

## 综述

# 实验室重构流感病毒的生物安全问题

贾晓娟, 黄力勤, 刘文军

中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

贾晓娟, 黄力勤, 刘文军. 实验室重构流感病毒的生物安全问题. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1736-1742.

Jia XJ, Huang LQ, Liu WJ. Biosafety issues and public concerns on recombinant influenza viruses generated in the laboratories. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1736-1742.

**摘要:** 流感病毒的跨种间传播是流感病毒研究的重要方面。部分研究者采取实验室重构流感病毒的方法, 试图发现影响流感病毒跨种间传播的重要因子, 这对揭示流感病毒跨种间传播的分子机制以及流感的防控和治疗具有重要意义, 但重构流感病毒潜在的生物安全问题令人关注。文中重点讨论了目前实验室重构流感病毒的生物安全问题, 建议从实验室防护和科研管理两方面重视并加强实验室重构流感病毒, 特别是高致病流感病毒的生物安全管理工作。

**关键词:** 重构, 流感病毒, 实验室生物安全, 风险管理

## Biosafety issues and public concerns on recombinant influenza viruses generated in the laboratories

Xiaojuan Jia, Liqin Huang, and Wenjun Liu

CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Understanding inter-species transmission of influenza viruses is an important research topic. Scientists try to identify and evaluate the functional factors determining the host range of influenza viruses by generating the recombinant viruses through reverse genetics in laboratories, which reveals the viruses' molecular mechanisms of infection and transmission in different species. Therefore, the reverse genetic method is a very important tool for further understanding the biology of influenza viruses and will provide the insight for the prevention and treatment of infections and transmission. However, these recombinant influenza viruses generated in laboratories will become the potential threat to the public health

**Received:** July 9, 2013; **Accepted:** August 16, 2013

**Supported by:** Special Fund for Health-scientific Research in the Public Interest (No. 201302006).

**Corresponding author:** Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807503; E-mail: liuwj@im.ac.cn

公益性卫生行业科研专项 (No. 201302006) 资助。

and the environment. In this paper, we discussed the biological safety issues of recombinant influenza viruses and suggested we should set up protocols for risk management on research activities related to recombinant highly pathogenic influenza viruses.

**Keywords:** recombination, influenza virus, laboratory biological safety, risk management

2012年1月20日,国际知名学术期刊 *Nature* 和 *Science* 同时发表了一份联合声明:39位流感研究者声明在60 d内暂停实验室突变H5N1禽流感病毒的研究工作。这一声明引发了科研工作者对实验室重构流感病毒潜在的生物安全问题的重视和思考。我们尊重和鼓励科学家利用重构流感病毒的方法探索其致病机理,但也应高度重视重构流感病毒潜在的生物风险<sup>[1-2]</sup>,应当对重构病毒的生物安全和防范措施进行风险评估,并权衡相关研究的科学意义和社会价值。

## 1 流感病毒简介

流感病毒是一种造成人及动物患流行性感冒的RNA病毒,在分类学上属于正黏病毒科,根据其内部核蛋白(NP)和基质蛋白(M)的抗原性不同,可分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型。其中甲型流感病毒在禽类和哺乳动物中广泛存在,也是目前引起人类和各种动物流感的主型。甲型流感病毒根据血凝素(Hemagglutinin, H)和神经氨酸酶(Neuraminidase, N)抗原不同,又分为许多亚型, H可分为15个亚型(H1~H15), N分为9个亚型(N1~N9),其中仅H1N1和H3N2主要感染人类,其他许多亚型的自然宿主是多种禽类和动物,其中对禽类危害最大的是H5、H7和H9亚型毒株。甲型流感病毒基因组有8个RNA片段构成,它们编码了14个病毒蛋白:聚合酶蛋白(PB1、PB2和PA)<sup>[3-4]</sup>、

核蛋白(NP)、血凝素蛋白(HA)、神经氨酸酶(NA)、基质蛋白(M1和M2)、非结构蛋白(NS1)、核输出蛋白(NEP),以及最近报道的PB1-F2、PB1-N40、PA-X和M42蛋白<sup>[3-6]</sup>。

流感病毒会造成急性上呼吸道感染,并借由空气迅速传播,引发世界各地周期性的大流行。每年世界范围内因季节性流感导致的死亡人数约超过5万人<sup>[7]</sup>。除季节性流感外,广泛流行的流感病毒株可以在短时间内造成全球性感染,例如,1918年的西班牙大流感,两年之内导致全球超过5000万人死亡<sup>[8]</sup>;2009年暴发的H1N1大流感感染量超过2000万人。一些流感病毒可以通过跨种间传播感染人类,最典型的是亚洲禽流感病毒H5N1和今年新发现的是H7N9。其中,H5N1虽具有极高的致死率(约占感染者的56%),但却不能在人群中有效传播,2003-2006年,全球仅有263例感染病例<sup>[9]</sup>。2013年3月底,我国出现的H7N9流感病毒是由来自东亚地区的野鸟和中国上海、浙江、江苏鸡群的流感病毒基因重组产生的<sup>[10]</sup>。截至2013年5月6日,我国内地已确诊H7N9感染病例129例,其中31人死亡。

甲型流感病毒含有的8个基因片段极易发生突变和重组,这是新型流感病毒的产生和跨种间传播的主要原因。基因突变容易造成流感病毒HA和NA蛋白抗原性变化,即抗原漂移,基因突变造成流感病毒变异的程度较小;而基因重组会使流感病毒的表面抗原发生根本转

换, 即抗原转换。基因重组会产生新型流感病毒, 这也是流感病毒跨种间传播以及导致感染不可预测和反复持续的主要原因。

## 2 流感病毒的实验室重构

为了探索流感病毒跨种间传播的分子机制以及影响流感病毒感染力和致病力的分子机理, 科学家采用反向遗传操作技术在实验室模拟自然环境中流感病毒基因重组的过程构建出新型流感病毒。他们希望借助这一研究手段揭示流感病毒跨种间感染机理和不同亚型流感病毒感染力和致病力存在巨大差异的原因。目前国内外实验室重构流感病毒的研究工作主要是对 H5 型病毒进行重构实验, 目前世界上几个实验室已经构建出了可以在哺乳动物传播的 H5 型流感病毒<sup>[11-13]</sup>, 这对于揭示 H5 型流感病毒跨种间传播的分子机制以及对流感病毒的预防和控制具有重要意义。

2011 年底, 荷兰伊拉斯姆斯大学医学中心 (Erasmus Medical Center) 的荣·费奇 (Ron Fouchier) 及其同事向 *Science* 杂志提交了一份研究论文, 文章指出他们在实验室里对禽流感病毒 H5N1 只需进行 5 次基因的人工变异, 便可以使之具有在哺乳动物雪貂间传播的易感性<sup>[11]</sup>。这 5 种变异此前已经分别在自然界中独立观察到过。无独有偶, 2012 年, 美国威斯康星大学麦迪逊分校的河冈义裕 (Yoshiro Kawaoka) 及其同事也在另一本权威科学杂志——*Nature* 发表了一篇文章, 报告了类似的研究结果<sup>[12]</sup>。2013 年 5 月, Zhang 等在 *Science* 杂志上发表了将 H5N1 型和 H1N1 型流感毒株进行基因重配的文章<sup>[13]</sup>, 其研究是通过将 H5N1 型流

感病毒与 2009 年引发大流感的 H1N1 型流感病毒进行基因重配, 包装出 127 株重构流感毒株, 研究介绍了人工重构病毒的传播能力, 并希望以此研发新型抗流感病毒疫苗。

上述研究成果对于阐明流感病毒跨种间传播的分子机制以及不同病毒感染力和致病力差异的分子机理具有重要意义, 但重构病毒潜在的风险危害也令人担忧。这些重构毒株在鉴定为无害或确定安全等级之前, 都存在着可预见或潜在的生物风险因素, 如: 某些基因毒株或基因片段带有致病基因、抗药基因等, 倘若实验者缺乏足够的安全意识使之进入到环境中, 一旦在外界环境中发生突变或与环境中的物种发生基因重组等, 便很可能造成严重的生物灾害。这一担忧在上述荣·费奇和河冈义裕两个研究小组公布研究成果后更是达到了顶峰。他们的研究引起了科学界和社会的巨大恐慌, 人们不禁思索这是否意味着可以通过实验室基因重组的方法构造出新的流感病毒? 实验重构的流感病毒如何处置? 现有的生物安全防护条件和科研管理是否可以有效防控重构流感病毒的扩散?

2012 年 2 月, 世界卫生组织在日内瓦召开了一个闭门会议, 包括荣·费奇和河冈义裕两名科研成果处于争议的科学家在内的 22 名来自科学界和出版界的专家参加了此会。会议最后决定暂停流感病毒相关研究 60 d, 以给科学家和生物安全管理者足够的时间辩论, 确定如何能在保障生物安全的前提下持续此类研究, 实验室采取哪些措施能避免重构病毒的生物危害<sup>[14]</sup>。

## 3 实验室重构流感病毒的生物安全防护

科学界和公众对实验室重构流感病毒的恐

惧和担忧主要表现为以下 5 点：1) 重构出的流感病毒是否具有更高的感染性和致病力，是否潜在生物危害？2) 重构的流感病毒是否会从实验室传播到自然环境，导致流感的大暴发？3) 从事重构流感病毒工作的科研工作者是否具有生物安全层面的职业操守和自律意识？4) 如何防止恐怖分子利用公开发表的实验数据制造出新型病毒危害社会？5) 国外研究者是否会质疑此类研究属于“生物战剂”的研制范畴，从而阻碍其他相关科研项目的顺利开展？因此，科学家和科研管理者有必要在实验室重构流感病毒项目立项前，权衡其研究的科学意义和风险危害，并确保批示项目具备完善的生物安全保障体系。目前国内外主要从实验室防护和制度管理两方面保障实验室重构流感病毒的安全防护体系<sup>[15]</sup>，本文将对此两方面提出相关建议。

### 3.1 重构流感病毒的实验室防护

#### 3.1.1 加强重组流感病毒实验活动的风险评估

建议对实验室重构流感病毒的实验活动在实验操作、重构毒株、仪器设备、管理制度等方面均进行动态的生物危害风险评估。根据我国《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院第 424 号令)、《人间传染的病原微生物名录》、《重组 DNA 实验管理条例》等相关条例、要求确定原始毒株和重组毒株的危害等级，并按规定选择在相应等级的生物安全实验室开展实验活动。对实验室重构流感病毒的实验活动进行生物危害风险评估主要基于以下 3 个原因：

1) 流感病毒中有些毒株属于高致病性病原微生物，例如：H5N1 禽流感病毒属于甲型流感病毒的一个高致病型亚型，按照《人间传染的病原微生物名录》划分，属于危害等级为二类

的病原微生物，具有跨种间传播特性，可导致人和动物患病，且有很高的致死率，因此其相关重组实验均具有一定的生物风险；2) 流感病毒是一种经空气传播感染呼吸道的病毒，在实验操作中病毒极易扩散到空气中，存在潜在重构流感病毒向自然环境扩散甚至感染人类的生物风险；3) 重构流感病毒可能产生新型耐药株和强毒株<sup>[16]</sup>，而目前缺少对重组毒株防控和感染治疗的有效手段，比如：现有人用 H5N1 禽流感疫苗不能保证对所有实验操作人员均具有很好的免疫保护效果，且对重组毒株的免疫效果未知。

#### 3.1.2 加强实验室重组流感病毒的等级防护

实验室重构流感病毒的出发毒株常为从感染病例中分离得到的野生型毒株，基于野生型流感病毒与重构后病毒的差异以及对重构病毒感染性和致病力的未知，建议在生物安全三级以上实验室中从事流感病毒的重构实验。生物安全四级实验室的实验室结构、设备设施、安全操作规程等安全体系适用于对人体具有高度危险性、通过气溶胶途径传播或传播途径不明、目前尚无有效的疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。比如：重构 H5N1 流感病毒具有人与人之间传播的可能性，结合 H5N1 的高致死率，一旦发生病毒泄露，会造成大量的人员死亡，而生物安全四级实验室相比三级实验室有着更安全的防护设施<sup>[17-18]</sup>，如：实验人员需要穿戴正压服，同时需要进行更严格的消毒灭菌等，这些设施最大程度地保证了对重构病毒的安全防护，但仅有设备和系统上的防护对于保障整个实验活动的安全体系也是远远不够的。2004 年下半年台湾和新加坡先后发生急性呼吸

系统综合征 (SARS) 实验室感染事件<sup>[19]</sup>；据美国国家研究委员会统计，2003–2009 年，美国的生物安全实验室共发生过 395 起生物安全事故，其中 7 起事故源于实验室改造生物的泄露。因此，我们建议在加强实验室重构流感病毒的防护工作时，也应注意提高相关科研工作者生物安全层面的防范意识和自律意识<sup>[20-23]</sup>。

当然，可能目前我们对实验室重构流感病毒的恐惧是多余的，这种过分担忧在历史上也曾发生，如 1979 年，单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因克隆实验要求必须在生物安全四级实验室中进行，因为当时认为这一实验具有很高的潜在生物危害，现在我们明白这一危险是不存在的<sup>[24]</sup>，同样的实验现在生物安全一级实验室就可以进行。所以，未来我们可能获得预防和治疗流感更有效的方法，重构流感病毒实验也无需在高等级的生物安全实验室中进行，但基于目前研究的未知现状，我们还是应当从意识和行动上加强对流感病毒重构实验的生物安全防护。

### 3.2 实验室重构流感病毒的生物安全管理防护

实验室重构流感病毒研究结果的公开发表具有被恐怖分子参考利用制造生物恐怖事件的潜在风险。因此，国际社会有必要制定出一套行之有效的管理和防范措施健全实验室重构病毒的生物安全管理体系。

早在 1992 年，我国作为第一批缔约方签署了联合国《生物多样性公约》，在此框架下，于 2000 年通过了《卡塔特生物安全议定书》，表明要与世界各国共同致力于国际生物安全的管理工作<sup>[25]</sup>。之后，为了加强病原微生物生物安全

领域的学术和技术交流，保障安全有效地从事病原微生物相关的基础和应用研究，各个国家相继成立了生物安全委员会，并积极举办和参与国际性、区域性生物安全协会的交流互动。我国也于 1979 年和 2012 年分别成立了中国微生物学会病毒学专业委员会和微生物生物安全专业委员会，这标志着我国病原微生物生物安全工作进入了一个崭新阶段。目前我国已制定和颁布了《中华人民共和国传染病防治法》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《基因工程安全管理办法》等相关法律法规，对实验室生物安全的防护和管理提出了要求，但这些法律法规的实施和可操作性有待进一步加强。《基因工程安全管理办法》于 1993 年 12 月发布实施，至今已近 20 年。此间，生物技术飞速发展，其涉及的基因工程范围、深度及生物安全问题发生了明显改变，人们对生物安全的认识亦在不断加深，随着重组基因技术的日趋发展和完善，重组病毒带来的生物安全问题可能越来越多、越来越复杂，这就需要建立和健全一套行之有效的生物安全管理和监督制约制度，而目前我国基因重组相关的法律法规缺少可操作性，其中所提出的生物安全风险评估、项目申报和审批等重要内容，尚未具体落实，这就亟需政府和社会各阶层统一行动，尽快修订和完善《基因工程管理办法》等相关法律法规，落实和加强实验室生物安全管理。本文从建立和健全相关法律法规、基因工程项目审批、生物安全组织管理模式、提高科研人员和公众生物安全意识 4 方面提出建议。

1) 建议成立或组织专门机构负责基因工程生物制品的研究和生产中生物安全有关规定、

实施细则的制定、完善和及时更新；建议加强法律和公约约束，要求从事实验室重组病毒研究的科研工作者履行相应的生物安全国际公约，并在开展实验前签署相关协议并发表生物安全声明。

2) 建议设立组织机构对实验室重构病毒研究项目进行立项前的生物安全审查、审批，要求涉及基因重组的科研课题必须在项目准入前尽可能全面地提供生物风险评估报告、实验标准操作规程、应急预案及防控措施等，并由该组织机构进行初评。

3) 建议加强科教文卫农等相关部门生物安全管理的沟通与合作，避免“管理断层”，同时整合社会各阶层生物安全管理的优势资源，将流感研究的生物安全监督和管理工作建成体系；将此工作渗入到流感防控的各项工作中，并使其制度化、常态化和长效化。

4) 建议充分发挥相关学会、专业委员会的民间团体作用，联合政府、社会各机构做好科普宣传工作，警示和提高流感科研工作者生物安全层面的伦理道德、职业操守和自律意识，提高公众对“两用性”科研成果的敏感性和主动监督意识。

## 4 总结与展望

实验室重构流感病毒是把“双刃剑”，一方面对于揭示流感病毒跨种间传播的分子机制、阐明不同毒株具有不同感染力和致病力的分子机理以及研发新型抗流感药物具有重要意义；另一方面却存在着重构出强毒株、耐药株以及病毒泄露引发新型流感大流行的生物风险。如何评价实验室重构流感病毒研究的科学价值和社会价值是值得广大科研工作者深思的课题。

生物安全相关政策、管理制度的健全和完善最终体现为科研工作者的操作规范，因此，从事流感研究的科研人员应当明确科研目的和社会责任，将生物安全意识贯穿于整个流感病毒研究工作的始终，充分体现科学家的价值观和使命感，尽可能规避风险，体现重构流感病毒科学研究的社会意义。

## REFERENCES

- [1] Berns KI, Casadevall A, Cohen ML, et al. Policy: adaptations of avian flu virus are a cause for concern. *Nature*, 2012, 482(7384): 153–154.
- [2] Berns KI, Casadevall A, Cohenn ML, et al. Public health and biosecurity. Adaptations of avian flu virus are a cause for concern. *Science*, 2012, 335(6069): 660–661.
- [3] Wise HM, Foeglein A, Sun J, et al. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 2009, 83(16): 8021–8031.
- [4] Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 2001, 7(12): 1306–1312.
- [5] Jagger BW, Wise HM, Kash JC, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 2012. 337(6091): 199–204.
- [6] Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11): e1002998.
- [7] Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*, 2003, 289(2): 179–186.
- [8] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and

- pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 2009, 459(7249): 931–939.
- [9] Graham-Rowe D. Epidemiology: racing against the flu. *Nature*, 2011, 480(7376): S2–3.
- [10] Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1926–1932.
- [11] Cohen J. Avian influenza. The limits of avian flu studies in ferrets. *Science*, 2012, 335(6068): 512–513.
- [12] Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 2012, 486(7403): 420–428.
- [13] Zhang Y, Zhang Q, Kong H, et al. H5N1 hybrid viruses bearing 2009/H1N1 virus genes transmit in guinea pig by respiratory droplet. *Science*, 2013, 340(6139): 1459–1463.
- [14] Fouchier RA, Garcia-Sastre A, Kawaoka Y, et al. Pause on avian flu transmission research. *Science*, 2012, 335(6067): 400–401.
- [15] Butler D. Fears grow over lab-bred flu. *Nature*, 2011, 480(7378): 421–422.
- [16] Imperiale MJ, Hanna MG. Biosafety considerations of mammalian-transmissible H5N1 influenza. *MBio*, 2012, 3(2): e00043–12.
- [17] General biosafety standard for microbiology and biomedical laboratories. ws233-2002 (in Chinese). 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则 WS-233-2002.
- [18] Laboratory—General requirements for biosafety. GB19489-2008 (in Chinese). 实验室生物安全通用要求. GB19489-2008.
- [19] Eornile D. Infectious diseases. Mounting lab accidents raise SARS fears. *Science*, 2004, 304(5671): 659–661.
- [20] Li WY, Li H, Kuang Y, et al. Construction of biological safety guarantee system of pathogenic micro-organism laboratory. *Exper Sci Technol* 2013, 11(1): 156–158 (in Chinese). 李婉宜, 李华, 邝玉, 等. 病原生物实验室生物安全保障体系的建设和思考. *实验科学与技术*, 2013, 11(1): 156–158.
- [21] Wei M, Kong LH, Li P, et al. Safety and hygienic protection in animal experiment teaching. *J Prev Med Inf*, 2013, 29(5): 431–433 (in Chinese). 魏明, 孔令恒, 李萍, 等. 动物实验教学的卫生安全防护. *预防医学情报杂志*, 2013, 29(5): 431–433.
- [22] Hao ZH, Zhao HD. An approach to biosafety containment of animal laboratory. *Lab Ani Sci*, 2010, 27(4): 62–64 (in Chinese). 郝智慧, 赵厚德. 动物实验的生物安全防护初探. *实验动物科学*, 2010, 27(4): 62–64.
- [23] Li H, Zhang RY, Zhao RZ, et al. Investigation of the awareness in laboratory biosafety among teachers and students of medical colleges in Jiangsu province. *Chin J Dis Control Prev*, 2010, 14(5): 447–450 (in Chinese). 厉洪, 张汝阳, 赵人争, 等. 江苏省医学院校师生实验室生物安全知识认知情况现状调查. *中华疾病控制杂志*, 2010, 14(5): 447–450.
- [24] Enquist LW, Vande Woude GF, Wagner M, et al. Construction and characterization of a recombinant plasmid encoding the gene for the thymidine kinase of herpes simplex type 1 virus. *Gene*, 1979, 7(3/4): 335–342.
- [25] Sang WG, Ma KP, Wei W. Management mechanism of biotechnology safety in China and abroad. *Biodiv Sci*, 2000, 8(4): 413–421 (in Chinese). 桑卫国, 马克平, 魏伟. 国内外生物技术安全管理机制. *生物多样性*, 2000, 8(4): 413–421.

(本文责编 陈宏宇)