

- ZEB1/ΔEF1 in human mammary epithelial cells [J]. Biol Pharm-Bull, 2011, 34(3):324-329
- 12 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial - mesenchymal transitions [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6):1429-1437
- 13 Yap WN, Chang PN, Han HY, *et al.* Gamma - tocotrienol suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion through multiple - signalling pathways [J]. Br J Cancer, 2008, 99(11):1832-1841
- 14 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial - mesenchymal transitions [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6):1429-1437
- 15 Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, *et al.* The epithelial - mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease [J]. J Cell Biol, 2006, 172(7):973-981
- (收稿日期:2013-11-07)
- (修回日期:2013-11-26)

肾综合征出血热汉坦病毒分型及序列特征的研究

盛 欣 陈淑红 兰英华 陈国林 郭 伟 王开利 李用国

摘 要 **目的** 分析黑龙江省肾综合征出血热(HFRS)患者携带汉坦病毒的基因型别及序列特征。**方法** 采集临床诊断为肾综合征出血热病人的全血 60 例,其中通过金标法检测出血热特异性抗体阳性 40 例、阴性 20 例,血凝块提取汉坦病毒 RNA,应用 RT - Nest - PCR 及核苷酸序列测定分型技术对黑龙江地区的汉坦病毒进行分型研究,设计汉坦病毒 M 片段通用引物(MOF, MOR)及 HTNV 和 SEOV 的 M 片段特异性引物(HTNMF, HTNMR, SEOMF, SEOMR),应用 Nest - PCR 进行扩增,回收阳性扩增产物进行基因序列测定,将所测基因序列与国内外 HV 病毒株序列进行核苷酸同源性分析,构建 M 基因种系进化树。**结果** 出血热特异性抗体阳性的病例中扩增出 HTN 型 19 份,抗体阴性的病例中扩增出 HTN 型 1 份、SEO 型 1 份。总体来看黑龙江省流行的汉坦病毒毒株主要为 HTN 型和 SEO 型,以 HTN 型为主。经核苷酸及氨基酸同源性和种系进化分析表明其黑龙江地区的病毒株同源性较高,其中 HTN 型与 76 ~ 118 株同源性较高,SEO 型与 Z37 株的同源性较高。**结论** 黑龙江省的 HV 感染病例多为 HTN 型,与其他 GenBank 中的各地标准株的核苷酸及推导的氨基酸序列均有一定差异,在系统进化树中分析 HTN 型与 76 - 118 株较为接近。SEO 型与国内 Z37 较为接近。结合临床症状发现其临床症状较为相似的在系统进化发生树中较为接近。

关键词 肾综合征出血热 汉坦病毒 M 基因 分型 种系进化

[中图分类号] R512.8 [文献标识码] A

Study on the Genotypes and Sequence Characteristics of Hanta Virus. Sheng Xin, Chen Suhong, Lan Yinghua, Chen Guolin, Guo Wei, Wang Kaili, Li Yongguo. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Department of Infectious Diseases, Heilongjiang 150001, China

Abstract **Objective** To study the genotypes and sequence characteristics of hantavirus carried by patients of HFRS in Heilongjiang province. **Methods** Whole blood from 60 patients with the clinical diagnosis of HFRS was collected. All cases were tested with gold standard assay, 40 cases of which were positive, 20 cases negative. Then the Hantaviruses RNA from the blood clots were extracted. Genotyping Hantaviruses in Heilongjiang was Analyzed using RT - Nest - PCR and gene sequencing. The universal primers of hantavirus M gene (MOF, MOR) and the M gene - specific primers of HTNV and SEOV (HTNMF, HTNMR; SEOMF, SEOMR) were designed and used in Nest - PCR. All products were collected and completed sequencing. A nucleotide homology analysis was done on the gene sequence and the other HV sequence, and phylogenetic tree of M gene was built. **Results** Totally 19 cases of HFRS antibody positive and 1 case of HFRS antibody negative were amplified by HTN genotype specific primers successfully. 1 case of HFRS antibody negative was amplified by SEO genotype specific primers. Generally, the hantavirus strains were mainly HTN and SEO genotype in Heilongjiang province, and HTN genotype mostly. The results of homology analysis of nucleotides and amino acid and the Phylogenetic tree indicated that the virus strains in Heilongjiang province were highly homogenous. Compared to the strains in the GenBank of other area, the HTN and the strain 76 - 118 were high homology, and so were the SEO and Z37. **Conclusion** Most HV infections in Heilongjiang Province were caused by

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700700);中国博士后基金资助项目(20100471095);黑龙江省青年科学技术专项基金资助项目(QC07C68)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院感染一科(盛欣、兰英华、陈国林、郭伟、李用国);黑龙江省疾病预防控制中心(陈淑红、王开利)

通讯作者:兰英华,电子信箱:lan_yinghua@163.com

HTN genotype. The nucleotide and deduced amino acid sequences of HTN and the strains in the GenBank of other areas had some differences. The HTN and 76 – 118 were closer in the phylogenetic tree, and the SEO appeared to be closer to the Z37. Combined with clinical symptoms, we found that the clinical symptoms were more similar when the strains that caused them were closer in the phylogenetic tree.

Key words Hemorrhagic fever with renal syndrome; Hanta virus; M gene; Virus genotyping; Phylogenetic

汉坦病毒 (Hanta virus, HV) 属于布尼亚病毒科汉坦病毒属, 为分节段负链 RNA 病毒, 基因组按其大小分为 L、M、S。L 基因编码病毒 RNA 依赖的 RNA 多聚酶、M 基因编码病毒糖蛋白 G1 和 G2、S 基因编码病毒的核衣壳蛋白^[1]。世界上有 30 多个国家和地区有肾综合征出血热 (HFRS) 发生, 我国报告病例发生数占全世界病例数的 90% 以上。目前国外研究表明, HV 至少存在近 30 个血清型/基因型。在我国引起 HFRS 的主要病原为汉滩病毒 (Hantann virus, HTN) 和汉城病毒 (Seoul virus, SEO)^[2,3]。黑龙江省是我国最早发现 HFRS 的地区, 也是我国 HFRS 的高发病省份之一, 但目前对黑龙江省 HV 基因型和基因亚型的分布研究却少有报道。本研究对黑龙江省 2005 ~ 2013 年临床诊断 HFRS 患者血样标本为检测对象, 根据汉坦病毒 M 基因保守区设计 HV 通用引物 (MOF, MOR), 再分别根据 HTN 型和 SEO 型 M 片段核苷酸序列设计特异性引物 (HTNMF, HTNMR; SEOMF, SEOMR), 应用一步法 RT – PCR 技术进行第 1 轮序列扩增, 回收扩增产物再进行第 2 轮序列扩增, 再回收阳性扩增产物进行基因序列测定, 将所测序列与国内外 HV 病毒株序列进行核苷酸同源性分析, 应用 DNASTar 软件构建 M 基因种系进化树, 再结合临床特征进行研究。

材料与方法

1. 病例标本: 来自黑龙江省 2005 ~ 2013 年临床诊断为 HFRS 患者全血标本。
2. 主要试剂与仪器: Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 美国)、QIAGEN OneStep RT – PCR Kit (QIAGEN 公司, 德国)、Lyophilized HS Taq PCR Master Mix 及 2000bpDNA MarkerI 均为 TaKaRa 公司产品, PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国), 离心机及各型号移液器: 法国 Gilson 公司和荷兰 LabSystems 产品, 紫外透射仪: Promega 公司产品。
3. 引物设计: 委托 (上海生工) 合成, 详见表 1。
4. 核酸的提取: 应用 Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 美国) 具体方法参照说明书。
5. RT – Nest – PCR: 应用通用引物 (MOF; MOR) 及 QIAGEN Onestep RT – PCR Kit (QIAGEN 公司, 德国) 试剂盒, 合成反应体系与反应条件参照试剂盒说明书进行; 回收扩增产物后将其作为模板加入巢式 PCR 引物 (HTNMF、HTNMR, SEOMF、SEOMR), Lyophilized HS Taq PCR Master Mix (TaKaRa

公司) 试剂盒, 具体反应体系与反应条件参考试剂盒说明书进行。

表 1 引物设计

引物名称	大小 (nt)	引物序列 (5'→3')	扩增片 段 (nt)
MOF	29	AAAGTAGCTGITAYATCYTIACAATGTGG	464
1910 ~ 1939			
MOR	20	GTACAICCTGTRCCIACCCC	383
2373 ~ 2354			
HTNMF	26	GAATCGATACTGTGGGCTGCAAGTGC	418
1958 ~ 1984			
HTNMR	23	GGATTAGAACCCAGCTCGTCTC	383
2318 ~ 2340			
SEOMF	22	GTGGACTCTTCTCTCATTATT	418
1936 ~ 1957			
SEOMR	23	TGGGCAATCTGGGGGTTGCATG	418
2353 ~ 2331			

6. 电泳: 将扩增产物用 1% ~ 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。回收条带的分子质量与预期片段大小相同的产物 (即特异性扩增产物)。

7. 测序: 切胶纯化后进行 PCR 产物双向测序, 委托 (上海生工) 完成。

8. 序列分析及进化分析: 运用 ContigExpress 软件对所测序列进行校对与拼接, 并且最后结果均通过人工确认, 对拼接后的序列进行命名, 运用 BLAST 与 DNASTar (Lasergene) 程序与 GenBank 报道的汉坦病毒 HV 各型病毒 M 基因序列进行核苷酸比较, 应用 MegAlign 程序对所获序列进行基因组成特征的分析, 取 GenBank 中各型 HV 病毒代表株的 M 片段 (与本研究扩增片段相同位置片段) 进行同源性分析, 构建矩阵图和种系发生树。

结 果

1. 扩增结果: 临床诊断为 HFRS 患者血标本 60 份 (出血热特异性抗体阳性 40 例、阴性 20 例), 经 RT – Nest – PCR 检测汉坦病毒 M 片段基因, 分别应用 HTN 型和 SEO 型特异性分型引物扩增标本, 其中出血热特异性抗体阳性的标本中应用 HTN 型特异性引物可见 19 份明显的阳性扩增条带。抗体阴性的标本中应用 HTN 型特异性引物见 1 份明显的阳性扩增条带, 条带大小约 383bp, 与预期目的片段大小一致。应用 SEO 型特异性引物可见 1 份明显的阳性扩增条带, 条带大小约 418bp, 与预期目的片段大小一致。

此标本为出血热特异性抗体阴性的标本。

2. 部分 M 片段的基因序列与其他汉坦病毒的同基因片段进行比较:对 21 份 HTN 型和 SEO 型特异性分型引物扩增结果为阳性的标本进行基因序列的测定,经过序列的拼接与校正其大小与预期一致,将 HTN 型的序列编号为 (sx1、sx2、sx3、sx4、sx5 …… sx19、sx20),SEO 型的序列编号为 (sx21)。所测得序

列去掉引物序列信息与引物附近核苷酸序列信息后,进行同源性比对可见 20 株 HTN 型的序列同源性较高,部分毒株间核苷酸序列同源性低于 95%,与汉坦病毒国内外标准株核苷酸序列 M 基因 (1958 ~ 2340nt) 对比发现与 76 ~ 118 株同源性较高在 89.3% ~ 91.4% 之间,与其他标准株对比情况如图 1。SEO 型与 Z37 同源性较高为 97.4%。

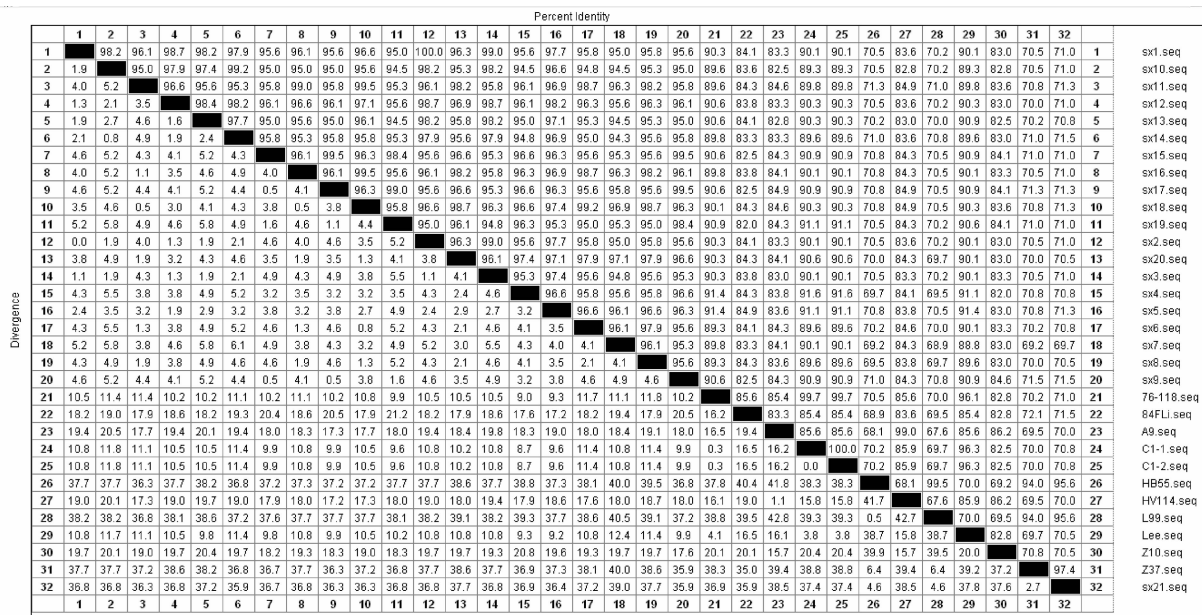


图 1 SX1 – SX21 及各地标准株的核苷酸同源性分析图

3. 推导的部分 M 片段氨基酸序列与其他汉坦病毒的比较分析:将 21 株 HTN 型和 SEO 型部分 M 片段基因推导的氨基酸序列与 GenBank 报告中其他标准株 M 片段相同位点氨基酸进行比较后发现,20 株

HTN 型的氨基酸较核苷酸的同源性高,均为 96.9% ~ 100.0%。与其他标准株同源性为 92.9% ~ 99.2%。1 株 SEO 型与其他 SEO 型标准株同源性均为 100% (图 2)。

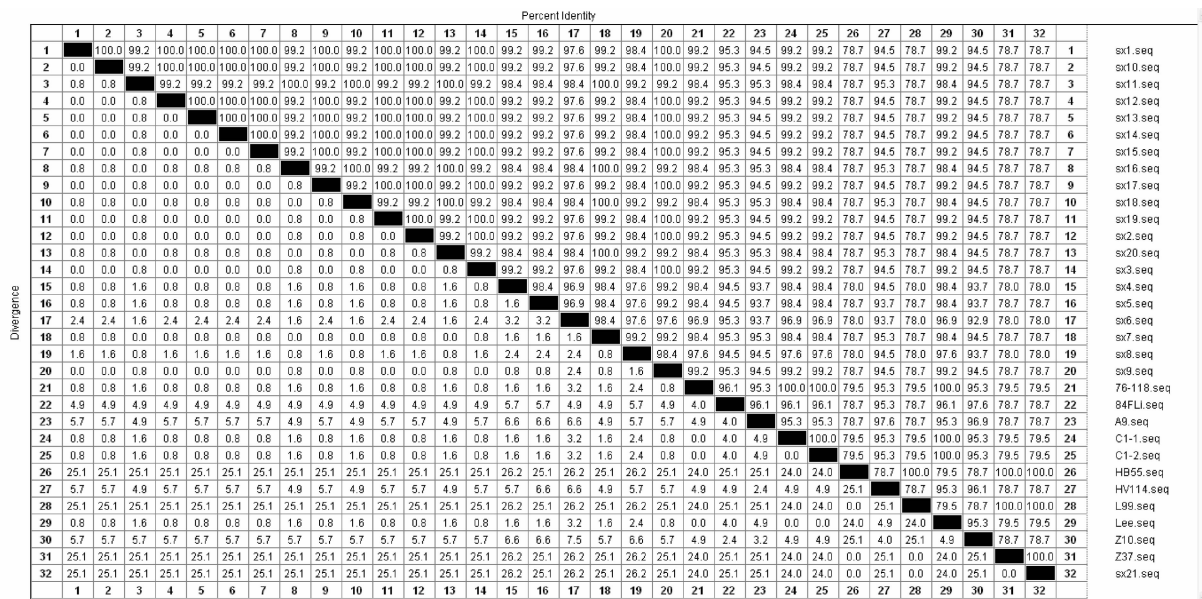


图 2 SX1 – SX21 及各地标准株的氨基酸同源性分析图

4. 种系发生树比较分析:将 21 株 HTN 型和 SEO 型部分 M 片段核苷酸序列及其推导氨基酸序列与 GenBank 注册的各种汉坦病毒株序列进行比对后,应用 DNASTar 软件中的 Clustal W 方法建立种系发生树,结果见图 3、图 4。从 M 基因片段核苷酸及其推导氨基酸序列的种系发生树上看,黑龙江省的汉滩病毒可能分为 3 个不同的分支,与国际标准株 76~118 亲缘性较为接近,汉城病毒与 Z37 亲缘性较为接近。

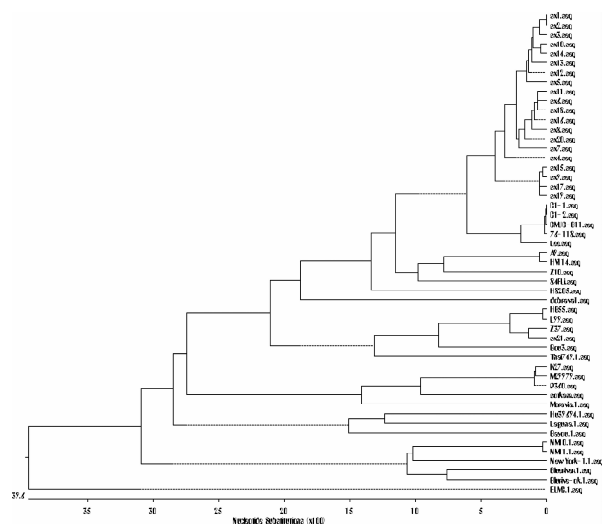


图 3 SX1-SX21 核苷酸序列与参考毒株 M 基因部分核苷酸序列的进化树分析

讨 论

我国肾综合征出血热的主要病原体为汉坦病毒 HTN 型和 SEO 型,黑龙江省以 HTN 型为主,根据序列同源性分析及种系发生树分析黑龙江省的 HTN 型与其他各地标准株均不属于同一分支,SEO 型与 Z37 较为接近,属于同一分支。由于两种病原体的致病性和病毒毒力的不同导致的流行特点和临床症状的不同,所以笔者可以根据黑龙江省的具体情况有针对性的进行防治。在与临床症状相关性的分析中发现 sx4、sx2、sx13、sx19、sx3、sx17 在种系发生树中较为接近,并在同一分支,核苷酸及推导的氨基酸同源性也较高,6 例患者在病情进展中白细胞均达到 $18 \times 10^9/L$ 以上;血小板下降较明显,均低于 $37 \times 10^9/L$;凝血酶原活动度在病情进展中下降较快,最低时均低于 25%;心肌、肝功能及肾功能损伤较明显;均有蛋白尿(+++);病情均较重,预后均较差。提示不同分支存在的基因序列的差异可能是影响病毒毒力与致病性的重要位点,目前疫区扩大、流行季节不固定、各种

非典型临床症状及实验室血清学检测的假阴性结果等极可能与之相关^[4,5]。笔者将继续分段扩增 M 基因全长,找出变异位点,分析其在临床中的意义,为减少临床误诊率、研制新型疫苗等工作奠定基础。

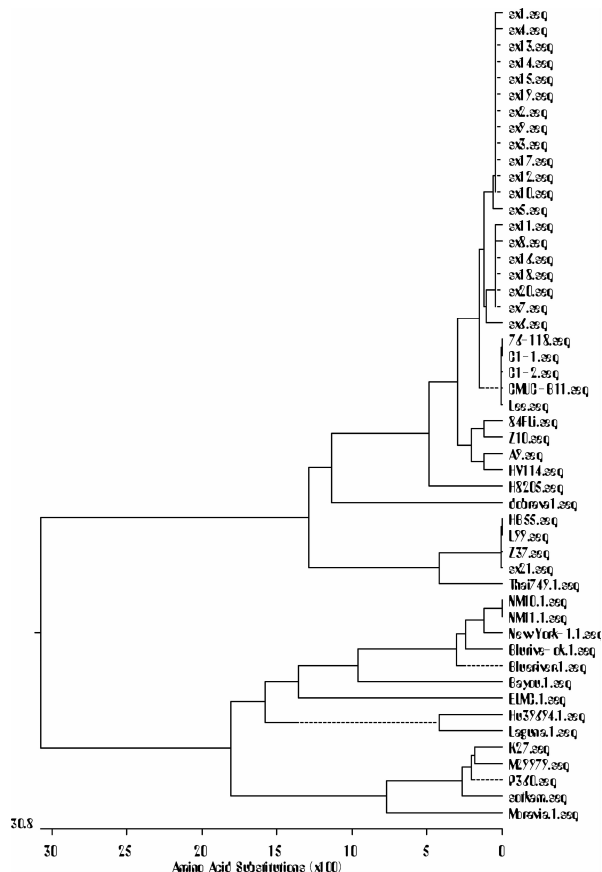


图 4 SX1-SX21 核苷酸序列推导出的氨基酸与参考毒株 M 基因部分氨基酸的进化树分析

参考文献

- 1 Khaiboullina SF, Morzunov SP, St Jeor SC. Hantavirus: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis[J]. Curr Mol Med, 2005, 5(8): 773-790
- 2 Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses. a global disease problem[J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3(2): 95-104
- 3 Kariwa H, Lokugamage K, Lokugamage N, et al. A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and Far East Russia[J]. Jpn J Vet Res, 2007, 54(4): 145-161
- 4 Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, et al. Hantavirus infections in Europe and their impact on public health[J]. Rev Med Virol, 2013, 23(1): 35-49
- 5 Krautkrämer E, Zeier M, Plyusnin A. Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure[J]. Kidney Int, 2013, 83(1): 23-37

(收稿日期:2013-11-28)

(修回日期:2014-01-03)