深圳口岸输入寨卡病毒的基因和生物学特性分析

王强^{①†}, 杨扬^{①†}, 郑海霞^①, 毕玉海^{①②⑦*}, 宋敬东^③, 李力强^④, 顾大勇^⑤, 王培毅^{①⑥},
李世华^②, 刘升^②, 赵迎泽^②, 刘磊^①, 高福^{①②③⑦}, 刘映霞^{①*}

① 深圳市第三人民医院, 感染性疾病国家重点学科, 深圳市病原微生物与免疫学重点实验室, 深圳 518112;

② 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;

③ 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206;

④ 深圳市华大基因研究院, 深圳 518083;

⑤ 深圳检验检疫科学研究院, 深圳 518010;

⑥ Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK;

⑦ 中国科学院流感研究与预警中心, 北京 100101

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: beeyh@im.ac.cn; yingxialiu@hotmail.com

2016-06-06 收稿, 2016-06-23 修回, 2016-06-27 接受, 2016-07-08 网络版发表

深圳市科技计划(ZDSYS201504301534057)和深圳市“三名工程”资助

摘要 2016年2月14日下午, 一名从斐济和萨摩亚旅游回国的旅客在深圳皇岗口岸入关时有发热症状, 其在旅行期间有蚊虫叮咬史. 经过病因筛查和诊断确诊为寨卡病毒感染. 本研究利用乳鼠和细胞培养传代, 成功从病人血清中分离到致病病原——寨卡病毒, 命名为SZ_SMGC-1. 分离病毒在电子显微镜下可见圆球形经典黄病毒特征, 病毒颗粒直径大小约为50 nm. 利用特异性引物扩增并获得了病毒全基因组序列, 同源性分析显示: SZ_SMGC-1与我国输入性病例中斐济/萨摩亚来源病毒高度同源, 同源性均为99.9%, 与委内瑞拉来源病毒同源性在99.0%~99.4%之间. 研究显示, 寨卡病毒进化为亚洲和非洲2个分支. 进一步遗传进化分析表明, SZ_SMGC-1毒株与近期我国分离毒株同属于亚洲分支; SZ_SMGC-1与斐济/萨摩亚来源病毒聚类在一个亚分支; 委内瑞拉来源的病毒除我国首个病例处于单独的小分支外, 其余病毒全部聚类到另一个小分支. 生物学特性研究显示, SZ_SMGC-1寨卡病毒可以在蚊虫来源C6/36细胞和哺乳动物来源Vero, BHK-21细胞中生长, 感染Vero和BHK-21细胞后可见明显病变并形成典型噬斑. 值得注意的是, 相同细胞系的不同细胞克隆株对寨卡病毒的敏感性不同. 寨卡病毒感染敏感哺乳动物细胞系的建立, 对病毒致病机制的深入研究及相关疫苗和药物的研发奠定了基础. 寨卡病毒在我国的输入, 给我国寨卡疫情防控带来了严峻挑战, 必须提早采取灭蚊等防控措施, 加紧对疫苗和相关药物的研发, 做好预防寨卡流行的技术储备.

关键词 寨卡病毒, SZ_SMGC-1, 基因组, 遗传进化, 生物学特性, 细胞病变效应

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)于1947年通过黄热病监测网络在乌干达寨卡丛林的恒河猴中首次发现, 随后于1952年在乌干达和坦桑尼亚感染患者体内分离到活病毒^[1]. 寨卡病毒属于黄病毒科(Flaviviridae)

黄病毒属(Flavivirus), 病毒颗粒呈球形, 直径约为50 nm, 是一种主要通过蚊虫进行传播的虫媒病毒, 主要在野生灵长类动物和栖息在树上的蚊子, 如非洲伊蚊中循环, 自然宿主尚不明确^[2-5]. 寨卡病毒为

引用格式: 王强, 杨扬, 郑海霞, 等. 深圳口岸输入寨卡病毒的基因和生物学特性分析. 科学通报, 2016, 61: 2463-2474

Wang Q, Yang Y, Zheng H X, et al. Genetic and biological characterization of Zika virus from human cases imported through Shenzhen Port (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 2463-2474, doi: 10.1360/N972016-00665

单股正链RNA病毒,其基因组全长约10.8 kb^[3].遗传进化分析结果显示,其主要存在非洲型和亚洲型2个谱系,在系统发生树上与登革热病毒、日本脑炎病毒及西尼罗病毒等黄病毒相近^[6,7].寨卡病毒基因组包含5'UTR, 3'UTR区域和一个单一的可读框(open reading frame, ORF).该ORF编码一个多聚蛋白,翻译后被切割成不同的功能蛋白,包括3个结构蛋白(C, prM/M和E)以及7个非结构蛋白(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B和NS5)^[3].

寨卡病毒主要通过伊蚊叮咬传播,近期研究显示也可能通过母婴传播、血液传播和性传播^[8-10],进一步增加了寨卡病毒传播和流行的风险.寨卡病毒病是由寨卡病毒引起的一种急性自限性疾病,其临床表现一般较轻,典型的临床表现为皮疹及登革热样症状^[8].但是最近的大量研究表明,寨卡病毒感染能够引起胎儿小头症(Microcephaly)^[9,10].此外,研究显示,寨卡病毒感染和格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)也有着密切的联系^[10-12].尽管寨卡病毒的发现已经有几十年的历史,但是到目前为止病毒的致病机制没有被完全揭示,也缺乏有效的疫苗和治疗药物.

寨卡病毒活动范围一直比较隐匿,仅在赤道周围的非洲、美洲、亚洲和太平洋地区有散发感染病例^[1].2007年首次在太平洋岛国密克罗尼西亚的雅普岛出现寨卡病毒暴发疫情^[7,8]之后,出现寨卡病毒感染病例和疫情暴发的国家及地区明显增多,目前已经在非洲、东南亚和美洲等地造成多次暴发流行.截至2016年4月20日,全球至少有66个国家和地区出现了寨卡病毒感染病例(WHO)^[13].寨卡疫情已经成为全世界关注的重要公共卫生问题^[1,14].

2016年2月9日,从委内瑞拉回国人员中确诊了我国首例输入性寨卡病毒感染病例^[15,16].2016年2月14日下午,一名从斐济和萨摩亚旅游回国的旅客在深圳皇岗口岸入关时有发热症状,其在旅行期间有蚊虫叮咬史,经过广东省疾病预防控制中心和中国疾病预防控制中心确诊为寨卡病毒感染.本研究利用乳鼠和细胞培养传代,成功从病人血清中分离到了寨卡病毒,命名为SZ_SMGC-1.为进一步认识输入我国的寨卡病毒,本文从病毒形态学、基因组序列和遗传进化、以及病毒对不同细胞系的感染特性入手,分析病毒的基因和生物学特性,为我国寨卡疫情的防控奠定基础.

1 材料与方法

(i) 乳鼠颅内接种分离病毒. 选择3日龄BALB/c乳鼠进行颅内接种,每只乳鼠接种30 μ L临床血清样品,接种8 d后处死,取出脑组织,加液氮磨成粉末状,加入1 mL PBS后分装, -80℃冻存备用.

(ii) 细胞接种分离病毒. 取30 μ L的临床血清样品稀释于1 mL无血清DMEM培养基,加入80%细胞密度的细胞培养瓶中,37℃吸附1 h,弃吸附液,PBS洗2次后,加入4 mL病毒培养液(含2%胎牛血清和100单位青链霉素的DMEM培养基),37℃,5% CO₂培养,每3 d吸出培养上清分装、冻存于-80℃备用,并更换新的病毒培养液.

(iii) 病毒生长曲线测定. 分别以0.01个感染复数(multiplicity of infection, MOI)和0.1 MOI病毒剂量,感染Vero, BHK-21和C6/36三种细胞.接种后每间隔24 h取1 mL培养液上清、分装保存,取样后回补1 mL病毒培养液.对每个取样时间点的样本分别测定病毒滴度,绘制病毒生长曲线.

(iv) 病毒噬斑计数. 用细胞维持液将寨卡病毒进行10倍倍比稀释(10^{-1} ~ 10^{-9}),在单层致密Vero或BHK-21细胞的六孔培养板中加入不同稀释倍数的病毒悬液,500 μ L/孔,37℃吸附1 h,每隔15 min轻轻摇动1次.吸附后弃病毒液,每孔加入3 mL琼脂盖(2%琼脂糖和细胞维持液1:1混合液),37℃继续培养.在感染5~6 d后加入2 mL固定液(4%甲醛),37℃固定1 h,然后弃固定液和营养琼脂盖,并用去离子水清洗2~3次.加入1 mL 1.5%的结晶紫溶液,37℃染色1 h,并弃结晶紫溶液,并用去离子水清洗2~3次,观察形成的噬斑并计数.

(v) 巢式RT-PCR和real-time RT-PCR. 取140 μ L病毒培养上清或鼠脑研磨液,用病毒RNA提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN)提取总RNA,用逆转录酶(AMV Reverse Transcriptase XL, Takara)合成第一链cDNA,用引物1 (5'-GGAAGCC-TAGGACTTGATTGT-3')和引物2 (5'-GATCAAGTT-CCAGCATCATCT-3')进行巢式第一轮PCR反应,反应退火温度为55℃,Taq DNA聚合酶72℃延伸30 s,35个循环;然后用内套引物3 (5'-GCTGGDGCRGAC-ACHGGRAC-3')和引物4 (5'-RTCYACYGCCATYTGRRCTG-3')^[17]进行第二轮巢式PCR反应,反应条件与第一轮PCR相同.real-time RT-PCR按照达安基因公司(广州)的寨卡病毒检测试剂盒说明书进行.

(vi) 全基因组扩增和测序. 利用随机引物合成第一链cDNA, 使用表1中的引物分段扩增全基因组片段并进行测序, 测序结果用DNASTAR Seqman软件进行拼接以获得全长基因组序列.

(vii) 病毒形态观察. 病毒接种Vero细胞扩大繁殖, 培养上清用PEG 8000浓缩, 24%蔗糖、10%和30%酒石酸钾超速离心纯化. 用铜网吸附纯化的病毒悬液, 经1%磷钨酸(pH 7.2)行负染色后, 进行透射电子显微镜观察. 病毒感染后3 d, Vero细胞经2.5%戊二醛(0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲, pH 7.2)及1%四氧化锇固定后, 进行脱水及树脂浸透, 再用Pon812树脂包埋、聚合, 之后进行超薄切片并经乙酸双氧铀及枸橼酸铅染色. 负染及超薄切片样本在透射电子显微镜(Tecnai 12, FEI, USA)下观察, 加速电压为80 kV.

(viii) 基因组同源性比较及系统进化树构建. 从GenBank数据库下载所有的寨卡病毒全长基因组序列作为参考序列, 用MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>)软件与SZ_SMGC-1基因组进行多序列比对, 在BioEdit7.2.5软件^[18]中进行同源性比较, 运用

Neighbor-Joining方法Maximum Composite Likelihood模型在MEGA7.0.14软件^[19]中构建系统进化树.

2 结果

2.1 寨卡病毒分离

利用该病人的血清, 同时进行乳鼠颅内注射接种和细胞接种培养技术对寨卡病毒进行分离培养, 成功分离到一株寨卡病毒, 命名为SZ_SMGC-1(“三名工程”1号病毒). 3日龄BALB/c小鼠接种8 d后处死, 取脑组织制备病毒悬液提取总RNA; Vero细胞接种后每隔3 d取培养上清提取总RNA. 利用建立的巢式RT-PCR和Real-time RT-PCR检测鼠脑悬液和Vero培养上清, 结果均为阳性(图1(a)和(b)). RT-PCR扩增基因片段经测序确认为寨卡病毒; Real-time RT-PCR检测鼠脑接种病毒8 d后C_t值为21, Vero细胞接种3 d后上清C_t值为32, 阳性对照C_t值为27. Vero细胞培养第6和9天后, 病毒C_t值降低至20~28之间, 提示寨卡病毒分离需要较长时间培养.

表1 寨卡病毒全基因组扩增引物

Table 1 The primers for whole genome replications of ZIKV

目的基因	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)
C+M	C-F: ATGAAAAACCCAAAAAAGAA	870
	M-R: GCTGTATGCCGGGGCAATCA	
E	E-F: ATCAGGTGCATAGGAGTCAG	1524
	E-R: AGCAGAGACGGCTGTGGATA	
NS1	NS1-F: GATGTGGGGTGCTCGGTGGA	1056
	NS1-R: TGCAGTCACCATTGACCTTA	
NS2A	NS2A-F: GGATCAACTGATCACATGGATCA	678
	NS2A-R: CCGCTTCCCACTCCTTGTGA	
NS2B	NS2B-F: AGCTGGCCCCCTAGCGAAGTACTCA	390
	NS2B-R: CCTTTTTCCAGTCTTTCACGT	
NS3	NS3-F: AGTGGAGCTCTATGGGATGT	1851
	NS3-R: TCTTTTCCAGCGGCAAACT	
NS4A+NS4B	NS4A-F: GGAGCGGCCTTTGGAGTGAT	1203
	NS4B-R: ACGTCTCTTGACCAAGCCAG	
NS5	NS5-F: GGGGGTGGAAACAGGAGAGAC	2709
	NS5-R: TTATAGCACTCCAGGTGTGGACC	
5'UTR	5'UTR-F: AGTTGTTGATCTGTGTGAATCAGACT	308
	5'UTR-R: ATTGATGAGACCCAGTGATGGCTTG	
3'UTR	3'UTR-F: CACCACCTGGGCTGAGAACATT	568
	3'UTR-R: AAGACCCATGGATTTCCTCCACA

图1 寨卡病毒分子鉴定和全基因组扩增。(a) 鼠脑和Vero细胞分离培养寨卡病毒的巢式RT-PCR鉴定电泳图。1~3: 外套引物鉴定结果; 4~6: 内套引物鉴定结果; 1, 4: 阴性对照; 2, 5: Vero细胞接种病毒3 d后培养液上清; 3, 6: 乳鼠接种病毒后第8天的脑组织; M: DNA marker。(b) Vero细胞和鼠脑分离培养寨卡病毒的Real-time RT-PCR扩增曲线图。红色曲线表示乳鼠接种病毒后第8天的脑组织的检测结果; 黄色曲线表示Vero细胞接种病毒3 d后培养液上清的检测结果; 紫色曲线表示阳性对照; 蓝色曲线表示阴性对照。(c) 寨卡病毒全基因组扩增电泳图。1~10: 寨卡病毒C-prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A/4B, NS5, 5'UTR, 3'UTR扩增电泳图; M: DNA marker

Figure 1 Molecular characterization and whole genome amplification of SZ_SMGC-1 virus. (a) Nested RT-PCR detection for ZIKV isolated from Vero cells and suckling mice. 1–3: PCR results with the outer primers; 4–6: PCR results with the inner primers; 1, 4: Negative control; 2, 5: The supernatant of Vero cells at 3 days after inoculation (d.p.i.); 3, 6: The supernatant of homogenized mice brains at 8 d.p.i.; M: DNA marker. (b) Real-time RT-PCR detection for ZIKV isolated from Vero cells and suckling mice. Results from infected mice brains and Vero cells are represented by the red and yellow curves, respectively. Positive and negative controls are denoted by the purple and blue curves, respectively. (c) Amplification of the ZIKV whole genome by RT-PCR. 1–10: DNA gels of the gene segments of C-prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A/4B, NS5, 5'UTR, and 3'UTR, respectively; M: DNA marker

为进一步对分离病毒的遗传特征进行分析, 利用合成的全基因分段扩增引物(表1)针对Vero细胞培养病毒, 分段对病毒全基因组进行了扩增(图1(c)), 将扩增的基因片段分别测序, 获得了SZ_SMGC-1病毒株的全长基因组序列。

2.2 寨卡病毒SZ_SMGC-1基因组同源性及系统进化分析

本研究分离的寨卡病毒来源于大洋洲区域, 经我国深圳口岸输入。为分析其与近期输入我国病毒的遗传相关性, 我们对GenBank数据库释放的所有中国毒株的基因组序列进行了同源性比较(表2)。结果表明, SZ_SMGC-1与中国12个输入性分离病毒株序列的同源性均在99.0%以上, 与同样来源于大洋洲

(斐济/萨摩亚)的SZ-WIV01, Z16006, SZ01, SZ02, ZJ03和ZJ04病毒株(表3)的同源性最高, 均为99.9%; 而与来源于南美洲(委内瑞拉)的VE_Ganxian, Z16019, GZ02, GD01, GDZ16001, GZ01同源性在99.0%~99.4%之间。值得注意的是, 本实验室分离的SZ_SMGC-1与SZ01, SZ-WIV01三个分离株来源于同一病例, 3个分离株彼此同源性为99.9%, 其中SZ_SMGC-1与SZ-WIV01相差仅一个碱基, 与SZ01相差3个碱基。SZ01从鼠脑中分离测序^[21], SZ-WIV01从蚊虫来源C6/36细胞中分离测序^[22], 而SZ_SMGC-1是用非洲绿猴来源Vero细胞分离测序, 3株病毒基因组的细微差异可能与不同的分离系统有关。

为更准确分析我国寨卡病毒的遗传进化地位, 将GenBank数据库中所有寨卡病毒的全基因组序列

表 2 中国寨卡输入性病例病毒全基因组同源性比较

Table 2 Genetic identities of the ZIKVs isolated in China imported cases

基因组同源性Genetic identities (%)													
Strains	SZ_SMGC-1	VE_Ganxian	Z16019	GZ02	GD01	GDZ16001	GZ01	SZ01	ZJ04	ZJ03	Z16006	SZ-WIV01	SZ02
SZ_SMGC-1		99.0	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
VE_Ganxian	99.0		99.1	99.1	99.2	99.2	99.2	99.0	99.1	99.0	99.0	99.1	99.1
Z16019	99.3	99.1		99.9	99.8	99.8	99.8	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
GZ02	99.3	99.1	99.9		99.8	99.8	99.8	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
GD01	99.4	99.2	99.8	99.8		100.0	99.9	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
GDZ16001	99.4	99.2	99.8	99.8	100.0		99.9	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
GZ01	99.4	99.2	99.8	99.8	99.9	99.9		99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
SZ01	99.9	99.0	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
ZJ04	99.9	99.1	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.9		99.9	99.9	99.9	99.9
ZJ03	99.9	99.0	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.9	99.9		99.9	99.9	99.9
Z16006	99.9	99.0	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.9	99.9	99.9		99.9	99.9
SZ-WIV01	99.9	99.1	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.9	99.9	99.9	99.9		100.0
SZ02	99.9	99.1	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.9	99.9	99.9	99.9	100.0	

表 3 我国寨卡病毒感染病例的相关信息

Table 3 The information of Zika cases imported in China

入关时间	入关前后路径	样品采集时间	基因组来源	分离株名称	GenBank Accession No.
2016.02.05	委内瑞拉→香港→ 深圳 →广州→江西	2016.02.06	血清	VE_Ganxian	KU744693 ^{a)}
2016.02.09	委内瑞拉→ 广州	2016.02.14	不详	GZ01	KU820898 ^{d)}
		2016.02.12	不详	GDZ16001	KU761564 ^{d)}
		2016	鼠脑分离	SZ01	KU866423 ^{b)}
2016.02.14	斐济/萨摩亚→香港→ 深圳 →浙江	2016	C6/36细胞分离	SZ-WIV01	KU963796 ^{c)}
		2016	Vero细胞分离	SZ_SMGC-1	KX266255
		2016.02.16	不详	Z16006	KU955589 ^{d)}
2016.02.15	斐济/萨摩亚→香港→ 深圳 →浙江	2016.02.17	不详	SZ02	KX185891 ^{d)}
		2016.02.17	不详	ZJ03	KU820899 ^{d)}
2016.02.15	斐济/萨摩亚→香港→ 深圳 →浙江	2016.02.17	不详	ZJ04	KX117076 ^{d)}
		2016.02.17	不详	ZJ04	KX117076 ^{d)}
2016.02.21	苏里南→ 上海 →浙江	—	—	—	—
2016.02.25	委内瑞拉→ 广州	2016.02	不详	GD01	KU740184 ^{d)}
2016.02.25	委内瑞拉→ 广州	2016.02.25	不详	GZ02	KX056898 ^{d)}
2016.02.19	委内瑞拉→ 广州 →广东恩平	2016.02.26	不详	Z16019	KU955590 ^{d)}
2016.02.25	委内瑞拉→ 广州 →广东恩平	—	—	—	—
2016.03.03	委内瑞拉→ 广州 →广东恩平	—	—	—	—
2016.03.03	委内瑞拉→ 广州 →广东恩平	—	—	—	—
2016.02.29	委内瑞拉→香港→ 深圳 →广东恩平	—	—	—	—

a) [20]; b) [21]; c) [22]; d) 根据GenBank数据库中相关病毒序列的采样时间和分离地点等信息,判断病毒全基因与病例的对应关系;加粗地名表示病例入关地点

下载作为参考序列,构建系统进化树(图2)。结果表明,寨卡病毒全基因序列总体上分成两个谱系,分别是亚洲和非洲谱系。目前已测得的中国分离株的全基因组序列都属于亚洲谱系。中国13个分离株又可分成3个小分支,可以从来源地进行区分,分支一(包

括GD01, GDZ16001, GZ01, Z16019和GZ02)来源于委内瑞拉,而分支二(包括SZ_SMGC-1, SZ-WIV01, SZ01, SZ02, Z16006, ZJ03和ZJ04)均来源于斐济和萨摩亚;而VE_Ganxian^[20]虽然也来源于委内瑞拉,但与海地等国家地区的分离株单独聚在一个小分支。

Figure 2 Phylogenetic analysis of whole genomes from ZIKVs. ZIKVs isolated from imported human cases to China are highlighted in red; SZ SMGC-1 is denoted by a green triangle

2.3 寨卡病毒SZ_SMGC-1形态学和细胞感染特性分析

在透射电子显微镜下, 负染的寨卡病毒颗粒呈直径基本均一的球形, 直径约50 nm, 病毒刺突不显著(图3(a)). 寨卡病毒(0.1 MOI)感染Vero细胞72 h后, 细胞超薄切片可见细胞浆内的囊泡中有大量呈高电子密度的病毒颗粒存在(图3(b)).

寨卡病毒感染Vero细胞6 d后, 取培养上清分别感染Vero, C6/36和BHK-21三种细胞, 在接种后第5或6天, 3种细胞均呈现出典型的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE). 在Vero和BHK-21细胞中表现为变圆透明、坏死脱落(图4(a)和(b)), 而在C6/36中仅表现为聚集性变圆透明, 病变后的细胞脱落并不明显(图4(c)). 在Vero(图4(g))和BHK-21(图4(h))细胞中寨卡病毒可以形成明显的噬斑. 有意思的是, BHK-21细胞中形成的噬斑数量明显少于Vero细胞中的噬斑数, 但噬斑面积却显著大于Vero细胞中形成的噬斑. 其原因可能与两种细胞系对寨卡病毒的敏感性差异相关, 具体影响因素有待于进一步深入研究.

为进一步研究寨卡病毒的生长特性, 分别以0.01和0.1 MOI的感染剂量感染Vero, C6/36和BHK-21三种不同细胞, 测定寨卡病毒在三种细胞中的生长曲线(图4(i)和(j)). 结果表明筛选的Vero细胞对寨卡病毒最为敏感, 在0.01和0.1 MOI感染的情况下, 病毒滴度分别在96和72 h左右就可达到峰值; 而在感染剂量相同的情况下, BHK-21和C6/36细胞中的病毒滴度在168~192 h才能达到峰值.

图 3 (网络版彩色)寨卡病毒的电子显微镜形态结构观察. (a) 寨卡病毒粒子电子显微镜负染. (b) 寨卡病毒感染Vero 3 d后超薄切片. 白色箭头指示病毒粒子

Figure 3 (Color online) Morphology of ZIKV by transmission electron microscopy. (a) Negative-stain of purified ZIKV virions. (b) Thin-sectioned of Vero cells infected by ZIKV, 3 d.p.i. Virus particles were denoted by white arrows

3 讨论

寨卡病毒于1947年首次从恒河猴体内分离, 1948年在同区域的非洲伊蚊(*Ae. Africanus*)中也分离到了活病毒. 其后主要在丛林中栖息的伊蚊属蚊虫中检测到该病毒, 包括带叉伊蚊(*Ae. furcifer*)、黄头伊蚊(*Ae. Luteocephalus*)、白点伊蚊(*Ae. Vitattus*)以及非洲伊蚊(*Ae. Apicoargenteus*)等^[1,3,23]; 此外, 在埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)、赫斯里伊蚊(*Ae. Hensilli*)、波尼尼西亚伊蚊(*Ae. Polynesiensis*)以及白纹伊蚊(*Ae. Albopictus*)中也分离到了寨卡病毒^[8,24]. 其中埃及伊蚊和白纹伊蚊是登革热病毒和基孔肯雅病毒的重要传播媒介. 尽管伊蚊是寨卡病毒的传播媒介, 但是其自然宿主目前还没有明确^[2-5]. 有研究认为, 寨卡病毒可能是在丛林中的非人类的灵长类动物或一些伊蚊类蚊虫中维持着天然病毒循环^[4,5]; 同时, 血清学研究显示, 在啮齿类动物、猫以及大象中也存在寨卡病毒的特异性抗体^[25,26].

在城市地区, 寨卡病毒的传播则主要依靠埃及伊蚊和白纹伊蚊, 但是这两种蚊虫叮咬的宿主有一定差异性^[5,7]. 此外, 研究发现除了依靠蚊虫叮咬传播以外, 寨卡病毒也可能通过母婴传播、血液传播和性传播^[25-27]. 这些传播途径提高了寨卡病毒在人群中传播的风险. 登革热病毒^[28,29]、基孔肯雅病毒^[30,31]、西尼罗河病毒^[32,33]以及黄热病病毒^[34,35]都已经被证实能够通过母婴垂直传播, 引起新生儿脑病(encephalopathy)、出血热^[31]、出生体重低、甚至死胎等严重后果^[28,30]. 因此, 对于寨卡病毒的母婴传播应该积极监测. 在法属玻里尼西亚寨卡疫情暴发期间, 约3%的无症状献血者血液内曾检出寨卡病毒RNA, 提示寨卡病毒可能通过感染的血液及血液制品传播^[9]. 此外, 在感染寨卡病毒出现相应症状17 d后的患者精液样本中也分离到寨卡病毒, 62 d后的精液样本中检测到病毒RNA^[36,37], 提示寨卡病毒能够通过性传播, 而最新研究已经进一步证实了该传播途径^[27].

2007年以前, 全球仅报告14例寨卡病毒散发病例, 主要通过血清学实验证实^[1,7,40]; 尽管没有出现病毒的暴发流行, 但是病毒流行病学调查表明该病毒在非洲和东南亚地区分布广泛^[6]. 2007年以后寨卡病毒感染病例和暴发疫情的国家及地区明显增加, 非洲、东南亚和美洲等地出现了多次暴发和流行, 到目前为止全球至少有66个国家和地区出现了寨卡病

图4 (网络版彩色)寨卡病毒的增殖特性。(a)~(c) 寨卡病毒感染Vero细胞 5 d.p.i. ((a), 100×), BHK-21 细胞 6 d.p.i. ((b), 100×), C6/36 细胞 6 d.p.i. ((c), 100×) 形成的细胞病变。(d)~(f) 分别为细胞对照。(g)和(h)分别是寨卡病毒感染Vero和BHK-21 细胞后形成的噬斑。0.01 (i)和 0.1 MOI (j)感染剂量接种Vero, BHK-21, C6/36 细胞后的生长曲线

Figure 4 (Color online) Kinetics of ZIKV replication *in vitro*. (a)~(c) CPE caused by SZ_SMGC-1 in Vero cells at 5 d.p.i., BHK-21 and C6/36 cells at 6 d.p.i., respectively. (d)~(f) The corresponding control cells (all 100× magnification). (g) and (h) Representative images of plaques caused by SZ_SMGC-1 on Vero and BHK-21 cells, respectively. (i) and (j) Multi-replication curves of SZ_SMGC-1 in Vero, BHK-21 and C6/36 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 and 0.1, respectively

毒感染病例^[13](图5)。Oliveira Melo等人^[41]通过种群分布建模的方法,从环境因素方面分析了可能出现寨

卡病毒流行的区域,结果显示除了已经出现和正在暴发寨卡病毒的地区以外,美国东南部、撒哈拉以南

图5 寨卡病毒的流行和分布。红色区域表示寨卡病毒发生流行和传播的地区。黄色区域表示寨卡病毒输入地区，但未发生流行和传播。绿色表示报道的很可能通过性接触而感染寨卡病毒的地区。黑色箭头代表输入我国的寨卡病例

Figure 5 Global distribution of ZIKV cases. Regions with primary human ZIKV infections are colored in red. Regions with imported ZIKV cases from travelers are colored in yellow. Regions with reported cases probably infected through sexual contact are colored in green. Black arrows represent the ZIKV cases imported into China

的非洲、澳大利亚北部以及中国东南沿海一带等部分热带和亚热带地区风险较高，大约2亿人居住在这些地区，影响范围巨大。此外，越来越多的研究表明，寨卡病毒感染能够引起格林-巴利综合征和胎儿小头症等严重疾病^[9,10,38,39]，而且不断有通过新型传播途径——性接触感染病例的报道(图5)，进一步提示寨卡病毒病防控的重要性和紧迫性。

2016年2月，寨卡病毒敲开了中国的大门，截至2016年5月12日已经确诊13例寨卡病毒感染病例，均为输入性病例，其中12例入境口岸在广东地区^[42](表3)。广东地区作为我国重要入关口岸和非洲友人居住地，给寨卡病毒等热带传染病的防控带来了困难。有研究分析结果显示：寨卡病毒在广东地区发生地方性流行的风险指数较高^[43]。根据广东地区的伊蚊分布、人口密度和出入境流动情况，以及疫区疾病流行趋势分析，推测广东地区输入性病例还会有所增加；3月份以后广东地区伊蚊密度逐渐增加，因此广大居民应提高防范意识，积极采取灭蚊防蚊措施，做好预防工作；相关部门还应增强对寨卡等病毒检测、以及药物和疫苗的研发和储备，降低寨卡等虫媒传染病流行和传播的风险。

本文针对GenBank数据库中所有寨卡病毒的全基因组序列进行遗传进化分析显示，寨卡病毒主要分为

非洲型和亚洲型两个谱系，与以往报道^[6,7,44]相符。本研究分离的SZ_SMGC-1毒株与中国其他分离病毒株均属于亚洲型，基因组同源性在99%以上，但进化地位可以分为3个亚分支(图2)。虽然无法判断这些微小的基因差异和进化是否会对病毒的致病性和传播性等生物学特性造成影响，但病毒基因的多样性对寨卡的防控提出了挑战。尽管已经确认寨卡病毒能够引起小头症和格林-巴利综合征等严重疾病，而且流行范围广、暴发风险高，但是目前并没有针对寨卡病毒的疫苗和特异性治疗药物^[1,2]。最近，寨卡病毒的病毒结构以及一些与病毒致病相关的蛋白结构相继被解析^[45~48]；同时，Dai等^[45]通过结构生物学的方法发现一种被称为2A10G6的黄病毒广谱中和抗体能够通过病毒入侵发挥关键作用的融合肽区进行包裹，从而阻止病毒对宿主的入侵。这些研究为寨卡疫苗及特异性治疗药物的开发提供了重要的理论基础。临床治疗方面目前主要是对症治疗，但是临床上并不清楚哪一类药物对治疗寨卡病毒引起的发热、关节痛等症状更有效^[1~3]。在过去的几十年中，人们在寻找抗登革热病毒的有效药物和疫苗方面做出了不懈努力^[49]。不管是临床症状，还是遗传进化方面，寨卡病毒与登革热病毒都有许多相似之处，因此在寨卡病毒的疫苗和药物研发方面可以借鉴一些抗登革热

病毒制剂研发的经验. 细胞系是全病毒疫苗研发的基本保障, 本研究发现不同Vero和BHK-21细胞系克隆株, 对寨卡病毒的灵敏程度不同. 通过实验筛选到了一株对寨卡病毒敏感的Vero细胞株, 病毒在该细

胞中增殖速度和效果良好, 0.01 MOI感染细胞后, 72 h后可见明显细胞病变. 寨卡病毒敏感细胞系感染体系的筛选和建立, 为病毒致病机制的解释, 以及抗病毒药物和疫苗的研发奠定了基础.

参考文献

- Basarab M, Bowman C, Aarons E J, et al. Zika virus. *BMJ*, 2016, 352: i1049
- Hamel R, Liégeois F, Wichit S, et al. Zika virus: Epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microb Infect*, 2016, doi: 10.1016/j.micinf.2016.03.009
- Lindenbach B D, Murray C L, Thiel H J, et al. Flaviviridae. In: Knipe D M, Howley P M, eds. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 712–746
- Grard G, Moureau G, Charrel R N, et al. Genomics and evolution of aedes-borne flaviviruses. *J Gen Virol*, 2010, 91: 87–94
- Wolfe N D, Kilbourn A M, Karesh W B, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among bornean orangutans. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 64: 310–316
- Wang L, Valderramos S G, Wu A, et al. From mosquitos to humans: Genetic evolution of Zika virus. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 561–565
- Haddow A D, Schuh A J, Yasuda C Y, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: Geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6: e1477
- Duffy M R, Chen T-H, Hancock W T, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, 2009, 360: 2536–2543
- Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med*, 2016, 374: 951–958
- Lucchese G, Kanduc D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barre Syndrome, and beyond. *Autoimmun Rev*, 2016, doi: 10.1016/j.autrev.2016.03.020
- Malkki H. Cns infections: Zika virus infection could trigger Guillain-Barre Syndrome. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12: 187
- Smith D W, Mackenzie J. Zika virus and Guillain-Barré Syndrome: Another viral cause to add to the list. *Lancet*, 2016, 387: 1486–1488
- WHO. Zika Situation Report. 2016, <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/21-april-2016/en>
- WHO. Zika Strategic Response Framework and Joint Operations Plan, January-June 2016. 2016, <http://www.who.int/iris/handle/10665/204420>
- Li J, Xiong Y, Wu W, et al. Zika virus in a traveler returning to China from Caracas, Venezuela, February 2016. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22: 22
- Li J H, Huang R F, Yang J P, et al. Clinical manifestations and laboratory test results of the first imported Zika virus infection in Mainland China (in Chinese). *Chin J Public Health*, 2016, 32: 413–415 [李建华, 黄仁发, 杨健平, 等. 中国大陆首例输入性寨卡病毒感染病例临床表现及实验室检测结果分析. *中国公共卫生*, 2016, 32: 413–415]
- Faye O, Faye O, Dupressoir A, et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol*, 2008, 43: 96–101
- Hall T A. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Nt. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 2016: msw054
- Liu L, Wu W, Zhao X, et al. Complete genome sequence of Zika virus from the first imported case in Mainland China. *Genome Anounc*, 2016, 4: e00291-16
- Deng Y-Q, Zhao H, Li X-F, et al. Isolation, identification and genomic characterization of the Asian lineage Zika virus imported to China. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 428–430
- Deng C, Liu S, Zhang Q, et al. Isolation and characterization of Zika virus imported to China using C6/36 mosquito cells. *Virol Sin*, 2016, 31: 176
- Hayes E B. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1347–1350
- Li M I, Wong P S J, Ng L C, et al. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *Aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6: e1792
- Besnard M, Lastère S, Teissier A, et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*, 2014, 19: 20751

- 26 Musso D, Nhan T, Robin E, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill*, 2014, 19: 1–3
- 27 D’Ortenzio E, Matheron S, de Lamballerie X, et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N Engl J Med*, 2016, doi: 10.1056/NEJMc1604449
- 28 Tan P C, Rajasingam G, Devi S, et al. Dengue infection in pregnancy: Prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*, 2008, 111: 1111–1117
- 29 Basurko C, Carles G, Youssef M, et al. Maternal and foetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*, 2009, 147: 29–32
- 30 Fritel X, Rollet O, Gérardin P, et al. Chikungunya virus infection during pregnancy, reunion, France, 2006. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 418–425
- 31 Gérardin P, Barau G, Michault A, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med*, 2008, 5: e60
- 32 Stewart R D, Bryant S N, Sheffield J S. West Nile virus infection in pregnancy. *Case Rep Infect Dis*, 2013, <http://www.hindawi.com/journals/crid/2013/351872>
- 33 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Possible west Nile virus transmission to an infant through breast-feeding, Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2002, 51: 877
- 34 Bentlin M R, de Barros Almeida R A M, Coelho K I R, et al. Perinatal transmission of Yellow Fever, Brazil, 2009. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1779–1781
- 35 Kuhn S, Twele-Montecinos L, MacDonald J, et al. Case report: Probable transmission of vaccine strain of Yellow Fever virus to an infant via breast milk. *Can Med Assoc J*, 2011, 183: E243–E245
- 36 Musso D, Roche C, Robin E, et al. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 359
- 37 Atkinson B, Hearn P, Afrough B, et al. Detection of Zika virus in Semen. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22: 940
- 38 Darwish M A, Hoogstraal H, Roberts T J, et al. A sero-epidemiological survey for Bunyaviridae and certain other arboviruses in Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1983, 77: 446–450
- 39 Messina J P, Kraemer M U, Brady O J, et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife*, 2016, 5: 1–22
- 40 Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet*, 2016, 387: 1531–1539
- 41 Oliveira Melo A, Malinger G, Ximenes R, et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47: 6–7
- 42 Zhang Y, Chen W, Wong G, et al. Highly diversified Zika viruses imported to China, 2016. *Protein Cell*, 2016, 6: 461–464
- 43 Tu W X, Ma T, Li Y, et al. Risk assessment on importation and autochthonous transmission of Zika virus disease in the mainland of China, 2016 (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2016, 61: 1344–1353 [涂文校, 马涛, 李昱, 等. 2016 年我国内地寨卡病毒的输入和传播风险评估. *科学通报*, 2016, 61: 1344–1353]
- 44 Shi W F, Zhang Z J, Ling C, et al. Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5: e68
- 45 Dai L, Song J, Lu X, et al. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe*, 2016, 19: 696–704
- 46 Kostyuchenko V A, Lim E X, Zhang S, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 2016, 533: 425–428
- 47 Sirohi D, Chen Z, Sun L, et al. The 3.8 Å resolution Cryo-Em structure of Zika virus. *Science*, 2016, 352: 467–470
- 48 Song H, Qi J, Haywood J, et al. Zika virus Ns1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 456–458
- 49 Lim S P, Wang Q-Y, Noble C G, et al. Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects. *Antiviral Res*, 2013, 100: 500–519

Genetic and biological characterization of Zika virus from human cases imported through Shenzhen Port

WANG Qiang¹, YANG Yang¹, ZHENG HaiXia¹, BI YuHai^{1,2,3}, SONG JingDong³, LI LiQiang⁴, GU DaYong⁵, WANG PeiYi^{1,6}, LI ShiHua², LIU Sheng², ZHAO YingZe², LIU Lei¹, GAO George F.^{1,2,3,7} & LIU YingXia¹

¹ Shenzhen Key Laboratory of Pathogen and Immunity, State Key Discipline of Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518112, China;

² CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³ National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (China CDC), Beijing 102206, China;

⁴ BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China;

⁵ Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen 518010, China;

⁶ Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK;

⁷ Center for Influenza Research and Early-warning (CASCIRE), Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

During February to March 2016, a total of 13 Zika virus (ZIKV) cases were imported into China by travelers. Infection with ZIKV in humans results in fever, rash and has been associated with microcephaly as well as Guillain-Barré syndrome. ZIKV is a mosquito-borne flavivirus and *Aedes* mosquitoes are the main transmission vector species. Since *Aedes* are prevalent throughout China, ZIKV has the potential to become widely disseminated if not properly controlled. The genetic and biological characteristics of ZIKV should be thoroughly studied in order to enact effective countermeasures. A novel ZIKV strain (SZ_SMGC-1) was successfully isolated from the sera of an imported case returning to China from Fiji and Samoa at the Shenzhen Port. The entire viral genome was sequenced and compared to whole ZIKV genomes downloaded from GenBank. Results showed that SZ_SMGC-1 possesses the highest nucleotide identity (99.9%) to ZIKV from Fiji and Samoa, and also has high nucleotide identity (99.0%–99.4%) to ZIKV from Venezuela. Additionally, ZIKV is known to have evolved into distinct Asian and African lineages, and our phylogenetic analyses showed that the ZIKVs isolated from all imported cases into China clustered into the Asian lineage. To study the biological characteristics of ZIKV, SZ_SMGC-1 was used to infect different cell lines including the mosquito-derived C6/36, monkey-derived Vero and hamster-derived BHK-21 cells. Infection with SZ_SMGC-1 *in vitro* resulted in considerable cytopathic effects (CPE) to mammalian cells and supported replication of the virus to high titers, but did not cause readily observable CPE in C6/36 cells despite virus replication to comparable titers with mammalian cell lines. Interestingly, two clones of Vero and BHK-21 cell lines were used in the present study, respectively, but ZIKV SZ_SMGC-1 replicated much quicker to high virus titers in one clone than the other. Furthermore, there are no effective vaccine or drug for ZIKV until now. The results of the genetic and biological characteristics and the sensitive cell lines form the basis for further investigation into the pathogenesis and development of an effective medical countermeasure against ZIKV.

Zika virus, SZ_SMGC-1, genome, genetic evolution, biological characteristics, cytopathic effect (CPE)

doi: 10.1360/N972016-00665