

诱导大鼠中枢神经系统 HSP70 表达。其机制可能是通过诱导蛋白激酶 C 表达,上调 HSP70 表达。推测替普瑞酮抗热损伤作用的可能机制为替普瑞酮对抗热损伤引起的炎症反应和循环休克,延长生存时间,减少氧自由基产生。

参考文献

[1] Bouchama A ,Knochel JP. Heat stroke [J]. N Engl J Med 2002 , 346(25) : 1978 - 1988.
 [2] 尹泉,王启仪.替普瑞酮的作用机制及临床应用探讨[J].实用医学杂志 2010 26(14) :2660 - 2662.
 [3] 吕阳,罗炳德,杨光,等.青蒿琥酯抗中暑内毒素血症的机制研究[J].中国公共卫生 2006 22(12) :1514 - 1515.
 [4] 杨光,罗炳德,李文,等.热毒平抗中暑内毒素血症机制研究[J].中国公共卫生 2005 21(12) :1416 - 1417.
 [5] Hall DM ,Buetner GR ,Oberley LW et al. Mechanisms of circulatory

and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001 280: H509 - 521.
 [6] Bouchama A ,Ollivier V ,Roberts G et al. Experimental heatstroke in baboon: analysis of the systemic inflammatory response [J]. Shock , 2005 24: 332 - 335.
 [7] Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance [J]. Journal of Applied Physiology 2002 92: 2177 - 2186.
 [8] Wang JL ,Ke DS ,Lin MT. Heat shock pretreatment may protect against heatstroke-induced circulatory shock and cerebral ischemia by reducing oxidative stress and energy depletion [J]. Shock , 2005 23: 161 - 167.
 [9] Li PL ,Chao YM ,Chan SH et al. Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nucleus tractus solitarii confers cardiovascular protection during heatstroke [J]. Circulation , 2001 ,103: 2114 - 2119.

收稿日期: 2011-08-02

(解学魁编辑 周欣琳校对)

• 实验研究 •

辽宁省汉城型汉坦病毒基因亚型分析*

耿英芝,田疆,刘芸,王博,孙英伟,李鑫,姚文清

摘要:目的 分析辽宁省汉城型汉坦病毒(HV)的基因亚型及其分布情况。方法 收集辽宁省内主要肾综合征出血热(HFRS)流行地区的鼠肺和病人血清标本,采用间接免疫荧光法(IFA)检测鼠肺中HV抗原,应用HV特异性引物以RT-PCR方法扩增标本中M和S基因片段的特异性核苷酸序列,测序后与已知病毒序列进行比较分析,构建系统发生树,以明确其型别和亚型及其地理分布情况。结果 辽宁省HFRS疫区褐家鼠携带的病毒均为汉城型病毒(SEOV);对鼠肺及病人携带HV的部分M片段及部分S片段进行核苷酸序列分析表明,发现SEOV的同源性较高,变异较小,稳定性较高,而且地理位置相近地区基因组核苷酸序列的同源性很高(>98.8%),具有小范围的地理聚集现象。结论 辽宁省流行的SEOV均为S3亚型,基因亚型分布比较单一。

关键词:汉坦病毒(HV);汉城型病毒(SEOV);基因亚型;系统发生分析;分布

中图分类号:R 373.9

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2012)12-1594-03

Genetic subtypes and distribution of Seoul hanta virus in Liaoning province

GENG Ying-zhi ,TIAN Jiang ,LIU Yun ,et al(Department of Endemic Disease Control ,Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention ,Shenyang Liaoning Province 110005 ,China)

Abstract: Objective To investigate the genetic subtype and distribution of Seoul hanta virus in Liaoning province.

Methods Rat lung samples and serum samples of the patients were collected in major epidemic areas and hantavirus antigens in the rat lungs were detected by indirect immunofluorescence assay. Partial M and S segments were amplified by nested reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) using hantavirus specific primer and then sequenced , analyzed and compared with known sequences. The phylogenetic trees were constructed to analyze subtypes and geographical distribution. Results The Seoul hanta virus(SEOV) were carried by Rattus norvegicus in Liaoning province. The analytic results of partial M and S segments carried by rat lungs and patients indicated that the homology and variation of SEOV were high. The homology of nucleotides sequence was above 98.8% for samples from similar geographical areas ,with a high homology for adjacent geographical areas. Conclusion The popular SEOV is S3 subtypes in Liaoning province and the gene subtypes distribution is single.

Key words: hantavirus; Seoul hanta virus; genetic subtype; phylogenetic analysis; distribution

汉坦病毒(hantavirus ,HV)属于布尼亚病毒科

汉坦病毒属,是分节段的单股负链RNA病毒,主要导致肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome ,HFRS)及汉坦病毒肺综合征(hantavirus pulmonary syndrome ,HPS)。目前已发现的HV至少可分为40种血清型或基因型^[1-2],而且每一型均来自1种或少数几种密切相关的啮齿动物,并在宿

* 基金项目:国家科技重大专项(2009ZX10004-209)

作者单位:辽宁省疾病预防控制中心感传所,沈阳110005

作者简介:耿英芝(1979-),女,辽宁沈阳人,主管技师,硕士,主要从事病毒病原学及分子生物学研究工作。

通讯作者:姚文清,E-mail: yaowenqing@lncdc.com

主动物中产生持续性无症状感染,与其宿主共进化^[3]。由于 HV 与宿主动物间的这种对应关系,宿主动物的种群类型及其感染情况决定了疫区的性质和流行强度。中国目前仍以汉滩型病毒(hantaan virus, HTNV)和汉城型病毒(Seoul virus, SEOV)为主,分子流行病学研究表明,中国流行的 HTNV 可分为 9 个亚型,SEOV 可分为 4~6 个亚型^[4]。本研究于 2010—2011 年开展 HV 基因亚型的分子流行病学研究,旨在了解辽宁省 HV 流行强度及其亚型特点,以及与中国其他地区 HV 的进化关系。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2010 年辽宁省 7 个地市 HFRS 监测点捕获的啮齿动物 71 只,其中褐家鼠 41 只,小家鼠 9 只,大仓鼠 11 只,黑线姬鼠 10 只。取鼠肺组织,冰冻切片后用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测, HV 抗原阳性的标本用于反转录聚合酶反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增。收集 20 份 HFRS 患者急性期血清,采用汉坦病毒特异性引物进行扩增。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取 参照 Trizol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司)的使用说明书对鼠肺标本提取病毒 RNA,用 40 μL 无 RNA 酶的去离子水溶解, -70 °C 保存备用。血清标本参照 QIAGEN Rneasy Mini kit RNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司)说明书提取病毒 RNA, 30 μL 无 RNA 酶的去离子水洗脱, -70 °C 保存备用。

1.2.2 引物的设计及合成 使用 AMV 逆转录酶和 P14 引物 5'-TAGTAGTACTCC-3'(美国 Promega 公司)按说明书合成 cDNA,用于扩增 HV 部分 S 片段和部分 M 片段,引物序列见参考文献[5-7],引物由上海生工公司合成, ddH₂O 溶解后分装, -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 RT-PCR 及其产物的纯化和回收 采用套式 PCR 方法, HV-MFO 和 HV-MRO 为 HV 通用 M 片段外引物, HMF 和 HMR 为 HTNV M 片段分型内引物, SEOMF 和 SEO-MR 为 SEOV M 片段分型内引物, GS4 和 CS8 为 HV 的 S 片段引物。具体扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 采用凝胶回收试剂盒(德国 QIAGEN 公司)按照说明进行回收纯化。

1.2.4 序列测定和系统发生分析 测序由上海生

工生物工程技术有限公司完成,用 Clustal X (v1.8) 和 Mega 4 软件进行排序、比较分析并以邻位相连法(NJ)构建系统发生树。用于比较分析的 HV 序列来自于 GenBank, 详见文献[5]。

2 结果

2.1 HV 基因型及其亚型的分布(表 1) 采用 IFA 法检测 71 份鼠肺样本,共 10 份鼠肺样品 HV 抗原阳性,病毒携带率为 14.08%。检测出 HV 抗原阳性的鼠均为褐家鼠。RT-PCR 方法对 10 份 HV 抗原阳性标本进行部分 S 片段和 M 片段扩增,共 9 份样本扩增阳性,编号分别为 SY12、SY18、AS48、BX55、BX56、BX58、DD66、JZ3、HLD28。对 20 份 HFRS 患者急性期血清标本进行 RT-PCR 扩增,共 6 份样本扩增阳性,编号分别 SY8、AS26-4、DD12、JZ49、TL25-1、HLD88。共扩增、测序及其系统发生分析辽宁省 15 份病人血清及鼠肺标本,其中 9 只褐家鼠携带 SEOV,6 例患者为 SEOV 感染。采用 SEOV 分型引物进行扩增,共扩增出 14 个 M 与 9 个 S 基因片段上核苷酸序列片段,对其核苷酸片段进一步分析,结果发现 15 份标本均为同一个基因亚型。采用 M 基因片段与 S 基因片段分型,结果一致。

表 1 辽宁省 HV 基因型及其亚型的分布

地点	样品	宿主	基因型	亚型片段	
				M	S
沈阳	SY12	褐家鼠	SEO	S3	S3
	SY18	褐家鼠	SEO	S3	S3
	SY8	人	SEO		S3
鞍山	AS48	褐家鼠	SEO	S3	
	AS26-4	人	SEO	S3	
本溪	BX55	褐家鼠	SEO	S3	
	BX56	褐家鼠	SEO	S3	S3
	BX58	褐家鼠	SEO	S3	
丹东	DD66	褐家鼠	SEO	S3	S3
	DD12	人	SEO	S3	S3
锦州	JZ3	褐家鼠	SEO	S3	S3
	JZ49	人	SEO	S3	
铁岭	TL25-1	人	SEO	S3	S3
葫芦岛	HLD28	褐家鼠	SEO	S3	S3
	HLD88	人	SEO	S3	

2.2 同源性比对及系统发生分析(图 1、2) 分别使用 SEOV 的 M 基因片段(2003~2302)和 S 基因片段(620~999)核苷酸序列构建系统发生树。图 1 可见,辽宁省 SEOV 的 M 基因片段核苷酸序列均分布于同一支,与 SD10、C3、Z37 等 S3 亚型序列位于同一分支,其亚型内核苷酸序列同源性为 95.7%~100%,同源性很高,变异很小,尤其是辽宁省地理位置相近的锦州和葫芦岛地区基因组核苷酸序列同源性 >98.8%。SEOVs 基因片段的核苷酸片段分析

与 M 基因片段分析结果一致,所有序列均分布于同一支,属于 S3 亚型,亚型内的核苷酸序列同源性为 97.8% ~ 100%,亚型间的核苷酸序列同源性接近 95%。基于 S 片段所构建的系统发生树与 M 片段基本一致,但 S 片段比 M 片段更保守。另外,所有的 SEOV 构成分为 6 个单元支,表明 SEOV 与其他 HTNV 等一样具有遗传多样性。

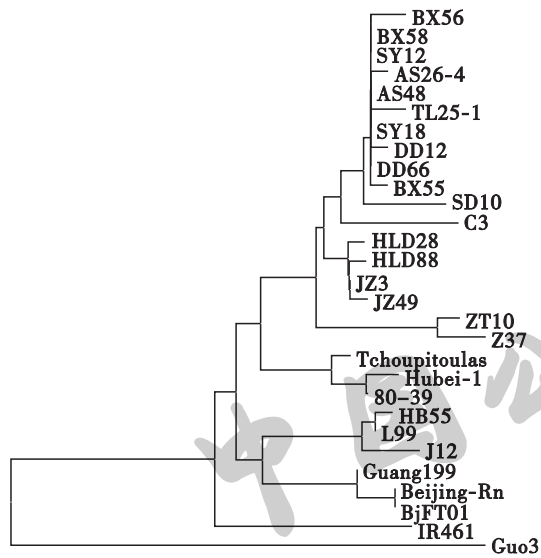


图 1 SEOV 部分 M 片段核苷酸的系统进化树

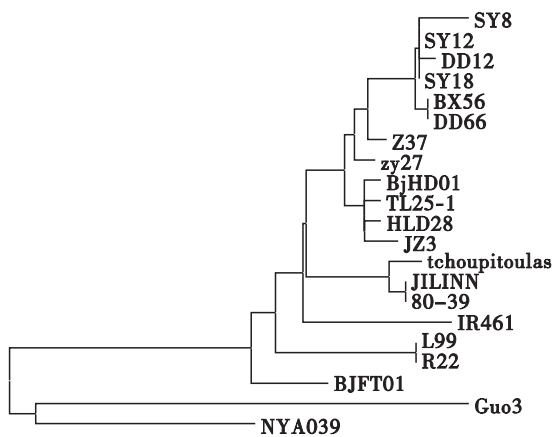


图 2 SEOV 部分 S 片段核苷酸的系统进化树

3 讨论

辽宁省是中国 HFRS 的主要疫区之一,与朝鲜及吉林等省接壤。本研究采用 RT-PCR 分型及核苷酸序列测定技术对辽宁省流行 HV 的基因型及亚型分布进行研究,结果表明辽宁省 SEOV 的主要传染源是家鼠属褐家鼠,序列分析表明其同源性较高,变异较小,均为同一亚型。

据 Xiao 等^[8]报道,用 G2 区部分核苷酸序列来构建系统发生树并常作为分型依据^[5,9],其结果与本研究血清分型结果一致。本研究根据 M 和 S 片段序列与 Genbank 中已知序列进行比较并绘制系统发生树,发现辽宁省 SEOV 均在同一分支,属 S3

亚型,且 M 和 S 片段分型结果一致。M 和 S 片段 S3 亚型内核苷酸序列同源性均 >95%,与其他亚型同源性大部分均 <95%,因此辽宁省 SEOV 为 S3 亚型,与吉林省褐家鼠携带的 SEOV 亚型一致^[10],显示出 HV 分布的地理聚集性。辽宁省锦州市和葫芦岛市 SEOV 核苷酸序列同源性 >98.8%,呈现出地理位置相近地区基因组序列同源性很高的特点。孙黎等^[7]研究表明在多种宿主中均可携带 SEOV 的不同亚型,亚型分布表现出明显地理聚集性,但范飞能等^[11]研究发现同一地区,褐家鼠与黄胸鼠可携带不同的亚型,显示出局部地区 SEOV 的基因多样性。本研究中的阳性动物标本均为褐家鼠,表明褐家鼠是辽宁省的优势鼠种,但应加强其他鼠种尤其偏远山区动物携带 HV 的研究,阐明辽宁省 SEOV 的流行特点。

本研究显示辽宁省 SEOV 均为 S3 亚型,表明 S3 亚型是该地区的优势流行亚型,但随着新、老疫区的不断变化,其他亚型仍会存在。因此应系统地开展 SEOV 的分子流行病学研究,及时发现辽宁省是否还存在 SEOV 的新亚型及进化关系,对 HFRS 的防控具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O, et al. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease [J]. Clin Microbiol Rev 2010, 23(2): 412-441.
- [2] 周济华, 张海林. 汉坦病毒分型及致病性的研究进展 [J]. 国际病毒学杂志, 2008, 15(2): 37-42.
- [3] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantavirus and their rodent hosts [J]. Curr Top Microbiol Immunol 2001, 256(1): 47-75.
- [4] 王世文, 杭长寿, 王华, 等. 我国汉坦病毒基因型和基因亚型的分布研究 [J]. 病毒学报, 2002, 18(3): 211-216.
- [5] Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, et al. Genetic diversity of hantavirus isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Neotoma confucianus* and *Rattus* [J]. Virology, 2000, 278: 332-345.
- [6] 姚智慧, 俞永新. 应用聚合酶链反应对我国不同来源肾综合征出血热病毒的型别分析 [J]. 病毒学报, 1994, 10(2): 128-135.
- [7] 孙黎, 张永振, 李林红, 等. 河南省 II 型汉坦病毒基因亚型及其分布的研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(8): 578-582.
- [8] Xiao SY, Liang M, Schmaljohn CS. Molecular and antigenic characterization of HV114, a hantavirus isolated from a patient with haemorrhagic fever with renal syndrome in China [J]. J Gen Virol, 1993, 74: 1657-1659.
- [9] Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, et al. Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8: 768-776.
- [10] 熊海萍, 李明慧, 段正秀, 等. 吉林省汉城型汉坦病毒基因分型研究 [J]. 江苏农业科学, 2010(1): 40-42.
- [11] 范飞能, 杨鹏飞, 施南峰, 等. 浙江省慈溪市啮齿动物中汉坦病毒分子流行病学研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(4): 365-368.