

湖南省2006—2009年人感染高致病性禽流感病毒(H5N1)分子特征研究

黄一伟 董丽波 李俊华 刘运芝 高立冬 张红 陈长 胡世雄 李芳彩 舒跃龙

【摘要】 目的 分析湖南省2006—2009年4例人感染高致病性禽流感病例感染病毒的可能来源、基因重配情况以及分子特征。方法 鸡胚分离核酸检测H5N1病毒阳性标本,获得高致病性H5N1病毒,对病毒进行全基因组序列测定,采用BLAST和MEGA 4.0进行同源性比对、基因进化分析和各基因分子特征分析。结果 4株病毒的基因片段均为禽源,并未发现与人季节性流感病毒之间发生重配,且与当地禽类中分离的病毒高度同源。全基因组进化树分析显示,4株病毒在分支2.3.4中,2株为基因型V,2株为新的基因型。分子特征分析显示,4株病毒的血凝素(HA)分子裂解位点均为PLRERRKR/G,均出现A160T位点突变,神经氨酸酶(NA)分子49~68位均出现20个氨基酸(aa)缺失,非结构蛋白1(NS1)分子80~84位均出现5个aa的缺失。在HA分子大部分位点,4株病毒仍然表现出与禽类受体的亲和性,HN/1/09和HN/2/09出现可能使病毒对 α -2,6连接的唾液酸人类受体的亲和性增强的T192I突变。HN/1/08的PB2基因出现增加小鼠致病力的D701N改变。耐药性基因片段分析显示,4株病毒对金刚烷胺和奥司他韦均敏感。结论 2006—2009年湖南省4株人感染高致病性禽流感病毒(H5N1)为禽源,但存在多种基因型,而且发生了部分位点的突变。

【关键词】 禽流感病毒H5N1; 基因特性

Molecular characterization of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in Hunan province, 2006–2009 HUANG Yi-wei¹, DONG Li-bo², LI Jun-hua¹, LIU Yun-zhi¹, GAO Li-dong¹, ZHANG Hong¹, CHEN Zhang¹, HU Shi-xiong¹, LI Fang-cai¹, SHU Yue-long². 1 Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China; 2 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: SHU Yue-long, Email: yshu@cnic.org.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Mega-projects of China (No. 2008ZX10004-013) and Hunan Provincial Health Department Research Fund (No. A2007008).

【Abstract】 Objective To understand the possible origins, genetic re-assortment and molecular characterization of 4 highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in Hunan province, between 2006 and 2009. **Methods** H5N1 PCR test-positive specimens were inoculated in embryonated eggs while H5N1 virus was isolated and genomes sequenced. Genome homology and genetic molecular characterization were analyzed by BLAST and MEGA 4.0. **Results** All gene segments of the 4 viruses were avian in origin. No re-assortment was found between avian influenza A (H5N1) viruses and human seasonal influenza viruses. Viruses that isolated from domestic poultry shared high similarity with the 4 human viruses in gene homology. Data from the whole genome phylogenetic analysis showed that the 4 viruses were in clade 2.3.4, while 2 viruses belonged to genotype V, and another 2 were new genotypes. Results from molecular characterization showed that amino acid sequences of HA cleavage site of the 4 viruses were PLRERRKR/G. All 4 viruses had A160T mutation in HA, a 20 amino acid deletion in the neuraminidase (NA) stalk at position 49–68, and a 5 amino acid deletion in the non-structural protein 1 (NS1). Most sites in the HA molecules showed that the viruses preferentially bound to avian

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.07.017

基金项目: 国家科技重大专项课题(2008ZX10004-013); 湖南省卫生厅科研基金课题(A2007008)

作者单位: 410005 长沙, 湖南省疾病预防控制中心(黄一伟、李俊华、刘运芝、高立冬、张红、陈长、胡世雄、李芳彩); 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所(董丽波、舒跃龙)

黄一伟、董丽波同为第一作者

通信作者: 舒跃龙, Email: yshu@cnic.org.cn

influenza virus receptor. However, T192I mutation that might enhance the $\alpha 2, 6$ -linked sialic acid human influenza receptor binding had emerged in HN/1/09 and HN/2/09. D701N mutation of PB2 that increased the virulence in mice was found in HN/1/08. Analysis on drug resistance gene amino acid showed that all 4 viruses were sensitive to amantadine and oseltamivir. **Conclusion** Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in Hunan province from 2006 to 2009 were avian in origin, and the 4 viruses belonged to different genotypes. Some mutations that related to virulence and receptor binding positions had emerged in some of the strains.

【Key words】 Avian influenza virus H5N1; Genetic characterization

人感染 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒(H5N1 病毒)自 1997 年首次在香港经实验室确诊以来,截至 2010 年底全球已有 512 例感染者,其中 304 例死亡,病死率近 60%^[1]。目前, H5N1 亚型禽流感病例感染来源多为接触禽类或者暴露于病毒污染的环境中,仅有极少数人传人病例。然而由于流感病毒极易发生变异,若 H5N1 病毒通过基因突变或重配获得人传人的能力并在人群中广泛传播,可能导致流感大流行,因此加强 H5N1 病毒的监测,及时发现其变异是流感大流行应对的基础。湖南省是 H5N1 病毒疫情影响最为严重的省份之一。2005 年,中国大陆首例人禽流感病例即出现在湖南省湘潭县。至今全省已发现 7 例感染患者,占全国发病人数的 17.9%。本研究从全基因组和分子水平上,对 2006—2009 年湖南省 4 例人禽流感病例中分离的病毒进行基因特性和分子特征分析。

材料与方法

1. 标本来源:禽流感疑似患者通过不明原因肺炎病例监测系统发现。用于病毒分离的患者标本包括鼻拭子、咽拭子、气管分泌物、痰、肺穿刺物以及尸检标本等。标本采集、保存和运输方法按照《中国流感/人禽流感监测实施方案》进行。

2. 病毒分离和序列测定:标本核酸检测方法按照文献[2]进行。核酸检测 H5N1 阳性标本采用 SPF 级鸡胚在生物安全三级实验室进行病毒分离培养,具体方法见文献[3]。病毒 8 条基因片段通过德国 Qiagen 公司 one-step RT-PCR 试剂盒进行扩增,PCR 产物纯化后进行测序,测序反应使用美国 Amersham 公司 DYEnamic ET Dye Terminator 测序试剂盒,在美国 Amersham 公司 MegaBACE 1000 测序仪上完成。

3. 病毒序列分析:BLAST 分析使用美国国立生物技术信息中心(NCBI)网页。针对 H5N1 病毒全部 8 条基因的全长编码序列分别构建进化树。进化树的构建选取 GenBank 中具有代表性且具有全长或接近全长基因序列的 H5N1 病毒作为参照。使用

MEGA 4.0 软件中的 Clustal W 程序进行序列比对,再用 MEGA 4.0 软件构建进化树。进化树的构建采用邻-接法,采用 Kimura 2-parameter 模型,Bootstrap 重复值为 1000。

结 果

1. 病例资料和病毒命名:2006—2009 年,湖南省共检测不明原因肺炎病例 38 例,检出 H5N1 病毒核酸阳性病例 4 例,从病例标本中均成功分离出禽流感病毒。4 例病例分别是 2006 年 1 月邵阳市绥宁县病例,毒株命名为 A/Hunan/1/2006 (HN/1/06); 2008 年 1 月永州市江华县病例,毒株为 A/Hunan/1/2008 (HN/1/08); 2009 年 1 月怀化市靖江县病例(贵州省发病,输入性病例),毒株为 A/Hunan/1/2009 (HN/1/09); 2009 年 1 月怀化市溆浦县病例,毒株为 A/Hunan/2/2009 (HN/2/09)。4 例首次就诊的临床表现均有发热、咳嗽、肌痛等流感样症状,均有病死禽的接触史或病死禽污染的环境暴露史。除溆浦县病例外,其他 3 例均死亡。

2. 病毒核酸序列 BLAST 分析:4 株病毒各基因片段 BLAST 分析显示,GenBank 中与 4 株病毒的各基因片段同源性最高(均 > 97%)的毒株均来自于禽类中分离的 H5N1 病毒,表明 4 株病毒的基因片段均为禽源,显示病毒未与人流感或其他亚型的流感病毒发生新的重配。

分析 4 株病毒全基因,GenBank 中均找到基因同源性很高、可从本地禽类中分离出的禽流感病毒,提示病毒可能是由禽类直接传播给人。HN/1/06、HN/1/09 和 HN/2/09 与 GenBank 中 A/duck/Hunan/5152/2005 (H5N1)同源性最高,分别为 99%、97% 和 97%。而 HN/1/08 与 GenBank 中 A/duck/Hunan/3340/2006 (H5N1)同源性最高,为 98%。HN/1/06、HN/1/09 和 HN/2/09 同源性最高的病毒为同一株病毒,提示 HN/1/09 和 HN/2/09 可能由 HN/1/06 类似株演化而来。A/duck/Hunan/5152/2005 与 A/duck/Hunan/3340/2006 病毒分离自活禽市场鸭中,均为湖南省本地禽流感病毒,推测人感染的病毒可能

来自本地禽类,而非由候鸟或其他输入性途径传播。

3. 全基因 8 片段进化树和基因型分析: 对 2006—2009 年湖南省人禽流感分离株和 GenBank 中选取代表性病毒的 8 条基因片段构建进化树,进行基因进化分析和基因型分析。

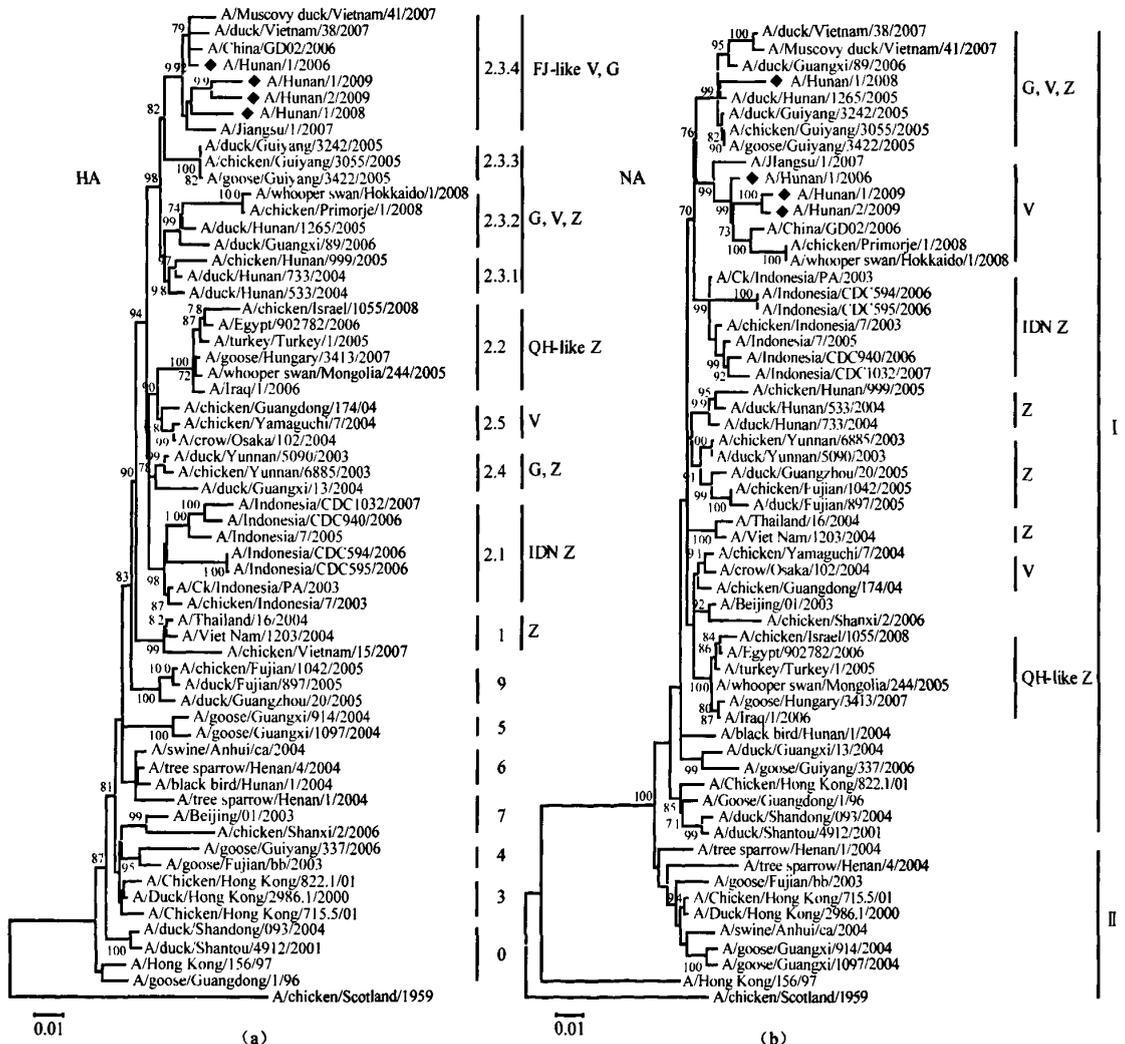
(1) 病毒表面蛋白基因: HA 基因进化树按照 WHO 的分类命名法分成 0~9 个一阶分支,其中分支 2 又可以分成一些二级分支和三级分支。图 1a 显示湖南省的 4 株病毒 HA 基因均在 2.3.4 分支中,属于当前流行的福建类似株。在 2.3.4 分支中,HN/1/06 又与其他 3 株病毒分在两个不同的小分支中,HN/1/06 与 2006 年中国广东、2007 年越南分离株更为接近,体现时间对 HA 进化树分支的影响(图 1a)。

NA 基因进化树可以分成两部分(I 和 II),4 株病毒均在第 I 部分中。HN/1/08 又与其他 3 株病毒

处在不同分支中,HN/1/08 在基因型 G、V、Z 分支中,而其他 3 株在基因型 V 分支中(图 1b)。

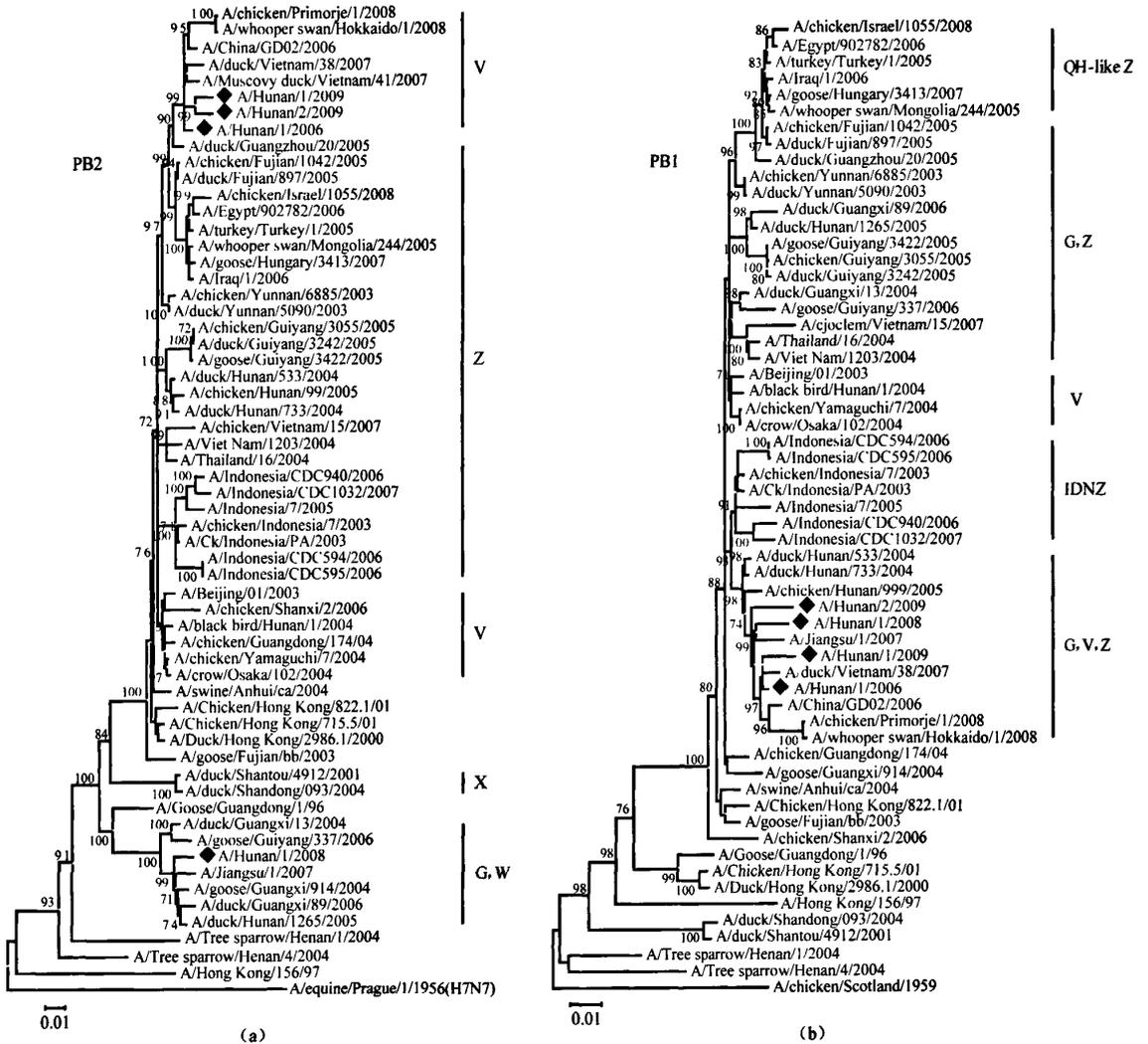
(2) 其他 6 个基因: 对于 PB2 和 PA 基因进化树,HN/1/08 与其他 3 株病毒处在亲缘关系非常远的 2 个分支中。HN/1/08 在 PB2 基因进化树中在基因型 G、W 分支中,在 PA 进化树中在 G、Z 分支中,而其他 3 株在两个进化树中均在基因型 V 分支中(图 2a、3a)。对于 NP 基因进化树,HN/1/06 和 HN/1/09 在基因型 G、V、Z 分支中,HN/1/08 和 HN/2/09 在基因型 V4 分支中(图 3b)。对于 PB1、M 和 NS 基因进化树,4 株病毒均在基因型 G、V、Z 分支中(图 2b、图 4)。

(3) 基因型: 根据 6 条内部蛋白基因片段的进化树分析表明,HN/1/08 的 NP 为 V4 基因型来源,但是与 V4 基因型相比,PA 的来源不同,为新的基因型。HN/2/09 的 NP 也为 V4 来源,但 PB2 为 B 型来源,也



注: ◆本研究分离的H5N1病毒

图1 2006—2009年湖南省H5N1病毒HA和NA基因进化树分析



注: 同图 1

图 2 2006—2009 年湖南省 H5N1 病毒 PB2 和 PB1 基因进化树分析

为新的基因型。HN/1/06 和 HN/1/09 的 PB2 和 PA 基因在 V 分支中, 为 V 型来源; PB1、NP、M 和 NS 均在 G、V、Z 分支中, 为 Z 型来源。因此, 此 2 株均为基因型 V。

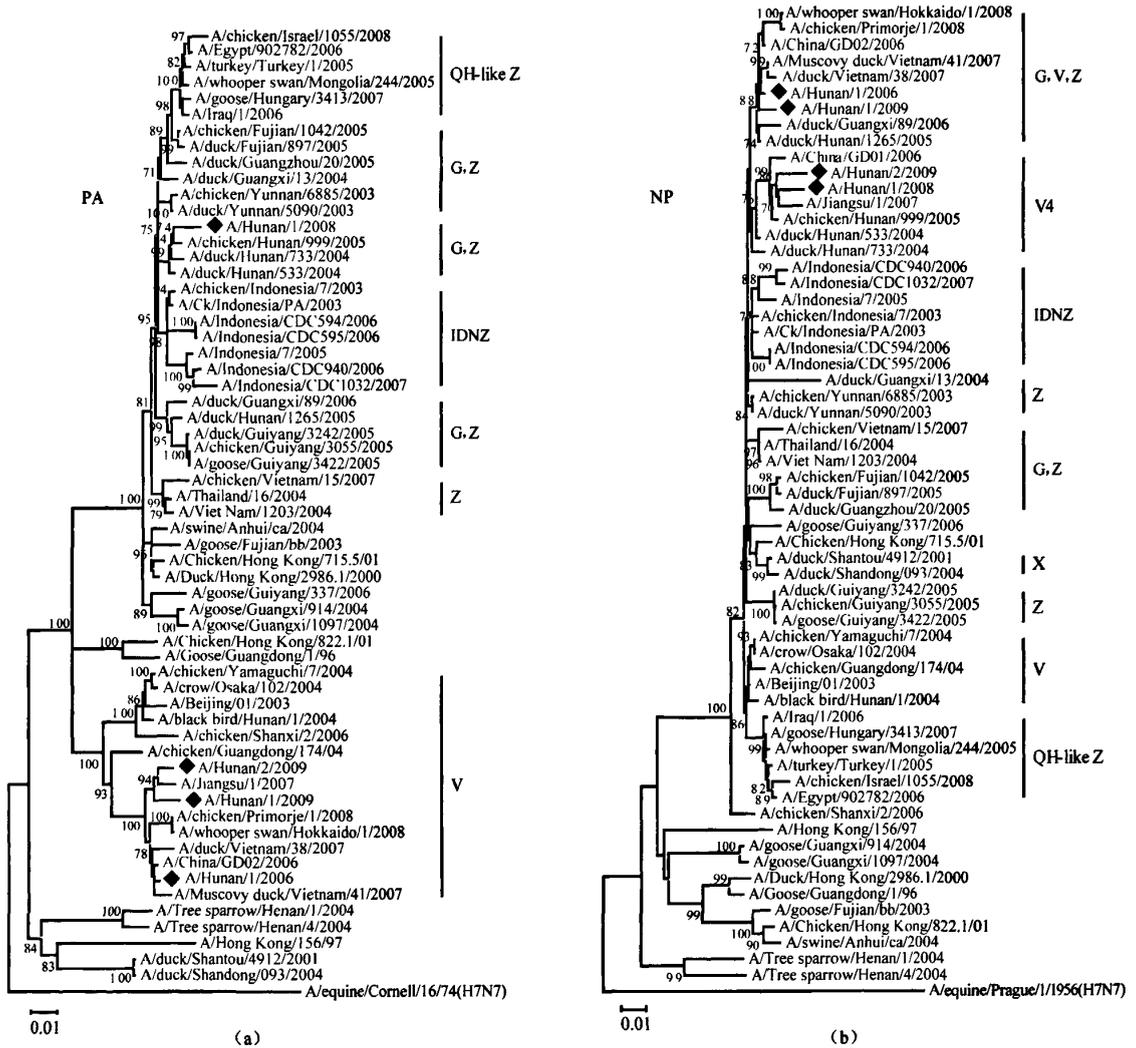
4. 分子特征分析(表 1):

(1) HA 分子特征: HA 基因推导的氨基酸(aa)序列分析表明, 4 株病毒在 HA1 和 HA2 裂解位点的序列均为: PLRERRKR/G, 符合高致病性禽流感病毒的特征。HA 受体结合位点 226 位和 228 位(H3N2 流感病毒 aa 位点编号, 下同), 4 株病毒均为 Q 和 G, 并未发生突变。4 株病毒 137 位为 S, 无突变; 但在 192 位点, HN/1/08 出现 T→A 突变, HN/1/09 和 HN/2/09 出现 T→I 突变。此外, 4 株病毒均在 160 位点出现了 A→T 突变, 此突变被认为可以增加家禽中毒毒

的毒力^[4]。

(2) 毒力相关位点的突变: 4 株病毒的 NA 分子在 49~68 位点均缺失一个长 20aa 的片段, NA 茎部 aa 的缺失可能与流感病毒对陆生家禽的进化适应有关^[5]; HN/1/08 的 PB2 分子在 701 位点具有 D→N 突变, 此突变被认为是一种在小鼠中有效复制和具有毒力的标志^[6]。NS1 蛋白是一种干扰素拮抗剂, 4 株病毒均在 NS1 的 80~84 位缺失 5 个 aa, 可能增加病毒对鸡和小鼠的毒力^[7]。

(3) 耐药性突变: 4 株病毒 NA 分子的 274 位点均为 H, 表明该 4 株病毒对于神经氨酸酶类抗病毒药物奥司他韦均是敏感的。此外, 其他一些耐药性位点: 4 株病毒的 NA 分子 116 位均为 V、150 位为 K、222 位为 I, 并未发生突变。4 株病毒 M2 分子的 31



注: 同图 1

图 3 2006—2009 年湖南省 H5N1 病毒 PA 和 NP 基因进化树分析

表 1 2006—2009 年湖南省 H5N1 病毒各基因的分子特征

病毒	HA	NA					PB2		M2	NS1					
		裂解位点	137	160	192	226	228	20aa 缺失	116	150	222	274	627	701	31
A/Hunan/1/2006	PLRERRKR/G	S	T	T	Q	G	✓	V	K	I	H	E	D	S	✓
A/Hunan/1/2008	PLRERRKR/G	S	T	A	Q	G	✓	V	K	I	H	E	K	S	✓
A/Hunan/1/2009	PLRERRKR/G	S	T	I	Q	G	✓	V	K	I	H	E	D	S	✓
A/Hunan/2/2009	PLRERRKR/G	S	T	I	Q	G	✓	V	K	I	H	E	D	S	✓

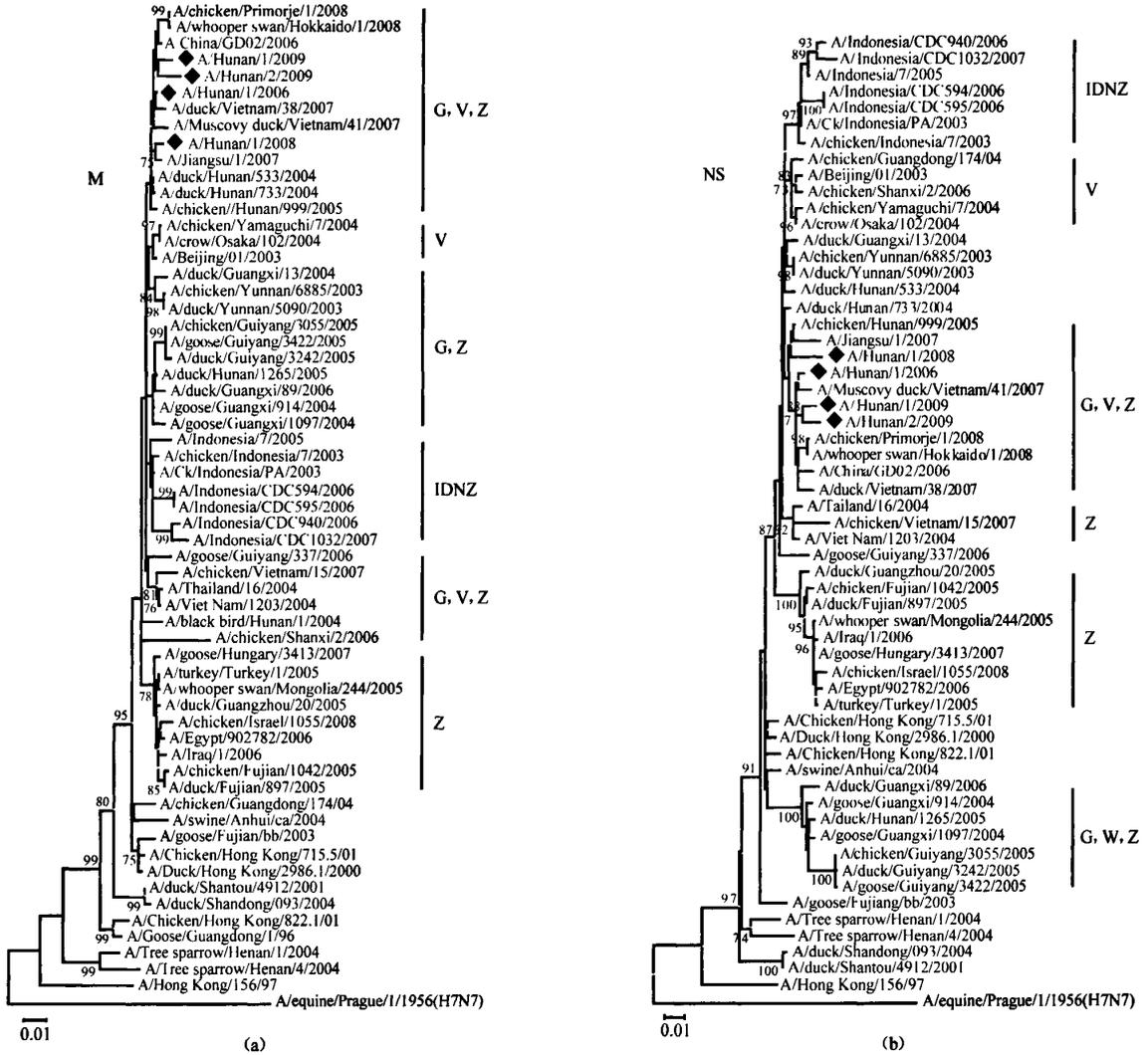
位点均为 S, 未发生耐药改变, 表明对 M2 离子通道抑制剂类药物金刚烷胺均敏感。

讨论

本研究对 2006—2009 年湖南省 4 例人禽流感病例中分离的病毒全基因进行测序分析, 显示 4 株病毒的基因片段均为禽源, 并未发现与人季节性流感病毒之间发生重配, 且均找到同源性高度相似的本

地禽类中分离的病毒。最近的一项研究发现, 将 H3N2 亚型人季节性流感中的 PB2 基因片段与 H5N1 的其他基因片段进行重配后人工构建出的新病毒, 比原来的 H5N1 病毒具有更高的致病性^[8]。因此, 及时获得人禽流感病毒基因序列, 并分析其来源, 对于发现可能的重配病毒、防止人禽流感在人间传播, 以及流感大流行的预测预警有着重要的意义。

目前, 有两套广泛使用的 H5N1 病毒基因分类



注: 同图1

图4 2006—2009年湖南省H5N1病毒M和NS基因进化树分析

系统,一套是WHO基于病毒HA基因序列进化建立的进化树分支命名法^[9],另一套是Guan等^[10]根据病毒全基因组8条基因片段不同来源建立的基因型分类。本研究参照这两套命名法对全基因组8个片段进行进化树分析和基因型分析,结果显示湖南省2006—2009年的4株人禽流感病毒HA在分支2.3.4中,2株为基因型V,为目前我国已发现禽流感的流行型别^[11],且与浙江省2006年一株人禽流感病毒进化树中的位置类似^[12]。另外2株为不同基因片段来源的新组合,即新的基因型。由于湖南省家禽和水禽中禽流感病毒基因型缺乏系统而全面的调查和研究,因此,需要加强湖南省动物宿主家禽和野鸟中禽流感病毒的监测,完善在野鸟和家禽中所有亚型禽流感病毒基因序列的数据库,这对于发现新的禽流感

基因型别,了解全省禽流感基因型的分布以及病毒的起源进化情况均有着重要意义。

HA蛋白负责病毒吸附于宿主细胞以及病毒和细胞膜的融合,在病毒的致病力方面起着重要的作用。HA蛋白对受体识别和结合的特异性取决于受体末端唾液酸和倒数第二位半乳糖之间糖苷连接的方式。人流感病毒主要识别和结合唾液酸以 α -2,6方式连接到半乳糖上的受体(α -2,6受体),而禽流感病毒主要识别和结合以 α -2,3方式连接的受体(α -2,3受体)。目前,研究认为HA与受体结合的这种特异性是导致禽流感病毒无法突破种属屏障在人与人之间传播的一个关键因素。1918、1957和1968年3次全球流感大流行的病毒均优先与 α -2,6受体结合^[13],因此,获得对于 α -2,6受体的亲和力可能是

病毒成为大流行株的一个先决条件之一。研究表明, HA 受体结合位点发生的两个突变 Q226L 和 G228S 能够在一定程度上赋予 H5N1 病毒结合 α -2, 6 受体的能力^[14], S137A 或 T192I 的突变也能使 H5N1 病毒对 α -2, 6 受体的亲和性增强^[15]。4 株病毒 226 位、228 位和 137 位未发生突变, 仍然亲合 α -2, 3 受体, 为典型的禽类禽流感病毒特征位点。但是在 192 位 HN/1/09 和 HN/2/09 出现了 T192I 突变、HN/1/08 出现 T192A 突变, 至于该单个位点突变对于增强病毒对人类受体亲和性的程度以及产生的影响, 还有待进一步研究进行证实。

目前临床上治疗流感主要有两类药物, 一类为针对 M2 蛋白离子通道阻断剂的烷胺类药物如金刚烷胺, 另外一类为神经氨酸酶抑制剂包括奥司他韦和扎那米韦。目前金刚烷胺抗性毒株在很多国家均有出现, 因此对病毒的耐药性分析就显得尤为重要。分子特征分析显示, 4 株病毒对金刚烷胺和奥司他韦均敏感。而 2006—2008 年在老挝发现的一些对奥司他韦和扎那米韦耐药性的突变位点为 V116A、K150N 和 I222L^[16], 也均未在该 4 株病毒中发现。然而, 存在于 NA 的多位点突变的累积仍然有可能导致病毒药物抗性发生改变, 因此对耐药性基因位点的识别和进一步开展耐药生物学监测也是十分必要的。

(感谢湖南省疾病预防控制中心参与此项调查研究人员的辛勤工作和大力支持)

参 考 文 献

- [1] WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) Reported to WHO. [2011-01-02]. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_12_29/en/index.html.
- [2] Huang YW, Li Z, Zhang H, et al. Laboratory diagnosis and molecular characterization of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in Hunan province in 2005–2006. *Chin J Virol*, 2007, 23(6): 434–439. (in Chinese)
黄一伟, 李梓, 张红, 等. 2005—2006 年湖南省人感染高致病性禽流感 (H5N1) 实验室诊断及病毒基因特性研究. *病毒学报*, 2007, 23(6): 434–439.
- [3] Guo YJ, Cheng XW. *Influenza virus and experimental techniques*. Beijing: China Three Gorges Press, 1997: 87–90. (in Chinese)
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: 87–90.
- [4] Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol*, 2000, 74(1–2): 77–86.
- [5] Matrosovich M, Zhou NN, Kawaoka Y, et al. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol*, 1999, 73(2): 1146–1155.
- [6] Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian model. *J Virol*, 2005, 79(18): 12058–12064.
- [7] Long JX, Peng DX, Liu YL, et al. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15–nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes*, 2008, 36(3): 471–478.
- [8] Lia C, Hatta M, Nidomb CA, et al. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(10): 4687–4692.
- [9] WHO. Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. [2010-07-12]. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html.
- [10] Guan Y, Peiris JSM, Lipatov AS, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 8950–8955.
- [11] Duan L, Bahl J, Smith GJD, et al. The development and genetic diversity of H5N1 influenza virus in China, 1996–2006. *Virology*, 2008, 380(2): 243–254.
- [12] Xu CP, Lu YY, Yan JY, et al. Molecular characteristics and its evolution of the complete genome of avian influenza H5N1 virus isolated in Zhejiang province from 2002 to 2006. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(11): 1114–1118. (in Chinese)
徐昌平, 卢亦愚, 严菊英, 等. 浙江省 2002—2006 年禽流感 H5N1 病毒基因特性与进化重组分析. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(11): 1114–1118.
- [13] Stevens J, Blixt O, Glaser L, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*, 2006, 355(5): 1143–1155.
- [14] Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, et al. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 2006, 312(5772): 404–410.
- [15] Yang ZY, Wei CJ, Kong WP, et al. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science*, 2007, 317(5839): 825–828.
- [16] Boltz DA, Douangneun B, Phommachanh P, et al. Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic. *J Gen Virol*, 2010, 91: 949–959.

(收稿日期: 2011-01-05)

(本文编辑: 万玉立)