

1070-1072.

- [23] 李学军. 腰-硬联合麻醉与硬膜外麻醉在剖宫产术中的比较 [J]. 当代医学, 2012, 18(2): 57.
- [24] Agakidis C, Agakidou E, Philip Thomas S, et al. Labor epidural analgesia is independent risk factor for neonatal pyrexia [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 24(9): 1128-1132.
- [25] Wassen M M, Winkens B, Dorssers E M, et al. Neonatal sepsis

is mediated by maternal fever in labour epidural Analgesia [J]. J Obstet Gynaecol, 2014, 34: 679-683.

- [26] Richard A Polin. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis [J]. Pediatrics, 2012, 129 (5): 1005-1015.

(编辑:曾敏莉)

(收稿日期:2014-09-29 修回日期:2014-11-20)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2016.01.020

• 综述 •

肠道病毒 71 型变异的研究进展

胡云鸽 综述, 刘泉波 审校 (重庆医科大学附属儿童医院, 重庆 400014)

[中图分类号] R373.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-108X(2016)01-0052-04

The Research Progress of EV71 Variation

Hu Yunge, Liu Quanbo (Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 属于嗜神经的小 RNA 病毒, 是引起手足口病 (hand-foot-and-mouth disease, HFMD) 的主要病原之一, 同时也是引起重症 HFMD 的主要病原。自 1969 年 EV71 首次被发现以来, 在世界范围内引起 HFMD 周期性的暴发流行, 且与无菌性脑炎、急性非迟缓性瘫痪、脑干脑炎及神经源性肺水肿等严重神经系统并发症密切相关。近年来手足口病发病率大幅增长, EV71 相关的重症手足口病病例亦逐年增多, 严重危害儿童的生命健康。目前尚无针对 EV71 的抗病毒药物及有效的疫苗。本文旨在从分子生物学角度对肠道病毒 EV71 的流行病学演变、病原变异趋势进行综述, 为更好地预防和控制 EV71 相关 HFMD 及疫苗的研制提供理论依据。

1 EV71 及其分类

EV71 是肠道病毒属成员, 为无包膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组约含 7 500 个核苷酸。仅有一个开放阅读框 (ORF), 编码由 2 194 个氨基酸组成的多聚蛋白。多聚蛋白裂解为 P1、P2、P3 三个特定区域, P1 编码四个结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4), P2、P3 则编码七个非结构蛋白 (2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)。肠道病毒的结构蛋白与病毒受体的识别、绑定和进入宿主细胞密切相关。在结构蛋白中, 暴露在最外部、免疫位点集中, 且特异性中和抗原位点均位于 VP1 区。因此, 对肠道病毒的实验及分子流行病学研究主要集中在其衣壳蛋白 VP1 上。非结构蛋白则在病毒复制过程中发挥重要作用

用^[1]。根据病毒衣壳蛋白 VP1 区的核酸序列差异可分为 A、B、C、D 四个基因型, 其中 A 型仅包含 BrCr 株, 即 EV-71 原型株; B 型、C 型进一步分为 B0 ~ B5、C1 ~ C5 共 10 个亚型, 其中 C4 还可分为 C4a 和 C4b 亚型^[2]。

2 EV71 亚型的演变规律

引起手足口病流行的 EV71 亚型随时间的变迁不断变化。1969 年 EV71 A 基因型首次在美国加利福尼亚州分离, 并成为之后几年的优势流行株, 而 1970-1988 年流行的主要菌株为 B 型。1988 年后则被新兴的 C 型菌株所取代。亚太地区手足口病首次于 1997 年在马来西亚暴发流行, 优势流行株为 B3、B4, 2000 年后 B4 和 C1 成为优势菌株, 而 2003-2005 年则以 B4 和 B5 为主。1998 年中国台湾分离的 EV71 C2 型菌株取代 B 型菌株成为当年的优势菌株 (在 1997-2002 的日本、1999 年的澳大利亚也有类似报道), 随后 B4 型菌株成为 2000-2003 年该地 HFMD 暴发流行的优势菌株。自此台湾再无 C 亚型菌株的报道, 直至 2004 年一种新亚型 (C4) 出现^[3], 而 2008 年后 B5 型菌株则成为该地区的优势株菌株。综上所述, 1986-2008 年台湾地区的 EV71 优势流行株在 B、C 亚型之间相互转换。

中国大陆 EV71 相关的 HFMD 大规模暴发流行起于 2007 年山东省临沂市, 2008 年后便在全国范围内迅速流行。有研究^[3]表明, C4 亚型菌株是 1998 年后中国大陆主要的流行菌株, 其中 1998-2004 年以 C4b 型菌株为主, 2004 年后逐渐被 C4a 菌株所取代 (见表 1)。马来

西亚、新加坡等存在不同亚型间的循环,而我国流行的 EV71 毒株始终为 C4 亚型菌株,且不受其他外来因素影响,这可能与中国大陆相对独特的地理结构和气候因素有关^[4]。引起 HFMD 流行的 EV71 菌株在各亚型之间相互转换,暴发流行的优势菌株在流行之前的 2~5 年

曾在当地引起循环的散发病例,因此不能排除近年来局部流行菌株会成为未来某次大流行的致病菌株。同一时期不同地区、同一地区不同时期手足口病流行的菌株型别各异,肠道病毒随时间、空间的变迁而不断进化。

表 1 1997-2011 年世界范围内 EV71 亚型的变化

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
马来西亚	C1、C2、B3、B4	C1	B4、C1	B4、C1		B4、C1	B4、B5、C1		B5、C1	B5					
新加坡	B3、B4	B3、C1	B3	B4、B5	B4	B4、C1				B5		B5、C2			
台湾		B4、C2、C4	B4	B4	B4	B4、C4	B4	C4	C4	C5	B5、C5	B5、C4、C5	B5	C4	
香港	C2	C4	B3、C1、C4	C1、C4	B4、C4	C1、C2	C4	C4	C4	C4	C2、C4	B5、C2、C4			
日本	C2、B3、B4	C2	C2	C2、B4	C2	C2、B4、C4	C4、B5	C4		C4	C4				
中国		C4		C4	C4	C4	C2、C4	C4	C2、C4	C2、C4	C2、C4	AC2、C4	C2、C4	C2、C4	C4
越南										C1、C4、C5					
澳大利亚		C2	B3、C2	B4、C1	B4	C2	C1	C4							
韩国					C3		C4						C2、C4		
英国	C2	C1、C2	C1、C2	C1	C1	C1		C1	C1	C1、C2		C2			
美国	C2	C2													

3 EV71 的变异

肠道病毒间的基因重组和突变是产生新变异体的重要机制, EV71 因其复制的低保真度和频繁的重组现象被认为具有高度的突变率^[5]。

3.1 型内/型间重组

基因重组是肠道病毒进化和变异的重要方式^[2]。完整的 EV71 基因测序用于基因研究重组的发生。已证实基因库中四个基因型的 EV71 菌株是重组而来,包括两株型内重组和两株型间重组。令人震惊的是 1997 年之后引起亚太地区 HFMD 暴发流行的优势流行株为型间/型内重组病毒,涉及到的有 B3、C2、B4、C4 亚型^[6]。1999 年澳大利亚分离的 B3 亚型菌株为型内重组体,其在 5' 末端与 EV71 有超过 93% 的同源性,而在 3D 聚合酶和 3' UTR 区与 CAV16 接近,这或许是 B3 亚型菌株感染多表现为自限性的手足口病的原因之一^[6]。台湾 1998 年流行的 C2 亚型菌株源于 EV71 结构蛋白和 CAV8 非结构蛋白区的重组; 1999-2002 年的 B4 型菌株为 B3 亚型菌株 5' UTR、P1 多聚蛋白区和 B2 的 P3 多聚蛋白区重组体; C4 型菌株是 EV71 C 基因型的 P1 多聚蛋白区和 B 基因型的 2B-3B 蛋白编码区的重组,即 C 亚型结构蛋白区和 B 亚型的非结构蛋白区的型间重组^[3]。Zhang Y 等^[7]发现,中国大陆地区 1998 年后流行的 C4 型菌株是 EV71 原型株结构蛋白和 CAV16、CAV14 非结构蛋白的重组体,研究显示 C4a、C4b 亚型菌株在 5' UTR 区域与 BrCr 有较高的基因同源性,而在 P2、P3 区域则与 CAV16、14 同源性较高(核酸序列同源性 81.8%~84.6%,氨基酸序列同源 96.5%~97.7%),同时 Zhang Y 等^[7]报道 2005 年在厦门发现的 B5 亚型菌株有着与

C4 型菌株相同的重组模式。2008 年深圳报道的两株 EV71(SZ/HK08-5 和 SZ/HK08-6) 菌株证实为 EV71 B 和 C 亚型菌株,在 2A、2B 结合区以及 B 亚型菌株和 CVA G10 3C 区的双重重组^[8],其不同于现今中国流行的 C4 型菌株,因而有人提议将其命名为 EV71 D 基因型。有关 EV71 重组的报道较多,常见的重组热点有 5' UTR、P2、P3 结合区(约在核苷酸的 3 500~3 800 之间)、3' UTR 的 3C(第 5 500 和 5 600)区和 3' UTR 的 2A 区(3 716 和 3 781)^[2]。新的病毒亚型在 EV71 自然倍增的过程中产生。基于宿主和环境选择的压力,同一时期相同地区多种亚型共同流行导致基因重组的发生^[9]。重组菌株可能造成病毒翻译和复制速率、传播能力及诱导细胞凋亡能力的改变,从而影响其复制、组织嗜性甚至病毒毒力,但其确切的生物学效应尚不清楚。

3.2 突变

EV71 核酸为单股正链 RNA,因其复制时在链的延长过程中缺乏 3'-5' 核酸外切酶的校对功能而导致较高的出错率,约每复制一个基因就有一个自发突变^[10]。

3.2.1 VP1 区的突变 VP1 区由于其高度多样性和较少参与重组而被认为是肠道病毒进化研究中最有意义的基因区域^[11]。VP1 区位于病毒衣壳蛋白最外部,是构成峡谷和疏水袋的主要部分,VP1 区的氨基酸尤其是位于峡谷表面氨基酸的变化影响病毒与宿主细胞的绑定,从而影响其致病性^[12]。Yip C C 等^[9]发现,VP1 区 97 位 Leu-Arg 的改变能够提高 EV71 的组织嗜性。Zhang B 等^[11]发现, EV71 B 亚型菌株 VP1 区 145 位 Glu-Gln、164 位 Glu-Asp/Lys、292 位 Thr-Asn/Lys、以及 C 亚型菌株 VP1 区 31 位 Asn-Asp 的突变与神经系统并发症的发生密切相关,其中 292 位 Asn 是 B1 和 B2 型菌株的共有序

列,尚未在其他基因型中发现,这可能是此两种亚型菌株神经毒性较高的序列基础,它们通过形成一个离子键来提高 VP1 与受体的亲和力。C1 ~ C3 亚型菌株中位于峡谷最底部 262 位 Val-Ile 的替换可能影响病毒相关蛋白的疏水作用导致峡谷结构松散,从而降低神经毒性的风险。绑定在宿主细胞表面的 VP1 蛋白残余物的变化使得 VP1 与其受体之间发生特异性改变,从而在神经系统并发症的发生过程中起重要作用。有研究^[13]表明, EV71 通过绑定特定的受体分子—PSGL-1 (选择素糖蛋白配体 1) 而感染白细胞, VP1 区第 145 位的氨基酸残基则是决定病毒绑定受体与否的关键,其为 Gly/Gln 时病毒与受体分子牢固结合,为 Glu 替换时则失去绑定受体的能力。这一分子机制或许可以解释 VP1-E145Q 所导致的重症临床表现。Li R 等^[14]关于 EV71 神经毒性的决定因素研究显示, VP1 区 P710 位 (VP1-145) Glu 替换为 Gly/Gln/Arg 可提高 EV71 的毒性;而 P729 (VP1-164) 位 Asp 替换为 Glu 时因氨基酸极性未变,不会导致病毒结构的改变,只是影响其与抗体或受体的绑定; EV71 2A 蛋白酶区 P930 位 Met/Arg 被 Lys 替换可影响 2A 蛋白酶的活性。澳大利亚 C2 基因库菌株 (DQ381846) VP1 区 170 位 Ala-Val 的替换,亦可能与神经毒性的增强相关^[10]。Huangs W 等^[15]关于 EV71 小鼠模型的研究证实, VP2 区 149 位 Lys 替换为 Met 及 VP1 区 145 位 Gln 替换为 Glu 的协同作用,可增强病毒的绑定能力和病毒 RNA 的累积,从而提高其传染性和对小鼠的杀伤力。

3.2.2 5' UTR 区的突变 5' UTR 对病毒的复制和毒力表达至关重要。5' UTR 在核苷酸水平相当保守,经常用于肠道病毒感染的核酸检测。然而也有许多例子证明 5' UTR 的突变会显著减少病毒增殖效率、改变其生物趋性使毒力减弱^[10]。动物实验证实, 5' UTR 区 485 位 A-G、158 位 C-U 的核苷酸替换可降低病毒的复制能力,减弱对小鼠的毒性作用^[10]。有研究^[16]表明, EV71 所致疱疹性咽峡炎分离株中检测出位于 5' UTR G 环上第 575/576 nbp 区 U-C 的点突变,该毒株在细胞培养基中显示较低的复制能力,且该突变尚未在其他复制能力强的神经系统菌株中被发现。袁晓晶等^[17]分析 2013 年山东 EV71 流行特点发现,在 5' UTR 区,神经系统累及 HFMD 的病毒株在第 40 和 575 位处均出现了核苷酸的变异,在第 40 位由 T 变为 C,第 575 位由 C 变为 T。另有 VP2 区与 VP1 协同突变导致神经毒性增强的报道^[15],目前尚缺乏有关 EV71 其他区域基因变异的报道。

4 EV71 重症与普通病例基因型的区别

分子流行病学调查显示, EV71 感染引起的临床症状与病毒基因型之间并无直接关联,不同基因型的 EV71 毒株均可引起自限性手足口病或严重的神经系统并发症。因此,研究人员对 EV71 基因特定区域的毒力

相关位点展开研究。1998 年台湾暴发流行 HFMD 中所有重症、非重症 EV71 菌株的核苷酸及氨基酸序列各菌株间基因型差异性较小,其总体核酸同源性和氨基酸同源性为 97%,氨基酸同源性为 98%^[3]。而台湾地区亦有报道,从严重神经系统并发症病例中分离出的均为 EV71 C2 亚型,其在 VP1 的第 170 位有一个独特的氨基酸替换 (Ala-Val)^[18]。1999 年在澳大利亚, EV71-C2 亚型被认为是引起重症感染的主要菌株, Ooi M H^[19]报道显示与其他亚型相比 B4 亚型更多引起自限性的手足口病。Zhang B 等^[11]比较分析 76 例并发神经系统症状的 EV71 菌株与 111 例引起自限性 HFMD 的 EV71 菌株, B 和 C 亚型并无显著差异,但进一步研究发现 B1 ~ B3 与神经系统症状的发生有较好的相关性。EV71 的毒力受多个基因组功能区域的共同影响,除了病毒本身,其他宿主因素 (如免疫力、遗传因素、营养状况、卫生条件) 及环境因素也被认为是普通与重症病例的影响因素,其中年龄是重症和死亡病例的一个危险因素,尤其是 <3 岁儿童。同一基因型的毒株在不同国家不同地区引起的临床症状可能完全不同。有关 EV71 基因型与其临床表现的关系还有待进一步深入的研究。

综上所述, EV71 因其在全球范围内,特别是亚太地区引起一定范围内的暴发和流行,明确 EV71 的致病机制及病毒变异趋势,进而研发针对 EV71 的有效抗病毒药物及疫苗,对于控制病毒感染,建立安全有效的公共卫生防御体系至关重要。肠道病毒的进化是遗传漂移和长时间内编码衣壳蛋白的结构基因抗原多样性的结果^[10]。基因的重组和突变可能是生物应对自然选择做出的反应,不同亚型的菌株同一时期在相同地域循环,因其基因型间的重组及突变催生新的病毒亚型,而人群对新型病毒尚未产生免疫力,便会引起该亚型的暴发流行。这可能是近年来手足口病发病率逐年增长、容易并发严重神经系统症状的原因之一。目前有关 EV71 毒力与临床表现的相关性及病毒突变位点的研究仅局限于独家实验室报道,所报道的突变位点各异,要想获得公认的结论,还需要多中心、大样本的分子流行病学研究验证。

参考文献:

- [1] Yehm T, Wang S W, Yu C K, et al. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27082.
- [2] Yip C C, Lau S K, Lo J Y, et al. Genetic characterization of EV71 isolates from 2004 to 2010 reveals predominance and persistent circulation of the newly proposed genotype D and recent emergence of a distinct lineage of subgenotype C2 in Hong Kong [J]. Virol J, 2013, 10: 222.
- [3] Huang S W, Hsu Y W, Smith D J, et al. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008 [J]. J Clin Microbiol,

- 2009, 47(11): 3653-3662.
- [4] van der Sanden S, van der Avoort H, Lemey P, et al. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses [J]. J Gen Virol, 2010, 91 (Pt 8): 1949-1958.
- [5] Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3835-3839.
- [6] Huang S W, Kiang D, Smith D J, et al. Evolution of re-emergent virus and its impact on enterovirus 71 epidemics [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236(8): 899-908.
- [7] Zhang Y, Tan X, Cui A, et al. Complete genome analysis of the C4 subgenotype strains of enterovirus 71: predominant recombination C4 viruses persistently circulating in China for 14 years [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56341.
- [8] Yip C C, Lau S K, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71 [J]. Arch Virol, 2010, 155(9): 1413-1424.
- [9] Yip C C, Lau S K, Woo P C, et al. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? [J]. Emerg Health Threats J, 2013, 6: 19780.
- [10] Zhou F, Kong F, Wang B, et al. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region [J]. J Med Microbiol, 2011, 60 (Pt 3): 349-358.
- [11] Zhang B, Wu X, Huang K, et al. The variations of VP1 protein might be associated with nervous system symptoms caused by enterovirus 71 infection [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 243.
- [12] Zhu J, Luo Z, Wang J, et al. Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009 [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56318.
- [13] Nishimura Y, Lee H, Hafnstein S, et al. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(7): e1003511.
- [14] Li R, Zou Q, Chen L, et al. Molecular analysis of virulent determinants of enterovirus 71 [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26237.
- [15] Huang W, Wang Y F, Yu C K, et al. Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement [J]. Virology, 2012, 422(1): 132-143.
- [16] Chang G H, Lin L, Luo Y J, et al. Sequence analysis of six enterovirus 71 strains with different virulences in humans [J]. Virus Res, 2010, 151(1): 66-73.
- [17] 袁晓晶, 温红玲, 高峰, 等. 山东省肠道病毒 71 型分离株 SDLY11 全基因组序列分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(3): 232-235
- [18] Mcminn P, Lindsay K, Perera D, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia [J]. J Virol, 2001, 75(16): 7732-7738.
- [19] Ooi M H, Wong S C, Podin Y, et al. Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(5): 646-656.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2014-09-11 修回日期:2014-11-08)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2016.01.021

• 综述 •

半胱天冬氨酸蛋白酶-3 与病毒性心肌炎心肌细胞凋亡

张芸娟 综述,董湘玉 审校 (兰州大学第二医院,甘肃兰州 730000)

[中图分类号]R725.4

[文献标识码]A

[文章编号]1672-108X(2016)01-0055-03

Relationship of Caspase-3 Levels and the Apoptosis in Viral Myocarditis

Zhang Yunjuan, Dong Xiangyu (The Second Hospital of Lanzhou University, Gansu Lanzhou 730000, China)

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)为感染性心肌炎中最常见的一类心肌炎性病变,主要表现为心肌局灶性、弥漫性的间质炎性渗出,心肌纤维化或心肌细胞坏死,可伴有心包及心内膜的炎症改变。关于 VMC 心

肌损伤的致病机制,一直是众学者研究和讨论的热点课题之一。大致可以概括以下几方面:(1)病毒的直接损伤:病毒直接侵犯心肌细胞、病毒在心肌细胞内复制均是心肌受损的直接原因^[1]。(2)免疫病理机制:抗心肌