

I ~ IV 登革病毒基因同源性分析及 II 型 C 蛋白二级结构预测

姜黎明 杨佳佳 罗 佳 叶 超 文送娇 孙强明

摘 要 **目的** 对登革病毒(dengue virus, DENV) I ~ IV 基因同源性进行分析,同时对 DENV II C 蛋白的二级结构进行预测,为更深入了解 DENV 4 个血清型间差异及衣壳蛋白 C 构想。**方法** 通过 DNAMAN 分子生物学分析软件和蛋白结构在线预测网站分别对登革病毒基因同源性及 C 蛋白的二级结构进行预测。**结果** 在登革病毒基因组同源性中, DENV I 与 III 同源性最高为 72%,发现 DENV I 与 IV 同源性最低为 67%;在登革病毒基因中,前膜基因 prM 的同源性最高为 82.5%,非结构基因 NS2a 的同源性最低为 55.28%。在编码 capsid 的氨基酸中,占组成比例最多的为精氨酸,可能存在的蛋白结合位点较多。**结论** 通过基因组同源分析图谱看出 I ~ IV DENV 在结构基因(C、prM、E)之间和非结构基因 NS1、NS2b 和 NS3 中的同源性较高,同时蛋白二级结构预测发现 DENV II C 蛋白可能具有分子识别和蛋白骨架等功能。

关键词 登革病毒 同源性 Capsid

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.010

Identity Analysis of Dengue Virus Gene I - IV and Prediction of Secondary Structure of II Capsid Protein. Jiang Liming, Yang Jiajia, Luo Jia, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Yunnan 650118, China

Abstract **Objective** To analysis the identity of dengue virus I - IV gene homology and prediction of DENV II C protein secondary structure, for more understanding of the difference between four DENV serotype and capsid protein C. **Methods** The identity analysis of dengue virus gene homology was used DNAMAN molecular biology software and DENCV II C protein secondary structure prediction was used the protein structure prediction online website. **Results** In dengue virus genome homology analysis, DENV I with III with high homology was 72% nevertheless DENV I - IV with lowest homology was 67%. The gene of dengue virus, the high homology was prM, however the lowest homology was NS3a. In the amino acid of coding Capsid, the most percentage was arginine, and there may be more protein binding sites. **Conclusion** The analysis of genome homologous map find that DENV I - IV in structure gene (C, prM, E) and unstructured gene (NS1 NS2b and NS3) had higher identity, at the same time through the protein secondary structure prediction discover DENV II C protein may possess molecular recognition and protein skeleton, and other functions.

Key words Dengue virus; Identity; Capsid

登革热(dengue fever, DF)是由 I、II、III 和 IV 型登革病毒(dengue virus, DENV)引起的急性传染病,主要通过埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)传播,广泛流行于全球热带和亚热带地

区^[1-3]。近 10 年来,我国广东、福建、浙江和云南等省曾发生过因输入性病例引起的本地流行^[2-4]。2014 年,广东省暴发近 20 年来最严重的登革热疫情,致使 4 万余人受到感染;2015 年,云南西双版纳傣族自治州暴发登革疫情,导致 1000 余人感染登革热。东南亚国家全年都有病例,是全球范围内登革热流行最为严重的地区之一,且流行季节与雨季相一致。缅甸、越南和泰国等国家登革疫情严重,又与我国接壤,与我国西南地区人员往来频繁,对我国登革热的发病和流行产生了一定程度的影响。登革病毒属于黄热病毒科(Flaviviridae)黄热病毒属(Flavivirus),是一种小型黄病毒,有 4 种不同血清型,每一型均有传染性并能致病,其中 2 型毒力最强^[5]。4 种血

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81171946);国家“十二五”“重大新药创新”科技重大专项基金资助项目(2012ZX09104-302);云南省科技厅社会发展科技计划项目(2011CA016);云南自然科学基金资助项目(2012FB188,2016FA029);中国医学科学院医学生物学研究所研究生创新基金资助项目(2015-018-004)

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

通讯作者:孙强明,研究员、博士生导师,电子信箱:msun08@yahoo.com

清型都曾经在我国流行。1995 ~ 2007 年,DENV - 1 型是广东省登革热感染的主要流行株,从 2009 年开始,陆续出现 DENV - 2、DENV - 3 和 DENV - 4 血清型的流行^[6,7]。

4 种血清型登革病毒中每一型单独感染均能导致一系列程度不一的临床症状,从自限性的登革热(DF)至危及生命的登革出血热(DHF)或登革休克综合征(DSS)等重症形式。临床研究发现,二次异型感染或登革热患者胎儿随年龄增长均显著增加重症感染概率,抗体依赖增强(antibody dependent enhancement, ADE)假说的提出以解释登革病毒重症感染病理机制。该理论认为,在二次异型感染过程中,首次感染后残存的交叉抗体能够与病毒结合,同时抗体与靶细胞表面 Fc 受体结合促进病毒对含有 Fc 受体的单核细胞、巨噬细胞以及成熟 DC 细胞的感染^[8]。这使得体外模型研究重症登革热的病理机制成为可能。登革病毒抗体依赖增强感染假说的提出基于两项重要的临床观察结果,即登革感染母亲的新生儿更易产生重症登革热,以及登革热二次异型感染导致更高比例的 DHF 或 DSS 等重症形式^[8,9]。上述研究与临床发现相吻合,即在登革热初次感染中,较多患者仅出现轻微发热症状并且是自限性的,而 DHF/DSS 较常出现于 6 ~ 12 个月龄婴儿^[10]。

登革病毒是一种虫媒病毒,其基因组为单股正链 RNA 分子,具有感染性。登革病毒基因组约含 11000 个碱基,其编码基因顺序为:5' - C - prM - E - NS1 - NS2a - NS2b - NS3 - NS4a - NS4b - NS5 - 3'。本研究通过生物信息学方法,对 DENV I ~ IV 基因组及每个基因进行同源性分析,同时通过蛋白质在线预测网站对 DENV II C 衣壳蛋白(capsid)的二级结构进行预测,为在基因水平了解登革病毒型间差异及进一步推测抗体依赖增强感染机制打下基础;同时对 DENV II 衣壳蛋白可能具有分子识别和蛋白骨架等功能进行预测。

材料与方法

1. 登革病毒基因及基因组:选取 GenBank 中登录的登革病毒 I ~ IV 全基因组(登录号:KT279761. 1, KX702403. 1, KU216209. 1, JX024758. 1);DENV I ~ IV C 基因(KM519584. 1; JQ846016. 1; KM519589. 1; KM519592. 1);DENV I ~ IV prM 基因(Z74047. 1; X51713. 1; L11436. 1; AF459627. 1);DENV I ~ IV E 基因(KR919614. 1; KF381202. 1; EU182246. 1; AJ428560. 1);DENV I - IV NS1 基因(AY089979. 1; Z17213. 1; U93294. 2; KF385934. 1);DENV I ~ IV NS2a 基因(AF426128. 1; X57469. 1; ×; AH012032. 2);DENV I ~ IV NS2b 基因(AF426130. 1; M84727. 1; AF497738. 1; Y19175. 1);DENV I ~ IV NS3 基因(U60585. 1; U60587. 1; EF589668. 1; KP774959. 1);DENV I ~ IV NS5 基因(AF246787. 1; AF246790. 1; DQ867121. 1; KM085996. 1)为研究对象。

2. 4 种血清型间登革病毒同源性分析:通过基因同源性分析软件 DNAMAN 进行登革病毒全基因组和各个基因同源性分析,同时 I ~ IV 血清型间的 Identity 进行两两比对分析。

3. 登革病毒 II 型 capsid 蛋白二级结构预测:通过蛋白结构在线预测网站 predict protein server(<http://www.predictprotein.org/>)^[11,12]预测 DENV C 的二级结构,对氨基酸组成及编码序列中可能存在的蛋白结合区域、螺旋区域、线性区域、螺旋跨膜区域以及其他不规则区域进行分析,同时预测蛋白位点可能的暴露区域及隐藏区域。

结 果

1. 4 种血清型登革病毒基因组及基因同源性分析:DNAMAN 同源性分析结果显示,DENV I ~ IV 整体同源性为 73. 47%,其中 DENV I 与Ⅲ之间同源性最高为 72%,DENV I 与Ⅳ之间同源性最低为 67%。通过基因组同源分析图谱看出在结构基因(C、prM 和 E)和非结构基因(NS1, NS2b 和 NS3)中的同源性较高,而在非结构基因 NS2a 和 NS5 的同源性较低(表 1)。

表 1 DENV I ~ IV 基因及基因组同源性分析

基因	基因组	C	prM	E	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS5
大小(bp)	10803	171	200	78.06	1056	442	209	306	78
I ~ IV	73. 47	79. 82	82. 5	78. 06	80. 78	55. 28	78. 83	79. 82	65. 38
I : II	69	67. 06	68	65. 42	69. 13	28. 05	64. 11	68. 95	65. 38
I : III	72	78. 82	77	68. 96	73. 96		69. 86	71. 9	30. 77
I : IV	67	65. 88	69. 5	63. 51	68. 47	48. 64	63. 16	69. 28	35. 90
II : III	70	65. 88	69	63. 04	69. 03		65. 55	66. 67	37. 18
II : IV	68	65. 29	67	65. 15	67. 71	29. 64	64. 11	71. 57	38. 46
III : IV	69	66. 47	74. 5	62. 39	68. 18		62. 68	63. 73	62. 82

2. 登革病毒Ⅱ型C蛋白其编码基因位置在基因组5'→3'的96~438位,蛋白质大小为114个氨基酸,氨基酸序列为:MNNQRKKAKNTPFNMLKRERN-RVSTVQQLTKRFSGLMLQGRGPLKLFMALVAFLRFLT-IPPTAGILKRWGTIKKSKAINVLRGFRKEIGRMLNILN-RRRRSAGMIIMLIPTVMA。

3. DENV ⅡC 二级结构预测结构:predict protein server 预测结果显示,登革病毒Ⅱ型C蛋白的114个编码氨基酸组成中占主要比例的是精氨酸、亮氨酸和赖氨酸(图1)。可能的蛋白结合位点有19个,主要集中在N末端第18~21和93~102区段;可能产生螺旋结构的区域有6个,分别为N末端12~18、26~28、44~57、63~71、74~97和104~112区段;可能存在3个大的无序结构,分别为N末端1~37、66~77和93~114(图2)。

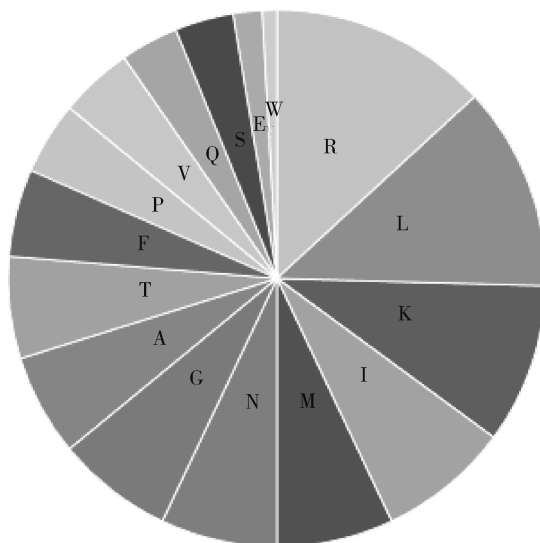


图1 登革病毒Ⅱ型C蛋白氨基酸组成分析

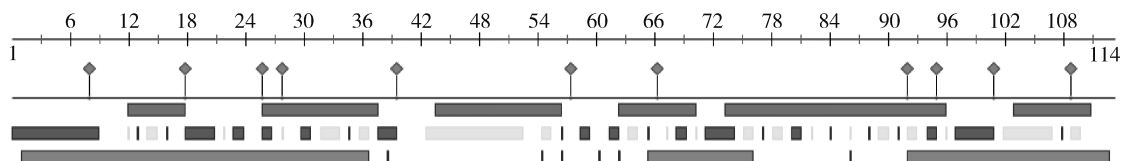


图2 登革病毒Ⅱ型C蛋白二级结构预测

讨 论

较多体外(细胞系)研究表明,亚中和浓度抗体能够促进登革病毒对含Fc受体细胞的阳性感染同时具有更高的病毒载量^[8]。同时动物模型研究也表明,静脉注射特定抗体能够促进病毒体内复制以及重症表现。这些研究揭示,亚中和浓度抗体能够诱发更高的病毒载量及重症登革热。上述实验结果揭示登革病毒型别之间不仅存在相似性,同时也存在明显的差异性,这与本研究在基因水平上的分析结果相一致,即4种型别的登革病毒在基因组水平具有较高的同源性,同时在具体不同基因上具有明显的差异性,如本研究发现在结构基因(C、prM和E)和非结构基因(NS1、NS2b和NS3)中的同源性较高,而在非结构基因NS2a和NS5的同源性较低。

登革病毒4种血清型之间存在广泛的血清学交叉反应,这种亚组反应性表位不仅存在于病毒的结构蛋白上,也存在于非结构蛋白上。尽管登革病毒的4种型属于同一抗原亚组,但通过本研究发现可能还存在抗原次亚组,发现登革病毒Ⅰ和Ⅲ型无论是基因组还是结构基因(C、prM、E)和非结构基因(NS1、NS2a、NS2b、NS3)其同源性与其他型别相比更高。

蛋白质结构在进化中要比蛋白质序列保守得多。登革病毒衣壳蛋白(capsid)是病毒核衣壳的基本构成成分,对病毒RNA的复制及蛋白翻译具有调节作用,除衣壳蛋白本身外,登革病毒capsid基因在病毒RNA复制和翻译过程中也发挥了重要作用,并且其核定位对于维持在哺乳动物中病毒RNA的正常复制具有重要作用,因此通过衣壳蛋白靶药物来控制病毒复制及扩增可能是一个临床上有效治疗手段。本研究通过predict protein server对登革病毒Ⅱ型C蛋白进行了二级结构预测,结构显示C蛋白可能包含的蛋白结合位点较多,存在的螺旋结构的区域也较多,可能在分子识别和蛋白骨架等方面具有功能,可对其进行深入研究。

综上所述,基于上述研究结果,笔者将在下一步工作中通过合成登革病毒capsid基因部分核酸序列,通过构建表达载体,研究登革病毒C蛋白在其RNA复制及蛋白翻译中的功能,为更全面了解登革病毒及临床治疗提供理论基础。

参考文献

- 1 Bhat TS, Gething PW, Brady OJ, *et al.* The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 504-507

(下转第67页)

疫调节作用,致其数量及黏附活性消耗性下降^[13]。除慢性乙型肝炎外,国外也有研究报道 ECR1 在与类风湿疾病的炎性活动密切相关,炎症活动期外周血红细胞及白细胞上所有 CR1 表达明显下降。

本研究显示 12 周红细胞为影响阿德福韦抗病毒治疗 52 周的疗效的独立预测因素,红细胞高者应答不佳,结合既往研究笔者推测,红细胞可能通过补体、ECR1 途径参与了免疫调节、发挥了免疫复合物清除作用,应答佳组与应答不佳组比较,红细胞总数较低,但两组间 ECR1 分子活性水平及免疫调节活性是否存在差异,目前尚无研究资料,且本研究病例较少,属回顾性研究,临床资料受限,无基础实验证实,需要将来补充相应实验以了解具体机制。

目前国内外最新慢乙肝抗病毒治疗指南均推荐一线抗病毒药物首选强效低耐药药物——恩替卡韦或替诺福韦酯。国内由于实际用药落后于指南推荐用药,所以一些经济欠发达地区仍然广泛使用阿德福韦酯等非一线抗病毒药物。阿德福韦虽然起效慢且使用过程中需监测患者肾功能,但其抗病毒治疗效果确切,耐药率相对较低。本研究对阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎病毒应答特点进行了分析,提示 12 周 HBV DNA 下降的 $\log_{10}$ 值、12 周红细胞为影响其 52 周治疗效果的独立预测因素,对临床应用此类药物有指导意义。如果用药 12 周 HBV DNA 载量仍然较高的患者需要尽快更改治疗方案。这或许对于制定慢性乙型肝炎感染者个体化治疗方案,尤其是对于耐药患者具有一定的借鉴作用。

参考文献

- 1 丁广军,刘源. 对阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎患者血清 HBV - DNA 载量变化及不良反应的研究[J]. 中国社区医师,2016,32(35):54 - 55

(上接第 40 页)

- 2 邓掌,张海林. 全球登革热和登革出血热流行状况及防治研究进展[J]. 中国热带医学,2009,9(12):2318 - 2321
- 3 卫生部疾病预防控制局. 登革热防治手册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2008:13 - 23
- 4 杜建伟,潘先海. 中国登革热流行概况与流行特征[J]. 中国流行病学杂志,2010,31(12):1429 - 1433
- 5 World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control[M]. Geneva: World Health Organization,2010
- 6 蒋力云,曹毅敏,许阳. 等. 广州市 2011 年登革病毒流行状况及 E 基因进化特征分析[J]. 中华流行病学杂志,2012,33(12):1273 - 1275
- 7 郭汝宁,彭志强,宋铁. 广东省 1990 - 2012 年登革热和基孔肯雅热感染状况及流行风险分析[J]. 中华流行病学杂志,2014,35(2):167 - 169

- 2 Gu J, Sun R, Shen S, *et al.* The curative effect of adefovir dipivoxil treating HBeAg negative chronic hepatitis B and treating HBeAg positive chronic hepatitis B combining interferon α - 2b[J]. Pak J Pharm Sci, 2015,28(Suppl 4):1493 - 1497
- 3 陈小春,黄昌婧. 拉米夫定联合阿德福韦对乙型肝炎患者免疫应答与浆细胞样树突状细胞功能变化的研究[J]. 中国生化药物杂志,2016,2(36):125 - 127
- 4 Luo Q, Deng Y, Cheng F, *et al.* Relationship between nephrotoxicity and long - term adefovir dipivoxil therapy for chronic hepatitis B: A meta - analysis[J]. Medicine: Baltimore,2016,95(50):e5578
- 5 苏航,陈雅,傅晓钟,等. 阿德福韦单三. 氨基酸酯及单胆酸酯衍生物的合成、抗病毒活性及原代肝细胞摄取研究[J]. 2016,47(3):264 - 268
- 6 苏敏,商振球,梁凌峰,等. 阿德福韦对比恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2015,2(186):256 - 258
- 7 Li M, Xi H, Wang Q, *et al.* Kinetics of serum HBsAg in Chinese patients with chronic HBV infection with long - term adefovir dipivoxil treatment[J]. Chin Med J, Engl, 2014,127(11):2101 - 2104
- 8 王欣,石铭,王楠,等. 阿德福韦治疗拉米夫定耐药慢性乙肝患者的疗效[J]. 标记免疫分析与临床,2015,22(11):1107 - 1109
- 9 屠艳君,阿德福韦磷酸酯衍生物肾毒性及抗 HBV 活性分析[J]. 国际病毒学杂志,2015,22(S1):158 - 159
- 10 Fan XH, Geng JZ, Wang LF, *et al.* De novo combination therapy with lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B patients[J]. World J Gastroenterol, 2011,17(43):4804 - 4809
- 11 Tokuno M, Taguchi K, Yamasaki K, *et al.* Long - term stored hemoglobin - vesicles, a cellular type of hemoglobin - based oxygen carrier, has resuscitative effects comparable to that for fresh red blood cells in a rat model with massive hemorrhage without post - transfusion lung injury[J]. PLoS One, 2016,11(10):e0165557
- 12 Müller K, Fedosov DA, Gompper G. Understanding particle margination in blood flow - A step toward optimized drug delivery systems[J]. Med Eng Phys, 2016,38(1):2 - 10
- 13 徐建明,李兵,游红勇,等. 恩替卡韦联合替诺福韦与恩替卡韦联合阿德福韦治疗 拉米夫定耐药性慢性乙型肝炎患者疗效比较[J]. 检验医学与临床,2016,13(13):1788 - 1791

(收稿日期:2017 - 03 - 01)

(修回日期:2017 - 03 - 07)

- 8 Halstead S. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever VI Hypotheses and discussion [J]. Yale J Biol and medicine, 1970, 42(5):350
- 9 Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants [J]. Am J Trop Med Hygiene, 1988, 38(2):411 - 419
- 10 黄新伟. 登革病毒抗体依赖增强感染体外模型的建立[D]. 北京:北京协和医学院,2015:1 - 2
- 11 Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L. Predict protein an open resource for online prediction of protein structural and functional features[J]. Nucleic Acids Res,2014,12(Web Server issue):337 - 343
- 12 Hamp T, Kassner R, Seemayer S, Homology based inference sets the bar high for protein function prediction [J]. BMC Bioinformatics, 2013,14(3):7 - 16

(收稿日期:2016 - 10 - 07)

(修回日期:2016 - 10 - 31)