

· 医药生物技术 ·

B型流感病毒 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 毒株的遗传进化及其对小鼠的致病性分析

孟庆鑫^{1,2}, 焦鹏涛², 孙蕾^{2,3}, 王大燕⁴, 罗廷荣¹, 范文辉², 刘文军^{1,2,3}

1 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

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 中国科学院大学, 北京 100049

4 中国疾病预防控制中心, 北京 102206

孟庆鑫, 焦鹏涛, 孙蕾, 王大燕, 罗廷荣, 范文辉, 刘文军. B型流感病毒 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 毒株的遗传进化及其对小鼠的致病性分析. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3390-3405.

MENG QX, JIAO PT, SUN L, WANG DY, LUO TR, FAN WH, LIU WJ. Phylogenetic and pathogenicity analysis of influenza B virus strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3390-3405.

摘要: B型流感病毒 (influenza B virus, IBV) 比 A型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 更易引发并发症, 在一定季节内造成的疾病负担甚至超过 IAV, 但目前人们对 IBV 的关注较少。为了分析 IBV 临床毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的遗传进化特点, 本研究构建了系统进化树, 并以世界卫生组织推荐的疫苗株为参考, 对其血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 进行了氨基酸序列同源性及突变位点分析。分析结果发现 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 毒株无谱系间重配现象, 与同年疫苗株 B/Colorado/06/2017 匹配性较差。另外, 测定了 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 毒株感染小鼠的半数致死量 (median lethal dose, LD_{50}) 及其对小鼠的致病性。结果表明, B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 毒株感染小鼠的 LD_{50} 为 $10^{5.9}$ TCID₅₀ (median tissue culture infective dose), 小鼠肺脏中病毒滴度在感染后 1 d 达到高峰, 炎性细胞因子的 mRNA 水平在感染后 12 h 达到高峰, 且感染后肺脏中的肺泡损伤严重, 有大量炎性细胞浸润。本研究证明了 IBV 临床毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 可以感染小鼠并诱发典型的肺脏炎症, 为研究 IBV 致病及传播机制奠定了基础, 为评价新型流感疫苗、抗病毒和抗炎症药物提供了理想的动物模型。

关键词: B型流感病毒; Victoria 谱系; 遗传进化分析; 致病性; 动物模型

Received: February 25, 2022; Accepted: June 6, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32070164); Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Science (XDB29010000)

Corresponding authors: LIU Wenjun. Tel: +86-10-64807497; E-mail: liuwj@im.ac.cn

FAN Wenhui. Tel: +86-10-64807503; E-mail: fanwh@im.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32070164); 中国科学院 B 类先导专项 (XDB29010000)

Phylogenetic and pathogenicity analysis of influenza B virus strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018

MENG Qingxin^{1,2}, JIAO Pengtao², SUN Lei^{2,3}, WANG Dayan⁴, LUO Tingrong¹,
FAN Wenhui², LIU Wenjun^{1,2,3}

1 Animal Science and Technology College, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

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

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: Influenza B virus (IBV) is more likely to cause complications than influenza A virus (IAV) and even causes higher disease burden than IAV in a certain season, but IBV has received less attention. In order to analyze the genetic evolution characteristics of the clinical strain IBV (B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018), we constructed genetic evolution trees and analyzed the homology and different amino acids of hemagglutinin and neuraminidase referring to the vaccine strains recommended by World Health Organization (WHO). We found that strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 was free of interlineage reassortment and poorly matched with the vaccine strain B/Colorado/06/2017 of the same year. We also determined the median lethal dose (LD_{50}) and the pathogenicity of strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 in mice. The results showed that the LD_{50} was $10^{5.9}$ TCID₅₀ (median tissue culture infective dose), the IBV titer in the lungs reached peak 1 d post infection and the mRNA level of the most of inflammatory cytokines in the lungs reached peak 12 h post infection. The alveoli in the lungs were severely damaged and a large number of inflammatory cells were infiltrated post infection. The study demonstrated that the clinical strain IBV (B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018) could infect mice and induce typical lung inflammation. This will facilitate the research on the pathogenesis and transmission mechanism of IBV, and provide an ideal animal model for evaluation of new vaccines, antiviral and anti-inflammatory drug.

Keywords: influenza B virus; Victoria lineage; genetic analysis; pathogenicity; animal model

流感病毒 (influenza virus) 是引起人和动物呼吸道疾病的重要病原体, 对公共卫生和人类健康构成严重威胁。流感病毒目前分为 A、B、C、D 四个型^[1-2], A 型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 宿主范围较广^[3], 可感染人、哺乳动物和禽类等, 而 B、C 和 D 型流感病毒的宿主范围有限, 其中, B 型流感病毒 (influenza B virus, IBV) 自然条件下仅感染人和海豹^[4-7]。

IAV 可引起人类流感大流行, 而 IBV 常在全球范围内以与 IAV 共流行的方式引起流感的局部暴发或季节性流行, 尤其对儿童和青少年较为易感^[8]。相较于 IAV, IBV 更容易引发感染者产生并发症, 且在一定季节内造成的疾病负担甚至超过 IAV^[9], 但目前关于 IBV 的研究较少。

IBV (B/Lee/1940) 于 1940 年被首次分离^[10], 从 1985 年开始逐渐进化为 B/Victoria 和 B/Yamagata

两大谱系,于20世纪90年代开始共同循环流行,并且经常在局部区域交替出现^[11-12]。IBV基因组包括8个分节段的单股负链RNA,共编码至少11种蛋白^[13],主要通过碱基插入、缺失、突变以及谱系间和谱系内的频繁重配实现抗原进化^[14-17]。对IBV核苷酸和氨基酸的遗传进化及突变位点比对分析有助于评估抗原进化、发现新的突变基因并对流感病毒的防控提供参考。另外,如果要对IBV的致病性机制进行深入研究,稳定的IBV动物感染模型显得尤为重要。目前大多数研究者通过对小鼠进行免疫抑制后感染或采用传代法筛选出致死性的IBV鼠适应株^[18-19],从而建立小鼠致死模型,而用临床毒株直接感染建立小鼠致死模型的研究鲜有报道。

本研究对IBV Victoria谱系的临床分离毒株B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018进行了关键基因片段血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的遗传进化特点分析,并研究了其对BALB/c小鼠的致病性,结果发现该毒株对小鼠高度易感并致死。本研究旨在为研究IBV的致病及传播机制奠定基础,为评价新型疫苗、抗病毒和抗炎症药物提供理想的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验室设备

与临床毒株B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018有关的实验操作均在生物安全二级实验室(bio-safety level laboratory-2, BLS-2)进行,根据病原微生物的危害等级穿戴相应的防护用品,且所有操作严格遵循BLS-2操作规范。本研究中用到的实验动物均饲养于独立通气笼盒(individual ventilated cages, IVC)中。

1.2 毒株、细胞及实验动物

IBV毒株(B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018)

由中国疾病预防控制中心提供并由本实验室保存;犬肾细胞系(madin-darby canine kidney cells, MDCK)由本实验室保存;6周龄雌性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)BALB/c小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

所有动物实验均经过中国科学院微生物研究所动物实验与人类生物医学研究伦理委员会审核并批准(APIMCAS2021)。

1.3 主要试剂与仪器设备

麻醉剂(1.25%阿佛丁)购自南京爱贝生物科技有限公司;Trizol Reagent、DMEM培养基购自Thermo Fisher科技公司;逆转录酶M-MLV、RNA酶抑制剂购自Promega公司;脱氧核苷酸混合物(dNTPs)、寡聚胸腺嘧啶(oligo dT)和TB Green Premix Ex Taq II购自大连宝生物工程有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为Gibco公司产品。组织细胞破碎机购自湖北新纵科病毒疾病工程技术有限公司;实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪购自ABI公司;NanoDrop 1 000超微量分光光度计购自Thermo Fisher公司;PCR仪购自杭州柏恒科技有限公司。

1.4 病毒的遗传进化与分子特征分析

以WHO推荐的IBV疫苗株和国内2016-2021年部分IBV流行毒株为参考毒株,其HA、NA基因登录号见表1,利用MEGA 7.0软件中的Clustal W进行多序列比对,采用相邻连接法(neighbor-joining method)绘制毒株B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 HA和NA基因片段的遗传进化树,bootstrap循环值设为1 000。利用DNASTAR软件中的MegAlign对该毒株的HA、NA氨基酸序列与参考毒株进行同源性分析。以疫苗株为对照,对研究毒株HA和NA的关键氨基酸位点变化进行分析,并通过SWISS-MODEL搜索HA和NA氨基酸序列的

表 1 参考毒株 HA、NA 基因登录号

Table 1 The HA and NA accession number of reference strains

Strain name	Strain ID
B/Wisconsin/01/2010	JN993031.1 (HA)/JN993012.1 (NA)
B/Brisbane/60/2008	KX058884.1 (HA)/FJ766841.1 (NA)
B/Colorado/06/2017	CY236607.1 (HA)/CY236609.1 (NA)
B/Washington/02/2019	MN155753.1 (HA)/MN155755.1 (NA)
B/Massachusetts/2/2012	MT056027.1 (HA)/MT056021.1 (NA)
B/Phuket/3073/2013	EPI1381150 (HA)/EPI1381149 (NA)
B/Zhejiang-Shangcheng/16/2018	EPI1229511 (HA)/EPI1229513 (NA)
B/Guangxi-Xixiangtang/11019/2016	EPI963544 (HA)/EPI963543 (NA)
B/Guizhou-Kaili/11102/2020	EPI1845137 (HA)/EPI1844417 (NA)
B/Zhejiang-Yiwu/1976/2019	EPI1692080 (HA)/EPI1692079 (NA)
B/Shanghai-Pudongxin/11420/2019	EPI1648907 (HA)/EPI1648906 (NA)
B/Zhejiang-Jiaojiang/11018/2019	EPI1648448 (HA)/EPI1648447 (NA)
B/Henan-Wolong/1275/2019	EPI1503775 (HA)/EPI1503774 (NA)
B/Jiangxi-Xihu/1876/2018	EPI1381120 (HA)/EPI1381119 (NA)
B/Shanxi-Xinghualing/1104/2019	EPI1381093 (HA)/EPI1381092 (NA)
B/shenzhen/2018-22511/2017	EPI1341167 (HA)/EPI1341166 (NA)
B/Yunnan-Funing/31/2017	EPI1340152 (HA)/EPI1340151 (NA)
B/Sichuan-Gaoxin/1914/2017	EPI1340131 (HA)/EPI1340130 (NA)
B/Guizhou-Jinping/31/2017	EPI1340089 (HA)/EPI1340088 (NA)
B/Anhui-Tianjiaan/1773/2017	EPI1340074 (HA)/EPI1340073 (NA)
B/Jilin-Hunjiang/1316/2018	EPI1339735 (HA)/EPI1339734 (NA)
B/Heilongjiang-Daowai/1185/2018	EPI1339711 (HA)/EPI1339710 (NA)
B/Shanghai-Pudongxin/1293/2018	EPI1339684 (HA)/EPI1339683 (NA)
B/Guangdong-nanshan/39/2018	EPI1339309 (HA)/EPI1339308 (NA)
B/Liaoning-Shuangta/1535/2016	EPI885522 (HA)/EPI885521 (NA)
B/Guangxi-Jiangzhou/1924/2016	EPI885486 (HA)/EPI885485 (NA)
B/Heilongjiang-Nangang/1224/2016	EPI768871 (HA)/EPI768870 (NA)
B/Fujian-Zhangping/32/2016	EPI768856 (HA)/EPI768855 (NA)
B/Jiangxi-Anyuan/1750/2021	EPI1918235 (HA)/EPI1918234 (NA)
B/Guangxi-Hengxian/314/2020	EPI1845170 (HA)/EPI1844483 (NA)
B/Hubei-Danjiangkou/2380/2021	EPI1918283 (HA)/EPI1918282 (NA)
B/Jiangxi-Linchuan/1969/2021	EPI1918227 (HA)/EPI1918226 (NA)
B/Chongqing-Yuzhong/1781/2021	EPI1918115 (HA)/EPI1918114 (NA)
B/Zhejiang-Ninghai/2531/2021	EPI1917675 (HA)/EPI1917674 (NA)
B/Guangxi-Lingshan/359/2018	EPI1340873 (HA)/EPI1340872 (NA)
B/Guangxi-Jiangzhou/1311/2018	EPI1340560 (HA)/EPI1340559 (NA)
B/Guangxi-Jiangzhou/1722/2018	EPI1339369 (HA)/EPI1339368 (NA)
B/Guangxi-Jiangzhou/512/2018	EPI1340539 (HA)/EPI1340538 (NA)
B/Guangxi-Jiangzhou/1584/2018	EPI1340308 (HA)/EPI1340307 (NA)
B/Guangxi-Lingshan/340/2018	EPI1339750 (HA)/EPI1339749 (NA)
B/Hunan-Kaifu/1628/2021	EPI1918043 (HA)/EPI1918042 (NA)
B/Guangxi-Chengzhong/133/2018	EPI1168548 (HA)/EPI1168547 (NA)
B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018	EPI1340557 (HA)/EPI1340556 (NA)
B/Guangxi-Changzhou/373/2018	EPI1339516 (HA)/EPI1339515 (NA)

三维结构模板并模拟其三维结构, 关键突变位点均通过 Py MOL 软件编辑并标出。

1.5 IBV 半数组织感染量的测定

取生长状态良好的 MDCK 细胞于 96 孔细胞培养板中培养, 待细胞汇合度至 80% 后使用。将 IBV 10 倍梯度稀释 (10^{-3} – 10^{-10}) 后感染 (每个梯度设 8 个重复孔), 同时设立非感染孔作为阴性对照。置于 33 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 观察并记录细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 结果。根据 Reed-Muench 方法计算 IBV 的半数组织感染量 (median tissue culture infective dose, TCID₅₀)。

1.6 IBV 感染 BALB/c 小鼠半数致死量的测定

将初始滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL 的 IBV 用无菌磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 进行 2 倍梯度稀释后置于冰上备用。将 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠随机分成 5 组, 每组 6 只, 腹腔注射阿佛丁麻醉后, 用初始浓度及 2 倍梯度稀释后的 IBV 对其进行滴鼻感染, 50 μL/只, 对照组以相同方式给予无菌 PBS。连续 15 d 观察小鼠存活状况并记录体重, 根据 Reed-Muench 方法计算 IBV 感染小鼠的半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀)。

1.7 IBV 对 BALB/c 小鼠的致病性分析

选取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 随机分为

2 组, 分别为 IBV 感染组 (30 只) 与阴性对照组 (3 只), 将小鼠腹腔麻醉后, 以 0.5 LD₅₀/只的剂量滴鼻感染小鼠, 阴性对照组以相同方式给予无菌 PBS。感染组分别在感染后 12 h、1 d、3 d、5 d 和 7 d 时解剖 6 只小鼠, 其中 3 只无菌取肺脏置于 1 mL 含 1% 双抗无血清 DMEM 中, 经 3 次冻融研磨后离心取上清, 进行 TCID₅₀ 测定; 另外 3 只无菌取肺脏, 左肺于 4% 的多聚甲醛中固定 72 h 后, 送武汉赛维尔生物科技有限公司制备苏木精—伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 的病理切片, 右肺置入无菌研磨管中研磨, TRIzol 法提取 RNA 并反转录成 cDNA, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantification polymerase chain reaction, RT-qPCR) 方法检测 cDNA 中的炎症细胞因子, 如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNF-α)、白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白介素 1 β (interleukin 1 beta, IL-1β) 和天然免疫相关细胞因子干扰素 α (interferon alpha, IFN-α)、干扰素 β (interferon beta, IFN-β)、干扰素 γ (interferon gamma, IFN-γ) 的 mRNA 水平。阴性对照组左右肺分开处理。其中, 炎症细胞因子的 RT-qPCR 引物序列见表 2。

1.8 数据处理及统计学分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 RT-qPCR 结果, 并用 Microsoft Excel 进行统计分析, 所有数据均以

表 2 用于 RT-qPCR 分析的引物序列

Table 2 Primers for RT-qPCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>TNF-α</i>	CCAAAGGGATGAGAAGTTCC	CTCCACTTGGTG GTTTGCTA
<i>IL-6</i>	ATGAAGTTCTCTCTGCAAG	GTGTAATTAAGCCTCCGACT
<i>IL-1β</i>	TAGGCTCATCTGGGATCCTC	AAAAGGTGGCATTTCACAGT
<i>IFN-α</i>	ATGGCTAGGCTCTGTGCTTT	CTCTTGTTCTGAGGTTAT
<i>IFN-β</i>	AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT	GCCCTGTAGGTGAGGTTGATCT
<i>IFN-γ</i>	ATGAACGCTACACACTGCATCTTG	TCAGCAGCGACTCCTTTTCC
<i>GAPDH</i>	ACCACCATGGAGAAGGCTGG	CTCAGTGTAGCCCAGGATGC

至少 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间的比较采用双尾学生 *t*-test 检验 (unpaired, two-tailed Student *t*-test) 分析差异显著性, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。使用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 遗传进化分析结果

2.1.1 HA 和 NA 基因进化树分析

以 WHO 推荐的疫苗株和国内 2016–2021 年局部暴发流行的部分毒株为参考株, 对 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 HA 和 NA 基因构建遗传进化树, 如图 1 和图 2 所示, IBV 被分为 Victoria 和 Yamagata 两大谱系, 遗传进化树显示 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 属于 Victoria 谱系, 与疫苗株 B/Washington/02/2019、B/Brisbane/60/2008 和 B/Colorado/06/2017 同属一个分支, 无谱系间重配现象。HA 和 NA 遗传进化树均显示, B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与同年分离的毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1311/2018 亲缘关系最近。

2.1.2 HA 和 NA 氨基酸同源性分析

对 HA 氨基酸序列进行同源性分析发现 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与以上参考毒株的同源性在 92.3%–99.8% 之间。其中与 2017 年疫苗株 B/Brisbane/60/2008 和 2020 年的疫苗株 B/Washington/02/2019 的同源性均为 99.7%; 与 2018 年和 2019 年的疫苗株 B/Colorado/06/2017 同源性为 98.8%。

对 NA 氨基酸序列进行同源性分析发现 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与以上参考株的同源性在 92.9%–100.0% 之间。与 2017 年疫苗株 B/Brisbane/60/2008 的同源性为 98.7%; 与 2018 年和 2019 年的疫苗株 B/Colorado/06/2017、2020 年的疫苗株 B/Washington/02/2019 同源性

均为 99.8%。

2.1.3 病毒 HA、NA 等关键氨基酸位点分析

HA 基因的高度突变性是流感病毒发生抗原漂移的重要原因, 尤其是 HA1 的 4 个抗原决定簇 120 环 (116–137)、150 环 (141–150)、160 环 (162–167) 和 190 螺旋 (194–202), 其中 Victoria 谱系的 120 环还包含 75 和 77 位点^[20]。B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株相比, HA1 区的氨基酸差异位点如表 3 所示, 并在模拟的 HA 三维结构模式图 (图 3) 中标出, HA 蛋白建模模板编号为 PDB ID: 4NRL。B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株 B/Brisbane/60/2008 相比, HA1 区的突变位点有位于 120 环的 I117V、N129D 和 190 环的 S197N; 与疫苗株 B/Washington/02/2019 相比, HA1 区突变位点有位于 120 环的 R133G、E136K 和 190 环的 S197N, 且在 160 环中有 3 个氨基酸 (KND) 插入; 与疫苗株 B/Colorado/06/2017 相比, 有 3 个突变位点, 分别是位于 120 环的 G129D、位于 160 环的 D162K 和位于非抗原决定区的 V180I, 另外在 160 环还有 2 个氨基酸 (ND) 插入。

IBV HA 上的受体结合位点 (receptor binding site, RBS) 区由 HA1 的 190 螺旋 (HA1 193–202) 构成顶部, 240 环 (HA1 237–242) 构成左边缘, 140 环 (HA1 136–143) 构成右边缘, HA1 的 4 个残基 Phe-95、Trp-158、His-191 和 Tyr-202 构成了受体结合位点的基部^[21]。B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与 B/Colorado/06/2017 相比受体结合位点并无发生突变; 与 B/Brisbane/60/2008 相比, 有位于 190 螺旋的 S197N 突变; 与 B/Washington/02/2019 相比, 有位于 140 环的 E136K 突变和位于 190 螺旋的 S197N 突变。另外, Glu-136 和 Asn-197 是抗原表位相关氨基酸位点, S197N 使该处增加 1 个糖基化位点。

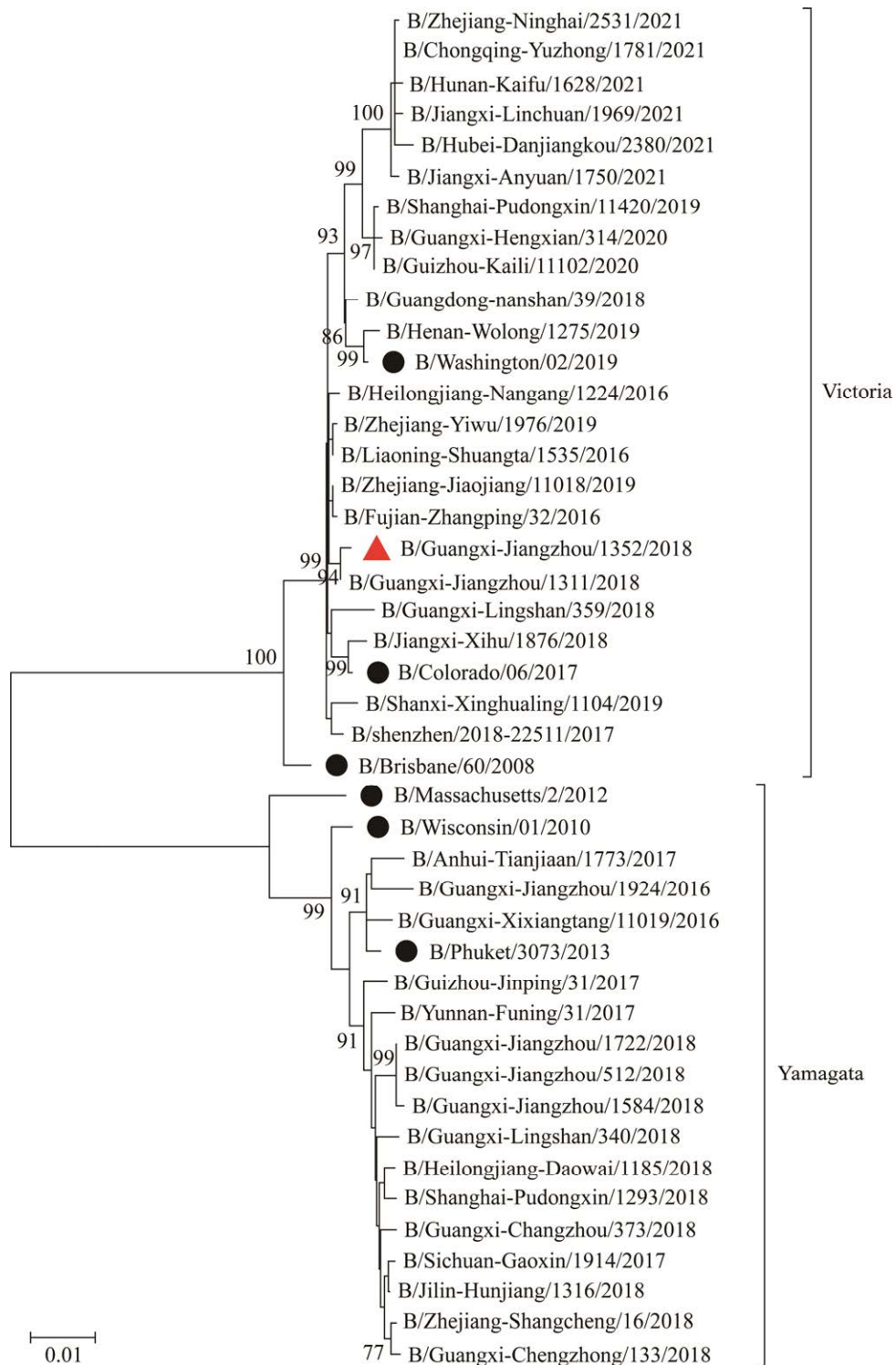


图 1 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 HA 基因进化树

Figure 1 The phylogenetic tree constructed based on the HA gene of strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 by neighbor-joining method. ● represents vaccine strains, ▲ represents the investigated strain.

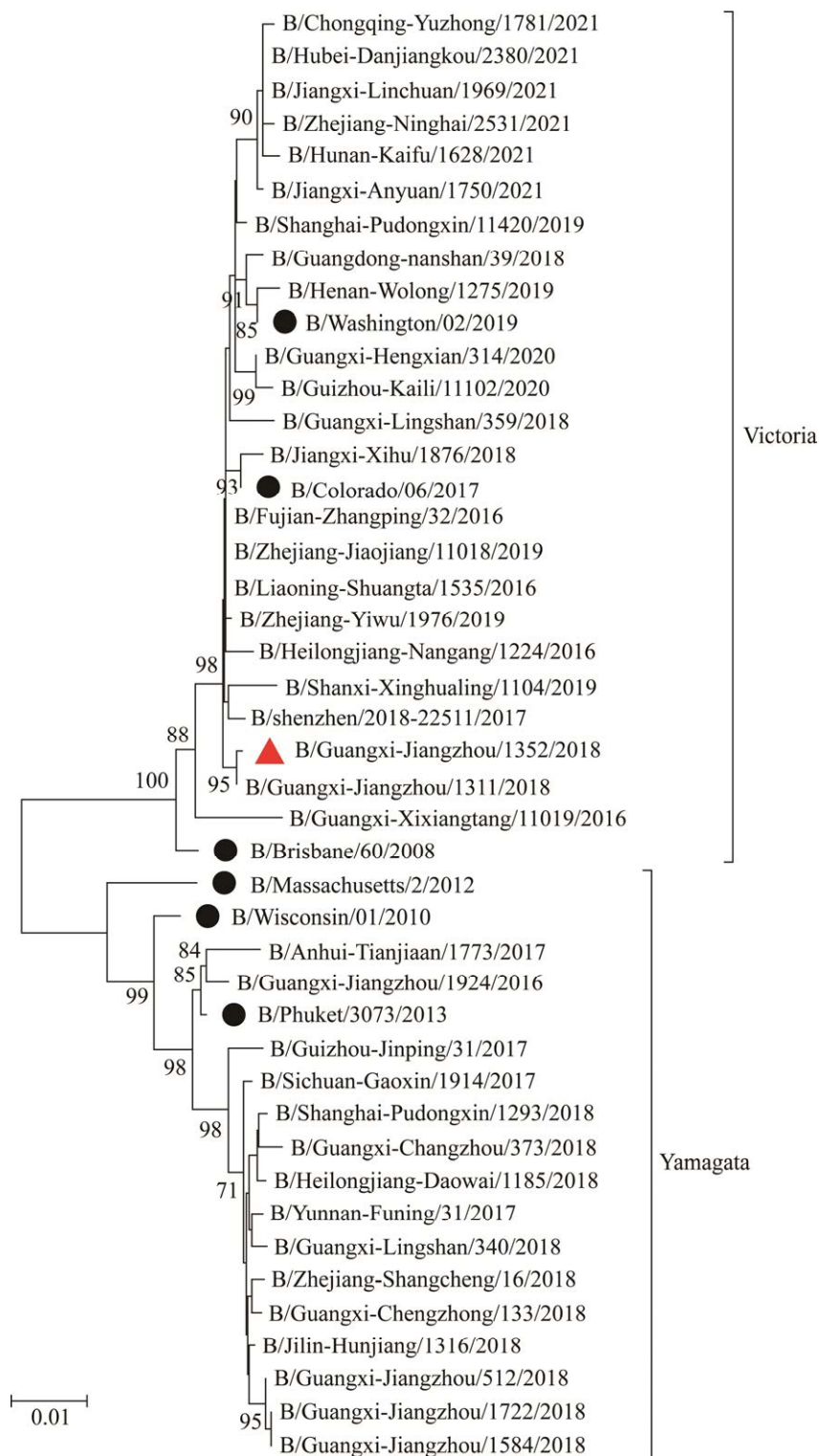


图 2 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 NA 基因进化树

Figure 2 The phylogenetic tree constructed based on the NA gene of strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 by neighbor-joining method. ● represents vaccine strains, ▲ represents the investigated strain.

表 3 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株 HA1 区氨基酸差异位点

Table 3 Different amino acids in HA1 between strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 and WHO recommended vaccine strains

Strains	117	129	133	136	162	163	164	180	197
B/Brisbane/60/2008	I	N	G	K	K	N	D	I	S
B/Washington/02/2019	V	D	R	E	–	–	–	I	S
B/Colorado/06/2017	V	G	G	K	D	–	–	V	N
B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018	V	D	G	K	K	N	D	I	N

– represents deletion.

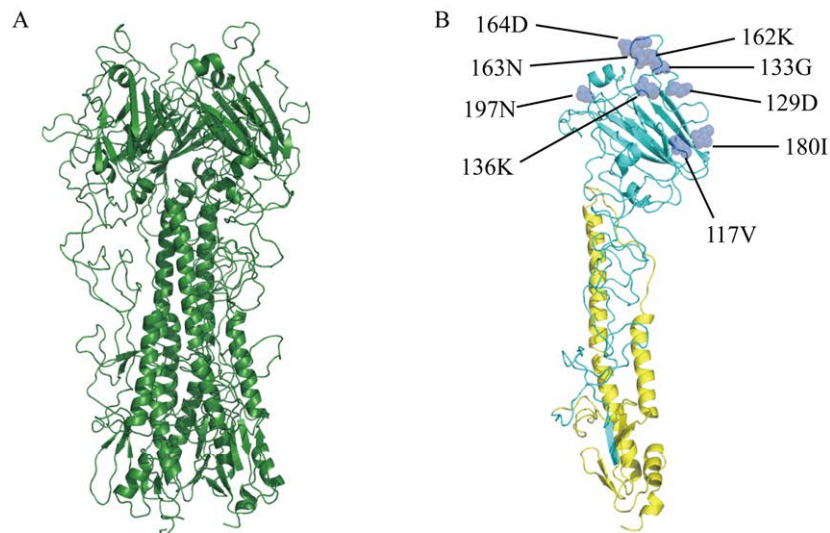


图 3 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 HA 蛋白三聚体、单体模拟图 A: 模拟的 HA 蛋白三聚体, 用绿色表示; B: 模拟的 HA 蛋白单体, HA1 用青色表示, HA2 用黄色表示, HA1 区域中抗原决定区和 RBS 区的氨基酸差异位点用蓝色表示

Figure 3 Simulated subunit and homotrimer of HA protein of strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018. (A) Simulated homotrimer of HA protein shown in green. (B) Simulated subunit of HA protein, HA1 shown in cyan, HA2 shown in yellow and the different amino acid in HA1 shown in blue.

NA 可切断 HA 蛋白与唾液酸受体的结合, 使病毒粒子释放并扩散, 是抗流感病毒药物 (神经氨酸酶抑制剂类) 的主要作用靶点。B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株相比, NA 的氨基酸差异位点如表 4 所示, 并在模拟的 NA 三维结构模式图 (图 4) 中标出, 其中 NA 蛋白建模模板编号为 PDB ID: 1B9V。与 2017 年疫苗株 B/Brisbane/60/2008 相比, B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的突变位点有 I120V、

K220N、S295R、N340D、E358K 和 D384G; 与 2018 年疫苗株 B/Colorado/06/2017 相比, B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的突变位点有 Q371K; 与 2019 年疫苗株 B/Washington/02/2019 相比, B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的突变位点有 T395A。

NA 片段上的抗病毒药物关键作用位点包括 8 个酶催化活性位点 (R118、D151、R152、R224、E276、R292、R371、Y406) 和 11 个辅

表 4 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株 NA 氨基酸差异位点

Table 4 Different amino acids in NA between strain B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 and WHO recommended vaccine strains

Strains	120	220	295	340	358	371	384	395
B/Brisbane/60/2008	I	K	S	N	E	K	D	A
B/Washington/02/2019	V	N	R	D	K	K	G	T
B/Colorado/06/2017	V	N	R	D	K	Q	G	A
B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018	V	N	R	D	K	K	G	A

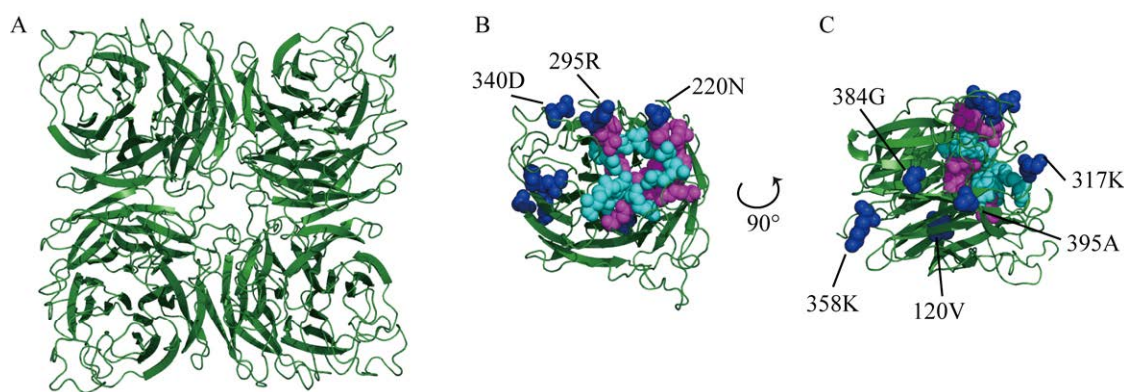


图 4 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 NA 蛋白四聚体、单体模拟图 A: 模拟的 NA 蛋白四聚体, 用绿色表示; B 和 C: 模拟的 NA 蛋白单体, 将 (B) 逆时针旋转 90° 得到 (C), NA 酶活性位点用青色表示, 辅助位点用品红色表示, 氨基酸差异位点用蓝色表示

Figure 4 Simulated subunit and homotetramer of NA protein of B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018. (A) Simulated homotetramer of NA protein shown in green. (B) and (C) simulated subunit of NA protein, rotate (B) 90° counterclockwise to get (C), NA neuraminidase active sites shown in cyan, the auxiliary sites shown in magenta and the different amino acid in HA1 shown in blue.

助位点 (E119、R156、W178、S179、D/N198、I222、E227、H274、E277、N294、E425), 分别作用于唾液酸底物和作为框架结构起稳定作用, 这些关键位点的改变可能导致病毒耐药性的产生^[22]。研究毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 NA 片段中的上述保守位点, 没有氨基酸突变, 推测该毒株对神经氨酸酶抑制类药物敏感。

2.2 IBV 对 BALB/c 小鼠致病性分析

2.2.1 IBV 在 MDCK 细胞上的 TCID₅₀

将 IBV 10 倍梯度稀释并感染 96 孔板中的 MDCK 细胞, 感染 72 h 后观察细胞出现细胞病变 (CPE) 的情况并记录, 再根据 Reed-Muench

方法计算 IBV 的 TCID₅₀, 测得 IBV 的滴度为 10^{7.5} TCID₅₀/mL。

2.2.2 IBV 感染 BALB/c 小鼠的 LD₅₀

将不同剂量的 IBV 滴鼻感染 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠后, 连续 15 d 观察小鼠存活状况并记录体重, Reed-Muench 方法计算出 IBV 感染 BALB/c 小鼠的 LD₅₀ 为 10^{5.9} TCID₅₀。感染后小鼠的体重变化和生存曲线如图 5 所示, 10^{6.2} TCID₅₀ 组的小鼠感染后体重陡降, 至第 7 天全部死亡; 10^{5.9} TCID₅₀ 组的小鼠感染后体重持续下降, 第 7 天降到最低, 为实验开始时体重的 75%, 且出现部分死亡 (死亡率 50%), 随后存

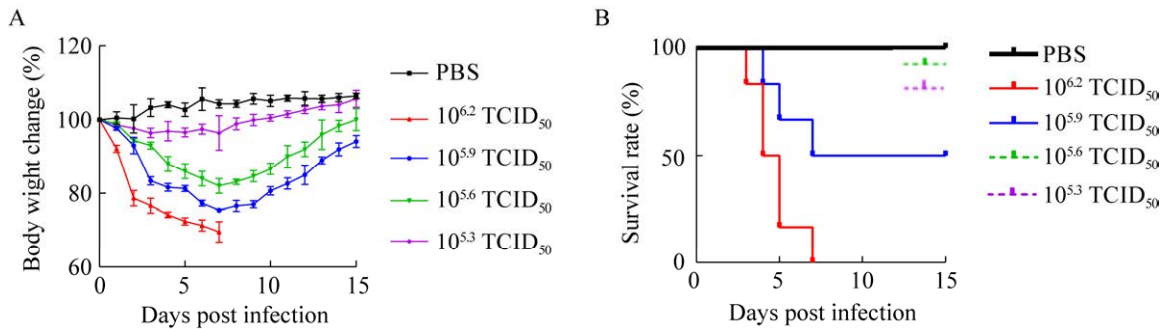


图5 IBV感染后小鼠体重变化(A)与生存曲线(B)

Figure 5 Body weight change (A) and survival rate (B) post infection. The animal experiment was repeated three times.

活小鼠体重逐渐回升; $10^{5.6}$ TCID₅₀组的小鼠和 $10^{5.3}$ TCID₅₀组的小鼠感染后体重均出现不同程度地下降并回升, 但无死亡。

2.2.3 IBV感染小鼠引起的肺损伤

将感染后的小鼠心脏采血后进行解剖, 取肺脏并观察 IBV ($0.5 LD_{50}$) 感染不同时间后的小鼠肺脏外观病变情况, 如图 6A 所示。对照组小鼠肺脏表面光滑, 呈淡粉红色, 颜色均匀, 含气 (图 6A-a)。感染后 12 h (图 6A-b) 和 1 d (图 6A-c), 肺脏出现肿胀, 但病变不明显; 感染后 3 d, 肺脏出现明显病变, 病变范围约占整个肺脏的 20%–40% (图 6A-d); 感染 5 d 后, 肺脏病变范围扩大, 约占整个肺脏的 30%–50% (图 6A-e); 感染后 7 d, 肺脏病变进一步扩大, 约占整个肺脏的 70% (图 6A-f)。

对解剖出的完整肺脏进行称量, 计算肺指数, 如图 6B 所示。从图中可以看出, IBV 感染后 12 h 的肺指数与对照组相比, 差异不显著 ($P>0.05$)。随感染时间延长, 肺指数持续升高, 其中, 感染后 7 d 肺指数 (2.26%) 达最高, 为对照组 (0.8%) 的 2.8 倍, 差异极显著 ($P<0.01$)。

取左肺置于 4% 的多聚甲醛中固定后, 制备 HE 染色的病理切片并进行扫描分析, 如图 6C 所示。从图中可以看出, 对照组肺泡充盈, 形

态结构明显 (图 6C-a); 感染后 12 h 肺泡间隔增宽 (图 6C-b); 感染后 1 d 肺泡间隔进一步加宽 (图 6C-c); 感染后 3 d 发生肺实变, 肺泡结构不明显, 出现巨噬细胞和中性粒细胞 (图 6C-d); 感染后 5 d 炎性细胞浸润、聚集 (图 6C-e); 感染后 7 d 依然有炎性细胞浸润, 但较 5 d 少 (图 6C-f)。

2.2.4 IBV感染后小鼠肺内的病毒滴度

为了详细了解 IBV 在小鼠肺脏中的复制情况, 取研磨后的肺脏上清, 测定其中 IBV 的 TCID₅₀, 如图 7 所示。结果表明, 从感染后 12 h 开始, 均能检测到病毒。感染后 1 d 的病毒滴度最高 ($10^{3.3}$ TCID₅₀/mL), 而感染后 3 d、5 d 和 7 d, 病毒滴度有所下降, 分别为 $10^{2.7}$ TCID₅₀/mL、 $10^{2.5}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{2.3}$ TCID₅₀/mL。

2.2.5 IBV感染后小鼠肺内的细胞因子水平

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 为促炎细胞因子, 可刺激和维持白细胞向炎症部位的细胞活化和迁移, 导致炎症的发生, 并可能造成疾病严重程度的升级^[23], 因此本研究还对 IBV 感染后不同时间点小鼠肺脏中的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 水平进行了检测, 以期评估 IBV 引起的炎症反应, 结果如图 8A–8C 所示。与对照组相比, 实验组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的 mRNA 显著上调 ($P<0.05$), 且均在感染后 12 h 达到高

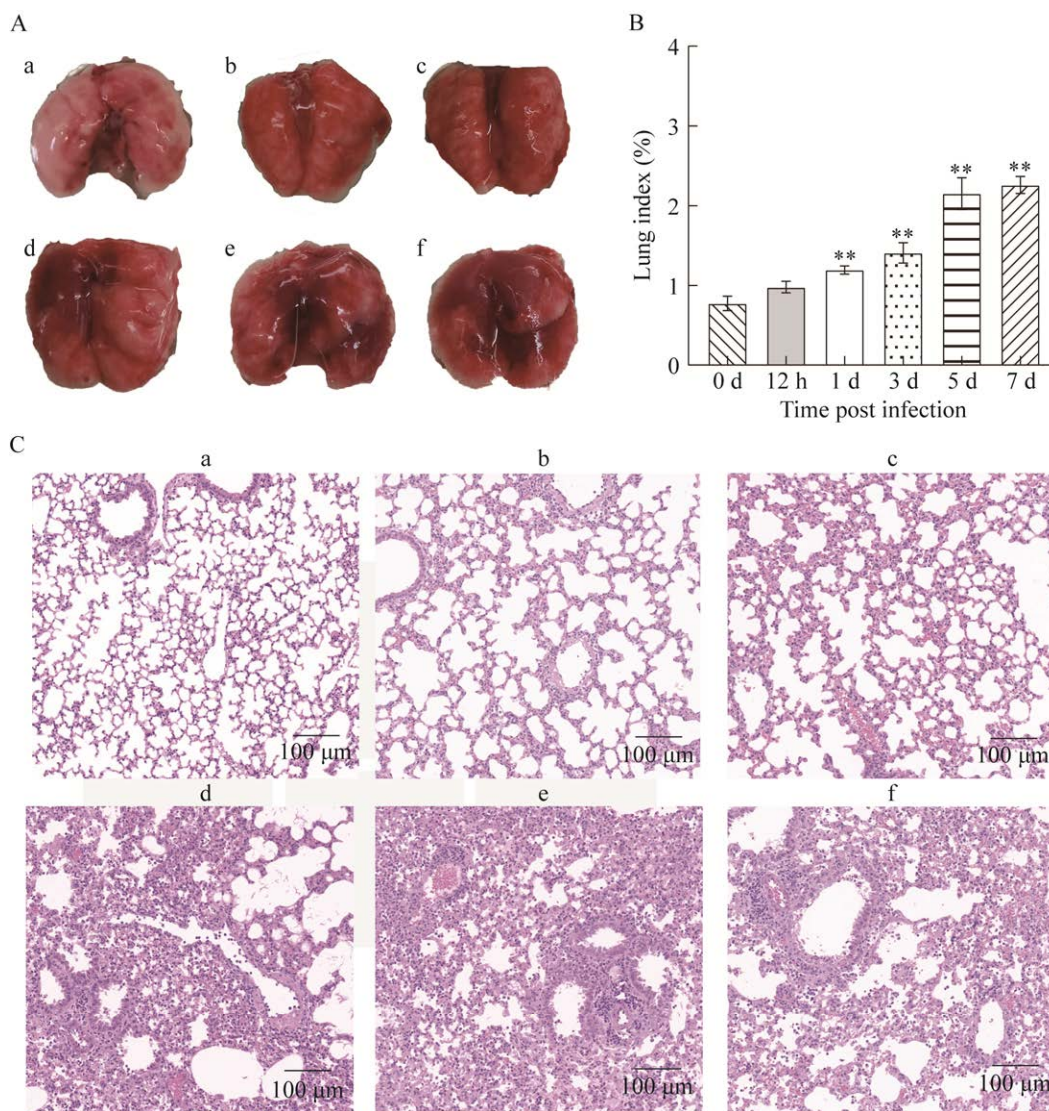


图 6 IBV 感染小鼠引起的肺损伤

Figure 6 Lung damage post IBV infection. (A) Appearance of lung post infection. a: negative control; b: 12 h post infection; c: 1 d post infection; d: 3 d post infection; e: 5 d post infection; f: 7 d post infection. (B) Lung indices post infection. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$. (C) Histopathologic changes of lungs post infection. a: negative control; b: 12 h post infection; c: 1 d post infection; d: 3 d post infection; e: 5 d post infection; f: 7 d post infection. Scale bar=100 μm .

峰, 后呈下降的趋势。感染后 12 h, $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-1\beta$ 的 mRNA 水平分别为对照组的 21.5 倍、25.0 倍和 8.5 倍, 说明 IBV 感染后能在短时间内引起肺脏中炎症反应的发生。

干扰素是机体抵抗病毒入侵的第一道天然免疫防线, 在抗病毒的过程中发挥着重要的作

用, IBV 感染后干扰素可迅速上调^[24-25], 因此, 本研究还对 IBV 感染后小鼠肺脏中的 $IFN-\alpha$ 、 $IFN-\beta$ 和 $IFN-\gamma$ 的 mRNA 水平进行了检测。结果如图 8D-8F 所示。IBV 感染后 12 h, 与对照组相比, $IFN-\alpha$ 、 $IFN-\beta$ 和 $IFN-\gamma$ 的 mRNA 水平显著上调 ($P < 0.05$)。其中, $IFN-\alpha$ 的 mRNA 水平

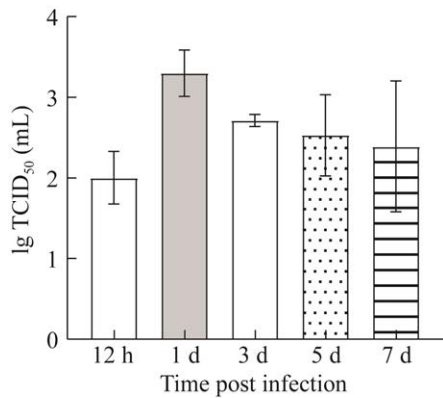


图7 IBV感染后小鼠肺脏中的病毒滴度
Figure 7 The IBV titer in lungs post infection.

在感染后 12 h 达到峰值，为对照组的 7 倍，随后与 12 h 相比呈逐渐下降趋势；*IFN-β* 的 mRNA 水平在感染后 1 d 达到峰值，为对照组的 11.5 倍，随后与 1 d 相比呈逐渐下降趋势；而 *IFN-γ* 的

mRNA 水平在感染后 7 d 达到峰值，为对照组的 14.6 倍。

3 讨论

IBV 每年都在全球范围以局部暴发或季节性流行的方式引起流感的发生，约占全球流感疾病负担的 1/3^[26]，对全球公共卫生提出巨大挑战。IBV 主要通过改变 HA 抗原性以逃避宿主的免疫系统，从而在普通人群中引起反复流行^[27]。研究表明，只有发生在 HA1 区的抗原决定区和受体结合位点及其周围的点突变，才有可能造成流感病毒抗原改变，引发新的流感流行。据报道，HA 片段 162-164 位是决定 Victoria 谱系 IBV 的抗原性的关键氨基酸位点，该位点缺失 2 个或 3 个氨基酸后均能引起抗原性改变^[28]。

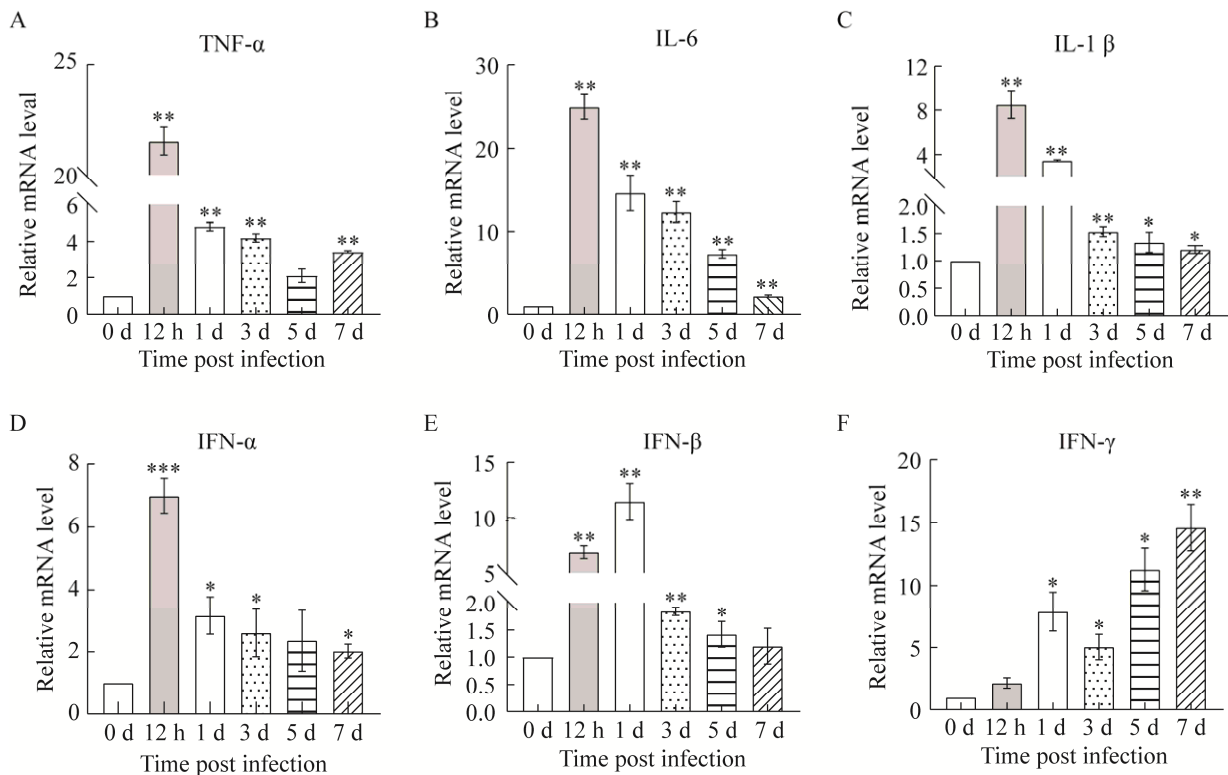


图8 IBV感染后小鼠肺脏细胞因子 mRNA 水平
Figure 8 The mRNA transcription level of cytokines in lungs infected by IBV. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

在本文中,我们将研究毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与另外 3 个疫苗株的 HA1 区域氨基酸差异位点进行了比较(表 3)。其中, B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与 B/Brisbane/60/2008 162-164 位均无缺失,因此推测 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与 B/Brisbane/60/2008 抗原性相似; B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株 B/Washington/02/2019 (162-164 位缺失)和 B/Colorado/06/2017 (163-164 位缺失)相比,抗原性可能发生了改变。

除 HA 的抗原性外,HA 与受体的亲和性对病毒的感染也至关重要。已有报道表明,IBV HA 片段的 F95Y、G141E、R162M、D196Y、N197S 和 G141R/G237E 突变均可影响 HA 与受体的亲和性。其中, F95Y、R162M、D196Y 和 N197S 突变能增强 HA 与受体的亲和性(N194D 和 N197S 主要增强 HA 与 α -2,3 唾液酸受体的结合性, F95Y 主要增强 HA 与 α -2,3 唾液酸受体的结合性),而 G141E 和 G141R/G237E 突变则可显著降低 HA 与受体的亲和性(G141R/G237E 主要降低 HA 与 α -2,6 唾液酸受体的结合性)^[29-33]。本研究毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株 B/Brisbane/60/2008 和 B/Washington/02/2019 之间存在 S197N 的突变,使该处增加 1 个糖基化位点,因此推测 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 HA 对 α -2,3 唾液酸受体的亲和性会更弱。B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 与疫苗株 B/Colorado/06/2017 相比,影响 HA 与受体结合的关键氨基酸并没有改变,因此推测 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 的 HA 与受体的亲和性也未发生改变。

NA 是 B 型流感病毒药物的作用靶点。据 WHO 检测数据,目前与 IBV 耐药相关的突变位点有 R152K、D198E、D198N、I122T、N294S 和 G402S 等^[34]。另外 Bumham 等通过反向遗传

技术发现了 E199A 和 H274Y 的突变可以降低病毒对药物的敏感性^[35]。Fujisaki 等发现非 NA 酶活性区域的 E105K 突变病毒也可降低对神经氨酸酶抑制剂类药物的敏感性,由于该突变位点位于单体边缘,可能降低氢键的结合能量,影响四聚体结构的稳固性^[36]。本研究中 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 毒株的 NA 序列中酶催化活性位点和辅助位点无耐药性突变,推测对神经氨酸酶抑制剂类药物敏感。

随着对 IBV 研究的深入,建立稳定的 IBV 小鼠感染模型尤为重要,有研究通过 B/Lee/40 毒株在小鼠体内连续传代,建立鼠适应株,用于构建 IBV 小鼠感染模型,但要求感染剂量较高且感染后难致死^[37]。还有研究通过使用免疫抑制剂或基因敲除降低小鼠天然免疫^[38],提高病毒复制能力的方法来建立 IBV 小鼠感染模型。除此之外,也有通过在小鼠体内多次传代筛选出鼠致死性病毒毒株的报道^[19]。本研究用 IBV Victoria 谱系的临床毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 感染小鼠,发现小鼠高度易感且出现死亡,感染小鼠肺部出现典型病变和炎症,如肺泡结构破坏严重、炎性细胞浸润、巨噬细胞和中性粒细胞增加等。另外,感染不同时间后小鼠肺中炎性细胞因子 *TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 和干扰素 *IFN- α* 、*IFN- β* 和 *IFN- γ* 转录水平显著上调,这与 IBV 可通过视黄酸诱导基因蛋白 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) 介导的信号传导刺激机体产生天然免疫应答,从而引发宿主大量炎症因子、干扰素及干扰素诱导基因等免疫因子的表达的研究结果一致^[39]。其中促炎因子 *TNF- α* 和 *IL-6* 等招募巨噬细胞和中性粒细胞到病毒感染的肺部,引起肺部发生急性炎症反应,从而造成肺部急性损伤,增强疾病程度,甚至引起宿主死亡^[40-42]。

本研究对临床毒株 B/Guangxi-Jiangzhou/

1352/2018 的 HA、NA 的核苷酸和氨基酸分别进行了遗传进化和突变位点比对分析,为评估抗原进化、发现新的突变基因和流感病毒的防控提供参考;另外,本研究还就 B/Guangxi-Jiangzhou/1352/2018 对小鼠的致病性进行了分析,发现该毒株对小鼠高度易感且可致死,并建立了小鼠体内感染模型,为阐明 IBV 的致病机制和抗 IBV 药物、疫苗评价奠定基础。

REFERENCES

- [1] Hause BM, Collin EA, Liu RX, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio*, 2014, 5(2): e00031-14.
- [2] Smith DB, Gaunt ER, Digard P, et al. Detection of influenza C virus but not influenza D virus in Scottish respiratory samples. *J Clin Virol*, 2016, 74: 50-53.
- [3] Moussi AE, Pozo F, Kacem MABH, et al. Virological surveillance of influenza viruses during the 2008-09, 2009-10 and 2010-11 seasons in Tunisia. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74064.
- [4] Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, 288(5468): 1051-1053.
- [5] Ramis AJ, Van Riel D, Van De Bildt MWG, et al. Influenza A and B virus attachment to respiratory tract in marine mammals. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(5): 817-820.
- [6] McCullers JA, Hayden FG. Fatal influenza B infections: time to reexamine influenza research priorities. *J Infect Dis*, 2012, 205(6): 870-872.
- [7] Özkaya PY, Turanlı EE, Metin H, et al. Severe influenza virus infection in children admitted to the PICU: comparison of influenza A and influenza B virus infection. *J Med Virol*, 2022, 94(2): 575-581.
- [8] Heikkinen T, Ikonen N, Ziegler T. Impact of influenza B lineage-level mismatch between trivalent seasonal influenza vaccines and circulating viruses, 1999-2012. *Clin Infect Dis*, 2014, 59(11): 1519-1524.
- [9] 张瑶, 舒跃龙, 王大燕. B 型流感病毒相关研究进展. *疾病监测*, 2017, 32(2): 153-156.
Zhang Y, Shu YL, Wang DY. Progress in research of influenza B virus. *Dis Surveillance*, 2017, 32(2): 153-156 (in Chinese).
- [10] Francis T Jr. A new type of virus from epidemic influenza. *Science*, 1940, 92(2392): 405-408.
- [11] Tafalla M, Buijssen M, Geets R, et al. A comprehensive review of the epidemiology and disease burden of Influenza B in 9 European countries. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(4): 993-1002.
- [12] 何兰, 何军, 俞俊岭, 等. 2017-2018 年安徽省乙型流感病毒病原学特征分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018, 32(5): 479-483.
He L, He J, Yu JL, et al. Virological characteristics of influenza B virus isolated in Anhui province during 2017-2018 surveillance year. *Chin J Exp Clin Virol*, 2018, 32(5): 479-483 (in Chinese).
- [13] Lamb RA, Choppin PW. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 467-506.
- [14] Chen RB, Holmes EC. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. *J Mol Evol*, 2008, 66(6): 655-663.
- [15] Dudas G, Bedford T, Lycett S, et al. Reassortment between influenza B lineages and the emergence of a coadapted *PB1-PB2*-HA gene complex. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(1): 162-172.
- [16] Nerome R, Hiromoto Y, Sugita S, et al. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch Virol*, 1998, 143(8): 1569-1583.
- [17] McCullers JA, Wang GC, He S, et al. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J Virol*, 1999, 73(9): 7343-7348.
- [18] 杨子峰, 杨春光, 王玉涛, 等. 从乙型流感病毒流行株中筛选获得鼠肺适应株的研究. *第三军医大学学报*, 2014, 36(5): 446-449.
Yang ZF, Yang CG, Wang YT, et al. Screening of mouse-lung adapted strain from clinical influenza B viruses. *J Third Mil Med Univ*, 2014, 36(5): 446-449 (in Chinese).
- [19] 张海亮, 冯俊霞, 肖冬光, 等. B 型流感病毒小鼠致死模型的建立. *军事医学*, 2017, 41(1): 53-57.
Zhang HL, Feng JX, Xiao DG, et al. Establishment of a lethal mouse model of influenza B virus. *Mil Med Sci*, 2017, 41(1): 53-57 (in Chinese).
- [20] Wang QH, Cheng F, Lu MY, et al. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol*, 2008, 82(6): 3011-3020.
- [21] Wang QH, Tian X, Chen XR, et al. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin.

- PNAS, 2007, 104(43): 16874-16879.
- [22] Lin YP, Gregory V, Bennett M, et al. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res*, 2004, 103(1/2): 47-52.
- [23] Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(1): 3-10.
- [24] Shim JM, Kim J, Tenson T, et al. Influenza virus infection, interferon response, viral counter-response, and apoptosis. *Viruses*, 2017, 9(8): 223.
- [25] Jiang JW, Li J, Fan WH, et al. Robust Lys63-linked ubiquitination of RIG-I promotes cytokine eruption in early influenza B virus infection. *J Virol*, 2016, 90(14): 6263-6275.
- [26] Yang JR, Huang YP, Chang FY, et al. Phylogenetic and evolutionary history of influenza B viruses, which caused a large epidemic in 2011-2012, Taiwan. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47179.
- [27] Kanegae Y, Sugita S, Endo A, et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J Virol*, 1990, 64(6): 2860-2865.
- [28] Kato-Miyashita S, Sakai-Tagawa Y, Yamashita M, et al. Antigenic variants of influenza B viruses isolated in Japan during the 2017-2018 and 2018-2019 influenza seasons. *Influenza Other Respir Viruses*, 2020, 14(3): 311-319.
- [29] Ilyushina NA, Lee N, Lugovtsev VY, et al. Adaptation of influenza B virus by serial passage in human airway epithelial cells. *Virology*, 2020, 549: 68-76.
- [30] Lugovtsev VY, Smith DF, Weir JP. Changes of the receptor-binding properties of influenza B virus B/Victoria/504/2000 during adaptation in chicken eggs. *Virology*, 2009, 394(2): 218-226.
- [31] Ni FY, Mbawuiké IN, Kondrashkina E, et al. The roles of hemagglutinin Phe-95 in receptor binding and pathogenicity of influenza B virus. *Virology*, 2014, 450/451: 71-83.
- [32] Zhang Y, Wen LY, Zhao X, et al. Antigenic and genetic study of influenza virus B circulated in China in 2004-2005. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2006, 20(2): 11-13.
- [33] 张焯, 温乐英, 赵翔, 等. 2004-2005年中国B型流感病毒抗原性及基因特性研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2006(2): 11-13.
- Zhang Y, Wen LY, Zhao X, et al. Antigenic and genetic study of influenza virus B circulated in China in 2004-2005. *Chin J Exp Clin Virol*, 2006(2): 11-13 (in Chinese).
- [34] Burnham AJ, Baranovich T, Govorkova EA. Neuraminidase inhibitors for influenza B virus infection: efficacy and resistance. *Antiviral Res*, 2013, 100(2): 520-534.
- [35] Burnham AJ, Armstrong J, Lowen AC, et al. Competitive fitness of influenza B viruses with neuraminidase inhibitor-resistant substitutions in a coinfection model of the human airway epithelium. *J Virol*, 2015, 89(8): 4575-4587.
- [36] Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, et al. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 429(1/2): 51-56.
- [37] Hai R, Martínez-Sobrido L, Fraser KA, et al. Influenza B virus NS₁-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach. *J Virol*, 2008, 82(21): 10580-10590.
- [38] Lai C, Struckhoff JJ, Schneider J, et al. Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UBE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection. *J Virol*, 2009, 83(2): 1147-1151.
- [39] Van De Sandt CE, Bodewes R, Rimmelzwaan GF, et al. Influenza B viruses: not to be discounted. *Future Microbiol*, 2015, 10(9): 1447-1465.
- [40] Dai JP, Gu LM, Su Y, et al. Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF-κB pathways. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 177-187.
- [41] Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, Herpes, and Sindbis viruses. *PNAS*, 2007, 104(4): 1371-1376.
- [42] Woo PCY, Tung ETK, Chan KH, et al. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. *J Infect Dis*, 2010, 201(3): 346-353.

(本文责编 陈宏宇)