

狂犬病病毒糖蛋白的抗原性和致病性功能研究进展

何健^{1,2}, 张海林²

1 大理学院公共卫生学院, 云南 大理 671000; 2 云南省地方病防治所/云南省病毒立克次体研究中心, 云南 大理 671000

摘要: 狂犬病病毒糖蛋白(GP)的抗原性和致病性研究有助于阐明病毒的免疫应答特点和致病机制, 从而为狂犬病的有效防治提供科学依据。GP的抗原性不仅用于各种单克隆抗体、基因工程抗体以及新型疫苗的研究, 还可辅助病毒感染的早期诊断和暴露后的早期治疗; 而病毒的致病性与GP的表达水平及诱导细胞凋亡的能力有紧密联系。因此, GP的抗原性和致病性已逐渐成为人们的研究热点。该文就狂犬病病毒GP的抗原性和致病性最新研究进展予以综述。

关键词: 狂犬病病毒; 糖蛋白; 抗原性; 致病性; 狂犬病疫苗

中图分类号: R512.99 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)02-0178-05

Progress in functional research on antigenicity and pathogenicity of Rabies virus glycoprotein

HE Jian^{1,2}, ZHANG Hai-lin²

1 Institute of Public Health, the Dali College, Dali 671000, Yunnan Province, China; 2 Yunan Institute of Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, Yunnan Province, China

Corresponding author: ZHANG Hai-lin, Email: zhangHL715@163.com

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30560142)

Abstract: The study on the antigenicity and pathogenicity of rabies virus (RV) glycoprotein (RVG) is helpful for clarifying the characteristics of immune response to RV and the pathogenesis of rabies, thus providing a scientific basis for effective prevention and treatment of rabies. The antigenicity of RVG is not only utilized in the research on various monoclonal antibodies, genetic engineering antibodies, and new rabies vaccine, but also aids in early diagnosis of RV infection and early treatment after RV exposure. On the other hand, the pathogenicity of RVG is closely related to the expression level of RVG and its ability to induce cell apoptosis. Consequently, the antigenicity and pathogenicity of RVG have gradually become major foci of research. The purpose of this paper is to review the recent progress in the research on the antigenicity and pathogenicity of RVG.

Key words: Rabies virus; Glycoprotein; Antigenicity; Pathogenicity; Rabies vaccine

狂犬病病毒(Rabies virus, RV)糖蛋白(glycoprotein, GP)是一种跨膜糖蛋白, 以同源三聚体的形式构成病毒包膜表面的棘突。它不仅是狂犬病病毒5个结构蛋白中, 唯一能刺激机体产生中和抗体的有效保护性抗原, 而且与狂犬病病毒的毒力及致病性有关。随着基因工程技术的快速发展, 针对RV-GP所研发的各种单克隆抗体(McAb)及新型疫苗广泛应用于狂犬病的预防和治疗。

1 GP的抗原性

GP基因全长 1675 bp, 其开放阅读框架(ORF)全长 1575 bp, 位于全基因 3318~4892 位核苷酸, 编码 524 个氨基酸。GP 是狂犬病病毒 5 种结构蛋白中唯一能刺激机体产生中和抗体的保护性抗原。McAb 中和实验证明^[1], GP 上至少存在 3 个中和抗体结合位点: G I、G II 和 G III。G I 是只含有一个抗原表位的独立位点; G II 位点比较保守, 由第 34~42 位和第 198~200 位氨

基酸残基通过二硫键连接形成; G III 位点是连续的, 大致位于 330~357 位氨基酸区段, 为最主要的抗原区。最近有研究发现结合 RV-GP 氨基酸 218~240^[2]和 261~264^[3]的 McAb 也可以中和 RV。GP 抗原性改变通常是因为 G II 位点上的 34~42、147、184 和 198~200 位氨基酸及 G III 330~340 氨基酸位点的变化所致, 其中与抗原性关系最大的是第 333、336、339 和 357 位氨基酸残基^[4]。分布在 GP 膜外区的主要抗原表位, 分别位于第 34~42、198~200、333~338 和 342~343 位氨基酸 4 个区域。王水明等^[5]在国内首次利用 PCR 法将上述 RV-GP 主要抗原位点串联起来, 并成功地在大肠埃希菌中表达。经蛋白质印迹法(Western blot)验证纯化后的蛋白可与 RV 标准阳性血清产生特异性反应。该抗原位点的串联表达为建立检测动物血清样品中和抗体水平的 ELISA 方法奠定了基础。

近年来, 关于 GP 线性抗原表位的研究越来越引起人们的重视。G5 是 GP 上一个保守的线性中和表位, 针对 G5 而制备的独特型 McAb AR16, 在抗 RV 方面显示出极大的应用潜质。Cai 等^[3]根据 McAb 实验证实: 线性抗原表位 G5 内的最小结合区域为 H D F R (H 组氨酸, D 天冬氨酸, F 苯丙氨酸, R 精氨酸)

基金项目: 国家自然科学基金(30560142)

作者简介: 何健(1984-), 男, 在读硕士, 从事狂犬病病毒研究。

通讯作者: 张海林, Email: zhangHL715@163.com

(residues 261-264),其中关键性残基是HDF(H组氨酸,D天冬氨酸,F苯丙氨酸)(residues 261-263)。并且,关键性残基HDF在基因1型狂犬病毒中是高度保守的,但在基因2型的狂犬病毒中并不保守。利用计算机辅助对接和交互模型技术不仅确认了AR16中与G5相结合的关键性残基分别是Asp30、Asp31、Tyr32、Trp53、Asn54、Glu99、Ile101、Trp166,而且还发现,范德瓦尔斯力对抗体与抗原表位的特异性结合起到一定的调节作用。8个关键氨基酸中的7个(Asp30、Asp31、Tyr32、Trp53、Asn54、Glu99、Ile101)位于AR16重链的可变区。包括AR16和CR57的独特型McAb混合物具有识别非重叠、非竞争性抗原表位以及中和各种类型RV的应用潜力。

另外,Bassi等^[6]将兽用疫苗弱毒株ERA株的线性抗原表位(residues 179-281)命名为rGERA179-281,并将其克隆到大肠埃希菌中进行表达。表达纯化后的目的蛋白显示与现在用于治疗人狂犬病的免疫球蛋白(human rabies immune globulin, HRIG)发生强烈的免疫反应,并被免疫印迹分析所证实。另外,体外竞争性中和实验表明:rGERA179-281会导致HRIG中和RV的能力显著降低。这些实验结果,鼓励人们进一步研究rGERA179-281的免疫学特性,比如诱导产生针对RV的中和抗体的能力和针对GP的McAb的制备。这两者的结合,或许对研发新的诊断方法起到重要作用。

RV-GP上的微小变化甚至一个氨基酸的改变即有可能影响病毒的抗原性。Wang等^[7]实验发现:当实验室固定毒株CVS-11的糖蛋白336位点的天冬酰胺N变为天冬氨酸D和346位点变为赖氨酸K,就会导致变异后的毒株CVS-11无法被McAb(RAB1)中和。而仅仅在糖蛋白336位点的天冬酰胺N变为天冬氨酸D的另一株实验室固定毒株(ERA)却不能抵抗RAB1的中和。目前的研究表明,RAB1具备中和所有已鉴定的RV分离株的能力。但是,要想使RV毒株具备抵抗RAB1的中和效应,必须确保该毒株GP上至少有2个关键性氨基酸残基发生变异。

单链抗体可变区基因片段(the single-chain Fv fragment, scFv),是一种根据完整抗体重链和轻链的可变区而设计的一种小型抗原结合蛋白。这种新颖的抗体模式极有可能取代目前应用于检测及中和RV的免疫球蛋白(RIG)。这些构建的单链抗体片段(scFvs)不仅能够针对RV的感染提供足够的有效保护,而且在狂犬病暴露后的预防治疗方面也具有广阔的应用前景^[8]。Gu等^[9]构建了一种相当于McAb效应的scFv,命名为FV57。实验证明,单链抗体片段FV57,能够特异性地与重组抗原片段RVG179(氨基酸残基179~281)、RVG224(氨基酸残基224~236)结合。竞争性ELISA实验表明,RVG179和RVG224能够与完整的GP抗原竞争性结合FV57。除了抗原表位226~231能够与McAb-CR57结合以外,在224~236以内未发现新的抗原表位,scFv识别的抗原表位与它的完整抗体CR57所识别的完全一致。这也说明单链抗体片段FV57的轻链和重链的互补决定区像它的完整抗体CR57一样,能够折叠成正确的空间结构。

2 GP与病毒致病性的关系

2.1 GP的结构对RV毒力及致病性的影响 GP 333位点的精

氨酸或者赖氨酸被认为是RV毒力所必须的。这一关键位点的氨基酸置换会导致致病性减弱的表型表达甚至是无毒力表型的表达。迄今为止,GP 333位点的变异仅在RV的固定毒株中被发现。然而,Sato等^[10]实验发现,分离自巴西非吸血蝙蝠的RV街毒株的333位点分别发生了组氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺的替换,这些变异毒株通过大脑途径感染成年小鼠,显示出较强的致病性和杀伤力,并被免疫荧光法证实RV感染呈阳性。表明在野生动物中,也存在着333位点氨基酸变异的RV街毒株,并且这些毒株依然保持着较强的毒力与致病性,甚至还会导致RV的感染循环。

此外,RV-GP 242、255和268三个位点氨基酸的置换对RV感染的传播效率会产生重要影响,从而间接影响着毒株的致病性。Takayama-Ito等^[11]报道,RV Nishigahara株通过大脑接种可以导致成年小鼠发病死亡,并且当另一毒株R(G 242/255/268)中GP 242、255和268位点的氨基酸分别被来自Nishigahara株对应位点的氨基酸所取代时,也能导致成年小鼠死亡。表明GP 3个位点的氨基酸对Nishigahara株的致病性起着重要作用。为了阐明这3个位点氨基酸影响病毒致病性的机制,Ito等^[12]又通过实验分别比较来自Nishigahara变异的弱毒株RC-HL和致病性毒株R(G 242/255/268)的病毒感染传播能力和诱导细胞凋亡的能力。结果发现RC-HL毒株在小鼠大脑内的感染传播效率低于毒株R(G 242/255/268)。但无论是体内还是体外实验,这2株病毒诱导细胞凋亡的能力几乎是一致的。这些实验结果表明GP242、255和268三个位点氨基酸的置换直接影响着RV在细胞之间的传播效率,但几乎不影响诱导细胞凋亡的能力。最终导致分别感染毒株RC-HL、R(G 242/255/268)的小鼠神经细胞呈现明显不同的分布状态,而这种不同的细胞分布状态也直观地反映出二者在致病性方面的差异。

2.2 GP基因和基质蛋白(M)基因的联合作用对致病性的影响 GP和M基因联合作用可调节病毒的复制和促进病毒在细胞之间的传播,最终影响RV的致病性。Pulmanousahakul等^[13]用致病性毒株SB株的GP基因取代弱毒株SN株的GP基因,再用后者感染小鼠。结果发现,含有来自强毒株SB株GP基因的重组病毒SN株在致病性方面有显著增强。并且,当弱毒株SN株的GP和M基因同时被强毒株SB株对应的GP和M基因所取代,会导致重组SN株的致病性更进一步增强。有趣的是,SN株的GP基因或M基因甚至这2种基因都被强毒株SB株的相应基因所取代,病毒的复制和RNA合成能力都会显著下降。另外,这种包含来自SB株的GP和M基因的嵌合病毒SN株比仅含有来自SB株GP基因的嵌合病毒,在细胞之间的播散能力方面显示出更高的效率。

2.3 GP基因表达水平及诱导细胞凋亡能力与RV致病性的关系 文献报道^[14],RV诱导细胞凋亡的能力与GP的表达水平有关,但与致病性呈反比关系。Sarmento等^[15]利用GP基因被取代的重组RV通过大脑途径感染小鼠。实验发现,表达来自弱毒株GP的重组RV比表达来自野生型或致病性RV-GP的重组RV,显示出更高水平的GP表达和更强的诱导细胞凋亡能力。此实验说明,GP基因决定GP的表达水平和诱导细胞凋亡的能力。与之对应地,表达来自野生型或致病性GP的重组病毒比表达来自弱病毒GP的重组病毒有更强的致病性。这也证实

RV的致病性与诱导细胞凋亡的能力呈反比关系。为了阐明诱导细胞凋亡减弱病毒致病性的具体机制,分别用野生型RV和弱毒株RV通过肌肉注射的途径感染小鼠。结果发现,低剂量的弱毒株RV能够在脊髓内诱导细胞凋亡,从而阻止病毒向大脑播散及神经性疾病的发生。另一方面,用同样剂量的野生型RV感染小鼠,不仅未发现小鼠脊髓内有细胞凋亡,病毒反而扩散到大脑的各个部分并引发致命性的神经性疾病。这些实验结果表明,GP诱导细胞凋亡的能力极大地限制了RV在中枢神经系统(CNS)内的传播,从而削弱了RV的神经侵袭力。

2.4 两组GP基因重组RV毒株的生物学特性和致病性 为了研究表达两组GP基因的重组RV毒株Flury LEP (low egg passage)的生物学特性和致病性,翟洪月等^[16]利用反向遗传学技术,在磷蛋白(P)和M基因之间额外插入一个GP基因,构建出表达两组GP基因的重组病毒株(rLEP-PGM)。在体外,rLEP-PGM株的生长特性类似于LEP株。利用蛋白质印迹技术分析GP的表达水平显示,重组病毒株rLEP-PGM的GP表达量大约是LEP株的1.5倍。rLEP-PGM株和LEP株通过大脑途径感染小鼠的半数致死剂量(LD₅₀)分别是3 FFU和1 FFU。然而,经肌肉注射途径,毒株rLEP-PGM和LEP株的LD₅₀分别是 4.0×10^4 lg FFU和 3.2×10^5 lg FFU。以上实验数据表明,在P和M基因之间额外插入一个GP基因,能显著提高GP的表达水平和病毒从外周组织侵入宿主CNS的能力。

以往不同毒株之间的比较表明,在感染RV的细胞中,RV的致病性与GP的表达量呈反比关系。为了进一步揭示二者之间的关系,Wirblich和Schnell^[17]通过实验仅改变GP的表达水平而不改变GP的序列,从而避免了因为GP氨基酸的改变而引起病毒致病性的变化。其构建了一个高致病性的RV毒株CVS-N2c,并且用人工合成的GP基因取代了毒株CVS-N2c的GP基因,在这种人工合成的基因片段中引入同义突变:使用频率较高的同义密码子来取代野生型GP基因的密码子。在鼠类的神经节细胞中,重新获得了包含最优密码子的完整GP基因的重组病毒变体N2c和3种携带部分GP基因的病毒变体。并且重组病毒变体N2c的GP表达量是野生型N2c的2~3倍,而后3种只含有部分GP基因病毒变体的GP表达量是野生型N2c的1/3~1/2。对鼠的致病性研究表明,WT-N2c株是致病性最强的毒株。尽管重组病毒变体N2c和3种携带部分GP基因的病毒变体没有WT-N2c株的致病性强,但依然能导致较高死亡率。这项实验证明,GP基因的表达水平确实对病毒的致病性有一定的影响,但并不是决定RV致病性的优势因子。因此,想通过改变密码子的方式达到改变GP基因表达水平的策略并不足以使致病性的RV株变为非致病性。也即,这种策略并不是一个减弱毒株致病性的可行而又安全的理想方法。

3 GP在狂犬病防治中的应用

3.1 用转基因植物研发新型狂犬病疫苗 近年来,利用转基因植物研发新型狂犬病疫苗成为热点。Ashraf等^[18]运用基因工程技术把RV-GP基因融入到转基因烟草中,从而实现GP基因在转基因烟草中的高水平表达。与灭活的商业狂犬病疫苗相比,用这种从烟叶微粒体中提纯出的GP免疫小鼠,能够引起高水平的免疫反应,从而保护小鼠免受RV的攻击,说明从转基因烟

草中提取的GP能够诱导宿主产生完整的保护性免疫。实验结果表明,转基因植物能够为RV-GP的高效表达,提供一个安全、有效的生产系统。此外,RV-GP还能够在胡萝卜素中以完整的形式高效表达。Rojas-Anaya等^[19]将GP基因克隆到pUCpSSrabG表达载体,并利用粒子轰击的方法使胡萝卜素胚胎细胞发生转变,然后从液体培养基里筛选出所需要的胡萝卜素细胞,该法以往未见报道。目的转基因已经被PCR和RT-PCR证实存在,并且利用蛋白质印迹技术,在93.3%的成熟胡萝卜根中鉴定出GP转基因。运用密度计分析法,GP还可以量化,范围在0.4%~1.2%之间。这种转基因所表达的GP在小鼠体内显示出良好的抗原性。这项实验证明,胡萝卜素完全能够作为GP表达的理想生产体系。

最近,有学者用新城鸡瘟病毒(鸟类的一种副黏液病毒, Newcastle disease virus, NDV)作为表达载体研发新型狂犬病疫苗。Ge等^[20]构建了一种无毒性的表达RV-GP的重组新城鸡瘟病毒毒株(NDV La Sota),并评估它作为狂犬病疫苗的应用潜质。重组病毒体rL-RVG在鸡蛋中依然保留了它高水平增长的属性。RV-GP的表达能够使毒株rL-RVG以类似于RV的方式在细胞之间传播,并且GP被合并到重组病毒体rL-RVG的表面。rL-RVG和La Sota NDV不仅对NDV的中和抗体显示出相似的敏感性,而且对RV的中和抗体,也体现出相似的抵抗水平。动物实验研究证实,rL-RVG在几种物种中的应用都有很高的安全性,其中包括猫和犬。通过肌肉注射接种疫苗rL-RVG,能够诱导大量的RV中和抗体反应,并且针对RV的流行株提供完全性免疫保护。最重要的是,rL-RVG能够在猫和犬的体内诱导产生强烈而又持久的针对RV的中和抗体反应。注射低剂量的这种疫苗能够为犬提供至少1年的免疫保护。国内研究表明,利用NDV作为表达载体的新型疫苗能够针对RV诱导产生持久而又系统的保护性免疫。

3.2 双倍GP的RV变体口服活疫苗 口服活疫苗所产生的免疫效应是消灭陆栖动物狂犬病最实用的方法。Faber等^[21]构建出表达双倍GP的RV变体(SPBNGAS-GAS),这种变体作为减毒活疫苗具有广阔的应用前景。啮齿动物和几种目标物种经口服(SPBNGAS-GAS)会诱导产生保护性免疫,并且免疫效果要优于表达单倍GP的RV变体(SPBNGAS)。SPBNGAS-GAS高水平的免疫功效很可能是因为它提高了感染单核细胞和未成熟树突状细胞(DCs)的能力,并促使它们向成熟的树突状细胞转换。而且,表达双倍GP的RV变体感染DCs会导致与信号传输相关的基因表达的显著上调,其中包括IFN- α 和IFN- β ,而这些上调基因的表达产物很可能是这种疫苗产生保护效应的基础。由于所有RNA病毒都存在高突变的特性,因此,这种口服活疫苗有可能返祖成为致病性表型。针对这一潜在的危险性,非致病性的第2个GP基因的存在能够极大地降低这种疫苗返祖为致病性表型的风险,因为在决定表达双倍GP的RV变体的致病性上,非致病性的GP比致病性的GP占绝对优势。由于它极好的免疫功效和安全性,能大范围地给哺乳类动物接种疫苗。因此,表达双倍GP的新型口服疫苗SPBNGAS-GAS比其他活的RV疫苗具有无法比拟的优势。

3.3 3倍GP的变异型RV对小鼠进行暴露后治疗 Li等^[22]利用表达3倍GP的变异型RV(TriGAS),对感染野生型RV的小鼠

进行暴露后治疗。结果发现,这种治疗方法可以提高存活率。成功的暴露后治疗应该是与诱导产生强烈的中和抗体反应及促进RV从大脑组织的清除有关。实验过程中还发现,在接受TriGAS治疗的小鼠脑内,有许多宿主基因被激活,并且大部分活化基因在适应性免疫应答中发挥了作用:其中包括对T淋巴细胞激活、分化的调节,以及淋巴细胞和单核细胞增殖的调节。特别有3个活化基因,分别编码趋化因子配体3(Ccl3),自然杀伤细胞激活剂2(interleukin 12B (IL-12B))也就是白介素12B和粒酶A(GzmA)。相比于接受模拟治疗的小鼠,它们在受到TriGAS治疗的小鼠大脑内被更早更大程度地激活。这些基因的激活,不仅对淋巴细胞和单核细胞的增殖起着关键性作用,也极有可能是TriGAS调节它的疗效所依赖的机制重要组成部分。

3.4 抗RV-GP小分子McAb的应用 随着基因工程抗体技术的进展,各种抗RV-GP小分子McAb库构建成功,并由此筛选制备Fab抗体、单链抗体等^[23]。小分子抗体组织渗透能力强,可以率先到达局部组织,还可以和其他蛋白融合表达制备双功能抗体,如抗RV-GP单链抗体和碱性磷酸酶融合表达用于RV的快速检测。然而,小分子抗体的抗原结合能力不及完整McAb,并且相对分子质量越小在体内代谢清除速率越快。因此,只有克服以上技术难题,小分子抗体才能更好地应用于狂犬病的预防和治疗。在RV接触后预防或狂犬病暴露后的早期治疗过程中,联合使用完整抗体和小分子抗体能否起到快速且持久的免疫效果,仍值得尝试和研究。运用基因突变技术提前预测可能发生变异的抗原位点,制备相应分子模式的McAb可防患于未然^[24]。

此外,陈晶等^[25]运用反向遗传操作技术将RV HEP-Flury株的GP基因由基因组的第4位重排至第2位,拯救重组病毒。本研究表明RV的GP基因重排对病毒的功能有极大影响,基因重排使GP基因离启动子更近,重组病毒与亲代病毒相比,其GP表达量增高,病毒毒力减弱,免疫原性提高。因此,为筛选新型狂犬病疫苗提供了一个较好的后备疫苗株。另外,DNA重组疫苗也有较好的发展前景^[26]。

4 结语与展望

针对RV-GP的深入研究,不仅有利于阐明RV感染、播散特征、致病机制、毒力变异和免疫特点,而且对新型疫苗的研发也具有很好的指导意义。近年来,随着基因工程技术的快速发展,导致了RV疫苗产生新的革命。目前正在广泛研究并得到初步应用的转基因疫苗和口服活疫苗,与传统疫苗相比,具有生产简便、成本低、表达的抗原有良好的免疫原性、免疫应答持久全面、可同时诱导细胞免疫和体液免疫、易于联合免疫等众多优点。因此,转基因疫苗和口服活疫苗将对人类更好地控制和预防狂犬病产生深远的影响。

参考文献

[1] 徐兰,郭增柱,张永振,等. 狂犬病毒糖蛋白研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志,2006,22(9):876-879.
 [2] Marrisen WE, Kramer RA, Rice A, et al. Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping escape mutant analysis [J]. *J Virol*, 2005, 79 (8) : 4672-4678.

[3] Cai K, Feng JN, Wang Q, et al. Fine mapping and interaction analysis of a linear Rabies virus neutralizing epitope [J]. *Microbes Infect*, 2010, 12(12-13):948-955.
 [4] 唐青, Lillian AO, Charles ER, 等. 我国4株狂犬病毒糖蛋白基因序列分析和位点比较[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(1):22-33.
 [5] 王水明, 艾峰, 刘学辉. 狂犬病病毒糖蛋白基因中和抗原表位在大肠杆菌中的串联表达[J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(11):32-33.
 [6] Bassi EJ, Vernal J, Zanluca C, et al. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179-281) of the G protein from Rabies virus ERA strain [J]. *Protein Expr Purif*, 2008, 59(2):309-313.
 [7] Wang Y, Rowley KJ, Booth BJ, et al. G glycoprotein amino acid residues required for human monoclonal antibody RAB1 neutralization are conserved in Rabies virus street isolates [J]. *Antiviral Res*, 2011, 91(2):187-194.
 [8] Duan Y, Gu TJ, Jiang CL, et al. A novel disulfide-stabilized single-chain variable antibody fragment against Rabies virus G protein with enhanced in vivo neutralizing potency [J]. *Mol Immunol*, 2012, 51(2):188-196.
 [9] Gu TJ, Wei W, Duan Y, et al. Identification of binding epitope for anti-rabies virus glycoprotein single-chain Fv fragment FV57 [J]. *Protein Pept Lett*, 2011, 18(11):1099-1106.
 [10] Sato G, Kobayashi Y, Motizuki N, et al. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of Rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil [J]. *Virus Genes*, 2009, 38(1):74-79.
 [11] Takayama-Ito M, Ito N, Yamada K, et al. Multiple amino acids in the glycoprotein of Rabies virus are responsible for pathogenicity in adult mice [J]. *Virus Res*, 2006, 115(2):169-175.
 [12] Ito Y, Ito N, Saito S, et al. Amino acid substitutions at positions 242, 255 and 268 in Rabies virus glycoprotein affect spread of viral infection [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(2):89-97.
 [13] Pulmanasahakul R, Li J, Schnell MJ, et al. The glycoprotein and the matrix protein of Rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread [J]. *J Virol*, 2008, 82(5):2330-2338.
 [14] Morimoto K, Hooper DC, Spitsin S, et al. Pathogenicity of different Rabies virus variants inversely correlates with apoptosis and Rabies virus glycoprotein expression in infected primary neuron cultures [J]. *J Virol*, 1999, 73(1):510-518.
 [15] Sarmiento L, Li XQ, Howerth E, et al. Glycoprotein-mediated induction of apoptosis limits the spread of attenuated rabies viruses in the central nervous system of mice [J]. *J Neurovirol*, 2005, 11 (6):571-581.
 [16] 翟洪月, 陶丽红, 葛金英, 等. 糖蛋白G基因在基因组P-M位的插入重组表达对狂犬病毒Flury LEP致病力的影响[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8):1098-1105.
 [17] Wirblich C, Schnell MJ. Rabies virus (RV) glycoprotein expression levels are not critical for pathogenicity of RV [J]. *J Virol*, 2011, 85 (2):697-704.
 [18] Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, et al. High level expression of surface glycoprotein of Rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice [J]. *J Biotechnol*, 2005, 119(1):1-14.