

DOI: 10.16505/j.2095-0136.2018.0082

· 论 著 ·

北京市东城区 2017—2018 监测年度 H3N2 亚型 流感病毒 HA1 基因进化分析

李艳宇, 李姗姗, 高鹏

北京市东城区疾病预防控制中心微生物检验科, 北京 100050

摘要: 目的 了解北京市东城区 2017—2018 监测年度 H3N2 亚型流感病毒分离株 HA1 基因序列变异特征及进化情况。方法 对北京市东城区 2017 年 4 月 1 日至 2018 年 3 月 30 日采集的流感样病例咽拭子进行核酸检测及病毒分离, 将分离得到的 12 株 H3N2 亚型流感病毒进行 HA1 基因序列测定, 通过 DNASTar 5.0 和 MEGA 6.0 软件与国际卫生组织 (WHO) 推荐的北半球 2017—2018 年流感疫苗株、2018—2019 年流感疫苗株进行比对, 绘制系统进化树。结果 以 2017—2018 年流感疫苗株 [A/HongKong/4801/2014 (H3N2)-like virus] 为参比序列, 12 株分离株中共发现 HA1 基因序列中 20 个氨基酸位点发生改变; 涉及到 2 个抗原决定簇、受体结合位点 (RBS) 及附近位置。而 2018—2019 年推荐的疫苗株 [A/Singapore/IN-FIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like] 氨基酸一些变异位点与 12 株分离株的氨基酸变异位点一致, 差异较小。12 株 H3N2 亚型流感病毒的 HA1 基因核苷酸同源性为 96.35%~100.00%, 氨基酸的同源性为 94.97%~100.00%, 与 WHO 推荐的 2018—2019 年疫苗株同源性更高; 系统进化树显示, 分离到的流感病毒株大部分与 2018—2019 年推荐的疫苗株在一个大分支上, 亲缘关系较近, 与 2017—2018 年疫苗株距离较远, 差异较大。结论 2017—2018 监测年度北京市东城区 H3N2 亚型流感病毒的 HA1 基因特性发生了一定改变, 与 WHO 推荐的 2018—2019 年新疫苗株匹配性更好, 将为北京市流感监控发挥更好的保护作用。

关键词: 流感病毒; H3N2 亚型; HA1 基因; 进化树; 疫苗株

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 2095-0136 (2019) 02-0144-05

Analysis of genetic evolutionary of HA1 gene of influenza A (H3N2) virus from 2017—2018 in Dongcheng district of Beijing, China

LI Yan-yu, LI Shan-shan, GAO Peng

Laboratory of Microbiology, Center for Disease Control and Prevention
of Dongcheng District, Beijing 100050, China

Corresponding author: LI Yan-yu, E-mail: spring200424@126.com

Abstract: Objective To study the mutations and evolution of HA1 gene of influenza A H3N2 isolated in Dongcheng district of Beijing from 2017 to 2018. **Methods** Throat swab specimens of influenza-like illness (ILI) were collected and isolated in Dongcheng district of Beijing for nucleic acid detection from April 1, 2017 to March 30, 2018. The HA1 gene sequences of 12 isolated H3N2 strains were determined. The variations of nucleic acid and amino acid sequences were compared with the recommended 2017—2018 influenza vaccine strains and the 2018—2019 influenza vaccine strains of the northern hemisphere by WHO to generate the phylogenetic tree of nucleotide sequences using DNASTar5.0 and MEGA6.0 software. **Results** A total of 20 sites of amino acid variation in the HA1 gene were detected in the 12 isolates from the 2017—2018 influenza vaccine strain [A/HongKong/4801/2014 (H3N2)-like virus], including two antigenic determinant clusters, receptor binding sites (RBS) and the nearby locations. Some variation sites of amino acids recommended by 2018—2019 vaccine strain [A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like virus] were consistent with

作者简介: 李艳宇, 硕士研究生, 主要从事病毒检测工作

通讯作者: 李艳宇, E-mail: spring200424@126.com

the amino acid variation sites of the 12 isolates, and the differences were smaller. The HA1 gene nucleotide homology of the 12 H3N2 influenza viruses is 96.35%-100.00% and the homology of amino acids is 94.97%-100.00%, which are higher than that of recommended vaccine strain (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016) for 2018-2019 by WHO. The phylogenetic tree showed that most of the isolated H3N2 strains were in a large branch of the vaccine strains for 2018-2019, and the genetic relationship was relatively close; the distance between the vaccine strains of 2017-2018 was far away and the differences were more significant. **Conclusions**

Some genetic features of HA1 gene of H3N2 influenza virus isolated in Dongcheng district of Beijing from 2017 to 2018 changed and better match the recommended new vaccine strain by WHO. The new vaccine strain for 2018-2019 would play a better protection for the influenza prevention and control in Beijing of China.

Key words: Influenza virus; Influenza A virus subtype (H3N2); HA1 gene; Phylogenetic tree; Vaccine strain

流感病毒属于正黏病毒科, 其基因组为分节段负链 RNA, 分为甲、乙、丙 3 种型别, 均可感染人^[1]。其中甲型流感病毒抗原经常发生变异, 不断在世界范围内出现新的流行。每隔几年, 就会有一种逃避人类免疫的变异株出现^[2]。流感病毒血凝素 (hemagglutinin, HA) 是流感病毒主要抗原之一, 是流感病毒发生抗原性变异的分子基础。HA1 是 HA 蛋白的重链区, 该区的抗原漂移和抗原转变极易造成流感流行^[3]。甲型流感病毒中的 H3N2 亚型是引起人类流感的主要病原之一, 它曾经引起世界性的流感大流行, 在我国也曾引起局部的暴发流行^[4-5]。本课题组对北京市东城区 2017-2018 监测年度分离到的 H3N2 亚型流感病毒毒株的 HA1 进行了基因测序, 构建系统进化树, 分析 H3N2 亚型流感病毒基因变异趋势及与疫苗株的匹配性。

1 资料与方法

1.1 样本来源 2017 年 4 月 1 日至 2018 年 3 月 30 日间, 采集北京市东城区两家流感监测哨点医院 (北京市第六医院和北京中医药大学东直门医院) 的流感样病例 (influenza-like illness, ILI) 咽拭子样本。

1.2 方法

1.2.1 核酸检测与病毒的分离鉴定 实验室收到咽拭子样本后立刻进行实时荧光 PCR 反应 (具体操作按江苏硕世试剂盒中的说明书进行), 然后阳性样本参照《流行性感病毒及其实验技术》^[6] 接种到狗肾传代细胞 (MDCK) 和鸡胚进行培养后, 将血凝 (HA) 滴度 $\geq 1:8$ 的培养物进行血凝抑制 (HI) 实验。MDCK 和鉴定血清均由国家流感中心提供, 培养的毒株由国家流感中心统一编号并复核。

1.2.2 病毒 RNA 的提取 新鲜病毒细胞培养液采用美国 Thermo 公司生产的试剂盒 (Mag-MAXTM-96 Viral RNA Isolation Kit 磁珠试剂盒) 提取流感病毒 RNA (按试剂盒说明书进行操作),

之后 -70°C 保存备用。

1.2.3 扩增 HA1 基因序列 设计引物序列, 上游引物序列为 5'-ATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCTACATT-3', 下游引物序列为 5'-AGTTTGTCTCTGGTACATTCCGCA-3', (上海伯杰生物科技有限公司合成), 采用 TaKaRa 大连宝生物工程公司的 Prime-Scriptone Step RT-PCR Kit Ver. 2.0 反应试剂盒扩增 HA1 基因序列。具体的反应体系 (50 μl) 包括 $2 \times$ 反应缓冲液 25 μl , 5 mmol/L Mg^{2+} 5 μl , Prime-Scriptone step Enzyme Mix 2 μl , 上游引物 1 μl (20 $\mu\text{mol/L}$), 下游引物 1 μl (20 $\mu\text{mol/L}$), 模板 RNA (提取的病毒 RNA) 5 μl , 补水到 50 μl 。RT-PCR 反应条件如下: 50°C 30 min; 94°C 2 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 2 min 循环 30 次, 72°C 10 min, 4°C ∞ 。

1.2.4 测序与分析 RT-PCR 扩增后的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确定扩增成功后送至上海生物工程科技有限公司完成测序。用 DNASTar 5.0 和 MEGA 6.0 软件对 12 株序列与 WHO 推荐的北半球流感疫苗株 A/HongKong/4801/2014 (H3N2)-like virus (2017-2018 年) 和 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)-like virus (2018-2019 年) 进行同源性和氨基酸位点比对, 并构建系统进化树。

2 结果

2.1 2017-2018 年北京市东城区流感监测及 H3N2 病毒分离情况 北京市东城区在 2017-2018 年流感监测季共检测流感样病例 (ILI) 咽拭子样本 1 780 份, 核酸阳性为 286 份 (16.07%), 其中 H3N2 为 76 份 (26.57%), H1N1 为 99 份 (34.62%), B 型为 111 份 (38.81%)。核酸阳性样本经 MDCK 细胞和鸡胚培养后, 细胞分离 H3N2 阳性毒株 12 株 (15.79%), 鸡胚 0 株。

H3N2 亚型流感主要出现在 2017 年 10~12 月, 2018 年 1 月开始, B 型和 H1N1 型流感逐渐成为优势毒株。

2.2 HA1 基因氨基酸变异分析 以 A/HongKong/4801/2014 (H3N2) -like virus (2017-2018 年疫苗株) 为参比序列, 与东城区 2017-2018 监测年度 H3N2 亚型流感分离株及 WHO 推荐的北半球 2018-2019 年疫苗株进行氨基酸位点比对, 结果显示, 12 株分离株中共有 20 个氨基酸位点发生变化, 其中 8 个氨基酸位点变异涉及到 A (T135K/N、I140V、R142G、S144K/N) 和 B (Y159S、K160T、F193S、P194L) 两个抗原决定簇, 并且 HA1 蛋白受体结合位点 (receptor binding site, RBS) (包括的基因位点有第 98、131~137、153、155、183、190、194 和 225~228) 中出现 T131K、T135K/N、P194L 的氨基酸转变, 还有 11 个其他位点发生氨基酸替换。结果还显示 2018-2019 年推荐的疫苗株与参比疫苗株在氨基酸位点上发生了改变, 这些变化位点与 12 株分离株的氨基酸位点一致 (第 96、121、142、160、194 位), 同源性较高, 具体见表 1。

2.3 HA1 基因的同源性和系统进化树分析 12 株 H3N2 分离株 HA1 基因序列中, 其核苷酸的同源性为 96.35%~100.00%, 氨基酸的同源性为 94.97%~100.00%, 与 WHO 推荐的 2017-2018

年度北半球疫苗株 A/HongKong/4801/2014-like virus 相比, 其核苷酸同源性为 97.76%~98.52%, 氨基酸同源性为 95.97%~97.80%。与 WHO 推荐的 2018-2019 年度北半球疫苗株 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) -like virus 相比, 核苷酸同源性为 97.78%~99.02%, 氨基酸同源性为 96.34%~98.90%。

从绘制的系统进化树中可以看出: 主要形成的两大分支中, 有 2 株分离株与 A/HongKong/4801/2014-like virus (2017-2018 年) 疫苗株亲缘关系较近, 其余的 10 株分离株与 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) -like virus (2018-2019 年) 疫苗株位于另一大分支上, 亲缘关系较近, 可见, 本次监测的流感毒株 HA1 基因序列上产生了一定变异, 以往的疫苗株已不再适合继续应用。而 WHO 新推荐的 2018-2019 年北半球疫苗株进化谱与流感毒株进化谱较近, 适合推荐使用, 具体见图 1。

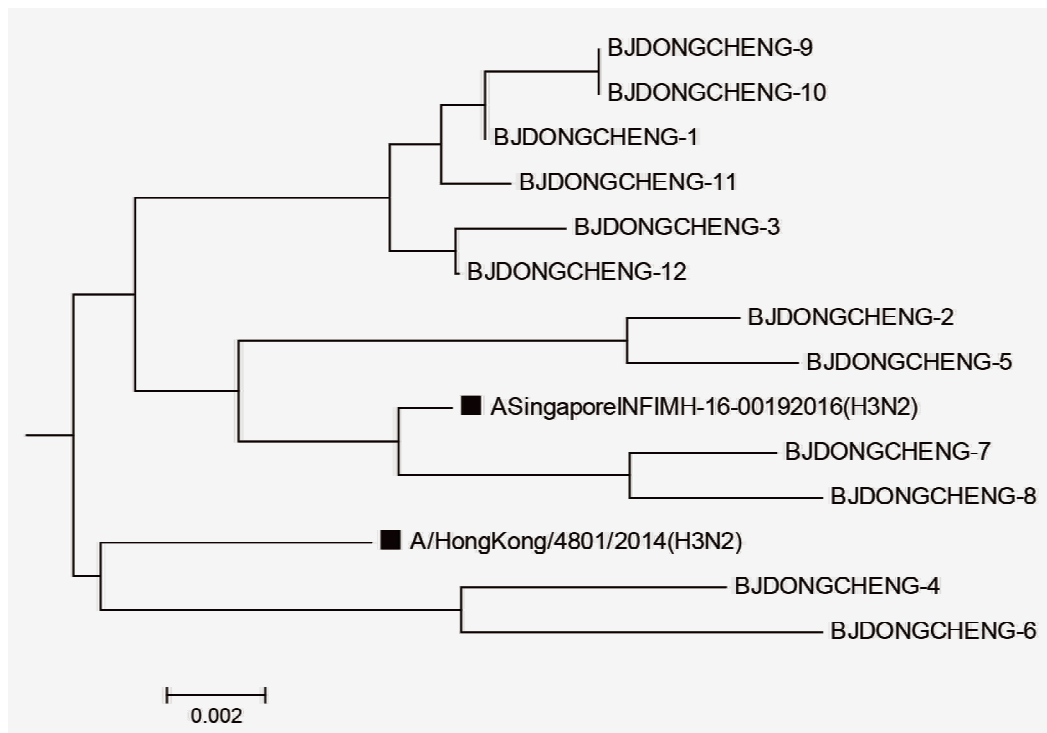
3 讨论

本次研究结果显示, H3N2 亚型流感在 2017-2018 年流感监测季中出现最早, 主要集中在 2017 年的 10~12 月, 2018 年 1 月 B 型和 H1N1 亚型流感开始出现, 并逐渐取代 H3N2 亚型流感成为优势毒株, 这与东城区在 2016-2017 年流感

表 1 2017-2018 年北京市东城区 H3N2 亚型流感病毒 HA1 基因氨基酸变异位点

| 毒株号 | 氨基酸位点 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 62 | 96 | 121 | 124 | 128 | 131 | 135 | 138 | 140 | 142 | 144 | 150 | 159 | 160 | 171 | 193 | 194 | 212 | 259 | 261 |
| A/HongKong/4801/2013 | E | S | N | S | T | T | T | A | I | R | S | R | Y | K | N | F | P | P | K | R |
| A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 | | N | K | | | | | | | G | | | | T | K | | L | | | |
| BJDONGCHENG-1 | | N | | | | K | | | | G | | | | T | | | L | L | | Q |
| BJDONGCHENG-2 | | N | K | | | | K | S | | | K | K | | T | | | L | | | Q |
| BJDONGCHENG-3 | | N | | | A | | | | V | G | N | | S | | | | L | | | |
| BJDONGCHENG-4 | | N | | | | K | | S | | G | | | | T | | | L | | | Q |
| BJDONGCHENG-5 | | N | N | A | | | | | | | N | | | | | | L | | | Q |
| BJDONGCHENG-6 | | N | K | | | | N | | | G | | | | T | K | | L | | | |
| BJDONGCHENG-7 | G | N | K | | A | | K | | | G | K | | | T | K | | L | | | |
| BJDONGCHENG-8 | | N | K | | | | K | | | G | K | K | | T | | S | L | | R | Q |
| BJDONGCHENG-9 | | N | K | | | | K | | | | K | K | | T | | S | L | | R | Q |
| BJDONGCHENG-10 | | N | K | | | | K | | | G | K | K | | T | K | | L | | | Q |
| BJDONGCHENG-11 | | N | K | | | | K | | | G | K | K | | T | | | L | | | Q |
| BJDONGCHENG-12 | | N | K | | | | K | | | G | K | K | | T | K | | L | | | Q |

注: E 为谷氨酸; S 为丝氨酸; N 为天冬酰胺; T 为苏氨酸; A 为丙氨酸; I 为异亮氨酸; R 为精氨酸; Y 为酪氨酸; K 为赖氨酸; F 为苯丙氨酸; P 为脯氨酸; G 为甘氨酸; L 为亮氨酸; Q 为谷氨酰胺; V 为缬氨酸。



注：■标记的为 WHO 推荐的北半球流感疫苗中的 H3N2 亚型名称。

图 1 2017—2018 年北京市东城区 H3N2 亚型流感病毒 HA1 基因进化树

监测结果^[7]略有不同。在 2016 年 10~12 月也是以 H3N2 亚型流感为主，而从 2017 年 1 月开始 H1N1 亚型流感成为主要毒株，但是没有监测到 B 型流感。H3N2 亚型流感在本监测季虽然不是优势流行毒株但是其细胞和鸡胚分离的阳性率很低，细胞分离毒株 12 株，鸡胚 0 株，这与 H3N2 亚型流感容易发生变异有很大关系。鸡胚株难以分离给研制更新 H3N2 疫苗株造成很大困扰，这就需要我们长期从基因水平来监测 H3N2 亚型流感变异的特点，从而为研制推广基因疫苗提供基础资料。

H3N2 亚型流感病毒于 1968 年在香港首次暴发，之后在人群中不断地流行和变异^[8]。导致 H3N2 亚型流感暴发和流行的关键原因就是其 HA 蛋白的抗原决定簇位点变异改变了病毒的抗原性和毒力^[9]。有研究表明，出现 4 个以上氨基酸突变且分布在 2 个以上抗原决定簇就能成为一个具有代表性的新变种^[10]。流感病毒 HA1 区分布着 5 种抗原决定簇（A、B、C、D、E），A 位于由 140~146 位氨基酸形成的突出环上及 133~137 位氨基酸，B 位于 155 位上面的主环（156~160）及球区末端围绕 α 螺旋结构的 187~198 位氨基酸，C 位于球区末端的 53、54、275 和 278 所在区，D 位于 HA 三聚体交界处的 207、172~174 位氨基酸，E 由

63、78、81、83 位形成的表面氨基酸区^[6]。本次研究结果显示，以 WHO 推荐的 2017—2018 年度疫苗株 A/HongKong/4801/2014-like virus 为参比序列，东城区 2017—2018 年分离的 12 株 H3N2 亚型流感病毒 HA1 基因发生了 20 个氨基酸位点突变，位于抗原决定簇的 A 和 B 上，HA1 基因的改变使疫苗的保护作用受到了限制，这与近年来国内其他报道一致^[11-13]。而 WHO 推荐的 2018—2019 年疫苗株改变的氨基酸位点和分离株氨基酸位点有一些是一致的（第 96、121、142、160、194 位），核苷酸和氨基酸的同源性与分析毒株更高，其保护作用将会大大提高。

流感病毒 HA 蛋白上具有受体结合位点（receptor binding site, RBS），这是病毒感染细胞时与细胞表面结合的必要条件。RBS 呈口袋状，位于 HA1 分子的球区末端。郭元吉等^[6]认为大部分流感毒株 HA 的 5 个氨基酸是保守的（98、153、183、190、194），而且 RBS 的口袋后壁一些氨基酸位点也是保守的，它们不参与 RBS 位点与受体结合，可能对稳定 RBS 结构，促进病毒与受体结合和病毒繁殖等生理功能起重要作用。本次检测的 12 株流感毒株第 194 位氨基酸全部发生改变，由 P 变为 L，这说明随着时间的推移，流感毒株比较保

守的位点也会发生改变,这可能也是 H3N2 亚型流感容易发生流行的一个重要原因。

另外,从系统进化树中也可以看出,分离株大部分与 WHO 推荐的 2018—2019 年度 H3N2 疫苗株位于同一大分支上,与 2017—2018 年疫苗株的亲缘关系较远,这提示东城区 H3N2 亚型流感病毒不断发生变异,以往的疫苗已不适合现在的流行毒株,要及时使用 WHO 推荐更新的疫苗株。今后的流感病原学监测工作要加强流感病毒基因分子学研究,这有助于及时发现新的变异株,也为疫苗的更换制备提供科学依据。

参考文献

- [1] Paget C, Ivanov S, Fontaine J, *et al.* Potential role of invariant NKT cells in the control pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia [J]. *Immunology*, 2011, 186 (10): 5590-5602.
- [2] Wu SS, Yang P, Shi WX, *et al.* Surveillance of influenza like illness and influenza in Beijing, 2007-2012 [J]. *Guoji Bingduxue Zazhi*, 2013, 20 (1): 11-16. (in Chinese)
吴双胜, 杨鹏, 石伟先, 等. 2007-2012 年北京市流感样病例和流感病原学监测[J]. *国际病毒学杂志*, 2013, 20 (1): 11-16.
- [3] Shu YY, Zhang Y. Antigenic and genetic study of hemagglutinin in gene of influenza virus (H3N2) circulated in China in 2004 [J]. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi*, 2005, 19 (4): 362-365. (in Chinese)
舒跃龙, 张焯. 2004 年中国甲 3 亚型流感病毒 (H3N2) 抗原性和基因特性研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 19 (4): 362-365.
- [4] WHO. Ten things you need to know about pandemic influenza (update of 14 October 2005) [J]. *Wkly Epidemics Rec*, 2005, 80 (50): 428-431.
- [5] Li XY, Cheng YH, Tan MJ, *et al.* Virological characteristics of influenza A (H3N2) virus in China during 2013-2014 [J]. *Bingdu Xuebao*, 2015, 31 (1): 30-35. (in Chinese)
李希妍, 成艳辉, 谭敏菊, 等. 2013-2014 年中国 H3N2 亚型流感病毒病原学特征分析[J]. *病毒学报*, 2015, 31 (1): 30-35.
- [6] Guo YJ, Cheng XW. Influenza virus and its experimental technology [M]. Beijing: China Three Gorges Publishing House, 1997: 19-21. (in Chinese)
郭元吉, 程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 19-21.
- [7] Li YY, Li SS, Zhang Y, *et al.* Analysis of laboratory surveillance results of influenza in Dongcheng district in Beijing from 2016 to 2017 [J]. *Yufang Yixue Qingbao Zazhi*, 2018, 34 (4): 419-421. (in Chinese)
李艳宇, 李珊珊, 张瑶, 等. 2016—2017 年北京市东城区流感实验室监测结果分析[J]. *预防医学情报杂志*, 2018, 34 (4): 419-421.
- [8] Ramsay LC, Buchan SA, Stirling RG, *et al.* The impact of repeated vaccination on influenza vaccine effectiveness: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Med*, 2017, 15 (1): 159-159.
- [9] Yang XZ, Cui DW, Xie GL, *et al.* Analysis on the molecular characteristics of influenza A subtype H3N2 virus in Hangzhou City during the influenza outbreak of 2013-2014 [J]. *Linchang Jianyan Zazhi*, 2015, 33 (8): 586-589. (in Chinese)
杨先知, 崔大伟, 谢国良, 等. 杭州市 2013-2014 年流感暴发流行期甲型流感病毒 H3N2 亚型基因特性分析[J]. *临床检验杂志*, 2015, 33 (8): 586-589.
- [10] Lobova TG, Prokopets AV, Komissarow AB, *et al.* Evolutionary variability of influenza B viruses in Russian Federation in 2005-2012 [J]. *Vopr Virusol*, 2013, 57 (6): 22-26.
- [11] Chen GQ, Li CX, Shao RB, *et al.* Analysis of the molecular evolutionary characteristics of the HA1 gene of the influenza A H3N2 virus isolated in Yancheng city in 2015 [J]. *Jiangsu Yufang Yixue*, 2017, 28 (2): 137-139. (in Chinese)
陈国清, 李春香, 邵荣标, 等. 2015 年盐城市甲型 H3N2 亚型流感病毒 HA1 基因分子进化特征分析[J]. *江苏预防医学*, 2017, 28 (2): 137-139.
- [12] Lu GL, Liu YM, Peng XY, *et al.* Molecular characterization of HA1 genes and phylogenetic analysis of H3N2 virus in Beijing children during 2010-2011 [J]. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi*, 2012, 13 (4): 251-255. (in Chinese)
卢桂兰, 刘医萌, 彭晓晏, 等. 2010-2011 年北京市儿童甲型 H3N2 流感病毒的血凝素基因特性和遗传进化分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 13 (4): 251-255.
- [13] Liu D, Wang JH, Chen HY, *et al.* Genetic characterization of the hemagglutinin gene of influenza A (H3N2) viruses in Tangshan during influenza seasons from 2010-2016 [J]. *Zhongguo Bingyuan Shengwuxue Zazhi*, 2017, 12 (7): 658-662. (in Chinese)
刘丹, 王建红, 陈洪永, 等. 2010-2016 年唐山市 H3N2 亚型流感病毒血凝素基因特性分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12 (7): 658-662.

收稿日期:2018-05-04 修回日期:2018-06-11 责任编辑:刘磊