论著

文章编号:1000-5404(2014)17-1780-05

流感 pH1N1 病毒血凝素基因进化特征及选择性

黄钟洲[1,2*],梁丽君[1*],邹丽容[1],黄 平[1],宋颖超[1] (511430 广州,广东省疾病预防控制中心广东省应急病原学检测重点实验室[1];510515 广州,南方医科大学第二临床医学院[2])

[摘要] **目的** 分析广东地区 2012 – 2013 年新型 H1N1(pH1N1)病毒血凝素(HA)基因、表位和受体结合位点(receptor binding sites,RBS)进化特征和选择性。**方法** 检测广东地区 2012 – 2013 年分离的 pH1N1 毒株 HA 基因核苷酸序列,与 GenBank 中全球相应毒株序列比对,应用 MEGA 6.05 构建进化树,通过 Chimera v1.8.1 建模并标记,应用 DATAMONKEY 筛选 HA 选择性位点。**结果** 与疫苗株 A/California/07/2009 的 HA 基因比较,广东地区 2012 – 2013 年 pH1N1 毒株的 HA 基因同源性为 98.1% ~98.7%;变异位点 H155Q、K180Q/N 和 S202T 分别位于 HA 抗原的 Ca2、Sa 和 Sb 表位,S220T 和 R222K 均位于 HA 抗原的 Ca1 表位区域;位点 A151V 位于 RBS 的 140 环上。正向选择位点为 AA202 位点。广东毒株 A/Guangdong/64/2013 与其他毒株相比,发生 6 个氨基酸位点变异,包括 V6I、N55S、S101G、A151V、H155Q 和 V267A。**结论** 广东 2012 – 2013 年 pH1N1 毒株 HA 基因变异导致了 HA 抗原表位和 RBS 140 环位点变异将分别影响毒株的抗原性和受体功能;正向选择位点 AA202 位点承受着较大的免疫压力;毒株 A/Guangdong/64/2013 的抗原表位 Ca2 和 RBS 位点变异可能是下个流感流行季节优势毒株的分子基础。

[关键词] 流感病毒;H1N1 亚型;血凝素;表位;进化;变异;选择性

[中图法分类号] R373.13; R393-33; R394.3 [文献标志码] A

Molecular evolution and evolutionary selection of influenza pH1N1 virus hemagglutinin gene

Huang Zhongzhou[1,2], Liang Lijun[1], Zou Lirong[1], Huang Ping[1], Song Yingchao[1] ([1]Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergent Pathogen Detection, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong Province, 511430; [2]Second Clinical College, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To reveal the molecular characteristics and evolutionary selection of hemagglutinin (HA) genes of pandemic H1N1 (pH1N1) viruses isolated from Guangdong from the year of 2012 to 2013. **Methods** The HA genes of Guangdong influenza pH1N1 viruses isolated during 2012 to 2013 were sequenced and compared with global HA genes downloaded from GenBank. The phylogenetic tree and the molecular model of HA genes was conducted respectively by MEGA 6.05 and Chimera v1.8.1 as the selected sites were analyzed by DATAMONKEY. **Results** Compared with HA genes of vaccine strain A/California/07/2009, the HA genetic homologies of Guangdong strains during 2012 to 2013 reached to 98.1% to 98.7%. There were some amino acid substitutions including H155Q (Ca2 epitope), K180Q/N (Sa epitope), S202T (Sb epitope), S220T (Ca1 epitope) and R222K (Ca1 epitope), where the A151V was located in receptor binding sites (RBS) 140 loop. Residue 202 was revealed to be the positively selected site. Moreover, the HA amino acid mutations of A/Guangdong/64/2013 occurred in V6I, N55S, S101G, A151V, H155Q and V267A. **Conclusion** The mutations in HA genes of Guangdong pH1N1 viruses during 2012 to 2013 lead to variations in antigenic epitopes and RBS loop, which might respectively influence the antigenicity and the receptor-binding. Mutation AA202 with positive selection means to be borne the great immunological pressure on it. Epitope Ca2 and RBS mutation sites in strain A/Guangdong/ 64/2013 could contribute to the dominant

[基金项目] 中央财政转移支付 2013 年流感项目;广州市科技计划项目(2014J4100084);国家自然科学基金(30972757)

* 同等贡献者

[通信作者] 黄 平,E-mail: pphuang1@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140710.0905.007.html (2014-07-10)

strain in the following influenza season.

[**Key words**] influenza virus; H1N1 subtype; hemagglutinin; epitope; evolution; mutation; selection

Supported by the National Transfer Payments Funding for the 2013 Influenza Survey, the Project of Science and Technology Planning of Guangzhou (2014J4100084) and the National Natural Science Foundation of China (30972757). Huang Zhongzhou and Liang Lijun are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Huang Ping, E-mail: pphuang1@163.com

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病,历史上曾发生多次世界范围的大流行。2009年4月在北美地区暴发的甲型H1N1流感疫情是由三重重排的猪H1N1流感病毒(简称pH1N1)引起[1];此后该病毒在世界范围内蔓延,并成为广东地区2009-2011年的主要流行型别[2]。

流感pH1N1病毒RNA由8个节段组成,其中血凝素(Hemagglutinin,HA)基因位于第4节段,ORF为1 701 bp,编码566个氨基酸[3]。HA在病毒包膜上以三聚体形式存在,具有识别与结合宿主细胞膜上的唾液酸分子和介导病毒与细胞发生膜融合而进入细胞的作用;HA识别并结合宿主细胞表面的唾液酸的主要部位位于HA单体分子球形头部上的受体结合位点(Receptor binding site,RBS),其功能具有特异性[4]。pH1N1的HA具有刺激宿主机体产生保护性中和抗体的作用,是设计流感疫苗的常用靶点[5]。HA的抗原性主要取决于Sa、Sb、Ca和Cb等表位特征[6]。

美国2012年的1项研究发现,pH1N1病毒在HA抗体的免疫压力作用下,HA抗原表位Sa区发生了K157N和G158E置换[7];2009-2011年广东地区pH1N1 HA抗原表位Sa发生S160G置换,影响了对该病毒的抗原性[2]。为进一步了解广东地区2012-2013年pH1N1 HA基因的变异和进化特征,我们开展毒株HA基因分析,以期从分子水平为pH1N1流感防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 毒株来源

采用时空抽样方法[2],筛选来自广东省pH1N1分离株,合计7株。其中,2012年1株(2012年12月19日,全年仅此1株pH1N1毒株),2013年6株;菌株分别来自东莞(1)、广州(1)、惠州(1)、汕头(2)、韶关(2)。从GenBank检索获得世界各地人类pH1N1毒株的HA基因序列共45条,包括世界卫生组织(WHO)疫苗株A/California/07/2009的HA基因[8];其中2009、2010、2011、2012、2013年各2、11、11、10、11株;地域分布:亚洲18株(含广东5株),欧洲13株,北美14株。

1.2 引物合成

根据2009-2011年全球pH1N1 HA基因核苷酸序列,采用Primer Premier 5.0软件设计并合成扩增引物:PHAF1:5′-CAAAAGCAGGGGAAAACA-3′, PHARl:5′-ACTTTGGTTGGTCAGCACTAG-3′;PHAF2:5′-CCTCGTGCTATGGGGCATTC-3′, PHAR2:5′-CTGTGTGCTCTTCAGGTCGG-3′; PHAF3:5′-AACACCAGCCTCCCATTT-3′, PHAR3:5′-TGACACTTTCCATGCACG-3′; PHAF4:5′-TARGTYGATGATGG-3′, PHAR4:5′-AGTAGAAACAAGGGTGTTTTT-3′。

1.3 序列检测

采用Qiagen公司QIAamp Viral RNA mini Kit提取pH1Nl毒株RNA,进行RT-PCR扩增,试剂采用SurperScriptⅢ one-step RT-PCR with Platium *taq*。PCR产物纯化采用QIAGEN Gel Extraction Kit,测序用ABI PRISM BigDye Terminator V3.0 Ready Reaction Cycle Sequence Kit,在ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer上测序。根据顺向和反向引物,双向测序,采用Lasergene v8.1.3软件(DNASTAR,Madison,WI,USA)拼接;分析检测序列的正确性。

1.4 变异与进化分析

采用MEGA 6.05软件[9]的Clustal W分析基因同源性,邻接法(Neighbor-joining)构建HA基因进化树;氨基酸糖基化位点分析采用NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/etNGlyc);通过BioEdit v7.2.3(Ibis Biosciences,Carlsbad,CA,USA)计算HA上每个氨基酸位点的熵值(entropy value)。熵值的范围在0~4.392,熵值越大、纵轴峰值越高则意味着该位点变异频率越高。氨基酸位点保守性定义为:高突变位点熵值≥1.000,易突变位点熵值≥0.600,保守位点熵值<0.600[10]。辅以DATAMONKEY软件(http://www.datamonkey.org/),分别采用单似然祖先计数(Single likelihood ancestor counting,SLAC)和固定效应似然比(Fixed-effects likelihood,FEL)法,在显著性水平为0.1的条件下,对HA基因进行进化压力分析,筛选出正向选择位点与反向选择位点。

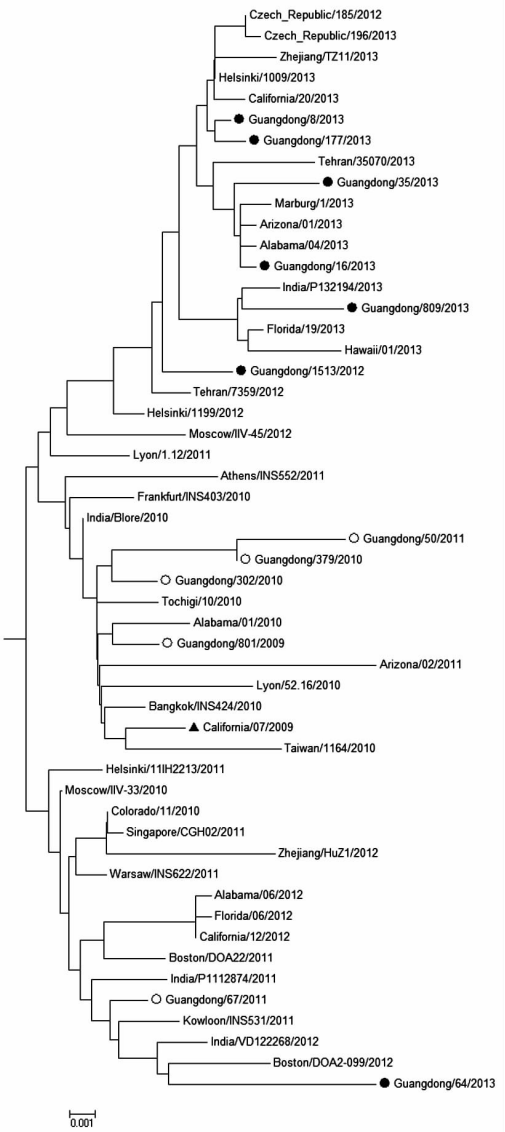
1.5 三维结构分析

使用SWISS-MODEL软件(http://swissmodel.expasy.org/)分析HA分子3D结构;利用Chimera v1.8.1构建分子空间结构模型[11],并对HA的分子抗原表位和RBS区域等的变异进行分析与3D标注。

2 结果

2.1 同源性与进化树

来自2009-2013年的52株pH1N1毒株HA基因同源性在97.4%~99.9%;其中,疫苗株A/California/07/2009与其他毒株同源性在98.1%~99.6%、与广东地区2012年毒株(1株)同源性为98.6%,而与2013年广东毒株(6株)同源性在98.1%~98.7%。2012-2013年广东毒株HA基因序列之间的同源性为97.5%~99.8%;2009-2013年pH1N1毒株HA进化树如图1所示。



▲:疫苗株 A/California/07/2009 ;●:广东地区 2012 – 2013 年毒株;○:广东地区 2009 – 2011 年毒株

图1 2009 – 2013 年 52 株流感 pH1N1 毒株 HA 基因进化树

2.2 氨基酸变异

以疫苗株 A/California/07/2009 的 HA 基因作为参照标准,2009 – 2013 年 52 株毒株中共有 202 个核苷酸位点发生变异,导致 67 个氨基酸位点置换,占总氨基酸位点的 11.8%(67/566);未发现 HA 编码区发生核苷酸的插入或丢失,无半胱氨酸(C)的置换。超过半数毒株发生 HA 氨基酸置换的位点包括 P100S(51/52)、P200S(50/52)、S220T(50/52)、I338V(50/52)、E391K(41/52)、S468N(38/52)和 S202T(31/52);此外变异位点还包括 S160G(11/52)、K180Q/N/I/T(8/52)、A214T(17/52)和 R222K(2/52)。广东 2013 年毒株 A/ Guangdong/64/2013 发生氨基酸置换的位点包括 V6I、N55S、S101G、A151V、H155Q 和 V267A,而 114 位(D)、251(V)和 516 位(E)与疫苗株保持一致。

2012 – 2013 年广东地区毒株 HA 基因具有 8 个潜在的糖基化位点;和疫苗株 HA 基因比较,广东地区毒株糖基化位点未发生变异。

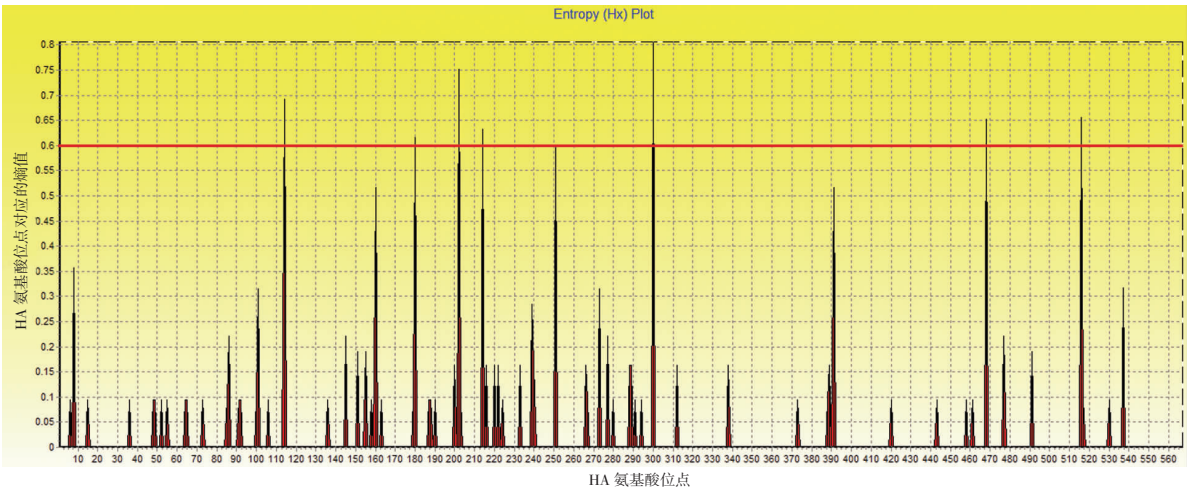
2.3 抗原表位分析与熵值

在广东地区 2012 – 2013 年的 7 株毒株中,具有较高熵值的易突变位点包括 300 位(0.806),202 位(0.752),114 位(0.692),516 位(0.656),468 位(0.652)、214 位(0.632)和 180 位(0.616);52 株毒株 HA 氨基酸位点熵值结果如图 2 所示。

广东毒株 HA 基因抗原表位变异位点中,A/Guangdong/64/201 毒株 H155Q 变异位于 Ca2 区(PHAGAK);A/Guangdong/177/2013 和 A/Guangdong/792/2013 毒株的 K180Q/N 变异位于 Sa 区(PKLSKS);A/Guangdong/1513/2012 和 A/Guangdong/16/2013 毒株 S202T 变异位于 Sb 区(TSADQQSLYQNA);广东 6 株 2013 年毒株均出现 S220T 变异位于 Ca1 区(SSR),此外 A/Guangdong/35/2013 毒株 R222K 变异也位于该区。A/Guangdong/64/201 毒株 A151V 变异位于 RBS 的 140 环(KGVTAA)上。

2.4 建模与变异评价

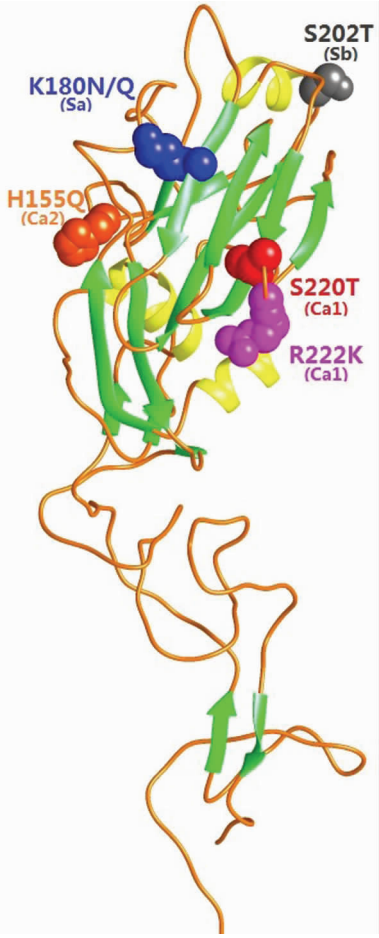
以 A/Guangdong/8/2013 毒株的 HA 氨基酸序列作为建模序列;录用氨基酸残基为 18 ~ 338 位,分子相似度为 98.75%,E-Value为0.00e-1,Z值为 – 1.91。根据SLAC和FEL方法的



红线为阈值线(熵值 = 0.600,高于此线定义为易突变位点)

图2 52 株 HA 氨基酸位点熵值图

分析结果,筛选出氨基酸序号 202 为正向选择位点,置换变异方式包括 S202T/N(31/52;1/52);位点 10、53、91、116、132、166、171、225、272、315、344、347、392、402、521 和 551 均为负向选择位点,共 16 个。HA 分子空间结构模型如图 3 所示;表位变异位点 H155Q、K180Q/N、S202T、S220T 和 R222K 均位于 3D HA 分子模型表面。



建模 HA 序列来自 A/Guangdong/8/2013 毒株;紫色球为标记位点

图 3 流感 pH1N1 毒株 HA 分子三维结构模型

3 讨论

我国南方地区流感流行高峰季节通常为每年的 3 – 7 月[12];广东地区 2012 年 H3N2 和 B 型毒株为优势毒株,而 pH1N1 几乎处于静息状态,仅在 12 月分离到 1 株 pH1N1(广东东莞,2012.12.19);与此比较,美国 2012 年 5 – 9 月流感患者中约 9% 采集样本为 pH1N1 型毒株[13]。

参照疫苗株 A/California/07/2009 HA 基因序列,2012 – 2013 年广东地区毒株 HA 基因同源性(98.1% ~ 98.7%)较 2009 – 2011 年广东同亚型基因同源性(99.2% ~ 99.9%)变异幅度增加了 1.38 倍(99.2% *vs* 98.1%)[2],这提示广东地区 pH1N1 毒株 HA 核苷酸序列在 2012 – 2013 年发生了进一步变异。广东地区 2013 年毒株 A/Guangdong/16/2013(广东,分离于 2013.03.06)与 A/Marburg/1/2013(德国,分离于 2013.02.25)、A/Arizona/01/2013(美国,分离于 2013.01.14)和 A/Alabama/04/2013(美国,分离于 2013.02.25)具有较高的亲缘性,这提示该毒株可能早先出现于美国亚利桑那州,后传播至德国以及中国华南地区。此外,广东地区的 A/Guangdong/64/2013(分离于 2013.03.21)与 A/Boston/DOA2-099/2012(美国,分离于 2012.12.23)有较高亲缘性;根据分离的时间分析,可能毒株 A/Guangdong/64/2013 源自 A/Boston/DOA2-099/2012;也可能先后来自其他地区的毒株。

梁丽君等[2]发现广东地区 2009 – 2011 年部分 pH1N1 毒株 HA 基因变异特征为 S202T 和 S160G。本研究的 52 株毒株 HA 基因中,S160G、S202T 和 A214T 的置换频率尽管较高,但 2012 – 2013 年广东地区毒株中仅分别有 1 株发生相应置换。这提示该特征在广东地区 2012 – 2013 年的 pH1N1 毒株 HA 基因中未呈主要趋势。广东地区 2013 年毒株变异位点 H155Q、K180Q/N、S202T、S220T 和 R222K 分别位于 HA 抗原的 Ca2、Sa、Sb 和 Ca1 表位区域[4],具有明显的流行病学意义。尤其广东毒株 A/Guangdong/64/2013 与其他广东毒株相比,发生了包括 H155Q 等 6 处位点变异,同时部分位点依旧与疫苗株 HA 基因位点保持一致;这提示该毒株 HA 基因与另外 5 株的进化方向有别。

HA 的受体唾液酸有 α-2,3 和 α-2,6 两种连接方式,不同的 RBS 对两种唾液酸的亲和力有差异;RBS 内或者邻近处发生变异,将会影响病毒与细胞的识别与吸附[5-6]。本研究中,毒株 A/Guangdong/64/2013 毒株 A151V 变异位于 RBS 的 140 loop 上,可能会影响该毒株 RBS 的功能[14]。毒株 A/Guangdong/35/2013 毒株 R222K 置换在印度毒株中也曾出现[15]。有学者研究发现 pH1N1 病毒 HA 发生 D222N/E/G 置换后可能增加病毒毒力,与重症流感有关[16]。在三维分子结构中,R222K 位点位于 HA 分子头部表面,R(精氨酸)与 K(赖氨酸)均为碱性氨基酸,且分子量相近,故对 HA 分子理化性质影响可能相对较小;据此推测,该变异有可能对 HA 的唾液酸亲和力有较轻微的影响。

由于流感病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶缺乏校对功能,HA 基因易于发生点突变[17]。通过错义(或称非同义)替换率(dN)和同义替换率(dS)的比值可以评估氨基酸位点所受到的选择压力,若错义替换率高于同义替换率,则认为该位点受到机体免疫压力大

于毒株自身进化压力,为正向选择位点[18]。有学者认为HA抗原151和222位为pH1N1 HA的正向选择位点,该两位点均为已知的B细胞表位[15]。本次研究筛选的202位点为正向选择位点,且是HA抗原表位Sb区域;这意味着该位点承受着较大的免疫压力,可能在宿主的免疫应答中发挥明显的作用。基于毒株A/Guangdong/64/2013抗原表位Ca2的H155Q变异和RBS的A151V变异,该毒株可能成为一个具有流行病学意义的变异株。根据2012年流感流行季节后人群流感抗体水平检测结果,人群pH1N1抗体阳性(≥1∶40滴度)比例为31.3%,较其他两个型别(H3N2和B型)低[19]。广东2012-2013年多株pH1N1毒株分别发生了Ca2、Sa、Sb和Ca1表位和RBS的140环位点变异,毒株A/Guangdong/64/2013发生了包括Ca2表位和RBS 140环位点变异;随着基因持续进化,该毒株有可能成为下个流感流行季节优势毒株。

参考文献:

[1] Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2011, 5(3): 157-166.

[2] 梁丽君, 钟静, 黄平, 等. 广东新型甲型H1N1病毒血凝素基因分子进化与变异[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(3): 173-177.

[3] 贾文祥. 医学微生物学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 298-299.

[4] Xu R, McBride R, Nycholat C M, *et al*. Structural characterization of the hemagglutinin receptor specificity from the 2009 H1N1 influenza pandemic[J]. J Virol, 2012, 86(2): 982-990.

[5] Gamblin S J, Skehel J J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins[J]. J Biol Chem, 2010, 285(37): 28403-28409.

[6] Xu R, Ekiert D C, Krause J C, *et al*. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus[J]. Science, 2010, 328(5976): 357-360.

[7] O'Donnell C D, Vogel L, Wright A, *et al*. Antibody pressure by a human monoclonal antibody targeting the 2009 pandemic H1N1 virus hemagglutinin drives the emergence of a virus with increased virulence in mice[J]. MBio, 2012, 3(3): e00120-12.

[8] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity - United States, September 29 - December 7, 2013[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013, 62(50): 1032-1036.

[9] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al*. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.

[10] 傅天韵, 娄维义, 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.

[11] Yang Z, Lasker K, Schneidman-Duhovny D, *et al*. UCSF Chimera, MODELLER and IMP: an integrated modeling system[J]. J Struct Biol, 2012, 179(3): 269-278.

[12] Huang P, Ni H, Shen G, *et al*. Analysis of the 1991-2000 influenza epidemic in Guangdong Province, China[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2001, 32(4): 787-790.

[13] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza activity-United States and worldwide, May 20-September 22, 2012[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2012, 61(39): 785-789.

[14] Bradley K C, Jones C A, Tompkins S M, *et al*. Comparison of the receptor binding properties of contemporary swine isolates and early human pandemic H1N1 isolates (Novel 2009 H1N1)[J]. Virology, 2011, 413(2): 169-182.

[15] Sharma S, Joshi G, Dash P K, *et al*. Molecular epidemiology and complete genome characterization of H1N1pdm virus from India[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56364.

[16] Houng H S, Garner J, Zhou Y, *et al*. Emergent 2009 influenza A (H1N1) viruses containing HA D222N mutation associated with severe clinical outcomes in the Americas[J]. J Clin Virol, 2012, 53(1): 12-15.

[17] 黄平, 钟静, 梁丽君, 等. 广东地区流感H3N2毒株血凝素基因特征、进化和变异分析[J]. 病毒学报, 2012, 28(4): 330-335.

[18] 钟静, 黄平, 倪汉忠, 等. 新型甲型H1N1流感毒株NA基因特征和进化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 31(15): 1675-1677.

[19] Huang P, Liang L J, Huang Z Z, *et al*. A humoral immunity survey following the 2012 influenza season after the pH1N1 pandemic in Guangzhou, China[J]. Viral Immunol, 2014, 27(3): 124-128.

(**收稿**:2014-02-22;**修回**:2014-04-09)

(编辑 邓强庭)

血压计量单位恢复mmHg表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明mmHg与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa)。

本刊编辑部