

DOI:10.13350/j.cjpb.230602

• 论著 •

SARS-CoV-2 非感染性细胞-细胞融合模型的构建^{*}

单静, 杨曼清, 尚方建, 刘奇^{**}

(大理大学基础医学院病原生物学综合实验室, 云南大理 671000)

【摘要】 目的 构建一种基于 SARS-CoV-2 S 蛋白介导的非感染性、可视化细胞-细胞融合模型, 用于检测 SARS-CoV-2 进入抑制剂的抑制活性。**方法** 构建可同时表达 SARS-CoV-2 S 蛋白和绿色荧光蛋白 EGFP 的重组质粒 pAAV-EGFP-SARS2-S, 在 293T 细胞瞬时表达(293T/EGFP/SARS-2), 将其与靶细胞 Huh-7 共同培养, 模拟病毒侵染靶细胞, 分别在 2、8、12、24、48 h 于荧光显微镜下观察并记录细胞不同时间的融合情况, 同时在该模型上评价 SARS-CoV-2 进入抑制剂 EK1 的活性。**结果** 荧光显微镜观察 293T/EGFP/SARS-2 和 Huh-7 细胞混合后的细胞融合情况: 4 h 后发生融合, 24 h 后可形成大面积融合。SARS-CoV-2 进入抑制剂 EK1 能抑制细胞融合, 且呈剂量依赖, 其 IC_{50} 为 $(287 \pm 1.78) \text{ nmol/L}$ 。**结论** 成功构建无感染性、成本低廉的 SARS-CoV-2 进入抑制剂药物检测筛选融合模型, 可对天然小分子化合物进行筛选, 为冠状病毒药物的研发提供了一种检测途径。

【关键词】 SARS-CoV-2; 细胞-细胞融合; 进入抑制剂

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0625-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jun;18(6):625-629.]

Construction of SARS-CoV-2 cell-cell fusion model

SHAN Jing, YANG Manqing, SHANG Fangjian, LIU Qi (*Integrated Lab of Pathology Biology, College of Basic Medical, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China*)

【Abstract】 Objective To construct a non-infectious and visual cell-cell fusion model mediated by SARS-CoV-2 S protein to detect the inhibitory activity of SARS-CoV-2 entry inhibitors. **Methods** The recombinant plasmid pAAV-EGFP-SARS2 was constructed to express both SARS-CoV-2 S protein and green fluorescent protein EGFP. The recombinant plasmid PaAV-EGFP-SARS2 was transiently expressed in 293T cells (293T/EGFP/SARS-2) and co-cultured with target cell Huh-7 to simulate virus infection of target cells. Fluorescence microscopy was used to observe and record the fusion of cells at different times at 2, 8, 12, 24 and 48 h. Meanwhile, the activity of SARS-CoV-2 entry inhibitor EK1 was evaluated on this model. **Results** Fluorescence microscope observation of cell fusion after mixing 293T/EGFP/SARS-2 and Huh-7 cells: fusion occurred 4 hours later, and large-scale fusion could be formed 24 hours later. The entry inhibitor EK1 of SARS-CoV-2 can inhibit cell fusion in a dose-dependent manner, with an IC_{50} of $(287 \pm 1.78) \text{ nmol/L}$.

Conclusion Successfully constructed a non-infectious and low-cost SARS-CoV-2 inhibitor drug detection and screening fusion model, which can screen natural small molecule compounds and provide a detection pathway for the development of coronavirus

【Key words】 SARS-CoV-2; cell-cell fusion; inhibitor of entry

^{***}2019 年末新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease-19, COVID-19)爆发并迅速传播, 疫情涉及全球大部分国家和地区, 截至 2022 年 10 月底, 全球已累计确诊病例超过 6.1 亿, 累计死亡超过 659 万。因此亟待开发有效的抗病毒药物用于控制 COVID-19 的传播。

新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome corona-virus 2, SARS-CoV-2)是 COVID-19 的病原体, 为单股正链 RNA 的 β 属冠状病毒, 与 SARS 病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS)具较高同源性^[1], 其基因组约为 30 kb, 编码 4 个结构蛋白, 包括刺突蛋白(Spike Protein, S 蛋白)、膜蛋白(Membrane Protein, M 蛋白)、囊膜蛋白(Envelope Protein, E 蛋白)和核衣壳蛋

白(Nucleocapsid protein, N 蛋白), 与病毒的构成和功能密切相关; 同时编码主蛋白酶(Main Protease, Mpro)、木瓜样蛋白酶(Papain-like Protease, PLpro)及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA-polymer-ase, RdRp)等非结构蛋白^[2], 在病毒的复制周期中发挥重要作用。其中 S 蛋白的 S1 亚基受体结

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81703573); 大理大学创新团队项目(No. ZKLX2019105)。

^{**} **【通讯作者】** 刘奇, E-mail: qiliu@aliyun.com

【作者简介】 单静(1998-), 女, 内蒙古鄂尔多斯人, 在读硕士研究生。主要研究方向: 感染与免疫。
E-mail: 873307118@qq.com

合域负责与靶细胞表面的 ACE 受体特异性结合^[3],并借助宿主体内多种蛋白酶的辅助参与病毒和细胞的膜融合,作为感染的第一步。尽管已有多种新冠疫苗被批准上市且接种次数高达 129.3 亿次,但不断出现的变异株(variant of concern, VOC)^[4]如奥密克戎(omicron)使病毒具有更高的传播性和致病性,并不断挑战着现有疫苗的有效性。因此抗病毒药物的研发仍然是应对此次新冠疫情的重要手段。

由于 SARS-CoV-2 的活病毒检测需要在生物安全三级实验室进行,这在一定程度上限制了 SARS-CoV-2 的研究。本研究拟构建一种能同时表达绿色荧光蛋白 GFP 和 SARS-CoV-2 的 S 蛋白基因的真核表达质粒,瞬时转染 293T 细胞。结合 SARS-CoV-2 进入细胞的分子机制,将其作为效应细胞与靶细胞 Huh7 共同培养(模拟 SARS-CoV-2 进入细胞的步骤),构建 SARS-CoV-2 的非感染性、可视化细胞-细胞融合模型(图 1)。该模型为一种无病毒感染风险、可视化、能够在普通实验室进行操作的 SARS-CoV-2 细胞-细胞融合模型,可用于在化合物库及天然药物提取物中快速筛选 SARS-CoV-2 进入抑制剂。

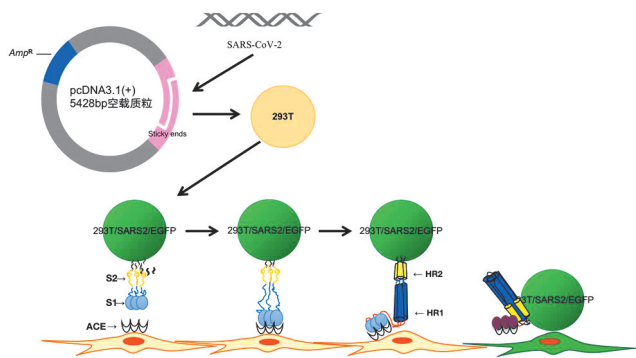


图 1 细胞-细胞融合模型构建过程

Fig. 1 Cell-cell fusion model construction process

材料与方法

1 材料

1.1 菌株、质粒和细胞感受态细胞 (DH-5 α)购于天根生物科技有限公司;含 SARS-CoV-2 S 基因的表达质粒 pcDNA3.1-SARS2、293T 细胞及 Huh-7 细胞为本实验室保存。多肽 EK1(SLDQINVTFLDLEYEM-KKDEEAIKKLEESYIDLKEL)和多肽 T1144(TTW-EAWDRIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL)均由浙江昂拓莱公司合成。

1.2 主要试剂 EcoRI 和 XhoI 限制性内切酶及 T4 DNA 购于美国 Takara 公司;Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase PCR 扩增试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;快速小提质粒试剂盒和大提质粒试剂盒及 DNA 纯化试剂盒购自天根生

科技有限公司;EZ Trans 细胞转染试剂购自 Life-iLab 李记生物公司;DMEM 培养基及细胞冻存液购自大连美仑生物科技有限公司;胎牛血清购自美国 ThermoFisher 公司;胰蛋白酶及青链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司。

2 方法

2.1 重组质粒 pAAV-EGFP-SARS2 的构建将 pcDNA3.1-SARS2 与 pAAV-IRES-GFP 分别用 EcoRI 和 XhoI 双酶切。酶切体系(100 μ L):EcoRI 和 XhoI 各 2 μ L, FastDigest Green Buffer 10 μ L, DNA 2 μ g, 补水至 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 20 min 后于 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,纯化后与 pAAV-IRES-GFP 载体连接。连接体系:载体 100 ng, 插入片段与载体按 7 : 1 摩尔比加入, T4 DNA Ligase Buffer 2 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, 补水至 20 μ L, 混合后置 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。取连接产物转化 DH-5 α 感受态细胞,涂板培养后挑取单个菌落克隆,使用小提质粒试剂盒提取质粒进行酶切验证,阳性克隆委托昆明擎科生物科技公司测序。

2.2 细胞培养及转染效应 细胞 293T 与靶细胞 Huh7 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱,均采用添加 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养基进行培养。293T 细胞铺于 6 孔板培养 24 h 后用于转染,每孔细胞约为 5×10^5 个。待贴壁细胞形态良好且密度达 80% 以上时,采用 EZ Trans 转染试剂进行转染:取 3 μ g 质粒 DNA,用 122 μ L 无血清及抗生素的 DMEM 培养液稀释,取 9 μ L EZ Trans 用 116 μ L 无血清和抗生素的 DMEM 培养液稀释,然后将稀释的 EZ Trans 转染试剂缓慢加入已稀释的质粒 DNA 中,室温放置 15 min,形成 EZ Trans 复合物。将上述 250 μ L EZ Trans-DNA 转染复合物均匀滴入 293T 细胞培养孔中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中轻轻摇晃培养以使 EZ Trans-DNA 复合物均匀分布。转染后 12 ~ 18 h,将含 EZ Trans-DNA 复合物的培养基弃去,更换新鲜培养液,继续培养至 36 ~ 48 h。转染 pAAV-IRES-GFP-SARS2 质粒的 293T 细胞命名为 293T/SARS2/EGFP 细胞,并以转染 pAAV-EGFP 质粒的 293T 细胞(命名为 293T/EGFP 细胞)作对照。

无胰酶介导的细胞-细胞融合:以 293T/EGFP 细胞作为阴性对照与 293T/SARS2/EGFP 细胞进行对比。将 DAPI 试剂(1 mg/mL)稀释成 15 μ g/mL,以 1/10 培养基体积分别加入已转染的 293T 细胞培养基和 Huh-7 细胞培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下培养 2 h,用 PBS 洗去 DAPI 染液;加入胰蛋白酶,分别将 293T 和 Huh-7 细胞消化成单个细胞,在波长 360 ~ 400 nm 的激发光下观察 DAPI 染色情况。弃去转

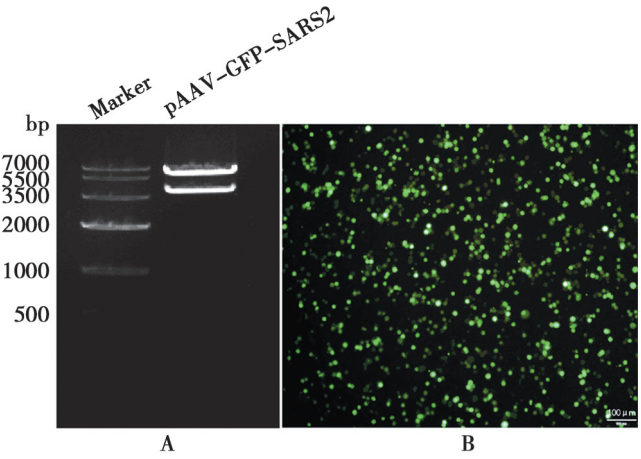
染 293T 细胞上清,及无菌 PBS 清洗两次。每孔加入 500 μ L 的胰酶,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境静置 3 min 至晃动六孔板细胞脱落时终止消化。重悬细胞,800 r/min(离心半径 15.6 cm)离心 3 min,弃上清,用 10% FBS 培养基重悬细胞。分别将 293T/EGFP/ SARS-2 细胞加入已铺 Huh-7 细胞的 96 孔板,200 μ L/孔,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下继续培养,在荧光显微镜下观察并记录细胞融合情况。

2.3 EK1 抑制活性测定 为检测在该模型上 SARS-CoV-2 进入抑制剂的效果,选择冠状病毒广谱进入抑制剂 EK1 进行试验,同时用 T1144 作阴性对照(一种 HIV 融合抑制剂)^[5-6],测定其在本模型的抑制活性。293T/SARS-2/EGFP 与 Huh7 共培养作为阳性孔,293T/EGFP 与 Huh7 共培养作为阴性孔,以 EK1 与 293T/SARS-2/EGFP 及 Huh7 共培养作为检测孔。于 10 h 后,计算各孔的细胞融合情况,同时计算检测孔中 EK1 对细胞融合的抑制率。抑制率(%)=[1-(E-N)/(P-N)] $\times$ 100%。

结 果

1 293T/SARS-2/EGFP 质粒的构建和鉴定

通过双酶切将 SARS-CoV-2 连接于 PAAV-IRES-GFP 载体中,连接产物转化 DH-5 α 感受态细胞进行培养。提取质粒,用 EcoRI 和 XhoI 进行双酶切鉴定,得到 6.1 kb 的载体片段和 3.8 kb 的 SARS-CoV-S 基因片段(图 2A),重组质粒 pAAV-EGFP-SAR2-S 构建成功。测序后进行 Blast 比对,结果与 SARS-CoV-2 基因序列完全吻合。



A pAAV-IRES-GFP-SARS-2 双酶切鉴定 B pAAV-IRES-GFP-SARS-2 表达的绿色荧光

图 2 重组质粒的鉴定及转染

A pAAV-IRES-GFP-SARS-2 Double enzyme digestion identification B pAAV-IRES-GFP-SARS-2 Green fluorescence expression

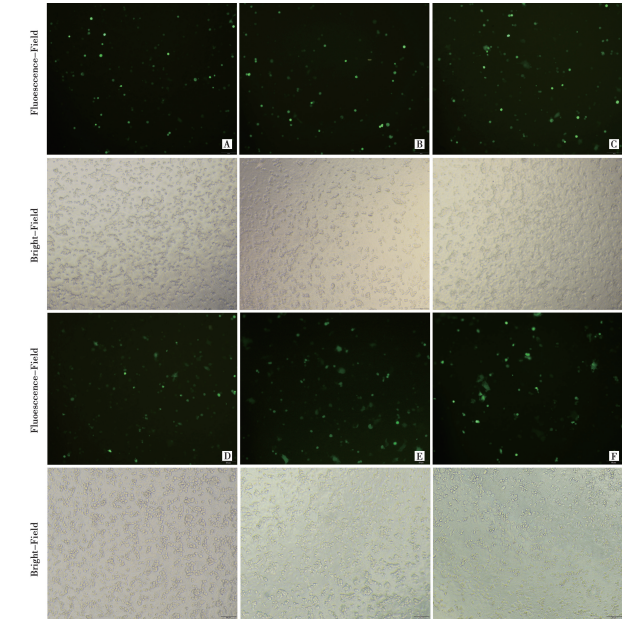
Fig. 2 Identification and transfection of recombinant plasmids

pAAV-EGFP-SARS2-S 经大提质粒后转染 293T

细胞(293T/SARS-2/EGFP),结果如图 2B。该质粒成功表达 GFP。

2 细胞-细胞融合模型的构建

SARS-CoV-2 病毒可感染 Huh-7^[7],因此使用 Huh-7 作为细胞融合实验的靶细胞。分别用 pAAV-EGFP-SARS2-S 和 pAAV-EGFP 转染至 293T 细胞,获得细胞 293T/EGFP/SARS2 与 293T/EGFP 细胞。然后分别将其与 Huh-7 共孵育。该效应细胞特异识别细胞上的受体,两者发生融合(图 3)。



A-E 分别为 293T/EGFP/SARS2 细胞与 Huh7 细胞混合 2、8、12、24、48 h 后的细胞融合形态 F 293T/EGFP 细胞与 Huh7 细胞混合 24 h 阴性对照

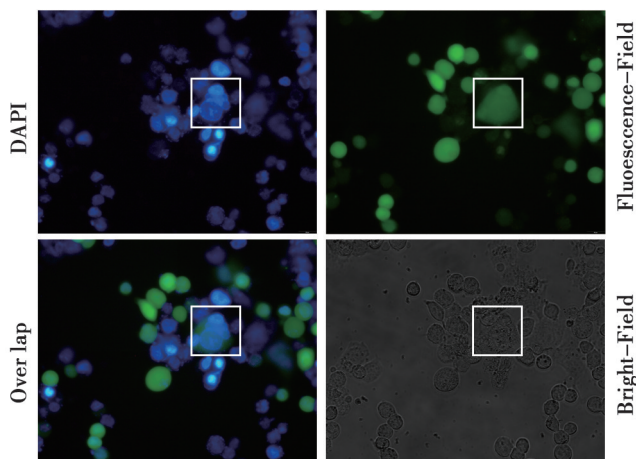
图 3 293T/EGFP/ SARS2 与 Huh-7 的细胞-细胞融合(10 $\times$)

A-E shows the fusion morphology of 293T/EGFP/SARS2 cells mixed with Huh7 cells at 2, 8, 12, 24, and 48 hours, respectively. F shows 293T/EGFP cells mixed with Huh7 cells at 24 hours negative control

Fig. 3 293T/EGFP/ SARS2 with Huh-7 cell-cell fusion(10 $\times$)

由上图可见,效应细胞 293T/EGFP/SARS2 与靶细胞 Huh-7 在 37 $^{\circ}$ C 共同培养 4 h 后,细胞与细胞发生融合。与未融合细胞相比,融合细胞的面积增大,荧光强度变弱。这是因为细胞发生融合时 EGFP 从效应细胞 293T/EGFP/SARS2 扩散到靶细胞 Huh-7 中,导致细胞中的绿色荧光蛋白重新分布。对照组 293T/EGFP 细胞未发生融合。表明以上细胞融合是由 SARS-CoV-2 S 介导的。培养 24 h 后,在光学视野和荧光视野均观察到效应细胞与靶细胞之间形成了更大的融合,而对照组未发生融合,也未形成大的合胞体。DAPI 是常用于活细胞和固定细胞染色的一种荧光染料,可透过细胞完整的细胞膜并与细胞核中的双链 DNA 强力结合,在 364 nm 波长激发后产生比 DAPI 自身强 20 多倍的蓝色荧光。用 DAPI 对融合细胞(2

h的融合形态)进行细胞核染色,可见未发生融合的细胞只有一个细胞核,而发生融合的细胞中有两个或多个细胞核(图4)。表明效应细胞293T/EGFP/SARS2与靶细胞发生融合后绿色荧光范围增大,荧光强度减弱,形成核包体。



A 绿色荧光视野下的融合细胞 B DAPI染色后的细胞核 C 绿色荧光和DAPI染色的重叠图片 D 融合细胞的白光视野

图4 融合细胞的细胞核染色(40×)

A Fusion cells under green fluorescence field of view B DAPI stained nuclei C Overlapping images of green fluorescence and DAPI staining D White light field of view of fused cells

Fig. 4 Nuclear staining of fused cells (40×)

3 EK1对SARS-CoV-2 S介导的细胞-细胞融合抑制活性

结果表明,冠状病毒广谱进入抑制剂EK1能抑制SARS-CoV-2 S诱导的细胞-细胞融合,且呈剂量依赖,IC₅₀为(287±1.78)nmol/L。对照组T1144无细胞融合抑制作用(图5)。

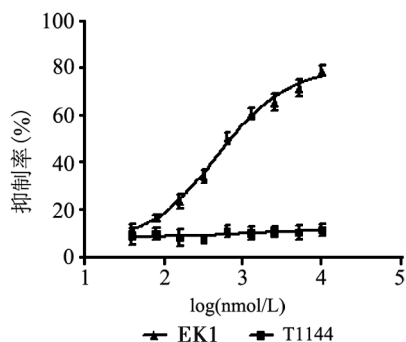


图5 SARS-CoV-2 S介导的细胞-细胞融合模型药物活性测定

Fig. 5 Inhibitory activity of SARS-CoV-2 entry inhibitor on env-mediated cell-cell fusion model of SARS-CoV-2 S

讨论

冠状病毒主要是通过受体介导的膜融合侵入宿主细胞,包括S蛋白与受体结合、S蛋白发生裂解、病毒与宿主细胞膜融合3个步骤。冠状病毒通过RBD区识别宿主细胞膜表面受体人血管紧张素转换酶

(Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)并与之结合,随后S1与S2分子之间结合力减弱,或被宿主蛋白酶将S蛋白酶解为S1和S2。病毒与宿主细胞融合后S2构象改变,并将疏水FP插入细胞内体膜HR1和HR2通过反向折叠形成六螺旋束,使得病毒囊膜与内体膜靠近发生膜融合,释放核衣壳或病毒基因组到细胞质中^[8]。研究表明,SARS-CoV-2 S蛋白的RBD与宿主细胞ACE2之间具有极强的亲和力,RBD结构域亲和力是SARS-CoV S蛋白的10~20倍^[9]。S蛋白是介导SARS-CoV-2入侵靶细胞的关键蛋白,是研发抗病毒药物及疫苗的重要靶点。

冠状病毒抑制剂是冠状病毒药物开发的重要方向。SARS-CoV-2进入细胞抑制剂可分为三类:一是靶向刺突蛋白进入细胞抑制剂,分别以刺突蛋白RBD和HR1为靶点阻断病毒与受体融合的蛋白多肽抑制剂。小分子抑制剂如肝素、依诺肝素抑制剂能够模仿SARS-CoV-2进入细胞所需蛋白HS而与S蛋白RBD区域竞争性结合,抑制病毒与细胞膜表面受体结合。二是靶向细胞受体抑制剂,如以氯喹啉啉为主的靶向ACE的抑制剂能结合ACE2受体,从而抑制SARS-CoV-2感染细胞。三是靶向SARS-CoV-2辅助蛋白的抑制剂,包括靶向TMPRSS2的抑制剂、靶向CatB/L的抑制剂、靶向furin的抑制剂等^[1]。进入抑制剂能在病毒入侵宿主细胞前发挥作用,可切断病毒的传播路径。因此可优先考虑其在预防和治疗新型冠状病毒肺炎中的作用。EK1为首个冠状病毒通用融合抑制剂,已被证实可广谱抑制多种人冠状病毒和一些蝙蝠来源的SARSr-CoV的感染^[10]。因此研究选用EK1作为本模型的HCoV进入抑制剂。

关于冠状病毒进入抑制剂研究倍受重视,但药物的开发仍存在诸多问题,如进入抑制剂的筛选方法。目前采用的筛选方法包括虚拟筛选法、FRET筛选法和表型筛选法。虚拟筛选法虽经济高效但容易出现假阳性;FRET筛选法易出现假阳性且成本较高;表型筛选法需要在生物安全P3级生物安全实验室进行,有一定局限性^[11]。本研究参照MERS-CoV S蛋白的细胞细胞融合模型^[12],HIV-1临床株SC42无感染性细胞-细胞融合模型的构建^[13],以及HIV NL4-3病毒株非感染性细胞细胞融合模型的构建^[14],建立了一种可视化的、无感染的SARS-CoV-2检测模型。该模型用同时表达SARS-CoV-2 S蛋白及GFP的重组质粒瞬时转染293T细胞,再将转染后的293T细胞与靶细胞Huh-7共同培养,可模拟病毒的进入过程,待细胞发生融合的2、4、8、12、24、48 h分别在在荧光显微镜下进行计数,通过细胞融合情况评价SARS-CoV-2进入抑制剂的抑制效果,且无感染性。此模型的构建可以在

普通实验室内进行,且方法简单、成本低廉,具有较高的特异性,可作为 SARS-CoV-2 进入抑制剂的筛选模型对天然小分子化合物进行筛选,为冠状病毒药物的研发提供了一种检测途径。

【参考文献】

- [1] 龙昕雁,罗荣华,郑永唐. 新型冠状病毒进入细胞抑制剂的研究进展[J]. 中国药理学通报,2021,37(8):1037-1041.
- [2] 蓝巧帅,夏帅,陆路,等. 以不变应万变:高效广谱抗新冠病毒疫苗和药物防控现在和未来的冠状病毒疫情[J]. 中国科学基金,2022,36(4):635-643.
- [3] Kumar S, Saxena SK. Structural and molecular perspectives of SARS-CoV-2[J]. Methods,2021(195):23-28.
- [4] Wang L, Cheng G. Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa[J]. J Med Virol,2022,94(4):1728-1733.
- [5] Xia S, Liu M, Wang C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion[J]. Cell Res,2020,30(4):343-355.
- [6] Louis JM, Baber JL, Clore GM. The C34 peptide fusion inhibitor binds to the six-helix bundle core domain of HIV-1 gp41 by

displacement of the C-terminal helical repeat region [J]. Biochemistry,2015,54(45):6796-6805.

- [7] Takayama K. *In vitro* and animal models for SARS-CoV-2 research[J]. Trend Pharmacological Sci,2020,41(8):513-517.
- [9] Wrapp D, Wang N, Corbett KS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. Science (New York, N. Y.),2020,367(6483):1260-1263.
- [10] Xia S, Yan L, Xu W, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike [J]. Science Advances,2019,5(4):eaav4580.
- [11] 威海燕,闫干干,付正豪,等. 新型冠状病毒主蛋白酶抑制剂的筛选方法研究进展[J]. 生命的化学,2021,41(2):207-214.
- [12] Lu L, Liu Q, Zhu Y. Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor [J]. Nature Communications,2014(5):3067.
- [13] 石哲芳,魏雪玲,刘奇. HIV-1 临床株 SC42 无感染性细胞-细胞融合模型的构建[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(8):892-895,900.
- [14] 石哲芳,罗春雨,李亚飞,等. HIV NL4-3 病毒株非感染性细胞-细胞融合模型的构建[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(6):496-501.

【收稿日期】 2022-12-21 【修回日期】 2023-03-01

(上接 624 页)

- [3] Yazici OP, Turanli 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]. J Med Virol,2022,94(2):575-581.
- [4] Saverio C, Gabriela K, Veronica VG, et al. The epidemiological signature of influenza B virus and its B/Victoria and B/Yamagata lineages in the 21st century [J]. PLoS One, 2019, 14 (9): e0222381.
- [5] Huang WJ, Cheng YH, Tan MJ, et al. Epidemiological and virological surveillance of influenza viruses in China during 2020-2021[J]. Infect Dis Poverty,2022,11(1):74.
- [6] Worldwide Influenza Centre/WHO CC for Reference & Research on Influenza. Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2021 - 2022 [R]. London, United Kingdom: The Francis Crick Institute,2021.
- [7] Ni F, Kondrashkina E, Wang Q. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin-ScienceDirect [J]. Virology,2013,446(1-2):112-122.
- [8] Wang QH, Tian X, Chen XR, et al. Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin[J]. Proc Natl Acad

Sci U S A,2007,104(43):16874-168749.

- [9] Chen R, Holmes EC. The evolutionary dynamics of human influenza b virus[J]. J Mol Evol,2008,66(6):655-663.
- [10] WHO. Fact sheet on influenza (seasonal) [EB/OL]. (2018-11-06)[2022-07-30][https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- [11] 吴巨龙,孙林,张圣洋,等. 山东省 2017-2018 年 B 型流感病毒药物敏感性检测及神经氨酸酶基因特征分析[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(3):229-233.
- [12] Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin -neuraminidase with influenza virus neuraminidase[J]. J Virol,1993,67(6):2972-2980.
- [13] Mazhar H, Henry G, Yhew HT, et al. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management[J]. Infect Drug Resist,2017(10):121-134.
- [14] Zoltan V, Peter T. Extinction of the influenza B yamagata line during the COVID pandemic-implications for vaccine composition [J]. Viruses,2022,14(8):1745.

【收稿日期】 2023-01-09 【修回日期】 2023-03-21