

· 调查报告 ·

2008~2009 年南宁市季节性 H1N1 亚型流感病毒血凝素 HA1 基因变异分析*

范云燕, 刘海燕, 林新勤, 秦剑秋, 黄莉, 覃巍巍
(广西壮族自治区南宁市疾病预防控制中心 530023)

摘要:目的 分析南宁市 2008~2009 年度流行性感冒的病原学监测结果, 探讨其季节性 H1N1 亚型流感病流行情况和 HA1 基因变异规律及进化趋势。方法 根据流感病原学监测和疫情挑选 2008~2009 年中分离到的季节性 H1N1 亚型毒株 20 株(每年 10 株), 提取病毒 RNA, 采用 RT-PCR 扩增病毒 HA 基因后进行核苷酸序列测定, 利用 VectorNTI 9.0 分析处理, 并与 WHO 推荐疫苗株进行比对, 用 Mega 4.1 构建系统进化树。结果 2008~2009 年南宁市季节性流感流行主要集中在夏秋季节, H1N1 成为 2008 年度的优势毒株。进化树分析表明, 南宁市 2008~2009 年毒株被分为 2 个分支(I 和 II), A/Solomon/3/2006 和 A/Brisbane/59/2007 分别分布在分支 I 和 II 内。对 H1N1 HA1 氨基酸序列分析表明, 20 份毒株二硫键和糖基化位点比较保守, 受体结合位点(RBS)和抗原决定簇位点相对活跃, 其中 RBS 188、189、222、224 均发生了不同程度的变异。与 A/Solomon /3/2006 相比, 2008 年毒株抗原决定簇存在 4 个氨基酸的替换并且分布在两个抗原决定簇区域, 2009 年毒株除 A/nanning/473/2009 外, 抗原决定簇区氨基酸变异未达到 4 个。结论 南宁市 2009 年 H1N1 流感病毒 HA1 基因特性与 A/Brisbane/59/2007 疫苗株接近, 2008 年毒株与两疫苗株相比变异较大, 这可能是导致 2008 年南宁市 H1N1 亚型流感病毒流行强度明显增加的原因。

关键词: 流感, 人; H1N1; 血凝素类; 基因变异

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.03.035

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)03-0329-03

Analysis of the genetic variation of HA1 gene of human seasonal influenza H1N1 virus in Nanning during 2008—2009*

Fan Yunyan, Liu Haiyan, Lin Xinqin, Qin Jianqiu, Huang Li, Qin Weiwei

(Nanning Center for Disease Prevention and Control, Nanning, Guangxi 530023, China)

Abstract: Objective To analyze the data of influenza surveillance and discuss the epidemic situation, genetic variation and evolution characteristics of HA1 gene of human influenza H1N1 viruses circulating in Nanning City during 2008—2009. **Methods** 20 H1N1 strains(10 strains each year) isolated in influenza surveillance and epidemic situation during 2008—2009 were selected. RNAs were extracted, their HA genes were amplified by RT-PCR and then sequenced. The data obtained were compared with the vaccine strains recommended by WHO with the software VectorNTI 9.0. Genetic distance and phylogenetic tree of these strains were constructed by using Mega 4.1. **Results** Seasonal influenza epidemics mainly occurred in the summer and autumn in Nanning during 2008—2009. The HA1 phylogenetic tree constructed and showed that the strains were divided into two branch, both vaccine strains A/Solomon /3/2006 and A/Brisbane/59/2007 were located in branch I and II, analysis of the H1N1 HA1 amino acid sequence showed that 20 strains disulfide bonds and glycosylation sites were more conserved, but the receptor binding site(RBS) and the antigenic sites were relatively active, including the RBS 188, 189, 222, 224 occurred in distinct variation. Compared to the vaccine strains A/Solomon /3/2006, the strains in 2008 showed four amino acid substitution which located in two antigenic sites. Except to A/nanning/473/2009, all strains that isolated in 2009 showed less than 4 variation in antigenic sites. **Conclusion** The genetic characteristics of HA1 gene of influenza H1N1 virus isolated in Nanning in 2009 was similar to A/Brisbane/59/2007. More genetic variation occurred in 2008 strains compared with two vaccine strains recommended, which may lead to human seasonal influenza epidemics in 2008.

Key words: influenza, human; H1N1; hemagglutinins; genetic variation

流行性感冒是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 流感病毒分为 A、B、C 3 种型别^[1]。血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)是流感病毒主要表面抗原, 尤其是 HA 基因具有高度易变性, 是流感病毒发生抗原性漂移的主要原因^[2]。流感病毒的 HA 基因在病毒受体识别和复制中起重要作用, 它不仅与机体免疫密切相关, 而且还是流感病毒发生抗原性变异的分子基

础。研究表明中和抗体针对的抗原位点和受体结合位点(RBS)都位于 HA 蛋白分子的头部重链区(HA1)^[3]。本研究通过分析 2008~2009 年度南宁市季节性 H1N1 流感病毒的流行和 HA1 基因的变异情况, 有助于掌握流感病毒进化方向和流行动态, 为及时掌握本地区流感病毒活动动态, 及早预测预警流感疫情提供实验信息和依据。

* 基金项目: 广西南宁科学研究与技术开发计划项目(200802127C)。 作者简介: 范云燕(1981~), 主管技师, 硕士, 主要从事病毒检验的研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008~2009 年南宁市流感病毒监测哨点医院采集到的流感样病例咽拭子,流感疫情采集到的流感样病例鼻咽拭子。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离培养 将鼻咽拭子标本接种于狗肾传代细胞(MDCK)进行流感病毒分离培养。根据采样时间,2008 年和 2009 年各选取 10 株季节性 H1N1 亚型流感毒株进行序列测定分析。

1.2.2 病毒 RNA 的提取和 HA 基因全长扩增 用 QIAGEN Rneasy Mini kit RNA 提取试剂盒提取 20 份毒株 RNA,方法按试剂盒说明书。取 5 μ L RNA 模板,用引物 H1N1-HA-F: 5'-AGC AGG GGA AAA TAA AAM CAA CC-3' 进行反转录,条件为:25 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 1 h,98 $^{\circ}$ C 5 min,冰上冷却。取 5 μ L cDNA 为模板,分别用 H1N1-HA-F 和 H1N1-HA-991R: 5'-CAC TCT CCT ATT GTG ACT GGG TG-3',以及 H1HA-F768:5'-ACT ACT GGA CTC TGC TGG AAC-3' 和 H1N1-HA-R:5'- TTC TGA AAT TCT GGT CTC AGA TGC -3' 引物分别进行 PCR,PCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min,(94 $^{\circ}$ C 40 s,52 $^{\circ}$ C 40 s 72 $^{\circ}$ C 1 min)35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,50 μ L 体系,以上反转和 PCR 试剂均购自 Fermentas。

1.2.3 HA 基因测序和分析 PCR 产物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行纯化和测序,测序结果采用 VectorNTI 9.0 软件进行分析。将获得的 HA1 氨基酸序列与 WHO 推荐的北半球 A 亚型疫苗株 A/Solomon/3/2006(2007 年 11 月至 2008 年 4 月,ABU50586)和 A/Brisbane/59/2007(2008 年 11 月至 2010 年 4 月,ACA28844)进行比对,并用 Mega4.1 软件构建系统进化树。

2 结果

2.1 2008、2009 年南宁市 H1N1 亚型流感病毒流行情况

2008、2009 年南宁检测标本分别为 849 份和 863 份,流感病毒分离培养阳性率为 8.00% 和 26.65%,2008 年以季节性 H1N1(47.6%)和 H3N2(32.35%)为主,2009 年以 H3N2(62.61%)为主,B 型流感病毒(20.87%)其次。南宁市流感流行主要集中在夏秋季节,2008 年和 2009 年分别在 7 月和 9 月达到病毒分离高峰。见图 1。

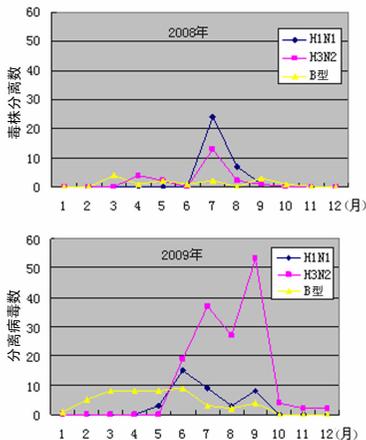


图 1 2008、2009 年南宁市季节性流感毒株分离分布

2.2 核苷酸序列测定结果及氨基酸进化树分析 2008~2009

年 20 株 H1N1 亚型流感病毒 HA 全长 1 698 bp 翻译成 566 个氨基酸,HA1 长为 325 个残基。将 20 株 H1N1 流感病毒 HA1 蛋白与北半球疫苗推荐进行比对。20 株 H1N1 聚成 2 个大的类群,其中 A/Solomon/3/2006 与 2008 年的毒株形成类群 I,而 A/Brisbane/59/2007 与 2009 年的毒株形成类群 II,两疫苗株分别在类群中形成独立的亚分支。

2.3 H1N1 亚型流感病毒 HA1 氨基酸序列变异及蛋白质分子结构变化分析

2.3.1 HA1 蛋白分子二硫键的变异和糖基化位点的变异情况 H1N1 血凝素的基因翻译后经过剪切,52 与 284、65 与 77、100 与 145、289 与 313 的半胱氨酸 C 间形成二硫键^[4]。南宁市 2008~2009 年 20 株 H1N1 二硫键形成位点未发生氨基酸水平的插入、替换或缺失。HA 蛋白潜在的糖基化位点序列为 N-X-T/S^[5]。对糖基化位点分析发现,两疫苗株在 HA1 区有 8 个糖基化位点,20 份本地毒株除 A/nanning/621/2008 氨基酸发生突变(N54K),减少一个糖基化位点。其他毒株糖基化位点相对保守,未发现氨基酸替换。

表 1 2008~2009 人类季节性 H1N1 流感病毒 HA1 受体结合位点变异情况位点比对

毒株	受体绑定位点					
	130 位环	190 位环				220 位环
	131	188	189	192	193	222
A/Solomon /3/2006	V	R	A	H	T	R
A/Brisbane/59/2007	—	K	—	—	—	Q
A/nanning/467/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/468/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/494/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/546/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/551/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/572/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/580/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/595/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/621/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/656/2008	—	M	T	—	K	Q
A/nanning/039/2009	A	K	T	—	—	Q
A/nanning/179/2009	—	K	T	—	—	Q
A/nanning/225/2009	—	K	T	—	—	Q
A/nanning/447/2009	T	K	T	—	—	Q
A/nanning/473/2009	—	K	T	—	—	Q
A/nanning/546/2009	A	K	T	—	—	Q
A/nanning/592/2009	A	K	T	—	—	Q
A/nanning/632/2009	A	K	T	—	—	Q
A/nanning/662/2009	—	K	T	N	—	Q
A/nanning/797/2009	A	K	T	—	—	Q

—:表示未检出。

2.3.2 HA1 蛋白分子上受体结合位点(RBS)的变异情况

HA 上的受体结合位点位于头部末端(HA1 部分),每个 HA

单体上有 3 个二级结构分别是 190 螺旋, 130 环, 220 环^[6]。HA1 编码序列受体结合位点变异情况见表 1, 在 3 个二级结构中 190 的 R188M(R188K)、A189T、H193N、T193K 氨基酸位点均发生了整体的替换; 220 位环 222 位点在 2008~2009 年的毒株以及 A/Brisbane/59/2007 中均为氨基酸 Q; 另外, 2009 年的毒株中已有多个毒株 130 位环的 131 位点发生 V131A (V131T) 的替换。

2.3.3 HA1 蛋白分子上抗原决定簇位点的变异情况 H1N1 流感病毒 HA1 蛋白有 4 个抗原决定簇分别为 Cb、Sa、Sb 和 Ca 区^[7-10]。通过对抗原位点的统计和分析, 47 个抗原位点有多个发生了变化, 其中 Sb、Ca、Cb 位点相对活跃, 而 Sa 位点相对保守。在发生氨基酸变异的抗原位点中, 相对于 A/Solomon /3/2006 或 A/Brisbane/59/2007 毒株, 20 份毒株的 HA1 发生替换的是 Sb 位点: 185、188、189、192; Ca 位点: 141、167; Cb 位点: 73; Sa 位点未发生氨基酸变异。2008 年的 10 份毒株在 188、189、193 位点与两疫苗株均不同; 2009 年毒株除个别毒株外, 在 185、189、141 位点与 A/Brisbane/59/2007 相比发生了整体的变异, 另外 A/nanning/473/2009 和 A/nanning/662/2009 分别在发生 H192N、N167K 点变异。

3 讨 论

通过对本地检测标本统计分析, 2008~2009 年南宁流感流行主要集中在夏秋季节, H1N1 和 H3N2 交替成为 2008 年和 2009 年的优势毒株。以上年度的 H1N1 血凝素基因重链区进化树显示, A/Solomon /3/2006 与 2008 年毒株属于分支 I, 而 A/Brisbane/59/2007 与 2009 年毒株属于分支 II。A/Brisbane/59/2007 作为 2008 年 11 月至 2010 年 4 月疫苗推荐毒株, 与 2008 年毒株相距较远。本地毒株 HA1 氨基酸序列二硫键和糖基化位点比较保守; 而 HA1 蛋白上的受体结合位点则相对活跃, 其中 190 位环氨基酸位点变异最大, 尤其是在 188 位和 189 位为高突变位点, 但 188 位和 189 位氨基酸位点并不直接与宿主受体唾液酸发生结合, 因此这些变化可能不影响 RBS 与受体结合的亲和力^[11]。Vines 等^[12]通过氨基酸定点替换实验证明了流感病毒 RBS 第 222 位和 224 位氨基酸的变化决定了病毒感染宿主的特异性。当 H3 病毒的 HA 同时发生 L222Q、S224G 突变时, 可使感染人的 H3 流感病毒能够感染禽类。本实验当中 H1N1 病毒的 RBS 的 222 和 224 位点分别为 Q 和 G, 这种替换是否影响病毒感染宿主的特异性, 尚有待考证。流感病毒 HA1 蛋白上的抗原决定簇的变异情况是评价该毒株是否有流行病学意义的关键因素, 新变种必须具备在其 HA 区抗原位点有 4 个以上氨基酸突变, 而且必须分布在 2 抗原决定簇区^[13]。分析表明, 2009 年毒株除 A/nanning/473/2009 外, 与对应的疫苗株相比抗原决定簇区氨基酸变异未达到 4 个; 2008 年毒株与 A/Solomon /3/2006 相比则存在 4 个氨基酸的替换并且分布在两个抗原决定簇区域。因此, 可以推测, 2008 年根据 WHO 疫苗推荐株生产的疫苗对该年南宁市 H1N1 亚型流感预防效果可能并不理想, 这将导致 2008 年南宁市 H1N1 亚型的流行的强度明显增加。而经历了 2008 年的流行后, 人群中有了保护抗体, 同时 H1N1 疫苗及时更新,

使得 H1N1 在 2009 年流行强度有了明显下降。

参考文献:

- [1] Palese P, Young JF. Variation of influenza A, B and C viruses [J]. *Science*, 1982, 215(4539): 1468-1474.
- [2] Pontoriero AV, Baumeister EG, Campos AM, et al. Antigenic and genomic relation between human influenza A (H3N2) viruses circulating in Argentina during 1998 and the H3N2 vaccine component [J]. *Rev Panam Salud Publica*, 2001, 9(4): 246-253.
- [3] Weis W, Brown JH, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid [J]. *Nature*, 1988, 333(6172): 426-431.
- [4] Austin FJ, Kawaoka Y, Webster RG. Molecular analysis of the haemagglutinin gene of an avian H1N1 influenza virus [J]. *J Virol*, 1990, 71(Pt 10): 2471-2474.
- [5] Sun S, Wang Q, Zhao F, et al. Glycosylation site alteration in the evolution of influenza A(H1N1) viruses [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22844.
- [6] Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin [J]. *Science*, 2004, 303(5665): 1838-1842.
- [7] Raymond FL, Caton AJ, Cox NJ, et al. The antigenicity and evolution of influenza H1 haemagglutinin, from 1950 - 1957 and 1977 - 1983: two pathways from one gene [J]. *Virology*, 1986, 148(2): 275-287.
- [8] Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, et al. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 Subtype) [J]. *Cell*, 1982, 31(2 Pt 1): 417-427.
- [9] Igarashi M, Ito K, Yoshida R, et al. Predicting the antigenic structure of the pandemic 2009 influenza virus hemagglutinin [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8553.
- [10] Al-Majhdi, Fahad N. Structure of the sialic acid binding site in influenza a virus: hemagglutinin [J]. *J Biol Sci*, 2008, 7(1): 113-122.
- [11] 傅天韵, 姜维义, 石铁流. 不同宿主 H1N1 病毒血凝素蛋白(HA)受体结合位点的变异特征 [J]. *遗传*, 2010, 32(7): 701-711.
- [12] Vines A, Wells K, Matrosovich M, et al. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction [J]. *J Virol*, 1998(72): 7626-7631.
- [13] 张焯, 温乐英, 赵翔, 等. 2004~2005 年中国 B 型流感病毒抗原性及基因特性研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006, 20(2): 11-13.