

中国滇西北地区分离流行性乙型脑炎病毒的分子特征研究

孙肖红 王环宇 潘晓玲 付士红 冯云 孟维珊 梁国栋

【摘要】 目的 对中国滇西北地区分离的流行性乙型脑炎(乙脑)病毒进行分子特征研究,了解与云南省内其他地区病毒株的差异。方法 用 RT-PCR 的方法扩增滇西北地区分离的 13 株乙脑病毒 *PrM*、*E* 片段和 3' 非编码区,对扩增产物进行序列测定。用 Clustal 1.8X、DNASTAR、GENEDOC 等生物学软件进行核苷酸序列和系统进化分析。结果 基于 *PrM* 和 *E* 基因核苷酸序列的系统进化显示,滇西北分离的 13 株乙脑病毒中有 12 株属于基因 I 型,1 株为基因 III 型;12 株基因 I 型乙脑病毒与云南省其他地区分离的病毒株处于不同分支;和云南省其他地区分离株之间 *E* 基因核苷酸序列差异度为 0.2%~13.9%;3' 非编码区存在两种核苷酸缺失情况,基因 I 型毒株在终止密码子后出现 3 处缺失,而基因 III 型毒株只有 1 处缺失。结论 滇西北地区乙脑病毒分离株以基因 I 型为主,*E* 基因核苷酸序列与云南省其他地区分离株差异不明显;基因 I 型毒株在 3' 非编码区存在 3 处缺失,而基因 III 型毒株只有 1 处缺失。

【关键词】 流行性乙型脑炎病毒;分子特征;基因分型

Analysis on the molecular characteristics of Japanese encephalitis virus isolated in Northwestern Yunnan province SUN Xiao-hong, WANG Huan-yu, PAN Xiao-ling, FU Shi-hong, FENG Yun, MENG Wei-shan, LIANG Guo-dong. Institute for Viral Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 100052, China

Corresponding author: LIANG Guo-dong, Email: gdliang@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the molecular characteristics of Japanese encephalitis virus (JEV) isolated in Northwestern Yunnan province, and to clarify the differences between the strains isolated in Northwestern and other parts of Yunnan province. **Methods** *PrM*, *E* and 3' untranslated region nucleotide acid sequences of the isolates were amplified by RT-PCR and then sequenced. Sequence alignment and phylogenetic analysis were performed by using Clustal 1.8X, DNASTAR, GENEDOC and Mega 3.1 programs. **Results** 12 of the 13 isolates of JEV obtained in Northwestern Yunnan were identified as genotype I, only one strain was genotype III of JEV. The 12 strains of genotype I were clustered in different branches with other isolates obtained in other parts of Yunnan province. Data from sequence analysis on *E* gene found that the nucleotide identity was 0.2%–13.9% between the Northwestern isolates and other Yunnan strains. There were two kinds of nucleotides deletion patterns at 3' untranslated region with three and one deletions was found after termination codon in genotype I and III isolates, respectively. **Conclusion** There were two genotypes of I and III in 13 strains of JEV in this study and genotype I isolates were predominant (12/13). There were no apparent differences in *E* gene sequence between isolates obtained in the Northwestern and other parts of Yunnan. Three deletions were found in 3' untranslated region in genotypes I isolates and one deletion was in genotypes III.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Molecular characteristics; Genotype

流行性乙型脑炎(乙脑)主要在亚洲流行^[1],我国的发病数占世界总发病数的 80%以上^[2]。我国除新疆、西藏和青海三个省、自治区以外,其他省份均

有不同程度的乙脑流行。云南省属于乙脑高发地区^[3],从中缅边境到金沙江沿岸的 112 个县(市)均有分布^[4]。有关云南省乙脑病毒的流行、媒介、基因分型等研究时有报道^[5-9],但是这些研究内容都不包括云南省西北部(滇西北)的病毒株。为明确滇西北乙脑病毒与云南省其他地区病毒株在分子水平的关系,本研究对 2005、2006 年 13 株滇西北乙脑病毒的分子特征进行研究。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.06.017

基金项目:科技部重大传染病专项(2003BA712A08-01);中美合作项目(U19-GH000004)

作者单位:100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

通信作者:梁国栋,Email:gdliang@hotmail.com

材料与方法

1. 病毒株: 本实验室保存的 2005、2006 年从滇西北地区三带喙库蚊和杂蚊中分离的 13 株乙脑病毒, 在生物安全 2 级实验室 (BSL-2) 内将保存的病毒打开, 取 250 μl 接种于 25 cm × 25 cm 培养瓶的单层 BHK21 细胞, 37℃ 吸附 1 h 后弃去病毒液, 加 6 ml 含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续 37℃ 培养, 每天观察细胞病变情况。

2. 乙脑病毒基因的扩增: 用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA 提取试剂盒从病变 BHK21 细胞上清液中提取病毒 RNA, 按说明书操作; 用美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司的 Amersham Bioscience Ready-to-Go™ You First-Strand Beads 和随机六聚体引物制备 cDNA, 分别用乙脑病毒 *PrM* 片段、*E* 片段^[10] 和 3' 非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 引物扩增 (表 1)。20 μl PCR 体系中含有 cDNA 2 μl, 10 × PCR buffer 2 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μl, rTaq 酶 0.3 μl, 无菌双蒸水 12.7 μl。回收 PCR 产物直接测序。

3. 序列分析: 参考 GenBank 中我国及其他国家的乙脑病毒株 *PrM*、*E*、3' UTR 片段核苷酸序列, 利用 Clustal 1.8X、GENEDOC 软件进行序列比对, 用 Mega 3.1 软件绘制系统发生树 (Neighbor-Joining 法)。

结果

1. 基因扩增和序列分析: 用乙脑病毒 *PrM* 片段引物扩增得到 13 株乙脑病毒的相应产物, 长度为 600 ~ 700 bp。序列测定显示, 该段基因位于病毒基因第 251 ~ 925 位, 长 674 bp, 未发现核苷酸插入或缺失等。*E* 基因扩增产物位于乙脑病毒基因第 955 ~ 2536 位, 长 1581 bp。13 株病毒在该区域均无核苷酸插入或缺失。

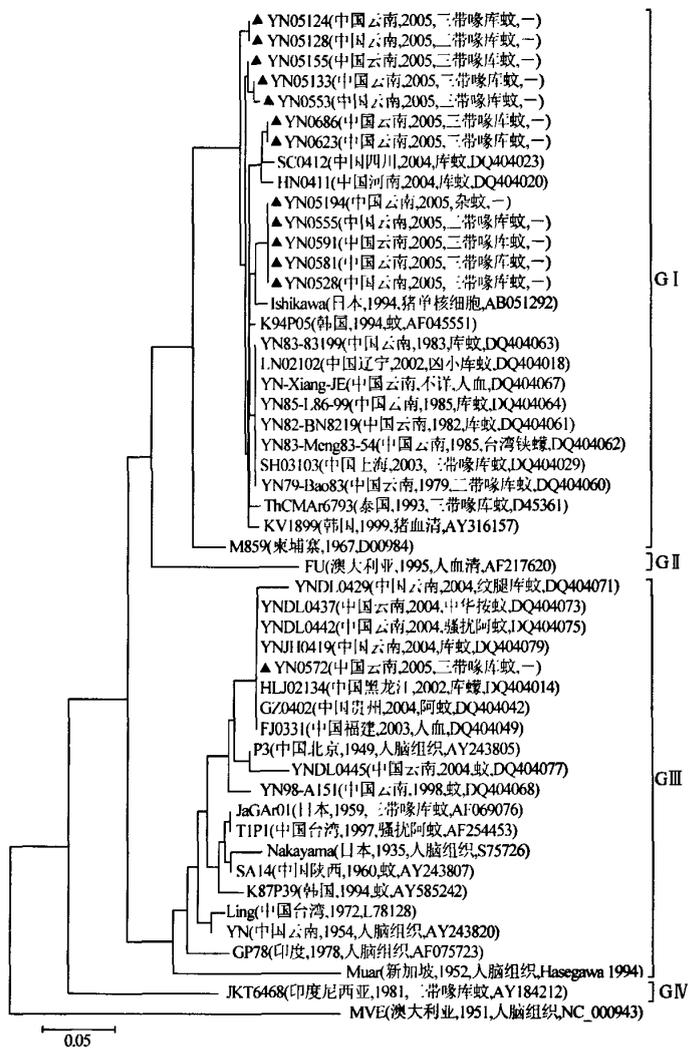
2. 基因分型: 将 13 个乙脑病毒株的 *PrM* 片段和 *E* 基因片段的 PCR 产物直接测序, 与来源于 GenBank 中不同国家、不同年代、不同宿主、不同基因型别的 39 株乙脑病毒进行基因分型。结果显示, 基于 *PrM* 片段序列的基因分型将所有的乙脑

表 1 研究所用引物序列

引物	序列 (5' ~ 3')	目的基因	扩增长度 (bp)
JE-PrM-F	CGTTCCTCAAGTTTACAGCAATGAC	<i>PrM</i>	674
JE-PrM-R	CCYRTGTTYCTGCCAAGCATCCAMCC		
JE-955F	TGYTGGTCGCTCCGGCTTA	<i>E</i>	1581
JE-2536R	AAGATGCCACTTCCACAYCTC		
JE-3-10141F	TGGATTGAAGAAAATGAATGGATG	3' UTR	645
JE-3-10786R	TGTTATTGTTTCCACGGGGTCT		
JE-1-9727F	CATTCCTCAACGCAATGTC	3' UTR	1051
JE-1-10778R	CCGCATAATGTTGTTTCCAC		

注: F: 正向引物; R: 反向引物; Y = T/C; R = A/G; M = A/C

病毒分布在 I、II、III、IV 4 个基因型别中 (图 1), 滇西北的 13 株分布在基因 I、III 2 个型别中, 其中 12 株属于基因 I 型, 1 株 (YN0572) 属于基因 III 型。



注: ▲滇西北分离乙脑病毒

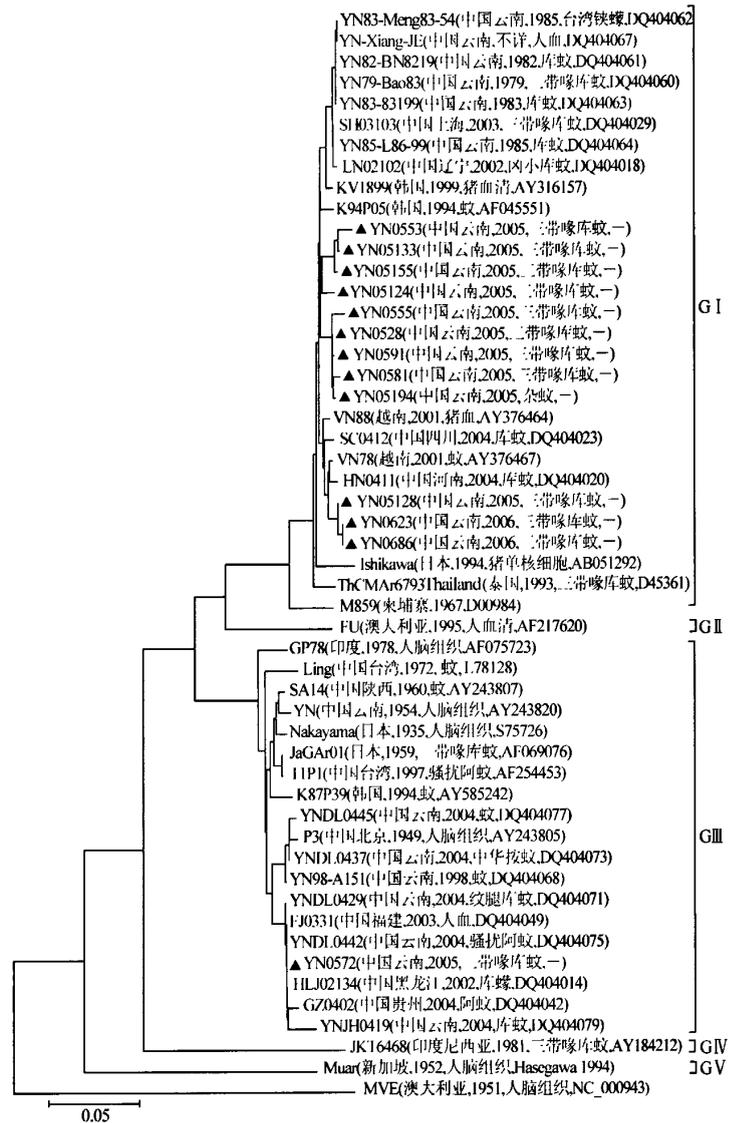
图 1 以 *PrM* 片段为基础的系统进化分析

基于 *E* 基因序列的分型显示所有的乙脑病毒分布在 I、II、III、IV、V 5 个基因型别中(图 2), 其中在用 *PrM* 基因区段分析中属于基因 III 型的新加坡分离株(Muar)分离出来形成独立的基因 V 型。滇西北的 13 株乙脑分离株有 12 株属于基因 I 型, 还有 1 株 YN0572 属于基因 III 型, 与基于 *PrM* 区段的分型结果一致。

3. 滇西北分离乙脑病毒系统进化分析: 图 2 显示包括滇西北分离株在内的 52 株乙脑病毒 *E* 基因系统进化分析。在基因 I 型病毒中, 滇西北分离的 12 株处于二个分支, 其中 3 株(YN05128、YN0623、YN0686)与我国河南(HN0411)、四川(SC0412), 以及越南分离株(VN78、VN88)共处一个分支, 其他 9 株分布于一个分支, 而云南省其他地区分离自蚊、蠓、患者血清的乙脑病毒(YN83-83199、YN79-Bao83 等 6 株)则处于另一不同的分支上, 说明滇西北分离株和这些 20 世纪 80 年代不同来源的分离株在进化上存在一定距离。基因 III 型病毒中, 滇西北分离的 1 株(YN0572)和 2004 年云南大理(YNDL0442、YNDL0429)、景洪(YNJH0419)分离株处于一支。

4. *E* 基因核苷酸序列差异分析: 以疫苗株 SA14-14-2 为参照, 分析 13 株滇西北分离株和云南省其他地区病毒株之间 *E* 基因 1500 nt 序列同源性。结果: ①分离自不同蚊种的病毒株差异: 滇西北地区分离自杂蚊的 YN05194 和三带喙库蚊的 YN0528 之间差异仅为 0.2%, 而滇西北地区分离自三带喙库蚊的 YN0533 与从云南大理中华按蚊中分离的 YNDL0437 之间差异度则为 13.9%; ②不同来源病毒株间差异: 分离自蚊虫的 YN0533 和分离自人血的 YN-Xiang-JE, 以及和分离自台湾铗蠓的 YN83-Meng83-54 之间的差异度均仅为 2.8%; ③不同年代分离株之间的差异: 最小差异度为 1979 年的分离株 YN79-Bao83 和 2005 年滇西北地区病毒株 YN0553 之间(1.6% ~ 2.7%)。

5. 3' UTR 序列分析: 用针对 I 型(JE-1-9727F



注: ▲滇西北分离乙脑病毒

图 2 以 *E* 片段为基础的系统进化分析

和 JE-1-10778R) 和 III 型(JE-3-10141F 和 JE-3-10786R) 乙脑病毒 3' UTR 区段的引物分别扩增滇西北地区乙脑病毒基因, 目的片段长度分别为 1051 bp 和 645 bp。

以疫苗株 SA14-14-2 为参照, 将 13 个滇西北地区分离株与国内外其他病毒株的 3' UTR 序列进行比对, 在终止密码子 TAG 之后, 滇西北地区的 12 个基因 I 型分离株存在 11 个核苷酸缺失, 4 个核苷酸之后又有 2 个缺失, 在 36 个核苷酸之后出现 2 个缺失(图 3, 虚线框内)。这种缺失规律与我国四川分离株(SC0425)、河南分离株(HN0440), 以及韩国(JEV/sw/Mie)、日本(Kagawa27)病毒株一致。滇西北地区基因 III 型病毒株 YN0572 则没有这三处缺失(图 3, 实线框内), 而是在 TAG 后 40 个核苷酸处出

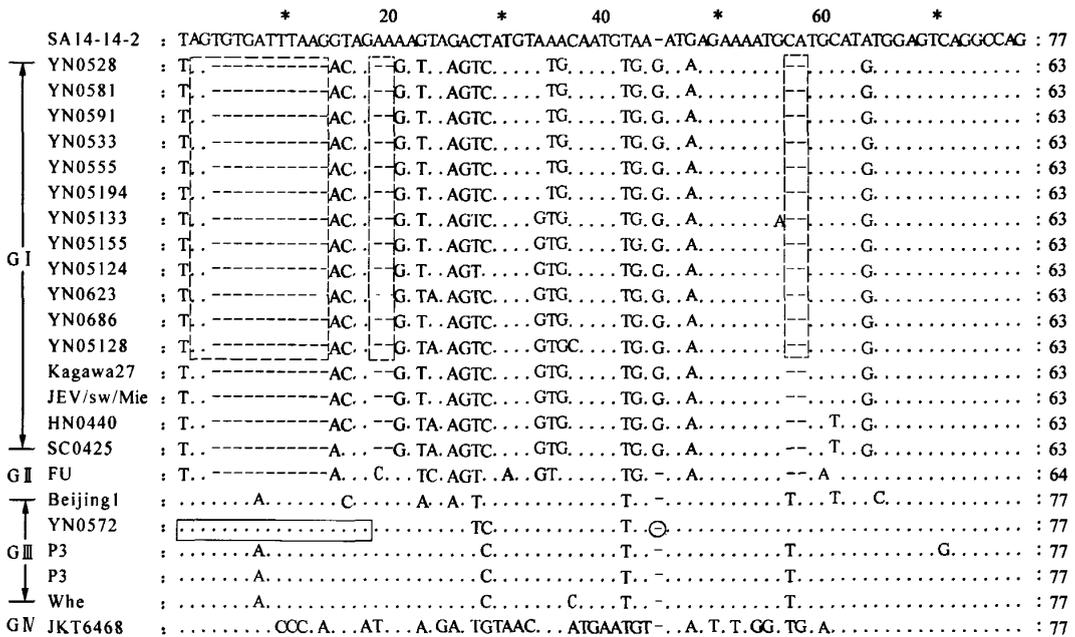


图3 我国滇西北地区乙脑病毒分离株3' UTR核苷酸序列比较

现了1个核苷酸缺失(图3,圆圈内)。

讨 论

乙脑是我国存在流行的四种虫媒病毒病之一,也是云南省分布广、发病多、危害大的一种疾病^[6]。多年来从云南省蚊虫、蝙蝠、鸟类标本中分离鉴定了几十株乙脑病毒^[6,7,11,12],也对分离株进行了基因型别等研究^[9],但均缺乏对滇西北地区分离株的研究。

对于乙脑病毒的基因分型,早期采用Chen等^[13,14]建立的方法,因为乙脑病毒基因组中第456~695位属于PrM区段的240个核苷酸所受的进化压力较小,可以反映乙脑病毒的自然进化状况,所以该方法选择以这240个核苷酸作为基因分型的基础,将乙脑病毒分为基因I~IV 4个型别。此后为了避免用较短的核苷酸序列进行生物进化分析可能导致的结果不准确,印度学者提出用乙脑病毒E基因作为基因分型的基础,这种方法分型的结果使得乙脑病毒株的分布更具有地域特征,因此被广泛接受并使用^[15,16],为此用该方法乙脑病毒分为I~V 5个型。本研究发现两种方法的分析结果相同,12株为基因I型,1株为基因III型,说明滇西北地区分离的13株乙脑病毒基因分型不受分析方法的影响,计算结果相同。

用PrM和E基因序列对滇西北地区分离乙脑病毒进行基因分型发现,大部分分离株属于基因I型,13株中只有1株属于基因III型,说明该地区同时存

在基因I、III型乙脑病毒流行,其中基因I型病毒株占绝对优势。

关于我国1949—2005年间乙脑病毒分离株基因型别的分布和变化,文献[9,10]系统分析认为,1977年以前均为基因III型,2001年以后则为基因I、III型混杂。本研究中2005、2006年滇西北地区分离的13株乙脑病毒中,只有1株属于基因III型,基因I型病毒株占绝对优势(12/13),而2004年在大理和西双版纳地区分离的12株乙脑病毒则全部是基因III型^[8],显示滇西北地区乙脑病毒的基因型有明显的地域性。由于缺乏滇西北地区乙脑病毒的历史资料,现在无法判断该地区乙脑病毒基因型的流行、变化趋势。但有研究报道证实,从20世纪80年代至今,泰国乙脑病毒发生了基因型的转换过程。基因III型病毒原来主要流行于泰国北部,之后从北向南逐渐表现为I型和III型混合流行,到2005年泰国只存在I型病毒,在近30年间发生了从III型到I型的转变^[17]。这种转变过程是否也发生在云南省,还需要有更多调查结果证明。

E基因是乙脑病毒的毒力相关基因^[18],通过比较滇西北地区分离株和云南省其他地区分离株E基因核苷酸序列,发现不同来源、不同年代分离株间的差异不明显,差异度只在1.6%~2.8%之间;分离自不同蚊种的病毒株间的差异与地区有关,同一地区病毒株间差异较小,而滇西北分离株与省内其他地区病毒株间的差异则较大,与先前的研究结果

一致^[9]。由于目前乙脑病毒的基因分型多以 *E* 基因序列为基础,因此,这种和分离地区有关的 *E* 基因差异也从另一方面反映了乙脑病毒基因型别分布的地域性。

近年研究发现,乙脑病毒 3' *UTR* 的开放读码框下游存在一段高变区,有些病毒株在该区段内存在插入或缺失^[19-21]。对滇西北地区乙脑病毒株该区域序列分析发现,12 个基因 I 型分离株和 1 个基因 III 型分离株的核苷酸缺失情况不同,具有明显的基因型别特异性,同一基因型别的病毒株缺失情况相同。目前认为,存在于乙脑病毒 3' *UTR* 的不同模式的核苷酸缺失可能与病毒 RNA 复制效率有关,由此可用于不同病毒株之间遗传关系的分析^[22]。

滇西北地区处青藏高原南延部分,与缅甸及我国西藏、四川省交界,乙脑病毒的流行情况直接影响其临近地区和国家,历年来缺乏乙脑病毒研究资料,本研究是首次对滇西北地区乙脑病毒分离株进行的分子特征研究,为全面了解云南省乙脑病毒的分布和流行提供了基础数据。

参 考 文 献

- [1] 连文远. 计划免疫学. 2 版, 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001.
- [2] Rey FA, Heinz FX, Man C, et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 1995, 375:291-298.
- [3] 梁国栋. 我国虫媒病毒的研究状况. *中国人兽共患病杂志*, 1997, 13:61-65.
- [4] 张海林. 云南省虫媒病毒研究进展. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2004, 15:410-414.
- [5] 张海林, 米竹青, 张云智, 等. 云南省边境地区蚊虫自然感染乙型脑炎病毒的研究. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2002, 13(2):102-104.
- [6] 张海林, 自登云, 龚正达. 云南省乙型脑炎病毒宿主和媒介研究. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(2):81-83.
- [7] 陶三菊, 张海林, 杨冬荣, 等. 云南省澜沧江下游地区虫媒病毒的调查研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17:322-326.
- [8] 孙肖红, 付士红, 张海林, 等. 云南省虫媒病毒分离鉴定. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 19:319-324.
- [9] 王静林, 张海林, 周济华, 等. 云南省乙型脑炎病毒基因分型研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22:87-90.
- [10] Wang HY, Takasaki T, Fu SH, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J Gen Virol*, 2007, 88:885-894.
- [11] 张海林, 张云智, 黄文丽, 等. 从云南蝙蝠脑组织中分离出乙型脑炎病毒. *中国病毒学*, 2001, 16:74-77.
- [12] 杨起饶, 张嘉玉, 刘行知, 等. 云南省昭通地区鸟类乙脑病毒分离与鉴定. *中国人兽共患病杂志*, 1991, 7:52-54.
- [13] Chen WR, Tesh RB, Rico-Hesse R. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. *J Gen Virol*, 1990, 71:2915-2922.
- [14] Chen WR, Rico-Hesse R, Tesh RB. A new genotype of Japanese encephalitis virus from Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, 47:61-69.
- [15] Uchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian Subcontinent. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65:242-251.
- [16] Nga PT, Parquet MC, Cuong VD, et al. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia. *J Gen Virol*, 2004, 85:1625-1631.
- [17] Nitattattana N, Dubot-Pérés A, Gouilh MA, et al. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14:1762-1765.
- [18] 金奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] Nam JH, Chae SL, Papk SH, et al. High level of sequence variation in the 3' noncoding region of Japanese encephalitis viruses isolated in Korea. *Virus Genes*, 2002, 24:21-27.
- [20] Yun SI, Kim SY, Choi WY, et al. Molecular characterization of the full-length genome of the Japanese encephalitis viral strain K87P39. *Virus Res*, 2003, 96:129-140.
- [21] Yang DK, Kim BH, Kweon CH, et al. Molecular characterization of full-length genome of Japanese encephalitis virus (KV1899) isolated from pigs in Korea. *J Vet Sci*, 2004, 5:197-205.
- [22] Nam JH, Chae SL, Won SY, et al. Short report: genetic heterogeneity of Japanese encephalitis virus assessed via analysis of the full-length genome sequence of a Korean isolate. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65:388-392.

(收稿日期:2009-01-16)

(本文编辑:张林东)