

· 病毒病原学研究 ·

2004年北京婴幼儿中甲 3型流感病毒血凝素基因特性对其抗原性改变的提示

朱汝南 徐红 钱渊 王芳 邓洁 赵林清 廖斌 黄蓉妍

【摘要】目的 了解 2004 年流感流行季节 (2004 年 8 月—2005 年 4 月) 北京地区婴幼儿急性呼吸道感染患儿中分离到的甲 3 型流感病毒是否存在抗原性的改变以及其变异程度。**方法** 提取 1 株于 2004 年 3 月和 32 株于 2004 年流感流行季节从北京地区急性呼吸道感染患儿中分离到的甲 3 型流感病毒的病毒 RNA, 经 RT-PCR 扩增得到 HA1 区基因片段并进行核苷酸序列测定, 使用生物信息软件分析 HA1 区基因序列。**结果** 所测定的血凝素 HA1 区基因均为 987 bp, 编码一个含 329 个氨基酸的蛋白质。将 33 株甲 3 型流感病毒流行株的血凝素 (HA1) 氨基酸序列与近年 WHO 推荐的参考疫苗株比较, 我们发现一致的多处位点的氨基酸突变, 而且突变位点涉及 2 个抗原决定簇 (A、B) 和受体结合部位。而 2004 年 3 月分离到的毒株在进化分析和氨基酸变异上均不同于 2004 年流行季节的毒株。**结论** 对血凝素基因 HA1 区的序列分析结果提示 2004—2005 年流行季节的甲 3 型流感病毒较春季的流行株和 2004 年疫苗株出现了较大的漂移, 提示其抗原性可能出现了改变。这种变异对于病毒抗原性的影响以及对于疫苗效果评价的意义值得密切关注。

【关键词】 流感病毒 A 型, 人; 血凝素, 病毒性; 抗原, 病毒; 变异 (遗传学)

Sequence analysis of the HA1 regions of hemagglutinin gene from influenza viruses (H3N2) isolated from children in Beijing in 2004 indicated antigenic variation ZHU Ru-nan*, XU Hong, QIAN Yuan, WANG Fang, DENG Jie, ZHAO Lin-qing, LIAO Bin, HUANG Rong-yan *Laboratory of Virology, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Corresponding author: QIAN Yuan, yqianbjc@263.net

【Abstract】Objective To identify variations in hemagglutinin genes from influenza viruses (H3N2) isolated from infants and young children with acute respiratory infection (ARI) between March, 2004 and April 2005. **Methods** RNAs from influenza A virus strains (subtype H3) isolated from specimens collected from ARI children were extracted followed by amplification for HA1 fragments from hemagglutinin (HA) genes by RT-PCR. The sequences of the fragments were defined by direct sequencing for the PCR products or the target inserts after the PCR fragments were cloned into the TA-cloning vector pBS-T and analyzed by bioinformatic software. **Results** Fragments of 987 bps of HA1 (encoding 329 amino acids) from a total of 32 strains of influenza A virus (subtype H3) isolated from the 2004 season and 1 from the 2003 season were amplified and the sequences were compared with vaccine reference strains recommended by WHO which were used in recent years. There were several consistent amino acid variations which involved in both antigenic epitopes A and B and receptor binding site (RBS) for isolated strains in the 2004 influenza season compared with the vaccine strains used during the recent years and the virus strains isolated in March 2004, indicated the antigenic drift of the viruses isolated in 2004 influenza season may lead to variant viruses. **Conclusion** The variations of the HA genes from influenza virus (subtype H3) strains in the 2004—2005 influenza season were confirmed by sequence analysis for the HA1 regions of the hemagglutinin genes, which indicate that the antigenic drift would have been caused by the diversification of the genes and the efficacy of the recently used vaccines should be kept under close watch.

【Key words】 Influenza A virus, human; Hemagglutination, viral; Antigens, viral; Variation (genetics)

基金项目: 北京市科委新星计划 (2004B34); 北京市自然科学基金基础性研究实验室项目 (JS96004)

作者单位: 100020 首都儿科研究所病毒室, 北京市感染与免疫中心实验室 (朱汝南、钱渊、王芳、邓洁、赵林清); 中国疾病预防控制中心病毒病控制所流感室 (徐红); 首都儿科研究所附属儿童医院内科 (廖斌、黄蓉妍)

通信作者: 钱渊, Email: yqianbjc@263.net, 010-85616680

流行性感(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。其传播迅速,抗原易变异。近年来流感病毒变异活跃。1997年香港首例禽流感感染人的发生^[1]以及2003年以来东南亚越南等国感染禽流感事件的连续发生^[2-4],使全球对流感的关注日益增长。专家们认为可能会再次出现流感的大流行^[5];WHO发出预警并呼吁各国应该建立对流感大流行的防备计划,以应对可能发生的流感大流行^[6]。加强流感监测,及时发现变异毒株和新毒株是预防和控制大流行的关键。本研究室多年来一直在儿科患者中进行流感病毒的监测^[7,8]。世界流感流行资料 and 我们的监测资料都表明,近年来在感染人类的流感病毒中,甲3型(H3N2)流感病毒相当活跃,往往是流行优势株^[9];其血凝素基因的变异是流感病毒抗原性变异的分子基础。因此本研究就2004年3月—2005年4月北京地区儿科急性呼吸道感染患儿中分离到的甲3型流感病毒的血凝素基因HA1区进行了核苷酸序列分析,从分子水平了解是否有抗原性变异及其变异的程度,为了解和掌握流感变异及其流行规律提供基础数据,同时也为防控流感策略的制定提供科学依据。

材料和方法

一、病毒分离鉴定

将临床采集的急性呼吸道感染患儿的咽拭子(取自门诊患儿)或鼻咽洗液(取自住院患儿)接种于MDCK细胞,观察细胞病变,并用豚鼠血球进行血凝试验,阳性者用血凝抑制试验进行型别鉴定。取标本的患儿年龄从1d~18岁。用来进行序列分析的甲3型流感病毒分离自2个月~8岁的患儿。

二、血凝抑制试验

采用WHO流感诊断试剂盒(the WHO influenza reagent kit for identification of influenza isolates),由美国疾病预防控制中心(CDC)提供。

三、分离毒株血凝素基因HA1区测序

选取32株于2004年流感季节(2004年8月—2005年4月)从首都儿科研究所附属儿童医院就诊患儿中分离的甲3型流感病毒毒株和1株于2004年3月分离的毒株(H4205)进行了核苷酸测序。

1. 引物:HA1区基因PCR扩增测序引物为H3F1:5'-ATGAAGACTATCA TTGCT-3'和H3R1184:5'-ATTGCTGCTTGA GTGCTT-3',预期扩增片段为1169 bp。部分毒株HA1区基因进行克隆后测序,测序引物为载体上的通用引物(位于插入片段的两

侧);大多数毒株直接用PCR产物进行测序,这些样品除用以上2个引物测序外还加测另一个反应以确证其5'端序列,引物为5'-TAA GGGTAACAGTTG-CTG-3'。

2. 病毒RNA提取和血凝素基因HA1区扩增、克隆和测序:使用Trizol提取病毒悬液中的RNA后,用随机引物逆转录合成cDNA。然后用上述引物进行PCR反应,反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min 20 s,扩增35个循环;72℃延伸5 min。预期扩增产物大小为1169 bps,经琼脂糖凝胶电泳纯化后,与载体pBS-T进行T-A连接。连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞;用PCR筛选出阳性克隆后进行序列测定。Trizol和逆转录酶M-MLV为Invitrogen公司产品;随机引物由上海博亚生物技术有限公司合成;Taq酶expand long template PCR system为Boehringer Mannheim公司产品。DNA凝胶纯化回收试剂盒和载体pBS-T为天为时代科技有限公司产品。所测毒株中只有3株使用克隆测序,其余30株毒株的HA1区基因是使用Qiagen公司的One-Step RT-PCR Kit进行扩增后,产物直接进行测序。

四、序列分析和种系进化分析

序列分析和种系进化分析使用生物学软件DNAStar中的EditSeq和MegAlign。序列比较选用了WHO推荐的甲3型流感病毒疫苗株为参照株,它们是:2001—2004年疫苗株A/Panama/2007/99(简称Panama99),2004—2005年北半球疫苗株A/Fujian/411/2002(简称Fujian02),2004—2006年南半球疫苗株A/Wellington/1/2004(简称Wellington04)以及刚刚公布的2005—2006年北半球疫苗株A/California/7/2004(简称California04)。

结 果

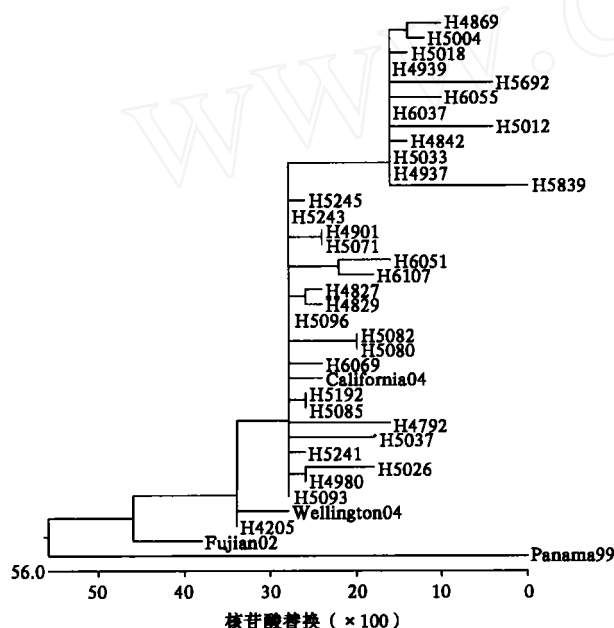
一、病毒分离鉴定

2004年8月—2005年4月从2313例儿科急性呼吸道感染患儿标本中分离的流感病毒(毒株中有相当一部分血凝滴度很低)中经血凝抑制试验鉴定为甲3型流感病毒的共有69株。选用其中32株病毒和1株2004年3月分离的毒株(H4205)做进一步的分子水平分析。

二、血凝素基因HA1区序列的进化分析

扩增到的33株甲3型流感病毒流行株血凝素基因HA1区域为987 bp,编码一个329个氨基酸的蛋白质。将这些毒株的核苷酸序列与WHO近年推

荐的疫苗参考株进行的比较分析结果表明,本流感流行季节分离的流行株和去年的疫苗株 Fujian02较前年的疫苗株 Panama99株近源;与 WHO 新推荐的 2004—2006年度疫苗株 Wellington04 更近源;和刚公布的 2005—2006年的疫苗株 California04株最为近源,而明显自成一个新的进化分支。如图 1所示,2004年 3月分离到的一株病毒 (H4205)属于 2003—2004年流感流行季节的流行株,它与 Fujian02近源,和 Wellington04株更为近源,属于一个进化分支;而 2004年冬季北京地区流行的病毒不仅和去年的疫苗株 (Fujian02和 Wellington04)不同而形成一个新的进化分支,而且与新推荐的 2005—2006年度疫苗株 (California04)也有所不同,部分毒株形成了一个更新的分支,提示 2004年北京地区冬季流行的甲 3型流感病毒有一定程度的变异。



H4205为 2004年 3月分离株,其余分离株为 2004年 8月—2005年 4月的毒株;各年的疫苗推荐株以缩写形式表示

图 1 2004年甲 3型流感病毒流行株与疫苗株基于核苷酸的进化分析

三、流行株与疫苗株 HA1区的氨基酸序列比较

将本流行季节分离毒株血凝素基因的 HA1区编码的氨基酸序列与近年 WHO 推荐的疫苗毒株序列比较,发现变异位点有一些新的特点。流行株 HA1区的氨基酸序列既不同于去年的疫苗毒株 (Fujian02),也不完全同于 WHO 新推荐的 2005—2006年度疫苗株 (Wellington04和 California04)。变异位点详见表 1。2004年流感流行季节的分离株与 2003—2004年疫苗株 (Panama99)比较,有 5个位点

发生了改变 (145, 159, 189, 225, 226);与 2004—2005年的疫苗株 (Fujian02)比较,有 4个位点发生了改变 (145, 159, 189, 226);与 2004—2006年南半球疫苗株 (Wellington04)比较,有 2个位点发生了改变 (145, 226);与 2005—2006年北半球疫苗株 (California04)比较也出现了改变,但氨基酸的变异不一致。2004—2005年流行季节的毒株与 H4205 (2004年 3月分离到,作为 2003—2004年流行季节分离株)比较,出现了 2个位点的改变 (145, 226)。2004年毒株的 227位氨基酸在 P/S之间替换。这些变异位点涉及了抗原决定簇 A、B和受体结合位点 (RBS),提示 2004年流感流行季节的毒株出现了一定程度的变异。

表 1 2004年 3月—2005年 4月分离的甲 3型流感病毒流行株与疫苗株氨基酸位点差异比较

毒株编号	145A	159B	189B	225 RBS	226 RBS	227 RBS
Panama99	K	Y	S	G	V	S
Fujian02	K	Y	S	D	V	S
Wellington04	K	F	N	D	V	P
California04	N	F	N	D	I	P
H4205*	K	F	N	D	V	P
2004年流行季节毒株 [#]	N	F	N	D	I	P/S

注: * 2004年 3月分离的毒株,属于 2003—2004年流行季节;

[#]其余 32株 2004—2005年流行季节分离的毒株,这些毒株在这 6个位点的氨基酸变异完全相同,因此统一标明

四、流行株血凝素 HA1特性分析

1 血凝素蛋白二硫键保守性:流感病毒血凝素蛋白二硫键位点具有高度保守性。这些二硫键对维持流感病毒 HA 蛋白分子的正常空间构象起到非常重要的作用。2004年流行毒株在 14、52、64、76、97、139、281和 305位的半胱氨酸 (Cys)均保守不变。表明 2004年流行株血凝素的三维结构保持稳定。

2 糖基化位点:我们所分析毒株的血凝素 HA1区有 11个 N糖基化位点 (N-X-T/S)非常保守,分别位于 8、22、38、63、122、126、133、144、165、246和 285位氨基酸。较 1968年分离的第一株甲 3型毒株 (A/HongKong/1/68)增加了 6个糖基化位点 (63、122、126、133、144、246位),减少了一个位点 (81位)。有文献报道自 1997年以后的毒株在 122和 133位增加了两个糖基化位点,1999年以后的毒株均在 144位增加了一个糖基化位点^[7,8]。HA1区糖基化位点逐渐增多,增加的糖链可能会影响蛋白的抗原特性以及宿主 CD₄⁺细胞对 HA 分子的识别。

3 受体结合位点:流感病毒血凝素的受体结合

位点呈口袋状,由底部(98、153位氨基酸),后壁(183、190、194),前壁(131~137),左侧壁(225~228)构成。其中98、153、183、190、194、226(G或L)恒定不变^[10]。与去年的疫苗株(Fujian02)比较,本研究中流行株(除H4025)血凝素的226位氨基酸(缬氨酸V→异亮氨酸I)发生了变异,它们和1968年A/Hong Kong/1/68株226位的亮氨酸(L)均属疏水氨基酸,它们间的置换对受体结合的能力影响不大。A/Hong Kong/1/68株的227位是丝氨酸,而流行株的变异在丝氨酸和脯氨酸二者间交替变换。关于其对病毒血凝素的影响报道甚少,变换的原因不明,或许和个体免疫压力有关。

讨 论

目前按照血凝素和神经氨酸酶的不同,甲型流感病毒分为15个亚型^[11]。其中感染人类并能够引起一定范围流行的甲型流感病毒包括甲1(H1N1)和甲3(H3N2)型。但是以前只感染动物的某些甲型流感病毒也出现了感染人的情况,但是尚未造成大范围的流行。甲型流感病毒的进化频率高于乙型和丙型流感病毒,尤其是甲3型流感病毒,其进化频率达到5.7个核苷酸/年^[12]。曾经3次导致世界性大流行的流感病毒都是甲型流感病毒^[13]。从WHO每年推荐的疫苗株来看,甲3型流感病毒疫苗株的更换频率最高,说明其抗原性的改变很频繁。

流感病毒的抗原变异有2种形式,一是所有流感病毒所共有的抗原漂移,二是只有甲型流感病毒特有的抗原转变或变异。抗原漂移主要是通过编码血凝素和神经氨酸酶基因的持续不断的氨基酸点突变的积累,导致其蛋白分子上的抗原位点发生改变,从而影响病毒的抗原性,这也是导致甲型流感病毒感染不断流行的原因。而抗原转变或变异是指病毒的一个基因片段发生了改变(基因重配)而导致了新的血清亚型的出现。位于血凝素HA1区头球部的氨基酸突变(包括5个抗原结合簇和受体结合位点)与其抗原漂移关系更为密切^[14]。我们分析的2004年甲3型流感病毒的流行株与2004—2005年疫苗株之间已经出现了位于2个抗原决定簇(A和B)和受体结合位点的氨基酸突变,提示有可能已经出现了一个新变种。WHO公布的下一年度北半球疫苗株中甲3型流感病毒California04替换了Fujian02。California04与Fujian02相比出现了与我们观察到的相同的位于2个抗原决定簇(A和B)和受体结合位点的4个氨基酸突变,说明我们分离到

的这些病毒,即2004—2005年流行季节的甲3型流感病毒,确实在氨基酸水平已经出现了有意义的替换,提示其可能出现了新的抗原性漂移,当然这还需要更进一步的血清学实验进行确证。

每年冬季甲、乙型流感病毒在我国北方都会引起不同程度的流行。流感病毒可感染任何年龄组人群,儿童感染率最高。虽然由流感引起的重症感染和死亡率最高的为65岁以上人群,但是在流感流行季节小于2岁的婴幼儿因流感导致的住院率也非常高。婴幼儿作为最敏感的人群在流感流行的监测中有着重要的地位。冬春季儿科发热患者数的突然增加往往是流感流行的信号。因此,密切关注儿童中流感病毒的流行情况,在流行季节之初对其抗原在分子水平的改变进行监测,并结合抗原性的分析来确定是否出现了抗原漂移,会使我们更充分地认识到变异对其流行状况和已有疫苗使用效果将会产生的影响,将会更加有利于流感的防控。

参 考 文 献

- 1 Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, 1998, 351: 467-471.
- 2 Abbott A. Human fatality adds fresh impetus to fight against bird flu. *Nature*, 2003, 423: 5.
- 3 Sheldon T. Vet dies from pneumonia in avian flu case. *BMJ*, 2003, 326: 952.
- 4 Nomile D. Infectious diseases. Stopping Asia's avian flu: a worrisome third outbreak. *Science*, 2004, 303: 447.
- 5 Webby RJ, Webster RC. Are we ready for pandemic influenza? *Science*, 2003, 302: 1519-1522.
- 6 Støbr K. The global agenda on influenza surveillance and control. *Vaccine*, 2003, 21: 1744-1748.
- 7 朱汝南,邓洁,王芳,等. 2000年秋冬至2002年夏北京地区呼吸道感染的病毒病原学研究. *临床儿科杂志*, 2003, 21: 25-28.
- 8 刘成贵,朱汝南,万里涛,等. 1998-1999年北京地区流感病毒监测及血凝素基因分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20: 285-288.
- 9 World Health Organisation (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2004-2005 influenza season. *W K L Y Epidemiol Rec*, 2004, 79: 88-92.
- 10 Bush RM, Bender CA, Subbarao K, et al. Predicting the evolution of human influenza A. *Science*, 1999, 286: 1921-1925.
- 11 Rohm C, Zhou N, Suss J, et al. Characterization of a novel influenza haemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology*, 1996, 217: 508-516.
- 12 Fitch WM, Bush RM, Bender CA, et al. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7712-7718.
- 13 Centers for Disease Control and Prevention. The influenza (FLU) viruses. Available: <http://www.cdc.gov/flu/about/fluviruses.htm>
- 14 Lee MS, Chen J. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 1385-1390.

(收稿日期:2005-05-23)

(本文编辑:付晓霞)