

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00188

埃博拉病毒的研究进展

徐庆强[△], 唐海琳[△], 戚中田^{*}

第二军医大学热带医学与公共卫生学系生物防御(微生物学)教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

[摘要] 埃博拉病毒是迄今发现的最凶险、对人类生命危害最大的病毒之一,能在人类和非人灵长类动物中引起严重的埃博拉出血热,病死率可高达90%,并且目前还没有有效的疫苗和治疗药物。面对埃博拉病毒带来的挑战,针对该病毒的实验室诊断、治疗药物以及疫苗的研究已经成为病毒学领域的热点。本文就埃博拉病毒的起源与流行、分子生物学特性、致病机制、病原检测及疫苗研究的新进展作一综述。

[关键词] 埃博拉病毒; 流行病学; 致病机制; 诊断; 疫苗

[中图分类号] R 373.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)02-0188-05

Research progress on Ebola virus

XU Qing-qiang[△], TANG Hai-lin[△], QI Zhong-tian^{*}

Department of Biological Prevention (Microbiology), Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Shanghai 200433, China

[Abstract] Ebola virus is a highly virulent pathogen which can cause severe viral hemorrhagic fever in humans and non-human primates, with the case fatality rates being as high as 90%. Currently, there is neither a specific treatment nor a vaccine licensed for use in humans. The challenge brought by the Ebola epidemic has promoted the following research focuses: specific and sensitive detection techniques, safe and effective vaccines and drugs. Here, we summarized the epidemiology, biology and pathogenesis of ebola virus, as well as the recent advances in diagnosis and vaccines for prevention of Ebola hemorrhagic fever.

[Key words] Ebola virus; epidemiology; pathogenesis; diagnosis; vaccines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(2): 188-192]

埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)是迄今发现的致死率最高的病毒之一,其流行局限在中非和西非,通常由血液和其他体液传播,传播速度很快,感染性极强。人类或其他灵长类动物被 EBOV 感染后,可导致埃博拉出血热(Ebola haemorrhagic fever, EBHF),病死率可达 50%~90%^[1]。鉴于 EBOV 的致病力以及能在人-人间传播且无特效的抗病毒药物和治疗方法,世界卫生组织(WHO)已将其列为对人类危害最严重的“生物安全第 4 级病毒”,并将其列为潜在的生物战剂^[2]。

1 EBOV 的起源和流行

1976 年,一场突如其来的出血热疫情在非洲中部扎伊尔(1997 年易名刚果民主共和国)北部小城扬布库暴发并导致多人死亡,其病原体后来被鉴定

为一种新的病毒,以流经本地的埃博拉河的名字被命名为 EBOV,和马尔堡病毒(Marburg virus, MBV)组成新的丝状病毒科^[3]。也是在 1976 年,苏丹西南部也发生不明原因的传染病流行,其病原体后来也被确认为 EBOV^[4]。迄今为止,根据 EBOV 的发生地和抗原特性,EBOV 可以分为 5 个亚型:扎伊尔型 EBOV(Zaire ebolavirus)、苏丹型 EBOV(Sudan ebolavirus)、本迪布焦型 EBOV(Bundibugyo ebolavirus)、塔伊森林型 EBOV(TaiForest ebolavirus)以及莱斯顿型 EBOV(Reston ebolavirus)。不同亚型病毒基因组核苷酸构成差异较大,但同一亚型的病毒基因组相对稳定^[5]。其中,扎伊尔型 EBOV、本迪布焦型 EBOV 和苏丹型 EBOV 与非洲 EBHF 大型疫情相关,而莱斯顿型 EBOV 和塔伊森林型 EBOV 则与之无关。莱斯顿型 EBOV 是 1989

[收稿日期] 2014-08-23 **[接受日期]** 2015-01-07

[作者简介] 徐庆强,博士生。E-mail: xqingqiang1027@126.com; 唐海琳,博士,讲师。E-mail: hailint@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

^{*}通信作者(Corresponding author). Tel:021-81870998, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

年从菲律宾输出至美国的短尾猴中分离获得, 该种病毒亚型只会使灵长类动物发病, 对人类不致病^[6]。

蝙蝠很可能是 EBOV 的主要自然宿主, 在自然界携带 EBOV 的蝙蝠唾液污染过的水果和树叶, 极有可能将病毒传染给大猩猩、猴、小羚羊、豪猪等食草类哺乳动物, 而人类可通过接触带病动物的体液或进食这类野生动物或带毒蝙蝠而感染^[7]。接触传播是最主要的人-人传播途径。患者或动物的血液及其他体液, 如呕吐物、分泌物、排泄物等均具有高度的传染性。吸入感染性的分泌物、排泄物等也可造成感染。医护人员在治疗、护理患者时, 或处理患者尸体过程中容易受到感染, 医院内传播是导致

EBHF 暴发流行的重要因素^[8]。

EBOV 主要呈现出地方性、间歇性流行的特征, 疫源地主要位于中西非热带雨林和东南非洲的热带大草原。非洲以外地区偶有病例报道, 但均属于输入性或实验室意外感染^[9]。而此次西非埃博拉病毒疫情暴发于 2014 年 2 月, 始于几内亚, 随后蔓延至塞拉利昂、利比里亚及尼日利亚等西非国家(表 1)。本次疫情中流行的的病毒株属扎伊尔型 EBOV。根据 WHO 实况报道, 截至 2015 年 1 月 18 日, EBOV 暴发感染病例数达到 21 296 人, 其中 8 429 人死亡, 是自 1976 年发现埃博拉病毒以来最严重的疫情, 已被 WHO 正式列为国际间关注的公共卫生紧急事件^[10]。

表 1 历史上病例数超过 50 例的埃博拉出血热暴发流行情况统计^[10]

Table 1 Previous Ebola hemorrhagic fever outbreaks with more than 50 cases^[10]

Year	Country	Ebolavirus species	Cases <i>n</i>	Deaths <i>n</i>	Case fatality %
1976	Democratic Republic of Congo	Zaire	318	280	88
1976	Sudan	Sudan	284	151	53
1994	Gabon	Zaire	52	31	60
1995	Democratic Republic of Congo	Zaire	315	254	81
1996	Gabon	Zaire	92	67	73
2000	Uganda	Sudan	425	224	53
2001-2003	Congo/Gabon	Zaire	302	254	84
2007	Democratic Republic of Congo	Zaire	264	187	71
2007	Uganda	Bundibugyo	149	37	25
2012	Democratic Republic of Congo	Bundibugyo	57	29	51
2014-2015	Guinea/Sierra Leone/Liberia et al	Zaire	21 296 ^a	8 429	40

^a: As of January 18, 2015, the World Health Organization (WHO) reported cases

2 EBOV 的生物学特性

EBOV 属丝状病毒科, 该科另一成员为马尔堡病毒。EBOV 在电镜下一般呈线形结构, 但也有分支、呈“6”字形、环形或 U 型结构。病毒体直径 70~90 nm, 长度 300~1 500 nm 左右^[11]。EBOV 基因组是单股负链 RNA, 包含 18 959 个碱基, 编码 7 种蛋白质, 基因顺序为 3-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5。基因序列两端有保守的互补序列, 具有重要的调节病毒的转录、复制和新病毒颗粒包装等作用。病毒最外层为病毒包膜, 由源自宿主细胞的双层脂质膜和嵌入膜内的糖蛋白(GP)三聚体刺突组成, 包膜内是螺旋状核衣壳, 由单链 RNA 和 4 种蛋白(NP、VP30、VP35 和 L)共同组成。包膜与核衣壳之间是基质蛋白 VP40 和 VP24^[12]。

EBOV 通过其表面的 GP 与细胞表面的受体作用而进入细胞内, 能够感染巨噬细胞、树突状细胞、肝细胞、肾上腺皮质细胞和成纤维细胞等细胞。侵入细胞的多样性提示病毒受体可能非单一, 但目前所知受体还非常有限^[13]。EBOV 可在非洲绿猴肾 Vero 细胞、人脐带血内皮细胞和人原代细胞等许多不同类型的细胞中培养, 并均能得到很高滴度。小鼠、豚鼠、叙利亚仓鼠以及非人灵长类动物(non-human primates, NHPs), 如猕猴、恒河猴、非洲绿猴以及狒狒均可作为 EBOV 感染模型^[14]。

3 EBHF 的致病机制

病毒可以从黏膜表面、皮肤擦伤、胃肠表面等进入机体^[15], EBOV 的靶组织和细胞非常广泛, 包括淋巴结单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等免疫相

关细胞^[16],但与一般病毒不同,EBOV可利用这些细胞进行复制,并随着细胞移动而将病毒扩展到其他组织。当病毒进入淋巴或血液中,会引起肝脏、脾脏感染并出现坏死^[17]。感染的单核吞噬细胞被激活,释放大量的细胞因子和趋化因子,使血管内皮细胞通透性增加,内皮细胞表面黏附和促凝因子大量表达,以及组织破坏后血管壁胶原暴露,组织因子释放,最终导致弥散性血管内凝血。EBOV感染晚期可导致脾脏、胸腺和淋巴结等大量淋巴细胞凋亡,患者经常还没有出现有效免疫反应就已经死亡,甚至幸存者恢复期也检测不到病毒中和抗体。皮肤、黏膜及脏器出血是EBOV感染的主要病理改变,很多器官发生灶性坏死,尤以肝脏、淋巴组织为最严重^[18]。EBHF潜伏期为2~21 d,一般5~12 d,患者表现为突发高热、头痛、肌肉痛,高者可达39℃以上,接着出现咽喉痛、恶心、呕吐、腹痛、腹泻和肾衰竭,严重者会出现吐血,早期红色,后期巧克力色或黑色,最终多因休克而死亡^[19]。整个病程大约6~16 d,临床实验报告通常显示凝血异常。

4 EBOV感染的实验室诊断

EBOV对多种细胞系易感,常用Vero和Vero E6细胞进行病毒分离,由于EBOV的分离必须在生物安全第4级(BSL-4)实验室内操作并且样本必须在冷链中保存并在尽可能短的时间送达,而只有发达国家才建有为数不多的BSL-4实验室,因此病毒分离并不能作为诊断EBOV感染的常规方法;套式RT-PCR以及实时荧光定量RT-PCR能在发病后早期从体液中检测出病毒核酸,检测的靶序列集中在GP、NP以及L基因中的片段^[20-21];发病后早期高滴度病毒以及病毒抗原出现在患者血液和组织中,相应地,用ELISA能在发病后3~6 d从绝大多数甚至全部的血液样本中检测到病毒抗原,如NP、VP40和GP蛋白^[22];在发病后2 d、6 d可分别在部分感染者血液中检测到IgM和IgG抗体,而在发病后10 d和19 d可在全部感染者血液中检测到IgM和IgG抗体,其中IgM抗体在发病30 d以后逐渐消失^[23]。在1995年刚果民主共和国、1996年加蓬和2000年乌干达的EBOV暴发期间,套式RT-PCR以及抗原ELISA能敏感、特异用于病原学诊断^[21]。2014年EBOV在西非暴发流行以来,荧光定量RT-

PCR是主要的病原检测手段。

5 埃博拉疫苗研究进展

针对GP糖蛋白的抗体能中和EBOV,因而该蛋白是重要的疫苗候选抗原,灭活疫苗以及以委内瑞拉马脑炎病毒为载体,含EBOV GP基因的RNA复制子疫苗在NHPs均不能有效诱导保护性免疫^[24]。重组GP蛋白、GP-IgG Fc融合蛋白以及GP-GP抗体免疫复合物疫苗在小鼠等啮齿类动物能诱导保护性免疫,但还没有在灵长类动物的试验报道^[25]。EBOV的基质蛋白和GP蛋白共表达可组装成病毒样颗粒(VLPs),该VLPs接种食蟹猴3次,能取得100%的免疫保护^[26]。缺失VP30基因的复制缺陷型EBOV在啮齿类动物可获得良好的免疫保护,但其安全性仍有待观察^[27]。目前,以多种病毒为载体的疫苗在灵长类动物取得了良好的免疫保护效果(表2),其中含GP基因的复制缺陷型5型腺病毒载体疫苗免疫1次,能有效保护NHPs抵抗病毒攻击^[28]。啮齿类和NHPs对该型腺病毒的先存免疫较低,而人类大多对于该型腺病毒具有免疫力,这可导致免疫效果的下降,但可通过增加免疫次数或以在人群中流行不广的血清型,如26、35型腺病毒或黑猩猩腺病毒为载体可克服这个问题^[29]。在小鼠暴露在致死剂量的EBOV 30 min后接种该疫苗仍然具有100%的保护作用,表明该疫苗可用于感染后的应急治疗^[30]。目前,已有数种腺病毒载体疫苗开始了临床试验^[31]。

水疱性口炎病毒(VSV)也是一种非常有潜力的疫苗载体,含EBOV GP基因的复制型重组VSV接种1次即可在灵长类动物获得100%免疫保护,与复制缺陷型腺病毒载体疫苗类似,此种疫苗也具有暴露后的保护作用。小鼠和豚鼠感染致死剂量的EBOV,感染24 h后再注射该疫苗,其存活率分别是100%和50%;而猕猴在感染EBOV 20~30 min后再进行免疫,有50%的保护作用^[32-33]。VSV载体疫苗不存在先存免疫的问题,其具备复制能力,是否会引起人类相关疾病仍有待观察,但目前在灵长类动物实验中还未观察到不良反应。此外,以含有EBOV GP基因的复制型人流感病毒(HPIV)为载体的疫苗也在NHPs中取得良好的免疫保护效果^[34]。

表2 埃博拉疫苗及试验简况^[1,28-34]Tab 2 Ebola vaccine tested in rodents and non-human primates^[1,28-34]

Vaccine platform	Targets in vaccine	Therapeutic efficacy	Concerns
Recombinant denovirus serotype 5 (rAd5)	GP, GP+NP	Efficacy in rodents and non-human primates; clinical trials	Pre-existing immunity; high dose
Rare adenovirus serotypes (rAd26 prime/rAd35 boost)	GP	Efficacy in rodents and non-human primates	Boost immunization required
Vesicular stomatitis virus (VSV)	GP	Efficacy in rodents and non-human primates	Safety (replication competent)
Human parainfluenza virus type (HPIV-3)	GP, GP+NP	Efficacy in rodents and non-human primates	Boost immunization required; Safety Replication competent)
Venezuelan equine encephalitis virus (VEE) replicon	GP	Efficacy in rodents and non-human primates	Boost immunization required
Virus-like particles (VLPs)	GP+NP+VP40	Efficacy in rodents and non-human primates	Boost immunization required; production

6 展望

当前 EBOV 流行的发病和死亡人数都已远超历史水平,其中重要的原因是疫情早期没有得到足够的重视而错失最佳防控时机。可幸的是,经过国际社会努力之后,目前疫情得到了控制。本次疫情将促进国际社会,尤其是西非国家对 EBOV 的重视。西非国家将改进疾病控制机制,包括更安全的丧葬习俗、更早的发现病例,更多的医疗工作者以及提高公众认识的宣传活动。在治疗方面,烟草重组表达的单抗 ZMapp 在本次疫情中的 2 名 EBOV 感染的美国医护人员身上显示出较好的效果,但由于样本少,ZMapp 抗埃博拉病毒的有效性还未能充分证明^[35]。目前几种最有希望的 EBOV 疫苗只证实保护 NHPs 有效,对人类的保护也未得到证实^[31]。因此,未来一段时间,国际社会将会对 EBOV 感染的防治药物与疫苗投入更多支持,药物和疫苗的研究将会有根本性的改变,以彻底控制 EBOV。

7 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Feldmann H, Geisbert T W. Ebola haemorrhagic fever [J]. *Lancet*, 2011, 377:849-862.
 [2] Sanchez A, Geisbert T W, Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses[M]//Fields B N, Knipe D M, Howley P M. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1410-1448.
 [3] Colebunders R, Borchert M. Ebola haemorrhagic fever-a

review [J]. *J Infect*, 2000, 40:16-20.

[4] WHO. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team [J]. *Bull World Health Organ*, 1978, 56: 247-270.
 [5] Towner J S, Sealy T K, Khristova M L, Albariño C G, Conlan S, Reeder S A, et al. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4:e1000212.
 [6] Jahrling P B, Geisbert T W, Dalgard D W, Johnson E D, Ksiazek T G, Hall W C, et al. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA [J]. *Lancet*, 1990, 335: 502-505.
 [7] Groseth A, Feldmann H, Strong J E. The ecology of Ebola virus [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15:408-416.
 [8] Wilson J A, Bosio C M, Hart M K. Ebola virus: the search for vaccines and treatments [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(12-13):1826-1241.
 [9] Feldmann H, Wahl-Jensen V, Jones S M, Ströher U. Ebola virus ecology: a continuing mystery [J]. *Trends Microbiol*, 2004, 12:433-437.
 [10] Ebola virus disease[R]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/> (2014-09)[2015-01-22]
 [11] Kiley M P, Bowen E T, Eddy G A, Isaacs M, Johnson K M, McCormick J B, et al. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? [J]. *Intervirology*, 1982, 18(1-2):24-32.
 [12] Cook J D, Lee J E. The secret life of viral entry glycoproteins: moonlighting in immune evasion [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9:e1003258.
 [13] Schoepp R J, Rossi C A, Khan S H, Goba A, Fair J N. Undiagnosed acute viral febrile illnesses, Sierra Leone [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20:1176-1182.
 [14] Nakayama E, Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections [J]. *Front Microbiol*, 2013, 4:267.

- [15] Dowell S F, Mukunu R, Ksiazek T G, Khan A S, Rollin P E, Peters C J. Transmission of Ebola haemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit*[J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl):S87-S91.
- [16] Geisbert T W, Hensley L E, Larsen T, Young H A, Reed D S, Geisbert J B, et al. Pathogenesis of Ebola haemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163:2347-2370.
- [17] Casillas A M, Nyamathi A M, Sosa A, Wilder C L, Sands H. A current review of Ebola virus: pathogenesis, clinical presentation, and diagnostic assessment [J]. *Biol Res Nurs*, 2003, 4:268-275.
- [18] Geisbert T W, Young H A, Jahrling P B, Davis K J, Larsen T, Kagan E, 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[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163:2371-2382.
- [19] Paessler S, Walker D H. Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8:411-440.
- [20] Formenty P, Leroy E M, Epelboin A, Libama F, Lenzi M, Sudeck H, et al. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42:1521-1526.
- [21] Towner J S, Rollin P E, Bausch D G, Sanchez A, Crary S M, Vincent M, et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome[J]. *J Virol*, 2004, 78:4330-4341.
- [22] Zaki S R, Shieh W J, Greer P W, Goldsmith C S, Ferebee T, Katshitshi J, et al. A novel immunohistochemical assay for the detection of Ebola virus in skin: implications for diagnosis, spread, and surveillance of Ebola hemorrhagic fever. *Commission de Lutte contre les Epidémies à Kikwit* [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179 (Suppl 1):S36-S47.
- [23] Ksiazek T G, Rollin P E, Williams A J, Bressler D S, Martin M L, Swanepoel R, et al. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995[J]. *J Infect Dis*, 1999, 179 (Suppl 1):S177-S187.
- [24] Pushko P, Bray M, Ludwig G V, Parker M, Schmaljohn A, Sanchez A, et al. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus [J]. *Vaccine*, 2000, 19:142-153.
- [25] Phoolcharoen W, Dye J M, Kilbourne J, Piensook K, Pratt W D, Arntzen C J, et al. A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal Ebola virus challenge [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108:20695-20700.
- [26] Warfield K L, Swenson D L, Olinger G G, Kalina W V, Aman M J, Bavari S. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge[J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(Suppl 2):S430-S437.
- [27] Halfmann P, Ebihara H, Marzi A, Hatta Y, Watanabe S, Suresh M, et al. Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate[J]. *J Virol*, 2009, 83:3810-3815.
- [28] Sullivan N J, Geisbert T W, Geisbert J B, Xu L, Yang Z Y, Roe-derer M, et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates[J]. *Nature*, 2003, 424:681-684.
- [29] Geisbert T W, Bailey M, Hensley L, Asiedu C, Geisbert J, Stanley D, et al. Recombinant adeno-virus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against Ebola virus challenge[J]. *J Virol*, 2011, 85:4222-4233.
- [30] Richardson J S, Yao M K, Tran K N, Croyle M A, Strong J E, Feldmann H, et al. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine[J]. *PLoS One*, 2009, 4:e5308.
- [31] Sridhar S. Ebola and Marburg vaccines for Africa: one step closer[J]. *Lancet*, 2014, 22, pii: S0140-6736(14)62445-4.
- [32] Feldmann H, Jones S M, Daddario-Dicaprio K M, Geisbert J B, Stroher U, Grolla A, et al. Effective post-exposure treatment of Ebola infection[J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3:e2.
- [33] Geisbert T W, Daddario-DiCaprio K M, Williams K J, Geisbert J B, Leung A, Feldmann F, et al. Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates[J]. *J Virol*, 2008, 82:5664-5668.
- [34] Bukreyev A, Yang L, Zaki S R, Shieh W J, Rollin P E, Murphy B R, et al. A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge[J]. *J Virol*, 2006, 80:2267-2279.
- [35] Rubin E J, Baden L R. Out of Africa—caring for patients with Ebola[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371:2430-2432.