

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00613

## 2009年新型甲型H1N1流感病毒血凝素基因进化分析

谢佳新<sup>△</sup>, 殷建华<sup>△</sup>, 李淑华, 鹿文英, 韩一芳, 韩磊, 张宏伟, 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(A)型H1N1流感病毒血凝素(HA)基因与世界各地不同年代分离的A/H1N1代表株HA基因的进化关系。**方法:**从NCBI数据库下载2009年新型A/H1N1亚型流感病毒的HA基因序列以及以往流行的人、猪和禽的A/H1N1亚型流感病毒参考序列,采用Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0(MEGA4.0)软件进行序列比对和构建系统进化树,并分别比较2009年新型甲型H1N1流感病毒HA基因与北美地区、欧洲地区、亚洲地区A/H1N1流感病毒HA基因编码蛋白的氨基酸序列。**结果:**不同时期人A/H1N1亚型流感病毒代表株HA基因进化分析显示:2009年新型A/H1N1流感病毒HA基因与1976~2007年北美地区分离的7株人A/H1N1亚型流感病毒具有较高的同源性,与欧洲和亚洲地区的同源性较低。不同种属间A/H1N1亚型流感病毒HA基因进化分析显示:2009年新型A/H1N1流感病毒HA基因与1998和2007年北美地区分离的A/H1N1猪流感病毒的HA基因进化关系较近,与欧洲及亚洲地区分离的A/H1N1猪流感病毒及A/H1N1禽流感病毒进化关系较远。氨基酸比对结果显示2009年新型A/H1N1流感病毒HA基因的重要抗原位点与北美地区分离的A/H1N1猪流感病毒相近,与欧洲和亚洲地区分离的A/H1N1猪流感病毒及人类流感病毒疫苗株相比变化较大。**结论:**2009年新型甲型H1N1流感病毒HA基因可能是北美地区甲型H1N1猪流感病毒长期进化并与该地区人A/H1N1流感病毒部分基因片段重排的结果,对人H1N1甲型流感病毒疫苗可能并不敏感。

**[关键词]** H1N1甲型流感病毒;血凝素基因;进化;基因重排

**[中图分类号]** R 371.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0613-05

### Evolution analysis of hemagglutinin gene of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic

XIE Jia-xin<sup>△</sup>, YIN Jian-hua<sup>△</sup>, LI Shu-hua, LU Wen-ying, HAN Yi-fang, HAN Lei, ZHANG Hong-wei, CAO Guang-wen\*

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

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the evolutionary relationship of the hemagglutinin(HA) gene of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 pandemic with the HA genes of A/H1N1 viruses isolated in different parts of the world previously. **Methods:** The sequences of the HA gene of the novel A/H1N1 strain and the reference sequences of human, swine, and avian influenza A viruses were retrieved from NCBI. MEGA 4.0 software was employed to align, blunt nucleotide sequences, and construct phylogenetic tree. The deduced amino acid sequences of the HA genes of novel influenza virus A/H1N1 were compared with those of the A/H1N1 isolates in North America, Europe, and Asia. **Results:** Phylogenetic tree of the HA genes of A/H1N1 strains worldwide showed that the HA genes of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 shared a high homology with those of the 7 human A/H1N1 influenza viruses isolated in North America during 1976 to 2007, and shared a low homology with those of the human influenza viruses A/H1N1 isolated in Europe and Asia. Phylogenetic tree of the HA gene between different species showed that the HA genes of novel influenza virus A/H1N1 in 2009 had a close evolutionary relationship with those of the two swine A/H1N1 strains isolated in 1998 and 2007 in North America, but a distant evolutionary relationship with those of swine and avian A/H1N1 isolated in Europe and Asia. Alignment of amino acid at important antigenic sites showed that the HA gene of the novel A/H1N1 strains shared important antigen sites with the swine A/H1N1 influenza viruses isolated in North America, and did not share with the swine A/H1N1 influenza viruses isolated in Europe and Asia or the human A/H1N1 influenza vaccine strains. **Conclusion:** The HA genes of the novel influenza virus A/H1N1 might originate from swine A/H1N1

**[收稿日期]** 2009-05-22 **[接受日期]** 2009-06-04

**[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 “11<sup>th</sup> 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]** 谢佳新, 博士生。E-mail: xiejiaxin2006@yahoo.com.cn; 殷建华, 硕士, 讲师。E-mail: hawkyjh163@163.com

<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors)。

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

influenza viruses in North America after a long time evolution and the reassortment with fragments of human A/H1N1 in the area, and the current A/human/H1N1 influenza vaccine may not be effective for the novel A/H1N1 virus.

[KEY WORDS] H1N1 subtype influenza A virus; hemagglutinin gene; evolution; gene rearrangement

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 613-617]

甲(A)型流感病毒(influenza virus A)属正黏病毒科,其基因组含有8个RNA片段。流感病毒的血凝素(HA)由RNA第4区段编码,全长1 742~1 778 nt,是甲型流感病毒主要抗原基因之一。HA抗原具有免疫原性,能使人体产生保护性抗体<sup>[1]</sup>;但其容易变异,是流感流行的主要原因之一。导致甲型流感病毒抗原高度易变的主要原因是高发的点突变率和基因重排(reassortment)<sup>[2]</sup>。随着流感病毒的抗原演变,其在流行病学上出现了一些新的特征流行株,致使人类对其的免疫保护相对滞后。20世纪以来,至少已在人群中发生了3次由甲型流感病毒引起的世界范围流感大流行<sup>[3]</sup>。

2009年3月以来,一种新型H1N1甲型流感从墨西哥开始流行。截至2009年5月19日,世界卫生组织(WHO)官方网站已经公布全球有40个国家和地区共9 830例患者感染H1N1流感(主要包括墨西哥3 648例、美国5 123例、加拿大496例),其中包括79例死亡(墨西哥72例、美国5例、加拿大1例、哥斯达黎加1例)<sup>[4]</sup>。WHO在2009年4月30日已经将本次全球流感大流行预警级别从4级提升至5级,并且仍有继续提升的可能,显示病毒极有可能已在人与人之间广泛传播。为了解2009年新型甲型H1N1流感病毒的主要抗原之一HA基因特性及对应的抗原变异,本研究对新型甲型H1N1病毒HA基因的全长核苷酸序列及编码蛋白氨基酸序列进行了分析,对重要抗原位点的氨基酸序列与世界其他地区以往流行的甲型H1N1流感病毒进行比较,以期能为新型甲型H1N1流感病毒建立有效的疫苗提供参考。

## 1 资料和方法

1.1 流感病毒HA基因序列的下载 截至2009年5月11日,在NCBI流感病毒库<sup>[5]</sup>上共下载新型A/H1N1流感病毒HA基因序列7条(GQ132145、GQ132155、FJ998208、FJ998214、CY039893、CY039895、GQ150328),来自美国、墨西哥和加拿大,其中从患者中分离6条,从感染人H1N1的猪中分离1条。在NCBI基因库中检索1918~2008年世界不同地区不同时间分离的A/swine/H1N1、A/human/H1N1和A/avian/H1N1甲型流感病毒HA基因序列,人甲型流感病毒A/human/H1N1疫苗株

HA基因序列共63条,按各国的地理分布进行分类,分别为北美地区流行株、欧洲地区流行株及亚洲地区流行株。

1.2 系统进化树的构建 采用Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0(MEGA4.0)软件进行序列比对,修剪对齐后HA基因序列长1 701 bp,采用NJ法构建世界各地不同时期人A/H1N1亚型流感病毒代表株HA基因进化树和HA基因种间进化树(Bootstrap=1 000)。

1.3 HA基因编码蛋白氨基酸序列变异分析 对2009年新型甲型H1N1流感病毒HA基因编码蛋白氨基酸序列的变异情况进行分析,对其中重要氨基酸功能位点进行比对。

## 2 结果

2.1 HA基因不同年代进化分析 分析不同地区(墨西哥、加拿大、美国纽约、美国加利福尼亚州)2009年新型A/H1N1病毒株间序列同源性(图1),结果显示序列同源性为99.8%~100.0%,提示此次新型甲型H1N1流感病毒的流行可能来自相同的传染源。

与1918~2008年世界各地分离的人类H1N1甲型流感病毒株HA基因序列构建进化树(图1)显示,此次爆发的新型A/H1N1病毒株HA基因单独构成一个分支,与1976、1988、1991、2005、2006、2007年的7株A/human/H1N1同源性较高,共同构成一个主干支,且均来自北美地区,提示此次新型的病毒株HA基因是北美地区的A/H1N1变异经历了量变到质变的过程。同时,从进化图还可以发现,1918年分离的爆发株(AF116575/human/Brevig Mission/1918/H1N1)HA基因向两个不同方向进化,2009年新型病毒株与其他大多数A/H1N1流感病毒在HA基因序列上有较大的差异。

2.2 HA基因不同种属间进化分析 应用人、猪和禽H1N1病毒HA基因构建种属间进化图(图2),结果显示新型猪A/H1N1流感病毒HA基因聚集在一支独特的进化支上,与1998和2007年北美地区分离的2株猪A/H1N1的HA基因的进化的关系很近,与禽A/H1N1的HA基因进化关系较远;此次流行株与北美地区猪H1N1最接近,而与亚洲地区的4株猪H1N1及欧洲的2株猪H1N1关系都

较远。这提示 2009 年新型 A/H1N1 流感病毒 HA 基因是由北美地区猪 A/H1N1 进化而来, 在进化过程中可能与该地区人 A/H1N1 流感病毒 HA 基因片段发生了某种程度的基因重排。

213(A)、214(Y)、258(F)、284(S)、306(L)、328(L) 等 8 个位点与 A/swine/H1N1 流感病毒、A/avian/H1N1 流感病毒、A/human/H1N1 流感病毒和 A/human/H1N1 流感病毒疫苗株完全相同, 是相对保守位点; 第 71(K)、103(D)、113(I)、149(T)、155(A)、202(A)、288(V)、293(T) 等 8 个位点与北美 A/swine/H1N1 完全相同, 而与 A/human/H1N1 疫苗株不同, 这 8 个位点中除 149(T)、155(A) 外, 其余 6 个位点与 A/human/H1N1 流感病毒相同。第 53(K)、224(K)、238(D)、283(I) 等 4 个位点与北美地区不同年代的 A/swine/H1N1 病毒株相比变异较大。结果说明 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 HA 抗原性可能与北美地区 A/swine/H1N1 相似, A/swine/H1N1 流感病毒重要抗原位点(HA) 的长期进化使 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒的抗原性发生了较大的变化, 对人类自身现有的免疫系统产生免疫逃逸<sup>[7]</sup>。

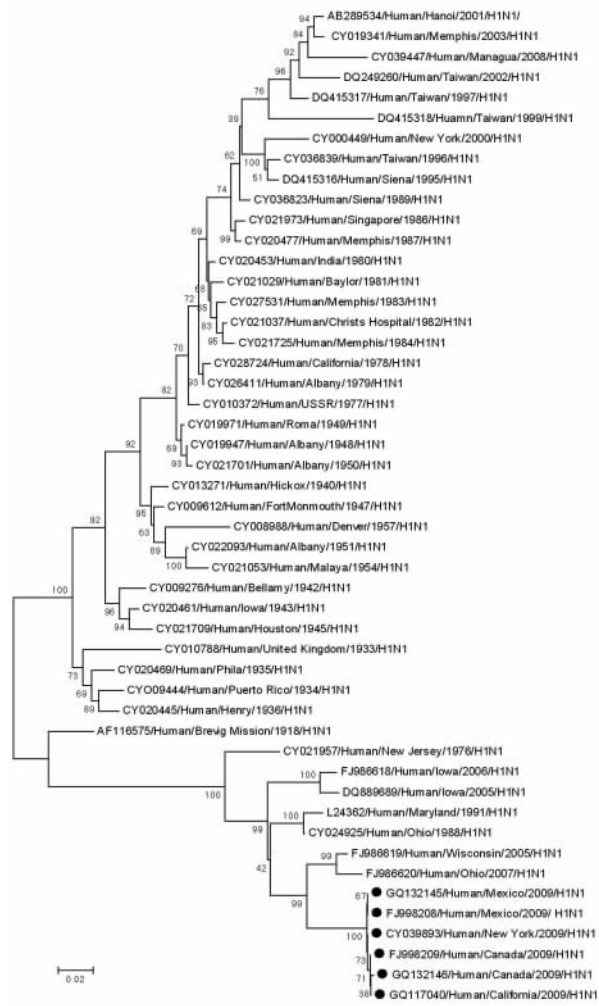


图 1 世界各地不同时期人 A/H1N1 亚型流感病毒代表株 HA 基因进化树  
Fig 1 Phylogenetic tree of HA genes of human A/H1N1 strains worldwide

●: HA genes of novel A/H1N1 strains in 2009 pandemic

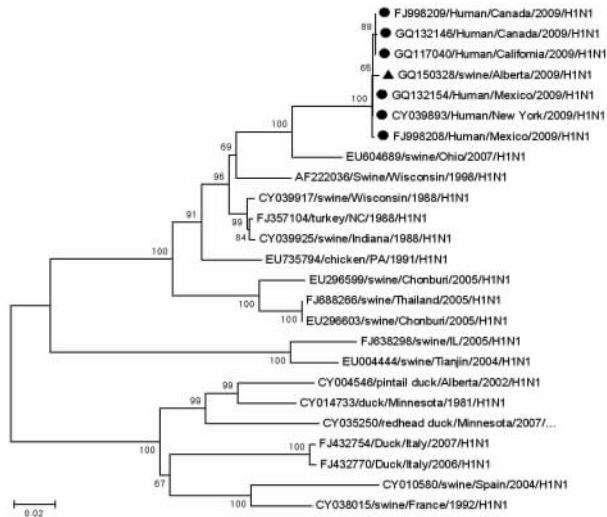


图 2 A/H1N1 流感病毒 HA 基因种属间进化树  
Fig 2 Phylogenetic tree of HA genes between different species  
●: HA genes of novel A/H1N1 in the 2009 outbreak; ▲: HA genes of swine A/H1N1 in 2009

2.3 HA 基因编码蛋白氨基酸序列变异分析 流感病毒 HA 基因编码蛋白氨基酸序列的第 53、71、77、103、113、138、149、155、159、202、213、214、224、238、258、283、284、288、293、306、328 位氨基酸是重要的抗原位点<sup>[6]</sup>, 因此本研究对这些位点进行了变异分析。

结果(表 1)表明: 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因编码蛋白与 2006、2007 年美国俄亥俄州 A/swine/H1N1 病毒相差 35~37 个氨基酸。其 HA 基因编码蛋白氨基酸序列第 77(W)、159(S)、

进一步研究发现, 与欧洲 A/swine/H1N1 亚型流感病毒相比, 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因的 21 个重要抗原位点中, 有 13 个位点有不同程度的变异, 且即使同一位点在不同地区、不同年代变异也相差较大。与亚洲地区 A/swine/H1N1 流感病毒相比, 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因的 21 个重要抗原位点中, 有 12 个位点不同(表 1), 提示 2009 年新型甲型 H1N1 流感病毒与欧洲和亚洲地区 A/swine/H1N1 的进化关系不明显。

表 1 甲型 H1N1 流感病毒重要抗原位点变异情况

Tab 1 Amino acid substitutions at important antigenic sites of deduced hemagglutinin proteins of influenza virus A/H1N1

Influenza virus A/H1N1	Amino acid position												
	53	71	103	113	138	149	155	202	224	238	283	288	293
New strains(2009)													
A/human/Mexico/2009	K	K	D	I	S	T	A	A	K	D	I	V	T
A/human/California/2009	K	K	D	I	S	T	A	A	K	D	I	V	T
Swine influenza A virus in USA													
A/swine/Ohio/2007	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
A/swine/Ohio/2006	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
A/swine/Iowa/2004	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	V	-	-
A/swine/Carolina/2002	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-
A/swine/Minnesota/1999	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/swine/Iowa/1985	R	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
A/swine/Wisconsin/1961	R	-	-	-	-	-	-	-	R	G	-	-	-
A/swine/Iowa/1930	S	-	-	-	-	-	-	-	R	G	T	-	-
Swine influenza A virus in Europe(1980-2006)	N/S	N/D/K	K/E/G	A/T/I	-	-	S	S/R/N	Q/R	E/G	M/T	-	-
Swine influenza A virus in China													
A/swine/Tianjin/2004	S	N	E	A	-	S	K	G	R	G	T	M	A
A/swine/Henan/2006	S	N	E	A	-	S	K	G	R	G	T	M	A
A/swine/Zhejiang/2007	S	N	K	A	-	-	S	S	-	E	M	-	-
Vaccine for human H1N1													
A/Beijing/262/1995	S	N	E	A	S	T	N	R	R	G	T	M	A
A/New Caledonia/20/1999	S	N	E	A	S	S	N	G	R	D	T	M	A
Human influenza A virus in USA													
A/human/Kansas/2007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A/human/Texas/1986	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-
Human influenza A virus in China													
A/human/Guangzhou/2006	-	-	-	-	-	T	-	R	-	G	-	-	-
A/human/HongKong/2002	-	-	-	-	-	S	-	G	-	D	-	-	-
A/human/Nanchang/1996	-	-	-	-	-	T	-	R	-	G	-	-	-

A: Alanine; D: Aspartic acid; E: Glutamic acid; G: Glycine; I: Isoleucine; K: Lysine; ; M: Methionine; Q: Glutamine; R: Arginine; S: Serine; T: Threonine; V: Valine; N: Asparagine. -: No alteration as compared with novel H1N1 strains

### 3 讨论

本研究结果表明,来自墨西哥、美国及加拿大的2009年爆发流行的A/H1N1流感病毒属于新型A/H1N1流感病毒株,不同于以往流行的人A/H1N1病毒,而且毒株之间具有很高的同源性(99.8%~100%),进化关系密切,说明该病毒来源于同一个感染源,且到目前为止变异较小。2009年新型A/H1N1病毒株与1976~2007年的7株A/human/H1N1的HA基因同源性较高,共同构成一个主干支,可能是由1918年的爆发株进化而来<sup>[8]</sup>,而该病毒株向另外一个方向的进化速度相对较慢,且这7个病毒株全部来自北美地区,可能是本次流行病毒株的中间过渡阶段。在这个中间过渡阶段内,A/H1N1亚型流感病毒可能在猪体内与人A/H1N1流感病毒的基因片段发生了重排,进化为此次爆发的新型流感病毒。新型人A/H1N1流感病毒与北美地区猪A/H1N1流感病毒的HA基因在进化树

上最为接近,它们共同组成一个较大的分支。而且新型人A/H1N1流感病毒的HA基因与以往存在的某些人A/H1N1流感病毒HA基因也较接近,推测新型人A/H1N1流感病毒的HA基因可能是由过去已存在的人A/H1N1流感病毒与猪A/H1N1流感病毒重排而来。

HA基因重要抗原位点的氨基酸比对分析表明,2009年新型A/H1N1流感病毒与北美地区A/swine/H1N1流感病毒流行株相比,HA基因的21位重要抗原位点中除第53、138、224、238、283共5个氨基酸位点不同外,其余的16个位点完全相同;而在1930~2004年流行的A/swine/H1N1中,HA基因的部分功能位点如第53、224、238、283位已逐渐呈现向2009年新型甲型H1N1流感病毒进化的趋势。由此可见,2009年新型甲型H1N1流感病毒HA基因可能是北美地区A/swine/H1N1流感病毒长期进化的结果。

HA基因编码蛋白具有重要的免疫原性,能使

人体产生保护性抗体,而HA抗原性不断变异,是流感流行的主要原因之一。我们应用猪H1N1病毒潜在的抗原位点作为参考标准,发现2009年新型甲型H1N1流感病毒与A/Beijing/262/1995和A/New Caledonia/20/1999疫苗推荐株相比有13个位点发生变化。由于新型A/H1N1流感病毒的抗原发生了变化,原来针对该抗原产生的抗体便失去了保护作用。因此,目前使用的A/human/H1N1流感疫苗对于控制目前的新型流感病毒的流行可能帮助不大。因此,尽快明确目前的新型A/H1N1流行株的抗原变化是研制新疫苗的关键。

### [参考文献]

- [1] Drescher J, Aron R. Influence of the amino acid differences between the hemagglutinin HA1 domains of influenza virus H1N1 strains on their reaction with antibody[J]. J Med Virol, 1999, 57: 397-404.
- [2] Bizebard T, Gigant B, Rigolet P, Rasmussen B, Diat O, Bösecke P, et al. Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody[J]. Nature, 1995, 376: 92-94.
- [3] Nelson M I, Viboud C, Simonsen L, Bennett R T, Griesemer S B, St George K, et al. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918[J]. PLoS Pathog, 2008, 4: e1000012.
- [4] World Health Organization. Influenza A (H1N1)-update 33, 19, May, 2009. <http://www.who.int/csr/don/2009-05-19/en/index.html>
- [5] National Center for Biotechnology Information, Newest 2009 H1N1 Flu Outbreak sequences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Flu/Database/select>
- [6] Brown I H, Ludwig S, Olsen C W, Hannoun C, Scholtissek C, Hinshaw V S, et al. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs[J]. J Gen Virol, 1997, 78(Pt 3): 553-562.
- [7] McDonald N J, Smith C B, Cox N J. Antigenic drift in the evolution of H1N1 influenza A viruses resulting from deletion of a single amino acid in the haemagglutinin gene[J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 12): 3209-3213.
- [8] Taubenberger J K, Morens D M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12: 15-22.

[本文编辑] 贾泽军

### • 书 讯 •

## 《内科学——听课、记忆与测试》已出版

本书由丛书编委会主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-909-8,16开,定价:35.00元。

“轻松突破”系列丛书是配合医学第七轮统编教材学习,帮助学生高效听课、记忆与成功应考的一套系列书。该系列书的重点构架如下:

**【课堂记录——听要点抓考点】** 将教材中该记的重点和考试的要点精炼,帮助学生记录下来,相当于一个质量非常高的听课笔记或者授课教案,这样学生就可以把精力用在老师讲课内容和消化难点上,因而大大提高听课效率。

**【记忆处方——重理解活思维】** 正如给患者看病一样,记忆处方是把难点指出来,把深奥的医学理论简单化、生活化,让学生插上记忆的翅膀,将基础课与临床结合起来,临床课点出其理论基础。这样不但提高了学生的学习效率,也提高了对医学的兴趣,还能启发学生,使其在以后的工作中能举一反三,灵活应用。

**【课后巩固——练知识增考技】** 检验学生学习好坏的标准就是考试,所以,大量的练习是应付考试的最好武器。本套丛书配有高质量的测试题,因为大部分试题是选自研究生入学考试、执业资格考试,所以不但对目前的学习有帮助,而且对以后的考试也非常有指导价值。

本套丛书适合广大医学生使用,同时也是授课教师的较好参考书。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595

<http://www.smmup.com>