

• 综述 •

# 生物信息学在禽流感病毒研究中的应用\*

史卫峰<sup>1</sup>, 顿爱社<sup>2</sup>, 刘帅<sup>2</sup>, 张彦周<sup>3</sup>, 朱朝东<sup>3,\*</sup>

(1. 泰山医学院生命科学研究所, 山东泰安 271000; 2. 泰山医学院基础医学部, 山东泰安 271000;  
3. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

【摘要】 生物信息学自诞生之日起,其技术手段便在生物学、医学、农学和药学等领域的研究中得到广泛应用。虽然病毒学研究有其自身的特点和规律,但生物信息学已深入到禽流感病毒研究的各个层次,从微观的禽流感病毒基因组遗传变异到宏观的禽流感病毒的扩散等都有生物信息学的应用。本文简要综述了生物信息学在禽流感研究中的应用。

【关键词】 生物信息学; 禽流感病毒; H5N1; 综述

【中图分类号】 S858.3, Q811.4 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2009)03-0219-05

[Journal of Pathogen Biology. 2009 Mar; 4(3): 219-223.]

## Applications of bioinformatics in avian influenza virus research

SHI Wei-feng<sup>1</sup>, DUN Ai-she<sup>2</sup>, LIU Shuai<sup>2</sup>, ZHANG Yan-zhou<sup>3</sup>, ZHU Chao-dong<sup>3</sup> (1. Institute of Life Sciences, Taishan Medical College, Taian 271000, China; 2. Department of Basic Medicine, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong, China; 3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】 Bioinformatics has been extensively applied in the fields of Biology, Medicine, Agronomy, and Pharmacy since it was proposed. Although Virology has its own characteristics and rules, Bioinformatics has been embedded into the different levels of avian influenza research. These levels range from the evolution and variation of the genome of the avian influenza virus at the microcosmic level to the spread of the avian influenza virus at the macroscopic level. This paper reviewed the main applications of Bioinformatics in avian influenza research.

【Key words】 Bioinformatics; avian influenza virus; H5N1; review

生物信息学(bioinformatics)是应用数理和信息科学的理论和方法研究生命现象,组织和分析日益剧增的生物信息数据库的一门新兴学科。它主要利用计算机,网络技术和不断发展的各种软件,研究遗传物质的载体DNA及其编码的功能大分子物质,对逐日增多的序列和结构进行收集、整理、储存、加工、检索和分析,从中发现新的序列,从而揭示生命的起源、进化、遗传和发育的本质,破译隐藏在DNA序列中的遗传语言<sup>[1]</sup>。

近年来,禽流感病毒,尤其是H5N1高致病性禽流感病毒在全球肆虐,造成大量的家禽和鸟类死亡,经济损失惨重。更重要的是,部分亚型,如H5和H9型禽流感病毒感染哺乳动物甚至人类,造成人类患病甚至死亡<sup>[2,3]</sup>。根据世界卫生组织公布的数据,截止到2008年4月8日,全球共确诊H5N1禽流感病毒人类感染379例,死亡239人,病死率高达63%<sup>[4]</sup>。尤其是在近期,世界卫生组织和我国疾控部门已分别确认H5N1禽流感病毒能够在人际间有限传播<sup>[5,6]</sup>,使得H5N1禽流感病毒成为公众和学术界关注的焦点,加强对禽流感的监控、预防和研究已刻不容缓。

生物信息学自诞生之日起,其技术手段便在生物学、医学、农学和药学等领域的研究中得到广泛应用。虽然病毒学研究有其自身的特点和规律,但生物信息学已深入到禽流感研究的各个层次,从微观的禽流感病毒基因组遗传变异到宏观的禽流感病毒的扩散等都有生物信息学的应用。因此,生物信息学对禽流感研究的发展起到了重要的推动作用。本文对近年来生

物信息学在禽流感病毒研究中的应用作简要综述。

## 1 病毒系统发育分析(phylogenetic analysis)

系统发育分析是生物信息学的一个重要分支,它主要通过生物序列的多态性研究,构建系统发育树,推算物种的进化历史、分歧时间和进化速率等,并且给出统计学的量化结果。测序所得的禽流感病毒基因序列数据可以利用系统发育分析的方法和技术路线构建病毒的进化树,推断其进化历史,寻找其基因来源或研究病毒之间的亲缘关系、基因交流以及遗传变异情况。Hoffmann等<sup>[7]</sup>发现一株H6N1禽流感病毒的6个内部基因与病毒A/HK/156/97(H5N1)相同的片段序列高度相似(>98%),在进化树上位于同一分枝,因此认为H6N1禽流感病毒可能是其遗传供体。另外,基于基因组序列的系统发育分析显示,取自老虎、猫、猪、豹以及人等哺乳动物的H5N1禽流感病毒与取自鸟类和家禽的H5N1病毒在亲缘关系上非常接近,均属于禽流感病毒的范畴<sup>[8-10]</sup>。Krauss等<sup>[11]</sup>研究了北美水鸟体内的禽流感病毒,并且与取自欧亚的病毒进行了系统发育分析,结果表明美洲与欧亚的病毒很少发生病毒基因交流。

\*【基金项目】 泰山医学院青年基金项目(No. 2007QNZR056)。

\*\*【通讯作者】 E-mail: zhucd@ioz.ac.cn

【作者简介】 史卫峰(1979-),男,山东宁阳人,硕士,讲师。主要从事病毒分子系统学和生物信息学研究。

E-mail: weifeng\_cau@sina.com

基因重配(reassortment)和重组(recombination)是禽流感病毒两种主要的遗传变异方式<sup>[12]</sup>。所谓基因重配是指2种或多种不同亚型甚至同一亚型的不同基因型(genotype)的流感病毒基因片段的重配,它是导致流感抗原转换的重要原因。基因重配可产生新的基因型病毒,产生的新的基因型病毒也被称为重配株(reassortant)。研究证实,引起1957和1968年流感大暴发的毒株均是由不同亚型的流感病毒基因重配产生的<sup>[13]</sup>。而目前流行的H5N1和H9N2禽流感病毒的重配也有报道<sup>[14-17]</sup>。

目前检测禽流感病毒重配,常规的做法是利用系统发育分析构建进化树,分别鉴定其基因组8个片段的来源,然后定义一个基因型。与之具有相同基因来源的病毒同属于一个基因型,来源不同病毒的属于其他基因型。采用上述方法已在H5N1禽流感病毒中鉴定出10余种基因型,目前流行的H5N1病毒主要属于Z型<sup>[14,16,17]</sup>。不同的基因型也在H9N2禽流感病毒中发现<sup>[15,17]</sup>。Lu等<sup>[18]</sup>基于系统发育分析方法构建了一个在线的检测A型禽流感病毒基因型的网站FluGenome(<http://www.flugenome.org/>),能够自动地检测基因组序列的基因型。

另外,利用系统发育分析还可以检测禽流感病毒可能存在的重组。重组涉及核酸分子的断裂及其他核酸分子的再连接。Chare等<sup>[19]</sup>利用系统发育分析法发现,重组在RNA负链病毒中发生率比较低。但是,不同的研究组证实低致病性H7N3禽流感病毒血凝素和核蛋白之间的重组导致了高致病性H7N3禽流感病毒的产生,造成了鸟类大量死亡<sup>[20,21]</sup>。

## 2 检测病毒基因重配与重组

如上所述,目前通常采用系统发育分析的方法分析禽流感病毒基因组每个片段的来源,来确定该病毒是否是重配株。但是该方法依赖于进化树所提供的信息,受数据本身的影响很大,有时还受建树方法以及人为因素的影响,分辨率不高,重复性也较差。更重要的是,不同重配株之间没有明确的量化的差异。Wan等<sup>[22]</sup>基于准种(quasispecies)理论提出了一种量化的检测重配的方法,使用此方法研究发现H5N1禽流感病毒与其他亚型的禽流感病毒存在广泛的重配,并将283株H5N1病毒分成了107个基因型。另外,将目前流行的Z型和Z<sup>+</sup>型H5N1禽流感病毒细分成20余个基因型,这些细分的基因型体现了病毒对不同环境的适应。

现在已有多种生物信息学方法可以检测基因是否存在重组,如RDP2<sup>[23]</sup>、GENECONV<sup>[24]</sup>和Scan<sup>[25]</sup>等。由于算法之间的差异,单纯地采用上述算法检测的结果往往不一致,断点(breakpoint)不同,甚至出现假阳性的结果<sup>[26]</sup>。Gibbs等<sup>[27]</sup>使用Scan软件对1918年西班牙流感病毒的血凝素基因进行分析后发现,来源于人及猪体内的流感病毒血凝素基因的重组导致了致命的“西班牙流感病毒”产生的可能性极大。尽管这种观点受到了不少质疑<sup>[28]</sup>,但不可否认该研究方法对禽流感病毒的研究具有借鉴意义。虽然基因重配屡屡在H5N1和H9N2禽流感病毒基因组中检出,也有H5N1存在重组的疑似案例<sup>[29]</sup>,但是到目前为止尚未有在H5N1亚型的病毒中发现基因重组现象的确实报道。

## 3 病毒分子特征及蛋白分型分析(Proteotyping)

将禽流感病毒基因序列用生物信息学提供的比对软件或

手工调整对齐后翻译,对其进行分子特征分析,研究其关键点或片段的变异,就可以获得该病毒遗传和致病力的部分信息。如通过大量比对H3和H9流感病毒的血凝素蛋白序列发现,H9N2禽流感病毒血凝素蛋白Gln226Leu的突变是H9病毒能否侵染哺乳动物的标志<sup>[30]</sup>。如果该突变发生,则暗示此病毒已具备了侵染哺乳动物甚至是人类的能力。血凝素基因的连接肽被认为是决定禽流感病毒毒力和致病性的关键因素之一<sup>[31,32]</sup>。而在连接肽位点存在的多重碱性氨基酸则被认为是高致病性病毒的标志。比如连接肽模式R-X-K/R-R是高致病性禽流感病毒的标志<sup>[31]</sup>,而RSSR、RETR等则是低致病性或者非致病性禽流感病毒的标志<sup>[33]</sup>。因此,通过对病毒分子特征进行分析就可以获得病毒的部分信息。但是分子特征分析的结果有时不准确,甚至是错误的,因此需要结合其他生物学的数据才能得出充分的结论。比如,Wood等<sup>[34]</sup>发现一株H10亚型的病毒对鸡是致死性的,但其连接肽模式为PEIMQGR,并不具有高致病性禽流感所有的多重碱性氨基酸。

此外,分子特征分析往往关注于单个位点或片段的特征信息,很难将这些遗传信息整合起来,从而忽略了位点间可能存在的联系,不能发现共重配的遗传位点或存在互补突变的蛋白<sup>[35]</sup>。为此,Obenauer等<sup>[36]</sup>将蛋白分型的概念引入到禽流感病毒研究中。与分子特征分析,蛋白分型能够将特异性的氨基酸标记(蛋白型)可视化,还可以发现共重配的基因,长的蛋白片段间的相互作用,具有特殊基因和蛋白组合的蛋白家族。利用蛋白分型技术对大量的禽流感病毒基因组序列进行的研究发现很多共重配和互补突变的位点以及具有共同遗传特征的病毒家族,最重要的是,发现非结构蛋白1(non-structure 1, NS1)的一个结构域可能是决定病毒毒力的一个因素<sup>[36]</sup>。

但是,到目前为止尚没有统一的理论来指导蛋白分型,蛋白分型主要依靠病毒序列在进化树上的位置以及蛋白序列间的差异进行,而且还受样本量的影响,蛋白型间没有明确的数量差异,分型结果重复性较差。倘若能够将Wan等<sup>[22]</sup>提出的基因型分型方法修改后应用于蛋白分型,或引入其他的数理统计手段将蛋白分型数量化,那么蛋白分型技术将得到更加广泛地应用。

## 4 病毒RNA和蛋白结构预测及显示

通过同源建模进行DNA、RNA以及蛋白质高级结构预测是生物信息学研究的热点之一。禽流感病毒是负链RNA病毒,因此其RNA结构的变异可能对于病毒侵染宿主和致病力等起着重要的作用。Gulyaev等<sup>[37]</sup>利用生物信息学手段发现,在最近流行的H5N1禽流感病毒NS基因发生的单一位点替代能够显著地影响非结构基因3'端剪切位点的发夹(hairpin)与假结(pseudoknot)结构间的平衡。而这个构象的转换可能影响NS基因mRNA的剪切调控。

通过生物信息学技术手段还可以对禽流感病毒基因组各个基因片段在线或利用下载的软件进行蛋白结构预测,并且通过显示软件将蛋白结构以及与结构相关的一些信息显示出来。通过构建其蛋白的二维和三维结构,可以研究其蛋白亲水性、预测抗原表位及抗原性变异、发现并研究其重要的保守位点和催化活性位点等<sup>[38]</sup>。

郭晓莉等<sup>[39]</sup>利用生物信息学方法构建了H5N1禽流感病毒血凝素蛋白的三维结构,通过研究发现,其连接肽位点存在

的多重碱性氨基酸携带的正电荷分布在蛋白表面,有利于被蛋白水解酶识别而水解,而血凝素的裂解是决定流感病毒感染宿主和致病力的关键因素之一。

## 5 病毒传播方向和传播方式研究

禽流感病毒的传播方向和传播方式一直是研究和争论的焦点。尤其是近年 H5N1 禽流感病毒在全球迅速扩散,已几乎遍布整个亚欧大陆和非洲的大部分国家<sup>[40]</sup>。北美也有报道,但属于低致病性 H5 亚型禽流感病毒<sup>[41]</sup>。Chen 等<sup>[14, 42]</sup>通过在 2005 年青海湖和鄱阳湖发现的 H5N1 禽流感病毒具有很高的遗传相似性,并且从健康的候鸟体内检测到了 H5N1 的抗体,据此认为候鸟是禽流感病毒的携带者和传播者。但是由于取样方法的原因,这个观点受到了质疑<sup>[43, 44]</sup>。

Kilpatrick 等<sup>[45]</sup>则利用数学模型整合了系统发育分析、候鸟迁徙和禽类运输的数据后提出 H5N1 禽流感病毒的扩散是由候鸟迁徙和禽类运输共同造成的。而且该研究还指出 H5N1 病毒将由已经发生疫情的国家传入西半球,并且通过候鸟的迁徙传入美国大陆,而不是原先所认为的从西伯利亚传入美国。其中候鸟对 H5N1 禽流感病毒的传播起到部分作用的观点与 Normile<sup>[46]</sup>的看法相同。

Wallace 等<sup>[47]</sup>应用系统地理学的方法研究了 H5N1 禽流感病毒血凝素基因和神经氨酸酶基因后提出中国的广东省是多个家系 H5N1 禽流感病毒的发源地,而从广东先后发生了 3 次大的 H5N1 禽流感病毒的迁移:1997 年从广东到香港,2003 年从广东到泰国和 2005 年从广东到青海。但是,金冬雁<sup>[48]</sup>认为该研究采用生物信息学的方法研究病毒的传播固然值得肯定,但是存在取样不足和取样偏颇等诸多方面的问题,其结论尚须经过病毒学研究的验证。Wallace 等<sup>[49]</sup>近期采用同样的方法对取自 2006 年欧亚和非洲的更多 H5N1 病毒序列研究却发现 H5N1 禽流感病毒的迁徙被限制在一部分区域,并且在一些国界被滤除,比如中国与某些东南亚国家,尽管中国与这些国家同处于候鸟迁徙的路线上。

当然,单纯的数理统计分析不可避免地受多种因素的制约,如取样不充分,不合理,甚至取样错误,选择不同的数学模型或者参数可能得出不同的结果。因此,如果结合应用全球卫星定位系统(Global Positioning System, GPS)以及地理信息系统对候鸟迁徙进行监控的数据,将有助于研究禽流感病毒快速传播的途径及方式,并且还可以对禽流感病毒的传播方向进行预测。

## 6 病毒基因正选择压力(positive selection pressure)研究

比较同义突变(synonymous, dS)和非同义突变(nonsynonymous, dN)是研究 DNA 序列进化的一种重要方法。如果非同义突变速率(dN)大于同义突变速率(dS),也即  $\omega > 1$  ( $\omega = dN/dS$ ),则表示非同义突变有利于提高了蛋白的适应性,比同义突变更可能在种群中固定下来,这就是正选择<sup>[50]</sup>。正选择压力使得物种获得遗传优势,更能适应环境,有更多的机会生存下来。

Fitch 等<sup>[51]</sup>早在 1991 年就发现 H3 亚型流感病毒血凝素基因部分抗原位点受到正选择压力的影响,并且正选择压力提高了 H3 亚型病毒的生存能力。同样的结论也在 H1 亚型的流感病毒中得出<sup>[52]</sup>。后续采用不同的计算方法又对 H3 流感病毒血凝素基因进行了反复地研究,尽管算法不同,但都得到了

类似的结论<sup>[53]</sup>。Campitelli 等<sup>[54-56]</sup>不同的研究组陆续对 H5N1 禽流感病毒全基因组或者部分基因片段进行了研究,发现除了血凝素基因受到正选择压力外,部分病毒的 PB1 和 NS1 也受到正选择压力的影响。

但是上述研究都停留在时间层面上,所选取的材料基本上都是以时间划分的,另外研究的区域也比较有限。因此如果将分析提高到时间、地点和寄主三个层面上,可能得到更多有意义的信息来解释病毒对不同地理环境和不同寄主的适应性,还有助于研究禽流感病毒跨越不同宿主屏障的机制。

## 7 辅助流感疫苗开发和效果评价

生物信息学已被用于辅助药物开发,成为新药发现的重要工具和手段。与传统新药开发模式相比,应用生物信息学技术的优势进行新药开发,具有缩短新药研发周期、降低研发成本以及提高研发成功率等优点<sup>[57]</sup>。目前用于禽流感预防的疫苗有灭活疫苗、减毒活疫苗、重组疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗以及多肽疫苗等。生物信息学可以帮助筛选禽流感病毒基因组内主要的抗原位点,辅助设计基于禽流感病毒表面抗原和保守性蛋白的核酸疫苗和多肽疫苗。

更重要的是,通过对病毒序列与核酸疫苗序列的比对、分子特征和系统发育分析,可以评价核酸疫苗接种的有效保护性。潘劲草<sup>[58]</sup>等对杭州甲 1 型、甲 3 型以及乙型流感病毒的序列与世界卫生组织推荐的疫苗进行了比对和系统发育分析,结果表明杭州分离的甲 1、甲 3 和乙型流感病毒血凝素 HA1 均分别与当时推荐疫苗株 HA1 的亲缘关系很近,使用这些候选疫苗能够对甲 1、甲 3 和乙型流感病毒等起到很好的预防作用。

## 8 结语

本文只是就生物信息学在禽流感研究中的主要应用作一综述,其他应用方面如基于生物信息学方法设计禽流感病毒扩增引物<sup>[59, 60]</sup>、利用多序列比对寻找禽流感病毒宿主分子标记<sup>[61]</sup>等本文不再赘述。毫无疑问,生物信息学从微观到宏观的各个层次都促进了禽流感的研究的发展。随着生物信息学自身的发展和完善,相信其在禽流感研究中的应用将越来越广泛。但是必须清醒地认识到,病毒学研究有其自身的特点,尽管生物信息学的结果对我们的研究具有重要的价值,但仍然需要经过生物学实验予以验证。

### 【参考文献】

- [1] 胡德华, 方平. 生物信息学在医学上的应用及其社会意义[J]. 湖南医科大学学报(社会科学版), 1999, 1: 75-79.
- [2] Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2[J]. Lancet, 1999, 354: 916-917.
- [3] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279(5349): 393-396.
- [4] World Health Organization. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO [EB/OL]. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2008\\_04\\_08/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_04_08/en/index.html) [2008-04-08].
- [5] Wang H, Feng Z, Shu Y, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China[J]. Lancet, 2008, 371(9622): 1427-1434.

- [6] World Health Organization. Avian influenza—situation in Pakistan—update 2[EB/OL]. [http://www.who.int/csr/don/2008\\_04\\_03/en/](http://www.who.int/csr/don/2008_04_03/en/) [2008-04-03].
- [7] Hoffmann E, Stech J, Leneva I, et al. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? [J]. J Virol, 2000, 74 (14): 6309–6315.
- [8] Claas ECJ, Osterhaus ADME, Van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus [J]. Lancet, 1998, 351: 472–477.
- [9] Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(12): 2189–2191.
- [10] Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, et al. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(4): 681–683.
- [11] Krauss S, Obert CA, Franks J, et al. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange [J]. PLoS Pathog, 2007, 3(11): e167.
- [12] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. Microbiol Rev, 1992, 56: 152–179.
- [13] Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza? [J]. Science, 2003, 302: 1519–1522.
- [14] Chen H, Smith GJD, Li KS, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 2845–2850.
- [15] Choi YK, Ozaki H, Webby RJ, et al. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in southern China [J]. J Virol, 2004, 78: 8609–8614.
- [16] 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: 209–213.
- [17] Shi WF, Gibbs MJ, Zhang YZ, et al. Genetic analysis of four porcine avian influenza viruses isolated from Shandong, China [J]. Arch Virol, 2008, 153(1): 211–217.
- [18] Lu G, Rowley T, Garten R, et al. FluGenome: a web tool for genotyping influenza A virus [J]. Nucleic Acids Res, 35 (Web Server issue): W275–279.
- [19] Chare ER, Gould EA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative sense RNA viruses [J]. J Gen Virol, 2003, 84: 2691–2703.
- [20] Pasick J, Handel K, Robinson J, et al. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia [J]. J Gen Virol, 2005, 86: 727–731.
- [21] Suarez DL, Senne DA, Banks J, et al. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10: 693–699.
- [22] Wan XF, Chen GR, Luo F, et al. A quantitative genotype algorithm reflecting H5N1 Avian influenza niches [J]. Bioinformatics, 2007, 23(18): 2368–2375.
- [23] Martin DP, Williamson C, Posada D. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments [J]. Bioinformatics, 2005, 21: 260–262.
- [24] Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination [J]. Virology, 1999, 265: 218–225.
- [25] Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences [J]. Bioinformatics, 2000, 16: 573–582.
- [26] Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13757–13762.
- [27] Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Recombination in the haemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu" [J]. Sci, 2001, 293 (5536): 1842–1845.
- [28] Worobey M, Rambaut A, Pybus OG, et al. Questioning the evidence for genetic recombination in the 1918 "Spanish flu" virus [J]. Sci, 2002, 296(5566): 211.
- [29] Recombinomics Commentary. New H5N1 Sequences Confirm Recombination in China [EB/OL]. [http://www.recombinomics.com/News/10050603/H5N1\\_Recombination\\_Confirmation.html](http://www.recombinomics.com/News/10050603/H5N1_Recombination_Confirmation.html) [2006-10-05].
- [30] Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity [J]. Virology, 2001, 281: 156–162.
- [31] Horimoto T, Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of haemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus [J]. J Virol, 1994, 68: 3120–3128.
- [32] Perdue ML, Garca M, Senne D, et al. Virulence-associated sequence duplication at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses [J]. Virus Res, 1997, 49: 173–186.
- [33] Guo YJ, Krauss S, Senne DA, et al. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia [J]. Virology, 2000, 267: 279–288.
- [34] Wood GW, Banks J, Strong I, et al. An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site [J]. Avian Pathol, 1996, 25: 799–806.
- [35] Shi WF, Zhang Z, Peng L, et al. Proteotyping: a new approach studying influenza virus evolution at the protein level [J]. Virol Sinica, 2007, 22(5): 405–411.
- [36] Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, et al. Large scale sequence analysis of avian influenza isolates [J]. Sci, 2006, 311(5767): 1576–1580.
- [37] Gultyaev AP, Heus HA, Olsthoorn RCL. An RNA conformational shift in recent H5N1 influenza A viruses [J]. Bioinformatics, 2007, 23(3): 272–276.
- [38] 范学政, 王琴, 宁宜宝, 等. 用生物信息学手段辅助分析猪瘟疫病的基因结构 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(1): 45–50.
- [39] 郭晓莉, 朱贻盛, 李亦学, 等. H5N1 血凝素蛋白切割位点的序列研究 [J]. 科学通报, 2007, 52(16): 1908–1912.
- [40] World Health Organization. H5N1 avian influenza: timeline of major events [EB/OL]. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/Timeline\\_08%2003%2025.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_08%2003%2025.pdf) [2008-03-25].
- [41] Spackman E, Swayne DE, Suarez DL, et al. Characterization of low-pathogenicity H5N1 avian influenza viruses from North America [J]. J Virol, 2007, 81: 11612–11619.
- [42] Normile D. Avian influenza. Evidence points to migratory birds in

H5N1 spread[ J ]. Sci, 2006, 311: 1225.

[ 43 ] Feare CJ, Yasu M. Asymptomatic infection with highly pathogenic avian influenza H5N1 in wild birds: how sound is the evidence? [ J ]. Virol J, 2006, 3: 96.

[ 44 ] Normile D. Avian influenza. Are wild birds to blame? [ J ]. Sci, 2005, 310: 426– 428.

[ 45 ] Kilpatrick AM, Chmura AA, Gibbons DW, et al. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza [ J ]. Proc Natl Acad Sci U SA, 2006, 103: 19368– 19373.

[ 46 ] Normile D. Avian influenza. Wild birds only partly to blame in spreading H5N1[ J ]. Sci, 2006, 312: 1451.

[ 47 ] Wallace RG, Hodae H, Lathrop RH, et al. A statistical phylogeography of influenza A H5N1[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 4473– 4478.

[ 48 ] 金冬雁. 甲型流感病毒 H5N1 的系统进化分析简评[ J ]. 病毒学报, 2007, 23( 3 ): 240– 243.

[ 49 ] Wallace RG, Fitch WM. Influenza A H5N1 immigration is filtered out at some international borders[ J ]. PLoS ONE, 2008, 3( 2 ): e1697.

[ 50 ] Yang Z, Nielsen R, Goldman N, et al. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites[ J ]. Genetics, 2000, 155( 1 ): 431– 449.

[ 51 ] Fitch WM, Leiter JME, Li X, et al. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 4270– 4274.

[ 52 ] Ina Y, Gojobori T. Statistical analysis of nucleotide sequences of the hemagglutinin gene of human influenza A viruses [ J ]. Proc Natl Acad Sci U SA, 1994, 91: 8388– 8392.

[ 53 ] Gibbs MJ, Wayper P, Fourment MLA, et al. The variable codons of H3 influenza A virus haemagglutinin genes [ J ]. Arch Virol, 2007, 152: 11– 24.

[ 54 ] Campitelli L, Ciccozzi M, Salemi M, et al. H5N1 influenza virus evolution: a comparison of different epidemics in birds and humans ( 1997– 2004 ) [ J ]. J Gen Virol, 2006, 87: 955– 960.

[ 55 ] Ciccozzi M, Montieri S, Facchini M, et al. Evolutionary analysis of HA and NS1 genes of H5N1 influenza viruses in 2004– 2005 epidemics[ J ]. Avian Dis, 2007, 51( 1 Suppl ): 455– 460.

[ 56 ] Smith GJ, Naipospos TSP, Nguyen TD, et al. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam[ J ]. Virology, 2006, 350: 258– 268.

[ 57 ] 吴永英, 徐德昌, 王专, 等. 生物信息学及其在新药发现中的应用[ J ]. 生物信息学, 2005, 3( 2 ): 89– 92.

[ 58 ] 潘劲草, 叶榕, 黄志成, 等. 1998– 2002 年杭州市流感病毒的 HA1 序列及与推荐疫苗株的比较研究[ J ]. 中国预防医学杂志, 2005, 6( 3 ): 248– 251.

[ 59 ] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[ J ]. Arch Virol, 2001, 146: 2275– 2289.

[ 60 ] 王兴友, 陈杭薇, 李兵. 基于生物信息学分析方法设计流感病毒 A 的通用寡核苷酸探针[ J ]. 华北国防医药, 2006, 18( 5 ): 310– 312.

[ 61 ] Finkelstein DB, Mukatira S, Mehta PK, et al. Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses [ J ]. J Virol, 2007, 81( 19 ): 10292– 10299.

【收稿日期】 2008-09-11 【修回日期】 2008-11-09

( 上接 204 页 )

[ 5 ] Mordue DG, Monroy F, La Regina M, et al. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines[ J ]. J Immunol, 2001, 167( 8 ): 4574– 4584.

[ 6 ] 赖植发, 刘轼初, 陈晓光, 等. 弓形虫感染对大鼠小鼠血清一氧化氮水平的影响[ J ]. 热带医学杂志, 2006, 6( 4 ): 362– 366.

[ 7 ] 牛朝诗, 孙敬武, 卞留贵. TNF- $\alpha$  抑制胶质瘤增殖和诱导凋亡的研究[ J ]. 中国药理学通报, 2000, 16( 2 ): 205– 207.

[ 8 ] 张济, 陈汉春. 干扰素诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制[ J ]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12( 13 ): 1025– 1029.

[ 9 ] 孙晓杰, 杨秀珍, 张英博. 一氧化氮与肿瘤研究进展[ J ]. 齐齐哈尔医学院学报, 2000, 21( 2 ): 233– 235.

【收稿日期】 2008-09-09 【修回日期】 2008-12-10

( 上接 210 页 )

[ 3 ] 许兵红, 曾莉萍, 赵春澎, 等. 丝光绿蝇抗菌肽的热稳定性研究[ J ]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2005, 16( 4 ): 254– 257.

[ 4 ] 许兵红, 赵春澎, 曾莉萍. 丝光绿蝇抗菌肽针刺诱导及初步电泳分离[ J ]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19( 2 ): 114– 117.

[ 5 ] 许兵红, 曾莉萍, 孙斐. 家蝇抗菌物质超声波诱导效果的动态观察[ J ]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1( 5 ): 372– 373, 376.

[ 6 ] 许兵红, 曾莉萍, 孙斐, 等. 不同强度超声波对家蝇抗菌物质的诱导研究[ J ]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22( 11 ): 1084– 1085, 1044.

[ 7 ] 许兵红, 刘勇, 曾莉萍, 等. 家蝇抗菌物质针刺诱导研究[ J ]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18( 2 ): 100– 102.

[ 8 ] 许兵红, 陈萍, 曾莉萍, 等. 溶壁微球菌对家蝇抗菌物质的诱导[ J ]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3( 8 ): 610– 611, 628.

【收稿日期】 2008-10-16 【修回日期】 2008-12-15