

2009 年昆明地区流行的肠道病毒 71 型基因特征分析

陈俊英 潘 玥 李 华 施海晶 赵玉娇 孙强明 马绍辉

摘 要 **目的** 分析 2009 年昆明地区肠道病毒 71 型分离株 VP1 的遗传特征。**方法** 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法从 Vero 细胞分离的病毒株基因组中扩增出 VP1 基因,并测序;分别用 Mega4.1 软件分析其遗传特征。**结果** 中国昆明分离到的 6 株肠道病毒 71 型 VP1 基因的核苷酸和氨基酸同源性为 95.4%~97.9% 和 97.3%~99.7%,与其他 C 基因型 C1、C2、C3 和 C5 的 VP1 的同源性为 87.9%~89.1% 和 98.3%~99.1%,而与 C4 基因型的同源型为 92.6%~98.5% 和 97.0%~99.7%,与 SHZH98 的同源性最低为 92.6% 和 97.0%,与其他基因型的同源性为 82.7%~84.6% 和 96.0%~97.6%。**结论** 2009 年云南昆明流行的肠道病毒 71 型均为 C4 基因型;其 VP1 基因保守性较好。

关键词 肠道病毒 71 型 C4 基因型 VP1 基因

Genetic Analysis of the VP1 Region of Human Enterovirus 71 Strains Isolated in Kunming, China, During 2009. Chen Junyin, Pan Yue, Li Hua, et al. Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To analyze genetic characterization of the VP1 genes of enterovirus 71 isolated in Kunming, China in 2009. **Methods** Six enterovirus 71 strains were isolated in Kunming, China in 2009. By using RT-PCR, the VP1 gene fragments contained 891 nucleotides in all strains were sequenced. The sequences were aligned with other enterovirus 71 sequences downloaded from GenBank using Mega4.1 software. **Results** Six isolated strains were closely related to other reference strains of subgroup C4. In VP1 gene, the homology of nucleotide and amino acid among the six isolated strains were 95.4% - 97.9% and 97.3% - 99.7%, respectively, and 92.6% - 99.4% and 87.7% - 100% of homology when compared with that of strains isolated from the subgroups C1, C2, C3 and C5, respectively. SHZH98 strain had less homology when compared to other strains of subgroup C4. The six strains had homology of 92.6% - 98.5% and 97.0% - 99.7% compared to that of other subgroups on nucleotide and amino acid, respectively. **Conclusion** Six strains isolated in Kunming in 2009 were belonged to subgroup C4 of enterovirus and 71. VP1 gene was more conservative.

Key words Enterovirus 71; Subgroup C4; VP1 gene

肠道病毒 71 型(enterovirus71, EV71)属小 RNA 病毒科(picornaviridae)肠道病毒属(enterovirus),主要引起手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)、疱疹性咽峡炎、无菌性脑炎、无菌性脑膜炎和脊髓灰质炎样麻痹。近年来, EV71 在我国广泛流行。据中国 CDC 报道在 2008 年手足口病感染者为 488955 例,死亡 126 例;2009 年 1155525 例,死亡为 353 例和 2010 年 1795336 例,死亡为 888 例。

EV71 为单股正链 RNA 病毒,其病毒的毒粒为二十面体立体对称,呈球形,直径约为 23~33nm,核衣壳裸露,无包膜和突起。其基因组只含 1 个大的开放读码框架(ORF),该 ORF 依次分为 P1、P2 和 P3 3 个

区,其中 P1 区编码病毒的结构蛋白 VP1 到 VP4,组成病毒衣壳,而 P2 和 P3 区编码非结构蛋白。根据病毒衣壳蛋白 VP1 核苷酸序列的差异将 EV71 病毒分为 3 个基因型,即 A、B、C 型, B 和 C 分别分为 B1~B5 和 C1~C5 亚型^[1]。

为了解昆明地区流行的 EV71 基因型和流行特点,本研究对 2009 年昆明地区流行的 EV71 部分分离毒株进行全 VP1(891bp)核苷酸序列扩增和测序,并与 GenBank 上的序列进行比对及分析,为预防和控制 EV71 流行提供实验依据。

材料与方法

1. 材料:①细胞:VERO 细胞皆由中国医学科学院医学生物学研究所免疫室保存并提供;②标本来源:34 份粪便标本采集于疫情发生地区手足口病患者, -20℃ 保存;③RNA 提取试剂盒: Axygen Body Fluid viral DNA/RNA Miniprep Kit. lot: KC50090501 - B - G; ④RT-PCR Kit: TAKARA One step RT-PCR Kit VER. 2203. lot: BK1101。

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所、云南省重大传染病疫苗研发重点实验室(注:陈俊英、潘玥为共同第一作者)

通讯作者:马绍辉,电子邮箱:shaohuima@imbcams.com

2. 方法: (1) 病毒分离与鉴定: 采用组织培养法, 取粪便标本 1g, 加入 5ml 0.01M PBS (pH7.4) 制成悬液, 3000r/min, 离心 30min, 用 0.45 μ l 滤器除菌过滤, 接种已长成致密单层的 Vero 细胞, 细胞培养严格按 WHO 分离肠道病毒规程操作, 于 37℃ 培养, 培养液为含 10% 小牛血清的 MEM。观察病毒在细胞上的细胞病变情况 (CPE), 如果无 CPE, 盲传 3 代; 3 代后无 CPE 出现, 判为阴性。病毒继续在 Vero 细胞培养增殖 2 代。(2) 病毒的提取: 按照 Axygen Body Fluid viral DNA/RNA Mini-prep Kit 试剂盒说明书操作, 具体步骤为: 先取样品 200 μ l 加入 200 μ l V - L 缓冲液, 静置 5min 后加 75 μ l V - N 缓冲液混匀, 12000 $\times$ g 离心 5min; 然后, 取上清与 300 μ l 异丙醇 (1% 冰乙酸) 混匀, 并将混合液移入制备管中, 6000 $\times$ g 离心 1min; 分别用 500 μ l W1 和 800 μ l W2 缓冲液洗涤, 12000 $\times$ g 离心 1min, 最后用 50 μ l TE 洗脱, 并贮存在 -70℃。(3) 引物设计: 引物参照参考文献 [2], 并根据 FY23 (EU812515) 设计如下: EV713F: 5' - TGT TTYACTGGATCCTTCATGGC - 3' (2070 ~ 2091); EV713R: 5' - GCCAGCRTAATTTGGRTTGGCT - 3' (3282 ~ 3261); EV714F: 5' - TRCCATTTCATGTCACTGCGA - 3' (3012 ~ 3032); EV714R: 5' - TACGACACATTCCCAAACAT - 3' (4320 ~ 4301)。(4) PT - PCR: 采用 TaKaRa 公司生产的 One - step RNA PCR kit (AMV) 试剂盒。反应条件: 50℃ 30 min, 反转录 95℃ 2min 后 94℃ 50s, 50℃ 50s, 72℃ 1.5min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 7min, 然后转入 4℃。取扩增产物 5 μ l, 用 1.0% 琼脂糖电泳, 根据 Marker 位置对扩增片段进行确认。(5) 序列测定和数据分析: 扩增阳性的 PCR 产物由北京三博生物技术有限公司进行纯化和序列测定。其他有关 EV71 的 VP1 序列从 NCBI 的基因数据库 (GenBank) 上下载, 通过 Mega 4.1 对测序结果进行处理和分析。参比序列如下: BrCr: AB204853; BrCr - TR: AB204852; J115 - MAL - 01: DQ341360; 804 - NO - 03: DQ452074; 1M - AUS - 12 - 00: DQ341361; Tainan - 4643 - 98: AF304458; Tainan - 4746 - 98: AF304459; Tainan - 5746 - 98: AF304457; 03 - KOR - 00: DQ341356; 06 - KOR - 00: DQ341355; Fuyang. Anhui. P. R. C -

17. 08 - 3: EU703813; F1 - CHN - 00: AB115490; SHZH98: AF302996; SHZH03: AY465356; 1431 - Yamagata - 07: AB433881; 1571 - Yamagata - 07: AB433883; AnHui - HeFei: EU697903; 2007 - 07364: EU527983; NTU1482 - TW - 06: DQ846662; 258 - Bulgaria75: AB059814; Nagoga - Japan73: AB059813; 7968 - PA - 87: AF009524; 8102 - WA - 87: AF009526; NOH0037 - SIN - 08: FJ461788; SB11977 - SAR - 03: AY905549; 17M - AUS - 5 - 99: AF376094; MY1049 - SAR - 97: DQ341368; 2120 - SIN - 01: AF376112; SB1647 - SAR - 00: AF376065。

结 果

1. 病毒分离及鉴定: 将直接从临床样品中鉴定为 EV71 的 34 手足口病患者的粪便标本, 分别接种 Vero 细胞后, 培养分离到 6 个阳性分离物, 收集上清, 并保存在 -70℃。从中分离得到的阳性毒株为 6 株, 经微量中和试验鉴定, 均确认为 EV71 病毒。

2. RT - PCR 产物确定及测序: 采用特异性引物做一步法 RT - PCR, 取 5 μ l RT - PCR 产物, 1% 琼脂糖胶电泳, 大小与所设计一样。将扩增出的特异性核酸片段测序, 结果与标准 EV71 的 VP1 序列同源达 95%。并获得基因登陆号: HQ199874、HQ199875、JF505389、JF505390、JF505391 和 JF505392。

3. 基因型和系统进化分析: 将 EV71 分离株完整 VP1 的核苷酸与 GenBank 中 28 株的 VP1 经 Mega4.1 分析, 发现此次暴发 EV71 与其他 C 基因型 C1、C2、C3 和 C5 的 VP1 的同源性为 87.9% ~ 89.1%, 而与 C4 基因型的同源型为 92.6% ~ 98.5%, 与 SHZH98 的同源性最低为 92.6%, 而本次 6 个分离株之间的同源性为 95.4% ~ 97.9%。与其他基因型的同源性为 82.7% ~ 84.6%。另外, 从表 1 也可看出; 本次分离株与 C4 基因型的 EV71 的距离较小, 而与其他基因型较大。

表 1 分离株与其他不同基因型分离株 VP1 核苷酸两两距离分析 (distances&Std. Err)

株	基因型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
KM9 - 09	C4		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
KM11 - 09	C4	0.02		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
KM16 - 09	C4	0.05	0.06		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
KM23 - 09	C4	0.05	0.06	0.02		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
KM186 - 09	C4	0.04	0.05	0.04	0.05		0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
KMM - 09	C4	0.05	0.06	0.05	0.06	0.02		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
SHZH98	C4	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.10		0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
1M/AUS/12/00	C1	0.12	0.13	0.13	0.13	0.11	0.12	0.12		0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Tainan/4643/98	C2	0.12	0.14	0.13	0.12	0.12	0.13	0.11	0.10		0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
03/KOR/00	C3	0.12	0.13	0.13	0.12	0.13	0.14	0.11	0.10	0.09		0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
2007/07364	C5	0.13	0.15	0.14	0.13	0.13	0.15	0.13	0.11	0.11	0.12		0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
258/Bulgaria/75	B1	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.20	0.22	0.22	0.23	0.21	0.21		0.01	0.01	0.01	0.02	0.02
7968/PA/87	B2	0.17	0.18	0.18	0.18	0.017	0.19	0.21	0.20	0.21	0.21	0.22	0.06		0.01	0.01	0.01	0.02
17M/AUS/5/99	B3	0.18	0.19	0.18	0.18	0.17	0.19	0.22	0.21	0.22	0.22	0.20	0.09	0.08		0.01	0.01	0.02
2120/SIN/01	B4	0.20	0.20	0.19	0.20	0.18	0.20	0.22	0.21	0.22	0.20	0.21	0.11	0.09	0.06		0.01	0.02
NUH0037/SIN/08	B5	0.21	0.21	0.20	0.20	0.18	0.20	0.22	0.21	0.21	0.21	0.20	0.13	0.12	0.10	0.09		0.02
BrCr	A	0.19	0.20	0.21	0.21	0.19	0.20	0.21	0.20	0.19	0.22	0.22	0.23	0.21	0.21	0.22	0.22	

董晓楠等^[3]根据分析结果并参考前人的研究,设定 VP1 区同源性高于 85% 的毒株为同一基因型,同源性高于 91% 的毒株为同一基因亚型;以及从基于 VP1 的亲缘性系统发生树(图 1),可见昆明暴发流行 EV71 分离株与 C4 基因型聚为一簇,因此,可认为该次昆明流行株 EV71 的基因型为 C4。

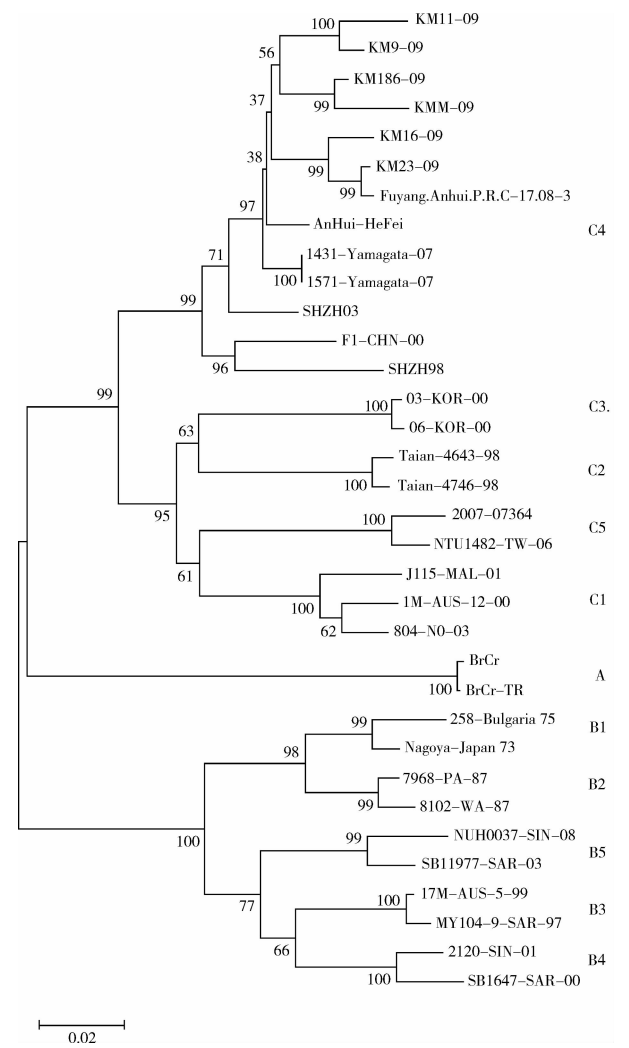


图 1 昆明 EV71 病毒分离株 VP1 基因进化树

4. 氨基酸序列的比较:经分析发现(表 2)此次昆明流行的 EV71 与其他 C 基因型 C1、C2、C3 和 C5 的 VP1 的氨基酸的同源性为 98.3%~99.1%,而与 C4 基因型的同源型为 97.0%~99.7%,与 SHZH98 的同源性最低为 97.0%,而本次 6 个分离株之间同源性为 97.3%~99.7%。与其他基因型的同源性为 96.0%~97.6%。

讨 论

在本研究中,通过对昆明地区的 EV71 VP1 基因分析发现,昆明分离株属于 C4 亚型,未发现其他基

表 2 KM9-09 分离株 VP1 基因核苷酸和氨基酸同源性比较

株	基因型	核苷酸(%)	氨基酸(%)
KM11-09	C4	97.9	98.3
KM16-09	C4	95.4	98.7
KM23-09	C4	95.4	99.0
KM186-09	C4	96.5	99.7
KMM-09	C4	95.4	97.3
SHZH98	C4	92.6	97.0
IM/AUS/12/00	C1	89.1	99.3
Tainan/4643/98	C2	89.1	98.3
03/KOR/00	C3	89.1	98.7
2007/07364	C5	87.9	98.7
258/Bulgaria	B1	84.4	96.0
7968/PA/87	B2	85.3	97.6
17M/AUS/5/99	B3	84.6	97.3
2120/SIN/01	B4	83.5	97.6
NOUH0037/SIN/08	B5	82.7	97.6
BrCr	A	84.4	97.0

因型的存在,同时也发现所有 EV71 各分离株序列以及与其他 C4 基因型之间存在差异,而且随着时间的推移,EV71 发生了一定程度的变异。

接种 EV71 疫苗是预防和控制 EV71 流行的主要手段之一。目前国内已有 3 家开始实施临床试验,而疫苗的免疫原性好坏决定该疫苗是否成功的关键因素。Oberste 等^[4]研究表明,EV71 的 VP1 与决定血清型的抗原决定因子密切相关,根据 VP1 区序列进行分型结果与中和试验鉴定结果一致性较好,与血清型相关性较其他结构蛋白编码区高,VP1 蛋白是主要的病毒中和决定因子,它直接决定病毒的抗原性。Foo 等^[5-7]基于 EV7141 株(5865/SIN/00009)的 VP1 合成的两个肽 SP55(163~177)和 SP70(208~222)能够诱导出抗 EV71 的中和抗体,而另一合成的 SP2 肽(145~159)能够诱导出良好的 T 细胞增殖反应和细胞因子。从 EV71VP1 氨基酸分析的结果来看,除 SHZH98 在 220 处由 L 变成 F,以及 258-Bulgaria75(B1),2120-SIN-01(B4),7968-PA-87(B2)和 17M-AUS-5-99(B3)株在氨基酸 164 位由 D 变为 E 外,其余各株均一致。而且 C 基因型氨基酸同源性为 97.3%~99.3%,与其他基因型的同源性为 96.0%~97.6%。这说明 C 基因型在 VP1 氨基酸上较保守,这与以前研究结论相一致^[8]。

EV71 作为 RNA 病毒,其核苷酸的替代突变率为 1.35×10^{-2} 位点/年^[9]。自 1969 年分离到第一株 EV71 以来,EV71 已经分为 A、B、C 3 个型,而且 B 和 C 两型分别又分为 B1~B5 和 C1~C5 亚型。另外,目前资料已经显示^[10],中国台湾及邻近的韩国、日

本、新加坡、马来西亚均有多种基因型及亚型的流行,而且不同阶段可出现不同的 EV71 基因型。而中国除 2008 年安徽省阜阳市报道出现 A 基因外^[11],其余均为 C4 基因型。因此,对 EV71 监测有利于了解该病毒的变异,并对其传播途径、预防和控制具有重要的意义。

参考文献

- 1 Tee KK, Lam TT, Chan YF, *et al.* Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene[J]. J Virol, 2010, 84(7): 3339 – 3350
- 2 周世力, 李琳琳, 何雅青, 等. 我国分离的肠道病毒 71 型(SHZH03 病毒株)全基因组核苷酸序列分析[J]. 病毒学报, 2004, 20(1): 1 – 11
- 3 董晓楠, 应剑, 陈应华. 1970 ~ 2004 年全球肠道病毒 71 型分离株的分子流行病学分析[J]. 科学通报, 2007, 52(9): 1021 – 1027
- 4 Oberste MS, Maher K, Kilpatrick, DR, *et al.* Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to Picornavirus classification[J]. J Virol, 1999, 73: 1941 – 1948
- 5 Foo DG, Alonso S, Chow VT, *et al.* Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide[J]. Microbes Infect, 2007, 9(11): 1299 – 1306
- 6 Foo DG, Alonso S, Phoon MC, *et al.* Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. Virus Res, 2007, 125(1): 61 – 68
- 7 Foo DG, Macary PA, Alonso S, *et al.* Identification of human CD4 T – cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71[J]. Viral Immunol, 2008, 21(2): 215 – 224
- 8 Shao MA, Jian SL, Jing JW, *et al.* Genetic analysis of the VP1 region of Human enterovirus 71 strains isolated in Fuyang, China, during 2008[J]. Virologica Sinica, 2009, 24(3): 162 – 170
- 9 Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, *et al.* Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications[J]. Rev Med Virol, 2007, 17(6): 371 – 379
- 10 Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(11): 778 – 790
- 11 Yu H, Chen W, Chang H, *et al.* Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008[J]. Virus Genes, 2010, 41(1): 1 – 4

(收稿: 2011 – 03 – 23)

(修回: 2011 – 04 – 07)

自噬相关基因 MAPLC3 在放射损伤人骨髓间充质干细胞中的表达

陈 哲 白 海 潘耀柱 王存邦 欧剑锋 赵 强

摘 要 **目的** 探讨人骨髓间充质干细胞(hBMSCs)放射损伤后自噬水平的变化。**方法** 利用 X 线 8Gy 照射体外培养的 hBMSCs, 应用反转录 – 聚合酶链反应(RT – PCR)技术检测自噬相关基因微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule – associated protein 1 light chain 3, MAPLC3)的 mRNA 表达。**结果** 正常对照组中 MAPLC3 呈低表达, 而 8GyX 线照射后 2h 其表达明显升高($P < 0.05$)。**结论** hBMSCs 放射应激时存在自噬的活化。

关键词 放射损伤 人骨髓间充质干细胞 自噬 MAPLC3

Expression of Autophagy – related Gene MAPLC3 in Human Mesenchymal Stem Cells with Irradiation Injury. Chen Zhe, Bai Hai, Pan Yaozhu, *et al.* The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Gansu 730000, China

Abstract Objective To investigate the change of autophagy level in hBMSCs after irradiation injury. **Methods** Cultured hBMSCs were irradiated with 8Gy X – rays in this study. The mRNA expression of MAPLC3 in hBMSCs was analyzed by RT – PCR at 2h after irradiation. **Results** The mRNA expression of MAPLC3 in irradiation exposed group was significantly higher than that in normal control group($P < 0.05$). **Conclusion** Autophagy could be activated in hBMSCs exposed to irradiation.

Key words Irradiation injury; Human mesenchymal stem cells; Autophagy; MAPLC3

作者单位: 730000 兰州大学第二临床医学院(陈哲、白海、潘耀柱、王存邦、欧剑锋、赵强); 730050 兰州军区兰州总医院血液病研究所(陈哲)

通讯作者: 白海, 主任医师, 电子信箱: baihai98@tom.com