

假病毒的应用及其动物模型的研究进展

庞灿¹ 综述 李秀玲² 审校

¹ 国药中生生物技术研究院第二研究室 101111; ² 上海生物制品研究所有限责任公司 201403

通信作者: 李秀玲, Email: lixiuling@sinopharm.com

【摘要】 随着新型高危病毒的出现,使用野生型病毒株进行研究的传统方法显示出局限性,迫切需要一种新方法。体外构建假病毒具有安全稳定、宿主嗜性广等优点,已被广泛应用于中和抗体检测、抗原表位研究、病毒与宿主细胞间相互作用研究、抗病毒药物筛选等领域,是一种安全有效的研究手段。为了进一步评价疫苗、抗体、抗病毒药物的体内保护效果,建立便捷可靠的假病毒动物模型显得尤为重要。此文对假病毒的应用、假病毒动物模型的建立等方面做一综述,总结相关领域的研究进展。

【关键词】 假病毒; 包装系统; 模型, 动物

DOI: 10.3760/cma.j.cn311962-20200324-00030

Advances in research on application and animal models of pseudovirus

Pang Can¹, Li Xuling²

¹ No. 2 Research Laboratory, National Vaccine and Serum Institute Co., Ltd., Beijing 101111, China;

² Shanghai Institute of Biological Products Co., Ltd., Shanghai 201403, China

Corresponding author: Li Xiuling, Email: lixiuling@sinopharm.com

【Abstract】 With the emergence of new high-risk viruses, traditional research methods using wild-type virus strains have shown great limitation, and there is an urgent need for a new way for virus study. Pseudovirus generated *in vitro* is becoming an effective means in this aspect, as it is safe, stable and has a broad host tropism. It has been widely used in neutralizing antibody detection, epitope research, research of interaction between virus and host cells, and antiviral drug screening. In order to evaluate the *in vivo* protection effect of vaccines, antibodies, and antiviral drugs, establishing a convenient and reliable animal model of pseudovirus is particularly important. This article reviews recent advances in the application and the animal model establishment of pseudoviruses.

【Key words】 Pseudovirus; Packaging system; Models, animal

DOI: 10.3760/cma.j.cn311962-20200324-00030

假病毒技术起源于逆转录病毒载体的应用,但由于早期假病毒表达系统操作复杂、产量低,一直未被广泛应用。伴随着重组病毒表达技术、哺乳动物细胞蛋白表达技术等的发展,假病毒研究得到了快速发展。2004 年, Buck 等^[1]首次使用简单的质粒转染方法,用密码子优化的犬乳头瘤病毒结构蛋白表达质粒和报告基因表达质粒共转染 293T 细胞,成功进行细胞内组装,表达效率较之前的塞姆利基森林病毒表达系统提高了 1 000 万倍。这对假病毒生产是一个重大突破,使用质粒载体转染哺乳动物细胞也成为目前普遍使用的假病毒构建方法。

1 假病毒基本特性

假病毒是一种具有单轮感染能力的重组病毒颗粒,由病毒包膜蛋白或衣壳蛋白包裹非病毒自身核酸所形成。其核酸中编码衣壳蛋白的基因通常被报告基因所取代。假病毒由于核酸的缺陷性而只具有一个周期的感染能力,因此具有较高的生物安全性,除此之外还具有稳定性强、宿主嗜性广等优点。其核酸携带的报告基因还可用于假病毒定量、指示假病毒进入细胞以及反映假病毒在动物体内分布情况。因此假病毒技术被广泛应用于中和抗体水平测定、抗原表位研究、病毒与宿主细胞间相互作用、抗

病毒药物筛选等方面。

常见的假病毒报告基因主要有 β 半乳糖苷酶、荧光蛋白家族和萤光素酶等。其中, β 半乳糖苷酶报告基因的表达产物 β -gal 催化底物 X-gal 水解呈蓝色, 可通过酶联免疫图像分析系统检测计数。荧光蛋白家族主要包括绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)、增强型 GFP (enhanced GFP, EGFP)、红色荧光蛋白和蓝色荧光蛋白等, 以荧光蛋白作为报告基因检测方便, 可直接通过荧光显微镜观察, 但定量则需借助流式细胞仪。萤光素酶主要包括萤火虫萤光素酶 (firefly luciferase, Fluc)、海肾萤光素酶、纳米萤光素酶等, 其中以萤光素为底物来检测 Fluc 活性的生物发光体系检出灵敏度高、特异性强、检测便捷, 使得 Fluc 成为近些年应用最为广泛的一类假病毒报告基因。

2 常见假病毒包装系统

2.1 包膜病毒

SARS 冠状病毒 (SARS coronavirus, SARS-CoV)^[2]、中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)^[3]、埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV)^[4]、HIV^[5] 等包膜病毒作为假病毒的研究前景良好。目前常用的包膜病毒假病毒包装系统包括 HIV 慢病毒包装系统、水疱性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 包装系统和鼠白血病病毒包装系统等。慢病毒载体包装系统通常是制作包膜病毒假病毒的首选, 具有转染细胞范围广、感染效率高、导入基因片段容量大且表达稳定等优点。以 HIV-1 型三质粒包装系统为例, 需分别构建包装载体、异源包膜载体以及转移载体, 包装载体控制除病毒包膜蛋白 (envelop, Env) 外的所有病毒结构蛋白的基因表达, 包括主要结构蛋白 Gag、Pol, 调节蛋白 Rev、Tat 以及辅助蛋白 Vif、Vpr、Vpu、Nef 等; 异源包膜载体上含有 VSV 糖蛋白 (glycoprotein, G) 基因序列, 相较于原病毒 Env 序列编码的 Env 具有更广泛的宿主范围; 转移载体上含有目的基因、报告基因以及必要的包装元件。为降低质粒系统意外重组产生活活病毒的概率, 有研究删除包装载体上辅助蛋白 (Vif、Vpr、Vpu、Nef) 序列及调节蛋白 Tat 序列, 只保留 Gag、Pol、Rev, 并将调节蛋白 Rev 序列放在一个单独的表达质粒上, 形成安全性更高的四质粒表达系统^[6]。Fontana 等^[7] 则通过慢病毒三质粒包装系统成功构建了流感病毒假病毒, 其中包装载体 pCMVDR8.2

表达除 Env 外的 Gag、Pol 等所有结构蛋白, 包膜载体 pMD. G 表达 VSV-G, pTY2-CMV-GFP 为表达目的基因并携带报告基因的转移载体。

2.2 非包膜病毒

非包膜病毒结构简单, 没有包裹在外层的脂质双层膜, 其抗原直接分布在衣壳蛋白表面, 如人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV)^[8]、肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71)^[9]、脊髓灰质炎病毒^[10]、柯萨奇病毒 (Coxsackie virus, CV) A16^[11] 等。非包膜病毒假病毒的构建需要衣壳蛋白表达载体、报告基因表达载体 (编码衣壳蛋白的序列被报告基因替代) 或复制子表达载体, 转染至真核细胞后自行组装为完整假病毒。李雄雄等^[12] 将分别表达 HPV16 主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2 的 p16L1、p16L2 以及表达 EGFP 的 pEGFP 共转染 293FT 人胚肾细胞, 构建 HPV 假病毒。衣壳蛋白 L1、L2 可自组装成具有感染性的病毒样颗粒, 同时把长度不超过 8 kb 的报告基因包装入病毒颗粒内, 形成具有单轮感染能力、并通过报告基因的表达反映病毒感染情况的 HPV 假病毒。常见肠道病毒假病毒的构建方法有以下两种: (1) 将衣壳蛋白表达载体和体外转录的病毒复制子 RNA 分步转染真核细胞。Chen 等^[13] 使用 Fluc 报告基因替代 EV71 复制子中的 P1 序列, 线性化后体外转录为复制子 RNA, 在转染衣壳蛋白表达载体 24 h 后转染复制子 RNA, 获得 EV71 假病毒。(2) 将衣壳蛋白表达载体、假病毒复制子表达载体、T₇RNA 聚合酶表达载体共转染真核细胞。Jin 等^[11] 通过构建 T₇RNA 聚合酶表达载体实现了病毒复制子的体内转录, 通过三质粒共转染 293T 细胞, 使 CV-A16 衣壳蛋白包裹携带 FLuc 报告基因的 CV-A16 复制子, 获得 CV-A16 假病毒。

3 假病毒的应用

3.1 中和抗体研究

中和抗体水平检测及中和抗体活性评价是评价疫苗效果的重要指标, 在流行病学研究、临床诊断等方面也具有重要意义。但对于 SARS-CoV、MERS-CoV、HIV、HPV 等传染性强、致病性高且体外难以培养的病毒, 用假病毒评价中和抗体水平成为一种安全有效的方法。

冠状病毒假病毒已被广泛应用于中和抗体评价。马建等^[14] 分别构建了表达 SARS-CoV 和 MERS-CoV 刺突 (spike, S) 蛋白的质粒载体

pcDNA3.1-SS 和 pcDNA3.1-MS, 通过携带 Fluc 报告基因的 VSV 复制缺陷型病毒载体系统制备了高滴度的 SARS-CoV 和 MERS-CoV 假病毒, 建立了稳定性和重复性均良好的中和抗体假病毒检测方法。HPV 假病毒也被国内外普遍用于检测 HPV 疫苗免疫血清中和效价。魏双萍等^[8]通过构建不同的报告基因表达载体建立了基于 GFP、红色荧光蛋白和蓝色荧光蛋白报告基因的三色混合荧光 HPV 假病毒检测系统, 在 HPV 九价疫苗免疫血清中和试验中, 同一份血清只需检测 3 次, 大大提高了临床血清中和检测的效率。EV71^[9]、CV-A16^[11]、CV-B5^[15] 等肠道病毒也建立了基于假病毒的中和抗体检测系统。

与传统的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 中和抑制试验相比, 假病毒检测系统具有操作简单、精确度高、可进行高通量检测等优点, 但如果假病毒产量过低, 则会提高检测成本并造成中和结果偏差。此外, 各实验室之间的检测方法需标准化后才能更普遍应用。

3.2 抗原表位研究

MERS-CoV 主要在人和骆驼之间传播。S 蛋白受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 作为疫苗关键靶点, 已在多次暴发的分离株中检测到突变, 这引起了人们对基于 RBD 的 MERS-CoV 疫苗对循环 MERS-CoV 毒株功效的担忧。Tai 等^[16] 基于在 2012—2015 年分离到的 MERS-CoV RBD 突变株构建了 5 种亚单位疫苗, 同时通过 HIV-1 假病毒包装系统构建了 17 种 MERS-CoV 假病毒, 其中 pNL4-3. luc. RE 为编码表达 Env 缺陷携带萤光素酶的 HIV-1 基因组的质粒, 与编码不同 S 蛋白的质粒共转染 293T 细胞。这些假病毒分别表达了 2012—2015 年流行的分离突变株、单克隆抗体逃逸突变株以及人 MERS-CoV 活毒株的 S 蛋白, 证实了这些病毒 RBD 诱导的抗体具有广泛的交叉中和能力, 可以对抗不同的循环 MERS-CoV 毒株。

根据基因同源性及抗原特性, 狂犬病毒属可分为多个谱系, 但目前的狂犬病疫苗只可预防遗传谱系 1 型病毒, 无法预防遗传谱系 2 型的病毒。对此, Evans 等^[17] 针对决定狂犬病毒中和谱的 G 蛋白展开研究, 基于 HIV-1 慢病毒系统构建了含有 5 个 G 抗原位点分别在遗传谱系 1 型和 2 型之间交换的重组狂犬病毒假病毒, 以此确定 G 抗原位点改变对狂犬病毒功能和中和特性的影响。结果显示狂犬病毒

中单个 G 抗原位点改变可影响中和谱, 其中抗原位点 II 具有免疫优势, 可能与其影响 G 蛋白表面构象有关。因此, 在狂犬病毒 G 蛋白晶体结构未知的情况下, 假病毒为狂犬病毒抗原表位研究提供了有效方法。

3.3 病毒与宿主细胞间相互作用研究

近年来, 多种冠状病毒跨越物种壁垒感染人类, 引起严重呼吸道疾病。研究病毒与宿主细胞间的作用、确定细胞表面特异性受体成为急需解决的问题。而假病毒不仅可以通过基因手段改变表达的外膜蛋白或衣壳蛋白, 还可以通过携带的报告基因指示病毒进入, 故在研究病毒的特异性受体方面具有广泛应用。

2002 年, 由 SARS-CoV 引起的 SARS 席卷全球。Moore 等^[2] 通过猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 包装系统构建表达 SARS-CoV S 蛋白的假病毒, 其中包装载体为删除 Env 基因同时使用 GFP 替换 Nef 基因的 SIV-GFP, 包膜载体为 VSV-G, 转移载体为表达 S 蛋白的 pcDNA3.1。同时还制备可稳定表达人血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 的细胞, 发现 ACE2 上的 S 蛋白结合位点和酶活性催化位点在介导病毒感染过程中功能不同, 阻断催化活性形式的 ACE2 并不会降低病毒感染, 而非催化活性形式的可溶性 ACE2 可有效阻断 SARS-CoV 感染, 为 SARS 治疗提供了思路。之后, Lang 等^[18] 又通过 SARS-CoV 假病毒发现了介导病毒侵染宿主细胞的其他作用位点, 使用肝素酶或外源肝素处理细胞可阻断 S 蛋白与宿主细胞结合, 抑制 SARS-CoV 假病毒感染, 这表明肝素蛋白多糖是参与 SARS-CoV 进入细胞的重要细胞表面结构。

2012 年在沙特阿拉伯首次分离到 MERS-CoV, 该病毒引起的疫情迅速扩散到 20 多个国家。已有学者证明二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP-4) 为 MERS-CoV 感染细胞的功能性受体。之后 Zhao 等^[19] 使用 HIV 慢病毒包装系统, 将包装载体 pNL4-3. luc. RE、异源包膜载体 VSV-G-pcDNA3.1、转移载体 rMERS-CoV-S 共转染 293T 细胞制备 MERS-CoV 假病毒。通过该假病毒测试 MERS-CoV 对不同细胞的感染能力, 结果显示不表达 DPP-4 的细胞也能感染 MERS-CoV, 证明了 DPP-4 并不是 MERS-CoV 唯一受体, 还存在其他

尚未明确的替代受体。蝙蝠冠状病毒 HKU4 和 HKU5 作为 MERS-CoV 的近缘病毒,其 RBD 序列与 MERS-CoV 高度一致,可能具有感染人类的风险。Yang 等^[20]同样使用 HIV 慢病毒包装系统构建了 HKU4、HKU5 及 MERS-CoV 假病毒,通过假病毒抑制等功能实验证明了 HKU4 的功能受体也是 DPP-4;但不同的是,MERS-CoV 假病毒无需添加外源蛋白酶即可感染表达人 DPP-4 的 HEK293T 细胞,而 HKU4 假病毒只有在加入外源胰蛋白酶的条件下才可实现。这表明 MERS-CoV 不仅适应人类受体,还可利用人类细胞蛋白酶来有效进入人体细胞,而 HKU4 作为可以识别 DPP-4 的蝙蝠冠状病毒可能会感染人类细胞,这对于评估蝙蝠冠状病毒所致的新兴疾病潜力以及防控其在人类中的传播至关重要。

2019 年 12 月,中国武汉出现由 SARS-CoV-2 引发的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19)。Letko 等^[21]通过替换 SARS-CoV 的 RBD 序列构建了 29 种 β -CoV 谱系 B 假病毒,并根据 RBD 的系统发育聚类为 3 个单系群,研究了包括 SARS-CoV-2 在内的所有病毒进入细胞及受体使用情况,结果显示人 ACE2 是 SARS-CoV-2 的特异性受体;同时确定了单系群 1 的 RBD C 端的受体结合基序是病毒通过 ACE2 进入宿主细胞所必需的。国内 Ou 等^[22]分别使用慢病毒包装质粒 psPAX2、表达 GFP 和萤光素酶的慢病毒报告质粒 pLenti-GFP、表达 VSV-G 的质粒以及表达 SARS-CoV-2 S 蛋白的质粒共转染 293T 细胞,获得 SARS-CoV-2 假病毒,通过稳定表达人 ACE2 的 293T 细胞系证实了人 ACE2 是 SARS-CoV-2 的受体,并发现 SARS-CoV-2 主要通过内吞作用进入细胞。

3.4 抗病毒药物筛选研究

传统的抗病毒药物筛选方法是观测野生型病毒感染的 CPE 或检测病毒抗原,但实验操作流程复杂,观测 CPE 主观性强,操作某些高致病性病毒株还需具备严格的实验条件。假病毒药物筛选平台作为一种新型、安全、可靠的实验手段,为抗病毒药物的研究做出了很大贡献。

3.4.1 抗流感药物 流感病毒作为全球范围内的重要公共卫生威胁,其耐药株的频繁出现限制了抗病毒治疗的选择,迫切需要找到新的抗流感药物来应对季节性和大流行性流感。血凝素 (hemaggluti-

nin, HA) 是流感病毒表面分布最多的包膜蛋白,由 HA1 和 HA2 两个亚基组成。有研究表明,HA 在病毒感染的早期阶段,包括受体结合与膜融合过程中起关键作用,使其成为开发抗流感药物的重要潜在靶点。

Basu 等^[23]使用基于甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 假病毒的高通量筛选,从化学多样性小分子文库 (106 440 个化合物) 中筛选新型小分子合成抑制剂,以阻断 HA 介导的 IAV 与宿主细胞膜融合,最终筛选出两种具有广谱抗流感活性的新型化合物 MBX2329 和 MBX2546。这些化合物可结合到 HA 三聚体的茎部结构域,从而抑制 HA 介导的融合,对多种流感病毒 (H5N1、H1N1、耐奥司他韦 H1N1) 均有较强的抑制活性。Wu 等^[24]则进一步对 IAV 的 HA2 中序列极其保守的融合肽 (fusion peptide, FP) 进行研究,将 FP 上的带负电荷或中性电荷的残基替换为带正电的赖氨酸,通过基于 IAV 假病毒的进入抑制试验验证了这些 FP 的抗菌活性及作用机制。研究表明带正电荷的 FP 通过与 HA2 亚基相互作用阻断了 HA2 亚基的构象变化,从而阻止了病毒进入宿主细胞,可有效抑制包括奥司他韦抗性株在内的 IAV 的复制。同样基于 IAV 假病毒药物筛选系统, Wu 等^[25]又验证了槲皮素对 H5N1 假病毒感染的抑制活性,阐明了槲皮素是通过与 HA2 亚基相互作用在流感病毒感染早期阶段发挥抑制作用。

3.4.2 抗 HIV-1 药物 AIDS 严重威胁人类健康。AIDS 主要由 HIV-1 引起,但由于 HIV-1 耐药突变率高,快速筛选出具有新靶点、廉价高效、不易产生耐药性的 AIDS 药物的需求日益迫切。HIV-1 的危害性高,必须在生物安全三级实验室中进行,且易发生职业暴露,选择 HIV-1 假病毒体系是筛选抗病毒药物的安全方法。目前广泛用于 HIV-1 研究的假病毒主要有两类,其主要区别在于包膜载体的选择:使用编码 VSV G 蛋白的包膜载体构建而成的 VSVG/HIV-1 Δ env;使用编码 HIV-1 Env 的包膜载体构建而成的 HIV-1env/HIV-1 Δ env^[26]。与 VSVG/HIV-1 Δ env 包装系统相比, HIV-1env/HIV-1 Δ env 假病毒具有 HIV-1 的 Env,能够以类似于野生型 HIV-1 的侵入机制进入细胞,多用于筛选 HIV-1 进入抑制剂和融合抑制剂。

HIV-1 进入宿主细胞的第一步为 Env gp120 与宿主细胞表面受体 CD4 的结合,因此 gp120 及其

受体 CD4 被认为是开发进入抑制剂的潜在靶点。Curreli 等^[5]设计了一系列化合物,使其能与 CD4 竞争结合 gp120 的 Phe43 凹槽,最终通过 HIV-1env/HIV-1 Δ env 假病毒系统筛选出 CD4 拮抗剂 NBD-11021。该小分子可对 56 种代表临床分离株的 HIV-1 假病毒显示出广谱抑制作用,半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀) 低至 270 nmol/L。随后又基于 NBD-11021 合成了 25 种类似物,通过 HIV-1 假病毒感染试验发现化合物 45A(NBD-14009)和 46A(NBD-14010)具有广谱抗病毒效力,IC₅₀低至 150 nmol/L,同时可抵制趋化因子受体 4 嗜性的 HIV-1 在细胞间的传播^[27]。

非核苷类逆转录酶抑制剂在 AIDS 的高效抗逆转录病毒疗法中发挥重要作用。2-硫甲基吡啶嘧啶酮类衍生物作为代表性化合物,因具有较小的毒副作用和较高的抗 HIV-1 活性而倍受关注。唐成润^[26]构建了 HIV-1env/HIV-1 Δ env 假病毒筛选药物体系,并通过此体系对 19 种 2-硫甲基吡啶嘧啶酮类衍生物进行体外抗 HIV-1 活性筛选,得到的 WYM-17 和 WYM-25 对包括耐药株在内的多株 HIV-1 假病毒表现出显著抑制作用,IC₅₀ 均在 nmol/L 水平,有望成为抗 HIV-1 候选化合物。

2.4.3 抗 SARS-CoV-2 药物 在 COVID-19 疫苗上市前,找到一种有效的抗 SARS-CoV-2 药物将具有重大意义。直接使用 SARS-CoV-2 进行研究需要实验室安全级别达到三级以上,极大限制了研究。因此表达 SARS-CoV-2 S 蛋白的假病毒发挥了重要作用。

Xia 等^[28]曾研发出一种靶向人类冠状病毒 S 蛋白七肽重复序列(heptad repeat, HR)1 结构域的广谱抗冠状病毒融合抑制剂 EK1,通过 SARS-CoV、MERS-CoV 等一系列人类冠状病毒假病毒验证了 EK1 的广谱抗病毒活性,可以剂量依赖方式显著抑制假病毒感染,IC₅₀为 2.38 μ mol/L。此外,SARS-CoV-2 的 HR2 衍生肽也对 SARS-CoV-2 假病毒显示出强抑制活性,IC₅₀为 0.98 μ mol/L。随后,Xia 等^[29]又基于 EK1 设计了一系列脂肽,通过表达 SARS-CoV-2 S 蛋白的假病毒感染抑制试验,确定其中的 EK1C4 是最有效的融合抑制剂,其 IC₅₀为 15.8 nmol/L,是 EK1 抗 SARS-CoV-2 活性的 149 倍。同时 EK1C4 对 SARS-CoV、MERS-CoV 以及 SARSr-CoV 假病毒的膜融合和感染的抑制也非常有效,这表明 EK1C4 很有希望成为第一个用于治

疗或预防的广谱抗冠状病毒融合抑制剂。

Hoffmann 等^[30]通过复制缺陷性 VSV 载体 VSV * Δ G-fLuc 构建了表达 SARS-CoV-2 S 蛋白的假病毒。研究发现 SARS-CoV-2 利用 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶(transmembrane protease serine 2, TMPRSS2)激活 S 蛋白启动宿主细胞进入,而已上市蛋白酶抑制剂 Camostat Mesylate 正是通过抑制 TMPRSS2 活性阻断 SARS-CoV 等冠状病毒感染,进而验证了 Camostat Mesylate 对 SARS-CoV-2 感染的阻断效果,有望成为 COVID-19 的治疗方法。2020 年 4 月 3 日,关于该抑制剂在 2019 新型冠状病毒感染的临床试验在丹麦开展。

4 假病毒动物模型

建立传染病动物模型的主要目的是探究病毒的发病机制以及评价抗病毒药物和疫苗。理想的动物模型首先是允许被病毒感染的,其次应重现患者在临床过程中观察到的临床过程和病理表现。但由于有些病毒所需实验室的生物安全等级要求高,缺少经济有效的动物模型,限制了针对此类病毒的药物和疫苗研发。鉴于假病毒系统可克服以上缺点,又可通过检测报告基因的表达反映病毒感染部位,故基于假病毒建立的动物模型被广泛应用到病毒研究中。

4.1 冠状病毒假病毒动物模型

多种实验动物可感染 SARS-CoV,但由于 MERS-CoV 的宿主细胞表面受体 DPP-4 具有种属限制性,除了某些非人灵长类动物以外,大多数实验动物不能自然感染 MERS-CoV。因此 Fan 等^[31]基于 CRISPR-Cas-9 技术建立了表达人 DPP-4(hDPP-4)的 R26-hDPP-4 小鼠,该小鼠极易受到 MERS-CoV 感染。该团队使用高滴度 MERS-CoV 假病毒通过胸腔感染 4 周龄 R26-hDPP-4 小鼠,活体成像结果显示在攻毒后 10、11 d 假病毒感染达峰值,主要感染器官为胸腺、心脏和肺。同时,通过活体成像和免疫组织化学研究,发现 MERS-CoV 假病毒更倾向于感染支气管,这一组织嗜性和 MERS-CoV 活病毒一致。之后,将此 MERS-CoV 假病毒动物模型成功应用于 MERS-CoV S 蛋白 RBD 特异性中和抗体以及 MERS-CoV S 蛋白 HR1 特异性融合抑制剂的体内评价,得到与活病毒小鼠模型一致的结果。

鉴于 hDPP-4 基因敲入小鼠存在高成本、高技术屏障等缺点,牛军伟等^[32]建立了 MERS-CoV 假病毒感染小鼠模型。首先将表达 hDPP-4 的重组腺

病毒 (Ad5-hDPP-4) 通过胸腔或腹腔注射转导 BALB/c 小鼠, 再通过胸腔或腹腔注射高滴度 MERS-CoV 假病毒, 通过活体成像观察 MERS-CoV 假病毒在体内的感染过程与分布特点。但受限于 Ad5-hDPP-4 较低的组织感染效率, hDPP-4 体内表达量低, MERS-CoV 假病毒不能有效感染细胞, 导致此模型的荧光信号强度较低, 持续时间较短。但此模型可以通过提高 hDPP-4 体内表达水平、优化 MERS-CoV 假病毒感染等方式继续完善, 或可为 MERS-CoV 药物评价提供一种精确便捷的动物模型。

4.2 丝状病毒假病毒动物模型

丝状病毒活病毒必须在生物安全四级实验室内操作, 且其对免疫系统完整的成熟小鼠不易感, 若通过将病毒在小鼠体内连续传代以获得致死突变型小鼠适应株, 则非常耗时, 这对相关治疗药物及疫苗的研发带来很大阻碍。Chen 等^[33]基于 HIV/filovirus-GP 假病毒, 成功构建了 EBOV、马尔堡病毒 (Marburg virus, MARV) 和 Lloviu 病毒的假病毒小鼠模型。腹腔途径感染 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 感染了假病毒的小鼠体内表达 Fluc, 通过腹腔途径注射底物后进行活体成像可检测到生物发光, 生物发光强度与假病毒感染剂量呈线性相关, 且随时间推移逐渐增强, 感染后 4 或 5 d 强度达峰值, 后逐渐下降; 最强发光区域位于胸腺。经过对 2 种已知的丝状病毒进入抑制剂的评估, 证实了该假病毒动物模型评估系统的可靠性。Zhang 等^[34]通过修饰 HIV 包装载体、调整 HIV 包装载体和 MARV-GP 表达载体转染比例、比较不同转染试剂等方法优化了假病毒包装系统, 获得了高滴度 MARV 假病毒, 基于此建立了 MARV 假病毒小鼠模型。通过腹腔途径感染 4 或 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 感染后 5 d 生物发光强度达峰值, 并观察到假病毒在多器官中广泛分布, 脾脏、肠道、肌肉中发光最强。还在豚鼠中诱导出 MARV 保护性抗血清, 在体外具有很高的中和活性, 且可以保护 BALB/c 小鼠免受 MARV 假病毒感染。

假病毒技术结合可视化假病毒动物模型, 将给病毒学研究带来极大便利。但假病毒动物模型成功构建的前提, 是制备出高滴度的假病毒或使用高灵敏度的报告基因, 这样才能准确地反映假病毒在体内的分布、重现活病毒的临床特征。因此优化假病毒包装载体表达原件、开发灵敏度更高的报告基因

显得尤为重要。

5 结语

假病毒作为一种安全有效的研究手段, 在病毒学基础研究中, 尤其是对于一些高致病性病毒的研究中发挥了重要作用。面对未知高危病毒的爆发, 假病毒技术以其安全、可靠、便捷等优势可以快速投入使用。COVID-19 疫情爆发之后, SARS-CoV-2 的感染诊断成为疫情防控的重中之重, 中国国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心在发布的《2019 新型冠状病毒核酸检测试剂注册技术审评要点》^[35]中明确指出, 2019 新型冠状病毒核酸检测试剂盒需要使用天然病毒或假病毒作为阳性质控品; 阴性参考品中的 SARS-CoV、MERS-CoV 可采用假病毒。国内以厦门大学、厦门致善生物科技股份有限公司为代表的多个科研团队及企业在第一时间研制出 2019 新型冠状病毒 RNA 假病毒标准品, 以应对疫情的紧急需要, 这为全球疫情的防控做出重大贡献。但目前假病毒技术也存在一定缺陷: 由于假病毒包装系统多样, 每个包装载体又可装配不同表达元件, 导致不同实验室制备的同一种病毒的假病毒滴度差异较大, 而不同实验室间假病毒滴度判定方法也有所差异, 这些差别可能会削弱假病毒技术的可靠性。但不可否认的是, 假病毒技术已被广泛应用于多个领域并做出了很大贡献, 相信随着科研人员的共同努力, 假病毒技术平台会日趋完善, 并会在医学生物学领域有着更为广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, et al. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors [J]. J Virol, 2004, 78(2): 751-757. DOI: 10.1128/jvi.78.2.751-757.2004.
- [2] Moore MJ, Dorfman T, Li W, et al. Retroviruses pseudotyped with the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein efficiently infect cells expressing angiotensin-converting enzyme 2 [J]. J Virol, 2004, 78(19): 10628-10635. DOI: 10.1128/JVI.78.19.10628-10635.2004.
- [3] Kim JY, Kim YI, Park SJ, et al. Safe, high-throughput screening of natural compounds of MERS-CoV entry inhibitors using a pseudovirus expressing MERS-CoV spike protein [J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52(5): 730-732. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.05.003.
- [4] Li H, Yu F, Xia S, et al. Chemically modified human serum albumin potentially blocks entry of ebola pseudoviruses and viruslike particles [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(4): e02168-16. DOI: 10.1128/AAC.02168-16.
- [5] Curreli F, Kwon YD, Zhang H, et al. Structure-based design

- of a small molecule CD4-antagonist with broad spectrum anti-HIV-1 activity [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(17): 6909-6927. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00709.
- [6] 辛凌翔, 常迪. 慢病毒载体表达系统的研究进展 [J]. *中国动物保健*, 2017, 19(10): 84-86. DOI: 10.3969/j.issn.1008-4754.2017.10.049.
- [7] Fontana JM, Christos PJ, Michelini Z, et al. Mucosal immunization with integrase-defective lentiviral vectors protects against influenza virus challenge in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97270. DOI: 10.1371/journal.pone.0097270.
- [8] 魏双萍, 范飞, 陈洁, 等. 三色混合荧光 HPV 假病毒中和检测系统的建立及评价 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(10): 1039-1044. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2018.10.014.
- [9] Zhang H, An D, Liu W, et al. Analysis of cross-reactive neutralizing antibodies in human HFMD serum with an EV71 pseudovirus-based assay [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100545. DOI: 10.1371/journal.pone.0100545.
- [10] Arita M, Iwai M, Wakita T, et al. Development of a poliovirus neutralization test with polio virus pseudovirus for measurement of neutralizing antibody titer in human serum [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(11): 1889-1894. DOI: 10.1128/CVI.05225-11.
- [11] Jin J, Ma H, Xu L, et al. Development of a coxsackievirus A16 neutralization assay based on pseudoviruses for measurement of neutralizing antibody titer in human serum [J]. *J Virol Methods*, 2013, 187(2): 362-367. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.11.014.
- [12] 李雄雄, 董占柱, 吴元元, 等. 两种高危型 HPV 假病毒的构建及其在血清中和抗体测定中的应用 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2019, 47(5): 1-9. DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2019.05.001.
- [13] Chen P, Song Z, Qi Y, et al. Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenger receptor B2 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6406-6420. DOI: 10.1074/jbc.M111.301622.
- [14] 马建, 贺鹏飞, 赵晨燕, 等. SARS 和 MERS 中和抗体假病毒检测方法的建立 [J]. *病毒学报*, 2019, 35(2): 189-195. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003523.
- [15] Chen P, Wu X, Su Y, et al. Development of a pseudovirus based assay for measuring neutralizing antibodies against coxsackievirus B5 [J]. *J Virol Methods*, 2017, 246: 21-26. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.04.005.
- [16] Tai W, Wang Y, Fett CA, et al. Recombinant receptor-binding domains of multiple Middle East respiratory syndrome coronaviruses (MERS-CoVs) induce cross-neutralizing antibodies against divergent human and camel MERS-CoVs and antibody escape mutants [J]. *J Virol*, 2017, 91(1): e01651-16. DOI: 10.1128/JVI.01651-16.
- [17] Evans JS, Selden D, Wu G, et al. Antigenic site changes in the rabies virus glycoprotein dictates functionality and neutralizing capability against divergent lyssaviruses [J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(2): 169-180. DOI: 10.1099/jgv.0.000998.
- [18] Lang J, Yang N, Deng J, et al. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23710. DOI: 10.1371/journal.pone.0023710.
- [19] Zhao G, Du L, Ma C, et al. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV [J]. *Virol J*, 2013, 10: 266. DOI: 10.1186/1743-422X-10-266.
- [20] Yang Y, Du L, Liu C, et al. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(34): 12516-12521. DOI: 10.1073/pnas.1405889111.
- [21] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B beta coronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4): 562-569. DOI: 10.1038/s41564-020-0688-y.
- [22] Ou X, Liu Y, Lei X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1620. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9.
- [23] Basu A, Antanasijevic A, Wang M, et al. New small molecule entry inhibitors targeting hemagglutinin-mediated influenza A virus fusion [J]. *J Virol*, 2014, 88(3): 1447-1460. DOI: 10.1128/JVI.01225-13.
- [24] Wu W, Lin D, Shen X, et al. New influenza A virus entry inhibitors derived from the viral fusion peptides [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138426. DOI: 10.1371/journal.pone.0138426.
- [25] Wu W, Li R, Li X, et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry [J]. *Viruses*, 2015, 8(1): E6. DOI: 10.3390/v8010006.
- [26] 唐成润. HIV-1 ϵ env/HIV-1 Δ env 假病毒筛选药物体系的建立及化合物 WYM-17 和 WYM-25 体外抗 HIV 活性研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- [27] Curreli F, Belov DS, Ramesh RR, et al. Design, synthesis and evaluation of small molecule CD4-mimics as entry inhibitors possessing broad spectrum anti-HIV-1 activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(22): 5988-6003. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.09.057.
- [28] Xia S, Zhu Y, Liu M, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, Epub ahead of print. DOI: 10.1038/s41423-020-0374-2.
- [29] Xia S, Liu M, Wang C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infection (previously 2019-nCoV) by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that

harbors a high capacity to mediate membrane fusion [J]. Cell Res, 2020, 30 (4): 343-355. DOI: 10. 1038/s41422-020-0305-x.

[30] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. Cell, 2020, 181(2): 271-280. DOI: 10. 1016/j. cell. 2020. 02. 052.

[31] Fan C, Wu X, Liu Q, et al. A human DPP4-knockin mouse's susceptibility to infection by authentic and pseudotyped MERS-CoV [J]. Viruses, 2018, 10 (9): E448. DOI: 10. 3390/v10090448.

[32] 牛军伟, 詹瑛, 邓瑶, 等. 基于 DPP4 转导快速建立 MERS-CoV 假病毒感染小鼠模型 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39 (4): 250-255. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-5101. 2019. 04. 002.

[33] Chen Q, Tang K, Zhang X, et al. Establishment of pseudovirus infection mouse models for *in vivo* pharmacodynamics evaluation of filovirus entry inhibitors [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(2): 200-208. DOI: 10. 1016/j. aps. 2017. 08. 003.

[34] Zhang L, Li Q, Liu Q, et al. A bioluminescent imaging mouse model for Marburg virus based on a pseudovirus system [J]. Hum Vaccin Immunother, 2017, 13 (8): 1811-1817. DOI: 10. 1080/21645515. 2017. 1325050.

[35] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心. 2019 新型冠状病毒核酸检测试剂注册技术审评要点 [EB/OL]. [2020-02-12] (2020-03-14). <https://www.cmde.org.cn/CL0050/20447.html>. 2020-02-12.

(收稿日期:2020-03-24)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊使用的缩略语

以下是本刊常用的英文缩略语,第一次出现时可不必标注中英文全称。

缩略语	中文全称	缩略语	中文全称
AIDS	获得性免疫缺陷综合征	HBsAg	乙型肝炎表面抗原
APC	抗原呈递细胞	HBV	乙型肝炎病毒
BCG	卡介苗	HCV	丙型肝炎病毒
CDC	疾病预防控制中心	HIV	人类免疫缺陷病毒
CTL	细胞毒性 T 淋巴细胞	HLA	人类白细胞抗原
DNA	脱氧核糖核酸	IFN	干扰素
DTP	白喉-破伤风-百日咳疫苗	IL	白细胞介素
DTaP	白喉-破伤风-无细胞百日咳疫苗	MHC	主要组织相容性复合体
DTwP	白喉-破伤风-全细胞百日咳疫苗	PBS	磷酸盐缓冲液
ELISA	酶联免疫吸附试验	PCR	聚合酶链反应
FDA	(美国)食品药品监督管理局	RNA	核糖核酸
GMP	药品生产质量管理规范	SARS	重症急性呼吸综合征
HAV	甲型肝炎病毒	Th	辅助性 T 细胞
HBcAg	乙型肝炎核心抗原	TNF	肿瘤坏死因子
HBeAg	乙型肝炎 e 抗原	WHO	世界卫生组织