

·论 著·

## 南宁市2007~2009年H3N2亚型流感病毒NA基因变异分析

范云燕, 刘海燕, 林新勤, 秦剑秋, 黄莉, 覃巍巍

**摘要:**目的 对2007~2009年度南宁市流行性感冒病毒NA序列分析, 阐明NA基因变异和进化特征。方法 提取2007~2009年30株(每年10株)H3N2亚型病毒RNA, 采用RT-PCR扩增病毒NA基因后进行序列测定, 利用VectorNTI 9.0对测序结果分析处理, 并与WHO推荐疫苗株进行比对, 用Mega 4.1构建系统进化树。结果 南宁市2007~2009年H3N2亚型流感病毒被分为3个分枝, 其中疫苗株A/Wisconsin/67/2005独立形成一个分支(类群I), A/Brisbane/59/2007与2007年毒株(除339外)形成类群II, 2008和2009年毒株聚集成类群III。NA基因在质尾区域、极性跨膜区、柄部区域有个别毒株个别位点发生了替换。抗原区域328~336替换频率较高, 2008年毒株抗原位点更活跃。A/nanning/242/2007在酶活性位点发生了D151E替换, 可能导致NA对扎纳米韦和奥司他韦的轻微耐药性; A/nanning/242/2007、A/nanning/561/2008分别在非活性位点N234D, 在G286D的替换则可能影响NA介导的病毒粒子的释放从而影响NA蛋白的活性。结论 南宁市2007~2009年毒株NA均发生了较大变异, 当年疫苗株均滞后南宁流行株。

**关键词:** 流感病毒; H3N2; 神经氨酸酶; 基因分析

中图分类号: R373.13 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)9-1042-04

Genetic variations of NA gene of influenza H3N2 virus in Nanning in 2007-2009. FAN Yun-yan, LIU Hai-yan, LIN Xin-qin, et al. (Nanning Municipal Center for Disease Control and Prevention, Nanning, 530021, Guangxi P. R. China)

**Abstract:** Objective To analyze the sequence of influenza and understand the genetic variation and evolution characteristics of NA gene of influenza H3N2 viruses circulating in Nanning city in 2007~2009. Methods 30 H3N2 strains (10 each year) isolated from influenza surveillance during years of 2007~2009 were selected. RNAs were extracted, NA genes were amplified by RT-PCR and then sequenced. The data obtained were compared with the vaccine strains recommended by WHO with the software VectorNTI 9.0. Genetic distance and phylogenetic tree of these strains were constructed by using MEGA 4.1. Results The NA phylogenetic tree showed that the strains were divided into three branches, vaccine strain A/Wisconsin/67/2005 was located in branch I separately, all strains isolated in 2007(in addition to the strain 339)were located in branch II, and strains isolated in 2008-2009 were located in branch III. There were individual substitutions in the cytoplasmic tail, transmembrane domain, and stalk region of NA in some strains. Higher variation frequency was showed in antigenic region 328~336, and antigenic sites were more active in 2008 strains. E 151 amino acids that located in enzyme active site of A/nanning/242/2007 NA gene were replaced by D, which might lead to a slight resistance to zanamivir and oseltamivir. The sites N234D in A/nanning/242/2007 and G286D in A/nanning/561/2008, mapped away from the active site of NA, affected the NA-mediated viral particle release and NA enzymatic activity. Conclusion Relatively genetic variations occurred to the strains isolated during 2007~2009. The vaccine strains lagged behind the circulating strains in Nanning.

**Key words:** Influenza virus; H3N2; Neuraminidase; Genetic analyses

流感病毒常引起急性呼吸道感染, 季节性流感每年影响世界上10%~20%的人口, 导致300~500万严重病例和25~50万人口死亡<sup>[1]</sup>。自1968年以来, H3N2亚型流感病毒是引起流感大流行的一个主要亚型。该亚型病毒在流行的过程中不断发生变异, 特别是在一些重要功能位点发生突变, 从而引起流感的爆发。神经氨酸酶(NA)又称唾液酸酶, 是流感病毒主要的表面糖蛋白之一, 由胞质尾区域、极性跨膜区、柄部、头部4部分组成, 在膜上以四聚体形式存在<sup>[2]</sup>。它具有抗原性, 可以催化唾液酸水解, 协助成熟流感病毒脱离宿主细胞感染新的细胞, 在流感病毒生活周期中扮演了重要的角色<sup>[3]</sup>。在甲型流感病毒中, 神经氨

酸酶的抗原性会发生变异, 这成为划分甲型流感病毒亚型的依据, 目前已知的甲型流感病毒中共有9种不同的神经氨酸酶抗原型。另外, NA也是流感治疗药物作用靶点之一<sup>[4~6]</sup>, NA蛋白一级结构的改变直接影响其二级结构、三级结构的稳定性和对药物的易感性。研究NA氨基酸的替换和不同区域结构的改变有利于了解NA在流感病传播中的作用, 对流感病毒的预防和治疗, 以及耐药性研究, 以及疫苗的制备等都有着实际的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取2007~2009年MDCK流感病

基金项目 广西南宁科学研究与技术开发计划项目(No.200802127C)

作者单位 广西南宁市疾病预防控制中心, 广西南宁530023

作者简介 范云燕(1981~), 女, 广西桂林, 主管技师, 硕士, 主要从事病毒检验工作。

毒分离株,血凝试验阳性,其中每年选取10株阳性H3N2毒株。

1.1.2 病毒RNA的提取 用QIAGEN Rneasy Mini kit RNA(Not No.130169171)提取试剂盒提取毒株RNA,方法按试剂盒说明书。

## 1.2 方法

1.2.1 HA基因的RT~PCR扩增 用QIAGEN Rneasy Mini kit RNA试剂盒提取30份毒株RNA,取5 $\mu$ l RNA模板,用引物H3N2-NA-F:5'-GCAAAAGCAGGAGTAAAGATGAATC-3'进行反转录,条件为:25 $^{\circ}$ C 10min,42 $^{\circ}$ C 1h,98 $^{\circ}$ C 5min,冰上冷却。取5 $\mu$ l cDNA为模板,分别用H3N2-NA-F和N2-R955:5'-AGCACACATAACTGGAAACAATGC-3',以及N2-F779:5'-GGAAATCGTTCATATTAGCCCATTG-3'和H3N2-NA-R:5'-AGCTATGACCAGTAGAAACAAGGAG-3'引物分别进行PCR,PCR条件为:95 $^{\circ}$ C 3min,[94 $^{\circ}$ C 40s,52 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 1min]34cycle,72 $^{\circ}$ C 10min,50 $\mu$ l体系,以上反转录和PCR试剂分别为RevertAid-TM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Lot NO.00035501)和Taq DNA Polymerase (1U/ $\mu$ l) (lot NO.00025869)均购自Fermentas。

1.2.2 HA基因测序和分析 PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行纯化和测序,测序结果采用Vector NTI 9.0软件进行分析整理。将获得的NA序列与WHO推荐的北半球A亚型疫苗株A/Wisconsin/67/2005(2006.11~2008.4,ABW80978),A/Brisbane/10/2007(2008.11~2010.4,ABW23353)进行氨基酸序列分析,并用MEGA4.1软件构建系统进化树。

## 2 结果

2.1 病毒流行情况 2007~2009年南宁市分别分离到H3N2亚型流感病毒59、22、144株,分别占总分离病毒的60.2%、30.5%、61.5%,其中H3N2亚型流感病毒成为了2007和2009年的优势毒株,而2008年形成了H1N1(44.4%)亚型、H3N2同时流行的局面。

2.2 核苷酸序列测定结果及氨基酸序列树分析 H3N2亚型流感病毒NA全长1410bp,翻译成469个氨基酸,所测毒株均没有任何氨基酸的插入和缺失。将30份毒株与北半球疫苗推荐株A/Wisconsin/67/2005(H3N2)和A/Brisbane/10/2007用MEGA(Ver 4.1)软件构建进化树,如图1所示,所有毒株聚成3个大的类群(分别用I、II、III标识),其中A/Wisconsin/67/2005独立形成一个分支(类群I),而A/Brisbane/59/2007与2007年的毒株(除2007年的339外)聚集成类群II,2008和2009年毒株聚集成类群III。

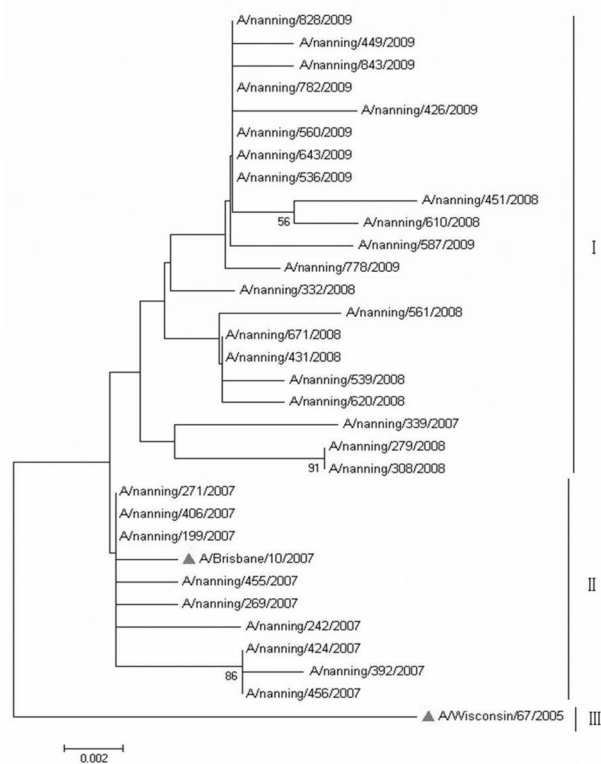


图1 2007~2009年南宁市H3N2流感病毒流行株与WHO疫苗株NA氨基酸序列系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree constructed between 2007~2009 NA Amino acid sequences for Nanning influenza A(H3N2) samples and (WHO) influenza A(H3N2) vaccine strains

## 2.3 NA氨基酸序列变异及蛋白质分子结构变化

2.3.1 胞质尾变异情况 神经氨酸酶没有翻译后多肽和信号肽的剪切,NA的N端有6个极性氨基酸M-N-P-N-Q-K,NA分子通过N端疏水氨基酸固定在细胞膜上,这个结构在所有亚型的NA中都非常保守(不包括B型流感病毒)<sup>[2]</sup>。对南宁2007~2009年30株流感病毒NA胞质尾分析表明,2007年392、424、456在发生Q5K位点替换,除此之外所有本地毒株NA胞质尾亦高度保守。

2.3.2 跨膜区域变异情况 NA跨膜区域长度为29(aa7~aa35)个氨基酸,具有疏水性,能将病毒固定在膜上,在筛选的30份毒株跨膜区域相对保守,仅2007年392(T34A)发生了氨基酸的替换。

2.3.3 柄部区域的变异情况 NA柄部区域长度不等,并且不太保守,柄部区域虽然没有酶的活性位点,但柄部的长度会影响神经氨酸酶的活性。所获得的30份毒株NA柄部区域为55个氨基酸(aa36~90),并未见长片段和氨基酸的缺失和插入,个别毒株有氨基酸的替换,分别是2007年:339(P45S);2008年:279(P45S)、308(P45S)、620(V50T);2009年:449(N43D)、587(E64K)。

2.3.4 蛋白分子头部抗原决定簇位点和酶的活性位

点变异的情况 NA 蛋白抗原决定簇和酶活性中心位于 NA 头部, N2 蛋白头部有 7 个抗原决定簇, 并且这 7 个区域内相邻的氨基酸变化频率较大, 他们分别是 153 位氨基酸, 197~199, 328~336, 339~347, 367~370, 400~403 和 431~434 氨基酸<sup>[7]</sup>, 以上区域分别用序号 1~7 表示, 如表 1 所示。相对于疫苗株, 毒株抗原决定簇位点存在着多个位点的替换, 表 1 中仅列出发生变异位点, 抗原位点 328~336 区域替换频率较高, 该区域有 3 个位点出现了替换; 从年代来分析, 2008 年毒株抗原位点较 2007 和 2009 年更为活跃, 氨基酸出现替换分别为 S332F、S334N、G346D 和 G401D, 分布在区域 3、4 和 6 区域。然而, 这种变异在 2009 年毒株中并未得到继承, 2009 年度的毒株与疫苗株 A/Brisbane/10/2007 抗原位点有更多地一致性。

流感病毒 NA 酶活性位点包括催化位点 (Catalytic site) (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 和 Y406) 和框架位点 (Framework site) (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294 和 E425)<sup>[8]</sup>, 30 份毒株在酶活性位点非常保守, 仅 A/nanning/242/2007 D151E 位点氨基酸发生替换和缺失。

2.3.5 蛋白分子二硫键和糖基化位点的变异情况 一般来说, NA 蛋白分子上有 21 个半胱氨酸残基, 形成 9 个二硫键<sup>[9]</sup>。根据测序结果表明, 此次筛选的 30 份毒株 NA 蛋白二硫键形成位点均无氨基酸替换, 缺失, 插入。

2008.11~2010.04 年北半球疫苗株 A/Wisconsin/67/2005 NA 蛋白有 9 个 N 型糖基化位点, 其序列为 N~X~T/S (N 为苏氨酸, S 为丝氨酸, X 为任一氨基酸), 分别位于 61、70、86、93、146、200、234、329、和 402 位点, 糖基化位点的增加或减少在稳定 HA 三维结构、对病毒的抗原性及其他生物特性均有一定的影响。对糖基化位点分析发现, 疫苗株 A/Brisbane/10/2007 和其他毒株在 93 位点 (N93D) 发生突变, 导致糖基化位点的减少。除此之外, A/nanning/242/2007 (N234D), A/nanning/242/2009 (N43D), 减少一个糖基化位点; A/nanning/339/2007、A/nanning/279/2008、A/nanning/308/2008 (P45S) 增加了一个糖基化位点, 其余毒株糖基化位点均无增减。

### 3 讨论

NA 既是流感病毒表面重要抗原也是抗流感病毒药物的重要靶标, 它由胞质尾区域、极性跨膜区、柄部、头部 4 部分组成。据研究表明, 胞质尾对病毒复制并不是绝对必要的, 但是这些保守的结构起到控制病毒形态、病毒的组装和出芽等作用<sup>[10]</sup>。跨膜区域在病毒的运输过程中也起到信号肽的功能, 同时对病毒

表 1 2007~2009 H3N2 流感病毒 NA 抗原决定簇氨基酸突变位点比对

Table 1 Comparison of amino acid mutation of the antigenic sites on NA gene among 2007~2009 influenza H3N2 viruses

毒株 Strain	抗原决定簇 Antigenic determinant						
	3			4	5	6	
	332	334	336	346	370	401	403
A/Wisconsin/67/2005	S	S	H	G	L	G	R
A/Brisbane/10/2007					S		
A/nanning/199/2007					S		
A/nanning/242/2007					S		
A/nanning/269/2007					S		K
A/nanning/271/2007					S		
A/nanning/339/2007			N		S		
A/nanning/392/2007					S		
A/nanning/406/2007					S		
A/nanning/424/2007					S		
A/nanning/455/2007					S		
A/nanning/456/2007					S		
A/nanning/279/2008				D	S		
A/nanning/308/2008				D	S		
A/nanning/332/2008					S	D	
A/nanning/431/2008					S		
A/nanning/451/2008		N		D	S		
A/nanning/539/2008					S		
A/nanning/561/2008	F				S		
A/nanning/610/2008					S		
A/nanning/620/2008					S		
A/nanning/671/2008					S		
A/nanning/426/2009					S		
A/nanning/494/2009					S		
A/nanning/560/2009					S		
A/nanning/587/2009					S		
A/nanning/643/2009					S		
A/nanning/758/2009					S		
A/nanning/778/2009	F				S		
A/nanning/843/2009					S		
A/nanning/849/2009					S		
A/nanning/856/2009					S		

注: 表中 S Ser, H His, G Gly, L Leu, R Arg, K Lys, F Phe, N Asn, D Asp

出芽方式释放过程也起到重要作用。柄部区域虽然没有酶的活性位点, 但柄部的长度会影响神经氨酸酶的活性。流感病毒在不同宿主 HA 糖基化位点的不同, 可以通过调节 NA 柄长度以达平衡, 以利于病毒复制<sup>[7]</sup>。南宁市 2007~2009 年 H3N2 亚型流感病毒 NA 基因在质尾区域、极性跨膜区、柄部区域变异不大, 仅有个别毒株个别位点发生了变异。其中, A/nanning/392/2007 34 位点发生了由非极性疏水性氨基酸 A 替换了极性中性氨基酸 T, 据 Barman<sup>[11]</sup>等报道, NA 跨膜

区域32~35aa区域的替换可能会改变蛋白的极化,从而影响NA的活性。这种变异情况是否会影响NA的生物学功能,有待进一步实验的论证。

NA抗原决定簇因受到宿主免疫压力的影响,容易使抗原决定簇发生变异。2007~2009 H3N2流感病毒NA中不同抗原决定簇变异频率不同,从位点来看抗原区域328~336替换频率较高,从时间来看2008年毒株抗原位点更为活跃。除此之外,在抗原决定簇370位点,A/Brisbane/10/2007和所有毒株均由S替换了L,类似的氨基酸替换还有非抗原决定簇位点N93D、H150R、L285P、L370S、S372L、K387N等,结合进化树可判定疫苗株A/Wisconsin/67/2005与同年度毒株相比存在明显滞后,这种滞后可能导致疫苗免疫保护失效,导致流感病毒的流行。流感病毒NA的二硫键和所有的亚型NA酶活性位点都比较保守,NA抑制剂的设计就是基于这些保守的结构和活性位点。作为药物的靶标,NA保守位点的替换不仅会使病毒对神经氨酸酶抑制剂产生耐受性,而且会降低NA酶的催化活性。在2007~2009毒株中,仅有A/nanning/242/2007在酶活性位点151处发生了氨基酸的替换D>E。目前,已经有学者在N1、N2和B型流感病毒中分离到NA D151(G/V/N/E)突变株,D151位点并未有想象的那么保守,D151被认为是唾液酸酶形成初始阶段的酸催化剂,D151E的替换并对病毒复制和酶活性影响不大,但对扎纳米韦(Zanamivir)和奥司他韦(Oseltamivir)的轻微耐药性<sup>[8,12]</sup>。更值得注意的是,毒株A/nanning/242/2007在位点D234N,A/nanning/561/2008在D286G均发生了替换,从空间结构来看这两个位点均远离酶活性区域,D234N替换将导致在234位点缺失一个糖基化位点,D234N或D286G的替换可能影响NA介导的病毒粒子的释放,以及NA蛋白的活性<sup>[13]</sup>。

季节性流感病毒在流行的过程中不断发生变异,通过上述研究,我们监测到了本地区H3N2流感病毒NA基因不同区域的变异情况,对NA抗原性变异特点进行了掌握。由于季节性流感病毒区域性流行趋势及毒株特性相近<sup>[14]</sup>,本次研究为更有效的选择符合我国华南地区的疫苗株制备,及抗流感药物的研究提供了重要的信息。

#### 参考文献:

- [1] World Health Organization. Prevention and control of influenza pandemics and annual epidemics (agenda item 14.14) [C/OL]. Fifty-Sixth

- World Health Assembly, (2003-05-28)[2008-09-10]. [http://apps.who.int/gb/archive/pdf\\_files/WHA56/ea5623.pdf](http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA56/ea5623.pdf)
- [2] Gillian M.Air, W. Graeme Laver. The neuraminidase of influenza virus [J]. Structure Function and Genetics, 1989, 6:341~356.
- [3] Jennifer R.Tisoncik, Ying Guo, et al.. Identification of critical residues of influenza neuraminidase in viral particle release[J]. Virology J, 2011, 8:14.
- [4] Pratip Shil, Sameer S Chavan, Sarah S Cherian. Antigenic variability in neuraminidase protein of influenza A/H3N2 vaccine strains (1968~2009) [J]. Bioinformatics, 2011, 7(2): 76~81.
- [5] Xavier Duval, Sylvie van der Werf, Thierry Blanchon, et al. Efficacy of oseltamivir-zanamivir combination compared to each monotherapy for seasonal influenza: a randomized placebo-controlled trial [J]. PLoS Medicine, 2010, 7:11.
- [6] Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance [J]. Clin Virol, 2008, 41(1):13~19.
- [7] Li XZ, Fang F, Chen Z. Roles of different domains of influenza virus neuraminidase [J]. Life science research, 2005, 9(2):55~61. (In Chinese)
- (李向忠, 方芳, 陈则. 流感病毒神经氨酸酶不同区域的作用 [J]. 生命科学研究, 2005, 9(2):55~61.)
- [8] Hui-Ling Yen, Erich Hoffmann, Garry Taylor, et al. Importance of neuraminidase active site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses [J]. J Virol, 2006, 80(17):8787~8795.
- [9] J. N. Varghese and P. M. Colman. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution [J]. J Mol Biol, 1991, 221(2):473~486.
- [10] L J Mitnaul, M R Castrucci, K G Murti et al. The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication [J]. J Virol, 1996, 70(2): 873~879.
- [11] S Barman, DP Nayak. Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association [J]. J Virol. 2000. 74 (14): 6538~6545.
- [12] McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(7):2264~2272.
- [13] Jennifer R.Tisoncik, Ying Guo, et al.. Identification of critical residues of influenza neuraminidase in viral particle release [J]. Virology, 2011, 8:14.
- [14] Liang HL, Huang RM, Wang LP, et al. Results of monitoring of epidemic flu in Nanshan District, Shenzhen from 2007 to 2009 [J]. China Trop Med [J]. 2011, 11(3):313~314. (In Chinese)
- (梁海丽, 黄锐敏, 王丽平, 等. 深圳市南山区2007~2009年流行性感冒监测分析 [J]. 中国热带医学. 2011, 11(3):313~314.)

收稿日期 2012-06-24 编辑 符式刚