

## 2007 年至 2008 年昆明地区腹泻患儿轮状病毒非结构蛋白基因特征的分析

刘梅<sup>1)</sup>, 杨娟<sup>1)</sup>, 赵亚玲<sup>1)</sup>, 侯宗柳<sup>2)</sup>, 戚勤<sup>1)</sup>, 周丽芳<sup>1)</sup>, 黄永坤<sup>1)</sup>  
(1) 昆明医学院第一附属医院儿科, 云南昆明 650032; 2) 昆明市延安医院中心实验室,  
云南昆明 650000)

**[摘要]** **目的** 探讨轮状病毒非结构蛋白(NSP4)基因的特征及变异情况。**方法** 在2007年和2008年昆明医学院第一附属医院儿科住院的96例秋冬季腹泻患儿中,随机选取轮状病毒阳性的12例(其中2007年6例,2008年6例)患儿粪便标本,采用RT-PCR扩增NSP4基因,并进行测序,测序结果用DNAassist软件对核苷酸序列进行翻译,并用Clustal-mp软件与Genbank Database中的4株人RV(Wa、KUN、AU-1、Hochi)、3株动物RV(EW、OSU、S11)和中国北京、上海、广州的流行株的NSP4序列进行分析比较。**结果** (1)选取的2007年6份和2008年6份样本均可以扩增出NSP4的全长片段,测序表明:2007年6份样本中有5株属于Wa株,1株属于KUN株;2008年6份样本中也有5株属于Wa株,1株属于KUN株。10株Wa株与来自GenBank Database的4株人RV(Wa、KUN、AU-1、Hochi)和3株动物RV(EW、OSU、S11)同源性分别为96.3%、85.3%、84.7%、95.1%和57.7%、92%、82.8%,与中国北京、上海、广州的流行株同源性均在95%以上;2株KUN株与以上来自GenBank Database的标准株的同源性分别为85.3%、98.2%、82.8%、85.9%、60.1%、85.3%、94.3%,和其他地区流行株的同源性为85%左右;(2)以Wa株为参考,10株Wa株的NSP4基因变异发生在第34位氨基酸,第76位氨基酸,第141位氨基酸,第145位氨基酸,第161位氨基酸和第169位氨基酸;以KUN株为参考,2株KUN株的NSP4基因变异仅在第87位氨基酸和第140位氨基酸。**结论** 2007年和2008年昆明地区流行株NSP4基因为Wa组和KUN组,以Wa组为主。

**[关键词]** 轮状病毒; NSP4; 基因; 变异

**[中图分类号]** R723.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2012)02-0080-04

## Analysis on Genetic Characteristics of the Nonstructural Protein NSP4 of Human Rotavirus Strains in Infants with Diarrher in 2007 and 2008 in Kunming

LIU Mei<sup>1)</sup>, YANG Juan<sup>1)</sup>, ZHAO YA - ling<sup>1)</sup>, HOU Zong - liu<sup>2)</sup>, QI Qin<sup>1)</sup>, ZHOU Li - fang<sup>1)</sup>  
(1) Dept. of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Central Laboratory, Kunming Yan'an Hospital, Kunming Yunnan 650000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the genetic characteristics and genetic variation of the nonstructural protein NSP4 of Human rotavirus strains. **Methods** We selected twelve positive RV samples among 96 infants with diarrhea who were hospitalized in the Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University from October to December in 2007 and 2008. NSP4 genes was amplified by RT-PCR and then cDNAs were sequenced. The homology of the nucleotide sequences of the NSP4 genes were analyzed by DNA assist and Clustal-mp. **Results** (1) NSP4 gene was amplified from 12 (6 of 2007 and 6 of 2008) RV positive samples. Among the twelve Kunming strains, the nucleotide homologies of the ten Wa strains to the four HRV standard strains

**[基金项目]** 云南省教育厅重点科研基金资助项目(03Z442C); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养计划资助项目(2006py01-18)

**[作者简介]** 刘梅(1968~),女,云南昆明市人,医学硕士,副主任医师,主要从事儿科临床及科研工作。

**[通讯作者]** 黄永坤. E-mail:hykkmynwd@163.com

(Wa, KUN, AU-1 and Hochi) and three animal RV (EW, OSU and All) were 96.3%, 85.3%, 84.7%, 95.1% and 57.7%, 92%, 82.8%. Compared with the epidemic strains in other different areas of China, the nucleotide homology of the NSP4 gene was over 95%. Compared with the standard strains from the above GenBank Database, the nucleotide homology of the two KUN strain were 85.3%, 98.2%, 82.8%, 85.9% and 60.1%, 85.3%, 94.3%. And compared with the epidemic strains other different areas of China, the nucleotide homology of the NSP4 gene was about 85%. (2) 6 unique conserved amino acids of 10 Wa strains differing from Wa at aa34, aa76, aa141, aa161 and aa169 were identified within NSP4; 2 unique conserved amino acids of 2 KUN strains differing from KUN at aa87 and aa140 were identified within NSP4. **Conclusions** Among the NSP4 of the twelve Kunming strains, the genotypes are Wa strain and KUN strain. The most dominant genotype of NSP4 is Wa strain.

[**Key words**] Rotavirus; NSP4; Gene; Variation

轮状病毒 (rotavirus, RV) 是世界范围内儿童重症腹泻的最主要病原, 每年全球约有 2 500 万人次就诊, 200 万人次住院, 平均 44 万小于 5 岁的儿童死亡<sup>[1]</sup>. 在我国, 因胃肠炎住院的 6~24 月龄的婴幼儿中, 大约有 60% 以上的患儿是由 RV 感染所致<sup>[2]</sup>. RV 的核心是由 11 个片段的 dsRNA 组成, 每个 RNA 片段各编码 1 种蛋白, 包括 6 种结构蛋白 (VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7) 和 5 种非结构蛋白 (NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5)<sup>[3]</sup>. 传统的发病机制认为 RV 感染后破坏小肠绒毛上皮细胞的绒毛结构, 从而引发渗透性腹泻和水、盐分泌及吸收失调性腹泻. 然而, 腹泻可发生在绒毛脱落之前, 这提示早期腹泻与其它的因素相关. 自 1996 年 Ball 等<sup>[4]</sup>首次提出 RV 非结构蛋白 NSP4 可能是一种肠毒素以来, NSP4 在 RV 致病机制中的作用越来越受到重视. 本研究在 2007 年和 2008 年 96 例秋冬季腹泻患儿中随机挑选 12 例 RV 阳性样本, 对其非结构蛋白 NSP4 基因特征进行初步分析, 以了解 NSP4 的基因特征和变异情况.

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集 2007 年 10~12 月和 2008 年 10~12 月在昆明医学院第一附属医院儿科住院的 96 例腹泻患儿粪便标本, 所有病例均符合以下腹泻诊断标准<sup>[5]</sup>: 大便性状改变, 呈稀便、水样便、黏液便或脓血便; 大便次数比平时增多. 标本逐月收集, 详细记录腹泻患儿大便次数, 病程长短及有无合并呼吸道感染症状, 并存于 -70 °C 备用. 从中随机选取轮状病毒抗原检测阳性的 12 份粪便标本 (其中 2007 年 6 份, 2008 年 6 份) 用于获得 NSP4 基因.

### 1.2 RV-RNA 提取

用 pH = 7.6 的 tris 缓冲液将粪便标本稀释为 10%, 3 000 r/min 离心 30 min 后得到粪便上清液, 用柱式小量病毒 RNA 抽提试剂盒 (购自上海华舜生物工程有限公司) 提取 RNA, 按试剂盒说明书进行操作.

### 1.3 NSP4cDNA 的扩增及序列分析

采用 RT-PCR 法扩增 NSP4cDNA, 上、下游引物分别为 10Beg16 (5'-TGTTCCGAGAGAGCGCGT-G-3'), 10End722c (5'-GACCATTCCCTCCATTAA-C-3'). 具体操作如下: DMSO、dsRNA、上游及下游引物 (10 pmol/L) 各 2 μL, 97 °C 变性 5 min, 冰浴 5 min; 5 × RT-PCR 缓冲液 4 μL、Ribonucle-ase Inhibitor 0.5 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、AMV 逆转录酶 0.5 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20 μL, 42 °C 逆转录 30 min, 94 °C 变性 5 min, 再加上游及下游引物各 1 μL、dNTP 4 μL、Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL、10 × PCR 缓冲液 5 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 70 μL. 94 °C 变性 5 min, 开始 PCR 循环, 条件为: 94 °C 1 min, 42 °C 2 min, 72 °C 3 min 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min, 扩增产物长度为 725 bp. 以上引物和试剂购自大连宝生物工程有限公司. PCR 产物经纯化后送至上海生工生物工程有限公司进行测序.

### 1.4 数据分析

采用 DNAassist 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 各序列的同源性比较采用 Clustal-mp, 种系进化树计算采用 MEGA4.0 软件. 用于参比的 NSP4 序列 4 株人 RV (Wa、KUN、AU-1、Hochi)、3 株动物 RV (EW、OSU、SAIL) 和中国北京、上海、广州的流行株来源于基因序列数据库 (Genbank Database).

## 2 结果

### 2.1 NSP4 基因氨基酸序列的同源性分析

选取的2007年6份和2008年6份VP7阳性标本均可以扩增出NSP4的全长片段,2007年6份样本中有5株属于Wa株,1株属于KUN株;2008年份样本中也有5株属于Wa株,1株属于KUN株。GenBank Database中选择4株人RV(Wa、KUN、AU-1、Hochi)、3株动物RV(EW、OSU、S11)和中国北京、上海、广州的流行株作为比较对象,12份样本和以上毒株的NSP4基因经过DNAassist软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列,各序列的同源性比较采用Clustal-mp进行分析:10株Wa株与来自GenBank Database的4株人RV(Wa、KUN、AU-1、Hochi)和3株动物RV(EW、OSU、S11)同源性分别为96.3%、85.3%、84.7%、95.1%和57.7%、92%、82.8%,与中国北京、上海、广州的流行株同源性均在95%以上。2株KUN株与以上来自GenBank Database的标准株的同源性分别为85.3%、98.2%、82.8%、85.9%、60.1%、85.3%、94.3%,和其他地区流行株的同源性为85%左右。组内的同源性较高,大于95%;而组间的同源性低,约85%左右。

### 2.2 NSP4 基因进化树分析

从进化树中可知10株昆明株与Wa株和1998年广州、北京、上海处于1个独立进化分支上,2株昆明株与KUN株处于1个独立的进化分支上,与1998年广州、北京、上海处于不同进化分支,结果见图1。

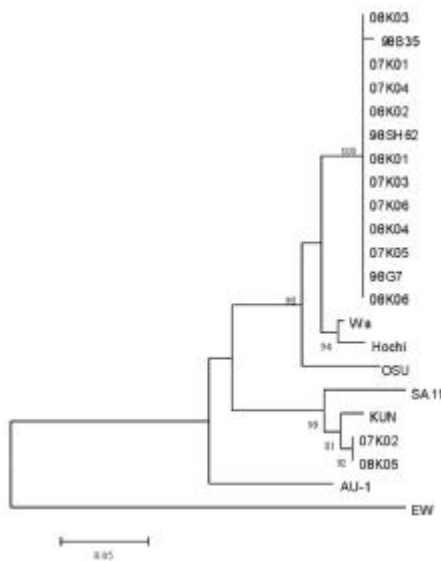


图1 NSP4 基因结构进化树

Fig. 1 The cladogram of NSP4 gene

### 2.3 SP4 氨基酸序列变异位点分析

以Wa株为参考,对昆明地区10株Wa株的

NSP4 基因变异主要在第34位氨基酸(L-P),第76位氨基酸(I-V),第141位氨基酸(V-T),第145位氨基酸(S-T),第161位氨基酸(S-N)和第169位氨基酸(S-I)。以KUN株为参考,对昆明地区2株KUN株的NSP4基因变异仅在第87位氨基酸(E-Q)和第140位氨基酸(G-D)。

## 3 讨论

NSP4由RV基因组中的第10基因片段编码,初始产物含有175个氨基酸,分子量为20KD,在氨基酸糖基化后的分子量为28KD(糖基化后成为穿越内质网的穿膜蛋白)。A组RV的NSP4基因全长750bp,具有1个单一的开放阅读框架,而其它组RV的NSP4基因结构尚未阐明。研究显示NSP4是1种跨内质网膜糖蛋白,其氨基末端固定在内质网膜内,而其羧基端延伸至感染细胞的胞浆内,可作为胞浆中的RV内层颗粒(inner capsid particle, ICP)的细胞内受体,它能够通过VP6蛋白结合ICP,并将这些亚病毒颗粒通过出芽的方式运至内质网膜腔内并获得暂时性包膜<sup>[6]</sup>。Ball等<sup>[4]</sup>的研究也证实了该点,同时发现NSP4亲水区第114至135位氨基酸组成的肽段(NSP4 114-135)具有肠毒素活性。Zhang等<sup>[7]</sup>则认为NSP4亲水区第114至140位氨基酸组成的肽段具有肠毒素功能。NSP4有2个重要功能区:1个是ICP结合区,另1个是VP4结合区,分别位于161~175位及132~148位氨基酸。Ball等还用重组的猴轮状病毒SA11株NSP4或其合成肽段NSP4 114~135,经腹腔或回肠内注射给6~10日龄小鼠,能诱导与鼠龄有关的剂量依赖性腹泻,而且这种致泻作用具有特异性,因此认为NSP4可能与轮状病毒的毒力有关。随后的研究显示NSP4具有明显的抗原性,RV感染后NSP4能刺激免疫反应,有可能成为发展疫苗的候选基因。研究还表明NSP4增加内质网膜对Ca<sup>2+</sup>通透性,引起细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,导致Cl<sup>-</sup>分泌增加,引发腹泻。

Horie等<sup>[8]</sup>的相关研究发现了3种NSP4基因型:Wa组(包括G1、G3、G4、G5、G9、P1A<sup>[8]</sup>)、KUN组(包括G2、G6、G10、P1B<sup>[4]</sup>、P2A<sup>[6]</sup>、P6<sup>[1]</sup>、P7<sup>[5]</sup>、P<sup>[2]</sup>)、AU-1组(G8、P3<sup>[9]</sup>、P5<sup>[3]</sup>)。本研究从GenBank中选择4株人RV(Wa、KUN、AU-1、Hochi)、3株动物RV(EW、OSU、S11)和中国北京、上海、广州的流行株作为比较对象,12份样品和以上毒株的NSP4基因经过DNAassist软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列,各序列的同源性

比较采用 Clustal-mp 进行分析, 根据氨基酸的同源性和进化树分析发现: 2007年6个昆明株中有5株属于 Wa 株, 1株属于 KUN 株; 2008年6个昆明株中也有5株属于 Wa 株, 1株属于 KUN 株. 10株 Wa 株与来自 GenBank Database 的4株人 RV (Wa、KUN、AU-1、Hochi) 和3株动物 RV (EW、OSU、Sall) 同源性分别为 96.3%、85.3%、84.7%、95.1%和 57.7%、92%、82.8%, 与中国北京、上海、广州的流行株同源性均在 95%以上. 2株 KUN 株与以上来自 GenBank Database 的标准株的同源性分别为 85.3%、98.2%、82.8%、85.9%、60.1%、85.3%、94.3%, 和其他地区流行株的同源性为 85%左右. 研究发现昆明地区 NSP4 基因为 Wa 组和 KUN 组, 相对保守, 组间同源性高, 组内同源性低, 这与王大燕等<sup>[9]</sup>的报道一致.

本研究组 2002 年的研究证实腹泻患儿轮状病毒 02, K1 株的 NSP4 基因型属于 Wa 组, 02, K1 株与 ST3 株、Wa-1 株、Wa-a 株、Wa-v 株的核苷酸和氨基酸同源性均达 90%以上; 02, K1 株的 NSP4 氨基酸序列有 14 个位点发生了变异, 即 aa16、aa26、aa60、aa72、aa76、aa124、aa135、aa140、aa141、aa 145、aa146、aa161、aa162、aa169<sup>[10]</sup>. 研究组的另外研究表明, 2002 年昆明轮状病毒流行株以 G1 型为主, 2003 年轮状病毒腹泻株主要以 G3 型为主; 该研究分离的 22 株 RV NSP4 有重症腹泻株 8 株, 轻症腹泻株 14 株, 其氨基酸序列均十分保守, 仅在第 76 及 139 位氨基酸上有变异<sup>[11,12]</sup>. 在比较了轻症腹泻株和重症腹泻株 NSP4 基因 2 个位点的氨基酸后发现: 第 76 及 139 位氨基酸由缬氨酸变为异亮氨酸 (V→I) 与轮状病毒腹泻临床症状严重程度无相关关系. 氨基酸同源性表明昆明地区轮状病毒流行株间的同源性高达 98.9%~99.4%, 重症腹泻株和轻症腹泻株可同属于 1 个亚组, 流行株全都属于 Wa 组<sup>[13]</sup>.

本研究以标准株 Wa 株为参考, 对昆明地区 10 株 Wa 株的 NSP4 基因变异情况进行比较, 发现 10 株 Wa 株的氨基酸序列变异位点在第 34 位氨基酸 (L-P), 第 76 位氨基酸 (I-V), 第 141 位氨基酸 (V-T), 第 145 位氨基酸 (S-T), 第 161 位氨基酸 (S-N) 第 169 位氨基酸 (S-I). 以标准株 KUN 株为参考, 对昆明地区 2 株 KUN 株的 NSP4 基因变异情况进行比较, 氨基酸序列变异位点仅在第 87 位氨基酸 (E-Q), 第 140 位氨基酸 (G-D). 在 NSP4 的肠毒素活性区 (aa114-135) 12 个昆明株在肠毒素活性区是高度保守的.

综上所述, 目前发展的各种轮状病毒疫苗主要针对 VP7 血清型, 但不同时间不同地域流行的轮状病毒 VP7 血清型变异较大, 而 NSP4 基因的相对保守性及其免疫原性使其有可能成为发展疫苗的首选基因.

### [参考文献]

- [1] PARADLAR U D, HMMNELMAN E G, BREASEE J S, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(5):565-572.
- [2] 王蓓, 汪宁, 金辉, 等. 不同地区婴幼儿轮状病毒感染性腹泻的流行病学研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(9):737.
- [3] GENTSCH J R, LAIRD A R, BIELFELT B, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs [J]. *J Infect Dis*, 2005, 192 (Suppl 1):S146-159.
- [4] BALL J M, TIAN P, ZENG C Q Y, et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein [J]. *Science*, 1996, 272:101-104.
- [5] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:848-853.
- [6] 赵亚玲, 黄永坤, 魏群德. 轮状病毒NSP4与轮状病毒腹泻的相关研究新进展 [J]. *国外医学儿科学分册*, 2004, 1(34):9-11.
- [7] ZHANG M, ZENG C Q, DONG Y, et al. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence[J]. *J Virol*, 1998, 72(5):3666-3672.
- [8] HORIE Y, MSAMUNE O, NAKAGOMI O. Three major alleles of rotavirus NSP4 protein identification by sequence analysis[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78:2341-2346.
- [9] 王大燕, 王健伟, 徐倏燊, 等. 中国轮状病毒非结构蛋白NSP4基因变异特征的分析[J]. *中华实验与临床病毒学杂志*, 2003, 3(17):10-14.
- [10] 黄永坤, 赵亚玲, 侯宗柳, 等. 人轮状病毒非结构蛋白NSP4基因特征的初步分析 [J]. *昆明医学院学报*, 2004, 25(4):47-50.
- [11] 甄双平, 黄永坤, 侯宗柳. 昆明地区2002年到2004年轮状病毒肠炎患儿的病毒分子流行病学特征[J]. *中国实用儿科杂志*, 2006, 21(5):354-355.
- [12] 王艳丽. 60例秋冬季腹泻患儿轮状病毒分子基因型变化研究[D]. 昆明:昆明医学院第一临床学院, 2008.
- [13] 黄永坤, 戚勤, 侯宗柳, 等. 昆明地区22株人轮状病毒VP7及NSP4基因分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(12):980-983.

(2011-11-12 收稿)