

肠道病毒 71 型分离株基因特征分析*

司鲁莹¹, 高峰², 温红玲¹, 赵丽¹, 宋艳艳¹, 许洪芝¹, 袁晓晶¹, 王志玉¹

摘要:目的 了解 2009—2010 年山东省临沂市肠道病毒 71 型(EV71)分离株的基因特征,初步探讨 VP1 区核苷酸或氨基酸变异与不同临床类型的关系。方法 从手足口病(HFMD)病例、重症病例和死亡病例的粪便标本中分离获得 23 株 EV71 病毒株,RT-PCR 扩增 VP1 区,并进行序列测定和分析。结果 23 株分离株与 A、B 基因型同源性较低;与 C4 亚型的 C4a 群代表株的核苷酸和氨基酸同源性分别达到 92.8%~93.5% 和 98.3%~99.3%,明显高于其他亚型代表株的同源性;各分离株间的氨基酸序列比对显示无特征性改变。结论 2009—2010 年临沂地区流行的 EV71 是 C4 亚型的 C4a 群, HFMD 病例、重症病例和死亡病例分离株 VP1 区核苷酸序列和氨基酸序列无特征性差异。

关键词: 肠道病毒 71 型(EV71); VP1 基因; 基因特征

中图分类号: R 373

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1446-03

Genetic characteristics of enterovirus 71 strains isolated in Linyi, Shandong province 2009 – 2010

SI Lu-ying*, GAO Feng, WEN Hong-ling, et al (* Education Ministry Key Laboratory of Experimental Teratology, Department of Virology, School of Public Health, Shandong University, Ji'nan, Shandong Province 250012, China)

Abstract: Objective To explore the genetic characteristics of VP1 gene of enterovirus 71 strains isolated in Linyi, Shandong province 2009 – 2010 and to analyze the relationship between variations of VP1 gene and different clinical types. **Methods** The VP1 genes of 23 enterovirus strains isolated from stool and throat swab specimens of hand-foot-and-mouth disease (HFMD) cases were amplified with reverse transcription-PCR (RT-PCR) and their sequences were analyzed with DNASTAR 6 and MEGA 4. **Results** The homology between the 23 strains and the reference strains of subtype A and B was relatively low. The homologies of nucleotide and the amino acid of the 23 strains with the reference strains of group C4a were 92.8% – 93.5% and 98.3% – 99.3%, respectively, indicating that there was a close relationship between them. Comparisons of amino acid sequences among the 23 strains showed that there were no characteristic variations. **Conclusion** The enterovirus 71 strains isolated in Linyi, Shandong province belonged to the group C4a of subtype C4 and there were no characteristic variations in nucleotides or amino acids among HFMD cases, severe cases or death cases.

Key words: enterovirus 71; VP1 gene; genetic characteristics

肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(enterovirus)成员,是引起手足口病(hand-foot-and-mouth disease, HFMD)的主要病原体之一。此外, EV71 还可侵犯呼吸系统、中枢神经系统及心血管系统而引起脑炎、心肌炎、肺水肿和弛缓性麻痹等症状。近年来亚洲地区的 EV71 流行呈上升趋势^[1]。为了解山东省临沂地区 EV71 基因特征,探讨病毒株流行情况,于 2010 年 5 月—2011 年 12 月对 2009—2010 年分离自不同类型病例(HFMD 病例、重症病例和死亡病例)的 23 株 EV71 进行 VP1 区核苷酸序列扩增,

使用 DNASTAR 6 和 MEGA 4 对序列进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料 采用单纯随机抽样法,从 2009—2010 年临沂市临床诊断为 HFMD 的患儿中采集粪便标本和咽拭子标本共 112 份,其中男性患儿标本 60 份,女性患儿标本 52 份, -70 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离 将预处理后的标本接种至刚长满单层、形态良好的人横纹肌瘤细胞(rhabdomyosarcoma, RD)上,同时设置正常细胞对照,置 36 °C 培养箱内培养,逐日观察细胞病(cytopathogenic effect, CPE),当 CPE 达 +++ 以上时收获病毒,即为阳性分离物;若连续传 3 代仍无 CPE 出现,则判为阴性。

1.2.2 病毒鉴定 自阳性病毒分离物中提取病毒 RNA(Omega, Viral RNA Kit, 美国 Omega 公司)。采用一步法 RT-PCR 试剂盒(QIAGEN, One step RT-PCR Kit, 德国 QIAGEN 公司)进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)^[2],以鉴定病毒类型。引物

* 基金项目: 国家自然科学基金(30901265); 教育部博士点基金新教师基金(20090131120068); 山东省自然科学基金(ZR2010CQ030); 山东大学公共卫生学院青年人才创新基金(GGWS200801)

作者单位: 1. 山东大学公共卫生学院病毒学研究室 实验畸形学教育部重点实验室, 山东 济南 250012; 2. 山东临沂市人民医院

作者简介: 司鲁莹(1986-), 女, 山东威海人, 硕士在读, 研究方向: 分子病毒学和传染性疾病预防流行病学。

通讯作者: 温红玲, E-mail: wenhongling@sdu.edu.cn

包括人肠道病毒(包括 EV71、Coxsackievirus B 组)核酸检测通用引物序列和 EV71 核酸检测引物序列^[3]。反应条件:50 ℃ 30 min, 95 ℃ 15 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 产物。

1.2.3 RT-PCR 扩增 VP1 全序列 采用一步法 RT-PCR 扩增 VP1 全序列。扩增引物: EV71-VP1-F: 5'-GCAGCCCAAAGAACTTCAC-3', EV71-VP1-R: 5'-AAGTCGCCGAGAGCTGTCTC-3', 扩增片段全长为 1 042 bp^[4]。RT-PCR 反应条件: 50 ℃ 30 min, 95 ℃ 15 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 产物。

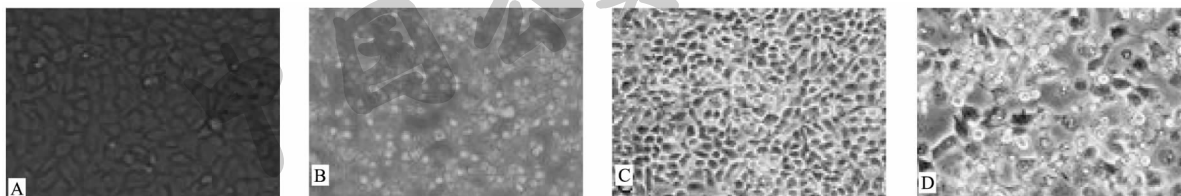
1.2.4 VP1 区全序列测定和分析 扩增的片段纯化后送由上海博尚生物技术有限公司进行测序。使用 DNASTAR 6 进行同源性分析, MEGA 4 软件构

建系统发生树。用于构建系统发生树的 EV71 病毒各基因型代表株的参比序列来自 GenBank。

1.3 统计分析 采用 Excel 2003 对数据进行统计分析。

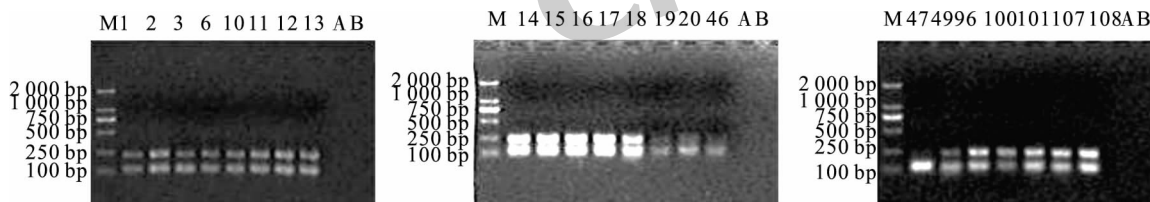
2 结果

2.1 病毒分离与鉴定(图 1、2) RD 细胞接种标本后, CPE 达 +++ 以上时收获(图 1)。在同一反应体系中同时加入 2 对鉴定引物进行 RT-PCR 鉴定, 在预期位置分别出现 2 条条带的初步鉴定为 EV71(图 2), 共获得 23 株分离株, 其中分离自 HFMD 病人 20 株(SDLY 1、SDLY 2、SDLY 3、SDLY 6、SDLY 10、SDLY 11、SDLY 12、SDLY 13、SDLY 14、SDLY 15、SDLY 16、SDLY 17、SDLY 18、SDLY 19、SDLY 20、SDLY 46、SDLY 47、SDLY 49、SDLY 100、SDLY 101)、分离自重症病例 2 株(SDLY 96、SDLY 108)、分离自死亡病例 1 株(SDLY 107)。



注: A、C 为正常细胞; B、D 为接种标本后出现 CPE 的细胞。

图 1 RD 细胞和 CPE

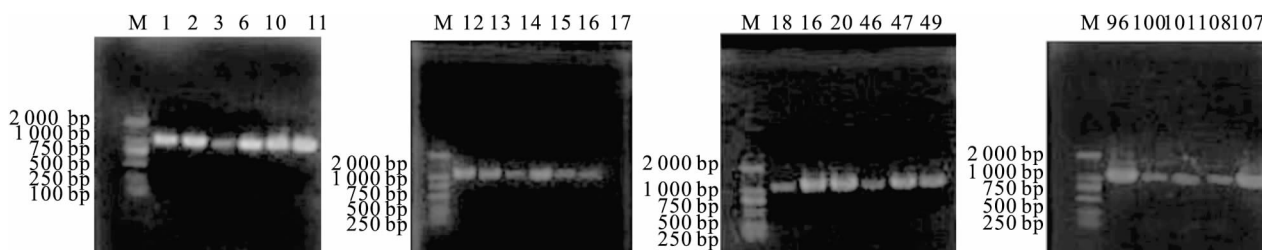


注: M: DL2000 分子量对照; A: 正常 RD 细胞; B: 试剂对照。

图 2 RT-PCR 对 EV71 病毒核酸特异性扩增情况

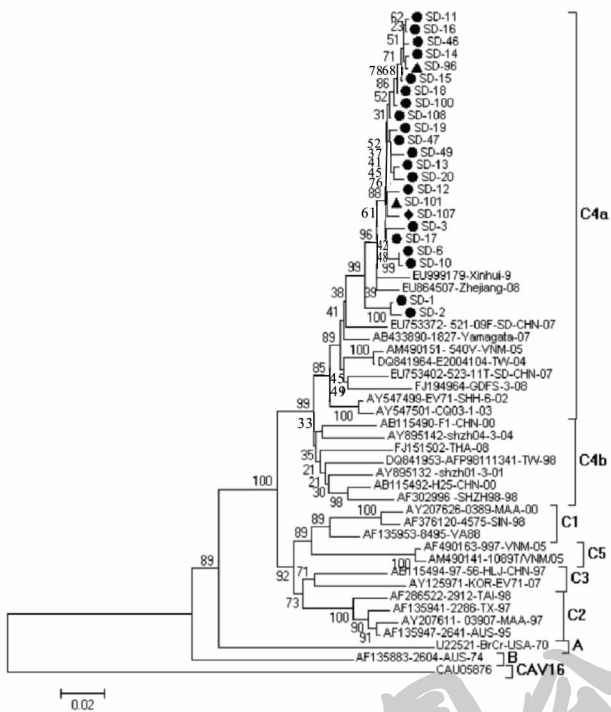
2.2 VP1 全序列片段核苷酸及氨基酸的序列分析(图 3、4) 由 PCR 扩增获得的包含 VP1 区的片段全长为 1 042 bp, 其中 VP1 区为 891 bp, 可编码 297 个氨基酸。从 GenBank 中下载 EV71 的各基因型(亚型)的代表株, 与 23 株分离株进行 VP1 全序列片段核苷酸与氨基酸的同源性分析。结果显示, 这 23 株分离株与 A 型和 B 型代表株的亲缘性较远, 核

苷酸和氨基酸的同源性分别为 82.0% ~ 82.7% 和 94.3% ~ 95.0%; 与 C 型代表株的亲缘性较近, 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 87.1% ~ 93.5% 和 96.3% ~ 99.3%, 尤其与 C4 亚型的 C4a 群代表株亲缘性最近, 核苷酸和氨基酸的同源性分别为 92.8% ~ 93.5% 和 98.3% ~ 99.3%。将 23 株分离株与各基因型及亚型代表株的 VP1 全序列构



注: M: DL2000 分子量对照。

图 3 RT-PCR 对 VP1 序列进行特异性扩增情况



注: ●代表 HFMD 病例; ▲代表重症病例; ◆代表死亡病例。

图 4 23 株毒株与 EV71 各亚型代表株 VP1 区的基因进化树

建系统发生树,结果表明,23 株分离株与 EV71 的 C4 基因亚型的 C4a 群相近,处于同一簇。23 株分离株与阜阳株 EU703813(分离自 2008 年的死亡病例, C4a 群)进行氨基酸顺序比对分析,结果显示 23 株分离株的氨基酸顺序与阜阳株的同源性为 99.0%~100%。在 145 位氨基酸差异最大(SDLY 46、SDLY 107 由 E→Q, SDLY 2、SDLY 11、SDLY 100 由 E→G),但这一变化与临床类型并不存在关联。其余氨基酸变化不大且改变均非特异性。23 株分离株与阜阳株的氨基酸序列比对可发现 27~97、99~144、146~210、212~256、258~288 位氨基酸完全相同,提示这些区域可能是 VP1 的保守区域,是否可将其作为制备多肽疫苗的候选区域尚需进一步研究。

3 讨论

EV71 可引起 HFMD 及神经系统相关疾病,与手足口病的其他病原相比,它具有更高的致残率和病死率,因此引起特别重视和关注。1998—2008 年中国大陆地区广泛传播的 EV71 以 C4 亚型的 C4a 群为主^[4-8]。2007—2009 年山东主要的流行株为 C4a 群^[4,9],本研究显示,山东省临沂市 2009—2010 年流行的 EV71 也是属于 C4 亚型的 C4a 群,目前山东省尚未见报道有其他型别的 EV71 毒株流行。McMinn 等^[10]研究认为,VP1 蛋白的第 170 位氨基酸的变化(分离株为 A,具有神经毒性的分离株为 V)可能导致 VP1 蛋白空间结构的改变,从而使病毒

与受体结合能力下降,毒力发生根本改变,而本研究中的 23 株分离株 170 位均为 A,与上述研究结果不符。也有部分学者研究表明, EV71 的毒力决定簇可能不在 VP1 区域内^[11],本研究分析了不同类别病例(重症、死亡、轻症)分离毒株的 VP1 全序列片段的亲缘关系,结果与上述研究一致。这也许与 EV71 毒力决定簇在基因组中并非单一一位点有关。系统进化树显示不同类别病例的分布并无规律性,表明其神经毒力可能与基因型(亚型)关系不大。为弄清 EV71 的致病机制与其分子结构的相关性,找出毒力决定簇,还应作进一步的研究。此外,23 株分离株与阜阳株的氨基酸序列比对可发现多区域的氨基酸序列完全相同,提示这些区域可能为 VP1 的保守区域,在今后的研究中可对其免疫原性和抗原性进行研究,探讨利用这些区域制备多肽疫苗的可能性。到目前为止,手足口病尚无特效的疫苗预防,必须要进一步了解 EV71 的流行情况,加强监测,因地制宜地采取措施控制疾病流行^[12]。

参考文献

- [1] Komatsu H, Shimizu Y, Takeuchi Y, et al. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection [J]. *Pediatr Neuro*, 1999, 20(1): 17-23.
- [2] 王石平, 钱燕华, 缪小兰, 等. 无锡市 2009 年手足口病流行特征及病原学监测分析 [J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(12): 1539-1541.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 手足口病实验室检测方案 [EB/OL]. [2008-05-03]. http://www.moh.gov.cn/open/web_edit_file/20080503162905.doc.
- [4] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China [J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(4): 262-267.
- [5] Chan KP, Goh KT, Chong CY, et al. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(1): 78-85.
- [6] Jee YM, Cheon DS, Kim K, et al. Genetic analysis of the VP1 region of human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000 [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(9): 1735-1746.
- [7] Tu PV, Thao NT, Perera D, et al. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot and mouth disease, Southern Vietnam, 2005 [J]. *J Emerg Infect Dis*, 2007, 13(11): 1733-1741.
- [8] Yang F, REN LL, Xiong ZH, et al. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008 [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7): 2351-2352.
- [9] Liu XL, Wang ZG, Yang TT, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains in Qingdao region, Shandong province, 2007-2009 [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2011, 32(4): 382-384.
- [10] McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, et al. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Western Australia [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 32(2): 236-242.
- [11] Cheng LY, Hsla SH, Wu CT, et al. Outcome of enterovirus 71 infections with or without stage-based management 1998 to 2002 [J]. *Pediatr Infect Dis*, 2004, 23(4): 327-331.
- [12] 王联君, 高洪, 常志荣, 等. 北京市崇文区手足口病流行病学分析 [J]. *中国公共卫生*, 2009, 25(9): 1139.