



埃博拉出血热及埃博拉病毒的研究进展

许黎黎 张连峰

(中国医学科学院实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 埃博拉病毒可以引起一种人畜共患烈性传染病, 即埃博拉出血热, 此病于 1976 年始发于埃博拉河流域, 并且于该区域严重流行, 故而得名。人类一旦感染埃博拉病毒, 死亡率可高达 88%, 从而引起医学界的广泛关注, 世界卫生组织已将埃博拉病毒列为对人类危害最为严重的病毒之一。深入地了解埃博拉出血热及埃博拉病毒, 及其致病机理, 对于埃博拉出血热的预防和控制具有非常重要的意义。

【关键词】 埃博拉出血热; 埃博拉病毒

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)01-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.01.016

Progress on Ebola Hemorrhagic Fever and Ebola Viruses

XU Li-li, ZHANG Lian-feng

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Ebola virus, which was first identified in 1976 during outbreaks in Ebola River valley, is a zoonotic pathogen that causes highly lethal hemorrhagic fever syndrome in human and nonhuman primates. Since the high mortality rates of Ebola viruses, up to 88% in humans, Ebola viruses are listed in the most dangerous viruses to humans by World Health Organization. Comprehending the characterization and pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever and Ebola viruses, is very important for the prevention and control of this disease.

【Key words】 Ebola hemorrhagic fever; Ebola virus

埃博拉出血热 (Ebola hemorrhagic fever, EHF) 是由埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 引起的一种急性出血性传染病, 自 1976 年在非洲中部扎伊尔 (现刚果民主共和国) 和苏丹暴发流行后, 已在非洲中部形成地方流行, 主要包括乌干达、刚果、加蓬、苏丹、科特迪瓦、利比里亚、南非等国家于 20 世纪 70 年代在非洲首次发现^[1-3], 具有极高的传染性, 致死率高达 50% ~ 88%。人主要通过接触病人或感染动物的体液、排泄物、分泌物等而感染。临床表现

主要为发热、出血和多脏器损害。

作为 18 种可引起人类病毒性出血热综合征的病毒之一, EBOV 包括四种亚型: 埃博拉-扎伊尔 (Ebola-Zaire, ZEBOV), 埃博拉-苏丹 (Ebola-Sudan, SEBOV), 埃博拉-科特迪瓦 (Ebola-Cote d'Ivoire, CEBOV) 和埃博拉-莱斯顿 (Ebola-Reston, REBOV)。发生在扎伊尔、苏丹和科特迪瓦的三种亚型 EBOV 已被证实能够使人类致病。不同亚型毒力不同, ZEBOV 毒力最强, 人感染死亡率高达 88%; SEBOV

[基金项目] 科技重大专项-艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治 (2009ZX10004-402; 2009ZX10004-503); 卫生公益性行业科研专项项目 (200802036); 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (DWS200905)。

[作者简介] 许黎黎 (1982 -), 博士后, 研究方向: 分子病毒学。

[通讯作者] 张连峰, 教授, 博士生导师。E-mail: lianfeng_zhang3@yahoo.com.cn。

次之,致死率约为 50%;CEBOV 对黑猩猩有致死性,对人的毒力较弱,致病但不致死;REBOV 对非人灵长类有致死性,人感染不发病^[4]。

由于其在自然界的宿主尚未查明,且暂无有效的抗病毒药物和疫苗,目前对埃博拉出血热的预防还极为困难。世界卫生组织已将 EBOV 列为对人类危害最严重的第 4 级病毒,相关的实验操作要求必须在高度安全的 BSL-4 级实验室中进行。

1 埃博拉出血热的流行病学

1.1 自然宿主

EBOV 的自然宿主至今尚未确定。研究表明蝙蝠可能是 EBOV 的潜在自然宿主之一^[5]。法国研究人员于 2001 至 2003 年间在爆发过埃博拉出血热疫情的加蓬和刚果两国捕捉了上千只不同的动物,其中包括 679 只不同种类的蝙蝠,222 只鸟类和 129 只松鼠等小哺乳动物。通过检测,研究人员在 3 种近 29 只蝙蝠的体内(包括血液、肝脏和脾脏中)发现了感染过 EBOV 的痕迹,但这些蝙蝠却都没有出现埃博拉出血热的症状,他们推测蝙蝠具有成为 EBOV 自然宿主的条件^[6,7]。目前认为 EBOV 的宿主也可能为某些啮齿类动物或鸟类。从中非共和国的 2 种啮齿类动物的器官中检测到了与 ZEBOV 型的 GP 和 L 相同的序列,说明 EBOV 与非洲动物种群可能有着共同的进化历史。另一方面,EBOV 入侵的生化途径及病毒的蛋白质外壳与多种鸟类的反转录病毒非常相似,这提示鸟类可能是 EBOV 的天然宿主,或鸟类反转录病毒与 EBOV 有着相同的祖先,但鸟类是否传染 EBOV 还未能确定^[8]。

1.2 传播途径

接触传播是本病最主要的传播途径。病人或动物的血液及其他体液,呕吐物,分泌物,排泄物(如尿、粪便)等均具有高度的传染性,可以通过接触病人和亚临床感染者(特别是血液,排泄物及其它污染物)而感染。病人自急性期至死亡前血液中均可维持很高的病毒含量,医护人员在治疗,护理病人时,或处理病人尸体过程中容易受到感染,病人的转诊还可造成医院之间的传播。医院内传播是导致埃博拉出血热暴发流行的重要因素。

吸入感染性的分泌物,排泄物等也可造成感染。1995 年曾有学者报道用恒河猴,猕猴作为感染 EBOV 实验动物,含有感染动物分泌物,排泄物的飞沫通过空气传染了正常猴,证实了气溶胶在 EBOV

传播中的作用。

以往,使用未经消毒的注射器是该病的重要传播途径。1976 年扎伊尔一位疑诊为疟疾的病人,在接受注射治疗后 1 周内,数日在该院住院接受注射治疗的病人感染了埃博拉出血热而死亡。另外,在一埃博拉出血热病人发病后第 39 天和第 61 天,甚至第 101 天的精液中均检测到 EBOV,故存在性传播的可能性。

2 埃博拉病毒的基因组结构

EBOV 属丝状病毒属(*Filovirus* Family),其形态包括杆状,丝状,及“L”形,毒粒长度平均 1000 nm,直径 70~90 nm。EBOV 基因组是不分节段的负链 RNA,长度为 18.9 kb,含 7 个开放阅读框^[9,10],在病毒基因组中的基因排列顺序为:3'-NP-VP30-VP40-GP/sGP-VP30-VP24-L-5',每种产物均由各自单独的 mRNA 所编码。包膜糖蛋白 GP 为 I 型跨膜蛋白,具有 2 个阅读框,分别编码 1 个分泌型的小蛋白 sGP(secreted GP)和 1 个全长的跨膜 GP,sGP 作为 GP 的早期产物被大量分泌出来,可能与干扰免疫细胞对病毒的杀伤作用有关,然后再通过 RNA 编辑或框架漂移方式合成 GP 蛋白。GP 是病毒表面棘突的唯一结构蛋白,它通过与受体结合介导病毒进入宿主细胞;GP 可通过与内皮细胞结合破坏微血管的完整性,引起血管渗漏^[11]。VP40 是与毒粒内膜相关的基质蛋白,在病毒以病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)方式在宿主细胞芽生过程中起重要作用。VP24 为小型膜蛋白,可能与病毒的组装和出芽释放有关^[12]。研究表明,正是这三种与膜相偶联的蛋白(GP,VP40 和 VP24)在病毒的毒粒装配、出芽以及致病过程中起到了相当关键的作用^[13,14]。NP 为病毒的核衣壳蛋白;VP35 不仅在 RNA 的合成中起到不可替代的作用,而且还可以抑制 I 型干扰素;VP30 是一种锌指结构蛋白,能与 DNA 双螺旋结构结合,可激活病毒的转录;病毒多聚酶 L(polymerase)是一种依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。

3 埃博拉出血热的发病机制、病理改变及临床表现

病毒进入机体后,可能在局部淋巴结首先感染单核吞噬系统的细胞(mononuclear phagocytic system, MPS),包括单核细胞和巨噬细胞等等。一些感染的 MPS 细胞转移到其他组织,当病毒释放到淋巴或血液中,可以引起肝脏、脾脏以及全身固定

的或移动的巨噬细胞感染。从 MPS 细胞释放的病毒可以感染相邻的细胞,包括肝细胞、肾上腺上皮细胞和成纤维细胞等。感染的 MPS 细胞同时被激活,释放大量的细胞因子和趋化因子。这些细胞活性物质可增加血管内皮细胞的通透性,诱导表达内皮细胞表面粘附和促凝因子,以及组织破坏后血管壁胶原暴露,释放组织因子等,最终导致弥散性血管内凝血(DIC)。埃博拉出血热的一个显著特点是抑制宿主的免疫反应,在感染晚期可发生脾脏、胸腺和淋巴结等大量淋巴细胞凋亡^[5,14-16],患者经常还没有出现有效的免疫反应就已经死亡,甚至在幸存者的恢复期也检测不到病毒的中和抗体^[14]。

感染后主要的病理改变是皮肤、黏膜、脏器的出血,在很多器官可以见到灶性坏死,但是以肝脏、淋巴组织最为严重。肝细胞点、灶样坏死是本病最显著的特点,可见小包涵体和凋亡小体。

病人感染后潜伏期为 2~21 d,一般为 5~12 d。感染 EBOV 后可不发病或呈轻型,非重病病人发病后 2 周逐渐恢复。起病急,临床表现为高热、畏寒、头痛、肌痛、恶心、结膜充血及相对缓脉。2~3 d 后可有呕吐、腹痛、腹泻、血便等表现,半数病人有咽痛及咳嗽。病后 4~5 d 进入极期,病人可出现神志的改变,如谵妄、嗜睡等,重症病人在发病数日可出现咯血、鼻、口腔、结膜下、胃肠道、阴道及皮肤出血或血尿,第 10 天为出血高峰,50% 以上的病人出现严重的出血,并可因出血、肝肾功能衰竭及致死性并发症而死亡。90% 的死亡病人在发病后 12 d 内死亡(7~14 d)。病人最显著的表现是低血压、休克和面部水肿,还可出现 DIC,电解质和酸碱的平衡失调等。急性期并发症有心肌炎、细菌性肺炎等。由于病毒持续存在于精液中,也可引起睾丸炎、睾丸萎缩等迟发症。在病程第 5 天至第 7 天可出现麻疹样皮疹,以肩部、手心和脚掌多见,数天后消退并脱屑,部分病人可较长期地留有皮肤的变化^[5,15,16]。

4 埃博拉出血热引发机体的免疫反应

4.1 先天免疫损伤

许多研究表明先天免疫反应在 EBOV 感染中起核心作用,人类和非人灵长类感染后可检测到伴随大量细胞因子产生的炎症反应。在人体内,EBOV 选择性抑制 IFN- α 和 IFN- γ 的相关功能,Basler 等^[17]鉴别出了可以干扰 IFN 反应的两种 EBOV 蛋

白,其中 VP24 可能阻碍 IFN 信号转导,VP35 阻碍 IRF3 的磷酸化,而 IRF3 在 IFN 产生中起转录因子的作用。单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞(DCs)在 EBOV 感染中是最重要的早期靶细胞,但机体感染 EBOV 后,单核细胞和巨噬细胞的作用有多大,还未被广泛研究。相反,在先天免疫和获得性免疫中都有重要作用的 DCs,在体外感染 EBOV 实验研究中发现其并不行使功能,即不能产生前炎性细胞活素或表达协同刺激分子。自然杀伤细胞 NK 也是受 EBOV 感染影响的先天免疫细胞,这些细胞以独立抗原的方式应答病毒的感染,并通过释放穿孔素和颗粒酶诱导凋亡来杀死被感染的细胞。非人类灵长类感染 EBOV 的过程中,NK 细胞的数量锐减,第 4 天后几乎完全消失,而另有研究表明,人类感染 EBOV 后体内 NK 细胞的数量仅略为减少。

4.2 获得性免疫损伤

从人类感染 EBOV 获得的有效数据中得出,获得性免疫在致死和非致死病例中呈显著不同,这暗示了获得性免疫在 EBOV 感染中的重要作用。对幸存者的研究显示,机体被攻击 2 d 后就产生特异性 IgM 抗体,在 5~8 d 后产生特异性 IgG 抗体。相反,在致死病例中,只有 30% 的病人被检测出了低水平的特异性 IgM,而特异性 IgG 未被检测到。在症状发生后的初期出现的获得性免疫应答对患者能否存活有重要影响,幸存者在感染 EBOV 后出现的早期炎症反应也使这个假设得到了支持。

5 埃博拉出血热的研究模型

EBOV 可在人、猴、豚鼠等哺乳类动物细胞中增殖,其中 Vero-98, Vero-E6, HeLa-229 细胞最敏感。病毒接种后,6~7 d 后出现细胞病变,表现为细胞圆化、皱缩,细胞质内可见纤维状或颗粒状结构的包涵体^[16]。

目前常用的 EBOV 动物模型主要包括小鼠、豚鼠、及非人灵长类三种。免疫系统完整的成熟小鼠并不能感染 EBOV,推测可能是由于其强大的先天免疫系统,尤其是 IFN-I 型反应所导致^[18]。然而,腹腔或脑内接种病毒可导致乳鼠^[19]、成熟的免疫系统缺陷 SCID 小鼠^[20]、以及 IFN α/β 受体或 STAT 基因敲除小鼠^[21,22]的死亡。另一途径是通过将 ZEBOV 在免疫系统完整的小鼠体内连续传代,来获得小鼠适应株^[23]。

用 EBOV 攻毒豚鼠仅能引发短时的、非致死的

发热症状^[24]。同样,使用 ZEBOV 在近交及远交系豚鼠体内连续传代可获得使豚鼠致死的适应株^[24]。

很多非人灵长类动物均被用于 EBOV 动物模型的研究。其中狒狒对所有亚型 EBOV 均存在一定程度耐受,非洲绿猴 (*Chlorocebus aethiops*) 对 REBOV 毒株耐受^[24]。恒河猴 (*Rhesus macaques*) 和食蟹猴 (*Cynomolgus macaques*) 是目前使用的最为广泛的埃博拉动物模型,均对 EBOV 高度敏感,可引起与人类极为类似的临床症状。食蟹猴对 ZEBOV 毒株最敏感,临床症状出现最快;而恒河猴临床症状出现时间要稍慢一些,但更接近于人类。对模型更详细的说明见我们的另外一篇综述^[25]。

6 埃博拉出血热的疫苗研究

埃博拉出血热的防治方法主要有以下 3 种:①密切注意世界 EBOV 疫情动态,加强国境检疫;②病人处理,发现病人后严格隔离治疗,病人的分泌物和排泄物要严格消毒,病人用过的衣物进行蒸汽消毒,病人的尸体应包裹严密就近火葬或掩埋,需转移处理时,应放在密闭容器中进行,医务人员做好自身防护工作,如接触病人时需戴口罩、手套、眼镜、帽子和防护服,严密防止接触病人污染物;③免疫预防。疫苗作为最有效的防治方法,一直是科研工作者努力的方向。

6.1 活载体疫苗

应用无致病性或弱毒的病毒和细菌,例如痘病毒、鸡痘病毒、火鸡疱疹病毒、伪狂犬病毒、腺病毒以及卡介苗分枝杆菌和沙门氏菌弱毒疫苗等作为载体,插入外源性保护基因,构建重组活载体疫苗。用活病毒为载体表达 EBOV 蛋白有一个优点,即病毒疫苗进入人体后接近于自然感染,EBOV 蛋白便可在转染的细胞中表达。这种方法有两个缺点:一是宿主细胞中大量的载体蛋白会导致免疫竞争,由此削弱了由载体表达的特异性 EBOV 蛋白的免疫反应。二是人体中原先存在的免疫力可能会在机体针对活载体疫苗产生足够免疫应答之前就清除了被转染的细胞^[26]。

6.2 DNA 疫苗

将经筛选的 EBOV 基因克隆到质粒载体中,通过肌肉注射的方式注入重组 DNA,或者将重组 DNA 涂在胶体金颗粒表面,然后用基因枪注入皮肤内,同时结合委内瑞拉复制子,使这一体系具有体液免疫和细胞免疫都能同时诱导 EBOV 蛋白产生的优

点。与上述活载体疫苗方法不同的是,DNA 疫苗不会诱发针对载体自身免疫反应。但是,这种方法需要很高的注射剂量,而且克隆 DNA 很可能会整合到宿主基因组内,这也是一个值得高度关注的安全性问题^[27]。

6.3 用 DNA 激发配合腺病毒 (AdV) 增强疫苗 (DNA/AdV 法)

此种疫苗是美国 NIH 疫苗研究中心的研究人员 Gary Nabel 等于 2000 年研制开发的,是继 DNA 疫苗之后的又一新型疫苗,目前已进入二期临床阶段。主要采取“两步走”的策略,首先向动物体内注射 DNA 疫苗,随后用腺病毒载体疫苗加强免疫,结果发现小白鼠抗体效价的增长较单用 DNA 疫苗有 10~100 倍的增长。然后在恒河猴中进行进一步试验,结果显示接种安慰剂的 4 只猴子在 2 周内死亡。而接种疫苗的 4 只猴子均存活。然而,该疫苗接种过程长达 6 个月,需进行 4 次注射,无法有效控制快速传播的疾病^[26,28]。

6.4 快速疫苗

2003 年 8 月,一种针对 EBOV 的快速疫苗被研制出来,此疫苗仅需通过一次注射,4 周后就能使短尾猿免受 EBOV 的感染。快速疫苗是用腺病毒 (AdV) 为载体来表达 EBOV 的 GP 基因,它比用 DNA 激发,AdV 刺激的反应的速度要快得多,但此反应相对较弱^[26,28]。

7 埃博拉出血热对我国的潜在威胁

目前,我国尚未发现感染埃博拉出血热病例,但随着我国与世界其他国家之间的贸易、旅游、人员往来日益频繁,EBOV 通过各种途径传入我国是有可能的。EBOV 是一种新生的病原微生物,我国人群无免疫力,普遍易感。如前所述,从病毒活载体疫苗、DNA 疫苗、用 DNA 激发配合腺病毒增强疫苗到快速疫苗,人类在征服 EBOV 的这条道路上已经迈进了一大步,同时也给予我们征服其它高危烈性病毒性疾病有很大的启迪。总之,对 EBOV 的深入研究,将对今后防治埃博拉出血热提供科学依据,为更快、更早地研制有效的治疗药物及疫苗奠定基础。

参考文献:

- [1] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, et al. The natural history of Ebola virus in Africa [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7: 1005-1014.

- [2] Colebunders R, Borchert M. Ebola haemorrhagic fever—a review [J]. J Infect, 2000, 40:16–20.
- [3] Peters CJ, LeDuc JW. An introduction to Ebola: the virus and the disease [J]. J Infect Dis, 1999, 179 Suppl 1:ix–xvi.
- [4] Bente D, Gren J, Strong JE, et al. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses [J]. Dis Model Mech, 2009, 2:12–17.
- [5] Groseth A, Feldmann H, Strong JE. The ecology of Ebola virus [J]. Trends Microbiol, 2007, 15:408–416.
- [6] Biek R, Walsh PD, Leroy EM, et al. Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir [J]. PLoS Pathog, 2006, 2:e90.
- [7] Pourrut X, Souris M, Towner JS, et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus* [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9:159.
- [8] Gallaher WR. Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses [J]. Cell, 1996, 85:477–478.
- [9] Volchkova VA, Feldmann H, Klenk HD, et al. The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer [J]. Virology, 1998, 250:408–414.
- [10] Sanchez A, Rollin PE. Complete genome sequence of an Ebola virus (Sudan species) responsible for a 2000 outbreak of human disease in Uganda [J]. Virus Res, 2005, 113:16–25.
- [11] Yang Z, Delgado R, Xu L, et al. Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins [J]. Science, 1998, 279:1034–1037.
- [12] Han Z, Boshra H, Sunyer JO, et al. Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding [J]. J Virol, 2003, 77:1793–1800.
- [13] Beer B, Kurth R, Bukreyev A. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses [J]. Naturwissenschaften, 1999, 86:8–17.
- [14] Sullivan N, Yang ZY, Nabel GJ. Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies [J]. J Virol, 2003, 77:9733–9737.
- [15] Feldmann H, Wahl-Jensen V, Jones SM, et al. Ebola virus ecology: a continuing mystery [J]. Trends Microbiol, 2004, 12:433–437.
- [16] Zaki SR, Goldsmith CS. Pathologic features of filovirus infections in humans [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1999, 235:97–116.
- [17] Basler CF, Wang X, Muhlberger E, et al. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97:12289–12294.
- [18] Bray M. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection [J]. J Gen Virol, 2001, 82:1365–1373.
- [19] van der Groen G, Jacob W, Pattyn SR. Ebola virus virulence for newborn mice [J]. J Med Virol, 1979, 4:239–240.
- [20] Warfield KL, Alves DA, Bradfute SB, et al. Development of a model for marburgvirus based on severe-combined immunodeficiency mice [J]. Virol J, 2007, 4:108.
- [21] Bray M, Hatfill S, Hensley L, et al. Haematological, biochemical and coagulation changes in mice, guinea-pigs and monkeys infected with a mouse-adapted variant of Ebola Zaire virus [J]. J Comp Pathol, 2001, 125:243–253.
- [22] Gibb TR, Bray M, Geisbert TW, et al. Pathogenesis of experimental Ebola Zaire virus infection in BALB/c mice [J]. J Comp Pathol, 2001, 125:233–242.
- [23] Bray M, Davis K, Geisbert T, et al. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever [J]. J Infect Dis, 1998, 178:651–661.
- [24] Ryabchikova E, Kolesnikova L, Smolina M, et al. Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis [J]. Arch Virol, 1996, 141:909–921.
- [25] 许黎黎, 秦川. 埃博拉出血热动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(9):67–71.
- [26] Wilson JA, Bosio CM, Hart MK. Ebola virus: the search for vaccines and treatments [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58:1826–1841.
- [27] Volchkov VE, Volchkova VA, Muhlberger E, et al. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity [J]. Science, 2001, 291:1965–1969.
- [28] Hart MK. Vaccine research efforts for filoviruses [J]. Int J Parasitol, 2003, 33:583–595.

修回日期)2010-03-08