

大熊猫轮状病毒 CH-1 株研究进展

杨 锐¹, 王成东², 颜其贵¹

摘要: 轮状病毒(Rotavirus, RV)是引起婴幼儿及幼龄动物急性腹泻甚至死亡的重要病原。2009年,首次在幼龄大熊猫粪便中分离到RV,被确定为A组,并将其命名为大熊猫轮状病毒(Giant Panda Rotavirus, GPRV)CH-1株。GPRV CH-1株主要感染断奶后的大熊猫,引起急性传染性、顽固性腹泻甚至死亡,这对大熊猫的健康造成了严重的危害。本文介绍了GPRV CH-1株的基因结构和病毒蛋白结构及其生物信息学分析学以及该病的诊断方法和防治措施,以期为该病致病机制及疫苗研究提供参考。

关键词: 大熊猫轮状病毒 CH-1 株; 基因结构; 病毒蛋白; 生物信息学分析; 诊断方法

中图分类号:R373.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)11-1040-04

Research progress of giant panda rotavirus strain CH-1

YANG Rui¹, WANG Cheng-dong², YAN Qi-gui¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081, China)

Abstract: Rotavirus is the most important cause of severe diarrhea and death in infants and young animals. In 2009, rotavirus was isolated from fecal samples of sick panda cubs suffered an acute, infectious and intractable diarrhea. The strain belongs to group A and is designated as Giant Panda Rotavirus (GPRV) strain CH-1, which has caused serious threats to giant panda. In this paper, we review the gene structure, viral proteins, bioinformatics analysis of GPRV strain CH-1, and the diagnostic methods and prophylactico-therapeutic measures of this disease. This review will be helpful for further study of the pathogenic mechanism, as well as vaccine development of GPRV strain CH-1.

Keywords: giant panda rotavirus strain CH-1; gene structure; viral proteins; bioinformatics analysis; diagnostic methods

Supported by the Research Project of Chengdu Giant Panda Breeding Research Foundation (No. CPF08013)

Corresponding author: Yan Qi-gui, Email: yanqigui@126.com

轮状病毒(Rotavirus, RV)是引起儿童发生严重腹泻甚至死亡的重要病原^[1],它还能够感染牛、猪、马、羊、兔、禽、猫类等动物并引起病毒性腹泻。在我国,王成东等于2009年首次从大熊猫腹泻粪便中检测出轮状病毒,将其命名为大熊猫轮状病毒(Giant Panda Rotavirus, GPRV)CH-1毒株。迄今为止,在人类、哺乳动物和鸟类分离的RV根据病毒外壳特异性抗原可将RV分为A~I 9个不同的组,其中A、B、C和H组可感染人和动物,而D、E、F、G和I组只感染动物^[2-4]。RV包括P和G两种血清

型,其中G1-G4、G9、P[8]和P[4]是最常见的流行优势株,在全球主要流行的RV基因型G1P[8],G2P[4],G3P[8]和G12P[8]^[5]。GPRV CH-1株的血清型为G1-P[7]-I5-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1^[6]。

GPRV CH-1株主要感染5-11月龄的断奶大熊猫,感染后通常表现为体温升高、呕吐、水泻、蛋花样腹泻,腹泻物中含有血,白细胞总数和中性粒细胞增多,淋巴细胞减少、腹水、顽固性胃肠胀气、腹泻迁延不愈甚至死亡等症状^[7-8],通过常规对症治疗能较大缩短该病的治疗疗程、治愈率达100%,且很少出现并发症^[8],但目前尚无有效疫苗和特效药物对GPRV感染进行防治,这对大熊猫的健康造成了严重威胁。

成都大熊猫繁育研究基金会科研项目(No. CPF08013)

通讯作者:颜其贵,Email: yanqigui@126.com

作者单位:1. 四川农业大学动物医学院,成都 611130;

2. 成都大熊猫繁育研究基地,成都 610081

1 GPRV 基因结构及进化特点

GPRV CH-1 株属于呼肠孤病毒科轮状病毒属, 病毒粒子呈球形似车轮状, 直径 70 nm^[7]。GPRV CH-1 株基因组为线状双股 RNA, 它包含 11 个基因片段(1-11), 这些基因分别编码 6 个结构蛋白(VP1-VP4, VP6, VP7) 和 5 个非结构蛋白(NSP1-NSP5), 长度分别为 3 287 bp, 2 717 bp, 2 591 bp, 2 362 bp, 1 356 bp, 1 042 bp, 1 532 bp,

1 042 bp, 1 017 bp, 750 bp, 663 bp。其中 VP4、VP6、VP7 是 GPRV 的主要抗原性基因^[9-16]。每个基因片段分别包含一个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)^[6], 长度分别为 3 267 bp, 2 673 bp, 2 508 bp, 2 362 bp, 1 194 bp, 981 bp, 1 461 bp, 954 bp, 942 bp, 528 bp 和 594 bp 另外, GPRV CH-1 株的 VP1, VP3, VP4, VP6, VP7 和 NSP4 基因主要与人或猪 RV 的基因的进化距离最近, 其同源性见表 1^[10-15]。

表 1 GPRV CH-1 株基因序列与人和猪 RV 的同源性

Tab.1 Homologies for the rotavirus genes from giant panda, human and porcine

基因名称	人			猪		
	毒株登录号	核酸(%)	氨基酸(%)	毒株登录号	核酸(%)	氨基酸(%)
VP1	EU984103	86.7	97.4	JF781158	86.8	97.6
VP3	EU984105	87.1	93.4	JX290177	96.6	97.0
VP4	AY787644	64.4	69.1	AY523636	99.6	99.5
VP6	DQ873675	89.2	97.0	FJ617209	95.1	98.7
VP7	AF260938	86.9	93.0	AB176682	71.7	80.4
NSP4	GU189558	95.6	96.0	D88831	99.6	98.9

2 病毒蛋白

蛋白质是病毒粒子的主要成分, 具有重要的功能。GPRV CH-1 株有 11 种蛋白成分, 包括 6 个结构蛋白与 5 个非结构蛋白。编码结构蛋白(VP1-VP4, VP6, VP7)的氨基酸长度分别为 1 088, 890, 835, 776, 397, 326 aa 以及编码非结构蛋白(NSP1-NSP5)的氨基酸长度分别为 486, 317, 313, 175 和 197 aa^[6]。对这些蛋白的信号肽、跨膜区、疏水性、抗原表位、N-糖基化作用位点、蛋白激酶 C 磷酸化

位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点和 N-豆蔻酰化位点等结构进行分析, 其中 N-糖基化作用位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点和 N-豆蔻酰化位点分别与抗原性和免疫原性^[17], 介导胞外分泌^[18], 病毒凋亡和病毒周期的调节^[19]和蛋白定位于内质网或线粒体外膜^[20]这些生物学功能有关, 但对 VP2 蛋白的生物信息学特点暂无相关文献报道。表 2 是 GPRV CH-1 株(VP2 除外)结构蛋白的生物信息学特点。

表 2 GPRV CH-1 株结构蛋白的生物信息学特点

Tab.2 Bioinformatics characteristics of structural proteins of GPRV strain CH-1

蛋白	分子质量	疏水性	N-糖基化位点	蛋白激酶 C 磷酸化作用位点	酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点	酪氨酸激酶磷酸化作用位点	N-豆蔻酰化位点
VP1 ^[10]	124892.71u	-3.244-2.533	7	16	19	5	6
VP3 ^[9]	97937.91u	-3.000-2.256	10	20	18	1	5
VP4 ^[12]	86768.8u	-2.911-2.244	8	15	15	0	12
VP6 ^[13]	44725.1u	-2.733-1.822	5	5	4	1	6
VP7 ^[14]	37354.8u	-2.344-3.567	2	5	4	1	4

注:通过 ProtScale 分析的蛋白质疏水性, 为蛋白质的最小疏水性与最大疏水性, 正值表明疏水, 负值表明亲水。

3 实验室诊断

采取发病大熊猫的呕吐物、腹泻便、肛拭子、血

液等样本进行抗原检测, 包括轮状病毒粪便抗原 ELISA 诊断试剂盒和病毒分离鉴定等^[7]。另外, 通

过提取样本中的 RNA, 进行分子生物学检测, 包括 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 扩增^[21] 和实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR)^[22] 等方法。

3.1 抗原检测 王成东等^[7] 用兰州生物制品研究所生产的 RV 粪便抗原 ELISA 诊断试剂盒检测腹泻物出现 RV 阳性结果; 同时将处理过的标本接种于 MA-104 细胞进行病毒分离培养, 出现病变以后, 用检测抗原或核酸方法鉴定病毒。通过电镜形态观察、理化特性、中和实验等方法, 鉴定分离到的病毒颗粒为 RV。

3.2 分子诊断 GPRV CH-1 株在大熊猫粪便中含量较高, 可通过提取大熊猫粪便的总 RNA 进行分子生物学诊断, 即常规 RT-PCR 和 qRT-PCR。根据 GPRV CH-1 株保守基因 VP7 序列设计引物, 对从大熊猫粪便中提取到的 RNA 和实验室保存病毒液的 RNA 同时进行反转录, 将得到的 cDNA 进行 PCR 扩增, RT-PCR 扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并测序, 最低可以检测出大约 1pg 的病毒 RNA, 该诊断结果重复性较好, 可用于 GPRV CH-1 株的临床快速诊断^[21]。此外, 根据 GPRV CH-1 株 VP4 基因序列设计引物^[22], 进行 qRT-PCR 扩增, 最低可检测到的拷贝数为 1.0×100 拷贝/ μL , 与常规 RT-PCR 相比, 其灵敏度至少高出 100 倍, 两种方法的特异性与重复性均较好^[21-22]。

通过上述两种方法^[23] 对 2011 至 2015 年(除 2014 年)大熊猫基地 A 和 B 共 227 份大熊猫粪便中的 GPRV CH-1 株进行检测, 利用 qRT-PCR 方法检测出 25 份阳性粪便样品, 阳性率为 11% (25/227), 而利用常规 RT-PCR 只检出 15 份阳性粪便样品, 阳性率为 6.6% (15/227), 表明 qRT-PCR 更适用于 GPRV CH-1 株的诊断检测。因此, 一旦发现有腹泻等症状, 应及时采取 qRT-PCR 方法对大熊猫的粪便进行快速且精确的检测, 以预防更严重的传染。目前对于 RNA 病毒的检测, RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 是快速且灵敏的方法, 该方法简便易操作不需要高端仪器, 直接通过肉眼观察结果, 可快速检测病原^[24-26], 但目前仍然没有用于检测 GPRV CH-1 株。

4 防治措施

RV 主要是通过水源传播或呼吸道传播, 因此, 预防 RV 感染的主要措施是关注大熊猫的饮食方面的健康。同时, RV 是人兽共患病毒, 保证大熊猫与其接触人员的安全距离也极其重要。另外, 饲养员

应定期收集大熊猫粪便, 定期检测 GPRV CH-1 株感染情况。一旦诊断发现为 GPRV CH-1 株感染, 及时采取隔离办法并治疗感染大熊猫。对于 GPRV CH-1 株感染主要可通过对症治疗和常规抗感染治疗, 这能缩短该病的治疗疗程且治愈率高达 100%, 主要包括: 抗生素治疗; 及时纠正水、电介质和酸碱平衡紊乱; 及时调整人工配乳的浓度和饲喂量; 使用消化酶、肠黏膜保护剂以及使用微生态制剂进行肠道菌群调整, 而且被治愈的大熊猫很少出现并发症^[8]。

目前尚无有效疫苗预防 GPRV CH-1 株感染和特异性治疗药物, 但马磊将 GPRV CH-1 株的 VP4 和 VP7 基因与真核表达载体 pVAX1 进行定向连接, 构建出真核表达质粒, 再将其转化入减毒鼠伤寒沙口氏菌, 这为研究以减毒沙门氏菌为载体的 GPRV CH-1 株疫苗的生物学性质奠定了基础^[27], 同时为预防大熊猫感染 GPRV 起着重要作用。

5 展 望

大熊猫是我国珍稀动物, 其繁殖率与生存率也较低, 而 GPRV CH-1 株主要感染幼龄大熊猫, 引起大熊猫腹泻甚至死亡, 在 2000—2003 年, 成都大熊猫繁育研究基地的 RV 发病率为 64.7%。由于成年动物感染轮状病毒多为隐性经过, 并持久地向外界排毒, 加之轮状病毒对环境因子和许多常见消毒剂有较强抵抗力, 导致某一地方发病, 随后的每年会连续发生^[8]。但是通过常规对症治疗后治愈率达 100%, 现目前对 GPRV CH-1 株的相关研究主要在于其感染来源、诊断方法、防治措施和 GPRV CH-1 株的分子特点, 病毒感染发病机制及机体免疫应答机制的相关研究缺乏, 造成了对 GPRV CH-1 株认识的不足。另外, 由于病毒的侵入会引起宿主细胞的蛋白表达模式改变, 将影响宿主细胞的正常生理功能并决定病毒的致病进程和结果^[28-30], 因此通过研究病毒感染宿主细胞后引起的细胞因子转录水平及蛋白质水平的变化, 将有利于揭示病毒与宿主或宿主细胞的相互作用机制和病毒分子致病机制。

根据中国 GPRV 的研究现状, 应加强以下几方面的研究: 加强 GPRV 流行病学调查, 分离新毒株并进行基因组学与蛋白组学研究, 了解 GPRV 不同分离株基因型分布情况; 进行 GPRV 感染其宿主细胞后的转录组及蛋白质组水平分析 GPRV 感染复制机制、致病机制及机体免疫应答机制的相关研究; 加强病原诊断与疫苗以及抗病毒药物的研发等。

参考文献:

- [1] Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(2): 304-306. DOI: 10.3201/eid1202.050006
- [2] Mihalov-Kovacs E, Gellert A, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(4): 660-663. DOI: 10.3201/eid2104.141370
- [3] Matthijnssens J, Martella V, Van Ranst M. Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses[J]. *Future Virol*, 2010, 5(4): 385-390. DOI: 10.2217/fvl.10.37
- [4] Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation[J]. *Arch Virol*, 2012, 157(6): 1177-1182. DOI: 10.1007/s00705-012-1273-3
- [5] Degiuseppe JI, Reale EA, Stupka JA. Rotavirus epidemiology and surveillance before vaccine introduction in Argentina, 2012-2014[J]. *J Med Virol*, 2017, 89(3): 423-428. DOI: DOI: 10.1002/jmv.a.24650
- [6] Guo L, Yan QG, Yang SL, et al. Full genome sequence of giant panda rotavirus strain CH-1[J]. *Genome Announc*, 2013, 1(1): 1. DOI: 10.1128/genomeA.00241-12
- [7] 王成东, 颜其贵, 张志和, 等. 大熊猫幼兽腹泻粪便分离出的轮状病毒鉴定[J]. 兽类学报, 2008, 28(1): 87-91.
- [8] 王成东, 罗娌, 张志和, 等. 幼龄大熊猫轮状病毒感染性腹泻的防治[J]. 动物医学进展, 2009, 30(7): 120-122.
- [9] 雷燕. 大熊猫轮状病毒CH-1株基因克隆及分子解析[D]. 温江: 四川农业大学硕士学位论文, 2011.
- [10] 郭玲, 杨绍林, 张和民, 等. 大熊猫轮状病毒CH-1株VP1基因的克隆和生物信息学分析[J]. 中国兽医学报, 2014(1): 27-32. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2014.01.003
- [11] 侯蓉, 郝中香, 廖红, 等. 大熊猫源轮状病毒CH-1株VP3基因的克隆与生物信息学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(11): 4-8. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2015.0934
- [12] 雷燕, 颜其贵, 张志和, 等. 大熊猫轮状病毒CH-1株外衣壳蛋白VP4基因的克隆与生物信息学分析[J]. 中国兽医学报, 2011(6): 575-581. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2011.06.003
- [13] Lie Y, Chen SJ, Wang CD, et al. Molecular cloning and sequence analysis of VP6 gene of giant panda rotavirus strain CH-1[J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(65): 14329-14336. DOI: 10.5897/AJB11.1173
- [14] 颜其贵, 雷燕, 张志和, 等. 大熊猫轮状病毒CH-1株外衣壳蛋白(VP7)基因的克隆和生物信息学分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(6): 705-710.
- [15] 刘菲, 雷燕, 颜其贵, 等. 大熊猫轮状病毒CH-1株NSP4基因的克隆与生物信息学分析[J]. 中国兽医学报, 2010(8): 783-787. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2010.08.015
- [16] Lei Y. Cloning and phylogenetic analysis of the NSP1~5 genes of giant panda rotavirus strain CH-1 isolated in China[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5(31): 228-236. DOI: 10.5897/AJMR11.337
- [17] Sun X, Jayaraman A, Maniprasad P, et al. N-Linked glycosylation of the hemagglutinin protein influences virulence and antigenicity of the 1918 pandemic and seasonal H1N1 influenza a viruses[J]. *J Virol*, 2013, 87(15): 8756-8766. DOI: 10.1128/JVI.00593-13
- [18] Petrov AM, Zakyrianova GF, Yakovleva AA, et al. Inhibition of protein kinase C affects on mode of synaptic vesicle exocytosis due to cholesterol depletion[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2015, 456(1): 145-150. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.049
- [19] Hwang DW, So KS, Kim SC, et al. Autophagy induced by CX-4945, a casein kinase 2 inhibitor, enhances apoptosis in pancreatic cancer cell lines[J]. *Pancreas*, 2017, 46(4): 575. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000780
- [20] Paramanik V, Thakur MK. Estrogen receptor beta and its domains interact with casein kinase 2, phosphokinase C, and N-myristoylation sites of mitochondrial and nuclear proteins in mouse brain[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 22305-22316. DOI: 10.1074/jbc.M112.351262
- [21] 雷燕, 颜其贵, 张志和, 等. 大熊猫轮状病毒RT-PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2010(5): 490-493. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2010.05.020
- [22] 陈珍容, 廖红, 郝中香, 等. 大熊猫轮状病毒荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 兽类学报, 2016, 36(4): 445-451. DOI: 10.16829/j.slxb.201604009
- [23] 曾杨茹, 颜其贵, 杨锐, 等. SYBR Green I实时荧光定量RT-PCR与常规RT-PCR检测大熊猫轮状病毒的比较研究[J]. 中国兽医学报, 2016(10): 1248-1252. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2016.10.007
- [24] Kou XX, Fan HY, Wu QP, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay on rapid and sensitive detection of rotavirus in fecal samples and artificially seeded oysters[J]. *Food Control*, 2014, 41(1): 151-157. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.01.013
- [25] Rudolph DL, Sullivan V, Owen SM, et al. Detection of acute HIV-1 infection by RT-LAMP[J]. *PloS One*, 2015, 10(5): e0126609. DOI: 10.1371/journal.pone.0126609
- [26] Oloniniyi OK, Kurosaki Y, Miyamoto H, et al. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. *J Virol Methods*, 2017(246): 8-14. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.03.011
- [27] 马磊. 携大熊猫轮状病毒CH-1株VP4-VP7双基因的减毒沙门氏菌的构建与免疫原性研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2013.
- [28] Sun JF, Han ZX, Shao YH, et al. Comparative proteome analysis of tracheal tissues in response to infectious bronchitis coronavirus, newcastle disease virus, and avian influenza virus H9 subtype virus infection[J]. *Proteomics*, 2014, 14(11): 1403-1423. DOI: 10.1002/pmic.201300404
- [29] Sun X, Wang SY, Lin X, et al. Proteome analysis of duck tembusu virus (DTMUV)-infected BHK-21 cells[J]. *Proteomics*, 2017, 17(12): 1-11. DOI: 10.1002/pmic.201700033
- [30] Zhu SL, Chen X, Wang LJ, et al. Global quantitative proteomic analysis profiles host protein expression in response to Sendai virus infection[J]. *Proteomics*, 2017, 17(5): 1-14. DOI: 10.1002/pmic.201600239