

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00618

2009年新型甲型H1N1流感病毒神经氨酸酶基因进化分析

苏彤,李淑华,常文军,刘世建,鹿文英,韩一芳,曹广文*

第二军医大学基础部流行病学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**探讨2009年新型甲型H1N1流感病毒神经氨酸酶(NA)基因的进化及NA基因编码蛋白抗原性、酶活性位点、糖基化位点变异情况。**方法:**从NCBI基因库检索获得43株不同年代不同地域甲型流感病毒NA基因序列,用Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0(MEGA 4.0)软件进行基因进化分析和氨基酸序列分析。**结果:**2009年新型甲型H1N1流感病毒与禽H5N1流感病毒NA基因的同源性达到85%,潜在抗原位点氨基酸分布相同;所有毒株的酶活性中心位点高度保守,但糖基化位点有变异。**结论:**2009年新型甲型H1N1流感病毒的NA基因可能来源于禽H5N1流感病毒;神经氨酸酶抑制剂治疗有效。

[关键词] H1N1甲型流感病毒;神经氨酸酶;进化;变异

[中图分类号] R 373.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0618-04

Genetic characterization of neuraminidase gene of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic

SU Tong, LI Shu-hua, CHANG Wen-jun, LIU Shi-jian, LU Wen-ying, HAN Yi-fang, CAO Guang-wen*

Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the genetic characterization (evolution, antigenicity, enzymatically active site, and glycosylation site) of the neuraminidase (NA) gene of the novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic. **Methods:** Genetic evolution and amino acid substitutions of the 43 NA gene sequences of influenza virus A of different years were retrieved from GenBank and were analyzed by using MEGA 4.0 software. **Results:** The new A/H1N1 influenza virus strains and avian H5N1 influenza virus strains had similar antigen sites of the NA genes, sharing a homology of 85%. Amino acid residues at the enzymatically active site of the NA genes were strictly conserved in all influenza virus strains, but the glycosylation sites varied. **Conclusion:** The NA genes of novel H1N1 influenza viruses may originate from avian H5N1 influenza virus endemic in Asia. The new H1N1 influenza viruses may respond well to the neuraminidase inhibitor treatment.

[KEY WORDS] H1N1 subtype influenza A virus; neuraminidase; evolution; variation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):618-621]

甲型流感病毒抗原变异率高,容易造成大范围流行。1918年由甲型H1N1流感病毒引起的“西班牙流感”是最为严重的一次流感大流行,导致2 000多万人死亡,且多数为15~45岁的青壮年^[1]。此后,世界范围内陆续发生H2N2型、H3N2型及H5N1型流感大流行。2009年,从墨西哥开始爆发的甲型H1N1流感迅速在北美地区蔓延,并波及欧洲、亚洲,极有可能形成全球大流行。甲型流感病毒能不断引起流感流行是因为其抗原性不断发生变异,主要是其表面血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)

的变异。NA蛋白是流感病毒包膜上重要的糖蛋白,能促使病毒释放扩散,同时也是抗流感药物的重要作用靶点。本研究分析了甲型N1亚型流感病毒NA基因的进化、NA蛋白抗原性及酶活性位点的变化情况,深入了解NA基因的变异特点,为甲型流感的控制和治疗提供依据。

1 资料和方法

1.1 资料来源 从NCBI基因库检索获得近年来世界各地甲型流感病毒N1亚型(主要是H1N1和

[收稿日期] 2009-05-21 **[接受日期]** 2009-05-25

[基金项目] 军队“十一五”科技攻关计划(06G65),上海市自然科学基金(07ZR14141),上海市公共卫生“三年行动计划”重点学科项目(08GWZX0201,08GWZX0101)。Supported by Key Research Project of Military “11th 5-year Plan” of China(06G65), Natural Science Foundation of Shanghai (07ZR14141), and the “Three-year G & D Program” on Shanghai Public Health Affairs (08GWZX0201,08GWZX0101)。

[作者简介] 苏彤,助教。E-mail:sutong-2006@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-81871060, E-mail:gcao@smmu.edu.cn

H5N1) 的 NA 基因序列共 1 438 条, 选择其中 43 条作为代表进行分析, 包括: 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 3 株 (FJ966973. 1, GQ132156. 1, GQ132155. 1), 人 H1N1 流感病毒 15 株 (CY038809. 1, CY025231. 1, CY019343. 1, AJ518098. 1, CY033616. 1, CY033600. 1, CY036825. 1, CY020567. 1, CY020487. 1, CY020439. 1, CY021031. 1, CY021719. 1, CY021823. 1, CY021711. 1, CY020471. 1), 禽 H5N1 流感病毒 14 株 (CY029998. 1, CY029633. 1, DQ676832. 1, DQ650661. 1, DQ323673. 1, DQ366332. 1, CY029484. 1, DQ094280. 1, DQ023147. 1, AB188818. 1, AY676043. 1, DQ211926. 1, CY029344. 1, AF509109. 2), 禽 H1N1 流感病毒 2 株 (EU743177. 1, EU735796. 1), 猪 H1N1 流感病毒 9 株 (EU604690. 1, EU502888. 1, CY028782. 1, CY022972. 1, CY028790. 1, CY022471. 1, CY022479. 1, AB434394. 1, CY022980. 1)。

1.2 资料分析 采用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4. 0 (MEGA 4. 0) 软件对检索的 NA 基因核苷酸序列进行比对, 并确定氨基酸编码序列。绘制基因种系发生树, 进化树构建采用 NJ 法 (Bootstrap=1 000)。对 NA 蛋白可能的抗原位点、酶活性中心及周围相关位点和糖基化位点的变异情况进行分析。以 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒毒株 FJ966973. 1 | A/California/2009 (H1N1) 为比对基准。

2 结果

2.1 甲型流感病毒 N1 亚型 NA 基因进化分析 根据 1935~2009 年各地 43 株 N1 亚型流感病毒的 NA 基因序列构建进化树 (图 1); NA 基因核苷酸序列的进化树分为 3 个主干, 分别是人 H1N1、猪和禽 H1N1、禽 H5N1。进化的大体方向是分别沿主干斜长型向上发展。毒株间存在年代差异, 年代相隔越长, 序列差异越大。以人 H1N1 为例, 2008 年毒株 (CY038809. 1) 与 2006 年毒株 (CY025231. 1) 的核苷酸差异为 2. 9%, 而与 1945 年毒株 (CY021711. 1) 的差异为 14%。值得注意的是, 2009 年新型甲型 H1N1 流感爆发代表毒株 NA 基因在进化上不属于人 H1N1 主干, 而是属于禽 H5N1 主干。在所有毒株中, 2009 年新型甲型 H1N1 毒株 NA 基因与 2001 年禽 H5N1 毒株 (AF509109. 2) 的同源性达到 85%, 而与 2008 年人 H1N1 毒株 (CY038809. 1) 的同源性仅为 73%。

2.2 甲型流感病毒 N1 亚型 NA 基因编码蛋白氨基酸序列分析 NA 基因全长包括 1 413 个核苷酸, 编码 469 个氨基酸。在对 43 株病毒序列进行对比的基础上发现 1951~2008 年人 H1N1 流感病毒在第

434 位有氨基酸 (N/R/G/K) 插入, 大多数 2002~2007 年禽 H5N1 毒株在第 49~68 位缺失 20 个氨基酸。其他位点无氨基酸缺失或插入。

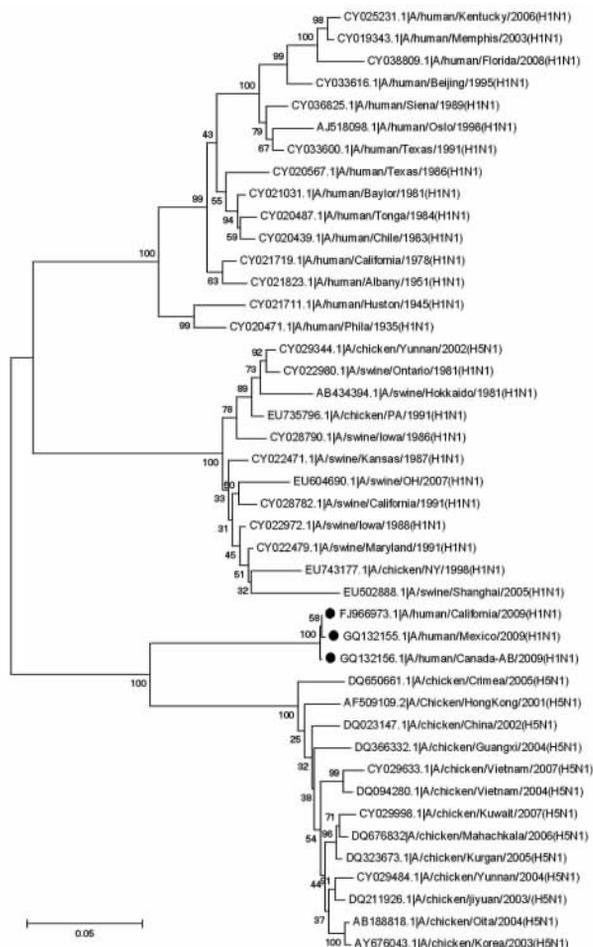


图 1 43 例甲型流感病毒 N1 亚型 NA 基因进化树
Fig 1 Phylogenetic tree of the NA genes of 43 influenza A virus (N1) strains

●: NA genes of the novel A/H1N1 of the 2009 outbreak

2.2.1 NA 蛋白分子抗原决定簇位点氨基酸序列分析 NA 蛋白 N 端第 140~157 位氨基酸很有可能是抗原决定簇位点所在^[2-4]。分析 43 株 N1 亚型流感病毒的氨基酸序列分析发现, L140、N141、D142、H144、S145、N146、G147、T148、D151、R152、S153、P154、R156 等 13 个位点未发生改变, 第 143、149、150、155、157 位等 5 个位点发生不同程度的氨基酸替换 (表 1)。2009 年新型甲型 H1N1 毒株与 1935~2008 年人 H1N1 毒株相比, 潜在抗原位点变异较大, 其第 149 位发生 V/I 替换、第 155 位发生 H/Y 替换、第 157 位发生 A/T 替换, 这些变化与禽 H5N1 毒株相同。

2.2.2 NA 蛋白分子酶活性中心及周围相关位点的氨基酸序列分析 NA 蛋白的酶活性中心包括催化部位的 118、151、152、224、276、292、371 和 406 位

等8个位点,另外酶活性中心周围的辅助位点有11个,分别是第119、156、178、179、198、222、227、274、

277、294、425位^[5-7]。序列分析结果(表2)表明,上述这些位点均没有出现氨基酸的替换。

表1 NA蛋白潜在抗原位点氨基酸序列变化

Tab 1 Amino acid substitutions at potential antigenic sites of the neuraminidase

Influenza A virus	Amino acid position				
	143	149	150	155	157
Novel strains 2009 (H1N1)	K	I	K	Y	T
Human strains 1935-2008 (H1N1)	K	V	K	H	A
Chicken strains 2001-2007 (H5N1)	K	V/A	K	H/Y	T
Chicken strains 1991/1998 (H1N1)	R	V	K/R	Y	T
Swine strains 1981-2007 (H1N1)	R	V	K	Y	T

K: Lysine; I: Isoleucine; Y: Tyrosine; T: Threonine; V: Valine; H: Histidine; A: Alanine; R: Arginine

表2 NA蛋白酶活性中心及周围相关位点氨基酸分布

Tab 2 Amino acids as catalytic residues or framework residues of the neuraminidase

Influenza A virus	Amino acid position																		
	118	151	152	224	276	292	371	406	119	156	178	179	198	222	227	274	277	294	425
Novel strains 2009 (H1N1)	R	D	R	R	E	R	R	Y	E	R	W	S	D	I	E	H	E	N	E
Human strains 1935-2008 (H1N1)	R	D	R	R	E	R	R	Y	E	R	W	S	D	I	E	H	E	N	E
Chicken strains 2001-2007 (H5N1)	R	D	R	R	E	R	R	Y	E	R	W	S	D	I	E	H	E	N	E
Chicken strains 1991/1998 (H1N1)	R	D	R	R	E	R	R	Y	E	R	W	S	D	I	E	H	E	N	E
Swine strains 1981-2007 (H1N1)	R	D	R	R	E	R	R	Y	E	R	W	S	D	I	E	H	E	N	E

R: Arginine; D: Aspartic acid; E: Glutamic acid; Y: Tyrosine; W: Tryptophan; S: Serine; I: Isoleucine; H: Histidine; N: Asparagine

2.2.3 NA蛋白分子糖基化位点的氨基酸序列分析 NA基因上有8个潜在的糖基化位点,分别位于第50、58、63、68、88、146、235和386位。通过比对发现,所有43例毒株的第88位NSS、第146位NGT和第235位NGS未发生缺失或氨基酸替换,其他5个位点在不同年代有不同程度的糖基化位点缺失或氨基酸替换(表3)。1981~2008年人H1N1

毒株的第50、68、386位糖基化位点缺失。2002~2007年禽H5N1毒株的第50、58、63、68位糖基化位点缺失,并且这4个糖基化位点缺失常伴有第386位点糖基化缺失。猪H1N1流感病毒在第50、68、386位有不同程度糖基化位点缺失。2009年新型甲型H1N1毒株和2001年禽H5N1毒株在这8个位点均存在糖基化现象。

表3 NA蛋白糖基化位点氨基酸序列的变化

Tab 3 Glycosylation site variations of the neuraminidase

Influenza A virus	Amino acid position				
	50	58	63	68	386
Novel strains 2009 (H1N1)	N-Q-S	N-N-T	N-Q-T	N-I-S	N-F-S
Human strains 1981-2008 (H1N1)	Deletion	N-S-T	N-H/Q-T	Deletion	Deletion
Human strains 1978/1951 (H1N1)	Deletion	N-S/N-T	N-Q-T	N-I-S	Deletion
Human strains 1945/1935 (H1N1)	N-Q-S	N-S-T	N-Q-T	N-I-S	Deletion
Chicken strains 2002-2007 (H5N1)	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion	Deletion*
Chicken strains 2001 (H5N1)	N-Q-S	N-N-T	N-Q-T	N-I-S	N-F-S
Chicken strains 1991/1998 (H1N1)	N-Q-S	N-N/K-Y	N-Q-T	Deletion	Deletion
Swine strains 1981-2007 (H1N1)	Deletion [#]	N-N/S-Y	N-Q-T	Deletion	Deletion [§]

* The chicken strain 2005(DQ650661.1) has a glycosylation site at amino acid 386; [#] The swine strains 1986/1981(CY028790.1/AB434394.1/CY022980.1) have a glycosylation site at amino acid 50; [§] The swine strain 2005(EU502888.1) has a glycosylation site at amino acid 386. N: Asparagine; Q: Glutamine; S: Serine; T: Threonine; I: Isoleucine; F: Phenylalanine; K: Lysine; Y: Tyrosine

3 讨论

甲型流感病毒基因组由8个单独的单链RNA片段组成,片段6编码NA。甲型流感病毒抗原性

变异的主要方式是抗原转移和抗原漂移。抗原转移是以前流行于人和动物的流感病毒基因片段重组的结果;抗原漂移是基因连续点突变的积累造成的^[8-9]。本研究发现,2009年新型甲型H1N1流感

病毒与以前人 H1N1 流感病毒在 NA 基因进化树上相隔甚远,同源性较低(73%),而与禽 H5N1 流感病毒距离较近,同源性较高(85%)。在 NA 蛋白潜在的抗原位点第 155、157 位上,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与人 H1N1 流感病毒区别较大,而与禽 H5N1 流感病毒一致。这些发现提示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒的 NA 基因可能来自禽 H5N1 流感病毒,其 NA 蛋白的抗原性与以前人 H1N1 流感病毒有所不同。

NA 蛋白的作用是水解细胞膜上各种多糖受体末端的 N-乙酰神经氨酸,清除病毒表面和感染细胞表面糖蛋白末端的唾液酸,防止子代病毒的自身凝集,促使病毒释放。NA 蛋白的酶活性中心位于 NA 的头部,包括催化部位的第 118(R)、151(D)、152(R)、224(R)、276(E)、292(R)、371(R)和 406(Y)等 8 个位点,它们都是直接与底物相互作用的位点,除此之外还有第 119(E)、156(R)、178(W)、179(S)、198(D)、222(I)、227(E)、274(H)、277(E)、294(N)、425(E)位等 11 个辅助位点^[5-7]。从这些位点的功能来看,它们都直接或间接参与了酶的催化作用,一旦有氨基酸的替换,就可能影响酶活性,导致病毒扩散能力的下降,或者造成对神经氨酸酶抑制剂的耐药抵抗^[10]。本次研究纳入的所有毒株 NA 蛋白酶活性中心及周围辅助区的氨基酸组成都没有发生任何变化。由于 NA 在流感病毒复制和传播中发挥重要作用,并且酶活性中心的氨基酸组成高度保守,因此以 NA 为靶点开发选择性抑制剂具有非常重要的意义。目前针对甲型 H1N1 流感有效的磷酸奥司他韦(oseltamivir phosphate,达菲)正是 NA 抑制剂。它能够与病毒的 NA 特异性结合,阻断该酶的活性,使病毒不能轻易地从感染细胞表面释放,促进病毒凝集,阻止病毒进一步扩散,从而发挥抗流感作用^[11]。

糖基化位点对于维持 NA 蛋白分子的结构和正常生物功能具有重要意义。2002~2007 年禽 H5N1 毒株由于在 49~68 位缺 20 个氨基酸,因而缺失第 50、58、63、68 位糖基化位点,这种缺失有利于禽流感病毒在家禽中传播^[12]。2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒具有全部 8 个糖基化位点,与之相同的只有 2001 年禽 H5N1 毒株,其他毒株(包括人 H1N1、禽 H1N1、猪 H1N1)均存在不同程度的糖基化位点缺失,这也提示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒的 NA 基因有可能来自禽 H5N1 流感病毒。禽 H5N1 流感病毒感染人类会造成非常高的病死率,但目前其对人类感染能力却很有限;而新型甲型 H1N1 流感病毒对人类却有广泛的感染力,目前已在墨西哥、

美国和日本等国家造成社区传播。既然 NA 基因是决定病毒侵袭性的主要功能基因之一,而且新型病毒 NA 基因与 H5N1 亲缘关系很近,那么是否在新型病毒 NA 基因上存在一种能够增强病毒侵袭力的突变目前尚不清楚。

综上所述,2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒的 NA 基因在基因进化、NA 蛋白潜在抗原位点和糖基化位点上与禽 H5N1 流感病毒有相似之处,2009 年新型甲型 H1N1 病毒 NA 基因可能来源于禽 H5N1 病毒。另外,流感病毒 NA 蛋白的酶活性位点和周围相关位点高度保守,为抗流感药物的研发提供了重要的研究靶点。

[参考文献]

- [1] Taubenberger J K, Reid A H, Fanning T G. The 1918 influenza virus: A killer comes into view[J]. *Virology*, 2000, 274: 241-245.
- [2] Russell R J, Haire L F, Stevens D J, Collins P J, Lin Y P, Blackburn G M, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design[J]. *Nature*, 2006, 443: 45-49.
- [3] 黄平, 俞守义, 柯昌文. 逐步预测和统计学筛选人 H5N1 毒株神经氨酸酶蛋白 B 细胞表位[J]. *科学通报*, 2008, 53: 2748-2753.
- [4] Parida R, Shaila M S, Mukherjee S, Chandra N R, Nayak R. Computational analysis of proteome of H5N1 avian influenza virus to define T cell epitopes with vaccine potential[J]. *Vaccine*, 2007, 25: 7530-7539.
- [5] Colman P M, Hoyne P A, Lawrence M C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase[J]. *J Virol*, 1993, 67: 2972-2980.
- [6] Colman P M, Varghese J N, Laver W G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase[J]. *Nature*, 1983, 303: 41-44.
- [7] Yen H L, Ilyushina N A, Salomon R, Hoffmann E, Webster R G, Govorkova E A. Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Virol*, 2007, 81: 12418-12426.
- [8] Schreier E, Roeske H, Driesel G, Künkel U, Petzold D R, Berlinghoff R, et al. Complete nucleotide sequence of the neuraminidase gene of the human influenza virus A/Chile/1/83 (H1N1). Brief report[J]. *Arch Virol*, 1988, 99(3-4): 271-276.
- [9] Martínez C, del Rio L, Portela A, Domingo E, Ortín J. Evolution of the influenza virus neuraminidase gene during drift of the N2 subtype[J]. *Virology*, 1983, 130: 539-545.
- [10] Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance[J]. *J Clin Virol*, 2008, 41: 13-19.
- [11] Gubareva L V, Kaiser L, Hayden F G. Influenza virus neuraminidase inhibitors[J]. *Lancet*, 2000, 355: 827-835.
- [12] Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying P C, Sangsiriwut K, Pooruk P, Boonak K, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 2): 423-433.