

· 基础研究 ·

# 吉林省 2016 年手足口病患儿肠道病毒 71 型 VP1 编码区基因分析

魏雷雷<sup>1</sup>, 吴东林<sup>2</sup>, 黄彪<sup>1</sup>, 王岙<sup>1</sup>, 苟伟民<sup>3</sup>, 杨尧<sup>2</sup>, 王爽<sup>2</sup>, 单元春<sup>2</sup>1. 吉林省卫生监测检验中心, 吉林 长春 130062; 2. 吉林省疾病预防控制中心, 吉林 长春 130062;  
3. 延边州疾病预防控制中心, 吉林 延边州 133000

**摘要:** 目的 分析吉林省 2016 年肠道病毒 71 型(enterovirus 71 ,EV71)流行株基因学特征及其变异情况。方法 采集 2016 年吉林省 9 个市、州送检的临床诊断为手足口病(hand foot and mouth disease ,HFMD)298 份标本,分离病毒获得阳性分离物,利用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction ,RT-PCR)扩增阳性分离物 VP1 编码区,并对扩增产物进行核苷酸序列测定,应用 Mega6 和 Bioedit 7. 01 软件分析扩增序列基因亲缘关系和氨基酸位点变异。结果 吉林省 2016 年分离的 38 株 EV71 同属于 C4a 基因亚型,并在 VP1 编码区共发生 7 处氨基酸位点的变异。结论 吉林省 2016 年 EV71 流行株与 C4a 代表株位于同一分支属于 C4a 基因亚型,且发生了多位点氨基酸变异。

**关键词:** 手足口病 肠道病毒 71 型 氨基酸位点 变异 C4a 基因亚型

中图分类号: R373. 2 Q789 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2018)11-1215-04

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.002360

## Genetic characteristics of VP1 encoding region gene of enterovirus 71 in children with hand , foot and mouth disease in Jilin Province , China in 2016

WEI Lei-lei<sup>\*</sup>, WU Dong-lin, HUANG Biao, WANG Ao, GOU Wei-min,  
YANG Yao, WANG Shuang, SHAN Yuan-chun

\*Jilin Provincial Center for Health Surveillance and Test, Changchun 130062, Jilin Province, China

Corresponding author: WU Dong-lin, E-mail: dl\_wu@163.com

**Abstract:** **Objective** To analyze the genetic characteristics and variation of enterovirus 71 (EV71) epidemic in Jilin Province, China in 2016. **Methods** A total of 298 samples from patients with hand, foot and mouth disease in nine cities of Jilin Province in 2016 were collected, from which the positive isolates were obtained by virus isolation for amplification of VP1 encoding region gene by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotides of PCR products were sequenced, while the genetic relationship and variation of amino sequences were analyzed by using Mega6 and Bioedit 7. 01 software. **Results** The 38 EV71 isolates in Jilin Province in 2016 belonged to the C4a subgenotype, and seven amino acid sites varied in the VP1 coding region. **Conclusion** The EV71 strains isolated in Jilin in 2016 were in the same branch as that of representative C4a strain, which belonged C4a gene subtype, with amino acid variants in several sites.

**Key words:** Hand, foot and mouth disease (HFMD); Enterovirus type 71 (EV71); Amino acid site; Variation; C4a subgenotype

手足口病(hand foot and mouth disease ,HFMD)

基金项目: 国家科学技术艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项传染病监测技术平台项目“辽宁及周边省市传染病病原谱流行规律研究”课题子课题“吉林省传染病病原谱流行规律研究”(编号 2012ZX10004209-003), 吉林省手足口病病原谱分析(2017J028)。

通讯作者: 吴东林, E-mail: dl\_wu@163.com

是由肠道病毒引起的传染病,多发生于婴幼儿,可引起多种临床表现,包括皮肤、内脏和神经系统症状<sup>[1]</sup>,多数患者症状较轻,少数患者可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜炎等并发症。人肠道病毒 71 型(enterovirus 71 ,EV71)是引起 HFMD 暴发和流行以及重症病例的主要病原体之一。自 1974 年首次报道以来,已在世界范围内引起了 10 余次的暴发及流行。

有研究表明,近年来,我国几次由该病毒引起的较大规模的 HFMD 暴发流行都与 EV71 的变异有关<sup>[2,3]</sup>。2008 年 5 月 2 日,国家卫生和计划生育委员会正式将 HFMD 纳入丙类法定传染病管理。本文分析了引起吉林省 2016 年 HFMD 流行的 EV71 流行株的基因特征,以期为防控 HFMD 提供科学依据。

### 1 材料与amp;方法

**1.1 细胞** 人横纹肌肉瘤(human rhabdomyosarcoma, RD)细胞来自中国疾病预防控制中心。

**1.2 标本** 采集 2016 年吉林省 9 个市、州送检的临床诊断为 HFMD 患儿发病 1 周内的咽拭子或粪便标本,共 298 份。标本处理方法参照卫生部《手足口病预防控制指南(2009 版)》<sup>[4]</sup>。

**1.3 主要试剂** 病毒核酸纯化试剂盒(批号:E0115-120161)和 One Step RT-PCR Kit(批号:151035115)均购自美国 QIAGEN 公司。

**1.4 病毒分离及核酸序列测定** 将处理过的咽拭子或粪便标本接种于 RD 细胞,病毒分离按《手足口病预防控制指南(2009 版)》<sup>[4]</sup>方法操作。当细胞病变(cytopathic effects, CPE)大于 75%时,视为病毒分离阳性。阳性分离物经反复冻融 2 次,剧烈振荡 2 min 后,取 200 μL,按病毒核酸纯化试剂盒说明书提取病毒核糖核酸(ribonucleic acid, RNA),并于 -70 ℃保存备用。按照 One Step RT-PCR Kit 说明书进行 EV71 VP1 编码区全基因组扩增<sup>[5]</sup>,EV71 特异性引物序列 VP1-S 5'-GCAGCCCAAAAGAAGCTTAC-3';VP1-A 5'-AAGTCGCGAGAGCTGTCTTC-3'。PCR 反应条件:50 ℃ 30 min,95 ℃ 15 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃保存。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,阳性产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

**1.5 生物信息学分析** 将测序结果利用 Sequencher 软件 5.0 对原始序列(.ab1)进行人工拼接校准后,获得全长约为 891 bp 的 VP1 区核苷酸序列。应用 MEGA 6.0 软件对遗传进化关系进行分析,应用 Bioedit 7.01 软件对氨基酸变异位点进行分析。

### 2 结果

**2.1 EV71 流行株的基因型分析** 298 份 HFMD 标本经 PCR 鉴定,共获得 EV71 VP1 编码区全长序列 38 条。构建的亲缘关系树显示,2016 年吉林省 EV71

流行株集中在 C4 基因亚型的 C4a 进化分支上,见图 1。

**2.2 EV71 流行株 VP1 编码区全基因组氨基酸变异分析** 以 2003 年中国 C4a 基因亚型代表株 (AY905614-2003ZJ-C4a,浙江株)为基准,对 2016 年 EV71 38 株流行株 VP1 编码区基因组氨基酸序列进行分析,共发现 7 处氨基酸位点变异。在 22 位点 38 株流行株中,有 35 株发生了由谷氨酰胺到组氨酸的突变,此位点的变异与参考株中的 FY23 / AH / CHN / 2008-C4a,0708T / NM / CHN / 07-EU910861-C4a,CY11 / BJ / CHN / 2008-FJ469153-C4a 和 518-03F / SD / CHN / 2007-C4a 相一致,另外该位点有 3 株流行株发生了由谷氨酰胺到精氨酸的变异,此变异与 C2 代表株[9F-AUS-6-99-Australia-1999(AF37-6110)-C2]相一致;198 位点有 13 株流行株发生了丙氨酸到丝氨酸的变异;282 位点有 3 株流行株发生了天冬氨酸到丝氨酸的变异;283 位点有 21 株流行株发生了丝氨酸到苏氨酸的变异;289 位点有 35 株流行株发生了苏氨酸到丙氨酸的变异,此位点的变异与 FY23 / AH / CHN / 2008-C4a,CY11 / BJ / CHN / 2008-FJ469153-C4a,EU024958-BJ4211-07-C4a,EU703813-Fiang-08 / 2-C4a,AF302996-SHZH98-C4b,AY547499-2002Shh-6-C4b,F1 / SHCHN / 2000-AB1 15490-C4b,ShZh98 / GD / CHN / 1998-AF302996-C4b,07-Korea-2000(AY125971)-C3,171840-Tailand-2008(FJ151495)-C1,9F-AUS-6-99-Australia-1999(AF 376110)-C2,2008-00643-Taiwan-2008(HM622391)-C6 和 6658-COL-94-Colombia-1994(AF135899)-B6 相一致;293 位点有 21 株流行株发生了丙氨酸到丝氨酸的变异;295 位点有 1 株流行株发生了苏氨酸到丙氨酸的变异。见表 1。

表 1 EV71 流行株的 VP1 编码区全基因组氨基酸变异情况  
Tab 1. Amino acid variation of complete genome of VP1 encoding region in epidemic EV71 strain

变异位点	变异情况	变异毒株数量
22	Q-H	35
	Q-R	3
198	A-S	13
282	N-S	3
283	S-T	21
289	T-A	35
293	A-S	21
295	T-A	1

注 S 表示丝氨酸;Q 表示谷氨酰胺;H 表示组氨酸;N 表示天冬酰胺;R 表示精氨酸;T 表示苏氨酸;A 表示丙氨酸。

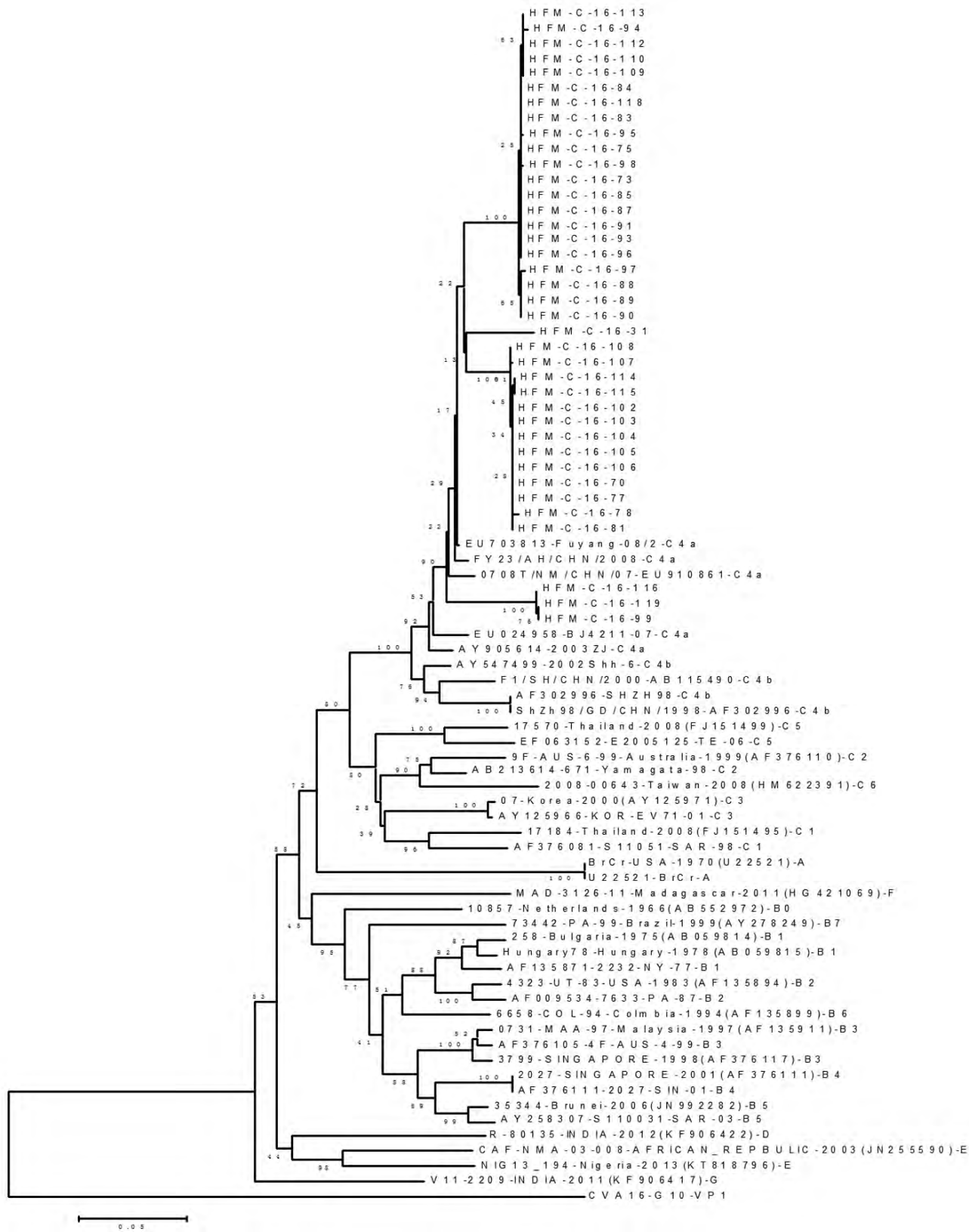


图 1 2016 年吉林省 EV71 流行株和各基因亚型代表株 VP1 编码区遗传进化分析

Fig 1. Phylogenetic analysis of VP1 encoding regions of epidemic EV71 strain in Jilin Province in 2016 and representative EV71

strains of various gene subtypes

## 3 讨论

EV71 是引起 HFMD 的主要病原体之一, EV71 属于小 RNA 病毒科(*Picornaradae*)肠道病毒属(*Enterovirus*)。目前根据病毒 VP1 编码区核苷酸序列的差异将 EV71 分为 A、B、C、D、E、F、G 共 7 个基因型, B 基因型和 C 基因型可进一步分为 B0 ~ B7 和 C1 ~ C6 基因亚型, C4 基因亚型可以进一步划分为 C4a 和 C4b 两个基因亚型进化分支, 其中基因型内核苷酸序列差异 < 12%, 型间差异为 16.5% ~ 19.7%<sup>[67]</sup>。EV71 全长 VP1 编码区被公认为进行基因型鉴定和基因特征分析的标准区域。本研究通过对 2016 年吉林省分离到的 38 株 EV71 流行株进行 VP1 编码区基因序列测定和氨基酸变异位点分析, 基因亲缘关系树显示, 2016 年吉林省所有流行株均为 C4a 基因亚型, 与中国其他地区的流行趋势一致, 推测 C4a 基因亚型的 EV71 流行株已适应中国社会和人口环境, 流行趋于稳定。在进化树上, 自上而下可以假设 4 条传播链, 提示吉林省 EV71 流行株具有多条传播链, 这与文献报道相一致<sup>[8]</sup>, 传播链 1 和传播链 3 所占流行株数量较多(34/38), 为引起吉林省 EV71 所致 HFMD 流行的优势流行株。

对 38 株 EV71 流行株的氨基酸变异位点研究发现, 在 VP1 编码区共有 7 处氨基酸位点发生变异, 这可能与肠道病毒 VP1 基因具有易重组、变异快的特点有关。在 22 位点 38 株流行株中有 35 株发生了 Q 到 H 的突变, 张建群等<sup>[9]</sup>也曾报道过此位点的变异, 吉林省自 2009 ~ 2015 年以来, 所有 EV71 流行株都发生了 Q 到 H 的突变。该位点 2016 年有 3 株 EV71 流行株发生了 Q 到 R 的改变, 此变异与 C2 代表株相一致, 无论是 Q 到 H 还是 Q 到 R 都发生的是由极性、中性氨基酸到碱性氨基酸的改变, 198 和 293 位点发生了由非极性疏水性氨基酸到极性、中性氨基酸的改变, 289 和 295 位点发生了由极性、中性氨基酸到非极性疏水性氨基酸的改变。邱晓枫等<sup>[10]</sup>和刘佳等<sup>[11]</sup>认为这些氨基酸特性的改变可能对蛋白质空间结构有一定的影响, 从而导致毒力的改变<sup>[12]</sup>。

在 HFMD 病原学监测中加强对 EV71 优势流行株的基因特征和遗传进化分析, 及时掌握流行株的重组变异情况, 对防止发生 EV71 大规模暴发流行具有重要意义。

## 参考文献

- [1] JI Y L, YANG Q J, WANG Y Q, *et al.* Phylogenetic analysis of enterovirus 71 isolated from patients with hand foot and mouth disease in Xicheng district, Beijing [J]. J Pub Health 2019, 29(11): 1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>
- [2] LI R Q, ZOU Q H, CHEN L J, *et al.* Molecular analysis of virulent determinants of Enterovirus 71 [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26237. doi: 10.1371/journal.pone. .
- [3] VAN DER SANDE S, VAN EEK J, MARTIN D P, *et al.* Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epedmic years, 1963-2010 [J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(5): 886-894.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2009 版)[S/OL]. [http://www.gov.cn/gzdt/2009-06/04/content\\_1332078.htm](http://www.gov.cn/gzdt/2009-06/04/content_1332078.htm). 2009.
- [5] ZHOU J H, WANG S, WEI L L, *et al.* Multiple viral transmission chains of enterovirus 71 co-circulated in Jilin province during 2009-2010 [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2012, 26(4): 273-276. (in Chinese)
- 周剑惠, 王爽, 魏雷雷, 等. 吉林省 2009-2010 年引起手足口病流行的肠道病毒 71 型基因特性的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2012, 26(4): 273-276.
- [6] SAXENA V K, SANE S, NADKSRNI S S, *et al.* Genetic diversity of enterovirus A71, India [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(1): 123-126.
- [7] WU X F, JI L, XU D S, *et al.* Genetic evolution and recombinant of enterovirus 71 isolation in Huzhou [J]. Dis Surveil, 2016, 31(7): 566-570. (in Chinese)
- 吴晓芳, 纪蕾, 徐德顺, 等. 肠道病毒 71 型湖州分离株的遗传进化和重组分析 [J]. 疾病监测, 2016, 31(7): 566-570.
- [8] ZHOU X F, YIN J, CUN J P, *et al.* Analysis of VP1 gene of enterovirus 71 isolated in Kunming and Qujiang city from 2012 to 2013 [J]. Chin J Viral Dis, 2016, 6(5): 368-373. (in Chinese)
- 周晓芳, 尹洁, 寸建萍, 等. 2012-2013 年昆明和曲靖两地肠道病毒 71 型 VP1 基因分析 [J]. 中国病毒病杂志, 2016, 6(5): 368-373.
- [9] ZHANG J Q, LUO X H, LI Y D, *et al.* The detection of hand-foot-mouth disease pathogens and analysis of EV71 VP1 in Yuyao, Zhejiang [J]. Chin J Health Lab Tec, 2016, 26(21): 3167-3169. (in Chinese)
- 张建群, 罗学辉, 李永东. 浙江省余姚市手足口病病原谱和 EV71 VP1 基因分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(21): 3167-3169.
- [10] QIU X F, ZHU S F, PU X Y, *et al.* Isolation and sequencing of VP1 region of enterovirus 71 strains in Hangzhou, Zhejiang [J]. Chin Prev Med, 2011, 12(12): 1014-1018. (in Chinese)
- 邱晓枫, 祝水芬, 濮小英, 等. 杭州市肠道病毒 71 型的分离与 VP1 区域序列分析 [J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(12): 1014-1018.
- [11] LIU J, XIA M L, GUO X M, *et al.* Analysis of the genetic characteristics of EV71 VP1 in hand-foot-mouth disease in certain provinces and cities of China [J]. Mod Prev Med, 2015, 42(14): 2626-2629. (in Chinese)
- 刘佳, 夏玛丽, 郭秀梅, 等. 我国部分省市手足口病 EV71 VP1 基因特征分析 [J]. 现代预防医学, 2015, 42(14): 2626-2629
- [12] SI L Y. Sequence analysis of complete genomes of enterovirus 71 and study on candidate virulence position of VP1 region [D]. Jinan: Shandong University, 2013. (in Chinese)
- 司鲁莹. 肠道病毒 71 型全基因组序列分析及 VP1 基因毒力位点研究 [D]. 山东济南: 山东大学, 2013.