



埃博拉病毒病: 病原学、致病机制、治疗与疫苗研究进展

程颖^①, 刘军^②, 李昱^①, 刘翟^③, 任翔^①, 施一^{④⑤}, 高福^{④⑤⑥}, 余宏杰^{①*}

① 中国疾病预防控制中心传染病预防控制处, 传染病监测预警中国疾病预防控制中心重点实验室, 北京 102206;

② 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206;

③ 中国科学院微生物研究所网络信息中心, 北京 100101;

④ 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101;

⑤ 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;

⑥ 中国疾病预防控制中心, 北京 102206

* 联系人, E-mail: yuhj@chinacdc.cn

2014-08-22 收稿, 2014-08-26 接受, 2014-08-29 网络版发表

摘要 2013 年 12 月始, 埃博拉病毒病在几内亚、利比里亚、塞拉利昂和尼日利亚 4 国暴发. 其病原体——埃博拉病毒(Ebolavirus)于 1976 年被首次分离, 为单股负链、不分节段、有囊膜的 RNA 病毒, 属丝状病毒科, 分 5 种, 包括扎伊尔型、苏丹型、本迪布焦型、塔伊森林型和莱斯顿型. 其基因顺序为 3'端-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'端. 埃博拉病毒属于 A 类病原, 致病能力极强, 操作活病毒需在生物安全 4 级实验室进行. 其主要靶细胞是血管内皮细胞、肝细胞、巨噬细胞和树突状细胞等, 通过抑制天然和获得性免疫应答反应, 增加血管通透性, 引起肝脏等多脏器损伤, 引发发热、出血、多器官功能衰竭和休克等症状. 目前尚无批准上市的特异治疗药物和疫苗, 处于研发或临床试验阶段的治疗药物包括: (i) 抗流感病毒药物 T-705 可能阻碍埃博拉病毒在细胞内增殖, 从而遏制感染; (ii) ZMapp 包含 3 种人源化的单克隆抗体, 属优化的鸡尾酒疗法; (iii) 基于 RNA 干扰的基因治疗药物 TKM-Ebola; (iv) 凝血调节因子、炎性介质制剂, 如源于丝虫的抗凝蛋白 rNAPc2 等. 处于研发阶段的疫苗有: (i) 复制缺陷型疫苗, 安全性好, 但诱导免疫的时间较长; (ii) 减毒复制型疫苗, 效果好, 但存在安全隐患. 开展深入的病原学、免疫病理和致病机制研究, 将有利于治疗药物和疫苗的研发. 同时, 应推进有希望的治疗方案和疫苗进入人体临床试验阶段.

关键词

埃博拉病毒
基因组
免疫
致病机制
治疗药物
疫苗

埃博拉病毒病(Ebola Virus Disease)以往称埃博拉出血热(Ebola Hemorrhagic Fever). 目前国内统称为埃博拉出血热, 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, US CDC)已将埃博拉出血热更名为埃博拉病毒病. 该病是埃博拉病毒(Ebolavirus)感染所致的一种急性传染病, 病死率可高达 90%, 是病死率最高的传染病之一. 2013 年 12 月, 地处西非的几内亚开始出现埃博拉病毒病暴发

疫情, 随后在利比里亚、塞拉利昂和尼日利亚等西非国家相继暴发. 截至 2014 年 8 月 15 日, 上述西非 4 国已报告 2127 例埃博拉病毒病病例, 死亡 1145 人^[1,2]. 2014 年 8 月 8 日, 世界卫生组织宣布西非埃博拉病毒病疫情为“国际公共卫生紧急事件”^[3], 进一步引起了国内外媒体和公众的广泛关注. 我国与西非国家在劳务、商务、留学教育等领域合作紧密, 相关人员往来密切, 还有援外医疗队常驻西非国家, 虽然尚无确认埃博拉疫情, 但随时面临输入风险. 为加深对该病

引用格式: 程颖, 刘军, 李昱, 等. 埃博拉病毒病: 病原学、致病机制、治疗与疫苗研究进展. 科学通报, 2014, 59: 2889–2899

Cheng Y, Liu J, Li Y, et al. Ebola Virus Disease: virology, pathogenesis, therapy, and vaccines (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2014, 59: 2889–2899, doi: 10.1360/N972014-00884

的科学认识和应对准备, 现对其病原学特征、致病机制、治疗和疫苗研究进展进行综述.

1 病原学特征

1.1 形态

埃博拉病毒属与马尔堡病毒属和 Cuevavirus 属同归为丝状病毒科^[4]. 埃博拉病毒为单股负链、不分节段、有囊膜的 RNA 病毒, 于 1976 年被首次分离. 在电子显微镜下, 该病毒一般呈现线形结构^[5], 也可能出现“U”字、“6”字形、缠绕、环状或分枝状等多种形态(图 1(a)). 病毒直径 80 nm 左右, 但长度变化很大, 一般为 1000 nm, 最长可达 14000 nm^[4,5], 病毒基因组大小约 19 kb.

1.2 基因组

成熟的病毒体由位于中心的核衣壳(Nucleocapsid)和外面的囊膜(Envelope)构成(图 1(b)). 核衣壳与囊膜之间的区域, 称为基质空间, 由病毒蛋白 VP40 和 VP24 组成. 位于病毒体中心的核衣壳蛋白

由螺旋状缠绕的负链核糖核酸与核蛋白(NP)、病毒蛋白 VP35 和 VP30、RNA 依赖的 RNA 聚合酶(L)组成. 病毒囊膜来自宿主的细胞膜, 糖蛋白(GP)为跨膜蛋白, 形成三聚体刺突, 包含由二硫键链接的糖蛋白 1 和糖蛋白 2 两个碱性蛋白酶裂解片段.

埃博拉病毒基因组编码 7 个结构蛋白和 2 个非结构蛋白. 基因顺序为 3'端-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'端^[4,5], 两端的非编码区含有重要的信号以调节病毒转录、复制和新病毒颗粒包装(图 1(c)). 除编码糖蛋白的基因外, 所有基因均为一个单顺反子, 编码一个结构蛋白. 基因组所编译的蛋白中, NP 是核衣壳蛋白, VP30 和 VP35 是病毒结构蛋白^[6], VP35 具有拮抗 I 型干扰素作用^[7], GP 是跨膜糖蛋白, 与病毒的入侵过程及细胞毒性有关, VP24 和 VP40 与病毒的成熟释放有关, 前者是小型膜蛋白^[8], 后者构成病毒基质蛋白^[9]. RNA 依赖的 RNA 聚合酶(L), 是病毒基因组转录成信使 RNA 所必需的酶, 它对病毒基因组的复制也有重要作用. 另外, 可溶性的糖蛋白(sGP)和小可溶性糖蛋白(ssGP)与跨膜 GP 约有 300

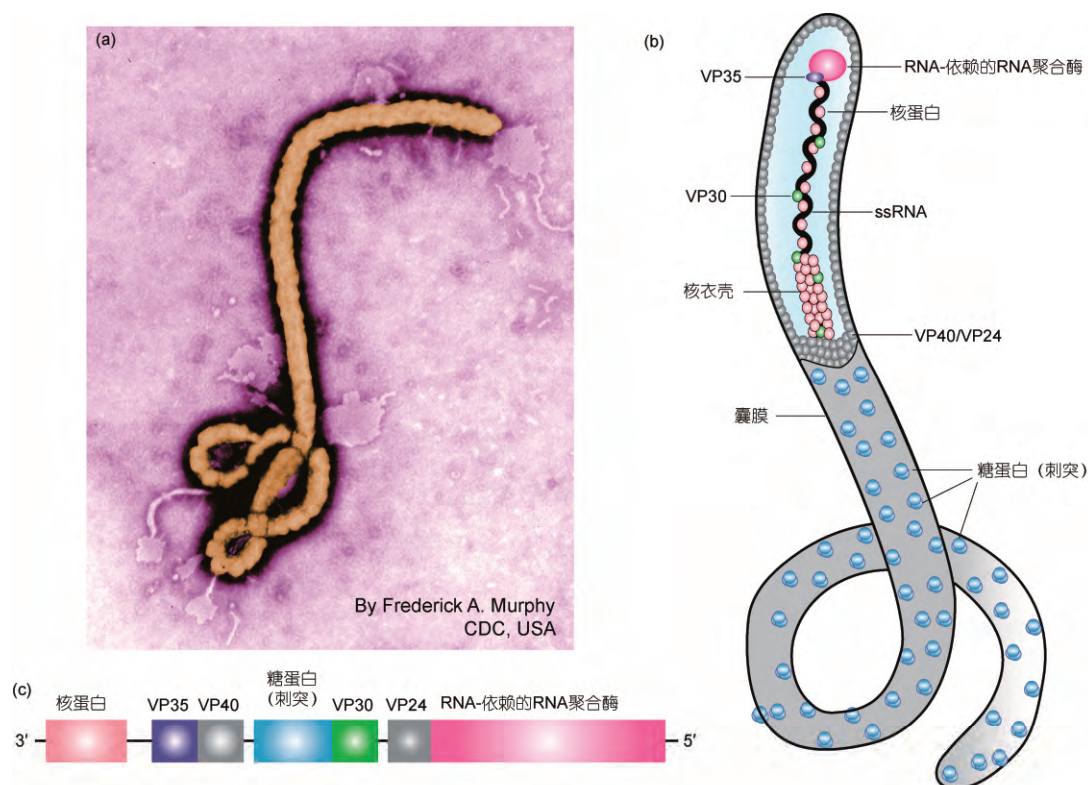


图 1 埃博拉病毒

(a) 电子显微镜图; (b) 病毒结构示意图; (c) 病毒基因序列图

个氨基酸相同^[9,10],大小分别为 60~70 kD 和全长度的 150~170 kD,经过相同基因转录编辑过程, sGP 和 ssGP 与埃博拉病毒细胞毒性有关^[11,12]。

1.3 分型与变异

埃博拉病毒病一直被认为是动物源性传染病,但其在自然界确切的传播和循环方式尚不清楚。现有证据支持的假说认为,埃博拉病毒通过其自然储存宿主果蝠传给大猩猩、黑猩猩等非人类灵长类动物^[13],果蝠和这些灵长类动物均可将埃博拉病毒传给人,然后病毒在人与人之间传播,最终引起人群中暴发流行。目前,确认埃博拉病毒属包括 5 个种:扎伊尔型(Zaire ebolavirus, EBOV)^[14]、苏丹型(Sudan ebolavirus, EBOV)^[15]、塔伊森林型(Tai Forest ebolavirus, TAFV, 又叫科特迪瓦型或象牙海岸型)、本迪布焦型(Bundibugyo ebolavirus, BDBV, 又叫乌干达型)^[16]和莱斯顿型(Reston ebolavirus, RESTV)。前 4 种埃博拉病毒都有感染人类并导致类似临床症状的报道,目前仅在非洲发现。它们的毒力不同,所致疾病的病程进展也各不相同,病死率约为 25%~90%^[17]。其中,扎伊尔型对人致病性最强,苏丹型、本迪布焦型、塔伊森林型,对黑猩猩致病性强,对人较弱^[18]。莱斯顿型曾在菲律宾的猕猴暴发疫情中发现,也曾在美国和意大利从菲律宾进口的猕猴中发现,2008 年首次在菲律宾的猪中分离到该型病毒^[19]。莱斯顿型可以感染人类,但至今尚无引起疾病或死亡的报道^[20,21]。2011 年我国曾在猪中检出莱斯顿型病毒 RNA,但缺乏病毒分离的结果^[22]。

埃博拉病毒的进化速率约为 7×10^{-4} 突变/位点⁻¹年⁻¹。1976 年发现扎伊尔型埃博拉病毒以来,埃博拉病毒 40 年里积累了大量的突变^[23]。目前已发现的 EBOV 病毒株都是 1976 年的毒株突变而来(图 2)。但是全基因组测序分析显示,此次西非疫情的几内亚毒株与已发现的刚果 EBOV 病毒株的同源性只有 97%^[24],并形成独立进化支,该毒株与刚果和加蓬 EBOV 型平行进化,源自共同祖先,并非由其他两国传入几内亚。然而,仍有德国科学家认为此次暴发疫情的病毒株可能来源于中非^[25]。

1.4 抵抗力

埃博拉病毒对热有中度抵抗力,在室温及 4℃ 存放 1 个月后,感染性无明显变化,但在 60℃ 条件下 60

min 可被杀死。还可以通过紫外线、 γ 射线、煮沸灭活 5 min 等方式灭活病毒。同时,该病毒还对次氯酸钠和消毒剂敏感,但冰冻或冷藏无法灭活病毒^[26]。

2 致病机制

埃博拉病毒属生物安全级别最高的 A 类病原,对活病毒的操作需要在生物安全 4 级实验室进行,包括实验动物接种、细胞培养、病毒分离等。埃博拉病毒的主要靶细胞是血管内皮细胞、肝细胞、巨噬细胞等,通过抑制天然和获得性免疫应答反应,增加血管通透性,引起肝脏为代表的多脏器损伤,引发严重的发热、出血、休克、多器官功能衰竭等症状,重者可致死亡(图 3)。

2.1 病毒感染靶细胞和组织

埃博拉病毒感染机体后,通过刺突糖蛋白与宿主细胞膜表面的受体结合进入细胞。原位杂交和电子显微镜显示,单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、成纤维细胞、肝细胞、肾上腺细胞,以及多种上皮细胞对病毒复制起重要作用^[27~32]。其中单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞是早期被感染的细胞和主要的病毒复制场所,进而使病毒由感染部位进入淋巴结、肝脏和脾脏等器官。病毒对靶细胞的感染具体包括:(i) 受到感染的单核细胞和巨噬细胞释放多种细胞因子和趋化因子,包括肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、活性氧和一氧化氮等^[33,34],引起单核细胞和巨噬细胞的聚集,并激活中性粒细胞,进一步扩大炎症反应。同时,受到感染的单核细胞和巨噬细胞表达多种与凝血功能异常密切相关的细胞因子。因此,单核细胞和巨噬细胞不仅无法清除埃博拉病毒,反而协助病毒增殖,并将病毒转运、扩散至宿主全身;(ii) 埃博拉病毒可在重要的抗原呈递细胞(APC),如树突状细胞(DC)内完成增殖;(iii) 通过糖蛋白或病毒感染,可直接破坏细胞结构,损伤肝、肾上腺皮质、脾脏等组织器官。人类和非人灵长类动物感染后,肝脏出现不同程度灶状坏死,引发凝血功能障碍^[35,36];肾上腺皮质细胞坏死,导致血管血压调节障碍^[37]。

2.2 免疫应答反应受到抑制

包括天然免疫及获得性免疫应答均受到抑制:(i) 天然免疫应答,如干扰素产生受到抑制。病毒蛋

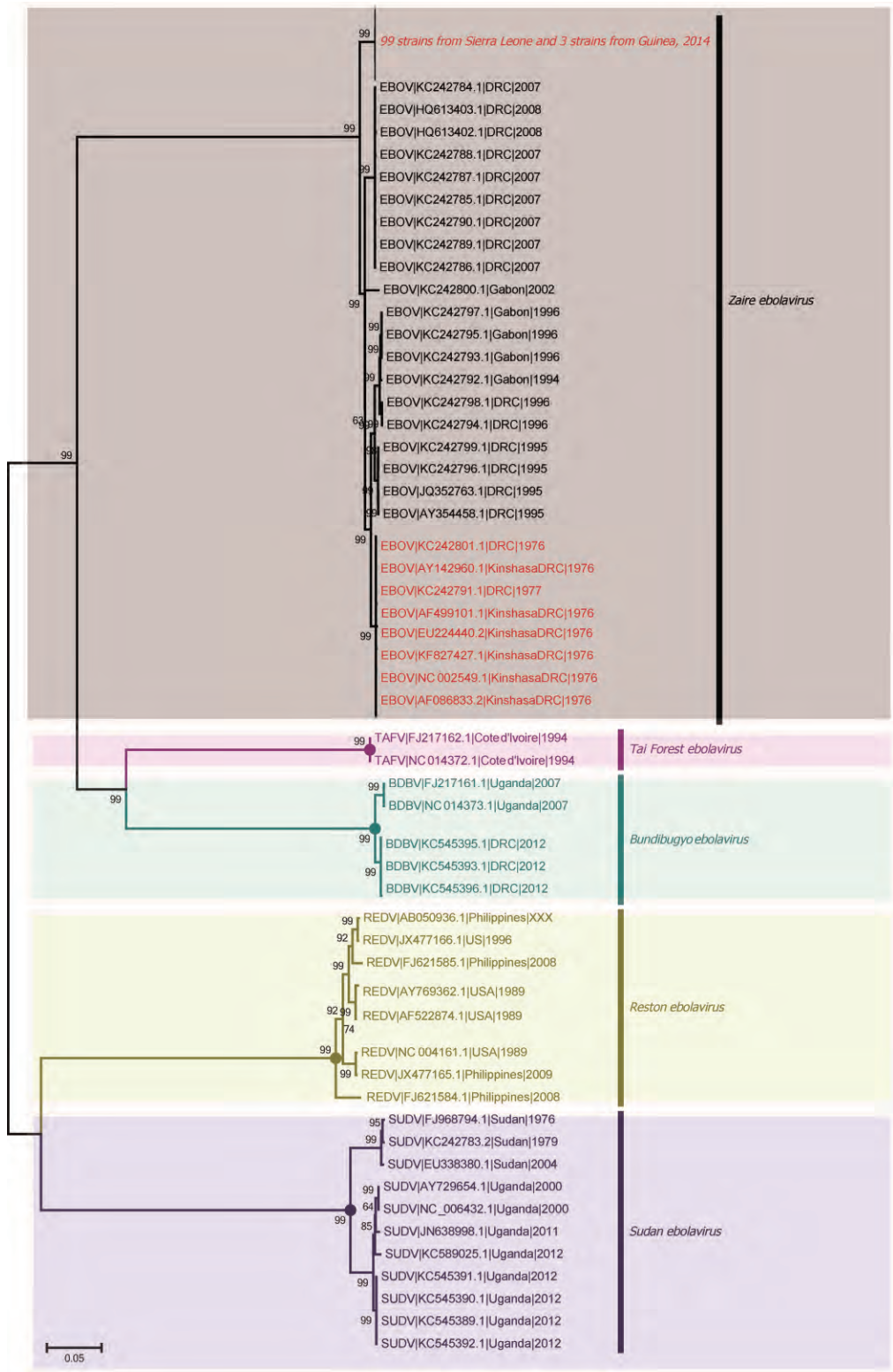


图 2 已公布全基因组的 5 种埃博拉病毒的种群进化关系树

Bootstrap value 值(大于 60)标记在利用邻接法构建的种群关系树上. 99 株 Zaire 型病毒株分离自塞拉利昂(2014 年 6 月), 3 株 Zaire 型病毒株(KJ660346, KJ660347, KJ660348)分离自几内亚^[24]. 自上而下, 不同颜色依次代表扎伊尔型、塔伊森林型、本迪布焦型、莱斯顿型和苏丹型

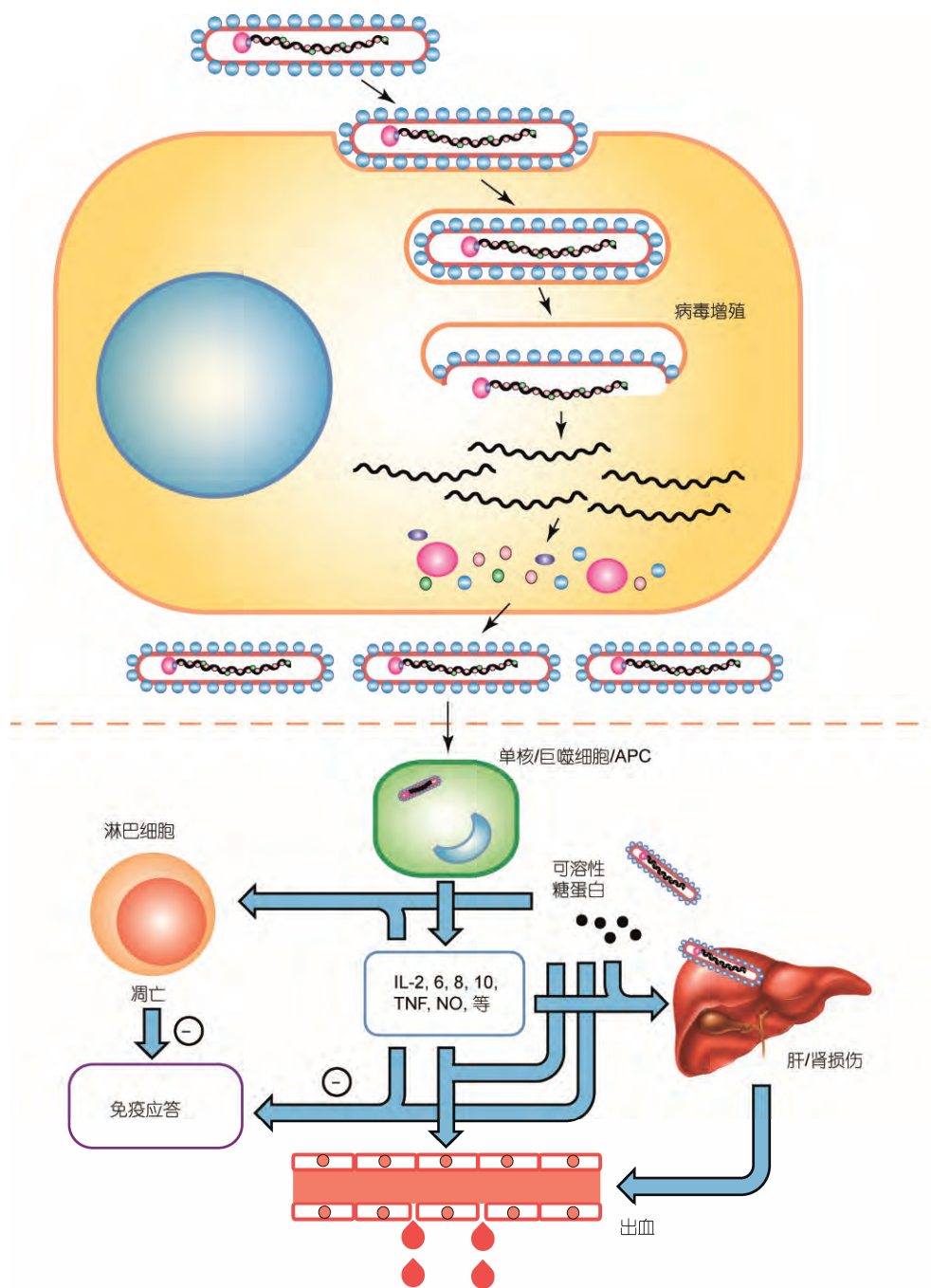


图3 埃博拉病毒致病机制图

白 VP24 中止了蛋白信号转导和活化因子 1 (STAT1) 在细胞核内积聚过程, 通过阻止 I 型干扰素的信号抑制干扰素产生^[38]; 病毒蛋白 VP35 通过阻断干扰素调节因子 3 (IRF-3) 的活性, 降低干扰素的作用, 使周围的正常细胞失去保护^[39,40]. (ii) 获得性免疫应答的多个环节受到抑制: (1) 树突状细胞作为重要的抗原呈递细胞, 处于机体天然免疫和获得性免疫防御病

原体的核心环节. 体外实验表明, 埃博拉病毒感染后的髓系树突状细胞将无法释放集落刺激因子等细胞因子, 不能发育成熟, 从而无法上调主要组织相容性复合物(MHC)分子的表达, 激活淋巴细胞^[41,42]. 树突状细胞功能的异常, 意味着无法正常激活重要的体液和细胞免疫应答过程; (2) 通过 TRAIL 和 Fas-FasL 途径^[43], 引起大量淋巴细胞凋亡, 导致 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$

T 细胞的锐减^[44-46]。猕猴感染病例的研究显示,病毒主要导致体内 T 细胞和 NK 细胞凋亡^[47]。淋巴细胞凋亡,部分解释了死亡病例进展性的淋巴细胞减少和淋巴耗竭。2000 年乌干达埃博拉疫情暴发时,重症病例出现循环 T 淋巴细胞减少,但幸存者淋巴细胞数量未见明显减少。另外,可溶性介质(如 NO 等)的非正常产生,病毒糖蛋白 C 末端免疫抑制性基序的识别或直接介导淋巴细胞功能破坏或细胞减少^[48,49]。(iii) 胸腺、淋巴结和脾脏等重要免疫器官,出现耗竭和坏死,而炎症细胞少见。

对比感染埃博拉病毒后康复者和病情恶化者的临床表现和免疫反应发现,抗原特异性细胞介导的免疫反应的发展和病毒的清除成正相关^[50]。然而,给感染埃博拉病毒的猕猴被动输注埃博拉病毒人源中和性单克隆抗体 KZ52^[51],却无法控制感染。因此,免疫球蛋白的保护作用尚不明确。但可以肯定的是,感染早期正常的、短暂的天然免疫应答,以及随之激活的获得性免疫应答,对于保护机体免受致命性感染是必需的。最近 3 种单克隆抗体联合使用的鸡尾酒疗法被证明有效^[52]。

2.3 血管损伤

关于血管内皮细胞损伤的分子机制尚待研究。现有研究显示,糖蛋白是血管细胞损伤的重要因子,再加上病毒对内皮细胞结构的直接破坏,最终导致出血症状。但尸检并未见明显血管损伤^[53]。并且有研究显示,内皮细胞感染偶然发现于食蟹猴病毒感染的晚期。血小板减少症、凝血因子消耗和纤维蛋白降解产物滴度增加,是埃博拉病毒感染后凝血病理表现。埃博拉病毒病中凝血异常与弥散性血管内凝血一致。因此,凝血因子合成下降以及肝功受损导致血浆蛋白异常与出血倾向有关^[54]。肾上腺皮质受损后,会导致低血压和低血容量低钠血症。该症状几乎见于所有感染者,并在出血晚期的休克过程中起重要作用。病毒感染后还引发众多炎症因子 IL-2,6,8,10,天然抗凝蛋白 C 等释放,导致了疾病晚期出血和休克的发生。值得关注的是,NO 在非人灵长类动物感染扎伊尔型病毒,以及人类感染扎伊尔型和苏丹型病毒后,滴度升高,并显示与死亡相关^[55]。NO 不正常产生,与旁路淋巴细胞凋亡、组织损伤和血管缺乏完整性等众多病理生理紊乱有关。另外,NO 也是重要的低血压介质。

目前认为,APC 细胞的感染和激活是埃博拉病毒病发展的重要基础。APC 细胞以及其他细胞释放的炎症促进因子、趋化因子和其他介质,造成血管和凝血系统的损伤,引发多器官功能衰竭以及类似中毒性休克的症候群。

3 治疗研究进展

3.1 抗病毒药物

抗流感病毒药物-法匹拉韦(favipiravir)(T-705,商品名 Avigan)是针对埃博拉病毒病研究进展较快的抗病毒药物。T-705 作为嘌呤类似物,可引发 RNA 病毒复制过程紊乱,从而阻碍病毒增殖^[56]。实验证实,T-705 还能抑制黄病毒科的西尼罗病毒、黄热病毒和口蹄疫病毒等,因此,对于同属 RNA 病毒的埃博拉病毒可能有效。该药已在日本批准上市用于治疗流感,目前在美国通过了 II 期临床试验。

广谱抗病毒药物 BCX4430,属于小分子的腺苷类似物^[57],被整合进病毒 RNA 复制过程后,使得病毒 RNA 空间构型改变,从而严重影响后续转录、翻译过程。BCX4430 对马尔堡病毒和扎伊尔型埃博拉病毒效果明显,目前该药已经进入临床试验阶段。

广谱抗病毒药物三氮唑核苷(ribavirin,利巴韦林),通过干扰病毒 mRNA 的帽化阻碍病毒复制,用于治疗布尼亚等病毒引起的出血热。由于缺乏针对丝状病毒的体内、体外实验数据,加上严重的副作用,不推荐利巴韦林用于治疗埃博拉病毒病^[58,59]。

3.2 生物治疗

目前针对埃博拉病毒病的治疗主要是基于混合多种抗体的鸡尾酒疗法等生物治疗和支持治疗。其中 ZMapp 是由美国与加拿大联合研制的药物,包含 3 种人源化的单克隆抗体,通过植物细胞表达系统(烟草属)表达生产。属于优化的鸡尾酒疗法^[60],包含针对埃博拉病毒感染有保护效果的单克隆抗体组合 MB003 和 ZMAB 中最有效的成分。ZMapp 在非人类灵长类动物实验中效果显著,并且在两位在西非感染埃博拉病毒的美国医务人员和一位西班牙传教士的治疗中使用,其中 2 名美国患者的临床症状得以改善,西班牙患者死亡。然而,目前不能确定是否因为使用 ZMapp 而使 2 位美国患者康复,其安全性和有效性尚待进一步临床试验验证。同时,ZMapp 的供应

量有限,规模化生产虽处于准备阶段,仍需时间.此外,人鼠嵌合单克隆抗体(c13C6, h-13F6 和 c6D8)的混合株 MB-003^[61],可以对恒河猴发挥有效的保护作用,但尚未在人类证实有效.

另外,TKM-Ebola 是一种基因治疗药物,属 siRNA,专门针对埃博拉病毒相关基因 VP24 和 VP35、RNA 依赖的 RNA 聚合酶,通过 RNA 干扰^[62,63],使得相关蛋白的 RNA 被沉默封闭,达到阻止病毒增殖的目的.目前正处于临床 I 期试验.基于 RNA 的治疗,目前主要针对扎伊尔型埃博拉病毒,在啮齿类和非人类灵长类动物有效.该方法需要限定特定型别的埃博拉病毒,但暴发早期常无法确定病毒型别.另外,这类药物主要经静脉给药,对于偏远地区的治疗面临物流的挑战.输注患者恢复期血浆提供中和抗体的治疗,尚未取得满意疗效,或有助于减轻病毒载量,若结合其他治疗方式,或许有效.各类治疗方法的研究

发现状和面临的问题详见表 1.

3.3 支持疗法

在非人灵长类动物感染扎伊尔型埃博拉病毒的实验中,使用源于丝虫的抗凝蛋白 rNAPc2,可提供 33% 的有效性^[64]. rNAPc2 主要作用于外源性凝血途径.研究表明,活化蛋白 C 在恒河猴中的保护作用与 rNAPc2 一致^[65]. 该类药物已经获批用于临床,可在应急处置时贮备.其他的凝血调节因子、炎性介质制剂等的研究进展见表 1.

4 疫苗研发进展

过去数 10 年,埃博拉疫情多次暴发流行,因仅限于非洲大陆,其疫苗研发速度受限.截至目前,尚无批准上市的疫苗.开展针对候选疫苗有效性的实验,至少需要 2 个动物模型,其中 1 个必须为非人类

表 1 埃博拉病治疗和预防方案

种类	现状评价	尚存问题
治疗措施		
抗体治疗	啮齿类和非人灵长类有效	逃逸突变; 遗传变异; 抗体性感染加重
反义寡核苷酸		
吗啉反义寡核苷酸	啮齿类和非人灵长类有效(仅预防)	遗传变异; 递送
小干扰 RNA	啮齿类和非人灵长类有效	遗传变异; 递送
炎症介质		
I 型干扰素	啮齿类有效, 非人灵长类无效	影响免疫系统
S-腺苷高半胱氨酸水解酶抑制剂	同上	影响免疫系统
凝固酶调节因子		
硫酸肝素	人类效果可疑; 未做动物实验	影响血液凝固
组织因子途径抑制物	非人灵长类有部分保护性啮齿类实验未做	影响血液凝固
活化蛋白 C	非人灵长类有部分保护性	影响血液凝固
疫苗		
暴露后疫苗		
疱疹性口炎病毒	啮齿类和非人灵长类有效	与感染亚型和暴露后开始使用时间有关
减毒活丝状病毒	仅为概念证据; 反向遗传可缓解高风险	活疫苗; 安全、效力衰减不全或逆转的平衡
活疫苗载体	证据概念, 随其他痘疹-载体疫苗优化中	活疫苗安全与效力平衡; 载体免疫
缺陷性 VEE 复制子	啮齿类和非人灵长类有效	载体免疫; 高剂量安全性
暴露前疫苗		
腺病毒 Ad5 型	啮齿类和非人灵长类有效; 1 次; 临床试验	预存免疫; 高剂量
人副流感病毒 3 型	啮齿类和非人灵长类有效; 非人灵长类 2 次	预存免疫; 安全(复制能力)
疱疹性口炎病毒	啮齿类和非人灵长类有效; 1 次	安全(复制能力)
病毒样颗粒	啮齿类和非人灵长类有效; 非人灵长类 3 次	加强免疫; 生产; 佐剂
无 VP35 重组病毒	啮齿类有效	安全
灭活的丝状病毒	非人灵长类保护不充分	安全; 效力; 观察到的病程恶化
表达蛋白, 杆状病毒	豚鼠不完全有效, 非人灵长类无效	效力, 需要佐剂; 糖基化改变
DNA	啮齿类有效, 非人灵长类无效, 强调免疫启动	效力

灵长类动物模型^[66]。因此,目前少有候选疫苗能满足此要求,进入临床试验阶段。目前处于研发中的“有希望疫苗”主要分两类:一类是复制缺陷型疫苗,安全性好,有些已在动物实验和 I 期临床试验中显示良好的效力和免疫原性,但诱导免疫的时间较长,适合暴露前预防使用;另一类是减毒复制型疫苗,存在一定的安全隐患。例如,以疱疹性口炎病毒为载体的重组疫苗在灵长类动物实验中表现良好,可用于暴发疫情处置和生物恐怖袭击应对。随疫苗研发技术改进,腺病毒 Ad5 亚型载体疫苗携有重组的扎伊尔型埃博拉病毒糖蛋白的复制缺陷疫苗^[67],仅需一次免疫。当然,使用该类疫苗要区分病毒型别,因不同型别之间少有交叉反应。未来,至少包含 3 种成分的多价丝状病毒疫苗也有良好应用前景^[68]。同属于该类疫苗的第 2 个研发方案是共表达基质蛋白 VP40、核蛋白和糖蛋白的病毒样颗粒。该方案有效克服疫苗安全隐患,但需佐剂和加强免疫,不适合在疫情应急处置中使用^[69]。另外,该疫苗的费用和生产存在一些挑战,虽然可借反向遗传技术缓解生产压力,但会带来新的安全隐患^[70,71]。

通常而言,减毒复制型疫苗比复制缺陷型疫苗引发免疫应答的效果更显著,易于生产且能刺激天然和获得性(体液和细胞)免疫应答。然而,该原则并不适用于埃博拉病毒,因为在确认活疫苗的安全性上有一定难度。减毒复制型疫苗是基于弱毒的病毒载体制备而成^[72,73],如疱疹性口炎病毒、副流感病毒载体。尽管已在动物,包括免疫缺陷动物实验中取得良好记录^[73],但这些疫苗均存在安全隐患。对于腺病毒载体,采用人副流感病毒的方法或许

存在预存免疫的问题^[74]。目前对抗体反应、T 细胞增殖、细胞毒性 T 细胞研究显示,抗体和辅助性 T 细胞记忆是介导保护性免疫应答必要的;细胞介导的免疫应答尽管重要,但并非必需。针对几种疫苗的临床前评价也在进行中,由美国 NIH 支持的一种疫苗,正在等待 FDA 进入临床实验的审批,有望在 2014 秋天进入 I 期临床试验。该腺病毒载体疫苗,包含 2 个埃博拉病毒糖蛋白插入基因片段,已开展了黑猩猩动物实验。另外 2 种包含疱疹性口炎病毒假型病毒的疫苗,其中一种候选疫苗的临床试验,将于 2015 年早期进行。埃博拉病毒疫苗的研发进展详见表 1。

5 未来研究方向

针对免疫病理和致病机制开展深入研究,将有利于未来疫苗和治疗药物的开发和研制。埃博拉病毒如何下调免疫应答的机制值得深入研究,如何介导淋巴细胞凋亡,病毒如何损害抗原呈递细胞加工抗原的能力?特别是处于获得性免疫应答核心环节的树突状细胞,埃博拉病毒增殖过程中是否对于不同发育阶段的树突状细胞有所选择^[75]?病毒对于血管内皮细胞直接损伤具体机制如何?目前的疫苗研究,主要限于扎伊尔型埃博拉病毒,缺乏其他型别的研究,并且集中于非人灵长类动物实验。未来应继续深入探讨候选疫苗针对其他型别埃博拉病毒的是否存在差异。未来还需要开展深入细致的实验动物的病原学研究,为制定干预措施提供靶标。同时,有希望的治疗方案和疫苗应向临床实验推进,并为应急处置,如实验室暴露提供储备。

参考文献

- 1 CDC centers for Disease Control and Prevention. 2014 Ebola Outbreak in West Africa. <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/guinea/index.html>
- 2 李昱,任翔,刘翟,等.埃博拉病毒病:流行病学、生态学、诊断、治疗及控制.科技导报,2014,32(24):15-24
- 3 WHO. WHO Statement on the Meeting of the International Health Regulations Emergency Committee Regarding the 2014 Ebola Outbreak in West Africa.[2014-8-10]. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/en/>
- 4 Sanchez A, Geisbert T W, Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Knipe D M, Howley P M, eds. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 1409-1448
- 5 Feldmann H, Geisbert T W, Jahrling P B, et al. Filoviridae. In: Fauquet C, Mayo M A, Maniloff J, et al, eds. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier/Academic Press, 2004. 645-653
- 6 Kiley M P, Bowen E T, Eddy G A, et al. Filoviridae: A taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? Intervirology, 1982, 18: 24-32
- 7 Muhlberger E, Weik M, Volchkov V E, et al. Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. J Virol, 1999, 73: 2333-2342

- 8 Basler C F, Wang X, Muhlberger E, et al. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 12289–12294
- 9 Reid S P, Leung L W, Hartman A L, et al. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol*, 2006, 80: 5156–5167
- 10 Noda T, Sagara H, Suzuki E, et al. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol*, 2002, 76: 4855–4865
- 11 Sanchez A, Trappier S G, Mahy B W J, et al. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 3602–3607
- 12 Sanchez A, Ksiazek T G, Rollin P E, et al. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and non-human primates. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl 1): S164–S169
- 13 Volchkov V E, Becker S, Volchkova V A, et al. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology*, 1995, 214: 421–430
- 14 Groseth A, Feldmann H, Strong J E. The ecology of Ebola virus. *Trends Microbiol*, 2007, 15: 408–416
- 15 WHO. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull World Health Organ*, 1978, 56: 247–270
- 16 WHO. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull World Health Organ*, 1978, 56: 271–293
- 17 Towner J S, Sealy T K, Khristova M L, et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e1000212
- 18 Sanchez A, Geisbert T, Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In: Knipe D M, Howley P M, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001. 1279–1304
- 19 Barrette R W, Metwally S A, Rowland J M, et al. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus. *Science*, 2009, 325: 204–206
- 20 Le Guenno B, Formenty P, Wyers M, et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet*, 1995, 345: 1271–1274
- 21 Jahrling P B, Geisbert T W, Johnson E D, et al. Preliminary report: Isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet*, 1990, 335: 502–505
- 22 Pan Y, Zhang W, Cui L, et al. Reston virus in domestic pigs in China. *Arch Virol*, 2014, 159: 1129–1132
- 23 Carroll S A, Towner J S, Sealy T K, et al. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J Virol*, 2013, 87: 2608–2616
- 24 Baize S, Pannetier D, Oestereich L, et al. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *N Engl J Med*, 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1404505
- 25 Calvignac-Spencer S, Schulze J M, Zickmann F, et al. Clock rooting further demonstrates that Guinea 2014 EBOV is a member of the Zaire Lineage. *PLoS Curr*, 2014, doi: 10.1371/currents.outbreaks.c0e035c86d721668a6ad7353f7f6fe86
- 26 European Centre for Disease Prevention and Control. Outbreak of Ebola virus disease in West Africa. Third update, 1 August 2014. Stockholm: ECDC, 2014
- 27 Zaki S R, Shieh W J, Greer P W, et al. A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola haemorrhagic fever. *Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. J Infect Dis*, 1999, 179 (Suppl 1): S36–S47
- 28 Geisbert T W, Hensley L E, Larsen T, et al. Pathogenesis of Ebola haemorrhagic fever in cynomolgus macaques: Evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol*, 2003, 163: 2347–2370
- 29 Jaax N K, Davis K J, Geisbert T J, et al. Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure. *Arch Pathol Lab Med*, 1996, 120: 140–155
- 30 Baskerville A, Fisher-Hoch S P, Neild G H, et al. Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J Pathol*, 1985, 147: 199–209
- 31 Ryabchikova E I, Kolesnikova L V, Luchko S V. An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl 1): S199–S202
- 32 Geisbert T W, Young H A, Jahrling P B, et al. Pathogenesis of Ebola haemorrhagic fever in primate models: Evidence that haemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells. *Am J Pathol*, 2003, 163: 2371–2382
- 33 Feldmann H, Bugany H, Mahner F, et al. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol*, 1996, 70: 2208–2214
- 34 Bray M, Geisbert T W. Ebola virus: The role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 1560–1566
- 35 Fisher-Hoch S P, Brammer T L, Trappier S G, et al. Pathogenic potential of filoviruses: Role of geographic origin of primate host and virus strain. *J Infect Dis*, 1992, 166: 753–763
- 36 Johnson E, Jaax N, White J, et al. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int J Exp Pathol*, 1995, 76: 227–236

- 37 Ryabchikova E I, Kolesnikova L V, Luchko S V. An analysis of features of pathogenesis in two animal models of Ebola virus infection. *J Infect Dis*, 1999, 179 (Suppl. 1): S199–S202
- 38 Reid S P, Leung L W, Hartman A L, et al. Ebola virus VP24 binds karyopherin $\alpha 1$ and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol*, 2006, 80: 5156–5167
- 39 Basler C F, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, et al. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*, 2003, 77: 7945–7956
- 40 Cardenas W B, Loo Y M, Gale M Jr, et al. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol*, 2006, 80: 5168–5178
- 41 Bosio C M, Aman M J, Grogan C, et al. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis*, 2003, 188: 1630–1638
- 42 Mahanty S, Hutchinson K, Agarwal S, et al. Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol*, 2003, 170: 2797–2801
- 43 Gupta M, Spiropoulou C, Rollin P E. Ebola virus infection of human PBMCs causes massive death of macrophages, CD4 and CD8 T cell sub-populations *in vitro*. *Virology*, 2007, 364: 45–54
- 44 Baize S, Leroy E M, Georges-Courbot M C, et al. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med*, 1999, 5: 423–426
- 45 Reed D S, Hensley L E, Geisbert J B, et al. Depletion of peripheral blood T lymphocytes and NK cells during the course of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques. *Viral Immunol*, 2004, 17: 390–400
- 46 Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol*, 2004, 78: 10370–10377
- 47 Geisbert T W, Hensley L E, Larsen T, et al. Pathogenesis of Ebola haemorrhagic fever in cynomolgus macaques: Evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol*, 2003, 163: 2347–2370
- 48 Yaddanapudi K, Palacios G, Towner J S, et al. Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses. *FASEB J*, 2006, 20: 2519–2530
- 49 Volchkov V E, Blinov V M, Netesov S V. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses. *FEBS Lett*, 1992, 305: 181–184
- 50 Chepurinov A A, Tuzova M N, Ternovoy V A, et al. Suppressive effect of Ebola virus on T cell proliferation *in vitro* is provided by a 125-kDa GP viral protein. *Immunol Lett*, 1999, 68: 257–261
- 51 Oswald W B, Geisbert T W, Davis K J, et al. Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys. *PLoS Pathog*, 2007, 3: 62–66
- 52 Qiu X, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 2014, doi:10.1038/nature13777
- 53 Murphy F A. Pathogenesis of Ebola virus infection. In: Pattyn S R, ed. *Ebola Virus Haemorrhagic Fever*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1978. 43–59
- 54 Feldmann H, Geisbert T W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*, 2011, 377: 849–862
- 55 Sanchez A, Lukwiya M, Bausch D, et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: Cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol*, 2004, 78: 10370–10377
- 56 Furuta Y, Takahashi K, Shiraki K, et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res*, 2009, 82: 95–102
- 57 Falzarano D, Feldmann H. Possible leap ahead in filovirus therapeutics. *Cell Res*, 2014, 24: 647–648
- 58 Huggins J W. Prospects for treatment of viral haemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis*, 1989, 11 (Suppl 4): S750–S761
- 59 Ignatyev G, Steinkasserer A, Streltsova M, et al. Experimental study on the possibility of treatment of some haemorrhagic fevers. *J Biotechnol*, 2000, 83: 67–76
- 60 Fauci A S. Ebola—Underscoring the global disparities in health care resources. *N Engl J Med*, 2014, doi: 10.1056/NEJMp1409494
- 61 Pettitt J, Zeitlin L, Kim do H, et al. Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 199ra113
- 62 Geisbert T W, Hensley L E, Kagan E, et al. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J Infect Dis*, 2006, 193: 1650–1657
- 63 Warfield K L, Swenson D L, Olinger G G, et al. Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog*, 2006, 2: e1
- 64 Geisbert T W, Hensley L E, Jahrling P B, et al. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: A study in rhesus monkeys. *Lancet*, 2003, 362: 1953–1958

- 65 Hensley L E, Stevens E L, Yan S B, et al. Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola haemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 2007, 196 (Suppl 2): S390–S399
- 66 Geisbert T W, Pushko P, Anderson K, et al. Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8: 503–507
- 67 Sullivan N J, Geisbert T W, Geisbert J B, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, 2003, 424: 681–684
- 68 Swenson D L, Wang D, Luo M, et al. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15: 460–467
- 69 Warfield K L, Swenson D L, Olinger G G, et al. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis*, 2007, 196: S430–S437
- 70 Halfmann P, Kim J H, Ebihara H, et al. Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 1129–1133
- 71 Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, et al. Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol*, 2009, 83: 3810–3815
- 72 Bukreyev A, Yang L, Zaki S R, et al. A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol*, 2006, 80: 2267–2279
- 73 Bukreyev A, Rollin P E, Tate M K, et al. Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J Virol*, 2007, 81: 6379–6388
- 74 Geisbert T W, Daddario-Dicaprio K M, Lewis M G, et al. Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog*, 2008, 4: e1000225
- 75 Yang L, Sanchez A, Ward J M, et al. A paramyxovirus-vectored intranasal vaccine against Ebola virus is immunogenic in vector-immune animals. *Virology*, 2008, 377: 255–264

Ebola Virus Disease: virology, pathogenesis, therapy, and vaccines

CHENG Ying¹, LIU Jun², LI Yu¹, LIU Zhai³, REN Xiang¹, SHI Yi^{4,5}, GAO George F^{4,5,6} & YU HongJie¹

¹ Division of Infectious Disease, Key Laboratory of Surveillance and Early-warning on Infectious Disease, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

² National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

³ Information Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁴ Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁵ CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁶ Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Outbreaks of Ebola virus disease (EVD) have been occurring in West Africa (Guinea, Liberia, Sierra Leone, and Nigeria) since December 2013. The etiological agent of this disease, a member of the *Ebolavirus* genus, was first recognized in 1976. *Ebolaviruses* have a non-segmented, enveloped, negative-sense RNA genome and are members of the *Filoviridae* family. There are five recognized species within the *Ebolavirus* genus: Zaire ebolavirus (EBOV), Sudan ebolavirus (SEBOV), Taï Forest ebolavirus (TAFV), Bundibugyo ebolavirus (BDBV), and Reston ebolavirus (RESTV). The genomes of these viruses contain trailer sequences at the 3' and 5' ends, and genes encoding the following proteins (from the 3' to the 5' end): NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, and L. *Ebolaviruses* are classified as category A pathogens, and should be operated under biosafety level four laboratory conditions. The target cells of *Ebolaviruses* are hepatocytes, endothelial cells, macrophages, and dendritic cells. By depressing innate and adaptive immune responses and increasing vascular permeability, the viruses cause lesions on the liver and other organs. Symptoms of EVD include fever, hemorrhaging, dysfunction, and septic shock. There are currently no licensed antiviral drugs or vaccines against EVD. Therapies under development, or that have been studied in phase I clinical trials, include: the anti-influenza drug T-705, which possibly prevents virus replication in cells; ZMapp, an optimized “cocktail” therapy that includes three humanized antibodies; TKM-Ebola, an RNA interference-based gene therapy; and modulators of coagulation and inflammation. Vaccines under development include replication-deficient vaccines with good safety but long induction times, and live attenuated vaccines with good efficacy but some safety concerns. Further investigation into virology, immunopathology, and pathogenesis of *Ebolaviruses* will benefit drug and vaccine research and development. At the same time, promising therapies and vaccines should be fast-tracked to human clinical trials.

Ebolavirus, genome, immunity, pathogenic mechanism, therapy drug, vaccine

doi: 10.1360/N972014-00884