

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2026.01.001

✦基础医学研究✦

# 乙脑/寨卡嵌合病毒包膜蛋白 K283R 突变对小鼠神经毒力的影响

任阳<sup>1</sup>, 黄荣<sup>1</sup>, 杨俊杰<sup>2</sup>, 陈蓉<sup>1</sup>, 陈岚<sup>3</sup>, 冯亚岚<sup>1</sup>, 袁磊<sup>1</sup>, 杨健<sup>1</sup>

(1. 川北医学院基础医学与法医学院, 四川南充 637000; 2. 中国医学科学院输血研究所, 四川成都 610073; 3. 自贡市第三人民医院检验科, 四川自贡 643000)

**【摘要】目的:** 探讨乙脑/寨卡嵌合毒株 JE/ZIKV(MR766)包膜蛋白 K283R 突变对小鼠神经毒力的影响。**方法:** 基于 JE/ZIKV(MR766)嵌合病毒全长 cDNA, 通过重叠延伸 PCR 介导的定点突变及分子克隆技术, 构建含包膜蛋白 E 第 283 位突变(K283R)的感染性全长克隆。经酶切鉴定后, 通过 Xho I 酶线性化全长感染性克隆并体外转录获得突变病毒 RNA, 经电穿孔转染 BHK21 细胞拯救出突变病毒 JE/ZIKV(MR766)(K283R)。通过病毒传代和测序、蚀斑实验、生长曲线、间接免疫荧光鉴定病毒特性, 利用 3 周龄雌性昆明鼠脑内攻毒模型, 解析嵌合病毒的神经毒力, 以 LD<sub>50</sub> 量化神经毒力水平。**结果:** 酶切验证确认成功构建 JE/ZIKV(MR766)(K283R)全长感染性克隆。蚀斑实验、病毒测序及间接免疫荧光证实拯救目的病毒成功, 其蚀斑直径大于亲本株 JE/ZIKV(MR766) [ $(0.20 \pm 0.04$  vs.  $0.14 \pm 0.03$ ) cm,  $P < 0.05$ ]。生长曲线显示, 突变株与亲本株均在感染后 60 h 达到病毒滴度峰值。动物实验表明, JE/ZIKV(MR766)(K283R)的 LD<sub>50</sub> 为 1.35 pfu/0.03 mL, 稍低于亲本株 (2.21 pfu/0.03 mL)。**结论:** 寨卡病毒 E 蛋白 K283R 突变未明显减弱嵌合病毒对小鼠的脑内神经毒力, 提示该位点并非调控病毒毒力的关键位点。

**【关键词】** 寨卡病毒; 乙脑病毒; 嵌合病毒; 包膜蛋白; 神经毒力

**【中图分类号】** R373.3+1 **【文献标志码】** A

## Effect of the K283R mutation in JE/Zika chimeric virus envelope protein on neurovirulence in mice

REN Yang<sup>1</sup>, HUANG Rong<sup>1</sup>, YANG Jun-jie<sup>2</sup>, CHEN Rong<sup>1</sup>, CHEN Lan<sup>3</sup>, FENG Ya-lan<sup>1</sup>, YUAN Lei<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1</sup>

(1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 2. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences, Chengdu 610073; 3. Department of Laboratory Medicine, Zigong Third People's Hospital, Zigong 643000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the effect of the K283R mutation in JE/Zika chimeric virus envelope protein on neurovirulence in mice. **Methods:** Using the full-length cDNA clone of JE/ZIKV(MR766) as the template, the infectious clone carrying E-K283R substitution was constructed via overlap extension PCR-mediated site-directed mutagenesis and molecular cloning, followed by restriction enzyme (Xho I) linearization and in vitro transcription. The mutant virus JE/ZIKV(MR766)(K283R) was rescued by electroporation into BHK21 cells. Viral characteristics were validated through serial passage, sequencing, plaque assay, growth kinetics, and indirect immunofluorescence. Neurovirulence was quantitatively assessed by intracranial challenge in 3-week-old female Kunming mice, with LD<sub>50</sub> as the endpoint metric. **Results:** Restriction analysis confirmed successful construction of the JE/ZIKV(MR766)(K283R) infectious clone. Plaque assays, sequencing, and immunofluorescence verified viral rescue, showed larger plaque diameters ( $0.20 \pm 0.04$ ) cm for the mutant compared to the parental strain JE/ZIKV(MR766) ( $0.14 \pm 0.03$ ) cm,  $P < 0.05$ . The growth curve showed that both strains reached peak titers at 60 h post-infection. Animal experiments revealed an intracranial LD<sub>50</sub> of 1.35 pfu/0.03 mL for JE/ZIKV(K283R), slightly lower than the parental strain (2.21 pfu/0.03 mL). **Conclusion:** The K283R substitution in ZIKV E protein did not significantly attenuate murine neurovirulence, suggesting its non-critical role in viral pathogenicity regulation.

**【Key words】** Zika virus; Japanese encephalitis virus; Chimeric virus; Envelope protein; Neurovirulence

基金项目: 川北医学院青年项目(自然科学类)(CBY24-QNA16, CBY24-QNA23)

作者简介: 任阳(1993-), 男, 硕士研究生, 助教。E-mail: 1486089265@qq.com

通讯作者: 杨健, 博士, 教授。E-mail: jiany74@163.com

寨卡病毒(zika virus, ZIKV)是一种主要以伊蚊为传播媒介的单股正链 RNA 病毒<sup>[1]</sup>,最初于 1947 年在乌干达的寨卡森林中被发现<sup>[2]</sup>,从 2007 年开始,寨卡病毒的传播范围逐渐扩大,首次在非洲、亚洲之外的密克罗尼西亚联邦的雅普岛引发大规模疫情<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,寨卡病毒与先天性寨卡综合症(congenital zika syndrome, CZS)和成人格林-巴利综合症(guillain-barre syndrome, GBS)高度相关。尽管寨卡病毒对全球公共卫生构成了严重威胁,但目前尚无针对寨卡病毒感染的特异性治疗方法,也无批准上市的疫苗<sup>[5]</sup>。嵌合病毒疫苗属于减毒活疫苗的一种,具备较高的灵活性和安全性<sup>[6]</sup>。本课题组用乙脑疫苗株 SA14-14-2 为骨架,获得 JE/ZIKV(MR766)与 JE/ZIKV(PRVABC59)两株重组嵌合病毒。通过小鼠颅内攻毒实验证实,基于 PRVABC59 株的嵌合病毒其神经毒力明显低于 MR766 株衍生毒株<sup>[7-8]</sup>。E 蛋白位于病毒的最外侧,介导病毒进入细胞,是决定病毒毒力的关键蛋白<sup>[9]</sup>。通过对 E 蛋白序列的对比分析,发现二者在 E 蛋白的 120、158、283、341 和 343 位点存在差异。本课题组对 120、158、341 和 343 位点进行了回复突变实验,但发现这些位点的突变均未导致毒力明显减弱。因此,推测 283 位点可能是导致这两株嵌合病毒神经毒力差异的关键位点<sup>[10-12]</sup>。本研究以 JE/ZIKV(MR766)嵌合病毒为基础,采用定点突变技术构建了 E 蛋白 K283R 突变株,并通过颅内接种小鼠模型,系统评估了突变株与亲本株在神经毒力方面的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、细胞、病毒及实验动物 质粒 [pACNR-JEV-3'(包含乙脑疫苗株 SA14-41-2 的核苷酸序列 nt 3345~10970)、pACNR-JEV-5'(包含乙脑疫苗株 SA14-14-2 的核苷酸序列 nt 1~3450)及 pACNR-JE/ZIKV(MR766)-5'(包含 JE/ZIKV(MR766)的核苷酸序列 nt 1~3450)]、嵌合病毒 JE/ZIKV(MR766)、BHK21 细胞均由本实验室构建并保存;乙脑疫苗株 SA14-14-2 购自成都生物制品研究所;清洁级昆明小鼠由川北医学院动物实验中心提供。川北医学院伦理委员会审查批件编号: NSMC 伦理论文审[2025036]。

1.1.2 主要试剂和仪器 所用引物基于 GenBank 数据库收录的 ZIKV 参考序列(登录号:AY632535.20)进行设计。见表 1。所有引物合成及病毒基因

组测序工作均委托上海生工生物工程股份有限公司完成。高保真 Taq DNA 聚合酶及 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒购自 OMEGA 公司产品。限制性内切酶系列产品由 New England Biolabs(NEB)公司提供。质粒大量抽提和 RNA 回收所用的试剂盒则由 QIAGEN 公司提供。体外转录试剂盒采购自 Promega 公司。JEV-E 蛋白、JEV-NS1 蛋白及 ZIKV-E 蛋白的特异性抗体购自 GenTex 公司, AlexaFluor488 标记的二抗则由上海碧云天生物技术有限公司提供。PCR 仪、电泳仪和电转仪、倒置荧光显微镜分别为 Eppendorf 公司、BIO-RAD 公司产品、Leica 公司产品。

表 1 PCR 及测序引物

引物名称	序列	用途
F2	5'-GCTTGGCAGTTGTCATAG-3'	突变扩增
R3	5'-AGATCTGACTCCGCACACGCCTT-3'	突变扩增
K283R F	5'-GCAAAGGGAAGGCTGTTCT-3'	突变扩增
K283R R	5'-AGAACAGCCTTCCCTTGC-3'	突变扩增
RR5	5'-GACTGCTTCTGTGATTGCA-3'	测序

### 1.2 方法

1.2.1 点突变片段 prM/E(K283R)的获取 以全长质粒 pACNR-JE/ZIKV(MR766)为模板,采用两对特异性引物(F2/K283R R 和 K283R F/R3)进行 PCR 扩增,分别获得约 1.3 kb 和 0.8 kb 的 DNA 片段。PCR 反应程序设置为:98 °C 变性 2 min→25 个循环的 98 °C 变性 10 s、58 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 1 min→72 °C 终延伸 5 min。经凝胶电泳分离后回收目标片段,各取 1 μL 作为模板进行重叠延伸 PCR。重叠延伸反应条件为:98 °C 预变性 2 min→10 个循环的 98 °C 变性 10 s、58 °C 退火 15 s、72 °C 延伸 2 min→72 °C 终延伸 5 min。随后加入外引物 F2 和 R3(各 1 μL)进行二次扩增,反应程序与首次扩增相同,但延伸时间延长至 2 min。最终通过凝胶电泳回收 2.1 kb 的目的片段。

1.2.2 全长感染性克隆 pACNR-JE/ZIKV(MR766)(K283R)的构建 以片段 prM/E(K283R)替换 pACNR-JEV-5'上相应片段,获得 pACNR-JE/ZIKV(K283R)-5';再与 pACNR-JEV-3'质粒连接得到全长感染性克隆 pACNR-JE/ZIKV(MR766)(K283R)。见图 1。

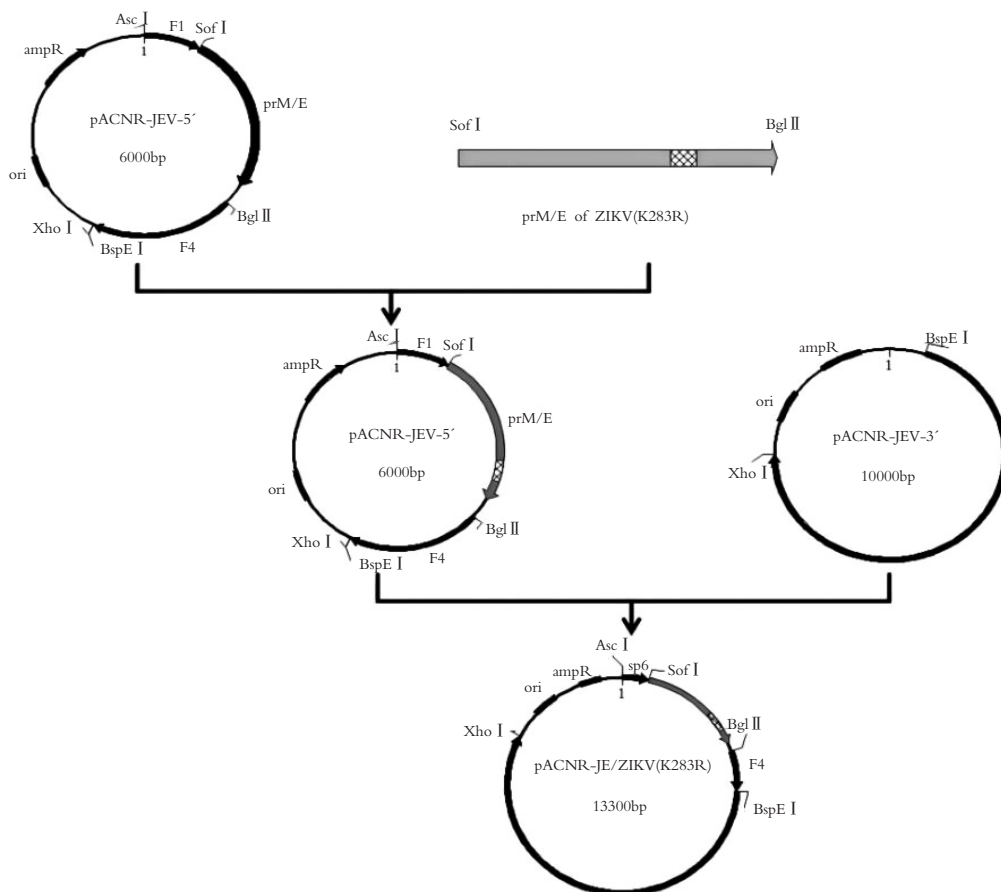


图1 pACNR-JE/ZIKV(MR766)(K283R)感染性克隆构建示意图

1.2.3 突变病的拯救及传代 采用 Xho I 限制性内切酶对携带目标突变位点的全长质粒进行线性化处理,随后使用体外转录试剂盒进行病毒基因组 RNA 的体外合成。将纯化的 RNA 通过电穿孔仪转染至铺满率约 90% 的 BHK21 细胞中,电转电压为 180 V。转染后更换含 2% (体积分数) 胎牛血清的 MEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每日观察细胞病变效应(CPE),当约 50% 细胞出现圆缩、脱落时,进行三次冻融循环(-80 °C、37 °C 交替),收集细胞裂解液,病毒悬液经 4 °C 条件下 2 000 r/min 离心 10 min 后收集上清,分装冻存于 -80 °C 冰箱,记为 P1 代病毒储备液。将 BHK21 细胞接种至培养皿中,待细胞融合率达到 70% 时吸弃原有培养基。用 1×PBS 轻柔洗涤 1 次。按感染复数按 M. O. I=0.01 接种 P1 代病毒液,37 °C 吸附 1 h(期间每 20 min 水平摇摇匀 1 次)。吸附结束后更换含 2% FBS 的维持培养基,继续培养至约 70% 细胞死亡,收获病毒悬液,标记为 P2 代。重复上述步骤,直至病毒滴度达  $\geq 10^6$  PFU/mL(通过蚀斑试验测定)。

1.2.4 病毒测序 以病毒 RNA 为模板合成 cDNA,使用特异性测序引物进行 PCR 扩增,反应程序为:98 °C 预变性 2 min → 25 个循环的 98 °C 变性

10 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 2 min → 72 °C 终延伸 5 min。扩增产物经凝胶电泳纯化后测序分析。

1.2.5 间接免疫荧光实验 将 BHK21 细胞接种于 96 孔板中,待细胞铺满度达 80% 时,按 MOI=0.1 分别接种突变毒株 JE/ZIKV (MR766) (K283R) 及对照毒株 SA14-14-2,实验设立未接毒处理的阴性对照组;感染 72 h 后吸弃培养液,使用 1×PBS 缓冲液轻柔洗涤 1 次,加入 4% 多聚甲醛溶液室温避光固定 30 min,PBS 浸洗 3~5 次(每次 5 min),再用 0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温透化 10 min 并彻底漂洗;向对应孔内滴加 30  $\mu$ L 稀释后的一抗工作液;分别使用抗 JEV-E 抗体(1:20 稀释)、抗 JEV-NS1 抗体(1:1 000 稀释)和抗 ZIKV-E 抗体(1:500 稀释),置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 60 min,随后用 PBS 缓冲液彻底洗涤 3 次;每孔加入 50  $\mu$ L AlexaFluor488 标记的二抗(1:500 稀释),37 °C 避光孵育 60 min。1×PBS 彻底漂洗后于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.6 病毒蚀斑实验 将 BHK21 细胞铺板于 6 孔培养板中,待细胞达 60% 时,对 JE/ZIKV (MR766)(K283R) 及 JE/ZIKV(MR766) 病毒液进行 10 倍连续梯度稀释,每孔加入 400  $\mu$ L 稀释病毒液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下感染 1 h,期间每 20 min

水平振荡培养板以确保病毒均匀吸附。吸附完成后移除病毒上清液,各孔加入 2 mL 含 1% 低熔点琼脂糖和 2% 热灭活血清的覆盖培养液,随后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中持续培养 4~5 d。待蚀斑形态清晰可见后,以 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,再经 10 g/L 结晶紫溶液染色,最终统计各稀释度孔内蚀斑数量并计算病毒滴度,同时对比蚀斑直径差异。

**1.2.7 生长曲线绘制** 接种 BHK21 细胞于培养皿中,待融合度达到 70% 时,按 M. O. I=0.01 接种病毒 JE/ZIKV (MR766) (K283R) 和 JE/ZIKV (MR766),每 12 h 收集 1 次培养上清,待细胞完全死亡后终止实验。对上清样本进行蚀斑实验测定病毒滴度,绘制增殖曲线分析突变株与亲本株的生长动力学差异。

**1.2.8 突变病毒的神经毒力检测** 将 36 只雌性清洁级昆明小鼠分为 6 组,每组各 6 只,其中一组为空白对照组,其余均为实验组。采用 10 倍系列稀释法对重组病毒 JE/ZIKV (MR766) (K283R) 及其亲本株 JE/ZIKV (MR766) 进行梯度稀释,每组实验小鼠通过颅内注射途径接种 0.03 mL 病毒悬液。持续观察 14 d,记录各组小鼠的生存状态及死亡时间,通过 Reed-Muench 法计算半数致死剂量 (LD<sub>50</sub>)。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行处理与分析。计量资料符合正态分布且方差齐性,以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较行独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 全长质粒 pACNR-JE/ZIKV (MR766) 的构建及鉴定结果

以 pACNR-JE/ZIKV (MR766) 全长质粒为模板,采用引物对 F2/K283R R 扩增获得约 0.8 kb 的片段 1,使用引物对 K283R F/R3 扩增得到约 1.4 kb 的片段 2。经重叠延伸后,以 F2/R3 为引物对进行扩增,最终获得 2.2 kb 的 prM/E (K283R) 片段,结果与预期大小一致。

将质粒 pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)-5' 用 Sfo I 和 Bgl II 双酶切,得到大小约 3.8 kb 和 2.2 kb 的片段,均与理论相符。将全长质粒 pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R) 分别用 Sfo I 与 Bgl II、BspE I 与 Xho I 双酶切、Bgl II 单酶切。经 Sfo I 和 Bgl II 双酶切处理,产生约 7.0 kb、3.2 kb、2.2 kb 及 1.2 kb 的 DNA 片段;BspE I 和 Xho I 双酶切则生成 7.6 kb 与 6.0 kb 的片段;而 Bgl II 单酶切后得到 7.0 kb、5.4 kb 和 1.2 kb 的片段。所有

片段分子量均与理论预测值吻合。见图 2。

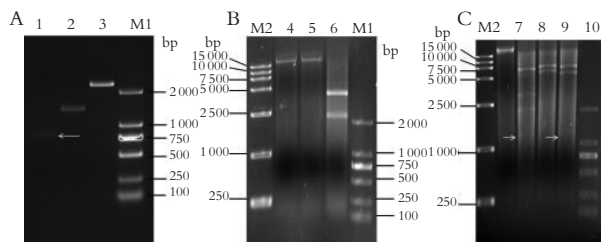


图 2 全长质粒 pACNR-JE/ZIKV (MR766) 的构建及鉴定

A. 含 K283R 突变 PCR 扩增产物;B. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)-5' 的鉴定;C. 全长质粒 pACNR-JE/ZIKV (MR766) 的鉴定;M1. DNA 分子量标 (DL 2000);M2. DNA 分子量标 (DL 15000);1. 含 K283R 突变片段 1;2. 含 K283R 突变片段 2;3. 含 K283R 突变的 prM/E 片段;4. pACNR-JE/ZIKV (MR766)-5';5. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)-5';6. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)-5'/Sfo I +Bgl II;7. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R);8. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)/Sfo I +Bgl II;9. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)/BspE I +Xho I;10. pACNR-JE/ZIKV (MR766) (K283R)/Bgl II。

### 2.2 病毒测序测定结果

将测序结果与 GenBank 发表的 ZIKV (MR766) 序列 (序列号: AY632535.20) 进行对比,显示点突变构建成功 (AAG → AGG) 且无其他突变。见图 3。

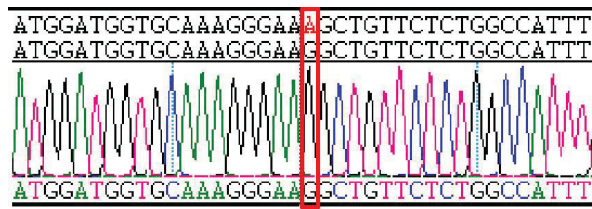


图 3 JE/ZIKV (MR766) (K283R) 测序

### 2.3 间接免疫荧光实验结果

间接免疫荧光实验结果显示,JE/ZIKV (MR766) (K283R) 重组病毒株可被 JEV-NS1 和 ZIKV-E 特异性抗体识别,但对 JEV-E 抗体无反应;而对照株 JEV SA14-14-2 则呈现 JEV-E 和 JEV-NS1 抗体阳性反应,ZIKV-E 抗体检测为阴性,与预期完全一致。见图 4。

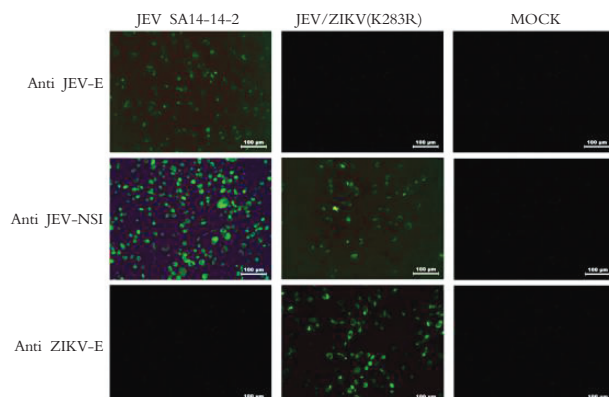


图 4 间接免疫荧光实验

## 2.4 病毒蚀斑实验结果及生存曲线分析结果

蚀斑实验结果显示,实验组 JE/ZIKV(MR766)(K283R)蚀斑大于对照组 JE/ZIKV(MR766),差异有统计学意义[(0.14±0.03 vs. 0.20±0.04)cm,  $P<0.05$ ]. 见图 5A. 生长曲线分析显示,JE/ZIKV(MR766)(K283R)和 JE/ZIKV(MR766)滴度均在 60 h 达到高峰,分别为 7.500 Log<sub>10</sub> pfu/mL 和 7.609 Log<sub>10</sub> pfu/mL,随后均逐渐下降。二者病毒增殖趋势比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 5。

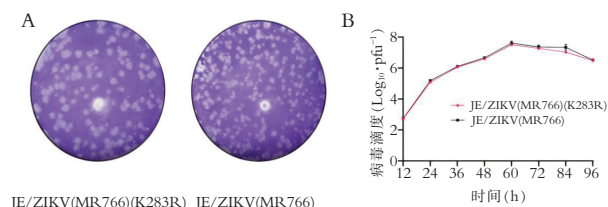


图 5 病毒蚀斑实验结果及生长曲线分析结果

A. 病毒蚀斑实验结果;B. 生存曲线分析结果。

## 2.5 突变病毒小鼠脑内神经毒力测定结果

分别用 JE/ZIKV(MR766)(K283R)和 JE/ZIKV(MR766)脑内接种 3 周龄清洁级昆明小鼠,每只小鼠 0.03 mL,观察 14 d,并记录小鼠的死亡情况。采用 Reed-Muench 法计算得 JE/ZIKV(MR766)(K283R)LD<sub>50</sub> 为 1.35 pfu/0.03 mL,JE/ZIKV(MR766)LD<sub>50</sub> 为 2.21 pfu/0.03 mL。见图 6 及表 2。

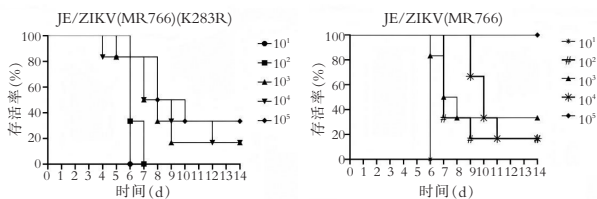


图 6 嵌合病毒的生存曲线

表 2 突变病毒小鼠脑内神经毒力

病毒稀释度	死亡数/总数	
	JE/ZIKV(MR766)(K283R)	JE/ZIKV(MR766)
10 <sup>1</sup>	6/6	6/6
10 <sup>2</sup>	6/6	5/6
10 <sup>3</sup>	5/6	4/6
10 <sup>4</sup>	5/6	5/6
10 <sup>5</sup>	4/6	0/6
初始滴度(pfu/mL)	4.5×10 <sup>6</sup>	0.95×10 <sup>6</sup>
LD <sub>50</sub> (PFU)	1.35	2.21

## 3 讨论

嵌合病毒以成熟的减毒活疫苗株为载体,保留其稳定的减毒特性和复制能力,将目的病毒的关键保护性抗原基因插入骨架,既保留稳定的减毒表型,

又能表达目的病毒的天然构象抗原。黄病毒拥有相同的基因结构,使得嵌合病毒的研发成为可能。ZIKV 嵌合病毒的研发在国内外已有多方报道。例如以乙脑减毒活疫苗株 SA14-14-2 为骨架,构建寨卡嵌合疫苗 ChinZIKV,单剂免疫即可在恒河猴模型中诱导持久中和抗体,并完全阻断母婴传播<sup>[13]</sup>;以朝阳病毒(chayang virus, CYV)为载体构建 CYV-ZIKV 嵌合体,通过“绝育伊蚊叮咬”递送疫苗至恒河猴,单次免疫中和抗体滴度(geometric mean titer, GMT)达 320,能够完全阻断攻毒后的病毒血症<sup>[14]</sup>;以昆虫特异性黄病毒 Aripo 病毒(Aripo virus, ARPV)为骨架,构建嵌合病毒 ARPV/ZIKV,该病毒在脊椎细胞中零复制,具有很好的免疫原性和免疫保护能力<sup>[15]</sup>。这些研究均表明嵌合病毒疫苗是研究安全有效的 ZIKV 病毒疫苗的重要方式。

E 蛋白是 ZIKV 的核心功能蛋白,负责介导病毒与宿主细胞的相互作用、免疫识别及致病机制<sup>[16]</sup>,是 ZIKV 病毒疫苗的研究重点。E 蛋白主要分为三个结构域:结构域 I(DI)、结构域 II(DII)、结构域 III(DIII)<sup>[17]</sup>。DII 最主要的作用是介导病毒与宿主细胞膜的融合,酸性环境触发 EDII 构象发生重排,其融合环从二聚体遮蔽状态解离并定向插入宿主细胞内体膜,启动膜融合过程<sup>[18]</sup>。同时 DII 参与维持病毒颗粒的稳定,在病毒未成熟之前与相邻单体的 DI、DIII 共同维持紧密二聚体构象<sup>[19]</sup>,且在病毒成熟前,DII 的融合环被前体膜蛋白(prM)覆盖,避免在内质网或胞外环境中发生非特异性膜融合<sup>[20]</sup>。此外,DII 在免疫逃逸和调控宿主免疫应答中同样扮演重要的角色<sup>[21]</sup>。E 蛋白 DII 在病毒的感染致病过程中起着至关重要的作用。在已有的报道中,DII 关键位点的突变对寨卡病毒的毒力、免疫原性具有很大的影响。Fan 等<sup>[22]</sup>发现,位于 DII-C 末端跨膜区的 H401Y 突变,能够提高病毒对小鼠的致死率;Liu 等<sup>[23]</sup>发现在 DII 远端引入 D67N 突变能增强寨卡病毒与神经细胞黏附分子结合,促进对神经组织的侵袭能力,这为寨卡病毒疫苗的研究提供了理论依据。寨卡病毒 E 蛋白第 283 位氨基酸处于 DII 结构域。病毒的蚀斑实验结果表明,JE/ZIKV(MR766)(K283R)蚀斑大于 JE/ZIKV(MR766)( $P<0.05$ ),蚀斑直径的变大,提示病毒的毒力可能变强。动物实验的结果显示,JE/ZIKV(MR766)(K283R)的小鼠脑内神经毒力 LD<sub>50</sub> 为 1.35 pfu/0.03 mL,JE/ZIKV(MR766)LD<sub>50</sub> 的小鼠脑内神经毒力为 2.21 pfu/0.03 mL,二者的毒力差异并不十分明显。生长曲线提示,JE/ZIKV(MR766)(K283R)和 JE/ZIKV(MR766)滴度均在

60 h 达到高峰,分别为 7.5 Log<sub>10</sub> pfu/mL 和 7.6 Log<sub>10</sub> pfu/mL,随后均逐渐下降,二者生长趋势无明显差异,说明 K283R 突变并未对嵌合病毒小鼠脑内神经毒力造成影响。前期本课题组针对多个病毒位点的单点突变研究表明,单一突变对嵌合毒株毒力影响有限,提示联合突变可能在毒力调控中发挥主导作用。Fan 等<sup>[22]</sup>发现,包膜蛋白双突变(V153D-H401Y)通过协同机制提升毒力,该突变不仅稳定 E 蛋白二聚体空间构象,还增强病毒与神经细胞的特异性结合效率,从而协同增强神经侵袭性。值得注意的是,在嵌合病毒构建过程中,JE/ZIKV (MR766)嵌合株引入的 prM 蛋白同样可能是毒力决定因素。现有研究<sup>[24]</sup>已证实 prM 关键位点突变可增强神经毒力,如 S139N 位点。因此课题组后续将分别整体替换 prM 与 E 蛋白,以明确两者对毒力差异的贡献,并进一步探索影响神经毒力的关键位点。

综上,虽然两株毒力差异巨大的乙脑寨卡嵌合病毒 E 蛋白 283 位点存在差异,但实验结果表明 E283 位点并不是影响该嵌合病毒毒力的关键位点。基于此进一步推测,多基因位点的联合突变更可能是影响毒力的潜在机制,同时需重点考量 prM 蛋白在神经毒力中的潜在贡献。

#### 参考文献

[1] Tsang TK, Rojas DP, Xu F, *et al.* Estimating transmissibility of Zika virus in Colombia in the presence of surveillance bias [J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 4299.

[2] Liu J, Liu Y, Shan C, *et al.* Role of mutational reversions and fitness restoration in Zika virus spread to the Americas [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 595.

[3] Huang C, Jiang T, Pan W, *et al.* Ubiquitination of NS1 confers differential adaptation of Zika virus in mammalian hosts and mosquito vectors [J]. *Advanced Science*, 2024, 11(39): 2408024.

[4] Fujimura K, Guise AJ, Nakayama T, *et al.* Integrative systems biology characterizes immune-mediated neurodevelopmental changes in murine Zika virus microcephaly [J]. *iScience*, 2023, 26(7): 106909.

[5] Wang Y, Ling L, Zhang Z, *et al.* Current advances in Zika vaccine development [J]. *Vaccines*, 2022, 10(11): 1816.

[6] Wang ZJ, Zhang RR, Wu M, *et al.* Development of a live-attenuated chimeric vaccine against the emerging Usutu virus [J]. *Vaccine*, 2024, 42(6): 1363–1371.

[7] 黄荣, 冯亚岚, 冷生玲, 等. 乙脑/寨卡嵌合病毒感染性克隆构建及病毒拯救 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(1): 17–22.

[8] 唐丽萍. 以乙脑病毒疫苗株为骨架的寨卡嵌合减毒活疫苗候选株的构建 [D]. 南充: 川北医学院, 2020.

[9] Roy A, Liu Q, Yang Y, *et al.* Envelope protein-targeting Zika virus entry inhibitors [J]. *International Journal of Molecular*

*Sciences*, 2024, 25(17): 9424.

[10] 冯亚岚, 李玥珂, 任阳, 等. 乙脑/寨卡嵌合病毒包膜蛋白 T120A 位点突变对小鼠脑内神经毒力的影响 [J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(1): 69–75.

[11] 李玥珂, 冯亚岚, 任阳, 等. 寨卡病毒包膜蛋白 Y158H 突变对乙脑/寨卡嵌合病毒感染小鼠脑内神经毒力的影响 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(6): 655–660.

[12] 陈岚, 李玥珂, 任阳, 等. 乙脑/寨卡嵌合病毒包膜蛋白 V343A 及 I341V/V343A 联合突变对小鼠脑内神经毒力的影响 [J]. *微生物学杂志*, 2023, 43(6): 104–112.

[13] Li XF, Dong HL, Wang HJ, *et al.* Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 673.

[14] Wen D, Ding LS, Zhang Y, *et al.* Suppression of flavivirus transmission from animal hosts to mosquitoes with a mosquito-delivered vaccine [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 7780.

[15] Hobson-Peters J, Harrison JJ, Watterson D, *et al.* A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus [J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(522): eaax7888.

[16] Giraldo MI, Xia H, Aguilera-Aguirre L, *et al.* Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus [J]. *Nature*, 2020, 585(7825): 414–419.

[17] 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]. *Nature Medicine*, 2020, 26(2): 228–235.

[18] Ma X, Yuan Z, Yi Z. Identification and characterization of key residues in Zika virus envelope protein for virus assembly and entry [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1604–1620.

[19] Sourisseau M, Lawrence DJP, Schwarz MC, *et al.* Deep mutational scanning comprehensively maps how Zika envelope protein mutations affect viral growth and antibody escape [J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(23): e01291–19.

[20] Goellner S, Enkavi G, Prasad V, *et al.* Zika virus prM protein contains cholesterol binding motifs required for virus entry and assembly [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7344.

[21] Slon-Campos JL, Dejnirattisai W, Jagger BW, *et al.* A protective Zika virus E-dimer-based subunit vaccine engineered to abrogate antibody-dependent enhancement of dengue infection [J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(10): 1291–1298.

[22] Fan XX, Li RT, Zhu YB, *et al.* An accumulated mutation gained in mosquito cells enhances Zika virus virulence and fitness in mice [J]. *Journal of Virology*, 2024, 98(11): e01251–24.

[23] Liu Z, Zhang Y, Cheng M, *et al.* A single nonsynonymous mutation on ZIKV E protein-coding sequences leads to markedly increased neurovirulence in vivo [J]. *Virologica Sinica*, 2022, 37(1): 115–126.

[24] Shang J, Zhou C, He M, *et al.* Mutation S139N on Zika virus prM protein shifts immune response from Asian to contemporary strain [J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2025, 126: 247–259.

(收稿日期: 2025-07-03

修回日期: 2025-10-28)