

李怡然,师长宏,赵勇,等. 基于登革病毒免疫逃逸机制的小鼠感染模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 390-396.

Li YR, Shi CH, Zhao Y, et al. Research progress in mouse infection models based on the immune escape mechanism of dengue virus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 390-396.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.03.014

基于登革病毒免疫逃逸机制的小鼠感染模型研究进展

李怡然^{1,2}, 师长宏², 赵勇², 吕玉红^{1*}, 张彩勤^{2*}

(1. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 登革病毒(dengue virus, DENV)感染是世界上虫媒传播最广的病毒性疾病,感染人体后可出现轻型和严重程度不同的登革热疾病进程。由于 DENV 主要通过抵抗人干扰素(interferon, IFN)信号通路的传导来逃逸人体内的免疫系统的识别与攻击,而小鼠天然对 DENV 感染具有抵抗力,因此一直以来研究人员试图通过构建 IFN 信号通路相关分子敲除的小鼠模型来实现 DENV 的感染,但很难准确复制 DENV 感染的临床特征。本文总结了登革病毒基于 IFN 信号通路的免疫逃逸机制,分析了其相应靶点敲除小鼠模型在登革病毒的致病机制、疫苗和药物研发中的应用,最后提出在敲除小鼠的基础上,进一步进行人源化改造可能会获得更好的模拟临床 DENV 感染后不同疾病进程的小鼠模型。

【关键词】 登革病毒;免疫逃逸;干扰素;小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 03-0390-07

Research progress in mouse infection models based on the immune escape mechanism of dengue virus

LI Yiran^{1,2}, SHI Changhong², ZHAO Yong², LYU Yuhong^{1*}, ZHANG Caiqin^{2*}

(1. Yan'an University School of Medicine, Yan'an 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: ZHANG Caiqin. E-mail: zhangcai-qin-bei@163.com; LYU Yuhong. E-mail: yuhonglyu@126.com

【Abstract】 Dengue virus (DENV) infection is the most widespread viral disease transmitted by insect vectors worldwide. Mild and severe clinical dengue disease processes can occur after human infection. DENV escapes recognition and attack by the immune system, mainly by resisting transduction of the human interferon (IFN) signaling. Moreover, mice are naturally resistant to DENV infection. Therefore, researchers have been attempting to induce DENV infection by establishing a mouse model devoid of IFN signaling pathway-related molecules. However, it remains difficult to accurately replicate the clinical characteristics of DENV infection. This review summarizes the immune escape mechanism of dengue virus by IFN signaling pathways. This article also analyzes the applications of the mouse model devoid of such pathways to uncover the pathogenic mechanisms of dengue virus and develop effective vaccines and drugs. In conclusion, we propose that a better mouse model that closely simulates the processes of different diseases after clinical DENV infection may be

【基金项目】 军队实验动物专项课题(SYDW_KY(2021)-14, SYDW_KY(2021)-16), 陕西省创新能力支撑计划(2023-CX-PT-04)。

Funded by Special Topic of Military Experimental Animals(SYDW_KY(2021)-14, SYDW_KY(2021)-16), Shaanxi Innovation Capability Support Plan(2023-CX-PT-04)。

【作者简介】 李怡然(1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 登革病毒感染模型的制备。Email: W15309146298@163.com

【通信作者】 张彩勤(1981—), 女, 副教授, 研究方向: 人源化动物模型的制备和应用。Email: zhangcai-qin-bei@163.com;

吕玉红(1976—), 女, 副教授, 研究方向: 阿尔兹海默症的发病机制及干预。Email: yuhonglyu@126.com。

* 共同通信作者

established by modifying the present models in humans.

[Keywords] dengue virus; immune escape; interferon; mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

登革病毒(dengue virus, DENV)是一种经蚊虫传播的黄病毒,主要流行于热带及亚热带地区,估计每年有 3.9 亿人感染,其中有症状病例约 9600 万^[1]。登革病毒感染人体后,有 3 种表现形式:登革热(dengue fever, DF)主要表现为发热、疼痛、皮疹、中毒样等轻型症状;登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)主要表现为血浆渗漏、腹部剧痛、呕吐、结膜水肿、四肢渗漏征、胸腔积液、腹水等严重的症状;登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)主要表现为消化道大出血、出血性休克等^[2]。由于缺乏完全概括人类疾病的动物模型, DENV 的研究受到阻碍。尽管感染 DENV 的非人类灵长类动物可出现病毒血症,但大多数不表现出严重登革热的关键体征。相比之下,小鼠和其他啮齿动物(如豚鼠、仓鼠和大鼠)对 DENV 感染和发病具有抵抗力。然而,在过去的二十年中,研究人员一直通过构建人源化小鼠模型实现 DENV 的感染,在 DENV 的相关研究取得了很大的进展^[3-4]。

已明确, DENV 主要通过抵抗 I 型 IFN 信号通路的传导来逃逸人体内的免疫系统的识别与攻击^[5]。因此,本文通过分析登革病毒感染的免疫逃逸机制,汇总了其相应靶点敲除小鼠模型的特征,重点综述了该类模型在登革病毒的致病机制、疫苗和药物研发中的应用,期望制备基于 I-IFN 信号通路分子和免疫系统双入源化的小鼠模型,以充分模拟临床 DENV 感染后的不同疾病进程。

1 DENV 感染的免疫逃逸

1.1 通过抵抗 IFN 信号通路的传导来逃逸人体免疫系统的识别与攻击

先天免疫是指利用特定的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)来识别入侵的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)或损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP)的生物大分子。PAMP 包括病原体入侵所带来的一系列生物大分子,如细菌表面的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、鞭毛、病毒入侵带来的溶酶体内或胞质内的双链或单链 DNA 与 RNA 等,继而激活抵抗病原微生物感染的天然免疫机制。当细胞质中出现异常核酸后,

其作为独特的病毒 PAMP 可激活相应的 PRRs^[6-7]。一旦被激活,传感器将信号传递给衔接蛋白,通过衔接蛋白募集激酶使转录因子磷酸化,最终促使抗病毒干扰素(interferon, IFN)的产生。I 型 IFN 是抵御 DENV 感染的最主要防御系统。当 I 型 IFN 与其受体结合后,激活 Janus 激酶(Janus kinase, Jak)-信号转导和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT)介导的信号传导,进而调控下游的干扰素调控基因(interferon stimulated gene, ISG)的转录与表达来发挥抗病毒效应^[8-9]。

1.2 通过直接抑制 IFN 的产生来逃逸 IFN 的抗病毒作用

尽管 I 型 IFN 免疫系统对登革病毒具有显著的抑制作用,但为了在宿主中复制与传播, DENV 已演化出多层次、多方面的拮抗策略。DENV 的 7 个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)可靶向结合 RNA 触发的视黄酸诱导基因-I 样受体(retinoic acid inducible gene-I like receptors, RLR)-线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)(RLR-MAVS)和 DNA 触发的环 GMP-AMP 合酶(cyclic GMP-AMP synthase, CGAs)-干扰素基因刺激物(stimulator of interferon genes, STING)信号,以减少感染细胞中 IFN 的产生^[10]。

在登革病毒感染后,细胞的多个模式识别受体,如视黄酸诱导基因 I(retinoic acid-inducible gene-I, RIG-I)、黑色素瘤分化相关蛋白 5(melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5)和 Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)-3 识别病毒的 PAMP(如 NS1 蛋白、基因组 RNA 和中间复制产物 dsRNA)^[11]。病毒 RNA 与 MDA5 和 RIG-I 的 C 端解旋酶结构域结合后,触发 RIG-I/MDA5 的 N 端 CARD 结构域与其下游结合的 MAVS 的 CARD 结构域相互作用,这种 CARD-CARD 相互作用将 MAVS 信号聚集级联,从而诱导 IFN 的产生。但是 DENV 的 NS4A 的 TM3 结构域可以结合 MAVS,从而阻止 RIG-I-MAVS 相互作用以抑制 IFN 的产生^[12-13]。

DENV 感染也会激活 DNA 感应途径。cGAS 是一种胞质 DNA 传感器,可响应 DNA 刺激合成 cGAMP(一种非经典环状二核苷酸)cGAMP 可结合

并激活 STING,之后 STING 二聚化,并转移到细胞核周围,形成点状结构并与 TANK 结合激酶 1(TANK binding kinase-1,TBK1)相互作用以激活干扰素调节因子(interferon regulatory factor,IRF)。此外,STING 也可以与 RIG-I 结合从而增强 RIG-I-MAVS 抗病毒反应^[14-17]。但 DENV 的 NS2B3 也可直接靶向人类 STING,干扰模式识别受体 RIG-I 和 MDA5 的下游信号传递,下调抗病毒反应^[18]。

1.3 通过抑制 IFN- α/β 信号通路逃逸病毒杀伤

虽然 DENV 使用各种策略来防止受感染细胞产生 IFN。然而,分泌的 IFN 结合 IFN 受体(IFN- α/β receptor,IFNAR),这最终使抗病毒蛋白表达,以抵抗 DENV 感染。在 IFN 结合后,与 IFNAR 相关的 Jak1 和酪氨酸激酶 2(tyrosine kinase 2,Tyk2)发生自身磷酸化,然后通过磷酸化激活下游转录因子,主要是 STAT1 和 STAT2。I-IFN 的信号能够使 STAT1 与 STAT2 发生磷酸化形成异源二聚体,再与 IRF9 结合形成复合物干扰素刺激基因因子 3(interferon-stimulated gene factor 3,ISGF3)。ISGF3 能够入核并结合到 ISGs 的上游序列干扰素刺激应答元件(interferon-stimulated response elements,ISRE)上,诱导 ISGs 大量转录发挥抗病毒作用^[19-20]。

1.3.1 通过抑制 STAT1 的磷酸化以阻断 IFN- α/β 信号

DENV 的 NS4B 通过抑制 STAT1 的磷酸化干扰其形成复合物而强烈阻断 IFN 诱导的信号转导级联,而 NS4A 对 NS4B 具有协同效应,同时表达 NS4A 和 NS4B 可使 NS4B 的抑制能力大为提高。当 NS2A、NS4A 和 NS4B 共同表达时能够增强登革病毒在细胞中的复制能力,显著下调 ISG 的表达,从而可以完全抑制 IFN 信号传导^[21]。

1.3.2 通过降解 STAT2 以协助病毒的增殖

登革病毒 NS5 通过蛋白酶体介导人源 STAT2 降解,抑制 I-IFN 信号传递。但是,成熟的 NS5 仅能够与 STAT2 结合,无法将其靶向降解。只有 NS5 通过 N 末端上游存在的蛋白酶切割后形成前体形式,并在其他非结构蛋白的协助下才能靶向降解 STAT2^[22]。在后来进一步的研究中还发现细胞蛋白 UBR4(一个 600 kDa 的 E3 连接酶家族成员)可作为 DENV NS5 相互作用的伙伴,NS5 将 STAT2 与 UBR4 连接起来,导致 UBR4 介导的 STAT2 降解。消除 UBR4 可防止 NS5 诱导 STAT2 降解,这使得对

DENV NS5 诱导 STAT2 降解的机制有了新的认识^[23]。

2 基于 IFN 途径的 DENV 感染小鼠模型

2.1 IFN 受体缺失小鼠模型

基于 IFN 途径的 DENV 感染小鼠模型,常用的就是通过将缺乏 I 型 IFN 受体(*Ifnar1*^{-/-})的 A129 小鼠与缺乏 II 型 IFN 受体(*Ifngr*^{-/-})的 G129 小鼠杂交产生的 AG129 小鼠(缺乏 I 型和 II 型 IFN 受体)^[24]。同时也有人用到 C57BL/6 背景下的 *Ifnar1* 敲除小鼠或者 *Ifnar1* 和 *Ifngr* 共同敲除小鼠。由于它们缺失 IFN 受体,阻断了 IFN 信号通路的传导,可以产生更好的感染效果,因此被广泛用于 DENV 致病机制以及疫苗和抗病毒药物的评估研究。

2.1.1 用于登革病毒血管渗漏发病机制的研究

DENV 可以导致血管内皮功能障碍和血管渗漏,这是 DHF 和 DSS 的典型特征。AG129 小鼠在感染 DENV-D2S10 株后非神经和神经组织中都携带病毒,并表现出血管通透性增加的迹象,同时血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)水平显著升高,而在使用 TNF- α 抗体后,可以阻止小鼠的早期死亡,该模型可表征 DENV 感染后的关键特征血管渗漏,是更类似于人类感染后疾病的小鼠模型^[25]。进一步在过表达血红素加氧酶 1(HO-1)的 AG129 小鼠模型中发现 DENV 诱导的血浆渗漏和血小板减少症的表现有所减轻,HO-1 或其代谢物胆绿素的过表达可以减少 DENV 诱导的内皮高渗透性。这表明 HO-1 对血管内皮钙粘蛋白具有正调节作用,表明 HO-1 有希望用于治疗 DENV 感染后的血管病变^[26]。此外由于登革病毒 NS1 蛋白与血管渗漏密切相关,在 AG129 小鼠中比较了 DENV 的临床流行毒株和 NS1 的 T164S 突变株的感染模型差异。结果发现,与感染野生型病毒相比,感染 T164S 突变病毒的 AG129 小鼠中 NS1 蛋白的表达增加,补体激活增加,小鼠的组织炎症增加,同时导致了更快的死亡率。这表明突变的 NS1 可能导致更严重的登革热^[27]。

2.1.2 用于血小板减少症的研究

血小板减少症也是 DENV 感染后常见的症状,但其机制尚不清楚。DENV 感染 *Ifnar1*^{-/-} *Ifngr*^{-/-} (C57BL/6)小鼠后,在感染后第 1 天就出现血小板减少,同时脾中活化的血小板增加,血液中血小板也出现聚集现象。进一步用肥大细胞(mast cell,

MC)敲除小鼠感染 DENV 后发现 MC 释放的五羟色胺(5HT_{2A})通过其受体促进血小板活化、聚集并增强吞噬作用,小鼠缺乏 MC 或 MC 的抑制剂可逆转血小板减少症。并且靶向 5HT_{2A} 受体的治疗有效地预防了小鼠的血小板减少症。因此,MC 所产生的 5HT_{2A} 是 DENV 引起血小板减少症的潜在治疗靶点^[28]。

2.1.3 用于 ADE 效应的研究

继发感染期间由抗体依赖性增强(ADE)引起严重登革热的风险增加,这是 DENV 感染后疾病严重程度增强的主要原因。将抗 DENV 的抗体或免疫小鼠的血清在 AG129 小鼠感染前和感染后 1 d 腹腔注射入体内从而产生 ADE 诱导类似于人类 DHF/DSS 的严重登革热疾病小鼠模型。该模型中大量肝窦内皮细胞被 DENV 感染,小鼠其他组织中也表现出病毒水平升高、细胞因子风暴、血小板计数低、血管通透性增加,甚至发生肠道出血并最终死亡^[29]。在 AG129 小鼠感染前 30 min 注射抗 DENV prM 单克隆抗体 2H2 产生 ADE 模型。小鼠在感染后第 4 天,60%发生死亡,并伴有明显的皱毛、驼背、昏睡等现象,到第 9 天,只有 10%的存活。感染后 24 ~ 96 h 小鼠肝、小肠和肾中的病毒水平均呈上升趋势。在用此 ADE 模型评估亚氨基糖类药物 UV-4 对致命登革热病毒攻击提供体内保护的力量的研究中,发现 UV-4 的施用降低了小鼠死亡率,以及小鼠血清、肝和肾中的病毒载量,同时也降低了细胞因子风暴。这为人体 I 期临床试验中开发 UV-4 作为 DENV 特异性抗病毒药物奠定了基础^[30]。

2.1.4 用于登革病毒感染疫苗研发的应用

IFN 受体敲除小鼠除在对于 DENV 感染机制的研究中有独特价值外,在疫苗研究中也发挥着重要作用。在同属于黄病毒科的寨卡病毒(ZIKV)的中和抗体 MZ4 的研究中,使用 Ifnar1^{-/-}(C57BL/6)小鼠,在注射 DENV-2 病毒前 4 h 注射 MZ4 抗体,与仅感染病毒的小鼠相比,MZ4 能够阻止小鼠体重减轻,并显著降低了血清、肾、脾、大脑和淋巴结中的病毒负荷,表明 MZ4 具有对 DENV 的保护力^[31]。由于 AG129 小鼠缺乏麻疹病毒(MV)受体,因此在评估 MV 载体的登革热疫苗应用中受到限制。为了克服这一不足,将携带 MV 受体-人 CD46 转基因的 YAC-CD46 小鼠与 AG129 小鼠交配,获得 AG-hCD46 转基因小鼠。用此小鼠对四价登革热疫苗(rMV-TDV)进行疫苗效力的评估,发现 rMV-TDV

免疫小鼠对 DENV 的所有血清型毒株均能产生显著的中和抗体反应,以及针对 DENV-3 的显著 IFN- γ 反应。这表明 rMV-TDV 四价疫苗对登革热病毒感染具有保护作用^[32]。

2.1.5 用于登革病毒感染抗病毒药物研发的应用

在 AG129 小鼠的非致命性 DENV 感染模型中发现,体外实验中有效的 DENV 抑制剂 ST-148,在体内也可通过与 DENV 衣壳蛋白直接相互作用从而显著降低小鼠血清和脏器中的病毒载量以及血浆中细胞因子水平^[33]。使用抗 DENV 药物舒尼替尼/厄洛替尼对 Ifnar1^{-/-} Ifngr^{-/-}(C57BL/6)小鼠进行为期 5 d 的联合治疗后有 70%的小鼠存活至第 14 天,并在此过程中免疫细胞因子增多,脾病毒滴度降低,并在第 6 天被根除。这表明舒尼替尼/厄洛替尼联合治疗对 DENV 复制的抑制作用是可持续的,该治疗方案可以防止进展为严重登革热^[34]。

总之 IFN 受体敲除小鼠在登革病毒致病机制和疫苗检测以及药物开发的研究中有着广泛的应用,是目前 DENV 研究中应用最多的小鼠模型。然而,由于缺乏人的免疫成分所以在对于 DENV 感染后人体免疫反应的研究中使用受到限制。应该开发具有完整免疫反应的小鼠感染模型,更好地模拟人类临床症状以及感染后的一系列免疫反应。

2.2 I 型干扰素信号通路下游 STAT 基因缺失的小鼠模型

2.2.1 STAT1^{-/-}小鼠模型

对于 STAT1^{-/-}小鼠,研究发现无论是感染小鼠适应的 DENV-1 株还是感染小鼠尚未适应的 DENV-2 株,相比 AG129 小鼠出现的瘫痪与死亡症状,STAT1^{-/-}小鼠仅表现出局部后腿麻痹。而且在感染后第 1、3、7 天对小鼠的血清、肝、脾、淋巴结等组织进行病毒检测时发现在第 1 天就可检测到病毒滴度,到第 3 天仅部分可检测到,然而到第 7 天就无法检测到了,这证明 STAT1 可以在感染早期限制病毒复制。除此之外,小鼠脾中的 B 细胞和 NK 细胞在 DENV-2 株感染 3 d 后均有所增加,这表明 DEN 感染小鼠 B 细胞和 NK 细胞的早期激活不依赖 STAT1 的调节。因此,IFN 控制原发性 DEN 感染涉及 STAT1 依赖性和 STAT1 非依赖性两种机制^[35]。

2.2.2 STAT2^{-/-}小鼠模型

相同高剂量 DENV 感染小鼠后,与 STAT1^{-/-}小鼠发生死亡相比,STAT2^{-/-}小鼠的组织病毒载量在感染后的多个时间点略低于 STAT1^{-/-}小鼠,且不会

发生死亡,这表明 STAT1 在抗 DENV 感染中的作用比 STAT2 更大。此外,虽然两者都引起 IFN 产生的延迟,但高峰处的 IFN 水平 STAT2^{-/-}仍比 STAT1^{-/-}高。通过对 STAT1^{-/-}和 STAT2^{-/-}小鼠感染 DENV 的比较研究,确定 STAT2 是 STAT1 非依赖性 DENV 感染保护机制的关键组成部分,并证明 STAT1 和 STAT2 都具有独立限制 DENV 发病的能力^[36]。

2.2.3 STAT1^{-/-}/2^{-/-}小鼠模型

STAT1 和 STAT2 单缺小鼠在感染 DENV 后均能存活,这表明单一 STAT1 或 STAT2 功能失活不足以中和抗病毒反应。与单缺小鼠相比,STAT1^{-/-}/2^{-/-}小鼠在感染后 12 ~ 72 h 血清中的病毒含量更高,且在 24 ~ 72 h 之间增加了 25 倍,尽管在小鼠脾中病毒 RNA 水平在 72 h 显著下降,但 STAT1^{-/-}/2^{-/-}小鼠脾中的病毒 RNA 水平仍比单一缺陷的小鼠增高至少 40 倍。此外,与 AG129 小鼠相比,双基因敲除小鼠可以表现出感染早期死亡现象,提示早期病毒复制的控制需要 STAT1 和 STAT2 的联合作用,只有二者同时缺乏才能消除抗病毒反应,使病毒复制不受限制。此外,STAT1^{-/-}和 STAT2^{-/-}小鼠在感染后 72 h 血清中 TNF 水平相似,比野生型小鼠高 4 ~ 5 倍,但仍然明显低于 STAT1^{-/-}/2^{-/-}小鼠 20 倍,这表明单独的 STAT1 或 STAT2 抵抗病毒机制会导致 DENV 感染期间 TNF 表达的降低^[36]。

3 展望

登革病毒通过表达拮抗先天免疫途径中的蛋白来逃避宿主免疫应答,因此在对于 DENV 感染小鼠模型的制备上,针对 IFN 抗病毒通路进行了不同程度的基因敲除和改造,可以使 DENV 能够在一定程度上进行复制,但这些小鼠在先天免疫方面均存在缺陷,这样不利于研究病毒与免疫系统相互作用的机制。因此,未来登革病毒的感染小鼠模型可以考虑以下制备策略。

3.1 IFN 信号通路中关键基因的人源化可进一步促进 DENV 在细胞内的增殖

想要开发出具有完整免疫活性且更接近临床患者感染的 DENV 小鼠模型,可能不是仅限于对 IFN 免疫通路上单一 STAT1 或 STAT2 的敲除或是二者的共同敲除,而是基于 DENV 非结构蛋白能特异逃逸人 IFN 的效应,从而通过将其关键基因人源化达到在保持小鼠具有完整的免疫系统的基础上才能使病毒更好的复制。由于登革病毒 NS2B3 蛋

白酶可识别并剪切人源 STING,但对鼠同源蛋白无作用,有研究者构建并比较了两种人-鼠嵌合 STING 构建体,这两种结构均可激活正常 IFN 反应,并模拟了人感染 DENV 后的 STING 切割作用,这一发现为进一步开发小鼠模型提供了思路^[37]。此外登革病毒 NS5 仅能够降解人源性的 STAT2,但不能降解鼠源性的 STAT2^[38]。因此,基于干扰素抗病毒途径以及登革病毒对于关键分子在人鼠上的差异,或许在免疫健全的小鼠体内将对应的 STAT2 和 STING 基因改造为人类的基因,从而实现双基因人源化,以支持 DENV 在保持小鼠具有完整的免疫系统的基础上还能在体内更好的复制。

3.2 免疫系统人源化和关键基因的人源化改造利于研究 DENV 感染后的人体免疫反应

大多数关于登革热疾病进展的了解来自于对人类患者的观察性研究,而人源化小鼠模型目前也是研究传染病的强大工具。许多研究都证明了移植人类造血干细胞的小鼠可以支持登革热病毒的复制,并出现人类患者的临床体征^[39]。在重度免疫缺陷小鼠上移植人的造血干细胞从而产生的免疫人源化小鼠模型可以重建出人类 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、髓系细胞,可以更好的模拟人类感染 DENV 后体内发生疾病的过程。可观察到人类感染 DENV 后的先天性和适应性免疫反应^[40-41]。人源化小鼠模型可以用来研究具有较完整免疫反应的小鼠的发病机制,同时还可以提供在自然感染过程中被病毒特异性靶向的人类细胞,这在发病机制、疫苗和药物开发研究中都有着重要作用。如果在人源化小鼠模型中再加入对于 IFN 通路上 STING 和 STAT2 基因的人源化,这种免疫-基因双人源化的小鼠模型可能会使 DENV 在体内更好的复制,同时也可以保证免疫系统的完整性,从而产生出更好的 DENV 感染小鼠模型。

3.3 小鼠适应性 DENV 株的开发促进小鼠登革病毒感染模型的研究

对于小鼠模型的改造是对 DENV 感染研究最重要的部分,但同时对于感染毒株以及病毒的传播方式等的改变也可以起到辅助的作用。将 DENV 的 NS1 蛋白 164 位残基从苏氨酸(T)到丝氨酸(S)(T164S)的单一保守氨基酸替换后产生的 T164S 突变病毒,与野生型病毒相比,埃及伊蚊感染导致蚊中肠病毒载量增加,NS1 产量增加。与感染野生型病毒的 AG129 小鼠相比,感染 T164S 突变病毒的

AG129 小鼠会导致组织炎症,同时补体激活增加且会发生更快的死亡^[27]。除此,对于用临床分离的毒株直接进行小鼠的感染,可能不如在用乳鼠脑进行连续传代后,使其成为小鼠适应病毒株进行感染的效果更好。此外还可以通过在蚊子细胞和小鼠之间交替传代非小鼠适应的 DEN 病毒株,从而模拟病毒之间的自然传播周期^[25]。此外,通过受感染的埃及伊蚊将病毒传播至小鼠会出现更高和更持续的病毒血症,红斑和血小板减少症,这些迹象比单独注射病毒时更严重,表明了登革热发病模型中天然载体的重要性^[42]。

总之,理想的动物模型应该充分模拟 DENV 感染后的疾病症状和疾病进展变化,从而与临床感染更贴近。因此,在基于 DENV 对人 IFN 逃逸机制的基础上,不仅是对 IFN 受体以及 IFN 通路上关键基因 STAT1/2 的敲除以提高病毒的复制能力,应该进一步通过将 STING、STAT2 人源化从而既能保持小鼠完整的免疫系统,又允许 DENV 在其体内复制。由于免疫人源化小鼠模型也可用于 DENV 的感染,从而在免疫系统人源化的基础上,再加入基因的人源化,从而产生的双人源化模型可能会更好的模拟出人类感染 DENV 后的特征症状。

参 考 文 献(References)

- [1] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 504–507.
- [2] Roy SK, Bhattacharjee S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology [J]. *Can J Microbiol*, 2021, 67(10): 687–702.
- [3] Chen RE, Diamond MS. Dengue mouse models for evaluating pathogenesis and countermeasures [J]. *Curr Opin Virol*, 2020, 43: 50–58.
- [4] 陈倩, 鲍琳琳, 王卫. 登革热动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 120–124, 137.
Chen Q, Bao LL, Wang W. Advances in research on animal models of Dengue virus infection [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(5): 120–124, 137.
- [5] Ngono AE, Shrestha S. Immune response to dengue and Zika [J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 279–308.
- [6] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805–820.
- [7] Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion [J]. *J Virol*, 2012, 86(6): 2900–2910.
- [8] Doly J, Civas A, Navarro S, et al. Type I interferons: expression and signalization [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(10): 1109–1121.
- [9] Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses [J]. *Virology*, 2006, 344(1): 119–130.
- [10] Kao YT, Lai MMC, Yu CY. How dengue virus circumvents innate immunity [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2860.
- [11] Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, et al. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011, 5(1): e926.
- [12] Seth RB, Sun L, Ea CK, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3 [J]. *Cell*, 2005, 122(5): 669–682.
- [13] He Z, Zhu X, Wen W, et al. Dengue virus subverts host innate immunity by targeting adaptor protein MAVS [J]. *J Virol*, 2016, 90(16): 7219–7230.
- [14] Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 786–791.
- [15] Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling [J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 674–678.
- [16] Zhong B, Yang Y, Li S, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF₃ transcription factor activation [J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 538–550.
- [17] Sun W, Li Y, Chen L, et al. *ERIS*, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(21): 8653–8658.
- [18] Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(10): e1002934.
- [19] Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(5): 375–386.
- [20] Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1): 36–49.
- [21] Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, et al. Inhibition of α/β interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses [J]. *J Virol*, 2005, 79(13): 8004–8013.
- [22] Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, et al. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation [J]. *J Virol*, 2009, 83(11): 5408–5418.
- [23] Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, et al. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(3): e1003265.
- [24] van den Broek MF, Müller U, Huang S, et al. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors [J]. *Immunol Rev*, 1995, 148: 5–18.
- [25] Shrestha S, Sharar KL, Prigozhin DM, et al. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability [J]. *J Virol*, 2006, 80(20): 10208–10217.

- [26] Wu YH, Chen WC, Tseng CK, et al. Heme oxygenase-1 inhibits DENV-induced endothelial hyperpermeability and serves as a potential target against dengue hemorrhagic fever [J]. FASEB J, 2022, 36(1): e22110.
- [27] Chan KWK, Watanabe S, Jin JY, et al. A T164S mutation in the dengue virus NS1 protein is associated with greater disease severity in mice [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(498): eaat7726.
- [28] Masri MFB, Mantri CK, Rathore APS, et al. Peripheral serotonin causes dengue virus-induced thrombocytopenia through 5HT₂ receptors [J]. Blood, 2019, 133(21): 2325–2337.
- [29] Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease [J]. Cell Host Microbe, 2010, 7(2): 128–139.
- [30] Perry ST, Buck MD, Plummer EM, et al. An iminosugar with potent inhibition of dengue virus infection *in vivo* [J]. Antiviral Res, 2013, 98(1): 35–43.
- [31] Dussupt V, Sankhala RS, Gromowski GD, et al. Potent Zika and dengue cross-neutralizing antibodies induced by Zika vaccination in a dengue-experienced donor [J]. Nat Med, 2020, 26(2): 228–235.
- [32] Lin TH, Chen HW, Hsiao YJ, et al. Immunodominance of serotype-specific CD4⁺ T-cell epitopes contributed to the biased immune responses induced by a tetravalent measles-vectored dengue vaccine [J]. Front Immunol, 2020, 11: 546.
- [33] Byrd CM, Dai D, Grosenbach DW, et al. A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1): 15–25.
- [34] Pu SY, Xiao F, Schor S, et al. Feasibility and biological rationale of repurposing sunitinib and erlotinib for dengue treatment [J]. Antiviral Res, 2018, 155: 67–75.
- [35] Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, et al. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice [J]. J Immunol, 2005, 175(6): 3946–3954.
- [36] Perry ST, Buck MD, Lada SM, et al. STAT2 mediates innate immunity to Dengue virus in the absence of STAT1 via the type I interferon receptor [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(2): e1001297.
- [37] Zhu T, Webb LG, Veloz J, et al. Generation and characterization of human-mouse STING chimeras that allow DENV replication in mouse cells [J]. mSphere, 2022, 7(3): e0091421.
- [38] Ashour J, Morrison J, Laurent-Rolle M, et al. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication [J]. Cell Host Microbe, 2010, 8(5): 410–421.
- [39] Coronel-Ruiz C, Gutiérrez-Barbosa H, Medina-Moreno S, et al. Humanized mice in dengue research: a comparison with other mouse models [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(1): 39.
- [40] Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection [J]. Viruses, 2012, 4(1): 62–82.
- [41] Mota J, Rico-Hesse R. Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20762.
- [42] Cox J, Mota J, Sukupolvi-Petty S, et al. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice [J]. J Virol, 2012, 86(14): 7637–7649.

[收稿日期] 2022-10-20