

乙型流感病毒河北株的 HA₁ 基因 序列及种系发生的分析

李性善 赵翠英 高惠敏 齐顺祥

(河北省卫生防疫站, 保定 071000)

根路铭 国 昭

(日本国立预防卫生研究所, 日本东京)

提要 对 1989 年春在河北保定分离的两株乙型流感病毒进行了抗原性、HA₁ 基因序列和种系发生分析, 与不同期的国内外代表株比较结果表明, 自 1988 年以来乙型流感病毒变异较快, B/河北/53/89 株的 HA₁ 基因序列与 B/挪威/1/85 株相比, 其氨基酸的同源性为 94.52%, 与同期的 B/香港/20/89 株同源性为 97.12%。种系发生分析结果, 从 1988 至 1989 年乙型流感病毒出现了 5 个支系, 同期在保定分离的两株病毒, 在同源替代中分别属于两个支系。日本国基本每隔两年出现一次乙型流感的流行优势型, 其发生频度与甲型流感相似。国内少见乙型的流行优势型, 可能和使用的分离病毒材料有关, 日本用 MDCK 细胞比国内用鸡胚对乙型流感病毒的分离阳性率高。

关键词 乙型流感病毒, HA₁ 基因, 核苷酸序列分析, 种系发生分析

在日本乙型流感病毒基本每隔两年出现一次流行的优势型, 而国内在历年检出的流感病毒中却看不出。我们对 1989 年春在河北保定分离的两株乙型流感病毒, 进行了抗原性、HA₁ 基因序列和种系发生分析, 与国内外有关毒株进行比较, 以了解毒株间的抗原性以及 HA₁ 基因特征和进化途径的关系。

材料与amp;方法

- 1 毒株及免疫血清来源** 河北株在保定用 MDCK 细胞分离^[1], 按常规方法用鸡制备免疫血清^[2]。国内代表株及免疫血清购自国家流感中心。日本毒株及免疫血清由日本国立预防卫生研究所惠赠。
- 2 抗原性分析** 采用常量法交叉血凝抑制试验^[2]。免疫血清用日本武田药品工业株式会社生产的 RDE 处理。
- 3 核苷酸序列分析** 同文献报道^[3], 提取病毒 RNA, 用系列合成引物按双脱氧末端终止法, 测定 B/河北/45/89(简称 K4589)和 B/河北/53/89(K5389)的 HA₁ 核苷酸序列, 与报道的有关毒株的氨基酸序列比较。
- 4 种系发生分析** 同报道方法^[3], 将 K4589 与 K5389 的 HA₁ 基因序列分析结果与历年有关代表株的序列, 同邻位连接法绘制同源替代和异源替代图, 并进行直线回归分析。

本文于 1994 年 7 月 8 日收到, 11 月 9 日修回

结 果

1 抗原性分析 结果见表1。

从表1可知, K5389株与前流行期的B/河北/63/88抗原性相似, 抗原比为1.3; 与当时国内代表株B/上海/24/88, 抗原性差异较明显, 抗原比为3.9; 与前流行期的国内代表株B/京科/1/87和日本代表株B/长崎/1/87相比, 其抗原性差异明显, 抗原比分别为10.6和51.8。以上结果表明乙型流感病毒的抗原性变异较快。

2 HA₁核苷酸序列分析 将K4589与K5389和有关比较毒株的核苷酸序列换成氨基酸序列进行比较, 结果见图1和表2。

表1 1987—1989年乙型流感病毒抗原性分析
Table 1 Antigenic analysis of influenza B isolated during 1987—1989

病毒抗原 Viral antigen	免疫血清 Antiserum					
	B/京科/1/87 B/Jing Ke/1/87	B/长崎/1/87 B/Nagasaki/1/87	B/上海/24/88 B/Shanghai/24/88	B/山形/16/88 B/Yamagada/16/88	B/河北/63/88 B/Hebei/63/88	B/河北/53/89 B/Hebei/53/89
B/京科/1/87 B/Jing Ke/1/87	160(1*)	160(2)	70(17.1)	60(15.1)	40(3.7)	80(10.6)
B/长崎/1/87 B/Nagasaki/1/87	240	960(1)	40(55.4)	30(45.3)	40(9.2)	20(51.8)
B/上海/24/88 B/Shanghai/24/88	20	20	2560(1)	640(2)	560(2.3)	240(3.9)
B/山形/16/88 B/Yamagada/16/88	30	40	2560	2560(1)	4480(0.8)	1920(1.8)
B/河北/63/88 B/Hebei/63/88	20	20	60	60	70(1)	70(1.3)
B/河北/53/89 B/Hebei/53/89	20	20	800	480	640	1120(1)
B/河北/45/89 B/Hebei/45/89	10	10	480	320	480	800

* 抗原比 Antigenic ratio

从表2可看出, 随着时间推移, 株间的同源性在不断下降, K4589与K5389和四年前的国际代表株B/挪威/1/85(NOR85)的氨基酸同源性分别为95.10%和94.52%; 与同期国际和日本代表株B/香港/20/89(HK89)和B/横滨/6/89(YO689)的同源性分别为97.41%、97.12%及97.98%、97.69%; K4589和K5389亦有差别, 同源性为99.14%。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
NOR85  DRICGTSNSSPHVVKATATQGEVNVTVGVIPLTTTPKSHFANLKGTRGKLCPNCLNCTDLDVALGRPKCMGTIPSAKASILHEVKPVTSGCFFI:MH
YAM88  .....
Y0689  .....
K4589  .....
K5389  .....
HK 89  .....

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
NOR85  RTKIKQLNLLRGYENIKLSTENVINAEKRAPGGPYRLGTSKSCPNVTNGNGFFATMAWVYKDN-K-TATDPLTIEVPCICTKGEDQIIVWGFHSDNKAQ
YAM88  .....
Y0689  .....
K4589  .....
K5389  .....
HK 89  .....

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
NOR85  MVKLYGDSKPKQFTSSANGVTHIYVSGIGGFPNQTEGGLPQSGRIVDYVMYKPKGKTGIIVYQGVLLPQKVKWCAQRSAVYKGLFLIGEADCLHEKY
YAM88  .....
Y0689  .....
K4589  .....
K5389  .....
HK 89  .....

310     320     330     340
NOR85  GGLNRSKPYTGAHAEKIGNGPIWVKTPLKLANGTKYRPPAKLLNER
YAM88  .....
Y0689  .....
K4589  .....
K5389  .....
HK 89  .....

```

缩写: NOR85B/挪威/1/85, YAM88=B 山形/16/88, Y0689=B/横滨/6/89
 K 4589=B/河北/45/89, K 5389=B/河北/53/89, HK 89=B/香港/20/89
 Abbreviations: NOR85=B/Norway/1/85 Y am88=B/Y amagada/16/88
 Y0689=B/Yokohama/6/89 K 4589=B/Hebei/45/89
 HK 89=B/Hongkong/20/89 K 5389=B/Hebei/53/89

图 1 1985--1989 年乙型流感病毒 HA₁ 氨基酸序列比较

Fig 1 Comparison of amino acid sequences of HA₁ influenza B viruses isolated during 1985--1989

表2 1985—1989年乙型流感病毒HA₁氨基酸序列比较Table 2 Comparison of amino acid sequences of the HA₁ subunit of influenza B viruses isolated during 1985—1989

	同源性(%) Identity(%)					
	B/挪威/1/85 NOR85	B/山形/16/85 YAM88	B/横滨/6/89 YO689	B/河北/45/89 K4589	B/河北/53/89 K5389	B/香港/20/89 HK89
B/挪威/1/85 NOR85	100	95.97	95.39	95.10	94.52	94.81
B/山形/16/85 YAM88		100	98.85	98.85	98.58	97.69
B/横滨/6/89 YO689			100	97.98	97.69	97.98
B/河北/45/89 K4589				100	99.14	97.41
B/河北/53/89 K5389					100	97.12
B/香港/20/89 HK89						100

3 种系发生分析 结果见图2a、b、c。从图2a同源替代可知,自1985年的NOR85株以来,到1989年乙型流感病毒已进化为5个支系。因为NOR85支系的另一侧支长,提示与其相连的5个支系的进化时间发生在1988—1989年,经图2c的直线回归分析得到证实。值得注意的是同期在保定流行的K4589和K5389在同源替代中分别属于两个支系。在图2b异源性替代中K4589和K5389同属一个支系,1988—1989年的毒株亦分布在5个支系中。

讨 论

通过抗原性分析、HA₁基因序列分析和种系发生分析结果,都表明自1988年以来,乙型流感病毒的变异较快,其HA₁的变异速度不慢于甲型流感病毒。我们曾分析A/山形/120/86(H₁N₁)株与A/得克萨斯/12/82(H₁N₁)株,两株间隔4年,其HA₁氨基酸同源性为95.1%^[3]。而K5389与NOR85两株间隔4年,其HA₁氨基酸同源性为94.52%。从1988—1989年乙型流感病毒在种系发生上向多支系进化,已出现5个支系,不同支系的毒株可同时在同一地区流行。

乙型流感病毒在日本的检出率一直很高,从近6年的监测资料看,每年分离流感病毒株数在1593株至4549株之间。在型别分布上,基本上每隔两年乙型流感病毒出现一次优势株,与甲型流感病毒检出的优势程度相似^[4]。河北省自1988年以来,每年定点、定期进行流感监测,用MDCK细胞分离流感病毒,其中乙型检出率占优势的情况与日本相类似,但检出年度不完全一致^[5]。我国1990—1993年的流感监测亦发现乙型流感非常活跃,几乎每年都有变异株出现^[6]。但从1988—1993年国家流感中心公布的流感简报中,看不出乙型检出率占明显优势的

规律,其原因可能是国内多用鸡胚分离流感病毒,它对乙型流感病毒的分离阳性率不如 MD-CK 细胞高^[1]。

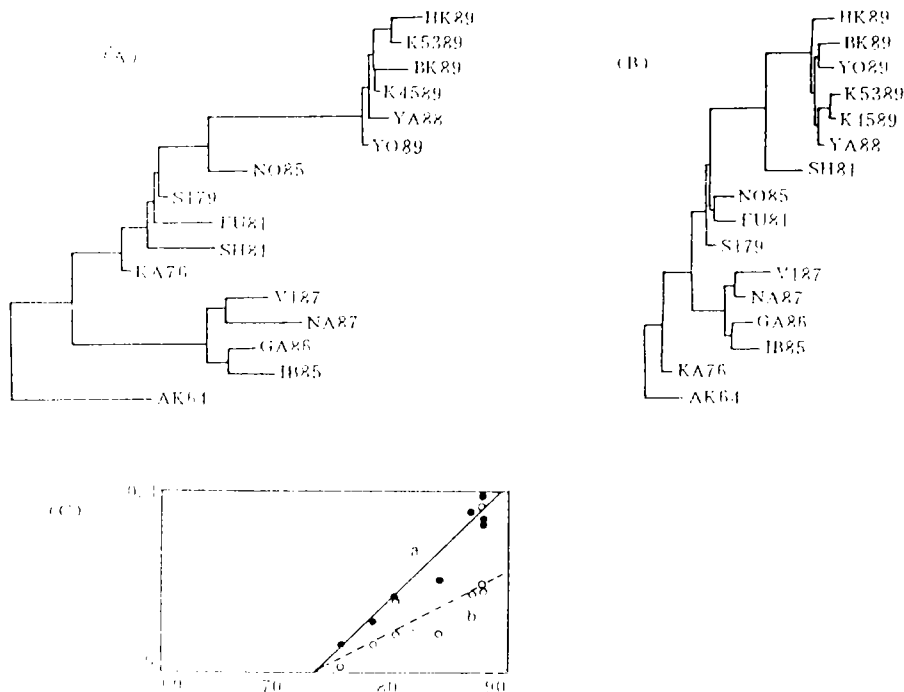


图2 16株不同年代的乙型流感病毒的 HA₁ 基因的同源替代(a)、异源性替代(b)及替代数与时间的回归分析(c)

Fig 2 Evolutionary trees for HA genes (HA₁ subunit) of 16 influenza B viruses isolated in different years on the basis of synonymous (a) and no-synonymous (b) substitutions. (c) Linear regression analysis of the number of synonymous substitutions with time.

以前报道国内乙型流感传播力弱,流行比较局限,人群免疫状态不那么普遍平衡^[7]的情况有所改变。1994年春河北省流感流行,乙型占分离毒株的73.7%,人群对乙型抗体阳性率也由流行前1993年10月的14.6%,升到流行后1994年4月的68.1%,说明此次乙型流行很普遍^[8]。提示今后在使用金刚烷胺预防流感时,要考虑到流行的型别,该药只对甲型流感病毒有预防作用。

参 考 文 献

- 1 李性善,高惠敏,赵翠英,等.用狗肾细胞与鸡胚分离流感病毒的比较研究.中华实验和临床病毒学杂志,待发表
- 2 郭元吉.流行性感冒.见:黄祯祥主编.医学病毒学基础及实验技术.北京:科学出版社,1990:670—678
- 3 Lixs,Zhao C Y,Gao H M,et al. Origin and evolutionary characteristics of antigenic reassortant influenza (H₁H₂) viruses isolated from man in China . J Gen Virol,1992;73:1329—1337

- 4 日本国立预防卫生研究所,等.病原微生物检出情报(月报),1993;14(12):265-266(日文)
- 5 李性善,高惠敏,赵翠英,等.1988-1994年河北省流感监测(内部资料)
- 6 郭元吉,郭志明,张莎利,等.我国流感监测(1990-1993).中华实验和临床病毒学杂志,1994;8(1):11-15
- 7 朱既明.流行性感冒.见:耿贯一主编.流行病学(中册).北京:人民卫生出版社,1982;316-320
- 8 赵翠英,高惠敏,齐顺祥,等.乙型流感新变种B/河北/11/94抗原性分析及人群免疫状态研究.解放军预防医学杂志,待发表.

Analysis of Nucleotide Sequence and Phylogeny on HA₁ Gene of Influenza B Viruses Isolated in Hebei

Li Xingshang Zhao Cuiying Gao Huimin Qi Shunxiang Kuniaki Nerome*

(Hebei Provincial Sanitary and Antiepidemic Station, Baoding 071000)

* (National Institute of Health, Tokyo 141)

In the spring of 1989, two influenza B viruses were isolated in Baoding, Hebei. The results of antigenic, HA₁ gene nucleotide sequence and phylogenetic analysis of the two isolates in comparison with other reported strains of influenza B viruses revealed that the antigenicity of influenza B viruses had varied at a higher speed since 1988. The amino acid sequence of HA₁ subunit of B/Hebei/53/89 exhibited 94.52% homology with that of B/Norway/1/85, and 97.12% with that of B/Hong Kong/20/89. The synonymous substitution analysis of the influenza B viruses HA₁ gene indicated that these HA₁ gene can be segregated into 5 lineages and viruses evolved rapidly since 1988. The two viruses isolated in Hebei belonged to two lineages. Influenza B viruses usually become dominant at interval of two years in Japan, with equal frequency as influenza A viruses. However, influenza B viruses had not been reported dominant in China. We believed that this was attributed to the methods used for the isolation of influenza B viruses; the positive rate of MDCK cell for influenza B viruses in Japan was higher than that of chick embryos used for influenza B virus isolation in China.

Key words Influenza B viruses, Analysis of nucleotide sequence, HA₁ gene, Phylogenetic analysis