

研究报告

1968–2014 年中国甲型 H3N2 流感病毒 PB1 基因进化分析

郭艳¹ 颜文娟¹ 邓斐² 余慧燕² 王慎骄² 汤奋扬² 祁贤^{2*} 卫平民^{1*}

(1. 东南大学公共卫生学院 江苏 南京 210009)

(2. 江苏省疾病预防控制中心 江苏 南京 210009)

摘要:【目的】分析季节性 H3N2 流感病毒 PB1 基因序列的变异情况, 揭示 H3N2 流感病毒 PB1 基因的分子特征与进化趋势。【方法】对 1968–2014 年中国地区 82 株人 H3N2 毒株、2012–2014 年江苏省分离的 81 株甲型 H3N2 流感病毒、6 株 SIV 和 4 株 AIV H3N2 亚型 PB1、PB1-F2 基因进行分子进化分析。【结果】1968–2014 年中国 H3N2 流感毒株 PB1 核苷酸和氨基酸相似性分别为 90.91%–100% 和 96.91%–100%。系统进化树分析, 1968–2014 年共 173 株 H3N2 流感病毒总体上分为 4 个分支, 2002–2014 年分离毒株位于第 IV 分支上, 1968–1994 年分离毒株位于第 II 和 III 分支; 猪源 H3N2 亚型分布于第 I、II、IV 分支上; 分子特征显示 PB1 氨基酸 52、113、179、216、576、586、619、621、709 位在 2002 年以后发生适应性改变, 替换了原来的氨基酸; PB1-F2 基因编码截断型蛋白长度有 52、34、25、24、11 aa (猪源), PB1-F2 蛋白毒力关键位点上未出现高致病性特征突变。【结论】自 1968 年起 H3N2 亚型 PB1 基因变异逐步趋于稳定, 且 PB1-F2 截断型毒株正逐渐成为一类新的进化特征, 但 PB1 基因与其他亚型之间发生重配以及关键毒力位点的变异仍应是监测的重点。

关键词: H3N2 流感病, PB1 基因, PB1-F2 蛋白, 进化分析

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81273143); The 11th High-level Talents Cultivation and Funded Project of “Six Talent Peak” in Jiangsu Province (No. 2014-WSN-40); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20131450); Medical Notable Talent Fund Project of Jiangsu (No. RC2011084)

***Corresponding author:** QI Xian: Tel: 86-25-83759506; E-mail: qianxiansyc@hotmail.com

WEI Ping-Min: Tel: 86-25-83795531; E-mail: mpw1963@126.com

Received: November 04, 2015; **Accepted:** January 08, 2016; **Published online** (www.cnki.net): January 11, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81273143); 江苏省“六大人才高峰”第十一批高层次人才选拔培养资助项目(No. 2014-WSN-40); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20131450); 江苏省医学重点人才基金项目(No. RC2011084)

***通讯作者:** 祁贤: Tel: 86-25-83759506; E-mail: qixiansyc@hotmail.com

卫平民: Tel: 86-25-83795531; E-mail: mpw1963@126.com

收稿日期: 2015-11-04; **接受日期:** 2016-01-08; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-11

Evolution of PB1 genes of influenza A/H3N2 viruses in China, 1968–2014

GUO Yan¹ YAN Wen-Juan¹ DENG Fei² YU Hui-Yan² WANG Shen-Jiao²
TANG Fen-Yang² QI Xian^{2*} WEI Ping-Min^{1*}

(1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

(2. Jiangsu Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: [Objective] We analyzed the evolution and mutations of PB1 genes among seasonal H3N2 influenza viruses, to reveal the molecular characteristics and evolutionary trend of PB1 genes. [Methods] We analyzed PB1 and PB1-F2 genes by molecular biological software with 82 A/H3N2 viruses from 1968 to 2014 in China, 81 viruses isolated from Jiangsu Province between 2012 and 2014, 6 swine influenza viruses and 4 avian influenza viruses. [Results] PB1 segments in China showed high nucleic acid and amino acid sequence similarity (90.91% to 100%, 96.91% to 100%). The phylogenetic tree of PB1 genes was divided into 4 clusters. Strains isolated from 2002 to 2014 located in Clade IV and 1968 to 1994 were in Clade II and III. SIVs dispersed in Clade I, II, IV suggesting a reassortment of PB1 genes may occurred in swine population between A/H3N2 and other subtypes. Compared to strains isolated from 1968 to 1994, the amino acid substitution of PB1 gene (52, 113, 179, 216, 576, 586, 619, 621 and 709) was observed between 2002 and 2014 with adaptive changes. Truncated PB1-F2 protein included 52, 34, 25, 24 and 11 aa (SIV). The mutation of the key virulence sites did not appear among Human A/H3N2 influenza. [Conclusion] PB1 segments of A/H3N2 influenza virus underwent stable evolution and mutation, the truncated PB1-F2 protein has become a new trend in its evolutionary process. This finding suggests that we should pay great attention on the reassortment of PB1 genes and its mutation on key virulence sites. This emphasizes the importance of virus surveillance of A/H3N2 virus.

Keywords: H3N2 influenza virus, PB1 gene, PB1-F2 protein, Evolution analysis

甲型流感病毒是威胁人类健康的重要病原体之一。根据其表面蛋白血凝素(Hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的不同,可以将其分为多种血清型,其中 H3N2 是目前流行的主要亚型之一。流感病毒基因重配率高、基因变异快等特点是造成流感大流行的重要因素。历史上,1968 年“香港流感”大流行(H3N2)是由于 H2N2 流感病毒基因组与禽流感病毒基因组发生重配而造成的^[1],而后由于其抗原漂移速度快等特点不断暴发局部范围内 H3N2 流感疫情,给人类健康和生活带来了巨大的威胁。

甲型流感病毒基因组包含 8 个基因片段,编码至少 11 种蛋白, PB1 是流感病毒核糖核蛋白复合体(RNP)的重要构件,对流感病毒的复制起重要作用^[2]。此外 PB1 基因编码的另一条 87–90 个氨基酸的病毒蛋白肽 PB1-F2,与甲型流感病毒复制能力、

致病力等也有一定的关联^[3–4]。20 世纪发生的 4 次甲型流感大流行中,有 2 次(1957 年 H2N2、1968 年 H3N2)出现了流感病毒 PB1 基因来自禽类而形成的重配^[5],另外 21 世纪首次流感大流行的病原,甲型 H1N1 (pdm09)病毒也出现了 PB1 片段的基因重配。目前针对 PB1 基因的研究主要围绕的是禽流感病毒,如 H5N1 亚型、H9N2 亚型等^[6–9],而对人 H3N2 流感病毒 PB1 基因的监测和研究并不深入。基于此,本研究对 1968–2014 年全国上传到 GISAID 数据库的 82 株 H3N2 流感病毒 PB1 基因,以及江苏省 13 个地区分离并测序的 PB1 基因进行进化分析,为甲型 H3N2 流感病毒 PB1 基因的监测提供相关信息。

1 材料与方法

1.1 资料来源

通过江苏省流感网络监测系统,选取

2012–2014 年江苏省 13 个地市流感哨点医院流感样病例毒株 81 份(已通过流感亚型鉴定被确认为甲型 H3N2 亚型的标本)进行序列测定。选取 GISAID 流感数据库 1968–2014 年人 H3N2 流感病毒 PB1 核苷酸序列, 以及 6 株猪源和 4 株禽源甲型 H3N2 流感病毒 PB1-F2 核苷酸序列纳入分析。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离及 PB1 基因 PCR 扩增: 将 81 株甲型 H3N2 流感病毒咽拭子样本接种 MDCK 细胞进行分离培养。提取病毒 RNA, 利用逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)反转录病毒 RNA 为 cDNA, 利用自行设计的引物(表 1)进行 PB1 基因 PCR 扩增。

利用 ExTaq PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)进行 PCR 扩增, 扩增体系: 10×Buffer (含 Mg²⁺) 5 μL、2.5 mmol/L dNTPs mixture 8 μL、正反向引物 10 μmol/L 各 2 μL、ExTaq enzyme 0.5 μL、cDNA 1.5 μL、DEPC H₂O 31 μL, 总体积为 50 μL。扩增反应程序: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经电泳纯化回收后由上海生工公司进行测序。

1.2.2 序列分析: 利用 Conting Express Application 软件对测序结果进行序列拼接, 得到 PB1 核苷酸序列, 已将毒株的部分序列上传到 GISAID, 序列号 EPI675731–EPI675745。采用 MEGA 6.0.6 软件进行核苷酸序列比对(ClustalW), 对 PB1 及 PB1-F2 氨基酸位点的改变进行分析, 利用 Fasttree 软件绘制 PB1 基因编码区核苷酸序列的进化树。使用在线工具

Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>)对 PB1 节段进行选择压力分析。

2 结果与分析

2.1 PB1 同源性分析

2012–2014 年分离自江苏省 13 个地区的 81 株 H3N2 流感病毒 PB1 基因核苷酸及氨基酸的相似性分别为 97.02%–100%和 97.43%–100%。1968–2014 年 82 株中国人源甲型 H3N2 流感病毒核苷酸和氨基酸的相似性分别为 90.91%–100%和 96.91%–100%, 核苷酸变异频率明显高于氨基酸变异频率(表 2)。

2.2 PB1 基因系统进化分析

以 A/Beijing/132/2010 H1N1 流感病毒 PB1 序列为根, 构建 H3N2 亚型 PB1 基因系统进化树(图 1)。由图 1 可以看出, 173 株 IAV H3N2 流感病毒可分为 4 个进化分支, 江苏省 81 株 H3N2 流感毒株均位于第 IV 分支上, 与中国 2002–2014 年分离的人源 H3N2 流感病毒进化关系较近, 此外 A/swine/Shandong/3/2005(H3N2)也位于第 IV 分支, 核苷酸及氨基酸相似性比对结果为 96.00%–100%和 97.43%–100%。第 I 分支包含 A/swine/Guangdong/3494/2011、A/swine/Guangxi/NS2394/2012 和根 A/Beijing/132/2010 (H1N1), 核苷酸、氨基酸相似性为 99.17%和 97.95%。与外支 H1N1 亚型比较, 除 R211K、D377E、I435V、A652V、S741F 外, 其余位点与外支毒株均一致, 表明这两株猪源流感病毒 PB1 基因与新型甲型 H1N1 (09pdm)进化关系十分接近。第 II 分支包含人源 H3N2 流感病毒和 3 株猪

表 1 甲型 H3N2 流感病毒 PB1 基因引物序列		
Table 1 Primer pairs used for amplification of PB1 gene of influenza A/H3N2 strains		
引物名称 Primers	引物序列 Primer sequence (5'→3')	长度 Size (bp)
PB1-1-Forward	ATGGATGTCAATCCGACTCTACTGT	25
PB1-1-Reverse	TATTGGTGCGATGCTCAGGATGT	23
PB1-2-Forward	AGTGGAATGAAAATCAAAACCT	23
PB1-2-Reverse	CTGGTCCAAGGTCATTGTTTATC	23
PB1-3-Forward	GCTGCCCAGTTTTGGAGTGTCTG	23
PB1-3-Reverse	TCATTATTTTGGCGTCTGAGTTC	24

表 2 甲型 H3N2 流感病毒 PB1 基因核苷酸及氨基酸同源性比较
Table 2 Nucleotide and protein sequence identities of PB1 gene of influenza A/H3N2 strains

分组 Groups	年份 Year	毒株数量 Number of strains	核苷酸 Identities of nucleotide (%)	氨基酸 Identities of amino acid (%)
江苏省分离毒株 Strains of Jiangsu	2012	5	97.62–99.56	93.42–98.69
	2013	25	97.30–99.91	98.40–100
	2014	51	97.72–100	94.17–100
	Totle	81	97.02–100	97.43–100
中国人源 H3N2 病毒 Human H3N2 virus of China	1968–2014	82	90.91–100	96.91–100

源 H3N2 流感病毒, 除 A/HuNan/01/2014 外, 人源 H3N2 病毒分离时间均在 1968–1994 年之间。第 III 分支为 4 株禽源 H3N2 流感病毒, A/HuNan/01/2014 与 3 株猪源流感病毒氨基酸序列基本一致, 与人源 H3N2 流感病毒相比较, 氨基酸差异主要位于第 179、216、486、581、584 位。

2.3 PB1 氨基酸进化分析

PB1 基因序列起始密码子与终止密码子分别位于 25–27 位和 2 296–2 298 位, 编码 757 个氨基酸^[10]。对中国 H3N2 病毒 PB1 氨基酸进行分析, 2002–2014 年的流行株与 1968–1994 年 H3N2 毒株比较, 在 R52K、V113A、M179I、G216S、I576L、R586K、N619D、R621Q、I709V, 逐渐形成适应性变异, 替换了原来位点上的氨基酸(表 3)。与 2014 年参考毒株 A/Texas/50/2012 相比, 江苏省分离毒株氨基酸序列以下位点发生变化: 212、215、479、480、487、489、491、513, 且第 212 位发生缬氨酸到甲硫氨酸变异的毒株, 均出现 215 位精氨酸到赖氨酸的变异, 其原因有待进一步研究。

2.4 PB1 氨基酸位点选择压力分析

对人源 H3N2 流感病毒 PB1 片段进行选择压力分析, 采用 SLAC、FEL、REL 模型分析 1968–2014 年 163 株流感毒株, 通过 SLAC 模型得到 1 个正向压力选择(第 756 位), 且 $dS/dN > 1$ 表明该位点非同义突变被固定下来^[11]; 通过 IFEL 和 FEL 模型得到 2 个和 3 个正向选择压力位点(表 4)。

2.5 PB1-F2 蛋白分析

2001 年, Chen 等^[3]开展对 A/Puerto Rico/8/34

(H1N1) PB1 基因的研究发现了 PB1 基因序列第 119–121 位+1 开放阅读框, 编码长度为 87 aa 的 PB1-F2 蛋白。本研究 173 株 IAV H3N2 流感病毒共编码 6 种不同长度的 PB1-F2 蛋白, 81 株江苏省测序毒株中 79 株编码 90 aa, 截短型(4 株)长度均为 25 aa; 1968–2014 年全国人源 H3N2 毒株 PB1-F2 编码长度为 90、52、34、24 aa; 猪源 H3N2 编码 90、11 aa; 禽源 H3N2 流感毒株未出现截短型 PB1-F2(表 5)。此外氨基酸分析发现, 1994 年之前分离的 H3N2 毒株 PB1-F2 蛋白与 2002 年之后的毒株相比变异较大的有 E4G、D6G、K20R、Q25R、T27I、S47N、F57S、P60L、L62W、G70V, 且与禽流感、猪流感 PB1-F2 氨基酸变异相近。2014 年分离毒株 PB1-F2 蛋白第 8 位均出现 P→L 改变, 其临床及流行病学意义尚待进一步研究(图 2)。

3 讨论

自甲型 H3N2 流感病毒在人类流行以来, 其遗传变异及演化方向一直是流感病毒监测的重要内容。本研究对 H3N2 亚型 PB1 基因进化趋势进行分析, 结果显示 2012–2014 年江苏省监测到的 81 株甲型 H3N2 流感毒株 PB1 核苷酸与氨基酸的遗传距离与中国台湾地区监测到的 18 株 H3N2 流感病毒相近^[12]。比较 1968–2014 年人源 H3N2 流感毒株遗传距离发现, H3N2 流感病毒自 1968 年暴发以来其遗传变异不断累积, 但氨基酸进化距离却明显小于核苷酸进化距离, 这可能是由于维持病毒结构和功能的需要^[13]。

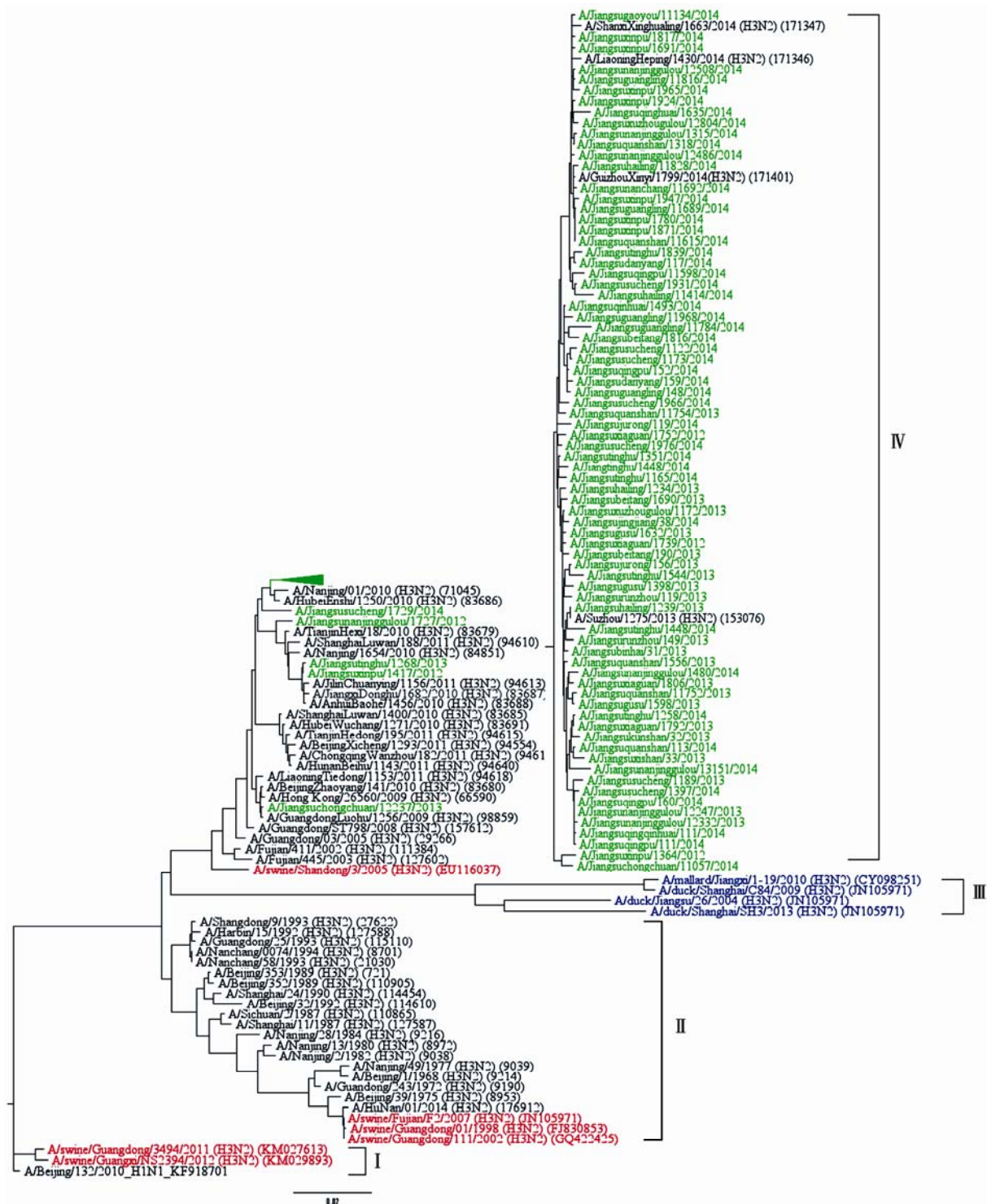


图 1 甲型 H3N2 流感病毒 PB1 基因系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of the PB1 gene segments of A/H3N2 virus

注：绿色：江苏省分离到的毒株；红色：猪源 H3N2 亚型毒株；蓝色：禽源 H3N2 亚型毒株；黑色：1968–2014 年中国人源 H3N2 毒株。标尺值 0.02 代表毒株间进化距离。

Note: Green: Strains of Jiangsu; Red: Swain H3N2 viruses; Blue: Avian H3N2 viruses; Black: Human H3N2 viruses of China. Scale value 0.02 represents the level of number of difference.

表3 1968–2014年甲型H3N2流感病毒PB1氨基酸变异位点分析
Table 3 Analysis of mutation sites in PB1 protein of IAV H3N2 in China, 1968–2014

毒株分离时间 Isolated year	变异位点 Mutation sites								
	R52K	V113A	M179I	G216S	I576L	R586K	N619D	R621Q	I709V
1968–1994	26/27	27/27	21/27	15/27	27/27	27/27	27/27	17/27	27/27
2002–2014	6/136	4/136	1/136	1/136	1/136	4/136	2/136	1/136	1/136

表4 2012–2014年江苏省甲型H3N2分离毒株正向选择位点分布
Table 4 The distribution of positively selected sites among A/H3N2 viruses in Jiangsu, 2012–2014

Model	Codon	dS/dN	Standard [dN–dS]	P-value
SLAC	756	5.38	12.56	0.028
IFEL	57	–	5.98	0.090
	586	–	5.13	0.647
FEL	6	–	3.78	0.077
	745	–	3.42	0.100
	756	–	14.44	0.006

系统进化分析表明, 2012–2014年江苏省分离毒株PB1均位于同一进化分支IV上, 除与2002年以后的人源H3N2亚型流感PB1进化关系较近外, 还与一株猪H3N2流感病毒(A/swine/Shandong/3/2005)的PB1同源性较近。猪群中流感病毒亚型和基因型的多样性以及与人流感病毒基因组的重配现象, 使流感病毒在不同宿主中的适应性增强, 对人类健康威胁不断加大。猪作为流感病毒的“混合器”, 在2009年已经使甲型H1N1(09pdm)发生巨大变异, 并造成世界性的大流

行, 推测猪作为流感病毒的中间宿主, 很有可能使各亚型流感病毒发生新的重配, 极有可能成为未来引起人流感流行或大暴发的潜在威胁^[14–15]。

流感病毒为单股负链RNA病毒, 由于RNA聚合酶缺少校正功能, 因此在复制过程中易发生突变。PB1基因氨基酸变异特征分析发现, 2000年以后分离株出现V113A、G216S、I576L、R586K等多个位点的突变, 其中第113位氨基酸与PB2聚合酶作用的功能区有关, 此位点发生变异可能会影响流感病毒的复制能力。上述位点的突变可能会影响流感病毒的复制能力及其致病性。1998年和2002年我国发生较大范围的H3N2亚型流感大流行, 从一定程度上增加了流感病毒PB1片段基因变异的可能性, 促进了新的优势毒株的形成。

PB1-F2蛋白是由流感病毒PB1片段+1开放阅读框编码的多肽, 是甲型流感病毒致病性的关键蛋白之一。长度的多态性是其重要特征之一, 也是影响其毒力作用的重要因素。PB1-F2基因有40个左右的位点能够发生碱基突变而形成终止密码子, 编码不同长度C端截短的PB1-F2蛋白^[16]。PB1-F2蛋

表5 PB1-F2基因编码蛋白的长度统计
Table 5 The induced length of PB1-F2 of influenza A viruses

分组 Group	数量 Number	PB1-F2 蛋白长度 Length of PB1-F2 (aa)						截短型构成比 Proportion of truncated PB1-F2
		90	52	34	25	24	11	
江苏省分离毒株 Strains of Jiangsu	81	77			4			4/81
中国人源H3N2病毒 Human H3N2 viruses of China	82	60	1	9	10	2		22/82
猪源H3N2病毒 Swine H3N2 viruses	6	4					2	2/6
禽源H3N2病毒 Avian H3N2 virus	4	4						0/4

		4	6	8	12	16	20	21	22	25	26	27	29	31	35	37	47	57	58	59	60	62	66	70	73	75	79	82	89
1	A/Jiangsuqingpu/152/2014	E	G	L	S	T	R	G	G	R	Q	I	K	G	S	Q	N	S	W	R	L	P	N	V	R	H	Q	P	T
2	A/Jiangsuxishan/33/2013	G
3	A/Jiangsuxiaguan/1739/2012	G
4	A/Jiangsuhailing/11414/2014	R	.	.	.	*	H
5	A/Jiangsuxinpu/1364/2012	.	.	P	*
6	A/Jiangsuxinpu/1417/2012	.	.	P	*
7	A/Jiangsutinghu/1268/2013	.	.	P	*
8	A/Jiangsuchongchuan/11057/2014	.	.	P	*
9	A/Guangdong/09/2005	.	.	P	.	.	R
10	A/Nanjing/01/2010	G	.	P
11	A/Beijing-Xicheng/12423/2012	G	.	P
12	A/Suzhou/1275/2013	G
13	A/Guangdong/ST798/2008	.	.	P	.	.	R
14	A/Beijing-Xicheng/13100/2014	G	*	Q	.
15	A/XinjiangTianshan/11190/2014	G	*	Q	.
16	A/Chongqing-Wanzhou/182/2011	G	.	P	*
17	A/Beijing-Xicheng/1293/2011	G	.	P	*
18	A/Shanghai-Luwan/1400/2010	G	.	P	*
19	A/Shanghai-Luwan/1568/2010	G	.	P	*
20	A/Hubei-Wuchang/1271/2010	G	.	P	*
21	A/Beijing-Xicheng/1409/2011	G	.	P	*
22	A/HeilongjiangXiangyang/1125/2011	G	.	P	*
23	A/Tianjin-Hedong/195/2011	G	.	P	*
24	A/Hunan-Beihu/1143/2011	G	.	P	*
25	A/Jiangxi-Donghu/1682/2010	.	.	P	*
26	A/Anhui-Baohe/1456/2010	.	.	P	*	.	.	R
27	A/Nanjing/1655/2010	.	.	P	*	G
28	A/Hunan-Wuling/1304/2011	.	.	P	*
29	A/Nanjing/1663/2010	.	.	P	*
30	A/Jilin-Chuanying/1156/2011	.	.	P	*
31	A/HeilongjiangNangang/124/2011	.	.	P	*
32	A/Liaoning-Haizhou/1118/2011	.	.	P	*
33	A/Hunan-Yanfeng/165/2011	.	.	P	*
34	A/Shanghai/24/1990	.	D	P	.	I	K	R	.	Q	*	T	.	.	R	S	F	.	.	P	L	.	G	S	.
35	A/Fujian/411/2002	.	.	P	.	.	R	S	Y	*	S	.
36	A/HuNan/01/2014	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	R	.	.	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	S	.	.
37	A/Beijing/39/75	.	D	P	L	I	K	K	.	Q	.	T	R	.	L	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	S	.	.
38	A/Nanjing/13/1980	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	.	.	L	R	S	.	.	K	.	L	.	G	.	R	.	S	.
39	A/Nanchang/A2/1994	.	D	P	.	.	K	R	.	.	T	S	F	.	.	P	L	.	G	.	.	.	L	I	.
40	A/Nanjing/49/1977	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	.	E	L	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	L	.	.
41	A/Guangdong/243/1972	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	.	.	L	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	S	.	.
42	A/Beijing/1/68	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	.	E	L	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	L	.	.
43	A/Beijing/353/89	.	D	P	.	I	K	R	.	Q	.	T	.	.	.	R	S	F	.	.	P	L	.	G	.	.	.	S	.
44	A/Sichuan/2/1987	.	D	P	.	I	K	R	.	Q	.	T	.	.	.	R	S	F	.	.	P	L	.	G	.	.	.	S	.
45	A/Beijing/32/1992	.	D	P	.	I	K	.	Q	.	T	R	S	F	.	.	P	L	.	G	.	.	.	S	.
46	A/Guangdong/25/1993	.	D	P	.	.	K	R	.	.	T	R	S	F	.	.	P	L	.	G	.	.	.	L	I
47	A/swine/Shandong/3/2005	.	.	P	.	.	K	R	.	.	.	R	.	.	.	S	G	S	.
48	A/mallard/Jiangxi/1-19/2010	.	D	P	.	I	K	R	.	Q	.	T	R	E	.	R	S	Y	.	K	Q	.	E	K	R	R	L	I	.
49	A/duck/Jiangsu/26/2004	.	D	P	.	I	.	R	E	Q	.	T	R	E	.	.	S	Y	.	K	Q	L	S	G	K	.	R	L	I
50	A/duck/Shanghai/C84/2009	.	D	P	.	I	K	R	.	Q	.	T	R	.	.	R	S	Y	.	K	Q	.	E	K	R	R	L	I	.
51	A/duck/Shanghai/SH3/2013	.	.	P	.	I	.	R	E	Q	.	T	R	E	.	.	S	C	.	K	Q	L	.	G	K	L	R	S	.
52	A/swine/Fujian/F2/2007	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	R	.	.	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	S	.	.
53	A/swine/Guangdong/01/1998	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	R	.	.	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	S	.	.
54	A/swine/Guangdong/111/2002	.	D	P	.	I	K	K	.	Q	.	T	R	.	.	S	.	.	K	Q	L	.	G	K	R	R	S	.	.
55	A/swine/Guangdong/3494/2011	.	D	P	.	*	.	K	R	E	Q	.	T	R	V	.	R	.	F	*	K	.	L	.	E	.	.	L	I
56	A/swine/Guangxi/NS2394/2012	.	D	P	*	.	K	R	E	Q	.	T	.	V	.	R	.	F	*	.	.	L	.	E	.	.	.	L	I

图 2 甲型 H3N2 流感病毒 PB1-F2 蛋白氨基酸位点变异情况

Figure 2 Amino acid mutations in PB1-F2 of influenza A/H3N2 virus

注：选择具有代表性的毒株进行氨基酸变异分析；*：终止密码子(即 PB1-F2 断裂部位)。

Note: We selected the representative viruses to show the mutations of amino acid; *: The termination codons (the tuncated sites of PB1-F2).

白第 46–75 aa 是其定位于受感染细胞线粒体上的重要区段^[17], 本研究中 H3N2 流感病毒截短型 PB1-F2 蛋白长度 52、34、25、24、11 aa (SIV), 均缺少或部分缺少此定位功能, 估计可能改变其线粒体途径致细胞凋亡的功能。研究显示, PB1-F2 蛋白 C 端第 L62、R75、R79、L82 以及 S66 位于促炎症区域, 是影响病毒毒力的关键位点^[7,18]。江苏省分离的 A/duck/Jiangsu/26/2004 中出现了 N66S 的变异, 目前尚未在人源 H3N2 流感病毒中监测到此类氨基酸位点的变化。结合流感病毒 PB1 基因重配的特点以及 PB1-F2 毒力特征, 在流感病毒的监测中, 对 PB1 基因重配而导致的 PB1-F2 蛋白致病性改变应当给予高度重视。此外, Coleman 等^[19]研究显示 1996 年以前季节性 H3N2 病毒均编码完整长度 PB1-F2, 而本研究中 A/Shanghai/24/1990 已出现 PB1-F2 断裂株, 可见国内 PB1-F2 蛋白长度变异出现的时间可能早于国外, 其进化过程值得进一步跟踪研究。

2002–2014 年间 H3N2 流感病毒 PB1 片段变异频率低于 1968–1994 年间分离的毒株, 其变异趋势逐渐稳定。但进化过程中发生基因重配的可能性仍不容忽视, 极有可能利用猪“混合器”的功能与其他物种流感病毒发生基因重配形成新的优势毒株, 实现流感病毒跨物种传播。此外流感病毒 PB1-F2 蛋白截短型已经逐渐成为 H3N2 流感病毒的进化方向, 其临床及流行病学意义值得广大学者进行更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Wendel I, Rubbenstroth D, Doedt J, et al. The avian-origin PB1 gene segment facilitated replication and transmissibility of the H3N2/1968 pandemic influenza virus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(8): 4170-4179
- [2] Resa-Infante P, Recuero-Checa MA, Zamarreño N, et al. Structural and functional characterization of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(20): 10477-10487
- [3] Chen WS, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death[J]. *Nature Medicine*, 2001, 7(12): 1306-1312
- [4] Ishihama A. A multi-functional enzyme with RNA polymerase and RNase activities: molecular anatomy of influenza virus RNA polymerase[J]. *Biochimie*, 1996, 78(11/12): 1097-1102
- [5] Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics[J]. *Journal of Virology*, 1989, 63(11): 4603-4608
- [6] Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, et al. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence[J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(10): e141
- [7] Marjuki H, Scholtissek C, Franks J, et al. Three amino acid changes in PB1-F2 of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus affect pathogenicity in mallard ducks[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(6): 925-934
- [8] Röder R, Bruns K, Sharma A, et al. Synthesis of full length PB1-F2 influenza A virus proteins from 'Spanish flu' and 'bird flu'[J]. *Journal of Peptide Science*, 2008, 14(8): 954-962
- [9] Liu JH, Shi WM, Wu QM, et al. Analysis on the relationship of the PB1 polymerase genes between chicken and human H9N2 subtypes of influenza viruses[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 20(7): 589-591 (in Chinese)
刘金华, 史为民, 吴清民, 等. 我国鸡源与人源 H9N2 亚型流感病毒聚合酶 PB1 基因的关系分析[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(7): 589-591
- [10] Matushevich OV, Egorov VV, Gluzdikov IA, et al. Synthesis and antiviral activity of PB1 component of the influenza A RNA polymerase peptide fragments[J]. *Antiviral Research*, 2015, 113: 4-10
- [11] Lan Y, Zhao X, Li XY, et al. Selection pressure analysis of H3N2 influenza virus from China between 1992 and 2012[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2013, 27(3): 177-180 (in Chinese)
蓝雨, 赵翔, 李希妍, 等. 1992-2012 年中国 H3N2 亚型流感病毒选择压力分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27(3): 177-180
- [12] Chen GW, Yang CC, Tsao KC, et al. Influenza A virus PB1-F2 gene in recent Taiwanese isolates[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(4): 630-636
- [13] Zhao FF. Study on the characteristic within the whole genome of influenza virus subtype A/H3N2 strains circulated in Zhejiang province during 1998 to 2009[D]. Ningbo: Master's Thesis of Ningbo University, 2011 (in Chinese)
赵斐斐. 1998-2009 年浙江省流感主要流行株 H3N2 的全基因组特征性研究[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2011
- [14] Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic[J]. *Nature*, 2009, 459 (7250): 1122-1125
- [15] Qi X, Zhu FC, Li L, et al. Epidemic characterization of swine influenza viruses and gene origins of the novel influenza A (H1N1) viruses emerging in human population[J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2009, 20(2): 78-82 (in Chinese)
祁贤, 朱凤才, 李亮, 等. 猪流感病毒流行特点及其新型甲型 H1N1 流感病毒的基因来源分析[J]. *江苏预防医学*, 2009, 20(2): 78-82
- [16] Huang YY, Hu BX, Wen XT, et al. Evolution analysis of the PB1-F2 genes of influenza A viruses isolated from China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2156-2163 (in Chinese)
黄艳艳, 胡北侠, 文心田, 等. A 型流感病毒中国分离株 PB1-F2 基因进化分析[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(6): 2156-2163
- [17] Yamada H, Chouan R, Higashi Y, et al. Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria[J]. *FEBS Letters*, 2004, 578(3): 331-336
- [18] Alymova IV, Green AM, van de Velde N, et al. Immunopathogenic and antibacterial effects of H3N2 influenza A virus PB1-F2 map to amino acid residues 62, 75, 79, and 82[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(23): 12324-12333
- [19] Coleman JR. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: Increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages[J]. *Virology Journal*, 2007, 4(1): 9