

· 论 著 ·

2012 年贵州省风疹病毒分离株的基因特征分析*

唐小敏¹, 朱 贞², 任 刚¹, 朱 青¹, 张 丽¹, 叶绪芳¹

(1. 贵州省疾病预防控制中心免疫规划所, 贵阳 550004;

2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206)

摘要:目的 对 2012 年贵州省流行的风疹病毒进行鉴定, 确定其基因型, 并进行基因特征分析。方法 采集 2012 年贵州省风疹爆发和散发疑似病例咽拭子标本, 使用 Vero/SLAM 细胞进行病毒分离。经 RT-PCR 方法鉴定为阳性的风疹病毒分离株, 使用 RT-PCR 方法扩增风疹病毒 E1 基因 944 个核苷酸片段, 并对扩增产物进行序列测定和分析, 与 WHO 13 个基因型的 32 个参考风疹病毒株的序列基于 1E 基因的 739 个核苷酸片段构建基因亲缘性关系树。结果 贵州省首次成功分离到 5 株风疹病毒株, 基因亲缘性关系树显示, 该 5 株风疹病毒分离株均属 1E 基因型。5 株风疹病毒分离株之间的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.8%~100.0% 和 100.0%; 与 WHO 1E 基因型参考株中国株 (T14-CH-02) 核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.7%~98.9% 和 100.0%; 与 WHO 1E 基因型参考株马来西亚株 (M1-MAL-01) 核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.5%~97.6% 和 99.5%。结论 2012 年贵州省分离的风疹病毒是 1E 基因型, 与目前我国其他省份流行的风疹病毒基因型一致。本研究为贵州省积累了风疹病毒分子流行病学基线数据。

关键词: 风疹病毒; 序列分析; 1E 基因型

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)32-3849-03

Genetic characterization of rubella virus isolated in Guizhou province in 2012*Tang Xiaomin¹, Zhu Zhen², Ren Gang¹, Zhu Qing¹, Zhang Li¹, Ye Xufang¹

(1. Department of Immunization Programs, Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: **Objective** To identify the rubella virus circulated in Guizhou province in 2012, and confirm the genotype and analyze the genetic characterization of rubella virus isolated. **Methods** The throat swab samples were collected from suspected rubella cases during the rubella outbreak and sporadic in 2012. Rubella virus isolation was performed using Vero/SLAM cells. The presence of viral RNA was detected using real-time RT-PCR after RNA extraction from infected tissue culture cells. Fragments of 944 nucleotides of E1 genes of the isolates were amplified by RT-PCR, the PCR products were directly sequenced and analyzed. The phylogenetic trees based on the 739 nucleotide sequences 1E was conducted with the rubella viruses isolated in Guizhou province in 2012 and 32 WHO reference sequences representing 13 genotypes. **Results** 5 rubella virus strains were isolated in Guizhou province for the first time. The results of phylogenetic analysis showed that all 5 rubella virus isolates belong to genotype 1E. The nucleotide acid and amino acid homology among 5 rubella virus isolates were 99.8%–100.0% and 100.0% respectively. Compared with the WHO reference strain (Chinese strain T14-CH-02), the nucleotide acid and amino acid homology were 98.7%–98.9% and 100.0% respectively; while compared with another WHO reference strain (Malaysia strains M1-MAL-01), the nucleotide acid and amino acid homology were 97.5%–97.6% and 99.5%. **Conclusion** Genotype 1E rubella virus was the predominant genotype in Guizhou province in 2012, which was similar to the other provinces. This study accumulated the molecular epidemiological baseline date in Guizhou province.

Key words: rubella virus; sequence analysis; genotype 1E

风疹是由风疹病毒引起的以发热和出疹为主要临床症状的急性呼吸道传染病, 可经呼吸道和密切接触传播。一般感染后临床症状较轻, 并发症少, 但是如果妊娠早期感染风疹病毒, 可引起胎儿流产, 胎儿死亡或婴儿出生后出现以多器官严重损伤为主要表现的先天性风疹综合征 (congenital rubella syndrome, CRS)^[1-2], 给患儿及其家庭和社会造成沉重的负担, 因此, CRS 是风疹病毒引起的最严重的危害。2004 年, 我国将风疹纳入疾病监测信息报告管理系统管理, 才开始逐步规范全国

风疹疫情报告, 但全国至今也未开展系统的风疹和 CRS 的监测。

目前贵州省只在疑似麻疹病例进行鉴别诊断时进行风疹病毒的血清学检测, 对于风疹病毒的分子流行病学的研究相对较少。本文对 2012 年引起贵州省风疹爆发和散发的患者标本进行病毒分离培养, 并对分离到的风疹病毒进行基因分型和基因特征分析, 以期今后贵州省风疹病毒的分子流行病学研究积累一定的基线数据。

* 基金项目: 贵州省疾病预防控制中心科技基金资助项目 (2011-2-7)。 作者简介: 唐小敏 (1975~), 主管技师, 本科, 主要从事麻疹、风疹病毒实验室监测。

1 材料与方 法

1.1 标本来源、采集及运送 现场采集出疹 5 d 内疑似风疹爆发和散发病例的咽拭子标本,并将标本置于 2 mL 标本运输液(含 2%牛血清、青霉素 1 000 U/mL 和链霉素 1 000 U/mL 的细胞培养液),均在 24 h 内冷藏运送到省级实验室进行病毒分离。标本由所在地疾病预防控制中心(CDC)专业技术人员负责采集。

1.2 风疹 IgM 抗体检测 静脉采血,无菌条件下分离血清,密封于-20 ℃保存。采用深圳科润达生物工程有限公司生产的风疹 IgM 抗体检测试剂盒,用 ELISA 捕获法进行风疹 IgM 抗体检测(市级 CDC 完成检测)。按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 病毒分离 Vero/SLAM 细胞(淋巴信号激活因子转染的非洲绿猴肾细胞)常规培养于斜面试管,当 Vero/SLAM 生长良好,长成合适的单层细胞,倒掉生长液,接种 0.2 mL 标本悬液,37 ℃吸附 2 h,弃标本液,换维持液,置 35 ℃,5%CO₂ 孵箱静止培养,连续培养 7 d,每日观察细胞病变(cytopathic effect,CPE)。同时作好阴性细胞对照。由于风疹病毒不能使细胞发生明显 CPE,因此盲传 3 代,每代病毒分离物置-70 ℃冻存^[3]。Vero/SLAM 细胞由中国 CDC 国家麻疹实验室提供。

1.4 病毒 RNA 的提取和鉴定 使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit(美国 QIA GEN 公司)从分离培养的阳性标本细胞培养液中提取病毒 RNA,提取的 RNA 保存在-20 ℃待用。使用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(Real-time reverse transcript-polymerase chain reaction,Real-time RT-PCR)检测病毒核酸的存在。Real-time RT-PCR 反应体系参照大连宝生物公司 One Step PrimeScript RT-PCR Kit 说明书配制,将上游引物、下游引物和经 FAM 荧光染料标记的探针同时加入反应体系中,于 ABI 7 500 型荧光 PCR 仪上进行反应。引物和探针序列由美国 CDC 提供。

1.5 标准靶核苷酸序列的扩增和测定 经鉴定为阳性的风疹病毒株,进行常规分子流行病学研究用的标准靶核苷酸序列扩增。使用 Takara One-step RNA PCR kit 试剂盒分别扩增 E1 基因 480 个核苷酸片段(8 633~9 112 nt)和 633 个核苷酸片段(8 945 F~9 577 R),基因分型引物序列由美国 CDC 提供^[4-5]。经序列整理后,将两个核苷酸片段序列拼接成用于分子流行病学监测所需的 739 个核苷酸片段(8 731~9 469 nt)。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,使用 QIA Gel Extraction kit 试剂盒(日本 QIA GEN 公司)进行纯化,纯化后的产物在 Perkin Elmer 公司 ABI3100 测序仪上自动完成序列测定和分析。

1.6 序列整理和分析 使用 Sequencher4.0.5 软件,将 944 个核苷酸片段序列截成用于分子流行病学监测所需的 739 个核苷酸片段(8 731~9 469 nt);使用 MEGA5.0 生物学软件进行基因亲缘性关系树的构建^[6];使用 BioEdit7.0 软件进行多序列比对,核苷酸和氨基酸同源性分析^[7]。

2 结 果

2.1 基本情况 2012 年贵州省毕节市七星关区 CDC 从 5 例疑似风疹病例中采集了 5 份咽拭子标本,其中 3 例来自于风疹散发病例,2 例来自于 1 起风疹爆发,病例均为女性学生,年龄为 12~15 岁,免疫史不详。其中 4 例患者血清学检测为风疹 IgM 抗体阴性(出疹后 4 d 内采集);1 例患者为风疹 IgM 抗体

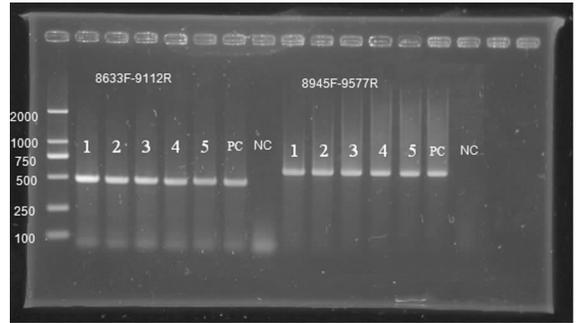
阳性。

2.2 病毒分离和鉴定 5 份咽拭子标本接种到 Vero/SLAM 细胞,未见明显 CPE,经 real-time RT-PCR 鉴定,共分离到 5 株风疹病毒株,根据 WHO 标准命名方法对 5 株风疹病毒株进行命名^[8],见表 1。

表 1 贵州省风疹病毒标准命名及基因分型

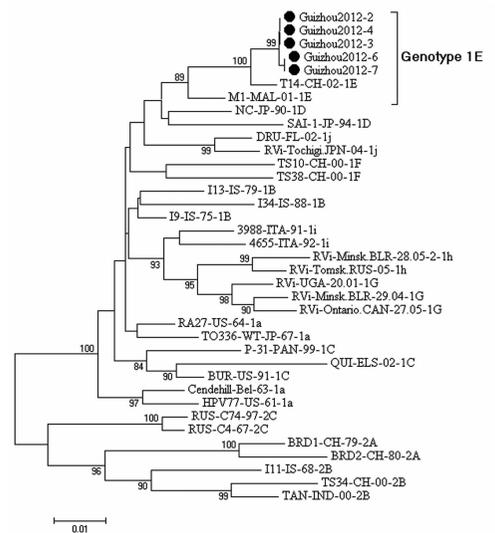
Table with 3 columns: 实验室命名, 野毒株标准命名, 基因型. Rows include Guizhou2012-2 through Guizhou2012-7 with their respective standard names and 1E genotype.

2.3 风疹病毒基因定型的靶核苷酸序列的扩增 扩增 E1 基因 480 个核苷酸片段(8 633 F~9 112 R)和 633 个核苷酸片段(8 945 F~9 577 R),将 RT-PCR 扩增产物经 1.7%的琼脂糖凝胶电泳约 30 min,溴化乙啶染色后可见约 480 bp 和 633 bp 处分别有一条明显的阳性,表明扩增成功,见图 1。



1: Guizhou2012-2; 2: Guizhou2012-3; 3: Guizhou2012-4; 4: Guizhou2012-6; 5: Guizhou2012-7; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照。

图 1 贵州省 2012 年风疹病毒分离株 PCR 产物电泳图



●: Guizhou strains

图 2 贵州省 2012 年株风疹病毒株与 WHO 各基因型参考株基于 739 个核苷酸(8 731~9 469 nt)构建的基因亲缘性关系树

2.4 基因亲缘性关系分析 将分离到 5 株风疹病毒株与 WHO

表 2 贵州省 2012 年风疹病毒分离株核苷酸和氨基酸同源性分析

毒株	M1-MAL-01 *	T14-CH-02 *	Guizhou2012-2	Guizhou2012-3	Guizhou2012-4	Guizhou2012-6	Guizhou2012-7 [△]
M1-MAL-01	—	0.974 [△]	0.976 [△]	0.976 [△]	0.976 [△]	0.975 [△]	0.975 [△]
T14-CH-02	0.995 [▲]	—	0.989 [△]	0.989 [△]	0.989 [△]	0.987 [△]	0.987 [△]
Guizhou2012-2	0.995 [▲]	1.000 [▲]	—	1.000 [△]	1.000 [△]	0.998 [△]	0.998 [△]
Guizhou2012-3	0.995 [▲]	1.000 [▲]	1.000 [▲]	—	1.000 [△]	0.998 [△]	0.998 [△]
Guizhou2012-4	0.995 [▲]	1.000 [▲]	1.000 [▲]	1.000 [▲]	—	0.998 [△]	0.998 [△]
Guizhou2012-6	0.995 [▲]	1.000 [▲]	1.000 [▲]	1.000 [▲]	1.000 [▲]	—	1.000 [△]
Guizhou2012-7	0.995 [▲]	1.000 [▲]	—				

—:此项无数据;△:核苷酸同源性比较;▲:氨基酸同源性比较;* :WHO 1E 基因型参考株。

风疹病毒 13 个基因型的 32 个参考株基于 E1 基因 739 个核苷酸序列构建基因亲缘性关系树^[8],见图 2。结果显示:2012 年贵州省 5 株风疹病毒分离株与 WHO 1E 基因型参考株(中国株 T14-CH-02 和马来西亚株 M1-MAL-01)形成一个分支,属于 1E 基因型,bootstrap 值为 89%。并且与分离于中国参考株 T14-CH-02 在 1E 基因型亲缘关系树上独立成簇,bootstrap 值为 100%。

2.5 核苷酸和氨基酸同源性分析 5 株风疹病毒分离株之间的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.8%~100%和 100%;与 WHO 1E 基因型参考株中国株(T14-CH-02)的核苷酸和氨基酸同源性分别为 98.7%~98.9%和 100%;与 WHO 1E 基因型参考株马来西亚株(M1-MAL-01)的核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.5%~97.6%和 99.5%,见表 2。

3 讨 论

风疹病毒是披膜病毒科风疹病毒属的惟一成员,为有包膜的单股正链 RNA 病毒。基因组中存在两个不重叠的开放读码框架,5'端 ORF 编码两个非结构蛋白 P150 和 P90,参与病毒的复制;3'端的 ORF 编码 3 个病毒的结构蛋白,基因的排列顺序为 5'-C-E2-E1-3'。其中 E1 基因全长 1 443 个核苷酸,编码 481 个氨基酸,具有重要的中和抗原决定簇和血凝抑制活性,抗原表位位于 E1 基因编码的 245~284 氨基酸上。因此,WHO 将 E1 基因的 739 个核苷酸(8 731~9 469 nt,159~404 aa)作为基因型划分和常规分子流行病学的标准靶核苷酸序列^[8-9],扩增并测定此基因片段,并与 WHO 参考株的序列比较,可以鉴定风疹病毒的基因型。风疹病毒只有 1 个血清型,但有多个基因型,包括 9 个基因型(1B、1C、1D、1E、1F、1G、2A、2B、2C)和 4 个临时基因型(1a、1h、1i 和 1j)^[10-11]。

我国虽然没有开展系统的风疹和 CRS 的监测,但是大部分省市 CDC 麻疹实验室已陆续将风疹病毒学监测整合到麻疹监测工作中去,获得了比较完整的风疹病毒分子流行病学基线数据。有学者于 1999 年开始开展我国风疹病毒的分子流行病学研究,初步建立了风疹病毒毒株库和基因数据库^[12]。随后 1999~2002 年通过对部分省市风疹病毒学监测,发现至少有 4 个基因型(1E、1F、2A、2B)在我国流行^[4],2003~2009 年分子流行病学研究表明,1E 基因型替代其他基因型逐渐成为我国风疹病毒流行的优势基因型^[3-5]。但近两年在全国范围内出现 2B 基因型病毒的流行(未发表资料),且与越南、日本、阿根廷等国近几年流行的 2B 基因型风疹病毒在基因亲缘性关系上较为接近^[13]。因此,有必要开展风疹病毒学监测工作,获得的分子流行病学数据以便了解病毒的来源,追踪病毒的传播途

径,阐述特定区域内随着时间推移病毒的变异情况,是实现风疹控制和消除的基础性工作之一。

2012 年贵州省首次成功分离到 5 株风疹病毒,通过基因亲缘性关系以及核苷酸和氨基酸同源性分析,证实 5 株分离株全部为 1E 基因型风疹病毒,与目前我国其他省份流行的风疹病毒基因型一致^[14-15]。且与 WHO 1E 基因型中国参考株(T14-CH-02 株)同源性较高,表明贵州省流行的 1E 基因型风疹病毒为我国本土流行的 1E 基因型风疹病毒。5 株风疹病毒分离株之间核苷酸和氨基酸同源性均接近 100%,且 5 株风疹病毒均来源于毕节七星关区,提示 2012 年同一 1E 基因型风疹病毒在该地区传播。

虽然本研究结果为今后贵州省风疹病毒的分子流行病学研究积累了一定的基线数据,进一步丰富了我国风疹病毒毒株库和基因数据库,但是也要清晰的认识到贵州省风疹病毒学监测还很薄弱,与其他省市相比还存在着很大的差距,需要进一步加强并扩大贵州省风疹的病毒学监测,提高爆发疫情病原学标本采集率和病毒分离率,建立贵州省完整的风疹病毒分子流行病学基线数据,为贵州省风疹和 CRS 的控制工作提供实验室依据。

参考文献:

- [1] Lee JY, Bowden DS. Rubella virus replication and links to teratogenicity[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(4): 571-587.
- [2] 林建华, 蒋萌. 风疹病毒感染对妊娠结局的影响[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2011, 27(8): 567-569.
- [3] 朱贞, 郭学斌, 崔爱利, 等. 中国 2007~2008 年风疹流行病学和病毒基因特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(3): 201-204.
- [4] Zhu Z, Abernathy E, Cui A, et al. Rubella virus genotypes in the people's republic of China between 1979 and 2007: A shift in endemic viruses during the 2001 rubella epidemic[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1775-1781.
- [5] Zhu Z, Cui A, Wang H, et al. Emergence and continuous evolution of genotype 1E rubella viruses in China[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 353-363.
- [6] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [7] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program (下转第 3855 页)

上腺素维持气道的舒张,同时由于和神经细胞起源相同,这些细胞不仅具有内分泌功能,还有向神经细胞转潜在分化能力。给孕鼠持续注射 NGF 可以使肾上腺髓质嗜铬细胞向交感神经元转化,而引起其结构和功能的改变^[12],同时原代培养的外源性 NGF 作用下,大鼠肾上腺嗜铬细胞可以长出突起,表现出神经细胞表型^[13]。本研究 RSV 组大鼠超微结构结果显示肾上腺髓质细胞细胞膜可见杵状和绒毛状突起,其中线粒体增多,间隙增宽,嗜铬颗粒浓度降低,同时血清中肾上腺素水平明显低于抗 NGF 组和对照组,说明 NGF 可以使血清中肾上腺素的表达下降。

神经丝(neurofilament protein, NF)是构成神经元胞体和神经轴突细胞骨架的主要成分^[14],存在于神经细胞、外周神经以及交感神经节中。本研究显示,反复 RSV 感染后肾上腺髓质中 NF-L mRNA 表达明显增强,而抗 NGF 抗体干预后 NF-LmRNA 表达下降,说明反复 RSV 感染后能促进肾上腺髓质细胞突触数量的增加和成熟,提示肾上腺髓质细胞有向神经细胞转化的倾向,而 NGF 可能是诱导肾上腺髓质细胞向神经细胞转化的重要因素。再次验证了过度表达的 NGF 可能诱导具有内分泌功能的肾上腺髓质细胞向神经细胞转化,同时可能伴有内分泌功能的改变。

因此,作者推测 RSV 反复感染后过度表达的 NGF 可能通过诱导肾上腺髓质细胞向神经细胞转化导致循环血中肾上腺素浓度下降,难以维持气道舒张,从而参与哮喘的发生和发展。

参考文献:

- [1] El Omari K, Dhaliwal B, Ren J, et al. Structures of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein from two crystal forms: details of potential packing interactions in the native helical form[J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011, 67(Pt 10): 1179-1183.
- [2] Wu P, Hartert TV. Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9(9): 731-745.
- [3] Hu C, Wedde-Beer K, Auais A, et al. Nerve growth factor and nerve growth factor receptors in respiratory syncytial virus-infected lungs [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(5): L494-502.
- [4] Zamora MR, Budev M, Rolfe M, et al. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 531-538.
- [5] Astor TL. RNA interference, RSV, and lung transplantation: A promising future for siRNA therapeutics[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(5): 427-428.
- [6] Scuri M, Chen BT, Castranova V, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticle exposure on neuroimmune responses in rat airways [J]. *J Toxicol Environ Health*, 2010, 73(12): 1353-1369.
- [7] Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117(1): 52-76.
- [8] Hahn C, Islamian AP, Renz H, et al. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(4): 787-794.
- [9] 汪俊, 胡成平, 梁伟军, 等. 哮喘大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞表型转化与神经生长因子表达水平初探[J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27(4): 270-272.
- [10] Feng JT, Li XZ, Hu CP, et al. Neural plasticity occurs in the adrenal medulla of asthmatic rats[J]. *Chin Med J*, 2010, 123(10): 1333-1337.
- [11] Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system: Roles in inflammation and cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1183(2): 183-194.
- [12] Kodani M, Yang G, Conklin LM, et al. Application of taqman low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 6(21): 2175-2182.
- [13] Chakraborty S, Piedimonte G, Ding M, et al. Fate of airway epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles: NGF-regulated apoptotic death[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(1): 21-25.
- [14] Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions[J]. *Ann Rev Microbiol*, 2010, 64(1): 123-141.
- [15] 朱贞, 许文波, 毛乃颖, 等. 2003~2007 年中国风疹病毒基因特征分析[J]. *病毒学报*, 2008, 24(1): 7-16.
- [16] 李崇山, 杨玉颖, 王建国, 等. 2001~2011 年上海市风疹病毒分子流行病学研究[J]. *病毒学报*, 2012, 28(2): 124-129.
- [17] 雷玥, 田宏, 刘杨, 等. 天津地区风疹病毒的分子特征分析[J]. *天津医药*, 2010, 38(7): 552-555.
- [18] 王艳, 李丹, 马艳, 等. 辽宁省风疹野病毒基因特征分析[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(2): 193-195.

(收稿日期: 2013-06-08 修回日期: 2013-07-29)

(上接第 3851 页)

- [5] for Windows 95/98/NT[J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41(1): 95-98.
- [6] World Health Organization. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2005, 80(14): 126-132.
- [7] Frey TK. Molecular biology of rubella virus[J]. *Adv Virus Res*, 1994, 44(1): 69-160.
- [8] World Health Organization. Global distribution of measles and rubella genotypes—update[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2006, 81(51/52): 474-479.
- [9] World Health Organization. Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses, 2007[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2007, 82(2): 216-222.

(收稿日期: 2013-06-08 修回日期: 2013-07-14)