综述

人偏肺病毒感染发病机制及疫苗研究

唐茂芝¹ 窦颖² 综述 赵晓东¹ 审校

(重庆医科大学附属儿童医院 1. 肾脏免疫科; 2. 血液肿瘤科, 重庆 400014)

[摘要] 人偏肺病毒(HMPV)在儿童呼吸道感染中的重要性越来越受到重视。HMPV感染往往在冬春季流行,且1岁以内婴儿感染率最高,临床表现与呼吸道合胞病毒相似。机体通过病原识别受体(PRRs)识别HMPV病原相关模式分子(PAMP),其中Toll样受体3和4可能起重要作用,诱导I型干扰素及其它促炎症因子产生。采用定点诱变法成功制备F蛋白去N连接糖链减毒重组活疫苗株,在小鼠动物模型中证实该疫苗株有良好的免疫原性和免疫保护作用,具有临床应用前景。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(5): 548-554]

[关键词] 人偏肺病毒; 固有免疫; Toll样受体; 减毒活疫苗

Pathogenesis of human metapneumovirus infection and research on attenuated live vaccine

TANG Mao-Zhi, DOU Ying, ZHAO Xiao-Dong. Department of Nephritic Immunology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Email: tmzm0130@163.com)

Abstract: Numerous studies have indicated that human metapneumovirus (hMPV) is an important viral pathogen in acute respiratory infections in children, presenting similar manifestations with respiratory syncytial virus (RSV). HMPV infection peaks in the winter-spring season and is more prevalent in younger ages, especially in children less than 1 year old. Host innate immune response has been implicated in recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of the virus. This recognition occurs through host pattern recognition receptors (PRRs). Toll like receptors (TLRs) are one of the largest class of PRRs which initiate and regulate adaptive immune responses. Some studies have indicated that TLR 3 and TLR 4 may play critical roles in hMPV infection. Construction of recombinant mutant viruses lacking one or two N-linked glycosylation sites in the F protein by using site-directed mutagenesis and reverse genetics may be helpful for developing attenuated live vaccines.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(5): 548-554]

Key words: Human metapneumovirus; Innate immunity; Toll-like receptor; Attenuated live vaccine

全球每年120万儿童死于急性呼吸道感染,大多发生在发展中国家^[1]。WHO报道呼吸道感染为5岁以下儿童死因的前三位之一^[2]。冯江等^[3]也报道了呼吸道感染为中国5岁以下儿童死亡的前三位死因之一,且以呼吸道合胞病毒(RSV)为首的病毒为急性呼吸道感染的主要病原。越来越多的流行病学研究表明人偏肺病毒(HMPV)是仅次于RSV的重要呼吸道感染病原。HMPV感染主要发生在3岁以内婴幼儿,特别是1岁以内婴儿^[4]。

HMPV感染可致重症肺炎甚至呼吸衰竭,免疫低下人群、儿童和老人等更容易发生^[5]。目前HMPV感染机制尚不完全清楚,临床治疗无针对性。全世界尚无HMPV疫苗进入临床使用,处于临床前研究的灭活疫苗、亚单位疫苗、重组减毒活疫苗等均具有诱导炎症、免疫原性不足、制备困难等弱点,临床应用前景堪忧。因此,HMPV感染机制的研究和疫苗开发十分必要。

[收稿日期] 2013-11-04; [接受日期] 2014-02-09

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(cstc2013jjB10029)。

[作者简介] 唐茂芝,男,硕士研究生。

1 HMPV 感染流行情况

HMPV 于 2001 年首次被分离, 属副粘病毒科偏肺病毒属。目前世界各地相继报道该病毒感染流行, 赵晓东等于 2004 年在国内首次分离了 HMPV。利用 HMPV 中国流行毒株感染 Vero-E6 细胞裂解液为抗原, 检测重庆地区 0~6 岁儿童血清中 HMPV IgG 水平, 结果发现儿童至 6 岁时几乎 100% 均已感染过 HMPV^[6], 与 Ebihara 等^[7] 国外报道一致。本课题组对重庆地区儿童 HMPV 感染进行了连续五年的分子流行病学研究, 发现该病毒感染在冬春季呈现高峰, 在因急性呼吸道感染住院患儿中的检出率可高达 14.6%~35.8%; HMPV 感染无明显性别差异, 但感染年龄以婴幼儿最为常见; 在急性呼吸道感染的患儿中, 6 个月以内 HMPV 感染者可高达 10%~27.8%, 6 个月~2 岁为 5.1%~8.2%, 2~6 岁为 4.5% 左右, >6 岁则仅为 0.2%~1.9%^[4,8-9], 上述流行病学特点与全球其他地区的研究结果相似^[10-12]。国内的一项研究报道北京的急性呼吸道感染的成年人中 1.7% 有 HMPV 感染^[13], 而台湾曾报道了一次 HMPV 在成人中的爆发流行, 13 个成年人中 10 人检出单纯 HMPV 感染, 且有 1 例因呼吸衰竭致死^[14]。HMPV 基于基因型可分为 A、B 两型, 又可进一步分为 A1、A2、B1、B2 四个亚型, 在 2007~2011 年间, 重庆地区 HMPV 流行株主要为 A2b 亚型, 国内其他地区也主要以 A2b 亚型为主^[9,15], 仅金玉等^[16] 报道 2009~2010 年南京地区以 B1 亚型流行为主。东亚、欧美及中东一些国家的研究也显示 HMPV 感染以 A2 亚型为主, 其中 A2a, A2b 亚型均可为主导流行, 但更多以 A2b 亚型感染为主, 其次为 B2 亚型, 而 A1 和 B1 亚型流行相对少见^[12,17-22]。基于 A2 亚型的长期流行, Li 等^[23] 从进化动力学方面分析了 A2b 亚型的流行, 并发现 A2 亚型基因相对其他亚型有最大的平均基因距离及第二高的等位基因互换率, 因而进化速度更快, 且遗传多样性水平高于其他亚型, 有更强的生存能力, 解释了 A2 亚型的长期流行。

HMPV 可致上、下呼吸道感染, 甚至重症肺炎, 临床表现与 RSV 感染相似, 表现为咳嗽、喘息、发热、紫绀等, 其中 30%~40% 患儿出现发热

症状, 70%~80% 患儿出现喘息症状, 诊断支气管肺炎及毛细支气管炎最为常见, 国外的一项研究显示 HMPV A 亚型感染致病更多地被诊断为肺炎, 而 B 亚型感染则更多地与毛细支气管炎发病联系密切^[21]。HMPV 与 RSV 合并感染时临床症状会加重, 特别是发生呼吸衰竭的风险更高^[4]。同时本课题组发现 HMPV 感染与喘息性疾病相关, 机制尚不明了, 可能是与 HMPV 感染导致的气道高反应性相关^[5,24]。

2 HMPV 与包膜融合

HMPV 基因 3' → 5' 的序列为 N-P-M-F-M2-SH-G-L, 编码 9 种蛋白, 其中 F、G 和 SH 是跨膜表面蛋白, N、P、L 共同形成核衣壳蛋白。现已知, HMPV 采用病毒宿主细胞膜融合机制进入宿主细胞, 其中 F 蛋白、G 蛋白是肺病毒亚科所有成员均具有的膜糖蛋白分子, 主要介导病毒粘附靶细胞、病毒与细胞膜融合过程。与 RSV 膜融合过程不同的是, 有研究报道重组的缺乏 G 蛋白、SH 蛋白的 HMPV 在细胞培养液中的复制水平不受影响, 而 G 蛋白反而可能对 HMPV F 蛋白介导的融合过程有抑制作用^[25-26], 这种现象提示 F 蛋白能单独介导膜融合过程。这种差异可能与 RSV F 蛋白缺乏 HMPV F 蛋白特有的 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列有关。RGD 序列与宿主细胞表面的整合素特别是 $\alpha v \beta 1$ 整合素结合促进病毒与宿主细胞粘附过程^[27]。HMPV 感染时, 病毒产生无活性前体蛋白 (F0), 需在蛋白酶作用下裂解成两个由二硫键相连的有膜融合活性的多肽 F1 和 F2, 而 HMPV F 蛋白介导的膜融合过程需要在低 pH 环境下进行^[5,28], F 基因外功能区的组氨酸残基对于 F 蛋白的功能有很大影响, 将组氨酸残基突变后, 降低了其促进细胞融合的作用^[28]。Chang 等^[29] 研究显示 HRB 连接区域的 H435 残基扮演 pH 感应器的角色, 当在低 pH 环境中时, H435 与周围区域的静电排斥作用促进 F 蛋白介导膜融合过程。另有研究显示人肺的上皮细胞中表达的 MPRSS2 (一种跨膜丝氨酸蛋白酶) 可以有效的促进 F 蛋白裂解过程, 为偏肺病毒的感染、复制提供了有利条件^[30]。

3 HMPV 感染免疫机制

病毒感染后肺部病变的严重程度取决于两方面：病毒复制及宿主对外来病原的免疫应答^[31]。而目前越来越多的证据表明，在病毒感染的发病机制中，机体的免疫应答在肺部炎症中的作用比病毒复制本身更大。

3.1 HMPV 感染的固有免疫应答

固有免疫系统是抵抗病毒入侵的第一道防线，在抗病毒免疫应答中，固有免疫的启动具有重要的作用，其不仅是感染清除和进展的主要决定因素，还影响后续适应性免疫的产生，并在两种不同的免疫功能之间起十分关键的桥梁作用。其主要功能为免疫识别和诱导炎症应答产生，通过单核/巨噬细胞及树突状细胞等固有免疫细胞表面或者胞内的模式识别受体（PRRs）识别病原体相关模式分子（PAMPs），从而诱导细胞产生大量细胞因子、趋化因子、低分子介质等，起到炎症和免疫调节作用。PRRs 目前分为 Toll 样受体（TLRs）、维甲酸诱导基因样受体（RLRs）和核苷酸结合寡聚化结构域蛋白（NLRs），其中在病毒感染中研究较多的是 TLRs。

TLRs 为 I 型跨膜蛋白，通过识别细菌、病毒和环境中的相应抗原的保守结构，启动天然免疫和调节性免疫应答^[32-33]，对于 TLRs 在呼吸道病毒感染中的作用，大量的研究发现 TLR3 可识别多种病毒 dsRNA，TLR4 与 RSV F 蛋白结合，TLR7~8 可识别流感等病毒的 ssRNA^[34-36]，而 TLR2 可与麻疹病毒 HA 结合^[37]。既往本课题组在 hMPV 感染体外培养的人肺上皮细胞株 A549 细胞中发现，HMPV 感染后 TLR3~4、TLR7~9 的表达明显增高，同时伴 IFN- α 及 TNF- α 的表达增加，在小鼠模型中也有相似发现^[38-39]，说明多条 TLRs 信号通路的激活，可能是 HMPV 引发 IRF-3 和 NF- κ B 过度激活，致使上皮细胞释放大量炎症因子导致气道炎症的原因。

目前 TLR3 在 RSV 感染机制的研究已相对比较成熟，TLR3 特异识别病毒复制的中间产物 ds-RNA，依赖非 MyD88 途径，通过接头分子 TRIF 介导下游信号转导，诱导 I 型干扰素分泌及 NF- κ B 激活^[5]。在 RSV 感染的动物模型和人呼吸道上皮中发现 TLR3 表达增加，且诱导增强趋化

因子的产生^[40]；而当 RSV 感染 TLR3 基因敲除小鼠后，呼吸道粘液渗出增多，机体病毒的清除能力下降，gob5 mRNA、IL-13 和 IL-5 等细胞因子产生增加，而这些细胞因子发现与哮喘有关^[41]。本课题组发现 HMPV 感染小鼠模型和 A549 细胞后 TLR3 表达上调，用 TLR3 受体激动剂 PolyI:C 预处理小鼠后再感染 HMPV，对照单纯 HMPV 感染，发现 polyI:C 可通过早期活化 TLR3 抑制 HMPV 在小鼠肺内的复制，并减轻肺部炎症^[39,42]。综合而言，TLR3 在 HMPV 感染中起着重要作用，且 TLR3 受体激动剂是一个潜在的治疗 HMPV 感染的手段。TLR4 除了可以依赖 MyD88 途径外，还可以同 TLR3 一样通过 TRIF 介导下游信号转导，导致 NF- κ B 激活和 I 型干扰素分泌。HMPV 感染 TLR4 基因敲除小鼠后，HMPV 诱导的细胞因子、趋化因子、I 型干扰素分泌水平明显下降^[31]，小鼠的临床症状缓解，可能与炎症因子减少降低了气道高反应性有关。TLR7~9 可通过 MyD88 途径诱导 NF- κ B 激活，并且通过 TRAF3 通路激活干扰素调节因子 7（IRF7）诱导 I 型干扰素的分泌^[5]。本课题组在对 HMPV 感染小鼠研究中发现，HMPV 感染后 TLR7~8 增高最为显著^[39]，提示在小鼠抗 HMPV 感染的免疫应答中，TLR7/8 通路的激活可能起着较为重要的作用，其原因还有待进一步的研究。

3.2 HMPV 感染的适应性免疫应答

呼吸道病毒感染诱导产生的特异性体液和细胞免疫应答在感染后期非常重要，病毒蛋白特异性抗体多数情况下与病情恢复相关，高滴度的中和性抗体可预防相应病毒的感染，但病毒的最终清除则须由细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）完成。这两方面互相配合，使机体在感染后 2~4 周内清除病毒并建立持久或暂时的免疫记忆。

F、G 和 SH 蛋白是 HMPV 的抗原性蛋白，其中 F 蛋白与机体免疫系统接触最为频繁。在对所有蛋白质基因序列的分析中发现 F 基因核苷酸序列具有高度保守性，A、B 两株同源性可达 95%。Skiadopoulos 等^[33]评价 HMPV SH、G 和 F 糖蛋白的免疫原性，发现 F 蛋白诱导了高水平的血清 HMPV 中和抗体，并能适度抵抗攻击的 HMPV 的复制，而 G 和 SH 蛋白仅有微弱的免疫原性和保护性，同时发现 HMPV F 蛋白诱导产生交叉反应性的、

保护性抗体,防止不同抗原亚型的病毒感染。

国内有研究观察了HMPV感染患儿免疫功能变化,发现CD3⁺、CD4⁺CD25⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD19⁺CD23⁺细胞数量有显著上升,而NK细胞无显著变化甚至有下降,提示HMPV感染后引起体液免疫及细胞免疫发生^[34-35]。在初次HMPV感染的小鼠模型中,研究发现CD4⁺和CD8⁺T细胞协同发挥较强的抗病毒作用,其中CD4⁺T细胞介导调控炎症因子的产生占主导作用,比如IL-6、IL-1、TNF等^[36];同时发现了不正常的适应性免疫反应,比如,HMPV感染小鼠后由CTL产生Th2细胞因子IL-4、IL-10表达增加,同时伴低水平IFN- γ 表达,但该CTL反应有延迟,相反,用CTL表位疫苗免疫小鼠后诱导Th1细胞因子IL-12和IFN- γ 明显增强,局部形成Th1优势环境,并证实小鼠模型中CTL表位疫苗在控制HMPV感染上的有效性;同时在CTL反应延迟阶段被动给予HMPV抗体可能有保护作用^[39,43]。上述研究表明同RSV感染相似,Th1/Th2失衡,特别是Th2类细胞因子占优势是HMPV致病的机制之一。

4 国内外疫苗研究现状

目前处于临床前研究的HMPV疫苗有灭活疫苗、亚单位疫苗、重组减毒活疫苗等。灭活的HMPV疫苗攻毒时诱导Th2反应增强以及严重的肺部组织病理损伤,证实上述灭活疫苗不可能应用于尚未感染过的婴幼儿^[44-45]。在非洲绿猴肺内,缺失SH的重组偏肺病毒复制能力较野生型病毒轻微下降,缺失G或M2-2基因的重组病毒在上下呼吸道的复制能力则分别下降6、160倍及3200、4000倍;再次攻毒时,上气道仅能检测到微量病毒复制,下气道则完全没有病毒复制,且都能诱导较高水平的HMPV血清中和抗体^[25]。Talaat等^[46]将修饰HMPV SH基因得到的毒性减弱的rHMPV-SHs感染21个健康成年人,这项临床试验证实rHMPV-SHs有一定感染力且能有不错免疫原性,21例参与者中未发现严重副反应。RSV F蛋白亚单位疫苗应用在已感染过的儿童或者成人中证明具有较好的免疫原性和安全性^[47-48],而动物模型

的结果提示该类型疫苗应用在未感染过的儿童可能出现肺病理损害加重的风险^[49],考虑HMPV和RSV密切的遗传相关性,HMPV F单位亚单位疫苗应用于未感染过的婴幼儿可能有肺病理损害增强的风险,而可能更适合运用于成人或者已感染过HMPV的儿童^[50]。

5 本课题组重组HMPV疫苗研究

减毒活疫苗模拟自然感染,不仅具有良好的免疫原性,在尚未感染过HMPV的婴幼儿中没有导致疫苗增强免疫病理应答的风险,因而被认为是目前最佳的初种HMPV疫苗^[51-53]。反向遗传学方法为减毒活疫苗的制备提供了条件,可在cDNA水平对病毒基因组进行改建,去除某一个病毒蛋白质基因,制备基因缺失型变异株,明显降低其毒力。

糖基化作为一种主要翻译后修饰对蛋白质功能有重要影响,主要表现在蛋白质折叠、运输、定位方面。与Schowalter等^[26]的研究一样,本课题组成功预测了HMPV F蛋白的糖基化和磷酸化位点,发现HMPV 4标准株均在F蛋白氨基酸序列3个相同位点(第57、172、353位)存在可能的N-连接糖基化位点;另外本课题组用Western Blot分析该3个位点突变株与野生株(WT株)F1的表达进一步证实第57、172、353位点为可能的糖基化位点^[5,54]。

本课题组以已获得的GFP标记的HMPV NL/1/00(WT株)全长cDNA质粒为模板,通过体外定点突变已知的3个N-连接糖基化位点,得到突变病毒株M1(第57位点突变),M2(第172位点突变),M3(第353位点突变),M4(第57+172位点突变),M5(第172+353位点突变),M6(第57+353位点突变),M7(第57+172+353位点突变);利用反向遗传技术成功获得重组突变株M1、M2、M4,而M3、M5、M6、M7经多次拯救均未成功,未拯救成功的4个突变株均包含第353位点的突变,提示正常的第353位点对病毒生长是必须的前提^[54]。同时本课题组用流式细胞术检测发现M1、M2、M4株F蛋白在被感染细

胞细胞膜上的表达水平同 WT 株比较无明显差异,提示突变株 F 蛋白的折叠、表达正确^[54]。

从病毒体外复制能力学方面,利用本课题组已成功建立的空斑形成法^[55]检测 WT 和突变株病毒感染 Vero E6 细胞后的病毒滴度,结果提示突变株和 WT 株病毒滴度均在感染后第 4 天达到顶峰,其中 M1 株和 WT 株峰值滴度水平相近,可达到 10^5 pfu/mL 水平,而 M2 和 M4 株峰值滴度只能达到 10^4 pfu/mL 水平。同时应用体外竞争复制试验分析突变株的复制能力, M1 株与 WT 等比例混合, M2、M4 株分别与 WT 株以 1:1, 10:1, 100:1, 1000:1 混合感染 Vero E6, 结果显示 M1 株与 WT 等比例混合时, M1 在感染后第 15 天从混合群体中消失。M2 株在与 WT 株 1:1 比例混合时, M2 株在感染后第 1 天在混合体中消失;以 10:1 比例混合时, M2 株在感染后第 8 天消失,继续传代 5 代仍检测不到 M2 信号;以 100:1 或 1000:1 混合时,在感染后 4 d 内仅检测到持续 M2 存在的信号。M4 株在与 WT 株 1:1 比例混合时, M4 株在感染后第 1 天在混合体中消失;以 10:1 比例混合时, M4 株在感染后第 5 天消失;以 100:1 比例混合时, M4 株在感染后第 8 天在混合体中消失;以 1000:1 比例混合时,感染后 5 d 内 M4 信号为主要信号。体外模型提示较 WT 株体外复制能力相比, M1 株轻度下降, M2、M4 株明显下降,但 M2 株强于 M4 株^[54]。

从病毒体内复制能力方面, WT 在感染 BALB/c 小鼠后 5 d 复制水平可达 10^5 pfu/g, M1 株肺内复制水平较 WT 稍低; M4 株感染小鼠后,仅少数小鼠于感染后 3 d 肺内检出病毒, M2 株则在感染后各时间点均未能检出病毒。采用 SCID 小鼠模型,结果显示 WT 和 M1 株在 SCID 小鼠肺内均能复制至高水平; M2 株和 M4 株则与在免疫功能正常小鼠肺内有所不同,维持低水平复制^[56]。本课题组也观察到 WT 株和突变株感染小鼠后,小鼠肺组织病理改变均为典型的间质性肺炎表现,但 M2 和 M4 株感染后肺组织病理评分明显低于 M1 株和 WT 株感染后,但高于正常对照组^[54]。同时本课题组研究发现 M2 不仅能诱导小鼠产生与野生型病毒几乎同一水平的中和抗体,而且在接种后 8 周能完全保护小鼠免于同型病毒感染,部分交叉保护免于异型病毒感染。

6 总结

人偏肺病毒为儿童呼吸道感染的重要常见病原,成为影响儿童期健康的重要威胁,但目前该病毒感染机制尚不完全明了,且尚无有效疫苗。本课题组发现 F 蛋白是 HMPV 主要的抗原蛋白,具有高免疫原性和保护作用,且能单独介导膜融合过程,本课题组着眼于 F 蛋白,通过体外定点突变 F 蛋白基因第 57 位,第 172 位,第 353 位及反向遗传技术开发出重组人类偏肺疫苗(专利号:201010106676),并已用动物实验证实 F 蛋白去 N 连接糖链可致 HMPV 不同程度减毒,且由于仅有 1 条糖链的差异,最大限度保存了 HMPV 的免疫原性,有效解决了减毒与免疫原性这一对减毒活疫苗制备过程中最主要的矛盾。由于 M2 株体外复制能力优于 M4 株体,因而 M2 株被确定为疫苗候选株,也是国内外唯一采用单核苷酸变异致病毒减毒的疫苗候选株。为远期开发用于临床,很有必要进行灵长类动物实验,进一步证实 M2 免疫保护效果和安全性,同时要评估 M2 株遗传稳定性,除外 F 基因第 172 位氨基酸发生回复突变恢复毒力的可能性。同时达到免疫效力和疫苗安全性这对矛盾的最佳平衡也是本疫苗研究的难点。

[参 考 文 献]

- [1] Izadnegahdar R, Cohen AL, Klugman KP, et al. Childhood pneumonia in developing countries[J]. *The Lancet*, 2013, 1(7): 574-584
- [2] Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. WHO estimates of the causes of death in children[J]. *Lancet*, 2005, 365(9465): 1147-1152.
- [3] 冯江,袁秀琴,朱军,等. 中国 2000-2010 年 5 岁以下儿童死亡率和死亡原因分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(6): 558-561.
- [4] Chen X, Zhang ZY, Zhao Y, et al. Acute lower respiratory tract infections by human metapneumovirus in children in Southwest China: a 2-year study[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2010, 45(8): 824-831.
- [5] Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus infection in immunocompromised child[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(5): 854-856.
- [6] 张琴,杨锡强,赵耀,等. 重庆地区 0-6 岁儿童人类偏肺病毒感染状况调查[J]. *中国实用儿科杂志*, 2007, 8(22): 579-582.
- [7] Ebihara T, Endo R, Kikuta H, et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan[J]. *J Med Virol*, 2003, 70(2): 281-283.
- [8] Ji W, Wang Y, Chen Z, et al. Human metapneumovirus in children with acute respiratory tract infections in Suzhou, China 2005-2006[J]. *Scand J Infect Dis*, 2009, 41(10): 735-744.
- [9] Lu G, Li J, Xie Z, et al. Human metapneumovirus associated with

- community-acquired pneumonia in children in Beijing, China[J]. *J Med Virol*, 2013, 85(1): 138-143.
- [10] Yahia S, Kandeel AY, Hammad E, et al. Human metapneumovirus (hMPV) in acute respiratory infection: a clinic-based study in Egypt[J]. *Indian J Pediatr*, 2012, 79(10): 1323-1327.
- [11] Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, et al. Human metapneumovirus infections in children[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(1): 101-106.
- [12] Williams JV, Edwards KM, Weinberg GA, et al. Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children[J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(12): 1890-1898.
- [13] Li J, Wang Z, Gonzalez R, et al. Prevalence of human metapneumovirus in adults with acute respiratory tract infection in Beijing, China[J]. *J Infect*, 2012, 64(1): 96-103.
- [14] Tu CC, Chen LK, Lee YS, et al. An outbreak of human metapneumovirus infection in hospitalized psychiatric adult patients in Taiwan[J]. *Scand J Infect Dis*, 2009, 41(5): 363-367.
- [15] 赵辛, 张兵, 段招军, 等. 2007-2011年长沙地区急性下呼吸道感染住院儿童人偏肺病毒的流行状况 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2012, 26(2): 99-101.
- [16] 金玉, 张静, 赵德育, 等. 南京地区儿童人偏肺病毒感染的流行病学及临床特征分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2011, 25(1): 11-13.
- [17] Kim HR, Cho AR, Lee MK, et al. Genotype variability and clinical features of human metapneumovirus isolated from Korean children, 2007 to 2010[J]. *J Mol Diagn*, 2012, 14(1): 61-64.
- [18] Nidaira M, Taira K, Hamabata H, et al. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2012, 65(4): 337-340.
- [19] Arabpour M, Samarbafzadeh AR, Makvandi M, et al. The highest prevalence of human metapneumovirus in Ahwaz children accompanied by acute respiratory infections[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2008, 26(2): 123-126.
- [20] Carr MJ, Waters A, Fenwick F, et al. Molecular epidemiology of human metapneumovirus in Ireland[J]. *J Med Virol*, 2008, 80(3): 510-516.
- [21] Qaisy LM, Meqdam MM, Alkhateeb A, et al. Human metapneumovirus in Jordan: prevalence and clinical symptoms in hospitalized pediatric patients and molecular virus characterization[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 74(3): 288-291.
- [22] Zhang C, Du LN, Zhang ZY, et al. Detection and genetic diversity of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infections in Southwest China[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(8): 2714-2719.
- [23] Li J, Ren L, Guo L, et al. Evolutionary dynamics analysis of human metapneumovirus subtype A2: genetic evidence for its dominant epidemic[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34544.
- [24] Peiris JS, Tang WH, Chan KH, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(6): 628-633.
- [25] Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, et al. Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate[J]. *J Virol*, 2004, 78(23): 12877-12887.
- [26] Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH[J]. *J Virol*, 2006, 80(22): 10931-10934.
- [27] Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, et al. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(5): 1566-1571.
- [28] Schowalter RM, Chang A, Robach JG, et al. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry[J]. *J Virol*, 2009, 83(3): 1511-1522.
- [29] Chang A, Hackett BA, Winter CC, et al. Potential electrostatic interactions in multiple regions affect human metapneumovirus F-mediated membrane fusion[J]. *J Virol*, 2012, 86(18): 9843-9853.
- [30] Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, et al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2[J]. *J Virol*, 2008, 82(17): 8942-8946.
- [31] Kolli D, Bao X, Liu T, et al. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits TLR4-dependent signaling in monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2011, 187(1): 47-54.
- [32] Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, et al. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity[J]. *Virology*, 2006, 345(2): 492-501.
- [33] Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, et al. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness[J]. *J Virol*, 2004, 78(13): 6927-6937.
- [34] 王宇清, 季伟, 陈正荣, 等. 人类偏肺病毒毛细支气管炎患儿细胞免疫分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(2): 145-148.
- [35] 朱宏, 缪美华, 徐俊, 等. 人类偏肺病毒感染患儿的免疫功能研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(7): 923-924.
- [36] Kolli D, Bataki EL, Spetch L, et al. T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection[J]. *J Virol*, 2008, 82(17): 8560-8569.
- [37] Bieback K, Lien E, Klagge IM, et al. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling[J]. *J Virol*, 2002, 76(17): 8729-8736.
- [38] 窦颖. 人偏肺病毒感染后 Toll 样受体的表达及功能 [D]. 重庆医科大学, 2010.
- [39] Alvarez R, Tripp RA. The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice[J]. *J Virol*, 2005, 79(10): 5971-5978.
- [40] Rudd BD, Burstein E, Duckett CS, et al. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression[J]. *J Virol*, 2005, 79(6): 3350-3357.
- [41] Rudd BD, Smit JJ, Flavell RA, et al. Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection[J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1937-1942.
- [42] Guerrero-Plata A, Baron S, Poast JS, et al. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections[J]. *J Virol*, 2005, 79(16): 10190-10199.
- [43] Herd KA, Mahalingam S, Mackay IM, et al. Cytotoxic T-lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice[J]. *J Virol*, 2006, 80(4): 2034-2044.

- [44] Yim KC, Cragin RP, Boukhalova MS, et al. Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged[J]. *Vaccine*, 2007, 25(27): 5034-5040.
- [45] Hamelin ME, Couture C, Sackett MK, et al. Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 12): 3391-3400.
- [46] Talaat KR, Karron RA, Thumar B, et al. Experimental infection of adults with recombinant wild-type human metapneumovirus[J]. *J Infect Dis*, 2013, 208(10): 1669-1678.
- [47] Falsey AR, Walsh EE. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PF2) in the institutionalized elderly[J]. *Vaccine*, 1997, 15(10): 1130-1132.
- [48] Groothuis JR, King SJ, Hogerman DA, et al. Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PF2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia[J]. *J Infect Dis*, 1998, 177(2): 467-469.
- [49] Murphy BR, Sotnikov AV, Lawrence LA, et al. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization[J]. *Vaccine*, 1990, 8(5): 497-502.
- [50] Herfst S, de Graaf M, Schrauwen EJ, et al. Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88(Pt 10): 2702-2709.
- [51] Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, et al. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine[J]. *Am J Epidemiol*, 1969, 89(4): 405-421.
- [52] Moss WJ, Polack FP. Immune responses to measles and measles vaccine: challenges for measles control[J]. *Viral Immunol*, 2001, 14(4): 297-309.
- [53] Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine[J]. *Am J Epidemiol*, 1969, 89(4): 422-434.
- [54] Zhang J, Dou Y, Wu J, et al. Effects of N-linked glycosylation of the fusion protein on replication of human metapneumovirus in vitro and in mouse lungs[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(Pt 7): 1666-1675.
- [55] 余春梅, 陈昕, 张金辉, 等. 绿色荧光标记重组人偏肺病毒空斑形成滴度测定方法的建立 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(8): 771-774.
- [56] Yu CM, Li RP, Chen X, et al. Replication and pathogenicity of attenuated human metapneumovirus F mutants in severe combined immunodeficiency mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(2): 231-236.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

“新生儿热点问题”研讨班通知 国家继续医学教育项目 (2014-06-03-034)

为进一步提高新生儿诊疗水平, 广东省继续医学教育委员会、暨南大学医学院附属东莞医院, 拟于 2014 年 8 月 20~23 日在中外知名的东莞市虎门镇举办国家级继续教育项目: “新生儿热点问题”研讨班。

将邀请全国著名新生儿学专家讲授国内外新生儿医学领域的热点问题, 如新生儿严重呼吸衰竭的体外循环膜充氧 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 治疗技术, 新生儿缺氧缺血性脑病高压氧治疗作用机制研究的最新进展和最佳治疗方案, 亚低温疗法国内多中心研究最新成果及国外五项大型多中心研究结果, 严重高未结合胆红素血症、败血症、中毒性疾病的中心静脉快速、高效、同步换血术, 能查 110 余种新生儿先天性代谢缺陷病最新筛查技术, 支气管肺发育不良 (BPD)、早产儿视网膜病 (ROP)、早产儿动脉导管未闭、新生儿肺动脉高压、坏死性小肠结肠炎等国内外研究的最新进展, 新生儿医患纠纷的原因及对策, 以及医学科研的选题、论文写作和投稿等问题。搭建一个相互交流和学习的平台, 进一步提高新生儿科的整体医疗、科研水平。参加学员每人赠送人民卫生出版社出版的我国 26 位著名围产新生儿学专家的科研成果和临床经验结集《围生儿窒息及多脏器损伤诊疗进展》一册。

招收对象: 适合各医药院校附属医院、综合性医院、儿童医院、妇幼保健院新生儿科、儿科、妇产科医师、护师参加学习, 建议各单位选派 1 名医师和 1 名护师参加。

地点: 广东省东莞市虎门镇虎门大道 154 号暨南大学医学院附属东莞医院

联系人: 暨南大学医学院附属东莞医院新生儿科

联系地址: 广东省东莞市虎门镇虎门大道 邮编: 523900

会务组: 李薇 电话: 0769-85010147; 13600281216; 电子邮箱: dr.li.wei@163.com

王德胜 电话: 0769-85010147; 13622690778; 电子邮箱: wds197606@163.com