

甲型H1N1 流感病毒北美毒株的分子特征

武斌^{*}, 王承民^{*}, 董国英^{*}, 罗静^{*}, 赵宝华^{*}, 何宏轩[†]

中国科学院动物研究所动物生态与保护生物学院重点实验室, 国家野生动物疫病研究中心, 北京 100101;

中国科学院研究生院, 北京 100049;

河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

^{*} 同等贡献[†] 联系人, E-mail: hehx@ioz.ac.cn

2009-05-07 收稿, 2009-05-21 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2007BC109103)、中国科学院知识创新工程(批准号: KSCX2-YW-N-063)和国家自然科学基金(批准号: 30671576)资助项目

摘要 以 10 个甲型流感病毒北美毒株的基因 *PB2*, *PB1*, *PA*, *HA*, *NP*, *NA*, *NS* 和 *M* 进行遗传进化分析, 并用不同的软件对 *PB2*, *HA*, *NS1* 和 *M2* 蛋白氨基酸序列、糖基化位点及抗药性位点分析. 结果表明, 甲型流感病毒北美毒株的基因片段是一个来源于不同宿主、不同地域的重组株. *HA* 蛋白氨基酸序列分析表明, 北美毒株 *HA* 蛋白的裂解位点氨基酸序列均为 *IPSIQSR↓G*, 不具有高致病性流感病毒的特性, 同时 *NS1* 蛋白第 92 位氨基酸残基由天冬氨酸突变为谷氨酸(*Asp* → *Glu*), *PB2* 蛋白氨基酸序列的第 627 位均为谷氨酸(*E*), 这些特性表明对人具有明显的亲和性, 但推测对人具有较低的致病力. *M2* 蛋白的同源建模表明了北美毒株 *M2* 蛋白的药物敏感位点突变为抗药型位点, 推测北美毒株具有抗金刚烷胺类药物的结构特点, *NA* 蛋白序列分析表明了北美毒株仍然对神经氨酸酶抑制剂类药物敏感. 这些研究结果对于我国预防和控制甲型流感北美毒株具有重要的参考价值.

关键词

甲型 H1N1 流感病毒
H1N1 亚型
分子特征
北美

A 型流感病毒是一类重要的病原体, 能够感染不同的宿主, 包括人类、猪、海洋哺乳动物和禽类^[1]. 根据两种不同表面糖蛋白血凝素(*HA*)和神经氨酸酶(*NA*), 可分为不同亚型. A 型流感病毒的某些亚型对特定宿主具有感染力, 感染人类的有 H1N1, H3N2, H2N2 和 H1N2, 感染猪的有 H1N1, H3N2 和 H1N2^[2]. 根据病毒对鸡的致病力强弱, 又将 A 型流感病毒分为低致病性和高致病性的病毒. A 型流感病毒中亚型 H1, H2 和 H3 通常是低致病性的, 能够感染动物和人类,

但也有可能通过 *HA1* 区和 *HA2* 区之间的连接肽中的多种碱性氨基酸的基因突变, 变成高致病性的病毒株.

H1N1 亚型流感病毒是人类最常见的流感病毒. 1918 年由 H1N1 亚型病毒引起的流感大流行, 造成 5000~10000 万人死亡, 被认为迄今为止人类历史上最致命一次流行^[1]. 1977~1978 年, 前苏联的流感流行是由 A/USSR/90/77(H1N1)病毒株引起的, 它主要感染儿童和 23 岁以下的青少年, 原因可能是在 1947~1957 年

1) Anonymous. 1918 Influenza A (H1N1) fact sheet. The Federation of American Scientists.
<http://www.fas.org/programs/ssp/bio/factsheets/H1N1factsheet.html>

引用格式: 武斌, 王承民, 董国英, 等. 0B 甲型 H1N1 流感病毒北美毒株的分子特征. 科学通报, 2009, 54: 1661~1672

Wu B, Wang C M, Dong G Y, et al. Molecular characterization of H1N1 influenza A viruses from human cases in North America. Chinese Sci Bull, 2009, 54: 2179–2192, doi: 10.1007/s11434-009-0421-y

流行期间,大多数成年人获得了免疫力¹⁻⁴⁾。此外分别在1976, 1988, 1998和2007年,屡次发生人类感染猪流感的事件。其实,弱毒H1N1病毒株一直存在,很大程度上会引起季节性流感。然而H1N1病毒却普遍存在于猪和家禽⁵⁾。

美国的专家猜测,在2009年爆发的A型H1N1流感,其病毒的基因片段可能来源于不同的流感病毒,其中包括北美墨西哥流感病毒、北美禽流感病毒,人类流感病毒和猪流感病毒,它可能是一个重组病毒⁶⁾。起初,世界动物卫生组织(OIE)把它定为“北美流感”⁷⁾,后来又改为“H1N1流感”⁸⁾。该病毒的遗传特征表明血凝素(HA)基因与1999年猪流感病毒相似,但神经氨酸酶(NA)和M蛋白基因却与欧洲猪流感病毒基因相似。然而,美国猪流感病毒的8个基因片段中,6个基因片段的来源不同,包括猪流感病毒基因片段、禽流感病毒基因片段和人类流感病毒基因片段^{9,10)}。然而整个病毒分子特征仍然不清楚。

本研究将对甲型H1N1流感病毒北美毒株的基因PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, NS和MP进行遗传进化分析,并用不同的软件对PB2, HA, NS和M2蛋白氨基酸序列、糖基化位点及抗药性位点进行分析。

1 材料与方法

() 遗传进化分析。从GenBank数据库中获得A/California/06/2009(H1N1)毒株的全基因8个片段的序列(PB2(FJ966963), PB1(FJ966965), PA(FJ966964), HA(FJ966960), NP(FJ966961), NA(FJ971075), NS(FJ971074), M(FJ966962))(表1),应用MEGA4.0进行多重序列比对,并利用Phylip3.67软件构建系统发育树^[3],所用算法包括邻接法(Neighbor-

Jioning, NJ)、自展值(bootstrap)为1000、最大似然法(Maximum-Likelihood, ML)以及自展值(bootstrap)为100。

() 病毒蛋白的氨基酸序列分析。从GenBank数据库中获得10个甲型流感北美毒株的HA, PB2, NS1和M2蛋白的氨基酸序列(表2),利用Clustal W^[4]进行多重序列比对,分析基因功能位点。

() N-糖基化位点。利用N-糖基化位点预测软件NetNGlyc1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)在线分析HA蛋白的N-糖基化位点。

() 抗药性突变位点的分析。利用SWISS-MODEL^[5](<http://swissmodel.expasy.org/>)对M2蛋白进行同源建模,预测抗药性突变位点的空间位置,并通过VMD软件显示模型^[6]。

2 结果

2.1 甲型H1N1流感病毒北美毒株的来源具有多样性

系统发育树构建(图1)和遗传距离计算(表3),我们可以清楚地看出,甲型H1N1流感病毒的各个核酸片段来源不同。NP片段与美洲猪源毒株具有很明显的亲缘关系,NP与A/Swine/Iowa/533/99(H3N2), A/swine/Korea/CY05/2007(H3N2)和A/Swine/Indiana/P12439/00(H1N2)据有较高的同源性(96%)。NA片段与欧洲猪源毒株也具有很明显的相似性,NA与A/Swine/England/195852/92(H1N1), A/swine/Spain/WVL6/1991(H1N1)和A/swine/England/WVL7/1992(H1N1)具有较高的同源性(94%)。但有些片段的来源就较难分辨,比如PB1片段同时与美洲的猪源毒株、人源毒株和禽源毒株都具有相当高的同源性,PB1与A/Wisconsin/10/98(H1N1), A/Swine/Indiana/9K035/

1) Anonymous. Interactive health timeline box 1977: Russian flu scare, CNN

2) Anonymous. Invasion from the Steppes. Time, 1978-2-20. <http://www.time.com/time/magazine/article/0,9171,948035,00.html>

3) Anonymous. Pandemic Influenza subsection Recent Pandemic Flu Scars. Global Security, http://www.globalsecurity.org/security/ops/hsc-scen-3_pandemic-influenza.htm

4) Anonymous. Russian flu confirmed in Alaska. Epidemiology, 1978-04-21. http://www.epi.hss.state.ak.us/bulletins/docs/b1978_09.htm

5) CDC. Flu view. A weekly influenza surveillance report prepared by the influenza division. 2008-2009 Influenza Season Week 18 ending May 9, 2009. <http://www.cdc.gov/flu/weekly/>

6) MacKenzie D. Deadly new flu virus in US and Mexico may go pandemic. New Scientist. 2009-04-28. <http://www.newscientist.com/article/dn17025-deadly-new-flu-virus-in-us-and-mexico-may-go-pandemic.html>

7) Anonymous. A/H1N1 influenza like human illness in Mexico and the USA: OIE statement. 2009-4. http://www.oie.int/eng/press/en_090427.htm

8) Renaming of strain to Influenza A (H1N1). WHO. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>

9) Watts S. Experts concerned about potential flu pandemic. BBC, 2009-04-25 http://www.bbc.co.uk/blogs/newsnight/susanwatts/2009/04/experts_concerned_about_potential.html

10) Niman H. at FluTrackers has described the homologies of the genes as PB2 Avian North America, PB1 Human circa 1993, PA Swine Eurasia and/or North America, HA Swine North America, NP Swine Eurasia and/or North America, NA Swine Eurasia, MP Swine Eurasia, NS Swine Eurasia and/or North America

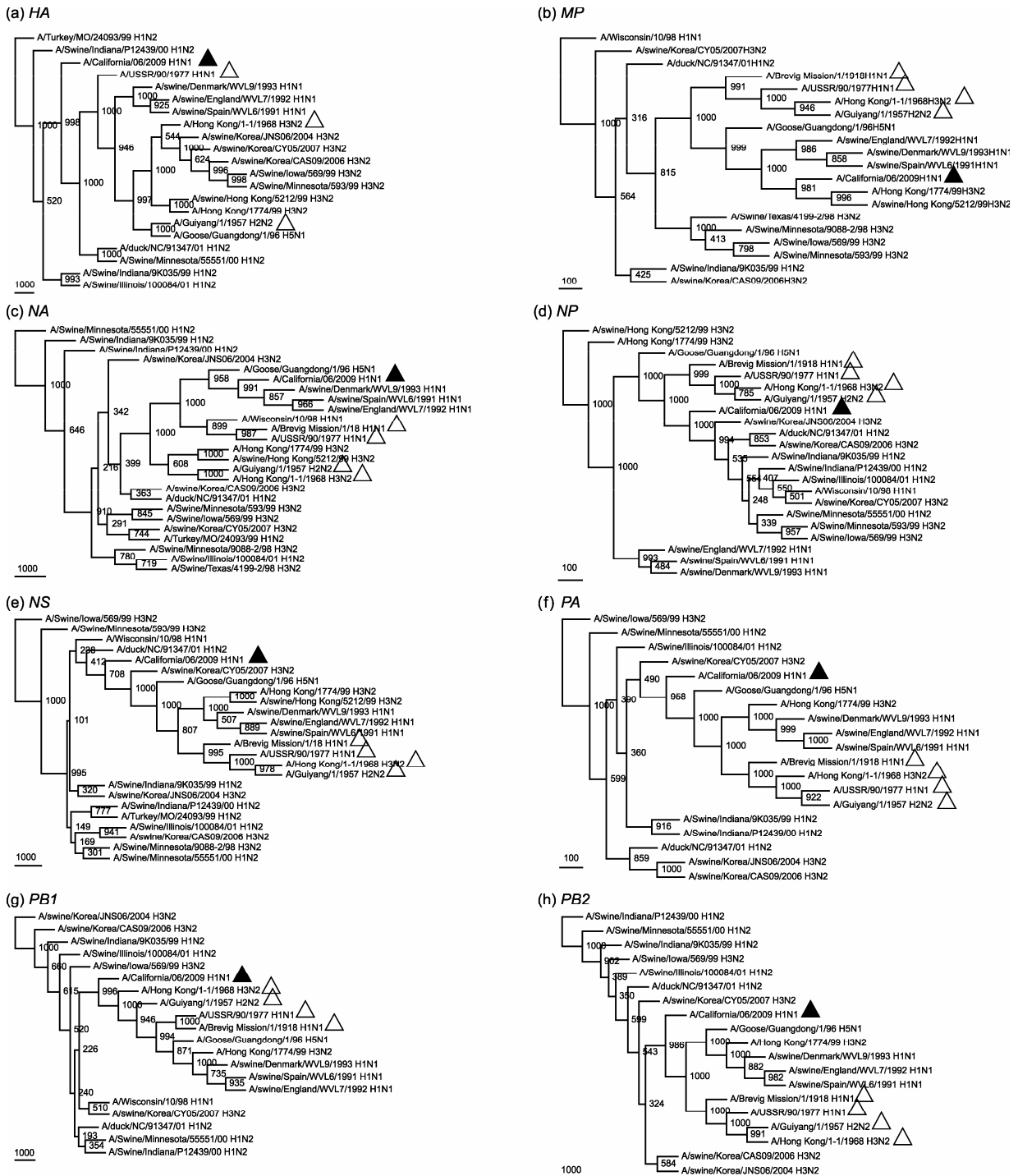


图 1 甲型流感北美毒株与相关参考毒株的 HA, NA, NP, M, NS, PB2, PB1 和 PA 基因的遗传进化树
黑三角表示甲型流感北美毒株的代表 A/California/06/2009(H1N1), 空心三角表示 20 世纪 4 次流感的流行毒株

99 (H1N2)和 A/mallard duck/South Dakota/Sg-00125/2007(H3N2)据有较高的同源性(96%)。M 片段与香港人源毒株、香港猪源毒株和丹麦猪源毒株具有相当高的同源性, M 与 A/swine/Hong Kong/5212/99 (H3N2),

A/Hong Kong/1774/99(H3N2)和 A/swine/Denmark/WVL9/1993(H1N1)具有较高的同源性(97%)。其他片段如 PB2 与 A/swine/Korea/JNS06/2004(H3N2), A/Swine/Minnesota/55551/00(H1N2)和 A/mallard duck/

South Dakota/Sg-00128/2007 都具有较高的同源性(98%); PA 与 A/Swine/Illinois/100084/01(H1N2), A/Swine/Minnesota/593/99(H3N2)和 A/Swine/Iowa/569/99(H3N2)具有较高的同源性(96%); HA 与 A/Swine/Indiana/P12439/00(H1N2), A/Swine/Indiana/9K035/99(H1N2)和 A/Turkey/MO/24093/99(H1N2)具有较高的同源性(95%); NS 与 A/Swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2), A/Swine/Texas/4199-2/98(H3N2)和 A/swine/Korea/CAS09/2006(H3N2) 具有较高的同源性(96%)。由此可见甲型流感病毒在它的进化来源上具有相当大的多样性。同源毒株在地理分布上包括了美洲、欧洲和东亚;在宿主分布上包括了人源、猪源和禽源,在病毒血清型上包括了 H1N1, H1N2 和 H3N2。同时我们也可以看到,此次流行的新型流感与 20 世纪人类 4 次大流感的病毒遗传距离较远,同源性差,而且与 H5N1 新高致病性禽流感的遗传距离也比较远。

2.2 甲型流感病毒北美毒株具有明显对人的亲和力

通过 NetNGlyc1.0 对 A/California/06/2009(H1N1) 毒株的 HA 蛋白序列分析,我们发现在 HA 蛋白上存在 8 个 N-糖基化位点(图 2),其中 HA1 上有 6 个,处于 27, 28, 40, 104, 293 和 304 位;HA2 上有两个糖基化位点,处于 498 和 557 位点,以上 N-糖基化位点,均非新近出现,在我国 2001 年分离到的猪流感 A/swine/Guangdong/2/2001(H1N1)具有与之完全相同的糖基化位点。HA 蛋白第 240 位除了 A/California/07/2009(H1N1)毒株为未明确指定的 X 外,其余皆为谷氨酰胺(Gln, Q),符合与人具有明显亲和力的 SA α 2, 6Gal 的特征。

2.3 甲型流感病毒北美毒株对人具有低致病力

目前,我们对GenBank注册的 10 个甲型H1N1 流感病毒北美毒株的NS1 蛋白进行分析,它们具有 100%同源性(图 3)。在NS1 蛋白氨基酸序列中,第 92 位氨基酸残基为天冬氨酸,蛋白的羟基末端没有 ESEV-COOH或EPEV-COOH序列。在禽源的高致病性毒株中,NS1 蛋白的羟基末端常会出现这种 4 个氨基酸残基的结构(ESEV-COOH或EPEV-COOH),经证实这个结构能与多个细胞内的受体(PDZ)结合,使得细胞信号转导通路受阻,影响细胞的生理功能,最终使宿主细胞死亡。因此这种羟基末端 4 个氨基酸的结构被认为是重要的毒力因素,但是在我们所分析的甲型流感病毒北美毒株的NS1 蛋白序列里都没有这个结构^[7]。有研究表明,流感病毒对IFN等细胞因子

抗病毒效应的抗性也与病毒对人的致病力有关,而这种抗性就体现在NS1 蛋白第 92 位氨基酸残基由天冬氨酸突变为谷氨酸(Asp $\rightarrow$ Glu),病毒获得此突变就能表现出对IFN等细胞因子的耐受性增强^[8]。同样在我们所分析的甲型流感病毒北美毒株的NS1 蛋白的氨基酸序列也无此突变。此外,我们又对甲型H1N1 流感病毒北美毒株的PB2 蛋白进行分析,发现第 627 位都为谷氨酸(图 4)。在PB2 蛋白氨基酸序列的第 627 位存在两种氨基酸谷氨酸(E)或赖氨酸(K)。若此位点为赖氨酸(K)时,病毒表现出对小鼠的强毒性,可导致小鼠全身各系统感染致病,若此位点为谷氨酸(E)时则对小鼠表现出弱毒性,只能感染小鼠的呼吸系统^[9]。我们所分析的甲型H1N1 病毒北美毒株均为谷氨酸(E),因此我们推测这些毒株应该表现弱毒性。其实,从甲型流感病毒北美毒株HA蛋白的裂解位点氨基酸序列均为IPSIQSR↓G(图 2),高度保守,也不符合高致病性毒株的特点。因此,从HA, NS1 和PB2 蛋白的氨基酸序列的结构分析,推测甲型流感病毒北美毒株对人具有低致病力。

2.4 抗药性分析

M2 蛋白为流感病毒的离子通道蛋白(图 5),其 37 和 41 位氨基酸为离子通道的活性核心部位^[10]。对甲型流感病毒北美毒株的M2 蛋白的氨基酸序列分析表明,第 31 位氨基酸残基为天冬氨酸(Asn, N),第 30 位氨基酸残基为丙氨酸(Ala, A),第 27 位氨基酸残基为缬氨酸(Val, V),第 26 位氨基酸残基为亮氨酸(Leu, L)。在流感病毒中,第 31 位氨基酸位点公认为抗药性位点,甲型流感病毒北美毒株的这个位点由敏感型的丝氨酸位点(S)突变为抗药型的天冬酰胺位点(N)。这个位点的突变影响了金刚烷胺类药物与第 37 和第 41 位氨基酸位点的结合,从而使药物起不到抑制病毒的作用。同时,有报道认为,第 26, 27, 30, 31 位(图 5)的氨基酸的定向突变可导致金刚烷胺类药物不能结合,使病毒具备抗药性。此外,又对NA蛋白氨基酸序列分析表明,在第 119 位(E)、152 位(R)、275 位(H)、293 位(R)、295 位(N)位点的氨基酸残基均未发生突变,恰好这些位点是N1 亚型流感病毒对神经氨酸酶抑制剂类药物如达菲敏感位点^[11~13]。故此我们认为,北美毒株对金刚烷胺类药物具有耐药性,而对神经氨酸酶抑制剂类药物不具抗性,这也就是北美流感发生后用达菲药物治疗有效的原因。

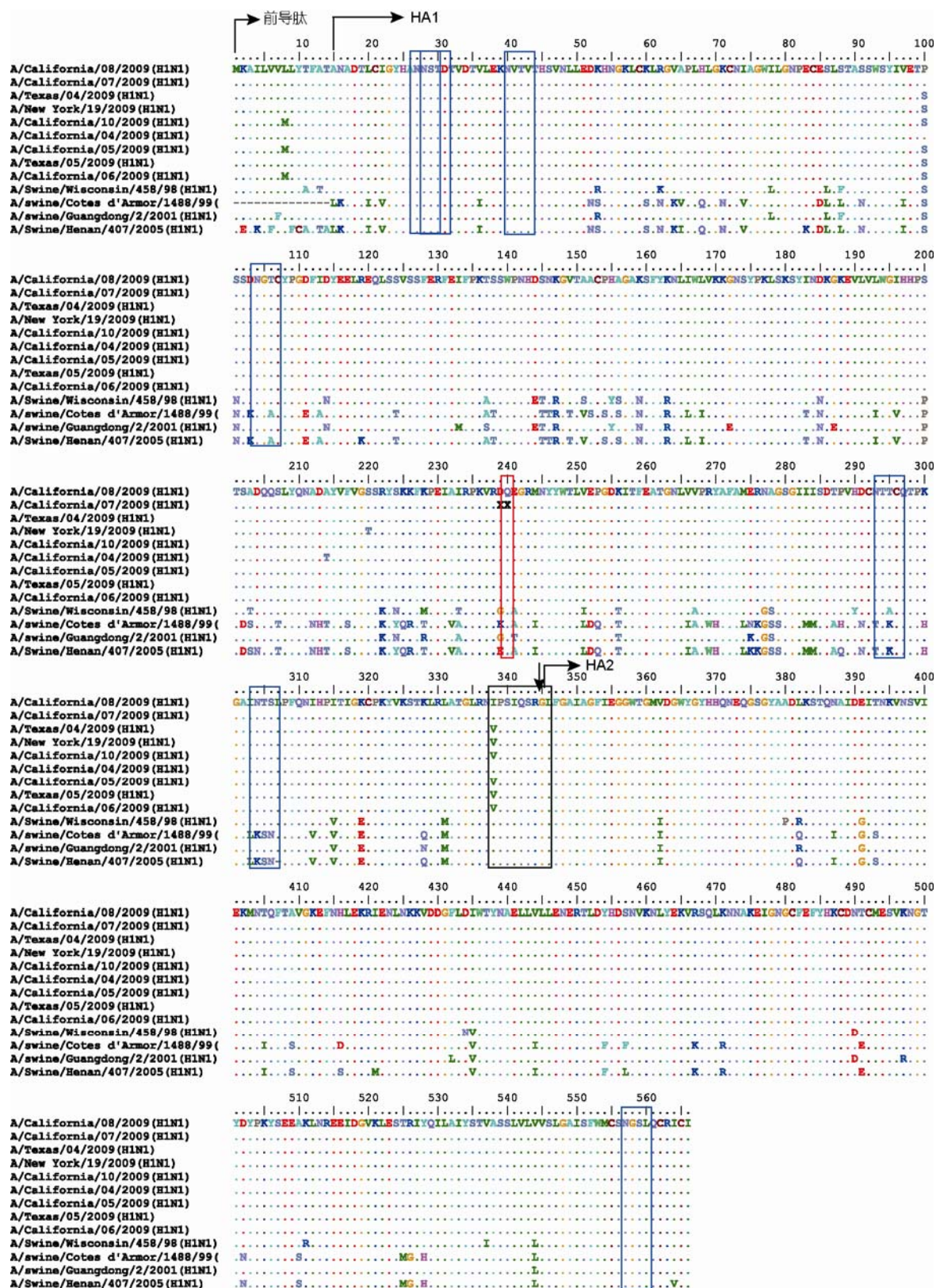


图2 A/California/06/2009(H1N1)毒株与其他参考毒株 HA 蛋白的序列比较

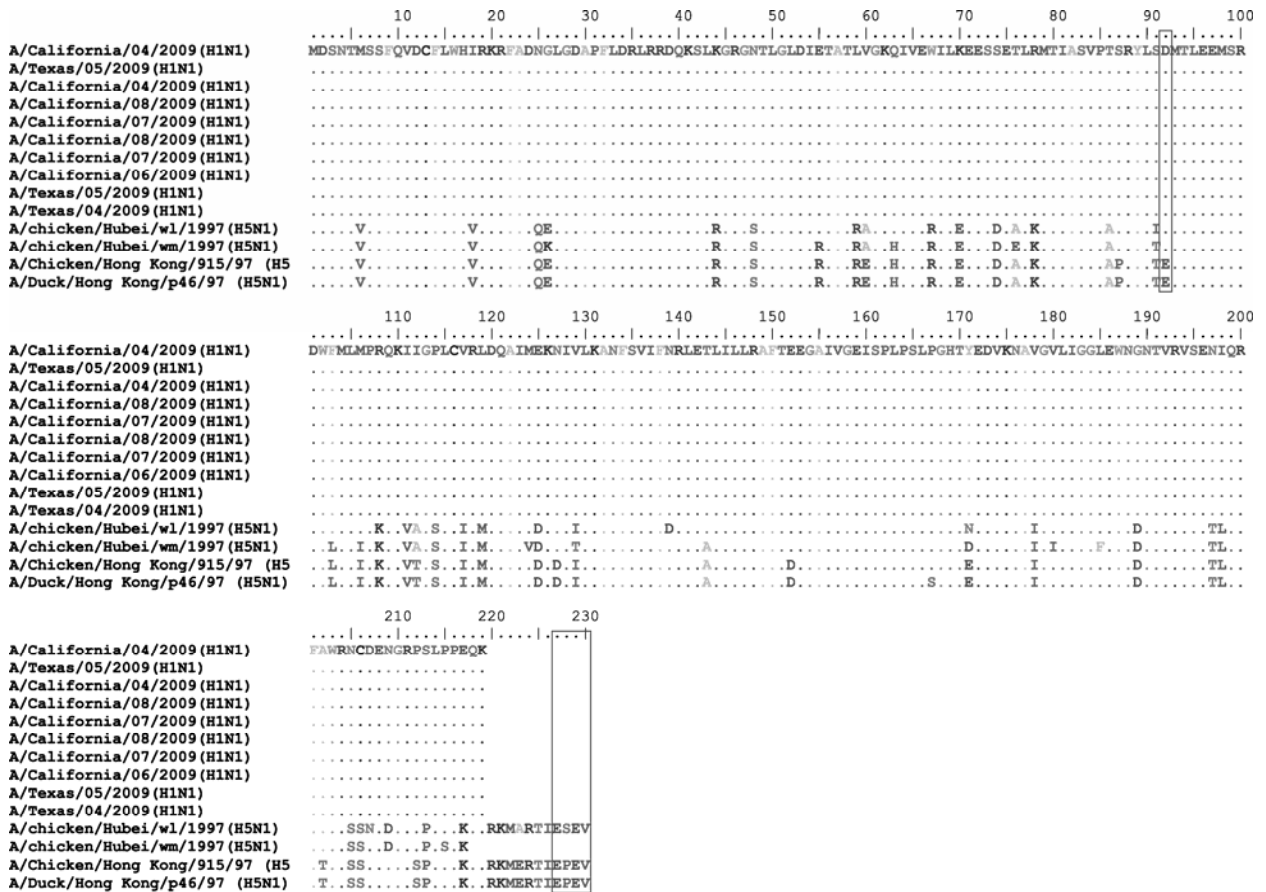


图3 A/California/06/2009(H1N1)毒株与其他参考毒株 NS1 蛋白的序列比较

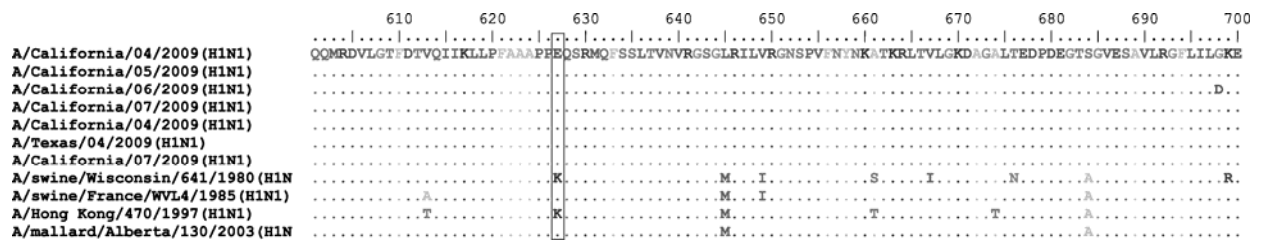


图4 A/California/06/2009(H1N1)毒株与其他参考毒株 PB2 蛋白的序列比较

3 讨论

我们研究发现, 所有 2009 年北美地区 10 株人类病例分离的病毒具有完全相同的 8 基因片段序列。因此, 我们选择了 A/California/06/2009(H1N1)分离作为代表, 与其他参考序列进行进一步的分析。A/California/06/2009(H1N1)分离株与 24 个来自北美、欧洲和亚洲的参考病毒株进行比较, 其中与来自美国的 H1N2 分离株 A/Swine/Indiana/P12439/00(H1N2)

的遗传距离最小。根据其他基因比较的结果, 也表明了不同的基因来源不同。系统进化发育分析的结果显示, 虽然大部分的基因与猪流感病毒谱系有比较密切的亲缘关系, 但是所有 8 个基因则分散在猪流感、禽流感和人类流感 3 个不同的流感病毒系中。因此, 所有 10 个北美 H1N1 病毒株是重组的病毒, 分别来源于 H1N2, H3N2 和 H1N1 流感病毒。我们的结果与相关文献^[14]报道的类似。

1) MacKenzie D. Deadly new flu virus in US and Mexico may go pandemic. New Scientist. 2009-04-28. <http://www.newscientist.com/article/dn17025-deadly-new-flu-virus-in-us-and-mexico-may-go-pandemic.html>

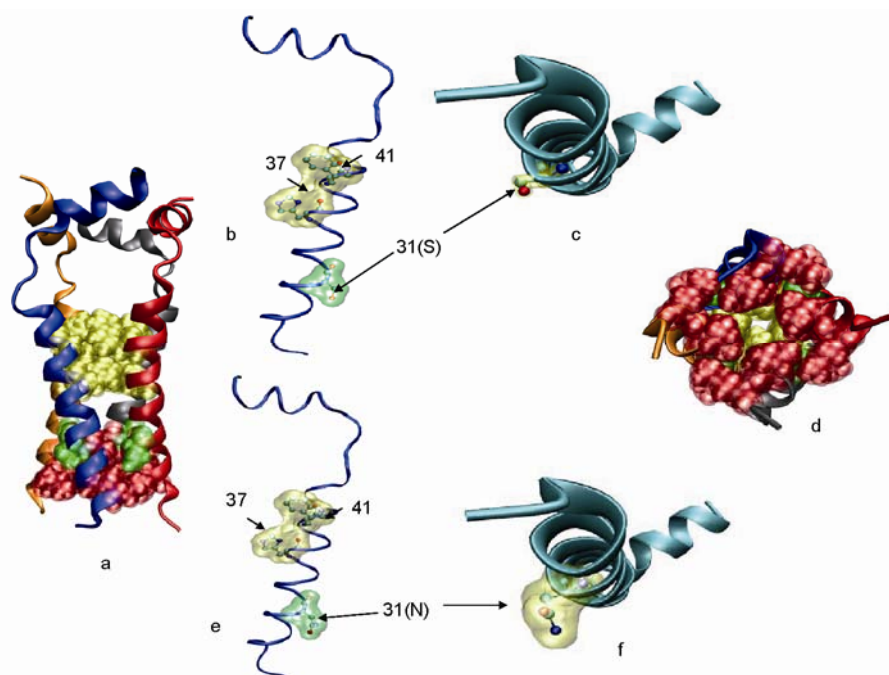


图5 M2蛋白四聚体的空间结构

a, M2蛋白主视图; d, M2蛋白仰视图. 敏感型结构中第31(S), 37(H), 41(W)位氨基酸位点的排布主视图(b)和仰视图(c); 抗药型结构中第31(S), 37(H), 41(W)位氨基酸位点的排布主视图(e)和仰视图(f). 绿色表示第37和第41位的分子表面, H^+ 离子通道的核心部位; 黄色表示第26, 27, 30, 31位的氨基酸位点, 是影响金刚烷类药物结合的位点

HA基因的HA1区比HA2区具有较高的变异率, 这可能是由于它的受体结合特性和它能够与中和抗体结合. 受体结合位点的残基相对保守, 但主要负责NeuAc α 2^[15,16]. 在我们的研究中, 在第131, 158, 160, 183, 187, 222和227位点的氨基酸残基并没有发生变化. 这些位点的氨基酸残基均位于受体结合位点(包括第158, 160和183位点)的侧翼^[17]. 在其他学者的研究中, 如果单个氨基酸残基变化, 如L226Q(受体结合特异性改变), 会使受体SA α 2,3Ga变成SA α 2,6Gal^[18], 从而改变病毒的宿主范围. 恰好在北美洲分离株A/California/07/2009(H1N1)第227位氨基酸残基是谷氨酰胺(Q), 这使得北美洲分离株获得了感染人的能力. 这一结果与北美流感H1N1传播的事实相符, 根据世界卫生组织发布, 截至2009年5月18日, 已有40个国家正式报告8829感染病例.

目前, 有两类抗流感病毒的药物: 一类是抑制M2蛋白的药物如金刚烷胺和金刚乙胺; 另一类是神经氨酸酶(NA)的抑制剂类药物, 如扎那米韦和奥司他韦^[19]. 这两类药物针对不同病毒蛋白, 具有不同的作用机制. 金刚烷胺和金刚乙胺通过阻断M2蛋白离

子通道而抑制病毒早期复制^[20,21], 而NA抑制剂则中断病毒的复制周期, 可防止病毒的释放, 影响病毒粒子对细胞表面的吸附^[17,22~24]. M2蛋白抑制剂对A型流感病毒不同亚型都具有抑制作用. 然而, 病毒对M2蛋白抑制剂的耐药性却会很快产生. 在我们的研究, 发现M2蛋白的第31位氨基酸残基S突变为N, 从而失去了对药物敏感的特性. 抗药性变异可以发生在第26, 27, 30, 31和34位的氨基酸残基上^[20,21], 若任何一个突变, 都会导致抗药性产生. 此外, 金刚烷胺抗药性产生并不影响毒力或传播特性的改变, 即M2蛋白突变后, 抗金刚烷胺抗性产生, 并不影响病毒的复制能力^[25,26]. 然而, 金刚烷胺抗药性的产生经常会发生在H3和H5亚型的变种病毒^[27,28].

扎那米韦和奥司他韦对所有流感病毒A型和B型的NA亚型都有效, 而且在临床试验中副作用很小^[19,29~31]. 与M2蛋白抑制剂不同的是, NA抑制剂类药物的抗药性出现的频率是比较低的. 众所周知, 流感毒株NA蛋白的第119, 152, 274, 292和294位点氨基酸残基构成了酶的活动中心^[31~34]. 在本研究中, 我们并没有发现NA蛋白的氨基酸序列发生突变. 所以, 可

断定这些北美毒株对NA抑制剂类药物不具抗药性,这与目前临床上仍然使用达菲药物治疗的事实是相符的。

NS基因编码的蛋白质为NS1和NS2。NS1蛋白仅在病毒感染的细胞中出现,并在细胞感染期间调节细胞的功能^[35]。大量证据表明,NS1蛋白通过抑制感染宿主细胞抗病毒基因的表达而发挥毒力作用,其中包括抑制干扰素(IFN),核因子- κ B(NF- κ B)以及RNA激活的蛋白激酶(PKR)途径等^[36-40]。PDZ结构域是一个模块化蛋白质相互作用结构域,可以特异性地与一个C-末端短肽(ESEV羧基)结合^[41]。含有PDZ结构域的蛋白质在许多关键信号通路中发挥重要作用,包括调节和转运膜蛋白,维持细胞极性和形态,调节神经细胞突触后介质的密度等。从1997~1999年香港爆发人类感染病例中分离的高致病性禽流感病毒,其NS1蛋白的C-末端短肽为EPEV,而从2003~2004年爆发于中国香港、越南和泰国的病例中分离的病毒,其NS1蛋白的C-末端短肽为ESEV。1918年大流行的病毒NS1蛋白的C-末端短肽为KSEV。最近发生的高致病性H5N1禽流感病毒的特点都是在病毒

的NS1蛋白C-末端带有明显的禽流感的特征,而以往低死亡率人类流感病毒(如在1957年和1968年)的特点是NS1蛋白C-末端为人流感的特征^[20]。我们研究2009年北美流感病毒株发现,它的NS1蛋白C-端没有“ESEV”结构。因此,认为北美流感分离株应该属于低致病性病毒。事实也证实了我们的推断,即此次流感到2009年5月18日为止,在8829病例中仅仅死亡74人。

4 结论

本研究通过对甲型流感北美毒株的全基因组的核苷酸序列分析表明来源的多样性,NS、PB2和HA的氨基酸序列分析表明,甲型流感北美毒株缺乏高致病性流感毒株的特征,但对人确实具有明显的亲和力,对M2蛋白氨基酸序列分析认为甲型流感北美毒株对经典抗流感药物金刚烷胺类药物具有耐药性,而NA蛋白的药物敏感型位点没有发生突变,故采用神经氨酸酶抑制剂类药物如达菲治疗北美流感仍然有效。这些研究结果对于我国预防和控制甲型流感北美毒株具有重要的参考价值。

参考文献

- Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992, 56: 152—179
- Peiris J S, de J, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 243—267[doi]
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1244—1245[doi]
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4673—4680[doi]
- Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3381—3385[doi]
- William H, Andrew D, Klaus S. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Grap*, 1996, 14: 33—38[doi]
- Gabriel G, Herwig A, Klenk H D. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e11[doi]
- Qi X, Li X, Rider P, et al. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China. *PLoS ONE*, 2009, 4: e4682[doi]
- Obenauer J C, Denson J, Mehta P K, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006, 311: 1576—1580[doi]
- Jackson D, Hossain M J, Hickman D, et al. A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4381—4386[doi]
- Atsushi O, Takashi M, Hideo T. Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza A virus. *Biochemistry*, 2001, 40: 6053—6060[doi]
- Suzuki H, Saito R, Masuda H, et al. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: Epidemiological study. *J Infect Chemother*, 2003, 9: 195—200[doi]
- Scholtissek C, Quack G, Klenk H D, et al. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res*, 1998, 37: 83—95[doi]

- 14 Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, 2009, [\[doi\]](#)
- 15 Parrish C R, Kawaoka Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59: 553—586 [\[doi\]](#)
- 16 Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531—569 [\[doi\]](#)
- 17 Weis W, Brown J H, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988, 333: 426—431 [\[doi\]](#)
- 18 Rogers G N, Paulson J C, Daniels R S, et al. Single amino acid substitutions in influenza hemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*, 1983, 304: 76—78 [\[doi\]](#)
- 19 Monto A S. The role of antivirals in the control of influenza. *Vaccine*, 2003, 21: 1796—1800 [\[doi\]](#)
- 20 Hay A J, Wolstenholm A J, Skehel J J, et al. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*, 1985, 4: 3021—3024
- 21 Pinto L H, Holsinger L J, Lamb L A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 1992, 69: 517—528
- 22 Madren L K, Shipman C, Hayden F G. *In vitro* inhibitory effects of combinations of anti-influenza agents. *Antivir Chem Chemother*, 1995, 6: 109—113
- 23 Varghese J H, McKimm-Breschkin J L, Caldwell J B, et al. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins*, 1992, 14: 327—332 [\[doi\]](#)
- 24 Von Itzstein M, Wu W Y, Kok G K, et al. Rational design of potent sialidase based inhibitors of influenza virus protection. *Nature*, 1993, 363: 418—423 [\[doi\]](#)
- 25 Hayden F G. Amantadine and rimantadine—clinical aspects. In: Richman D D, ed. *Antiviral Drug Resistance*. New York: Wiley, 1996. 59—77
- 26 Ziegler T, Hemphill M L, Ziegler M L, et al. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A viruses. *J Infect Dis*, 1999, 180: 935—939 [\[doi\]](#)
- 27 Bright R A, Medina M, Xu X, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: A cause for concern. *Lancet*, 2005, 366: 1175—1181 [\[doi\]](#)
- 28 Ilyushina N A, Govorkova E A, Webster R G. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology*, 2005, 341: 102—106 [\[doi\]](#)
- 29 Monto A S, Fleming D M, Henry D, et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections. *J Infect Dis*, 1999, 180: 254—261 [\[doi\]](#)
- 30 Lew W, Chen X, Kim C U. Discovery and development of GS4104 (oseltamivir): An orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem*, 2000, 7: 663—672
- 31 McKimm-Breschkin J L. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors —A review. *Antivir Res*, 2000, 47: 1—17 [\[doi\]](#)
- 32 McKimm-Breschkin J L. Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: Detection, incidence, and implications of drug resistance. *Treat Respir Med*, 2005, 4: 107—116 [\[doi\]](#)
- 33 Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: Descriptive study. *Lancet*, 2004, 364: 759—765 [\[doi\]](#)
- 34 Gubareva L V, Matrosovich M N, Brenner M K, et al. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis*, 1998, 178: 1257—1262 [\[doi\]](#)
- 35 Robert M K, Wei M Y, Diana L N, et al. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: The roles of the viral NS1 protein. *Virology*, 2003, 309: 181—189 [\[doi\]](#)
- 36 Stacey S C, Naomi D S, Gabriele N, et al. Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, 2001, 75: 7875
- 37 Adolfo G S, Andrej E, Demetrius M, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*, 1998, 252: 324—330 [\[doi\]](#)
- 38 Sang H S, Erich H, Robert G W. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res*, 2004, 103: 107—113 [\[doi\]](#)
- 39 Gary K G, Mirella S, Terrence M T, et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: The role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10736—10741 [\[doi\]](#)
- 40 Aleksandr S L, Samita A, Richard J W, et al. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: The role of cytokines and B- and T-cell responses. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1121—1130 [\[doi\]](#)
- 41 Morgan S, Carlo S. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 1—29 [\[doi\]](#)