

·基础研究·

两株人 H7N9 禽流感病毒的全基因组测序及分子特征分析

郭晓兰¹, 司露露¹, 管大伟³, 王颖¹, 于玉凤¹, 方丹云^{1,2}, 武婕^{3*}, 江丽芳^{1,2*}

(1.中山大学热带病防治研究教育部重点实验室, 广东广州 510080; 2.中山大学中山医学院微生物学教研室, 广东广州 510080; 3.广东省疾病预防控制中心, 广东广州 511430)

摘要:【目的】对两株从轻症病例和重症死亡病例中分离的人 H7N9 禽流感病毒进行全基因组测序, 研究其来源、基因组特征以及相互间的分子差异, 旨在了解毒株的遗传进化特征与其致病性及其所致疾病临床类型的关系, 为进一步阐明 H7N9 禽流感病毒的致病机制提供科学依据。【方法】选取两株从轻症病例和重症死亡病例中分离的 H7N9 禽流感病毒进行全基因组序列测定; 运用生物信息学软件比较分析两株病毒的遗传进化关系、基因组特征、受体结合位点、宿主特异性位点及致病相关位点等重要分子特征; 从禽流感共享数据(GISAID)下载 2013 年至 2014 年 10 月轻症和重症病例的病毒分离株序列, 分析致病相关关键位点差异, 并分析这些变异与其致病性及所致疾病临床类型的关系。【结果】这两株 H7N9 禽流感病毒的 HA、NA 和 M 基因来源于 2013 年华东地区流行的 H7N9 禽流感病毒, NP、NS、PA、PB1 和 PB2 基因来源于 2013 年在广东地区禽类中流行的 H9N2 禽流感病毒; H7N9 禽流感病毒 PA 蛋白 L336M 和 PB1 蛋白 I368V 的突变率随流行时间的延长而逐渐上升, 并存在地区差异; 两株病毒各基因核苷酸同源性达到 99.2% 以上, 氨基酸同源性在 99.5% 以上, 但各基因节段存在个别氨基酸的差异, 其中 HA 受体结合位点存在一个关键氨基酸的差异(226L 和 226Q), 宿主特异性位点存在两个关键氨基酸的差异(PB2-591L 和 PB2-591Q, PB2-627E 和 PB2-627K), 毒力位点存在两个关键氨基酸差异(PA-353R 和 PA-353K, PB2-627E 和 PB2-627K); M2 均发生了 S31N 突变; 潜在糖基化位点均相对保守; 2013 年至 2014 年 10 月报道的重症病例病毒分离株 PB2 蛋白 E627K 突变率高于轻症病例分离株。【结论】两株来自不同临床类型的 H7N9 禽流感病毒是一种新的重组病毒, 是由华东地区流行的人 H7N9 禽流感病毒和在广东地区禽类中流行的 H9N2 禽流感病毒基因重组而来; H7N9 禽流感病毒的某些致病相关的关键氨基酸位点在流行的过程中不断发生变异, 必须密切监测毒株的变异动向; 两株致病力不同的病毒各基因节段虽然同源性较高, 但存在关键氨基酸位点的差异, 其中 PB2 蛋白 627 位氨基酸位点的差异可能对病毒的致病性起重要作用, 与所致疾病临床类型相关。

关键词: H7N9 禽流感病毒; 测序; 进化特征; 分子特征; 致病性; 临床类型

中图分类号: R373.13 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2015)02-0167-09

Whole Genome Sequencing and Analysis of Molecular Characteristics of the two Avian Influenza A H7N9 Viruses

GUO Xiao-lan¹, SI Lu-lu¹, GUAN Da-wei³, WANG Ying¹, YU Yu-feng¹, FANG Dan-yun^{1,2}, WU Jie^{3*},
JIANG Li-fang^{1,2*}

(1.Key laboratory of Tropical Diseases Control, Ministry of Education, Sun Yat-sen University; 2.Department of Medical Microbiology, Zhongshan Medical College; 3. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: JIANG Li-fang, E-mail: jianglf@mail.sysu.edu.cn; WU Jie, E-mail: wuxiaorong@yahoo.com.

Abstract: 【Objective】To evaluate the potential association of the molecular characteristics of avian influenza A H7N9 virus with

收稿日期: 2014-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(81071367); 广东省高等学校自然科学研究重点项目(GXZD0901)

作者简介: 郭晓兰, 硕士研究生, 研究方向: H7N9 禽流感病毒的致病与免疫机制, E-mail: xiaolan_g@126.com; * 通信作者: 江丽芳, 教授, 博士生导师, E-mail: jianglf@mail.sysu.edu.cn; 武婕, 副主任技师, 广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所副所长, E-mail: wuxiaorong@yahoo.com

its pathogenicity and patients' clinical outcome by comparing the molecular differences between the two avian influenza A H7N9 virus strains isolated from the fatal case and the patient showing mild disease with full genome sequences, so as to provide further evidence for better understanding of the pathogenesis of avian influenza A H7N9 virus. 【Methods】 The two virus strains isolated from the fatal case and the patient showing mild disease were subjected to whole genome sequencing. The genome characteristics, the evolutionary relationship, the receptor binding sites, host specificity, virulence, drug resistance and potential glycosylated sites were analyzed by bioinformatics software. The sequences of avian influenza A H7N9 viruses isolated from the deceased and the recovered patients during 2013 and 2014 were downloaded from The Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID), and the pivotal sites were compared to elucidate their relationship with the pathogenicity and the clinical outcome. 【Results】 The HA, NA and M gene of the two virus strains clustered with original novel avian influenza A H7N9 virus circulating in East China in 2013, while the NP, NS, PA, PB1 and PB2 gene originated from avian influenza H9N2 virus circulating in the poultry of Guangdong in 2013. The mutation rate of L336M in PA and I368V in PB1 were increasing with time and had geographic differences. The two virus strains had over 99.2% nucleotide identity and 99.5% amino acid identity, but also showed several amino acid differences. Receptor binding sites exhibited one amino acid difference(226L and 226Q). Site 591 and site 627 in PB2 related to host specificity were different (591L and 591Q, 627E and 627K). Site 353 in PA and site 627 in PB2 associated with virulence were distinct (353R and 353K, 627E and 627K). The M2 protein of both virus strains had S31N mutation. All potential glycosylation motifs were relatively conservative. The mutation rate of PB2-E627K substitution of all the avian influenza A H7N9 viruses isolated from the fatal cases reported from 2013 until October 2014 was higher than the viruses isolated from the recovered cases. 【Conclusions】 The emergence of the two avian influenza A H7N9 virus strains in Guangdong may due to the further reassortments between the original novel avian influenza A H7N9 virus circulating in East China and the avian influenza H9N2 virus circulating in the poultry of Guangdong. The avian influenza A H7N9 virus was evolving because of the frequent reassortments and the increasing and geographic mutations of several key sites. Therefore, it is necessary to monitor its evolution and prevent a potential outbreak. The two virus strains, with different clinical outcomes, shared high sequence similarity, but also had differences in some pivotal sites. The mutation E627K in PB2 might be associated with the pathogenicity and the clinical outcome.

Key words: avian influenza A H7N9 virus; genome sequencing; molecular characteristics; molecular evolution; pathogenicity; clinical outcome

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(2):167-175]

禽流感病毒(Avian influenza virus)在病毒分类上属于正粘病毒科甲型流感病毒属,是分节段的单负链 RNA 病毒。基因组包括 8 个节段,分别编码病毒的包膜糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)、基质蛋白(M1、M2)、碱性聚合酶(PB1、PB2、PA)、核蛋白(NP)和非结构蛋白(NS1、NS2)。根据 HA 和 NA 的抗原性差异,又可将甲型流感病毒分为若干亚型,迄今已发现有 16 个 HA 亚型(H1-H16)和 9 个 NA 亚型(N1-N9)。人禽流感是由禽流感病毒的某些亚型所致的人类急性呼吸道传染病,目前已证实能直接感染人类的禽流感病毒有 H5N1、H9N2、H7N7 等。2013 年 2 月,中国华东地区出现首例人感染 H7N9 禽流感病毒病例,截止到 2014 年 7 月,WHO 公布人感染 H7N9 禽流感病例 450 例,死亡 165 例。本研究对两株 2013 年下旬在广东地区流行的人 H7N9 禽流感病毒进行全基因组测序,并绘制进化树,了解其来源与变异动向,对 Liu 等^[1]的分析结果进行了验证和补

充,对 H7N9 禽流感的监测具有重要意义。迄今发现,人类感染 H7N9 禽流感病毒后,临床上可表现为轻、重两种不同的临床类型,轻症患者多见于儿童,表现为发热、咳嗽、咽部充血等流感样症状^[2],重症患者多见于老人,病情发展迅速,可出现重症肺炎并快速发展为 ARDS、感染性休克和多器官衰竭等,最后导致死亡^[3]。Wang 等^[4]认为感染者出现不同的临床类型与宿主的易感性有关,Wang 等^[5]分析了 2013 年上旬流行的 H7N9 人禽流感病例,认为疾病的严重程度与所感染病毒的遗传进化特征相关。本研究对分离自轻症和重症感染者的两株 H7N9 禽流感病毒进行全基因组测序,研究它们的基因组特征以及相互间的分子差异,并结合 2013 年至 2014 年 10 月报道的轻、重症病例进行比较分析,更加全面系统地分析了 H7N9 禽流感病毒的遗传进化特征与其致病力及所致疾病临床类型的关系,为阐明 H7N9 禽流感病毒的致病机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 病毒与鸡胚

H7N9 禽流感病毒 A/Guangdong/6/2013 (H7N9) (简称 GD/6/2013) 和 A/Guangdong/7/2013 (H7N9) (简称 GD/7/2013) 由广东省疾病预防控制中心提供, 分别分离于轻症儿童患者和重症死亡病例(轻症儿童患者:3.5 岁,男,2013 年 10 月发病,轻症痊愈;重症病例:39 岁,男,2013 年 12 月发病,重症死亡)。SPF(无特定病原体, Specific Pathogen Free)级鸡胚由广东省疾病预防控制中心提供。

1.2 试剂

QIAGEN RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; Takara PrimeScript[®] RT reagent Kit、PCR 试剂和 pMD18-T 载体购自 TAKARA 公司; PCR 纯化试剂盒购自 OMEGA 公司; 大肠杆菌感受态 DH5 α 购自鼎国公司。

1.3 方法

1.3.1 病毒的增殖与滴定 将 H7N9 禽流感病毒 GD/6/2013 和 GD/7/2013 接种 10 日龄的 SPF 鸡胚, 48 h 后收获尿囊液, 将病毒倍比稀释并接种于 MDCK (马达二氏犬肾, Madin-Darby Canine Kidney) 细胞, TCID₅₀ (半数组织培养感染剂量, Tissue culture infective dose) 滴定病毒后分装保存。

1.3.2 核酸提取与 PCR 扩增 参照 QIAGEN RNeasy Mini Kit 的操作说明提取病毒核酸, 并将其反转录成 cDNA, 用相应特异性引物将流感病毒 8 个基因节段进行 PCR 扩增。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min; PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒回收并纯化。

1.3.3 PCR 产物的克隆、鉴定和测序 回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素的 LB 板上, 挑选重组质粒, 将含重组质粒菌液进行 PCR, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 将菌液送 Thermo Fish 公司测序。

1.3.4 序列分析 应用 Laser Gene 软件对测序结果进行分析; DNA Star 软件进行序列拼接; 采用 NCBI BLAST 软件进行核苷酸和氨基酸同源性分析; 采用 MEGA 6.0 软件进行遗传进化分析, 绘制进化树, 并进行序列比对, 找出关键位点的差异。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 医学统计软件进行统计学分析, 独立的两组二分类资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H7N9 禽流感病毒全基因组测序

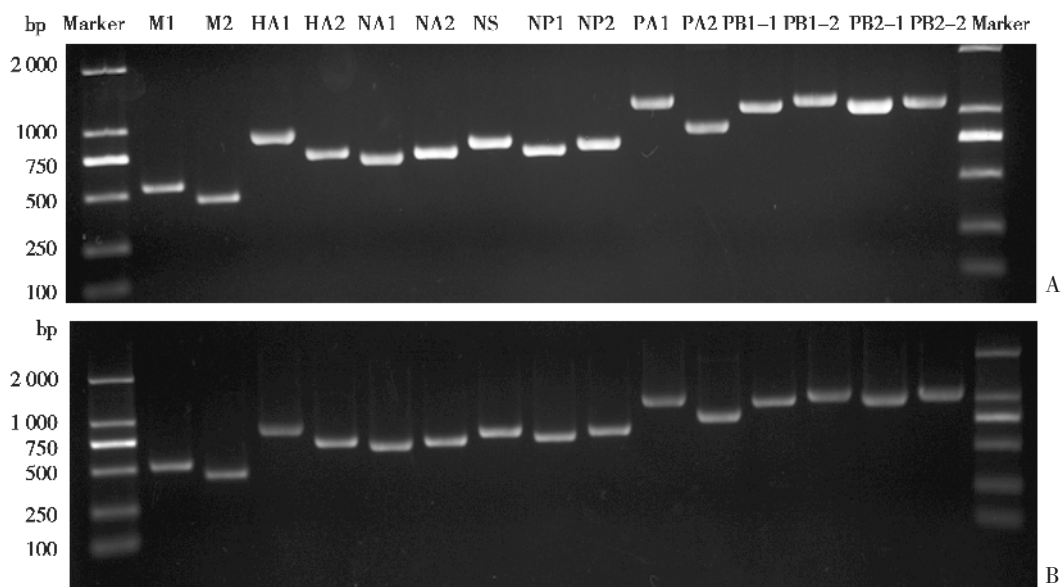
GD/6/2013 和 GD/7/2013 的 8 个基因, 除 NS 基因一次扩出外, 其余基因均分两段进行 PCR, 共 15 个基因片段进行克隆。克隆结果经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 两株病毒各基因大小正确并且一致。测序结果表明两株病毒各基因节段的长度及开放阅读框均一致(表 1, 图 1)。

表 1 两株病毒全基因组 8 个基因节段的核苷酸序列分析
Table 1 The genome characteristics of the two isolated virus strains

| Gene | Length(nt) | Amino acid | Open reading frame | |
|------|------------|------------|--------------------|------------|
| | | | Location | Length(nt) |
| HA | 1683 | 560 | 1-1 683 | 1 683 |
| NA | 1398 | 465 | 1-1 398 | 1 398 |
| NP | 1497 | 498 | 1-1 497 | 1 497 |
| PA | 2151 | 716 | 1-2 151 | 2 151 |
| PB1 | 2274 | 757 | 1-2 274 | 2 274 |
| PB2 | 2280 | 759 | 1-2 280 | 2 280 |
| M | 982 | M1:252 | 1-759 | 759 |
| | | M2:97 | 1-26, 715-982 | 294 |
| NS | 838 | NS1:217 | 1-654 | 654 |
| | | NS2:121 | 1-30, 503-838 | 366 |

2.2 分子进化分析

运用 NCBI 中的 BLAST 对 H7N9 禽流感病毒 8 个基因节段分别进行同源性搜索, 下载同源性最高的 30 条序列, 与 GISAID 下载的 170 株 H7N9 禽流感病毒基因序列进行合并整理, 利用 MEGA 6 软件, 使用邻接法 (Neighbor Joining) 绘制各基因的遗传进化树。结果表明 H7N9 禽流感病毒 GD/6/2013 和 GD/7/2013 HA 基因与 A/environment/Suzhou/8/2013 的同源性最高, NA 基因与 A/Zhejiang/1/2013 和 A/Huzhou/4/2013 的同源性最高, M 基因与 A/Nanjing/2/2013 和 A/Hangzhou/1/2013 同源性最高; NS、PA、PB1、NP 和 PB2 基因与 2013-2014 年在广东和香港流行的人 H7N9 禽



A: The electrophoresis result of successful clones of A/Guangdong/6/2013; B: The electrophoresis result of successful clones of A/Guangdong/7/2013

图 1 H7N9 禽流感病毒各基因节段克隆结果鉴定图

Fig.1 The electrophoresis results of successful clones of avian influenza A H7N9 virus

流感病毒在一个大的分支上,这个大分支与2011-2013年广东、香港或越南地区禽类分离到的H9N2禽流感病毒同源性最高(图2)。

2.3 关键氨基酸位点突变情况分析

根据 WHO 公布的最新数据^[6],H7N9 禽流感病毒的暴发主要出现两个高峰,分别是 2013 年上旬主要在华东地区流行的代表株(共 133 例)和 2013 年下旬至 2014 年上旬在华南地区流行的代表株(共 317 例),我们将其划分为早期和晚期代表株。

从 GISAID 下载了 78 株早期代表株和 21 株晚期代表株,按照时间来分析 H7N9 禽流感病毒关键氨基酸位点突变情况,结果发现 PB1 蛋白 I368V 突变在早期突变率是 84%,晚期突变率为 100%,具有上升趋势,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。PB2 蛋白 D701N 突变在早期的突变率是 8%,晚期突变率为 18%,具有上升趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$)。PA 蛋白 L336M 在早期无突变,晚期的突变率为 42%,有明显上升趋势,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

从 GISAID 下载了 71 株华东分离株和 21 株华南分离株,分析它们关键氨基酸位点的差异。结果表明华东分离株 PA 蛋白第 336 位氨基酸全部为 L,而华南分离株则发生了 L336M 突变,突变率

为 62%,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。华东地区 PB1 蛋白 I368V 的突变率是 84%,华南地区突变率为 100%,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。PA 蛋白 L336M 和 PB1 蛋白 I368V 的突变率在地区分离株间存在差异。

2.4 同源性分析

将 GD/6/2013 和 GD/7/2013 8 个基因节段进行同源性比对,结果表明各个基因节段的核苷酸同源性在 99.2%以上,氨基酸同源性在 99.5%以上(表 2)。两株病毒的同源性较高,但它们各个基因节段均有个别氨基酸的差异(表 3)。

2.5 致病相关位点分析

2.5.1 受体结合位点 流感病毒感染宿主细胞是由病毒包膜表面糖蛋白 HA 与细胞表面的唾液酸(sialic acid, SA)受体共同介导的。人流感病毒和禽流感病毒识别的受体类型不同,前者为唾液酸 $\alpha 2,6$ 半乳糖(SA α -2,6Gal),后者为唾液酸 $\alpha 2,3$ 半乳糖(SA α -2,3Gal)。人类上呼吸道黏膜上皮细胞存在大量 SA α -2,6Gal 受体,下呼吸道及肺泡上皮细胞既存在 SA α -2,6Gal 受体,也存在 SA α -2,3Gal 受体,但以 SA α -2,3Gal 受体为主,而禽类的呼吸道和肠道黏膜上皮细胞主要为 SA α -2,3Gal 受体,所以人类一般不容易感染禽流感病毒。

HA 受体结合位点主要包括 130 环(131-138

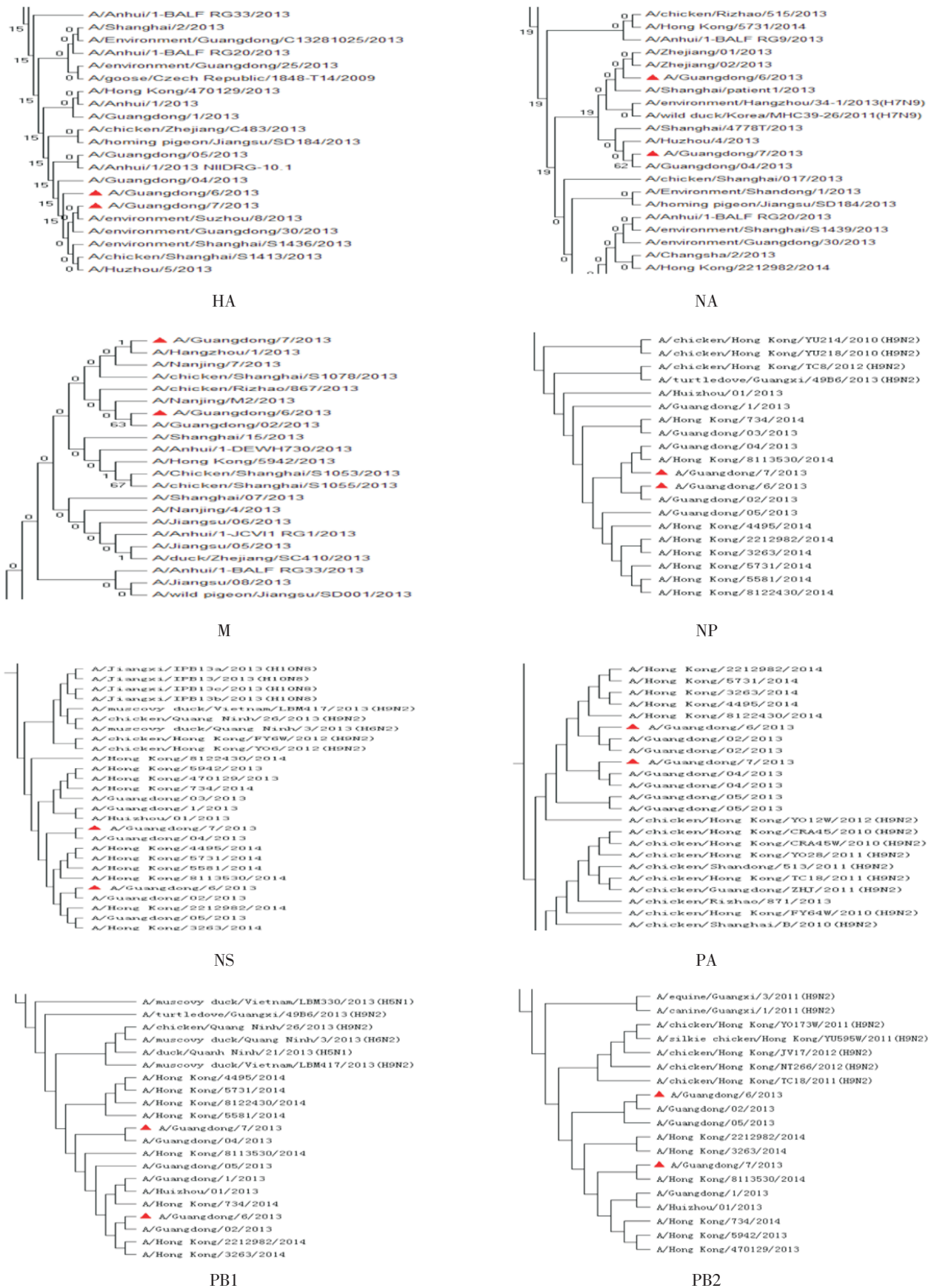


图 2 H7N9 禽流感病毒基因遗传进化树图

Fig.2 The phylogenetic analysis of the novel avian influenza A H7N9 virus

表 2 两株流感病毒同源性比对结果

Table 2 The homology analysis of the two avian influenza A H7N9 virus strains (%)

| Gene | Virus | Nucleotide identity | Amino acid identity |
|------|-----------|---------------------|---------------------|
| HA | GD/6/2013 | 99.8 | 99.5 |
| | GD/7/2013 | | |
| NA | GD/6/2013 | 99.6 | 99.6 |
| | GD/7/2013 | | |
| NS | GD/6/2013 | 99.2 | 100 |
| | GD/7/2013 | | |
| NP | GD/6/2013 | 99.9 | 100 |
| | GD/7/2013 | | |
| M | GD/6/2013 | 99.9 | 100 |
| | GD/7/2013 | | |
| PA | GD/6/2013 | 99.4 | 99.6 |
| | GD/7/2013 | | |
| PB1 | GD/6/2013 | 99.8 | 99.6 |
| | GD/7/2013 | | |
| PB2 | GD/6/2013 | 99.6 | 99.5 |
| | GD/7/2013 | | |

表 3 两株病毒核苷酸和氨基酸差异分析

Table 3 The differences in sites between the two avian influenza A H7N9 viruses

| Gene | Base mutation number | The sense mutation number | The sense mutation location | Amino acids mutation of sites | |
|------|----------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|
| | | | | GD/6/2013 | GD/7/2013 |
| M | 1 | 0 | - | - | - |
| HA | 3 | 3 | 381A-C | 127D | 127E |
| | | | 452A-G | 151G | 151E |
| | | | 704A-T | 235L | 235Q |
| NA | 5 | 2 | 197G-A | 66N | 66S |
| | | | 355T-C | 119P | 119S |
| NS | 7 | 0 | - | - | - |
| NP | 1 | 0 | - | - | - |
| PA | 13 | 3 | 332G-A | 111D | 111G |
| | | | 431A-T | 144L | 144H |
| PB1 | 5 | 1 | 1 058A-G | 353R | 353K |
| | | | 685G-A | 229K | 229E |
| PB2 | 8 | 4 | 752G-A | 251K | 251R |
| | | | 1 562C-T | 521I | 521T |
| | | | 1 772A-T | 591L | 591Q |
| | | | 1 879A-G | 627E | 627K |

位氨基酸),140 环 (140-145 位氨基酸),220 环 (219-228 位氨基酸),190 螺旋 (190-196 位氨基酸) 以及部分 150 环 (156-160 位氨基酸)。Dortmans 等^[7]认为 HA 受体结合位点 Q226L 和 G186V 突变使 H7N9 禽流感病毒对 SA α -2,3Gal 受体的结合减弱,对 SA α -2,6Gal 受体的结合增强,这是禽流感病毒感染人的重要因素之一。本研究的两株病毒 HA 受体结合位点均发生 G186V 突变,但轻症病例分离株 GD/6/2013 HA 发生了 Q226L 突变,而重症病例分离株 GD/7/2013 没有突变,提示 GD/6/2013 可能更容易感染人类。研

究表明 HA 蛋白只要出现 158D/224K/226L、110Y/160A/226L/228S、196R/226L/228S 三种突变组合中的一种,就能使 H5N1 禽流感病毒在上呼吸道有效增殖并通过飞沫在雪貂间传播^[8]。GD/6/2013 没有上述组合中任一种组合的突变,提示该病毒尚未获得飞沫传播的充分条件,人传人可能性较小,但同时也提示该病毒正在向适合感染哺乳动物的方向发展(表 4)。

2.5.2 宿主特异性分析 HA 受体结合位点是决

表 4 HA 受体结合的关键氨基酸位点

Table 4 The pivotal sites related to the receptor binding property

| HA Sites | 130 loop | | | | 140 loop | | 150 loop | | | | | |
|-----------|----------|-----|-----|-----|----------|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 131 | 133 | 136 | 138 | 145 | 153 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 |
| GD/7/2013 | R | N | T | A | S | W | L | S | N | T | D | N |
| GD/6/2013 | R | N | T | A | S | W | L | S | N | T | D | N |

| HA Sites | 190 helix | | | | | | | | 220 loop | | | | | | | |
|-----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 192 | 193 | 194 | 196 | 219 | 221 | 222 | 225 | 226 | 227 | 228 |
| GD/7/2013 | V | S | T | A | E | T | K | L | G | A | P | Q | G | Q | S | G |
| GD/6/2013 | V | S | T | A | E | T | K | L | G | A | P | Q | G | L | S | G |

The HA gene was under H3 numbering system

定宿主特异性的重要因素,此外,其他基因对宿主特异性也有重要意义。GD/6/2013 和 GD/7/2013 PA 蛋白均发生 L336M 突变, Bussey 等^[9]证实 PA 蛋白 L336M 突变可以明显增强病毒对哺乳动物的适应性。两株病毒均编码全长 PB1-F2 蛋白,该蛋白被证实与哺乳动物的适应性相关^[10]。Mok 等^[11]通过研究证明 H7N9 禽流感病毒的 PB2 蛋白 Q591R 和 E627K 突变能够明显增强禽流感病毒对小鼠的致病能力以及对哺乳动物的适应性。重症病例分离株 GD/7/2013 的 PB2 蛋白发生 E627K 突变,该突变可能影响了病毒的致病性(表 5)。

2.5.3 毒力位点分析 GD/6/2013 和 GD/7/2013 的 NA 蛋白茎杆区 69 ~ 73 位氨基酸发生缺失突变,类似的缺失曾在 H5N1 高致病性禽流感病毒中出现,被认为是毒力增强的标志之一。但 H7N9 禽流感病毒的 NA 缺失较短,其导致的具体生物学意义尚未完全明了。研究证明 M1 发生 N30D 和 T215A 突变,PA 发生 L336M 突变,PB2 发生 L89V

突变,NS1 发生 P42S 突变,都可以增强病毒的毒力^[3],两株病毒均发生上述位点的变异。重症病例分离株 GD/7/2013 的 PB2 蛋白发生 E627K 突变,该变异可能增强了病毒的毒力,从而表现为高致病性(表 6)。

2.5.4 耐药位点分析 目前抗流感病毒的药物主要分为两类:第一类是针对 NA 的神经氨酸酶抑制剂(达菲),流感病毒 NA 酶的活性位点发生 E119G、R152K、H274Y、R292K 突变时,会导致流感病毒产生耐药性^[12]。另一类是 M2 离子通道抑制剂(金刚烷胺类药物),当 M2 中 L26F、V27A、A30T、S31N 和 G34E 中的任何一个位点的改变都将使流感病毒对该类药物产生耐药性^[13]。结果表明 GD/6/2013 和 GD/7/2013 的 M2 均发生 S31N 突变,提示这两株病毒对离子通道抑制剂均不敏感。两株病毒没有发生 NA 酶关键位点的突变,提示对神经氨酸酶抑制剂无耐药性(表 7)。

2.5.5 潜在糖基化位点分析 本研究的两株病毒

表 5 流感病毒宿主特异性相关位点

Table 5 Sites associated with the host specificity

| virus | PB1 | | | | | PB2 | | | | | PA | | | | | PB1-F2 | | |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|-----|------|
| | 375 | 158 | 271 | 588 | 590 | 591 | 627 | 636 | 701 | 714 | 85 | 186 | 336 | 97 | 400 | | 423 | 476 |
| | N-S | E-G | T-A | A-I | G-S | Q-R | E-K | L-F | D-N | S-R | T-I | G-S | L-M | T-I | P-L | M-I | V-A | |
| GD/7/2013 | N | E | T | A | G | Q | K | L | D | S | T | G | M | T | P | V | A | 90aa |
| GD/6/2013 | N | E | T | A | G | L | E | L | D | S | T | G | M | T | P | V | A | 90aa |

The PB1, PB2 and PA gene were numbered from start codon (M)

表 6 流感病毒毒力相关位点

Table 6 Sites related to the virulence

| Virus | HA | NA | | M1 | | PA | | PB2 | | NS1 |
|-----------|-------|-------|-------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|------|
| | D225G | S315N | 69-73 deletion | N30D | T215A | L336M | K353R | L89V | E627K | P42S |
| GD/7/2013 | G | S | deletion | D | A | M | K | V | K | S |
| GD/6/2013 | G | S | deletion | D | A | M | R | V | E | S |

The HA gene was under H3 numbering system. The NA gene was under N2 numbering system. Other internal genes were numbered from start codon (M).

表 7 流感病毒耐药相关位点

Table 7 Sites related to drug resistance

| virus | NA (N2 Numbering) | | | | M2 | | | | |
|-----------|-------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| | E119G | R152K | H274Y | R292K | L26F | V27A | A30T | S31N | G34E |
| GD/7/2013 | E | R | H | R | L | V | A | N | G |
| GD/6/2013 | E | R | H | R | L | V | A | N | G |

表 8 轻、重症 H7N9 禽流感病毒分离株关键氨基酸位点差异

Table 8 The differences in pivotal sites between the virus strains isolated from the fatal and the recovered cases

| Clinical outcomes | HA226 | NA152 | NA292 | PA336 | PA353 | PB2591 | PB2627 | PB2701 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|--------|--------|
| Recovered (22) | 20(L) | 21(R) | 22(R) | 21(L) | 21(K) | 19(Q) | 13(K) | 19(D) |
| | 1(Q) | 1(K) | | 1(M) | 1(R) | 2(χ) | 9(E) | 3(N) |
| | 1(I) | | | | | 1(L) | | 21(D) |
| Fatal(23) | 19(L) | 23(R) | 20(R) | 21(L) | 23(K) | 22(Q) | 18(K) | 2(N) |
| | 2(Q) | | 3(K) | 2(M) | | 1(K) | 5(E) | |
| | 2(I) | | | | | | | |

“ χ ”: unknown aminol acid

的 HA 均含有 5 个保守的潜在糖基化位点, 分别为 30NGT、46NAT、249NDT、421NWT、493NNT; NA 也均含有 3 个潜在的糖基化位点, 分别为 82NLT、142NGT、197NAS。两株病毒的潜在糖基化位点没有发生数目和位置的变化, 推测糖基化不是影响这两株病毒毒力差异的因素。

2.6 病毒关键氨基酸位点差异与患者临床症状的关系分析

从 GISAID 下载了 22 株轻症(恢复)和 23 株重症(死亡)患者分离株, 更深入地分析关键位点突变与感染者临床类型的关系。轻症和重症分离株 HA-Q226L、NA-R152K、NA-R292K、PA-L336M、PA-K353R、PB2-Q591R、PB2-D701N 突变的突变率没有明显差异, 只有 PB2 蛋白 E627K 的突变率有明显差异(轻症:重症突变率:59%:78%), 进一步表明 PB2-E627K 突变可能对病毒致病性起重要作用(表 8)。

3 讨论

2013 年 4 月 H7N9 人禽流感在华东地区暴发, 截止至 2013 年 10 月感染病例为 137 例, 死亡 45 例。Liu 等^[14]研究表明 H7N9 禽流感病毒至少为四源重组病毒, HA 基因和 NA 基因分别与 A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3) 和 A/wild bird/Korea/A14/2011(H7N9)同源, NS 基因来源于江苏地区禽类的 H9N2 亚型禽流感病毒。而其余内部基因来源于上海及其周边地区禽类的 H9N2 禽流感病毒。2013 年 10 月到 2014 年上旬 H7N9 人禽流感又在华东和华南地区出现新的流行, 感染病例有 317 例。本研究的研究结果表明, GD/6/2013 和 GD/7/2013 两株病毒的 HA、NA 和 M 基因来源于

2013 年早期在华东地区流行的 H7N9 禽流感病毒, 其他 5 个基因均来源于在广东和香港禽类中流行的 H9N2 禽流感病毒, 是一种新型的重组 H7N9 禽流感病毒。对广东地区流行的其他 6 株人 H7N9 禽流感病毒进行进化分析, 结果与这两株病毒一致, 由此推测在广东地区流行的人 H7N9 禽流感病毒是一种新型的重组病毒。但为了更全面地监测广东地区流行病毒株的变异情况, 还需收集更多的流行病毒株序列信息并对其进行分析。

对流行早期和晚期的病毒分离株的分子特征比较分析有助于我们更好地了解 H7N9 禽流感病毒的进化趋势, 从而为 H7N9 禽流感的防控提供科学依据。我们的研究表明, H7N9 禽流感病毒在流行的过程中不断发生变异, 其中 PB1 蛋白 I368V 和 PA 蛋白 L336M 的突变率随着流行时间的延长有上升的趋势, 这些位点的突变被证实能够提高病毒的毒力和对哺乳动物的适应性^[5], 提示晚期分离株的致病性可能发生了变化。

两株病毒 HA 受体结合位点第 226 位氨基酸也存在差异, GD/7/2013 为 Q, 而 GD/6/2013 为 L, 发生了 Q226L 突变, Q226L 突变可使病毒与人上呼吸道上皮细胞的 SA α -2, 6Gal 受体的结合增强, 提示 GD/6/2013 可能更易感染人类。GD/7/2013 的 HA 蛋白虽无发生 Q226L 突变, 也能感染人类, 提示 HA 蛋白 Q226L 突变并不是禽流感病毒感染人类的充分条件。

Liu 等^[1]研究表明华南地区流行的 H7N9 禽流感病毒分离株 PB2 基因来源于本地禽类流行的 H9N2 禽流感病毒, 但两者的 PB2 蛋白第 627 位氨基酸位点存在差异, 前者大部分发生了 E627K 的突变, 而后者仍然为 627E, 提示 PB2 蛋白 E627K 突变可能是禽流感病毒对哺乳动物适应的重要因

素之一。Mok 等^[11]通过突变实验证明 PB2 蛋白 E627K 突变能够增强病毒对小鼠的致病性和哺乳动物的适应性。我们通过比较轻、重症分离株关键氨基酸位点的差异发现 PB2 蛋白 E627K 突变可能与感染者所致疾病类型相关,提示 H7N9 禽流感病毒的 PB2 蛋白 E627K 突变可能对病毒的致病性有重要作用。此外,两株病毒的毒力相关位点 PA 蛋白第 353 位和 PB2 蛋白第 591 位氨基酸位点也存在差异,Hu 等^[15]研究证明 PA 蛋白发生 K353R 突变,与 HPAI H5N1 在小鼠体内的致命性扩散及过度应答有关,但是否影响 H7N9 禽流感病毒的致病性和临床过程,有待进一步研究。

本研究结果表明,两株病毒分子特征的差异可能与病毒的致病力及临床类型的差异有密切的关系,因此,找出其中的规律有利于我们更好地阐明病毒的致病机制,但是病毒所致疾病是病毒与宿主相互作用的结果,不仅与病毒本身有关,还与宿主等因素相关。为了更系统科学地阐明两株病毒的遗传进化特征与致病性的关系,还需要对病毒的致病性进行深入的研究。

(致谢: 特别感谢 GISAID 为本研究提供所有 H7N9 禽流感病毒基因及蛋白序列,感谢 WHO 中国流感中心、杭州疾病预防控制中心、浙江疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、香港公共卫生检测中心、台湾 CDC 等无私共享 H7N9 禽流感数据。)

参考文献

- [1] Liu J, Zhang J, Huang F, et al. Complex reassortment of polymerase genes in Asian influenza A virus H7 and H9 subtypes[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 23: 203–208.
- [2] Zeng X, Mai W, Shu B, et al. Mild Influenza A/H7N9 Infection among Children in Guangdong Province [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014 Jul 25. [Epub ahead of print]
- [3] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A(H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(20): 1888–1897.
- [4] Wang Z, Zhang A, Wan Y, et al. Early hypercytokinemia is associated with interferon-induced transmembrane protein-3 dysfunction and predictive of fatal H7N9 infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(2): 769–774.
- [5] Wang D, Yang L, Gao R, et al. Genetic tuning of the novel avian influenza A(H7N9) virus during interspecies transmission, China, 2013[J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(25): 20836.
- [6] WHO. Human infections with avian influenza A(H7N9) virus[EB/OL]. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/riskassessment_h7n9_27june14.pdf, 2014-6-27/2014-10-25.
- [7] Dortmans JC, Dekkers J, Wickramasinghe IN, et al. Adaptation of novel H7N9 influenza A virus to human receptors[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 3058.
- [8] Russell CA, Fonville JM, Brown AE, et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host [J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1541–1547.
- [9] Bussey KA, Desmet EA, Mattiaccio JL, et al. PA residues in the 2009 H1N1 pandemic influenza virus enhance avian influenza virus polymerase activity in mammalian cells[J]. *J Virol*, 2011, 85(14): 7020–7028.
- [10] Smith AM, McCullers JA. Molecular signatures of virulence in the PB1–F2 proteins of H5N1 influenza viruses[J]. *Virus Res*, 2013, 178(1): 146–150.
- [11] Mok CK, Lee HH, Lestra M, et al. Amino acid substitutions in polymerase basic protein 2 gene contribute to the pathogenicity of the novel A/H7N9 influenza virus in mammalian hosts[J]. *J Virol*, 2014, 88(6): 3568–3576.
- [12] Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase[J]. *Nature*, 1983, 303(5912): 41–44.
- [13] Grambas S, Bennett MS, Hay AJ. Influence of amantadine resistance mutations on the pH regulatory function of the M2 protein of influenza A viruses [J]. *Virology*, 1992, 191(2): 541–549.
- [14] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1926–1932.
- [15] Hu J, Hu Z, Song Q, et al. The PA-gene-mediated lethal dissemination and excessive innate immune response contribute to the high virulence of H5N1 avian influenza virus in mice[J]. *J Virol*, 2013, 87(5): 2660–2672.

(编辑: 徐杰)