

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20210518

· 论 著 ·

人肺腺癌细胞 A549 对蜱媒脑炎病毒的易感性分析

唐万达¹, 赵平¹, 任瑞文², 戚中田¹, 赵兰娟^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海 200433

2. 南部战区疾病预防控制中心, 广州 510507

[摘要] **目的** 研究蜱媒脑炎病毒(TBEV)在易感细胞中的培养特性,并鉴定病毒RNA的复制、蛋白质表达和感染性。**方法** 利用非洲绿猴肾细胞Vero培养TBEV,采用qPCR检测TBEV RNA的复制水平,采用蛋白质印迹法检测黄病毒包膜蛋白的表达,采用空斑实验检测培养基中TBEV的滴度。用TBEV感染人肺腺癌细胞A549,于显微镜下观察TBEV感染A549细胞的细胞病变效应。通过免疫荧光法检测TBEV感染的A549、Vero细胞中黄病毒包膜蛋白的表达。**结果** 与孵育48 h的细胞相比,孵育72 h的Vero细胞内TBEV RNA水平更高,并检测到有黄病毒包膜蛋白表达。空斑实验结果显示,在孵育72 h Vero细胞的培养基中,TBEV病毒滴度为 $(2.0 \pm 1.4) \times 10^6$ 空斑形成单位(PFU)/mL。TBEV感染可引起A549细胞的细胞病变效应。在1:1 000稀释TBEV感染的细胞中,A549细胞中黄病毒包膜蛋白表达的阳性率(61.0%)高于Vero细胞(9.3%)。TBEV感染A549细胞48 h培养基中的病毒滴度高于Vero细胞培养基中的病毒滴度 $[(2.0 \pm 0.4) \times 10^7$ PFU/mL vs $(8.5 \pm 2.1) \times 10^3$ PFU/mL, $P < 0.05$]。**结论** Vero细胞可用于培养TBEV,A549细胞对TBEV更易感。

[关键词] 蜱媒脑炎病毒;细胞培养;RNA复制;蛋白质表达;滴度

[中图分类号] R 373.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2022)05-0478-06

Susceptibility of human lung adenocarcinoma cell line A549 to tick-borne encephalitis virus

TANG Wan-da¹, ZHAO Ping¹, REN Rui-wen², QI Zhong-tian¹, ZHAO Lan-juan^{1*}

1. Department of Biomedical Defense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Center for Disease Control and Prevention of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou 510507, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To study the culture characteristics of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in susceptible cells and identify the RNA replication, protein expression and infectivity. **Methods** The TBEV was cultured using African green monkey kidney cells (Vero cells). The RNA replication of TBEV was detected by quantitative polymerase chain reaction, the expression of flavivirus envelope protein was detected by Western blotting, and the titer of TBEV was detected by plaque assay. The human lung adenocarcinoma cells (A549 cells) was infected with TBEV, and the cytopathic effect of A549 cells infected with TBEV was observed under microscope. The expression of flavivirus envelope protein in A549 and Vero cells infected with TBEV was detected by immunofluorescence staining. **Results** The levels of TBEV RNA were increased in Vero cells at 72 h incubation compared with those at 48 h incubation, and the expression of flavivirus envelope protein was detectable. The results of plaque assay showed that the TBEV titer in the supernatant of Vero cells was $(2.0 \pm 1.4) \times 10^6$ plaque-forming unit (PFU)/mL after culturing for 72 h. There was obvious cytopathic effect in A549 cells with TBEV infection. The positive rate of flavivirus envelope protein expression in A549 cells (61.0%) was higher than that in Vero cells (9.3%) after infection with 1:1 000-diluted TBEV. Compared with Vero cells, the titer in the supernatant of A549 cells infected with TBEV for 48 h was significantly higher $[(2.0 \pm 0.4) \times 10^7$ PFU/mL vs $[8.5 \pm 2.1) \times 10^3$ PFU/mL, $P < 0.05$]. **Conclusion** Vero cells can be used to culture TBEV, and A549 cells are more susceptible to TBEV.

[Key words] tick-borne encephalitis virus; cell culture; RNA replication; protein expression; titer

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(5): 478-483]

[收稿日期] 2021-05-19 [接受日期] 2022-01-20

[作者简介] 唐万达, 硕士生. E-mail: 1908046645@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870990, E-mail: ljzhao13@163.com

蜱媒脑炎病毒 (tick-borne encephalitis virus, TBEV) 是一种由传播媒介蜱叮咬传播的虫媒病毒, 也称森林脑炎病毒 (forest encephalitis virus), 为自然疫源性疾病蜱媒脑炎的病原体。TBEV 感染会侵犯中枢神经系统, 引起急性脑膜炎或脑炎, 可伴有永久性后遗症, 致死率为 12%~40%^[1]。蜱媒脑炎主要流行于欧洲、东亚和东南亚^[2]。在中国, 蜱媒脑炎主要分布于东北和新疆地区, 西藏和云南也有病例; 传播媒介蜱的生活习性造成疾病呈季节性流行^[3]。目前蜱媒脑炎的临床治疗缺乏高效、特异的抗 TBEV 药物。

TBEV 属于黄病毒科黄病毒属, 和该属其他成员如寨卡病毒、登革病毒、黄热病毒、西尼罗病毒、乙型脑炎病毒等均是重要的人类高致病性病原体。TBEV 是有包膜的正链单链 RNA 病毒, 病毒基因组编码衣壳蛋白、前膜蛋白、包膜蛋白 3 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白^[4]。TBEV 分为欧洲亚型、西伯利亚亚型、远东亚型、贝加尔亚型和喜马拉雅亚型^[5]。文献报道, 中国 TBEV 分离株均为远东亚型^[6]。TBEV 感染所致疾病的严重程度与病毒的型别有关, 而远东亚型 TBEV 是致病性最严重的型别^[5]。全球蜱媒脑炎存在较高的发病率和致死率, 一些非自然疫源地也曾有病例发生。本研究旨在考察 TBEV 在易感细胞中的培养特性及鉴定病毒的 RNA 复制、蛋白质表达和感染性, 为抗 TBEV 药物的筛选研究提供合适的细胞模型和病毒检测方法。

1 材料和方法

1.1 主要材料 DMEM、FBS、EDTA、胰蛋白酶、TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), M-MLV 反转录酶、三磷酸脱氧核苷酸混合溶液、Eastep[®] qPCR 预混液试剂盒 (美国 Promega 公司), 随机引物、TBEV 非结构蛋白 1 引物 (北京六合华大基因科技股份有限公司), 黄病毒包膜蛋白鼠单克隆抗体 4G2 (美国 Sigma-Aldrich 公司), β -肌动蛋白兔多克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), HRP 标记的山羊抗兔或鼠 IgG、ECL 化学发光液 (美国 Bio-Rad 公司), Alexa Fluor[®] 488 山羊抗鼠 IgG、DAPI 封固剂 (英国 Abcam 公司), 牛血清白蛋白 (美国 Affymetrix 公司), 4% 多聚甲醛溶液 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。人肺腺癌细胞 A549 和猪肾细胞 PK-15 由复旦大学基础医学院病原生物学系叶荣研究员馈赠, TBEV 及非洲绿猴肾细胞 Vero 由海军军医大学 (第二军

医大学) 海军医学系生物医学防护教研室保存。

1.2 细胞培养 A549、PK-15、Vero 细胞均采用含 10% FBS、1% 谷氨酰胺、1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM (完全培养基) 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。用含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 对融合度达到 95% 以上的细胞进行传代培养。

1.3 病毒制备 将生长状态佳的 Vero 细胞接种于 T75 细胞培养瓶, 细胞融合度约为 90% 时吸弃培养基, 将 1 mL TBEV 和 5 mL 完全培养基涡旋混匀后加入细胞培养瓶内, 置 37 °C 培养箱中吸附 2 h, 其间轻缓摇动 2 次; 2 h 后于培养瓶内补加 12 mL 完全培养基, 继续培养并开始计时。每天于显微镜下观察细胞病变效应; 培养 72 h 后将培养瓶内培养基转移至 15 mL 离心管, 1 010×g 离心 10 min, 收集、分装病毒, -80 °C 冰箱贮存备用。

1.4 空斑实验 对于 Vero 细胞培养的 TBEV, 使用前在 PK-15 细胞上用空斑法测定病毒滴度。空斑实验操作参照文献 [7] 并适当改进: PK-15 细胞接种于 12 孔培养板, 细胞融合度接近 100% 时进行实验; 用完全培养基 10 倍系列稀释病毒, 于吸弃培养基的培养板内每孔加入稀释病毒液 1 mL, 吸附 3 h 后吸弃病毒液, 每孔加入 2% 羧甲基纤维素钠覆盖液 3 mL, 培养 6 d 后吸弃覆盖液; 每孔加入 4% 多聚甲醛溶液 600 μ L, 室温固定 15 min 后吸弃; 每孔加入 1% 结晶紫染液 600 μ L, 染色 15 min 后吸弃; 轻缓流水洗板至流水无色, 晾干后观察并计数病毒空斑。采用 Reed-Muench 法计算空斑形成单位 (plaque-forming unit, PFU), 以 PFU/mL 表示病毒滴度。

1.5 TBEV 感染细胞 将 A549 细胞接种于 12 孔培养板, 培养过夜。TBEV 感染细胞方式一: 细胞融合度接近 100% 时, 吸弃孔内培养基; 每孔加入完全培养基稀释的病毒液 1 mL, 病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.1。方式二: 吸弃孔内培养基后, 每孔加入稀释病毒液 200 μ L, MOI 为 0.1, 于 37 °C 吸附 2 h 后吸弃病毒液, 培养基洗涤 1 次后加入完全培养基 (每孔 1 mL)。每种方式均设未感染病毒的细胞对照。培养 48 h 后, 使用倒置显微镜 (日本 Olympus 公司) 观察细胞病变效应。

1.6 免疫荧光实验 A549、Vero 细胞接种于 48 孔培养板, 培养过夜, 细胞融合度约 90% 时吸弃培养基, 每孔加入完全培养基稀释的 TBEV 300 μ L (分别按 1 : 1 000、1 : 100 000 比例稀释), 未感染

病毒的对照孔加入完全培养基。细胞培养 48 h 后, 吸弃稀释病毒液, PBS 洗涤后每孔加入 4% 多聚甲醛溶液 300 μ L, 室温固定 15 min。PBS 洗涤后每孔加入甲醇 300 μ L, 于 -20 $^{\circ}$ C 透化 20 min。PBS 洗涤后每孔加入 3% 牛血清白蛋白溶液 300 μ L, 封闭 2 h。吸弃封闭液后加入 1% 牛血清白蛋白溶液稀释的黄病毒包膜蛋白鼠单克隆抗体 (稀释比例为 1 : 500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入 1% 牛血清白蛋白溶液稀释的 Alexa Fluor[®] 488 标记山羊抗鼠 IgG (稀释比例为 1 : 1 000) 避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后加入 DAPI 封固剂, 细胞核染色 5 min。使用全自动细胞成像及分析系统 (BioTek Cytation 5 Imaging Reader, 美国 BioTek 公司) 观察, 分析病毒包膜蛋白的表达情况。

1.7 实时 qPCR 实验 Vero 细胞中 RNA 样品收集、RNA 浓度检测、反转录实验操作参照文献 [8]。以 cDNA 为模板, 使用 Eastep[®] qPCR 预混液试剂盒, 采用 Rotor-Gene 3000 型 PCR 仪 (澳大利亚 Corbett 公司) 扩增目的基因。TBEV 的非结构蛋白 1 引物序列见文献 [9]。

1.8 蛋白质印迹法实验 Vero 细胞中蛋白质样品的制备、电泳及电转膜实验操作参照文献 [8], 电泳及电转膜实验使用 Bio-Rad Mini 仪。一抗用稀

释的黄病毒包膜蛋白鼠单克隆抗体 (稀释比例为 1 : 1 000) 和 β -肌动蛋白兔多克隆抗体 (稀释比例为 1 : 1 000), 二抗用 HRP 标记羊抗鼠或兔 IgG (稀释比例均为 1 : 2 000)。最后膜上加 ECL 化学发光液, 用化学发光成像仪 (英国 GeneGnome 公司) 显色, 分析黄病毒包膜蛋白的表达情况。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 病毒滴度的组间比较采用 Student *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Vero 细胞能够用于培养 TBEV qPCR 检测结果显示, 在无 TBEV 孵育的对照 Vero 细胞中, TBEV 的非结构蛋白 1 基因未出现扩增曲线; TBEV 孵育的 Vero 细胞出现扩增曲线, 并且孵育 72 h 样品的扩增曲线起峰时间较孵育 48 h 样品早, 荧光强度值也较高 (图 1A)。蛋白质印迹法检测结果显示, 在对照 Vero 细胞中未见黄病毒包膜蛋白表达, 而在 TBEV 孵育 72 h 的细胞中检出黄病毒包膜蛋白表达 (图 1B)。空斑实验结果显示, 在 TBEV 孵育 Vero 细胞 72 h 的培养基中病毒滴度为 $(2.0 \pm 1.4) \times 10^6$ PFU/mL。上述结果表明, Vero 细胞能够用于 TBEV 培养。

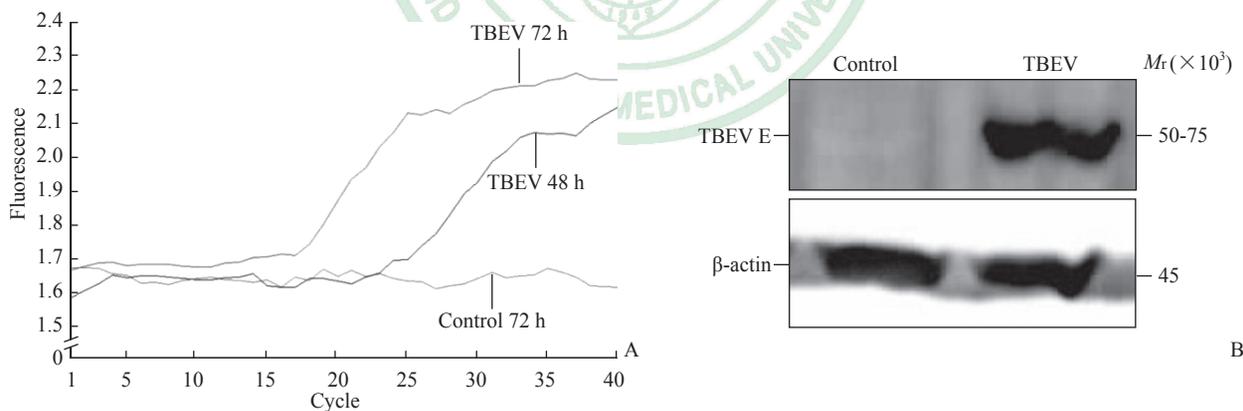


图 1 Vero 细胞培养 TBEV 的 RNA 复制和黄病毒包膜蛋白表达

Fig 1 RNA replication and flavivirus envelope protein expression of TBEV in Vero cells incubated with TBEV

A: TBEV RNA levels in Vero cells incubated with TBEV for 48 h and 72 h or without TBEV (control) detected by real time quantitative polymerase chain reaction; B: TBEV envelope protein (TBEV E) expression in Vero cells incubated with TBEV for 72 h or without TBEV (control) detected by Western blotting. TBEV: Tick-borne encephalitis virus.

2.2 TBEV 感染导致 A549 细胞病变 如图 2A 所示, TBEV 未感染的 A549 细胞形态正常, 铺满培养板孔底; TBEV 感染 48 h 的 A549 细胞出现明显细胞病变效应, 表现为胞体皱缩、变圆, 细胞间隙增大, 并出现细胞脱落。TBEV 孵育 2 h 后吸弃病

毒液, 继续以新鲜培养基培养 48 h 的 A549 细胞也有明显细胞病变效应, 而无 TBEV 孵育的对照组细胞则形态正常 (图 2B)。这一结果提示, Vero 细胞培养的 TBEV 具有高度感染性, A549 细胞对其易感, 2 种感染方式均可引发细胞病变效应。

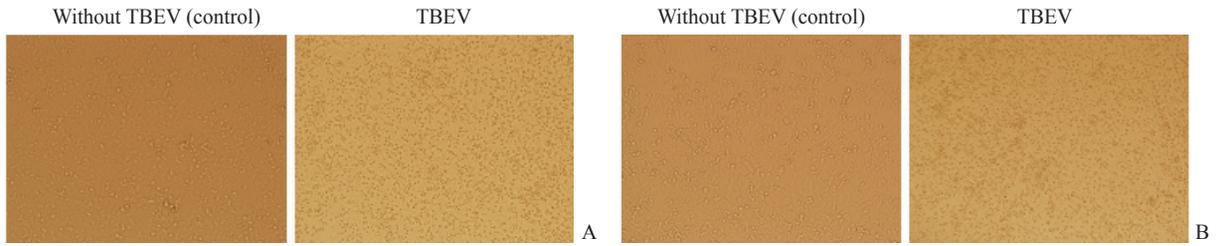


图 2 TBEV 感染后 A549 细胞的细胞病变效应 (100×)

Fig 2 Cytopathic effect of A549 cells after TBEV infection (100×)

A: A549 cells were incubated with or without TBEV for 48 h; B: A549 cells were incubated with or without TBEV for 2 h and continued to be cultured with fresh medium for 48 h after discarding the viral fluid. TBEV: Tick-borne encephalitis virus.

2.3 TBEV 感染的 A549 和 Vero 细胞中黄病毒包膜蛋白表达及病毒增殖水平 如图 3 所示, 在未感染 TBEV 的 A549 细胞中无阳性信号, 而在 1 : 1 000 稀释 TBEV 感染的 A549 和 Vero 细胞中均可见阳性信号——绿色荧光 (包膜蛋白)。经计数分析, 在 1 : 1 000 稀释 TBEV 感染的 A549 细胞中黄病毒包膜蛋白表达的阳性率为 61.0%, 而在 Vero 细胞中阳性率仅为 9.3%; 在 1 : 100 000 稀释 TBEV 感染的 A549 细胞中黄病毒包膜蛋白表达的阳性

率为 43.0%, 在 Vero 细胞中未检测到黄病毒包膜蛋白表达。空斑实验结果显示, TBEV 感染 A549 细胞 48 h 的培养基中的病毒滴度为 $(2.0 \pm 0.4) \times 10^7$ PFU/mL, 高于 Vero 细胞培养基中的病毒滴度 [$(8.5 \pm 2.1) \times 10^3$ PFU/mL], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果表明, TBEV 在 A549 细胞中的增殖水平较 Vero 细胞高, A549 细胞可作为抗病毒药物筛选研究的细胞模型。

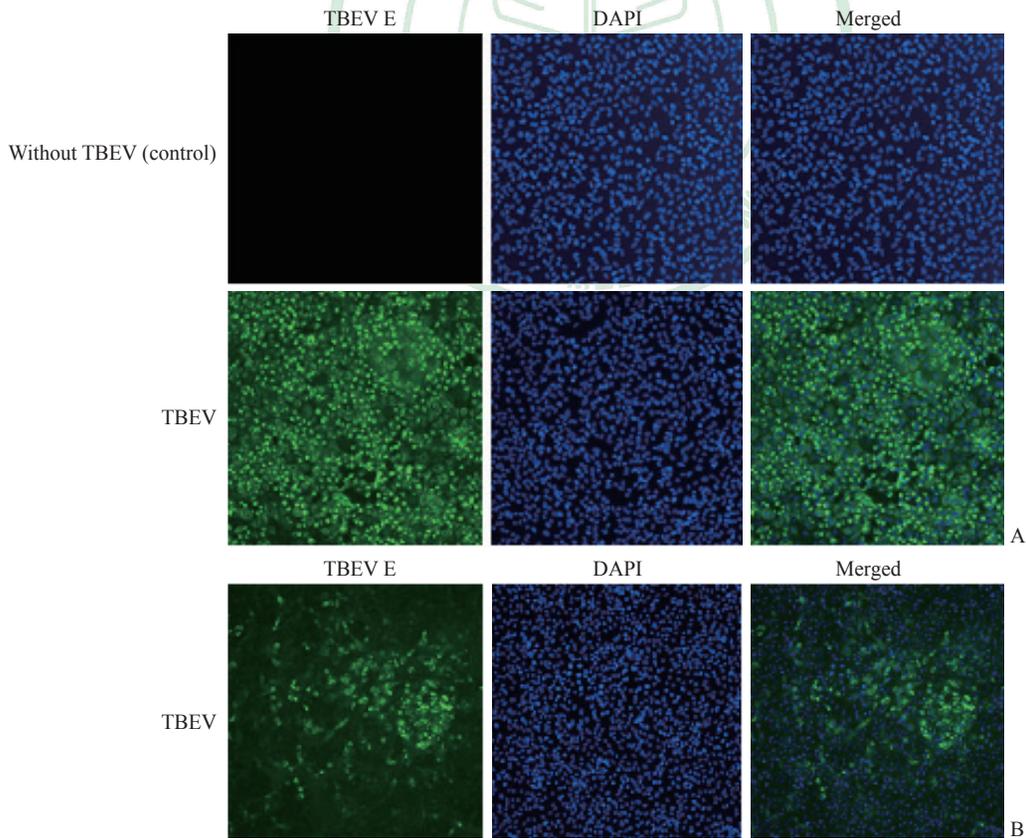


图 3 TBEV 感染的 A549 和 Vero 细胞中黄病毒包膜蛋白的表达 (100×)

Fig 3 Expression of flavivirus envelope protein in TBEV-infected A549 and Vero cells (100×)

A: A549 cells; B: Vero cells. The cells with or without TBEV infection at 1 : 1 000 dilution for 48 h were stained with flavivirus envelope protein-specific antibody and DAPI, and the TBEV envelope protein (TBEV E) (green) and cell nuclei (blue) were detected by indirect immunofluorescence staining. TBEV: Tick-borne encephalitis virus; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

3 讨论

虫媒病毒在吸血昆虫和宿主动物体内循环,可在自然界中长期存在,并随着传播媒介在全球分布范围的扩大而传播扩散,被称为重要的被忽略的热带传染病病原体^[10]。深入研究 TBEV 的生物学性状与致病机制对于防控 TBEV 感染具有重要意义。

病毒的生物学性状、病毒-细胞相互作用、病毒的致病机制和抗病毒药物的研发等研究工作需要合适的细胞模型。一些人畜共患病病毒如天花病毒、裂谷热病毒和脑心肌炎病毒 1 可在许多细胞系中增殖,而西尼罗病毒、辛德比斯病毒和 TBEV 仅在部分细胞系中增殖,表明特异的细胞分子可能参与病毒的增殖过程^[11]。文献报道,猪肾 PK 细胞对 TBEV 易感,可用于培养病毒, TBEV 感染的 PK 细胞可观察到细胞病变效应和空斑形成^[12]。

有研究通过检测 TBEV 滴度和 RNA 复制水平发现,病毒可在人单核细胞 THP-1 内有效复制和增殖,提示在 TBEV 感染并播散至其他组织器官过程中单核细胞可能起重要作用^[13]。仓鼠肾细胞 BHK-21 可用于从野生啮齿动物体内分离 TBEV^[14]。对 TBEV 包膜蛋白变异与感染性的研究选用病毒感染的 BHK-21 细胞作为模型^[15]。检测 TBEV 在 BHK-21 细胞内的空斑形成、RNA 复制和蛋白质合成可用于比较不同型别 TBEV 生物学特性的差异^[16]。Vero 细胞被用于从蜱体内分离培养 TBEV^[17],还可用于蜱媒脑炎疫苗的研发^[18]。本研究通过对 TBEV 的 RNA 复制、蛋白质表达与滴度等指标进行检测,发现在 TBEV 孵育的 Vero 细胞内不仅检测到 TBEV RNA 与黄病毒包膜蛋白,还在细胞培养基中检测到释放的病毒。这些结果表明 Vero 细胞能够用于培养 TBEV,并可从病毒的 RNA 复制、蛋白质合成与滴度方面对其进行鉴定。

TBEV 的增殖水平在不同类型细胞中有所差异。A549 细胞曾被用于研究蜱体内 TBEV 分离株与标准株 Hypr 之间的区别^[17]。近年有研究报道,在 A549 细胞中,腺苷类似物 NITD008 可抑制 TBEV RNA 复制,2-脱氧糖尿苷衍生物也可降低病毒滴度,均具有较高的抗 TBEV 活性^[19-20]。本研究用 Vero 细胞培养的 TBEV 感染 A549 细胞,发现 TBEV 在 2 种感染方式下均可引发明显细胞病变效应;间接免疫荧光法检测结果显示 A549 细胞中病

毒包膜蛋白的表达水平远高于 Vero 细胞;空斑实验结果证明 A549 细胞培养基中病毒滴度高于 Vero 细胞。本研究结果表明 Vero 细胞培养的 TBEV 具有感染性, A549 细胞对 TBEV 更易感。

[参考文献]

- [1] BARDINA S V, LIM J K. The role of chemokines in the pathogenesis of neurotropic flaviviruses[J]. *Immunol Res*, 2012, 54: 121-132.
- [2] MANSFIELD K L, JOHNSON N, PHIPPS L P, STEPHENSON J R, FOOKS A R, SOLOMON T. Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis[J]. *J Gen Virol*, 2009, 90: 1781-1794.
- [3] GAO X, NASCI R, LIANG G. The neglected arboviral infections in mainland China[J/OL]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4: e624. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000624.
- [4] LINDQUIST L, VAPALAHTI O. Tick-borne encephalitis[J]. *Lancet*, 2008, 371: 1861-1871.
- [5] RUZEK D, AVŠIČ ŽUPANC T, BORDE J, CHRDLA A, EYER L, KARGANOVA G, et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines[J]. *Antiviral Res*, 2019, 164: 23-51.
- [6] YOSHII K, SONG J Y, PARK S B, YANG J, SCHMITT H J. Tick-borne encephalitis in Japan, republic of Korea and China[J/OL]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6: e82. DOI: 10.1038/emi.2017.69.
- [7] 罗正汉,徐铮昊,唐海琳,何燕华,彭浩然,赵兰娟,等.基孔肯雅病毒感染性克隆的构建及鉴定[J]. *国际病毒学杂志*, 2019, 26: 337-340.
- [8] 徐铮昊,唐海琳,任瑞文,赵平,戚中田,赵兰娟.西尼罗病毒对人神经母细胞瘤细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶途径的调控[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40: 1169-1175.
- [9] XU Z H, TANG H L, REN R W, ZHAO P, QI Z T, ZHAO L J. Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase pathway by West Nile virus in human neuroblastoma cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2019, 40: 1169-1175.
- [9] ACHAZI K, NITSCHKE A, PATEL P, RADONIĆ A, DONOSO MANTKE O, NIEDRIG M. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing[J]. *J Virol Methods*, 2011, 171: 34-39.
- [10] 梁国栋. 虫媒病毒——重要的被忽略的热带传染病病原体[J]. *中国热带医学*, 2018, 18: 1-5.
- [11] BINDER F, LENK M, WEBER S, STOEK F, DILL V, REICHE S, et al. Common vole (*Microtus arvalis*) and bank vole (*Myodes glareolus*) derived permanent

- cell lines differ in their susceptibility and replication kinetics of animal and zoonotic viruses[J/OL]. *J Virol Methods*, 2019, 274: 113729. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113729.
- [12] LEONOVA G N, MAYSTROVSKAYA O S, KONDRATOV I G, TAKASHIMA I, BELIKOV S I. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection[J]. *Virus Res*, 2014, 189: 34-42.
- [13] 魏婧靖, 康晓平, 李裕昌, 吴晓燕, 张雨, 杨银辉. 蜱传脑炎病毒对人单核细胞的致病性[J]. *微生物学报*, 2013, 53: 1221-1225.
- [14] KIM S Y, YUN S M, HAN M G, LEE I Y, LEE N Y, JEONG Y E, et al. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, south Korea[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2008, 8: 7-13.
- [15] MANDL C W, KROSCHEWSKI H, ALLISON S L, KOFLER R, HOLZMANN H, MEIXNER T, et al. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo*[J]. *J Virol*, 2001, 75: 5627-5637.
- [16] GOTO A, HAYASAKA D, YOSHII K, MIZUTANI T, KARIWA H, TAKASHIMA I. Genetic and biological comparison of tick-borne encephalitis viruses from Hokkaido and Far-Eastern Russia[J]. *Jpn J Vet Res*, 2002, 49: 297-307.
- [17] HENNINGSSON A J, LINDQVIST R, NORBERG P, LINDBLOM P, ROTH A, FORSBERG P, et al. Human tick-borne encephalitis and characterization of virus from biting tick[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22: 1485-1487.
- [18] VOROVITCH M F, GRISHINA K G, VOLOK V P, CHERNOKHAEVA L L, GRISHIN K V, KARGANOVA G G, et al. Evervac: phase I/II study of immunogenicity and safety of a new adjuvant-free TBE vaccine cultivated in Vero cell culture[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16: 2123-2130.
- [19] LO M K, SHI P Y, CHEN Y L, FLINT M, SPIROPOULOU C F. *In vitro* antiviral activity of adenosine analog NITD008 against tick-borne flaviviruses[J]. *Antiviral Res*, 2016, 130: 46-49.
- [20] KROL E, WANDZIK I, BRZUSKA G, EYER L, RŮŽEK D, SZEWCZYK B. Antiviral activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars against tick-borne encephalitis virus[J/OL]. *Molecules*, 2019, 24: 1129. DOI: 10.3390/molecules24061129.

[本文编辑] 尹 茶