

诺如病毒及其疫苗的研究进展

段素琴 和占龙

摘要 诺如病毒(Norovirus, NoVs)是引起世界各地急性胃肠炎的主要病原体,由于该病毒分子进化快、剂量感染低、持续排毒久、传播途径多等原因导致其流行较为严重,据世界卫生组织(WHO)统计,每年有超过1亿人感染诺如病毒,并且引起数万人死亡,是严重危害全球公共卫生的主要病原体之一,因此对于该病毒及其疫苗的研究刻不容缓。迄今,研究者们已经克服了技术障碍,在诺如病毒生物学等方面的研究已取得较为显著的成果,开发了诺如病毒检测的滴液微流体技术、开展了人类诺如病毒体外培养、诺如病毒恒河猴动物模型建立、NoVs病毒样颗粒疫苗研究等,为今后的诺如病毒及疫苗研发奠定重要的研究基础。但是,由于诺如病毒存在着基因多样性、难以体外培养、缺乏有效的动物模型等问题,使得其疫苗的研发目前仍处于瓶颈期。本文在介绍NoVs病原学和流行病的基础上,着重从病毒感染检测方法、体外培养、动物模型、疫苗研发进展等几个方面对诺如病毒的研究现状进行全面综述和展望。

关键词 诺如病毒 检测技术 动物模型 体外培养 疫苗 研究进展

中图分类号 R31

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.045

诺如病毒(Norovirus)是一组形态相似、抗原性略有不同的杯状病毒科单股正链RNA病毒,是引起非细菌性急性胃肠炎暴发的主要病原体,会引起世界范围内较严重的疾病负担。1929年由诺如病毒引起的“冬季呕吐病”首次被报道,接下来1968年在美国诺瓦克市暴发的一次急性腹泻的患者粪便中分离得到,1972年Kapikion等在免疫电镜下观察到了诺克瓦病毒,发现其直径约为27nm。最后,第八届国际病毒命名委员会于2002年8月命名其为诺如病毒。世界范围内针对病情报道、检测技术研究、模型构建、疫苗研究等方面的研究日益增加,本文主要概述诺如病毒的病原学特性、流行病学、检测技术、模型构建和疫苗研发情况。

一、NoVs病原学及流行病学特征

1. 病原学特征:NoVs直径为26~35nm,无包膜,呈球形,由90个衣壳蛋白VP1二聚体构成正二十面体结构。基因组全长约7642nt,包括3个开放阅读框(ORF1、ORF2、ORF3)。最新研究发现,GⅡ的VP1的进化多样性可能与GⅡ的严格约束相关,决定病毒形态及抗原性^[1]。VP2参与病毒衣壳的构建,并有助于衣壳蛋白的稳定。另外,经证实表明NoVs在60℃

孵育30min后仍然具有感染性,在10ppmCl⁻浓度处理污水中可被灭活^[2]。

2. 流行病学特征:NoVs是食物源性胃肠炎的主要病原体,在全球范围内超过90%的非细菌性胃肠炎疾病的病例都是由该病毒引起的,且近年的感染率呈现逐年上升的态势^[3]。据美国疾病预防控制中心估计,在美国暴发的非细菌性腹泻中,60%~90%是由NoVs感染所致。并且,美国每年约有(1700~1900)万人发病,其中40万例急诊,(5.6~7.1)万例住院治疗,570~800例死亡。然而,由于缺乏完善的分子生物学检测手段,同时又因为病毒的强变异性等特征,NoVs在发展中国家的流行病学信息至今尚不十分清晰^[4]。从世界范围来看,迄今为止已经出现了诸如GⅡ.17、GⅡ.P17-GⅡ.17、GⅡ.P16-GⅡ.2等多种诺如病毒突变株^[2-6]。近期研究提示,除了已知的重组或抗原转移能引发病毒突变之外,非结构蛋白中的点突变也极有可能是导致新型诺如病毒基因型出现的重要原因^[7]。此外,人类诺如病毒与肠道细菌之间的动力学因素可能与诺如病毒的变异和发病机制也有一定的相关性^[8]。总之,要了解更多的诺如病毒变异机制和致病机制,还有待于各方研究机构投入更多的研究精力。

NoVs一年四季均有流行,其高发期为每年的12月~次年3月,可以造成各个年龄阶段的暴发流行,临床症状主要表现为腹泻、呕吐、发热、恶心、腹痛、发热、厌食等。该病毒传染源为患者、隐性感染者、食

基金项目:中国医学科学院医学创新工程项目(CIFMS,2016-12M-2-001)

作者单位:650118 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:和占龙,研究员,硕士生导师,电子信箱:hzl612@126.com

com

物、污染的水源和动物,其中患者及病毒携带者是主要传染源。污水、食物及接触物表面是其传播媒介。主要的传播途径为粪-口途径,其次还包括接触传播、患者呕吐物产生气溶胶传播、动物-人传播。并且,研究表明诺如病毒对免疫缺陷的感染者存在持续性感染的风险^[9]。但更值得注意的是,诺如病毒存在严重的二次传播的危险,同时,该病毒还可能会发生物种间的传播^[10,11]。

二、诺如病毒检测方法

1. 电镜法与免疫学检测方法:电镜法敏感度相对较低,不适于大规模流行病学调查,该方法只在感染初期病毒效价较高时能有效检测病毒。免疫学方法检测 NoVs 经济方便,特异性强,适合实验室检测,但存在一定的假阴性假阳性,所以对其的优化还是很有必要的。最近,有报道显示欧洲有 7 种诺如病毒免疫色谱法(IC)检测试剂盒,都能检测粪便中的菌株,但是针对 G II. 17 基因组试剂盒的敏感度各异^[12]。因此,需要优化一些 IC 检测试剂盒的性能且研发针对多种类型的诺如病毒的 IC 免疫检测试剂盒将是很好的一个研究方向。

2. 分子生物学检测方法:随着分子生物学技术的飞速发展,带来了多种更加敏感、特异的核酸检测方法,是目前检测诺如病毒应用最广泛的手段。但其病毒载量与临床症状的相关性受到重视,参考值尚未确定^[13-16]。Tao 等^[17]运用分子生物学技术和方法,研究出了更为便捷的检测方法——原位捕获 RT-qPCR,该方法可以避免最耗时的 RNA 提取步骤,适用于自动化系统检测多个样本。目前,研究人员正在测试这种方法,已经在食品上做过研究,表明可靠有效,对于是否可以用于实验室检测 NoVs 还有待于进一步的研究确证。

随着技术的不断发展,检查 NoVs 的方法不再局限于电镜法、免疫学和分子生物学,近期有两种肠道病原体分子检测平台(xTAGGPP platform 和 FilmArray GI Panel)问世,可对诺如病毒进行检测,较传统方法更敏感快捷,可用于临床快速检测。在此基础上德国科学家基于纳米技术的便携式检测平台,有望将该检测平台运用于床旁的快速检测^[15,16]。另外,微流体可以有针对性地确定中和抗体对鼠诺如病毒的功效,它的进一步开发和研究无疑会给该病毒的研究奠定一定的基础^[17,18]。此外,随着大规模基因组学的方法迅速发展,且 QIAGEN 二代测序方案助力诺如病毒检测与准确分型,采用 NGS 测序技术可以直接对诺如病毒感染的粪便样本同时获得检测和分型结果。

三、NoVs 体外培养技术

随着对 NoVs 的不断发现和其基因组克隆的成功,近年来科学家在 NoVs 体外细胞培养和感染模型的研究等方面也做出了许多努力,并建立了病毒复制子取得了一些开创性的成果。

1. 重组 NoVs 培养技术:含有部分病毒基因组的病毒复制子能够进行抗病毒药物的筛选和有效性测试,因此组建拥有 NoVs 全部 cDNA 的系统将成为一个很好的突破口。2014 年突破性的研究进展表明,通过将病毒基因组和衣壳蛋白相结合,构建了完整的 NoVs 逆转基因系统,可利用该系统成功地表达出含有绿色荧光蛋白 GFP 的重组 NoVs。重组 NoVs 的构建有助于在体内和体外鉴定诺如病毒易感细胞,从而更高效的建立一套有利于诺如病毒体外扩增的培养技术。利用表达 GFP 的重组 NoVs,研究者可以通过荧光和高通量等技术手段对初级细胞和已建立细胞的低水平感染进行检测。并且,将重组 NoVs 病毒与体外 B 细胞感染模型相结合,可以相对有效地分析和探测培养细胞中的病毒感染情况。

2. 病毒样颗粒(VLPs)培养技术:VLP 是诺如病毒的病毒样颗粒,是研究 NoVs 感染和免疫学机制等方面较好的材料。日前,已经开发了许多蛋白质表达系统,包括昆虫细胞,人类细胞(293T, Caco-2)和植物细胞等。研究显示 VLP 在体外可以直接结合宿主细胞表面的血型抗原分子 HBGA,从而表明 HBGA 是 hNoVs 的细胞受体,由此确定了 VLP 在诺如病毒与宿主细胞的相互作用方面发挥了关键作用。同时 VLP 耐酸、耐热,具有抗原性和免疫原性,可刺激机体产生免疫反应,为 VLP 疫苗的研发奠定了重要基础。

3. 3D 细胞培养技术:近年来科学家开发了 3D 培养技术,帮助改善了多种致病菌和病毒的感染及其培养微环境。在以往的研究中发现,3D 中各种细胞类型的共培养物导致诺如病毒感染率偏低。近年来,研究者利用 3D 技术,成就了人类肠道上皮细胞培养系统,在长达 5 年的努力研发后,最终建立了一个人类诺如病毒可以生长的体外细胞培养系统^[19]。该系统不仅有助于对 NoVs 感染发病机制的了解、还为不同个体易感性差异和流行病毒的基础研究打下了扎实的基础,同时为 NoVs 疫苗和药物研发提供了前景可观的研究平台,为构建动物体内建模提供了重要参考依据。

然而,人肠道组织的有限性为病毒的大规模生产及疫苗的生产带来了局限性。因此,迫切的需要找到一个能用于复制人诺如病毒的组织细胞培养系统来

替代人类肠道组织。总之, NoVs 体外培养模型的构建有很大的进展, 3D 细胞培养技术的完善无疑会成为未来发展的一个方向。

四、NoVs 动物模型

迄今为止已经有部分动物模型用于研究 NoVs, 将 NoVs 注入某些动物体内, 能够使病毒复制, 同时引起轻度腹泻和特异的免疫反应, 其中鼠诺如病毒 (MoVs) 模型主要用于研究病毒疫苗、特异性免疫应答和病毒感染机制。

1. 小鼠模型: 目前, 小鼠是用于研究该病毒较常用的模型。MoVs 在分子生物学、遗传学上的特征都与 NoVs 基本一致, 而且几乎所有的实验小鼠都能感染 MoVs, 因此 MoVs 已成为研究人类 NoVs 的替代病毒。通过与 NoVs 相同的粪口途径发生, 该病毒能感染鼠树突状细胞和巨噬细胞系 RAW264.7。然而, 用 MoVs 模型来研究 NoVs 的感染仍具有明显的局限性: ① MoVs 感染的小鼠不会出现类似于 NoVs 感染的腹泻或呕吐等症状; ② MoVs 模型的小鼠长期感染与 NoVs 的急性感染症状不相同; ③ 相对于 MoVs 模型, NoVs 在体外不能感染单核细胞衍生的巨噬细胞和树突状细胞。因此, 需要开发与人类 NoVs 感染更为接近的动物模型。

2. 大型动物模型: 除了小鼠, 近期研究人员对携带多等位基因修饰的遗传工程 (GE) 大型动物也进行了一系列诺如病毒模型研究, 利用 CRISPR/Cas9 技术迅速获得 RAG2/IL2RG 双重敲除猪, 将 NoVs 直接注入发育中的猪胚胎, 发现 NoVs 能在该缺陷型猪中感染并迅速增殖。因此, GE 免疫缺陷型生殖猪作为生物医学研究的新模型, 将促进 NoVs 的相关研究^[20]。

对于 NoVs 动物模型的构建, 研究者们不仅止步于猪牛, 他们也与人类更为接近的灵长类进行了相应的研究。最近有团队研究表明, 人诺如病毒诺瓦克株通过静脉注射恒河猴后, 鉴定到与人 G II.17 型诺如病毒具有高度同源性的病毒, 说明人诺如病毒可以自然感染非人类灵长类动物。虽然恒河猴的模型构建存在品种较昂贵、动物来源比较困难等局限性, 但是对于未来建立疫苗和抗病毒评估的诺如病毒感染的猴模型、对未知品种病毒的研究、对有可能的物种之间的传播的研究都有很好的意义, 将对未来发展抗病毒药物和疫苗起到关键作用。

五、NoVs 疫苗研发进展

在疫苗研发方面, 由于诺如病毒基因多样且高度变异, 因此迄今为止均无有效的上市疫苗。诺如病毒

的抗体可以起到一定的免疫保护作用, 但效果并不明显, 因为适应性免疫保护通常是在下一季的病毒流行开始前即接近失效了^[21]。但是人诺如病毒负荷试验研究显示, 病毒感染后可以引起研究对象的 T 细胞免疫应答及一定程度的分泌性 IgA 免疫应答, 因此学者们仍然对诺如病毒疫苗前景持相对乐观的态度^[22,23]。目前, 诺如病毒疫苗的研发主要集中在以下 3 方面:

1. 病毒样颗粒疫苗: 诺如病毒 VP1 蛋白可形成病毒样颗粒 (VLP), 利用包括昆虫、动物和植物在内的各大系统表达该 VLP, 经血清 IgG 和黏膜 IgA 反应, 该病毒颗粒的形状和免疫原性均与天然诺如病毒十分相似, 且该颗粒能诱导出较高水平的抗体反应。日本 Takeda 公司基于 VLP 开发的 NoVs 疫苗 TAK-214 目前已经处于临床试验 II 期阶段, 数据统计结果显示该疫苗具备良好的耐受性。同期, Guo 等^[24]利用重组腺病毒系统表达诺如病毒的衣壳蛋白, 通过滴鼻实验免疫小鼠后, 能够产生比较有效的免疫应答, 此项研究为诺如病毒疫苗的开发提供了重要策略。

在研究 VLP 疫苗的基础上, 很多研究者致力于开发便捷的嵌合双价疫苗, 将诺如病毒的 P 端融合到 HEV 的 P 端, 原核表达 NoVs P-HEVP 融合蛋白, 经实验证明免疫小鼠后可产生高滴度的中和抗体。VLP 的抗 EV71/G II.4 二联疫苗也有一定的可行性和有效性。嵌合双价疫苗的研究为进一步的临床研究奠定了基础, 同时建立对嵌合双价疫苗疗效的多层次多方面的评价体系, 也是对未来临床研究结果可靠性和病毒样颗粒疫苗安全性有效性评价的重要策略。

2. P 颗粒疫苗: P 颗粒疫苗是继 VLP 疫苗外另一研究热点, 诺如病毒的 P 颗粒具有一定的免疫原性, 适用于研制仅用病毒的主要表面蛋白质构成的亚单位疫苗, 可以避免产生一些无关抗体, 进而可以减少疫苗引起的不良反应。由于 P 颗粒疫苗易构建, 可用于开展季节性诺如病毒疫苗的研究, 现有的研究显示 P 颗粒疫苗可诱导实验动物产生与 VLP 疫苗相近的免疫原性和保护效果。但因其免疫原性较低, 需要与佐剂联合使用才能产生比较好的免疫保护效果。2016 年有研究机构成功表达并纯化了猴源性诺如病毒亚病毒颗粒蛋白, 同时与佐剂联合免疫小鼠后得到了高免疫原性的多抗, 为亚单位疫苗的研发奠定了重要基础。

3. 减毒活疫苗: 因其高免疫性和长期有效, 以减毒活病毒为载体的 VLP 疫苗也得到了越来越多的关

注和重视。其中采用减毒水疱性口炎病毒(VSV)构建的VSV-VLP疫苗,将NOVs-VPI插入VSV减毒病毒基因组中,可以在体内外表达NOVs-VLP蛋白,具有生产便捷、免疫原性强等特点,但由于载体病毒的减毒问题,其安全性尚需进一步研究。总之,虽然目前第1个VLP疫苗已进入第2期临床试验,但是其保护作用仍然非常有限,此外还有较多疫苗目前尚处在临床前期的研发阶段。

六、展 望

诺如病毒是引起全球范围病毒性胃肠炎和腹泻的最主要病原体之一,可导致儿童、老年人以及免疫异常人群转为慢性疾病或者死亡。无论是在发展中国家还是发达国家,均可导致暴发流行。虽然诺如病毒疫苗的研发目前已经取得了诸多可观的进展,但该疫苗的研制仍然面临着巨大的挑战。NoVs变异快,病毒遗传多样性。诺如病毒基因型间抗原差异大,与HBGAs的结合方式也在随时变化,且HBGAs在人群中具有高度多态性。诺如病毒的体外培养体系不够完善,并且存在诺如病毒的动物来源困难、临床症状不明显以及费用昂贵等问题。计划免疫程发病机制认识不够清楚。缺乏完善的动物模型,建立的模型存在实验要求高、程序复杂、疫苗不良反应事件、临床试验中的安全性等因素,阻碍了疫苗的研发和推广。同时,对于人类诺如病毒感染和发病后的免疫力方面的研究仍然很有限,并且诺如病毒感染后仅产生短期免疫力,尽管人和鼠诺如病毒的细胞培养已取得了一定的进展,但对其疫苗的研发仍需投入更多的精力。相信随着科学技术的进步,加上诸专家团队的不懈努力,有望在不久的将来研发出安全有效、廉价方便的诺如病毒疫苗,从而全方位有效控制全球NoVs的大规模流行。

参考文献

- Mori K, Motomura K, Somura Y, *et al.* Comparison of genetic characteristics in the evolution of Norovirus GⅡ.4 and GⅡ.17[J]. J Med Virol, 2017, 89(8):1480-1484
- Chan MCW, Kwok K, Hung TN, *et al.* Complete genome sequence of an emergent recombinant GⅡ.P16-GⅡ.2 Norovirus strain associated with an epidemic spread in the winter of 2016-2017 in Hong Kong, China[J]. Genome Announcements, 2017, 5(20):e00343-17
- Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, *et al.* The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(8):724-730
- Steer AC, Carapetis JR, Dale JB, *et al.* Status of research and development of vaccines for Streptococcus pyogenes[J]. Vaccine, 2016, 34(26):2953-2958
- De GM, Van BJ, Vennema H, *et al.* Emergence of a novel GⅡ.17 norovirus - End of the GⅡ.4 era? [J]. Euro Surveill, 2015, 20

- (26)pii: 21178
- Koo E S, Kim M S, Choi Y S, *et al.* Occurrence of novel GⅡ.17 and GⅡ.21 norovirus variants in the coastal environment of South Korea in 2015. [J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0172237
- Kazama S, Miura T, Masago Y, *et al.* Environmental surveillance of norovirus genogroups I and II for sensitive detection of epidemic variants [J]. Appl Environment Microbiol, 2017, 83(9):AEM.03406-16
- Almand E A, Moore M D, Outlaw J, *et al.* Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota[J]. PLoS One, 2017, 12(3):e0173124
- Ye X, Van J N, Munoz F M, *et al.* Noroviruses as a cause of diarrhea in immunocompromised pediatric hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients [J]. Am J Transplant, 2015, 15(7):1874-1881
- Cui C, Pan L, Wang Y, *et al.* An outbreak of acute GⅡ.17 norovirus gastroenteritis in a long-term care facility in China: The role of nursing assistants[J]. J Infect Public Health, 2017, 10(6):725-729
- He Z, Bo L, Tao Y, *et al.* Norovirus GⅡ.17 natural infections in rhesus monkeys, China[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(2):316
- Tao Y, Rotem A, Zhang H, *et al.* Artifact-free quantification and sequencing of rare recombinant viruses by using drop-based microfluidics[J]. ChemBiochem A Eur J Chem Biol, 2015, 16(15):2167
- Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2):373-381
- Zhou Z, Tian Z, Li Q, *et al.* In situ capture RT-qPCR: a new simple and sensitive method to detect human norovirus in oysters[J]. Front Microbiol, 2017, 8:554
- Nakatsuka K, Shigeto H, Kuroda A, *et al.* A split G-quadruplex-based DNA nano-tweezers structure as a signal-transducing molecule for the homogeneous detection of specific nucleic acids. [J]. Biosensors Bioelectron, 2015, 74:222
- Koromyslova AD, Hansman GS. Nanobody binding to a conserved epitope promotes norovirus particle disassembly[J]. J Virol, 2015, 89(5):2718-30
- Tao Y, Rotem A, Zhang H, *et al.* Rapid, targeted and culture-free viral infectivity assay in drop-based microfluidics[J]. Lab on A Chip, 2015, 15(19):3934
- Fischer AE, Wu SK, Proescher JB, *et al.* A high-throughput drop microfluidic system for virus culture and analysis. [J]. J Virol Methods, 2015, 213:111-117
- Zou WY, Blutt SE, Crawford SE, *et al.* Human intestinal enteroids: new models to study gastrointestinal virus infections. [J]. Methods Mol Biol, 2017, 7:332
- Lei S, Junghyun R, Ke W, *et al.* Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency[J]. Sci Rep, 2016, 6:25222
- Blazevic V, Malm M, Salminen M, *et al.* Multiple consecutive norovirus infections in the first 2 years of life[J]. Eur J Pediatr, 2015, 174(12):1679-1683
- Newman K L, Moe C L, Kirby A E, *et al.* Human norovirus infection and the acute serum cytokine response[J]. Clin Exp Immunol, 2015, 182(2):195-203
- Lindesmith L C, Beltramello M, Swanstrom J, *et al.* Serum immunoglobulin A cross-strain blockade of human noroviruses[J]. Open Forum Infect Dis, 2015, 2(3):ofv084
- Guo L, Zhou H, Wang M, *et al.* A recombinant adenovirus prime-virus-like particle boost regimen elicits effective and specific immunities against norovirus in mice[J]. Vaccine, 2009, 27(38):5233-5238

(收稿日期:2017-09-06)

(修回日期:2017-10-07)