

冠状病毒疫苗研究进展

马艺文, 付雅璐, 肖鑫, 王微

[摘要] 进入21世纪以来, 严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)及最新出现的严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)等高致病性冠状病毒先后在人群中暴发流行, 成为影响地区、国家乃至全球的重大公共卫生事件, 研发特异性疫苗成为防控病毒流行的当务之急。本文综述了SARS-CoV和MERS-CoV疫苗的研究进展, 望对SARS-CoV-2疫苗研制提供参考。

[关键词] 疫苗; 严重急性呼吸综合征冠状病毒; 中东呼吸综合征冠状病毒; 严重急性呼吸综合征冠状病毒-2

[中国图书资料分类号] R392.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-8134(2020)01-0065-06

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2020.01.014

Research progress of coronavirus vaccine

MA Yi-wen, FU Ya-lu, XIAO Xin*, WANG Wei*

No. 2 Company, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

*Corresponding author. WANG Wei, E-mail: wwang115@fmmu.edu.cn; XIAO Xin, E-mail: xiao_xxyfsxx@sina.com

[Abstract] Since the 21st century, several highly pathogenic coronaviruses such as severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) and the emerging severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) have successively outbreaked in the population, and become major public health events affecting regions, countries and even the whole world. Research and development of specific vaccines have become an urgent matter for the prevention and control of virus epidemics. This paper reviews the research progress of SARS-CoV and MERS-CoV vaccines, with the expectations to provide a reference for the development of SARS-CoV-2 vaccine.

[Key words] vaccine; SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2

冠状病毒(coronavirus, CoV)是一类高度多样并有包膜包裹的单股正链RNA病毒, 能感染人及多种宿主动物, 产生呼吸道、肠道、肝脏和神经系统疾病^[1]。在这类病毒中, 2002—2003年在中国发现并流行的严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)^[2]、2012年及2015年分别在沙特阿拉伯和韩国流行的中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)^[3]以及于2019年底至2020年初发现并正进一步流行扩散的严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)均为高致病性人病毒株^[4], 能够在人际间传染, 导致严重的呼吸窘迫和肺部炎症, 具有较高病死率。目前对上述3种冠状病毒都没有特效药, 临床治疗以对症支持治疗为主, 因此研发安全、有效的疫苗并开展人群接种, 是广泛并迅速应对病毒传播的重要防控措施^[5]。

本文对SARS-CoV和MERS-CoV疫苗的研究进展进行了综述, 希望对正在加紧研制的SARS-CoV-2疫苗带来启示和参考。

1 冠状病毒结构特点

冠状病毒颗粒直径在70~120 nm之间, 含有长度为26~32 kb的单股非节段性RNA基因组, 从5'到3'端依次编码复制酶蛋白、刺突状糖蛋白(S蛋白)、小膜蛋白(E蛋白)、膜蛋白(M蛋白)及核衣壳蛋白(N蛋白)^[1]。在这些结构蛋白中, S蛋白介导了冠状病毒对宿主细胞的黏附和进入, 它包含的受体结合区(receptor-binding domain, RBD)在不同病毒间保守度低, 包含多种构象中和表位, 使其能在广泛宿主间轻易跨越细胞组织类型乃至物种屏障进行传播^[2]。RBD的多样性也决定了不同冠状病毒利用宿主受体的种类和进入宿主细胞的方式不同, SARS-CoV结合血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体, MERS-CoV结合二肽基肽酶4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)受体^[6-7]。最新研究显示, SARS-CoV-2可能也是通过结合ACE2受体进入人体细胞, 以上结构特点为设计不同冠状病毒的特异性疫苗提供了结构基础和理论依据^[4]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81902897)

[作者单位] 710032 西安, 空军军医大学基础医学院二大队(马艺文、付雅璐), 第一附属医院骨科(肖鑫), 基础医学院免疫学教研室(王微)

[通信作者] 王微, E-mail: wwang115@fmmu.edu.cn; 肖鑫, E-mail: xiao_xxyfsxx@sina.com

2 SARS-CoV 疫苗研究进展

2.1 SARS-CoV 灭活疫苗 灭活疫苗是采用不同理化方法将病毒灭活,使其无法在宿主体内引发产毒性感染,但不破坏病毒颗粒结构从而保留其抗原性的疫苗形式。因表面存在多个能被免疫识别并产生中和抗体的抗原表位,这种疫苗成为 SARS 暴发后研究人员首先想到的制备方法^[8]。Tang 等^[9]用 β -丙内酯灭活的 SARS-CoV 免疫了小鼠,发现能诱导产生高滴度的中和抗体,并且这些抗体能通过识别 S 蛋白的 RBD,阻断病毒与 ACE2 受体的结合。还有研究者发现经紫外线照射灭活的 SARS-CoV 能在小鼠体内同时激活体液和细胞免疫应答,并用这种方法成功实现了疫苗的批量化生产^[10]。用福尔马林灭活病毒后,能在水貂和恒河猴体内产生高水平的中和抗体,但疫苗保护性作用的数据较少或缺失^[11]。在 SARS-CoV 灭活疫苗的 I 期临床试验中,有 36 名志愿者被接种,证明了其安全性和稳定性,但由于 SARS 疫情结束后再未发生过自然感染事件,阻碍了对疫苗有效性的验证^[12]。此外, SARS-CoV 作为烈性传染性病毒,其灭活过程需要在生物安全 3 级或以上级别实验室进行,成本、难度和危险性高也限制了灭活疫苗的推广应用。

2.2 SARS-CoV 减毒活疫苗 减毒活疫苗是通过体外传代或基因重组的方法减弱或去除病毒毒力,使其能够在宿主体内引发产毒性感染,但却是症状轻微甚至消失的疫苗类型。因其可模拟病毒感染宿主的过程,减毒活疫苗能同时激活固有免疫和适应性免疫应答,产生更持久的保护作用^[2]。Lamirande 等^[13]发现,与病毒形态形成和在细胞内运行密切相关的 E 蛋白对于 SARS-CoV 的复制必不可少,编码 E 蛋白的基因缺失后,重组病毒在体外和体内都出现了复制减弱,并引发仓鼠体内产生高水平的血清中和抗体,面对野生病毒入侵时也起到了免疫保护作用。SARS-CoV 的核酸外切酶在病毒 RNA 复制时发挥校正纠错作用,编码核酸外切酶的基因缺失后,病毒复制减弱,并且在传代过程中发生累积突变^[2]。Graham 等^[14]在小鼠源 SARS-CoV 上删除核酸外切酶后,发现减毒株在低龄、高龄和免疫缺陷小鼠体内的生长和致病性都有所减弱,即使很少量的注射也能产生高水平的中和抗体,对致命性野生毒株的入侵产生全面保护作用。但研发减毒活疫苗的主要局限在于,常用的减毒方法,如点突变或缺失突变会使减毒株与自然状态下的野生毒株重组而恢复毒

力,如果没有强有力的证据证明疫情已经严重到需要使用此类疫苗的地步,往往很难获得注册审批。

2.3 SARS-CoV 病毒载体疫苗 病毒载体疫苗作为病毒基因传递系统,是将 SARS-CoV 的抗原基因片段重组到非致病性活病毒载体的基因组中,使其在接种者体内表达保护性抗原的疫苗形式。该疫苗能直接感染抗原递呈细胞,具有较强的固有佐剂活性,因此可以高效诱导固有免疫应答和 T、B 细胞介导的适应性免疫应答^[2]。在 SARS 暴发流行之初就有研究人员将编码 SARS-CoV S 蛋白 S1 片段以及 M 蛋白和 N 蛋白的基因序列重组至腺病毒载体上,发现可在恒河猴体内诱导产生高水平的中和抗体,并激活细胞免疫应答^[15]。5 年后研究人员将重组了 SARS-CoV RBD 片段的腺病毒载体通过滴鼻方式接种 BALB/c 小鼠,发现局部高滴度中和抗体的产生及杀伤性 T 细胞应答的激活^[16]。Bukreyev 等^[17]将 SARS-CoV 的 S 基因重组至副流感病毒载体,并制成滴鼻剂免疫了 8 只非洲绿猴,诱导绿猴体内产生了高效价的中和抗体,并完全抵挡了 SARS-CoV 的攻击。而利用重组了 S 基因的牛痘病毒载体,研究人员在雪貂体内迅速诱导了高效价的中和抗体,但同时也观察到肝脏炎症反应的加重^[18]。Liu 等^[19]还利用杆状病毒/昆虫细胞表达系统重组了包含 SARS-CoV S 蛋白和流感病毒 M1 蛋白的病毒样颗粒,发现这一重组嵌合疫苗具有高度免疫原性,能保护小鼠免受致死性 SARS-CoV 的攻击。

2.4 SARS-CoV 亚单位疫苗 亚单位疫苗同样是利用病毒的抗原成分,但与载体疫苗不同的是,这些成分是在体外完成表达后才被用来制备疫苗^[2]。由于体外表达的蛋白通常由主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) II 类分子递呈,亚单位疫苗无法像载体疫苗一样在细胞内表达抗原,进而被 MHC I 类分子递呈并激活强烈的 T 细胞杀伤作用^[8]。SARS-CoV 的 S 蛋白与 N 蛋白常被体外表达和纯化用于制备亚单位疫苗, Bisht 等^[20]研究发现,相比 SARS-CoV 的减毒活疫苗、痘病毒载体疫苗和表达 S 蛋白的 DNA 疫苗, S 蛋白亚单位疫苗诱导产生了更高滴度的中和抗体,对鼻内感染病毒也提供了更全面的保护作用。此外, N 蛋白亚单位疫苗在小鼠体内也诱导产生了高水平的 T、B 细胞免疫应答,但缺乏在野生病毒感染下的有效性数据^[21]。随着 SARS-CoV S 蛋白 RBD 及其相应受体和互作区域的晶体结构被解析,这些重点结构域都将成为亚单位疫苗的设计靶点。

2.5 SARS-CoV DNA 疫苗 DNA 疫苗是由包含病毒抗原基因片段的质粒载体直接免疫机体,并在体内表达保护性抗原、激活体液和细胞免疫应答的疫苗种类。该疫苗能模仿活病毒的感染方式合成内源性抗原,并被递呈给 MHC I 类分子诱导 CD8⁺ T 细胞的杀伤作用,具有稳定性强、安全性高、制备简单的特点^[8]。与亚单位疫苗类似,编码 SARS-CoV S 蛋白和 N 蛋白的基因序列常被克隆至载体制备 DNA 疫苗。Yang 等^[22]研究发现,表达 S 蛋白的 DNA 疫苗可在小鼠肺内降低 SARS-CoV 的复制,并且这种保护作用是通过 S 基因的中和抗体而非 T 细胞应答介导的。表达 N 蛋白的 DNA 疫苗在诱导强烈细胞免疫应答的同时,还被观察到能诱导迟发型超敏反应^[23]。为了提高 DNA 疫苗的免疫原性增强其保护作用,研究人员还尝试设计同时表达 S 蛋白和 M 蛋白的多表位疫苗,得到了比单一疫苗更好的免疫效果^[24]。

3 MERS-CoV 疫苗研究进展

3.1 MERS-CoV 病毒载体疫苗 腺病毒作为常用疫苗载体,具有结构小、易操作、感染范围广以及蛋白表达水平高的特点^[25]。在常用的腺病毒 Ad5 载体上, Kim 等^[26]构建了分别含有 MERS-CoV S 蛋白全长和 S1 片段的两种疫苗,在小鼠体内经过首次肌内注射和 3 周后的滴鼻加强接种后,产生了抗原特异性的 IgG 和中和抗体。Jung 等^[27]同样在 Ad5 载体上构建了 S 蛋白疫苗,经过首次免疫和 S 蛋白纳米颗粒的加强接种后,检测到中和抗体的产生及辅助 T 细胞(helper T cell, Th) 1 和 Th2 细胞介导的免疫应答,在被表达人源化 DPP4 的腺病毒感染的小鼠体内产生了免疫保护作用。此外,研究人员也用猴腺病毒作为载体制作了 S 蛋白疫苗,在免疫小鼠 4 周后检测到高水平的中和抗体和细胞免疫应答,由于已被证明在人体内使用的安全性,该疫苗目前已进入 I 期临床试验阶段^[28]。痘病毒载体由于非必需基因多、稳定性好并且表达量高,也常被用作疫苗载体^[25]。Song 等^[29]在改良的痘病毒中整合了 MERS-CoV 的 S 蛋白制成载体疫苗,给 BALB/c 小鼠肌内注射接种后,产生了高水平的特异性中和抗体。用同样载体制成的疫苗,在第 21 d 首次接种及第 40 d 加强接种后,小鼠体内都出现了高水平中和抗体,同时检测到小鼠脾脏内 CD8⁺ T 细胞应答增加,IFN- γ 水平上调^[30]。研究人员将该疫苗肌内注射于 MERS-CoV 的中间宿主单峰骆驼后,能在其体内诱导产生中和抗体,并对鼻腔内感染的野生 MERS-CoV 起到

抑制作用,该疫苗目前已进入 I 期临床试验阶段^[31]。

3.2 MERS-CoV 亚单位疫苗 制备亚单位疫苗时,为了增强体外表达蛋白的抗原性,通常将编码病毒表位的基因和编码免疫球蛋白 Fc 片段的基因相连表达出融合蛋白。这样一来,具有 Fc 片段的抗原蛋白不仅有利于体外纯化,还能作为免疫增强剂延长疫苗在体内的滞留时间。目前的 MERS-CoV 亚单位疫苗都是 Fc 融合蛋白^[25]。而在选择代表最优病毒表位的氨基酸残基序列时,研究人员将目光聚焦到了 MERS-CoV S 蛋白的 RBD。Du 等^[32]报道 S 蛋白的第 377-662 氨基酸残基具备和 MERS-CoV 受体 DPP4 特异性结合的能力,并能在小鼠体内诱导产生中和性抗体。1 年后, Ma 等^[33]将上述氨基酸残基组成的肽段进一步截成 5 个长度不同的片段与 Fc 基因融合表达,发现 S377-588-Fc 相比其他 4 种融合蛋白,能在小鼠和家兔体内诱导产生更高滴度的中和抗体,且与 DPP4 的亲合力更强,说明这一长度的氨基酸残基已经足以表达制备亚单位疫苗所需的 RBD 融合蛋白。利用这些残基序列制备 MERS-CoV 亚单位疫苗免疫动物后,都在体内产生了高滴度的中和抗体^[33-34],其中采用 S377-662-Fc 融合蛋白的疫苗还在小鼠脾脏内诱导产生了特异性的细胞免疫应答^[34]。与此同时,这些研究还观察到与皮下注射的传统接种方式相比,鼻内滴注由于诱导了黏膜免疫应答产生分泌性 IgA,能够大大增加亚单位疫苗的保护作用^[34]。此外, Zhang 等^[35]对比了几种疫苗佐剂的作用后发现,包含 1% 鲨烯、0.5% 吐温 80 和 0.5% 三油酸聚山梨脂的水包油型乳剂 MF59 是 MERS-CoV S 蛋白亚单位疫苗的最佳佐剂。

3.3 MERS-CoV DNA 疫苗 pVax1 是一个优化的质粒疫苗载体,研究人员将编码 MERS-CoV S 蛋白全长的 DNA 序列导入其中制成 DNA 疫苗,并先后免疫恒河猴及 MERS-CoV 的中间宿主单峰骆驼,发现能够诱导产生中和抗体和 T 细胞应答,并能减轻野生病毒感染后的肺部症状,降低病毒载量^[36]。该疫苗(GLS-5300)目前已完成 I 期临床试验,在受试的 75 名患者中未发现疫苗诱导的不良反应,85% 的患者在两次免疫接种后检测到有效的免疫应答,并在随访 1 年后仍保持有效^[37]。除了 S 蛋白全长,研究人员还将编码 S 蛋白 S1 片段,即包含 RBD 结构域的序列克隆到 pcDNA3.1 质粒上构建了 MERS-CoV 的 DNA 疫苗。用该疫苗肌内注射给小鼠后诱导产生了高水平中和抗体,还在小鼠脾脏细胞中检测到抗原特异性细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 分泌升高,免疫效果甚至比表达 S

蛋白全长的疫苗更胜一筹^[38]。在另一项对比表达 S 蛋白全长和 S1 片段 DNA 疫苗的研究中, Al-Amri 等^[39]发现 S1 片段疫苗在小鼠中诱导的两种抗体 IgG2a 和 IgG1 的比值比表达 S 蛋白全长的疫苗所诱导的比值更平衡,表明体内诱导的 Th1/Th2 细胞应答更为平衡。这些结果都表明,编码 S 蛋白全长或 S1 片段的多个 DNA 疫苗都可诱导获得性免疫并有效预防 MERS-CoV 的感染攻击。

4 SARS-CoV-2 疫苗研究现状

2020年2月11日,WHO将新型冠状病毒肺炎正式命名为“COVID-19”,同日,国际病毒分类委员会也宣布,引起该疾病的新型冠状病毒正式命名为“SARS-CoV-2”。面对汹涌而来的疫情,国内外研究人员争相投入到疫苗的研发工作中,开始了与病毒的时间赛跑。2020年1月26—27日,中国疾病预防控制中心和浙江省疾病预防控制中心相继分离出 SARS-CoV-2 的病毒毒株,为疫苗研究奠定了基础。同 SARS-CoV 和 MERS-CoV 一样,SARS-CoV-2 的 S 蛋白及其中所包含的 RBD 依旧是疫苗研发的主要靶点^[40]。全球范围内,在流行病防范创新联盟的倡导和资助下,针对 SARS-CoV-2 的疫苗研制项目也相继公布。

从疫苗种类上来看,中国香港大学医学院和法国巴斯德研究所将分别对现有的流感疫苗和麻疹疫苗进行改良,加入 SARS-CoV-2 S 蛋白的表达序列,以缩短研发周期^[41];美国强生制药和武汉博沃生物与 GeoVax Labs 的合作团队将分别利用其腺病毒和改良痘病毒平台研制 SARS-CoV-2 的病毒载体疫苗^[42];中国科学院微生物研究所将与安徽智飞生物合作,研制 SARS-CoV-2 的重组蛋白亚单位疫苗^[43];澳大利亚昆士兰大学将利用其独有的“分子钳”疫苗平台,将体外合成的 SARS-CoV-2 S 蛋白“钳”成天然的聚合状态,便于在体内诱导产生中和抗体,这项研究还得到了葛兰素史克公司强大的“佐剂平台技术”辅助,以进一步增强这种亚单位疫苗在体内激发的免疫应答^[44];北京艾棣维欣生物将与美国 Inovio 公司合作,研发含有 SARS-CoV-2 S 蛋白序列的 DNA 疫苗“INO-4800”^[44]。与此同时,更多企业和科研机构将目光聚焦在新型 mRNA 疫苗的研发上,这一最新技术是用编码病毒抗原的 mRNA 作为疫苗,通过直接注射或载体递送进入体内后被翻译成病毒蛋白,诱导产生细胞和体液免疫应答,具备免疫原性低、生产流程短、研发速度快的特点^[45]。随着 SARS-CoV-2 的序列被迅速破解和公布,

研究人员可快速筛选抗原并设计合成多种 SARS-CoV-2 的潜在 mRNA 疫苗。目前美国 Moderna 和德国 CureVac 等 mRNA 疫苗研发公司及国内的上海斯微生物科技有限公司、广州冠昊生物科技有限公司等纷纷宣布将与科研院所合作或自主研发 SARS-CoV-2 的 mRNA 疫苗^[44]。

面对 SARS-CoV-2,不同于实验室检测和抗病毒药物研究,疫苗的研发要经历细胞和动物实验、临床研究、批准上市和质控生产等长达数年的过程,是一项长期的投入。对于正在流行的疫情这个“近火”,疫苗的“远水”往往无从救起。2002—2003年,SARS 疫情在不到半年时间内得到有效控制,而当时研发最快的 SARS-CoV 疫苗在 2004 年准备就绪开展 I 期临床试验的时候,这个病毒在人群中已经消失半年了^[46]。虽然疫苗在 36 名健康志愿者身上具有良好的作用和安全性^[12],但这项研究最终因为 SARS 的销声匿迹而宣告告终。面对这样“突发突止”的传染性疾病,在考验疫苗研发人员速度的同时,也在考验高校、科研院所、企业等进行长期人力、物力投资的勇气。但随着疫苗新技术的不断发展,我们期待在不久的将来,一定会诞生能有效防控 SARS-CoV-2 的疫苗产品。

【参考文献】

- [1] Zumla A, Chan JFW, Azhar EI, *et al.* Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5):327–347.
- [2] Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(12):836–848.
- [3] Mubarak A, Alturaiki W, Hemida MG. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): infection, immunological response, and vaccine development [J]. *J Immunol Res*, 2019. DOI: 10.1155/2019/6491738.
- [4] Lu R, Zhao X, Li J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- [5] 许庭莹, 石大伟, 刘东来, 等. WHO 对年度优先关注突发传染病的评估方法介绍 [J]. *传染病信息*, 2019, 32(5):385–389.
- [6] Li W, Moore MJ, Natalya Vasilieva, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*, 2003, 426(6965):450–454.
- [7] Raj VS, Mou H, Smits SL, *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC [J]. *Nature*, 2013, 495(7440):251–254.
- [8] Roper RL, Rehm KE. SARS vaccines: where are we? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 8(7):887–898.
- [9] Tang L, Zhu Q, Qin E, *et al.* Inactivated SARS-CoV vaccine prepared from whole virus induces a high level of neutralizing antibodies in BALB/c mice [J]. *DNA Cell Biol*, 2004, 23(6):391–394.
- [10] Tsunetsugu-Yokota Y. Large-scale preparation of UV-inactivated SARS coronavirus virions for vaccine antigen [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 454:119–126.

- [11] Darnell MER, Plant EP, Watanabe H, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vaccinated ferrets [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(9):1329–1338.
- [12] Lin J, Zhang J, Su N, *et al.* Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine [J]. *Antivir Ther*, 2007, 12(7):1107–1113.
- [13] Lamirande EW, Dediego ML, Roberts A, *et al.* A live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and efficacious in golden syrianhamsters [J]. *J Virol*, 2008, 82(15):7721–7724.
- [14] Graham RL, Becker MM, Eckerle LD. A live, impaired-fidelity coronavirus vaccine protects in an aged, immunocompromised mouse model of lethal disease [J]. *Nat Med*, 2012, 18(12):1820–1826.
- [15] Gao W, Tamin A, Soloff A, *et al.* Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys [J]. *Lancet*, 2003, 362(9399):1895–1896.
- [16] Du L, Zhao G, Lin Y, *et al.* Intranasal vaccination of recombinant adeno-associated virus encoding receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) spike protein induces strong mucosal immune responses and provides long-term protection against SARS-CoV infection [J]. *J Immunol*, 2008, 180(2):948–956.
- [17] Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ, *et al.* Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS [J]. *Lancet*, 2004, 363(9427):2122–2127.
- [18] Czub M, Weingartl H, Czub S, *et al.* Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets [J]. *Vaccine*, 2005, 23(17–18):2273–2279.
- [19] Liu YV, Massare MJ, Barnard DL, *et al.* Chimeric severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S glycoprotein and influenza matrix 1 efficiently form virus-like particles (VLPs) that protect mice against challenge with SARS-CoV [J]. *Vaccine*, 2011, 29(38):6606–6613.
- [20] Bisht H, Roberts A, Vogel L, *et al.* Neutralizing antibody and protective immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein [J]. *Virology*, 2005, 334(2):160–165.
- [21] Liu S, Leng C, Lien S, *et al.* Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates [J]. *Vaccine*, 2006, 24(16):3100–3108.
- [22] Yang Z, Kong W, Huang Y, *et al.* A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice [J]. *Nature*, 2004, 6982(428):561–564.
- [23] Qi Z, Cao H, Ren H, *et al.* Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine [J]. *Virology*, 2005, 331(1):128–135.
- [24] Wang X, Xu W, Tong D, *et al.* A chimeric multi-epitope DNA vaccine elicited specific antibody response against severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus which attenuated the virulence of SARS-CoV *in vitro* [J]. *Immunol Lett*, 2008, 119(1–2):71–77.
- [25] 胡慧祯, 沈宇清. 中东呼吸综合征冠状病毒重组疫苗研究进展 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(4):495–500.
- [26] Kim E, Okada K, Kenniston T, *et al.* Immunogenicity of an adenoviral-based middle east respiratory syndrome coronavirus vaccine in BALB/c mice [J]. *Vaccine*, 2014, 32(45):5975–5982.
- [27] Jung S, Kang KW, Lee E, *et al.* Heterologous prime-boost vaccination with adenoviral vector and protein nanoparticles induces both Th1 and Th2 responses against Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *Vaccine*, 2018, 36(24):3468–3476.
- [28] Munster VJ, Wells D, Lambe T, *et al.* Protective efficacy of a novel simian adenovirus vaccine against lethal MERS-CoV challenge in a transgenic human DPP4 mouse model [J]. *NPJ Vaccines*, 2017, 2(1):28.
- [29] Song F, Fux R, Provacia LB, *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus spike protein delivered by modified vaccinia virus ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies [J]. *J Virol*, 2013, 87(21):11950–11954.
- [30] Volz A, Kupke A, Song F, *et al.* Protective efficacy of recombinant modified vaccinia virus ankara delivering Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein [J]. *J Virol*, 2015, 89(16):8651–8656.
- [31] Haagmans BL, Brand JMA, Raj VS, *et al.* An orthopoxvirus-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels [J]. *Science*, 2016, 351(6268):77–81.
- [32] Du L, Zhao G, Kou Z, *et al.* Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development [J]. *J Virol*, 2013, 87(17):9939–9942.
- [33] Ma CQ, Wang LL, Tao XR, *et al.* Searching for an ideal vaccine candidate among different MERS coronavirus receptor-binding fragments—the importance of immunofocusing in subunit vaccine design [J]. *Vaccine*, 2014, 32(46):6170–6176.
- [34] Ma CQ, Li Y, Wang LL, *et al.* Intranasal vaccination with recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein induces much stronger local mucosal immune responses than subcutaneous immunization: implication for designing novel mucosal MERS vaccines [J]. *Vaccine*, 2014, 32(18):2100–2108.
- [35] Zhang N, Channappanavar R, Ma C, *et al.* Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2):180–190.
- [36] Muthumani K, Falzarano D, Reuschel EL, *et al.* A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(301):132–301.
- [37] Modjarrad K, Roberts CC, Mills KT, *et al.* Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase I, open-label, single-arm, dose-escalation trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 9(19):1013–1022.
- [38] Chi H, Zheng X, Wang X, *et al.* DNA vaccine encoding Middle East respiratory syndrome coronavirus S1 protein induces protective immune responses in mice [J]. *Vaccine*, 2017, 35(16):2069–2075.
- [39] Al-Amri SS, Abbas AT, Siddiq LA, *et al.* Immunogenicity of candidate MERS-CoV DNA vaccines based on the spike protein [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:44875.
- [40] Jiang S, Shi Z. The first disease X is caused by a highly transmissible acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Virol Sin*, 2020. DOI: 10.1007/s12250-020-00206-5.
- [41] Institut Pasteur. Institut Pasteur’s scientists isolate strains of coronavirus 2019-nCoV detected in France [EB/OL]. [2020-02-03]. <https://www.news-medical.net/news/20200203/Institut-Pasteurs-scientists-isolate-strains-of-coronavirus-2019-nCoV-detected-in-France.aspx>.
- [42] GeoVax, Inc. GeoVax and BravoVax (Wuhan, China) to collaborate on development of coronavirus vaccine [EB/OL]. [2020-01-27]. <https://geovax.com/news/geovax-and-bravovax-wuhan-china-to-collaborate-on-development-of-coronavirus-vaccine>.
- [43] 中国科学院微生物研究所. 面对疫情, 中科院微生物所在疫苗研发、机制研究、数据库建设等方面跑步前进 [EB/OL]. [2020-01-31]. http://www.im.cas.cn/xwzx2018/jqyw/202001/t20200131_5494673.html.

- [44] The Coalition for Epidemic Preparedness Innovations. CEPI to fund three programmes to develop vaccines against the novel coronavirus, nCoV-2019[EB/OL]. [2020-01-23]. https://cepi.net/news_cepi/cepi-to-fund-three-programmes-to-develop-vaccines-against-the-novel-coronavirus-ncov-2019/.
- [45] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, *et al.* mRNA vaccines – a new era

- in vaccinology [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(4):261-279.
- [46] 张洪涛. 疫苗暗战: 中英美, 谁可以最先拿到武汉肺炎疫苗[EB/OL]. [2020-02-08]. <https://news.ifeng.com/c/7tsFYiXlgMJ>.

(2020-02-06 收稿 2020-02-21 修回)
(本文编辑 揣征然)

· 病例报道 ·

初筛阴性的新型冠状病毒肺炎患者 1 例

王开利, 张 昕, 申立军, 王福川, 马贺成, 杨木易, 张洁利, 黄 磊, 赵 军

[摘要] 病毒核酸检测对于新型冠状病毒肺炎的诊断具有重要意义, 而在临床中也出现了核酸检测初筛阴性且最终确诊的患者。在治疗中, 新型冠状病毒肺炎患者有临床症状与肺部实际病变程度相分离的特点。一些患者临床症状并不重, 但影像学检查却显示病变明显。本例病例提示对于新型冠状病毒肺炎疑似患者, 病毒核酸阴性, 不能简单排除。应密切追踪患者影像学表现, 并及时进行病毒核酸复检, 以免漏诊, 造成病毒传播, 错过治疗时机。在临床治疗中影像学检查对于新型冠状病毒肺炎患者病变程度判断、指导治疗同样具有重要意义。

[关键词] 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 病毒核酸检测

[中国图书资料分类号] R563

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2020)01-0070-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2020.01.015

A novel coronavirus pneumonia patient negative by primary screening

WANG Kai-li, ZHANG Xin, SHEN Li-jun, WANG Fu-chuan, MA He-cheng, YANG Mu-yi, ZHANG Jie-li, HUANG Lei*, ZHAO Jun*
Fever Clinics, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Department of Blood Purification, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

*Corresponding author. HUANG Lei, E-mail: huangleiwa@sina.com; ZHAO Jun, E-mail: zhj68@263.net

[Abstract] For the diagnosis of novel coronavirus pneumonia, viral nucleic acid detection is of great significance. However, some patients with negative results in primary screening of viral nucleic acid detection have been made a definite diagnosed in the clinic. In the treatment, the patients with novel coronavirus pneumonia are characterized by clinical symptoms separated from the actual degree of lung lesions. In some patients, the clinical symptoms are not severe, but the imaging examination shows obvious lesions. This case in this study suggests that suspected novel coronavirus pneumonia patients with a negative result of viral nucleic acid cannot be ruled out imprudently. Imaging examination should be closely tracked and the viral nucleic acid re-detection should be conducted in time to avoid missed diagnosis, cause virus transmission and miss treatment opportunities. In clinical treatment, imaging examination is also of great significance for judging the degree of lung lesions in novel coronavirus pneumonia patients and guiding treatment.

[Key words] novel coronavirus; novel coronavirus pneumonia; viral nucleic acid detection

自 2019 年 12 月湖北省武汉市发现新型冠状病毒肺炎以来, 截至目前疫情尚未得到有效控制。新型冠状病毒属于 β 属冠状病毒, 基因特征与严重急性呼吸综合征相关冠状病毒和中东地区呼吸综合征相关冠状病毒有明显区别^[1-3]。基于目前的流行病学调查和研究结果, 新型冠状病毒肺炎潜伏期一般为

1~14 d, 多为 3~7 d; 传染源主要是新型冠状病毒感染的患者, 无症状感染者也可能成为传染源; 主要传播途径为经呼吸道飞沫和接触传播, 气溶胶和粪-口等传播途径尚待明确^[4]; 人群普遍易感。

对于新型冠状病毒肺炎的诊断, 病毒核酸检测具有重要意义, 但在临床中也出现了一些核酸检测初筛甚至多次检测阴性, 却最终确诊的患者。在治疗中, 新型冠状病毒肺炎患者有临床症状与肺部实际病变程度相分离的特点, 一些患者临床症状并不重, 但影像学检查却提示病变明显。新型冠状病毒肺炎患者的肺部影像学改变特点明显, 以肺外带为主。因此, 影像学检查, 尤其是分辨

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81772185)

[作者单位] 100039 北京, 中国人民解放军总医院第五医学中心发热门诊(王开利、张昕、申立军、王福川、马贺成、杨木易、张洁利、黄磊), 感染病诊疗与研究中心(张昕、马贺成、张洁利、黄磊), 血液净化科(王开利、赵军), 肝硬化诊疗一中心(申立军), 青少年肝病诊疗与研究中心(王福川), 肝胆外科一中心(杨木易)
[通信作者] 黄磊, E-mail: huangleiwa@sina.com; 赵军, E-mail: zhj68@263.net