



整个世界都屏住了呼吸，政府和卫生机构忙碌于药物、疫苗的储备以及制定应急计划。报刊的头版头条发出了不祥的预测，全球范围内死亡人数会增至1亿以上，经济也将遭受严重的破坏。而专家们所担心的已经不是这样的情况是否会发生，而是什么时候禽流感会袭击人类。

尽管H5N1型禽流感在亚洲已成为一个严峻的问题，但是在病毒突变株带有剧毒性并且能在人与人之间具有很强的传染性之前，暂时还不会对人类健康构成主要威胁。但是，众所周知，流感病毒能由抗原位移发生突变。

个环节就是研制开发出一种有效的疫苗。目前，Yoshihiro Kawaoka（河冈义裕）和他研究小组在威斯康辛-麦迪逊大学兽医学院以及东京大学做的实验中，创造性地采用了一种被称为反向遗传学的无活性“种子”病毒培养技术来用于疫苗的生产。这标志着我们能在很短的时间内能生产出足够的疫苗，使死亡人数得到极大的控制，这将是极为重要的技术突破。

鸡一鸡蛋

为了生产出有效的疫苗，必须将非致命性的病毒与在人群中传播的病毒株的基因构成进行匹配。让人们暴露于非

流感疫苗的新突破

突变出具有流行性毒株的情况可能并不会发生，但是一旦这种情况发生，其引发的死亡率将会极高。全球人口的高速流动会很快将疾病传播开来，而且，与冬季常见的季节性流感病毒不同的是，我们身体的免疫系统对这种禽流感病毒并不熟悉——没有人天生具有抵御或降低感染的能力。

美国以及全球都在竭尽全力应对禽流感的发生。控制流行病中最重要的一

致病性的病毒株下，刺激其免疫系统生成抗体，从而产生对致病株的抵御。这一过程的关键首先在于对病毒表面蛋白的两种亚型的识别并重建——红血球凝集素（HA）和神经氨酸苷酶（NA）。这些病毒的“活性成分”决定了病毒株的毒力和感染力，同时是疫苗干涉的目标。表面蛋白亚型包括16种HA亚型和9种NA亚型，它们之间的组合构成了病毒株（例如H5N1）。

重组法这一传统的病毒种子生产方法已经使用了50多年了，并且仍在广泛使用，尤其是在每年的季节性流感疫苗的生产中。在重组法中，科学家在受精的鸡蛋中同时注入能在鸡蛋中良好生长的标准非致病性流感毒株以及携带有期望值的HA和NA蛋白亚型基因的流行毒株。这两种毒株同时繁殖，它们的基因相互混合交叉组合，而8个基因有多达256种组合方式。接下来再对产生的毒株进行筛选，得到一种毒株，使之能与含有6个基因的鸡蛋里以及含有流行毒株的HA和NA基因的环境下良好生长。最后将这些足够一年的用量病毒种子注入于千万鸡蛋中，从而进行大量的疫苗生产。

科罗拉多大学医学院健康科学中心流行疾病部的主任、美国流行病学学会流感工作组成员Edward Janoff认为重组法的过程是“极其繁重”的。华盛顿大学圣.路易斯医学院分子微生物学的助理教授Andrew Pekoszye也提到：“乐观的话，种子库的整个生产过程需要耗费两周，而实际上往往需要两个月的时间。”Kawaoka直率地质疑：“传统的重组法？我不知道为什么人们仍要使用这种方法。”

猴子—质粒

Kawaoka和他的同事早在上世纪90年代就开始从事反向遗传学的研究。在反向遗传学的方法中，科学家们能够把包括6个无害株的和流行株的HA和NA基因在内的各基因剪接到被称为“质粒”的环状的DNA小片断中。这些质粒被转染到动物细胞中，使得疫苗的病毒种子在其中生长。无论通过传统的鸡蛋或是细胞培养，都可以产生大量的种子库用于疫苗的生产。

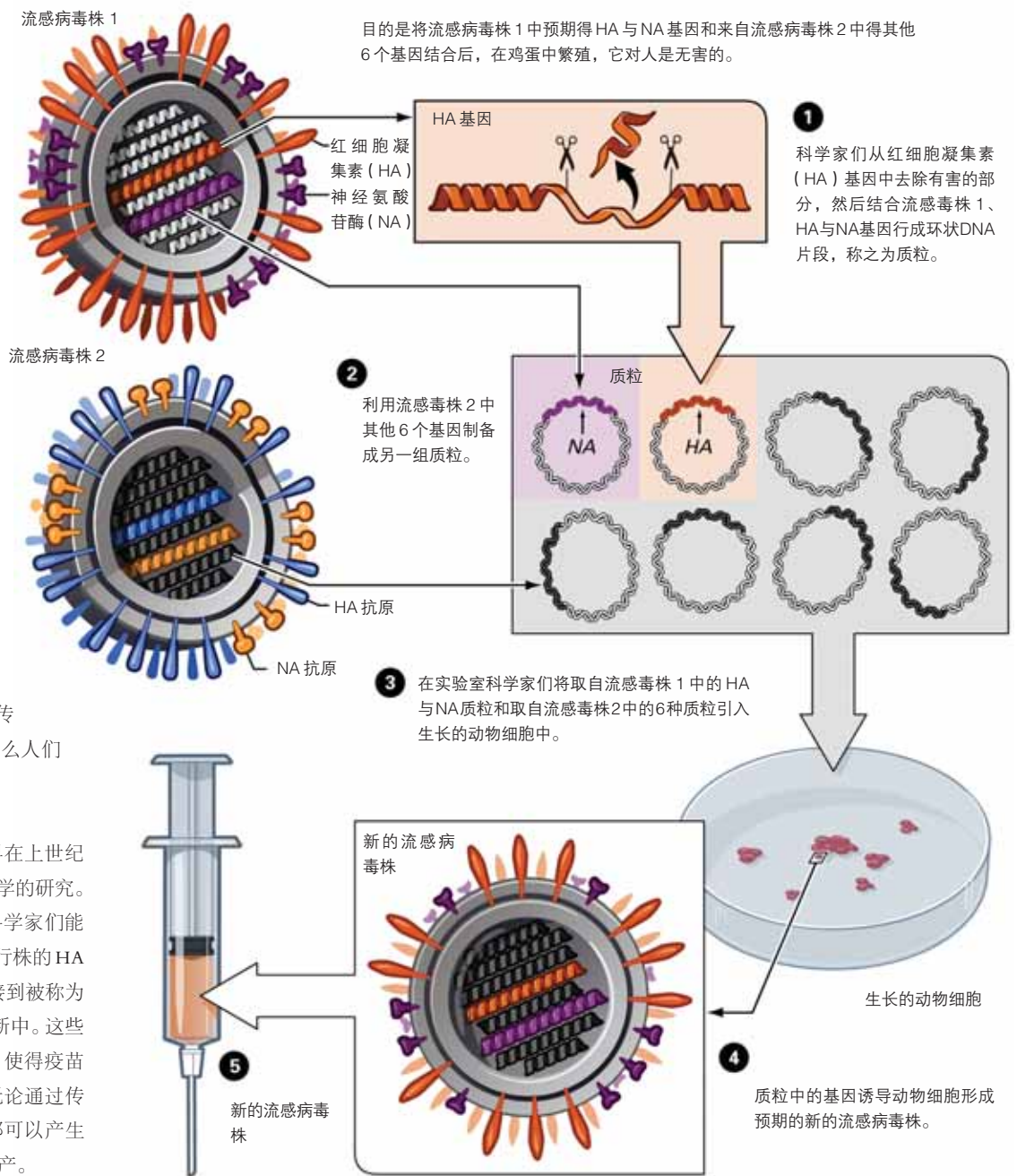
尽管反向遗传学使用的实验技术

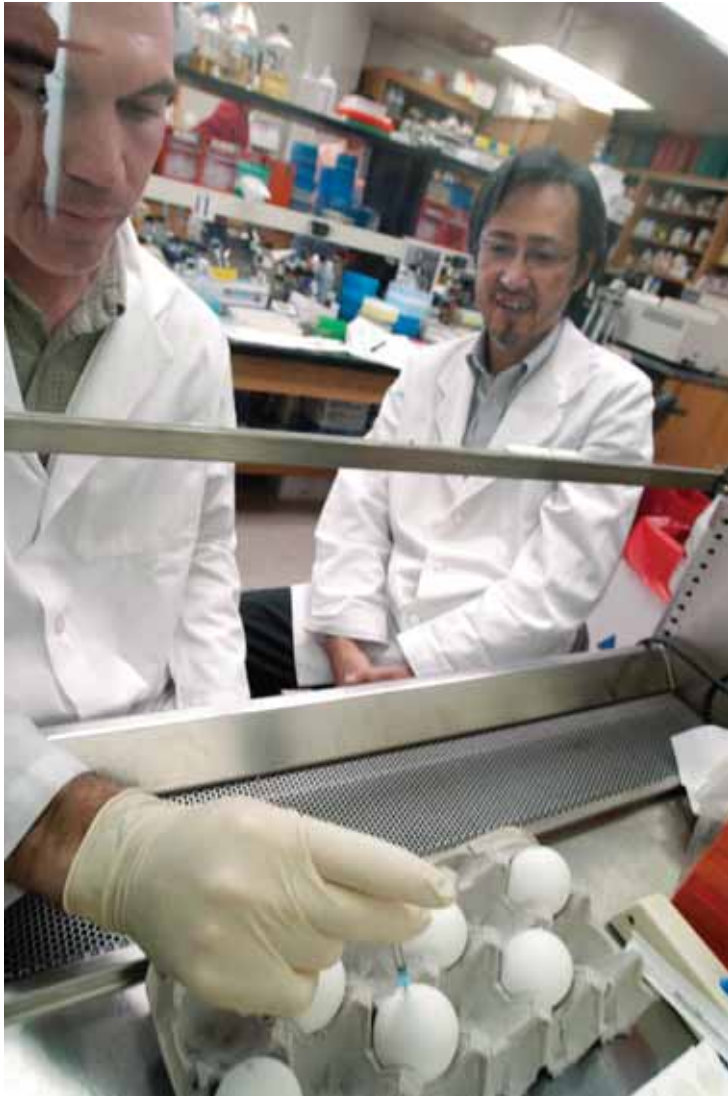
都是相当常规的，但是，其安全性和有效性问题仍然是它能否完全取代重组法的主要障碍。第一个障碍是动物细胞系本身的安全性问题。研究者担心这些细胞可能导致癌症或者携带其它危险的病毒。但是现在一株被称为Vero细胞系的非洲绿猴肾细胞已批准用于反向遗传学研究。Janoff指出：“通过相当仔细的兽用试验，已

证实了这些Vero细胞安全性，并且已获批准用于人类病毒的生产。”

第二个障碍是质粒转染细胞以及生长出足够的病毒作为种子库的难度。国家敏感和传染疾病所的流感组官员Karen Lacourciere指出：“很多我们想用于细胞培养生产疫苗的细胞系都很难用质粒转染。”直到现在，我们仍然认为转

利用反译遗传学生产疫苗





引用鸡蛋法生产疫苗: oshihiro Kawaoka (右) 和实验员 Barry McCernon (左) 在威斯康辛-麦迪逊大学兽医学院 Kawaoka 的实验室检查一项试验, 他们正在为流感爆发作出快速反应而进行疫苗制备和提炼的工作。

其技术改进很简单。Kawaoka 小组指出, 通过病毒元件的不同结合途径, 可以减少生成大量毒株所需 Vero 细胞的质粒数目, 直到他们筛选出生产病毒株的最佳途径。

Kawaok 指出质粒的最佳数目为4个: “如果我们的目仅仅是考虑产出病毒株, 我们只需要一个质粒就足够了。但是在实际情况中, 我们需要用4个质粒, 其中一个质粒的编码 H A 和 N A 基因……这种方法更易培育出疫苗的候选株, 因此现在在任何实验室都能够轻易地获得 H5N1 毒株。”

一小步一大启示

Kawaok 对他的研究成就极为谦虚, 而世人则将其视为这一领域发展的关键环节。Lacourciere 指出: “这个新的反向遗传系统, 将使我们基于疫苗生产的细胞培养的策略得到发展, 也更有效。”这对于鸡蛋生产系统也是个好消息, 鸡蛋的大量需求和大多数人对鸡蛋的反感这些问题都得到了很好的解决。(虽然并未对大多数人进行流行疾病的调查, 但根据“食物过敏与过敏反应网络”的资料, 1.5% 三岁以下儿童对鸡蛋过敏。)

流行性禽流感病毒株是否会出现还有待时间的验证。Pekosz 提出: “这种方法使得我们能在检测到病毒流行的 24 小时后, 立即生成流行病毒的种子库——它能使整个过程速度得以迅速提高。”

正积极备战流行病的 Janoff 同意这一观点。他说: “流行病令人担忧的一个问题就是它比普通流感传播得要快。”这就意味着疫苗生产商必须在一个更短的窗口期内筛选出病毒株并生产出足够多疫苗, 以保证控制传染源区以及全球范围内的疾病传播。“所以如果你能够缩短从确认到筛选从而得到最终疫苗的时间,” 他说, “才将是真正意义上挽救了千百万的生命。”

当 H5N1 的病毒突变株具有致命性并且在人与人之间的有更强的传染性时, 一切就开始进入了倒计时, 流行病的控制与时间之间便开始了真正的赛跑。感谢 Kawaok 以及他的研究小组, 至少到目前为止, 人类在这一较量中稍微领先了一步。

-Ernie Hood

译自 EHP 114:A108-A111 (2006)

染8到12个携带各种病毒元件的质粒到 Vero 细胞这一程序是必需的, 由于病毒作用的效率——也就是用于疫苗生产的毒粒的有效生产数目, 结果往往要差于理想状况。这一技术我们能够做到并且也已经做到了; 现在正在临床试验的 H5N1 疫苗即第一个通过反向遗传技术开发出来的疫苗。但是很明显, 反向遗传的研究至今还未达到技术上的完全成熟。

Kawaoka 和他的研究小组在 2005 年 11 月 15 日的《美国科学院院报》(Proceedings of the National Academy of Science) 上发表文章, 宣布反向遗传技术的革新已经克服了第二个障碍。

参 考 读 物

Davis M. 2005. The Monster at Our Door: The Global Threat of Avian Flu. New York, NY: The New Press.

Homeland Security Council. 2005. National Strategy for Pandemic Influenza. Washington, DC: The White House. Available: <http://www.whitehouse.gov/homeland/pandemic-influenza.html>.

Institute of Medicine. 2005. The Threat of Pandemic Influenza: Are We Ready? Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press.

Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. 2005. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. Proc Natl Acad Sci USA 102: 16825-16829.

Michael Forster Rothbart/University of Wisconsin-Madison