

- [22] 许聆雁, 黄宪章, 庄俊华. 类风湿关节炎的免疫学检测方法进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(1): 51-53.
- [23] 吴庆. 抗可提取性核抗原抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 679-680.
- [24] 刘军锋, 贾克刚, 刘运德. 免疫印迹法检测在自身免疫性疾病 ENA 多肽抗体谱及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27

(7): 669-670.

- [25] Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(3): 190-198.

(收稿日期: 2011-08-21)

• 综 述 •

流行性乙型脑炎病毒基因结构的研究进展

许丽娟 综述, 朱朝敏 审核

(重庆医科大学儿童医院 400016)

关键词: 脑炎; 脑炎病毒; 基因**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.020**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)18-2089-03

流行性乙型脑炎(简称乙脑)每年大约有 $(35 \sim 50) \times 10^3$ 例患者, 其中约 10×10^3 例患者死亡^[1]。乙脑患者中重症患者往往留下各种神经系统后遗症, 乙脑病毒主要经蚊虫或吸血昆虫传播, 携带乙脑病毒的蚊虫叮咬人体后, 病毒先在单核-巨噬细胞内增殖, 随后进入血流, 引起免疫反应, 抗体与病毒抗原结合, 沉积于脑实质和血管内皮细胞, 激活补体, 产生免疫损伤^[2]。

乙脑主要发病于亚洲地区和太平洋地区, 我国地域广阔, 占亚洲四分之一区域, 除了新疆、青海、西藏外, 其余各地均有病例发生^[1]。因此深入研究中国流行乙脑病毒的分子生物学, 对于了解亚洲乃至全世界的乙脑病毒的特性具有举足轻重的作用。现主要叙述乙脑病毒有关基因结构方面的进展。

1 乙脑病毒的基本基因组结构

乙脑病毒同其他黄病毒一样, 为一单股正链的 RNA 病毒, 全长约 11 kb, 中间有一个开放读码框。乙脑病毒的血清学包括有 8 种类型和 2 种亚型, 分别为 West Nile virus(WNV)、Kunjin virus(a subtype of WNV)、Murray Valley encephalitis virus(MVEV)、Alfuy virus(a subtype of MVEV)、St. Louis encephalitis virus(SLEV)、Usutu virus(USUV)、Koutango virus, Yaounde virus and Cacipacore virus^[3]。乙脑病毒的基因顺序从 5' 端到 3' 端依次为 C-preM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5^[4]。

2 乙脑病毒基因结构的编码区

乙脑病毒的编码区能编码 3 种结构蛋白(核衣壳蛋白 C、膜蛋白 M 和包膜蛋白 E)和 7 种非结构蛋白(包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)^[5]。乙脑病毒的生物学性质主要由其编码的结构蛋白决定, 如和细胞受体的结合、机体免疫反应的产生等^[6]。

核衣壳蛋白(C 蛋白)由 127 个氨基酸组成, C 蛋白的 C 端疏水性氨基酸将其固定在宿主细胞的粗面内质网膜上, 以便装配成包裹基因组的核衣壳, 使之免受核酸酶的破坏^[7]。

膜蛋白(M 蛋白)由 75 个氨基酸残基组成, 是病毒诱发保护性免疫的协同成份。M 蛋白能诱发中和抗体, 现在的一些研究表明在乙脑病毒的 PrM/M 蛋白上有一线性的表位, 并证明是一个线性的 B 细胞表位, 即 M14-13。这个线性的 B 细胞表位是乙脑病毒所特有的, 它只能和乙脑病毒猪血清或者兔血清发生反应, 而不能和抗 DENV、抗 WNV 血清反应, 且在不同的乙脑病毒序列中具有高度的保守性, 这对根据病毒特异性的

表位诊断乙脑提供了潜在的重要性依据, 并有助于进一步阐明乙脑病毒 PrM/M 的抗原结构和生物学功能^[8]。

E 蛋白是乙脑病毒最主要的结构蛋白, 位于病毒的表面, 由 500 个氨基酸残基组成, 具有决定病毒毒力、病毒入侵和病毒的免疫原性的作用^[7]。E 蛋白的这种作用机制是因为其作为一种膜融合蛋白, 能介导病毒包膜和细胞膜的结合, 这种结合使得病毒进入细胞并感染细胞^[9]。E 蛋白的氨基酸序列具有高度保守性, 但在其结构的部分区域是会有变化的, 如在乙脑病毒持续感染细胞的过程中 E 蛋白的氨基酸序列会有部分发生突变^[9]。许多研究还表明, 氨基酸序列中位于 E60~68 的 Cys-Tyr-His-Ala-Ser-Val-Thr-Asp-Thr, 在诱导产生细胞免疫中起最关键的作用^[10]。乙脑病毒 E 蛋白的三维结构主要由 3 个结构域(I、II、III)组成, 其中结构域 III(E310~E411)可独立地在病毒表面折叠成为免疫球蛋白样结构, 由于它的这种构象, 许多抗原中和表位都集中于此结构域。Zhao 等^[11]的研究表明位于第 I 和第 II 结构域部位连接处的 E-138 残基, 对乙脑病毒的神经毒力和神经侵袭力有重要的决定作用。

3 乙脑病毒基因结构的变异

在以往关于乙脑病毒基因变异的研究中, 比较了分离于一个国家内部(如日本)和分离于不同国家的病毒的差异(如日本和泰国或者日本和印度)。总的发现, 分离于不同时间和不同地区的病毒有序列上的差异^[6]。在 Chen 等^[6]的研究中, 他们观察了来自于较广泛地区和 52 年时间跨度的 46 例乙脑病毒的 pre M 序列, 结果显示分离于同一地区同一时间段的病毒的 pre M 序列非常相近, 但是分离于不同地区不同时间段的病毒之间存在变异, 不过大多数核苷酸的改变都是属于沉默突变, 并没有改变所编码的氨基酸。这些都提示乙脑病毒在自然界存在不断的进化。但是 Yun 等^[12]对分离于朝鲜的乙脑病毒稳定性的研究表明 E 基因具有高度的稳定性, 在他们研究的 10 株毒株中, 尽管分离于不同的地区, 而且有了 5 年的时间跨度, 但是所得到的 E 基因的序列是一致的。

Wang 等^[13]将从三带喙库蚊分离出来的病毒与减毒活疫苗株 SA14-14-2 相比, 发现 E 蛋白在核苷酸与氨基酸的同源性分别为 88.0% 和 97.2%, 并且在 E 蛋白上一共有 14 处氨基酸差异。Zhang 等^[14]于 2007 年从中国南部的三带喙库蚊中分离得到的病毒株 SH17M, 发现其有 5 个独特的氨基酸, 其中一处是位于 E 蛋白第 306 位点(谷氨酸变异为赖氨酸)。姜红月等^[15]2008 年新分离的 2 株乙脑病毒(HBZG08-09 和 HBZG08-

55)之间共有 197 个核苷酸的差异,总差异率为 1.80%,推断氨基酸序列有 8 个位点差异,总差异率为 0.23%。在 5'-C-preM-E 编码区中 E 基因区段核苷酸差异率最高,为 2.33%,但是 35 个核苷酸差异仅引起 1 个氨基酸的改变。非结构蛋白 NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' 编码区均存在大小不等的核苷酸差异,其差异率在 1.53%~2.43%之间,氨基酸差异不大。姜红月等还将新分离的 HBZG08-09 株和 HBZG08-55 株与 34 株其他乙脑病毒全基因组核苷酸及氨基酸序列进行同源性比较分析,其核苷酸同源性分别是 83.5%~99.4%和 83.6%~98.7%,氨基酸同源性均为 95.0%~99.9%。HBZG08-09 株与中国浙江省 2007 年分离的 XJ69 株核苷酸同源性最高,HBZG08-55 株与中国河南 2007 年分离的 HEN0701 株核苷酸同源性最高,2 株与 JKT6468 株同源性都很低。与 SA14-14-2 减毒活疫苗株相比,其核苷酸同源性分别是 88.7%和 88.6%,氨基酸同源性均为 97.6%。HBZG08-09 株和 HBZG08-55 株与减毒疫苗株 SA14-14-2 相比,结构蛋白 5'-C-preM-E 编码区中,囊膜基因区的核苷酸差异率最高,为 12.27%和 12.60%;衣壳基因区最低,为 7.09%和 7.35%。非结构蛋白中 NS4b 区没有引起氨基酸的差异,NS1、NS2a、NS2b 区的氨基酸差异均高于 NS3、NS4b、NS5 区,前者差异率均大于 3%,而后者均在 2%左右。

Yoshida 等^[16]将分离于 1991 年或者更早的毒株与 JAGAr01、Nakayama 毒株相比较,核苷酸同源性分别为 90.1%~96.4%和 91.1%~95.5%。分离于 1994 年或晚于 1994 年的 3 个毒株 (JaTAn1/94、JaTAn1/99 和 JaTAn1/00) 与 K94P05 株 (于 1994 年分离于韩国的南部) 之间的同源性为 97.7%~98.1%。

4 乙脑病毒基因结构变异对病毒的影响

乙脑病毒之间的变异已经有许多研究者通过不同的方法研究过,但是,这些变异对病毒影响方面的研究尚未有进展^[17]。一些研究表明 E 蛋白氨基酸的变异和乙脑病毒的毒性相关^[5]。通过对比 SA14 的野生型和减毒型, Ni 等^[18]发现在 E138 位点 (谷氨酸变异为赖氨酸)、E176 (异亮氨酸变异为缬氨酸)、E315 (丙氨酸变异为缬氨酸)、E439 (赖氨酸变异为精氨酸) 发生的变异有可能降低乙脑病毒的神经毒力和神经侵袭力。Chambers 等^[19]的研究显示乙脑病毒的很多可能的位点和病毒毒力的减弱有关。然而, E 蛋白仅仅只有 2 个位点,即 138 和 279, 决定了病毒的致病性^[20]。Tajima 等^[21]的研究中,他们集中在 4 个位点上,即 E 蛋白的 123、129、222 和 227 位点。结果表明 123 位点是决定病毒毒力的一个决定性位点之一, 123 位点的变异增加了毒株 Mie/41/2002 在小鼠神经细胞瘤 N18 细胞内的生长速率。Hung 等^[22]的研究显示在黄病毒 E 蛋白第三结构域上的变异改变了病毒黏附和进入宿主细胞。Lee 等^[23]的研究表明在乙脑病毒 E 蛋白的 E-49、E-138、E-306 或者 E-389 位残基的变异减少病毒黏附宿主细胞上乙酰酸盐残基的效率。

5 乙脑病毒的分型

根据乙脑病毒 Prm 和 E 基因的限制性核苷酸序列,乙脑病毒被分为 4 种基因型,且 4 种基因型别的测序工作已经顺利完成。基因 I 型包括从 1967~今分离于泰国北部、柬埔寨、朝鲜、中国、日本、越南、台湾和澳大利亚的病毒;基因 II 型包括从 1954 年至 1999 年分离于泰国南部、马来西亚、印度尼西亚、巴布亚新几内亚和澳大利亚的病毒;基因 III 型是从 1932 年至今分离于亚洲大部分热带地方的病毒,包括日本、中国、台湾、菲

律宾和亚洲次大陆;基因 IV 型包括从 1980~1981 年分离于印度尼西亚的病毒^[24]。根据有限的信息,分离于马来西亚的 1 个病毒有可能属于乙脑病毒的第 5 种型别。Mohammed 等^[25]的研究中,他们完成了 Muar 病毒的核苷酸和氨基酸测序,并且和其他 4 种测序完的基因型别相对比,发现 Muar 病毒和他们有相似之处,核苷酸变异率从 20.2%~21.2%,氨基酸变异率从 8.5%~9.9%,进化系统树分析 Muar 病毒揭示其是乙脑病毒的第 5 种型别。目前,分离于中国的乙脑病毒有基因 I 型和基因 III 型,其中基因 III 型分离于 1940 年,而基因 I 型分离于 1979 年,奇怪的是,在上海分离得到的乙脑病毒每年的型别不一样,其中 2001 年、2003 年和 2005 年属于基因 I 型,2004 年分离得到的属于基因 III 型^[26]。

6 结 语

乙脑病毒是人畜共患病的一种中枢神经系统的急性传染病,是引起人类病毒性脑炎的最主要的病原体,对世界公共健康造成很大的威胁。虽然现在人们对乙脑结构研究得比较透彻,加上乙脑是用疫苗可以预防的疾病,但是随着环境和时间的变化,病毒之间存在一定的差异,因此应该努力研究出适合各地区人群的乙脑疫苗,降低乙脑患病率,提高生活质量。

参考文献

- [1] Sapkal GN, Wairagkar NS, Ayachit VM, et al. Detection and isolation of Japanese encephalitis virus from blood clots collected during the acute phase of infection[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 16 (41): 1139-1145.
- [2] 杨珍, 沈应杰. 104 例流行性乙型脑炎临床分析[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(6): 95.
- [3] Cui J, COUNOU D, Shen D, et al. Detection of Japanese encephalitis virus antibodies in bats in southern china[J]. Tropical Medi and Hygiene, 2008, 78(4): 1007.
- [4] Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication, 4th ed [M]. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- [5] Zhang JS, Zhao QM, Gao XF, et al. Isolation and genetic characteristics of human genotype 1 Japanese encephalitis virus, China, 2009[J]. Plos One, 2011, 6(1): 16418.
- [6] Chen WR, Tesh RB, John JB, et al. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature[J]. Virol, 1990, 71(18): 2915-2922.
- [7] 郭杨, 郭万柱. 流行性乙型脑炎病毒及其研究进展[J]. 预防医学情报杂志, 2008, 24(1): 44-46.
- [8] Hua RH, Chen NS, Mohal A, et al. Identification and characterization of a virus-specific continuous B-cell epitope on the PrM/M protein of Japanese encephalitis virus; potential application in the detection of antibodies to distinguish Japanese Encephalitis virus infection from west Nile and dengue virus infections[J]. Virology Journal, 2010, 7(11): 313.
- [9] Li Q, Xu K, Hu E, et al. Sequence analysis of persistently infected mutant Japanese encephalitis virus strains[J]. Zhong Hua University of Science and Technology, 2006, 26(13): 409-410.
- [10] Takada K, Masaki H, Konishi E, et al. Definition of an epitope on Japanese encephalitis virus (JEV) envelope protein recognized by JEV-specific murine CD8 + cyto-toxic T lymphocytes[J]. Arch Virol, 2000, 145(62): 523-534.
- [11] Zhao ZJ, Date T, Zhang W, et al. Characterization of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone[J]. Virol, 2005, 86(91): 2209-2220.

[12] Yun SM, Cho JE, Ju YR, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus circulating in South Korea, 1983 - 2005 [J]. *Virology*, 2010, 7(16): 127.

[13] Wang HY, Gao XY, Song LZ, et al. Isolation and identification of Japanese encephalitis virus firstly in Shandong province [J]. *Zhongguo Yi Miao He Mian Yi*, 2009, 15(4): 337-340.

[14] Zhang JS, Zhao QM, Zhang PH, et al. Genomic sequence of a Japanese encephalitis virus isolate from southern China [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(7): 1177-1180.

[15] 姜红月, 李铭华, 杨小兵, 等. 湖北省新分离的 2 株乙型脑炎病毒全基因组序列特征分析 [J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(50): 438-443.

[16] Yoshida Y, Tabei Y, Hasegawa M, et al. Genotypic analysis of Japanese encephalitis virus strains isolated from swine in Tokyo, Japan [J]. *Jpa J Infect*, 2005, 58(62): 259-261.

[17] Okuno Y, Okuda T, Kondo A, et al. Immunotyping of different strains of Japanese encephalitis virus by antibody-absorption, haemagglutination-inhibition and complement-fixation test [J]. *Bulletin of World Health Organization*, 1968, 212(14): 547-563.

[18] Ni H, Chang GJJ, Xie H, et al. Barrett ADT(1995) molecular basis of attenuation of neurovirulence of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14 [J]. *J Gen Virol*, 2008, 76(21): 409-413.

[19] Chambers TJ, Droll DA, Jiang X, et al. Nakayama/JE SA14-14-2 virus structural region intertypic viruses; biological properties in the mouse model of neuroinvasive disease [J]. *Virology*, 2007, 366(35): 51-61.

[20] Zhao Z, Date T, Li Y, et al. Characterization of the E-138 (Glu/

Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(42): 2209-2220.

[21] Tajima S, Nerome R, Nukui Y, et al. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice [J]. *Virology*, 2010, 396(67): 298-304.

[22] Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, et al. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-speci? binding to mosquito but not mammalian cells [J]. *J Virol*, 2004, 78(9): 378-388.

[23] Lee E, Lobigs M. Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and murray valley encephalitis virus [J]. *J Virol*, 2002, 76(62): 4901-4911.

[24] Schuh AJ, Li L, Tesh RB, et al. Genetic characterization of early isolates of Japanese encephalitis virus; genotype II has been circulating since at least 1951 [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(8): 95-102.

[25] Mohammed MA, Galbraith SE, Radford AD, et al. Molecular phylogenetic and evolutionary analyses of muar strain of Japanese encephalitis virus reveal it is the missing fifth genotype [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 71(24): 2311-2320.

[26] Wang HY, Takasaki T, Fu SH. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus in China [J]. *Virology*, 2007, 88(14): 885-894.

(收稿日期: 2011-02-16)

• 综 述 •

使用尿液流式分析仪 UF-1000i 进行尿液检测的研究进展

何雨峰¹综述, 赵克斌^{2△}, 杨泽华², 李浩²审校

(1. 山西医科大学研究生学院, 太原 030001; 2. 山西医科大学附属第一医院, 太原 030001)

关键词: 泌尿道感染; 尿液流式细胞仪; 细菌培养

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 18. 021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2092-03

尿液检测以其简便、快捷、标本易得而被临床广泛应用,是目前检验科三大常规检查项目之一,能为临床提供丰富的信息。如今多数实验室对于尿液中有形成份的分析采用尿沉渣显微镜检测、尿干化学法、尿细菌培养以及尿液流式细胞分析。尿沉渣显微镜检测虽然被视为尿沉渣检测的金标准,但受检测者的主观因素影响较大,结果判断不一致,可比性差且费时费力^[1]。干化学法灵敏度较高,但受多种物质干扰,假阳性和假阴性较多^[2]。为了提高尿液检测的准确性和提高效率,流式细胞分析应运而生。UF-1000i 全自动尿液流式细胞仪是日本希森美康医用电子有限公司继 UF-50、UF-100 和 UF-100i 后于 2005 年推出的一套较先进的尿液有形成份分析系统,其以简便、快速、有效的特点受到临床工作者的青睐^[3]。

1 UF-1000i 的工作原理

UF-1000i 的分析原理是用红色半导体激光束照射染色后在鞘流贯流分析池中形成的鞘流样本,并通过对各粒子产生的前向散射光、侧向散射光以及侧向荧光信号转换成的光电信号进行分析,从而对各个粒子进行识别。

1.1 流式细胞计数技术 UF-1000i 利用鞘流机制使染色后的标本形成细胞流,确保尿液中的细胞成份始终以单队列穿过检测系统并处于悬浮状态。在红色半导体激光束的照射下,每个尿细胞都将暴露在高度密集的激光束下,单个细胞会按不同角度发出荧光和散射光。从前向散射光中获得细胞大小的信息,从侧向散射光中获知细胞表面和胞质内的性状的信息,从荧光强度可以获知细胞核的性状(核糖核酸和脱氧核糖核酸的数量)。

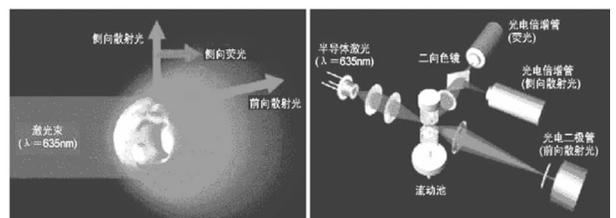


图 1 UF-1000i 半导体激光技术和核酸染色技术原理图

1.2 荧光染色技术 UF-1000i 具有两种荧光染料,一种是

△ 通讯作者, E-mail: syyyjygzkb@sina. com.