

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.30.016

重庆市 2009~2014 年甲型 H1N1 流感病毒分离株 HA 基因变异分析*

叶盛¹, 喻臻¹, 陈爽¹, 凌华^{1△}, 熊宇², 李勤²

(重庆市疾病预防控制中心:1. 微生物检测所;2. 传染病预防控制所, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 对 2009~2014 年分离得到的甲型 H1N1 流感病毒进行血凝素(HA)基因测序分析,与世界卫生组织(WHO)推荐疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)比对,研究其基因变异情况。**方法** 按分离时间及地点不同,选取 47 株 2011~2014 年分离得到的甲型 H1N1 流感病毒进行测序,同时选取既往已有的 25 株 2009 年甲型 H1N1 流感病毒的序列结果,经分子生物学软件进行核苷酸及氨基酸序列分析,并绘制系统进化树。**结果** 2009,2011~2014 年的新型甲型 H1N1 流感病毒与疫苗株均位于一个大的分枝下,各病毒间的关系均较近。72 株分离株的 HA 基因总的核苷酸差异在 0~2.7% 之间,氨基酸差异在 0~3.1% 之间;与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)的核苷酸差异在 0.4%~2.4% 之间,氨基酸差异在 0.9%~3.1% 之间。氨基酸变异情况随着年份增加累积得更多,但在氨基酸序列上仍显示为低致病性流感病毒特征;2009 年有 9 株病毒株丢失 481 位的糖基化位点,2013 年有 6 株病毒株增加位于 162 位的糖基化位点。**结论** WHO 推荐的甲型 H1N1 疫苗总体上对重庆地区的人群仍有较好的保护作用,但随着时间推移,部分甲型 H1N1 流感病毒株可能已发生抗原漂移,需继续对其监测。

[关键词] 甲型 H1N1;流感病毒;序列分析;HA 基因**[中图分类号]** R373.1+3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)30-4226-04

Variation of HA gene of influenza A H1N1 influenza virus isolated from 2009 to 2014 in Chongqing city*

Ye Sheng¹, Yu Zhen¹, Chen Shuang¹, Ling Hua^{1△}, Xiong Yu², Li Qin²

(1. Department of Microbe Detection; 2. Department of Infection Disease Control and Prevention, Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China)

[Abstract] **Objective** In order to analyze the variation of HA genes of influenza viruses (H1N1) by being compared with the vaccine strain A/California/07/2009(H1N1) recommended by WHO, influenza viruses (H1N1) isolated from 2009 to 2014 were selected to do this study. **Methods** According to the different isolating time and place, 47 strains of H1N1 collected from 2011 to 2014 were selected. Then the 47 strains' nucleotide sequence of HA genes which were sequenced in the study and other 25 sequences of HA genes which were sequenced in 2009 were collected. Nucleotide and amino acid sequences were analyzed by using molecular biology software, and the phylogenetic trees were drawn. **Results** A total of 72 strains isolated from 2009 to 2014 were closely related to the vaccine strain A/California/07/2009(H1N1), the nucleotide variance and amino acid variance between the 72 strains were 0~2.7% and 0~3.1% respectively. Compared with the vaccine strain A/California/07/2009(H1N1), the nucleotide variance and amino acid sequence variance were 0.4%~2.4% and 0.9%~3.1% respectively. The amino acids sequence indicated that, although the variance was increased by years, the H1N1 viruses were still showed characteristics of low pathogenic influenza viruses. It was also found that there were 9 strains lost their potential glycosylation site at HA protein site 481 in 2009, while in 2013 there were 6 strains got new potential glycosylation sites at HA protein site 162. **Conclusion** The vaccines (H1N1) recommended by WHO was still protective to people in Chongqing. But as time goes by, antigen drift may occur in some new antigenic drift strains and the routine monitoring of influenza viruses should be continued.

[Key words] H1N1; influenza virus; sequence analysis; HA gene

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的具有高度传染性的急性呼吸道传染病,传播迅速,短时间内可造成局部地区的暴发或全球范围的流行,也是人类迄今为止尚无法有效控制的传染病之一。流感病毒属正黏病毒科(orthomyxoviridae),按核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NP)和基质蛋白(matrix protein, MP)不同,分为甲(A)、乙(B)、丙(C)3型。流感病毒的流行与流感病毒的抗原变异密切相关,甲型流感病毒抗原变异主要有抗原漂移和抗原转变,一般认为抗原漂移常带来甲型流感病毒不同程度的流行。甲型流感病毒的亚型由血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)两种主要表面蛋白决定。HA基因是流感病毒的主要抗原基因,其编码的HA蛋白具有免疫原性,能使人体产生保护性抗体^[1];同时其承受的免疫压力

也较大,进化和变异速度相对较快。

2009年暴发于墨西哥、美国的新型甲型流感,其病原为重组的新型流感病毒^[2],该病毒传播迅速,几个月内即在世界范围内流行。该病毒于2009年5月进入我国大陆^[3],2009年6月重庆即出现首例甲型H1N1流感病例,自此,该病毒由输入性个案病例迅速本土化并造成重庆市本地区内的暴发流行^[4-5]。随着人群自然免疫和疫苗的接种,甲型H1N1流感病毒活动性似乎逐渐减弱,但其对人群的危害仍未消除。持续关注甲型H1N1流感病毒的HA基因和HA蛋白的变异情况,可为流感疫苗的筛选及病毒演化趋势判断提供重要的参考依据。

1 材料与方法**1.1 病毒来源** 2011~2014年,对重庆市疾病预防控制中心

* 基金项目:重庆市卫计委医学科科研基金资助项目(2011-2-316)。 作者简介:叶盛(1981-),主管技师,硕士,主要从事流感、禽流感的检测与研究。 △ 通讯作者, Tel: (023)68811571; E-mail: Linghuax@163.com。

表 1 甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因扩增引物序列

基因片断	起始位点	5'-3'序列
片断 1	正向引物	1 TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATA CGA CTA GCA AAA GCA GGG G
	反向引物	461 CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCA TGA TTG GGC CAY GA
片断 2	正向引物	351 TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACR TGT TAC CCW GGR GAT TTC A
	反向引物	943 CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAA AKG GGA GRC TGG THT TTA
片断 3	正向引物	379 TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACR TGT TAC CCA GGR GAT TTC
	反向引物	1 204 CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCT TTA CCY ACT RCT GTG AA
片断 4	正向引物	736 TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGR ATG TAC TAT TAC TGG AC
	反向引物	1 340 CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTC TKC ATT RTA WGT CCA AA
片断 5	正向引物	1 124 TGT AAA ACG ACG AGT TGG ATG GTA YGG TTA YCA YCA
	反向引物	1 541 CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCA TAA GTY CCA TTT YTG A
片断 6	正向引物	1 204 TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAG ATG AAY ACR CAR TTC ACA G
	反向引物	1 778 CAG GAA ACA GCT ATG ACC GTG TCA GTA GAA ACA AGG GTG TTT

流感网络实验室各哨点医院的样品及各区县流感暴发样品进行核酸检测和病毒分离,得到流感病毒株。将得到的毒株中的甲型 H1N1 病毒株按分离时间及地点不同,选取代表毒株。

1.2 方法

1.2.1 目的基因扩增 将选取的病毒分离株用全自动样品处理工作站(QIA Symphony SP, QIAGEN, 德国)及该工作站配套 RNA 提取试剂(QIASymphony Virus/Bact Mini Kit, QIAGEN, 德国)提取病毒 RNA,经逆转录试剂盒(SuperScript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen, 美国)逆转录后制备出病毒 cDNA,再取病毒 cDNA 为模板,用普通聚合酶链式反应(PCR)预混装试剂盒(GoTaq® Hot Start Green Master Mix, Promega, 美国)和表 1 中的引物(Invitrogen 合成, 美国)完成病毒 HA 基因核酸的 PCR 扩增,经电泳(E-Gel® 琼脂糖凝胶电泳系统, Invitrogen, 美国)后,观察到目的条带确认目的片断扩增成功。

1.2.2 基因测序与序列分析 含有目的片断的 PCR 反应产物直接送 Takara 和 Invitrogen 公司进行基因测序。测序所得序列经校对后采用 BIOEDIT 7.0 软件进行序列比对和剪切;采用 MEGA 4.0.2 基于 Neighbour-joining(NJ)法生成系统发生树,并进行序列分析和氨基酸位点差异分析;使用 DNASTAR 5.0 软件包的 MegAlign 软件进行核苷酸和氨基酸序列差异分析。

2 结 果

2.1 流感监测结果与病毒分离结果 除去 2009 年 6 月至 2010 年 3 月甲型 H1N1 在重庆地区的首次暴发流行期,从 2010 年 11 月至 2015 年 11 月共计 61 个自然月中,甲型 H1N1 共计出现两次流行,分别是 2010 年 12 月至 2011 年 3 月,和 2012 年 12 月至 2014 年 4 月(图 1);在这 61 个自然月中,共采集标本 26 108 份,共分离到流感病毒 2 098 株,总体病毒分离率为 8.04%,共分离得到甲型 H1N1 毒株 288 株,占所分离到病毒总数的 13.7%。在上述 288 株病毒株中选取 47 株甲型 H1N1 病毒株经基因测序后序列整理与拼接,得到其 HA 基因组序列信息。

2.2 基因进化分析 经与世界卫生组织(WHO)推荐疫苗株 A/California/07/2009(H1N1),以下简称 CA/07/09(HA 基因 Genbank 收录号为 GI:758899355)比对,47 株 2011~2014 年分离病毒株均未出现核苷酸插入与缺失。将上述 47 株病毒的 HA 基因序列与已有的 2009~2010 年流行期的 25 株 H1N1 病毒的 HA 基因序列和 A/Beijing/262/1995(H1N1)和 A/swine/Jiangsu/s16/2011(H1N1)的 HA 序列对齐剪切后生成基因进化树(图 2)。在图 2 所示的进化树上,除 A/Beijing/

262/1995(H1N1)和 A/swine/Jiangsu/s16/2011(H1N1)两株毒株外,2009 年、2011~2014 年的新型甲型 H1N1 流感病毒与疫苗株均处于一个大的分枝下,各病毒间的关系均较近,相邻年份的病毒聚集并交叉分布在相邻的分枝上;2009 与 2011 年分离病毒株包括疫苗株均交叉分布于一个大的分枝上,而 2013~2014 年的病毒株分布于另一大分枝上。

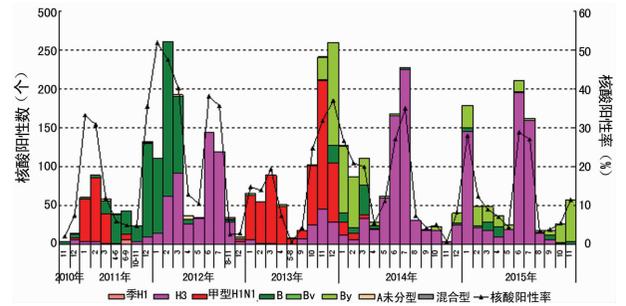


图 1 重庆市 2010 年 11 月至 2015 年 11 月流感检测情况

2.3 核苷酸及氨基酸差异情况 72 株分离株的 HA 基因总的核苷酸差异在 0~2.7%之间,氨基酸差异在 0~3.1%之间;与疫苗株 CA/07/09 的核苷酸差异在 0.4%~2.4%之间,氨基酸差异在 0.9%~3.1%之间,见表 2。

表 2 2009~2014 年甲型 H1N1 流感病毒株核苷酸及氨基酸差异情况 (%)

病毒分离年份	序列数	分离株间 HA 差异		与疫苗株 HA 差异	
		核苷酸差异	氨基酸差异	核苷酸差异	氨基酸差异
2009 年	25	0.1~1.0	0.2~2.1	0.4~1.0	0.9~2.1
2011 年	10	0.0~1.8	0.0~2.5	1.0~1.3	1.8~2.2
2013 年	33	0.0~2.7	0.0~3.1	1.2~2.4	1.8~3.1
2014 年	4	0.2~2.0	0.0~2.5	1.7~2.0	2.2~2.5

2.4 氨基酸变异情况 2009~2014 年 72 株甲型 H1N1 分离株与疫苗株 CA/07/09 的 HA 氨基酸序列存在 3 个共同的差异位点,分别是 P83S(减去信号肽序列号,以下序列位点相同)、S203T 及 I321V。除此之外,各年度分离到的病毒株与 CA/07/2009 在不同的氨基酸位点各有差异。2011 年的 10 株病毒株在 2009 年的变异基础上全部增加 R223Q、E374K 变异;2013 年的 33 株病毒株全部出现 D97N、S185P/T、E374K、S451N 变异;2014 年的 4 株病毒株则全部出现 D97N、K163Q、S185T、R223Q、A256T、K374E、S451N、E499K 变异,见表 3。

表 3 2009~2014 年毒株相对疫苗株 CA/07/09 氨基酸位点变化情况

病毒分离年份	氨基酸位点										
	83(P>S)	97(D>N)	163(K>Q)	185(S>T/P)	203(S>T)	223(R>Q)	256(A>T)	321(I>V)	374(E>K)	451(S>N)	499(E>K)
2009 年	+				+			+			
2011 年	+				+	+		+	+		
2013 年	+	+		+	+			+		+	
2014 年	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

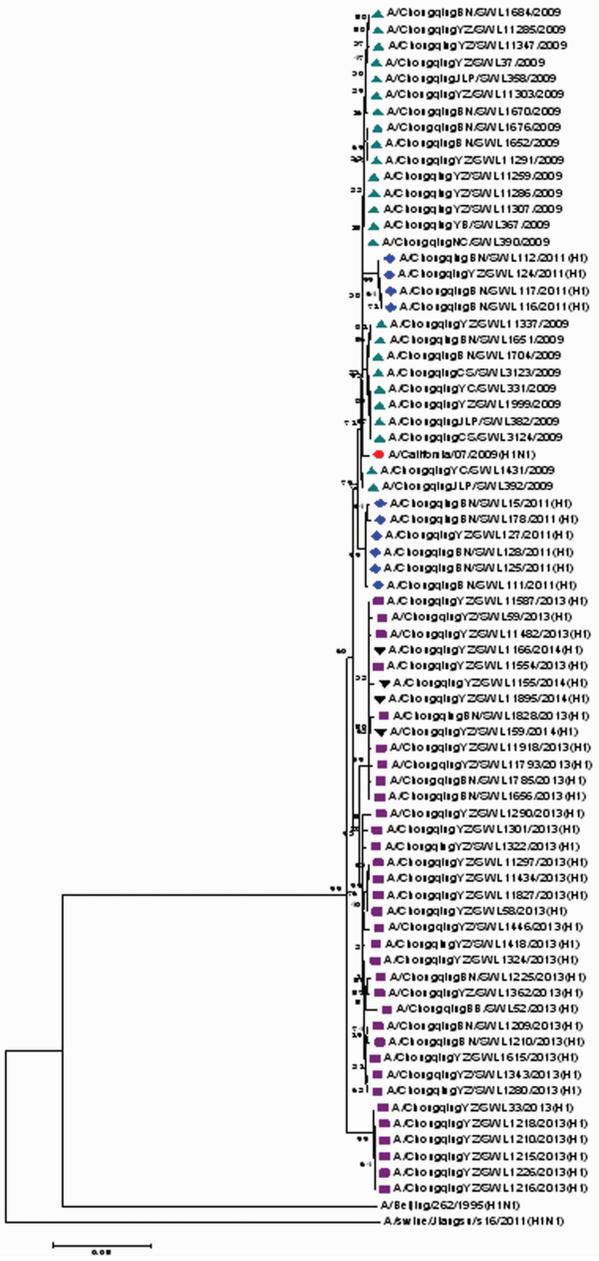


图 2 基于 HA 基因的系统进化树

2.5 致病性分析 本次研究的所有甲型 H1N1 流感病毒均表现为低致病性特征。病毒裂解位点氨基酸序列为 VPSIQSR ↓ GLFGAIA, HA1 与 HA2 间仅由一个碱性氨基酸 R(第 327 位)连接,其水解位点附近未见多个连续碱性氨基酸,属于低致病性流感病毒特征^[6]。

2.6 糖基化位点分析 本次研究中的所有甲型 H1N1 病毒,其糖基化位点大部分与疫苗株 CA/07/09 相同,共有 8 个稳定

的糖基化位点,其中,HA1 区有 6 个糖基化位点,分别位于 10、11、23、87、276 和 287 位点,HA2 区有 2 个糖基化位点,分别位于 481 和 540 位点。2009 年有 9 株病毒株(9/25)丢失 481 位点的糖基化位点,2013 年有 6 株毒株(6/33)增加位于 162 位的糖基化位点,见图 3。

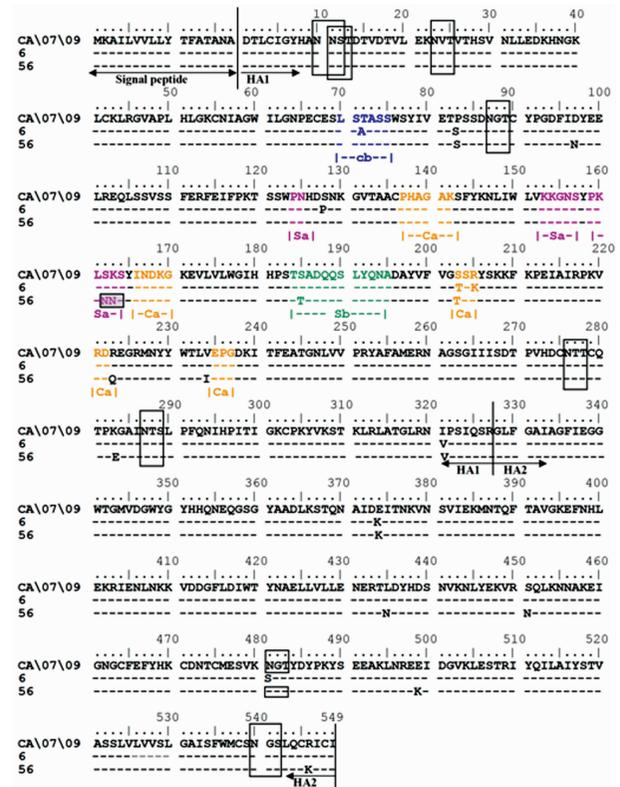


图 3 WHO 推荐疫苗株与部分病毒分离株的 HA 基因编码氨基酸序列对比

图 3 WHO 推荐疫苗株与部分病毒分离株的 HA 基因编码氨基酸序列对比

3 讨论

自 2009~2010 年初的甲型 H1N1 暴发流行过后,重庆地区从 2010 年 11 月至 2015 年 11 月又出现了两轮甲型 H1N1 流感病毒流行高峰,这与我国其他地区的情况基本相同^[7]。本次研究选择了 2011~2014 年分离的共 47 株甲型 H1N1 流感病毒株,以及 25 株 2009 年的甲型 H1N1 病毒核苷酸资料,对共计 72 株甲型 H1N1 病毒的 HA 基因进行了分析。从核苷酸及氨基酸差异性上看,所有毒株与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)仍保持较高的同源性。在基因进化树上,所有甲型 H1N1 包括疫苗株均在同一分枝上,各病毒株与疫苗株的距离不大,提示疫苗对重庆地区的甲型 H1N1 应仍有效;但

2013 年与 2014 年的病毒比 2009 年和 2011 年的病毒离疫苗株更远,提示随着年份增加,H1N1 病毒与疫苗株的基因序列差异在增加,这也与福建、江苏、陕西等地的甲型 H1N1 病毒与疫苗株的情况类似^[8-9]。氨基酸变异情况对比显示,本次研究中甲型 H1N1 流感病毒共有的氨基酸序列变异,随着年份增加而累积得更多,其中,2013 年与 2014 年的毒株变异情况也与江苏省的甲型 H1N1 流感病毒变异情况相似。这说明因氨基酸序列改变而发生的抗原性变化逐年积累的可能性较大。

与甲型 H1N1 流感病毒 HA 抗原性密切相关的 4 个抗原决定簇位于 HA1 区域,分别是 Ca(137~142、166~170、203~205、221~222、235~237)、Cb(70~75)、Sa(124~125、153~157、159~164)、Sb(184~195)^[10-12]。一般认为,HA1 区蛋白分子上有 4 个以上氨基酸位点发生变异,且变异涉及 2 个或 2 个以上抗原决定簇上的位点,或一个涉及抗原决定簇另一个涉及受体结合位点,将可能会出现新的抗原漂移株^[13]。本次研究中,2009、2011 和 2014 年的毒株均未出现上述情况。但 2013 年的毒株有 14 株毒株(14/33)出现 4 处及以上的氨基酸位点变异,且涉及 2 个及以上抗原决定簇。其中,A/重庆渝中/SWL59/2013(H1)出现 A73E、K163Q、S185T、S203T 4 个位点的变异,且 4 个位点分别位于 Cb、Sa、Sb 和 Ca 区。因此,该甲型 H1N1 流感病毒株可能出现抗原漂移现象,但 2014 年的毒株暂未观察到上述位点的持续变异,上述抗原漂移是否能够持续存在及积累,还需要对将来可能出现的甲型 H1N1 流感病毒继续监测。

糖基化在稳定蛋白的三维结构和其被水解,以及阻碍抗体的识别中起到重要作用。糖基化位点的改变或增减会对病毒的抗原性和生物特性带来一定的影响;特别是当糖基化位点的改变发生在抗原决定簇时,可能会造成病毒抗原性改变,产生抗原漂移^[14-15]。本次研究中,有 9 株 2009 年的甲型 H1N1 病毒株丢失 481 位的糖基化位点,但由于 481 位点不在抗原决定簇上,481 位的糖基化位点丢失对于毒株的抗原性改变影响可能不大;但另有 6 株 2013 年的毒株出现 162 位点糖基化,且 162 位点刚好位于 Sa 区,因此,该 6 株病毒有可能出现抗原性改变。同时,该 6 株病毒株中,A/重庆渝中/SWL11297/2013(H1)、A/重庆渝中/SWL11434/2013(H1)、A/重庆渝中/SWL58/2013(H1)和 A/重庆渝中/SWL11827/2013(H1)病毒株同时出现了 3 个抗原决定簇的氨基酸变异,这几株病毒的抗原性是否有改变,需对其进行进一步的抗原性分析。

综上所述,本次研究提示,2009~2014 年重庆市甲型 H1N1 流感病毒与疫苗株 A/California/07/2009(H1N1)相比,虽然变异程度逐年积累,但总体上甲型 H1N1 流行株与疫苗株仍保持较高的同源性,疫苗对本地区人群仍有较好的保护作用。但随着时间推移,相对于疫苗株,2013 和 2014 年的甲型 H1N1 病毒株已经出现一定的变异,部分病毒株的 HA 蛋白可能已发生抗原漂移。因此,持续监测甲型 H1N1 流感病毒,可以及时准确地发现抗原漂移株,掌握甲型 H1N1 流感病毒的流行与进化规律,预测其发生、发展情况,为可能的暴发流行做好充分的准备,为科学有序地防控甲型 H1N1 流感提供依据。

参考文献

[1] Drescher J, Aron R. Influence of the amino acid differ-

ences between the hemagglutinin HA1 domains of influenza virus H1N1 strains on their reaction with antibody [J]. *J Med Virol*, 1999, 57(4): 397-404.

- [2] Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl JA, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. *Nature*, 2009, 459(7250): U107-1122.
- [3] 王伟,潘明,常国辉,等.中国内地首例确诊甲型 H1N1 流感病例的实验室检测[J]. *病毒学报*, 2009, 25(S1): 4-7.
- [4] 李勤,肖达勇,龙江,等.重庆市甲型 H1N1 流感流行特征及趋势分析[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(21): 4003-4006.
- [5] 肖邦忠,李勤,凌华,等.重庆市 2009 年 6~10 月甲型 H1N1 流感疫情特征分析[J]. *重庆医学*, 2010, 39(2): 222-223, 240.
- [6] Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(2): 243-267.
- [7] 资海荣,郭艳,邓斐,等.江苏省 2013 年甲型 H1N1 (09pdm)流感病毒血凝素和神经氨酸酶分子特征分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6): 812-822.
- [8] 马萍,许晶,张蕾,等.陕西省 2012~2014 年甲型 H1N1 流感的基因特性研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2015, 16(1): 9-13.
- [9] 谢剑锋,沈晓娜,王美爱,等.福建省甲型 H1N1 流感病毒基因特征研究[J]. *病毒学报*, 2014, 30(1): 37-43.
- [10] Xu R, Ekiert DC, Krause JC, et al. Structural basis of pre-existing immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus [J]. *Science*, 2010, 328(5976): 357-360.
- [11] Igarashi M, Ito K, Yoshida R, et al. Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8553.
- [12] Huang JW, Lin WF, Yang JM. Antigenic sites of H1N1 influenza virus hemagglutinin revealed by natural isolates and inhibition assays [J]. *Vaccine*, 2012, 30(44): 6327-6337.
- [13] 郭元吉,程小雯.流行性感冒病毒及其实验技术[M].北京:中国三峡出版社,1997:41-47.
- [14] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin [J]. *J Infect Dis*, 1997, 176(Suppl 1): S24-S28.
- [15] Abe Y, Takashita E, Sugawara K, et al. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin [J]. *J Virol*, 2004, 78(18): 9605-9611.

(收稿日期:2016-04-01 修回日期:2016-06-29)