

张博,陈庭伟,李孝琢,等. 用于新型冠状病毒研究的小鼠和猴子动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1498-1503.

Zhang B, Chen TW, Li XZ, et al. Animal models of SARS-CoV-2 infection and pathology in mice and monkeys [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1498-1503.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.11.014

用于新型冠状病毒研究的小鼠和猴子动物模型

张博^{1,2}, 陈庭伟^{1,2}, 李孝琢^{1,2}, 李天晴^{1,2}, 董娥^{1,2*}

(1. 云南中科灵长类生物医学重点实验室,昆明 650500;2. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院,省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室,昆明 650500)

【摘要】 随着严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2(SARS-CoV-2)在世界范围内的传播,其基因组在不断突变进化,出现了 α 、 β 、 γ 、 δ 等不同的毒株,因而持续研发针对不同毒株的药物和疫苗是应对该病毒传播的核心。而构建 SARS-CoV-2 动物模型不仅用于研究新冠病毒的致病机制,也是评价 SARS-CoV-2 相关药物与疫苗治疗效果的关键。然而,常用的模式动物小鼠对野生型的 SARS-CoV-2 不易感,因此迫切需要能够感染新冠且更好地模拟人体病理生理状态的动物模型。本综述回顾了用于新冠病毒感染和传播的动物模型,以及这些模型在表征病毒免疫病理学方面的进展。

【关键词】 新型冠状病毒;SARS-CoV-2;动物模型;病理学;免疫学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)11-1498-06

Animal models of SARS-CoV-2 infection and pathology in mice and monkeys

ZHANG Bo^{1,2}, CHEN Tingwei^{1,2}, LI Xiaozhuo^{1,2}, LI Tianqing^{1,2}, DONG E^{1,2*}

(1. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China. 2. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)
Corresponding author: DONG E. E-mail: donge@lpbr.cn

【Abstract】 As the severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2) pandemic continues to spread globally, its genome is undergoing mutations and evolution, giving rise to various strains such as α , β , γ , and δ . Therefore, the continuous development of drugs and vaccines targeting the various strains has become pivotal to addressing the COVID-19 pandemic. Establishing animal models of SARS-CoV-2 enables study of the pathogenesis of the virus and is crucial for evaluating the efficacy of drugs and vaccines against SARS-CoV-2. However, commonly used animal models such as mice exhibit limited susceptibility to wildtype SARS-CoV-2 infection, underscoring the urgent need for animal models that can be infected with the novel coronavirus and better simulate the human pathological and physiological conditions. This review summarizes the animal models used to study SARS-CoV-2 infection and transmission, and their progress in characterizing the viral immunopathology.

【Keywords】 novel coronavirus; SARS-CoV-2; animal model; pathology; immunology

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

【基金项目】 云南省教育厅科学研究基金项目(2022J0060),国家自然科学基金(32130034)。

Funded by Scientific Research Fund Project of Yunnan Provincial Department of Education (2022J0060), National Natural Science Foundation of China(32130034).

【作者简介】 张博,女,硕士,研究方向:子宫内类器官相关研究。Email: 2516519803@qq.com

【通信作者】 董娥,女,博士,讲师,研究方向:子宫内类器官相关疾病研究。Email: donge@lpbr.cn

冠状病毒是单股正链的 RNA 病毒,具有多种毒株,其中包括 SARS-CoV-1 (SARS-CoV) 和 SARS-CoV-2,这两种病毒均可导致严重的急性呼吸系统综合症。SARS-CoV-2 感染宿主细胞涉及病毒的刺突蛋白(spike protein)与宿主细胞的血管紧张素转换酶 2(ACE2)受体特异性结合,因此宿主细胞表达 ACE2 是病毒感染的关键。合适的动物模型对于研究 SARS-CoV-2 的感染机制至关重要,也是药物和疫苗有效性评估的关键。生物信息学分析发现,与人 ACE2 受体同源性相近的动物包括恒河猴、食蟹猴、非洲绿猴、仓鼠、水貂和猫等^[1]。近交小鼠由于在遗传背景上具有均一性,实验结果上有一致性等优点,因此被广泛用于研究基因功能或疾病机制。但是由于小鼠和人类 ACE2 存在差异,传统的小鼠模型无法有效模拟 SARS-CoV-2 病毒感染以及临床患者的症状和相关免疫反应。因此,研究人员通过转基因、基因敲入、病毒递送等技术,构建能够感染 SARS-CoV-2 病毒的关键动物模型,最终用于研究 SARS-CoV-2 病毒的感染机制、评估疫苗和抗病毒药物的有效性,以及深入探究其致病机理。本文综述了目前用于模拟 SARS-CoV-2 感染的临床前动物模型以及构建这些动物模型的方法和策略。

1 小鼠模型

在许多病毒学研究中,小鼠模型被广泛采用。然而,由于 SARS-CoV-2 感染宿主细胞主要通过人血管紧张素转化酶 2(human angiotensin converting enzyme 2, hACE2)受体而非小鼠 ACE2 受体,这导致野生型 SARS-CoV-2 无法感染传统的标准实验小鼠。鉴于此,针对缺乏新冠病毒易感染小鼠模型现状,研究人员采取了多种策略来建立易感小鼠模型。首先,从病毒角度出发,在小鼠体内通过连续传代新冠病毒的方式,筛选出能够有效感染标准实验小鼠的适应株,利用适应株建立易感模型。其次,从小鼠角度来说,可构建 ACE2 基因人源化的小鼠来实现这一目标。由于转基因小鼠培育和繁殖周期较长,亦可通过气管接种腺病毒(adenovirus, AdV)或腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV),使小鼠肺组织迅速表达人源 ACE2(hACE2),从而促进 SARS-CoV-2 对小鼠肺部的感染。此外,为了更准确地研究新冠病毒攻击宿主后产生的免疫学反应,在小鼠肺组织人源化的基础上,还需将小鼠的免疫系统人源化,这将有助于更深入地了解

SARS-CoV-2 感染人体后引发的免疫病理反应。下面将详细介绍目前用于 SARS-CoV-2 研究的小鼠模型,并讨论这些模型的致病特征。

1.1 稳定遗传的转基因小鼠模型

构建 SARS-CoV-2 感染小鼠模型,表达人源的 ACE2 基因是关键。在早期,由于技术限制,通过将异源基因启动子驱动的 hACE2 表达载体直接注射到胚胎中就可构建转基因小鼠。涉及的启动子包括 mACE2、hK18、hHFH4/FOXJ1、CAG^[2-5]。mACE2 启动子驱动的 hACE2 基因表达更接近于小鼠体内天然 ACE2 的分布情况,但 hACE2 基因表达较弱。而由 hK18、hHFH4/FOXJ1 人源启动子驱动的 hACE2 基因的表达则更强,但改变了 ACE2 在小鼠组织中的分布,从而改变病毒的组织嗜性。总之,该方法的缺点在于外源性导入的 hACE2 基因随机插入小鼠基因组中,可能干扰其他基因表达,同时无法兼顾 hACE2 在体内的高表达以及表达分布接近体内的真实情况。随着 CRISPR/Cas9 技术不断成熟,这一技术也被用来构建转基因小鼠模型,并成功解决上述两个问题。研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统将 hACE2 基因定点敲入至小鼠内源性 ACE2 位点的 2 号外显子中,这种方式不仅破坏了小鼠内源性 mACE2 基因的表达,也保证了外源 hACE2 基因表达分布与内源性 ACE2 的表达具有一致^[6]。此外,将四倍体补偿技术和 CRISPR/Cas9 胚胎干细胞基因编辑技术相结合,可以在 35 d 内成功建立 ACE2 人源化的近交系小鼠^[7]。

SRAS-CoV-2 主要通过呼吸道传播,转基因小鼠经鼻途径感染病毒后,除了出现相关的上呼吸道症状外,体重减轻是小鼠感染模型中最主要的临床症状^[3-4]。不同的毒株、感染途径、病毒感染剂量以及 ACE2 在不同组织的分布差异,都可能会引起不同的临床表现和病理变化。hACE2 小鼠经 SARS-CoV-2 感染后会引发与人类患者高度相似的肺部疾病,包括弥散性肺泡损伤,间质性肺炎、炎症或淋巴细胞浸润以及肺血管损伤^[2]。人们发现,由于老年小鼠体内干扰素和抗体的产生明显受损,在感染病毒后,与年轻小鼠相比,病毒在其体内复制更加旺盛,从而导致症状加重^[8-9]。同时也发现,性别对于新冠患病严重程度也有影响,雄性小鼠比雌性小鼠的症状更加严重^[10]。目前 K18-hACE2 小鼠被大多数研究人员作为 SARS-CoV-2 免疫研究的对象,人们发现其感染病毒后,高表达与发病进程相关的趋化

因子(如 CCL2、CCL3、CCL4、CXCL1 和 CXCL10)以及炎症细胞因子(TNF α 、IL-6 和 G-CSF)^[11]。这与人感染 SARS-CoV-2 后具有高度一致性,因此 K18-hACE2 小鼠是目前研究新冠感染后机体免疫变化很理想的易感模型。

1.2 Ad5-hACE2 或 AAV-hACE2 转导的小鼠模型

除了通过基因修饰的转基因小鼠过表达 hACE2 基因之外,还可以通过病毒介导的基因递送方式在小鼠体内实现 ACE2 的异位表达。常用的病毒载体包括 Adv 或 AAV。例如,通过鼻内或者气管接种的方式,使过表达 hACE2 的腺病毒 Ad5-hACE2 感染大部分肺上皮细胞,促使 SARS-CoV-2 在小鼠呼吸道内繁殖和复制,这一过程可以持续数天,导致小鼠体重下降约 20%,在感染过程中,可以观察到肺部出现炎症浸润、出血以及肺泡水肿等病理变化,说明肺功能受到损害。TNF- α 和 IL-6 等炎症因子也显著上调^[12]。相较于腺病毒,腺相关病毒的免疫原性较低,通过 AAV 介导 hACE2 在小鼠肺部表达,再经 SARS-CoV-2 感染,病毒同样可以在小鼠肺组织中复制,进而引发肺单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的浸润增加,同时还诱导 I 型干扰素和体液免疫反应^[13]。目前靶向小鼠肺组织常用的 AAV 血清型是 AAV-6 和 AAV-9,通过腹腔注射和气管接种 AAV-ACE2 病毒,能够实现小鼠肺部持续表达 ACE2,时间可达 28 周^[14-16]。感染 AAV-ACE2 的野生型小鼠在 SARS-CoV-2 病毒攻击后,病毒在 hACE2 小鼠肺部的复制过程持续 7 d 左右,出现了中度的间质性肺炎症状。这些症状包括支气管周炎症、肺泡上皮弥散性感染、单核细胞以及衍生的巨噬细胞的浸润,不同品系小鼠免疫反应方面表现不一^[17]。免疫力强的小鼠能在 1 周左右迅速清除病毒,而免疫缺陷小鼠,如 IFNAR^{-/-} 和 STAT1^{-/-} 小鼠,病毒清除的时间则较长^[12-13]。这种个体免疫差异能够很好地模拟临床上的重症症状。值得注意的是,免疫缺陷小鼠被感染后,肺组织不再募集巨噬细胞,且 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞以及 NK 细胞的激活受到抑制,淋巴细胞数量减少,而中性粒细胞数量却显著增加,这一现象在 SARS-CoV-2 患者的病理过程中相当常见^[18-19],因此正向免疫反应对于抗病毒至关重要。尽管 AAV 或 Adv 可快速获得新冠易感的动物模型,但与 K18-hACE2 转基因小鼠相比,病毒在体内的复制能力降低,对应的临床症状也较轻,也就是说在模拟 SARS-CoV-2 感染的病理

特征方面存在一定限制,这可能主要归因于 hACE2 的异位表达影响了病毒对细胞或者组织的亲嗜性。

1.3 新冠病毒鼠适应株筛选及其感染模型

为了应对缺乏适用于新冠病毒研究的小鼠模型,从病毒角度着手,采用 SARS-CoV-2 在小鼠体内进行强制连续传代的方法,筛选能有效感染小鼠的新冠病毒适应株,即 MASCP6。经过对该毒株深度测序分析,发现与原始毒株相比,第一代(P0)的肺组织研磨液中,新冠病毒 S 蛋白基因的受体结合域(receptor-binding domain, RBD)已经出现了 A23063T(N501Y)突变,该位点突变可有效增强病毒与小鼠 ACE2 受体的亲和力。随着传代至 P36,获得了一株毒性更强的小鼠适应菌株 MASCP36,其中涉及突变位点包括 K417N、Q493H,该突变株感染小鼠后引起典型的呼吸道症状^[20]。同样,将 SARS-CoV-2-Hu-1 毒株在 1 岁龄 BALB/c 老年鼠中传代,病毒滴度达到峰值时处死老年小鼠,将收获的 P1 代病毒经鼻接种到幼鼠中连续传代,产生小鼠适应毒株 WBP-1。病毒序列分析显示,第一代出现了 Q498H 突变,而 Q493K 突变则发生在第五代,这些突变均发生在 RBD 区域,增强了病毒与 mACE2 的亲和力^[21-22]。使用 TLR7/8 激动剂雷西莫德可以保护小鼠免受 WBP-1 攻击,这种小鼠适应性毒株是研究 SARS-CoV-2 和开发新疗法的有力工具^[23]。除了通过连续传代积累有利于病毒复制的突变外,还可采用反向遗传技术重塑 S 蛋白抗原和 mAce2 的结合部位,从而快速构建小鼠适应性毒株 SARS-CoV-2 MA 重组病毒。该病毒借助 mAce2 受体感染宿主,产生的临床相关表型较 hACE2 小鼠更为丰富,包括体重下降、肺功能受损、致死率和死亡率增加等^[24]。并用 SARS-CoV-2 MA 毒株在小鼠身上证明了新冠感染严重程度高度依赖于年龄大小的疾病特征,同时证实聚乙二醇化 IFN- λ 1a 在临床上可用于治疗 SARS-CoV-2 引起的感染^[25]。

1.4 植入人体组织或细胞的人源化小鼠模型

尽管可以通过基因人源化或筛选小鼠易感的 SARS-CoV-2 毒株的方法建立新冠感染的小鼠模型,但是肺组织作为 SARS-CoV-2 感染的主要靶组织,难以通过小鼠模型揭示人肺感染 SARS-CoV-2 时的病理变化。因此,拥有人肺成熟结构的组织对于模拟 SARS-CoV-2 感染人体的过程至关重要。通过手术将人胎儿肺组织移植到重症联合免疫缺陷小鼠(severe combined immunodeficiency, SCID)的背部皮

肤内,经过 8 周的生长,建立了 SCID-人肺小鼠模型,随后对该模型进行 SARS-CoV-2 感染实验,结果显示病毒在肺组织中快速复制,引发了严重的肺损伤和强烈的炎症反应^[26]。但也有研究表明,将人胎儿肺移植到肾包膜下,更有利于人胎儿肺组织微血管的重塑。无论是肾包膜移植还是皮下移植均支持病毒在移植肺组织中的感染和复制,借助该模型发现 SARS-CoV-2 主要感染人 II 型肺泡上皮细胞(human type II alveolar epithelial cells, hAEC2s)以及气管中的纤毛细胞,并验证了口服 EIDD-2801 这种广谱抗病毒药物能显著抑制 SARS-CoV-2 在肺移植中的复制^[27]。

为了使人源化肺组织具备气体交换功能,从而更好地研究病毒传播,研究人员首先通过博来霉素破坏鼠源的肺细胞,随后通过静脉注射或者气管滴注的方式在原位嵌合人肺干细胞、人胎肺细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)以及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)定向分化来的肺样细胞,最终构建人肺嵌合小鼠模型^[28]。然而,迄今为止,尚未有使用此模型来研究呼吸道病原体感染的报道。其中一个重要的原因是该模型中的人肺嵌合比例较低。

尽管人肺异种移植小鼠模型可以作为研究 SARS-CoV-2 感染人肺部过程的有利工具,但要充分模拟 SARS-CoV-2 病毒感染人类肺部引起的人类免疫反应过程仍然存在困难,主要原因是人肺小鼠模型缺乏人的免疫反应系统,因此在人肺小鼠模型基础上,通过移植人的骨髓将小鼠免疫系统人源化是探索临床中 SARS-CoV-2 感染人体肺组织免疫反应的关键。当 SARS-CoV-2 感染该模型小鼠后,小鼠出现严重的炎症和 SARS-CoV-2 相关的免疫病理学表型,这可能与巨噬细胞浸润和分化以及 I 型干扰素上调有关^[29]。因此肺/免疫系统双人源化的小鼠不仅可以用于评估 SARS-CoV-2 病毒感染早期引发的免疫反应^[30],还可以作为评估抗体和类固醇疗法对新冠病毒早期感染影响的重要模型^[31]。

2 非人灵长类动物模型

与小鼠相比,非人灵长类动物(non-human primate, NHP),包括恒河猴、食蟹猴、非洲绿猴、狒狒和普通狨猴等,在生理特征和免疫调节等方面与人类具有显著的相似性,因此可以用于 SARS-CoV-2 感染的大动物模型。ACE2 基因在多物种中的序列

比对分析显示:恒河猴的 ACE2 基因与人 ACE2 基因的同源性为 91%,且 ACE2 与 S 蛋白关键结合区域 RBD 的氨基酸序列在人、食蟹猴和恒河猴中是保守的。尽管如此,不同品种的猴子对 SARS-CoV-2 的易感性不一样,最敏感的是非洲绿猴、其次是恒河猴,最后是食蟹猴,这一现象表明有无 ACE2 受体表达并不是评估新冠病毒感染与否的唯一指标,可能还与其他辅助受体的参与有关。NHP 单细胞测序分析显示,II 型肺泡细胞、鼻杯状分泌细胞和吸收性肠细胞均同时表达 ACE2 和 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 2(transmembrane protease, erine 2, TMPRSS2),而这两种蛋白是 SARS-CoV-2 感染宿主细胞的关键受体,这一结果表明这些类型的细胞很可能是 SARS-CoV-2 感染的主要靶细胞^[32]。

非洲绿猴在受到病毒攻击后,出现的临床症状包括短暂发烧、食欲下降、高碳酸血症、淋巴细胞和血小板减少症、肝转氨酶升高,单核细胞增加以及急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[33-35]。值得注意的是 ARDS 在老年非洲绿猴身上可以持续观察到,这个症状在其他 NHP 中很难模拟,因此老年非洲绿猴可能是模拟新冠重症非常重要的模型^[35]。感染病毒的猴观察到病毒性肺炎、胃肠道异常和广泛的肺部病变,包括:肺变色、浑浊、细支气管炎、充血和胸膜粘连^[34]。

恒河猴则在感染病毒后出现轻度发烧、体重减轻、食欲下降和缺氧,偶有乏力、血小板减少、短暂中性粒细胞减少和淋巴细胞减少^[36-37]。尽管恒河猴表现出典型的人类患者的临床症状:肺部变色、充血、玻璃样浑浊、浸润、出血、坏死和间质性肺炎,但是无法重现临床上重症患者的症状,例如 ARDS^[36]。

当通过鼻内或气管内的方式感染 SARS-CoV-2 时,食蟹猴的肺出现实质病变,轻度发烧以及体重减轻,同时还观察到 SARS-CoV-2 感染猴表现出另一种病理变化,即弥散性肺泡损伤(diffuse alveolar injury, DAI)^[35]。

总的来说,三种 NHP 均对 SARS-CoV-2 易感,但症状不如临床上的严重。序列分析显示:猴子 ACE2 与 RBD 的亲合力低于人,一定程度上也解释了为什么 NHP 能够感染 SARS-CoV-2,但不会发展为重症。因此通过 AAV 病毒在猴子肺部实现异位表达 hACE2,可能是模拟人类 SARS-CoV-2 引起的重症临床症状的最佳手段。此外,不同种类的 NHP

在病毒复制和清除方面存在差异。而病毒的复制和清除了与猴子品种有关,还与病毒感染宿主的途径有关。单独鼻腔和鼻腔气管联合接种病毒,这两种方式都可以使病毒大量复制,并在感染后 1 ~ 3 d 达到峰值,持续 5 ~ 7 d 后下降^[38-40]。有研究报道,SARS-CoV-2 感染后 5 d 会引起病毒在鼻腔组织中的第二波复制,病毒脱落期延长,可持续 4 周^[4]。另一项研究显示,下呼吸道和肺组织中的病毒复制在感染 3 d 后增加,并在感染 9 d 时达到峰值^[41]。而气管内接种 SARS-CoV-2 则不会引起病毒在鼻组织中复制,且病毒在肺组织中载量要低得多,表明上呼吸道病毒聚集是加剧下呼吸道的病毒传播和感染的重要前提,上呼吸道病毒聚集会出现更严重的新冠症状^[42]。

SARS-CoV-2 感染后,先天免疫反应的激活发生在感染后 1 ~ 3 d 内,感染早期诱导 I 型 IFN 反应,中晚期则诱导 Th1/Th2 反应和获得性免疫反应^[43-45]。中和抗体最早在 NHP 感染病毒后 5 d 产生,并在感染后 15 ~ 21 d 时达到峰值^[41,46]。当 NHP 再次暴露于 SARS-CoV-2 时,中和抗体和记忆免疫反应可有效防止病毒再次感染机体^[47]。当病毒诱导 T 辅助细胞的 Th0 亚型向 Th1 亚型转变后, Th1 细胞协同巨噬细胞激活 B 淋巴细胞,从而促进机体内病毒的清除。此外, TNF- α 和 IFN- γ 可直接作用于肺上皮表面的受体,诱导抗病毒反应。Th2 分泌的细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 和 IL-10 则抑制抗病毒反应并延迟清除病毒^[45],总之,清除 SARS-CoV-2 是一个受机体免疫调节的过程,针对病毒产生的中和抗体和适应性免疫反应会促进病毒的清除。

3 结语

小鼠模型可以很好地模拟在 SARS-CoV-2 患者上观察到的临床症状和特征。K18-hACE2 和 CAG-hACE2 转基因小鼠能很好地模拟重症 ARDS 患者的特征。由于小鼠遗传背景比较清楚,因此在操作性和重复性上具有很大优势。AAV 或 Adv 异位表达则会改变病毒对组织或细胞的嗜性,且仅短暂表达。而 NHPs 与人类亲缘关系较近,在疫苗和抗体效果评估方面有很强的优势,但价格昂贵。因此要想充分研究 SARS-CoV-2 的致病机制以及感染后引起的免疫反应,需要综合评估不同动物模型的优势和劣势,更好地为新冠病毒疫苗开发和抗病毒方法的研究服务。

参 考 文 献 (References)

- [1] Damas J, Hughes GM, Keough KC, et al. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117 (36): 22311-22322.
- [2] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. Nature, 2020, 583 (7818): 830-833.
- [3] Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function [J]. Nat Immunol, 2020, 21(11): 1327-1335.
- [4] Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 [J]. Cell, 2020, 182(1): 50-58.
- [5] Asaka MN, Utsumi D, Kamada H, et al. Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter-driven hACE2-transgenic mice [J]. JCI Insight, 2021, 6(19): e152529.
- [6] Sun SH, Chen Q, Gu HJ, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. Cell Host Microbe, 2020, 28 (1): 124-133.
- [7] Liu FL, Wu K, Sun J, et al. Rapid generation of ACE2 humanized inbred mouse model for COVID-19 with tetraploid complementation [J]. Natl Sci Rev, 2021, 8(2): nwa285.
- [8] Chen Y, Li C, Liu F, et al. Age-associated SARS-CoV-2 breakthrough infection and changes in immune response in a mouse model [J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 368-383.
- [9] Zhang Y, Huang K, Wang T, et al. SARS-CoV-2 rapidly adapts in aged BALB/c mice and induces typical pneumonia [J]. J Virol, 2021, 95(11): e02477.
- [10] Roberto A, Hiroshi D, Fernández Jose F, et al. Sex-specific differences in the pathogenesis, endothelial dysfunction, and hypercoagulability of sars-cov-2 infection in K18-hACE2 mice [J]. Blood, 2022, 140(1): 1674-1675.
- [11] Oladunni FS, Park JG, Pino PA, et al. Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6122.
- [12] Sun J, Zhuang Z, Zheng J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. Cell, 2020, 182(3): 734-743.
- [13] Israelow B, Song E, Mao T, et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling [J]. J Exp Med, 2020, 217(12): e20201241.
- [14] Gary EN, Warner BM, Parzych EM, et al. A novel mouse AAV6 hACE2 transduction model of wild-type SARS-CoV-2 infection studied using synDNA immunogens [J]. iScience, 2021, 24 (7): 102699.
- [15] Sun CP, Jan JT, Wang IH, et al. Rapid generation of mouse model for emerging infectious disease with the case of severe COVID-19 [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(8): e1009758.
- [16] Glazkova DV, Bogoslovskaya EV, Urusov FA, et al. Generation of SARS-CoV-2 mouse model by transient expression of the human ACE2 gene mediated by intranasal administration of AAV-

- hACE2 [J]. Mol Biol, 2022, 56(5): 774–782.
- [17] Nikesh T, Warner Bryce M, Griffin Bryan D, et al. Generation and characterization of a SARS-CoV-2-susceptible mouse model using adeno-associated virus (AAV_{6.2}FF)-mediated respiratory delivery of the human ACE2 gene [J]. Viruses, 2022, 15(1): 85.
- [18] Liu R, Wang Y, Li J, et al. Decreased T cell populations contribute to the increased severity of COVID-19 [J]. Clin Chim Acta, 2020, 508: 110–114.
- [19] Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19 [J]. Nat Med, 2020, 26(7): 1070–1076.
- [20] Gu H, Chen Q, Yang G, et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy [J]. Science, 2020, 369(6511): 1603–1607.
- [21] Huang K, Zhang Y, Hui X, et al. Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice [J]. EBioMedicine, 2021, 67: 103381.
- [22] Sun S, Gu H, Cao L, et al. Characterization and structural basis of a lethal mouse-adapted SARS-CoV-2 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5654.
- [23] Huang K, Zhang Y, Hui X, et al. Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice [J]. EBioMedicine, 2021, 67: 103381.
- [24] Leist SR, Dinnon KH 3rd, Schäfer A, et al. A mouse-adapted SARS-CoV-2 induces acute lung injury and mortality in standard laboratory mice [J]. Cell, 2020, 183(4): 1070–1085.
- [25] Dinnon KH 3rd, Leist SR, Schäfer A, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures [J]. Nature, 2020, 586(7830): 560–566.
- [26] Fu W, Wang W, Yuan L, et al. A SCID mouse-human lung xenograft model of SARS-CoV-2 infection [J]. Theranostics, 2021, 11(13): 6607–6615.
- [27] Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801 [J]. Nature, 2021, 591(7850): 451–457.
- [28] Kathiriyi JJ, Wang C, Zhou M, et al. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5⁺ basal cells [J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(1): 10–23.
- [29] Kenney DJ, O’Connell AK, Turcinovic J, et al. Humanized mice reveal a macrophage-enriched gene signature defining human lung tissue protection during SARS-CoV-2 infection [J]. Cell Rep, 2022, 39(3): 110714.
- [30] Sun R, Zhao Z, Fu C, et al. Humanized mice for investigating SARS-CoV-2 lung infection and associated human immune responses [J]. Eur J Immunol, 2022, 52(10): 1640–1647.
- [31] Zhang C, Wei B, Liu Z, et al. Bafilomycin A1 inhibits SARS-CoV-2 infection in a human lung xenograft mouse model [J]. Virol J, 2023, 20(1): 18.
- [32] Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues [J]. Cell, 2020, 181(5): 1016–1035.
- [33] Johnston SC, Ricks KM, Jay A, et al. Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure [J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0246366.
- [34] Woolsey C, Borisevich V, Prasad AN, et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection [J]. Nat Immunol, 2021, 22(1): 86–98.
- [35] Blair RV, Vaccari M, Doyle-Meyers LA, et al. Acute respiratory distress in aged, SARS-CoV-2-infected African green monkeys but not Rhesus macaques [J]. Am J Pathol, 2021, 191(2): 274–282.
- [36] Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model [J]. Science, 2020, 368(6494): 1012–1015.
- [37] Munster VJ, Flagg M, Singh M, et al. Subtle differences in the pathogenicity of SARS-CoV-2 variants of concern B.1. 1. 7 and B. 1. 351 in rhesus macaques [J]. bioRxiv, 2021, 7(43): eabj3627.
- [38] Böszörményi KP, Stammes MA, Fagrouch ZC, et al. The post-acute phase of SARS-CoV-2 infection in two macaque species is associated with signs of ongoing virus replication and pathology in pulmonary and extrapulmonary tissues [J]. Viruses, 2021, 13(8): 1673.
- [39] Salguero FJ, White AD, Slack GS, et al. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1260.
- [40] Lu S, Zhao Y, Yu W, et al. Comparison of nonhuman Primates identified the suitable model for COVID-19 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 157.
- [41] Zheng H, Li H, Guo L, et al. Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques; a nonhuman primate model of COVID-19 progression [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(11): e1008949.
- [42] Shan C, Yao YF, Yang XL, et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques [J]. Cell Res, 2020, 30(8): 670–677.
- [43] Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 [J]. Nat Immunol, 2020, 21(11): 1336–1345.
- [44] Zhou Y, Fu B, Zheng X, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients [J]. Natl Sci Rev, 2020, 7(6): 998–1002.
- [45] Aleebrahim-Dehkordi E, Molavi B, Mokhtari M, et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus; from cytokines produced to immune responses [J]. Transpl Immunol, 2022, 70: 101495.
- [46] Baek SH, Oh H, Koo BS, et al. Cynomolgus macaque model for COVID-19 delta variant [J]. Immune Netw, 2022, 22(6): e48.
- [47] Deng W, Bao L, Liu J, et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques [J]. Science, 2020, 369(6505): 818–823.