

· 学科进展与展望 ·

国家自然科学基金重大项目 “禽流感关键基础科学问题研究”结题综述

胡景杰 陈越 陈领 李人卫 杜生明

(国家自然科学基金委员会生命科学部, 北京 100085)

[摘要] 针对禽流感频繁发生和人感染禽流感新发病例不断出现,国家自然科学基金委员会组织专家论证,经过立项、公开申请、项目初评、答辩和委务会审议,紧急启动了重大项目“禽流感关键基础科学问题研究”。历经4年研究,项目在禽流感病毒分子流行病学、病毒蛋白结构与功能、感染机制与免疫应答、禽流感病毒感染人的特点与传播途径等方面都取得了原创性的成果,圆满完成了计划任务。通过项目的实施,课题组形成了具有国际竞争力的团队,开展了与国内外同行的广泛交流与合作,多次组织相关国际会议,引起了国内外同行的关注。在北京举行的结题验收会上,项目受到专家组的好评,获得了特优的综合评价。

[关键词] 重大项目, 禽流感, 研究成果, 结题验收

针对禽流感频繁发生和人感染禽流感新发病例不断出现,国家自然科学基金委员会迅速做出反应,组织多学科相关领域的专家进行了论证,经过立项、公开申请、项目初评、答辩和委务会审议,2005年紧急启动了重大项目“禽流感关键基础科学问题研究(NSFC30599430)”。历经4年研究,项目组在禽流感病毒致病与免疫机制、传播途径、病毒感染抑制等方面取得了重要的原创性成果,圆满完成了预期研究任务,受到专家组的好评,顺利通过结题验收。

1 项目的立项和实施

禽流感在一些国家和地区的发生和蔓延,不仅严重影响了经济、社会的发展,而且对人民的健康与生命安全构成严重危害。虽然各国高度重视并实施紧急预案,但禽流感频繁发生和人感染禽流感新发病例不断出现,充分说明防控形势依然非常严峻。中国作为世界上养禽大国,必须加强对禽流感病毒的分子流行病学特征、变异规律、病毒跨种传播和致病机理等方面的研究力度。国家自然科学基金委员会根据国家需求,积极组织相关科学家座谈和调研,经过充分讨论,紧急启动重大项目“禽流感关键基础

科学问题研究”。

该重大项目申请指南公布后,受理项目1项(联合申请,含4项课题)和单项课题申请28项,分别来自综合院校、农业院校、军事医学科研院所、中国科学院系统和医科院校。根据国家自然科学基金项目管理规定初筛6项。2005年12月由12位相关领域专家组成的评审组,以会议评审方式开展评议,从26份课题中遴选出8位申请人参加答辩。通过对8位申请人的汇报和答辩进行评议,最终确定由中国科学院微生物研究所高福研究员主持重大项目“禽流感关键基础科学问题研究”。该项目共分4个课题:课题1“禽流感病毒分子流行病学和病毒进化变异规律”,由中国农业大学刘金华教授负责;课题2“禽流感病毒主要蛋白的结构与功能研究”,由中国科学院生物物理研究所刘迎芳研究员负责;课题3“人感染禽流感病毒机制研究”,由国家疾病预防控制中心舒跃龙研究员负责;课题4“禽流感病毒感染的免疫应答及免疫保护机制研究”,由中国科学院微生物研究所高福研究员负责。通过项目组全体成员4年的努力,全面完成了研究内容和预期目标。

本文于2010年7月22日收到。

2 项目取得的重要研究成果

2.1 禽流感病毒分子流行病学和病毒进化变异规律研究

(1) 家禽禽流感病毒分子流行病学研究:对我国北方地区的家禽养殖场及活禽市场开展了流感病毒的分子流行病学调查,追踪并分析了该地区家禽禽流感病毒的分子演化及变异规律和抗原变异特征,为禽流感相应防控措施的制定提供了重要科学依据。调查证明,2005—2009年间,Clade2.3.4、Clade2.3.2和Clade7三大进化分支病毒是主要危害我国养禽业的H5N1亚型禽流感病毒,具有明显的优势性,并且其抗原性存在较大差异。H9N2亚型禽流感病毒遗传进化分析发现,不同分支病毒共流行和频繁的基因重排是我国H9N2亚型病毒的主要进化方式,F/98系列病毒成为近年的优势基因型;抗原性分析发现我国流行的H9N2病毒可分为4个抗原群。H3亚型禽流感病毒基因组研究证明,其内部基因片段与H5N1病毒存在广泛的基因重排现象,同时调查表明我国大部分地区的鸡群中存在H3亚型禽流感病毒感染。

(2) 候鸟H5N1亚型禽流感病毒分子流行病学研究:2005年青海湖斑头雁等迁徙鸟感染高致病性禽流感病毒造成了大量野鸟的发病与死亡,研究证明病毒为变异的高致病性H5N1亚型毒株。2005年之后连续3年对青海湖斑头雁等迁徙鸟高致病性禽流感的跟踪调查与研究,发现候鸟很可能又通过往返迁徙将病毒回传到该地区,从而再次引起该地区候鸟的发病与死亡。2009年青海湖迁徙鸟病毒学调查表明,Clade2.3.2 H5N1病毒已侵入到野鸟群中,与蒙古等国2009年迁徙鸟病毒属于相同的进化分支,其溯源尚在研究中。由于迁徙鸟在禽流感病毒的全球传播中发挥着“载体”和“传播器”的重要角色,因此加强候鸟迁徙路线附近的湿地、湖泊及候鸟聚集区的病毒学调查必将有利于世界禽流感疫情的实时监控和预警,为预防和控制禽流感提供科学依据。

(3) 伴侣动物甲型H1N1流感病毒感染的调查研究:2009年爆发的甲型流感病毒不仅对人类健康和生命安全造成了严重危害,而且对动物群也形成了威胁。项目组在国内率先确诊了甲型流感H1N1病毒对犬猫等伴侣动物的感染。虽然病毒与人源甲型流感病毒基因同源性为99.0%,但发现在血凝素关键位点如受体结合部位有突变现象。其科学意义提示甲流病毒在动物群中存在、传播与变异,又可能

会返传给人,造成更大的威胁。因而,鉴于目前甲型流感流行的严重态势,加强动物甲型流感的分子流行病学调查研究有重要意义。

2.2 禽流感病毒蛋白结构与功能研究

(1) 禽流感病毒蛋白PA结构与功能研究:流感病毒蛋白三维结构的解析是认识病毒及其蛋白功能的重要途径,项目组突破了长期以来对流感病毒RNA聚合酶研究的瓶颈,在世界上首次获得了PA亚基,揭示了PA在参与病毒转录过程中的部分功能,并确定PA亚基是流感病毒聚合酶复合体中行使核酸内切酶活性的亚基,否定了以往认为的该活性位于PB1或PB2亚基上的推断。同时通过结构分析,还发现了一种可能具有抗流感病毒聚合酶活性作用的含8个氨基酸的关键短肽序列。该项研究对揭示流感病毒聚合酶,特别是PA亚基的功能机制,推动对流感病毒聚合酶复合体的更进一步研究具有深远意义,为开展广谱抗流感药物的设计工作提供了一个理想的靶蛋白模型,对进一步开展相关理论研究及药物开发都具有极大地推动作用。

(2) 禽流感病毒NS1对PKR信号的影响研究:流感病毒的NS1能够抑制PKR的活性,项目组采用体外分析的方法证明了NS1不依赖于dsRNA抑制PKR的活性,并证明了高毒性禽流感毒株(H5N1)与较低毒性株的NS1蛋白对PKR活性抑制的区别;通过在抑制PKR反应动力学上的比较研究,证明了对PKR抑制能力的不同是导致H5N1毒株较强致死率的原因之一。

(3) 流感病毒M2与Hsp40相互作用调节p58介导的PKR信号途径:利用酵母双杂交方法筛选到热休克蛋白Hsp40。研究表明Hsp40参与由p58IPK介导的PKR信号途径的调节,与流感病毒感染有关;流感病毒感染细胞后,p58IPK与Hsp40解离而被激活并与PKR作用,导致PKR被抑制而不能发生自动磷酸化。由于流感病毒M2蛋白能与Hsp40结合,因此推测M2蛋白可能参与PKR信号途径的调节。

2.3 人感染禽流感病毒机制研究

(1) 我国人禽流感H5N1病毒基因特性和抗原特性分析研究:自2005—2009年以来,我国大陆共确诊37例人禽流感H5N1病例,从确诊病例中分离到30株人禽流感H5N1病毒。病毒全基因组序列测定表明,分离病毒未发现与人流感病毒的重配,重要位点仍然是禽源病毒特性,未发生本质的突变。通过交互血凝抑制试验分析表明,南方分离的病毒

从抗原性上不同于北方分离的病毒,同分支的病毒抗原性接近,与进化树分析结果相一致。

(2) 禽流感病毒 H5N1 感染机制与致病机理的研究:人体不同器官中禽流感病毒特异性受体的研究表明人体中绝大部分器官特别是人肠道细胞有禽流感病毒受体(α -2,3 半乳糖苷唾液酸受体)分布,揭示了 H5N1 禽流感病毒感染的机制。对 H5N1 病人病理标本(发病后 9—10 天致死性病例)进行研究,发现严重肺组织损伤、大量有核细胞浸润;肺部可检测到病毒抗原,CD68+ 巨噬细胞浸润;直肠、肝、胰腺和肾脏 CD68+ 巨噬细胞浸润,提示致死性病例存在强炎性反应,而病毒主要危害呼吸系统。采用免疫组化技术和原位杂交技术对病毒在细胞中定位,结果表明病毒存在于 II 型肺上皮细胞、气管纤毛和非纤毛上皮细胞、脑神经元细胞,肠道黏膜细胞和胎盘细胞等;对死亡胎儿的研究证明,胎儿的肺、肝等脏器组织呈现 H5 亚型阳性,说明胎儿也受到病毒的攻击,进而表明 H5N1 病毒可以通过感染胎盘屏障。

2.4 禽流感病毒感染的免疫应答及免疫保护机制研究

(1) 细胞自噬在流感病毒感染过程中的作用研究:运用自噬泡特异性标记技术和电镜等技术研究了流感病毒感染细胞后细胞的自噬活性的变化,证实了流感病毒感染可以诱导细胞自噬活性增强,发现细胞自噬可利于流感病毒感染;但同时也发现使用自噬的促进剂 Rapamycin 诱导细胞自噬后,感染病毒并不表现病毒效价增高反而是降低,表明细胞自噬在流感病毒的感染过程中发挥着双向的调节作用。

(2) H5N1 病毒感染中细胞免疫相关研究:HA 是位于流感病毒表面的主要抗原,与病毒的致病力密切相关。采用计算机程序预测和实验筛选,得到了两条相互重叠的、能在体内自然处理加工的 HLA-A*0201 限制性的十肽(P6 和 P12),该多肽能够诱导很强的细胞免疫反应。尤其是 P6,其诱导的细胞免疫强度高于流感病毒的优势表位 Mp(58—66)。研究还发现 P6 和 P12 所在的区域,存在着大量不同的 MHC 分子识别基序,是一个 T 细胞识别的“热点”。这些发现对理解人禽流感致病机理和免疫调控具有重要意义。

(3) 新型禽流感病毒抑制剂研究:项目组提出了一种新的流感病毒药物研制策略,即以流感病毒

感染宿主细胞这一关键步骤为靶标,基于流感病毒的膜蛋白 HA 在膜融合前后的构象变化特点,设计和筛选出了一种能抑制流感病毒膜融合的多肽抑制剂。研究表明,该多肽抑制剂可以有效地抑制高致病性禽流感病毒 H5N1 亚型和人流感病毒 H1N1 亚型及 H3N2 亚型病毒对体外细胞的感染,能对小鼠致死剂量病毒的攻击提供完全保护,为研发人流感的治疗药物开辟了新的途径。

2.5 人才培养与论文专利

在项目实施过程中,项目组成员有 1 人获得国家杰出青年科学基金资助;培养博士研究生 12 名,其中 1 人获得中国科学院优秀博士生称号;培养硕士研究生 12 名。发表论文 49 篇,其中 2 篇发表于 *Nature*, 1 篇发表于 *Lancet*;申请专利 13 项,其中国际专利 1 项。

通过项目的实施,项目组凝聚了国内跨学科领域的研究人才,形成了具有国际竞争力的团队,开展了与国内外同行的广泛交流与合作,多次组织相关国际会议,引起了国内外同行的关注。

3 小结

项目在禽流感病毒分子流行病学、病毒蛋白结构与功能、感染机制与免疫应答、禽流感病毒感染人的特点与传播途径等方面都取得了原创性的成果,阐明了近年来流感病毒在多种动物和人中的分子流行病学特征与进化变异规律;解析了 H5N1 病毒 RNA 聚合酶部分亚基的结构,发现了 PA 的新功能,为抗流感病毒药物设计提供了潜在的新靶点;发现了流感病毒 NS1 蛋白在调控 PKR 信号通路中的作用;首次报道了流感病毒感染引起人肺上皮细胞自噬,发现自噬抑制剂可以抑制流感病毒的复制;鉴定了第一个具生物学功能的 H5N1 病毒 CTL 表位,为进一步研究病毒感染与宿主细胞免疫应答、生物标记诊断与新型疫苗研发提供了新的信息;基于病毒膜融合机制,设计和筛选出一种能抑制流感病毒膜融合的多肽抑制剂;发现了 H5N1 病毒可以通过胎盘进行母婴传播,人肠道细胞存在禽流感病毒 α -2,3 半乳糖苷唾液酸受体;为进一步开展流感基础研究、流感疫苗的研制、药物开发提供了新的思路。在北京举行的重大项目结题验收会上,鉴于有关研究已经取得重要进展,专家组一致通过验收,同意按期结题,项目综合评估为特优;建议国家自然科学基金委员会进一步资助后续研究。

REVIEW OF THE ACHIEVEMENTS OF NSFC MAJOR PROGRAM: ESSENTIAL BASIC SCIENTIFIC RESEARCH OF AVIAN INFLUENZA

Hu Jingjie Chen Yue Chen Ling Li Renwei Du Shengming

(Department of Life Science, National Natural Science Foundation of China, Beijing 100085)

Abstract Based on the situation of increasing frequency of avian influenza and newly emerging human cases of infection with avian influenza virus, the NSFC emergently organized and launched the major program "Essential Basic Scientific Research of Avian Influenza". The whole procedure consisted of experts argumentation, projecting, open application, preliminary evaluation, the defense and deliberation of the commission services, which totally accorded with the related rules of the NSFC. After four years of research, the program has made important original achievements in several aspects including the molecular epidemiology of avian influenza virus, viral protein structure and function, infection mechanisms and immune response, characteristics of human infection with avian influenza virus, routes of transmission and so on. The research tasks were completed successfully. During the implementation period, the research group carried out a wide range of academic exchanges and cooperations with domestic and foreign peers and successfully organized several relevant international conferences. Through the program implementation, the project group has developed into a team with internationally competitive power and gained great attentions from the domestic and foreign counterparts. In the finished project meeting held in Beijing, the achievements presented in the final report had good appraisal from the evaluation expert group and were evaluated as A in the comprehensive evaluation.

Key words major program, avian influenza, achievements, completion and evaluation

· 资料 · 信息 ·

陈宜瑜主任出席第三世界妇女科学组织 第四届大会开幕式并致辞

第三世界妇女科学组织(TWOWS)第四届大会暨国际学术会议于2010年6月27日在北京开幕。国家副主席习近平出席大会开幕式并致辞。会议由中国科学院和第三世界科学院(TWAS)、第三世界妇女科学组织联合主办,科技部、中国科学院、中国工程院、国家自然科学基金委员会(以下简称自然科学基金委)、全国妇联、中国科协等部门的主要领导出席了在人民大会堂举行的大会开幕式。

陈宜瑜主任代表自然科学基金委在开幕式上致辞。陈主任简要介绍了自然科学基金委自成立以来女性科学家承担科学基金项目以及参与科学基金项目评审的情况。他指出,据不完全统计,1986—2009年度作为各类国家自然科学基金项目负责人而获得资助的女性科学家已达16586人次,从1986年到2009年间增长了近10倍;与此同时,自然科学基金

委为女性科学家参与资助决策提供了重要渠道,近年来每年都有数以千计的女性科学家承担科学基金的项目评审工作。21世纪以来,随着越来越多的女性正在步入科学殿堂,自然科学基金委将针对女性所面临的特殊问题制定有效的政策,为有志于科学研究的女性的成长发展扫清障碍。具体而言,将在3个方面进一步促进女性科学家的成长发展,一是在项目评审工作中进一步明确同等条件下女性优先的原则,二是尽可能吸纳更多的女性科学家参与项目评审过程,三是根据女性科学家在科研职业生涯中的特殊困难,适时制定和实施更具针对性的政策措施。

(政策局 龚旭 供稿)