

格尔德霉素抑制高致病性禽流感病毒增殖 及其所介导炎性反应研究*

胡奕^{1, 2)**} 刘朋朋^{2)**} 张志明³⁾ 卢鹤真^{2, 4)} 罗静²⁾
王承民²⁾ 刘军须⁴⁾ 赵宝华^{1)***} 何宏轩^{2)***}

¹⁾河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; ²⁾中国科学院动物研究所, 国家野生动物疫病研究中心, 北京 100101;
³⁾北京市野生动物救护中心, 北京 100101; ⁴⁾河北省实验动物中心, 河北省实验动物重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 对高致病性禽流感病毒感染最为有效的治疗应采用抗病毒和抗炎症的联合治疗。本试验用流感病毒 H5N1 感染不同细胞株(A549 细胞和 MDCK 细胞), 采用不同浓度格尔德霉素对病毒感染细胞培养物作用不同时长, 检测流感病毒滴度; ELISA 检测格尔德霉素作用于流感病毒 H5N1 感染 A549 细胞 12 h、24 h 促炎性细胞因子 IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 水平。结果显示, 流感病毒 H5N1 感染 A549 细胞和 MDCK 细胞, 格尔德霉素极显著地抑制了流感病毒 H5N1 在细胞培养物的增殖($P < 0.01$), 而在病毒感染 36 h 和 48 h, 格尔德霉素并没有显著抑制流感病毒在 MDCK 细胞上的增殖($P > 0.05$)。促炎性细胞因子分析结果显示, 格尔德霉素在流感病毒感染 A549 细胞 12 h 和 24 h 均显著降低了促炎性细胞因子 IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 的分泌($P < 0.05$)。上述实验结果显示, 格尔德霉素具有抑制流感病毒 H5N1 增殖及其所介导的炎性反应的双重效应, 为格尔德霉素成为应对流感病毒流行的备选药物提供基础科学依据。

关键词 格尔德霉素, 流感病毒 H5N1, 抗病毒, 促炎性细胞因子

学科分类号 Q939.4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00021

流感病毒是单股、负链的 RNA 病毒, 是呼吸道感染的重要病原体, 在全球范围内呈周期性流行^[1-2]。20 世纪爆发的 1918 年“西班牙流感”、1957 年“亚洲流感”以及 1968 年“香港流感”导致几千万甚至上亿人的死亡, 给全球公共卫生、经济造成极大破坏, 严重威胁人类生命健康^[3-4]。1997 年, 中国香港爆发的高致病性禽流感病毒导致 18 人感染, 6 人死亡, 首次证实高致病性禽流感病毒 H5N1 可以危及人类的生命^[5-8]。2005 年, 青海湖候鸟中分离到的高致病性禽流感 H5N1 病毒更是提示了高致病性禽流感 H5N1 病毒全球传播的可能性, 严重威胁全球公共安全^[9]。然而, 不论是 1918 年的“西班牙流感”还是 1997 年的香港 H5N1 感染均可介导机体免疫系统产生大量的促炎性细胞因子及趋化因子, 形成“细胞因子风暴”, 造成肺组织广泛的病理损伤及严重的并发症, 因此, 禽流感病毒的致病机制及高致死率长期以来被归结于病毒感染介导的“细胞因子风暴”^[10-11]。但

是, 主要促炎性细胞因子及趋化因子基因缺失的小鼠感染致死性禽流感病毒, 在缺乏抗病毒治疗的情况下, 促炎性细胞因子和趋化因子的缺失并不能有效保护感染致死性流感病毒的小鼠, 在其生存保护率和体重变化方面和对照组没有显著性差异, 提示我们在流感病毒感染的治疗中抗病毒治疗是不可缺少的^[12]。上述研究结论提示我们防控高致病性禽流感病毒感染应进行抗病毒和抗炎症的联合治疗, 任何一方面的缺失都不可能取得理想的治疗效果。

* 北京市家禽产业技术体系创新团队, 中国科学院知识创新工程(KSCX2-YW-N-063), USDA-IOZ CAS 中美合作项目(O760621234), 国家“十一五”科技支撑计划(2009BAI83B01)和国家自然科学基金(31072126/C1804, 31101806/C1804)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

何宏轩. Tel: 010-64807118, E-mail: hehx@ioz.ac.cn

赵宝华. Tel: 0311-80789712, E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

收稿日期: 2013-01-14, 接受日期: 2013-03-27

Hsp90 抑制剂——格尔德霉素(Geldanamycin)是一种处于临床前研究阶段的药物, 该药物最初是从吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)发酵液中分离得到的天然产物, 是第一个被发现的 Hsp90 N 端抑制剂, 属于苯醌安莎类抗生素, 体外具有抗原虫、抗细菌、抗真菌、抗病毒以及很好的抗肿瘤活性^[13]. 已有研究报道格尔德霉素可以通过调控病毒 RNA 聚合酶的功能抑制单股、负链 RNA 病毒的增殖以及对感染 MDCK 细胞流感病毒的早期抑制效应^[14-15]. 同时也有科学家报道格尔德霉素可以通过调控炎症细胞因子转录子的翻译和稳定性抑制炎症反应^[16]. 然而, 格尔德霉素是否具有抑制流感病毒增殖且抗炎的双重作用尚且没有相关的报道. 本研究利用流感病毒 H5N1 体外感染其重要的靶细胞——人肺癌上皮细胞系(A549)和其易感细胞——犬肾细胞系(MDCK), 进行了格尔德霉素抑制流感病毒增殖及其所介导的炎症反应的研究, 实验结果显示, 格尔德霉素显著地抑制禽流感病毒的增殖以及病毒感染所介导的炎症反应. 为格尔德霉素能否成为应对流感病毒流行的备选药物提供基础实验数据, 也对预防和控制高致病性禽流感传播具有重要的意义和参考价值.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用流感病毒 H5N1 分离于青海湖水鸟粪便, 接种 9 日龄 SPF 鸡胚(北京梅里亚维通实验动物技术有限公司), 37℃ 增殖病毒, 48 h 后收取鸡胚尿囊液, 0.22 μm 滤器过滤分装, -80℃ 超低温冰箱保存; 犬肾细胞(MDCK)接种尿囊液流感病毒 H5N1 测定 PFU(2×10^7 pfu/ml); 所有涉及到流感病毒 H5N1 的实验, 全部依照生物安全实验室三级(BSL-3)规章操作. 犬肾细胞(MDCK)和人肺癌上皮细胞(A549)在体积分数为 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养, 培养液为含 10% FBS, 1% 青链霉素双抗的 DMEM. 上述病毒株和细胞系均由中国科学院动物研究所国家野生疫病研究中心保存提供. 格尔德霉素购自石家庄华北制药集团; 二甲基亚砜购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 格尔德霉素溶于二甲基亚砜, 稀释为不同的浓度. 细胞因子酶联免疫试剂盒购自上海研吉生物技术公司; CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术研究, 用于细胞毒性试验. CCK-8 试剂盒, 是一种基于 WST-8 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒.

WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物, 在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臜. 细胞增殖越多越快, 则颜色越深; 细胞毒性越大, 则颜色越浅. 对于同样的细胞, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系.

1.2 实验方法

1.2.1 细胞毒性实验. 收集处于对数生长期的 MDCK 细胞和 A549 细胞, 调整细胞悬液浓度接种 100 μl 于 96 孔板, 使每孔细胞数量为 1×10^4 个, 在体积分数为 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 12 h, 培养液为含 10% FBS、1% 青链霉素双抗的 DMEM, 后移去培养基, 分别加入含有 0(Control)、50、100、200、500 和 1 000 nmol/L 格尔德霉素的上述成分培养基 100 μl, 每个药物浓度分别设 3 个复孔. 加药后在体积分数为 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 12 h 和 24 h, 参照 CCK-8 试剂盒说明书, 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 继续孵育 1 h, 利用酶标仪于 450 nm 测定吸光度, 计算细胞生存率. 细胞生存率 = $(A_{\text{药物作用孔}} - A_{\text{调零孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100\%$.

1.2.2 病毒增殖检测. 收集处于对数生长期的 MDCK 细胞和 A549 细胞, 调整细胞悬液浓度 3.5×10^5 个/ml 接种于 6 孔板, 在体积分数为 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 12 h, 培养液为含 10% FBS, 1% 青链霉素双抗的 DMEM, 待长成单层细胞后, 移去培养基, PBS 洗单层细胞 3 次, 以彻底除去血清. 0.001 moi (350 PFU) 流感病毒 H5N1 感染单层 MDCK 细胞和 A549 细胞, 加入培养液成分为 1% 青链霉素双抗的 DMEM 孵育 1 h. 流感病毒 H5N1 感染 MDCK 细胞和 A549 细胞 1 h 后, 弃去培养基, PBS 洗 3 次, 分别在两种细胞培养物上加入含有 0(control)、50、100、200、500 和 1 000 nmol/L 格尔德霉素的细胞生长培养基, 每个药物浓度分别设 3 个复孔, 于病毒感染后 24 h 测定病毒滴度(PFU/ml), 检测抑制病毒增殖的最适药物浓度. 以最适浓度的格尔德霉素作用于感染流感病毒 H5N1 的 MDCK 细胞和 A549 细胞培养物, 分别于感染后 12、24、36 和 48 h, 测定流感病毒 H5N1 在不同时间点的病毒滴度(PFU/ml).

1.2.3 促炎症细胞因子检测. 收集处于对数生长期 A549 细胞, 调整细胞悬液浓度 3.5×10^5 个/ml 接种于 6 孔板, 在体积分数为 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 12 h, 培养液为含 10% FBS, 1% 青链霉素双抗的 DMEM, 待长成单层细胞后移去培养基,

PBS 洗单层细胞 3 次，以彻底除去血清。2 moi (7×10⁵ PFU) 流感病毒 H5N1 感染单层 A549 细胞，加入培养液成分为 1% 青霉素双抗的 DMEM 孵育 1 h。流感病毒 H5N1 感染 A549 细胞 1 h 后，弃去培养基，PBS 洗 3 次，分别在两种细胞培养物上加入含有 1 000 nmol/L 格尔德霉素的细胞生长培养基，设置 3 个复孔，分别于感染后 12 h 和 24 h 收集细胞培养物上清液，4℃、5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液，按照酶联免疫(ELISA)试剂盒说明书检测流感病毒感染 A549 细胞产生的促炎性细胞因子 IFN-α，TNF-α 和 IL-6 水平。

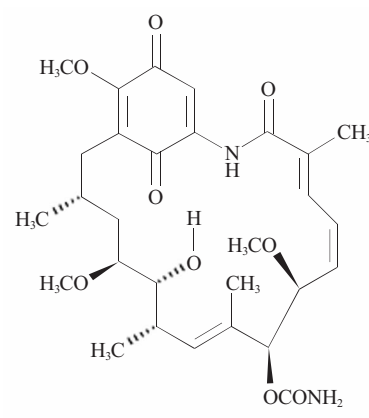
1.2.4 统计分析。 本研究所有数据均采用 Graphpad Prism 6 和 SPSS 16.0 软件进行数据的统计学分析，所有结果用($\bar{x} \pm s$)表示；** $P < 0.01$ 表示差异极显著，0.01 < * $P < 0.05$ 表示差异显著，# $P > 0.05$ 表示没有显著性差异。

2 结 果

2.1 格尔德霉素对 MDCK 细胞和 A549 细胞的毒性效应

Hsp90 抑制剂——格尔德霉素(Geldanamycin)分子结构如图 1 所示。我们在不同的细胞系(MDCK 细胞和 A549 细胞)中分别分析不同浓度格

尔德霉素及不同作用时间对细胞的毒性效应。WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物，可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臍。细胞毒性试验结果显示格尔德霉素在 50~1 000 nmol/L 的浓度范围内对 MDCK 细胞(图 2a)和 A549 细胞(图 2b)均没有显著($P > 0.05$)的毒性效应。因此，在下面的试验中格尔德霉素只要在 50~1 000 nmol/L 的浓度范围内对两种细胞株(MDCK 细胞和 A549 细胞)是没有细胞毒性效应的。



Geldanamycin
(C₂₉H₄₀N₂O) [M_r=560.64]

Fig. 1 Structure of Geldanamycin

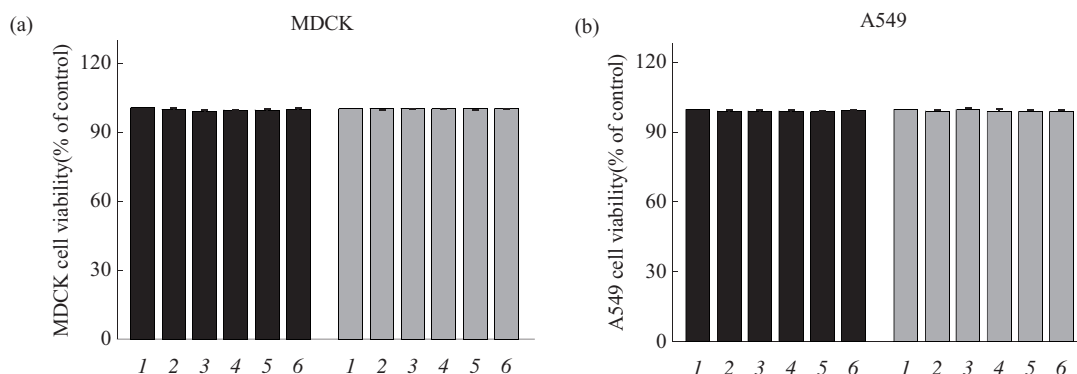


Fig. 2 Effect of Geldanamycin on cell viability

MDCK (a), A549 (b) cells were seeded in 96-well plates. Cells were then treated with the indicated concentrations of Geldanamycin or PBS, as shown, for 24 h, and cell viability was measured using a CCK-8 kit as described in instructions. Values represent the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. 1: Control; 2: 50 nmol/L; 3: 100 nmol/L; 4: 200 nmol/L; 5: 500 nmol/L; 6: 1000 nmol/L. ■: 12 h; □: 24 h.

2.2 格尔德霉素抑制流感病毒 H5N1 对 MDCK 细胞和 A549 细胞增殖的影响

格尔德霉素分别以 50、100、200、500 和 1 000 nmol/L 作用于感染流感病毒 H5N1 的 MDCK

细胞和 A549 细胞，于感染后 24 h 测定病毒滴度(PFU/ml)，以评价格尔德霉素对流感病毒 H5N1 的抑制。结果显示，不同浓度的格尔德霉素在流感病毒 H5N1 感染 MDCK 细胞(图 3a)和 A549 细胞(图 3b)

后 24 h 可以抑制病毒的增殖, 且呈剂量依赖性, 随着格尔德霉素浓度的增大, 抑制效应逐渐增强. 因此, 在后续的实验我们采用 1000 nmol/L 浓度的格尔德霉素进行药物的体外抗病毒研究.

1 000 nmol/L 浓度的格尔德霉素作用于流感病毒 H5N1 感染的 MDCK 细胞和 A549 细胞, 分别于感染后 12、24、36 和 48 h 测定病毒滴度 (PFU/ml). 结果显示, 格尔德霉素在流感病毒 H5N1 感染 MDCK 细胞 12 h 和 24 h 显著抑制了病毒的增殖 ($P < 0.01$), 但是在病毒感染后 36 h 和 48 h,

感染病毒加药组 (Geldanamycin+Virus) 和感染病毒不加药组 (Virus) 相比并没有显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3c). 而格尔德霉素在流感病毒 H5N1 感染 A549 细胞后 12、24、36 和 48 h 均显著抑制了病毒的增殖 ($P < 0.05$) (图 3d), 显示出了很好的抗病毒活性. 此外, 我们发现无论是实验组 (Geldanamycin+Virus) 还是对照组 (Virus) 流感病毒感染 A549 细胞的病毒滴度均显著低于其感染 MDCK 细胞的病毒滴度 (图 3e, f).

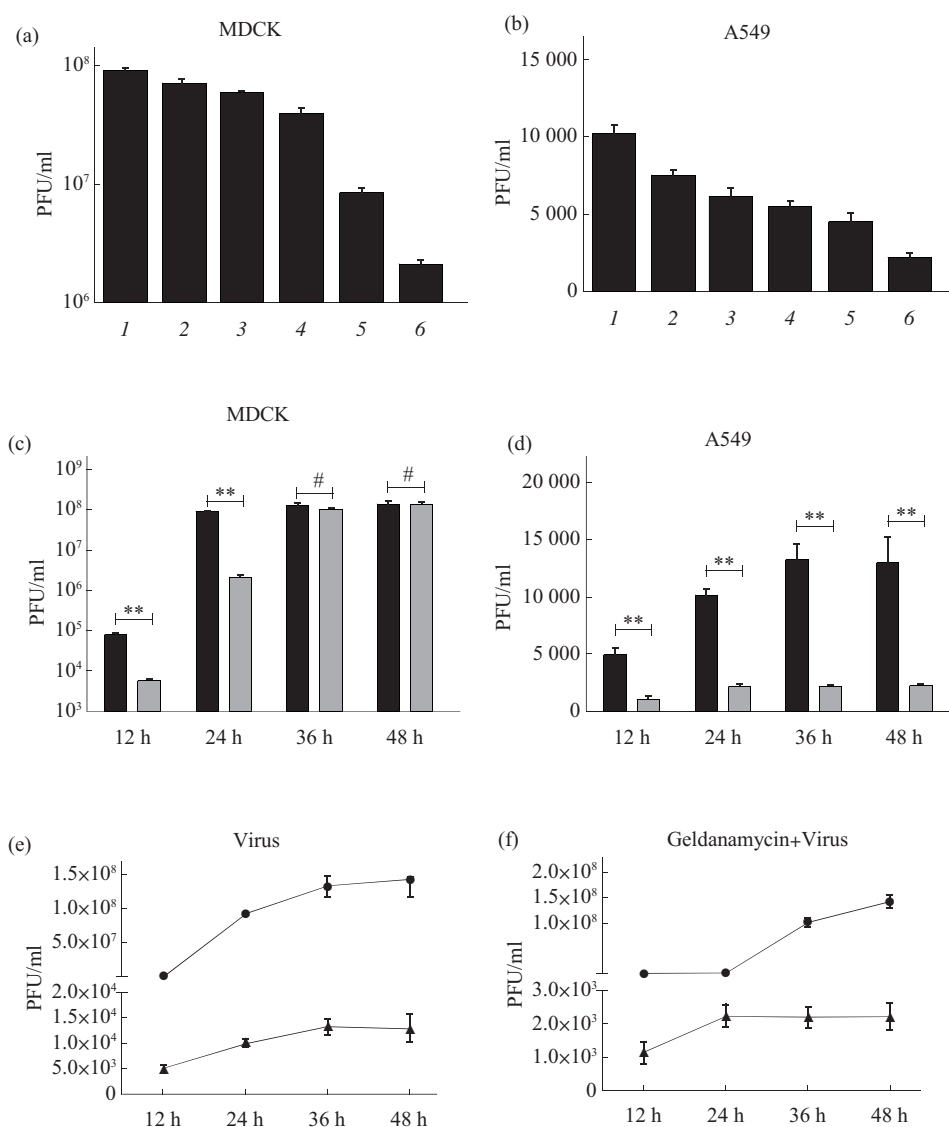


Fig. 3 Geldanamycin inhibits growth of influenza A virus H5N1 in two cells culture (MDCK cell and A549 cell)

(a, b) Effect of Geldanamycin at the indicated concentrations on virus titres in MDCK cells and A549 cells infected with influenza A virus H5N1 at 0.001 moi. for 24 h. 0 nmol/L Geldanamycin as Control. Viral titers were determined using a focus forming assay with MDCK cells and A549 cells. 1: Control; 2: 50 nmol/L; 3: 100 nmol/L; 4: 200 nmol/L; 5: 500 nmol/L; 6: 1000 nmol/L. (c~f) MDCK cells and A549 cells were infected with influenza virus H5N1 (0.001 moi) for 12 h, 24 h, 36 h or 48 h in the absence or presence of 1000 nmol/L Geldanamycin. Viral titers were determined using a focus forming assay with MDCK cells and A549 cells at the indicated time points. Values represent the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. ■: Virus; ▣: Geldanamycin+Virus; ▲—▲: A549; ●—●: MDCK.

2.3 格尔德霉素抑制流感病毒 H5N1 感染 A549 细胞介导的炎性反应

在本试验中, 我们评价了格尔德霉素对流感病毒 H5N1 感染人肺癌上皮细胞介导促炎性细胞因子的作用. 1000 nmol/L 浓度的格尔德霉素作用于流感病毒 H5N1 感染的 A549 细胞, 分别于病毒感染 12 h 和 24 h, ELISA 测定细胞培养物上清液中与

感病毒感染致病机制密切相关的促炎性细胞因子 IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 分泌水平. 结果表明格尔德霉素显著抑制了流感病毒 H5N1 感染 A549 细胞介导的促炎性细胞因子分泌. 在感染后 12 h 和 24 h, 与不加药的对照组(Virus)相比, 格尔德霉素加药组 (Geldanamycin+Virus)极显著地抑制了 IFN- α (图 4a)、TNF- α (图 4b)和 IL-6(图 4c)的分泌($P < 0.01$).

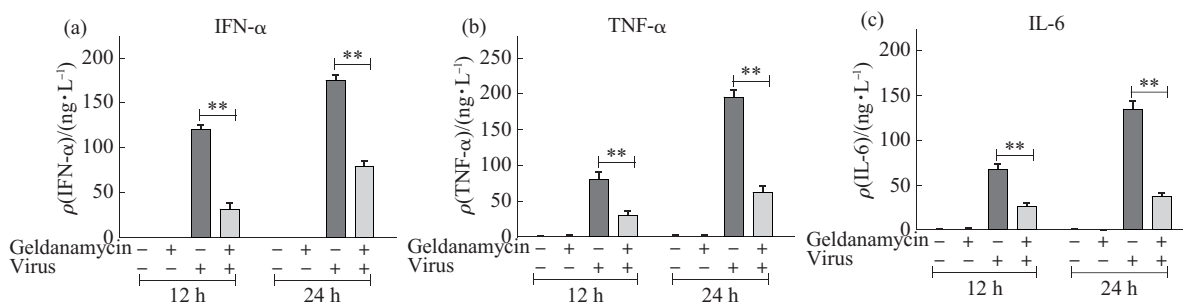


Fig. 4 Effect of Geldanamycin on the production of major pro-inflammatory cytokines associated with influenza pathogenesis

A549 cells were infected with influenza A virus H5N1 (2 moi) 12 or 24 h in the presence or absence of 1000 nmol/L Geldanamycin. Cell supernatants were collected and levels of IFN- α (a), TNF- α (b) or IL-6 (c) were determined using ELISA. Values represent the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments.

3 讨 论

高致病性禽流感病毒 H5N1 是导致人类高致死率的一种主要的呼吸道感染病原, 对全球人类健康和公共安全造成严重威胁^[1-2]. 机体天然免疫系统识别流感病毒通过 TLR7 的细胞内识别、RIG-I 的胞浆识别或在流感病毒复制阶段的 NLRs 识别激活天然免疫系统, 从而释放大量的促炎性细胞因子和趋化因子应对流感病毒感染的^[17-21]. 虽然细胞因子和趋化因子的分泌有助于机体清除病毒, 但是过度的炎性反应将导致机体严重的病理损伤及高的致死率, 因此长期以来人们将高致病性禽流感病毒感染导致人和动物的高致死率归咎于以“细胞因子风暴”为特征的过度炎性反应. 然而主要促炎性细胞因子及趋化因子基因缺失的小鼠感染致死性禽流感病毒, 在缺乏抗病毒治疗的情况下, 促炎性细胞因子和趋化因子的缺失并不能有效保护感染致死性流感病毒的小鼠, 在其生存保护率和体重变化方面和对照组没有显著性差异, 因此流感病毒感染治疗中抗病毒治疗是不可缺少的^[12]. 但是, 也有研究结果显示, 即使感染小鼠的流感病毒复制被抑制, 其所

介导产生的促炎性细胞因子和趋化因子水平与没有进行抗病毒治疗组的水平相比没有显著性差异, 且显著高于进行了抗病毒和抗炎联合治疗组的促炎性细胞因子和趋化因子水平, 该结果表明一旦流感病毒感染激活了机体的天然免疫系统, 导致机体产生过度的促炎性免疫反应, 即使进行了抗病毒治疗, 依然不能抑制“细胞因子风暴”造成的免疫病理损伤进程^[22]. 所以高致病性禽流感病毒感染应进行抗病毒和抗炎症的联合治疗, 任何一方面的缺失都不可能取得理想的治疗效果.

对于防治高致病性流感病毒感染的, 最为理想和有效的方案依然是进行疫苗的接种. 然而, 流感病毒两种主要表面抗原蛋白基因频繁的漂移和转换, 必须周期性地根据预测下一次流感病毒流行的基因型进行疫苗的频繁更新, 即便如此仍不能有效地防控流感病毒感染的, 且疫苗只能对易感人群起到预防作用, 对于已经发病的患者则无能为力^[23-26]. COX-2 抑制剂、皮质激素、减毒百日咳包特氏菌以及 AAL-R 作为免疫调节剂虽然显著地降低了流感病毒感染引起的免疫病理损伤, 但是其并没有降低实验动物模型的肺部病毒负载量^[22, 27-29]. 流感病

毒 M2 离子通道阻滞剂类药物和神经氨酸酶抑制剂类药物由于流感病毒对其耐药性以及一些不良反应使之在对抗流感病毒感染治疗上效果不理想^[30-34]。因此预防治疗禽流感病毒感染的理想药物应规避以下三种情况: 流感病毒靶基因的频繁变异, 金刚烷类、神经氨酸酶药物的耐药性和不良反应以及抗病毒或抗炎症的单一效应。Hsp90 蛋白是一种重要的分子伴侣蛋白, 参与体内多种生物学过程, 和病毒复制相关的研究已见于诸多报道。Momose 等^[35]研究表明, Hsp90 蛋白可以结合于流感病毒 RNA 聚合酶的亚基 PB2, 从而激活病毒聚合酶的活性; 而 Hsp90 抑制剂 - 格尔德霉素竞争性结合于 Hsp90 蛋白, 阻断了流感病毒聚合酶的激活, 从而抑制流感病毒的增殖。Chase 等^[15]利用流感病毒感染 MDCK 细胞, 首次报道了格尔德霉素及其衍生物对流感病毒的体外抑制作用。在本研究中, 我们首先评价了格尔德霉素对细胞培养物的毒性效应。结果显示, 格尔德霉素在 1000 nmol/L 的浓度下没有显著的毒性效应, 与 Chase 等^[15]的细胞培养物药物毒性研究结果是一致的。结合格尔德霉素药物说明书给予的细胞培养物安全实验浓度(300 nmol/L~1 μ mol/L), 我们在后续实验中利用 1 μ mol/L 作为格尔德霉素的实验浓度, 且在抗病毒实验中 1 μ mol/L 中的格尔德霉素显示了最好的抗病毒活性。格尔德霉素在流感病毒感染 MDCK 细胞的早期阶段(12 h 和 24 h)显著抑制了病毒的复制, 与 Chase 等^[15]的报道是一致的。同时, 格尔德霉素也显著抑制了流感病毒 H5N1 在其主要体外靶细胞——人肺癌上皮细胞(A549)上的增殖。流感病毒通过动物呼吸系统上皮细胞感染动物机体, 人肺癌上皮细胞(A549)作为人类呼吸系统的上皮细胞, 在本研究中可以获得更有参考价值的试验数据。在本研究中, 我们发现无论是对照组还是实验组的 A549 细胞其病毒感染量显著低于 MDCK 细胞(图 3e, f), 可能是由于流感病毒对不同细胞株系的易感性造成的, 也可能与 A549 细胞的炎性细胞因子分泌相关, 但是格尔德霉素对感染 A549 细胞流感病毒的增殖仍然表现出显著的抑制效应, 且在晚期阶段仍然呈现很好的抑制效应, 并在安全剂量区间内呈现剂量依赖性。

Hsp90 抑制剂结合于 Hsp90 蛋白可阻断机体多种生物学过程。Wax 等^[16]利用 LPS 在缺乏和加有格尔德霉素情况下刺激巨噬细胞系 RAW264.7, 结果显示, 格尔德霉素并不能显著抑制 TNF- α 和 IL-6 的转录, 但是却显著降低了炎性细胞因子转录

子的稳定性, 从而显著抑制了活化巨噬细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌。上述结果可能是由于格尔德霉素抑制了与调节炎性细胞因子转录子稳定性和转录相关的 p38 丝裂原激活蛋白酶的活性。IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 是和流感病毒感染相关的主要促炎性细胞因子, IFN- α 激活炎性细胞, 刺激多种炎性细胞因子和趋化因子的表达, TNF- α 的分泌将加剧组织的损伤, 而 IL-6 的分泌直接和宿主的高致死率相关。因此在本研究中我们检测了流感病毒感染 A549 细胞系 IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 的分泌水平, 结果显示, 格尔德霉素显著抑制了 A549 细胞 IFN- α 、TNF- α 和 IL-6 的分泌, 降低了炎症反应, 提示格尔德霉素体内抑制病毒感染介导炎症反应的可能性。

在本研究中, 格尔德霉素在细胞培养物上显著抑制了流感病毒 H5N1 的增殖及其所介导的促炎性细胞因子反应, 为筛选高效抗流感药物提供更具参考价值的基础科学数据, 对于防治不同类型的流感及以后可能出现的流感变异病毒都具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Salomon R, Webster R G. The influenza virus enigma. *Cell*, 2009, **136**(3): 402-410
- [2] Russell C J, Webster R G. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell*, 2005, **123**(3): 368-371
- [3] World Health Organization. Avian influenza: assessing the pandemic threat. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2005
- [4] Zhou K, He H. Avian influenza and swine influenza: new understanding of crossing species barrier. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(5): 523-529
- [5] 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. *Science*, 1998, **279**(5349): 393-396
- [6] Ku A S, Chan L T. The first case of H5N1 avian influenza infection in a human with complications of adult respiratory distress syndrome and Reye's syndrome. *J Paediatr Child Health*, 1999, **35**(2): 207-209
- [7] Chan P K. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis*, 2002, **34**(Suppl 2): S58-64
- [8] Uyeki T M. Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: review of clinical issues. *Clin Infect Dis*, 2009, **49**(2): 279-290
- [9] Liu J, Xiao H, Lei F, *et al.* Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 2005, **309**(5738): 1206
- [10] Kash J C, Tumpey T M, Proll S C, *et al.* Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature*, 2006, **443**(7111): 578-581
- [11] de Jong M D, Simmons C P, Thanh T T, *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and