

# 流感病毒 H3N2 神经氨酸酶双点突变对病毒抗药性影响的研究

董长颖, 韩冰孝

(吉林农业科技学院生物工程教研室, 吉林 132109)

**摘要:** 为验证流感病毒 H3N2 神经氨酸酶上 2 个抗药性的关键位点, 利用反向遗传学手段, 8 个质粒共同转染 293T 细胞, 包装带有双点突变(第 119 位氨基酸由 E 突变为 V, 第 222 位氨基酸由 I 突变成 L)、单点突变和野生型的流感病毒 H3N2; 在 MDCK 细胞中传代包装成的 H3N2 病毒, 检测不同感染时间和有无抗流感病毒药物(奥司他韦)存在下病毒的滴度。结果表明, 野生流感病毒 H3N2 和其突变株包装成功, 第 119 位氨基酸单点突变型滴度与野生型的相近, 而第 222 位氨基酸单点突变和双突变型滴度要比野生型的低; 双点突变株相比野生株具有很高的抗奥司他韦的生物活性, 而单点突变型不具有抗药活性。本试验成功证明了 H3N2 神经氨酸酶上 2 个位点(第 119 和 222 位氨基酸)对病毒抗药性起到关键的作用, 且只有双点同时突变的条件下, 病毒才会有抗奥司他韦的生物活性。

**关键词:** 流感病毒, H3N2; 神经氨酸酶 NA; 抗药性; 反向遗传学

中图分类号: R373.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)08-1260-06

## The Two Key Sites Responsible for Drug Resistance in H3N2 Neuraminidase Gene

DONG Chang-ying, HAN Bing-xiao

(College of Bioengineering, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132109, China)

**Abstract:** To determine the key sites responsible for drug resistance in H3N2 neuraminidase gene, H3N2 wild type and three mutation type (E119D+I222L, E119D and I222L) viruses were generated by reverse genetics; The reverse genetics viruses were stable after five passages in MDCK cells; Oseltamivir resistance was detected by analyzing the kinetics of the two types of viruses in MDCK cells in the absence or in the presence of oseltamivir at the indicated times. We successfully generated H3N2 wild type and mutation type viruses; The wild type had a similar virus titer with the mutation type E119D; The virus titer of E119D+I222L and I222L type were lower than the wild type; The mutation type E119D+I222L had a high oseltamivir resistance while the wild type, E119D type and I222L type were greatly inhibited by oseltamivir. These results indicated that double mutation (E119D+I222L) type H3N2 could induce a high level of oseltamivir resistance. Thus, two amino acids in H3N2 neuraminidase gene (119, 202) are the two key sites responsible for oseltamivir resistance.

**Key words:** influenza virus; H3N2; neuraminidase, NA; drug resistance; reverse genetics

甲型流感病毒表面主要有 2 个糖蛋白: 红细胞凝集素 (Hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA)。HA 通过结合细胞膜上的

唾液酸受体从而介导病毒内吞进入细胞<sup>[1]</sup>。NA 通过切割病毒和细胞多糖末端唾液酸, 有利于新形成的子代病毒颗粒从感染细胞中释放出去<sup>[1-2]</sup>。

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 教育厅十一五规划重点项目科技支撑计划(吉教科合字【2010】第 238 号)

作者简介: 董长颖(1975-), 女, 吉林市人, 讲师, 硕士, 主要从事制药工程的研究

\* 通讯作者: 董长颖, E-mail: dongchangying@163.com

由于 NA 结构非常保守,且对病毒的复制起到了很重要的作用,所以 NA 一直是理想的抗病毒靶标<sup>[3]</sup>。从甲型流感病毒 NA 蛋白的晶体结构可知,可以设计有效的 NA 抑制剂来抗流感病毒。目前有 2 种已应用于临床的 NA 抑制剂:奥司他韦(Osetamivir)<sup>[4]</sup>和扎那米韦(Zanamivir)<sup>[5]</sup>。这 2 种抑制剂能够有效地结合在 NA 激活位点,阻断 NA 的唾液酸酶的功能从而抑制新产生的病毒从被感染的细胞中释放出去<sup>[6]</sup>。

目前,有临床研究表明某些突变型甲型流感病毒 H3N2 具有抗奥司他韦的能力,发现其 NA 上的 2 个关键的氨基酸位点(第 119 和 222 位氨基酸)对病毒的抗药性起到了重要的作用,其中,第 119 位氨基酸由 E 突变为 V,而第 222 位氨基酸由 I 突变成了 L<sup>[7]</sup>。本试验以中国吉林地区流行的 H3N2 为野生株,对其进行以上 2 点的双点突变和单点突变,利用反向遗传学手段,8 个质粒共转染 293T 细胞分别包装形成带有点突变和未突变的流感病毒,在 MDCK 细胞中传代包装成的 H3N2 病毒,检测不同感染时间和有无奥司他韦存在下病毒的滴度,验证该突变病毒株对奥司他韦的抗药性。

## 1 材料与方法

### 1.1 基因、质粒、菌株及细胞

流感病毒包装 8 质粒和 pDC316-EGFP 由本室保存。选用流感病毒 H3N2 中国吉林流行株(GenBank: GU215036.1)为源病毒。DH5 $\alpha$  菌株、293T、MDCK 细胞系为本室保存。奥司他韦购自罗氏公司。NA 的双点突变和单点突变质粒(第 119 位氨基酸由 E 突变为 V,而第 222 位氨基酸由 I 突变成 L)由上海捷瑞生物有限公司合成。

### 1.2 主要试剂

Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司,胰蛋白酶和 Trizol 购自上海生工生物工程有限公司;L-谷氨酰胺,RIPA、蛋白裂解液、NBT 和 BCIP 购自北京鼎国公司;AP 标记的抗鼠 IgG 购自中山生物科技有限公司;流感病毒 HA 一抗由吉林大学人兽共患病实验室馈赠;神经氨酸酶活性检测试剂盒 P0309 购自于江苏碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 流感病毒 H3N2 的包装

将 293T 细胞和 MDCK 细胞按 1:1 的细胞数比例铺于 6 孔板中,24 h 后利用 9  $\mu$ L 的 Lipo-

fectamine 2000 转染试剂转染流感病毒包装 8 质粒(每种质粒 0.3  $\mu$ g)。同时单独转染 pDC316-EGFP 质粒,通过观察绿色荧光来确定转染效率。37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,在细胞培养上清中加入 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的胰蛋白酶,并 34  $^{\circ}$ C 继续培养。72 h 后,收获上清,1 800 g 离心 5 min 去除细胞碎片,上清过 0.22  $\mu$ m 滤膜后置-80  $^{\circ}$ C 备用。

### 1.4 RT-PCR

将病毒液用 DNA 酶处理后,利用 Trizol 提取 500  $\mu$ L 病毒液,并反转录,PCR,PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min; 72  $^{\circ}$ C 10 min。所选 PCR 引物为 NA-F: 5'-AATC-CAAATCAAATAAATTACCGATT-3'; NA-R: 5'-TATAGGCATGAGATTGAGGAC-3',引物由上海捷瑞生物科技有限公司合成。

### 1.5 流感病毒 H3N2 的 Western blot 鉴定

将病毒液用 RIPA 和蛋白裂解液裂解,煮沸变性 15 min,12 000 g 离心 15 min 后,取 10  $\mu$ L,进行 SDS-PAGE,电泳完毕后以 15 V 电压转膜 23 min,以 3% 脱脂奶常温封闭 1 h。与相应的 1:1 000 稀释的一抗和二抗(AP 标记)进行常温免疫杂交,分别作用 2 和 1 h。最后以 NBT 和 BCIP 为底物显色,进行 Western blot 显色。

### 1.6 流感病毒 H3N2 的传代培养

将病毒液以 1:3 的比例接种到含有 2 mL DMEM 培养基(含有 1% L-谷氨酰胺和 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的胰蛋白酶)的单层贴壁的 MDCK 细胞中。待出现细胞病变后收获病毒,若细胞未出现病变,在感染 96 h 后收获病毒。连续传代 5 次后,将收获的病毒进行滴定,病毒滴度以 TCID<sub>50</sub>  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 计算(半数组织感染量)。

### 1.7 流感病毒 H3N2 的抗药性试验

将含有不同浓度奥司他韦(10<sup>-1</sup>、10<sup>0</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的 DMEM 培养基中培养 MDCK 细胞,24 h 观察细胞状态,确定药物对细胞的安全浓度。在含有最佳给药浓度的 DMEM 中培养 MDCK 细胞,待细胞长至单层满时分别感染 MOI=0.001 的流感病毒 H3N2 野生型和突变型,以未加入奥司他韦作为对照组。在不同的感染时间,收获细胞培养上清进行滴定,计算 TCID<sub>50</sub> 值。

### 1.8 不同突变型和野生型 H3N2 神经氨酸酶 NA 活性的测定和药物对 NA 活性的抑制率(IC<sub>50</sub>)的测定

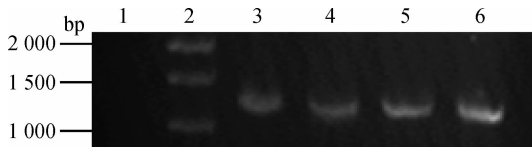
NA 活性通过与 2-(4-methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-

N-acetylneuraminic acid (MUN)底物反应来测定,具体步骤参考神经氨酸酶活性检测试剂盒说明书,由ThermoScientific Multiskan Spectrum微板光学测定仪在355 nm激发下读值。NA活性最终值为试验组与野生型病毒值的比例。将不同浓度的奥司他韦( $10^{-1}$ 、 $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )与1 mL不同突变型和野生型病毒孵育,再用神经氨酸酶活性检测试剂盒检测NA活性,以药物对NA活性半数抑制率 $\text{IC}_{50}$ 来定量病毒对药物的耐药性。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR

对包装好并传代5次后的流感病毒提取RNA,并通过RT-PCR鉴定NA基因,由(图1)可知,野生型、双点突变以及单点突变型都扩出了大小约为1 300 bp的条带,与NA基因大小相似。将以上DNA条带送捷瑞公司测序,测序结果通过与NA原始序列比对,表明为NA基因序列,且突变型的NA基因的第119氨基酸由E突变为V,而第222为氨基酸由I突变成了L。以上试验说明通过反向遗传学手段已成功获得野生型和双点突变型流感病毒H3N2。



1. 空白对照; 2. DNA 相对分子质量标准; 3. 野生型; 4. 双突变型; 5. 119 单突变型; 6. 222 单突变型  
1. Blank control; 2. DNA marker; 3. Wild type; 4. E119D+I222L mutation type; 5. E119D mutation type; 6. I222L mutation type

图1 RT-PCR 鉴定流感病毒 H3N2

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR product of H3N2 influenza virus

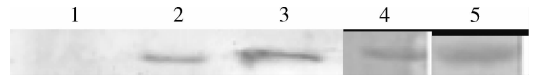
### 2.2 流感病毒 H3N2 的 Western blot 鉴定

为进一步在蛋白水平上验证流感病毒 H3N2 是否包装成功,对包装好并传代5次后的流感病毒用HA抗体进行Western blot检测。由图2可知野生型、双点突变以及单点突变型的流感病毒样品中均检测出大小为55 ku的目的蛋白条带,与预期大小相符,在空细胞上清中未检测出相应大小条带。以上试验在蛋白水平上证明已成功包装流感病毒。

### 2.3 流感病毒 H3N2 的滴定

为定量所包装的流感病毒的感染量,笔者对流

感病毒进行病毒滴定,由(图3)可知,在MDCK细胞中传代5次后,野生型H3N2的滴度达到了 $10^7 \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,而双点突变型以及222位单点突变型H3N2的滴度只达到了 $10^5 \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,比野生型的滴度低了约2个 $\log_{10}$ 的值;同时119位单点突变H3N2的滴度与野生型的相近。以上结果说明NA上第222位氨基酸对病毒的包装以及复制相对于第119位氨基酸的更重要,同时间接证明流感病毒在进化的过程中,为了产生耐药性的作用,迫于压力,流感病毒只好突变并部分放弃了感染复制能力。

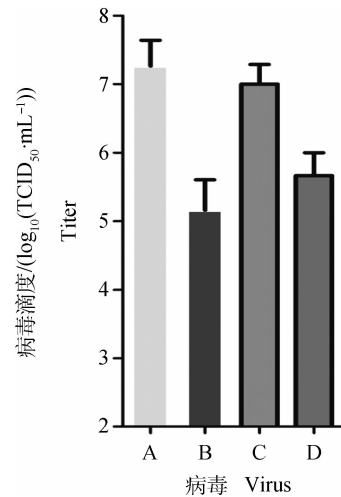


1. 空白对照; 2. 野生型; 3. 双突变型; 4. 119 单突变型; 5. 222 单突变型

1. Blank control; 2. Wild type; 3. E119D+I222L mutation type; 4. E119D mutation type; 5. I222L mutation type

图2 流感病毒 H3N2 的 Western blot 检测

Fig. 2 Western blotting of H3N2 influenza virus



A. 野生型; B. 双突变型; C. 119 单突变型; D. 222 单突变型

A. Wild type; B. E119D+I222L mutation type; C. E119D mutation type; D. I222L mutation type

图3 流感病毒 H3N2 野生型和突变型在 MDCK 细胞中传代 5 次后滴度测定

Fig. 3 Infectious titers of H3N2 influenza virus in MDCK cells after the fifth passage

### 2.4 不同突变型和野生型 H3N2 神经氨酸酶 NA 活性的测定

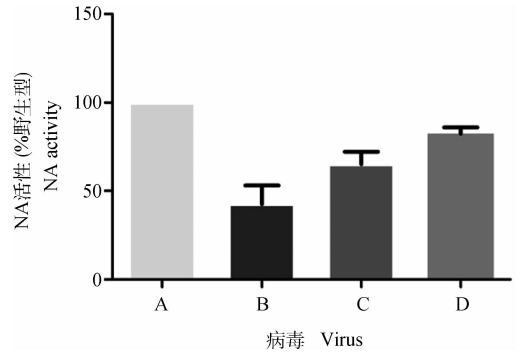
由图4可知,119位氨基酸单点突变H3N2的NA活性下降了约15%,而222位氨基酸单点突变

H3N2 则降低了近 30%，同时双点突变型 H3N2 的 NA 活性不足野生型的一半。虽然双点突变型 H3N2 的 NA 活性下降很多，但由于其病毒的滴度要比野生型低 10 倍以上，所以认为双点突变型 H3N2 的 NA 活性较野生型没有明显的下降。

## 2.5 流感病毒 H3N2 的抗药性试验

在做病毒抗药性试验前作者确定了奥司他韦对 MDCK 细胞的安全浓度为  $<1\ 000\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，所以试验中选用  $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  作为最佳给药浓度。随后在不同时间和是否加药的条件下测定了 H3N2 野生型和突变型在 MDCK 细胞中的滴度，画出了 H3N2 的滴度动力学曲线。由图 5A 可知，在奥司他韦不存在的条件下，野生型 H3N2 的滴度由  $10^6\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (18 h) 持续上升到了  $10^{7.5}\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (54 h)，在 66 h 略微下降至  $10^7\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，随后维持该水平至 96 h；双点突变型 H3N2 的滴度总体上比野生型的低 2~3 个  $\log_{10}$  的值，由原来的  $10^{2.5}\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (18 h) 持续上升到近  $10^{4.5}\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (96 h)；第 222 位氨基酸单点突变和第 119 位单点突变上升趋势与野生型相似，滴度总体上比野生型要低，其中 119 位单突变要比 222 位单突变的滴度高 1~2  $\log_{10}$  的值，但在 96 h 时两者滴度相近。而在奥司他韦存在的条件下(图 5B)，野生型 H3N2 的滴度发生了显著的下降，总体水平比未加奥司他韦条件下低了约 3 个  $\log_{10}$  的值，其滴度由  $10^2\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (18 h) 缓慢上升至  $10^4\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (96 h)；双点突变型的 H3N2 的滴度未发生明显变化，总体水平与未加奥司他韦条件下滴度相似，只是在 78 h 出现明显的下降，导致比野生型滴度反而低了 0.5  $\log_{10}$ ，随后又稳步上升至近  $10^5\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (96 h)；第 222 位氨基酸单点突变和第 119 位单点突变滴度总体水平比未加药条件下也低了 2~3  $\log_{10}$ ，其滴度由

$10^2\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (18 h) 缓慢上升至接近  $10^4\ \text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$  (96 h)，不具有抗药性。总体上，在加奥司他韦条件下双点突变型 H3N2 比野生型和单点突变型 H3N2 的滴度要高。以上试验证明由于双点突变型 H3N2 在第 119 位氨基酸由 E 突变为 V，而第 222 位氨基酸由 I 突变成了 L，使其具有很好的抗 NA 抑制剂(奥司他韦)的生物学功能，而野生型 H3N2 以及单点突变型 H3N2 不具有抗 NA 抑制剂的功能。



A. 野生型; B. 双突变型; C. 222 位突变型; D. 119 位突变型

A. Wild type; B. E119D + I222L mutation type; C. I222L mutation type; D. E119D mutation type

图 4 流感病毒 H3N2 野生型和突变型神经氨酸酶 NA 活性的测定

Fig. 4 Total NA activity of H3N2 and its mutation types

为定量检测病毒对奥司他韦的耐药性，作者检测了药物对病毒的半数抑制率，由表 1 可知，双点突变型 H3N2 的耐药性几乎是野生型的 1 200 倍，而 119 位氨基酸单点突变型和 222 位氨基酸单点突变型的耐药性只有野生型的 10 倍数量级，不具有明显的抗药能力。这些结果表明只有第 119 和 222 位氨基酸双点突变的 H3N2 病毒才具有很强的抗奥司他韦的生物学功能。

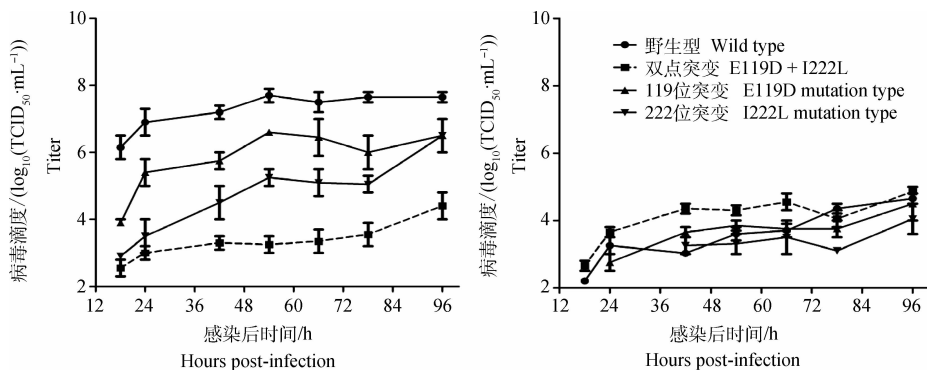


图 5 流感病毒 H3N2 野生型和突变型在奥司他韦不存在(A)和存在(B)的条件下在 MDCK 细胞中的滴度动力学

Fig. 5 Kinetics of H3N2 wild type and mutation type in MDCK cells in the absence or in the presence of Oseltamivir

表 1 奥司他韦对 H3N2 野生型和突变型 NA 活性半数抑制率 (IC<sub>50</sub>)

Table 1 Oseltamivir concentrations which inhibit 50% of the NA activity (IC<sub>50</sub>)

病毒株 Virus strain	奥司他韦 (Oseltamivir) IC <sub>50</sub> μg · mL <sup>-1</sup>
野生型 Wild type	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
119 位氨基酸突变型 Mutation type (119)	9.6 ± 0.6 <sup>b</sup>
222 位氨基酸突变型 Mutation type (222)	5.5 ± 0.3 <sup>b</sup>
双点突变型 Mutation type (119+222)	654.0 ± 34.2 <sup>c</sup>

同列数据后所标字母相异表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 所标字母相同表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )

<sup>a, b, c</sup>. Means within a row with different superscript differ significantly ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

本研究利用反向遗传学手段,通过 8 个质粒共转染的方式成功地包装出在神经氨酸酶 NA 上带有双点突变和单点突变的流感病毒(图 1 和 2)。通过对在 MDCK 细胞中传代 5 次的各种突变型毒株进行滴度测定发现,NA 上第 222 位氨基酸 I 对于病毒的复制和感染能力起到很重要的作用,而第 119 位氨基酸 E 的突变对病毒造成的影响不是很大,然而 2 点的共突变造成了病毒滴度进一步大的下降(图 3)。同时对各种突变型 NA 活性的检测也说明第 119 位氨基酸 I 突变成 L 不影响 NA 活性,而第 222 位氨基酸 E 突变成 D 和 2 点的双突变虽然对 NA 活性的影响到达了 50% 左右,但由于病毒其本身滴度比较低,加上与耐药性检测结果的比较,作者认为不存在 NA 活性的显著影响(图 4)。随后测定了奥司他韦对各种突变型毒株感染的抑制情况(图 5)和 IC<sub>50</sub>(表 1),发现只有双点突变的毒株才具有明显的抗药能力,而单点突变不具有明显的抗药能力,IC<sub>50</sub> 结果更是显示双点突变病毒的抗药能力是野生型毒株的 1 200 倍,而单点突变株的抗药能力只有野生型的 10 倍数量级,不具有明显的抗药能力。神经氨酸酶 NA 上第 119 位氨基酸和第 222 位氨基酸在不同亚型流感病毒中具有高的保守性,故本试验通过不同的点突变,或多或少都影响了病毒的滴度,然而第 222 位氨基酸的突变较第 119 位氨基酸突变所引起病毒滴度下降趋势更明显,原因可能在于虽然这 2 个位点都处于 NA 激活区域,但是

由于他们各自所处激活区的不同位点以及不同的点突变,造成了第 222 位由 I 突变成 L 对 NA 活性的影响要比第 119 位由 E 突变成 D 要高,先前有研究者对第 119 位氨基酸进行了不同的氨基酸替换,最后形成的突变株对病毒滴度的影响都不是很大<sup>[8-10]</sup>,对抗药性的产生也没有起到很大的作用,而第 222 位氨基酸在 NA 激活区与第 178 位氨基酸 W 形成了 1 个疏水核心,这个疏水核心位于唾液酸乙酰基群和甲基群中,正好是奥司他韦作用于 NA 活性区域的位点,然而单个的第 222 位点突变并不具有明显的抗药性,故笔者认为 222 位的突变并没有明显的改变 NA 激活区的构象和活性,故不影响奥司他韦与 NA 激活区结合抑制病毒,然而在第 119 位氨基酸一起突变的情况下,虽然影响了病毒的感染力,但所带来的是 NA 激活区空间的突破性改变,从而避免了与奥司他韦的结合,同时又大大减小了对 NA 活性的影响,产生了对奥司他韦很显著的抗药性。

目前从全球来看甲型 H3N2 流感病毒感染已经超过了甲型 H1N1 流感病毒<sup>[11]</sup>。同时由于流感病毒的高突变性、高传染性、致死性<sup>[12]</sup>,迫切需要国家及时检测和跟踪病毒的感染和变异情况。本研究证明了在 H3N2 的神经氨酸酶 NA 的 2 个双点突变(第 119 位氨基酸由 E 突变为 V,而第 222 位氨基酸由 I 突变成 L)确实能够使病毒产生很好的抗 NA 抑制剂药物奥司他韦的生物学功能,而单点突变不具有抗药活性,双点突变株同时也部分丧失了病毒感染和复制能力,说明流感病毒在进化的过程当中,迫于进化压力(包括人体免疫系统和抗病毒药物的作用)产生了一系列的氨基酸突变,而这些突变的虽然能影响到病毒的毒力,但是能够使病毒在这些进化压力下最终生存下来<sup>[1,13]</sup>。

鉴于 NA 上以上 2 个关键位点的作用,本研究为以后及时监测和跟踪 H3N2 在吉林地区的流行和抗药性的产生提供了有力的理论基础和实践经验。

### 4 结论

本试验成功证明了 H3N2 神经氨酸酶 NA 上 2 个位点(第 119 和 222 位氨基酸)对病毒抗奥司他韦(Oseltamivir)活性起到关键的作用,且只有双点同时突变的条件下,病毒才会有抗奥司他韦的生物活性,从而为监测和跟踪 H3N2 在吉林地区的流行和

抗药性的产生提供了有力的理论基础和实践经验。

#### 参考文献:

- [ 1 ] ZHIRNOV O, VOROB'EVA I, POIARKOV S, et al. Evolutionary changes in the NA and HA genes of H3N2 influenza virus in the Moscow Region during 2003-2009 [J]. *Vopr Virusol*, 2011, 56:9-15.
- [ 2 ] WANG L, QIN Z, PANTIN-JACKWOOD M, et al. Development of DIVA (differentiation of infected from vaccinated animals) vaccines utilizing heterologous NA and NS1 protein strategies for the control of triple reassortant H3N2 influenza in turkeys [J]. *Vaccine*, 2011, 29:7966-7974.
- [ 3 ] ZHIRNOV O, VOROBEVA I, SAPHONOVA O, et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells [J]. *J Clin Virol*, 2009, 45:322-333.
- [ 4 ] LI W, ESCARPE P, EISENBERG E, et al. Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42:647-653.
- [ 5 ] VON ITZSTEIN M, WU W, KOK G, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication [J]. *Nature*, 1993, 363:418-423.
- [ 6 ] HUANG W, DONG L, ZHANG Y, et al. Characteristic analysis of NA gene of human influenza viruses (H3N2) isolated from 1996 to 2005 in China [J]. *Bing Du Xue Bao*, 2007, 23:345-349.
- [ 7 ] RICHARD M, FERRARIS O, ERNY A, et al. Combinatorial effect of two framework mutations (E119V and I222L) in the neuraminidase active site of H3N2 influenza virus on resistance to oseltamivir [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55:2942-2952.
- [ 8 ] ABED Y, GOYETTE N, BOIVIN G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus [J]. *Antivir Ther*, 2004, 9:577-581.
- [ 9 ] ABED Y, NEHME B, BAZ M, BOIVIN G. Activity of the neuraminidase inhibitor A-315675 against oseltamivir-resistant influenza neuraminidases of N1 and N2 subtypes [J]. *Antiviral Res*, 2008, 77:163-166.
- [10] HURT A, ERNEST J, DENG Y, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa [J]. *Antiviral Res*, 2009, 83:90-93.
- [11] WANG R, SCHWARTZMAN L, MEMOLI M, et al. Detection of seasonal H3N2 influenza A virus by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70:281-284.
- [12] REN X, JU L, YANG J, et al. Antigenic and genetic variation in the hemagglutinins of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses in the Shanghai area from 2005 to 2008 [J]. *J Med Virol*, 2011, 83:1113-1120.
- [13] LIN J, CHIU S, CHENG J, et al. Molecular epidemiology and antigenic analyses of influenza A viruses H3N2 in Taiwan [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17:214-222.

(编辑 白永平)