

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.02.0196

· 综述 ·

## 黄病毒属虫媒病毒减毒疫苗研究新进展

徐铮昊, 赵平, 戚中田\*

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

**[摘要]** 黄病毒属虫媒病毒多为新发突发传染病的病原体, 已在全球引发多起突发公共卫生事件, 对人类健康构成严重威胁。减毒疫苗是黄病毒属虫媒病毒最有效的疫苗类型, 通过连续细胞传代筛选的黄热病病毒和乙型脑炎病毒减毒疫苗对预防这两种黄病毒感染发挥了重要作用。近年来, 利用病毒反向遗传学技术对黄病毒基因组进行定点改造以获得减毒表型, 在黄病毒属虫媒病毒疫苗研制中取得重要进展。本文就黄病毒属虫媒病毒减毒疫苗的历史和研究现状进行综述。

**[关键词]** 黄病毒属; 病毒疫苗; 减毒疫苗; 感染性克隆

**[中图分类号]** R 373.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)02-0196-07

### Attenuated vaccines of *Flavivirus* genus arborvirus: an update

XU Zheng-hao, ZHAO Ping, QI Zhong-tian\*

Department of Biodefense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** As a pathogen causing many infectious diseases, *Flavivirus* genus arborvirus has caused public health emergencies worldwide and posed a serious threat to human health. Attenuated vaccine is the most effective vaccine type against *Flavivirus* genus arborvirus. The attenuated vaccines against yellow fever virus and Japanese encephalitis virus obtained by consecutive cell passages play an important role in preventing viral infections. Recently, reverse genetics technique has been used to modify the flavivirus genome to obtain the attenuated phenotype, and this technique has made significant progress in the development of *Flavivirus* genus arborvirus vaccines. This review summarizes the history and the current status of attenuated vaccine of *Flavivirus* genus arborvirus.

**[Key words]** flavivirus; viral vaccines; attenuated vaccines; infectious clone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(2): 196-202]

黄病毒科黄病毒属虫媒病毒包括黄热病病毒(yellow fever virus, YFV)、寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、登革病毒(dengue virus, DENV)、西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)、蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)等。其是一类有包膜的单正链RNA病毒, 基因组编码3种结构蛋白[衣壳蛋白、前膜蛋白( precursor-membrane protein, prM)、包膜蛋白(envelope protein, E)]和7种非结构蛋白(non-structural protein, NS; NS1、NS2A、NS2、

NS3、NS4A、NS4B和NS5), 结构蛋白组装成病毒粒子, 而非结构蛋白在病毒复制和免疫逃逸中发挥作用<sup>[1]</sup>。已知E蛋白是介导病毒感染和诱导中和抗体的关键蛋白。黄病毒属病毒通过蚊虫或蜱虫叮咬传播, 引起发热、皮疹、皮肤黏膜出血、脑炎、新生儿畸形等多种疾病。一些黄病毒属虫媒病毒如YFV、ZIKV主要在非洲和南美洲流行, 但近年来其传播范围不断扩大; 1999年以来, WNV的流行范围从北美洲扩大到亚洲、欧洲; 全球每年DENV感染者约4亿人, JEV感染者近7万人<sup>[2-4]</sup>。鉴于黄病毒属虫媒病毒感染多发于热带

**[收稿日期]** 2018-09-06 **[接受日期]** 2019-01-24

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2016YFC1200401), 国家重大科技专项(2017ZX10304403-003). Supported by National Key Research and Development Plan (2016YFC1200401) and National Science and Technology Major Project (2017ZX10304403-003).

**[作者简介]** 徐铮昊, 硕士生. E-mail: 619302871@qq.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

地域, 其防控研究对于中非合作和“一带一路”建设具有重要意义。

减毒活疫苗免疫原性强、保护效果好, 是黄病毒属虫媒病毒最有效的疫苗类型, 一次免疫常可获得持久免疫, 是黄病毒属虫媒病毒疫苗的首选类型。继 20 世纪 30 年代首次成功制备 YFV 减毒疫苗<sup>[5]</sup>, 此后几十年间陆续研制出针对 JEV、DENV 和 TBEV 等病毒的减毒疫苗。然而, 目前还未研制出针对其他黄病毒如 ZIKV 和 WNV 的人用疫苗。本文综述了黄病毒属虫媒病毒减毒疫苗的研发历史与现状, 并简介了近年兴起的分子生物学技术在疫苗研制中的应用, 为疫苗的进一步研制提供参考。

## 1 细胞传代培养筛选的减毒活疫苗

1.1 黄热病疫苗 黄热病疫苗是黄病毒属中第 1 个被用于人类的有效疫苗<sup>[5]</sup>, 其制备方法是将强毒株法国嗜内脏株 (French viscerotropic virus, FVV) 在小鼠脑传 128 代, 从而得到减毒株法国嗜神经株疫苗 (French neurotropic vaccine, FNV), 并在非洲广泛应用至 1982 年<sup>[6]</sup>。目前使用的 YFV 疫苗是 1937 年制备的 YFV 17D 减毒株, 是以 YFV Asibi 野毒株经鸡胚连续传代获得<sup>[5]</sup>。YFV 17D 减毒株相比 Asibi 野毒株存在 31 个氨基酸突变, 另在 3' 端非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 存在 4 个核苷酸突变<sup>[7]</sup>。有趣的是, YFV 17D 减毒株和 YFV FNV 只有 2 个相同的非同义突变: 即 M 区 I36F 和 NS4B 区 I95M<sup>[6-7]</sup>。目前尚不清楚减毒与氨基酸突变之间的相关性, 但 YFV 17D 减毒株多样性丧失可能与减毒有关<sup>[7]</sup>。

1.2 乙型脑炎疫苗 另一种成功研制的减毒疫苗是 JEV SA14-14-2 株, 该疫苗通过将野生型 JEV SA14 毒株多次连续传代减毒及噬斑纯化获得<sup>[8]</sup>。与野生型 JEV SA14 株相比, JEV SA14-14-2 疫苗株有 25 个氨基酸残基的突变<sup>[9]</sup>。其中, E 蛋白 244 位 (E-244) 的谷氨酸突变为甘氨酸, 使 JEV SA14-14-2 疫苗株对小鼠中枢神经系统的感染性完全丧失。SA14 毒株中的 E-244 氨基酸位于靠近 E 蛋白融合环的发夹结构, 该结构与 JEV 神经毒性有关<sup>[10]</sup>。E-244 突变影响神经细胞对病毒结合、内吞和膜融合, 还影响后期的病毒组装、成熟和释放<sup>[11]</sup>。

同义突变也在 JEV SA14-14-2 疫苗株的减毒中

发挥作用。JEV 基因组 RNA 中有一个保守的假结结构, 该结构可使病毒基因组的核糖体翻译框向后移 1 位, 导致后续的氨基酸组成发生变化, 从而诱导 NS1 蛋白的分泌。NS1 蛋白与病毒的致病性尤其是神经侵袭性有关<sup>[12]</sup>。JEV SA14-14-2 疫苗株病毒在 NS2A 蛋白中发生 G66A 突变, 这种突变会破坏假结结构, 从而抑制核糖体框移及 NS1 的表达, 降低对小鼠神经细胞的侵袭性<sup>[13]</sup>。

1.3 登革疫苗 DENV 有 4 种血清型 (DENV1~DENV4), 利用连续传代减毒的方法可分别获得针对 4 种血清型的疫苗。DENV1 MD-1 减毒株通过在小鼠脑中连续传代获得<sup>[14]</sup>; DENV2 减毒株 PR-159 S-1 和 16881 PDK-53 分别由 DENV2-159 株传代感染原代绿猴肾细胞和 DENV2 16881 株传代感染原代犬肾细胞获得<sup>[15-16]</sup>; DENV3 16562PGMK33 和 DENV4 H-241 PDK35 减毒株分别是 DENV3 16562 株经原代绿猴肾细胞连续传代和 DENV4 H-241 株经原代犬肾细胞连续传代获得<sup>[17-18]</sup>。一般认为, DENV 诱导的体液免疫存在抗体依赖性增强 (antibody-dependent enhancement, ADE) 感染效应, 这种现象于 1980 年首次在泰国发现, 即一种血清型 DENV 诱导的抗体可增强另一种血清型 DENV 的感染性, 因而会增加登革出血热的风险<sup>[19]</sup>。小鼠巨噬细胞的 DENV 感染实验证实了这些观察结果, 如 DENV4 单克隆抗体增强了 DENV2 的感染<sup>[20]</sup>。由于存在 ADE 效应, 必须同时接种针对每个血清型 DENV 的疫苗, 以充分诱导针对 4 种血清型 DENV 的中和抗体。对一种四价减毒疫苗进行实验, 结果显示接种疫苗的 20 名受试者血液中只检测到 DENV3 减毒株, 这表明其他 3 种血清型减毒株在人体内的复制能力较低; 与此一致, 所有接种疫苗的受试者都产生了针对 DENV3 的抗体, 但其中仅 7 名受试者产生了针对其他 3 种血清型的抗体<sup>[21]</sup>。可见通过连续细胞传代制备的四价登革疫苗难以充分诱导产生针对 4 种血清型的中和抗体。

## 2 分子生物学技术制备的减毒疫苗

感染性克隆技术是研制 RNA 病毒感染与致病的一项新技术, 包括病毒基因组全长 cDNA 克隆构建、病毒基因组 RNA 转录本的制备与导入宿主细胞, 在分子水平上实现了对 RNA 病毒进行加工

改造,使开发分子与基因工程疫苗成为可能。

**2.1 基于现有疫苗株骨架的嵌合减毒疫苗** 嵌合疫苗是基于活病毒载体的一类新型疫苗,是未来黄病毒疫苗的发展方向。由于黄病毒具有相同的基因组结构和复制特性,设计嵌合病毒时可以使用已有的减毒黄病毒基因组作为载体,将具有高度免疫原性的靶病毒 *E* 基因和 *prM* 基因引入减毒病毒的基因组中制备嵌合病毒,作为疫苗免疫宿主会诱导产生中和抗体<sup>[22]</sup>。

以 YFV 17D 减毒株的感染性克隆作为骨架,将其 *E* 和 *prM* 编码区替换成另一黄病毒基因组中的相应编码区<sup>[23]</sup>,基于这种方法目前已研制出两种疫苗并投入市场:一种是乙型脑炎疫苗 Imojev (JEV SA14-14-2 疫苗株的 *prM* 和 *E* 基因替换 YFV 17D 减毒株的相应基因编码区<sup>[23]</sup>),另一种是登革疫苗 Dengvaxia (分别以 4 种血清型的 *prM* 和 *E* 基因置换 YFV 17D 病毒株的相应基因)。此法亦称为 ChimeriVax 法,制备的四价嵌合登革疫苗可以诱导出针对每一种血清型的中和抗体<sup>[24]</sup>。Arroyo 等<sup>[25]</sup>用 ChimeriVax 法制备了一种新的 WNV 疫苗原型 (ChimeriVaxWN02),即将 WNV 的 *prM* 和 *E* 基因引入 YFV 17D 骨架,然后在该嵌合病毒的 *E* 基因中引入 JEV SA14-14-2 减毒株 *E* 基因中的突变 (L107F、A316V 和 K440R),可明显降低原型毒株的神经毒性,大大增强了安全性。

除了 YFV 17D,也有其他黄病毒减毒活疫苗基因组被用作嵌合疫苗骨架,如 JEV SA14-14-2 基因组被用于制备 DENV1、DENV2、DENV4 和 TBEV 嵌合疫苗<sup>[26-29]</sup>。Li 等<sup>[30]</sup>将 ZIKV 的 *prM-E* 基因置换性插入 JEV SA14-14-2 疫苗株基因组,制备的嵌合病毒能在小鼠和恒河猴体内诱导高水平且持久的中和抗体,且能完全保护免疫动物抵抗活病毒攻击。

用其他家族病毒的减毒株作为黄病毒结构蛋白的载体是另一种可能的疫苗策略。麻疹病毒 (measles virus, MV) Schwarz 株是一种安全、高效的人用疫苗,在 MV 感染性克隆中引入 WNV 的 *E* 基因后,接种该嵌合病毒可保护小鼠抵抗致死剂量 WNV 的攻击<sup>[31]</sup>。

**2.2 基于现有疫苗株位点的突变减毒疫苗** 对感染性克隆进行定点突变可以制备减毒病毒,例如将 YFV 和 JEV 两种减毒活疫苗中的已知突变引

入到其他黄病毒基因组中可有助于制备新的减毒疫苗株。YFV Asibi 毒株 M 蛋白的第 36 位残基是亮氨酸,但在 17D 和 FNV 两种疫苗株中都是苯丙氨酸,Wispelaere 等<sup>[32]</sup>据此将 JEV 感染性克隆中 M 蛋白第 36 位的异亮氨酸替换为苯丙氨酸 (I36F),该突变能降低病毒在哺乳动物细胞中的复制效率,在小鼠模型中的致病性减弱,并可诱生 JEV 中和抗体。Yu 等<sup>[33]</sup>将 JEV SA14-14-2 疫苗株中 E 蛋白的 L107F、E138K、Y172V、T173A 和 A312V 突变引入 WNV 的感染性克隆,结果导致突变的 WNV 对小鼠致病性降低。

黄病毒基因组 3' UTR 对于病毒基因组的复制具有重要作用,删除 3' UTR 部分序列的 DENV 感染性克隆高度减毒,作为疫苗已经进入 III 期临床试验<sup>[34]</sup>。与此类似,对 1 株神经毒性较弱的 ZIKV 柬埔寨流行株 FSS13025 感染性克隆,删除其 3' UTR 的 10、20 和 30 个核苷酸后,均导致病毒的复制能力下降,并且对 I 型干扰素 (interferon, IFN) 的敏感性增强;将删除 10 个核苷酸的病毒皮下接种于 I 型 IFN 受体敲除的 A129 小鼠,表现出高度减毒的表型且一次免疫即能诱导高水平中和抗体,保护小鼠抵抗致死剂量野生型病毒攻击及病毒经胎盘传播;将删除 20 个核苷酸的病毒免疫恒河猴,一次免疫即可诱导高水平中和抗体,并对强毒株的攻击产生完全保护作用<sup>[35]</sup>。

**2.3 基于病毒-细胞互作干扰的减毒疫苗** 另一种思路是,通过引入可能削弱病毒与宿主细胞相互作用的突变获得减毒疫苗,而不是依赖在已减毒的黄病毒株中发现的突变。

IFN- $\alpha/\beta$  是黄病毒感染诱导的关键固有免疫分子<sup>[36]</sup>。细胞内的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 维甲酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene I, RIG-I) 和黑素瘤分化相关蛋白 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA-5) 可识别、结合病毒 RNA,经过细胞内一系列信号分子的激活,导致 IFN 的转录激活及干扰素刺激基因 (interferon-stimulated gene, ISG) 的表达<sup>[37]</sup>。黄病毒已经进化出逃避宿主固有免疫的不同“对策”。其中一种策略是通过病毒 RNA 的 5' 端进行 2'-O-甲基化修饰,使病毒 RNA 可模拟宿主细胞的 mRNA,从而逃避 PRR 的识别<sup>[38]</sup>。黄病毒 NS3 和 NS5 蛋白催化病毒 RNA 5' 端 2'-O-甲



基化修饰帽子结构的形成<sup>[39]</sup>, 因而抑制 NS3 和 NS5 蛋白的 2'-O-甲基化活性可增强病毒诱导 IFN 产生。JEV 的 E218A 突变位于 NS5 蛋白甲基转移酶活性位点中, 该突变破坏 2'-O-甲基化活性, 含有该突变的 JEV 不仅诱导 IFN 的能力增强, 且对 IFN 及 ISG [如干扰素诱导的三角形四肽重复蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeat 1), IFIT1] 的抗病毒作用更为敏感。IFIT1 优先与未甲基化的 mRNA 结合, 抑制 mRNA 的翻译, 因而对该突变毒株的抑制作用增强。该突变株在小鼠模型中的致病性降低, 并能保护小鼠抵抗致死剂量非突变型 JEV 的攻击<sup>[40]</sup>。

黄病毒非结构蛋白 NS2A 可抑制 *IFN-β* 启动子的转录活性, 并且 NS2A 蛋白中的 A30P 突变消除了该蛋白对 *IFN* 转录的抑制作用<sup>[41]</sup>。值得一提的是, 该氨基酸突变位点还通过改变 RNA 假结的二级结构而降低 NS1' 蛋白的表达, 使该 NS2A-A30P 突变体对小鼠的神经侵袭性降低<sup>[12]</sup>。黄病毒的结构蛋白与宿主因子的相互作用在病毒的细胞侵入、组装及分泌阶段发挥重要作用, 在结构蛋白中引入削弱病毒与宿主相互作用的突变也可获得减毒病毒。在病毒传代细胞培养过程中, 加入大量可与病毒 E 蛋白结合的可溶性细胞受体, 野生型病毒与可溶性受体结合后不能再与细胞表面的受体结合, 因此其感染性丧失, 突变病毒不能结合其本来的受体, 但能通过与其宿主细胞膜表面的其他受体结合而感染细胞。用此方法通过 C6/36 细胞培养筛选得到的 JEV 突变株 E-G306E 在小鼠模型中的致病性降低<sup>[42]</sup>。与此类似, 在 TBEV 的 E 蛋白结构域 III 中的 T310K 突变株的毒力也减弱<sup>[43]</sup>。在 JEV 的 M 蛋白编码区引入突变 I36F, 突变病毒在哺乳动物细胞中的组装和分泌能力减弱, 对小鼠的致病性也相应降低<sup>[32]</sup>。

**2.4 基于糖基化位点消除的减毒疫苗** 黄病毒糖蛋白 prM 和 E 蛋白中的 *N*-糖基化修饰对于病毒颗粒的组装和分泌至关重要<sup>[44]</sup>; E 蛋白 *N*-糖基化修饰还是病毒嗜神经感染的决定因素<sup>[45]</sup>。WNV、JEV 等感染中枢神经系统的黄病毒, 不仅依赖于它们在脑组织中的复制能力, 还依赖于它们穿透血脑屏障从而感染中枢神经细胞的能力<sup>[46]</sup>。消除 E 蛋白 *N*-糖基化位点可阻断 WNV 和 JEV 病毒进入中

枢神经系统并感染神经元。NS1 蛋白的 *N*-糖基化对于病毒的致病性也很重要<sup>[47]</sup>。DENV NS1 蛋白的六聚体形式与补体相互作用导致血管壁渗漏, 这与登革出血热和登革休克综合征的发生高度相关<sup>[48]</sup>。只有 *N*-糖基化形式的 NS1 蛋白才能形成六聚体, NS1 蛋白有 2 个 *N*-糖基化位点, 消除该位点能削弱 NS1 蛋白与补体的相互作用, 从而降低病毒的致病性<sup>[49]</sup>。

**2.5 基于在感染性克隆中引入微 RNA (microRNA, miR) 的减毒疫苗** MiR 是真核生物基因组编码的、长 22 nt 的单链 RNA, 通过结合靶基因 mRNA 3' UTR 调节蛋白的表达<sup>[50]</sup>。靶 mRNA 若与 miR 完全配对通常导致靶 mRNA 降解, 若不完全配对则导致翻译过程的抑制。在病毒基因组中引入宿主特定组织, 如中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 表达的 miR 靶序列可限制病毒对该组织的感染。Heiss 等<sup>[51]</sup>在一种嗜神经感染的 TBEV/DENV4 嵌合病毒基因组中插入在脑组织高表达的 miR-9、let-7c 或 miR-124a 单拷贝靶序列, 可抑制大剂量病毒攻击小鼠引起的致死性脑炎, 更为重要的是 miR 靶序列的存在不影响病毒在恒河猴非 CNS 组织中的复制, 并诱导强的免疫应答。

**2.6 基于密码子偏向性转码的减毒疫苗** 大规模的基因转码是一种新的病毒减毒策略, 该策略利用密码子的兼并特性, 在不改变蛋白质氨基酸序列的情况下通过引入沉默突变改变病毒基因组的核苷酸序列。虽然蛋白质的序列不发生变化, 但不同宿主细胞中密码子选择的差异可能影响病毒 RNA 的翻译和复制, 从而导致病毒减毒<sup>[52]</sup>。蚊子和人类细胞中同义密码子的使用频率不同, 在病毒基因组中引入在人类细胞中较少使用但在蚊子中正常使用的密码子, 可以削弱病毒蛋白在人类细胞中的翻译, 而不影响其在蚊子细胞中的翻译<sup>[53]</sup>。利用该原理改变 DENV2 的 E 蛋白和 NS5 蛋白编码基因的核苷酸序列, 产生的突变病毒与野生型病毒在蚊子细胞中的复制水平相似, 但突变病毒在哺乳动物细胞中的复制水平降低, 对小鼠的致病性也随之下降<sup>[54]</sup>。最近, 对 ZIKV 感染性克隆中的 *E* 和 *NS1* 基因密码子进行去优化, 得到的病毒在哺乳动物细胞的复制能力及其对小鼠的致病力下降, 一次免疫小鼠可诱导高水平中和抗体, 可保护小鼠抵抗致死剂量野生

病毒的攻击及经胎盘传播<sup>[55]</sup>。

### 3 展 望

黄病毒属虫媒传染病是严重威胁人类健康的自然疫源性传染病,近年来其流行范围呈扩大趋势,疫苗的需求日益紧迫。减毒活疫苗免疫原性强,保护效果好,是最有效的病毒疫苗类型。以目前相对成熟的黄病毒属虫媒病毒减毒疫苗的减毒机制为线索,利用分子生物学技术设计新一代的黄病毒候选疫苗,可以避免经典减毒疫苗研制耗时长、效率低的缺点,可作为我国研发黄病毒属虫媒病毒疫苗的可行方案。随着分子生物学技术的进一步发展,将保护性抗原与已知的减毒病毒骨架嵌合,引入 miR 靶向序列及大规模病毒基因组转码等技术,不仅可为目前尚无疫苗预防的 ZIKV、WNV 等病毒感染的减毒疫苗的设计和研发提供多种选择,而且可为未来新发突发传染病的及时防控提供快速通用的疫苗框架载体。

### [参 考 文 献]

- [1] LINDENBACH B D, THIEL H J, RICE C M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*[M]/KNIPE D M, HOWLEY P M. *Fields virology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2007: 1101-1152.
- [2] CAMPOS G S, BANDEIRA A C, SARDI S I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 1885-1886.
- [3] VASCONCELOS P F, COSTA Z G, TRAVASSOS DA ROSA E S, LUNA E, RODRIGUES S G, BARROS V L, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread[J]. *J Med Virol*, 2001, 65: 598-604.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Provisional surveillance summary of the West Nile virus epidemic—United States, January–November 2002[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2002, 51: 1129-1133.
- [5] MONATH T P. Yellow fever vaccine[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2005: 553-574.
- [6] WANG E, RYMAN K D, JENNINGS A D, WOOD D J, TAFFS F, MINOR P D, et al. Comparison of the genomes of the wild-type French viscerotropic strain of yellow fever virus with its vaccine derivative French neurotropic vaccine[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt 11): 2749-2755.
- [7] BECK A, TESH R B, WOOD T G, WIDEN S G, RYMAN K D, BARRETT A D. Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain Asabi by deep sequencing[J]. *J Infect Dis*, 2014, 209: 334-344.
- [8] YU Y. Development of Japanese encephalitis attenuated live vaccine virus SA14-14-2 and its characteristics[M/OL]. InTech Open Science, 2013: 181-206. DOI: 10.5772/52980. 2013.
- [9] YUN S I, SONG B H, POLEJAEVA I A, DAVIES C J, WHITE K L, LEE Y M. Comparison of the live-attenuated Japanese encephalitis vaccine SA14-14-2 strain with its pre-attenuated virulent parent SA14 strain: similarities and differences *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Gen Virol*, 2016, 97: 2575-2591.
- [10] GROMOWSKI G D, FIRESTONE C Y, WHITEHEAD S S. Genetic determinants of Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 that govern attenuation of virulence in mice[J]. *J Virol*, 2015, 89: 6328-6337.
- [11] YUN S I, SONG B H, KIM J K, YUN G N, LEE E Y, LI L, et al. A molecularly cloned, live-attenuated Japanese encephalitis vaccine SA14-14-2 virus: a conserved single amino acid in the *ij* Hairpin of the Viral E glycoprotein determines neurovirulence in mice[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004290. doi: 10.1371/journal.ppat.1004290.
- [12] MELIAN E B, HINZMAN E, NAGASAKI T, FIRTH A E, WILLS N M, NOUWENS A S, et al. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness[J]. *J Virol*, 2010, 84: 1641-1647.
- [13] YE Q, LI X F, ZHAO H, LI S H, DENG Y Q, CAO R Y, et al. A single nucleotide mutation in NS2A of Japanese encephalitis-live vaccine virus (SA14-14-2) ablates NS1' formation and contributes to attenuation[J]. *J Gen Virol*, 2012, 93: 1959-1964.
- [14] WISSEMAN C L, SWEET B H, ROSENZWEIG E C, EYLAR O R. Attenuated living type 1 dengue vaccines[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1963, 12: 620-623.
- [15] ECKELS K H, BRANDT W E, HARRISON V R, MCCOWN J M, RUSSELL P K. Isolation of a temperature-sensitive dengue-2 virus under conditions suitable for vaccine development[J]. *Infect Immun*, 1976, 14: 1221-1227.
- [16] BHAMARAPRAVATI N, YOKSAN S, CHAYANIYAYOTHIN T, ANGSUBPHAKORN S, BUNYARATVEJ A. Immunization with a live attenuated dengue-2-virus candidate vaccine (16681-PDK 53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers[J]. *Bull World Health Organ*, 1987, 65: 189-195.
- [17] ANGSUBHAKORN S, YOKSAN S, PRADERMWONG A, NITATPATTANA N, SAHAPHONG S, BHAMARAPRAVATI N. Dengue-3 (16562) PGMK 33 vaccine: neurovirulence, viremia and immune responses in *Macaca fascicularis*[J]. *Southeast Asia J Trop Med Public Health*, 1994, 25: 554-559.

- [18] HALSTEAD S B, ECKELS K H, PUTVATANA R, LARSEN L K, MARCHETTE N J. Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. IV. Characterization of a vaccine candidate in fetal rhesus lung cells[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1984, 33: 679-683.
- [19] SANGKAWIBHA N, ROJANASUPHOT S, AHANDRIK S, VIRIYAPONGSE S, JATANASEN S, SALITUL V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand: I. The 1980 outbreak[J]. *Am J Epidemiol*, 1984, 120: 653-669.
- [20] MORENS D M, VENKATESHAN C N, HALSTEAD S B. Dengue 4 virus monoclonal antibodies identify epitopes that mediate immune infection enhancement of dengue 2 viruses[J]. *J Gen Virol*, 1987, 68(Pt 1): 91-98.
- [21] KANESA-THASAN N, SUN W, KIM-AHN G, ALBERT S V, PUTNAK J R, KING A, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers[J]. *Vaccine*, 2001, 19: 3179-3188.
- [22] KAUFMAN B M, SUMMERS P L, DUBOIS D R, ECKELS K H. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1987, 36: 427-434.
- [23] CHAMBERS T J, NESTOROWICZ A, MASON P W, RICE C M. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties[J]. *J Virol*, 1999, 73: 3095-3101.
- [24] GUY B, GUIRAKHOO F, BARBAN V, HIGGS S, MONATH T P, LANG J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses[J]. *Vaccine*, 2010, 28: 632-649.
- [25] ARROYO J, MILLER C, CATALAN J, MYERS G A, RATTERREE M S, TRENT D W, et al. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy[J]. *J Virol*, 2004, 78: 12497-12507.
- [26] LI X F, DENG Y Q, YANG H Q, ZHAO H, JIANG T, YU X D, et al. A chimeric dengue virus vaccine using Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as backbone is immunogenic and protective against either parental virus in mice and nonhuman primates[J]. *J Virol*, 2013, 87: 13694-13705.
- [27] LI Z, YANG H, YANG J, LIN H, WANG W, LIU L, et al. Construction and preliminary investigation of a novel dengue serotype 4 chimeric virus using Japanese encephalitis vaccine strain SA14-14-2 as the backbone[J]. *Virus Res*, 2014, 191: 10-20.
- [28] YANG H, LI Z, LIN H, WANG W, YANG J, LIU L, et al. A novel dengue virus serotype 1 vaccine candidate based on Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as the backbone[J]. *Arch Virol*, 2016, 161: 1517-1526.
- [29] WANG H J, LI X F, YE Q, LI S H, DENG Y Q, ZHAO H, et al. Recombinant chimeric Japanese encephalitis virus/tick-borne encephalitis virus is attenuated and protective in mice[J]. *Vaccine*, 2014, 32: 949-956.
- [30] LI X F, DONG H L, WANG H J, HUANG X Y, QIU Y F, JI X, et al. Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone[J/OL]. *Nat Commun*, 2018, 9: 673. doi: 10.1038/s41467-018-02975-w.
- [31] DESPRÈS P, COMBREDET C, FRENKIEL M P, LORIN C, BRAHIC M, TANGY F. Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis[J]. *J Infect Dis*, 2005, 191: 207-214.
- [32] WISPELAERE M D, KHOU C, FRENKIEL M P, DESPRÈS P, PARDIGON N. A single amino acid substitution in the M protein attenuates Japanese encephalitis virus in mammalian hosts[J]. *J Virol*, 2016, 90: 2676-2689.
- [33] YU L, ROBERT P J, PLETNEV A G, MARKOFF L. Attenuated West Nile viruses bearing 3' SL and envelope gene substitution mutations[J]. *Vaccine*, 2008, 26: 5981-5988.
- [34] WHITEHEAD S S. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine?[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15: 509-517.
- [35] SHAN C, MURUATO A E, JAGGER B W, RICHNER J, NUNES B, MEDEIROS D, et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 676. doi: 10.1038/s41467-017-00737-8.
- [36] DIAMOND M S, ROBERTS T G, EDGIL D, LU B, ERNST J, HARRIS E. Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons[J]. *J Virol*, 2000, 74: 4957-4966.
- [37] CHANG T H, LIAO C L, LIN Y L. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF- $\kappa$ B activation[J]. *Microbes Infect*, 2006, 8: 157-171.
- [38] ZÜST R, CERVANTES-BARRAGAN L, HABJAN M, MAIER R, NEUMAN B W, ZIEBUHR J, et al. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor MDA5[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12: 137-143.
- [39] ISSUR M, GEISS B J, BOUGIE I, PICARD-JEAN F, DESPINS S, MAYETTE J, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a



- two-step reaction to form the RNA cap structure[J]. RNA, 2009, 15: 2340-2350.
- [40] LI S H, DONG H, LI X F, XIE X, ZHAO H, DENG Y Q, et al. Rational design of a flavivirus vaccine by abolishing viral RNA 2'-O methylation[J]. J Virol, 2013, 87: 5812-5819.
- [41] LIU W J, CHEN H B, WANG X J, HUANG H, KHROMYKH A A. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription[J]. J Virol, 2004, 78: 12225-12235.
- [42] NI H, BARRETT A D. Attenuation of Japanese encephalitis virus by selection of its mouse brain membrane receptor preparation escape variants[J]. Virology, 1998, 241: 30-36.
- [43] MANDL C W, ALLISON S L, HOLZMANN H, MEIXNER T, HEINZ F X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site[J]. J Virol, 2000, 74: 9601-9609.
- [44] HANNA S L, PIERSON T C, SANCHEZ M D, AHMED A A, MURTADHA M M, DOMS R W. N-linked glycosylation of west Nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity[J]. J Virol, 2005, 79: 13262-13274.
- [45] BEASLEY D W, WHITEMAN M C, ZHANG S, HUANG C Y H, SCHNEIDER B S, SMITH D R, et al. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains[J]. J Virol, 2005, 79: 8339-8347.
- [46] YASUI K. Neuropathogenesis of Japanese encephalitis virus[J]. J Neurovirol, 2002, 8 Suppl 2: 112-114.
- [47] WHITEMAN M C, LI L, WICKER J A, KINNEY R M, HUANG C, BEASLEY D W, et al. Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus[J]. Vaccine, 2010, 28: 1075-1083.
- [48] SOMNUKE P, HAUHART RE, ATKINSON J P, DIAMOND M S, AVIRUTNAN P. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement[J]. Virology, 2011, 413: 253-264.
- [49] AVIRUTNAN P, PUNYADEE N, NOISAKRAN S, KOMOLTRI C, THIEMMECA S, AUETHAVORNANAN K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement[J]. J Infect Dis, 2006, 193: 1078-1088.
- [50] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [51] HEISS B L, MAXIMOVA O A, PLETNEV A G. Insertion of microRNA targets into the flavivirus genome alters its highly neurovirulent phenotype[J]. J Virol, 2011, 85: 1464-1472.
- [52] LE N C, BROCK L G, LUONGO C, MCCARTY T, YANG L, MEHEDI M, et al. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111: 13169-13174.
- [53] GUTMAN G A, HATFIELD G W. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 3699-3703.
- [54] SHEN S H, STAUF C B, GORBATSEVYCH O, SONG Y, WARD C B, YUROVSKY A, et al. Large-scale recoding of an arbovirus genome to rebalance its insect versus mammalian preference[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 4749-4754.
- [55] LI P, KE X, WANG T, TAN Z, LUO D, MIAO Y, et al. Zika virus attenuation by codon pair deoptimization induces sterilizing immunity in mouse models[J/OL]. J Virol, 2018, 92. pii: e00701-18. doi:10.1128/JVI.00701-18.

[本文编辑] 尹 茶