

BMCMC 法分析 2009 年墨西哥 H1N1 流感病毒与 中国流感病毒的进化关系

刘中勇¹, 吴晓薇^{1,2}, 林志雄¹, 张婷婷²

(1 广东检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:从 GenBank 上下载所有 1978—2009 年在中国分离的 H1N1 亚型流感病毒的 HA 和 NA 基因及所有同期在中国分离的 A 型流感病毒(宿主包括人、猪和禽)的 PB1、PB2、PA、NS、NP 和 M 基因的序列,将这些基因序列与 2009 年在中国发生的墨西哥 H1N1 流感病毒的对应基因序列进行 BMCMC 法分析,绘制 BMCMC 进化树;结果揭示中国发生的墨西哥 H1N1 流感病毒的 HA 和 NA 基因相对独立于中国季节性 H1N1 流感病毒;M 基因相对独立于中国国内的季节性流感病毒和禽源流感病毒;PB1 基因包含在季节性流感病毒的分群内;PB2 基因和 NS 基因与国内重排的流感病毒相关,但相对独立于国内的季节性流感病毒和禽源流感病毒;PA 基因包含在国内禽流感病毒的分群内;NP 基因则与国内传统的猪流感病毒相关,但相对独立于国内的季节性流感病毒和禽源流感病毒。

关键词:BMCMC 法; H1N1 流感病毒; 进化关系

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)02-0113-04

Phylogenetic Analysis of the Relationship Between A Influenza Virus H1N1(2009) and Other A Influenza Virus in China by BMCMC

LIU Zhong-yong¹, WU Xiao-wei^{1,2}, LING Zhi-xiong¹, ZHANG Ting-ting²

(1 Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University)

Abstract: The HA and NA gene sequences of Chinese H1N1 subtype viruses and the sequences of all the rest genes of the Chinese A influenza viruses from different hosts (including human, pig and poultry) collected during 1978—2009 were downloaded from GenBank. All these sequences were aligned against the sequences of 2009 H1N1 viruses in China, and the phylogenetic trees were reconstructed by BMCMC. The result showed that HA and NA genes of 2009 H1N1 viruses in China were relatively different from Chinese seasonal H1N1 subtype viruses. M gene of H1N1 viruses were relatively different from Chinese seasonal flu viruses and avian flu, PB1 gene of 2009 H1N1 viruses were included in the cluster of Chinese seasonal flu viruses, PB2 gene and NS gene of 2009 H1N1 viruses were probably associated with Chinese reassortant flu viruses but relatively different from Chinese seasonal flu viruses and avian flu viruses, PA gene of 2009 H1N1 viruses were included in the cluster of Chinese avian flu viruses, NP gene of 2009 H1N1 viruses were probably associated with Chinese classical swine flu viruses but relatively different from Chinese seasonal flu viruses and avian flu viruses.

Key words: BMCMC method; H1N1 influenza virus; phylogenetic relationship

收稿日期:2009-09-02

作者简介:刘中勇(1962—),男,研究员,E-mail:liuzy@iqtc.cn

基金项目:2007 年国家质检公益性行业科研项目(10-65)

1998年,在美国首次发现3源重排的猪流感病毒,该病毒的基因组包含的基因片段有人、猪和禽的A型流感病毒^[1-2]. 2005—2009年,在美国先后发现了12个人感染3源重排的猪流感病毒的病例^[3]. 2009年4月15日,美国CDC首次报道墨西哥甲型H1N1流感,截至2009年6月21日8时,共有99个国家/地区报告了51 250例墨西哥H1N1流感病例(<http://www.who.int/>). 1918年曾经发生的西班牙H1N1流感大流行,死亡人数约为2 000多万^[4]. 流感病毒是负链RNA,由8个分节段的基因片段组成,流感病毒RNA聚合酶缺乏修正活性,所以各个基因片段在复制的过程中极容易发生基因变异^[5]. 如果同一宿主被不同的流感病毒感染,不同的流感病毒的不同基因会发生洗牌效应从而产生基因重排^[6]. 每一个复制循环都可能会随着基因重组而产生变异株,绝大多数变异株对病毒本身有致死性,但个别变异株的有利突变在选择压力下成为优势毒株,成为新的流行株. 墨西哥H1N1流感没有发生在季节性流感流行的季节,表明墨西哥H1N1流感病毒的某些基因与季节性H1N1流感病毒有所不同.

BMCMC法(Baysian markov chain monte carlo)是近年新出现的进化分析方法^[7],该方法出现后马上被广泛应用于各种基因的进化分析,在很大程度上取代了过去常用的Neighbour joining法和Maximum likelihood法. BMCMC法的主要特点包括^[8]:通过计算事后概率模拟事前概率,大大节约计算时间. 以事后概率替代bootstrap值,增加了进化树分支的可信度. 分子定年法引入分子钟假设和置信区间等统计方法,使推导结果更接近真实情况.

本研究通过从GenBank上下载所有1978—2009年在中国分离的H1N1亚型流感病毒的HA和NA基因以及同期在中国分离的A型流感病毒(宿主包括人、猪和禽)的PB1、PB2、PA、NS、NP和M基因,将这些基因序列与2009年在中国发生的墨西哥H1N1流感病毒的对应基因进行BMCMC法分析,绘制BMCMC进化树,揭示墨西哥H1N1流感病毒的基因组分子特征及其起源的进化规律.

1 材料与方法

1.1 数据库

从GenBank上下载1978—2009年所有中国分离的H1N1流感病毒的HA和NA基因序列及1978—2009年所有在中国分离的A型流感病毒(宿主包括人、猪和禽)的PB1、PB2、PA、NS、NP和M基

因序列.

1.2 分析软件

MEGA 4.0与BEAST v1.4.

1.3 HA、NA、PB1、PB2、PA、NS、NP和M基因的序列比对与BMCMC进化树分析

从GenBank上下载HA基因序列共36条、NA基因序列共29条、PB1基因序列共317条、PB2基因序列共336条、PA基因序列共360条、NS基因序列共559条、NP基因序列共297条和M基因序列共194条. 将这些序列的fasta格式文件导入MEGA 4.0,然后将核苷酸序列转换成蛋白质序列,选择完整的开放式阅读框去除其他多余的部分,运行Clustal W程序在BLOSUM模式下进行序列比对,再将比对后的蛋白质序列换回核苷酸序列,此时将alignment结果文件输出成Nexus格式,将文件导入BEAST v1.4,然后在GTR核酸替代模型下进行burn-in cycle = 5 000 000的BMCMC过程绘制BMCMC进化树. 观察进化树的lnLikelihood值是否趋于收敛,将lnLikelihood值趋于收敛的进化树结果以newick格式输出.

2 结果

2.1 HA基因的进化树分析

图1(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的H1N1病毒与2009年墨西哥H1N1病毒的HA基因明显存在于BMCMC进化树的不同分支上(分支具有100%的事后概率支持). 在进化树上,大体可将病毒分为2群,第1群主要为不同年代的传统中国季节性流感组成(包括人源流感和禽源流感),第2群主要为2009年发生的墨西哥H1N1流感. 两者的HA基因处于相对独立的分支,结果揭示了国内发生的墨西哥H1N1病毒的HA基因在进化上与不同年代的中国国内流感毒株的HA基因相距较远.

2.2 NA基因的进化树分析

图2(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的H1N1病毒与2009年墨西哥H1N1病毒的NA基因明显存在于BMCMC进化树的不同分支上(分支具有100%的事后概率支持). 在进化树上,大体可将病毒分为2群,第1群主要为不同年代传统中国季节性流感病毒组成(包括人源流感病毒和禽源流感病毒),第2群主要为2009年发生的墨西哥H1N1流感病毒. 两者的NA基因处于相对独立的分支,与

HA基因的情况类似,结果揭示了国内发生的墨西哥H1N1病毒的NA基因在进化上与不同年代的中国国内流感病毒的NA基因相距较远.

2.3 PB1基因的进化树分析

图3(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的各亚型流感病毒大体可分为3个分群(分支具有100%的事后概率支持),第1群主要为不同年代的传统中国禽源流感病毒组成(包括禽源流感H5、H7和H9亚型等),第2群主要为中国传统的季节性H3N2亚型流感病毒组成(其中包括1个2009年发生的墨西哥H1N1流感病毒的分支),第3群主要为中国重组猪流感病毒(包括人源H1N1亚型、猪源H1N1亚型和猪源H1N2亚型).与HA和NA基因不同,2009年墨西哥H1N1病毒的PB1基因存在于BMCMC进化树的中国传统的季节性H3N2亚型流感病毒的分支内,与H3N2亚型PB1基因的关系比较接近.结果揭示了国内发生的墨西哥H1N1病毒的PB1基因在进化上与不同年代的中国国内禽源流感病毒和中国的重组猪流感病毒的PB1基因相距较远,墨西哥H1N1病毒的PB1基因却与中国传统季节性H3N2亚型流感病毒的PB1基因相关.

2.4 PB2基因的进化树分析

图4(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的各亚型流感病毒大体可分为4个分群(分支具有81%~100%的事后概率支持),第1群主要为不同年代的传统中国禽源流感病毒组成(包括禽源流感H5、H7和H9亚型等),第2群主要为2009年墨西哥H1N1病毒,第3群主要为中国的重组猪流感病毒(包括猪源H1N2亚型),第4群主要为中国传统的季节性H1N1亚型和H3N2亚型流感病毒组成.2009年墨西哥H1N1病毒的PB2基因单独存在于BMCMC进化树的一个分支上,明显独立于中国禽源流感病毒分支、中国的重组猪流感病毒分支与中国传统季节性H1N1和H3N2亚型流感病毒的分支.结果揭示了国内发生的墨西哥H1N1病毒的PB2基因在进化上与不同年代的中国国内禽源流感病毒、中国的重组猪流感病毒和中国传统季节性H1N1和H3N2亚型流感病毒的PB2基因相距较远.

2.5 PA基因的进化树分析

图5(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的各亚型流感病毒大体可分为2个分群(分支具

有98%~100%的事后概率支持),第1群主要为不同年代的传统中国禽源流感病毒组成(包括禽源流感H5、H7和H9亚型等,其中也包括1个2009年发生的墨西哥H1N1流感病毒分支),第2群主要为中国传统的季节性H1N1和H3N2亚型流感病毒组成.2009年墨西哥H1N1病毒的PA基因存在于BMCMC进化树的传统中国禽源流感病毒组成的分支内,与H6N2亚型禽流感病毒的PA基因的关系比较接近.结果揭示了国内发生的墨西哥H1N1病毒的PA基因在进化上与不同年代的中国国内禽源流感病毒的PA基因相关,墨西哥H1N1病毒的PA基因却与中国传统季节性H1N1和H3N2亚型流感病毒的PA基因相距较远.

2.6 NS基因的进化树分析

图6(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的各亚型流感病毒大体可分为4个分群(分支具有83%~100%的事后概率支持),第1群主要为不同年代的传统中国禽源流感病毒组成(包括禽源流感H5、H7和H9亚型等),第2群主要为中国重组猪源流感病毒(其中包括1个2009年发生的墨西哥H1N1流感病毒的分支),第3群主要为中国传统的季节性H1N1亚型和H3N2亚型流感病毒组成,第4群主要为中国重组禽流感病毒.2009年墨西哥H1N1病毒的NS基因存在于中国的重组猪流感病毒分支中(包括H3N2、H1N1和H1N2猪流感病毒).结果揭示了国内发生的墨西哥H1N1病毒的NS基因在进化上与不同年代的中国国内重组猪源流感病毒的NS基因相关、与中国的重组禽流感病毒、中国传统的季节性H1N1和H3N2亚型流感病毒、中国传统禽流感病毒的NS基因相距较远.

2.7 NP基因的进化树分析

图7(详见http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html)所示,1978—2009年中国分离的各亚型流感病毒大体可分为3个分群(分支具有100%的事后概率支持),第1群主要为不同年代传统中国禽源流感病毒组成(包括禽源流感H5、H7和H9亚型等),第2群主要为2009年墨西哥H1N1病毒与重组猪源流感病毒组成,第4群主要为中国传统季节性H1N1亚型和H3N2亚型流感病毒组成.2009年墨西哥H1N1病毒的NP基因单独存在于BMCMC进化树的一个分支上明显独立于中国禽源流感病毒分支与中国传统的季节性H1N1和H3N2亚型流感病毒的分支,而与中国重组猪源流感病毒

相关. 结果揭示了国内发生的墨西哥 H1N1 病毒的 NP 基因在进化上与不同年代的中国国内禽源流感病毒和中国传统的季节性 H1N1 和 H3N2 亚型流感病毒的 NP 基因相距较远.

2.8 M 基因的进化树分析

图 8 (详见 http://blog.sina.com.cn/s/blog_64a543d00100guw4.html) 所示, 1978—2009 年中国分离的 H1N1 病毒与 2009 年墨西哥 H1N1 病毒的 M 基因明显存在于 BMCMC 进化树的不同分支上 (分支具有 100% 的事后概率支持). 在进化树上, 大体可将病毒分为 3 群, 第 1 群主要为不同年代的传统中国禽流感病毒组成 (包括禽源流感 H5、H7 和 H9 亚型等), 第 2 群主要为 2009 年发生的墨西哥 H1N1 流感病毒, 第 3 群主要为传统中国季节性 H1N1 亚型和 H3N2 亚型流感病毒. 2009 年发生的墨西哥 H1N1 流感的 M 基因处于相对独立的分支, 结果揭示了国内发生的墨西哥 H1N1 病毒的 M 基因在进化上与不同年代的中国国内流感病毒的 M 基因相距较远.

3 讨论

本研究结果显示, 2009 年在中国发生的墨西哥 H1N1 流感病毒基因组在进化的关系上显得相当复杂, HA、NA 和 M 基因在进化上与不同年代的中国国内流感病毒的 HA 基因相距较远, 而 PB1 基因与中国的季节性流感病毒关系最近, PB2 基因、NS 基因和 NP 基因则与中国重组猪源流感病毒相关, PA 基因与中国禽流感病毒关系最近.

各基因片段的来源不相同预示着墨西哥 H1N1 流感病毒在此次发生之前已经在世界上不同的地方流行过一段时间, 从而在不同的地方和不同宿主身上通过基因重排获得不同宿主来源的基因片段. 5 个基因片段来源于不同的 A 型流感病毒. 其中 HA、NA 和 M 基因独立于中国传统的季节性流感病毒的对应片段, 而这几个基因编码的恰好是流感病毒的表面蛋白与宿主的受体结合和激发离子通道有关, 这几个基因的变异很可能导致了流感病毒的流行规律, 该结果可以解释墨西哥 H1N1 流感发生的时间不是季节性流感流行的季节.

本研究的结果表明, 墨西哥 H1N1 流感病毒很可能是经过长时间基因组重排形成的新型流感病毒, 虽然该病毒本身的致死率很低, 但是该病毒的流行性极高 (在短短几个月内蔓延全世界 5 大洲的绝大多数国家) 已经足以引起我们的警惕. 低死亡率作

为墨西哥 H1N1 流感的特征之一^[9], 在身体抵抗力较高的人群甚至不出现任何发病症状, 但可以导致该病毒长期潜伏于人群中, 墨西哥 H1N1 流感的诊断和防治将面临严峻的考验. 如果未来出现新型的致死率高兼流行性高的重排病毒, 那么后果将非常严峻. 因此, 我们建议各国政府的相关部门要定期对人、猪和禽流感病毒进行抽样监测, 不同地区的政府相关部门要依据不同地方定期进行的流感病毒全基因组测序结果制备相应的疫苗, 同时立法禁止各地方滥用疫苗, 因为不当使用疫苗可以加速流感病毒进化.

参考文献:

- [1] OOLSEN C W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America [J]. *Virus Res*, 2002, 85: 199-210.
- [2] VINCENT A L, MA W, LAGER K M, et al. Swine influenza viruses: a North American perspective [J]. *Adv Virus Res*, 2008, 72: 127-154.
- [3] SHINDE V, BRIDGES C B, UYEKI T M, et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005—2009 [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360: 2616-2625.
- [4] JORDAN H, MOSQUERA M, NAIR H, et al. Swine-origin influenza A (H1N1) virus infections in a school—New York City, April 2009 [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2009, 58 (Dispatch): 1-3.
- [5] DOLIN R, WISE T G, MAZUR M H, et al. Immunogenicity and reactogenicity of influenza A/New Jersey/76 virus vaccines in normal adults [J]. *J Infect Dis*, 1977, 136 (Suppl): S435-S442.
- [6] CATE T R, KASEL J A, COUCH R B, et al. Clinical trials of bivalent influenza A/New Jersey/76-A/Victoria/75 vaccines in the elderly [J]. *J Infect Dis*, 1977, 136 (Suppl): S518-S525.
- [7] BRET L, DONALD L. SIMON K. Markov chain monte carlo algorithms for the bayesian analysis of phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16 (6): 750-759.
- [8] PAUL O, LEWIS P. Phylogenetic systematics turns over a new leaf [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2001, 16 (1): 30-37.
- [9] CARRAT F, VERGU E, FERGUSON N M, et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies [J]. *Am J Epidemiol*, 2008, 167: 775-785.

【责任编辑 柴 焰】