

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00602

新型甲型 H7N9 流感病毒神经氨酸酶基因进化分析

关蔚, 林吉, 李自雄, 韩一芳, 苏彤, 张宏伟, 曹广文*

第二军医大学热带医学与公共卫生学系流行病学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒神经氨酸酶(NA)基因的进化,及其编码蛋白重要氨基酸位点的变异情况。**方法** 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库和全球禽流感基因共享数据库(GISAID)下载不同年代、不同地区甲型流感病毒 N9 亚型的 NA 基因序列,利用 MEGA 5.05 和 BioEdit 软件对基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行分析。**结果** 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒 NA 基因与 2010 年捷克共和国 H11N9 禽流感病毒的相似性达到 96%,新型流感病毒存在 5 个氨基酸的缺失;其中 1 株新型病毒可能的酶活性位点发生了变异。**结论** 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒的 NA 基因可能是由 H11N9 进化而来;氨基酸的缺失可能是造成人感染和较高病死率的原因。

[关键词] H7N9 亚型流感病毒 A 型;神经氨酸酶;进化;变异(遗传学)**[中图分类号]** R 511.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0602-05

Evolutionary analysis of neuraminidase gene of the novel avian influenza virus A/H7N9

GUAN Wei, LIN Ji, LI Zi-xiong, HAN Yi-fang, SU Tong, ZHANG Hong-wei, CAO Guang-wen*

Department of Epidemiology, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the evolutionary characteristics and important amino acid sites of the neuraminidase (NA) gene of the novel influenza virus A/H7N9 in 2013 epidemic. **Methods** The NA gene sequences of influenza virus A N9 subtype of different times and areas were downloaded from the database of The National Center for Biotechnology Information (NCBI) and The Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). MEGA 5.05 and BioEdit softwares were used for phylogenetic tree construction and nucleotide/protein sequence analysis. **Results** The NA gene sequence of the novel influenza virus A/H7N9 in 2013 shared a 96% similarity with that of the H11N9 avian strain found in Czech Republic in 2010. There were 5 amino acid deletions in this novel influenza virus, and one of the new strains had a variation in potential enzymatic active sites. **Conclusion** The NA gene of this 2013 novel influenza virus might originate from the avian H11N9 strains detected in Czech Republic. The deletion of amino acid might result in human infection and high fatality rate.

[Key words] H7N9 subtype influenza A virus; neuraminidase; evolution; variation (genetics)

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6):602-606]

流感每年都会造成 3 000 万~5 000 万人感染呼吸道疾病,并造成 25 万~50 万人死亡,大流行时死亡人数则数以百万计^[1]。近 10 年来,禽流感因其人传染性和高致病性引起了社会广泛重视^[2],人感染病毒之后疾病进展快,病死率高,造成极大的疾病负担。2013 年 3 月开始,一种新型流感病毒 H7N9 开始出现人感染现象,截至 4 月 27 日,国内已有 121 例患者,其中 23 例死亡,病死率达到 19%。2013 年

以前出现的 N9 亚型流感病毒从未发生过感染人的情况^[3]。流感病毒包膜表面有 2 种重要糖蛋白:血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)。其中,NA 在流感病毒感染宿主细胞、复制、成熟与释放过程中起着关键性作用。NA 蛋白使得病毒能够通过黏蛋白进行转移,从被感染的细胞中释放出子代病毒颗粒,同时防止病毒发生自身聚集;此外,NA 通过裂解呼吸道黏液中的唾液酸,阻

[收稿日期] 2013-04-30 **[接受日期]** 2013-05-28**[基金项目]** 上海市公共卫生重点学科建设项目(12GWZX0102)。Supported by Key Construction Program of Shanghai Public Health (12GWZX0102)。**[作者简介]** 关蔚,硕士生。E-mail: muyuweiwei@163.com

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

止病毒被灭活(唾液酸是温和的 NA 抑制剂), 促进病毒渗入到呼吸道上皮细胞中^[4], 增加肺炎链球菌的二重感染概率, 加重病情^[1]。本研究通过对 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒 NA 基因核苷酸序列及 NA 基因编码蛋白氨基酸序列的分析, 探求新毒株的进化来源、重要变异, 及其传染特征和疾病谱变化的原因, 为疾病的预防与治疗提供依据。

1 资料和方法

1.1 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒 NA 基因的获取

从美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库和全球禽流感基因共享数据库 (GISAID) 下载报道过的 N9 亚型基因序列, 包括 H1N9~H7N9、H9N9~H13N9 和 H15N9。根据地区、物种、年份选取有代表性的病毒毒株 74 条, 包括 9 条 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒(截至 2013 年 4 月 23 日), 其中 3 条 (KC853765. 1、KC885958. 1、KC899671. 1) 来源于 NCBI 数据库, 6 条 (439487、439500、439509、440684、440700、440692) 来源于 GISAID。

1.2 NA 基因进化分析

使用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5. 05 对 NA 基因的核苷酸序列进行比对, 构建进化树 (neighbor-joining 法, NJ 法, bootstrap=1 000)。将 H7N9 病毒株 JN244222. 1 | Korea/2011 (H7N9) 作为参考序列, 该病毒的 NA 蛋白一级结构的氨基酸序列为比对标准; 同时将病毒株 KC853765. 1 | Hangzhou/2013 (H7N9) 作为 2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒代表, 对编码氨基酸序列进行比对, 分析 NA 蛋白重要酶活性位点、抗原位点和糖基化位点的变异情况。

2 结果

2.1 N9 亚型 NA 基因进化分析

根据 74 条 N9 亚型流感病毒进化树 (图 1) 和进化距离的结果, 中国境内检测的 9 条 2013 年新型 N9 亚型 NA 基因序列的进化距离为 0. 001~0. 007, 相似性在 99% 以上, 可认为新型 H7N9 毒株之间具有同源性。新型毒株与 2011 年韩国禽类 H7N9 毒株 JN244222. 1 的进化距离最近, 为 0. 024~0. 027, 相似性为 94%~95%; 与 2010 年捷克共和国 H11N9 毒株 JF789604. 1 的相似性最高, 为 96%~97%, 进化距离为 0. 027~0. 028。进化树的主干分支呈现明显的地理分布特

点, 地理位置较近则进化距离较短; 而在同一地区, 年代与毒株间的进化距离存在一定关联。

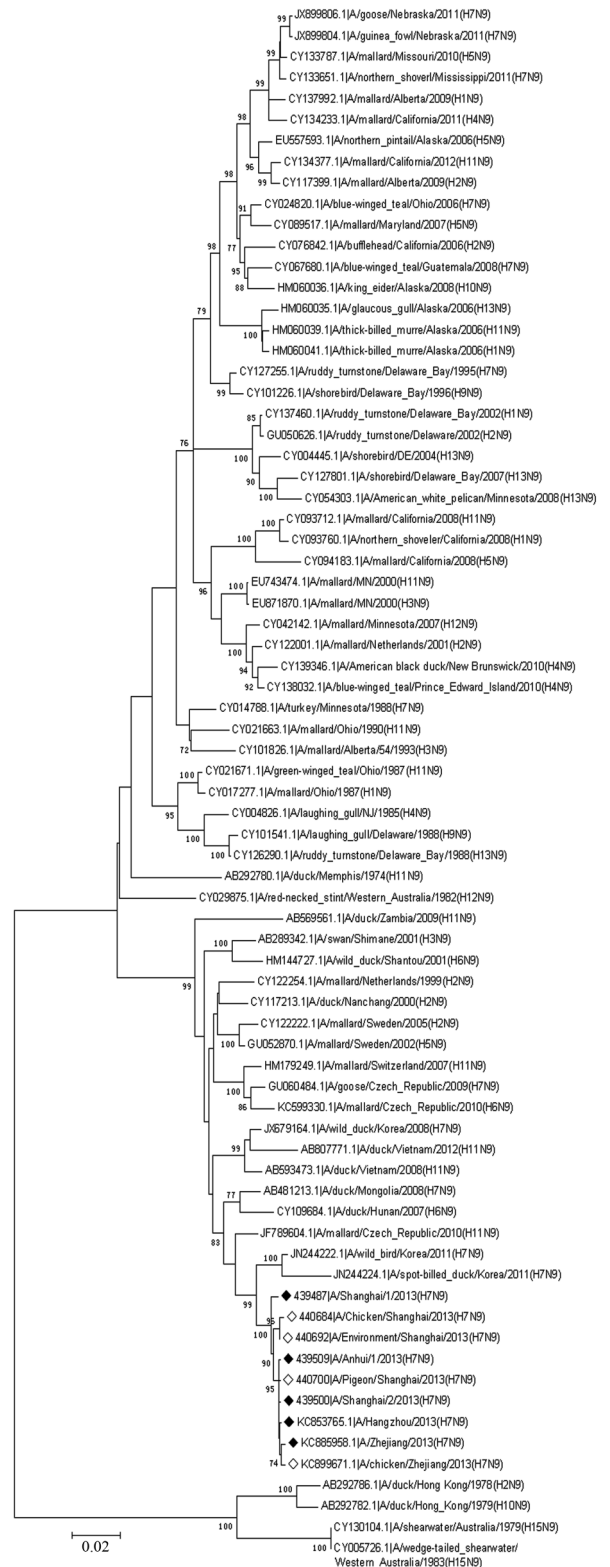


图 1 甲型流感病毒 N9 亚型 NA 基因进化树
Fig 1 Phylogenetic tree of the NA genes of influenza A virus (N9) strains

◆: NA genes of novel human A/H7N9 in 2013; ◇: NA genes of novel avian/environment A/H7N9 in 2013. NA: Neuraminidase

2.2 NA 基因编码蛋白氨基酸序列分析 在对 74 条病毒基因序列的比对中发现,NA 基因全长为 1 413个核苷酸,共编码 471 个氨基酸,而 2013 年发现的 9 株新型 H7N9 流感病毒 NA 基因发生 15 个核苷酸的丢失,造成第 69~73 位的 5 个氨基酸(QISNT)缺失。

2.2.1 NA 蛋白分子酶活性位点氨基酸序列分析 根据相关文献^[5]提示,N9 亚型 NA 蛋白的酶活性位点可能在 119(R)、120(E)、152(D)、153(R)、

200(N)、226(R)、229(E)、245(D)、276(H)、278(E)、279(E)、294(R)、332(D)、351(K)、427(E),酶活性位点周围相关重要位点可能在 122(Y)、135(L)、180(W)。比对所有 H7N9 序列和相似度较高(>95%)的 HxN9 序列,整理结果如表 1 所示,总体来看,新型 H7N9 病毒与以往 H7N9 病毒和 H11N9 亚型病毒的酶活性位点无明显区别,仅上海 1 株流感病毒(439487|Shanghai/2013)在第 294 位与其他病毒不同。

表 1 NA 蛋白酶活性位点及周围重要位点氨基酸分布

Tab 1 Catalytic residues and important amino acid residues of the neuraminidase

Influenza A virus	Amino acid position																	
	119	120	122	135	152	153	180	200	226	229	245	276	278	279	294	332	351	427
KC853765.1 Hangzhou/2013(H7N9)	R	E	Y	L	D	R	W	N	R	E	D	H	E	E	R	D	K	E
JN244222.1 Korea/2011(H7N9)	R	E	Y	L	D	R	W	N	R	E	D	H	E	E	R	D	K	E
439487 Shanghai/2013(H7N9) ^a	R	E	Y	L	D	R	W	N	R	E	D	H	E	E	K	D	K	E
Avian strains 2013(H7N9)	R	E	Y	L	D	R	W	N	R	E	D	H	E	E	R	D	K	E
Avian strains 1996-2010(H11N9)	R	E	Y	L	D	R	W	N	R	E	D	H	E	E	R	D	K	E

^a: A special strain of H7N9 human strains. R: Arginine;E: Glutamic acid;D: Aspartic acid;N: Asparagine;H: Histidine;K: Lysine;Y: Tyrosine;L: Leucine;W: Tryptophan

2.2.2 NA 蛋白抗原位点氨基酸序列分析 NA 蛋白的抗原决定簇与酶活性位点有密切关联,查阅相关文献,对 NA 上可能的抗原位点进行了氨基酸序列分析^[6],同样选取所有 H7N9 序列和相似度较高

(>95%)的 HxN9 序列,纳入研究的氨基酸位点包括:222、331、368、369、370、371、373、400、434,新型病毒在所列抗原位点均未发生改变(表 2)。

表 2 NA 蛋白潜在抗原氨基酸序列的变化

Tab 2 Amino acid variations at potential antigenic sites of the neuraminidase

Influenza A virus	Amino acid position								
	222	331	368	369	370	371	373	400	434
KC853765.1 Hangzhou/2013(H7N9)	R	N	S	T	A	S	S	N	K
Avian strains 2008-2011(H7N9)	R	N	S/N	T	A	S	S	N	K
Avian strains 2013(H7N9)	R	N	S	T	A	S	S	N	K
Avian strains 1996-2010(H11N9)	R	N	S	T	A	S	S	N	K

R: Arginine; N: Asparagine; S: Serine; T: Threonine; A: Alanine; K: Lysine

2.2.3 NA 蛋白糖基化位点的氨基酸序列分析 N9亚型的 NA 蛋白上,可能存在 7 个糖基化位点。经比对,如表 3 所示,所有序列第 87 位 NLT,第 147 位 NGT,第 202 位 NAS 的氨基酸序列均一致,未见缺失和替换。第 42、52、63、66 位的糖基化位点的氨基酸序列在 N9 亚型中均出现过,无特殊变化。

3 讨论

流感病毒的进化是导致流感流行的重要原因,

引起这一进化过程的机制包括点突变(抗原漂移)和基因重排(抗原转换)^[7-9]。中小型流行(如每年流感高发)是流感病毒表面抗原进化的结果,即抗原漂移^[10]。而片段基因组发生重排,即抗原转换,往往导致流感大流行^[11],如 1918 年西班牙流感大流行,1957 年亚洲流感大流行和 1968 年香港流感大流行等^[12]。本研究进化分析结果显示,新型 H7N9 流感病毒与 2010 年捷克共和国毒株 JF789604.1 的相似性最高,一般认为相似性越高提示同源的可能性越

大,所以2013年新型H7N9毒株的NA基因有可能由2010年捷克共和国流感病毒JF789604.1进化而来。同时,也有研究认为2011年韩国H7N9病毒株

是在进化树中显示的进化距离最近,可能为新型H7N9的进化来源^[3]。

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						
	42	52	63	66	87	147	202
KC853765.1 Hangzhou/2013(H7N9)	N-C-S	N-T-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1988-2012(H7N9)	N-C-S	N-A/T/V-S	N-E-T	N-I-T ^a	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1987-2009(H1N9)	N-C-S	N-A-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1978-2007(H2N9)	N-C-S	N-A/T/V-S	N-E-T	N-L/I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1993-2001(H3N9)	N-C-S	N-A-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1985-2011(H4N9)	N-C-S/T	N-A-S	N-E/K-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 2002-2010(H5N9)	N-C-S	N-A-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 2001-2010(H6N9)	N-C-S	N-A/T-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1996/1998(H9N9)	Deletion/N-C-S	N-A-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1979/2008(H10N9)	N-C-S	N-V/A-S	N-E-T	N-L/I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1974-2012(H11N9)	N-C-S	N-A/T-S	N-E/K-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1982/2007(H12N9)	N-C-S	N-A-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1988-2008(H13N9)	N-C-S	N-A/T-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S
Avian strains 1979/1983(H15N9) ^b	N-C-S	N-V-S	N-E-T	N-I-T	N-L-T	N-G-T	N-A-S

^a: The strain 2008(CY067680.1) has a deletion; ^b: The strains 1979/1983 have a glycosylation site at amino acid 45(N-P-T). N: Asparagine; S: Serine; A: Alanine; T: Threonine; L: Leucine; V: Valine; I: Isoleucine; C: Cysteine; G: Glycine

新型H7N9流感病毒发生人感染性和高致病性的改变,说明NA蛋白重要氨基酸位点可能发生了变化。现有的研究将对NA蛋白分为4个结构区域,分别是胞内区、跨膜区、柄部和头部^[1,12]。NA蛋白的“头部”存在其酶活性中心,抗原决定簇和糖基化位点^[13]。对NA蛋白结构的研究最早是在N2亚型中进行,发现少数氨基酸残基在一级结构中不连续,但在蛋白的三级结构中,这些氨基酸残基形成的结构具有特殊作用,是NA蛋白的酶活性中心^[5]。在对N9亚型的分析中发现该亚型类似的酶活性中心,可能所在的氨基酸位点如表1所示,新型病毒与既往H7N9流感病毒相比,并未发生明显变化,说明酶活性中心不是病毒宿主的决定因素。本研究发现仅1例上海患者身上检测到的流感病毒第294(K)位与其他新毒株294(R)不同,说明可能存在至少两株新型H7N9病毒株^[3]。

抗原位点对NA蛋白的酶活性有一定影响,若第369、371、372、373位发生改变会影响酶活性,通常是使酶活性降低^[6]。本研究结果显示新型病毒在这些位点并未发生改变,酶活性未受影响。由于新病毒株的出现可能会存在抗原位点变异,为了更好

地了解新型H7N9病毒抗原位点的分布及对酶活性的影响,还需要运用单克隆抗体对病毒的抗原表位重新筛选和鉴定。

糖基化是蛋白质修饰的重要方式,能够调节蛋白质功能。H5N1糖基化位点的缺失曾导致病毒传染性的改变,导致人感染高致病性禽流感^[14]。新型H7N9流感病毒毒株之间的糖基化位点完全一致;且与以往N9亚型相比(除H15N9),糖基化位点无缺失,大部分相同;在不同HxN9亚型中,存在和2013年新型H7N9流感病毒糖基化位点完全一致的毒株,这些糖基化位点与之前低致病性禽流感病毒H11N9的研究结果一致^[15]。这说明2013年新型流感病毒生物学特性的改变与糖基化位点无关。

所有2013年新型H7N9流感病毒存在第69~73位氨基酸的缺失(QISNT),这一区域属于NA蛋白的“柄部”,该区域氨基酸序列在不同亚型间差异较大,长度不等^[13],导致NA蛋白“头部”到病毒表面的距离不同,进而影响到蛋白活性甚至是病毒自身的生存(NA蛋白可水解任何SA残基,包括自身HA^[1])。2013年以前的N9亚型无“柄部”氨基酸缺失现象,也未有过人感染情况。1997年香港发生的

H5N1 禽流感病毒在“柄部”有 19 个氨基酸的缺失,这种病毒可以感染人,并且具有高致病性^[16]。上述证据提示新型 H7N9 病毒传染特征和疾病谱的变化极有可能是由于“柄部”氨基酸的缺失所致。

综上所述,2013 年新型甲型 H7N9 流感病毒 NA 蛋白的基因来源可能是捷克共和国 H11N9 毒株 JF789604.1,并在此基础上发生了氨基酸位点和结构的明显改变。流感病毒抗原进化研究中仅分析了 NA 蛋白并不能完全解释病毒生物学特性的改变。本研究发现的“柄部”氨基酸缺失可能与 HA 重要糖基化位点改变伴随出现。后续研究可对流感病毒全部基因段开展进化联合分析,进一步了解新型 H7N9 病毒,对预测新型流感流行趋势有指导价值。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Gong J, Xu W, Zhang J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase[J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14:113-122.

[2] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2013. [R/OL]. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/

[3] Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1888-1897.

[4] Colman P M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors[J]. *Protein Sci*, 1994, 3:1687-1696.

[5] 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.

[6] Webster R G, Air G M, Metzger D W, Colman P M, Varghese J N, Baker A T, et al. Antigenic structure and variation in an influenza virus N9 neuraminidase[J]. *J Virol*, 1987, 61:2910-2916.

[7] Fislov T, Kostolansk F. The factors of virulence of influenza a virus[J]. *Acta Virol*, 2005, 49:147-157.

[8] Ghedin E, Sengamalay N A, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution[J]. *Nature*, 2005, 437:1162-1166.

[9] Ferguson N M, Galvani A P, Bush R M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution[J]. *Nature*, 2003, 422:428-433.

[10] Kilbourne E D. Influenza pandemics of the 20th century [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12:9-14.

[11] Laver G, Garman E. Pandemic influenza: its origin and control[J]. *Microbes Infect*, 2002, 4:1309-1316.

[12] Kobasa D, Kawaoka Y. Emerging influenza viruses: past and present[J]. *Curr Mol Med*, 2005, 5:791-803.

[13] 李向忠, 方芳, 陈则. 流感病毒神经氨酸酶不同区域的作用[J]. *生命科学研究*, 2005, 9:55-59.

[14] Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying P C, Sangsiriwut K, Pooruk P, Boonnak 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.

[15] Li J, Cardona C J, Xing Z, Woolcock P R. Genetic and phenotypic characterization of a low-pathogenicity avian influenza H11N9 virus[J]. *Arch Virol*, 2008, 153:1899-1908.

[16] Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. *Science*, 1998, 279:393-396.

[本文编辑] 商素芳