

· 实验研究与卫生检验 ·

中山市 2014–2016 年 6 株 II 型登革病毒 E 基因分子特征分析

谢颖, 高赛珍, 陈子龙, 王翠玲, 吴衍恒, 林金思

广东省中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528403

摘要: 目的 分离鉴定中山市 2014–2016 年 II 型登革病毒, 从分子水平进行分析其地域来源和系统进化情况。 方法 选取中山市 2014–2016 年核酸阳性血清 6 份, 用 C6/36 细胞培养分离登革病毒, RT-PCR 扩增毒株 E 基因并进行序列测定, 分析其与不同区域流行株和国际标准株的同源性和系统进化情况。 结果 成功分离培养出 2 株 2014 年登革 II 病毒、2 株 2015 年登革 II 病毒、2 株 2016 年登革 II 病毒。ZS2014-02、ZS2014-03 与 2014 年广州分离株 D14115 在进化关系上最近, 2014 年的 3 株病毒氨基酸和核苷酸同源性均达到 91.3% 以上; 2015 年 ZS2015-01 与广州分离株 D14115 在进化关系上最近, 2015 年 2 株病毒氨基酸和核苷酸同源性分别为 98.8% 和 92.8%; 2016 年 ZS2016-01 与 2010 年巴布新几内亚分离株 JN568270.1 进化关系较近, 2016 年 2 株病毒氨基酸和核苷酸同源性分别为 91.4% 和 88.8%。 结论 6 株毒株与国际标准株 New Guinea C 登革 II 型比较均存在氨基酸位点的差异。2014 年 2 株毒株为广州输入病例, 2015 年的 2 株毒株 ZS2015-01 为广州输入, ZS2015-02 为中山市本地二代病例, 2016 年的 ZS2016-01 为巴布新几内亚输入, 而 ZS2016-02 为菲律宾输入病例。

关键词: 登革病毒; E 基因; 序列同源性; 系统进化

中图分类号: R373.3⁺3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)03-0367-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.03.033

在交通运输和全球贸易交流的快速发展下, 人们

能够很便捷的穿梭于各国家、各省市之间, 使登革热的暴发和流行的可能性变大了。目前, 登革热已经成为一个日益严重的全球性公共卫生问题。2012 年, 登革热被列为全球最重要的蚊虫传播性疾病。在登革热

基金项目: 中山市科技局医学科研立项课题(20132A73)

作者简介: 谢颖(1983-), 男, 广东梅州人, 本科学历, 主管技师, 主要从事卫生微生物检验工作。

参考文献

- [1] 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌研究现状[J]. 胃肠病学, 2007, 12(9): 516-518.
- [2] Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 449-490.
- [3] Kutlubay Z, Zara T, Engin B, et al. *Helicobacter pylori* infection and skin disorders[J]. Hong Kong Med J, 2014, 20(4): 317-324.
- [4] Moss SF, Leqon S, Davies J, et al. Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis [J]. Gut, 1994, 35(11): 1567-1570.
- [5] 马越, 李景云, 金少鸿. 美国临床实验室标准委员会推荐药敏试验操作方法和判断标准(2005 年修订版)[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(17): 1182-1184.
- [6] 刘文忠. “第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告”解读[J]. 胃肠病学, 2017, 22(6): 346-360.
- [7] Chuah SK, Tsay FW, Hsu PI, et al. A new look at anti-*Helicobacter pylori* therapy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(35): 3971-3975.
- [8] De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2010, 19(4): 409-414.
- [9] 王莉莉, 杨超, 董全江, 等. 青岛地区幽门螺杆菌多重耐药现状和突变特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(24): 3583-3585.
- [10] 汪望月, 陈光兰, 任玲玲, 等. 浙江省丽水地区幽门螺杆菌临床分离株耐药性分析[J]. 浙江临床医学, 2016, 18(10): 1903-1905.
- [11] Garcia M, Raymond J, Garnier M, et al. Distribution of spontaneous gyrA mutations in 97 fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* isolates collected in France [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(1): 550-551.
- [12] Lee CC, Lee VW, Chan FK, et al. Levofloxacin-resistant *Helicobacter pylori* in Hong Kong [J]. Chemotherapy, 2008, 54(1): 50-53.
- [13] Taylor DE, Ge Z, Purych D, et al. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(12): 2621-2628.
- [14] Kim JM, Kim JS, Kim N, et al. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients [J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 28(1): 6-13.
- [15] 宋艳斌, 马文丽, 郑文岭. DNA 测序中常见影响因素的研究[J]. 生物技术通报, 2005, 21(1): 44-46.

收稿日期: 2018-06-22

中,登革Ⅱ型是常见的血清型之一,可引起登革热以及登革出血热和登革休克综合征^[1-3]。本研究对 2014-2016 年中山市登革病毒进行分离鉴定并对 E 基因进行分析^[4-5],探讨其输入源头和系统进化情况。

1 材料与方法

1.1 材料来源 血清来源于中山市疾病预防控制中心登革热毒株库。选取 2014 年、2015 年、2016 年已经完成登革Ⅱ型血清型鉴定的阳性标本。其中,2014 年登革病毒Ⅱ型阳性血清 2 份,分别命名为 ZS2014-02、ZS2014-03;2015 年登革病毒Ⅱ型阳性血清 2 份,分别命名为 ZS2015-01、ZS2015-02;2016 年登革病毒Ⅱ型阳性血清 2 份,分别命名为 S2016-01、ZS2016-02。

1.2 登革病毒分离 取 15 μl 上述血清,用生长液(GIBCO;90.0%DMEM 培养基,5.0%胎牛血清,2.5%青霉素-链霉素,2.5%HEPES 缓冲液)作 10⁻¹ 稀释,取 100 μl 接种于长满单层的 C6/36 细胞,于 37 ℃ CO₂ 培养箱(Thermo)吸附 1 h,弃掉接种液,每管加入 1 ml 维持液(GIBCO;95.0%DMEM 培养基,2.5%青霉素-链霉素,2.5% HEPES 缓冲液),置于 35 ℃ 培养箱(Thermo)静置培养,每天观察是否出现膨大至融合,折光度增强、颗粒增多等特异性病变,连续 7 d。收获细胞培养液置-70 ℃冻存。

1.3 引物 引物由广东省疾病预防控制中心吴德博士设计提供,委托广州艾基生物公司合成,引物序列见表 1。

表 1 Ⅱ型登革病毒 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5' to 3')	扩增位置
D2F1	AGCAATCCTGGCATACACCATAG	849-871
D2R1	CCTTTGARCTGTAGTTTGTCCA	1823-1802
D2F2	CCTCGACTTCAATGAGATGCT	1506-1526
D2R2	TTGAAGGGGATTCTGCTTGGA	2542-2521

1.4 RT-PCR 扩增病毒 E 基因并进行序列测定分析 应用 PCR 试剂盒(Takara, One Step RNA PCR Kit (AMV), Code:DRR024A)对病毒的 E 基因进行扩增,获得长度为 1 485 bp 的目标片段,反应条件如下:50 ℃,30 min;94 ℃,2 min;94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;68 ℃,1 min;35 个循环;68 ℃:10 min 延伸,1 个循环。采用 1.2%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳分析,委托广州艾基生物公司进行序列测定。

利用 NCBI BLAST 对样品序列在 GenBank 数据库中进行同源性检索,并利用 MEGA 5.1 进行排序、比

对,运用 Neighbor-joining 算法建立系统分析树。运用 BioEdit 对序列核苷酸和推测的氨基酸进行同源性对比分析,以及样品序列与标准株基因突变情况分析。

2 结果

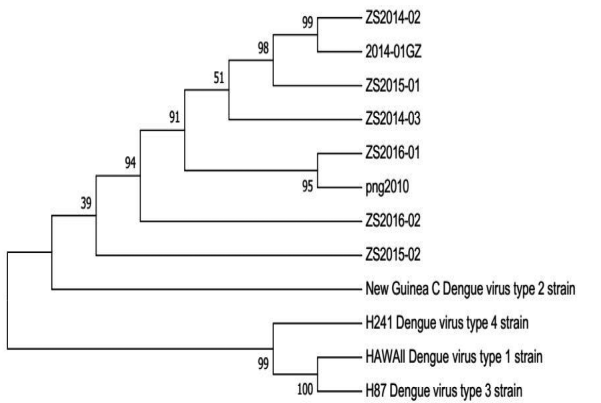
2.1 核苷酸及氨基酸序列同源性对比分析 将 6 株登革热Ⅱ病毒株与 New Guinea C 登革Ⅱ型国际标准株进行核苷酸结果显示 2014 年的 3 株 DENV 2 核苷酸序列同源性在 91.3%~97.4%之间。数据见表 2。

表 2 登革病毒核苷酸同源性比较(%)

毒株名称	ZS2014-02	ZS2014-03	ZS2015-01	ZS2015-02	ZS2016-01	ZS2016-02	NG-DENV2
ZS2014-02	-	99.8	98.8	98.8	99.0	91.0	96.8
ZS2014-03	97.4	-	98.7	98.7	98.8	90.9	97.0
ZS2015-01	97.4	95.7	-	98.3	99.0	92.1	96.1
ZS2015-02	93.7	93.3	92.8	-	98.5	90.5	96.5
ZS2016-01	97.2	96.2	96.2	93.4	-	91.4	96.3
ZS2016-02	88.8	88.0	89.1	86.3	88.8	-	88.7
NG-DENV2	94.1	93.8	92.7	93.5	93.5	86.1	-

注:NG-DENV2;New Guinea C 登革Ⅱ型。

2.2 系统进化树分析 将测得的 6 株登革Ⅱ型病毒 E 基因序列进行 Blast 比对,再使用 Mega 5.1 软件进行系统进化树建立,结果显示,在这 6 株病毒中,ZS2014-01 则与 2014 年广州分离株 GZ2014 进化关系最近,同源性达到 100%。ZS2014-02、ZS2015-01 均与 2014 年广州分离株 2014-011GZ 在进化关系上最近,同源性分别为 100%与 99%。ZS2016-01 与 2010 年巴布新几内亚分离株 PNG2010 进化关系较近,同源性达到 91%。ZS2016-02 与 ZS2015-02 进化距离相对较近。见图 1。



注:NG-DENGUE2;New Guinea C 登革Ⅱ型;2014-011GZ;2014 年广州分离株 D14115; PNG2010; 2010 年巴布新几内亚分离株 JN568270. 1;GZ2014;2014 年广州分离株 KT751357. 1。

图 1 中山市登革Ⅱ型病毒分离株的系统进化树

2.4 氨基酸突变位点分析 登革Ⅱ型病毒含有 1 485 个核苷酸,推导翻译出 495 个氨基酸。通过与国际标准株 New Guinea C 登革Ⅱ型的氨基酸对比分析后,发现有 22 个位点发生突变,见表 3。

表 3 1~485 号位点 6 株登革型病毒株与国际标准株 New Guinea C 登革Ⅱ型对比氨基酸的突变情况

突变位点	ZS2014 -02	ZS2014 -03	ZS2015 -01	ZS2015 -02	ZS2016 -01	ZS2016 -02
52	Q→H	Q→H	Q→H	-	Q→Y	Q→H
71	D→A	D→A	D→A	D→A	D→A	D→A
83	-	-	-	-	-	-
126	K→E	K→E	K→E	K→E	K→E	K→E
129	V→I	V→I	V→I	V→I	V→I	-
141	-	-	-	I→V	-	-
149	H→N	H→N	H→N	H→N	H→N	H→N
160	-	-	-	-	-	K→T
164	I→V	I→V	I→V	I→V	I→V	I→V
182	-	-	-	T→A	-	-
203	-	-	-	-	-	N→D
226	-	-	-	-	-	T→K
228	-	-	-	-	-	-
239	-	-	-	-	-	-
322	-	-	-	I→V	-	-
346	-	-	-	-	-	-
379	I→V	-	-	-	-	-
390	N→S	N→S	N→S	N→S	N→S	N→S
394	-	-	-	-	-	-
402	I→F	I→F	I→F	I→F	I→F	I→F
462	I→V	I→V	I→V	I→V	I→V	I→V
484	-	-	-	-	-	-

注:A:丙氨酸;C:半胱氨酸;D:天冬氨酸;E:谷氨酸;F:苯丙氨酸;G:甘氨酸;H:组氨酸;I:异亮氨酸;K:赖氨酸;M:甲硫氨酸;N:天冬酰胺;Q:谷氨酰胺;R:精氨酸;S:丝氨酸;T:苏氨酸;V:缬氨酸;Y:酪氨酸。

3 讨 论

E 蛋白是主要的结构蛋白,它由 489~495 个氨基酸构成,E 蛋白的膜外区可从结构和功能上分为 3 个

结构域:EDI、EDⅡ和 EDⅢ。其中 EDI 作为中心区域,支撑着整个 E 蛋白架构;EDⅡ包含疏水性的融合环,可在酸性的内吞泡中引起膜融合;EDⅢ由类似免疫球蛋白结构组成,可能参与病毒与宿主细胞表面受体的结合^[6]。

本研究所涉及的 6 例登革病例,临床症状符合登革发病特点,血小板和白细胞均低于正常值,但 6 例病例均无出血,无多器官功能衰竭等重型登革的临床表现。病人的阳性血清,在经历病毒分离、PCR 扩增以及电泳结果分析后,成功分离出全长 1 485 bp 的登革Ⅱ型 E 基因片段。基于 E 基因片段的变异可能导致毒力变化,并引起疾病症状的变化^[13],对 E 基因进行了分析。

2014 年的 2 株登革病毒 ZS2014-02、ZS2014-03 核苷酸与氨基酸序列同源性均在 91.3%以上,ZS2014-02 与 2014 年广州分离株 D14115 在进化关系上最近同源性达到 100%,结合流行病学资料,推测 2014 年的 2 株毒株来源于广州。2014 年广州和中山都分别有登革热的大暴发,由此造成了登革热城际之间的传播。

2015 年的 2 株毒株,ZS2015-01 与 2014 年广州分离株 D14115 进化关系很近,同源性达到 99%,ZS2014-02 与 ZS2015-01 同源性很高,ZS2015-01 病人在发病之前曾在广州旅游,而 ZS2015-02 病人无外出史,其发病时间为 2015 年中山登革暴发后期流行期间,结合流行病学资料分析,推测 ZS2015-01 来源于广州,ZS2015-02 为 2015 年中山市登革流行后期的本地二代病例。

2016 年的 2 株毒株,2016 年的 2 株 DENV 2 核苷酸和氨基酸序列同源性相对较远分别为 88.8%和 91.4%。推测两株毒株来源的地方不同。ZS2016-01 与 2010 年巴布新几内亚分离株 JN568270.1 进化关系较近,同源性达到 91%,结合流行病学资料发现该病人曾经去往巴布新几内亚,推测此株病毒来源于巴布新几内亚的输入病例,而 ZS2016-02 则曾经去过菲律宾,推测此毒株为菲律宾输入。

E 蛋白全长 495 个氨基酸,是登革病毒的包膜蛋白,登革病毒的毒力基因大多在 E 区。目前认为登革病毒 E 蛋白中影响毒力的 3 个区段是:①Ⅲ区(残基 303~395),此区的突变影响病毒进入细胞和细胞嗜性;②Ⅱ区(残基 52~136 和 190~284),此区的改变会影响病毒的促融合活性;③Ⅱ区/Ⅲ区分界面之间的区域(294~305)^[14]。

本实验的 6 株毒株在 E 蛋白Ⅱ区出现变化的位点有 E-52、E-71、E-83、E-126、E-129、E-203、E-

226、E-228、E-239。E-71 ZS2014-01 由 Asp→Glu, 其余均由 Asp→Ala。Asp 与 Glu 均为酸性氨基酸, 属于同类型氨基酸之间的突变。Ala 为非极性氨基酸, 由电离的极性氨基酸突变为非极性氨基酸, 对毒力有一定的影响。E-126 号位点, 所有毒株均由 Lys→Asp, Lys 为碱性氨基酸, Asp 为酸性氨基酸, 为带相反电荷氨基酸之间的突变。在所有被认为与毒力有关的位点中, E-126 位点得到多篇文献、不同实验室的研究结果的验证, 为 DEN-2、DEN-3 的毒力相关位点。在黄病毒的三维结构中, E-126 Lys 位于 II 区 E 二聚体平面向外延伸的 d-e 环的最上方。d-e 环由带正电荷的氨基酸占据, Glu 变为 Lys 使 d-e 环中唯一的带负电荷的氨基酸变为带正电荷氨基酸, 这一电荷变化可能改变了病毒和细胞间的相互作用^[14]。至于 E-126 号位点 Lys→Asp 的突变对细胞毒力是否有影响还有待研究。E-129 号位点除了 ZS2016-02 外其余均由 Val→Ile, Val 与 Ile 均为非极性氨基酸, 为同类型氨基酸突变, 对毒力的影响相对较小。

在 E 蛋白 III 区出现变化的位点有 E-322、E-346、E-379、E-390、E-394。报道最多的位点为 E-390。当 E390 位氨基酸由 Asp 突变成 His 时具有较强的神经毒力, 而当突变成 Asn 时神经毒力相对较弱, 说明其 E390 位氨基酸可能是 DENV2 乳鼠神经毒力相关位点, 决定了病毒的鼠神经毒性^[14]。本次实验 390 号位点除了 ZS2014-01 外其余毒株均由 Asn→Ser, 与文献不符, 由于 Asn 与 Ser 为同类型的氨基酸的改变, 对毒力影响较小。

E-322、E-346、E-379 和 E-394 的突变可能会影响病毒进入细胞和细胞嗜性。164 号位点、149 号位点、402 号位点和 462 号位点不是登革 II 型 E 基因的毒力位点, 其突变是否会带来影响还有待深入研究。此 6 例患者, 血常规及生化指标与其他感染登革病毒患者相关指标差异无统计学意义, 其临床症状亦无区别, 均为轻型登革病例。虽然上述 6 株病毒株均出现氨基酸突变, 并且涉及到已公认的毒力位点的突变, 但是突变是否会引起登革 II 型病毒毒力的改变或者毒力改变的情况则有待深入研究。

登革热是由蚊虫叮咬, DENV 感染所引起的急性

虫媒病毒传染病^[10]。20 世纪 90 年代以来, 广东省已成为我国登革热的主要流行区, 是广东省重点防控的传染病之一^[11]。登革病毒的进化遗传学研究发现, 其基因多样性正在增加, 导致产生大量不同毒力的病毒株, 这意味着人类将受到更多样的致病性登革病毒攻击^[12]。因此定期对流行区域的登革病毒进行序列分析有助于研究当地登革病毒的基因突变规律、进化方向以及来源。

参考文献

- [1] 韩雪玲, 史锋庆, 胡淑芳, 等. 蚊传疾病登革热和登革出血热[J]. 中华卫生杀虫药械, 2014, 20(6): 605-609.
- [2] WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control[J]. Geneva: WHO, 2009, 6(12): 990.
- [3] Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature[J]. Virology, 1990, 174(2): 479.
- [4] 王共飞, 程周祥, 王毅, 等. 登革病毒和基孔肯雅病毒检测技术进展[J]. 中国热带医学, 2016, 16(8): 839-842.
- [5] 王艳红, 宝福凯, 柳爱华. 登革病毒感染的检测技术研究进展[J]. 生命科学研究, 2013, 17(1): 78-85.
- [6] 李敏, 金侠. 登革病毒疫苗研究现状与展望[J]. 生命的化学, 2014, 34(1): 29-38.
- [7] 刘强强, 王明连, 李艳. 登革病毒非结构蛋白 NS5 研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2016, 6(4): 317-321.
- [8] 张顺先, 王英, 闫磊, 等. 我国 2005-2012 年登革热流行特征分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(16): 401-402.
- [9] 张树波, 赖剑煌. 分子系统发育分析的生物学信息学方法[J]. 计算机科学, 2010, 37(8): 47-52.
- [10] 龙健灵, 林斌, 张萍. 广东省登革热的流行病学特征分析[J]. 中国医药科学, 2015, 5(11): 183-185.
- [11] 曾四清, 钟豪杰, 方艳, 等. 多曲线季节指数模型分析广东省登革热流行时间特征及应用探讨[J]. 实用预防医学, 2018, 25(9): 1137-1141.
- [12] 白志军, 张培, 洪文艳, 等. 广东省流行的 3 株登革热 2 型病毒基因组全序列测定及分析[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(5): 392-396.
- [13] 阳帆, 何建凡, 洗慧霞, 等. 登革 4 型病毒深圳分离株 E 基因序列测定及其系统发生分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(1): 17-20.
- [14] 赵卫, 杨佩英. 登革病毒毒力研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15(2): 197-199.
- [15] 杨杰, 饶贤才. 登革病毒包膜 E 蛋白 III 区[J]. 生命的化学, 2011, 31(3): 366-370.

收稿日期: 2018-05-14