

• 综 述 •

埃博拉病毒及其药物研究进展

丁 玥^{1,2}, 曹泽或^{1,2}, 柯志鹏^{1,2}, 曹 亮^{1,2}, 李 娜^{1,2}, 丁 岗^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: 埃博拉病毒是一种能导致人类及脊椎动物出血热的致死性病毒, 病死率高达 90%, 对公共卫生具有严重危害, 目前还没有针对埃博拉病毒有效的疫苗和药物或者治疗手段, 世界卫生组织已经将埃博拉病毒列为对人类危害最为严重的病毒之一。2014 年在非洲肆虐的埃博拉疫情日趋严重, 针对埃博拉病毒的相关研究再次成为病毒学研究的热点。着重介绍了埃博拉病毒的一般特性、结构组成、生命周期, 同时综述了埃博拉出血热的发病机制、临床表现, 最后总结了抗埃博拉病毒的靶点与药物的最新研究进展, 对中药预防与治疗埃博拉出血热的前景进行了展望, 对人们了解埃博拉病毒和开发抗埃博拉病毒的药物起到推动作用。

关键词: 埃博拉病毒; 致病机制; 病毒结构; 抗病毒靶点; 抗病毒药物

中图分类号: R285; R286.87 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0912-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.024

Ebola virus and advances in studies on drugs used against it

DING Yue^{1,2}, CAO Ze-yu^{1,2}, KE Zhi-peng^{1,2}, CAO Liang^{1,2}, LI Na^{1,2}, DING Gang^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Ebola virus (EBOV) is a highly lethal virus leading to rapidly fatal hemorrhagic fever in humans and other vertebrates, whose mortality rate could be 90%. Up to now, there is still no effective anti-virus drug or vaccine. Because of severe public health hazard, EBOV has been listed in the most dangerous viruses to humans by WHO. Due to the outbreak of Ebola hemorrhagic fever (EHF) in Africa in 2014, the correlation research on EBOV has become the hot topic in virology. The general characteristics, structure composition, life cycle of virus, pathogenesis generalization, clinical manifestation of EHF were described in this review. The recent advances about the antiviral targets and drugs were also summarized, as well as prospect on the application of Chinese materia medica in anti-EBOV. In a word, the understanding of EBOV and drug development could be promoted by this review.

Key words: Ebola virus; pathogenesis; virus structure; antiviral target; antiviral drug

2014 年 2 月, 西非开始爆发大规模埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 疫情, 世界卫生组织关于疫情报告表明, 截至 2014 年 12 月 2 日, 以几内亚、利比里亚、塞拉利昂疫情最为严重、美国、塞内加尔与西班牙也陆续出现确诊病例报告, 目前为止累计出现埃博拉确诊、疑似和可能感染病例 17 290 例, 其中 6 128 人死亡, 死亡人数上升趋势正在减缓。本文着重介绍了埃博拉病毒的一般特性、结构组成、

生命周期, 同时综述了埃博拉出血热 (Ebola hemorrhagic fever, EHF) 的发病机制、临床表现, 最后总结了抗 EBOV 的靶点与药物的最新研究进展, 对中药预防与治疗 EHF 的前景进行了展望。

1 EHF 的研究现状

1.1 EBOV 的一般特征

EHF 是由丝状病毒科丝状病毒属的 EBOV 引起的一种高致死率和高传染性的急性出血性传染病,

收稿日期: 2015-01-05

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 丁 玥, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药新药筛选与药理研究。Tel: 18651895078 E-mail: neverreturn7@163.com

*通信作者 萧 伟, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: kanionlunwen@163.com

1976年从扎伊尔埃博拉河附近村庄的1例患者体内首次分离得到,并由此被命名^[1-2]。EBOV是一种泛嗜性的病毒,可侵犯各系统器官,尤以肝、脾损害为重,主要通过直接接触患者的体液、器官和排泄物,处理发病和死亡的动物,使用污染的医疗用品等途径传播,另外也可通过气溶胶和性接触传播。EHF发病无明显季节性,人群普遍易感,无性别差异,是人类目前已知最为烈性的传染病之一,感染后死亡率高达90%,世界卫生组织已将EBOV列为对人类危害最严重的病毒之一。

根据病毒抗原不同,EBOV主要分为4个亚型:扎伊尔型(EBOV-Z)、苏丹型(EBOV-S)、科特迪瓦型(EBOV-C)及雷斯顿型(EBOV-R)。不同亚型EBOV的毒力不同,其中EBOV-Z毒力最强,EBOV-S次之,两者对人类和非人类灵长类的致死率很高,为50%~88%。EBOV-R和EBOV-C对人的毒力较低,表现为亚临床感染,EBOV-R仅在非人类灵长类中引起发病和死亡,尚未见引起人类致病的报道^[3]。4种亚型相互间存在血清学交叉反应,通过定量血清学、胰酶消化多肽图谱分析和寡核苷酸图谱分析等方法可以检测出不同亚型。由于EBOV传染性极强,目前还没有针对EBOV特效的疫苗或者治疗手段,进行相关研究需在生物安全级别为最高的P4级的实验室中进行。

1.2 EBOV 感染的临床表现

EHF是一种多器官损害的疾病,组织病理学特征是肝、脾、肺、淋巴结和睾丸的急性坏死及弥散性血管内凝血(DIC)、电解质和酸碱的平衡失调,还表现为大动脉内皮细胞产生前列腺素能力的受损和内皮细胞生化完整性的破坏。临床症状主要表现为急性发热(38.3℃以上)、肌肉酸痛、头痛、呕吐、面部水肿、皮疹、胃肠道、呼吸道和器官瘀血、出血、肝功能和肾功能损害,器官坏死、分解,最后多因广泛性内出血、脑部受损等原因而死亡^[4-6]。

EHF特征性的感染周期分为几个阶段^[7-9]:潜伏期3~18 d,患者可观察到发热等前期症状;发病第2~3天可出现恶心、呕吐、腹痛,腹泻黏液便或血便,腹泻可持续数天;第4~5天进入极期,发热持续,出现神志意识变化,此期常见出血,可有呕血、黑便、注射部位出血、鼻咯血等,急性期并发症有心肌炎、肺炎等;第6~7天,可在躯干出现麻疹样斑丘疹,并扩散至全身各部,数天后脱屑,以肩部、手心、脚掌多见;重症患者常因出血、肝功能和肾功能衰竭、

严重的并发症或休克死于病程第8~9天。在临床症状开始显现初期,病人的肝、脾、淋巴结及肺部有较高的病毒滴度,随着病毒的复制,这些组织逐渐坏死。感染后2 d病毒首先在肺中检出,4 d后在肝、脾等组织中检出,6 d后全身组织均可检出。

1.3 EBOV 的致病机制

EBOV致病的原因主要由于对人体两方面的危害:一是血管以及肝、脾、肾等脏器,二是免疫系统。

病毒进入机体后,首先感染单核吞噬系统的细胞(mononuclear phago-cyctic system, MPS),受感染的MPS被激活,释放大量的细胞因子和趋化因子,这些细胞活性物质可增加血管内皮细胞的通透性,诱导表达内皮细胞表面黏附和促凝因子;当病毒释放到淋巴或血液中,可以引起肝脾肾等多脏器损伤^[10],两者协同作用下最终导致DIC,使患者迅速死亡^[7-9]。

EHF的另一个显著特点是抑制宿主的免疫反应,患者经常还没有出现有效的免疫反应就已经死亡,在感染晚期可发生脾脏、胸腺和淋巴结等大量淋巴细胞凋亡。单核细胞巨噬细胞和树突状细胞(DCs)在EBOV感染中是最重要的早期靶细胞,在先天免疫和获得性免疫中都有重要作用的DCs,在体外感染EBOV实验研究中发现其并不行使功能,即不能产生前炎性细胞活素或表达协同刺激分子^[11-13]。自然杀伤细胞(NK)也是受EBOV感染影响的先天免疫细胞,这些细胞以独立抗原的方式应答病毒的感染,并通过释放穿孔素和颗粒酶诱导凋亡来杀死被感染的细胞^[14]。

2 EBOV 的基因结构和蛋白组成

2.1 EBOV 的基因结构

EBOV是一种不分节段的单股负链RNA病毒,丝状病毒科丝状病毒属,EBOV形态多样,外有脂蛋白组成的包膜,多呈长丝状或杆状,有分支形、U形、6形或环形,分支形的较常见,直径70~90 nm,长度差异较大,长0.5~1 400 nm,感染能力较强的病毒一般长665~805 nm。毒粒表面有刷状样整齐排列的突起,长约7 nm,间隔10 nm,内含直径40 nm的内螺旋衣壳,染色观察内部有交叉条纹^[3]。

病毒基因组为非节段,线状,单股负链RNA,全长18.9 kb,相对分子质量为 4.2×10^6 ^[3],基因组反转录产生的正链能编码巨蛋白(large protein, L)、核蛋白(nucleoprotein, NP)、2个结构蛋白VP30和VP35(virion structural protein)、膜关联

蛋白 (membrane-associated protein) 或基质蛋白 (matrix protein) VP24 和 VP40、糖蛋白 (glycoprotein, GP) 以及 EBOV 特有的分泌型小糖蛋白 (secreted glycoprotein, sGP) 7 个蛋白和 RNA 聚合酶^[3], 每种产物由一种单独的 mRNA 编码, 基因外的两末端序列具有保守性和高度互补性, 含五聚体 3'-UAAUU-5', 多数基因被非保守的基因间隔开^[15]。

2.2 EBOV 的蛋白与功能

本文对 EBOV 各个蛋白的结构及其在致病感染中的作用进行逐一阐述 (图 1)^[16], 由于 4 种与膜相偶联的蛋白 (GP、VP40、VP24 和 NP) 在 EBOV 的毒粒装配、出芽以及致病过程中起到了相当关键的作用, 对这 4 种蛋白的研究有助于 EBOV 致病机制的阐明和加速 EBOV 疫苗与治疗药物的研发过程, 因此本文将主要介绍这 4 种蛋白的结构及功能。

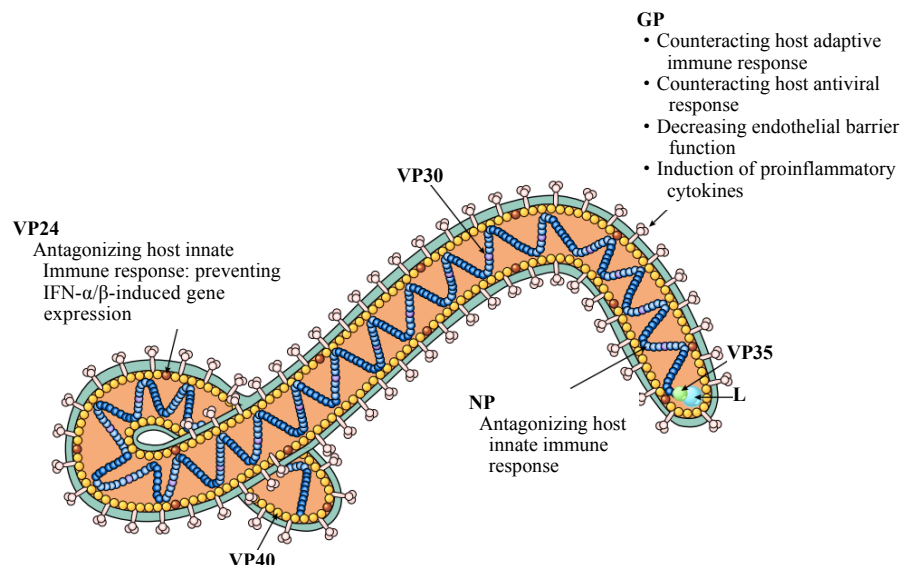


图 1 EBOV 结构及其蛋白在病毒感染致病过程中的功能

Fig. 1 Function of EBOV structure and its protein in pathogenic process with virus infection

GP 是病毒外膜表面的“小钉”, 该蛋白在 EBOV 入侵宿主细胞中具有重要作用^[17]。GP 蛋白是由 GP1 和 GP2 2 个亚单位形成三角裂杯状的同源三聚体, 并且高度糖基化。在病毒感染过程中, GP 蛋白被 furin 蛋白酶水解成 GP1 和 GP2^[18], 分别发挥受体识别与结合 (GP1), 以及病毒与细胞膜融合 (GP2) 的功能^[19-21]。Takada 等^[22]比较了 EBOV-Z 和 EBOV-R 的 GP, 发现 EBOV-R 的 GP furin 识别位点明显少于 EBOV-Z, 这可能是 EBOV-R 的毒力比 EBOV-Z 弱的原因。GP1 通过与受体结合黏附在细胞表面^[23], 在组织蛋白酶 B 和 L 的消化下, 打开蛋白衣壳将病毒遗传物质注入宿主细胞^[24-25]。此外, 也有研究表明, EBOV 进入细胞需要胆固醇转运蛋白 Niemann-Pick C1 (NPC1)^[26]。

病毒核酸进入宿主细胞后通过 RNA 编辑或框架漂移方式合成 GP 蛋白。GP 蛋白为 I 型跨膜蛋白, 具有 2 个阅读框, 分别编码 1 个分泌型的糖蛋白 sGP (secreted GP) 和 1 个全长的跨膜 GP, sGP 作为 GP 的早期产物被大量分泌出来^[27-28], 可能与干扰免疫

细胞对病毒的杀伤作用有关, sGP 通过 CD16b (中性粒细胞 Fc-受体的一种形式) 与中性粒细胞结合并抑制其早期活化作用, 使其对病毒的先天性免疫 (炎症反应) 减少, 为病毒复制提供了便利^[29]。科学家们还发现, sGP 能够与中和抗体结合以抑制抗 GP 抗血清的中和反应, 这可以解释当感染发生时为什么在病人的血清里并没有检测到 GP 特异性抗体, 却发现了 EBOV 其他主要病毒蛋白的抗体^[30]。综上所述, sGP 与宿主免疫细胞的密切互动可能是其能逃避免疫反应的重要原因之一。

此外, 宿主细胞中新合成的 GP 蛋白不但可以与细胞的整合素 (integrins) 结合诱导细胞变圆和细胞分离, 导致细胞病变, 还可以与上皮细胞更加紧密的结合, 破坏微血管的完整性, 引起血管渗漏^[31-32], 从而诱导上皮细胞的感染导致其功能紊乱, 导致出血热晚期阶段的出血症状。

VP24、VP40 与病毒颗粒的成熟有密切关系。VP40 是丝状病毒毒粒中量最丰富的一类蛋白, VP40 长约 326 个氨基酸, 含大量的疏水区, 保守性较高,

具有与细胞因子相互作用的位点,与病毒的成熟和释放有关,同时它与 GP 共表达,产生具特定形态、有感染力的病毒粒子。VP40 是由 2 个富含 β 折叠的结构相似的结构域组成,而这两个结构域由 6 个氨基酸残基构成的桥段连接。VP40 可以通过其 C 端与细胞膜紧密结合,具有抵抗高盐度的特点。相对于其他病毒蛋白来说,VP40 最突出的特点是能够发生寡聚化作用(oligomerization)^[33]。Scianimanico 等^[34]发现 VP40 与质膜结合后会发生自体寡聚化,并暴露出其 N 端结构域从而可与其他 VP40 单体结合。科学家已经分离出了 VP40 的六聚体和八聚体(结构元件都是 VP40 二聚体),两者结构均为环状结构,能与核酸结合。Gomis-Ruth 等^[35]推测,这种 VP40 八聚体可能与毒粒的核衣壳形成有关,还可能参与对毒粒 RNA 转录和翻译的调控过程。利用哺乳动物细胞表达的 VP40 能以与膜结合的形式释放到培养基中,其中 VP40 的 N 端结构域在毒粒装配和出芽过程中起着重要的作用^[36]。进一步的研究表明,VP40 中一种保守的结构域 Late-domain,在毒粒的出芽过程中也起着非常重要的作用。Late-domain 主要有 3 个重要的基序:PTAP、PPxY 和 YxxL。VP40 的 PPxY 基序在其 N 端部分,若对 PPxY 序列的酪氨酸残基进行突变,则对出芽过程造成影响^[37]。Late-domain 可以在 VP40 的不同部位发挥相同的作用:当把 VP40 N 端的 Late-domain 去除而插入 C 端后,由 VP40 介导的病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)的释放活性不会发生改变。Late-domain 与细胞因子还可发生相互作用促进其出芽过程。目前认为 EBOV 病毒颗粒的组装和出芽过程是 VP40 单体首先通过其 C 端与多囊泡体(multi-vesicularbodies, MVB)结合,这种结合使 VP40 的构象发生变化从而自体寡聚化。Nedd4 与 VP40 的 PPxY 基序结合后能够泛素化 VP40 和邻近的蛋白^[38]。Tsg101 与 ESCRT1 复合物结合后,再协同 ESCRT 复合物与泛素化了的 VP40 MVB 复合物结合,然后一起被运送到质膜。在质膜上,VP40 MVB 复合物在 ESCRT 复合物诱导膜的外翻作用下逐渐形成小泡,ESCRT 复合物还能促进成熟毒粒的聚集,最终导致毒粒的释放^[37-38]。

VP24 为小型膜蛋白,可能与病毒的组装和出芽释放有关。VP24 被认为是第 2 基质蛋白,VP24 在 EBOV 中是一种次级基质蛋白,同时也是毒粒的次要组成成分,分布于细胞的质膜或者核周区域,

具有膜蛋白的所有性质。目前在 EBOV-Z 的 VP24 的氨基酸序列中,发现了 3 个 N 端连接糖蛋白的潜在位点,分别在氨基酸序列的第 84、185 和 246 位置上,同时还发现了序列中存在着一段富含疏水残基的区域,即第 90、130 位的氨基酸序列。目前已发现,VP24 能够在哺乳动物细胞中寡聚化,并且优先形成四聚体,在这一过程中,VP24 的 N 端区域起着十分重要的作用^[39]。最近的研究表明,VP24 很可能与脂筏紧密地结合在一起,在 VP24 的 172~175 的氨基酸位置,发现了序列与 Late-domain(YxxL)相一致的基序,而且在 VLPs 中检测到了 VP24 的存在,这表明 VP24 很有可能在病毒的装配和出芽过程中起到重要的作用^[40]。此外,VP24 能够抑制 α 干扰素(IFN- α)信号转导通路,逃避宿主免疫系统的监视^[41]。

NP 是核蛋白的主要成分,其基因定位于基因组的 3'端,带有一个前导序列,编码区含 2 217 个核苷酸,编码一个含 737 个氨基酸残基的蛋白质,相对分子质量为 8.33×10^4 ^[42]。NP 可分为 N 端疏水性的一半(包含了所有的 Cys 残基)和 C 端亲水性的一半(包含了大部分的 Pro 残基),N 端的作用可能是与基因组的 RNA 结合,其 C 端的作用可能是结合病毒的其他蛋白。NP 与 VP30、VP35 及基因组 RNA 组成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)^[43],VP30 是具有锌指结构的蛋白质,VP30 与核衣壳紧密结合,是病毒转录的激活因子^[44-45],在转录起始之后作为抗转录终止因子发挥作用,另外,VP30 普遍磷酸化,这一翻译后的修饰过程可调节 VP30 在转录过程中的活性。VP35 对转录启动子有负调控作用,VP35 能够抑制干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)的磷酸化^[46],而磷酸化的 IRF3 在 IFN 分泌中起转录因子的作用,病毒可能通过 VP35 抑制 I 型干扰素的产生从而关闭免疫系统^[47],因此,VP35 很可能是 EBOV 毒力的一个重要因子。

L 基因有一些较为保守的序列,据专家估计 L 可能是一种依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,一般具有 RNA 聚合酶、外切酶等活性^[48]。

3 EBOV 研究的体内外模型

EBOV 可感染并在人、猴、豚鼠等哺乳类动物原代或者传代细胞中增殖,其中,非洲绿猴肾细胞(Vero)^[49]、HeLa-229 细胞^[49]和人胚肺纤维母细胞^[50]等最为敏感;病毒接种后,6~7 d 出现

细胞病变, 表现为细胞圆化、皱缩, 细胞质内可见纤维状或颗粒状结构的包涵体, 但仅在 Vero 细胞中形成空斑。包涵体主要由核衣壳组成, 成熟的病毒从细胞浆中含有核衣壳的管型结构通过宿主细胞膜以芽生的形式释放。

目前常用的 EBOV 动物模型主要包括小鼠、豚鼠及非人灵长类 3 种, 免疫系统完整的成熟小鼠并不能感染 EBOV, 推测可能是由于其强大的先天免疫系统, 尤其是 IFN-I 型反应所导致。然而, 腹腔或脑内接种病毒可导致乳鼠^[51]、成熟的免疫系统缺陷 SCID 小鼠^[52]以及 IFN- α/β 受体或 STAT 基因敲除小鼠死亡^[53-54]。另一途径是通过将 EBOV-Z 在免疫系统完整的乳鼠体内连续传代, 来获得乳鼠适应株^[55]。用 EBOV 攻毒豚鼠仅能引发短时的、非致命的发热症状。同样, 使用 EBOV-Z 在近交及远交系豚鼠体内连续传代可获得使豚鼠致死的适应株。很多非人灵长类动物均被用于 EBOV 动物模型的研究, 其中恒河猴 *Rhesus macaques* 和食蟹猴 *Cynomolgus macaques* 是目前使用的最为广泛的动物模型, 均对 EBOV 高度敏感, 可引起与人类极为类似的临床症状。食蟹猴对 EBOV-Z 毒株最敏感, 临床症状出现最快^[56-58]。现在使用的动物模型主要是啮齿类动物和灵长类动物, 疫苗实验在 2 种动物身上取得的结果差别很大, 或许二者在抗病毒的过程中存在着不同的保护机制。

4 针对 EBOV 的诊断学研究

EBOV 传染性极强, 由于 EHF 早期的临床症状与其他一些疾病有相似之处, 因此, 及时检出和确诊病例对其流行控制和治疗有重要意义。EHF 诊断主要依据流行病学资料、临床表现和实验室检查。目前, 对 EBOV 病原学的检查主要有细胞分离法、ELISA 检测法和 PCR 法 3 种。

在 ELISA 检测方面, 盖微微等^[59]构建了 pET2B (+)-VP 的重组质粒, 并诱导表达 VP40 蛋白。该蛋白具有免疫反应性, 以该蛋白为抗原建立的 ELISA 方法具有较高的特异性和稳定性, 可用于 EHF 的诊断和流行病学调查。同年, 该实验室构建重组病毒 rVSV-ZEBOV-GP, 通过蛋白印迹和共聚焦免疫荧光实验证明 GP 蛋白在感染细胞膜表面能够正确表达。中和实验结果表明该重组病毒能诱导小鼠产生针对 GP 蛋白的特异性中和抗体, 证明了重组病毒作为 EBOV-Z 疫苗的有效性。表明 rVSV-ZEBOV-GP 作为防控 EBOV-Z 的储备性疫苗

具有潜在的应用价值^[60-61]。王雪敏等^[62]原核表达并纯化了 EBOV-C 的核蛋白, 为 ELISA 检测法的开发奠定了基础。

在 PCR 检测方面, 夏咸柱院士团队根据 EBOV-S 和 EBOV-ZGP 基因的保守区序列, 设计一对通用引物及特异性 TaqMan 探针。用建立的 Real-time PCR 方法检测 EBOV 快速、灵敏、特异、重复性好, 为 EHF 的快速确诊奠定了基础^[63]。刘阳等^[64]根据 NP 基因序列, 设计引物和 MGB 探针, 通过优化反应条件, 建立了一种检测 EBOV-Z 和 EBOV-S 的一步法 MGB 荧光定量 RT-PCR 方法。

5 EBOV 疫苗的研究

目前还没有任何 EBOV 疫苗可用于人类, 疫苗被认为是当前最有前途的一个研究方向之一, 美国目前有多家机构在加紧研制针对 EBOV 的疫苗和药物。曾先后有 DNA 重组疫苗、增强型疫苗和病毒样颗粒疫苗问世。美国国立卫生研究院也于 2014 年 7 月 31 日宣布, 该机构将与美国食品及药品监督管理局 (FDA) 合作, 最早将于 2014 年 9 月开始进行埃博拉疫苗人体试验, 有望在 2015 年早些时候得到试验结果。

5.1 DNA 重组疫苗

Sullivan 等^[65]用非人灵长类动物研制了高效的疫苗免疫, 并利用 DNA 重组疫苗在食蟹猴和短尾猴体内诱发了自身免疫机制, 其免疫动物无症状达 6 个月, 而且最后未检测到 EBOV。由于用病毒载体进行初次免疫时, 宿主对载体自身的应答作用会降低对重组载体的免疫应答效果, 从而降低了疫苗的临床效果。而非病毒 DNA 疫苗可以克服这一缺陷, 但这种方法要求很高的注射剂量, 而且克隆 DNA 有整合到宿主基因组的风险, 具有潜在的安全性问题^[66]。

5.2 增强型疫苗

此疫苗由美国国立卫生研究院 Nabel 等于 2000 年研制开发的, 是继 DNA 疫苗之后的又一新型疫苗, 目前已进入 II 期临床阶段。该疫苗主要采取两步走的策略, 首先向动物体内注射 DNA 疫苗, 随后用腺病毒载体疫苗加强免疫, 结果发现小鼠抗体效价的增长较单用 DNA 疫苗有 10~100 倍的增长。然后在恒河猴中进行进一步试验, 结果显示接种安慰剂的 4 只猴子在 2 周内死亡, 而接种疫苗的 4 只猴子均存活。然而, 该疫苗接种过程长达 6 个月, 需 4 次注射, 无法快速控制疾病的传播^[67-68]。

5.3 病毒样颗粒疫苗

病毒样颗粒疫苗是由病毒衣壳蛋白或包膜蛋白自主包装形成的空衣壳结构,能快速刺激机体产生体液免疫和细胞免疫应答,病毒样粒子不含有病毒遗传物质和免疫抑制蛋白,安全性高^[69]。可以通过单独表达 VP40 或与 GP 联合表达产生 EBOV 病毒样颗粒,这种病毒颗粒缺失了 EBOV 基因组和 NP、VP30、VP24 和 VP35,被认为是最安全、最有潜力的候选疫苗。Warfield 等^[70]研究发现,病毒样颗粒疫苗能够激活 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞,产生 IgG 抗体,活化 B 细胞,并且没有细胞因子反应毒性。此外,免疫病毒样颗粒可以增加小鼠 NK 细胞浓度,免疫 NK 细胞缺失小鼠并不能完全保护,野生型则可以完全保护。免疫豚鼠后也可以获得完全保护,并检测出高滴度中和抗体。在以非人灵长类(NHPs)为模型进行免疫保护实验,NHPs 也能获得完全保护,且未发现 EBOV 感染的临床及实验室症状^[70]。在免疫的 NHPs 血液中检测到高滴度的抗体和 CD4⁺ T 细胞增加。

6 抗 EBOV 药物与靶点的研究

目前对 EHF 尚无特效治疗方法和可以利用的疫苗,一些抗病毒药如 IFN 和利巴韦林对 EHF 无效。目前对 EHF 病人主要采取对症治疗的策略,包括注意水电解质平衡、控制出血,肾脏衰竭时进行透析治疗等。

6.1 在研的抗 EBOV 药物

Mapp 生物制药公司正在测试针对病毒的单克隆抗体组合药物 ZMapp,该药物来自感染 EBOV 的实验动物体内产生的抗体,由 3 种单克隆抗体混合制成,这种抗体能够吸附在 EBOV 表面的蛋白上,降低病毒识别目标细胞的能力,从而阻止病毒入侵宿主细胞。每一种不同类型的抗体与病毒蛋白的不同部位结合,使被病毒感染的细胞不再与其他细胞结合,并且可以激活其他免疫系统而杀死被感染的细胞^[71]。Tekmira 制药公司研制的抗感染药物 TKM-Ebola 通过干扰病毒生活史发挥效用,这项技术可能拥有抗 EBOV 的潜力^[72-73]。该药已经获得 FDA 临床研究申请批准,I 期临床研究正在进行中^[74-75]。

日本富山化学工业公司日前表示,其研制的法匹拉韦能有效阻止细胞内的病毒增殖,在对抗 EBOV 方面很可能具有一定的疗效。法匹拉韦是一种流感治疗药物,通过阻碍细胞内的基因复制,从

而遏制病毒本身的增殖^[76-77]。Oestereich 等证实法匹拉韦在体外抗 EBOV 的 IC₉₀ 为 110 μmol/L,感染 6 d 后给药对动物的保护率达 100%^[78]。Smither 等^[79]认为由于流感病毒和 EBOV 类似,都是 RNA 病毒,所以法匹拉韦有可能阻碍 EBOV 在细胞内增殖,从而遏制感染。法匹拉韦作为新型抗流感药已获批在日本制造销售,在美国,富山化学工业公司于 2007 年申请对该药进行临床试验,确认其作为抗流感药物的疗效,美国卫生部门正准备加速审批是否用法匹拉韦开展抗 EBOV 临床试验。

2014 年 8 月 30 日,军事医学科学院微生物流行病研究所由王洪权研究员领衔的科研团队宣布,我国首个抗 EBOV 药物 jk-05 已完成临床前研究,历时 5 年研制的药物 jk-05 近日通过总后卫生部专家评审,获得军队特需药品批件。该药连同此前获批生产的 EBOV 检测试剂等科研成果为我国防控埃博拉疫情提供了关键技术手段。jk-05 是一种小分子化学药物,该药能够选择性地抑制 EBOV 的 RNA 聚合酶,从而达到抑制病毒复制的目的。研究表明,该药在细胞和动物水平感染实验中具有抗 EBOV 活性。专家特别强调,该药物虽已完成临床前研究,并在适用于广谱抗流感时完成了临床安全性评价,但对于 EHF 热治疗,目前仍仅限于紧急情况下使用。

6.2 GP 蛋白相关靶点

GP 蛋白在病毒入侵和感染人体细胞的过程中具有重要作用,Schornberg 等^[80]通过化学抑制剂和小干扰 RNA 的作用,确证了组织蛋白酶 B 和 L 在 EBOV 糖蛋白介导的感染中所起的作用。基于以上结果,如果能够人工合成抑制组织蛋白酶 B 和 L 的药物,有可能成为对抗 EBOV 的新手段。许多研究表明,EBOV 除了表达 GP 蛋白外,还表达 2 种分泌型糖蛋白和 1 种 Δ-肽段。其中分泌型糖蛋白包括 sGP 和小分子分泌型糖蛋白(ssGP)。这些糖蛋白与 GP 蛋白相比具有相同的 N 端,其中包含受体结合区域,但 C 末端不同。Radoshitzky 等^[81]将合成的 sGP、ssGP 以及 Δ-肽段分别加入 Vero-E6 和 HeLa 等细胞系中孵育,发现这些肽段能够抑制病毒通过 GP 介导的方式穿入细胞。推测可能的机制是这些糖蛋白与 GP 蛋白竞争结合细胞表面的受体,或者是干扰了组织蛋白酶对 GP 的切割。此外, furin 蛋白酶抑制剂也是潜在的药物设计靶点之一^[18]。

6.3 NPC1 靶点

NPC1 编码胆固醇转运蛋白, 该蛋白与 EBOV 进入宿主细胞有关^[26]。NPC1 突变细胞进行感染实验, 发现携带 EBOV 包膜蛋白且有复制能力的水泡性口炎病毒几乎不感染该细胞, 而当细胞再次表达 NPC1 后其又恢复了对病毒的易感性^[26]。Côté 等^[82]在 CHO 模型上的结果与之相一致; 该研究还发现 NPC1 的小分子抑制剂如苄基哌嗪金刚烷二酰胺衍生物对 EBOV 感染绿猴肾细胞有干扰作用。早在 2006 年, Côté 等^[83]就从 4 万个小分子的化合物库中筛选得到 NPC1 蛋白抑制剂苄基哌嗪金刚烷胺。因此, NPC1 蛋白也是抗 EBOV 药物开发的潜在靶点之一^[84]。

7 中药在抗 EBOV 方面具有光明前景

中药用于 EBOV 感染的治疗目前未见报道, 但是用于治疗 EBOV 感染的一个潜在选择。现代药理学证实中药具有抗病毒、抗菌、抗内毒素、消炎解热及调节免疫功能等作用, 抗病毒作用尤为显著, 并不断被药理研究和临床实践所证实。中药的抗病毒作用非常广泛, 几乎涉及到常见的病毒, 如流感病毒、副流感病毒、鼻病毒、腺病毒、腮腺炎病毒、乙型肝炎病毒、孤儿病毒、柯萨奇病毒、乙型脑炎病毒、出血热病毒、脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒^[85]等, 并且在抗流感病毒^[86-87]、呼吸道合胞病毒^[88-89]和肠道病毒^[90-92]等方面都已有广泛的应用。

中药在防治病毒感染性疾病方面具有独特的优势和广阔的发展前景, 由于其自身的药物特性, 也表现出不同于化学药的一些特点: 中药的抗病毒作用不仅体现在直接阻断病毒的生命周期 (直接杀灭病毒^[93-94]、阻挡病毒的吸附与入侵^[95]、抑制病毒自我复制^[96]、抑制病毒颗粒的释放^[97-98]等), 而且许多药物兼有缩短发热时间、控制炎症扩散^[99]等作用; 另一方面还可以激发机体的主动免疫机制^[100], 刺激免疫系统产生肿瘤坏死因子、干扰素、白细胞介素等细胞因子^[101], 杀伤病毒, 减轻病毒产生的毒素对机体的损害, 间接发挥抗病毒作用等, 即对病毒以及病毒引起的病理反应能多途径、多方位起作用。中医药治疗病毒性疾病时, 辨证论治是其不同于化学药的优势, 明确病毒性疾病特性, 选用有针对性的抗病毒药物, 即随证选药、随病用药, 如治疗病毒性肝炎, 属肝胆湿热, 应选用黄芩, 既可清热利湿, 又有抗肝炎病毒作用; 若肝炎属气阴两虚证型, 则应选用女贞子治疗, 女贞子既有补阴功效, 同时

也有抗肝炎病毒作用。以此类推, 这样才更能充分发中药抗病毒的优势及治疗效果^[102]。另有学者认为, 由于中药化学成分的多元化, 其抗病毒机制可能是综合作用的结果, 同时病毒对其也很少产生抗药性。因此, 在中药抗病毒药的筛选中, 除了从单味药着手外, 也应关注复方制剂、拆方、中药有效成分、多种有效成分联合应用等多个方面进行研究。

国内外关于中药、天然药物抗病毒的实验室和临床研究为中医药科学地用于 EBOV 的治疗提供了扎实的基础。根据传统中医理论, 埃博拉属于温病中的营血症, 具有发病和转变迅速的特点^[103]。部分中药清热解毒的功效可以截断病势, 降低高热期引发其他疾病的可能性, 在目前应对埃博拉等传染病尚无特效药物和疫苗情况下, 早期使用清热凉血药物是合适的。《中医药治疗埃博拉出血热专家指导意见 (第一版)》建议, 根据埃博拉病情的不同阶段和中医证候, 在口服制剂方面推荐临床使用双黄连、抗病毒和清开灵等口服液, 在注射剂方面推荐临床使用喜炎平、热毒宁、清开灵和痰热清等注射液, 为临床中医药治疗 EHF 给予了指导。结合发病原因、流行病特点以及患者证候的表现, 用中药控制病情、防止向重症发展方面, 中药具有重要的临床意义。目前, 鉴于中药治疗病毒性疾病确证的疗效和特点, 已普遍出现在国家有关部门颁发的病毒性疾病治疗指南上, 包括《登革热诊疗指南 (2014 年第 2 版)》、《人感染 H7N9 禽流感诊疗方案 (2014 年版)》以及《手足口病诊疗指南 (2012 年版)》等。上述国家行业管理机构的指导性意见均表明, 随着研究的日益深入和普及, 为中医药的抗病毒治疗提供了更广泛和有效的选择方案, 在严格把控质量标准的前提下, 中药应用于抗 EBOV 等病毒感染具有光明的前景。

同时, 中药的发展也必须与时俱进, 实现现代化, 达到“安全、有效、可控”的要求。中药治疗病毒感染性疾病, 不单纯着眼于直接的抗病毒作用, 而是重视病毒-机体-中药三者的关系; 不仅以清除体内病原体为目的, 而且能通过调动机体特异性和非特异性免疫功能来增强抗病毒感染的能力。中药抗病毒的临床应用与研究目前还存在不少亟待解决的问题, 一是就大部分药物而言, 其抗病毒作用的有效成分尚不十分明确; 二是临床使用证明有抗病毒作用的药物, 实验效果却并不满意, 也有的药物实验研究表明有抗病毒活性而未能在临床实践中进

行验证或应用；三是人们眼前往往重视药物实验和临床的研究，即药效学的研究，但缺乏药动学的研究，即对抗病毒药物在体内的代谢过程、量效关系、构效关系以及作用环节研究不够^[104]。另外，复方是中医应用的主要的也是最广泛的形式，对方剂和中成药整方，即复方抗病毒作用的研究，也将是一个长期而又艰巨的任务。

8 结语与展望

自2014年2月份EBOV疫情出现，感染人数就在不断上升，已致1.5万人感染，逾5000人死亡，这场流行病已经被认定为是非洲有史以来最严重的疫情。近年来在对EBOV的感染机制研究中取得了多项重大突破，但还有许多争议有待解决。总之，随着对于EBOV感染机制的研究不断深入，将有更多的潜在治疗靶点浮出水面。这不仅有利于EBOV疫苗和药物的研究，特别是中药和天然药物的研发，也对其他丝状病毒或出血热病毒的研究有重要的启示作用。

参考文献

- [1] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, *et al.* The natural history of Ebola virus in Africa [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(7/8): 1005-1014.
- [2] Colebunders R, Borchert M. Ebola haemorrhagic fever-a review [J]. *J Infect*, 2000, 40(1): 16-20.
- [3] 熊莉娟. 埃博拉出血热的研究近况 [J]. 内科理论与实践, 2007(4): 277-279.
- [4] Peters C J, Leduc J W. An introduction to Ebola: the virus and the disease [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl 1): ix-xvi.
- [5] Feldmann H, Jones S, Klenk H D, *et al.* Ebola virus: from discovery to vaccine [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(8): 677-685.
- [6] Bente D, Gren J, Strong J E, *et al.* Disease modeling for Ebola and Marburg viruses [J]. *Dis Model Mech*, 2009, 2(1/2): 12-17.
- [7] Groseth A, Feldmann H, Strong J E. The ecology of Ebola virus [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(9): 408-416.
- [8] Zaki S R, Goldsmith C S. Pathologic features of filovirus infections in humans [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 235: 97-116.
- [9] Feldmann H, Wahl-Jensen V, Jones S M, *et al.* Ebola virus ecology: a continuing mystery [J]. *Trends Microbiol*, 2004, 12(10): 433-437.
- [10] Ryabchikova E, Kolesnikova L, Smolina M, *et al.* Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis [J]. *Arch Virol*, 1996, 141(5): 909-921.
- [11] Geisbert T W, Hensley L E, Gibb T R, *et al.* Apoptosis induced *in vitro* and *in vivo* during infection by Ebola and Marburg viruses [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(2): 171-186.
- [12] Geisbert T W, Young H A, Jahrling P B, *et al.* Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(6): 2371-2382.
- [13] Martinez O, Leung L W, Basler C F. The role of antigen-presenting cells in filoviral hemorrhagic fever: gaps in current knowledge [J]. *Antiviral Res*, 2012, 93(3): 416-428.
- [14] Warfield K L, Perkins J G, Swenson D L, *et al.* Role of natural killer cells in innate protection against lethal ebola virus infection [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(2): 169-179.
- [15] Ascenzi P, Bocedi A, Heptonstall J, *et al.* Ebolavirus and marburgvirus: insight the filoviridae family [J]. *Mol Aspects Med*, 2008, 29(3): 151-185.
- [16] De Wit E, Feldmann H, Munster V J. Tackling Ebola: new in sights into prophylactic and therapeutic intervention strategies [J]. *Genome Med*, 2011, 3(1): 5.
- [17] Hood C L, Abraham J, Boyington J C, *et al.* Biochemical and structural characterization of cathepsin L-processed Ebola virus glycoprotein: implications for viral entry and immunogenicity [J]. *J Virol*, 2010, 84(6): 2972-2982.
- [18] Volchkov V E, Feldmann H, Volchkova V A, *et al.* Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(10): 5762-5767.
- [19] Wong A C, Sandesara R G, Mulherkar N, *et al.* A forward genetic strategy reveals destabilizing mutations in the Ebola virus glycoprotein that alter its protease dependence during cell entry [J]. *J Virol*, 2010, 84(1): 163-175.
- [20] Regula L K, Harris R, Wang F, *et al.* Conformational properties of peptides corresponding to the ebolavirus GP2 membrane-proximal external region in the presence of micelle-forming surfactants and lipids [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(20): 3393-3404.
- [21] Lennemann N J, Rhein B A, Ndungo E, *et al.* Comprehensive functional analysis of N-linked glycans on Ebola virus GP1 [J]. *MBio*, 2014, 5(1): e00862-13.
- [22] Takada A, Kawaoka Y. The pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(10): 506-511.
- [23] Kondratowicz A S, Lennemann N J, Sinn P L, *et al.* T-cell

- immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebola virus and lake victoria marburgvirus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(20): 8426-8431.
- [24] Kawaoka Y. How Ebola virus infects cells [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(25): 2645-2646.
- [25] Chandran K, Sullivan N J, Felbor U, *et al.* Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1643-1645.
- [26] Carette J E, Raaben M, Wong A C, *et al.* Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1 [J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 340-343.
- [27] Falzarano D, Krokhin O, Wahl-Jensen V, *et al.* Structure-function analysis of the soluble glycoprotein, sGP, of Ebola virus [J]. *Chembiochem*, 2006, 7(10): 1605-1611.
- [28] Lee J E, Fusco M L, Hessel A J, *et al.* Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor [J]. *Nature*, 2008, 454(7201): 177-182.
- [29] Sui J, Marasco W A. Evidence against Ebola virus sGP binding to human neutrophils by a specific receptor [J]. *Virology*, 2002, 303(1): 9-14.
- [30] Mohan G S, Li W, Ye L, *et al.* Antigenic subversion: a novel mechanism of host immune evasion by Ebola virus [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(12): e1003065.
- [31] Yang Z, Delgado R, Xu L, *et al.* Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins [J]. *Science*, 1998, 279(5353): 1034-1037.
- [32] Geisbert T W, Feldmann H. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(Suppl 3): 1075-1081.
- [33] 林 彬. 埃博拉病毒 (EBOV) 蛋白的最新研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2005(5): 27-30.
- [34] Scianimanico S, Schoehn G, Timmins J, *et al.* Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein [J]. *Embo J*, 2000, 19(24): 6732-6741.
- [35] Gomis-Ruth F X, Dessen A, Timmins J, *et al.* The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties [J]. *Structure*, 2003, 11(4): 423-433.
- [36] Adu-Gyamfi E, Soni S P, Jee C S, *et al.* A loop region in the N-terminal domain of Ebola virus VP40 is important in viral assembly, budding, and egress [J]. *Viruses*, 2014, 6(10): 3837-3854.
- [37] Jasenosky L D, Kawaoka Y. Filovirus budding [J]. *Virus Res*, 2004, 106(2): 181-188.
- [38] Timmins J, Schoehn G, Kohlhaas C, *et al.* Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40 [J]. *Virology*, 2003, 312(2): 359-368.
- [39] Han Z, Boshra H, Sunyer J O, *et al.* Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding [J]. *J Virol*, 2003, 77(3): 1793-1800.
- [40] Huang Y, Xu L, Sun Y, *et al.* The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 307-316.
- [41] Halfmann P, Neumann G, Kawaoka Y. The Ebolavirus VP24 protein blocks phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(Suppl 3): 953-956.
- [42] 聂福平, 范泉水, 王灵强, 等. 埃博拉病毒的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(10): 65-67.
- [43] Groseth A, Charton J E, Sauerborn M, *et al.* The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified [J]. *Virus Res*, 2009, 140(1/2): 8-14.
- [44] Modrof J, Becker S, Muhlberger E. Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein [J]. *J Virol*, 2003, 77(5): 3334-3338.
- [45] Hartlieb B, Modrof J, Muhlberger E, *et al.* Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(43): 41830-41836.
- [46] Basler C F, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, *et al.* The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3 [J]. *J Virol*, 2003, 77(14): 7945-7956.
- [47] Hartman A L, Bird B H, Towner J S, *et al.* Inhibition of IRF-3 activation by VP35 is critical for the high level of virulence of ebola virus [J]. *J Virol*, 2008, 82(6): 2699-2704.
- [48] Volchkov V E, Volchkova V A, Chepurinov A A, *et al.* Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(2): 355-362.
- [49] Kiley M P, Cox N J, Elliott L H, *et al.* Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus [J]. *J Gen Virol*, 1988, 69(Pt 8): 1957-1967.
- [50] Davis K J, Anderson A O, Geisbert T W, *et al.* Pathology of experimental Ebola virus infection in African green monkeys. Involvement of fibroblastic reticular cells [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 1997, 121(8): 805-819.
- [51] Van Der Groen G, Jacob W, Pattyn S R. Ebola virus virulence for newborn mice [J]. *J Med Virol*, 1979, 4(3): 239-240.

- [52] Warfield K L, Alves D A, Bradfute S B, *et al.* Development of a model for marburgvirus based on severe-combined immunodeficiency mice [J]. *Viol J*, 2007, 4: 108.
- [53] Bray M, Hatfill S, Hensley L, *et al.* Haematological, biochemical and coagulation changes in mice, guinea-pigs and monkeys infected with a mouse-adapted variant of Ebola Zaire virus [J]. *J Comp Pathol*, 2001, 125(4): 243-253.
- [54] Gibb T R, Bray M, Geisbert T W, *et al.* Pathogenesis of experimental Ebola Zaire virus infection in BALB/c mice [J]. *J Comp Pathol*, 2001, 125(4): 233-242.
- [55] Bray M, Davis K, Geisbert T, *et al.* A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever [J]. *J Infect Dis*, 1998, 178(3): 651-661.
- [56] Bowen E T, Platt G S, Simpson D I, *et al.* Ebola haemorrhagic fever: experimental infection of monkeys [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1978, 72(2): 188-191.
- [57] Baskerville A, Bowen E T, Platt G S, *et al.* The pathology of experimental Ebola virus infection in monkeys [J]. *J Pathol*, 1978, 125(3): 131-138.
- [58] Dalgard D W, Hardy R J, Pearson S L, *et al.* Combined simian hemorrhagic fever and Ebola virus infection in cynomolgus monkeys [J]. *Lab Anim Sci*, 1992, 42(2): 152-157.
- [59] 盖微微, 郑学星, 薛向红, 等. 埃博拉病毒 VP40 蛋白的原核表达及其抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(9): 782-786.
- [60] 宋 坤. 表达扎伊尔型埃博拉病毒囊膜糖蛋白重组水泡性口炎病毒的构建 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [61] Marzi A, Engelmann F, Feldmann F, *et al.* Antibodies are necessary for rVSV/ZEBOV-GP-mediated protection against lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(5): 1893-1898.
- [62] 王雪敏, 王皓婷, 邱亚峰, 等. 埃博拉病毒科特迪瓦型核蛋白的原核表达及纯化 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(7): 601-604.
- [63] 盖微微, 郑学星, 薛向红, 等. 埃博拉病毒检测与分型 Real-time PCR 方法的建立 [J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3): 208-211.
- [64] 刘 阳, 史子学, 王水明, 等. 一步法 MGB 荧光定量 RT-PCR 检测埃博拉病毒扎伊尔亚型和苏丹亚型方法的建立 [J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(4): 343-346.
- [65] Sullivan N J, Martin J E, Graham B S, *et al.* Correlates of protective immunity for Ebola vaccines: implications for regulatory approval by the animal rule [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(5): 393-400.
- [66] Volchkov V E, Volchkova V A, Muhlberger E, *et al.* Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity [J]. *Science*, 2001, 291(5510): 1965-1969.
- [67] 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): 1826-1841.
- [68] Hart M K. Vaccine research efforts for filoviruses [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(5/6): 583-595.
- [69] Martinez O, Tantral L, Mulherkar N, *et al.* Impact of Ebola mucin-like domain on antiglycoprotein antibody responses induced by Ebola virus-like particles [J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(Suppl 3): 825-832.
- [70] 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]. *J Infect Dis*, 2007, 196(Suppl 2): 430-437.
- [71] Qiu X, Wong G, Audet J, *et al.* Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp [J]. *Nature*, 2014, 514(7520): 47-53.
- [72] Choi J H, Croyle M A. Emerging targets and novel approaches to Ebola virus prophylaxis and treatment [J]. *BioDrugs*, 2013, 27(6): 565-583.
- [73] Omonzejele P F. Ethical challenges posed by the Ebola virus epidemic in West Africa [J]. *J Bioeth Inq*, 2014, 11(4): 417-420.
- [74] Bishop B M. Potential and emerging treatment options for Ebola virus disease [J]. *Ann Pharmacother*, 2015, 49(2): 196-206.
- [75] Ansari A A. Clinical features and pathobiology of Ebolavirus infection [J]. *J Autoimmun*, 2014, 55: 1-9.
- [76] Furuta Y, Takahashi K, Fukuda Y, *et al.* In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(4): 977-981.
- [77] Furuta Y, Takahashi K, Kuno-Mackawa M, *et al.* Mechanism of action of T-705 against influenza virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(3): 981-986.
- [78] Oestereich L, Ludtke A, Wurr S, *et al.* Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model [J]. *Antiviral Res*, 2014, 105: 17-21.
- [79] Smither S J, Eastaugh L S, Steward J A, *et al.* Post-exposure efficacy of oral T-705 (Favipiravir) against inhalational Ebola virus infection in a mouse model [J]. *Antiviral Res*, 2014, 104: 153-155.

- [80] Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, *et al.* Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein [J]. *J Virol*, 2006, 80(8): 4174-4178.
- [81] Radoshitzky S R, Warfield K L, Chi X, *et al.* Ebola virus delta-peptide immunoadhesins inhibit marburgvirus and ebolavirus cell entry [J]. *J Virol*, 2011, 85(17): 8502-8513.
- [82] Côté M, Misasi J, Ren T, *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection [J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 344-348.
- [83] Côté M, Misasi J, Ren T, *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection [J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 344-348.
- [84] Lee K, Ren T, Cote M, *et al.* Inhibition of Ebola virus infection: Identification of Niemann-Pick C1 as the target by optimization of a chemical probe [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(2): 239-243.
- [85] 邢世华, 李晓波. 清热解毒类中药抗病毒活性及作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 464-468.
- [86] 萧伟, 刘涛, 陈仕兰, 等. 热毒宁注射液对禽流感病毒的抑制作用 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1943-1945.
- [87] 周雪梦, 陆春妮, 元文宝, 等. 清开灵和双黄连口服液体内抗禽流感病毒作用 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1351-1356.
- [88] 冯盱珠, 周锋, 黄茂, 等. 热毒宁抗呼吸道合胞病毒(RSV, Long株)作用体外实验研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2007, 27(9): 1009-1012.
- [89] 王毅军, 奚肇庆, 冯盱珠. 痰热清对呼吸道合胞病毒体外抑制作用研究 [J]. 河北医药, 2010, 32(24): 3447-3448.
- [90] 曹泽戎, 常秀娟, 赵忠鹏, 等. 热毒宁注射液抗A16型柯萨奇病毒的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [91] 董巧丽, 柏金秀, 孙东明, 等. 喜炎平注射液和热毒宁注射液治疗手足口病普通病例的疗效观察 [J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(9): 686-687.
- [92] 管晨, 李敏, 任庆杰, 等. 穿心莲内酯通过抗炎和调节免疫提高EV71感染小鼠的生存率 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29(9): 737-744.
- [93] Wang J, Chen X, Wang W, *et al.* Glycyrrhizic acid as the antiviral component of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(1): 114-121.
- [94] Pompei R, Flore O, Marccialis M A, *et al.* Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles [J]. *Nature*, 1979, 281(5733): 689-690.
- [95] Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope [J]. *Biochem J*, 2005, 392(1): 191-199.
- [96] 李美玉. 金银花体外抗呼吸道合胞病毒的作用研究 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(4): 420-422.
- [97] 孙兰, 刘艾林, 王振中, 等. 热毒宁注射液及其组分对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1): 27-31.
- [98] Hsieh C F, Yen H R, Liu C H, *et al.* Ching-fang-pai-tu-san inhibits the release of influenza virus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 533-544.
- [99] 蒋成全. 中药抗病毒作用及其应用 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(15): 8-9.
- [100] 王振中, 鲍琳琳, 孙兰, 等. 热毒宁注射液抗甲型H1N1流感病毒作用机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 90-93.
- [101] Lau K M, Lee K M, Koon C M, *et al.* Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118(1): 79-85.
- [102] 张永兴. 略论抗病毒中药在临床中的应用及优势 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2331-2332.
- [103] 尹周安, 贺圆圆, 袁振仪, 等. 埃博拉出血热的中医防治策略构思 [J]. 中医药导报, 2014, 20(10): 4-7.
- [104] 王英燕, 王海. 抗病毒中药的研究进展 [J]. 中医药学报, 2006, 34(1): 25-26.