

柯萨奇病毒 A16 型 VP1 区基因变异和进化分析

任倩 王世富 张忠 于爱莲 张乐海

【摘要】 目的 分析 2010~2011 年本院分离的 2 株柯萨奇病毒 A16 (Cox16) VP1 区核苷酸(氨基酸)变异和进化特征,探讨 CoxA16 基因变异与临床特征的相关性。方法 选取 CoxA16 所导致的手足口病患儿的咽拭子标本,采用 RT-PCR 法扩增其 VP1 区 3'-端核苷酸序列(约 400 bp),所得序列与近几年中国内地和 1951~2010 年世界范围流行的 CoxA16 分离株进行核苷酸序列比对,并分析 VP1 区氨基酸的变异。结果 本研究中 2 例患儿均有典型的手足口病表现:发热,双手、足红色皮疹和口腔黏膜散在的疱疹,其中分离出 JN2011-B11 的患儿有轻微肝功能损害。此 2 株 CoxA16 均属于 B1b 基因型,与 2008 年中国株(QH0549T)的同源性最高,核苷酸和氨基酸的同源性分别为 96.0% 和 99.1%。近 11 年中国内地 CoxA16 VP1 区 C-端氨基酸序列变异很小,仅在 225、235 和 266 三个位点出现。资料显示世界范围内 2001 年后的流行株以 B1a 和 B1b 为主。结论 近 11 年来,中国内地 CoxA16 毒株 VP1 区基因的变异程度较低,核苷酸变异率为 4%~12.7%。本研究所分离的 2 株 CoxA16 毒株核苷酸和氨基酸同源性均较高,达 97.7% 和 96.8%。该病毒基因变异与临床特征的相关性尚有待于进一步验证。

【关键词】 柯萨奇病毒 A16 型;VP1 区;变异;进化;临床特征

Analysis on variation and evolution of the VP1 region of Coxsackievirus A16 REN Qian, WANG Shi-fu, ZHANG Zhong, YU Ai-lian, ZHANG Le-hai. The Laboratory of Qilu Children's Hospital of Shandong University, Jinan 250022, China

Corresponding author: ZHANG Le-hai, Email: zlh6813@126.com

【Abstract】 Objective To analyze the characteristics of variation and evolution in the VP1 region of Coxsackievirus A16 (CoxA16) and investigate the relationship between the mutations and clinical features thorough the two virus isolates obtained from children with hand, foot and mouth diseases (HFMD) in 2010 and 2011 in our hospital. **Methods** Two throat swabs from children with HFMD caused by CoxA16 were selected and the 3'-terminal regions of VP1 (about 400 bp) were amplified by RT-PCR technique. Nucleotide sequences of this study with the strains from the mainland of China in recent years and the epidemic ones worldly during 1951-2010 were aligned, then the amino acid variation of the VP1 region was analyzed. **Results** The two patients had typical manifestations of HFMD: fever, the red rash in hands and foot and herpes in oral mucosa, while one of them (JN2011-B11) had a mild liver function damage. The two isolates identified were most closely with B1b genotypes. Nucleotide and amino acid homology of the two sequences with QH0549T were 96.0% and 99.1%, respectively. In recent 11 years, there was little variation in VP1 C-terminal region of CoxA16 in mainland, which only occurred in 225, 235 and 266 locus. **Conclusions** The variation of CoxA16 VP1 region was lower in recent 11 years in mainland China. The nucleotide variation rate was 4%-12.7%. In this study, the nucleotide and amino acid homology of the two Ji'nan strains were relatively high, up to 97.7% and 96.8%, respectively. The relationship between CoxA16 gene mutation and the clinical features needed to be further verified.

【Key words】 Coxsackievirus A16; VP1 region; Variation; Evolution; Clinical features

肠道病毒 A 组(human Enterovirus A, HEVA)是

引起婴幼儿感染的重要病毒,以引发手足口病和中枢神经系统感染较为常见。柯萨奇病毒 A16 型(Coxsackievirus A16, CoxA16)是引起手足口病最常见的病原体^[1-2],属于 HEVA。与 EV71 相比, CoxA16 引起的手足口病症状较轻,因此,以往分子分型和进化分析多以 EV71 为主,而对 CoxA16 的研究较少。HEV 基因组是无包膜的单股正链 RNA,结构

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.006

基金项目:济南市科学技术发展计划第一批项目(No. 201201063)

作者单位:山东大学齐鲁儿童医院(任倩、王世富、张乐海);泰山医学院病原生物学专业(张忠、于爱莲)

通讯作者:张乐海,Email: zlh6813@126.com

蛋白包含较多主要的抗原中和位点,因此,VP1 区或 3'-VP1 区一直是 HEV 基因分型和进化分析最常用的区域^[3-4]。为分析 CoxA16 的分子特征和变异进化特点及其与临床特征的相关性,本研究对 2 例分离自本院住院患儿 CoxA16 VP1 区 3'-端的基因序列进行测定,并与近年来中国内地流行株以及 1951 ~ 2010 年世界范围内流行的 CoxA16 代表株进行变异分析,并构建系统进化树。

资料与方法

一、肠道病毒的分子鉴定

采用中山大学基因股份有限公司生产的“肠道病毒通用型、EV71、CoxA16”荧光探针 PCR 试剂盒进行病原鉴定。选取 2 例 CoxA16 阳性的咽拭子标本(JN2010-C07 和 JN2011-B11 分别为 2010 年 6 月和 2011 年 9 月所收集),应用 RT-PCR 法对 VP1 区 3'-端的基因序列进行测定和分析。

二、RNA 提取及 RT-PCR 扩增

用 QIAamp Viral RNA Kit 提取 2 例咽拭子中的病毒 RNA。利用简并引物 040-011 对 VP1 区 3'-端的 407 bp(2905 ~ 3311) 基因片段进行 RT-PCR 扩增^[5]。引物序列为:040:5'-ATGTAYRTICIMCIGG IGC-3'(2905 ~ 2924)(CoxA16 编号),011:5'-GCICIGAYTGITGCCRAA-3'(3311 ~ 3292)(CVB1 编号)。

RT-PCR 试剂盒为 TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit。反应体系为:RT-PCR 反应混合酶 2 μ l,缓冲液 25 μ l,上下游引物(20 μ mol/L)各 1 μ l, RNA 模板 10 μ l, RNase Free dH₂O 11 μ l,共 50 μ l。扩增条件为:50 $^{\circ}$ C 30 min;94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,共 41 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,切取目的条带,利用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Qiagen)进行回收。

三、序列测定和分析

回收后的 DNA 由上海博尚生物科技有限公司进行序列测定。采用 DNAMAN 5.2.2 和 Bio Edit 7.0.9.0 分析软件进行序列比对,并构建进化树。

系统进化分析所采用序列均来自美国国立卫生研究院(NIH)生物技术信息中心(NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上的 GenBank 核酸序列数据库。

结 果

一、病例的临床诊疗及预后

两例患儿均诊断为手足口病,有典型的临床特征,表现为发热、双手、足散在的红色丘疹及口腔黏膜散在疱疹,最高体温达 38.5 $^{\circ}$ C。入院时两例患儿血常规检测显示白细胞计数均高于 $11 \times 10^9/L$,其中 1 例患儿 AST 为 56 U/L、ALT 为 43 U/L,提示肝功能轻度损害。两例患儿辅助性 T 淋巴细胞均偏低(26.69%~36.69%)。其咽拭子标本经实时荧光定量 PCR 检测,CoxA16 为阳性。

临床给予此两例患儿以手足口病 II 级护理,对症治疗以利巴韦林抗病毒、热毒宁清热解毒为主,并给予多种维生素营养支持治疗,促进疾病恢复。对其中 1 例有肝功能损害的患儿给予谷胱甘肽保肝治疗。治疗约 1 周后两例患儿均病情平稳,皮肤皮疹消退,肝功能复常,均达临床治愈标准,准予出院。

二、RT-PCR 检测结果

选择对 HEVA VP1 区 3'-端序列具有较高特异性的兼并引物 040-011,应用 RT-PCR 法对 2 例 CoxA16 阳性标本进行基因序列测定和分析。扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

三、CoxA16 VP1 区 3'-端同源性分析

将测序所得 2 株 CoxA16 VP1 序列与 CoxA16 5 个基因型(亚型)的 61 个 VP1 区序列进行比对。发现此 2 个分离株之间核苷酸和氨基酸同源性较高,分别为 97.7% 和 96.8%,且与 B1b 亚型的同源性较高,核苷酸和氨基酸的同源性分别为 90.5%~95.5% 和 96.8%~100%,其中与 QH0549T (GenBank 号:GQ429274)同源性最高,达 96.0% 和 99.1% (见图 2~3),与 A 型同源性最低(78.0% 和 91.9%),与 B2 型代表株同源性分别为 87.3%~88.4% 和 99.1%~100%,见表 1。

表 1 本研究分离病毒与 CoxA16 各基因型代表株 VP1 区核苷酸及氨基酸同源性(%)

毒株	A	B1a	B1b	B1c	B2
JN-2010-C07	77.9(95.2)	90.3~92.3(95.9~100)	90.5~95.5(96.8~100)	88.5~90.7(98.3~99.1)	86.3~87.8(99.1~100)
JN-2011-B11	78.0(91.9)	90.5~92.7(96.8~100)	90.7~95.2(96.8~100)	88.3~90.5(98.3~99.0)	86.5~88.0(99.1~100)

注:表格中数值表示方法:核苷酸同源性(氨基酸同源性)

四、CoxA16 VP1 区 C-端氨基酸变异分析

本研究中 2 个病毒株与 2000 ~ 2010 年中国内地 CoxA16 分离株相比, 10 年内中国内地 CoxA16 VP1 区 C-端氨基酸序列的变异较小, 仅在 225、235 和 266 三个位点出现。2003 年北京分离株 (AY821798) 变异体现为 225 位 Y→C, 2004 年深圳 (AY895093) 和 2008 年山东分离株 (GQ253384) 变异体现为 235 位 V→I, 2003 年北京 (AY821798) 和 2008 年青海分离株 (GQ429274) 变异体现为 266 位 M→L。CoxA16 中国分离株 VP1 区 C-端氨基酸序列的变异分析结果如图 4 所示。JN2010 和 JN2011 与大部分毒株相比, 无氨基酸变异位点出现。

与 1951 ~ 2010 年非中国区域 CoxA16 B1 亚型 VP1 区 C-端氨基酸序列比较发现, 234、239 和 288 三个位点变异较高 (图 5)。在 234 位点, B1a、B1b 和

B1c 三个亚型均存在氨基酸变异 (V→I), 在 239 位 B1a 亚型出现 I→T, B1c 亚型出现 A→T, 在 288 位 B1a 和 B2 亚型则出现 A→T。

五、CoxA16 病毒基因系统进化分析

将本研究中 2 个病毒株与 61 个 CoxA16 病毒株进行系统进化分析, 并以 EV71 原型株 BrCr 作为组外对照构建系统进化树 (图 6)。由进化树可见, CoxA16 A 型中仅有 G10 一个病毒株, 为最早被分离到的毒株。B2 型多分离自 1981 ~ 2000 年的日本和马来西亚, 2000 年以后, B1 型取代 B2 型成为 CoxA16 主要的流行型别, B1a 和 B1b 亚型主要流行于东南亚, 而在其他区域较少见。本研究中 2 个毒株均属于 B1b 型。B1c 亚型仅见于 2005 年分离自马来西亚和 2010 年分离自法国的 3 个毒株。



注: M: DNA 分子量对照 (DL 2000 bp), 1、3 泳道为 CVA16 RT-PCR 扩增产物; 2 泳道为扩增出的 PCR 产物

图 1 本研究分离 CVA16 扩增产物电泳图 i

Homology matrix of 12 sequences

AB465400	100%											
AM292442	95.6%	100%										
AB119645	95.3%	95.2%	100%									
AB465399	94.3%	94.2%	97.5%	100%								
AB465372	96.6%	96.1%	95.2%	94.6%	100%							
AM292462	95.6%	95.3%	97.0%	96.2%	96.1%	100%						
GQ429228	95.8%	94.8%	94.5%	93.3%	95.4%	93.9%	100%					
GQ429260	95.8%	94.4%	93.4%	92.7%	94.7%	93.7%	94.6%	100%				
GQ429274	95.5%	95.2%	93.9%	93.0%	94.8%	93.6%	95.2%	98.1%	100%			
GQ429226	96.1%	95.1%	94.7%	93.5%	95.6%	94.2%	99.6%	94.8%	95.4%	100%		
JN2010-C07	93.0%	91.5%	91.4%	90.5%	91.3%	91.8%	92.0%	95.5%	96.6%	92.5%	100%	
JN2011-B11	93.2%	91.7%	91.6%	90.7%	91.5%	92.0%	92.7%	94.7%	95.2%	93.2%	97.7%	100%

图 2 本研究分离株与 CVA16 B1b 型 VP1 区核苷酸同源性分析

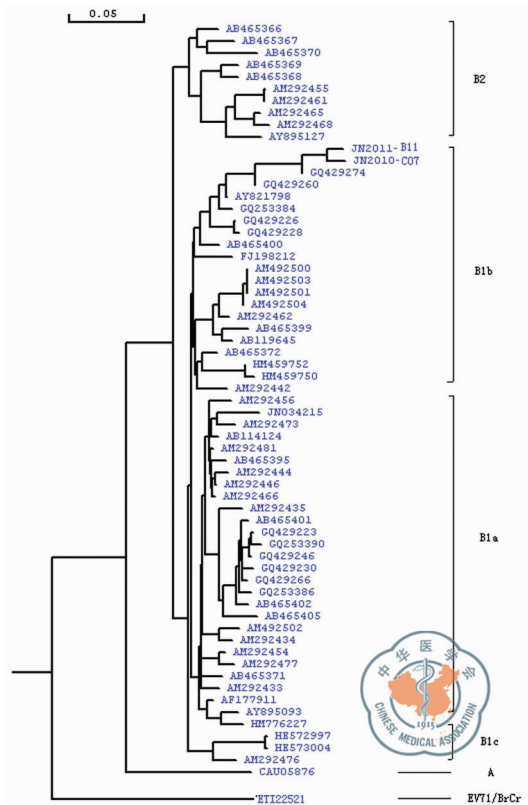


图6 CVA16系统进化树

讨论

1951年,于南非手足口病患者标本中分离出第1株CoxA16,即CoxA16的原型株CoxA16-G10^[6]。随后,手足口病在东南亚地区广泛流行^[7-9]。近年来,该病在中国的发病率也呈现明显的增长趋势^[1,10],其病原体以CoxA16和EV71最为常见,还包括CVA4、5、6、10型等其他肠道病毒,其中,由CoxA16引起的手足口病占40%^[11]。之前很多研究认为,与EV71相比,由CoxA16引起的手足口病,症状相对较轻,多为良性自限性疾病,但近年来却发现了由CoxA16引起的手足口病合并心肌炎或成人肺炎的死亡病例^[12-13],本研究中两例患儿均属轻型手足口病^[14],尽管其中1例患儿出现轻度肝功能损伤,但经积极治疗后也于7 d内痊愈,与EV71或CoxA16感染的轻型病例并无临床差别^[15],其基因型也未发现特征性变化。尽管如此,因肠道病毒极易发生变异和重组^[16],仍需要密切关注CoxA16基因特征和变异进化特点,尽早发现基因变异株,并追踪其与临床特征的相关性。

肠道病毒基因组编码VP1、VP2、VP3和VP4这4种衣壳蛋白,最初以VP4和VP1作为研究区域对CoxA16基因特征进行分析,将CoxA16分为A、B、C三个基因型^[1,17]。随着核酸序列研究的不断进展,

VP1区逐渐成为CoxA16序列分析的主要区域,并将CoxA16分为A、B、C三个基因型,A型仅含有G10一个毒株。按照肠道病毒分子分型方法,不同基因型间核苷酸差异至少为15.0%^[18],而B和C型之间核苷酸差异<13.8%,因此,把二者归于同一个基因型——B型,并将B和C型分别命名为B2亚型和B1亚型,其中B1又分为B1a、B1b和B1c^[19]。本实验采用兼并引物040-011,利用RT-PCR对CoxA16 VP1区3'-端进行扩增,得到特异性扩增条带,进一步提示该引物对HEVA良好的基因扩增特异性^[20]。同源性分析表明,本研究中两个毒株与B1b亚型同源性最高,核苷酸和氨基酸的同源性分别为90.5%~96.0%和98.3%~100%;与B2型同源性分别为87.3%~88.4%和99.1%~100%,与A型同源性最低(78.0%和91.9%)。

自A型原始株G10首次被分离后30年才再次出现有关CoxA16基因组序列研究的报道^[6,21]。CoxA16基因序列大多来自东南亚,均属于B2亚型,其核苷酸和氨基酸的差异分别为0.1%~10.8%和0~0.7%。2001年之后发现的病毒株以B1亚型为主。近10年来,世界范围内流行的CoxA16以B1a和B1b型交互出现,未发现时间和地点的分布规律。B1c型较少出现,搜集到的核酸序列信息中仅发现了1例来自马来西亚和2例来自法国的毒株。西方国家关于CoxA16的研究较少,从GenBank中检索和相关文献中查阅到的基因序列,经分析均为B1亚型。

参考文献

- Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. *J Clin Virol*, 2005, 43(8):3835-3839.
- Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol*, 2009, 44(4):262-267.
- Singh S, Chow VT, Chan KP, et al. RT-PCR, nucleotide, amino acid and phylogenetic analyses of enterovirus type 71 strains from Asia. *J Virol Methods*, 2000, 88(2):193-204.
- Cabrerizo M, Echevarria JE, González I, et al. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol*, 2008, 80(6):1018-1024.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(5):1288-1293.
- Sickles GM, Mutterer M, Feorino P, et al. Recently classified types of Coxsackie virus, group A; behavior in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1955, 90(2):529-531.

- 7 Yan JJ, Su IJ, Chen PF, et al. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 by RT-PCR. *J Med Virol*, 2001, 65(2):331-339.
- 8 Tu PV, Thao NT, Perera D, et al. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(11):1733-1741.
- 9 Wu Y, Yeo A, Phoon MC, et al. The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A strains. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(12):1076-1081.
- 10 李仁清, 陈丽娟, 张合润, 等. 北京市 2007 年手足口病暴发疫情的病原学分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(8):784-787.
- 11 Zhu Z, Zhu S, Guo X, et al. Retrospective seroepidemiology indicated that human Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 circulated widely in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008. *Virology*, 2010, 7(1):300.
- 12 Wang CY, Li Lu F, Wu MH, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23(3):275-276.
- 13 Legay F, Lévêque N, Gacouin A, et al. Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7):1084-1086.
- 14 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版). *国际呼吸杂志*, 2010, 30(24):1473-1475.
- 15 Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatr Infect Dis J*, 1999, 18(12):1092-1096.
- 16 Posada D. Recombination in evolutionary genomics. *Annu Rev Genet*, 2002, 36:75-97.
- 17 Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, et al. Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(4):254-259.
- 18 Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12):9969-9975.
- 19 Perera D, Yusof MA, Podin Y, et al. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16. *Arch Virol*, 2007, 152(6):1201-1208.
- 20 任倩, 张乐海, 马丽霞, 等. 手足口病柯萨奇病毒 A10 和 A6 型的分子鉴定及其 VP1 区 3' 端序列分析. *中国病原生物学杂志*, 2011, 6(8):561-570.
- 21 Zong W, He Y, Yu S, et al. Molecular phylogeny of Coxsackievirus A16 in Shenzhen, China, from 2005 to 2009. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4):1659-1661.

(收稿日期:2012-05-07)

(本文编辑:孙荣华)

任倩, 王世富, 张忠, 等. 柯萨奇病毒 A16 型 VP1 区基因变异和进化分析 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2013, 7(1):27-32.

中华医学会