流感中心提供。阳性毒株分装后保存于 -70℃。

3. HA1 片段的扩增和序列测定:

(1)病毒质粒 RNA 提取:采用 Roche 的 RNA 抽提试剂盒,具体操作见产品说明书。

(2)HA1 片段的扩增:将提取的 H1N1 流感病毒 RNA 逆转录合成 cDNA,后用 PCR 扩增。所用引物为 5'-GAT GCA GAC ACA ATA TGT ATA GG-3'; 3'-CTA CAG AGA CAT AAG CAT TT-5'。逆转录条件为:42℃ 1 h, 70℃ 15 min, 4℃。PCR 反应条件为:95℃ 2 min (94℃ 10 s, 51℃ 30 s, 72℃ 105 s) 34 个循环; 72℃ 5 min, 4℃。PCR 扩增产物送宝生物(大连)有限公司进行产物纯化并测序。实验所用引物、逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq DNA 聚合酶均购自宝生物(大连)有限公司。

4. 核苷酸序列比对和种系发生树分析:用 SIMMONIC 和 DNASTAR 软件对测序结果进行分析,同时与 WHO 推荐的 2005 - 2006 年度 H1N1 亚型流感病毒疫苗株 A/New Caledonia/20/1999、2007 - 2008 年度疫苗株 A/Solomon Island/3/2006 及 2007 年国内代表株 A/GuangDongLuoHu/219/2006(A/GDLH/219/2006)作为参照毒株,进行 HA1 区序列和种系进化分析。其中疫苗株 A/New Caledonia/20/1999 和 A/Solomon Island/3/2006 的 HA1 序列来自 FLU 网,收录号分别为:AJ344014、EU100724。

结 果

1. 流感病毒分离鉴定:由表 1 可见,2005 - 2007 年平均分离率为 7.16%, 2007 年分离率最高为 11.74%。从 H1N1、H3N2 和 B 型流感病毒所占比例看,尽管 3 年合计构成比接近,但 2005 和 2006 年 H1N1 亚型流感病毒占比例分别为 56.14% 和

表1 2005 - 2007 年深圳市流感病毒分离鉴定结果

年份	检测份数	阳性		H1N1 亚型		H3N2 亚型		B 型	
		株数	率(%)	株数	构成(%)	株数	构成(%)	株数	构成(%)
2005	2385	114	4.78	64	56.14	28	25.46	22	19.30
2006	2888	156	5.40	103	66.03	3	1.92	50	32.05
2007	2343	275	11.74	12	3.61	213	64.16	107	32.23
合计	7616	545	7.16	179	32.85	244	44.77	179	32.84

66.03%, 远高于其他两个型别。而 2007 年分离到的 H1N1 亚型毒株仅占 3.61%, 远低于前两年所占比例。

为了解流感病毒流行的分子基础, 随机选取深圳市流感监测网络分离的 H1N1 亚型流感病毒 2005 年 15 株、2006 年 10 株、2007 年 12 株, 共 37 株进行基因序列分析。

2. H1N1 亚型流感病毒 HA1 基因进化树: 由图 1 可见, 除 A/SZ/68/2007 外, 2005 - 2007 年深圳市 H1N1 亚型毒株基本是按时间顺序逐步演化发展, 可分为分支 I 和 II; 从 A/SZ/30/2005 到 A/SZ/2/2005 共 7 株毒株(主要是 2005 年 4 月份之前的毒株)与 A/New Caledonia/20/1999 一起, 形成了 I 分支。II 分支又可分为 II a、II b, 其中 II a 分支与疫苗株 A/Solomon Island/3/2006 同在一起, 包括 A/SZ/10/2005 到 A/SZ/48/2005 的 9 株 H1N1 流感病毒, 主要是 2005 年 5 月份以后分离得到。从 A/SZ/31/2006 到 A/SZ/107/2007 共 20 株 H1N1 流感病毒, 均由 2006 - 2007 年分离得到, 形成 II b 分支, 与国家推荐的 2006 年代表株 A/GDLH/219/2006 (为深圳市 CDC 上送国家流感中心的毒株) 同为一个分支。由图 1 可见, A/SZ/68/2007 虽然为 2007 年分离得到, 但在 HA1 基因进化树中另立一支, 值得引起重视。

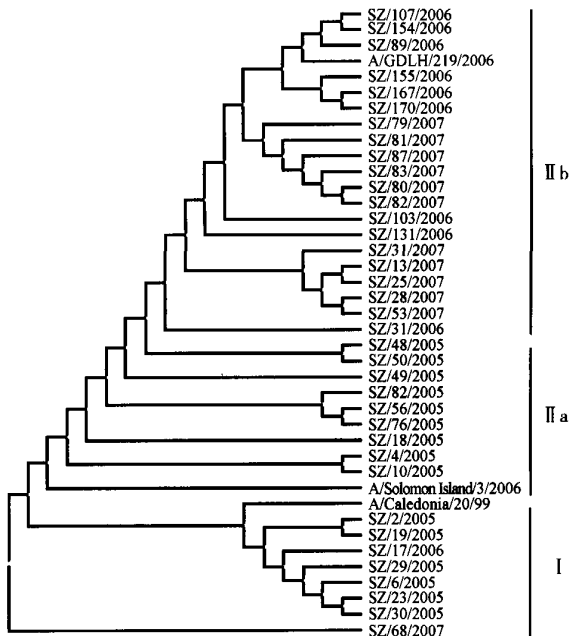


图1 2005 - 2007 年深圳市 H1N1 亚型流感病毒 HA1 区基因进化树

3. H1N1 亚型流感病毒 HA1 基因同源性比较:

对 37 株 H1N1 亚型流感病毒 HA1 基因与 3 株参照株进行核苷酸同源性比较发现, 2005 年 H1N1 流感病毒与 A/New Caledonia/20/1999 的同源性最高, 为 97.1% ~ 98.4%, 2006 - 2007 年的分离株与 A/GDLH/219/2006 的同源性较高, 分别为 97.2% ~ 99.9% 和 98.3% ~ 99.9%, 与分子进化树结果一致。

4. H1N1 亚型流感病毒 HA1 区氨基酸变异:

(1) HA1 区编码氨基酸长度: 所测定 37 株毒株 HA1 蛋白 N 端均含 17 个氨基酸长度的信号肽。其中 36 株毒株 HA1 区编码长度为 325 个氨基酸, 而另一毒株 (A/SZ/68/2007) 的 HA1 区含 326 个氨基酸。测序结果显示: 与疫苗株比较, A/SZ/68/2007 在 130 位点 (加上信号肽序列为 147 位点) 没有丢失赖氨酸 K, 其他 36 株毒株均在该位点丢失一个赖氨酸。

(2) 抗原决定簇位点的变异: 由表 2 可见, 与 A/New Caledonia/20/1999 比较, 2005 年 4 月份之前的毒株 (即序号为 2, 6, 19, 23, 29, 30, 17, 均位于 I 分支) 在以下氨基酸位点发生变化 (表 2), 即 Y253F, V315A; 而其余 35 株毒株 (除 A/SZ/68/2007 外), 在下列位点均发生变化: T82K, Y94H, R146K, R209K, T267N, 这些变化与 WHO 推荐疫苗株 A/Solomon Island/3/2006 及国内代表株 A/GDLH/219/2006 相同。上述 5 个位点第 146 位点位于抗原决定簇 A 区。II b 分支中有 12 株病毒发生了以下氨基酸置换: A190T, H193Y, E195D, 且均位于抗原决定簇 B 区; 相同的变异见于国内代表株 A/GDLH/219/2006。

氨基酸位点变化是随着时间发展而逐步变化, T82K, Y94H, R146K, R209K, T267N 位点的变化在 2005 年 1 月发现 2 株、3 月发现 1 株, 5 月份之后的毒株均发生了上述位点的变化, 且该部分毒株在流行上占优势; 进入 2006 年 5 月, 除 A/SZ/131/2006 毒株外, 其他 6 株毒株均发生 A190T, H193Y, E195D 氨基酸置换, 2006 年这 6 株毒株发生的 4 个氨基酸变化位点分别涉及抗原决定簇 A、B 两区。

与 A/New Caledonia/20/1999 比较, 病毒株 A/SZ/68/2007 的氨基酸变异位点较多, 326 个氨基酸中有 50 个发生了变化; 其中有 11 个氨基酸替换位于抗原决定簇位点、6 个位于受体结合位点, 且有 4 个位点由于氨基酸替换导致糖基化位点丢失。

(3) HA1 潜在糖基化位点和受体结合位点的变异: 与 A/New Caledonia/20/1999 比较, 7 个潜在糖基

表2 2005-2007 年深圳市 H1N1 亚型流感病毒 HA1 区氨基酸位点变异

毒株(采样时间)	氨基酸位点												
	82	94	128	146	187	189	190	193	195	209	253	267	315
A/New Caledonia/20/1999	T	Y	V	R	N	R	A	H	E	R	Y	T	V
A/Solomon Island/3/2006	K	H	T	K	D	K	.	N	.
A/GDLH/219/2006	K	H	T	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/4/2005 (2005-3)	K	H	V	K	D	K	.	N	.
SZ/2/2005 (2005-1)	F	.	A
SZ/6/2005 (2005-2)	D	F	.	A
SZ/19/2005 (2005-4)	F	.	A
SZ/23/2005 (2005-3)	D	F	.	A
SZ/29/2005 (2005-4)	D	F	.	A
SZ/30/2005 (2005-4)	D	F	.	A
SZ/17/2006 (2006-1)	.	.	.	K	F	.	A
SZ/10/2005 (2005-1)	K	H	.	K	D	K	.	N	.
SZ/18/2005 (2005-1)	K	H	.	K	D	K	.	N	.
SZ/48/2005 (2005-5)	K	H	.	K	D	K	.	N	.
SZ/49/2005 (2005-6)	K	H	.	K	V	K	.	N	.
SZ/50/2005 (2005-6)	K	H	.	K	K	.	N	.
SZ/56/2005 (2005-8)	K	H	.	K	K	.	N	.
SZ/76/2005 (2005-7)	K	H	.	K	K	.	N	.
SZ/82/2005 (2005-8)	K	H	.	K	D	K	.	N	.
SZ/31/2006 (2006-3)	K	H	.	K	K	.	N	.
SZ/103/2006 (2006-4)	K	H	I	K	.	.	T	.	.	K	.	N	.
SZ/131/2006 (2006-5)	K	H	.	K	.	K	.	.	.	K	.	N	.
SZ/89/2006 (2006-5)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/107/2006 (2006-5)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/154/2006 (2006-6)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/155/2006 (2006-6)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/167/2006 (2006-6)	K	H	I	K	D	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/170/2006 (2006-6)	K	H	I	K	D	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/13/2007 (2007-3)	K	H	.	K	.	M	T	.	.	K	.	N	.
SZ/25/2007 (2007-2)	K	H	.	K	D	M	T	.	.	K	.	N	.
SZ/28/2007 (2006-3)	K	H	.	K	D	S	T	.	.	K	.	N	.
SZ/31/2007 (2007-3)	K	H	.	K	D	M	T	.	.	K	.	N	.
SZ/53/2007 (2007-4)	K	H	.	K	D	S	T	.	.	K	.	N	.
SZ/68/2007 (2007-3)	.	D	T	K	E	Q	.	Q	.	K	.	.	.
SZ/79/2007 (2007-2)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/80/2007 (2007-4)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/81/2007 (2007-3)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/82/2007 (2007-4)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/83/2007 (2007-4)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.
SZ/87/2007 (2007-3)	K	H	I	K	.	.	T	Y	D	K	.	N	.

化位点(第 10、11、54、87、125、160 和 287 位点)中,除 A/SZ/68/2007 病毒株外,其余病毒均未见氨基酸置换,受体结合位点的氨基酸变异也很少,均较保守。

讨 论

本研究发现,2005-2007 年深圳市人群中 H1N1 流感病毒所占比例出现变化,2005 年和 2006 年分别为 56.14% 和 66.03%,而 2007 年仅占

3.61%,提示 H1N1 流感病毒在不同时期所占优势有所不同。本研究进一步从基因、氨基酸水平的变异来解释这一现象。由核苷酸同源性和基因进化树分析发现,2005-2007 年深圳市至少存在三种类型 HA1 基因不同的毒株,位于相应的基因进化树分支上。即 2005 年 4 月份之前分离株与 A/New Caledonia/20/1999 同归第一分支,而 2005 年 5 月份之后的分离株与 A/Solomon Island/3/2006 属另一支,说明同年不同时期分离到的 H1N1 亚型流感病

毒的基因特性已经发生了变化;而2006-2007年分离株又属一支,与国家代表株 A/GDLH/219/2006 同源性和基因发生树接近;A/GDLH/219/2006 是由中国 CDC 流感中心研究确定,说明2006-2007年深圳市 H1N1 病毒株的变化具有特殊性和代表性,不仅与同期 WHO 推荐的疫苗株在基因水平上已经出现变化和区别,而且提示深圳市流感监测结果对我国流感预防控制具有重要意义。这与程小雯等^[1]对深圳市1995-1997年 H1N1 毒株研究结论相似。

研究发现,氨基酸位点是随着时间的发展逐步变化的,与 A/New Caledonia/20/1999 相比,2005年5月以后的大部分毒株在 82、94、146、187、209、267 位点出现氨基酸变异;随着时间的发展,2006年5月份以后的7株毒株有6株开始在 128、190、193、195 位点出现氨基酸变化,2年的结果均显示毒株位点氨基酸开始变化一般在5月份。张静等^[5]分析全国的监测结果发现暴发疫情毒株类型发生改变一般在6月份,我们的研究从分子水平上解释了这一现象。由于深圳市地处亚热带,流感病毒的变异更会早期被发现,与最近越南的研究结果报道相一致^[6]。徐翠玲等^[7]的研究报道,虽然2004-2005年我国分离的毒株与同期疫苗株(A/New Caledonia/20/1999)类似,已注意到2005年分离株已经开始多位点变异最早始于2005年9月,其原因可能与研究分析中毒株的来源及样本量的大小等因素有关。

研究还发现,变异氨基酸位点中146位点位于抗原决定簇A区,190、193、195位点位于抗原决定簇B区,根据目前已知的研究结论,H1N1亚型流感病毒HA1上必须有4个以上的氨基酸发生替换,而且替换必须涉及2~3个抗原决定簇时,一般才能形成有代表性的新变种^[3,5];本研究发现2006年7株毒株中有6株在2个抗原决定簇部位发生4个氨基酸突变位点置换,且与A/GDLH/219/2006相一致,表明深圳市H1N1病毒在2006年确实发生了有意义的变化,某种程度上也使得2006年H1N1亚型流感病毒的活动强度继续增强,同时也说明H1N1流感病毒的变异速度是相当快的。

对2005-2007年深圳市H1N1的HA1区氨基

酸序列分析结果显示,绝大多数毒株均在第130位点缺失一个赖氨酸。郭元吉等^[2]一直对该缺失给予关注,发现自1995年以来在我国同时流行着两种HA基因特性不同的H1N1亚型流感病毒:一种与1995年以前所分离到的H1N1病毒相比较,其HA1区蛋白分子上没有任何氨基酸的丢失,另一种在130位(加上信号肽序列为147位)丢失一个赖氨酸K。美国学者新近报道^[3],K134缺失与病毒抗原性变异、与神经氨酸表面糖蛋白的适配确实有关。值得指出,本研究发现的A/SZ/68/2007毒株氨基酸序列第130位点却没有缺失赖氨酸K;但是氨基酸位点中有50个发生了变化,其中有11个位于抗原决定簇,在54、87、125、160位点均由于氨基酸变异而导致糖基化位点丢失;而该病毒株在人群中并没有引起暴发和流行,追踪观察也没有发现该毒株成为病原学的优势毒株,其来源、抗原特性和流行病学意义还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 程小雯,李良成,何建凡. 深圳地区甲1(H1N1)亚型流感病毒基因特性的研究. 中华实验和临床病毒学杂志,1999,13(4):340-344.
- [2] 郭元吉,董婕,王敏,等. 甲1(H1N1)亚型流感病毒相变异分子生物学基础的研究. 中华实验和临床病毒学杂志,2000,14(1):9-13.
- [3] McDonald NJ, Smith CB, Cox NJ. Antigenic drift in the evolution of H1N1 influenza A viruses resulting from deletion of a single amino acid in the haemagglutinin gene. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 12): 3209-3213.
- [4] 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.
- [5] 张静,杨维中,郭元吉,等. 中国2001-2003年流行性感冒流行特征分析. 中华流行病学杂志,2004,25(6):462-463.
- [6] Li D, Saito R, Le MT, et al. Genetic analysis of influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses circulating in Vietnam from 2001 to 2006. J Clin Microbiol, 2008, 46(2):399-405.
- [7] 徐翠玲,向妮娟,张焯,等. 2004-2005年中国A(H1N1)亚型流感病毒抗原性及基因特性研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(2):27-29.

(收稿日期:2008-01-09)

(本文编辑:张林东)