

文章编号: 1004-0374(2011)09-0921-10

合成病毒: 对流感病毒研究的贡献

孙明伟^{1,2}, 路希山^{1,3}, 高福^{1,2,3,4,5*}

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

2 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027; 3 中国农业大学动物医学院, 北京 100094;

4 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101; 5 中国疾病预防控制中心, 北京 102206)

摘要: 流感病毒是一种单股负链分节段 RNA 病毒。完全以质粒为基础的反向遗传学技术的建立和发展解决了利用 cDNA 克隆人工合成流感病毒的难题和技术障碍, 并逐渐成为研究流感病毒及生产流感疫苗的重要基础和手段。重点综述了流感病毒反向遗传技术 20 多年来的发展过程, 以及以质粒为基础的反向遗传操作系统在对流感病毒的生命周期、致病性的研究和生产疫苗等方面的巨大贡献。

关键词: 流感病毒; 反向遗传技术; 病毒拯救; 感染性克隆; 流感疫苗

中图分类号: R373; O621.3 **文献标志码:** A

The contribution of synthetic virus to the study of influenza

SUN Ming-Wei^{1,2}, LU Xi-Shan^{1,3}, GAO George Fu^{1,2,3,4,5*}

(1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 College of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; 3 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 4 Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 5 Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Influenza virus is a member of Orthomyxoviridae and contains a segmented RNA genome of negative-sense. The artificial generation of influenza viruses from cloned cDNA was long considered an insurmountable obstacle. This changed with the establishment and development of plasmid-based reverse genetics technique that has now become a fundamental part of influenza virus research and the generation of influenza vaccines. In this review, we describe the background for this advance, the systems that are available for the generation of influenza viruses, and the significant contributions for the understanding of the virus and disease during the past decades.

Key words: influenza virus; reverse genetics; rescue of virus; infectious clone; influenza vaccines

2010年5月, 美国 *Science* 杂志上的一篇文章报道了首例人造细胞的诞生: J. Craig Venter 等在体外人工合成了蕈状支原体 (*Mycoplasma mycoides*) 的基因组, 并将其转输到一个山羊支原体细胞内, 使组合后的细胞 (Synthia) 表现出前者的生命特性。这个人造基因组全长 1.08 Mb, 是目前世界上最大的人工合成的 DNA 组织; 基因组转输后的嵌合体细胞是第一个完全由化学合成基因组控制并能自我复制的人造细胞^[1]。该研究成果完成了合成生物学领域的一个里程碑式的创举, 同时也让合成生物学再一次赢得了全世界的目光。

合成生物学 (synthetic biology) 是一门建立在系统生物学、生物信息学等学科基础上, 并以基因组学技术为核心的现代生物科学^[2]。许多学者认为合成生物学成为一门真正的学科开始于 21 世纪初。但是, 早在 19 世纪人们就开始应用各种方法合成尿素、核苷酸和氨基酸等有机物了。所以, 合成生

收稿日期: 2011-08-22

基金项目: 国家自然科学基金委员会创新研究群体科学基金项目(81021003)

*通信作者: E-mail: gaof@im.ac.cn

物学发展到今天能够人工合成细胞个体,已经有将近 200 年的历史了^[3]。但如果谈到人工合成完整生命体,那么这还是从生物学家们对于病毒人工合成的探索开始的。

病毒是由核酸分子(DNA 或 RNA)与蛋白质构成的核酸-蛋白质复合体。病毒虽然具备了复制和遗传等生命活动的最基本特征,但是它们不具备细胞的形态结构,它们的主要生命活动必须借助宿主细胞才能体现,因而不是“完全”的生命体。各种病毒性疾病的恐怖和危害早已人所共知。在历史上,人类也多次遭受到病毒性疾病暴发所带来的灾难。至今,诸如麻疹病毒(measles virus)、艾滋病毒(又叫人类免疫缺陷病毒, HIV)、重症急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)以及流感病毒(influenza virus)等仍然威胁着全世界人类的生存和健康。对于不同种类病毒的研究不仅是众多病毒学家和免疫学家的主要任务,同时也是许多合成生物学研究者的关注对象和兴趣所在。由于病毒结构简单、增殖力强,并且具有自然界最小的基因组,因而如果能够实现对某些病毒的人工合成制造,不仅是合成生物学技术的突破,更对于理解该病毒的分子机制和致病机理具有重要的意义。在此基础之上,若能够对这些最小的生命体施以生物工程改造则很可能创造出能够为人类所利用的经济价值。因而,人工合成病毒一直是生物学界的一大目标与挑战。

可喜的是,随着生物工程和基因组学技术的快速发展,目前已经有一些不同种类的病毒相继在体外合成出来。其中最值得一提的是在 2002 年,纽约州立大学的 Cello 等^[4]第一次完全在无细胞环境中合成了脊髓灰质炎病毒(poliovirus)。脊髓灰质炎病毒是小核糖核酸病毒科的一员,由 Vp1、Vp2、Vp3 和 Vp4 四种核衣壳多肽各 60 个拷贝外加一条长度约 7 500 nt 的单股正链 RNA 基因组组成。研究者利用化学方法合成了与脊髓灰质炎病毒基因组 RNA 互补的 cDNA——F1、F2、F3 三段 DNA 片段,分别连接在 pUC18 或 pGEM-T Easy 质粒中,通过常规的酶切与连接,将三个片段拼接成 5' 端含有噬菌体 T7 RNA 聚合酶启动子的全长 cDNA 片段。含有病毒全长 cDNA 的载体在体外 T7 RNA 聚合酶的作用下转录成病毒的 RNA,并且在无细胞提取液中翻译和复制,最终重新装配成具有侵染能力的脊髓灰质炎病毒。虽然该人工合成病毒的毒力只相当于天然病毒的 1/1000~1/10000,但是将它注射到小

鼠体内仍然可使其脊椎麻痹而死亡。这一工作开创了以无生命的化合物完全体外合成感染性病毒的先河。之后在 2003 年,Smith 和 Venter 等^[5]又人工合成了噬菌体 ϕ X174 的基因组。该病毒基因组全长 5 386 bp,共有 11 个基因,研究者仅用了 14 d 就用化学合成的寡核苷酸拼接成了完整的噬菌体基因组。将合成的基因组 DNA 注入宿主细胞时,其侵染性与天然的 ϕ X174 噬菌体无异^[6]。2008 年,Becker 等^[7]设计合成了重组的蝙蝠体内 SARS 样冠状病毒(Bat-ScoV)基因组,该基因组中受体结合结构域(RBD)被替换为之前大流行的 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)的 RBD,从而成功感染了培养的人呼吸道上皮细胞和小鼠。这一 29.7 kb 的 RNA 序列是当时合成的最大的可以自我复制的基因组。

今日的成果并非一日之功。殊不知,如今所能实现病毒,甚至细胞的大片段基因组的体外合成几乎都得益于反向遗传学技术的发展。追溯人类合成病毒的历史,也是源自 20 世纪 80 年代对于流感病毒等的反向遗传技术的研究。事实上迄今为止,人工合成病毒的最大应用仍然要属反向遗传技术在流感病毒拯救中的贡献。

1 流感病毒反向遗传技术的建立与发展

流行性感冒病毒,简称流感病毒,包括人流感病毒和动物流感病毒。它属正黏病毒科(Orthomyxoviridae),流感病毒属,是一种有囊膜的单股负链分节段 RNA 病毒。其基因组 RNA 一般分为 8 个片段,可编码 12 种功能蛋白(PB2、PB1、PB1-F2、PB1-N40、PA、HA、NA、NP、M1、M2、NS1、NS2)。流感病毒按照病毒核蛋白和基质蛋白的不同可分为 A、B、C 三种类型。其中 A 型流感病毒(influenza A virus)最为常见,其抗原性也最容易发生变异,可导致传染性极强的呼吸系统疾病;而 B 型流感病毒对人类致病性较低;C 型流感病毒仅会引起轻微的上呼吸道感染。因而这后两种类型的流感病毒很少造成流行。我们通常所说的流感病毒主要是指 A 型流感病毒,它能够感染人类和多种动物。历史上的几次世界范围的大流行都是因 A 型流感病毒引起的,而流感在畜牧业的猪、马、家禽中的暴发则带来巨大的经济损失^[8]。

血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)是流感病毒粒子的两个表面糖蛋白。根据 HA 和 NA 的抗原性差异可将 A 型流感病毒分为各种不同的亚型。迄今为止,已经有 16 种 HA 和 9 种 NA 亚型被鉴定。

流感病毒的不同 HA 和 NA 相互组合形成新的亚型或旧亚型的重现从而引起流感(大)流行。流感病毒粒子内部是膜相关基质蛋白(M1)和另外 8 个病毒核蛋白复合体。其中每个核蛋白复合体都包括一段病毒 RNA 和病毒聚合酶亚基 PA、PB2、PB1 以及核蛋白 NP。另外, 流感病毒还编码一个干扰素拮抗物(NS1)、一个核输出蛋白(NEP, 又叫 NS2)、一个离子通道蛋白(M2)、一个具有促凋亡功能的 PB1-F2 以及一个新发现的 PB1-N40 蛋白^[9]。它们在病毒感染的早期和后期执行功能。流感病毒的各个 RNA 片段需要被核蛋白 NP 包裹, 并与 3 个聚合酶亚基(PB2、PB1、PA)结合在一起形成核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein, RNP)才具有侵染活性。病毒感染时, 病毒粒子通过 HA 与宿主细胞表面的特异性 HA 受体结合, 通过受体介导的内吞和膜融合进入细胞并释放出 RNPs。RNPs 进入细胞核后开始病毒基因组的复制和转录, 每个病毒 RNA 片段独立组成一个转录单位, 分别转录出 mRNA 和互补正链 RNA(cRNA)。mRNA 翻译合成各种病毒蛋白, cRNA 则复制生成病毒的子代 RNA。之后病毒蛋白和子代 RNA 在细胞膜上组装成完整的病毒粒子, 释放到胞外, 继而完成下一个感染周期。

早在 1978 年, 科学家就利用反向遗传操作成功地在大肠杆菌中拯救了第一例 RNA 病毒(Q β 噬菌体)^[10]。之后, 依靠感染性 cDNA 克隆技术, 狂犬病病毒、麻疹病毒、仙台病毒、新城疫病毒等负链不分段 RNA 病毒也相继被成功拯救^[11-12]。但是人工合成流感病毒却由于在技术上存在许多障碍而没有拯救成功: 首先, 流感病毒分节段的基因组有 8 个 RNA 片段(A 型和 B 型流感病毒有 8 个片段, C 型有 7 个片段), 若要人工合成流感病毒则需要提供全部的 RNA 片段; 其二, 不同于其他的 RNA 病毒, 流感病毒的复制发生在感染细胞的细胞核内, 因此要将人工设计的基因片段在细胞核内合成或是合成后运送到核内; 第三, 流感病毒基因组是负义链 RNA。也就是说, 其病毒 RNA 不具备信使 RNA 的功能, 不能作为模版直接翻译成蛋白质。而且, 感染周期的启动需要完整的病毒核衣壳, RNA 只有以核衣壳结构的方式存在才能作为病毒 RNA 聚合酶的功能模板。所以裸露的流感病毒 RNA 不具有侵染性, 只有病毒的 RNA 被病毒聚合酶复合物(PB2/PB1/PA)和核蛋白 NP 识别并复制, 否则流感病毒不会进行包装增殖。因此, 这 4 个重要功能蛋白要和流感病毒的 8 个 RNA 片段共同产生并结合;

此外, 流感病毒 RNA 不包括 5' 帽子结构和 3' 多聚腺苷酸尾巴, 因此人工合成的病毒基因片段必须有一个能够预先形成 5' 和 3' 末端而不需要细胞酶修饰的转录系统。许多年来, 正是由于这些要求的综合限制, 使得流感病毒的人工合成几乎成为了一个不可逾越的难关。

在实验室内体外合成流感病毒的探索始于 20 世纪 80 年代。由于流感病毒各个 RNA 片段必须与病毒蛋白结合在一起形成 RNPs 才有活性, 因此 RNPs 对于流感病毒的人工合成是至关重要的。1981 年, Plotch 等^[13]首次从变性的流感病毒中分离得到了有复制功能的 RNPs, 为后来合成流感病毒的反向遗传技术奠定了基础。为了获得含有人工合成 RNPs 的病毒粒子, 一种以 cDNA 转录合成病毒 RNA(vRNA)和蛋白质并结合辅助病毒为基础的操作系统逐渐发展起来。于是在 1989 年, Palese 研究组建立了一个可以向病毒基因组中导入单个人工合成病毒 RNA 的系统^[14]。他们通过体外克隆 cDNA 人工合成 vRNA, 并将其中的 NS 基因置换为氯霉素乙酰转移酶基因(CAT), 再与纯化的流感病毒聚合酶复合物(PB2、PB1、PA)及核蛋白 NP 在体外孵育, 从而得到重组的病毒 RNPs, 然后将该重组的 RNP 与辅助病毒(helper virus, 亦为流感病毒)共同转染真核细胞。在宿主细胞内, 病毒的聚合酶复合物、核蛋白 NP 及另外 7 条病毒 RNA 片段均由辅助病毒提供, 从而将合成的 RNA 重组到子代病毒粒子中。这就是历史上第一个流感病毒的反向遗传系统, 称为 RNPs 转染法。次年, 该研究组又应用此方法首次将特定位点突变引入重组的流感病毒中^[15]。然而, 这一系统仍然不能实现流感病毒的从头合成, 并且需要依赖于辅助病毒。由于在子代病毒中大多数仍然是辅助病毒, 重组病毒的筛选成为了限制环节, 因而该系统的重组效率很低。

1994 年, Neumann 等^[16]又建立了一种依赖于真核细胞 RNA 聚合酶 I(pol I)的转染系统。他们将病毒 RNA 互补的 cDNA 克隆到鼠源 pol I 启动子下游, 构建了在真核细胞内表达病毒 RNA 的转染质粒。pol I 位于细胞核内负责转录核糖体 RNA(与病毒 RNA 相似), 是所有 RNA 聚合酶中唯一不使转录的 RNA 加上 5' 帽子和 3' poly(A) 尾的聚合酶。研究表明插入到 pol I 启动子和终止子序列之间的外源 cDNA 可以被该酶转录。因此, 利用 pol I 能够转录出流感病毒的完整基因组并保证 RNA 片段正确的 5' 和 3' 末端。虽然仍然依赖于辅助病毒和

有效的筛选系统,但是这种方法却使病毒拯救摆脱了体外蛋白质的纯化和RNPs的形成。遗憾的是,研究者们没能充分挖掘pol I系统的利用潜力,因而没有得到广泛的认同和应用。1996年,Pleschka和Palese^[17]又将上述系统发展为可利用质粒载体在细胞内表达并重构RNP的方法,改用人源pol I启动子构建出能够高效转录vRNA的5质粒反向遗传系统。在其中一个质粒(pUC19载体)上克隆一段CAT报告基因,并受一个截短的人源pol I启动子和丁型肝炎病毒核酶终止子的调控;其余4个质粒(pHMG载体)分别编码流感病毒的PB1、PB2、PA和NP蛋白。将这5个质粒共转染293细胞(人肾上皮细胞系)。该系统能够自身启动病毒的转录和复制。虽然这个系统仍然不能脱离辅助病毒而包装出完整的流感病毒,但是应用该系统已经可以针对病毒的某一基因进行了研究,从而在流感病毒反向遗传系统的构建道路上迈出了重要的一步,为RNA病毒的人工合成带来了曙光。

1999年3月,Neumann和Kawaoka等^[18]合作在5质粒系统工作基础上将H1N1流感病毒A/WSN/33或A/PR/8/34的8个vRNA互补片段分别构建到8个cDNA克隆载体中,并用鼠源的pol I终止子代替丁型肝炎病毒核酶终止子。同时,又将编码流感病毒的9个重要蛋白(PB1、PB2、PA、NP、HA、NA、M1、M2和NS2)的基因分别克隆到9个真核表达载体中,如此总共17个质粒共同转染293T细胞,结果在每毫升培养上清中获得了 10^7 个以上的病毒粒子。此外,研究者也尝试将表达病毒蛋白的转染质粒减少到4个,即只转染表达3种聚合酶亚基(PB2/PB1/PA)和核蛋白NP的4种质粒,这样的共计12(8+4)质粒系统亦可达到同样的效果^[18]。虽然,十多个不同的质粒同时转染细胞曾被认为是不可可能的,但是事实上这种方法很快被证明是非常有效的。无独有偶,同年7月,Fodor和Palese等^[19]也完成了类似的工作,同样应用12质粒转染系统,只是依旧延用了丁型肝炎病毒核酶终止子来保证转录后的vRNA正确的3'末端。12质粒的反向遗传系统操作简单,不再依靠辅助病毒和筛选系统而只需构建cDNA克隆及普通的细胞转染便可成功合成具有感染性的流感病毒。该系统实现了真正意义上的流感病毒拯救,很快便广泛地应用到了流感病毒研究的各个领域。

基于质粒转染的反向遗传系统的高效运用十分依赖于细胞的转染效率,然而数量较多的质粒同时

进入细胞共表达的方式又会显著影响病毒拯救的成功率,并且在构建和转染上也会带来不便,尤其在转染效率较低的细胞中,转染质粒的数量更是成了整个系统的制约因素。因而为减少共转染质粒的数量,2000年Hoffmann和Kawaoka等^[20]在12质粒转染系统的基础上进行了改进,构建了pol I-pol II双向表达系统:将合成病毒RNA的cDNA的反义链克隆到人源pol I启动子和鼠源pol I终止子之间;将cDNA的正义链(即mRNA)克隆到人淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)pol II启动子和牛生长激素(BGH)poly(A)信号(相当于pol II终止子)之间。这样病毒的vRNA和蛋白质便共用同一模板合成,从而将转染质粒的数量减少到了8个。应用这样一个8质粒系统,研究者成功拯救了A/WSN/33(H1N1)和A/Teal/HK/W312/97(H6N1)流感病毒,在转染293T和MDCK(犬肾细胞系)细胞72h后获得了 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ 个/mL感染性病毒。之后,Hoffmann等^[21]还尝试将双向载体的pol I的启动子和终止序列位置调换,从而变成一个pol I/pol II同启动子的8质粒单向表达系统,但是其拯救效率相比双向系统要低。而且无论单向或双向的8质粒系统,由于使用同一模板合成vRNA和表达蛋白质,所以因片段缺失等造成的致死性突变将导致病毒拯救的失败^[22]。这一点在表达外源基因或突变位点较多的情况下,12质粒系统要优于8质粒系统。不过,12质粒系统和8质粒系统都是较为成熟的流感病毒反向遗传系统,也是至今为止实验室内最常采用的流感病毒拯救策略。

数量不断增长的人、禽、猪、马、犬类等的流感病毒分离株几乎涵盖A型流感病毒的全部亚型,而这些毒株都普遍适用pol I系统(8质粒或12质粒)进行病毒拯救。在多方学者的协力探索下,流感病毒的反向遗传系统也在不断发生着改进和完善。为了使该系统更加有效地应用于病毒致病机理的研究和疫苗的研制,考虑到即使8个质粒的构建和转染仍然不够简洁,2005年,Neumann及Kawaoka等^[23]又将用于合成8个vRNA的pol I转录单元或用于合成mRNA的pol II转录单元分别构建到一个质粒上,即一个质粒转录病毒所有的vRNA(也可将转录HA和NA的vRNA的片段单独构建为一个质粒),一个质粒表达聚合酶亚基PB1/PB2/PA,一个质粒表达NP蛋白。这样一个3质粒或4质粒系统共转染Vero(非洲绿猴肾细胞系)细胞获得了大量增殖的病毒。这种方法解决了在有限的哺乳动物细胞系

(如 MDCK、Vero) 中质粒转染效率低的限制, 进一步提高了转染效率和病毒拯救滴度, 也为疫苗的更新提供了更为便捷的工具。另外, 值得一提的是, 当研究者只将转录流感病毒 8 个 vRNA 的单个质粒转染 293T 细胞, 也令人惊奇地获得了较高的重组病毒滴度 ($6.3 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^7$ 个/mL)。这一出乎意料的结果, 为研究者对病毒 RNA 片段的人工整合操作提供了重要启示。单质粒的反向遗传系统也是将来病毒合成与拯救技术发展的必然趋势。

很快, RNA 病毒反向遗传系统也陆续在 B 型和 C 型流感病毒的研究中建立起来^[24-26]。在 2006 年, 依赖噬菌体 T7 RNA 聚合酶的流感病毒拯救也取得了成功^[27]。该方法曾广泛用于在感染细胞的细胞质中复制的负链 RNA 病毒的合成。将流感病毒的 cDNA 片段插入到 T7 RNA 聚合酶启动子和终止子 (及丁型肝炎核酶序列) 之间; 而由一个共转染的蛋白质表达质粒提供 T7 RNA 聚合酶。作用于细胞核内的 T7 RNA 聚合酶用于流感病毒的合成显示出更高的效率, 适用于多种细胞系为基础的流感病毒理论研究和疫苗开发。

2 反向遗传学与流感病毒研究

经典遗传学源于 19 世纪孟德尔的豌豆试验, 它通过研究生物的表型、性状来推测其遗传物质组成、分布与传递规律等, 从而研究生命过程的发生与发展规律。而与经典遗传学的从性状表型到基因特征的研究思路相反, 反向遗传学 (reverse genetics) 则是在已知生物体全部基因组序列的基础上, 通过现代生物技术手段, 对特定核苷酸序列进行突变、基因插入和缺失、基因置换等加工和修饰, 构建含生物体必要元件的重组或修饰基因组, 让其装配出具有生命活性的个体, 从而研究生物体基因组的结构与功能, 以及人工修饰和改造对生物性状的影响等。而 RNA 病毒的反向遗传操作技术正是在了解病毒基因组及复制特点等的基础上, 在病毒 cDNA 水平上进行体外人工操作, 构建感染性分子克隆, 并在满足病毒正常复制和包装的必要系统下完成病毒的人工从头合成的。这种病毒的反向遗传操作作为合成生物学技术手段之一, 实现了病毒的“复活”, 因而也被称作病毒拯救 (rescue of virus)。

通过反向遗传技术, 从 cDNA 克隆拯救出具有侵袭性的负链 RNA 病毒是 20 世纪分子病毒学领域最振奋人心的突破之一, 它揭开了对病毒基因组进行人工操作和详细了解病毒结构及其致病机制的历

史篇章。而在刚刚步入的 21 世纪, 反向遗传技术的最显著应用便是成功拯救了已经绝迹的 1918 年西班牙流感病毒。

人类历史上最具毁灭性的流感大暴发发生在 1918 至 1919 年间, 当时全球 17 亿人中有约 10 亿人感染。普通流感病毒的致死率仅为 0.1%, 而这种亚型的流感病毒致死率却高达 2.5%~5%, 造成全世界 2 000 万~5 000 万人死亡^[28]。由于当时西班牙最先报道了此病并约有 800 万人感染, 因而也被称作“西班牙流感”。这种病在当时几乎没有感染性病原体被分离, 使得以后的研究人员一直无法解开这种病毒的致命之谜。然而, 直到 2001 年, Taubenberger 等陆续从福尔马林和石蜡保存的“西班牙流感”患者遗体组织, 以及一个埋藏在阿拉斯加永久冻土下的一个患病女死者遗体中分离出了流感病毒的全部 RNA 片段^[29-35]。他们首先通过 RT-PCR 扩增出了西班牙流感病毒 NS 基因片段 (编码非结构蛋白 NS1), 并用反向遗传学方法与 A/WSN/33 (H1N1) 或 A/PR/8/34(H1N1) 等鼠适应性流感病毒株重组。重组后的病毒感染 MDCK 细胞情况良好, 但是在小鼠体内没有发挥 NS 蛋白的干扰素抑制作用。这表明 NS 基因可能对 1918 流感病毒的高致病性不具决定影响^[31]。该小组之后的一些研究表明 1918 流感病毒的 HA 和 NA 基因对于该病毒的致病力具有至关重要的作用^[36-37]。单就 1918 流感病毒的 HA 基因来说, 拥有该基因的重组病毒的致病性会显著增加^[38], 从而证明了流感病毒表面糖蛋白在病毒病原性及侵染宿主过程中的关键作用。

病毒学家们对于“复活”1918 西班牙流感病毒的愿望, 经过多年的探索和努力, 终于在 2005 年得以彻底实现。Tumpey 和 Taubenberger 等^[39]用反向遗传技术从 1918 流感病毒的 8 个基因片段重新合成了完整的病毒粒子。研究发现, 与现在流行的 H1N1 人流感病毒相比, 人工拯救的 1918 流感病毒在小鼠和鸡胚中表现出高度的致死性^[39-40], 在非人灵长类感染试验中也同样证实了这一点^[41]。另外, 1918 流感病毒与 H5N1 禽流感病毒不同, 它可以在人群中广泛地传播。Kobasa 等^[41]在之后的研究中发现, 在合成的 1918 流感病毒感染灵长类动物后, 宿主表现出抗病毒免疫反应失调及免疫保护不足等现象, 表明该病毒有调节宿主免疫反应的特性, 感染者非典型的固有免疫反应可能是 1918 大流感高致死性的原因之一。

提到 H5N1 禽流感病毒的研究, 基于反向遗传

技术的病毒合成方法同样功不可没。自1996年以来,高致病性H5N1亚型的禽流感病毒对东南亚的家禽种群造成了近乎毁灭性的疫情,给受影响的国家造成了巨大的经济损失。然而与此同时,H5N1亚型流感病毒对人类的真正威胁在于这种病毒一旦感染人将会造成致死率超过50%的呼吸系统疾病^[42-44]。1997年,香港发生了H5N1流感病毒感染人事件后不久,美国、荷兰和英国的3个实验室分别独立从死者的分泌物中分离到H5N1亚型的流感病毒(A/HongKong/156/97)^[45]。根据该亚型的病毒在小鼠中致病性,将分离毒株分为高致病性[代表株A/HongKong/483/97(HK483)]和低致病性[代表株A/HongKong/486/97(HK486)]两个毒力组^[46-47]。两种类型的毒株也都被应用反向遗传方法重新合成出来。研究者以HK483为骨架,用HK486的8个基因中的任意一个基因置换入HK483;或反过来以HK486为骨架,以HK483的基因依次进行置换,构建一系列的基因重组病毒粒子,并用重组病毒感染小鼠发现:HK486中的PB2基因被HK483的置换后,可对小鼠形成高致病性;反之,则病毒毒力下降^[48]。也就是说,在HA具有多碱性氨基酸裂解序列的前提下,PB2蛋白的627位氨基酸的改变(谷氨酸Glu→赖氨酸Lys)可以使H5N1流感病毒对小鼠的毒力产生从弱到强的变化。这些结果从分子水平上揭示了1997香港流感的致病机制。如此,应用反向遗传8质粒系统对毒株之间单个基因片段的相互置换揭示了PB2基因在H5N1流感病毒在哺乳动物致病性中的关键作用。还有一些反向遗传学研究进一步证明流感病毒聚合酶复合体在病毒致病性中的作用。例如,动物模型试验证明,聚合酶基因负责H5N1禽流感病毒在人群中的致病性^[49];PB2蛋白的第701位氨基酸由天冬氨酸突变为天冬酰胺即可使H5N1病毒的毒力显著提高,而反向突变则使病毒在小鼠中的毒力减弱^[50]。另外,反向遗传学研究还发现了NS1等病毒蛋白在H5N1病毒致病性中的作用。NS1蛋白是干扰素拮抗物,在抑制宿主细胞的干扰素反应并保证正常病毒包装中发挥重要的作用^[51]。H5N1禽流感病毒的NS1蛋白的92位是一个谷氨酸(Glu),而其他亚型的流感病毒在这一位点上几乎都是天冬氨酸(Asp)。也正是92位的Glu赋予了NS1蛋白对干扰素(IFN)和肿瘤坏死因子(TNF- α)等抗病毒分子强烈的抑制作用。在将重组了H5N1的NS基因的H1N1流感病毒感染猪时,出现了比野生H1N1流感更强且更长时间的病毒血

症、发热以及体重减轻现象^[52],从而部分解释了H5N1流感病毒在人群中的高致病力机制。

流感病毒的细胞受体识别是由病毒表面的糖蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)介导的。不同流感病毒亚型的受体特异性以及宿主细胞上受体分布的差异也导致了病毒间宿主范围的不同。比如,人流感病毒与禽流感病毒识别的受体就有所差别:人流感病毒(如H1N1亚型)主要识别并结合的受体是末端为唾液酸 α 2,6连接半乳糖的唾液酸寡糖(SA α 2,6Gal),主要存在于人的上呼吸道中;禽流感病毒几乎都识别并结合末端为唾液酸 α 2,3连接半乳糖的唾液酸寡糖(SA α 2,3Gal),主要存在于水禽的呼吸道及消化道中^[8, 53-56]。因此,病毒宿主的种属特异性使得H5N1高致病禽流感病毒在人与人之间的传播能力有限,这也是它不会在人群造成流感大流行的原因之一。事实上,HA介导的流感病毒受体识别是由HA蛋白上的关键位点的氨基酸差异决定的^[57]。2006年,Kawaoka等^[58]的一项反向遗传学研究发现,在HA蛋白中两个独立位点的突变(Asn182→Lys和Gln192→Arg)分别都可使H5N1禽流感病毒转为识别人类类型受体(SA α 2,6Gal)。此外,研究者采用反向遗传技术结合X射线晶体学分析的方法更好地揭示了流感病毒受体识别特异性及宿主致病性的奥秘。SA α 2,3Gal类禽流感受体存在于人类下呼吸道上皮细胞、肺泡和肺巨噬细胞上^[59-60]。因此,H5N1等禽流感病毒感染只有达到一定的量后才能深入这些部位。类似的进展也发生在1918流感病毒的研究中,Tumpey等^[61]也发现在改变了1918 H1N1流感病毒的HA蛋白上的两个氨基酸(Asp225→Gly, Asp190→Glu)之后,导致了病毒识别人类类型受体的能力增强。突变后的病毒其受体结合的偏好性从SA α 2,6Gal改变成了SA α 2,3Gal。这些位点的突变让流感病毒的组织感染范围由上呼吸道扩大到也能感染下呼吸道,同时仍可保持其在上呼吸道的杀伤力和复制效率。这些成果使人们对流感病毒感染特性的认识又推进了一步。

神经氨酸酶(neuraminidase, NA)是分布于流感病毒囊膜表面的另一种糖蛋白,它具有抗原性,可以催化唾液酸水解,因而又称唾液酸酶。与在感染初期行使功能的HA蛋白相反,NA蛋白主要负责在病毒感染末期移去细胞受体末端与HA结合的唾液酸,协助成熟流感病毒脱离宿主细胞并释放和迁移^[62]。所以,NA能防止病毒的聚集,

在流感病毒的感染周期中同样扮演了十分重要的角色。NA 的催化中心位于 NA 头部的唾液酸结合位点。目前, 一些神经氨酸酶抑制型药物如扎那米韦 (zanamivir)、奥塞米韦 (oseltamivir) 等, 就是根据 NA 及其底物的结构特点而设计合成的底物类似物, 通过竞争性结合病毒 NA 保守的唾液酸结合位点, 抑制 NA 的正常功能, 发挥抗病毒疗效的^[63]。2004 年, 加拿大的研究人员利用反向遗传系统分别将 H1N1 亚型的流感病毒 NA 蛋白的两个氨基酸位点突变 (His274 → Tyr, Glu119 → Gln), 拯救出两株该亚型病毒的 NA 突变株。但同时, Arg292 → Lys 和 Glu119 → Gly/Val/Ala/Asp 的突变导致病毒不能正常合成。空斑抑制试验及 NA 抑制试验表明, 与野生型病毒相比, His274Tyr 突变株对 oseltamivir 的抵抗力明显增强, 但对 zanamivir 仍然较敏感。而 Glu119Gln 突变株只在 NA 抑制试验中低水平抵抗两种抑制剂^[64]。之后又发现 N1 蛋白 Glu227Asp 突变能使流感病毒有效抵抗 zanamivir 的抑制作用^[65]。在对 H3N2 亚型流感病毒 (A/Wuhan/359/95) 引入 N2 蛋白 Glu276Asp 突变后, 也会降低拯救出的病毒对 oseltamivir 和 zanamivir 的敏感性^[66]。最新研究还发现, 研究者利用反向遗传方法将一株具有少许飞沫传播能力的猪流感病毒 sw915(H1N2) 的 NA 基因替换为 2009 年大流行的甲型 H1N1 流感病毒的 NA 基因后, 虽然没有增加病毒的复制效率, 但是却显著地提高了其通过呼吸道飞沫传播的能力。研究者得出结论, 2009 甲型 H1N1 流感病毒的 NA 酶活性明显高于其他猪流感病毒, 且表面糖蛋白 HA 和 NA 之间微妙的平衡可使流感病毒具备在人与人经飞沫传播的能力^[67]。以上这些具有重要意义的研究进展都昭示着反向遗传技术在流感病毒研究中的能力与贡献。

另一方面, 在控制流感病毒的流行和暴发中, 免疫疫苗的接种一直是最行之有效的预防措施。反向遗传技术的应用在病毒疫苗的开发和改进中也同样是不可或缺的一部分。灭活病毒及减毒活疫苗都已发展为流感疫苗的主要类型。每年, 世界卫生组织 (WHO) 都会筛选出流感病毒在人群中流行的代表株, 用以生产流感疫苗。而反向遗传技术的问世和发展为生产合适的病毒疫苗提供了条件与思路。目前, 流感灭活疫苗通常的研制原理是在另外 6 条病毒基因不变的情况下, 将最近流行毒株的 HA 与 NA 基因与之重组并在鸡胚中生长。重组病毒纯化后, 经过甲醛或丙内酯处理形成全病毒制剂, 或经

过乙醇或去垢剂处理而形成裂解疫苗, 通过皮下或肌肉注射刺激机体产生中和抗体。反向遗传学方法在疫苗的生产中体现出许多优势。首先, 与传统疫苗株筛选方法相比, 这种方法直接而合理。对于某些获准的疫苗生产, 要从大量具有不相关基因的重组病毒中筛选出所要的疫苗株, 其过程会十分繁琐。而反向遗传学可以从人工设计的质粒中合成流感病毒, 正是解决这一问题的理想工具。其二, 反向遗传学使疫苗株的生产不再局限于鸡胚繁殖。以细胞系培养为基础的流感疫苗正在迅速发展。与前者相比, 该系统可控性更强且生产周期短。而且一些如 H5N1 等的高致病性禽流感疫苗在传代中可能会杀死鸡胚, 造成有限的病毒增殖。细胞系疫苗生产恰好弥补了这一点。已有一些研究显示, 在 MDCK 和 Vero 等细胞系中生产的流感疫苗, 其纯度和免疫原性亦不亚于鸡胚生产的疫苗^[68-71]。另外, 基于细胞系的疫苗生产还可以消除那些非细胞系分离毒株可能带来的污染或者其他病原体。其三, 通过对质粒进行人工操作, 可以改造 HA、NA 和其他影响病毒毒力的基因, 降低了疫苗生产者的安全风险及生产成本; 去除致病因子及免疫干扰因素, 帮助疫苗株更有效地产生中和抗体。

3 结语

反向遗传学操作从 20 世纪 80 年代创始到现在 20 多年的时间内经历了不断改进而趋于完善的过程, 为流感病毒等的研究提供了更为方便快捷的手段和工具。反向遗传操作也作为合成生物学技术手段的一种, 让从基因到表型的研究设计思路成为了现实并应用于实际。反向遗传技术的产生和发展极大地推动了研究者对流感病毒的认识和研究, 使流感病毒的生命周期、组织嗜性、致病机理、宿主特异性及疫苗研制等方面研究都取得了突破性进展^[22]。这些进展与认识将在未来预测新生突发流感病毒的流行性和致病性中发挥重要的作用。而且, 反向遗传技术已经不仅仅局限于应用在流感疫苗生产以及流感大流行预测中, 它同样在其他类型的病毒研究中大显身手。可以说, 没有反向遗传学技术也不会有今天的这些成果。但在另一方面, 随着反向遗传技术和生物合成技术的日渐发展, 以及对病毒等微生物从基因到结构认识的不断积累, 在不久的将来人们很可能掌握人工制造高致病性病原微生物的能力。这些危险的产物倘若从实验室中无意或有意地流出, 后果将不堪设想。因而,

有关生物安全及生物防护等的评估和监管措施也是十分必要的, 这些也都需要同生物技术的发展相辅并行。尽管如此, 生物合成技术的发展和给科学及社会所能带来的裨益人所共见。在合理的监督和周密的设计下, 我们期待合成病毒能在能源、环境、公共健康领域为人类做出更大的贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987):52-6
- [2] 孙明伟, 李寅, 高福. 从人类基因组到人造生命: 克雷格·文特尔领跑生命科学. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 697-706
- [3] 孙明伟, 王勇, 高福, 等. 合成生物学研究[M]. 中国生物产业发展报告. 北京: 化学工业出版社, 2010: 31-40
- [4] Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002, 297(5583): 1016-8
- [5] Smith HO, Hutchison CA, 3rd, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15440-5
- [6] Pennisi E. Molecular biology. Venter cooks up a synthetic genome in record time. *Science*, 2003, 302(5649): 1307
- [7] Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19944-9
- [8] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 2009, 459(7249): 931-9
- [9] Wise HM, Foeglein A, Sun J, et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 2009, 83(16): 8021-31
- [10] Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. A Q β DNA-containing hybrid plasmid giving rise to Q β phage formation in the bacterial host [proceedings]. *Ann Microbiol (Paris)*, 1978, 129 B(4): 535-6
- [11] Nagai Y, Kato A. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol Immunol*, 1999, 43(7): 613-24
- [12] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*, 1994, 13(18): 4195-203
- [13] Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, et al. A unique cap(M7gpppxm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral-RNA transcription. *Cell*, 1981, 23(3): 847-58
- [14] Luytjes W, Krystal M, Enami M, et al. Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza-virus. *Cell*, 1989, 59(6): 1107-13
- [15] Enami M, Luytjes W, Krystal M, et al. introduction of site-specific mutations into the genome of influenza-virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(10): 3802-5
- [16] Neumann G, Zobel A, Hobom G. RNA-polymerase I-mediated expression of influenza viral-RNA molecules. *Virology*, 1994, 202(1): 477-9
- [17] Pleschka S, Jaskunas SR, Engelhardt OG, et al. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. *J Virol*, 1996, 70(6): 4188-92
- [18] Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 9345-50
- [19] Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*, 1999, 73(11): 9679-82
- [20] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 6108-13
- [21] Hoffmann E, Webster RG. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 12): 2843-7
- [22] 校海霞, 严景华, 王贵华, 等. 禽流感研究进展: 迁徙鸟的作用与反向遗传技术的贡献. *前沿科学*, 2007, 1(1): 62-73
- [23] Neumann G, Fujii K, Kino Y, et al. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(46): 16825-9
- [24] Jackson D, Cadman A, Zurcher T, et al. A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA. *J Virol*, 2002, 76(22): 11744-7
- [25] Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 1): 1-17
- [26] Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S. Rescue of influenza C virus from recombinant DNA. *J Virol*, 2007, 81(20): 11282-9
- [27] de Wit E, Spronken MI, Vervaeke G, et al. A reverse-genetics system for influenza A virus using T7 RNA polymerase. *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 4): 1281-7
- [28] Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 «Spanish» influenza pandemic. *Bull Hist Med*, 2002, 76(1): 105-15
- [29] Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, et al. Origin and evolution of the 1918 «Spanish» influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1651-6
- [30] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, et al. Characterization of the 1918 «Spanish» influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6785-90
- [31] Basler CF, Reid AH, Dybing JK, et al. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 2001, 98(5): 2746-51
- [32] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, et al. Characterization of the 1918 «Spanish» influenza virus matrix gene segment. *J Virol*, 2002, 76(21): 10717-23
- [33] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, et al. Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene. *J Virol*, 2004, 78(22): 12462-70
- [34] Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(11): 909-14
- [35] Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 2005, 437(7060): 889-93
- [36] Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, et al. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 3166-71
- [37] Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, et al. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol*, 2005, 79(23): 14933-44
- [38] Kobasa D, Takada A, Shinya K, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 2004, 431(7009): 703-7
- [39] Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 2005, 310(5745): 77-80
- [40] Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature*, 2006, 443(7111): 578-81
- [41] Kobasa D, Jones SM, Shinya K, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature*, 2007, 445(7125): 319-23
- [42] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279(5349): 393-6
- [43] Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 1998, 351(9101): 472-7
- [44] Claas EC, de Jong JC, van Beek R, et al. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. *Vaccine*, 1998, 16(9-10): 977-8
- [45] 宋晓晖, 胡旭东, 马素芳, 等. 动物源性流感病毒与人流感流行. *科技导报*, 2009, 27(9): 19-24
- [46] Gao P, Watanabe S, Ito T, et al. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol*, 1999, 73(4): 3184-9
- [47] Lu X, Tumpey TM, Morken T, et al. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. *J Virol*, 1999, 73(7): 5903-11
- [48] Hatta M, Gao P, Halfmann P, et al. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, 293(5536): 1840-2
- [49] Salomon R, Franks J, Govorkova EA, et al. The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med*, 2006, 203(3): 689-97
- [50] Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol*, 2005, 79(18): 12058-64
- [51] Krug RM, Yuan WM, Noah DL, et al. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*, 2003, 309(2): 181-9
- [52] Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med*, 2002, 8(9): 950-4
- [53] Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*, 1993, 29(2): 155-65
- [54] Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 2000, 74(18): 8502-12
- [55] Zambon MC. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol*, 2001, 11(4): 227-41
- [56] Thomas JK, Noppenberger J. Avian influenza: a review. *Am J Health Syst Pharm*, 2007, 64(2): 149-65
- [57] Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, et al. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*, 1983, 304(5921): 76-8
- [58] Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 2006, 444(7117): 378-82
- [59] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, 2006, 440(7083): 435-6
- [60] van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Science*, 2006, 312(5772): 399
- [61] Tumpey TM, Maines TR, Van Hoven N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science*, 2007, 315(5812): 655-9
- [62] von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(12): 967-74
- [63] 李青, 冯恩光, 柳红, 等. 基于结构的抗流感病毒神经氨酸酶抑制剂的设计和研发. *生物产业技术*, 2010, (6): 42-8
- [64] Abed Y, Goyette N, Boivin G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir Ther*, 2004, 9(4): 577-81
- [65] Hurt AC, Ho HT, Mosse J, et al. Neuraminidase inhibitor

- drug susceptibility differs between influenza N1 and N2 neuraminidase following mutagenesis of two conserved residues. *Antiviral Res*, 2007, 76(3): 263-6
- [66] Yen HL, Hoffmann E, Taylor G, et al. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol*, 2006, 80(17): 8787-95
- [67] Yen HL, Liang CH, Wu CY, et al. Hemagglutinin-neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(34): 14264-9
- [68] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, et al. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*, 1998, 16(9-10): 960-8
- [69] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, et al. Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. *Dev Biol Stand*, 1999, 98: 101-10; discussion 111
- [70] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, et al. A novel mammalian cell (Vero) derived influenza virus vaccine: development, characterization and industrial scale production. *Wien Klin Wochenschr*, 1999, 111(5): 207-14
- [71] Bruhl P, Kerschbaum A, Kistner O, et al. Humoral and cell-mediated immunity to vero cell-derived influenza vaccine. *Vaccine*, 2000, 19(9-10): 1149-58