·药咖论坛·
INSIDERS FORUM



流感减毒活疫苗的研究进展——从经验减毒到理性设计

程佳卉[1#]，李乐[1#]，张成辛[1,2]，王腾[1,2]，许展[1,2]，侯积环[1*]，司龙龙[1,2**]

（1. 中国科学院深圳先进技术研究院深圳合成生物学创新研究院/定量合成生物学全国重点实验室，广东 深圳，518055；2. 中国科学院大学生命科学学院，北京 100049）

[摘要] 流感病毒感染已严重威胁人类健康，接种疫苗仍是目前防控流感最有效的措施之一。流感减毒活疫苗（live attenuated influenza vaccine，LAIV）通过鼻腔接种模拟自然感染，可同时诱导体液、细胞和呼吸道黏膜免疫，是开发广谱流感疫苗的重要技术平台之一。近年来，随着反向遗传学、合成生物学和基因工程技术的发展，LAIV 研发逐渐由传统经验性减毒向基于病毒致病机制及宿主-病毒互作的理性设计转变。综述近年来甲型流感 LAIV 的主要理性设计策略，分析其减毒机制、病毒复制、安全性及免疫保护特点，并讨论其临床转化面临的挑战与发展前景，为后续减毒策略的优化、新型 LAIV 的研发及其临床转化提供参考。总体而言，理性设计为构建更安全、高效、广谱及快速响应的 LAIV 提供了新的技术路径，有望成为推动流感疫苗创新研发的重要方向。

[关键词] 流感减毒活疫苗；理性设计；减毒机制；甲型流感病毒

[中图分类号] R943；R373.1+3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094（2026）09-0775-08

DOI：10.20053/j.issn1001-5094.202604230394

Research Progress on Live Attenuated Influenza Vaccines: From Empirical Attenuation to Rational Design

CHENG Jiahui[1], LI Le[1], ZHANG Chengxin[1,2], WANG Teng[1,2], XU Zhan[1,2], HOU Jihuan[1], SI Longlong[1,2]

(1. Shenzhen Institute of Synthetic Biology/State Key Laboratory of Quantitative Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China; 2.College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] Influenza virus infection poses a serious threat to human health, and vaccination remains one of the most effective measures for influenza prevention and control. Live attenuated influenza vaccine (LAIV), administered intranasally to mimic natural infection, can simultaneously induce humoral, cellular, and respiratory mucosal immunity, and represents an important technological platform for the development of broad-spectrum influenza vaccines. In recent years, with advances in reverse genetics, synthetic biology, and genetic engineering, LAIV development has gradually shifted from traditional empirical attenuation toward rational design based on viral pathogenic mechanisms and host-virus interactions. This review systematically summarizes the major rational design strategies for influenza A LAIVs in recent years, analyzes their attenuation mechanisms, viral replication characteristics, safety and immune-protection profiles, and discusses the challenges and prospects of their clinical translation, to provide a reference for optimizing future attenuation strategies and for the development and clinical translation of novel LAIVs. Overall, rational design provides a new technological pathway for developing safer, more effective, broad-spectrum, and rapid-response LAIVs and is expected to be an important direction for advancing innovative research and development of influenza vaccines.

[Key words] live attenuated influenza vaccines; rational design; attenuation mechanisms; influenza A virus

流行性感冒（简称流感）是一种由流感病毒引　起的急性呼吸道传染病，具有传染性强、抗原易变

#贡献等同
接受日期：2026-06-13
基金项目：深圳市医学研究专项资金项目（No. B2303001）
*通信作者：侯积环　研究方向：新型疫苗技术开发　E-mail：jh.hou@siat.ac.cn
**通信作者：司龙龙　研究方向：新型疫苗技术开发　E-mail：ll.si@siat.ac.cn

异、易发生免疫逃逸的特征，常引发季节性流行甚至全球性大流行，其感染范围广、重症率与死亡率高，严重威胁人类健康，已成为全球范围内亟待应对的重大公共卫生问题。世界卫生组织（World Health Organization，WHO）的监测数据显示，全球每年约有 10 亿人感染季节性流感，其中 300 万～500 万为重症病例，29 万～65 万人因流感相关呼吸道疾病死亡[1]。历史上甲型流感病毒引发的大流行每 10～50 年发生 1 次，其中 1918 年暴发的“西班牙流感”是已知致死性最高的流感大流行，据估计造成全球约 4 000 万人死亡[2]。

接种流感疫苗是最经济有效的流感防控手段之一。现有临床使用的流感疫苗主要包括灭活流感疫苗（inactivated influenza vaccine，IIV）和冷适应流感减毒活疫苗（live attenuated influenza vaccine，LAIV）。IIV 技术成熟、安全性较高，能够诱导针对血凝素（hemagglutinin，HA）和神经氨酸酶（neuraminidase，NA）的特异性抗体，但其诱导的细胞免疫和呼吸道黏膜免疫相对有限。同时，流感病毒表面抗原，尤其是 HA 和 NA，具有较高的遗传变异性，可通过抗原漂移以及不同病毒株之间的重配等机制产生免疫逃逸，使疫苗株与流行株之间出现抗原不匹配，从而导致疫苗保护效果存在较大波动。LAIV 采用鼻腔接种方式，可在上呼吸道进行有限复制，在模拟自然感染的同时诱导体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫等多层次免疫应答。尤其是其能够诱导呼吸道分泌型 IgA（secretory immunoglobulin A，sIgA）以及针对核蛋白（nucleoprotein，NP）、基质蛋白 1（matrix protein 1，M1）等内部保守抗原的交叉反应性 $CD8^+$ T 细胞，为阻断病毒入侵、清除感染细胞以及降低异源病毒感染后的疾病严重程度提供了重要基础。因此，与主要依赖血清抗体保护的传统灭活疫苗相比，LAIV 在诱导黏膜免疫和交叉反应性细胞免疫方面具有独特优势，被认为是开发广谱乃至通用流感疫苗的重要技术平台。传统冷适应 LAIV 主要采用温度敏感的经验性减毒策略，使疫苗病毒能够在上呼吸道低温环境中有限复制，而在下呼吸道生理温度条件下复制受限，从而兼顾免疫原性与安全性。然而，传统 LAIV 的保护效果仍受到病毒抗原变异、不同人群免疫状态以及疫苗株与流行株匹配程度等因素影响，部分人群中的安全性和有效性也有待进一步优化。因此，如何理性设计 LAIV，在保持病毒免疫原性的同时更加精准、稳定和可控地减毒，成为 LAIV 研发的重要科学问题。

基于此，本文围绕近年来甲型流感 LAIV 的理性设计的研究进展进行综述，重点总结非结构蛋白 1（non-structural protein 1，NS1）截短或缺失、基质蛋白 2（matrix protein 2，M2）截短或缺失、HA 切割位点修饰、干扰素（interferon，IFN）敏感性调控、基因组重排、转座子诱变、密码子去优化、微小 RNA（microRNA，miRNA）靶向调控、内含肽剪接、遗传密码扩展、蛋白靶向水解和缺陷干扰颗粒等新型减毒策略，阐述不同策略在病毒复制、减毒机制、安全性和免疫保护效果方面的特点。同时，本文分析了新型 LAIV 在安全性评价、广谱长效保护、规模化生产质控和监管转化方面面临的关键问题与挑战，以期为下一代安全、高效、广谱减毒活流感疫苗的设计与临床转化提供参考。

1 流感病毒及其疫苗现状

1.1 流感病毒

流感病毒属于正黏病毒科，根据 NP 与 M1 蛋白的抗原差异，可分为甲（A）、乙（B）、丙（C）、丁（D）4 个型[3]，其中甲型流感病毒（influenza A virus，IAV）和乙型流感病毒（influenza B virus，IBV）是人类季节性流感的主要病原体，二者传播能力强、可引发重症，持续对公共卫生构成挑战。IAV 宿主适应范围广泛，且具备跨物种传播能力，可感染猪、犬、马、蝙蝠、海豹、禽类以及人类等，水禽为其主要天然宿主[4]；IBV 以人类为主要感染宿主，虽未引发过全球性大流行，但常与 IAV 共同流行，相关病例约占全球流感确诊病例的 20%[5]；丙型流感病毒（influenza C virus，ICV）感染后多引发轻症，目前尚未见大规模暴发的报道；近年发现的丁型流感病毒（influenza D virus，IDV）主要感染牛和猪[6]，目前尚无人类感染的确诊病例。

以 IAV 为例，其为一种有包膜的、分节段的、单股负链 RNA 病毒，基因组包含 8 个病毒 RNA（viral RNA，vRNA）节段[7]，目前已鉴定出至少 12 种病毒蛋白。病毒颗粒的结构从外到内分为 3 层：最外层为脂质包膜层，向内依次是基质层和核糖核蛋白层。脂质包膜层表面嵌有 HA、NA 及膜离子通道蛋白 M2；基质层位于脂质包膜层内侧，主要由基质蛋白 M1 构成；核糖核蛋白层在病毒颗粒内部，由病毒核糖核蛋白复合物（viral ribonucleoprotein，vRNP）构成。其中 vRNP 复合物由 vRNA、NP 和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase，RdRp）组装而成。vRNA 被病毒蛋白 NP 包裹，并与 PB2/PB1/PA 组成的异源三聚体（即

RdRp）结合，共同介导病毒的转录与复制过程[8]。此外，根据 *HA* 和 *NA* 基因的不同，IAV 目前已鉴定出包含 18 个 HA 亚型和 11 个 NA 亚型[9]。

1.2 流感疫苗现状

接种流感疫苗是预防季节性流感暴发的主要策略。鉴于流感病毒对全球公共卫生构成重大威胁，研发高效、广谱的疫苗是应对季节性流行与潜在大流行的关键。目前临床应用的流感疫苗主要包括 IIV 和 LAIV。IIV 技术成熟、安全性较高，可诱导 HA 和 NA 特异性抗体，但细胞及黏膜免疫应答相对有限，且主要采用肌内注射；相比之下，LAIV 通过鼻腔接种模拟自然感染，可在上呼吸道有限复制，同时诱导体液、细胞和黏膜免疫，其中呼吸道黏膜 sIgA 和交叉反应性 $CD8^+$ T 细胞有助于增强对异源毒株及抗原漂移流感毒株的保护[10−11]。

传统 LAIV 主要采用冷适应法，即通过低温连续传代筛选获得冷适应、温度敏感和减毒特性，使病毒在上呼吸道适度复制，而在肺部等较高温度环境中的复制受到限制。该策略是目前商业化 LAIV 的研发基础，如美国 FluMist 疫苗，其通过冷适应减毒的供体毒株与流行毒株的 HA、NA 基因节段重组制备。然而，FluMist 的免疫效果和安全性受人群、地区及流感季节等因素影响，且因 2 岁以下儿童存在喘息等风险，目前主要用于 2 ~ 49 岁健康人群[2]；其接种后虽可能出现轻微疫苗株病毒脱落，但人际传播事件罕见，且无伴随明显临床症状的感染病例。

尽管流感疫苗已广泛应用，其保护效力仍受病毒抗原漂移和重配影响而存在波动，疫苗株与流行株免疫匹配性下降及保护持续时间有限等问题仍然突出。近年来，分子生物学、基因工程和合成生物学的快速发展，为甲型流感 LAIV 的理性设计与研发提供了全新技术手段。本文系统总结近年来甲型流感 LAIV 的新型减毒策略，分析其减毒机制及应用特点，并探讨相关技术在未来流感疫苗研发和临床转化中的发展潜力。

2 新型 LAIV 的理性设计策略

2.1 基于病毒功能蛋白改造的 LAIV 设计策略

2.1.1 NS1 截短或缺失的 LAIV IAV NS1 蛋白为非结构 RNA 结合蛋白，可拮抗宿主 IFN-I抗病毒防御反应、促进病毒 mRNA 翻译，是病毒致病关键因子。基于 NS1 的干扰素拮抗功能定向改造病毒基因组，构建 NS1 截短型或缺失型（ΔNS1）重组毒株，其在宿主体内复制能力显著减弱，有望成为 LAIV 的候选毒株。Muster 团队利用反向遗传操作系统，构建了 NS1 缺失但保留了 *NS* 基因编码的核输出蛋白（nuclear export protein，NEP）表达的重组甲型流感病毒株（ΔNS1）。该毒株可在干扰素缺陷型 Vero 细胞中高效增殖，在 IFN 功能完整的 MDCK 细胞及小鼠体内复制能力显著下降，毒力明显减弱[12]。为进一步平衡病毒毒力减弱程度与免疫原性，Palese 团队以高致病性 H5N1 亚型 VN1203 毒株为骨架，系统对比了 3 种 NS1 蛋白 C 端截短形式（分别保留 N 端 126、99、73 个氨基酸），同时突变去除 HA 蛋白多碱性切割位点、引入 PB2 蛋白 K627E 减毒突变以进一步提升安全性。所得重组毒株在鸡胚中高滴度增殖，在 IFN 活性正常的细胞及小鼠中显著减毒，且能诱导更高水平 IFN-β 的表达；在鸡胚培养体系中，不同截短位点对病毒生长动力学无明显影响，同时，单次接种该类截短型重组病毒可完全保护小鼠抵御 IAV H5N1 亚型的攻击[13]。

2.1.2 M2 截短或缺失的 LAIV IAV M2 蛋白是参与病毒复制与组装的关键蛋白，M2 蛋白含胞外区、跨膜区与胞质尾区 3 个结构域，其中跨膜区行使离子通道功能，胞质尾区参与病毒颗粒形成与出芽，M2 功能缺失会显著影响病毒的复制能力，因此，靶向改造该蛋白是研发 LAIV 的潜力策略。Bilsel 团队在 *M2* 基因敲除（*M2* knockout，M2KO）基础上设计出了 M2 缺陷型单周期复制病毒（M2 singlecycle replication virus，M2SR），M2 跨膜区的部分核苷酸，不能形成完整、有功能的 M2 蛋白，无法产生感染性子代病毒，其复制被限制在单个周期内[14]。同时，M2SR 病毒又可以在稳定表达互补 M2 蛋白的细胞系中增殖，保证了疫苗的生产。在免疫原性方面，M2SR 病毒能够诱导强烈的全身及黏膜免疫反应，有效保护小鼠和雪貂抵御同源和异源流感病毒（如 H3N2 和 H5N1）的攻击，表现出优异的交叉保护免疫效果。这可能归因于 HA2 茎区、NA 保守区诱导的广谱交叉中和抗体，以及保守抗原表位诱导的交叉反应性细胞毒性 T 细胞的协同作用。此外，M2SR 感染仅诱导低至中度的细胞因子应答，避免了高水平细胞因子所引发的肺损伤。目前，甲型流感 M2SR 疫苗已进入临床试验阶段，该疫苗在成人中能提供增强的黏膜和血清抗体反应，表现出良好的安全性和交叉保护能力。与此同时，M2SR 设计策略被扩展到开发针对 IBV 的单周期复制疫苗，具有作为新型 LAIV 候选株的应用价值。

2.1.3 HA 蛋白切割位点修饰的 LAIV LAIV 的 HA 蛋白前体（HA0）需经宿主胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶裂解为 HA1 和 HA2 亚基，该裂解过程是病毒膜融合、宿主细胞侵入及获得感染性的关键步骤，因此，靶向抑制 HA0 裂解或破坏其裂解激活过程可有效降低病毒感染性，是一种具有应用前景的减毒策略。Klenk 团队将 WSN 毒株 HA 蛋白的胰蛋白酶裂解位点（Arg-Gly）突变为弹性蛋白酶敏感位点（Val-Gly），构建出 WSN-E 突变株，其仅在弹性蛋白酶存在时生长动力学与野生型相似，正常细胞中因无法被裂解形成功能性 HA 而减毒；在小鼠模型中，该突变株复制能力减弱，但诱导的免疫反应与野生型相当，可抵御流感攻击，且毒力回复突变率低[15]。

2.1.4 IFN 敏感的 LAIV 流感病毒可通过多种机制拮抗宿主 IFN 系统以维持自身复制，除经典 IFN 拮抗蛋白 NS1 外，近年研究发现，病毒聚合酶亚基（PB2、PB1、PA）、NP 及膜蛋白（M1/M2）也参与该调控过程。因此，通过削弱病毒拮抗宿主 IFN 抗病毒应答的能力，可增强病毒对宿主 IFN 的敏感性，从而限制其在宿主体内的复制并实现减毒，为 LAIV 的理性设计提供了新的思路。Sun 团队以 IAV WSN 为模型，建立了结合饱和诱变与下一代测序的高通量基因组筛选体系，通过比较 IFN 选择与非选择条件下病毒突变体的复制适应度，系统鉴定全基因组范围内的 IFN 敏感突变，并据此筛选能够在保持体外复制适应性的同时增强 IFN 敏感性的减毒突变。研究发现，IFN 突变株的 IFN 敏感性较野生型显著提升，据此设计出含 8 个突变的高 IFN 敏感型（hyper interferon sensitive，HIS）病毒，其中 *PB2*、*M1* 基因各含 3 个突变，*NS1* 基因含 2 个突变。该病毒在 IFN 缺陷细胞中高效复制，在敏感细胞及动物体内显著减毒，诱导的 IFN 应答水平更高，提示 PB2、M1 调控 IFN 敏感性的作用不同于 NS1 蛋白。在小鼠和雪貂模型中，HIS 病毒可短暂激活宿主 IFN 系统，诱导强效免疫反应，保护机体抵御同源及异源流感毒株的攻击[16]。因此，靶向病毒免疫逃逸机制优化病毒疫苗，为未来疫苗研发与免疫治疗开辟了新路径。

2.2 基于病毒遗传信息重构的 LAIV 设计策略

2.2.1 基因组重排的 LAIV 流感病毒基因组具有高度有序的结构和严格的功能分区，人为改变其天然排列可能干扰病毒复制与包装，降低复制适应性，从而实现病毒减毒，因此，基因组重排可用于减毒设计。Kawaoka 团队开发了一种 *PB2* 基因缺陷 IAV，其中 *PB2* 开放阅读框（open reading frame，ORF）被 *GFP* 基因取代。该病毒仅能在稳定表达 PB2 蛋白的细胞系中有效复制，而在宿主体内高度减毒[17]。在另一项研究中，Palese 团队将 H1 和 H3 亚型 HA 同时表达并展示于 PR8（H1N1）重组 IAV 表面，构建出首例包含 9 个 RNA 片段的重组病毒，这种重组病毒疫苗可对 H1 和 H3 亚型毒株产生显著的保护作用[18]。此外，病毒基因组重排技术也被用于改造 *M* 和 *NS* 基因，使 M1/M2 和 NS1/NEP 蛋白分别独立表达，以产生减毒候选疫苗。Martínez-Sobrido 团队对 PR8 的 *M* 和 *NS* 基因进行重排，插入了猪捷申病毒 1 型（porcine teschovirus 1，PTV-1）的 2A 肽介导的核糖体跳跃序列，使原本通过可变剪接表达的 M1/M2 转变为相互独立的蛋白表达模式；重排的 *M* 基因节段的病毒表现出温度敏感表型，在允许温度（33 ℃）下有效复制，而在体内显著减毒[19]。该方法通过破坏病毒基因组结构、插入或重排基因序列实现减毒，可支持多价疫苗和高致病性毒株的疫苗开发。

2.2.2 转座子诱变的 LAIV 转座子是一类可移动的 DNA 遗传元件，基于转座子的随机插入基因诱变技术可批量构建基因突变体，结合表型高通量筛选策略，可从重组病毒突变文库中快速鉴定减毒候选毒株，是 LAIV 研发中兼具效率与实用性的半理性筛选路径。Cheng 团队结合转座子突变与反向遗传学系统，将 15 个核苷酸序列插入 IAV A/WSN/1933（H1N1）的 *M* 基因，构建突变型 *M* 基因文库，将该文库与野生型 WSN 毒株其余 7 个野生型基因节段的反向遗传质粒共转染人胚肾细胞（Human Embryonic Kidney 293T，HEK293T），获得突变型病毒文库；将文库接种小鼠后，鉴定出与病毒生长特征相关的突变区域。结果表明，M2 蛋白跨膜区插入突变的毒株体内减毒效应显著；M2 胞质尾部插入氨基酸的候选毒株 W7-791，经多次传代仍稳定减毒。此外，该毒株在动物模型中诱导的病理损伤远低于野生型，单次接种即可为动物提供完全保护，抵御 H1、H3、H5 亚型流感病毒的致死性攻击[20]。该方法无需依托对病毒基因功能的全面解析，即可针对未知或新发病毒开展疫苗设计，这为疫苗研发搭建了高效且实用的技术平台。

2.2.3 密码子去优化的 LAIV 密码子去优化（codon deoptimization，CD）策略通过利用密码子使用偏差，在不改变病毒蛋白氨基酸序列与功能的前提下降低其翻译效率。Martínez-Sobrido 团队将甲型流感 PR8 毒株 *NS* 基因 32% 的密码子替换为低偏好同义密码子，构建的 NScd 突变株保留免疫原性，可保

护小鼠抵御同源、异源流感攻击[21]。Poon 团队对甲型 H1N1 流感 BR59 毒株的 8 个基因节段完成 300 余个沉默密码子去优化，所得病毒在哺乳动物细胞和小鼠中毒力显著降低，且能在鸡胚中高滴度生长[22]。Chen 团队将 PR8 毒株 *NA* 基因约 62% 的密码子进行了同义密码子优化，并部分恢复 3'和 5'末端野生型序列以维持包装能力，构建的疫苗在体内高度减毒，且能诱导特异性体液、细胞及黏膜免疫应答，保护小鼠抵御同源 PR8 及异源 H1N1（Ca04）和 H3N2（X31）病毒的致死攻击[23]。CD 的 LAIV 对病毒蛋白功能认知要求低，还可通过计算工具快速设计，适配传染病暴发应急需求。

2.3 基于条件性病毒复制的 LAIV 设计策略

2.3.1 miRNA 响应的 LAIV miRNA 是一种内源性非编码 RNA，通过 miRNA 诱导沉默复合体（RNA-induced silencing complex，RISC）与靶 mRNA 互补结合，介导翻译抑制或 mRNA 降解，进而调控基因表达。TenOever 团队率先利用 miRNA 实现流感病毒精准减毒，其在 H1N1 亚型 PR8 株 *NP* 基因 ORF 中插入 miR-93 的微小 RNA 响应元件（microRNA response element，MRE），同时构建含相同 MRE 的 H5N1 亚型 VN1203 株 HA/NA 重组病毒[24]。因 miR-93 在人、小鼠肺组织中高表达，而在鸡胚中不表达，该突变病毒在哺乳动物肺组织中复制能力显著受限、毒力大幅减弱，但可在鸡胚中高效复制。后续研究证明将 miR-21、miR-192 等多种 miRNA 的 MRE 引入到流感病毒的 *NP*、*HA* 等基因中，均可实现流感病毒的减毒[25–26]。基于 miRNA 开发的 LAIV 可在病毒多个基因节段引入一种或多种特异性 miRNA 的 MRE，可进一步优化基于 miRNA 介导的流感病毒精准减毒，进一步提高安全性。

2.3.2 内含肽剪接的 LAIV 内含肽作为一种能够在蛋白质前体中实现自我剪接的功能性多肽序列，近年来在流感病毒疫苗研发领域展现出独特的应用价值。内含肽的自剪接特性使其能够在无需外源蛋白酶参与的条件下，精准介导目的蛋白与功能元件的分离与连接，为疫苗设计提供了新的技术路径。Dong 团队利用内含肽自剪接技术，将 4-羟基他莫昔芬（4-hydroxytamoxifen,4-HT）依赖型内含肽插入 PA 蛋白，构建了复制受 4-HT 调控的重组病毒疫苗 S218。该疫苗以小分子化合物 4-HT 作为开关：在缺乏 4-HT 的环境中，疫苗无法有效复制，从而实现减毒；当提供外源 4-HT 时，病毒增殖得以恢复，进而有效刺激机体免疫应答。体内外实验表明，该疫苗减毒效果显著，安全性良好，且能够激发与野生型病毒相当的先天免疫反应，并诱导小鼠产生强大的体液、黏膜和细胞免疫应答，有效抵御同源病毒攻击[27]。基于内含肽剪接开发的 LAIV 的技术原理具有通用性，有望推广至新型冠状病毒、艾滋病毒等其他高变异病毒疫苗的研发。

2.3.3 遗传密码扩展的 LAIV 遗传密码扩展通过在基因中引入琥珀终止密码子（UAG），使基因在缺乏正交转运 RNA（transfer RNA，tRNA）/ 氨酰-tRNA 合成酶的正常宿主细胞中终止蛋白翻译；而在表达相应正交翻译系统的工程化细胞中，UAG 可被识别并完成非天然氨基酸掺入，恢复蛋白表达。Zhou 团队运用该策略，在甲型流感 WSN 毒株的 *PA*、*PB2*、*PB1*、*NP* 基因中分别引入 1 个 UAG，获得 PTC-4A 毒株。该毒株仅能在补充非天然氨基酸、表达正交转运 RNA（transfer RNA，tRNA）/氨酰-tRNA 合成酶的转基因细胞系中完成全长蛋白翻译并实现高滴度增殖；在正常宿主或动物体内则翻译提前终止，子代病毒无法扩增，呈单周期、不可逆减毒特性。PTC-4A 免疫小鼠后无明显流感相关临床症状，豚鼠同居实验未检测到有效病毒传播，且还可通过重排抑制野生株复制，对同源及抗原漂移毒株实现完全保护[28]。该毒株后续还被改造成肺癌免疫治疗载体，兼具疫苗与溶瘤载体的双重应用潜力[29]。基于遗传密码扩展技术开发的 LAIV 在正常宿主中实现不可逆减毒与传播阻断，同时保留了较强的免疫原性，为构建安全可控的流感疫苗及病毒载体提供了新的技术路径。

2.4 基于病毒复制周期调控的 LAIV 设计策略

2.4.1 靶向蛋白水解的 LAIV 真核细胞主要通过泛素-蛋白酶体和溶酶体等途径维持蛋白质稳态。利用内源蛋白降解系统调控病毒复制，是一种具有前景的理性减毒策略。2022 年，Si 等[30]以 IAV WSN 为模型，利用泛素-蛋白酶体途径开发了第一代蛋白降解靶向（proteolysis-targeting，PROTAR）活疫苗。该策略将 VHL 识别的蛋白降解靶向结构域（proteasome-targeting domain，PTD）经 TEV 切割位点连接至病毒 M1 蛋白 C 端，使常规细胞中的 M1 被 VHL 识别并经蛋白酶体降解，而在表达 TEVp 的生产细胞中，PTD 被切除，M1 得以稳定表达，从而实现病毒减毒与高效制备。随后，该团队进一步开发了基于溶酶体降解的减毒活流感疫苗，同样表现出良好的安全性和免疫保护效果[31–34]。

为了克服第一代 PROTAR 疫苗 PTD 仅能装载在病毒蛋白两端（N 端和 C 端）的局限性，该团队开发了 PROTAR2.0 疫苗，可支持 PTD 装载在病毒

蛋白的任意合适位点，包括病毒蛋白两端和内部位点，提高了技术的灵活性和通用性以及疫苗的安全性[35]。此外，该团队利用 E3 泛素连接酶的多样性，成功构建了一个含有 22 类 PTD 的 PROTAR 疫苗库，进一步拓展了 PROTAR 疫苗的种类[36]。

基于靶向蛋白水解技术开发的 LAIV 具备优异的安全性和免疫原性，具备较高的转化潜能。另外，基于溶酶体靶向降解的新材料的开发[37]，也将助力新型靶向蛋白水解的 LAIV 理性设计。

2.4.2 缺陷干扰颗粒的 LAIV 缺陷干扰颗粒（defective interfering particles，DIPs）是在病毒传代过程中自发产生的一类基因组缺陷型病毒颗粒。DIPs 携带缺失了部分基因节段的 RNA，但仍保留两端的包装信号，因此可被包装入病毒颗粒中。当 DIPs 与完整病毒共感染细胞时，DIPs 的短 RNA 在复制速度上具有优势，可竞争性消耗病毒聚合酶和其他复制资源，从而干扰标准病毒（standard virus，STV）的增殖。

现有部分 LAIV 中 DIPs 含量极高。2025 年的一项研究显示，从俄罗斯实验医学研究所（Institute of Experimental Medicine，IEM）获得的 H3N2、H1N1pdm09 和乙型 LAIV 种子株制备的单价疫苗中，DIPs 比例分别高达 99.5%、92.7% 和 98.0%[38]。高比例的 DIPs 可能通过 2 种相反的方式影响 LAIV 效力：一方面，DIPs 干扰疫苗株自身的复制，削弱其免疫原性；另一方面，DIPs 通过激活视黄酸诱导基因蛋白 I（retinoic acid-inducible gene I，RIG-I）通路增强 IFN-I 应答，发挥类似佐剂的作用。该研究团队通过优化鸡胚接种剂量和收获时间，成功制备了 DIPs 比例降至 64.0% 的 H3N2 LAIV 原型疫苗。与高 DIPs 疫苗相比，低 DIPs LAIV 在 MDCK 细胞和小鼠上呼吸道中复制能力显著增强，诱导更强的黏膜 IgA 应答、血清中和抗体和交叉保护免疫，可完全保护小鼠免受 H3N2 和 H1N1 致死剂量攻击。单细胞 RNA 测序显示，低 DIPs LAIV 在接种早期诱导了更强的抗原提呈细胞活化和生发中心反应[38]。这一发现揭示控制 DIPs 含量可提高 LAIV 的免疫原性和保护效力，为优化现有 LAIV 提供了新方向。

3 挑战与展望

3.1 安全性评估的标准化

新型 LAIV 在临床前动物模型中表现出良好的安全性和免疫原性，但向临床转化仍面临多重挑战。首先，不同减毒策略的安全性比较缺乏统一标准，暂未形成通用方法量化减毒程度，明确安全阈值。其次，小鼠、雪貂等动物模型与人类之间存在生物学特性的种属差异，尤其体现在 IFN 应答、miRNA 表达谱和蛋白酶分布等方面，可能高估或低估疫苗株在人体中的安全性。建立人源化小鼠模型或类器官模型验证减毒策略是未来研究方向之一。

3.2 广谱与通用流感疫苗

LAIV 广谱交叉保护并非依赖单一免疫机制，而是由呼吸道黏膜 sIgA、交叉反应性 T 细胞及中和抗体等共同介导。LAIV 可通过诱导呼吸道黏膜 sIgA、针对 NP、M1、PB1 等病毒内部保守蛋白的 $CD8^+$T 细胞应答，降低 HA、NA 抗原漂移对免疫保护的负面影响，因此被认为是通用流感疫苗的潜在平台之一。鼻腔接种 LAIV 可诱导具有较强交叉反应性的黏膜 sIgA，在病毒入侵早期阻断感染；同时可诱导针对保守内部抗原的 $CD8^+$T 细胞及肺组织驻留记忆 T 细胞（tissue resident memory T cell，TRM）应答，快速清除感染细胞、降低病毒载量和炎症反应[38−41]。

相较于传统冷适应 LAIV，近年来发展的新型 LAIV 平台在设计上更加理性，在广谱性和长效性方面进一步提升。例如，NS1 缺失/截短疫苗、干扰素敏感疫苗能够更充分激活天然免疫，尤其增强 IFN-I 反应和诱导更强的 T 细胞免疫应答，提供更加广谱和长效的保护[16, 42]；M2 截短或缺失的 LAIV 疫苗显著减毒，同时产生血清抗体、黏膜抗体应答以及 B 细胞、T 细胞应答，在小鼠中可诱导针对同源及异源毒株的保护性免疫，在I期临床研究中展示出持久保护和对异源毒株的保护能力[14, 43]；基因组重排的 LAIV 疫苗可同时携带不同亚型的 *HA* 基因，产生对不同毒株的广谱保护[18]；基于 PROTAR 技术的 LAIV 利用蛋白质降解机制降解病毒蛋白，抑制病毒复制，使病毒减毒，同时将降解的病毒蛋白抗原递呈到细胞表面，增强 T 细胞免疫，可提供对异源毒株的保护[30, 35−36]。然而，目前绝大多数新型 LAIV 仍处于临床前或I/II期临床阶段，其长期保护持续时间及真实世界广谱保护效果仍缺乏大规模临床证据，其广谱与通用流感疫苗特性有待进一步验证。

3.3 生产质控与监管

新型 LAIV 的规模化生产面临新挑战：NS1 缺失和 M2 缺失病毒依赖特定的工程细胞系，需要建立符合药品生产质量管理规范（Good Manufacturing Practice，GMP）的细胞库和培养基质；CD 和 PROTAR 疫苗的生产涉及基因合成和病毒重构，需建立更严格的质量控制标准；DIPs 比例的优

化需要精确控制生产参数，并在不同批次间保持一致性。我国国家药品监督管理局（National Medical Products Administration，NMPA）、美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）、欧洲药品管理局（European Medicines Agency，EMA）等监管机构，需要针对这些新型 LAIV 制定相应的审评指南和技术标准。

3.4 展望

近年来，流感减毒活疫苗领域经历了从“经验减毒”到“理性设计”的范式转变。NS1 截短、M2 缺失、基因组重排、miRNA 靶向、CD 及 PROTAR 靶向等创新策略的涌现，极大丰富了 LAIV 的理性设计技术体系。这些策略在减毒机制、安全性、免疫原性和生产可行性方面各有优劣，未来可能根据目标人群和应用场景进行组合优化。同时，DIPs 调控研究的突破揭示了现有 LAIV 产品的优化空间。可以预见，随着 LAIV 理性设计策略的不断突破与优化，更安全、更长效、更广谱的下一代 LAIV 将逐步推进临床转化与规模化应用，为全球流感防控提供更有力的技术支撑。

[参考文献]

[1] World Health Organization. Influenza (seasonal) [EB/OL]. (2025-02-28) [2026-05-28]. https://www. who. int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal).

[2] Zhang Q, Cheng J, Hou J, *et al*. Synthetic biology-inspired development of live attenuated influenza vaccines[J]. *npj Vaccines*, 2025, 10: 204.

[3] Zhu Z, Fodor E, Keown J R. A structural understanding of influenza virus genome replication[J]. *Trends Microbiol*, 2023, 31(3): 308−319.

[4] Peacock T P, Moncla L, Dudas G, *et al*. The global H5N1 influenza panzootic in mammals[J]. *Nature*, 2025, 637(8045): 304−313.

[5] Cai X, Fan M, Zhai Y, *et al*. Human monoclonal antibodies isolated after seasonal vaccination broadly neutralize antigenically drifted influenza B viruses[J]. *Cell Host Microbe*, 2026, 34(5): 860−872.e5.

[6] Uprety T, Sreenivasan C C, Yu J, *et al*. Differential tissue tropism and transmission efficiency of two dominant influenza D clades with overlapping but distinct receptor binding fine specificities in ferrets[J]. *PLoS Pathog*, 2025, 21(9): e1013493.

[7] Carter T, Iqbal M. The influenza A virus replication cycle: a comprehensive review[J]. *Viruses*, 2024, 16(2): 316.

[8] Kang H, Yang Y, Liu Y, *et al*. Coupling of polymerase-nucleoprotein-RNA in an influenza virus mini ribonucleo-protein complex[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 9741.

[9] Jain R, Sharma H, Pena L, *et al*. Influenza virus: genomic insights, evolution, and its clinical presentation[J]. *Microb Pathog*, 2025, 205: 107671.

[10] Jang Y H, Seong B L. Immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines as correlates of universal protection against influenza viruses[J]. *Vaccines*, 2021, 9 (4): 353.

[11] Jang Y H, Seong B L. Cross-protective immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines[J]. *Yonsei Med J*, 2013, 54(2): 271−282.

[12] García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al*. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems[J]. *Virology*, 1998, 252(2): 324−330.

[13] Steel J, Lowen A C, Pena L, *et al*. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza[J]. *J Virol*, 2009, 83(4): 1742−1753.

[14] Sarawar S, Hatta Y, Watanabe S, *et al*. M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice[J]. *Vaccine*, 2016, 34(42): 5090−5098.

[15] Stech J, Garn H, Wegmann M, *et al*. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin[J]. *Nat Med*, 2005, 11(6): 683−689.

[16] Du Y, Xin L, Shi Y, *et al*. Genome-wide identification of interferon-sensitive mutations enables influenza vaccine design [J]. *Science*, 2018, 359(6373): 290−296.

[17] Inagaki A, Goto H, Kakugawa S, *et al*. Competitive incorporation of homologous gene segments of influenza A virus into virions[J]. *J Virol*, 2012, 86(18): 10200−10202.

[18] Gao Q, Lowen A C, Wang T T, *et al*. A nine-segment influenza A virus carrying subtype H1 and H3 hemagglutinins[J]. *J Virol*, 2010, 84(16): 8062−8071.

[19] Nogales A, DeDiego M L, Topham D J, *et al*. Rearrangement of influenza virus spliced segments for the development of live-attenuated vaccines[J]. *J Virol*, 2016, 90(14): 6291−6302.

[20] Wang L, Liu S Y, Chen H W, *et al*. Generation of a live attenuated influenza vaccine that elicits broad protection in mice and ferrets[J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(3): 334−343.

[21] Nogales A, Baker S F, Ortiz-Riaño E, *et al*. Influenza A virus attenuation by codon deoptimization of the NS gene for vaccine development[J]. *J Virol*, 2014, 88(18): 10525−10540.

[22] Fan R L, Valkenburg S A, Wong C K, *et al*. Generation of live attenuated influenza virus by using codon usage bias[J]. *J Virol*, 2015, 89(21): 10762−10773.

[23] Dong J, Dong Z, Feng P, *et al*. Influenza virus carrying a codon-reprogrammed neuraminidase gene as a strategy for live attenuated vaccine[J]. *Vaccines*, 2023, 11(2): 391.

[24] Perez J T, Pham A M, Lorini M H, *et al*. MicroRNA-mediated species-specific attenuation of influenza A virus[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(6): 572−576.

[25] Waring B M, Sjaastad L E, Fiege J K, *et al*. MicroRNA-based attenuation of influenza virus across susceptible hosts[J]. *J Virol*, 2018, 92(2): e01741-17.

[26] Langlois R A, Albrecht R A, Kimble B, *et al*. microRNA-based

strategy to mitigate the risk of gain-of-function influenza studies[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 844−847.
[27] Chen J, Wang J, Zhu H, *et al*. Generation of a live attenuated influenza A vaccine using chemical-triggered intein[J]. *ACS Synth Biol*, 2023, 12(6): 1686−1695.
[28] Si L, Xu H, Zhou X, *et al*. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines[J]. *Science*, 2016, 354(6316): 1170−1173.
[29] Ji D, Zhang Y, Sun J, *et al*. An engineered influenza virus to deliver antigens for lung cancer vaccination[J]. *Nat Biotechnol*, 2024, 42(3): 518−528.
[30] Si L, Shen Q, Li J, *et al*. Generation of a live attenuated influenza A vaccine by proteolysis targeting[J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(9): 1370−1377.
[31] Hao J, Wang P, Shen Q, *et al*. Lysosome-targeting live attenuated influenza vaccines elicit robust and broad immunity in mice[J]. *Nat Commun*, 2026, 17(1): 2021.
[32] Hao J, Wang P, Li L, *et al*. Generation of an autophagy-targeting influenza A virus as live attenuated vaccine[J]. *Nat Commun*, 2026, 17: 5824.
[33] Hao J, Si L. Generation of live attenuated influenza vaccine through selective autophagy[J]. *Autophagy*, 2026: 1−2.
[34] Hao J, Si L. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the development of live attenuated influenza vaccines[J]. *Autophagy*, 2026, 22(6): 1435−1437.
[35] Zhang C, Hou J, Li Z, *et al*. PROTAR vaccine 2.0 generates influenza vaccines by degrading multiple viral proteins[J]. *Nat Chem Biol*, 2025, 21(9): 1330−1340.
[36] Shen J, Li J, Shen Q, *et al*. Proteolysis-targeting influenza vaccine strains induce broad-spectrum immunity and *in vivo* protection[J]. *Nat Microbiol*, 2025, 10(2): 431−447.
[37] 余萱, 杨长江, 崔旭, 等. 介孔生物活性玻璃在靶向蛋白降解中的应用[J]. 集成技术, 2026, 15(1): 31−40.
[38] Wu M, Wang P, Wang L, *et al*. Live attenuated influenza vaccine with low proportions of defective interfering particles elicits robust immunogenicity and cross-protection[J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 9647.
[39] Yang Z, Zhang S, Zhao Y, *et al*. A mosaic H3 subtype live attenuated influenza vaccine elicits broad immune responses to influenza A viruses[J]. *Vaccine*, 2025, 65: 127776.
[40] Zheng M Z M, Fritzlar S, Wang Z, *et al*. Cutting edge: high-dose live attenuated influenza vaccines elicit pulmonary tissue-resident memory $CD8^+$ T cells in the face of pre-existing humoral immunity[J]. *J Immunol*, 2022, 209(10): 1832−1836.
[41] Thwaites R S, Uruchurtu A S S, Negri V A, *et al*. Early mucosal events promote distinct mucosal and systemic antibody responses to live attenuated influenza vaccine[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8053.
[42] Shurygina A P, Shuklina M, Ozhereleva O, *et al*. Truncated NS1 influenza A virus induces a robust antigen-specific tissue-resident T-cell response and promotes inducible Bronchus-associated lymphoid tissue formation in mice[J]. *Vaccines*, 2025, 13(1): 58.
[43] Eiden J, Gordon G, Fierro C, *et al*. Safety and immunogenicity of M2-deficient, single replication, live influenza vaccine (M2SR) in adults[J]. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1388.



[本期栏目主编] 司龙龙：中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所研究员，定量合成生物学全国重点实验室副主任。长期致力于合成生物学驱动的新型疫苗策略开发、类器官（芯片）开发与应用。开发了蛋白降解靶向（proteolysis-targeting, PROTAR）减毒活疫苗技术，为疫苗开发提供新思路、新方法；构建了人呼吸道、肺等多种器官芯片，为相关疾病研究和药物评价提供与人体生理相关的临床前研究模型。代表性成果以通信、第一作者（含共同）发表在*Science*、*Nat Biotechnol*等期刊，发表SCI论文60余篇，授权和申请专利30余项。入选国家高层次人才，主持国家自然科学基金、国家重点研发计划等多项项目。



[专家介绍] 侯积环：中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所副研究员，长期致力于基于合成生物学的疫苗新技术研发与应用，探索利用宿主细胞蛋白降解系统对病毒关键蛋白进行精准调控，实现疫苗安全可控和高效免疫，为更加安全、高效、广谱的减毒活疫苗的研发提供新的技术路线。

（责任编辑：姚思卉）