

# 大连地区腮腺炎病毒 G 基因型全基因组特征

钱盈<sup>1#</sup>, 景淑军<sup>2#</sup>, 郑国君<sup>1</sup>, 杨扬<sup>1</sup>, 弓晓杰<sup>3</sup>, 李中玉<sup>3</sup>, 李悦<sup>2</sup>, 孟凡红<sup>1</sup>, 宋俐霏<sup>1\*</sup>

- 1 科兴(大连)疫苗技术有限公司, 辽宁 大连
- 2 大连市妇女儿童医疗中心(集团), 辽宁 大连
- 3 大连民族大学, 辽宁 大连

钱盈, 景淑军, 郑国君, 杨扬, 弓晓杰, 李中玉, 李悦, 孟凡红, 宋俐霏. 大连地区腮腺炎病毒 G 基因型全基因组特征[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1283-1300.

QIAN Ying, JING Shujun, ZHENG Guojun, YANG Yang, GONG Xiaojie, LI Zhongyu, LI Yue, MENG Fanhong, SONG Lifei. Genomic characteristics of mumps virus genotype G in Dalian[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1283-1300.

**摘要:** 【目的】腮腺炎病毒(mumps virus, MuV)是引起流行性腮腺炎的病原体, 目前国内广泛流行的为 F 基因型, 局部地区出现 G 基因型, 且存在逐渐扩大趋势。为了解国内 G 基因型 MuV 全基因组的基因特征, 本研究选择辽宁大连地区分离到的 2 株腮腺炎 G 基因型毒株进行分析。【方法】对 2 株腮腺炎毒株进行全基因组测序, 依据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)各基因型参考毒株序列确认毒株型别, 同时开展分子生物学分析, 对腮腺炎各基因型别间及 G 基因型内差异进行比较; 结合我国其他地区 G 基因型毒株的基因组序列信息, 分析我国 G 基因型 MuV 的全基因组特点及其与现有疫苗株的遗传距离及关键抗原位点变异情况。【结果】本研究分离毒株为 G 基因型, 与已划分的 12 个基因型间核苷酸差异为 4.2%–6.9%, 与 A 基因型差异最大; 蛋白编码基因中, SH 基因变异最大, NP、M 和 L 基因相对保守, P 基因、F 基因、HN 基因型间差异较大。本研究分离的 G 基因型毒株与 GenBank 数据库国内分离株江苏省毒株(Jiangsu.CHN/22.13/2)亲缘关系最近, 与同为辽宁地区分离株存在差异。在关键抗原表位中, 本研究分离的 G 基因型毒株与疫苗株相比在 HN 蛋白少了 aa 12–14 位 N-糖基化位点, 但多了 aa 464–466 位 N-糖基化位点, 在中和表位中, G 基因型毒株与 A 基因型疫苗株差异较大, 提示这些氨基酸位点的变异很可能会潜在地降低腮腺炎疫苗株对 MuV 野毒株的交叉保护作用, 而 F 蛋白虽然有氨基酸差异, 但功能区域较为保守。【结论】本研究详细分析了大连地区 G 基因型毒株的基因型别特征, 与国内 G 基因型毒株及参考毒株整体较为相似, 存在部分差异位点, 但与

资助项目: 辽宁省科学技术计划-揭榜挂帅(科技攻关专项)(2022JH1/10400012)

This work was supported by the Liaoning Province's Science and Technology Plan "Jie Bang Gua Shuai" (Special Foundation for Science and Technology Research) (2022JH1/10400012).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: songlf@sinovac.com

Received: 2024-10-13; Accepted: 2024-12-17; Published online: 2025-01-23

全球范围内使用的疫苗株(A基因型)差异较大。本研究提示未来需持续开展国内腮腺炎病例监控,对流行病学和病毒学特征进行分析,为国内腮腺炎病毒溯源、传播途径及免疫策略制定提供方向。

关键词: 腮腺炎病毒; G基因型; 全基因组; 基因特征

## Genomic characteristics of mumps virus genotype G in Dalian

QIAN Ying<sup>1#</sup>, JING Shujun<sup>2#</sup>, ZHENG Guojun<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, GONG Xiaojie<sup>3</sup>, LI Zhongyu<sup>3</sup>, LI Yue<sup>2</sup>, MENG Fanhong<sup>1</sup>, SONG Lifei<sup>1\*</sup>

1 Sinovac (Dalian) Vaccine Technology Co., Ltd., Dalian, Liaoning, China

2 Dalian Women and Children's Medical Group, Dalian, Liaoning, China

3 Dalian Minzu University, Dalian, Liaoning, China

**Abstract: [Objective]** Mumps virus (MuV) is the causative agent of mumps. Nowadays, genotype F is widely prevalent in China, while genotype G appears in localized areas and is exhibiting a trend of gradual expansion. To understand the genetic characteristics of genotype G strains in China, we selected two genotype G MuV strains that were isolated from Dalian, Liaoning for analysis. **[Methods]** The whole genomes of the two strains were sequenced, and the genotypes were determined according to the WHO reference strains. Furthermore, we compared the molecular characteristics among different genotypes and within genotype G. By comparison with the sequences of genotype G strains in other areas of China, we analyzed the features of genotype G MuVs in China, as well as the genetic distance and variations of key antigenic sites between the wild-type genotype G strains and the existing vaccine strains. **[Results]** The strains isolated in this study both belonged to genotype G, and they showed the nucleotide differences ranging from 4.2% to 6.9% from other 12 genotypes, with the greatest divergence from genotype A. Among the protein coding genes, the SH coding gene exhibited the largest variation, while the NP, M, and L coding genes were conserved. The P, F and HN coding genes demonstrated significant differences among different genotypes. The genotype G strains isolated in this study were closely related to the strain isolated in Jiangsu Province (Jiangsu.CHN/22.13/2), while they were distinct from the strains previously isolated in Liaoning Province. The genotype G strains isolated in this study lacked a N-glycosylation site (aa 12–14) but gained a N-glycosylation site (aa 464–466) in the key epitope of HN protein. In addition, the genotype G strains showed considerable differences in terms of neutralizing epitopes from the genotype A vaccine strain. These differences suggested that the mutations of these sites may potentially reduce the cross-protection effects of vaccine strains against wild-type MuV strains. Although there were some mutations in F protein, the functional region was conserved. **[Conclusion]** This study details the genotypic characteristics of genotype G MuVs in Dalian, highlighting their high similarities to the genotype G strains in China and the WHO reference strains, while underscoring significant differences from the genotype A vaccine

strain used worldwide. These findings suggest the necessity of continuous surveillance of MuV strains in China and further studies of their epidemiology and virology, which could provide references for tracing MuVs, cutting the transmission route, and developing immunization strategies in China.

**Keywords:** mumps virus; genotype G; whole genome; genetic characteristic

流行性腮腺炎由腮腺炎病毒引起, 是一种传染性很强的疾病, 通常导致单侧或双侧唾液腺肿胀等典型的症状, 此外还会引起睾丸、卵巢、胰腺或脑膜的炎症, 并导致不孕症或耳聋等并发症。我国和世界多国均将含腮腺炎成分疫苗(麻疹、腮腺炎和风疹联合疫苗)纳入免疫规划中, 疫苗的应用使腮腺炎发病率急剧下降<sup>[1-2]</sup>。然而, 在过去十几年中, 仍有腮腺炎暴发的情况发生。

腮腺炎病毒(Mumps virus, MuV)属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)腮腺炎病毒属, 是引起人流行性腮腺炎(简称腮腺炎)的病原体, 人是感染腮腺炎病毒的唯一自然宿主。MuV基因组为不分节段的单股负链核糖核酸(RNA), 含有15 384个核苷酸, 全基因组序列按3'-核衣壳蛋白(NP)-磷酸化蛋白(P)-基质蛋白(M)-融合蛋白(F)-小疏水性蛋白(SH)-血凝素/神经氨酸酶蛋白(HN)-聚合酶蛋白(L)-5'的顺序排列并编码7种病毒蛋白。腮腺炎病毒只有一个血清型, 基因组SH基因的变异程度最大, 可用作腮腺炎基因分型依据。根据SH基因核苷酸差异, 目前, 全球已划分12个MuV基因型, 分别命名为A-N基因型(不包括E和M)<sup>[3]</sup>。世界范围内存在多个MuV基因型野毒株同时流行, 其中C、D和H基因型主要分布在西半球, B、F、I和L基因型主要分布在亚洲, G基因型在全球大部分国家或地区均有检测到<sup>[4]</sup>。我国目前主要流行的MuV为F基因型, 自2011年开始局部地区出现G基因型, 比较腮腺炎SH基因检出比例, 发现2011-2016年为2.67% (G型12条/总451条),

到2018-2019年为6.25% (G型10条/总160条), G基因型存在逐渐扩大趋势<sup>[5-6]</sup>。

腮腺炎属于疫苗可预防疾病, 目前全球广泛使用的腮腺炎疫苗主要是Jeryl-Lynn (JL)株系列疫苗, 我国主要为S79株, 为JL株进一步传代获得。JL及S79株MuV疫苗株均属于A基因型, 与我国现流行的F基因型及逐渐出现的G基因型MuV毒株基因型别不同。目前对于G基因型的病原学研究较少, 为了解国内G基因型MuV的重要基因特征, 本研究选择了辽宁地区分离到的2株腮腺炎G基因型毒株进行全基因组测序, 结合GenBank下载的MuV各基因型以及我国其他地区G基因型毒株的基因组序列信息, 共同分析我国G基因型MuV的全基因组特点及与现有疫苗株的遗传距离及关键抗原位点变异情况, 为我国腮腺炎流行病学分析及疾病防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 MuV毒株来源

ETYY-LZH株和ETYY-HCQ株为大连市妇女儿童医疗中心(集团)希望广场院区传染科采集病例的咽拭子, 经科兴(大连)疫苗技术有限公司利用Vero细胞分离获得。MuV毒株分离培养后, 测定病毒滴度约7.5 lg CCID<sub>50</sub>/mL, 用于后续分析。其中, ETYY-LZH株来自病例A, 男性, 6岁7个月, 腮腺炎疫苗接种史不详, 2022年10月28日发病, 于当日采集病例咽拭子; ETYY-HCQ株来自病例B, 男性, 6岁6个月, 有腮腺炎疫苗接种史, 2023年6月5日发

病, 于当日采集病例咽拭子。

## 1.2 病毒基因组测序分析

### 1.2.1 RNA 提取和 RT-PCR 法扩增全基因组

使用 TRIzol LS Reagent 试剂提取病毒全基因组 RNA, 使用 cDNA 反转录试剂盒 FastKing

RT Kit With gDNase (KR116) [天根生化科技(北京)有限公司]合成 cDNA, 利用 Oligo 软件设计扩增测序引物(表 1), 将扩增的 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析, 切取目的条带后进行纯化。

表1 RT-PCR扩增测序引物序列

Table 1 Sequence of primers used in RT-PCR amplification and sequencing analysis

| Name of primers | Primer sequences (5'→3')  | Name of primers | Primer sequences (5'→3')  |
|-----------------|---|-----------------|---|
| 1F              | ACCAAGGGGAAAATGAAGATGG (LZH strain)/<br>ACCAAGGGGAAAATGAAGAT (HCQ strain) | 17F             | ATAGTGAATGCAGCAGGAGG  |
| 1R              | GTAGCATCGATCCAGGAATT  | 17R             | ATCTGTAACTCACCTGTCT   |
| 2F              | CGCCAATCTTACTGCCAATG  | 18F             | GATTACTCAATTCCATCCAC  |
| 2R              | TGTGCCGACTCCCATAGCAT  | 18R             | GCCCCAAAGTCTCATAATGC  |
| 3F              | TCACTAAGCTCCGATCCTTG  | 19F             | ATGGTGATCCTGTTGTAGAC  |
| 3R              | TCCTGTTGAGAATCACCATT  | 19R             | AGCTCTTAAATGGGATCGAA  |
| 4F              | CAATTCAAGCACAACTCTTC  | 20F             | GCAAGACTGGATGGGAGTAT  |
| 4R              | GAAAAGGGGCTCAGGAATCT  | 20R             | CCGACATAGAGAGTGCTTCG  |
| 5F              | AGAGCAAAAAGAACATTCAGT   | 21F             | CTGCTTTCTAACAACCTGACC   |
| 5R              | CTGTCGCCATCATTCCTTCA  | 21R             | AATCTTTCTCGACCCCGTTC  |
| 6F              | GCGAACGAGATTATGGACCT  | 22F             | TGGACACCACTTGAAAGAAC  |
| 6R              | GAATCTGAATCGGGGGCTT   | 22R             | TTCCTCAGCTGCATTTTAC   |
| 7F              | TAAGAGCCGCAATGATTCCC  | 23F             | TGGCAGCTGATCCTTATACT  |
| 7R              | AATCTAGATCGTGCAGCAAG  | 23R             | AGATCCGATGTAAGGCACTC  |
| 8F              | GCTCCGATAAATATGTCAAG  | 24F             | GGTGTGATAATTGGGTCA  |
| 8R              | AGGAAATTATCATAGGTTGC  | 24R             | GAAGGGTACAGGAAGCAACG  |
| 9F              | GGCTCAGACTATGCATCACT  | 25F             | GGCCTTGCTTTAATTGAGAC  |
| 9R              | GCTTGAACATAAGACAGC  | 25R             | TGGAGAATTGATTGGGGCTA  |
| 10F             | TCTTCCAATCGCAGAAAACA  | 26F             | CCAAGGAATTCTAGACTATG  |
| 10R             | CCTGTCTGGCAATTGAATTA  | 26R             | CTCGAATAGCATTAAGCAAC  |
| 11F             | ATGGAGGGTCAGATTGTTTC  | 27F             | ACCCATCTAATCCAAACTGT  |
| 11R             | CACAGATTGGAGTTGATGGT  | 27R             | CGGGCAAGAAAGTCTCTATA  |
| 12F             | ACGCTGAGAACCTTACCATT  | 28F             | CATCATGTTCTCAGACCACT  |
| 12R             | CATGATTGAACGGCATTATT  | 28R             | TCAAGATTAGTAAGCCACCT  |
| 13F             | TATAAGACTGCGGTGCGACA  | 29F             | ATACATGTGCATTGGTCCAT  |
| 13R             | AGGTCATTAACAAAGGGGAT  | 29R             | AGATCCAACCATTTTCTTGT  |
| 14F             | GTGGGAGTAATGAATCAAGT  | 30F             | ACTTATCCACCTGAATTAG   |
| 14R             | CAAAATATATCCCACTCCCC  | 30R             | GGTTAATGCAGACTTCAGA   |
| 15F             | ACTATGCGGGTCCAGTCCA   | 31F             | ACTGTAAGGAAGTGGTGTAT  |
| 15R             | GGAGTTAATGGCCAGGGATC  | 31R             | ACCAAGGGGAGAAAAGTAAAAAT (LZH strain)/<br>ACCAAGGGGAGAAAAGTAAAA (HCQ strain) |
| 16F             | ACATTTACAACTCTGGTCC   |                 |   |
| 16R             | AATTCTGATTGCTAGTGGG   |                 |   |



### 1.2.2 核苷酸序列测定和序列拼接

参考 BigDyeTrv3.1 Cycle Seq Kit (4336921) (赛默飞世尔科技公司)说明书, 采用 Sanger 法进行测序分析。反应体系为 5  $\mu$ L: 纯化的 PCR 产物 1  $\mu$ L, BigDyeMix 1  $\mu$ L, Primer (3.2 nmol/L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 5  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 50  $^{\circ}$ C 20 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 进行 30 个循环; 12  $^{\circ}$ C 保存。PCR 完成后进行乙醇沉淀纯化后置于 ABI3730XL 测序仪(赛默飞世尔科技公司)进行测序, 使用 SeqMan 进行数据拼接。

ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株全基因组序列数据均已提交到国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmdc.cn>), 编号分别为 NMDCN00060PQ 和 NMDCN00060PP。

### 1.3 分子生物学分析

从 GenBank 数据库获得参考毒株全基因组序列(包括 A、B、C、D、F、G、H、I、J、K、L 和 N 基因型)以及疫苗株 Jeryl-Lynn 株 (AF338106.1 和 AF345290.1)、S79 株 (HQ416906.1 和 HQ416907.1)、SP-A 株 (FJ556896.1) 的全基因组序列, 同时检索中国(未含港澳台地区) G 基因型毒株全基因组序列及 SH 基因序列, 将这些序列与本研究分离毒株进行遗传差异分析, 其中多序列比对、氨基酸和核苷酸同源性分析使用 SnapGene、ClustalX 2 软件; 系统发育树的构建及遗传距离的分析使用 MEGA 软件的 Neighbor-Joining Tree 算法(取样值为 1 000)和 Pairwise-distance 算法。

### 1.4 结构生物学预测分析

本研究分离毒株 HN 蛋白结构预测首先通过 Protein Blast 选择 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 确定参考结构为 Hoshino 毒株 HN 蛋白二聚体 (PDB: 5b2d), 结构模拟利用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 和 AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com/>) 进行

预测, 抗原关键表位分析采用 PyMOL 软件进行结构显示、分析和作图。

## 1.5 中和抗体效价检测分析

### 1.5.1 动物免疫及血清采集

本研究的动物实验方案已通过科兴(大连)疫苗技术有限公司实验动物伦理审查。研究用动物为 SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。将 20 只小鼠随机分为 2 组, 每组 10 只, 实验组为 A 基因型毒株 (S79 疫苗株), 对照组为 PBS 缓冲液, 免疫方式为肌肉注射, 免疫剂量为 100  $\mu$ L (样品滴度为 6.6 lg CCID<sub>50</sub>/mL), 共免疫 2 次, 免疫间隔 21 d, 免疫前及末次免疫后眼眶采血并分离血清。

### 1.5.2 血清中和抗体效价检测及判定

将免疫前及免疫后血清于 56  $^{\circ}$ C 灭活 30 min, 用抗血清稀释液(99% MEM 溶液, 1% 的 7.5% 碳酸氢钠溶液)按照 2 倍进行倍比稀释(即 1:2、1:4、1:8、1:16 等)后, 按照体积比 1:1 分别加入 A 基因型疫苗株(S79 疫苗株)、G 基因型分离株(ETYY-LZH 株)和 F 基因型分离株 [2022 年 10 月 14 日分离自大连市妇女儿童医疗中心(集团)病例咽拭子, 女性, 5 岁 5 个月, 腮腺炎疫苗接种史不详] (滴度均为 1 000 CCID<sub>50</sub>/mL), 设置病毒对照(3 种病毒分别与抗血清稀释液 1:1 混合), 于 37  $^{\circ}$ C 水浴 60 min; 取 Vero 细胞制备  $1.5 \times 10^5$ – $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液, 加至 96 孔细胞培养板中, 每孔 100  $\mu$ L, 静置培养 30 min 后进行接种, 包括中和后病毒液(100  $\mu$ L/孔, 设 4 个复孔), 细胞培养液对照(100  $\mu$ L/孔, 设 4 个复孔)、抗血清对照(稀释倍数 1:2, 100  $\mu$ L/孔, 不加病毒, 设 2 个复孔)和病毒对照(100  $\mu$ L/孔, 设 4 个复孔), 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 8 d。判定按照 Reed-Muench 法计算半数保护量 PD<sub>50</sub>, 即为中和效价。

## 2 结果与分析

### 2.1 ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株基因组特征分析

ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株全长为 15 384 个核苷酸, 由于未对毒株 5' 末端和 3' 末端进行测序分析, 因此 2 个毒株的 5'UTR 和 3'UTR 均有缺失, 实测 ETYY-LZH 株全基因组序列 15 340 nt (23–15 362), ETYY-HCQ 株全基因组序列 15 344 nt (21–15 364)。2 个毒株全基因组按照 3'-NP-P-M-F-SH-HN-L-5' 的顺序排列并编码 7 种病毒蛋白, 其中 NP、P、L 基因编码病毒核衣壳蛋白, 负责病毒的转录及复制; F、HN 基因编码蛋白负责病毒入侵及受体识别; M 为基质蛋白基因; SH 为小疏水性蛋白基因。比较 ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株全基因组序列 (表 2), 发现 2 个毒株序列相似性为 99.9%, 共有 13 个核苷酸差异, 分别位于 P、M、F、HN、L 蛋白的编码区 (coding sequences, CDS), 其中氨基酸同义突变 4 个, 单点突变 5 个, 混合位点突变 4 个。

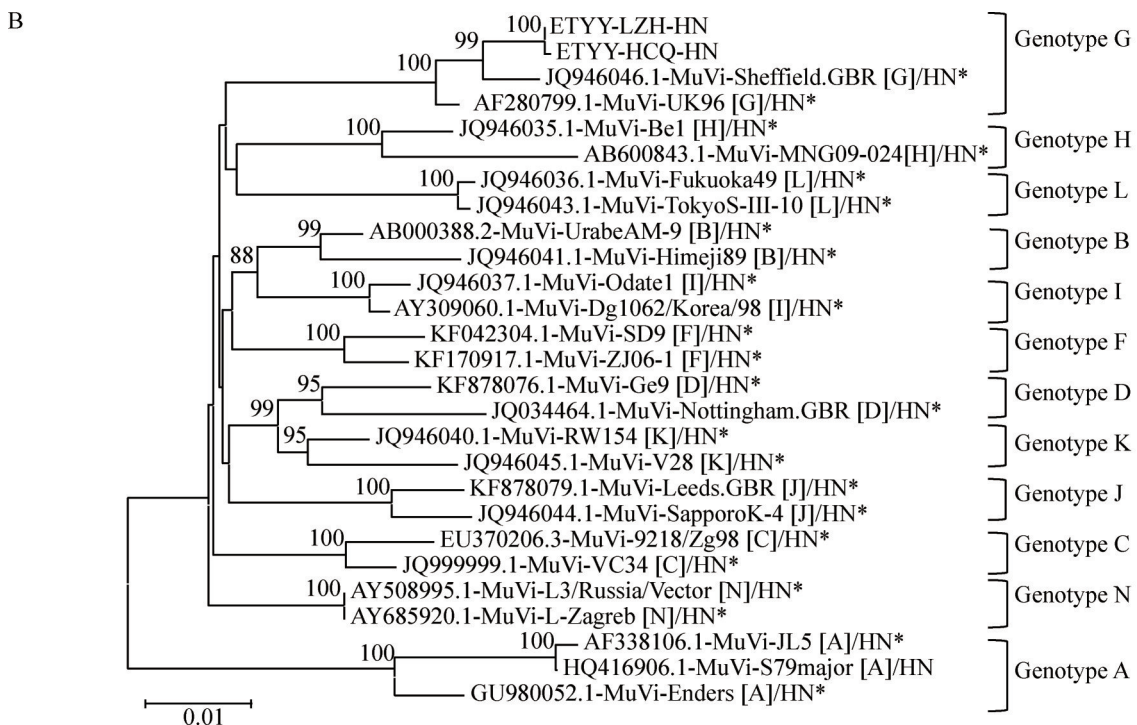
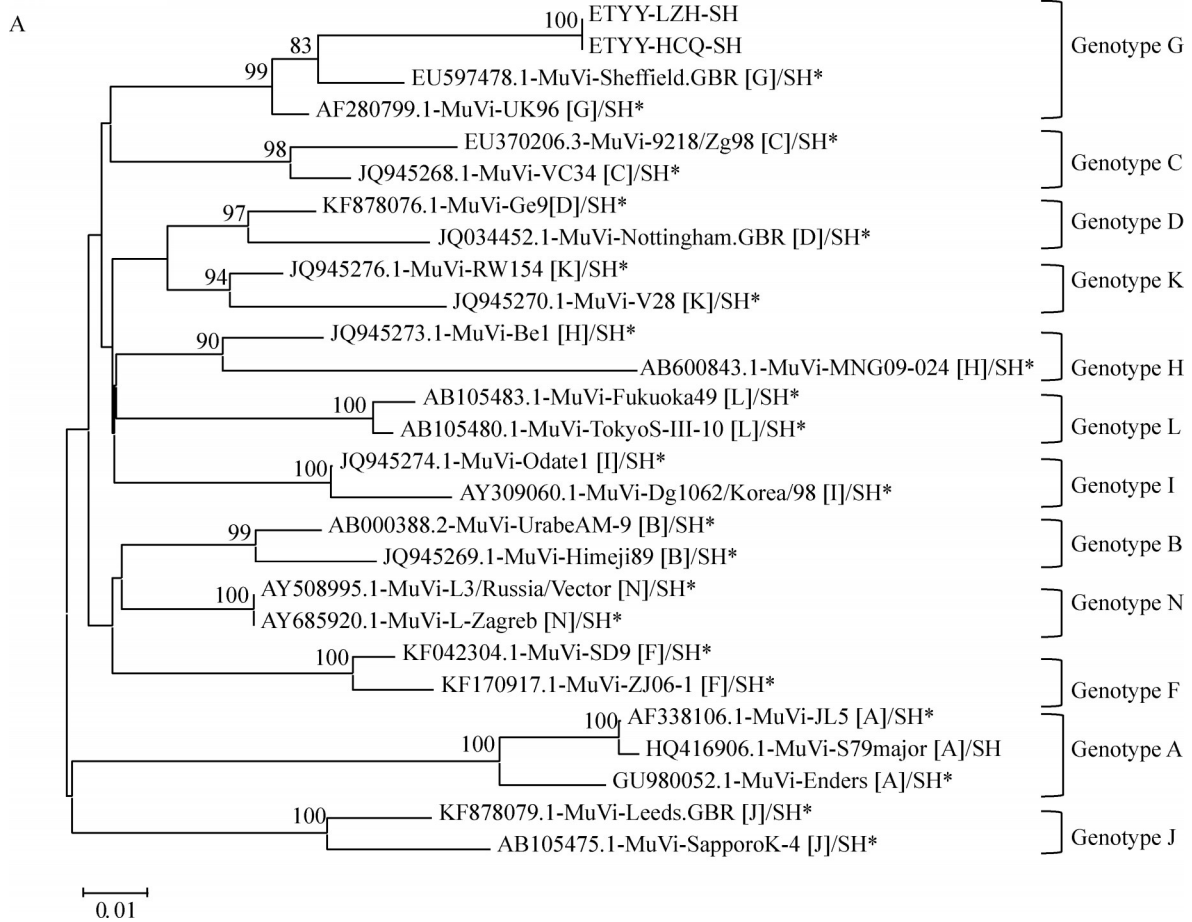
表2 ETYY-LZH株和ETYY-HCQ株序列差异

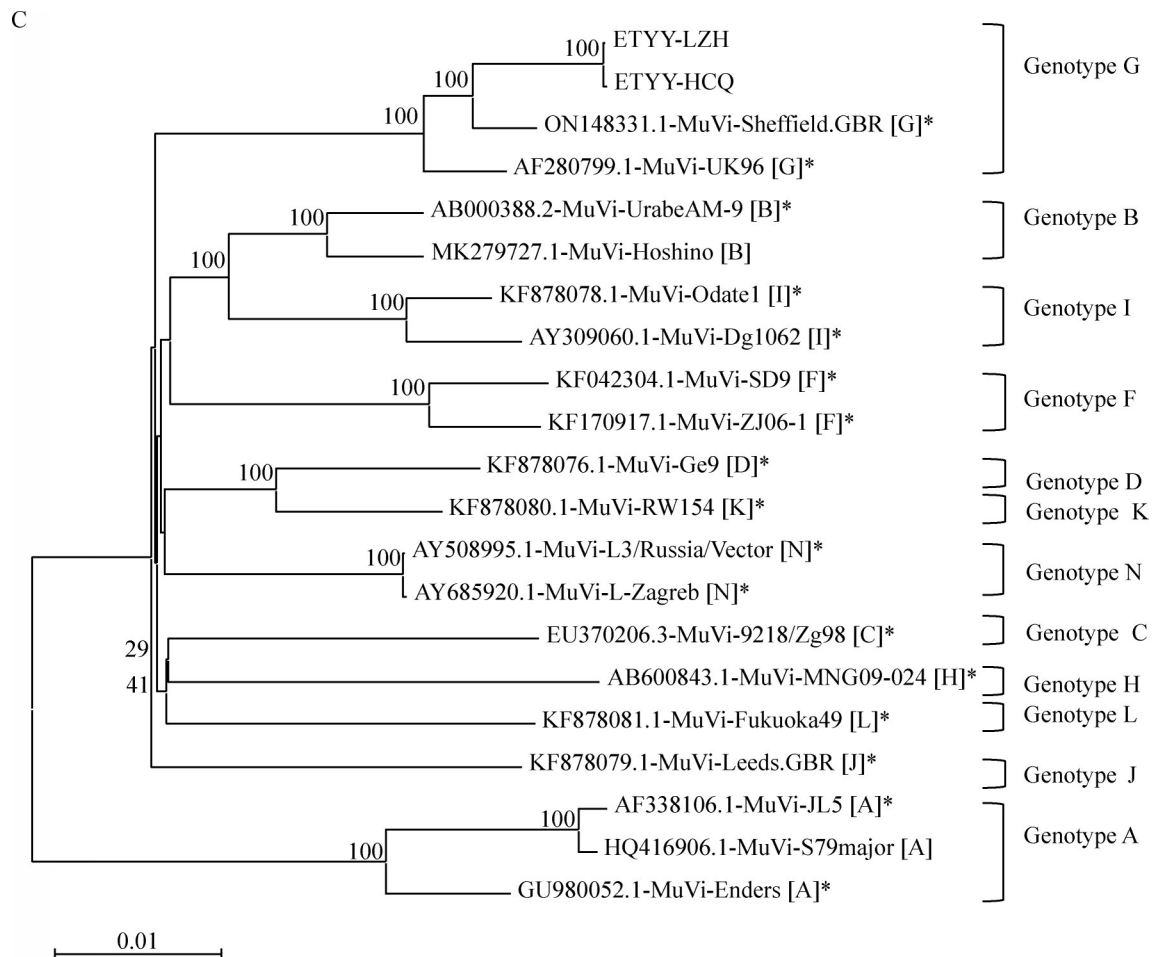
Table 2 Sequence differences between ETYY-LZH and ETYY-HCQ strains

| Number | Nucleotide position (nt) | Residue position | ETYY-LZH |            | ETYY-HCQ |               |
|--------|--------------------------|------------------|----------|------------|----------|---------------|
|        |                          |                  | Base     | Amino acid | Base     | Amino acid    |
| 1      | 1 994                    | P-CDS            | A        | Lys (K)    | C        | Gln (Q)       |
| 2      | 3 800                    | M-CDS            | T        | Val (V)    | C/T      | Val (V)       |
| 3      | 3 937                    | M-CDS            | A        | Asn (N)    | A/T      | Asn/Ile (N/I) |
| 4      | 5 555                    | F-CDS            | A        | Glu (E)    | A/G      | Glu/Gly (E/G) |
| 5      | 5 893                    | F-CDS            | G        | Ala (A)    | T        | Ser (S)       |
| 6      | 6 650                    | HN-CDS           | G        | Ala (A)    | A        | Thr (T)       |
| 7      | 6 691                    | HN-CDS           | G        | Lys (K)    | A/G      | Lys (K)       |
| 8      | 6 694                    | HN-CDS           | G        | Lys (K)    | A/G      | Lys (K)       |
| 9      | 6 835                    | HN-CDS           | G        | Lys (K)    | A/G      | Lys (K)       |
| 10     | 6 840                    | HN-CDS           | G        | Arg (R)    | A/G      | Lys/Arg (K/R) |
| 11     | 10 504                   | L-CDS            | C        | Phe (F)    | G        | Leu (L)       |
| 12     | 11 579                   | L-CDS            | G        | Glu (E)    | A/G      | Lys/Glu (K/E) |
| 13     | 14 789                   | L-CDS            | A        | Thr (T)    | C        | Pro (P)       |

SH 基因为 MuV 全基因组变异最大的基因, 常作为 MuV 基因型鉴别的主要依据, HN 基因序列也常作为分离病毒型别鉴别的补充, 此外本研究测定了分离株全基因组序列, 因此按照上述 3 种鉴别方式, 将 ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株与世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 参考毒株进行发育树分析。在发育树上, MuV 的 12 个基因型毒株均形成各自独立的分支, 本研究的 2 个分离毒株与 G 基因型在一个分支, 均为 G 基因型 (图 1)。基于 SH 基因、HN 基因和全基因组构建的亲缘关系树结果一致, bootstrap 自展值均大于 80, 说明发育树结果可信。

ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株的序列相似性较高, 且 ETYY-LZH 株基因组核苷酸均为单一碱基, 后面将 ETYY-LZH 株与各基因型毒株进行全基因组比对 (表 3)。本研究分离毒株 ETYY-LZH 株与 G 基因型毒株全基因组具有较高相似性, 核苷酸整体差异为 1.2%–1.6% (183/15 384–246/15 384), 与其他基因型差异





**图1 MuVs各基因型系统发育树构建。**A–C: MuVs毒株分别基于SH基因(A)、HN基因(B)和全基因组(C)构建的系统发育树;发育树分支自展值标注在节点位置,用于评估该分支的可信度,一般大于70被认为可信;距离标尺位于发育树下方,代表序列间差异的单位长度。

**Figure 1** Phylogenetic trees of MuV genotypes. A–C: Phylogenetic trees of MuV genotypes based on the SH gene (A), the HN gene (B) and the whole genome (C); The bootstrap value of the phylogenetic tree is marked at the node position to evaluate the credibility of the branch, generally, a value greater than 70 is considered credible; The distance scale is located below the tree which represents the unit length of differences between sequences.

为 4.2%–6.9% (648/15 384–1 058/15 384), 其中与 A 基因型差异性最大, 与国内 S79 疫苗株亚株 S79major 序列差异为 6.8% (1 047/15 384), 与其他已被应用的疫苗株序列差异分别为 Urabe AM-9 株 4.4% (673/15 384)、Hoshino 株 4.3% (662/15 384)、L3/Russia/Vector 株 4.2% (648/15 384)、L-Zagreb 株 4.2% (650/15 384),

差异相似。

进一步比较表达蛋白编码区的核苷酸与氨基酸发现, ETYY-LZH 株与各基因型毒株 SH 基因变异最大, 核苷酸差异为 5.7%–16.1% (10/174–28/174), 氨基酸差异为 5.3%–21.1% (3/57–12/57); NP 基因、M 基因和 L 基因序列相对保守, 核苷酸平均差异分别为 4.3% (71/1 650)、4.7% (53/1 128)、



**表3 ETYY-LZH株与MuV其他基因型在全基因组及表达蛋白编码区的核苷酸和氨基酸差异**

**Table 3 Differences of nucleotides and amino acids between the ETYY-LZH strain and other MuV genotypes in the whole genome and coding regions of the expressed proteins (%)**

| Strain              | GenBank number | Genotype | Genome | NP  |     | P   |     | M   |     | F   |     | SH   |      | HN  |     | L   |     |
|---------------------|----------------|----------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
|                     |                |          |        | nt  | aa  | nt  | aa  | nt  | aa  | nt  | aa  | nt   | aa   | nt  | aa  | nt  | aa  |
| Jeryl-Lynn, JL5*#   | AF338106.1     | A        | 6.9    | 5.6 | 1.6 | 6.9 | 5.9 | 6.3 | 0.8 | 6.8 | 5.8 | 16.1 | 14.0 | 7.9 | 5.2 | 5.7 | 1.1 |
| Enders*             | GU980052.1     | A        | 6.3    | 4.9 | 1.3 | 6.3 | 5.1 | 6.0 | 0.8 | 6.0 | 5.0 | 15.5 | 14.0 | 6.7 | 4.6 | 5.4 | 1.1 |
| S79major#           | HQ416906.1     | A        | 6.8    | 5.3 | 1.8 | 6.9 | 5.9 | 6.3 | 0.8 | 6.7 | 5.6 | 16.1 | 14.0 | 7.7 | 5.2 | 5.7 | 1.1 |
| Urabe AM-9*#        | AB000388.2     | B        | 4.4    | 4.7 | 1.6 | 3.8 | 2.8 | 4.6 | 0.5 | 4.8 | 4.1 | 9.8  | 15.8 | 4.5 | 2.9 | 3.6 | 0.6 |
| Hoshino#            | MK279727.1     | B        | 4.3    | 4.3 | 1.5 | 4.0 | 3.1 | 4.5 | 0.0 | 4.7 | 3.5 | 8.0  | 12.3 | 4.5 | 2.9 | 3.5 | 0.8 |
| 9218/Zg98*          | EU370206.3     | C        | 5.1    | 5.1 | 0.7 | 3.7 | 4.3 | 5.9 | 1.1 | 4.6 | 3.9 | 12.1 | 15.8 | 5.3 | 3.4 | 4.3 | 0.8 |
| Ge9*                | KF878076.1     | D        | 4.7    | 4.5 | 0.2 | 4.5 | 4.6 | 4.8 | 0.5 | 4.8 | 4.1 | 10.9 | 14.0 | 5.1 | 2.4 | 3.8 | 0.7 |
| SD9*                | KF042304.1     | F        | 5.1    | 5.1 | 0.7 | 4.6 | 3.6 | 5.1 | 0.5 | 4.9 | 3.5 | 12.6 | 17.5 | 5.1 | 2.4 | 4.3 | 0.7 |
| ZJ06-1*             | KF170917.1     | F        | 5.0    | 5.3 | 0.5 | 4.0 | 3.6 | 4.8 | 0.3 | 4.9 | 3.7 | 9.8  | 12.3 | 5.0 | 2.4 | 4.1 | 0.5 |
| UK96*               | AF280799.1     | G        | 1.6    | 1.6 | 0.0 | 1.4 | 1.0 | 1.6 | 0.0 | 2.1 | 2.2 | 6.3  | 7.0  | 1.3 | 0.7 | 1.1 | 0.1 |
| Sheffield.GBR*      | ON148331.1     | G        | 1.2    | 1.1 | 0.0 | 1.4 | 1.5 | 0.8 | 0.0 | 1.6 | 1.3 | 5.7  | 5.3  | 1.1 | 0.5 | 0.8 | 0.1 |
| MNG09-024*          | AB600843.1     | H        | 5.3    | 4.2 | 0.2 | 4.9 | 4.9 | 5.2 | 0.5 | 5.5 | 4.1 | 13.2 | 21.1 | 6.5 | 4.0 | 4.4 | 0.6 |
| Odate1*             | KF878078.1     | I        | 4.7    | 4.3 | 0.5 | 4.0 | 3.3 | 5.2 | 0.3 | 5.3 | 3.7 | 9.8  | 8.8  | 4.7 | 2.9 | 4.0 | 0.7 |
| Dg1062*             | AY309060.1     | I        | 4.9    | 3.9 | 0.5 | 4.4 | 1.0 | 5.1 | 0.3 | 5.6 | 4.5 | 10.9 | 10.5 | 4.7 | 2.2 | 4.2 | 1.8 |
| Leeds.GBR*          | KF878079.1     | J        | 5.0    | 4.3 | 0.2 | 4.7 | 3.8 | 5.2 | 0.3 | 5.8 | 4.3 | 13.8 | 15.8 | 5.3 | 3.1 | 4.1 | 0.6 |
| RW145*              | KF878080.1     | K        | 4.5    | 4.5 | 0.5 | 3.9 | 3.8 | 4.7 | 0.5 | 4.4 | 3.3 | 10.3 | 8.8  | 4.5 | 2.9 | 3.8 | 0.4 |
| Fukuoka49*          | KF878081.1     | L        | 4.9    | 4.5 | 0.5 | 4.5 | 3.3 | 5.2 | 0.3 | 5.8 | 3.2 | 11.5 | 14.0 | 5.1 | 2.7 | 3.9 | 0.8 |
| L3/Russia/Vector*#  | AY508995.1     | N        | 4.2    | 4.2 | 0.2 | 3.6 | 3.3 | 4.2 | 0.8 | 5.0 | 3.9 | 9.8  | 8.8  | 4.4 | 2.2 | 3.5 | 0.7 |
| L-Zagreb*#          | AY685920.1     | N        | 4.2    | 4.3 | 0.4 | 3.6 | 5.9 | 4.2 | 0.8 | 5.1 | 3.9 | 9.8  | 8.8  | 4.4 | 2.2 | 3.5 | 0.7 |
| Mean of differences | -              | -        | 4.7    | 4.3 | 0.7 | 4.3 | 3.8 | 4.7 | 0.5 | 4.9 | 3.9 | 11.2 | 12.6 | 5.0 | 2.9 | 3.9 | 0.7 |

\*: WHO参考毒株; #: MuV疫苗株或组分, 具体为Jeryl-Lynn株(JL), JL5为JL株亚株; S79major: 中国S79疫苗株亚株, 以SH基因作为亚株分型标准, 对应JL5; Urabe AM-9: 日本腮腺炎疫苗株; Hoshino: 日本腮腺炎疫苗株; L3/Russia/Vector: 俄罗斯腮腺炎疫苗株; L-Zagreb: 克罗地亚、印度腮腺炎疫苗株。

\*: WHO reference strain; #: MuV vaccine strain or component, specifically Jeryl-Lynn strain (JL), JL5 is the sub-strain of JL strain; S79major is the sub-strain of Chinese S79 vaccine strain, it corresponds to JL5 based on SH gene; Urabe AM-9 is a Japanese mumps vaccine strain; Hoshino is also a Japanese mumps vaccine strain; L3/Russia/Vector is the Russian mumps vaccine strain; L-Zagreb is used as mumps vaccine strain in both Croatia and India. nt: Nucleotide; aa: Amino acid.

3.9% (263/6 786), 氨基酸平均差异分别为 0.7% (4/549)、0.5% (2/375)、0.7% (16/2 261); P 基因、F 基因、HN 基因型间差异也较大, 核苷酸平均差异分别为 4.3% (50/1 176)、4.9% (80/1 617)、5.0% (87/1 749), 氨基酸平均差异分别为 3.8% (15/391)、3.9% (21/538)、2.9% (17/582)。

## 2.2 ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株与国内 G 基因型序列差异

进一步分析本研究分离毒株与国内其他地区分离 G 基因型毒株差异, 通过检索 GenBank 数据库, 中国(未含港澳台地区)共有 15 个 G 基因型 MuV 毒株 SH 基因全长序列信息录入, 包

括陕西 5 株、辽宁 1 株、福建 3 株、江苏 2 株、云南 4 株，其中云南 4 株为基因组全长序列信息。

通过发育树和遗传距离(P-distance)分析可知(图 2、表 4)，本研究大连分离的 2 株 G 基因型毒株与江苏分离毒株(Jiangsu.CHN/22.13/2)亲缘关系最近，与之前分离的辽宁毒株(Liaoning.CHN/16.11)较为不同，与云南毒株(Yunnan.CHN/2.19.1)和陕西毒株(Shannxi.CHN/17.11/3 和 Shannxi.CHN/17.11/2)亲缘关系较远。从发育树可知，本研究分离毒株与江苏、辽宁、福建毒株形成一个独立分支(Lineage 1)，而云南、陕西、参考毒株 UK96 和 Sheffield.GBR 形成另一个独立分支(Lineage 2)，结合世界其他国家和地区检测的腮腺炎 G 基因型 SH 序列分析，分支 1

主要来自 1996–2016 年欧洲和北美洲，包括美国、荷兰、德国、西班牙，也有印度、日本和中国的分离株，分支 2 主要来自 2000–2016 年亚洲国家，包括日本、中国和老挝等国家的分离株<sup>[4]</sup>。由于流行病学信息不足，目前尚无法确认这 17 株 G 基因型 MuV 毒株是否属于输入性 MuV。

### 2.3 ETYY-LZH 株和 ETYY-HCQ 株与疫苗株关键抗原差异

为进一步分析分离毒株致病性及现有疫苗株对 G 基因型野毒株保护效果的潜在影响，揭示未来疫苗研制关注方向，本研究将大连地区分离毒株、云南毒株及 WHO 参考毒株与现有疫苗株的关键抗原进行比对分析。目前世界范围内广泛使用的为 Jeryl-Lynn 株，中国为 S79 株，

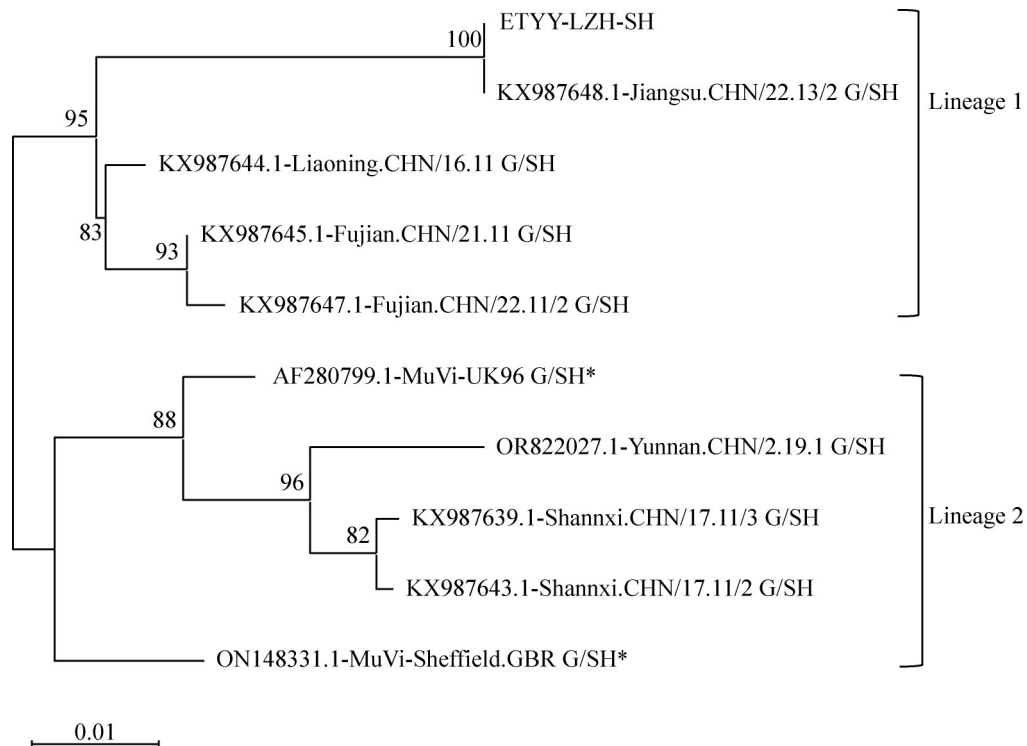


图2 ETYY-LZH株与我国不同地区G基因型毒株基于SH基因的系统发育树构建。同地区SH序列相同仅保留1个毒株进行构建。

Figure 2 Phylogenetic tree of the ETYY-LZH strain and genotype G strains from different regions of China based on SH gene. Only one strain per region with identical SH sequences was included.

表4 我国不同地区腮腺炎G基因型基于SH基因的遗传距离

Table 4 Genetic distances of genotype G MuVs based on the SH gene from different regions of China

| Number | Region/<br>Reference               | Strain <sup>a</sup>                                     | ETYY-<br>LZH | WHO-<br>AF280799.1-<br>MuVi-<br>UK96 | WHO-<br>ON148331.1-<br>MuVi-<br>Sheffield.GBR | WHO-<br>OR82202<br>7.1 | Yunnan-<br>KX98763<br>9.1 | Shannxi-<br>KX98764<br>3.1 | Shannxi-<br>KX98764<br>4.1 | Liaoning-<br>KX98764<br>5.1 | Fujian-<br>KX98764<br>7.1 | Fujian-<br>KX98764<br>8.1 |
|--------|------------------------------------|---|--------------|--------------------------------------|---|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1      | Liaoning<br>Dalian<br>(this study) | ETYY-LZH, ETYY-<br>HCQ                                  | -            | -                                    | -   | -                      | -                         | -                          | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 2      | WHO<br>reference<br>strain         | AF280799.1-MuVi-<br>UK96                                | 0.053 8      | -                                    | -   | -                      | -                         | -                          | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 3      | WHO<br>reference<br>strain         | ON148331.1-MuVi-<br>Sheffield.GBR                       | 0.053 8      | 0.025 3                              | -   | -                      | -                         | -                          | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 4      | Yunnan                             | OR822027.1,<br>OR822028.1,<br>OR822029.1,<br>OR822030.1 | 0.075 9      | 0.028 5                              | 0.047 5                                       | -                      | -                         | -                          | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 5      | Shannxi                            | KX987639.1,<br>KX987640.1,<br>KX987641.1,<br>KX987642.1 | 0.069 6      | 0.022 2                              | 0.041 1                                       | 0.019 0                | -                         | -                          | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 6      | Shannxi                            | KX987643.1  | 0.066 5      | 0.025 3                              | 0.044 3                                       | 0.022 2                | 0.003 2                   | -                          | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 7      | Liaoning                           | KX987644.1  | 0.034 8      | 0.031 6                              | 0.025 3                                       | 0.047 5                | 0.041 1                   | 0.038 0                    | -                          | -                           | -                         | -                         |
| 8      | Fujian                             | KX987645.1,<br>KX987646.1                               | 0.038 0      | 0.034 8                              | 0.028 5                                       | 0.050 6                | 0.044 3                   | 0.041 1                    | 0.009 5                    | -                           | -                         | -                         |
| 9      | Fujian                             | KX987647.1  | 0.041 1      | 0.038 0                              | 0.031 6                                       | 0.053 8                | 0.047 5                   | 0.044 3                    | 0.012 7                    | 0.003 2                     | -                         | -                         |
| 10     | Jiangsu                            | KX987648.1  | 0.000 0      | 0.053 8                              | 0.053 8                                       | 0.075 9                | 0.069 6                   | 0.066 5                    | 0.034 8                    | 0.038 0                     | 0.041 1                   | -                         |

<sup>a</sup>: 同地区SH序列相同仅保留1个毒株进行比较; -: 不进行比较。

<sup>a</sup>: Means only one strain per region with identical SH sequences was included; -: Not comparing.

二者均为 A 基因型疫苗株；此外中国医学科学院医学生物学研究所对野生型 SP 株进行减毒驯化，获得 F 基因型腮腺炎减毒活疫苗 SP-A 株，已完成临床 II 期(CTR20150482)，正在开展临床 III 期(CTR20201943)，也一并进行分析。

血凝素-神经氨酸酶 HN 蛋白和膜融合 F 蛋白是 MuV 重要的免疫原性蛋白。MuV 感染时，HN 蛋白首先与宿主细胞表面的唾液酸受体结合，介导病毒与细胞膜的初始黏附；受体结合后，触发 F 蛋白的结构发生改变。在此过程中，宿主内的 furin 蛋白酶对 F 蛋白进行切割，使其裂解为活性形式，进而引发从融合前到融合后的构象变化，最终促使病毒完成入侵。因此，HN 蛋白和 F 蛋白不仅是 MuV 发病的关键因子，也是病毒感染过程中免疫应答的重要靶点。

分析 HN 蛋白的氨基酸差异，与 ETTY-LZH 株相比，ETYY-HCQ 株、UK96 株、Sheffield.GBR 株及云南株的氨基酸差异分别为 0.3%(2/582)、0.7%(4/582)、0.5%(3/582)和 0.9%(5/582)；而疫苗株 JL5、S79major 和 SP-A 的差异显著升

高，分别为 5.2%(30/582)、5.2%(30/582)和 2.4%(14/582)。上述结果表明，G 型毒株基因型内变异较小，但与 A 型和 F 型疫苗株的遗传差异较大。

依据 HN 蛋白的功能，包括：(1) 血凝素受体结合活性；(2) 通过与细胞的糖链末端唾液酸结合并将其破坏，释放出唾液酸残基，促进病毒与宿主细胞的黏附；(3) 与 F 蛋白相互作用，起到病毒融合的作用从而促进病毒的释放<sup>[7]</sup>，本研究进一步比较 G 基因型毒株与疫苗株在 HN 蛋白的 N-糖基化位点、唾液酸结合表位，以及免疫作用相关的 B 细胞表位及中和表位等差异(表 5)。

N-糖基化位点中，疫苗株包括 7 个糖基化位点，而 G 基因型大部分 MuV 毒株缺失了 aa 12-14 的 N-糖基化位点(除 AF280799-UK96[G])，但增加了 aa 464-466 位点的 N-糖基化修饰，后者与目前流行的 F 基因型毒株一致。

进一步采用 SWISS-MODEL 和 AlphFold3 两种方法预测 G 基因型 HN 蛋白二聚体结构，

表5 ETTY-LZH株和ETYY-HCQ株与疫苗株HN蛋白差异位点

Table 5 Differences in HN protein between ETTY-LZH, ETTY-HCQ and vaccine strains

| Strain                       | N-glycosylation site <sup>a</sup> (aa) |         |         |         |         |         |         |         | Neutralizing epitope (aa) |     |     |     |     |     |
|------------------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                              | 12-14                                  | 127-129 | 284-286 | 329-331 | 400-402 | 448-450 | 464-466 | 507-509 | 279                       | 287 | 288 | 336 | 354 | 356 |
| ETYY-LZH                     | SAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | NCS     | NSS     | T                         | V   | T   | S   | Q   | D   |
| ETYY-HCQ                     | STT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | NCS     | NSS     | T                         | V   | T   | S   | Q   | D   |
| UK96*                        | NAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | NCS     | NSS     | T                         | V   | T   | S   | Q   | D   |
| Sheffield.GBR*               | SAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | NCS     | NSS     | T                         | V   | T   | S   | Q   | D   |
| Yunnan.CHN                   | SAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | NCS     | NSS     | T                         | V   | T   | S   | Q   | D   |
| Jeryl-Lynn,JL5* <sup>#</sup> | NAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NYS     | HCS     | NSS     | I                         | I   | T   | L   | Q   | E   |
| Jeryl-Lynn,JL2 <sup>#</sup>  | NAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | KCS     | NSS     | T                         | I   | K   | S   | P   | E   |
| S79major <sup>#</sup>        | NAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NYS     | HCS     | NSS     | I                         | I   | T   | L   | Q   | E   |
| S79minor <sup>#</sup>        | NAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | KCS     | NSS     | T                         | I   | K   | S   | P   | E   |
| SP-A <sup>#</sup>            | NAT                                    | NCS     | NDT     | NST     | NQT     | NSG     | SCS     | NSS     | T                         | V   | T   | S   | Q   | D   |

\*为WHO参考毒株；<sup>#</sup>为MuV疫苗株或组分；<sup>a</sup>为N-糖基化位点，即N-X-S/T，X不能为脯氨酸Pro。

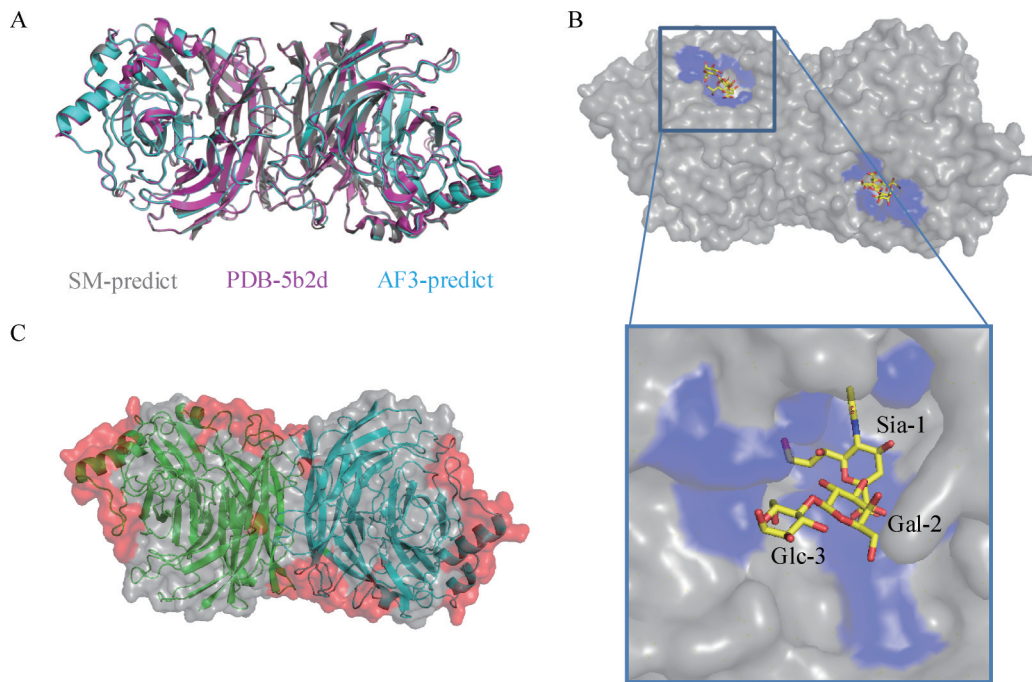
\*: WHO reference strain; <sup>#</sup>: MuV vaccine strain or component; a: Means N-glycosylation site predominantly occurs in N-X-S/T sequence where X is any amino acid other than proline.



发现二者总体相似(图 3A), 比较 HN 蛋白与  $\alpha$ -2, 3-唾液酸的结合位点, 发现 G 基因型与疫苗株的结合位点均较为保守, 说明基因型差异未导致识别抗原位点漂移, 这与预测的 HN 蛋白与  $\alpha$ -2, 3-唾液酸糖分子(3'-SL, NeuAca2, 3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc)复合物结构相一致(图 3B)。

比较 B 细胞表位发现, 各表位主要分布在

HN 蛋白的表面(除 aa 220-240), 由 B 淋巴细胞 BCR 或抗体进行识别(图 3C), 序列整体相似性较高。然而, 在中和表位中, HN 蛋白至少包括 3 个中和表位(aa 265-288、aa 329-340 和 aa 352-360), 研究表明氨基酸差异如 aa 329-340、aa 354、aa 356 可能会降低疫苗株对野毒株的交叉中和水平<sup>[8]</sup>, 且与疫苗株相比 G 基因型在



**图3 ETYY-LZH株HN蛋白结构分析。** A: HN蛋白的结构预测。ETYY-LZH株的HN蛋白结构采用SWISS-MODEL (SM)和AlphaFold3 (AF3)进行预测, 参考毒株为Hoshino株(PDB: 5b2d, 序列相似性为97.1%), 预测结构与参考毒株C $\alpha$ 的RMSD分别为0.114 Å和0.292 Å。B: HN蛋白与3'-SL的复合物结构预测。图中紫色区域为SWISS-MODEL预测结构识别3'-SL的结合表位, 具体为aa 180、407、422、512、540、561、204、242、254、323、369、476, 其中Sia为唾液酸、Gal为半乳糖、Glc为N-乙酰葡萄糖。C: HN蛋白的B细胞表位分布。图中红色区域为B细胞表位, 分别为aa 113-130 (结构中未展示)、aa 199-207、aa 220-240 (结构内部)、aa 261-266、aa 327-363、aa 375-403、aa 440-443、aa 533<sup>[9]</sup>。

**Figure 3** Structural analysis of the HN protein of ETYY-LZH strain. A: Structural prediction of HN protein. The HN protein structure of ETYY-LZH strain was predicted by SWISS-MODEL (SM) and AlphaFold3 (AF3), and the reference model was Hoshino strain (PDB:5b2d, sequence identity was 97.1%), and RMSD of C $\alpha$  were 0.114 Å and 0.292 Å, respectively. B: Structural prediction of HN protein complexed with 3'-SL. The purple area is the 3'-SL binding epitope, specifically aa 180, 407, 422, 512, 540, 561, 204, 242, 254, 323, 369, 476, where Sia is sialic acid, Gal is galactose, and Glc is N-acetylglucose. C: B cell epitopes distribution of HN protein. The red areas are B cell epitopes, which are aa 113-130 (not shown in the structure), aa 199-207, aa 220-240 (inside the structure), aa 261-266, aa 327-363, aa 375-403, aa 440-443, and aa 533<sup>[9]</sup>.

279 位和 287 位(分别为 I→T 和 I→V)发生了变异,可能会在 A 基因型和 G 基因型毒株之间产生对 CD4<sup>+</sup> T 细胞表位的识别错配,而导致重要的 T 细胞反应的丢失<sup>[9]</sup>。比较发现本研究中如上 3 个表位及可能影响中和与 T 细胞反应的关键位点, G 基因型毒株序列与疫苗株 SP-A 完全一致,差异位点与疫苗株 JL5、S79major 均不一致,与 JL2、S79minor 部分一致,可能揭示了目前广泛使用疫苗株导致病毒逃逸的部分原因。

分析 F 蛋白的氨基酸差异(表 6),与 ETTY-LZH 株相比,ETYY-HCQ 株、UK96 株、Sheffield.GBR 株、云南株氨基酸差异分别为 0.4% (2/538)、2.2% (12/538)、1.3% (7/538)、2.4% (13/538),与疫苗株 JL5、S79major 和 SP-A 株的氨基酸差异分别为 5.4% (29/538)、5.2% (28/538)和 3.0% (16/538),与 HN 相似, G 型毒株基因型内差异较小,与 A 基因型疫苗株差异较大,与 F 基因型疫苗株 SP-A 株差异较小。F 蛋白虽然有氨基酸差异,但在功能氨基酸部分,包括 N-糖基化位点、融合位点、中和表位<sup>[9]</sup>,

G 基因型与各疫苗株未出现型特异性差异,说明 G 基因型毒株在 F 蛋白功能区域较为保守。

## 2.4 疫苗株对临床分离株的血清交叉中和分析

本研究进一步探究了 A 基因型疫苗株对 G 基因型分离株(ETYY-LZH 株)及目前主要流行的 F 基因型分离株[同样分离自大连市妇女儿童医疗中心(集团)]的血清交叉中和水平。

结果显示免疫前各组 and 免疫后阴性对照组中和效价均小于 1:2,免疫后 S79 实验组 10 只小鼠对各基因型毒株的中和效价均大于 1:2,几何平均滴度(geometric mean titer, GMT)分别为对 A 基因型(疫苗株) 1:194,对 G 基因型 1:51,对 F 基因型 1:65(表 7),说明疫苗株对 G 基因型和 F 基因型均能产生良好的交叉中和反应,中和效价稍低于本基因型(A 型),与抗原关键中和表位分析较为一致。

## 3 讨论与结论

MuV 引起的腮腺炎是一种常见的、多发的

表6 ETTY-LZH株和ETYY-HCQ株与疫苗株F蛋白差异位点

Table 6 Differences in F protein between ETTY-LZH, ETTY-HCQ and vaccine strains

| Strain                       | N-glycosylation site (aa) |         |         |         |         |         | Neutralizing epitope (aa) |     |     |
|------------------------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------------------|-----|-----|
|                              | 73-75                     | 182-184 | 352-354 | 427-429 | 433-435 | 457-459 | 221                       | 323 | 373 |
| ETYY-LZH                     | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| ETYY-HCQ                     | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| UK96*                        | NNT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| Sheffield.GBR*               | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| Yunnan.CHN                   | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| Jeryl-Lynn,JL5* <sup>#</sup> | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| Jeryl-Lynn,JL2 <sup>#</sup>  | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| S79major <sup>#</sup>        | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| S79minor <sup>#</sup>        | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |
| SP-A <sup>#</sup>            | NKT                       | NMS     | NIS     | NIT     | NLT     | NAS     | I                         | N   | D   |

\*为WHO参考毒株; #为MuV疫苗株或组分。

\*: WHO reference strain; #: MuV vaccine strain or component.

表7 疫苗株对临床分离株的血清交叉中和结果

Table 7 Serum cross-neutralization results of vaccine strain against clinical isolates

| Group     | Before immunization |            |            |            | After immunization |            |            |            |
|-----------|---------------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|------------|------------|
|           | Mouse number        | Genotype A | Genotype G | Genotype F | Mouse number       | Genotype A | Genotype G | Genotype F |
| PBS group | 1                   | <2         |            |            | 1                  | <2         |            |            |
|           | 2                   |            |            |            | 2                  |            |            |            |
|           | 3                   |            |            |            | 3                  |            |            |            |
|           | 4                   |            |            |            | 4                  |            |            |            |
|           | 5                   |            |            |            | 5                  |            |            |            |
|           | 6                   |            |            |            | 6                  |            |            |            |
|           | 7                   |            |            |            | 7                  |            |            |            |
|           | 8                   |            |            |            | 8                  |            |            |            |
|           | 9                   |            |            |            | 9                  |            |            |            |
|           | 10                  |            |            |            | 10                 |            |            |            |
| S79 group | 1                   | <2         |            |            | 1                  | 107        | 89         | 89         |
|           | 2                   |            |            |            | 2                  | 214        | 74         | 89         |
|           | 3                   |            |            |            | 3                  | 295        | 45         | 79         |
|           | 4                   |            |            |            | 4                  | 295        | 40         | 64         |
|           | 5                   |            |            |            | 5                  | 178        | 89         | 89         |
|           | 6                   |            |            |            | 6                  | 148        | 40         | 50         |
|           | 7                   |            |            |            | 7                  | 256        | 45         | 74         |
|           | 8                   |            |            |            | 8                  | 295        | 40         | 64         |
|           | 9                   |            |            |            | 9                  | 214        | 100        | 100        |
|           | 10                  |            |            |            | 10                 | 89         | 16         | 16         |
| -         | -                   |            |            | GMT        | 194                | 51         | 65         |            |

儿童急性呼吸道传染病，在全球范围内广泛流行。腮腺炎是一种可预防性疾病，世界范围内最早使用的疫苗为 Jeryl-Lynn 株减毒活疫苗，我国于 1979 年引入 Jeryl-Lynn 株，在原代鸡胚细胞传代 3 次生成 S79 株<sup>[10]</sup>，于 20 世纪 90 年代开始应用，并在 2008 年将腮腺炎疫苗纳入国家扩大免疫规划，MuV 疫苗的接种大大降低了腮腺炎的发病率。目前我国把腮腺炎划分至丙类传染病，但每年仍有大量腮腺炎病例出现，腮腺炎的发病率一直居高不下。

本研究 2 个毒株分离自大连市妇女儿童医疗中心(集团)，均为腮腺发生肿大后到医院就

诊，并确诊为急性腮腺炎。流行病学调查显示 2 个病例均为散发性，未有聚集性感染。本研究对分离毒株进行基因组测定，不存在核苷酸或氨基酸的插入和缺失，整个基因组按照 3'-NP-P-M-F-SH-HN-L-5' 的顺序排列并编码 7 种病毒蛋白。通过基因型发育树分析，2 个毒株均为 G 基因型，与 G 基因型参考毒株相似性最高，与 A 基因型核苷酸差异最大。在全基因组编码的 7 个病毒蛋白基因中，SH 基因变异最大，NP、M 和 L 基因相对保守，P 基因、F 基因、HN 基因型间差异也较大，这也与它们的功能相一致，SH 基因为基因型鉴别基因，具有高变异率；M

蛋白为基质蛋白, 在病毒组装中起重要作用, NP、P 及 L 蛋白与病毒基因组共同组成 RNP, 负责病毒转录及复制过程, 因此, 它们的核苷酸和氨基酸序列相对保守, 此外 P 基因突变与 MuV 的毒力增加有关<sup>[11]</sup>, 因此型间具有差异性; HN 蛋白和 F 蛋白参与病毒入侵、介导病毒与细胞融合, 是中和作用和免疫保护的重要抗原, 型间具有显著差异。

本研究将大连分离毒株与 GenBank 数据库国内 G 基因型毒株进行比较, 发现大连毒株与江苏毒株遗传距离最小(P-distance: 0.000 0), 与 2011 年分离的辽宁毒株差异较大(P-distance: 0.034 8); 将世界范围内 G 基因型毒株进行追溯分析, 发现大连分离毒株与辽宁毒株、福建毒株属于一个分支(Lineage 1), 而云南、陕西、参考毒株 UK96 和 Sheffield.GBR 属于另一个独立分支(Lineage 2), 但从分支划分来看, MuV 毒株分支与发生时间和地域均有关联, 这给国内 G 基因型毒株的出现且范围逐渐扩大的溯源增加了更多不确定性。

比较本研究分离的 G 基因型毒株与疫苗株的 HN 蛋白和 F 蛋白差异发现, HN 蛋白少了 aa 12-14 位 N-糖基化位点, 但多了 aa 464-466 位 N-糖基化位点。有研究发现, HN 的糖基化位点和数量在不同病毒亚型间不一致, 这可能是一种免疫逃逸的策略<sup>[12]</sup>。此外, 分离株 HN 蛋白与唾液酸的识别位点和复合物空间结构均显示 G 基因型入侵宿主的作用模式未发生明显改变。然而有研究发现部分 G 基因型可能在其他功能结构域发生变异, 如 HN 蛋白 K203N 和 H205R, 由于该变异位于神经氨酸酶区域附近, 而导致病毒的致病性改变<sup>[9]</sup>。在本研究分离株中如上位点未发生突变, 未来应持续监测这些功能性位点。在 HN 蛋白中和表位中, G 基因型毒株与 A 基因型疫苗株差异较大, F 蛋白功能氨

基酸较为保守, 提示这些氨基酸位点的变异很可能会潜在地降低腮腺炎疫苗株对 MuV 野毒株的交叉保护作用。

基于分离毒株与疫苗株关键抗原的差异, 我们通过动物实验初步评估了 A 基因型疫苗株对临床分离毒株(G 基因型和 F 基因型)的血清交叉中和水平, 结果显示 S79 对临床分离株均能产生良好的交叉中和反应, 中和效价稍低于本基因型(A 型)毒株, 与抗原关键中和表位分析较为一致, 但疫苗株的交叉保护作用还需更多的临床数据进一步分析。

本研究毒株均为咽拭子在 Vero 细胞分离培养获得, 在培养第一代看到腮腺炎典型合胞体病变后进行一代测序分析, 相应结果能够真实反映临床分离毒株信息。比较发现, 相较 ETTY-LZH 株, ETTY-HCQ 株存在 4 个混合核苷酸位点(分别位于 M、F、HN 和 L 蛋白编码区), 发育树构建及关键中和表位分析显示, ETTY-HCQ 株混合位点均未改变毒株分型及关键表位。然而该混合位点的出现不确定是由于该分离株本身就是混合毒株, 或是分离培养过程中突变产生的(如疫苗株 JL 株即为混合毒株<sup>[13]</sup>)。未来还需进一步对该毒株纯化分析, 同时采用一代测序及 NGS 测序结合的方式, 确定该毒株性状。

中国疾病预防控制中心信息系统数据和腮腺炎流行病学调查数据显示, 2004-2023 年间我国流行性腮腺炎的发病趋势总体上大致分为急剧上升(2004-2012 年期间)<sup>[14]</sup>、基本平稳(2012-2018 年期间)<sup>[15]</sup>和明显下降(2020-2023 年期间)。后疫情时代的到来, 减少了居家隔离, 腮腺炎发病率又有抬头趋势, 因此需要对腮腺炎病毒进行流行病学监控。近 20 年来流行性腮腺炎病毒学监测发现, 我国流腮的流行病学特征未发生明显改变, 以 F 基因型为主要流行基因型, 但已出



现了较大的型内差异<sup>[6]</sup>。从 2011 年开始中国(未含港澳台地区)监测到 G 基因型 MuV 流行<sup>[16]</sup>, 目前已经有 9 个省(自治区、直辖市)检测到 G 基因型的流行, 并且 G 基因型 MuV 也在不断地进化和变异<sup>[5]</sup>。分子流行病学研究可以辅助流行病学调查, 通过比较相关性可以帮助判断潜在的传播风险。

本研究通过全基因组测序详细分析了大连地区 G 基因型毒株的基因型别特征, 通过识别不同分离株之间的核苷酸及氨基酸差异, 发现大连地区毒株与国内 G 基因型毒株及 WHO 参考毒株整体较为相似, 但各地区毒株间遗传距离存在差异, 这提示需进一步加强对我国现有腮腺炎流行株的监控, 对毒株溯源及传播途径开展分析, 持续积累 MuV 基因型变化的动态数据, 同时也应对流行毒株开展血清学研究, 更加系统评价现有疫苗株的免疫保护效果, 为疫苗策略制定奠定重要基础。

## 作者贡献声明

钱盈: 实验设计、数据分析及文章撰写; 景淑军: 病例搜集及数据分析; 郑国君: 病毒分离及滴定; 杨扬: 毒株测序; 弓晓杰: 研究调研和文章修改; 李中玉: 研究调研和文章修改; 李悦: 病例搜集及数据分析; 孟凡红: 动物免疫及数据分析; 宋俐霏: 研究指导及文章审阅。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 方兴, 常琳, 姚文清. 辽宁省扩大国家免疫规划前后流行性腮腺炎流行病学特征变化分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(3): 315-318.  
FANG X, CHANG L, YAO WQ. Change of epidemiological characteristics of mumps before and after implementation of the expanded program on immunization in Liaoning Province, China[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019, 32(3): 315-318 (in Chinese).
- [2] 蒋蕊鞠, 殷琼洲, 徐明珏, 赵志梅, 邓燕, 车艳春. 2004—2018 年全国流行性腮腺炎发病特征及重点防控人群分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(5): 441-444.  
JIANG RJ, YIN QZ, XU MJ, ZHAO ZM, DENG Y, CHE YC. Epidemiological characteristics of mumps in China's mainland from 2004 to 2018 and key population for prevention and control[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2019, 21(5): 441-444 (in Chinese).
- [3] WHO. Mumps virus nomenclature update: 2012[J]. Releve Epidemiologique Hebdomadaire, 2012, 87(22): 217-224.
- [4] 崔爱利. 中国腮腺炎病毒血凝素神经氨酸酶分子进化及其对疫苗保护效果影响[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心博士学位论文, 2017.  
CUI AL. Molecular evolution of hemagglutinin neuraminidase of mumps virus in China and its effect on vaccine protection[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2017 (in Chinese).
- [5] 王媛, 朱贞, 邓丽丽, 秦月, 黄芳, 陈萌, 王常银, 彭晓放, 陈海云, 马钰, 张婷, 范丽霞, 李立群, 刘李, 玛合木提江·库尔班, 徐昌平, 张燕, 毛乃颖, 许文波, 崔爱利, 王英. 2018—2019 年中国流行性腮腺炎流行特征和病毒基因特征分析[J]. 病毒学报, 2021, 37(2): 356-362.  
WANG Y, ZHU Z, DENG LL, QIN Y, HUANG F, CHEN M, WANG CY, PENG XF, CHEN HY, MA Y, ZHANG T, FAN LX, LI LQ, LIU L, Kurban Mhmtj, XU CP, ZHANG Y, MAO NY, XU WB, CUI AL, WANG Y. Analysis of the epidemiology and viral genetic characteristics of mumps in China during 2018–2019[J]. Chinese Journal of Virology, 2021, 37(2): 356-362 (in Chinese).
- [6] 崔爱利, 朱贞, 张燕, 邱琪, 毛乃颖, 许松涛, 姬奕昕, 王慧玲, 许文波. 2001—2017 年中国流行性腮腺炎病毒学监测及基因特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2018, 24(3): 249-255.  
CUI AL, ZHU Z, ZHANG Y, QIU Q, MAO NY, XU ST, JI YX, WANG HL, XU WB. Viral surveillance and genetic characteristics of mumps viruses in China during 2001–2017[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2018, 24(3): 249-255 (in Chinese).
- [7] LI M, SCHMITT PT, LI Z, McCORRY TS, HE B, SCHMITT AP. Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of virus-like particles[J]. Journal of Virology, 2009, 83(14): 7261-7272.
- [8] CUI AL, BROWN DWG, XU WB, JIN L. Genetic variation in the HN and SH genes of mumps viruses: a comparison of strains from mumps cases with and without neurological symptoms[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61791.
- [9] GOUMA S, VERMEIRE T, van GUCHT S, MARTENS L, HUTSE V, CREMER J, ROTA PA, LEROUX-ROELS G, KOOPMANS M, van BINNENDIJK R, VANDERMARLIERE E. Differences in antigenic sites

- and other functional regions between genotype A and G mumps virus surface proteins[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 13337.
- [10] 傅传喜, 聂军. S<sub>79</sub>株腮腺炎减毒活疫苗人群血清阳转研究系统评价[J]. *循证医学*, 2010, 10(1): 35-38.  
FU CX, NIE J. Systematic review on live attenuated S<sub>79</sub> mumps vaccine seroconversion studies among population[J]. *The Journal of Evidence-Based Medicine*, 2010, 10(1): 35-38 (in Chinese).
- [11] SAITO H, TAKAHASHI Y, HARATA S, TANAKA K, SANO T, SUTO T, YAMADA A, YAMAZAKI S, MORITA M. Isolation and characterization of mumps virus strains in a mumps outbreak with a high incidence of aseptic meningitis[J]. *Microbiology and Immunology*, 1996, 40(4): 271-275.
- [12] FROST JR, SHAIKH S, SEVERINI A. Exploring the mumps virus glycoproteins: a review[J]. *Viruses*, 2022, 14(6): 1335.
- [13] CHAMBERS P, RIMA BK, DUPREX WP. Molecular differences between two Jeryl Lynn mumps virus vaccine component strains, JL5 and JL2[J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90(Pt 12): 2973-2981.
- [14] FU XF, GE MJ, XU WC, YU M, JU JG, ZHONG YH, HUANG HQ. Epidemiological features and sociodemographic factors associated with mumps in China's mainland from 2004 to 2018[J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(10): 4850-4859.
- [15] 陆祖添, 苏永健, 李嘉铃, 张家玮, 赵文文, 李海. 2004-2018年我国流行性腮腺炎发病及死亡情况[J]. *广西医学*, 2022, 44(17): 2017-2025.  
LU ZT, SU YJ, LI JL, ZHANG JW, ZHAO WW, LI H. Morbidity and mortality of epidemic parotitis in China from 2004 to 2018[J]. *Guangxi Medical Journal*, 2022, 44(17): 2017-2025 (in Chinese).
- [16] 王艳, 马艳, 韩悦, 郭军巧. 辽宁省2008—2011年流行性腮腺炎野病毒SH蛋白基因特征分析[J]. *病毒学报*, 2012, 28(5): 506-510.  
WANG Y, MA Y, HAN Y, GUO JQ. SH protein genetic characterization analysis of wild-type mumps virus isolated in Liaoning Province from 2008 to 2011[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(5): 506-510 (in Chinese).