

不同基因型戊型肝炎病毒株宿主选择性 差异的基因突变分析

王晨 付红伟 杨桂芳

作者单位: 300052 天津, 天津医科大学总医院医学检验科

通讯作者: 付红伟, Email: frankson5323@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.01.001

【摘要】 目的 初步探讨影响不同基因型戊型肝炎病毒(HEV)能否跨物种传播的核苷酸或氨基酸突变位点的特点。**方法** 从 DNA 序列 GenBank 数据库获得 87 株 HEV 全基因组序列,根据宿主选择不同的特点将其分为 H 类和 Z 类,其中 H 类为基因 1 型和 2 型, Z 类为基因 3 型和 4 型。通过 ALIGNX 软件对两类中全部 HEV 全基因组序列进行比对分析,寻找影响两类 HEV 病毒株间宿主选择或致病性差异的可疑核苷酸或氨基酸突变位点。**结果** 本研究共发现 26 个可疑的核苷酸或氨基酸突变位点,可能参与决定不同基因型 HEV 宿主选择性差异;这些突变位点分布在 ORF1 区有 16 个,ORF2 区有 7 个,ORF3 区有 1 个,5'UTR 和 3'UTR 区分别各有 1 个,特别是 G11A/C(5'UTR 区)、T511S(E2s 蛋白决定簇区)及 E78D(ORF3 区)相对于其他突变子更为重要。**结论** 26 个可疑特异性核苷酸或氨基酸突变位点的发现为研究不同基因型 HEV 宿主选择性和致病性差异提供了重要线索。

【关键词】 戊型肝炎病毒; 宿主; 核酸决定子

基金项目: 国家自然科学基金(81401746)

Gene mutation analysis of host selective differences in different genotypes of hepatitis E virus strains

Wang Chen, Fu Hongwei, Yang Guifang. Department of Medical Laboratory, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Corresponding author: Fu Hongwei, Email: frankson5323@126.com

【Abstract】 **Objective** To preliminarily discuss the characteristics of by influencing on different genotypes of Hepatitis E virus (HEV) whether they can spread nucleotide and/or amino acid mutation sites across species or not. **Methods** Eighty-seven HEV whole genome sequences were obtained from DNA sequences GenBank database. They were divided into H and Z categories according to the characteristics of different host selections. H category contained genotypes 1 and 2, and Z category consisted of genotypes 3 and 4. Comparison analyses of all the whole HEV genome sequences in the two categories were conducted by using the ALIGNX software, so as to look for suspicious nucleotide or amino acid mutation sites which could influence the differences in host selection or pathogenicity between the two categories of HEV strains. **Results** A total of 26 suspicious nucleotide or amino acid mutation sites were found in this study, and they might be involved in determining host selective differences in HEV with different genotypes. These mutation sites included 16 in ORF1 region, 7 in ORF2 region, 1 in ORF3, 1 in 5'UTR and 1 in 3'UTR, particularly, the mutants at G11A/C (5'UTR region), T511S (E2s protein determinant region) and E78D (ORF3 region) mutation sites were more important than those at other sites. **Conclusion** The discovery of 26 suspicious specific nucleotide or amino acid mutation sites provides important clues for studying the differences in host selectivity and pathogenicity of HEV with different genotypes.

【Key words】 Hepatitis E virus; Host; Nucleotide determinants

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81401746)

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是一种单链无包膜的小 RNA 病毒,在我国卫生环境较差地区是急性病毒性肝炎的最主要致病因素^[1]。随着对戊型肝炎(戊肝)研究的不断深入,戊肝是人畜共

患病的事实已为科研工作者所公认,然而相关报道显示,不同基因型 HEV 病毒株存在着明显的宿主选择性及致病性强弱的差异^[2]。即基因 3 型和 4 型 HEV 病毒株既能感染人又能感染猪、兔、鼠等哺乳

类动物,而基因 1 型和 2 型 HEV 病毒株却仅能感染人和非人灵长类动物,不能跨物种传播^[3]。据其致病性强弱特点分析,基因 1 型和 2 型的致病性较基因 3 型和 4 型强^[4]。在近年来对 HEV 衣壳蛋白的晶体结构、其所编码蛋白的功能分析、病毒组装与进入宿主细胞的过程致病性影响因素的研究取得诸多进展的基础上,本研究通过对现有已知 HEV 全基因组序列的比对分析,寻找影响两大类 HEV 病毒株间宿主选择性及致病性差异的可疑基因突变决定子。

1 资料与方法

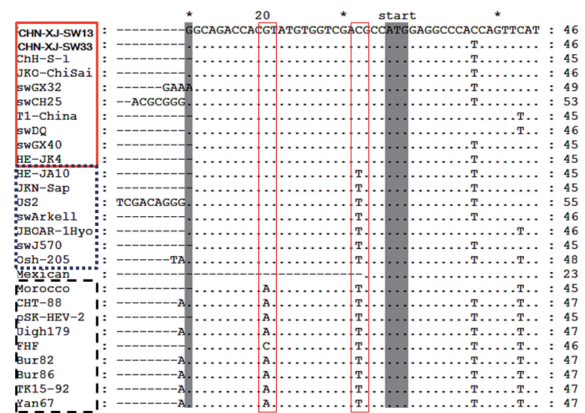
从 DNA 序列 GenBank 数据库获取 87 株背景较为资料清楚的 HEV 病毒株核苷酸序列,包含基因 1~4 型人源类或人畜共患类 HEV 病毒株,见表 1。鉴于兔 HEV 尚不确定是否能够跨物种传播,因此未纳入本次研究分析。

上述 87 株 HEV 病毒株分为两大类,一类为仅感染人的人源病毒类(human, H 类),包含基因 1 型和 2 型 HEV 病毒株;另一类为广泛分离自人、猪、鹿等多种哺乳类动物,且可跨物种感染人的畜共患类(zoonosis, Z 类),包含基因 3 型和 4 型 HEV 病毒株。Z 类 HEV 病毒株可引起急性散发性戊肝,已被广泛认为是一种人畜共患病的病原体^[5]。

利用 AlingX 软件(Vector NTI 软件包)对上述两类 HEV 核苷酸或编码氨基酸进行序列比对分析,寻找两类 HEV 病毒株间特异性的基因突变位点,并结合 HEV 病毒株基因组和编码蛋白的结构特点及功能特点进行综合分析,寻找可能影响不同基因型 HEV 的宿主选择性及致病性强弱的位点。

2 结果

2.1 5'UTR 区的分析 5'UTR 区长度为 26 nt 左右,相对较为保守。两类 HEV 病毒株间在此区域内仅发现 G11A/C(位点参照 GU11961)一个特异的核苷酸突变位点,即 Z 类 HEV 基因组中第 11 核苷酸位点均为 G,而 H 类 HEV 基因组中该位点核苷酸为 A 或 C。见图 1。



注:Start ATG 为 ORF1 起始密码子,两灰色条框之间区域为 5'UTR 区

图 1 不同基因型 HEV 病毒株 5'UTR 区基因序列比对分析

2.2 ORF1 区的分析 在 ORF1 区,Z 类 HEV 病毒株编码 1705~1707 位氨基酸(aa),H 类 HEV 病毒株编码 1692~1693 位氨基酸(aa)。两类病毒株编码氨基酸片段的长短不同主要是由其高变区(711~798aa)的长度不同引起的。在 ORF1 区域内共发现 16 个氨基酸置换位点,其中应关注的是位于高变区 5' 端的 9 个连续氨基酸位点的置换,其在 Z 类 HEV 病毒株中均为 SGFSSD/CFSP(708~716aa),而在 H 类 HEV 病毒株中相应的位点则分别为 VDAVS(基因 1 型)或 ITDTP(基因 2 型)。见表 2。

2.3 ORF2 区的分析 基因 4 型 HEV 病毒株的 ORF2 区编码约 674 个氨基酸,较基因 1~3 型多编码约 14 个氨基酸。ORF2 区较 ORF1 区更为保守,有 7 个氨基酸置换位点在 ORF2 区域内被发现,见表 3。

2.4 ORF3 区的分析 基因 4 型 HEV 病毒株的 ORF3 区编码约 114 个氨基酸,较基因 1~3 型少编码约 9 个氨基酸。在 ORF3 区域内,仅发现 E78D 一个特异的氨基酸位点突变。

2.5 3'UTR 区的分析 去除 poly(A) 尾后,3'UTR 区由 65~72 个核苷酸组成,该区域有诸多核苷酸缺失或插入,变异性较大。在 3'UTR 区,所有 Z 类病毒株在 poly(A) 尾前较 H 类病毒株多一个核苷酸 G。

表 1 87 株已知全基因组序列的 HEV 病毒株的分类和基因分型

类别	基因型	株数(株)	病毒株 GenBank 序列号
H 类	HEV-1	20	AF444002, AF185822, AF444003, AF459438, AF076239, AF051830, AR207663, AY204877, AY230202, D11693, D10330, D11092, L25547, L25595, L08816, M73218, M80581, M94177, X99441, X98292
	HEV-2	1	M73218
Z 类	HEV-3	30	AF455784, AB089824, AB074918, AB074920, AF060668, AF060669, AB073912, AF082843, AY115488, AP003430, AB091394, AB236320, AX181808, AB246676, AB222182-AB222184, AX181883, AB189070-AB189075, AY575857-AY575859, AB248520-AB248522
	HEV-4	36	AB200239, AB097811, AB099347, AB097812, AB253420, AB197673, AB161717-AB161719, AB108537, AB074915, AB197674, AY594199, AJ272108, DQ279091, EF077063, EU676172, EU366959, AB074917, AB082588, AB080575, AB193176-AB193178, AB091395, AB220971, AB723745, EU366959, AB220976-AB220979, GU206559, DQ450072, GU119961, GU119960

表 2 ORF1 区 H 类和 Z 类 HEV 病毒株 16 个氨基酸位点置换情况

类别	基因型	ORF1 区突变氨基酸及其位点															
		40	62	83	591	708-716	931	1061	1151	1256	1287	1298	1438	1445	1454	1573	1578
H 类	HEV-1	H	F	S	N	VDAVS	L	A	S	F	L	V	A	Q	D	E	P
	HEV-2	H	F	S	N	ITDTP	L	A	S	F	L	V	A	Q	D	E	P
Z 类	HEV-3	R	L	A	V	SGFSSDFSP	P	S	A	Y	M	L	E	P	E	D	R
	HEV-4	R	L	A	V	SGFSSCFSP	P	S	A	Y	M	L	E	P	E	D	R

注:位点信息参照 CHN-XJ-SW13(GU119961)病毒株

表 3 ORF2 区 H 类和 Z 类 HEV 病毒株 7 个氨基酸位点置换情况

类别	基因型	株数 (株)	ORF2 区突变氨基酸及其位点						
			19	105	131	497	506	511	613
H 类	HEV-1	20	P	A	H	S	V	S	A
	HEV-2	1	P	A	H	S	V	S	A
Z 类	HEV-3	30	A	S	P	T	M	T	G
	HEV-4	36	A	S	P	T	M	T	G

注:位点信息参照 CHN-XJ-SW13(GU119961)病毒株

3 讨论

本研究利用 ALIGN 软件比对分析 87 株基因 1~4 型 HEV 病毒株的基因组序列或氨基酸序列,以寻找影响 H 类和 Z 类 HEV 病毒株宿主选择性差异的突变位点。结果显示,发现 26 个特异的突变位点可能参与 HEV 宿主选择,其中在 5'UTR 区发现了 G11A/C 突变位点。先前报道显示,5'UTR 区和 ORF1 区 5'端 58 个核苷酸一起组成了保守的二级结构(颈环和发卡结构),该二级结构可通过与 ORF2 编码蛋白的结合,在 HEV 病毒衣壳的组装过程中发挥重要作用^[6]。本研究发现的 G11A/C 突变位点可能会影响到其 HEV 基因组 5'端的二级结构发生变化,进而可能影响到病毒衣壳的组装,并由此影响到宿主选择性的不同。另外,通过与甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)核苷酸序列的类比可以发现类似现象,即 HAV 5'UTR 区的基因位点突变与甲型肝炎疾病的严重程度密切相关^[7]。而本研究中发现的 5'UTR 区的 G11A/C 突变位点是否影响到两类 HEV 病毒株间的致病性差异亦值得进一步分析研究。

HEV 病毒株的 ORF1 区编码了一个包含多个功能区的非结构蛋白,如甲基转移酶、木瓜样蛋白酶(apain-like protease, PLP)、RNA 解旋酶(RNA helicase)和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)等^[8]。本研究在 ORF1 区共发现 16 个氨基酸置换位点。这些氨基酸位点的突变可能会引起蛋白质功能的改变,而各个位点的突变对病毒株究竟会引起什么样的

改变则取决于它们所在功能区的具体功能。例如甲基转移酶区核苷酸编码的蛋白与甲基帽结构(m7GpppX)的形成有关,具体负责将 m7GTP 添加到 mRNA 的 5'端^[9],而本研究发现的 R40H、L62F 和 A83F 位于甲基转移酶区,可能会导致两类病毒株添加甲基化帽的能力强弱有所不同,而甲基化帽结构又是 HEV 传染力的必要基础^[10],从而可以推测发生在甲基转移酶区三个突变可能通过影响甲基化帽的形成对 HEV 病毒株传染力产生作用。HEV 基因组在 ORF1 区存在一个高变区,既往研究结果提示,将部分或整个 ORF1 区内高变区完全删除的 HEV 诱导突变株毒力会减弱^[11]。本研究在此高变区 5'端发现,708-716 位点处 Z 类病毒株氨基酸均为 SGFSSD/CFSP,而在 H 类病毒株为 VDAVS(基因 1 型)或 ITDTP(基因 2 型),这是发生在高变区的连续 9 个氨基酸位点的突变,有必要建立删除 9 个氨基酸位点的 HEV 突变株,以进一步证实这 9 个连续氨基酸位点置换对 HEV 病毒株毒力强弱的影 响。此外,在 ORF1 区发现的 16 个氨基酸突变位点中,有 8 个坐落在 RdRp 区,而 RdRp 区在单股正链 RNA 病毒间是十分保守的区域,常被作为遗传进化标志。因此,如此高频率的特异性氨基酸突变发生在 RdRp 区,可以间接提示,Z 类和 H 类 HEV 病毒株可能是各自相对独立进化而来的。

HEV 病毒株 ORF2 区编码病毒衣壳蛋白,HEV 衣壳负责与宿主细胞结合从而引发感染过程^[12-13]。Li 等^[14]报道了 HEV 衣壳蛋白 E2s 区域(氨基酸 455-602)的三维晶体结构,并对其功能进行了研究,该报道显示,HEV 中和抗体的识别位点也在 E2s 区域,且 E2s 蛋白是与宿主细胞相互作用的基础。本研究在 ORF2 区发现了 7 个特异的氨基酸置换位点,其中有 4 个(T497S、M506V、T511S 和 G613A)位于 E2s 区。此外,本研究还发现,T511S 核苷酸位点突变与郭清顺等^[15]研究报道的 ORF2 蛋白第 511 位点的差异会影响基因 1 型和基因 4 型 HEV 病毒株的宿主选择的观点是一致的。鉴于以上分析,很有

必要通过基因位点敲除突变或重组定点突变的方式,进一步研究证实这 4 个发生在 E2s 区的突变是否真正影响了 H 类和 Z 类 HEV 病毒株间的宿主选择差异。

HEV 病毒株 ORF3 区含编码 114(基因 4 型)或编码 123(基因 1~3 型)氨基酸的蛋白(pORF3), pORF3 通过激活细胞信号通路(ERK 通路),能发挥延长内膜信号进而减弱宿主细胞的凋亡途径等作用,促进宿主细胞存活;同时也可减少急性时相反应蛋白的表达和提高 $\alpha 1$ -微球蛋白的分泌,降低宿主对 HEV 病毒株的天然免疫反应,在 HEV 病毒株侵入宿主的致病过程中发挥了重要影响作用^[16]。本研究在此区域仅发现 E78D 这一个氨基酸位点的置换,该突变是否能够通过影响 pORF3 而触发强弱不同的细胞信号通路反应或改变宿主细胞的天然免疫反应状态,最终影响两类 HEV 病毒株间的致病性差异,值得我们进一步研究。

HEV 病毒株 3'UTR 区是高突变区, Agrawal 等^[17]报道显示, 3'UTR 与它相邻的 ORF2 的 3' 末端共同组成二级结构(颈环状),该二级结构既负责与 HEV RdRp 酶结合,也参与宿主蛋白的反应。鉴于此报道结果, 3'UTR 区可能会参与 HEV 病毒株与宿主细胞的结合过程。然而 Graff 等^[18]报道结果却显示,将来源于猪 HEV 病毒株的 3'UTR 区重组到基因 1 型人源 HEV 病毒株形成新的突变镶嵌病毒体,依然不能使该人源 HEV 镶嵌病毒体成功感染猪。该报道结果说明, HEV 的 3'UTR 区对 HEV 病毒株的宿主选择起不到决定性作用。本研究发现, Z 类 HEV 病毒株的 3'UTR 区较 H 类病毒株多一个核苷酸 G,据前期研究报道来看,该突变对 HEV 宿主选择所发挥的影响作用可能较为有限,不能作为未来研究的重点。

综上所述,本研究发现了 26 个基因突变位点可能参与影响 Z 类和 H 类病毒株的宿主选择,由于目前对 HEV 进入宿主细胞机制的研究报道甚少,因此很难确定究竟是哪几个基因位点的置换对 HEV 的宿主选择及致病性差异起到了决定性作用。但是本研究为确定两类病毒株间宿主选择及致病性差异提供了重要的线索,有利于后续实验研究方案的设计。

参考文献

- 1 张海明. 肝移植患者的戊型肝炎病毒感染[J/C D]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3(4): 241-245.
- 2 付红伟, 杨桂芳, 李昕. 我国戊型肝炎流行病学新特点分析[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(3): 184-188.
- 3 Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E [J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2218-2226.
- 4 Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease [J]. J Hepatol, 2008, 48(3): 494-503.
- 5 付红伟, 杨桂芳, 李昕. 两株猪 HEV 病毒株全基因组序列分析[J]. 实用检验医师杂志, 2012, 4(2): 84-91.
- 6 Surjit M, Jameel S, Lal SK. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA [J]. J Virol, 2004, 78(1): 320-328.
- 7 Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, et al. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions [J]. Gut, 2002, 51(1): 82-88.
- 8 Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(17): 8259-8263.
- 9 Emerson SU, Zhang M, Meng XJ, et al. Recombinant hepatitis E virus genomes infectious for primates: importance of capping and discovery of a cis-reactive element [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(26): 15270-15275.
- 10 Magden J, Takeda N, Li T, et al. Virus-specific mRNA capping enzyme encoded by hepatitis E virus [J]. J Virol, 2001, 75(14): 6249-6255.
- 11 Pudupakam RS, Huang YW, Opiressnig T, et al. Deletions of the hypervariable region (HVR) in open reading frame 1 of hepatitis E virus do not abolish virus infectivity: evidence for attenuation of HVR deletion mutants in vivo [J]. J Virol, 2009, 83(1): 384-395.
- 12 Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention [J]. J Med Virol, 2008, 80(4): 646-658.
- 13 Graff J, Zhou YH, Torian U, et al. Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles [J]. J Virol, 2008, 82(3): 1185-1194.
- 14 Li S, Tang X, Seetharaman J, et al. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(8): e1000537.
- 15 郭清顺, 葛胜祥, 熊君辉, 等. 戊型肝炎病毒基因 1 型和基因 4 型中和表位区域分子差异研究[J]. 病毒学报, 2007, 23(6): 454-458.
- 16 Chandra V, Taneja S, Kalia M, et al. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus [J]. J Biosci, 2008, 33(4): 451-464.
- 17 Agrawal S, Gupta D, Panda SK. The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [J]. Virology, 2001, 282(1): 87-101.
- 18 Graff J, Nguyen H, Kasorndorkbua C, et al. In vitro and in vivo mutational analysis of the 3'-terminal regions of hepatitis e virus genomes and replicons [J]. J Virol, 2005, 79(2): 1017-1026.

(收稿日期: 2017-12-07)

(本文编辑: 张耘菲)