

[文章编号] 1000-8861(2006)05-0519-05

采用反向遗传学技术构建 H5 亚型禽流感疫苗株

童俊容¹, 刘明², 刘春志², 童光志², 陈政良¹ (1. 南方医科大学免疫学教研室, 广州 510515; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 畜生物生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的 构建重组 H5 亚型禽流感疫苗株。方法 采用 RT-PCR 技术, 分别扩增鹅源高产禽流感病毒 A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2) 的 6 条内部基因片段、高致病性禽流感病毒株 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) 的血凝素 (HA) 基因和 N3 亚型参考株 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 的神经氨酸酶 (NA) 基因, 并对 HA1 和 HA2 连接肽处的 5 个碱性氨基酸 (R-R-R-K-K) 的编码序列进行缺失与修饰, 然后分别构建这 8 个基因的转录与表达载体, 将其共转染 293T/MDCK 混合培养细胞单层, 对拯救出的重组病毒进行表型分析。结果 利用反向遗传学技术拯救出了全部基因都源于禽流感病毒的疫苗株, 其基因序列符合设计要求包括删除 HA 基因的毒力相关序列, 疫苗株的表型为 H5N3。结论 构建成功重组禽流感疫苗株 rH5N3, 为制备 H5 亚型禽流感疫苗打下了坚实的基础。

[关键词] 禽流感病毒; 反向遗传学; 疫苗株

[中图分类号] Q78 **[文献标识码]** A

Generation of avian influenza vaccine strain of subtype H5 by reverse genetics

TONG Jun-rong, LIU Ming, LIU Chun-zhi, TONG Guang-zhi, CHEN Zheng-liang (Department of Immunology, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

[Abstract] **Objective** To generate the recombinant avian influenza vaccine strain of subtype H5. **Methods** The six internal genes of the high yield influenza virus A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2), the hemagglutinin (HA) gene of A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) strain, and the neuraminidase gene from A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) reference strain were amplified by RT-PCR technique. The nucleotides encoding five basic amino acids (RRRKK) at the connecting peptide between HA1 and HA2 were deleted or modified. Eight recombinant expressing plasmids were constructed and the recombinant virus was reassorted by cells transfection, and its phenotype was analyzed. **Results** By using plasmid-based reverse genetics, a recombinant vaccine strain, whose all gene segments derived from avian influenza viruses with the virulence associated sequence of the HA gene removed, was generated. The phenotype of the vaccine strain was H5N3. **Conclusion** The recombinant avian influenza vaccine strain rH5N3 is generated successfully, which lays the foundation for developing the avian influenza vaccine to prevent and control the infection of avian influenza virus of H5N1 subtype.

[Key words] Avian influenza virus; Reverse genetics; Vaccine strain

高致病性 A 型禽流感 (highly pathogenic avian influenza A, HPAI) 是由正黏病毒科 A 型流感病毒中的 H5 或 H7 亚型引起的禽类急性、高度接触性烈性传染病。2003 年末到 2004 年初, 亚洲 8 个国家暴发了家禽感染 H5N1 型禽流感疫情^[1]。期间, 发生疫情的国家中有 1 亿多只家禽死于禽流感或被扑杀。自 2004 - 06 月底以来, 柬埔寨、中国、印度尼西亚、哈萨克斯坦、马来西亚、蒙古、俄罗斯、泰国和越南家禽又暴发了 H5N1 亚型 HPAI 新疫情, 土耳其和罗马尼亚的家禽及克罗地亚的野生候鸟中也出现 H5N1 型禽流感感染。迄今, H5N1 亚型禽流感疫情已在欧

洲大陆十几个国家出现, 且蔓延到了非洲^[2,3]。WHO 证实, 从 2003 - 2006 - 02, H5N1 亚型禽流感病毒至少造成 169 人感染, 91 人死亡。其中, 中国发生 12 人感染, 8 人死亡。因此, H5N1 亚型 HPAI 不仅给养殖业造成巨大经济损失, 也对人类健康带来严重威胁^[4]。

HPAI 病毒是有包膜的单股负链 RNA 病毒, 其包膜表面的血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 是其主要免疫原性物质。HA 在病毒入侵宿主细胞的过程中起重要作用, 而其 2 个片段 HA1 和 HA2 连接处的氨基酸组成决定病毒的致病性和组织嗜性^[5]。HA 也是诱导体液免疫的主要保护性抗原, 抗 HA 抗体能抑制病毒的血凝活性并能中和病毒, 是病毒诱导机体产生的主要保护性抗体。因 HA 基因突变而引起的 HA 抗原变异往

[收稿日期] 2006 - 06 - 25; [修回日期] 2006 - 07 - 13

[作者简介] 童俊容 (1963 -), 男, 湖北蕲春市人, 主治医师, 博士生, 主要从事天然免疫研究。(Tel) 020-36653565; (E-mail) tjrong@126.com

往会导致免疫失败和变异毒株流行。

全群扑杀和生物安全防护是及时扑灭和控制 HPAI 的主要措施,而疫苗接种可能是防止 HPAI 疫情大范围流行的最有效和经济的方法。采用传统方法构建 H5 亚型禽流感疫苗株非常困难,而流感病毒反向遗传学操作为禽流感疫苗的研制提供了新的技术手段^[6]。1999 年 Neumann 等^[7]首次建立了由 17 个质粒拯救流感病毒的反向遗传学操作技术,2002 年 Hoffmann 等^[8]报道采用该技术构建人流感疫苗株,2003 年 Liu 等^[9]采用人流感病毒高产株 PR8 为骨架成功地构建 H5 亚型禽流感疫苗株。本研究通过 RT-PCR 克隆了 H9 亚型禽源高产毒株的 6 个内部基因和 H5 亚型 HPAI 毒株 HA 基因及 N3 亚型参考株 NA 基因,采用反向遗传学技术构建了全部基因都来自禽源流感病毒的重组疫苗株。

1 材料与方法

1.1 主要材料 HPAI 毒株 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) 和 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1)、高产禽流感株 A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2) 及禽流感参考株 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 由哈尔滨兽医研究所保存。用于 cDNA 克隆的双向转录/表达载体 pHW2000^[10]由美国 St. Jude 儿童医院的 Webster 教授惠赠。DH5 大肠杆菌感受态细胞购自大连宝生

物工程公司,293T 和 MDCK 细胞购自北京博大泰克公司。病毒 RNA 提取试剂盒 TRIzol、cDNA 合成试剂盒、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶及 dNTP 购自大连宝生物工程公司。质粒抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。OPTI-MEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,TPCK-trypsin 和 DEPC 购自 Sigma 公司。鸡抗 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1)、A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1)、A/Goose/Dalian/3/01 (H9N2) 和 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 的抗血清均由哈尔滨兽医研究所制备。9~11 d 龄无特定病原体 (specific-pathogen-free, SPF) 鸡胚由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供,无禽流感病毒母源抗体。鸡红细胞采自隔离饲养的健康成年公鸡,用生理盐水洗涤 3 次后,用阿氏液配成 5 mL/L 悬液。

1.2 引物设计与合成 参照已知序列设计禽流感病毒反转录通用引物 Uni-12:5'-AGCAAAAGCAGG-3';根据流感病毒基因片段末端保守特性,分别合成流感病毒内部基因 NP、M、NS 和 NA 基因的 RT-PCR 扩增引物,引物序列参照 Hoffmann 等^[11]报道,其中 PB2、PB1、PA 基因以及 HA 基因扩增引物进行了重新设计,各引物序列见表 1。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

表 1 禽流感病毒聚合酶基因和 HA 基因引物序列

Tab 1 Primers sequences for three polymerase and HA genes of influenza virus

Designation of primers	Primer sequences	Fragments
Ba-PB2-1	5'-TATT <u>GGG</u> CTCA GGGAGCGAAA GCAAGGTC-3	PB2-I
Ba-PB2-1089R	5'-ATAT <u>GGG</u> CTCTA TCTTCAATGTTTGGAGGTF-3	
Ba-PB2-1084	5'-TATT <u>GGG</u> CTCAA GATAAAA GTACATGAA GGA F-3	PB2-II
Ba-PB2-2341R	5'-ATA <u>GGG</u> CTCGTATTA GTA GAAACAA GGCCTGTF-3	
Aa-PB1-1	5'-TATTCACCTGCCTCA GGGAGCGAAA GCA GCGAAACCATTTG-3	PB1-I
Aa-PB1-1266R	5'-ATATCACCTGCCATR TTAACATGCCCATCATCA F-3	
Aa-PB1-1255	5'-TATTCACCTGCATGTTAA YATGCTAA GTACGGTC-3	PB1-II
Aa-PB1-2341R	5'-ATA TCACCTGCCTCGTATTA GTA GAAACAA GGCATTF-3	
Bn-PA-1	5'-TATTC <u>GGG</u> CTCA GGGAGCGAAA GCAAGGTC-3	PA-I
PA-607R	5'-CGGACTGACGAAA GGARTCC-3	
PA-587	5'-GGGAYTCTTTTCGTCAGTCGG-3	PA-II
Bn-PA-2233R	5'-ATA <u>GGG</u> CTCGTATTA GTA GAAACAA GGTACTF-3	
Bn-HA-1	5'-TATTC <u>GGG</u> CTCA GGGAGCGAAA GCAAGGG-3	HA1
Bn-H5-1025R2	5'-ATTAC <u>GGG</u> CTCTCTCTTGTCTCTTTGA GGGGATTTCTGAGF-3	
Bn-H5-1020	5'-ATTAC <u>GGG</u> CTCA GAGGACTATTTGGA GCTATAGCA GG-3	HA2
Bn-NS-890R	5'-ATA <u>GGG</u> CTCGTATTA GTA GAAACAA GGGTGTTF-3	

The Ba, Aa, and Bn represent 5' ends of restriction endonuclease sites (RE) of Bsa I, Aar I, and BsmBI. The digits on the primers represent the first nucleotide of the primers; the character R means reverse direction; the underline nucleotides represent the restriction endonuclease recognized sites; and the bold characters represent the 5' end overhangs post the digestions with the corresponding RE.

1.3 病毒 RNA 提取、cDNA 合成和基因片段的扩增 分别用无菌 PBS 将毒种作 10³ 稀释后接种

SPF 鸡胚,37℃ 培养 48 h 后收集尿囊液,分装, -70℃ 保存备用。按 Trizol 试剂说明书从含流感病

毒尿囊液中提取病毒 RNA;以禽流感反转录通用引物 Uni-12 为引物,采用禽源反转录酶 AMV,反转录合成 cDNA;再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 参数:94 预变性 4 min;94 变性 30 s,54 退火 30 s,72 延伸 3 min,循环扩增 30 次;72 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳中进行鉴定。采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物并纯化。

1.4 HA 和 NA 基因重组质粒的构建 以 HPAI 病毒 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) 的 cDNA 为模板,以引物 Bnr HA-1/Bnr HA-1025R2 进行 PCR,扩增获得 HA 基因的 HA1 片段;以引物 Bnr HA-1020/Bnr NS-890R 进行 PCR,扩增得到 HA2 片段;2 个片段通过基因搭桥方法扩增,获得全长 HA 基因片段。以禽流感参考株 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 的 cDNA 为模板,以引物 Bnr NA-1/Bnr NA-1413R 进行 PCR,获得 NA 基因片段。将纯化 PCR 产物分别经 BsmBI 或 BsaI 酶切后与 pHW2000 载体连接,按常规方法进行细菌转化、质粒提取,获得重组质粒 pML-HA 和 pML-NA。

1.5 高产禽流感病毒内部基因重组质粒的构建 以高产禽流感病毒 A/Goose/Italian/3/01 (H9N2) 的 cDNA 为模板,PCR 扩增 6 条内部基因片段,回收纯化目的片段,分别用各自引物所带有的限制性内切酶酶切过夜,回收目的片段与 pHW2000 载体连接。PB2、PB1 基因各自的 2 条片段分别同时与载体进行三片段连接反应。PA 基因的 2 个片段通过搭桥方法扩增全长片段后再与载体连接。通过细菌转化、质粒提取,获取各基因重组质粒 pML-PB2、pML-PB1、pML-PA、pML-NP、pMLM 和 pML-NS。

1.6 重组质粒的鉴定 按照常规方法,对 8 个重组质粒进行酶切、PCR 鉴定。各质粒中插入片段的 DNA 序列测定由上海英俊生物技术公司完成。

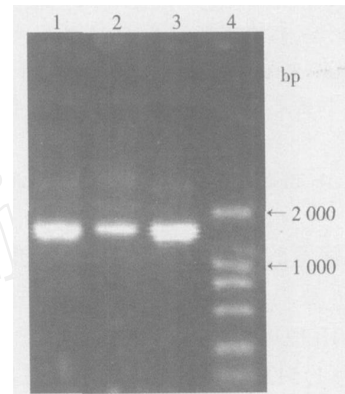
1.7 细胞转染与重组病毒拯救 293T 细胞和 MDCK 细胞分别培养在含 100 mL/L 胎牛血清的 OPTMEM 培养液中。胰蛋白酶消化 293T 细胞和 MDCK 细胞,将各 5×10^5 个细胞混匀后接种 6 孔组织培养板,过夜培养形成单层。按 Hoffmann 等^[11]报道方法略加改良进行细胞染:取 8 个阳性质粒 (pMLPB2、pMLPB1、pMLPA、pMLNP、pMLM、pMLNS、pMLHA 和 pMLNA) 各 1 μ g,加入适量的无血清、无抗生素 OPTMEM 培养液使之体积为 100 μ L;取 8 μ L lipofectamine 2000 加入到 92 μ L OPTMEM 培养液中,充分混合,室温作用 5 min 后,将其加到含有质粒的反应管中;质粒和脂质体室温作用 30 min 后,加 800 mL OPTMEM 细胞培养液使总体积为 1 mL。以 OPTMEM 培养液洗细胞单层 2 次,将上述质粒和脂

质体混合物加到细胞单层表面。37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 培养箱中转染 6 h,弃去质粒和脂质体混合物,添加含 0.5 μ g/mL TPCK-trypsin 的 OPTMEM 细胞培养液,培养 72 h 后收集细胞上清液,进行血清学鉴定。

1.8 HA 与血凝抑制 HI 试验、NA 与神经氨酸酶抑制 NI 试验 采用 5 mL/L 的公鸡红细胞,按微量法^[12]分别进行 HA 和 HI 试验。以微量法^[12]分别进行 NA 与 NI 试验。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增各基因片段 提取病毒 RNA,反转录成 cDNA,使用特异性引物进行 PCR 扩增,获得各基因片段。HA 基因片段电泳结果见图 1。



1-3) RT-PCR products of HA gene; 4) Marker DL 2 000

图 1 RT-PCR 扩增禽流感病毒株 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) HA 基因片段

Fig 1 RT-PCR products of HA gene from avian influenza virus A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1)

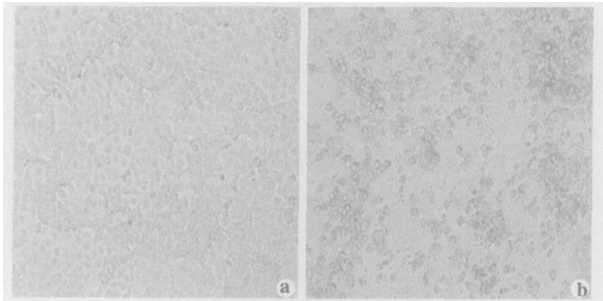
2.2 重组质粒的构建与鉴定 经琼脂糖凝胶电泳筛选的重组质粒以 PCR 和酶切进行初步鉴定,然后行序列测序,证实各质粒中插入序列与预期的相符。因此,已构建成功分别含目的基因 PB2、PB1、PA、NP、M、NS、HA 和 NA 的 8 个重组质粒 pML-PB2、pML-PB1、pML-PA、pML-HA、pML-NP、pML-NA、pML-M 和 pML-NS。其中重组质粒 pML-HA 基因已按实验设计缺失了 HA 连接肽处的 4 个连续碱性氨基酸 RRKK,其 343 位 R 也突变为 T,HA 基因核苷酸序列与实验设计完全一致。HA 基因连接肽修饰前、后的核苷酸序列和编码的氨基酸序列见图 2。

2.3 重组病毒的拯救 8 个重组质粒转染 293T/MDCK 混合培养细胞单层,72 h 后出现明显的细胞病变,293T 细胞树突消失,细胞皱缩,聚集呈团块状;MDCK 细胞出现大量崩解。相反对照质粒转染细胞无明显的形态学改变。阳性质粒转染前后细胞形态学变化见图 3。收集细胞培养上清即获重组禽流感病毒 rH5N3,血凝试验测定其血凝效价为 1 32。

```
Original HA nt 1 037→1 078 CCT CAA AGA GAG AGA AGA AGA AAA AAG AGA GGA CTA TTT GGA
Original HA aa 339→350 P Q R E R R R K K R G L F G
          |
Modified HA nt 1 037→1 066 CCT CAA AGA GAG AGA ..... AGA GGA CTA TTT GGA
Modified HA aa 339→348 P Q R E T ..... R G L F G
```

图 2 HA 基因修饰前、后的核苷酸序列和编码的氨基酸序列

Fig 2 Original and modified nucleotides and amino acids sequences of the HA gene



a) Before cell transfection; b) 72 h after cell transfection

图 3 阳性质粒转染 293T/MDCK 混合培养细胞前后的形态 (×100)

Fig 3 Microphotographs of mixed cell culture of 293T and MDCK (×100)

2.4 重组病毒的表型 HI 试验表明,重组病毒的血凝活性可被鸡抗 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) 和 A/Goose/HLJ/QFY/04 (H5N1) 抗血清完全抑制,HI 效价分别为 1 512 和 1 1 024,但不能被抗 A/Goose/Dalian/01 (H9N2) 抗血清所抑制。抗禽流感参考株 A/Duck/Germany/1215/73 (H2N3) 抗血清对重组疫苗株的 NI 效价为 1 800,抗 A/Goose/HLJ/QFY/2004 (H5N1) 抗血清的 NI 效价小于 1 10。表明该重组疫苗株病毒具有符合实验设计的 H5 和 N3 亚型表型,命名为 rH5N3。

3 讨论

A 型流感病毒的反向遗传学操作指由病毒负链 RNA 合成 cDNA,然后将其克隆到基因转录和/或表达载体,转染易感细胞后拯救出流感病毒的过程。与传统方法相比反向遗传学操作可以大大加速流感疫苗株的研制速度。尤其是对于人流感疫苗株的构建,只需将目前流行株的 HA 和 NA 基因分别克隆,然后与人流感病毒 PR8 高产株的内部基因表达质粒共转染细胞,即可拯救出理想的疫苗株。Hoffmann 等^[8]用 8 质粒系统证明了这是一个简单而快捷的方法。随后不久,Subbarao 等^[13]用 12 质粒系统拯救出 H5N1-PR8 重组疫苗株,Liu 等^[9]用 8 质粒系统拯救出 NA 基因亚型不同于流行株的 H5N3-PR8 重组疫苗株。Webby 等^[14]按 GMP 标准,采用 H5N1 亚型人流感病毒,在 4 周左右时间构建成功 H5N1-PR8 人流感疫苗株。上述疫苗株不论是禽流感疫苗株还是人

流感疫苗株,都是建立在人流感疫苗高产株 PR8 基础之上的。为了克服人-禽流感病毒重组株可能的安全隐患,我们构建了以 H9N2 亚型高产禽流感病毒为骨架的 8 质粒系统,拯救出了全部基因片段均属禽源的重组疫苗株 rH5N3。由于所有基因全部来自禽源,保留了禽流感病毒与人流感病毒之间所固有的种间屏障,大大降低了重组禽流感疫苗株感染人的机会。

由于流感疫苗的免疫效果主要取决于疫苗株与流行株的抗原相关性,为此 WHO 根据全球流感病毒监测网的监测结果提前一年推荐下一年的流感疫苗株。虽然流行病学证据显示 1996 年中国广东分离株 A/Goose/Guangdong/1/96 是目前东南亚地区流行的 H5N1 亚型 HPAI 病毒的共同祖先,但是 2004 - 2005 年新分离株与其相比不仅基因型不同,而且存在较大的抗原性差异^[15]。为了保证禽流感疫苗的最佳免疫效果,必须根据禽流感的流行变异情况更新疫苗株,以确保疫苗能够有效预防新出现的变异株。虽然抗 NA 抗体可能对流感病毒感染起到一定程度的保护作用,但只有抗 HA 抗体才能够中和流感病毒感染。因此,本研究选择 2004 年国内流行的 H5N1 亚型 HPAI 代表株 A/Goose/HLJ/QFY/04 作为疫苗株 HA 基因供体,通过基因操作删除其 HA1 和 HA2 之间与毒力相关的 5 个连续碱性氨基酸 (RRRKK),同时选取国内流感病毒中较少见的 NA 亚型 N3^[16]作为疫苗株的分子标记,为疫苗免疫家禽和野毒感染家禽的鉴别诊断提供了方便。该疫苗株的成功构建为制备 H5 亚型禽流感疫苗打下了坚实的基础。

(致谢 感谢美国 St. Jude 儿童医院 Erich Hoffmann 博士和 Richard Webby 博士的热心帮助。)

[参考文献]

- [1] Li KS, Guan Y, Wang J, *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in Eastern Asia[J]. *Nature*, 2004, 430(6 996): 209 - 213.
- [2] Abbott A, Pearson H. Fear of human pandemic grows as bird flu sweeps through Asia[J]. *Nature*, 2004, 427 (6 974): 472 - 473.
- [3] Enserink M. Avian influenza H5N1 moves into Africa, European Union, deepening global crisis [J]. *Science*, 2006, 311(5 763): 932 - 934.
- [4] Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, *et al.* Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1) [J]. *N Eng J Med*, 2005, 352(4): 333 - 340.
- [5] Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence[J]. *Vet*

(下转第 526 页)

前已鉴定的肿瘤坏死因子受体有两种： M_r 55 000 的 TNFR1 和 M_r 75 000 的 TNFR2，均由信号肽、胞外结构域、跨膜区及胞内结构域 4 部分组成。TNFR1 胞内区含死亡结构域，是细胞凋亡和细胞毒作用中重要的死亡受体^[7]，而 TNFR2 则没有。两种受体在不同种类的细胞上数量和分布不同，单核细胞和淋巴细胞含较多的 TNFR2，而 TNFR1 主要存在于上皮细胞表面^[8]。TNF 通过和细胞膜上 TNFR1 结合，触发信号传导级联而导致细胞凋亡。据 Chan 等^[9]报道，TNFR2 可以放大 TNFR1 的凋亡信号。因此，中药组服药后 PBMC 表达 TNFR2 基因的水平下调，避免了免疫细胞的凋亡，防止了免疫细胞数量的减少，这可能正是增强机体免疫功能的阳性指标。但目前此信号传导途径尚未十分明确，还有待进一步研究探讨。

综上所述，基因芯片技术尤其是功能性基因芯片技术应用于药物筛选的实际意义正在逐步展现，且具有充分的潜力成为将来实验研究与临床检测的一个工具，并有望得到进一步的发展。

(致谢 在研究中，我们得到了香港中文大学中医中药研究所和威尔氏亲王医院肿瘤科的协作、配合与支持，表示衷心感谢！)

[参考文献]

- [1] Al Amro A, Al Rajhi N, Khafaga Y, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemo-radiation therapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Radiat OncolBio Phys*, 2005, 62(2): 508 - 513.
- [2] Lai YH, Chang JT, Keefe F, *et al.* Symptom distress, catastrophic thinking, and hope in nasopharyngeal carcinoma patients[J]. *Cancer Nurs*, 2003, 26(6): 485 - 493.
- [3] 卢玉涛. 鼻咽癌患者放疗的副作用及护理体会[J]. *中华临床新医学*, 2005, 5(9): 852 - 853.
- [4] 姜辉, 田亚平, 董矜, 等. 应用基因芯片技术观察硝酸甘油对肿瘤细胞血管生成相关基因表达的调控[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(29): 6 413 - 6 415.
- [5] Wong CK, Bao YX, Wong EL, *et al.* Immunomodulatory activities of Yunzhi and Danshen in post-treatment breast cancer patients[J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(3): 381 - 395.
- [6] 陈向荣, 陆京伯, 石汉平. 丹参的药理作用研究新进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2001, 21(1): 44 - 45.
- [7] 刘京梅, 金伯泉. 肿瘤坏死因子受体超家族成员死亡受体在病毒感染中的作用[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(3): S4 - S8.
- [8] 梁卫江, 张万岱. 肿瘤坏死因子诱导细胞凋亡的信号传导机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2000, 8(3): 329 - 331.
- [9] Chan FK, Shisler J, Bixby JG, *et al.* A role for tumor necrosis factor receptor 2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(51): 51 613 - 51 621.
- [1] Al Amro A, Al Rajhi N, Khafaga Y, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemo-radiation therapy [J]. *Microbiol*, 2000, 74(1/2): 77 - 86.
- [6] Subbarao K, Katz JM. Influenza vaccines generated by reverse genetics[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, 283: 313 - 342.
- [7] Neumann G, Watanabe T, Ito H, *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 9 345 - 9 350.
- [8] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, *et al.* Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines [J]. *Vaccine*, 2002, 20(25/26): 3 165 - 3 170.
- [9] Liu M, Wood JM, Ellis T, *et al.* Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics[J]. *Virology*, 2003, 314(2): 580 - 590.
- [10] Hoffman E, Neumann G, Kawaoka Y, *et al.* A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 6 108 - 6 113.
- [11] Hoffman E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for full-length amplification of all influenza A viruses[J]. *Arch Virology*, 2001, 146(12): 2 275 - 2 289.
- [12] Webster RG, Cox N, Stohr K. WHO Manual on Animal Influenza diagnosis and surveillance[EB/OL]. (2004 - 09 - 01) (2006 - 05 - 20) <http://www.who.int/emc-documents/influenza/doc/whocdscsrms20025screen.pdf>. 2002.
- [13] Subbarao K, Chen H, Swayne D, *et al.* Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics[J]. *Virology*, 2003, 305(1): 192 - 200.
- [14] Webby R, Perez D, Coleman J, *et al.* Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines[J]. *Lancet*, 2004, 363(9 415): 1 099 - 1 103.
- [15] The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(10): 1 515 - 1 521.
- [16] Liu M, He S, Walker D, *et al.* The influenza virus gene pool in a poultry market in South Central China[J]. *Virology*, 2003, 305(2): 267 - 275.

(编辑 金晓琳)

(编辑 罗承丽)

(上接第 522 页)