· 论著 ·

2013—2014 年南京市流感病毒 H3N2 亚型血凝素分子遗传特性分析

杜雪飞[1],葛以跃[2],祁贤[2]

1. 南京市疾病预防控制中心,南京 210009; 2. 江苏省疾病预防控制中心,南京 210009

摘 要:2013—2014 年南京市流感病原监测系统分离到 31 株流感病毒 H3N2 亚型毒株,通过提取病毒 RNA,反转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增血凝素(hemagglutinin,HA)基因片段,进行 PCR 产物纯化、测序并分析其遗传进化特征。结果显示,31 株分离株与疫苗株 A/Texas/50/2012 之间的核苷酸和氨基酸进化距离分别为0.010 2和0.012 1,核苷酸和氨基酸的同源性分别为97.9%～99.6%和97.2%～99.3%。遗传进化分析表明,分离株的 HA 基因分属不同的进化分支,3 株 2013 年分离株属 3B 基因型,3 株 2014 年分离株属3C.1基因型,2 株 2014 年分离株属3C.2b基因型,其余 23 株属3C.3a基因型。与疫苗株相比,分离株的分子特征表现为发生 N128A/T 和 P198S/A(去信号肽排列)氨基酸位点变异,均位于抗原决定簇 B;分离株抗原决定簇上发生变异的位点共计 24 个;7 株分离株出现 126 NWT糖基化位点,3 株分离株糖基化位点 45NSS 和 144NNS 消失。结果提示,2013—2014 年南京市流感病毒 H3N2 亚型的 HA 基因较疫苗株发生了较大变异,疫苗对病毒的预防效果需重新评估。

关键词:流感病毒 H3N2 亚型;血凝素;分子特征

Molecular characteristics of hemagglutinin of influenza A virus H3N2 subtype, 2013-2014, Nanjing

DU Xuefei[1], GE Yiyue[2], QI Xian[2]

1. Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China

Abstract: A total of 31 representative strains of influenza A virus H3N2 subtype isolated at different time and regions in Nanjing between 2013 and 2014 through influenza pathogen monitoring system were selected for this study. The genetic distance between the vaccine strain A/Texas/50/2012 and the isolated group at nucleotide and amino acid levels were 0.010 2 and 0.012 1, respectively. The similarities of nucleotide and amino acid sequence were 97.9%-99.6% and 97.2%-99.3%, respectively. The phylogenetic analysis showed that hemagglutinin (HA) gene of 31 isolates could be divided into several groups. Three 2013 strains belonged to 3B, three 2014 strains belonged to 3C.1, two 2014 strains belonged to 3C.2b and the other 23 strains belonged to 3C.3a. Compared with the vaccine strain, the accumulated mutations on epitopes reached 24. The amino acid substitutions of N128A/T and P198S/A on HA in 31 isolates were observed. A new glycosylation site 126 NWT occurred in 7 isolates, and 45NSS and 144NNS glycosylation sites disappeared in 3 isolates. The results suggest that HA gene of H3N2 has a significant variation compared to the vaccine strain, and this may be related to the vaccine prevention program in Jiangsu Province during 2013-2014.

基金项目:国家自然科学基金(81501785),江苏省自然科学基金(BK20131450),南京市医学科技发展专项资金(YKK10129)

通信作者:祁贤

Corresponding author. QI Xian, E-mail: qixiansyc@hotmail.com

Key words：Influenza A virus H3N2 subtype；Hemagglutinin；Molecular characteristic

自 1968 年以来，甲型 H3N2 亚型流感病毒一直是人类季节性流感的重要病原。在人群免疫压力下，抗原漂移成为 H3N2 亚型变异的主要方式，也是持续引起流行的主要动因[1]。甲型流感病毒抗原变异中，以血凝素（hemagglutinin，HA）基因最重要，分析 HA 基因序列可在分子水平了解甲型流感病毒的变异特点和规律。南京市 2009—2013 年流感监测结果显示，除 2010 年春季和 2011 年季节性 H3N2 流感呈低水平散发外，其他时段均有季节性 H3N2 流感流行[2]。本研究选取南京市 2013—2014 年不同地区、不同时间段的 31 株季节性流感病毒 H3N2 亚型（2013 年 15 株、2014 年 16 株）进行 HA 基因特性分析，旨在了解 H3N2 亚型的变异情况，为流感防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

甲型 H3N2 亚型流感病毒毒株来自南京市流感监测哨点医院。2013 年 1 月—2014 年 12 月采集流感病例咽拭子标本，流感样病例的纳入标准按中国疾病预防控制中心（Chinese Center for Disease Control and Prevention，CDC）国家流感中心公布的标准。

1.2 样本采集及病毒分离

收集流感样病例咽拭子标本，提取病毒 RNA，采用荧光定量聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）对流感病毒的型别进行鉴定。阳性标本经 MDCK 细胞培养扩增后，上清液置于 −80 ℃保存。

1.3 病毒 HA 基因片段 PCR 扩增

提取病毒核酸，采用 Invitrogen 公司的反转录试剂盒将病毒 RNA 反转录为 cDNA，采用自行设计的引物对 HA 全基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系：总体积为 50 μL。扩增程序：95 ℃ 10 min；94 ℃ 30 s，72 ℃ 3 min，循环 35 次；72 ℃延伸 10 min。4 ℃ 保存。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测和鉴定，凝胶回收 PCR 产物并纯化，纯化产物经测序仪完成测序。

1.4 基因序列分析

测序结果用 CExpress 软件进行比对拼接，获得全长 HA 基因序列。从 NCBI Influenza Virus Database（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi? go = database）中选取 2013—2014 年全球不同地区流感病毒 H3N2 参考毒株（特别是中国和亚洲分离株）的 HA 序列，包括世界卫生组织（World Health Organization，WHO）推荐的 2013—2014 年疫苗毒株 A/Texas/50/2012（H3N2）。

采用 MEGA 5.2.1 软件对序列进行比对（Clustal W），采用 FastTree 软件的 GTR + GAMMA 模型构建系统进化树，并进行基因和氨基酸变异分析。利用在线软件 NetNGlyc 1.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc）对 HA 基因编码的氨基酸序列进行糖基化位点预测。

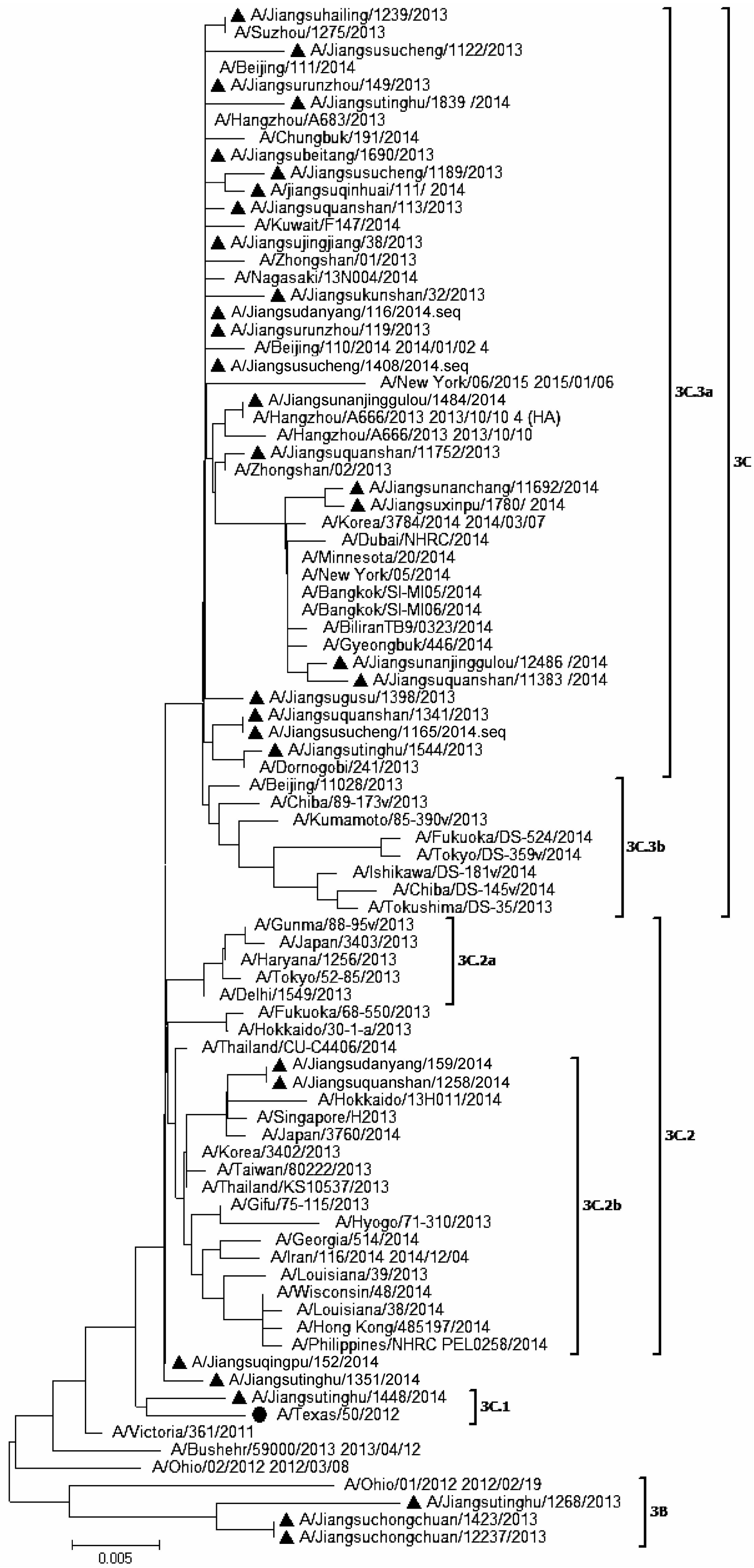
2 结果

2.1 同源性分析

用 MEGA 软件计算分离毒株与疫苗株 HA 基因的核苷酸和氨基酸平均遗传距离，分别为0.010 2 和0.012 1；与疫苗株核苷酸和氨基酸的同源性分别为97.9%～99.6%和97.2%～99.3%。

2.2 HA 基因系统进化树分析

对 31 株流感病毒 H3N2 分离株的 HA 基因构建核苷酸进化树（图 1）。其中 3 株 2013 年分离株（A/Jiangsutinghu/1268/2013、A/Jiangsuchongchuan/1423/2013 和 A/Jiangsuchongchuan/12237/2013）属 3B 基因型，3 株 2014 年分离株（A/Jiangsutinghu/1448/2014、A/Jiangsutinghu/1351/2014 和 A/Jiangsuqingpu/152/2014）属3C.1基因型，2 株 2014 年分离株（A/Jiangsudanyang/159/2014 和 A/Jiangsuquanshan/1258/2014）属3C.2b基因型，其余 23 株属3C.3a基因型。3C.1基因型平均遗传距离包含 WHO 推荐疫苗株 A/Texas/50/2012 和 3 株 2014 年南京分离株，均有 S45N、T48I、K62E、A198S、T212A 和 V223I 氨基酸变异。在3C.1基因型毒株变异的基础上，23 株3C.3基因型分离株（包括 2013 年的 13 株和 2014 年的 10 株）发生 T128A 和 R142G 氨基酸变异。与3C.1基因型相比，3B 基因型缺少糖基化位点 45NSS 和 144NSS；两者 HA 基因核苷酸和氨基酸的平均遗传距离分别为0.027 和0.032。3C.1与3C.3基因型毒株之间 HA 基因核苷酸和氨基酸的平均遗传距离分别为0.012 和 0.014。



注：图中标尺值 0.005 代表单位长度内核苷酸差异水平；●代表 WHO 推荐的疫苗株；▲表示南京分离株。

图 1　2013—2014 年南京市流感病毒 H3N2 亚型的 HA 基因系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic analysis of influenza A virus H3N2 subtype strains isolated from Nanjing city during 2013-2014

表 1　2013—2014 年南京市流感病毒 H3N2 亚型分离株的抗原位点变异分析

Tab. 1　Antigenic variants of influenza A virus H3N2 subtype strains isolated from Nanjing city during 2013-2014

毒株名称	抗原位点（以 H3 亚型 HA1 序列为编号标准）																					
	A					B				C						D			E			
	138	142	144	145	150	128	159	194	198	45	48	50	278	279	312	182	214	217	62	91	94	262
A/Texas/50/12	A	R	N	N	R	N	F	L	P	N	I	E	K	S	S	V	I	I	E	S	Y	S
Js/1690/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js/32/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	I	T	-		-	-	-
Js/1544/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1423/13	-	-	K	-	-	T	-	-	A	S	T	-	N	-	N	-	-	-	K	-	-	-
Js/12237/13	-	-	K	-	-	T	-	-	A	S	T	-	N	-	N	-	-	-	K	-	-	-
Js/1398/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/38/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1239/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/113/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	V		-	-	-
Js/1341/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1189/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/11752/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1268/13	-	-	K	-	-	T	-	P	A	S	T	K	N	Y	N	-	-	-	K	-	-	-
Js/149/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js/119/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js/116/14	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js/1448/14	-	-	-	-	-	T	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js/1408/14	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Js/159/14	-	-	-	S	-	T	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-
Js/12486/14	S	G	-	S	-	A	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
Js/1351/14	S	G	-	S	-	A	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/11383/14	S	G	-	S	-	A	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/11692/14	S	G	-	S	-	A	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1780/14	S	G	-	S	-	A	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1839/14	-	G	-	S	T	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		N	-	K
Js/111/14	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/152/14	-	-	-	S	-	T	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1484/14	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1258/14	-	-	-	S	-	T	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	H	-
Js/1165/14	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
Js/1122/13	-	G	-	S	-	A	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-

2.3　HA 分子特征分析

31 株 H3N2 南京分离株的裂解位点序列为 PEKQTR↓G,与参考株比对未发生变异,属于低致病力流感病毒。HA 蛋白发生 41 处位点变异(按去信号肽 HA 氨基酸序列排序),其中 31 株均发生变异的位点为 N128A/T 和 P198S/A,发生变异频率较高的位点有 R142G、N145S。本研究分离株的 41 处氨基酸变异位点中,32 处位于 HA1 区,9 处位于 HA2 区,分别占78.05%与21.95%。季节性流感病毒 H3N2 HA 蛋白的 5 个抗原决定簇(包括 A、B、C、D 和 E)均分布于 HA 头部重链 HA1 区[3]。抗原决定簇内的氨基酸替换可能引起 HA 蛋白发生抗原漂移。本研究中分离株抗原决定簇上发生变异的位点共计 24 个(位于抗原决定簇 A 者 5 个、B 者 4 个、C 者 6 个、D 者 5 个、E 者 4 个)(表 1)。流感病毒 HA 蛋白与宿主细胞表面受体结合是感染发生的关键步骤,HA 蛋白的受体结合特性是流感病毒宿主限制性的一个重要决定因素[4]。HA 蛋白的受体结合部位呈口袋状,位于 HA1 分子的球区末端,98、153 位氨基酸侧链构成其底部,183、190、194 位氨基酸构成其后壁,左壁和前壁分别由 225～228、130～137 位氨基酸构成[5]。本研究中 1 株分离株发生 L194P 变异,5 株发生 N225D 变异,1 株发生 N225S 变异。

HA 蛋白糖基化位点在稳定 HA 三维结构和诱导机体产生保护性抗体方面起一定作用,其增加或减少对病毒的生物学特性均有一定影响[6]。7 株测序毒株与疫苗株相比发生了 N128T 变异,出现 126 NWT糖基化位点。2013 年 3 株分离株均发生 N45S 和 N144K 变异,导致糖基化位点 45NSS 和 144NNS 消失。

3　讨论

自 1968 年流感流行以来,H3N2 亚型由于基因突变发生频率较高,一直是引起人群感染的主要型别。2013—2014 年中国流感监测数据显示,季节性 H3N2 亚型流感病毒成为南方省份流感流行的优势毒株。本研究中 2013—2014 年南京分离株与疫苗株 A/Victoria/361/2011 HA 核苷酸、氨基酸的同源性小于国内其他地区的报道[7],可能与病毒表面蛋白变异加快有关。

一般认为,具有流行病学意义的流感病毒变种要存在一定抗原差异,HA1 蛋白上至少有 4 个以上氨基酸发生替换,这些氨基酸替换需涉及 2～3 个抗原决定簇。上述氨基酸的替代可导致病毒抗原漂移[3,8]。与疫苗株相比,除 1 株分离株氨基酸位点变异仅涉及抗原决定簇 B 外,其余分离株涉及的抗原决定簇分别为 2～5 个,满足流感病毒新的变种要求。突变频率较高的 HA 变异位点 N128A、R142G、N145S 和 P198S 在 Wedde 等[9]的研究中也被发现。有研究表明,HA 基因的 T128A 突变与儿童高病死率相关[10]。本研究中 24 株发生 N128A 突变,7 株发生 N128T 突变,应继续加强对 HA 基因抗原位点变异的监测。以疫苗株为参考,本研究通过分析 HA1 蛋白抗原位点的氨基酸变异情况,提示流行株的抗原性可能发生变化,但需通过抗原性实验来验证流行株是否发生了抗原漂移。

流感病毒 HA 蛋白的糖基化对其抗原性和受体结合能力均有重要影响,可促进病毒进化[11-12]。本研究中分离株 HA 的固定糖基化位点共 10 个,另外出现 3 个位点改变。HA 的氨基酸变异未涉及糖基化位点、抗原决定簇和受体结合位点者 16 个,其作用目前还不清楚[13]。

通过初步分析,本研究获得了南京市 2013—2014 年季节性 H3N2 亚型流感病毒的 HA 蛋白分子特征,其抗原位点、受体结合位点和糖基化位点的改变在一定程度上驱使其成为 2013—2014 年的优势毒株。

参考文献

[1] Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus [J]. Nature, 2008, 453(7195): 615-619.

[2] 资海荣,郭艳,邓斐,余慧燕,王慎骄,汤奋扬,祁贤,卫平民. 南京市 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.

[3] Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin [J]. Annu Rev Immunol, 1990, 8: 737-771.

[4] 祁贤,汤奋扬,李亮,崔仑标,吴斌,祖荣强,朱凤才,羊海涛,汪华. 新甲型 H1N1(2009) 流感病毒的早期分子特征 [J]. 微生物学报,2010,50(1):81-90.

[5] Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus [J]. Science, 2004, 305(5682): 371-376.

[6] Schulze IT. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin [J]. J Infect Dis, 1997, 176(Suppl 1): S24-S28.

［7］ 刘瑞弘，潘虹，文奇，刘琴，熊英. 2013 年—2014 年新余市甲型 H3N2 流感病毒 HA1 基因特性分析［J］. 中国卫生检验杂志，2015，25（15）：2556-2558.

［8］ Shih AC, Hsiao TC, Ho MS, Li WH. Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution［J］. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104（15）：6283-6288.

［9］ Wedde M, Biere B, Wolff T, Schweiger B. Evolution of the hemagglutinin expressed by human influenza A（H1N1）pdm09 and A（H3N2）viruses circulating between 2008-2009 and 2013-2014 in Germany［J］. Int J Med Microbiol, 2015, 305（7）：762-775.

［10］ Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006：a complete genome study［J］. Virol J, 2008, 5：40. doi：10.1186/1743-422X-5-40.

［11］ Mishin VP, Novikov D, Hayden FG, Gubareva LV. Effect of hemagglutinin glycoprotein on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors［J］. J Virol, 2005, 79（19）：12416-12424.

［12］ Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses［J］. PLoS One, 2012, 7（2）：e32119.

［13］ 董丽波，张烨，温乐英，赵翔，黄维娟，蓝雨，郭俊峰，李梓，王敏，董婕，郭元吉，舒跃龙. 1995～2005 年中国 H3N2 亚型人流感病毒血凝素基因变异与流行相关性研究［J］. 病毒学报，2007，24（5）：339-344.

（收稿日期：2016-08-23）