

广东地区 1996 年流感暴发的分子变异基础*

黄平, 沈桂章, 倪汉忠, 周惠琼

(广东省疾病预防控制中心, 原广东省卫生防疫站, 广东广州市 510300)

Molecular Evolution of Guangdong Influenza Virus Isolates
in Influenza Outbreak in 1996

HUANG Ping, SHEN Gui-zhang, NI Han-zhong, ZHOU Hui-qiong

(Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

Abstract: It was demonstrated that there was significantly antigenic drift in the influenza virus strains from Guangdong in 1996. It was the molecular basis of the variation on A, B, C, D and E domain encoded by HA gene, especially on A, C and E domain while the change of receptor binding domain played the slight roles in the 1996 influenza outbreak. In the other hand, the variation of No 145 and No 193 encoded by HA gene resulted in biological-feature changes of epidemical influenza isolates, which could be isolated and cultured by MDCK cell-lines, but difficultly by embryonated-eggs.

Key words: Influenza Virus; HA Gene; Variation

摘要: 1996年广东地区流感毒株发生明显的血清学抗原漂移;引起广东地区流感暴发的分子基础是流感毒株HA基因编码的A、B、C、D和E五个抗原决定簇位点变异,尤其是A、C、E位点发生氨基酸改变;而受体结合位点的氨基酸改变对此流感流行未发挥明显影响。HA基因编码氨基酸的第145号和第193号位点变异导致流行毒株的生物学特性改变,即分离毒株适应于MDCK细胞株生长,而难以适应鸡胚生长环境。

关键词: 流感病毒;血凝素基因;变异

中图分类号: R373.13 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0001-05

广东地区1996年2~7月发生流感广泛流行,感染者多为青少年及婴幼儿^[1]。我们在开展流行调查的基础上,对于1995~1996年广东地区流感毒株血凝素(HA)基因进行研究,以探讨广东地区的流行毒株的血清学、核苷酸序列和抗原位点的变异在引发流感暴发中的作用。

1 材料与方法

1.1 毒株与抗血清

在广东省流感监测网各监测点中,筛选流行初

期或流感季节早期的毒株作为研究对象,血清学鉴定为甲型流感病毒H₃N₂亚型(或称甲3型),如表1所示。国际标准株抗血清(抗A/Alaska/10/95和抗A/Nanchang/993/95)由美国疾病控制中心(CDC)的世界卫生组织(WHO)流感合作中心制备;广东地区流感毒株抗血清由广东省疾病预防控制中心(原广东省卫生防疫站)按照WHO实验方法免疫制备

1.2 引物

引物由WHO流感合作中心设计。PCR引物:引物H₃F-007(核苷酸序列007-024),ACTATTGT-

收稿日期:1999-09-28,修回日期:1999-11-01

* 基金项目:世界卫生组织资助项目(WP/ICP/PHC/014/VD/94);CDC资助项目(E809030)

作者简介:黄平(1963-),男,副主任医师,医学硕士,从事病毒学研究及防治工作。

表1 广东省1995、1996年分离的流感毒株
Table 1 The strains from Guangdong in 1995 and 1996

毒株名称 Strain	采样时间 Date	采样地点 Spot	分离方法 Method
A/GD/8/95	1995.4.24	韶关市 SHAOGUAN	鸡胚羊膜腔 Amniotic inoculation
A/GD/1/95	1995.5.11	肇庆市 ZHAOQING	鸡胚尿囊腔 Allantoic inoculation
A/GD/1/96	1996.3.16	广州市 GUANGZHOU	MDCK 细胞株 MDCK cell-lines
A/GD/8/96	1996.4.2	韶关市 SHAOGUAN	鸡胚羊膜腔 Amniotic inoculation
A/GD/4/96	1996.4.16	湛江市 ZHANJIANG	鸡胚羊膜腔 Amniotic inoculation
A/GD/7/96	1996.4.23	广州市 GUANGZHOU	MDCK 细胞株 MDCK cell-lines

CATCTTGAGC(0.5 mg/ μ L);引物 H₃R-1184(核昔酸序列 1184-1167), ATGGCTGCTGAGTGCTT(0.5 mg/ μ L)。核昔酸序列分析引物(0.05 mg/ μ L)均为逆相引物,引物 H₃R-362;TAAGGGTAACAG-TTGCTG;引物 H₃R-570;TGGCATAGTCACGTT-CAG;引物 H₃R-792;CAGTATGTCTCCCGGTTT;引物 H₃R-1073;CCTGCTATTGCGCCGAAT。

1.3 方法^[2]

(1)抽提 RNA:病毒悬液 50 mL,加 250 μ L RLT 溶解缓冲液、 β 巯基乙醇和 EtOH,置于抽提柱混匀,10 000 r/min 15 s 离心 3 次。将抽提柱加 15 μ L 蒸馏水置 1 min 后,离心即得抽提的 RNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。(2)合成 dsDNA 与纯化:抽提 RNA 3 μ L, dNTPs 8 μ L,引物 H₃F-007(0.5 μ g/ μ L) 1 μ L,再加逆转录酶和 RNA 酶抑制剂,制备 cDNA,进行 PCR 扩增。用纯化柱纯化 dsDNA,置 -20 $^{\circ}$ C 保存。(3)磷酸化与测序:5 μ L 纯化后 PCR 产物,加核昔酸外切酶 I 和虾碱性磷酸酶,37 $^{\circ}$ C 15 min。PCR 产物 7 μ L,加蒸馏水 2 μ L,引物 1 μ L;引物 H₃R-362、H₃R-570、H₃R-792 和 H₃R-1073 各为 1 管。然后 100 $^{\circ}$ C 3 min,置于冰盒。根据试剂说

明书上步骤,逐步添加 4 种 dNTP、4 种末端核昔酸混合物、³²P dATP、序列分析 DNA 聚合酶、4 种末端核昔酸混合物以及终止溶液;置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。(5)电泳与曝光:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,1 500 V 3~5 h 后卸胶;置于醋酸混合液浸泡 15 min。将凝胶置于凝胶干燥器,80 $^{\circ}$ C 60 min。将干燥的凝胶置于 X 光胶片上,曝光 24~48 h。(6)读片分析:定影后,阅读各段序列。检索甲 3 型流感毒株 HA 基因核昔酸序列,与 A/Tianjiang/33/92、A/Hebei/12/93、A/Kitakyushu/129/93、A/GD/28/94、A/Sendai/384/94、A/Hebei/19/95 进行比较分析^[3]。

2 结果

2.1 血清学抗原分析

采用血凝抑制试验(HI)鉴定 1995、1996 年广东地区毒株的抗原性,血清学实验结果如表 2 所示。1996 年毒株 A/GD/1/96 与 1995 年三株毒株 A/Alaska/10/95、A/Nanchang/993/95、A/GD/1/95 比较,显示血凝抑制试验抗原比(r)分别为 5.67、2.83 和 2.83,揭示广东地区 1996 年流行毒株发生显著的血清学抗原漂移^[4]。

表2 1995、1996 年广东地区毒株的血凝抑制实验结果

Table 2 Hemagglutination inhibition test of Guangdong strains in 1995 and 1996

	A/Alaska/10/95	A/Nanchang/993/95	A/GD/1/95	A/GD/1/96
Anti-A/Alaska/10/95	1:2560	1:640	1:320	1:320
Anti-A/Nanchang/993/95	1:1280	1:1280	1:640	1:320
Anti-A/GD/1/95	1:160	1:160	1:1280	1:320
Anti-A/GD/1/96	1:320	1:640	1:640	1:1280

2.2 核昔酸及氨基酸一级结构

1995 年、1996 年广东地区 6 株毒株 HA₁ 基因核昔酸序列如图 1 所示。在 HA₁ 基因 984 个核昔酸中,32 个核昔酸位点发生内部置换。其中,1996 年 4 株毒株 HA₁ 基因核昔酸序列与 1995 年 A/GD/1/95 毒株比较,共有 11 个核昔酸位点均发生相同

置换。

广东地区 6 株毒株 HA₁ 基因氨基酸序列如图 2 所示。与 A/Tianjiang/33/92 比较,1993~1996 年 11 株毒株共有 30 个氨基酸位点发生变异,占 9.1% (30/328)。其中,1995 年 A/GD/1/95 和 A/GD/8/95 毒株氨基酸变异位点有第 124 号;D→G;第 135

A	001	CAAAAACCTTC	CCGAAATGA	CAACACCACG	GCAACGCTGT	GCCTGGGATA	CCATGCAATG	CCAAACGGAA	CCCTAGTGAA							
	081	AACAATCAAG	AATGATCAAA	TTGAAGTGAC	TAATGCTACT	GAGCTGGTTC	AGAGTTCCTC	AACAGGTAGA	ATATGGGACA							
	161	GTCTCAGCG	AATCCTTGAT	GGAAAAAAT	GCACACTGAT	AGATGCTCTA	TTGGGAGACC	CTCATTCTGA	FGCTTCCAA							
	241	AATAAGGAGT	GGGACCTTTT	TGTTGAACGC	AGCAAAGCTT	ACAGCAACTG	TTACCTTAT	GATGTGCCG	ATTATGCCTC							
	321	CCTTAGGTCA	CTAGTTCCT	CATCAGGCAC	CCTGGAGTTT	ACCAATGAAG	GCTTCAATTC	GACTGGAGTC	GCTCAGGATG							
	401	GAACAAGCTC	TGCTTGCAAA	AGGGGATCTS	TAAACAGTTT	CTTTAGTAGA	TTCAATTGGT	TGCACAAAT	AGAATACAAA							
	481	TATCCAGCAC	TGAACGTGAC	TATCCCAAAAC	AATGACAAAT	TTGACAAAT	GTACATTTGG	GGGTTTCAAC	ACCCGAGTAC							
	561	GCACAGTCTC	CAAAACCAGCC	TATATGTTCA	ATCATCAGGG	AGAGTCACAG	TCTCTACCAA	AAGAAGCCAA	CAAACCTGTAA							
	641	TCCCGAATAT	CGGGTCTAGA	CCCTGGGTGA	GGGGTATCTC	CAGCAGAATA	AGCATCTATT	GGACAATAGT	AAAAACGGGA							
	721	GACATACTTT	TGATTAACAG	CACAGGGAAT	CTAATTGCTC	CTCCGGGTTA	CTTCAAAATA	CGAAATGGGA	AAAGCTCAAT							
	801	AATGAGGTCA	GATGCACCCA	TTGGCAACTG	CAATCTGAA	TGCATCACTC	CAAAATGGAAG	CATTCCCAAT	CACAAACCTT							
	881	TTCAAAATGT	GAACAGGATC	AGATATGGGG	CCTGTCCAG	ATATGTTAAG	CAAAACACTC	TCAAATTTGC	AACAGGGATG							
	961	CCGAATGTAC	CAGAGAAACA	AACT												
B		026	030	090	096	145	160	162	233	249	318	345	366	370	397	410-435
	A/GD/1/95	-C	-G	-G	-T	-G	-A	-T	-G	-G	-C	-A	-T	-G	-G	-C
	A/GD/8/95	-G	-A	-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/7/96	-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/4/96	-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/8/96	-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/1/96	-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/1/95	-C	-G	-C	-T	-T	-C	-C	-T	-G	-G	-A	-C	-A	-G	-G
	A/GD/8/95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/7/96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/4/96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/8/96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A/GD/1/96	-T	-A	-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图 1 广东地区 1995、1996 年流感毒株 HA₁ 基因核苷酸序列A, A/GD/1/95 毒株 HA₁ 基因全序列; B, 6 株流感毒株 HA₁ 基因序列差异。Fig. 1 The Nucleotide sequencing of HA₁ of Guangdong strains in 1995 and 1996A, Nucleotide sequencing of HA₁ of A/GD/1/95 strain;B, Comparison with nucleotide sequencing of HA₁ of 6 influenza strains.

号:G→T;第 172 号:G→D/H;第 197 号:R→Q;第 226 号:Q→I。1996 年 4 株流感病毒(包括部分 1995 年毒株)均发生变异的位点有第 145 号:N→K;第 172 号:G→D;第 197 号:R→Q;第 262 号:N→S;第 278 号:S→N。

2.3 抗原决定簇位点及鸡胚适应位点

如图 2 所示, HA 基因编码的 A、B、C、D 和 E 共 5 个抗原决定簇中, 与 A 位点变异有关的氨基酸位点包括第 122 号、第 124 号、第 133 号、第 135 号、第 137 号和第 145 号; B 位点有第 157 号、第 190 号、第 194 号、第 193 号、第 197 号和第 198 号; C 位点有第 54 号、第 275 号、第 276 号、第 278 号; D 位点有第 172 号、第 203 号、第 214 号、第 226 号均发生变异; E 位点第 262 变异。1995 年两株毒株中, A 位点的

第 124 号、B 位点的第 157 号和 197 号、C 位点的第 278 号、D 位点的第 172 号均发生有意义变异。1996 年四株毒株在 1995 年氨基酸位点变异的基础上, 不仅增加抗原决定簇的氨基酸变异数量, 而且变异范围扩大至 5 个抗原决定簇位点。1996 年增加变异的氨基酸有 A 位点第 145 号、E 位点的第 262 号; 此外, 除 A/GD/7/96 外, 其余毒株的 C 位点均变异(第 054 号); 来自广州的 A/GD/1/96 和来自韶关的 A/GD/8/96 毒株的 A 位点(第 124 号和第 133 号)和 C 位点(第 275 号)均发生变异。

在 HA₁ 基因编码氨基酸中, A/Tianjing/33/92 有糖基化位点 8 个, 分别位于 8、22、38、63、126、165、246 和 285 位点; 而 1994 年和 1995 年部分毒株仅有 7 个糖基化位点, 减少第 156 位点。1996 年

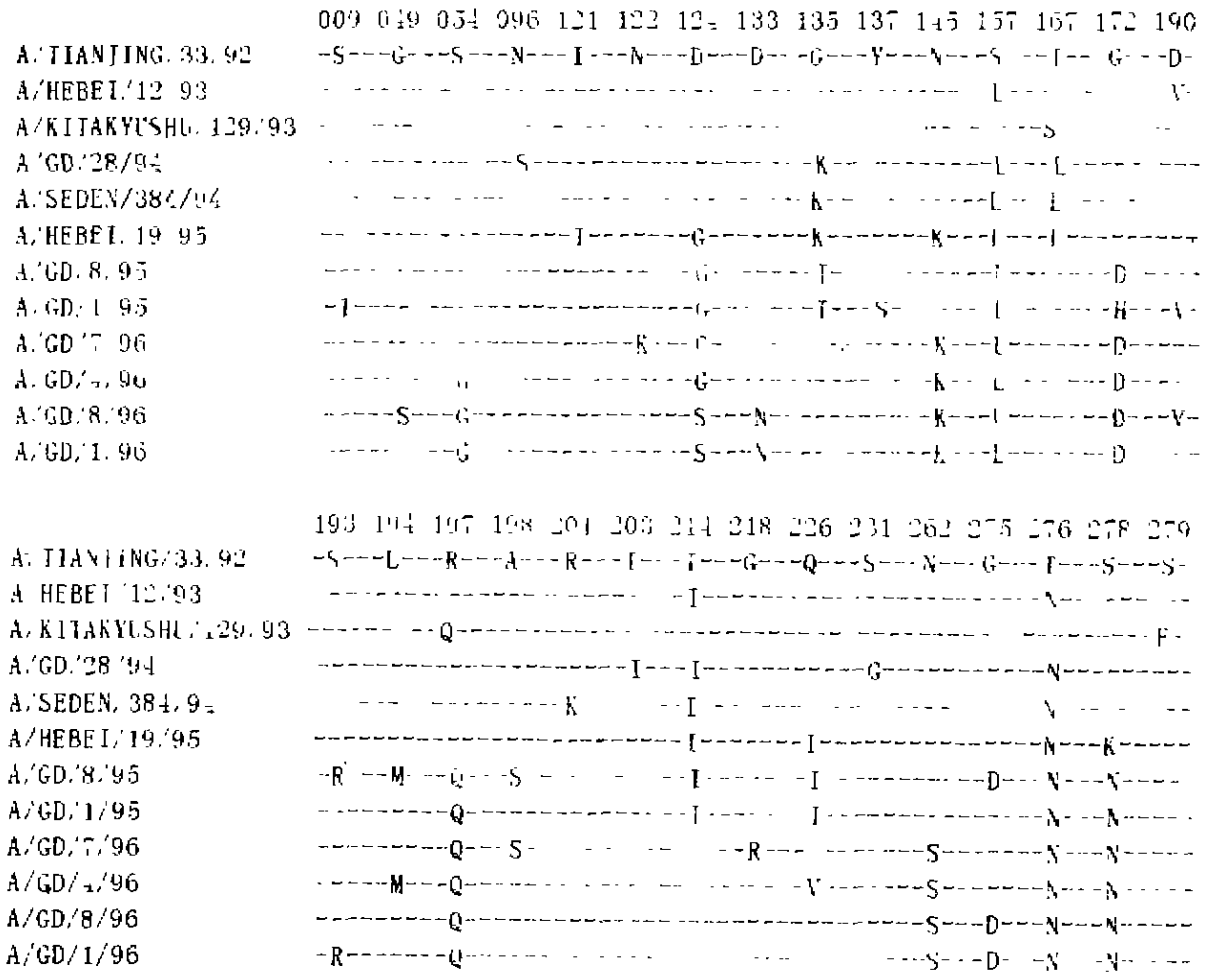


图2 广东地区1995、1996年流感毒株HA₁基因编码氨基酸变异位点
 Fig. 2 The changeable sites of amino acid of HA₁ in Guangdong strains in 1995 and 1996

毒株HA编码的抗原中,构成二硫键的半胱氨酸未改变。

与流感病毒侵袭力有关的受体结合部位也发生氨基酸变异,变异位点发生在第135号、第137号、第190号、第194号、第226号。从图2发现,该位点变异具有随机性和回复性,尚未稳定。

HA基因编码氨基酸与毒株生长环境(鸡胚或MDCK细胞株)的适应性有关。如图2所示的氨基酸变异位点有第145号:N(天冬酰胺)→K(赖氨酸);第193号:S(丝氨酸)→R(精氨酸);第276号:T(苏氨酸)→N(天冬酰胺)。可以发现,该氨基酸位点在1996年(甚至包括1995年)变异幅度增加,并导致鸡胚培养的生物特性改变。

3 讨论

1996年广东地区绝大多数市、县均出现甲3型

流感局部暴发或小规模流行,并有向周边地区传播有报告,我国北方地区也先后发生流感局部暴发^[1,5]。我们采用血清学抗原分析方法,比较1996年流行毒株A/GD/1/96与1995年三株来源不同的毒株的抗原性,结果显示发生了明显的抗原漂移。

HA是流感病毒毒粒的主要糖蛋白,分子量75K。HA基因编码的抗原决定簇有A、B、C、D和E位点,各位点之间存在着一定程度的氨基酸区域重叠。有报告,变异毒株的条件是至少有4个氨基酸在2个以上的抗原决定簇位点被置换^[6]。然而,1995年广东地区毒株尽管已有HA中的A、B、C和D四位点发生氨基酸改变,但并未引起流感流行这可能的原因包括:(1)毒株的抗原变异幅度尚未达到阈值;(2)机体免疫力因素的存在。而1996年毒株在1995年氨基酸变异的基础上,不仅五个抗原决

定簇位点均发生氨基酸变异而且每个抗原决定簇的氨基酸位点变异范围增大,尤其是A、C、E抗原位点的改变,终于引起广东乃至全国的流感流行。

流感病毒的侵袭力不仅取决于抗原变异,毒粒对于呼吸道上皮细胞的吸附作用(即受体结合作用)也是毒力的重要表现。HA基因的受体结合位点的氨基酸改变将提高毒粒的感染性可能性。一般受体结合位点由第190、第194位点、第226位点等氨基酸组成;与Lindstrom的报告^[3]比较,我们实验研究揭示1995年和1996年广东地区毒株尽管也发生受体结合位点的氨基酸改变,但在本次流感暴发起因中未起主导作用;而编码抗原的基因变异是导致流感广泛流行的主要原因。人群普遍易感新变异株,尤其是青少年和婴幼儿表现明显。

根据实验室病毒分离和鉴定发现,此次流感流行毒株的生物学特性包括:(1)毒株适应于MDCK细胞株生长,而难以适应鸡胚生长环境;(2)毒株凝集豚鼠红血球良好,而凝集鸡红血球结果难以观察^[1,5]。该现象自1995年我们已在实验中发现,无疑这与HA基因编码氨基酸的第145号和193号位点变异有关。在我们研究的来自韶关和湛江市的毒株中,采用鸡胚分离的毒株均在鸡胚羊膜腔中盲传

3~4次,以适应鸡胚生长环境。考虑到这种变异的不稳定性,我们建议基层流感监测点在尽快建立细胞培养技术的同时,努力增加鸡胚羊膜腔接种盲传的次,以提高病毒分离阳性率。

致谢: Dr. Nancy Cox and Dr. Xu Xiyan

参考文献

- [1] 黄平,沈桂章,倪汉忠,等.广东省1996年流感流行分析[J].疾病监测,1997,12(6):205.
- [2] 黄平,沈桂章,倪汉忠.1995年广东地区流感病毒H3N2亚型HA₁基因变异分析[C].广东省微生物学、免疫学和生物工程学术交流会论文汇编[A].湛江,广东省微生物免疫学会,广东省医学病毒学会、广东省免疫学会和广东省生物工程学会,1997,90.
- [3] Lindstrom S, Sugita S, Endo A, et al. Evolutionary characterization of recent human H3N2 influenza A isolates from Japan and China: novel change in the receptor binding domain [J]. Archives of Virology, 1996, 141(7):1349.
- [4] 黄祯祥.医学病毒学基础及实验技术[M].北京:科学出版社,1990,677.
- [5] 郭元吉,赵惠芬,王敏,等.流感病毒相变的发现及其意义[J].中华实验和临床病毒学杂志,1996,10(2):101.
- [6] Cox N, Jand C, Bender A. The molecular epidemiology of influenza viruses [R]. Seminars in Virology, Atlanta: 1995, 6: 359.