DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.08.011

人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因的分子特征及进化分析

杨建课[1,2]，宫 磊[1,2]，高继光[1]，林爱琴[1]，徐思斌[1]

摘 要：目的 检测人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因的分子特征、致病机制、来源及进化。**方法** 从 Flu 和 GISAID 两大数据库中获得人感染 H6N1 及近缘禽流感病毒的 HA 序列，通过 ML、MP、BI 法构建系统发育树，推测进化速率和最近共同祖先（TMRCA）时间，并分析相关变异位点、糖基化位点及裂解位点。**结果** 人感染与台湾 3 株禽感染 H6N1 病毒聚成一支，最近共同祖先时间为 2002 年，目前正在流行，且进化速度很快。其氨基酸序列含有 5 个 N-糖基化位点和 2 个 O-糖基化位点，裂解位点上游仅 1 个碱性氨基酸，拥有两个特异的变异位点 P186L 和 A287T。**结论** 人感染 H6N1 禽流感病毒目前仍是一种低致病性禽流感病毒，其 HA 基因由家鸡的序列进化而来。由于其高的进化速率及病毒重配的可能性，应引起高度重视。

关键词：人感染 H6N1 禽流感病毒；血凝素；分子特征；系统发育

中图分类号：R373 **文献标识码：**A **文章编号：**1002-2694(2014)08-0827-05

Molecular characterization and evolution of hemagglutinin gene in human-infecting avian influenza virus H6N1

YANG Jian-ke[1,2], GONG Lei[1,2], GAO Ji-guang[1], LIN Ai-qin[1], XU Si-bin[1]

(1. *Department of Medical Biology, Wannan Medical College, Wuhu* 241002, *China*;
2. *Department of Medical Genetics, Wannan Medical College, Wuhu* 241002, *China*)

ABSTRACT: To better understand the molecular characterization, pathogenesis, origin, and evolutionary relationship of the first human-infecting H6N1 influenza virus, the dataset was downloaded from the Flu and GISAID databases, and the phylogenetic trees were reconstructed by maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI). Furthermore, the evolution rate, the most recent common ancestor (TMRCA), variable sites, glycosylation sites, cleavage sites and other some molecular features were also analyzed by bioinformatic means. The results indicated that the HA gene fell into an individual clade with other three H6N1 virus strains isolated from chicken. TMRCA was in 2002, and the cluster had a higher evolution rate. The molecular features revealed the HA protein had 5 N-glycosylation sites, 2 O-glycosylation sites and 2 unique variable sites. The cleavage sites had only one basic amino acid and suggested that the human-infecting H6N1 virus strain was low pathogenic. However, because of the higher substitution rate and viral reassortment, people should pay more attention.

KEY WORDS: human-infecting H6N1 avian influenza virus; hemagglutinin; molecular characterization; phylogeny

Supported by the Scientific Research Fund of Wannan Medical College for Middle-aged and Young Scientist (No. WK201205)

A 型禽流感病毒属于正粘病毒科流感病毒属，在全世界范围内的家禽、野鸟、哺乳动物及人类中广泛传播[1]。该病毒基因组拥有 8 条负 RNA 链，至少编码 11 种不同功能的蛋白质。依据其表面血凝素（hemagglutinin, HA）和神经氨酸酶（neuraminidase, NA）的抗原性，将其分成 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型，最近又在一些蝙蝠体内分离并鉴定出了新的 H17N10 亚型[2]。这些病毒对人类的生活和健康都构成了极大的威胁。

虽然人们早已分离出低致病性禽流感病毒（LPAI）H6N1，且研究表明其在一定条件下具有在

皖南医学院中青年科研基金项目（No. WK201205）资助

作者单位：1. 皖南医学院医学细胞生物学教研室，芜湖 241002；
2. 皖南医学院医学遗传学研究室；
Email：ajiankebc@126.com

人和哺乳动物间交叉感染的能力[3-4]，但很少见到人感染的病例。2013 年 6 月，台湾发现了首例人感染 H6N1 禽流感病例[5-7]，引人关注。特拟对人感染 H6N1 禽流感病毒的 HA 基因及其近缘序列的分子特征及进化分析，以探求其变异规律、致病机制、来源及进化情况，为禽流感病毒的防治提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　数据来源　通过 Blast 方法从美国国立生物技术信息中心(NCBI)流感病毒资源库(Flu)和全球禽流感基因共享数据库(GISAID)中获得人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因及近缘序列共 47 条，其中 42 条来自台湾(如表 1)。经 MAFFT version 7.110比对和 BioEdit version 7.2.1 人工校正后作为分析数据集。

1.2　系统发育树重建　分别采用最大似然法(ML)、最大简约法(MP)、贝叶斯推理法(BI)，以 A/CK/TW/G23/87(DQ376692)为外类群，jModelTest version 2.1.4 的 AIC 标准计算的 GTR +G 为最适模型，重建其系统发育树。其中 ML、MP 树分别在软件 PhyML3.0、PAUP version 4.0b10 中运算执行，自举检验值(Bootstrap)1 000 次重复检验；BI 树由 MrBayes 3.2 运算获得，4 个独立的马可夫链-蒙特卡罗(MCMC)数据模拟技术运算 1 百万代，每 100 代取样一次，舍弃前 2 500 个老化样本(burnin)后，其余样本用来推测后验概率。

1.3　分子特征分析　分别通过 NetNGlyc 1.0、NetOglyc 4.0 预测氨基酸序列的 N-糖基化位点和 O-糖基化位点。以人感染 H6N1 禽流感病毒的 HA 蛋白序列为参考，分析其变异位点和裂解位点的特征，并通过 ProtParam、DiANNA 1.1、SignalP 4.1 分别预测其理化性质、二硫键和信号肽的位置。

1.4　进化速率和分歧时间推断　采用 GTR +G 模型、贝叶斯轮廓式(Bayesian Skyline)种群增长模式和对数正态分布松弛分子钟模型(CoV＞0)，通过 BEAST v1.7.5 推测 42 条台湾数据的进化速率(位点/年)和最近共同祖先(TMRCA)时间。2 个独立的 MCMC 数据模拟技术运算 5 千万代。FigTree v1.4.0 显示树的拓扑结构和相关信息。

2　结　果

2.1　系统发育分析　为更准确分析人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因的来源和进化历程，我们分别构建了 ML、MP 和 BI 树，三种树的拓扑结构基本一致，仅支持率略有不同(如图 1)。根据树的拓扑结构、支持率、病毒出现的时间、地点和序列特征等分析，由 A/CK/TW/G23/87 进化而来的 46 株病毒聚为两支。支 1 所含毒株均来自台湾，支持率 ML/MP/BI 分别为 99/99/1，其内部进一步聚成三个亚支，其中支 1.3 支持率为 99/99/1，包括 A/CK/TW/PF3/02 及 1999 至 2004 年间分离的 11 株病毒；支 1.2 支持率为 100/100/1，共 4 株病毒，其中人感染 H6N1 禽流感病毒(A/TW/2/13)与 A/CK/TW/A2837/13 亲缘关系最近，互为姐妹支，再与 2004 和 2005 年的两株禽感染病毒聚在一起；支 1.1 的支持率为 85/86/0.96，含有 2001 至 2010 年间分离的 20 株病毒，毒株数最多。支 1.1 和 1.2 互为姐妹支，再与 A/CK/TW/1205/01 和 A/CK/TW/0329/01 聚在一起，支持率分别为 88/86/0.88 和 100/100/1。支 2 支持率为 81/76/1，含 5 株来自广西和荷兰的禽流感病毒，寄主全为水禽，距根部最近。

2.2　HA 蛋白的分子特征　人感染 H6N1 病毒的 HA 蛋白的分子量约为 63.6 KDa，等电点为 6.07，由 567 个氨基酸残基组成，其中亮氨酸(L)含量最高(8.3%)，组氨酸(H)最少(1.6%)。1 至 16 位为信号肽序列，引导新合成的 HA 蛋白进入内质网。序列共有 15 个半胱氨酸(C)，可形成 7 个二硫键(6 与 92、44 与 479、57 与 137、279 与 552、283 与 468、307 与 475、542 与 549)；含有 5 个 N-糖基化位点(第 13、25、169、293、544 位)和 2 个 O-糖基化位点(第 130、134 位)(如表 1)，其中 N-糖基化位点在不同支系间较为保守，O-糖基化位点变异较大(支 2 多为一个、支 1.3 多为三个，支 1.1 和 1.2 多为两个)。HA1 和 HA2 的裂解位点位于第 331 和 332 位间，其上游序列 PQIATR，较为保守，仅含有一个碱性氨基酸，其中裂解位点上游第三位氨基酸(即 329 位)变异较大，较早分离的几株病毒为赖氨酸(K)，而支 1.2 的 4 株病毒为特有的丙氨酸(A)，其余毒株为谷氨酸(E)。虽然人感染 H6N1 禽流感病毒的 HA 蛋白序列第 193N、226Q、228S 与其它禽感染病毒一致，但 P186L、A287T 为其所特有。此外，55K、100L、157D、160T、200K、238R、480M、495K 为毒株 A/TW/2/13 和 A/CK/TW/A2837/13 特有，86N、273D、329A 为支 1.2 所特有。

2.3　进化速率和 TMRCA 时间推测　对来自台湾的 42 条 HA 基因进行了进化速率(位点/年)和 TMRCA 推测，结果如表 2。节点 C 进化速率最大，为 5.99×10^{-3}位点/年，说明支 1.2 的进化速速最快；节点 F 次之，为 5.90×10^{-3}位点/年；而节点 B 进化

表 1 人感染 H6N1 及近缘禽流感病毒 HA 基因的登录号及糖基化位点(参考 H3 序列位置)

Tab. 1 Accession numbers and glycosylation sites of the HA gene from human-infecting H6N1 and allied avian influenza virus (H3 numbering)

病毒株 Strain	登录号 Accession no.	N-糖基化位点 N-glycosylation site	O-糖基化位点 O-glycosylation site
A/CK/TW/TC147/10	KC693613	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/ CK /TW/TC135/2010	KC693596	13, 25, 169, 293	130, 134
A/ CK /TW/CF18/2009	KC785003	13, 25, 169, 293	130, 134
A/ CK /TW/CF16/2009	KC784995	13, 25, 169, 293	130, 134
A/ CK /TW/CF17/2009	KC784966	13, 25, 169, 293	130, 134
A/CK/TW/TC128/10	KC693628	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/CF24/2009	KC785078	13, 25, 169, 293	130, 134
A/CK/TW/CF22/09	KC785024	13, 25, 169, 293	130, 134
A/CK/TW/A342/05	DQ376725	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0706/03	DQ376716	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/A37/02	DQ376711	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0114/04	DQ376719	13, 25, 169, 280, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/PF1/02	DQ376707	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/PF2/02	DQ376708	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0107/02	DQ376712	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/1215/01	DQ376705	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0320/02	DQ376710	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0222/02	DQ376706	13, 25, 77, 169, 293, 485	130, 134
A/CK/TW/0408/02	DQ376714	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/1212/01	DQ376704	13, 25, 293, 485, 544	130, 134
A/TW/2/13	EPI_ISL_143275	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/A2837/13	EPI_ISL_143276	13, 25, 169, 293, 485, 544	130, 134
A/CK/TW/ch1006/04	DQ376722	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0204/05	DQ376724	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/1205/01	DQ376703	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0329/01	DQ376702	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/2838N/00	EF681872	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/2838V/00	EF681880	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/0208/02	DQ376713	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/CK/TW/1203/03	DQ376717	13, 25, 169, 293, 544	134
A/CK/TW/0305/04	DQ376720	13, 25, 169, 293, 544	134, 262
A/CK/TW/PF3/02	DQ376709	13, 25, 169, 293, 544	134
A/CK/TW/SP1/00	DQ376701	13, 25, 169, 293, 544	130, 134, 158
A/partridge/TW/LU1/99	DQ376697	13, 25, 169, 293, 544	130, 131, 134
A/DC/TW/29-3/00	DQ376700	13, 25, 169, 293, 544	130, 131, 134
A/ CK /Changhua/7-5/1999	AB830483	13, 25, 169, 293, 544	130, 131, 134
A/CK/TW/0705/99	DQ376696	13, 25, 169, 293, 544	130, 131, 134
A/CK/TW/ns2/99	DQ376695	13, 25, 169, 293, 544	130, 134
A/ CK /Tainan/V156/1999	AB830484	13, 25, 169, 293, 544	130, 131, 134
A/CK/TW/0824/97	DQ376693	13, 25, 169, 293, 544	130, 131, 134
A/CK/TW/na3/98	DQ376694	13, 25, 169, 293, 544	129, 130, 131, 134, 159
A/mallard/ NL /16/99(H6N5)	AY684892	13, 25, 167, 291, 542	130
A/DC/Guangxi/GXd-2/2010(H6N2)	JX297591	13, 25, 168, 292, 543	130
A/EW/ NL /4/2000(H6N2)	KF695262	13, 25, 167, 291, 542	130
A/greylag goose/ NL /4/1999	CY060198	13, 25, 167, 291, 542	130
A/WG/ NL /1/99	CY060433	13, 25, 167, 291, 542	130
A/CK/TW/G23/87	DQ376692	13, 25, 168, 292, 543	130

Note: CK--Chicken; DC--Duck; WG--whitefronted goose; TW--Taiwan; NL--Netherlands; EW--Eurasian wigeon.

表 2　不同节点的进化速率(位点/年)和最近共同祖先(TMRCA)时间

Tab. 2　Substitution rates (sites/year) and the most recent common ancestor (TMRCA) of some significant nodes

节点 Node	毒株数 No. strains	时间分布 Time interval	进化速率($\times 10^{-3}$) Evolution rate 平均速率 Mean	95%置信区间 95%HPD	最近共同祖先时间(年) TMRCA(year) 平均 TMRCA Mean	95%置信区间 95%HPD
A	41	1997—2013	4.53	2.44—6.27	1994	1993—1996
B	11	1999—2004	4.40	1.83—7.85	1996	1995—1997
C	4	2004—2013	5.99	3.71—8.62	2002	2001—2003
D	2	2013	5.07	3.80—6.49	2012	2011—2012
E	24	2001—2013	4.93	1.68—8.48	1999	1998—1999
F	20	2001—2010	5.90	2.62—10.21	2000	1999—2000
Root	42	1987—2013	5.00	4.29—5.73	1986	1984—1987

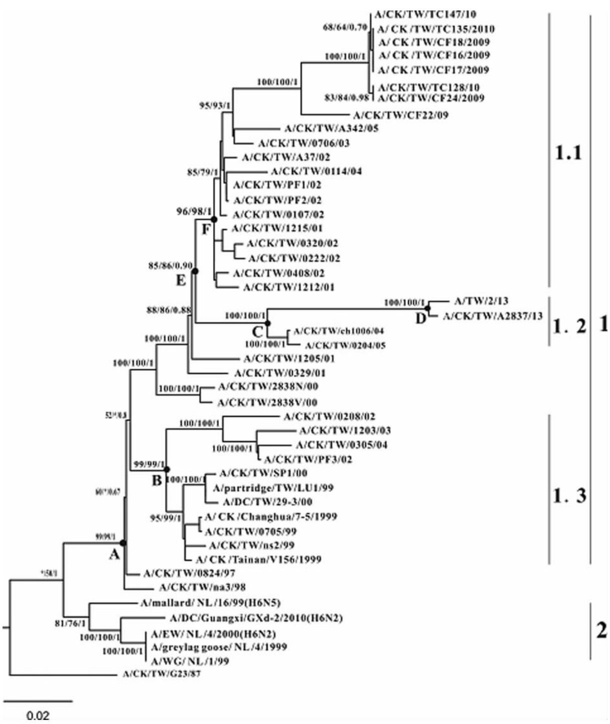

图 1　人感染 H6N1 及近缘禽流感病毒 HA 基因的系统发育树图。支上数字分别表示 ML、MP、BI 树的支持率，大写的英文字母代表一些重要的节点，加粗数字表示不同的支。

Fig. 1　Phylogenetic trees of the HA genes from human-infecting H6N1 and allied avian influenza virus by maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI)

The numbers stand for the support value. And some significant nodes and clades were indicated by capital letters and bold numerals, respectively.

速率最小，为 4.40×10^{-3} 位点/年，说明支 1.3 进化的最慢。节点 D 所代表的最近共同祖先时间为 2012 年，故推测人感染 H6N1 禽流感病毒的 HA 基因于 2012 年早期由家禽的序列进化而来。此外，C、D 节点间枝长较长，TMRCA 相差 10 年之久。

3　讨　论

虽然相对于高致病性的 H7N9[8]，低致病性的 H6N1 对人的危害性较小，但其对家禽的孵化率、死亡率及产蛋量等影响很大[4]，且可能与其它禽流感病毒重配产生新型高致病性流感病毒，如 A/Hong Kong/156/97(H5N1)的产生[9]，应高度关注。截止目前，由 A/CK/TW/G23/87 进化而来的 H6 亚型至少有 2 种类型——支 1 和 2，支 2 病毒主要出现在欧洲和中国的南部，支 1 病毒全分布在台湾。其中亚支 1.3 所含病毒出现时间相对较早，进化速率小，可能已不是优势种群，甚至已完全消失。而亚支 1.1、1.2 病毒可能为当地优势种群，正在流行且进化速度快，说明其还在不断的进化和适应环境。人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因属于亚支 1.2，高的支持率和一些特有的氨基酸位点，都表明这是早在 2002 年就进化出的新类型，并已适应外部环境。然而目前分离的毒株并不多，可能因为其低致病性，很多毒株未被发现，节点 C、D 间的长枝也说明如此[7]。Wei 等[6]研究认为，人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因可能由 A/CK/TW/PF3/02，经 A/CK/TW/0204/05 进化而来，而我们的结果不完全支持此观点。支 1.1 和 1.2 先与 A/CK/TW/1205/01、A/CK/TW/0329/01 聚在一起后再与 A/CK/TW/PF3/02 所在的支 1.3 互为姐妹支，结合有关数据[5,7,10]可见：人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 基因最早由 A/CK/TW/G23/87，经 A/CK/TW/0824/97、A/CK/TW/1205/01、A/CK/TW/0204/05，直到 2012 年由家禽的序列进化而产生，与 A/CK/TW/PF3/02(H6N1)病毒为共进化关系。

HA 蛋白以同源三聚体的形式镶嵌在病毒表面，作为主要的表面抗原，与病毒复制、毒力及宿主特异性等密切相关。研究表明，裂解位点上游碱性

氨基酸的数目决定着 HA 蛋白能否被裂解成 HA1 和 HA2,进而影响病毒的复制和毒力[11-12]。人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 蛋白的裂解位点上游 6 个氨基酸里仅有 1 个碱性氨基酸,表明其仍是低致病性的[6-7],但位点 328、329(裂解位点上游第 4、第 3 位)具有很大的变异性,可见其受到很大的选择压力,将来有可能进化产生高致病性的人感染 H6 亚型流感病毒。前人研究还表明 HA 蛋白的第 226 位(参照 H3 序列)如为 Q,则特异性地与禽类含唾液酸 α-2,3 半乳糖的糖蛋白受体结合;如为 L,则特异性地与人类含唾液酸 α-2,6 半乳糖的糖蛋白受体结合;此外,193R、228G、糖基化位点等也与宿主的特异性有关[11,13-14]。人感染 H6N1 禽流感病毒 HA 蛋白 193N、226Q、228S 未表现出人感染型的特性,可能尚未来得及进化,但特有的 P186L 也许是其感染人的原因[7,13]。同时,特有的 A287T 在病毒宿主的选择上是否具有一定作用,目前还不清楚。该蛋白拥有 5 个 N-糖基化位点,其中 4 个位于 HA1 区,1 个位于 HA2 区,5 个位点都比较保守,表明其具有重要的生物学功能[15]。同时拥有 2 个 O-糖基化位点,具体功能未知,但在不同类群间有所变异,这可能是适应性进化的结果。

综上,人感染 H6N1 禽流感病毒的 HA 基因由家禽的进化而来,并具备了感染人的能力,由于其高的进化速率和病毒重配的可能性,加以时日有可能进化出新型高致病性的 H6 亚型,人们应高度重视,并能及时的给与监测和防治。

参考文献:

[1]Zhou H, Jin M, Chen H, et al. Genome-sequenee analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in china in 2004 [J]. Virus Genes, 2006, 32(1): 85-95. DOI: 10.1007/s11262-005-5849-9

[2]Tong S, Li Y, Rivailler P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109 (11): 4269-4274. DOI: 10.1073/pnas.1116200109

[3]Beare A, Webster R. Replication of avian influenza viruses in humans[J]. Arch Virol, 1991, 119(1-2): 37-42. DOI: 10.1007/BF01314321

[4]Lee MS, Chang PC, Shien JH, et al. Genetic and pathogenic characterization of H6N1 avian influenza viruses isolated in Taiwan between 1972 and 2005[J]. Avian Dis, 2006, 50(4): 561-571. DOI: 10.1637/7640-050106R.1

[5]Yuan J, Zhang L, Kan X, et al. Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza A (H6N1) virus causing human infection in Taiwan[J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(9): 1367-1368. DOI: 10.1093/cid/cit479

[6]Wei SH, Yang JR, Wu HS, et al. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis[J]. Lancet Respir Med, 2013, 1(10): 771-778. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70221-2

[7]Shi W, Shi Y, Wu Y, et al. Origin and molecular characterization of the human-infecting H6N1 influenza virus in Taiwan[J]. Protein Cell, 2013, 4(11): 846-853. DOI: 10.1007/s13238-013-3083-0

[8]Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses[J]. Lancet, 2013, 381 (9881): 1926-1932. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60938-1

[9]Chin P, Hoffmann E, Webby R, et al. Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry[J]. J Virol, 2002, 76(2): 507-516. DOI: 10.1128/JVI.76.2.507-516.2002

[10]Zhang L, Zhang Z. The origin of human-infecting avian influenza A H6N1 virus[J]. bioRxiv, 2013, in press. DOI: 10.1101/000398

[11]Schrauwen EJA, Graaf M, Herfst S, et al. Determinants of virulence of influenza A virus[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(4): 479-490. DOI: 10.1007/s10096-013-1984-8

[12]Subbarao K, Chen H, Swayne D, et al. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics[J]. Virology, 2003, 305(1): 192-200. DOI: 10.1006/viro.2002.1742

[13]Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans[J]. Nature, 2013, 499 (7459): 496-499. DOI: 10.1038/nature12372

[14]Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses[J]. Science, 2001, 293(5536): 1840-1842. DOI: 10.1126/science.1062882

[15]Chen W, Zhong Y, Qin Y, et al. The evolutionary pattern of glycosylation dites in influenza virus (H5N1) hemagglutinin and neuraminidase[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49224. DOI: 10.1371/journal.pone.0049224

收稿日期:2014-01-14;**修回日期:**2014-03-19