

四川省 2006 年 B 型流感病毒抗原性及基因特性研究

潘明, 李天舒, 童文彬, 黄婷, 何树森, 杨超美

摘要: [目的] 阐明 2006 年四川省流行的 B 型流感病毒血凝素抗原性及其基因变异情况。[方法] 对 2006 年分离的 B 型毒株进行单向血凝抑制实验, 再将病毒株进行血凝素基因 HA1 区核苷酸序列测定并推导出其氨基酸序列, 然后进行基因进化特性分析。[结果] 2006 年四川省人群中同时流行着 B 型 Victoria 系和 Yamagata 系毒株。Victoria 系毒株与 B/Hongkong/330/2001 比较, 病毒单向血凝抑制效价均有 4 倍以上差异, 并且在 HA1 区发生 8 个氨基酸替换, 在 197 位增加一个糖基化位点。Yamagata 系毒株与 B/Shanghai/361/2002 比较, 病毒单向血凝抑制效价均有 4 倍以上差异, 并且在血凝素基因 HA1 区有 7 个氨基酸位点发生改变, 在 196 位增加一个糖基化位点。[结论] 四川省 2006 年 B 型流感病毒的抗原性与 B/Hongkong/330/2001、B/Shanghai/361/2002 相比已经发生了变化。

关键词: B 型流感病毒; 抗原特性; 血凝素

STUDY ON ANTIGENIC CHARACTERISTICS AND GENETIC VARIATIONS OF INFLUENZA B VIRUS CIRCULATING IN SICHUAN PROVINCE IN 2006 PAN Ming, LI Tian-shu, TONG Wen-bin, et al. (Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China)

Abstract: [Objective] To identify the antigenic characteristics and genetic variations of hemagglutinin genes from Influenza B virus, which circulated in Sichuan Province in 2006. [Methods] The single-way Hemagglutination Inhibition Tests was used to test the antigenic characteristics of the isolated strain of Influenza B virus. The nucleotide sequence of HA1 domain was tested and the amino acid sequence was deduced, then gene conversion levels were assessed. [Results] The Yamagata-like and Victoria-like viruses co-circulated in 2006. As for Victoria-like virus, not only 4 folds greater HI titer was obtained, but also 8 amino acid mutations in HA1 domain and one more glycosylation site at 196 were found. As for Yamagata-like virus, compared with B/Shanghai/361/2002, the same 4 folds higher HI titer, 7 amino acid mutations identified in HA1 domain and one more glycosylation site at 197 were found. [Conclusions] Compared with B/Hongkong/330/2001 and B/Shanghai/361/2002, Influenza B viruses discovered in Sichuan Province in 2006 has had antigenic variation already.

Key words: Influenza B virus; Antigenic characteristics; Hemagglutinin

B 型流感病毒是人类流感的主要病原之一^[1], 1983 年以来的 B 型流感病毒根据抗原性和基因特征的不同可分为两大谱系, 代表株分别为 B/Yamagata/16/88 和 B/Victoria/2/87, 简称为 Yamagata 系和 Victoria 系^[2-3]。1990~2001 年, 我国人群中分离的 B 型流感病毒活动呈现 3 次高峰, 分别为 1994、1997 和 2000 年^[4]。2005 年以来, B 型流感病毒的活动有所加强, 并且引起了小规模暴发^[5]。为了解四川省 2006 年 B 型流感病毒的变异情况, 阐明其在我省的变异特征和流行特点, 我们对 2006 年 B 型流感病毒进行了抗原性及基因特性的分析, 结果如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源

四川省 2006 年流感监测网络及流感暴发疫情所采集的流感样病例咽拭子。

1.2 狗肾传代细胞 (MDCK)、流感标准毒株和抗血清

作者简介: 潘明 (1983-), 男, 研究实习员, 本科, 研究方向: 病毒分子生物学研究

作者单位: 四川省疾病预防控制中心, 四川省卫生厅分子生物学重点实验室, 成都, 610041

由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家流感中心和 WHO 提供。

1.3 病毒分离及鉴定

咽拭子标本经抗生素处理后接种 MDCK 细胞, 观察细胞病变 (CPE), 采用新鲜配制的 1%豚鼠血检测血凝效价, 阳性分离物用流感标准抗血清进行血凝抑制试验鉴定毒株型别。具体实验方法参考文献[1]。

1.4 病毒抗原性测定

采用单向血凝抑制试验, 具体方法见参考文献[1]。

1.5 病毒 RNA 的提取

选取不同时间、地点, 经血凝抑制试验鉴定为 B 型的 11 株流感病毒新鲜细胞培养液, 采用德国 QIAGEN 公司的 RNeasyMini Kit 提取, 具体步骤参考产品说明书。

1.6 RT-PCR HA1 基因 RT-PCR 引物

引物 1: 5'-GAAGGCAATAATTGTACT-3'; 引物 2: 5'-ACCAGCAATAGCTCCGAA-3'均为上海生工公司合成。采用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 试剂盒进行 RT-PCR 反应, 反应条件: 60 1 min; 42 10 min; 50 30 min; 95 15 min; 94 30 sec; 52 30 sec; 72 1 min; 返回第 5 步, 循环 35 次; 72 10 min; 4 保存。

1.7 PCR 产物的纯化及序列测定

RT-PCR 产物按照 Promega 公司的 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 中所提供的产品说明书进行。纯化产物送上海捷瑞生物工程有限公司进行序列测定。

1.8 序列分析

核苷酸和氨基酸序列均采用 Mage4.0 序列分析软件进行; 摘录在 GenBank 和 Influenza Sequence Database 中收录的有关 B 型流感病毒的 HA1 区序列来参与分析, 序列收录号为: M58428、AY504610、ISDN133312、ISDN126672、AJ784056、AJ784040 和 M58419。

2 结果

2.1 四川省 2006 年 B 型流感病毒分离及抗原性分析结果

2006 年四川省共分离到 17 株 B 型流感病毒, 占病毒分离总数的 31.5%, 仅次于 H1 型流感病毒。在分离到的 B 型流感病毒中, Victoria 系为 14 株, 占 82.4%; Yamagata 系 3 株, 占 17.6%。抗原性分析结果显示, B 型 Victoria 系病毒与 B/Hongkong/330/2001 相比, 单向血凝抑制效价均有 4 倍以上的差异; Yamagata 系病毒的抗原性与 B/Shanghai/361/2002 相比, 单向血凝抑制效价均有 4 倍以上的差异。见表 1。

表 1 四川省 2006 年 B 型流感病毒株测定结果

抗原	鸡抗血清	
	B/上海/361/2002	B/香港/330/2001
B/四川安岳/4/2006		160
B/四川剑阁/31/2006		160
B/四川旌阳/2189/2006	80	
B/四川青羊/1107/2006	160	
B/上海/361/2002	640	
B/香港/330/2001		1280

2.2 核苷酸和氨基酸序列分析结果

在血清学分析的基础上, 选取不同时间、地点的 11 株 B 型流感病毒株, 对血凝素基因 HA1 区核苷酸序列进行测定, 推导其氨基酸序列并进行基因进化分析, 绘制基因发生树。

B 型 Victoria 系毒株与 B/HongKong/330/2001 比较有 8 个氨基酸位点发生替换, 分别是 48K > E、80K > R、116R > H、121N > T、129K > N、164E > D、170T > I、197S > N (80、116、121、129、164、170、197 均位于抗原决定簇区), 在 197 位增加了一个糖基化位点。与 2006~2007 年的北半球国际疫苗株 B/Malaysia/2506/04 比较, 四川省分离到的 Victoria 系病毒有 3 个氨基酸位点发生替换, 分别是 134S > P、170T > I、199A > T。

B 型 Yamagata 系流感病毒与 B/Shanghai/361/2002 相比, 有 7 个氨基酸位点发生改变, 分别是 37I > T、40H > Y、48R > K、98P > A、131L > P、196D > N、251V > M (其中 131、196 位于抗原决定簇区), 在 196 位增加了一个糖基化位点。

绘制基因发生树可以看出, 2006 年四川省流行的 B 型流感病毒的基因特性分为两个不同的谱系即 Victoria 系和 Yamagata 系。见图 1。

3 讨论

流感病毒的抗原变异与流感的暴发和流行密切相关, 流感病毒正是通过不断改变其抗原性来逃避宿主的特异性免疫识别

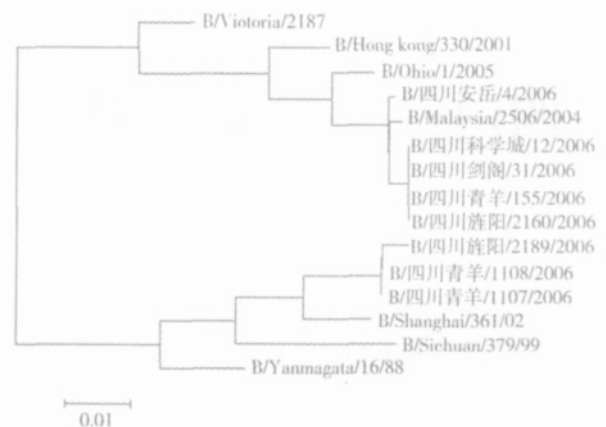


图 1 四川省 2006 年分离的 B 型流感病毒 HA1 基因种系发生树

和清除, 从而不断引起流行。血凝素和神经氨酸酶是流感病毒主要的表面抗原, 特别是血凝素基因具有高度易变性, 是流感病毒发生抗原性漂移的主要原因。B 型流感病毒 HA1 区第 70~90 位和 110~210 位之间的位点参与构成抗原的表位, 此间氨基酸的改变会导致病毒的抗原性改变^[9]。

四川地处我国西南, 由于其特殊的地理、气候条件, 在我国的流感监测和防制中具有十分重要的地位。四川省 2006 年 B 型流感病的抗原性和基因特性研究显示, B 型 Victoria 系病毒与 B/Hongkong/330/2001 相比, 单向血凝抑制效价均有 4 倍以上的差异, 并且在 HA1 链的抗原决定簇区发生了 7 个氨基酸位点的替换, 在 197 位增加了一个糖基化位点; B 型 Yamagata 系病毒的抗原性与 B/Shanghai/361/2002 相比, 血凝抑制效价均显示有 4 倍以上的差异, 并且在 HA1 区发生 7 个氨基酸位点的替换, 其中有 2 个位点位于抗原决定簇区, 在 196 位增加了一个糖基化位点。流感病毒血凝素蛋白糖基化的主要作用是稳定血凝素蛋白结构, 防止血凝素被水解以及阻碍抗体的识别。基因分析和血凝抑制结果表明四川省 2006 年流行的 B 型流感病毒的抗原性与 B/Shanghai/361/2002、B/Hongkong/330/2001 相比已经发生了变化, 且与 2006~2007 年疫苗株 B/Malaysia/2506/2004 比较, Victoria 系病毒在 HA1 链抗原决定簇区有 3 个氨基酸位点发生了替换, 提示流感疫苗对 B 型流感的预防效果可能会受到一定的影响。

2004 年起, WHO 推荐的疫苗株由 Victoria 系的 B/Hongkong/330/2001 变为 Yamagata 系的 B/Shanghai/361/2002, 2004~2005 年我国 B 型流感病毒中 Victoria 系毒株的活动逐渐加强, 并替代 Yamagata 系毒株成为 B 型的优势毒株^[9]。四川省 2006 年流感监测结果表明, B 型流感病毒的活动明显加强, 并在局部引起流行。2005~2006 年度 WHO 推荐的北半球疫苗株为 B/Shanghai/361/2002 (Yamagata 系), 而 2006 年春夏秋冬从四川省流感监测网络和暴发疫情的流感样病例咽拭子中分离到的 B 型流感病毒均为 Victoria 系; 2006~2007 年度 WHO 推荐的北半球疫苗株为 B/Malaysia/2506/04 (Victoria 系), 但 2006 年冬季四川省分离到的 B 型流感病毒均为 Yamagata 系。B 型流感病毒 Victoria 系和 Yamagata 系的流行趋势以及 WHO 推荐的流感疫苗株的预防效果如何, 还有待进一步研究。

(下转第 2241 页)

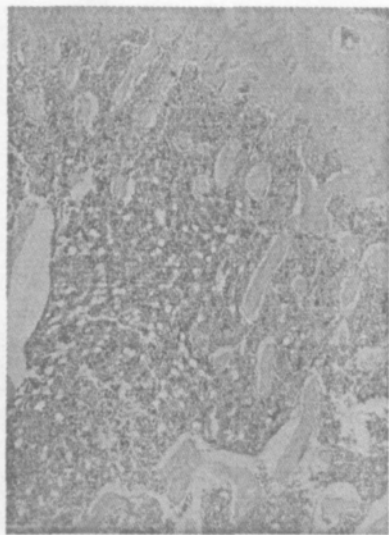


图 1

图 1 ovx 组：胫骨近侧干骺端骨小梁稀疏、细小，扭曲样变，髓腔相对增宽。HE × 40

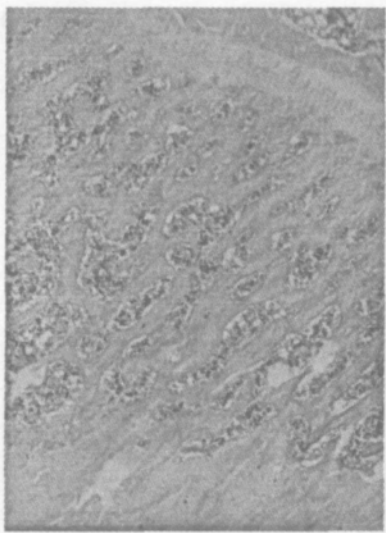


图 2

图 2 Sham 组：胫骨小梁正常结构。HE × 40

表 5 左胫骨形态计量学结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	小梁体积密度 (%)	小梁宽度 (μm)	成骨细胞指数 (No./mm)	破骨细胞指数 (No./mm)
Ovx 组	5	12.2 ± 9.7**	28.8 ± 8.8*	69.9 ± 15.6*	3.37 ± 1.51**
Sham 组	5	40.8 ± 8.7	36.5 ± 1.8	55.0 ± 17.5	1.25 ± 1.64

[注] 与 Sham 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

于 sham 组 ($P < 0.05$), 说明 8 月龄大鼠去卵巢后仍表现出一种高转换型的骨代谢现象, 造成骨重量及骨密度下降, 松质骨组织形态学和超微结构遭到破坏, 从而导致骨生物力学功能降低, 同时伴有子宫显著萎缩等, 这些都与人类绝经后 OP 十分类似。

参考文献:

[1] 王秋根, 陆晴友. 骨质疏松性骨折的外科治疗进展 [J]. 中华骨科杂志, 2004, 24 (11): 678-682.
[2] Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, et al. Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of

osteoporosis: distinct actions from estrogen [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15: 70-79.

[3] 上海市医学化验所. 临床生化检验 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 95-96.
[4] 张月峰, 韩景献. 骨质疏松动物模型研究进展 [J]. 动物医学进展, 2005, 26 (3): 8-11.
[5] 贾经汉, 邱新建, 陈志坚, 等. 常用骨质疏松动物模型特点的综述 [J]. 广西中医学院学报, 2006, 9 (4): 76-79.

(收稿日期: 2007-01-20)

(上接第 2238 页)

四川省为流感多发省, 且研究表明 2006 年 B 型毒株的抗原性和基因特性已经发生了变异, 这种变异能否影响下一个流感季节的流行情况, 还需进一步加强四川省流感监测和流感病毒抗原变异研究, 及时发现新的流感变异毒株以应对流感流行。

参考文献:

[1] 郭元吉, 程晓雯. 流行性感冒病毒及实验技术 [M]. 北京: 三峡出版社, 1997. 122.
[2] Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, et al. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza B virus since 1983 [J]. Virology, 1990, 175: 59-68.
[3] Kanegae Y, Sugita S, Endo A, et al. Evolutionary pattern of the

haemagglutinin of influenza B virus isolated in Japan: cocirculation lineages in the same epidemic season [J]. J Virol, 1990, 64: 2860-2865.

[4] 张烨, 温乐英, 王敏, 等. 2001 年中国新分离维多利亚系乙型流感病毒的抗原性及基因特性分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17 (1): 15-17.
[5] 张烨, 温乐英, 赵翔, 等. 2004-2005 年中国 B 型流感病毒抗原性及基因特性研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20 (2): 11-13.
[6] 舒跃龙, 王敏, 郭元吉. 当前我国流行的乙型流感病毒血凝素蛋白抗原性及基因特性的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1996, 10 (3): 217-221.

(收稿日期: 2007-01-20)