

浙江省麻疹病毒分离株的基因特性与免疫原性研究*

严菊英**，卢亦愚，张健华，冯 燕，史 雯，茅海燕，

龚黎明，葛 琼，周 敏，李敏红

(浙江省疾病预防控制中心，浙江杭州 310009)

Genetic and Immunogenic Characteristics of Measles Virus

Isolated in Zhejiang Province

YAN Ju-ying, LU Yi-yu, ZHANG Jian-hua, FEN Yan, SHI Wen, MAO Hai-yan

GONG Li-ming, GE Qiong, ZHOU Min, LI Min-hong

(Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China)

Abstract : In order to elucidate the relationship between genetic characteristics and measles outbreak, and the influence of antigenic variation on measles vaccine effect, we investigated the genetic characteristics and antigenic variation of measles viruses isolated in Zhejiang province during 1999 ~ 2003. Rats were immunized with the measles virus isolated from patients and the titers of the antibody were measured by cross neutralization test using the antigen of the isolated measles virus, vaccine strains of Shanghai191 and Edmonston strain. Meanwhile, the antigenic ratios between the strains were calculated. The titers of neutralizing (NT) antibody to different measles strains in serum samples collected from children before and after immunized with the measles vaccine were tested. *N* and *H* genes of measles virus were amplified by RT-PCR and sequenced. The results showed that antigenic ratios of Zhejiang99-1 and Zhejiang02-2 to Shanghai191 strain were 3.0 and 7.3 respectively; The geometric mean titer (GMT) of the NT antibody to Zhejaing02-2 strain from the vaccinated children was 15.03, which was obviously lower than titer to the Shanghai191 vaccine strain (GMT was 68.12); Besides, the homology of the amino acide sequence of HA protein and N protein was 99.8% and 98.5%~100% respectively between the measles virus circulating during 1999~2003 in Zhejiang Province. Comparing with China vaccine strain (Shanghai191), the homology of H and N proteins was 95.5% ~ 95.7%. and 95.9% ~ 96.3% respectively. The measles virus isolated during 1999~2003 in Zhejiang Province were all H1 genotype analysed by the phylogenetic trees of *H* and *N* gene and they were obviously different from Shanghai191 strain.

Key words : Measles viruses ; Shanghai-191 vaccine strain ; Antigenicity ; Genetic characteristics

摘要 : 为了研究浙江省 1999~2003 年麻疹病毒分离株的抗原性变化以及基因特性，阐明其基因特性与麻疹流行的关系，以及抗原性变化对疫苗免疫效果的影响。我们从麻疹患者含漱液中分离麻疹病毒株，制备大鼠免疫血清，与疫苗株沪 191 和 Edmonston 株等进行交叉中和试验，测定各毒株之间抗原比；并采集儿童麻疹疫苗免疫前后血清，分别测定其对不同毒株的中和抗体滴度；采用 RT-PCR 法扩增麻疹病毒血凝素蛋白(H)及核蛋白(N)基因，进行核苷酸序列测定。结果浙江 99-1 和浙江 02-2 株与沪 191 株之间的抗原比分别为 3.0 和 7.3；儿童免疫后血清对浙江 02-2 株的麻疹中和抗体平均几何滴度(GMT)为 15.03 明显低于沪 191 疫苗株(GMT 为 68.12) 浙江省 1999~

收稿日期：2005-06-21，修回日期：2005-10-13

* 基金项目：浙江省自然科学基金资助(Y204458)

** 通讯作者：严菊英(1960-)，女，副主任技师。Corresponding author. Tel: 0571-87235034, E-mail: jyyan@cdc.zj.cn

2003 年麻疹分离株之间, H 基因氨基酸同源性为 99.8%, N 基因氨基酸同源性为 98.5% ~ 100.0%; 与沪 191 疫苗株的 H 基因和 N 基因相比较, 分离株与其在氨基酸水平上同源性分别为 95.5% ~ 95.7% 和 95.9% ~ 96.3%。从基因进化树显示, 1999 ~ 2003 年浙江省分离到的麻疹毒株属于 H1 基因型, 但与疫苗株沪 191 在抗原性和基因特性上已存在明显的差异。

关键词: 麻疹病毒; 沪 191 疫苗株; 抗原性; 基因特性

中图分类号: R373.1⁺1; Q754

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)01-0001-05

麻疹是由麻疹病毒引起的以发热、全身斑丘疹为特征的急性病毒性传染病, 该病传染性强, 危害大。自麻疹减毒活疫苗使用以来, 其发病率、死亡率大为下降。但据 WHO 报导, 麻疹仍是严重威胁儿童健康的公共卫生问题之一^[1,2]。

1998 年以来, 浙江省大龄人群的麻疹发病率较 70 年代大为增长, 而研究发现麻疹疫苗免疫后中和抗体几何平均滴度 (GMT) 呈下降趋势^[3]。为了解浙江省近几年麻疹分离株的变异情况, 阐明基因变异对麻疹流行的影响, 并从基因水平探讨当前疫苗免疫效果下降的原因, 我们对浙江省近几年分离的麻疹病毒株与沪 191 疫苗株进行免疫交叉中和试验和毒株的血凝素蛋白 (H) 基因和核蛋白 (N) 基因序列测定, 并与疫苗株沪 191、早期标准株 Edmonston (Edm) 等进行同源性比较和进化分析, 现将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 实验材料

B95a 细胞 (EB 病毒转化的绒猴淋巴母细胞) 由中国疾病预防控制中心国家麻疹实验室提供。

麻疹患者含漱液与相关血清由浙江省各市、县级疾病预防控制中心及医院送检。

浙江省麻疹毒株从麻疹疑似患者含漱液中分离得到。将患者含漱液接种于长成单层的 B95a 细胞, 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养, 待 50% ~ 75% 细胞呈现病变时, 冻融两次, 取上清液于 -80 °C 保存。Edmonston 株、沪 191 毒株由卫生部药品生物制品检定所提供。

免疫血清参照 Coligan 等人的多克隆抗血清制备技术^[4], 免疫大鼠进行制备; 儿童麻疹疫苗免疫前后的血清由浙江省义乌市疾病预防控制中心提供。

1.2 引物

采用 BioEdit 软件, 在麻疹病毒 H、N 基因保守区域设计长度为 20 个碱基的一对引物。H 基因上游引物为 MV-H1 (序列为 5'-GCATCAAGCCCACTGAAAT-3'), 下游引物为 MV-H2 (序列为 5'-ACAGATAGCGAGTCCATAAC-3'), 扩增片段长为

2069bp。N 基因上游引物为 MV-N1 (序列为 5'-AGCAGGATTAGGGATATCCGAGAT-3'), 下游引物为 MV-N2 (5'-CGGCCTCTCGCACCTAGTCTA G-3'), 扩增片段长为 1613bp。

1.3 中和抗体 (NT) 和血凝抑制 (HI) 抗体的测定
参照文献^[5]的方法对麻疹中和抗体进行测定; HI 抗体测定参照卫生部计划免疫技术管理规程进行^[6], 麻疹血凝素由卫生部药品生物制品研究所提供。

1.4 病毒 RNA 的提取

采用德国 QIAGEN 公司的 Reansy Mini kit 试剂盒, 按照试剂盒说明书提取病毒 RNA。

1.5 RT-PCR

采用 Roche 公司的 RT-PCR system 1854476 试剂盒进行, 反应体系为 50 μ L, 其中 20.5 μ L DEPC 处理的双蒸水, 10 μ L 5 \times RT-PCR 缓冲液, 4 μ L dNTP 混合物 (10mmol/L), 2.5 μ L DTT (100mmol/L), 1 μ L RNase 抑制剂, 20 μ mol/L 引物 1 与引物 2 各 0.5 μ L, 0.5 μ L 酶混合物 (5 μ / μ L), 10 μ L 模板 RNA。反应条件为 50 °C 30min, 94 °C 2min 进行逆转录, 然后 94 °C 30s, 51 °C 30s, 68 °C 1.5min 进行扩增, 35 个循环后转入 68 °C 7min, 取 8 μ L 产物进行电泳判断有无相应分子量的特异性条带出现。

1.6 序列测定和数据分析

采用 Big DyeTM Terminator V3.0 Cycle Sequence Ready Reaction Kit 进行, 纯化产物在 ABI-3100 Avant 测序仪上自动完成序列测定, 数据采用 BioEdit、Mega 等软件进行分析。

2 结果

2.1 病毒分离

对浙江省 1999 ~ 2003 年采集的麻疹患者含漱液标本, 采用 B95a 细胞进行病毒分离, 共分离到麻疹病毒 4 株。对 2 株麻疹分离株 H 全基因序列和 4 株麻疹分离株 N 全基因序列进行测定, 序列已登录于 NCBI 的 GenBank, 登录号为 AY556537 ~ AY556542。

2.2 麻疹毒株抗原性差异分析

对麻疹疫苗株沪 191、早期国际标准株 Edm 株以及浙江省麻疹分离株(浙江 99-1 和浙江 02-2)分别制备免疫血清, 然后各毒株之间进行交叉中和试验, 结果沪 191 疫苗株与 Edm 株之间、浙江 99-1 株与浙江 02-2 株之间抗原性差异不大, 而沪 191 株与浙江麻疹分离株之间抗原比分别为 3.00、7.30, 提示麻疹疫苗沪 191 株与近年麻疹分离株之间存在较大的抗原性差异(见表 1)。

表 1 不同麻疹毒株之间的抗原比

Strains	Shanghai-191	Edmonston	Zhejiang 99-1	Zhejiang 02-2
Shanghai-191	1.00	1.68	3.00	7.30
Edmonston		1.00	2.60	5.65
Zhejiang 99-1			1.00	1.29
Zhejiang 02-2				1.00

2.3 疫苗免疫后血清对不同毒株的中和抗体

选取 11 名八月龄健康儿童, 采集麻疹疫苗(沪 191 株)免疫前和免疫后一个月的双份血清共 22 份, 每份血清分别测定 HI 抗体和 NT 抗体(包括中和沪 191 株和中和浙江 02-2 株)。免疫前血清麻疹 HI 抗体和 NT 抗体均为阴性; 免疫后血清 HI 抗体为 1:32 ~ 1:256, GMT 为 1:56.49; 对沪 191 疫苗株的

中和抗体为 1:32 ~ 1:256, GMT 为 1:68.12; 对浙江 02-2 株的中和抗体滴度为 1:4 ~ 1:64, GMT 为 1:15.03; 结果显示, HI 抗体和沪 191 疫苗株的中和抗体有良好的一致性; 而对浙江 02-2 株的中和抗体滴度较低, 两者差异明显(NT-沪 191 株 GMT 为 1:68.12, NT-浙江 02-2 株 GMT 为 1:15.03, $t=7.38$, $P<0.001$), 说明麻疹疫苗免疫后血清中特异性抗体中和麻疹分离株的能力大大低于疫苗株。

2.4 H 基因核苷酸序列测定和进化树分析

浙江省 1999 ~ 2003 年分离到麻疹病毒 4 株, 对其中两株(浙江 99-1 和浙江 02-2)进行 H 基因序列测定, 其 H 基因长度均为 1854bp, 未发现核苷酸的插入和缺失, 两毒株间仅有一个核苷酸替换(846 位 G → A); 与疫苗株沪-191 比较, 两毒株分别有 87 和 88 个核苷酸替换, 点突变率分别为 4.69% 和 4.75%。

由 H 基因序列推导的氨基酸数均为 617, 但分离株与沪 191 疫苗株或 Edm 株相比其 240 位 Ser 变为 Asn, 导致 238 位上一个潜在的糖基化位点的缺失。两毒株与疫苗株沪 191、国际标准株 Edmonston 以及 WHO 推荐的 2 株 H 基因型参考株的氨基酸差异见表 2。

表 2 浙江省麻疹分离株与其他毒株的 H 蛋白氨基酸差异

Strains	a.a. Position of H protein																																			
	9	18	40	46	133	149	164	211	240	243	276	280	282	283	288	303	348	359	364	396	397	405	410	411	413	476	481	484	506	546	562	576	609	613	614	
Shanghai-191	N	P	A	F	L	D	N	G	S	R	L	V	N	D	M	E	R	A	K	N	P	N	T	V	L	F	Y	N	D	S	V	K	T	G	T	
Edmonston				S	F		S																				N	T	G	G						
China 93-7		S	V			N	T			F	I				G	T	N					A	A	P								A	R	N		
Beijing 94-1	D	S				N				G	F	I		E	G	K	T	N	D			A		L								T		N		
Zhejiang 99-1		S				N			N	G	F	I	K		G	T	N			L	S	A	A	P	L							T	R	N	E	A
Zhejiang 02-2		S				N			N	G	F	I	K		I	G	T	N			L	S	A	A	P	L						T	R	N	E	A

将麻疹毒株浙江 99-1 和浙江 02-2 与 WHO 推荐的不同基因型参考株, 用 Mega2 软件分析, 建立系统进化树, 见图 1。从 H 基因进化树显示, 浙江麻疹毒株与中国麻疹毒株(China93-7)最靠近, 在同一个分支上, 属于 H1 亚型。

2.5 N 基因核苷酸序列测定和进化树分析

对 4 株麻疹分离株(浙江 99-1、浙江 02-2、浙江 03-3 和浙江 03-7)进行 N 基因序列测定, 其长度均为 1578bp, 未发现核苷酸的丢失和插入。由 N 基因核苷酸序列推导的氨基酸数为 525; 与疫苗株沪 191 比较, 同源率为 95.9% ~ 96.3%; 四个毒株与疫苗株沪-191、国际标准株 Edm 以及 WHO 推荐的参考株 N 蛋白的差异比较结果见表 3。

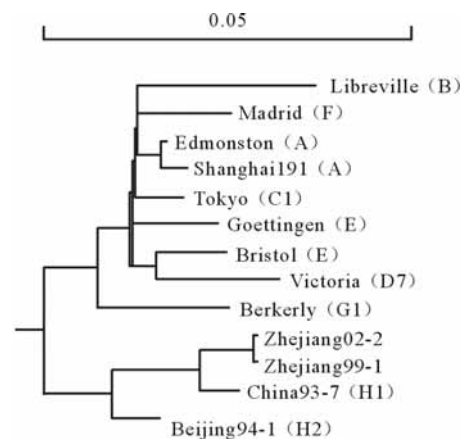


图 1 浙江省麻疹病毒 H 基因进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of H gene of the measles virus isolates of Zhejiang Province

表 3 浙江省麻疹分离株与其他毒株的 N 蛋白氨基酸差异

Table 3 Amino acid(aa) variation of N gene of measles virus isolates of Zhejiang Province with other measles virus strains

Strains	a.a. Position of N protein																											
	15	50	96	103	137	139	148	154	328	405	406	431	447	450	451	455	470	473	479	481	484	505	512	513	516	518	521	522
Shanghai191	K	R	D	E	I	S	G	D	S	K	I	R	A	S	Y	G	G	L	T	S	D	S	T	D	I	Y	R	N
Edmonston							E												S									
Zhejiang 99-1		K			S	G	E	N	W	R	T	G	T	N	S		S	P	S	Y	E	L	A		R			D
Zhejiang 02-2	R	K	N	K	S	G	E			R	T	G	T	N	S		S	P	S	Y	E	L		G	R		S	D
Zhejiang 03-3					S	G	E			R	T	G	T	N	S	E	S	P	S	Y	E	L			R	F		D
Zhejiang 03-7					S	G	E			R	T	G	T	N	S	E	S	P	S	Y	E	L			R	F		D

将分离到的麻疹分离株浙江 99-1、浙江 02-2、浙江 03-3、浙江 03-7 与中国疫苗株沪-191 以及早年国际标准株 Edm 等,用 Mega2 软件分析,建立基因进化树,见图 2。从系统树分析显示,浙江麻疹毒株与中国麻疹毒株(Human, CHN)聚集在一起,在同一个分支上,都属于麻疹病毒 H1 亚型,与 H 基因的系统树分析结果一致。

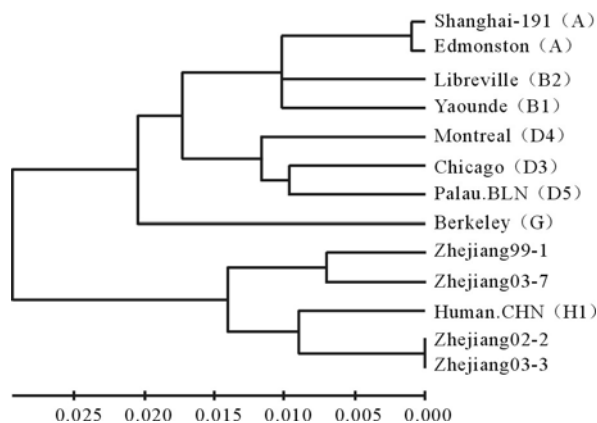


图 2 浙江省麻疹病毒 N 基因进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of N gene of the measles virus isolates of Zhejiang Province

3 讨论

20 世纪 80 年代以来,国内外研究发现新分离麻疹野毒株的特性与 20 世纪 50~60 年代的分离株以及目前广泛应用的麻疹疫苗株之间存在一定的差异^[3,7],如病毒无血凝活性、只能被多克隆抗体中和、且不能在 Vero 细胞上复制等,尤其是发生在病毒株基因上的变异,以及由此产生对疫苗免疫效果的影响等等,这些均引起了人们普遍的关注。

麻疹病毒的 6 个结构基因中,基因变化主要集中在血凝素蛋白(H)基因和核蛋白(N)基因。本研究对近几年浙江省分离到的麻疹毒株进行 H、N 基因全序列分析,并与中国疫苗株沪 191、WHO 推荐的不同基因型(A-H)参考株比较。结果表明

浙江分离株与 Human.CHN 麻疹株最为接近,仍属于中国麻疹的 H1 优势基因型。与中国疫苗株沪 191 比较,浙江分离株与其在 H、N 蛋白氨基酸水平上的同源性仅为 95.6%~95.8%和 95.9%~96.3%,提示这些基因变异可能导致病毒抗原性漂移。与 Edm 株为代表的具有 5 个 N 型糖基化位点的 A 基因型比较^[8],浙江分离株在 H 蛋白氨基酸 238 位都有一个糖基化位点的缺失,这与许文波等人报导的中国现阶段麻疹流行株的性状一致,这些糖基化位点在 C 和 F 基因型的部分野毒株也可观察到,且该变化可能导致 H 蛋白相对分子量的改变,从而可能影响病毒的免疫原性^[9]。据文献报道 N 蛋白上有 3 个抗原决定簇 NP1、NP2 和 NP3,分别位于 122~150、457~476 和 519~525 位氨基酸^[11],浙江省麻疹分离株与沪 191 疫苗株在 NP1、NP2 和 NP3 区域比较,氨基酸的变异分别为 3、2 和 2 个。此外,我们对麻疹病毒基因变异最大的区域,即 N 基因碳末端 456 个核苷酸进行分析,浙江省分离株与沪 191 株在 N 基因碳末端 151 个氨基酸上,分离毒株的变异竟达到 10%,已大大超过了以往毒株与沪 191 比较的差异。这些区域氨基酸的改变均有可能导致 N 蛋白的抗原性改变。

麻疹病毒在基因特性上的诸多变化必然会影响目前麻疹疫苗的免疫保护能力。本研究采用了能客观反应机体免疫力的中和抗体来描述近几年浙江省麻疹分离株的抗原性变化。通过麻疹毒株与相应大鼠免疫血清之间的交叉中和试验并计算各毒株之间的抗原比,结果表明浙江麻疹分离株与沪 191 疫苗株相比,抗原比分别为 3.0 和 7.3,提示当前麻疹分离株与现行疫苗株在抗原性上存在明显的差异,这与基因序列分析结果相符。值得注意的是,疫苗免疫后血清对浙江 02-2 株的中和抗体滴度为 15.03,较对疫苗株沪 191 的中和抗体滴度 68.12 低得多,其中和能力相差 4~8 倍。这种现象在国内外研究也有报导:Tamin 等认为近期麻疹野毒

株感染者的血清抗体中和野毒株 Chi-1 的抗体几何平均滴度 (GMT) 高于中和疫苗株的 4 倍^[8], 我国许文波等人也指出人类免疫血清中和中国株的滴度低于中和 Edm 和 Chi-1 株滴度的 2~5 倍^[9,10]。由上述结果可见: 麻疹疫苗免疫后对麻疹分离株的保护作用已经有所下降。

麻疹毒株基因特性的变化可能影响病毒的免疫原性, 而当前疫苗对麻疹病毒分离株是否仍有很好的保护作用还需进一步进行病毒免疫特性分析。但从麻疹免疫后儿童血清对麻疹分离株以及疫苗株沪 191 进行交叉中和试验的结果表明, 疫苗免疫后血清是能够中和麻疹分离株浙江 02-2, 说明近几年浙江省麻疹分离株仍然保留了主要的中和位点, 也提示目前的麻疹疫苗仍能对麻疹分离株起到保护作用。

References

- [1] Xu W B, Zhu Z, Zhang Z Y, (许文波, 朱贞, 张珍英) *et al.* An analysis of wild-type measles viruses of H 1 genotype circulated in China[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization (中国计划免疫), 2003, 9(1):1-8.
- [2] Jin Q (金奇). Medical molecular virology (医学分子病毒学)[M]. Beijing: Science press, 2001, 430-445..
- [3] Chen Z H (陈志慧). The genetic shifts of measles virus epidemic strains and the prevention efficacy of current measles vaccine[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization (中国计划免疫), 2003, 9(1): 47-52.
- [4] Johne. Coligan. Current protocol in immunology[M]. USA: 1991, 1.6.1-1.7.5
- [5] Kobune F. Improvement and standardization of neutralization test for Measles virus [J]. Clin Virol, 1996, 28 (1): 31-33
- [6] Diao L D (刁连东). Measles (麻疹)[M]. Shanghai: Shanghai science technique literature press, 1998, 98-101.
- [7] Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, *et al.* Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein[J]. J Gen Virol, 1994, 75(5): 1043-1052.
- [8] Tamin A, Rota P A, Wang Z D. Antigenic analysis of current wild-type and vaccine strains of measles virus[J]. J Infect Dis, 1994, 170: 795-801.
- [9] Xu W B, Zhang L B, Xia T H, (许文波, 张礼璧, 夏亭海) *et al.* Measles virus isolation and its serological analysis[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization (中国计划免疫), 1996, 2(1): 4-7.
- [10] Xu W B, Tamin A, Rota J S, *et al.* New genetic group of measles viruses iaolated in People's Republic of China[J]. Virus Resaearch, 1998, 54:147-156.
- [11] Buckland R, Wild T F. Is CD46 the cellular receptor for measles virus? [J]. Virus Res. 1997, 48(1):1-9.