

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.08.002

❖ 基础研究 ❖

# 乙脑/寨卡嵌合病毒株的生物学特性及免疫原性鉴定

黄荣<sup>1</sup>, 冷生玲<sup>2</sup>, 冯亚岚<sup>1</sup>, 唐丽萍<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. 绵阳市中心医院感染科, 四川绵阳 621000)

**【摘要】目的:** 鉴定以乙脑病毒(JEV)疫苗株 SA14-14-2 为骨架的乙脑/寨卡(ZIKV)嵌合病毒, 分析其作为疫苗候选株的可行性。**方法:** 通过对嵌合病毒的噬斑形态鉴定和生长特性鉴定, 初步判断嵌合病毒的毒力, 并用嵌合病毒接种昆明鼠, 检测其脑内、皮下及腹腔神经毒力, 使用噬斑减少中和试验(PRNT)及免疫攻击试验分析嵌合病毒的免疫原性及免疫保护作用。**结果:** 嵌合病毒比乙脑疫苗株 SA14-14-2 具有更小的噬斑; 用不同的感染复数(0.1、0.01、0.001)感染 BHK21 细胞, 可得到相似的生长曲线, 复制速度较 SA14-14-2 慢, 峰值出现较 SA14-14-2 晚; 对昆明鼠有较强的神经毒力但无明显神经侵袭力; 可诱导小鼠产生较高的中和抗体效价; 能保护小鼠免受病毒自身脑内攻击并呈现典型的剂量效应; 能与 SA14-14-2 产生一定程度的交叉反应。**结论:** 嵌合病毒 JE/ZIKA 免疫原性良好, 但对小鼠有较强的脑内神经毒力, 嵌合病毒和乙脑疫苗株也有一定的交叉免疫。

**【关键词】** 乙脑病毒; 寨卡病毒; 嵌合病毒; 免疫原性; 免疫保护

**【中图分类号】** R373.3 **【文献标志码】** A

## Biological characteristics and immunogenicity identification of Japanese encephalitis/Zika Chimeric virus strain

HUANG Rong<sup>1</sup>, LENG Sheng-ling<sup>2</sup>, FENG Ya-lan<sup>1</sup>, TANG Li-ping<sup>1</sup>, YUAN Lei<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1</sup>

(1. Basic Medicine and Forensics School, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 2. Department of Infectious Disease, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, Sichuan China)

**【Abstract】Objective:** To identify the Japanese encephalitis/Zika chimeric virus (JE/ZIKV) based on Japanese encephalitis virus (JEV) vaccine strain SA14-14-2, and analyze its feasibility as a vaccine candidate strain. **Methods:** The growth characteristics of the chimeric virus were identified by the plaque assay, of which the neurotoxicity in the brain, subcutaneous and abdominal cavity were evaluated with Kunming mice. The immunogenicity and immune protection of chimeric virus were analyzed by plaque reduction neutralization test (PRNT) and immune attack test. **Results:** The plaque of JE/ZIKA virus was smaller than that produced by JEV SA14-14-2. BHK21 cells were infected with different multiplicity of infection (m. o. i was 0.1, 0.01, and 0.001) got similar growth curve, while the peak appears later than those of strain SA14-14-2. No neuroinvasiveness but strong neurotoxicity were observed in Kunming mice. High neutralizing antibody titer was induced in mice, which could be able to protect mice from the chimeric virus brain attack and present a typical dose effect, and there was cross immunity with SA14-14-2. **Conclusion:** The chimeric JE/ZIKA virus showed good immunogenicity but has strong neurotoxicity in mice, and there is cross immunity between chimeric virus JE/ZIKA and Japanese encephalitis vaccine strain SA14-14-2.

**【Key words】** Japanese encephalitis virus; Zika virus; Chimeric virus; Immunogenicity; Immune protection

寨卡病毒(zika virus, ZIKV)属黄病毒科黄病毒属, 是单链 RNA 病毒, 编码 3 个结构蛋白(C, prM, E)和 7 个非结构蛋白(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B 和 NS5)<sup>[1]</sup>。ZIKV 主要传播媒介为伊蚊, 性传播也有报道<sup>[2]</sup>。成人感染症状轻微, 但有研究<sup>[3-4]</sup>显示, ZIKV 感染与新生儿小头畸形、成人格林巴利综合征(GBS)存在密切联系。ZIKV 主要在热带和亚热带地区流行, 2015~2016 年巴西寨卡

病毒病大暴发, 导致全球约 150 万人感染, WHO 将 ZIKV 感染列为国际关注的突发公共卫生事件<sup>[5]</sup>。ZIKV 对全球已造成较大的经济和健康负担, 尚且无特效药, 接种疫苗成为防控最有效的方式。一些 DNA 疫苗、灭活病毒疫苗等作为 ZIKV 疫苗候选株已进入临床试验阶段<sup>[6]</sup>。

目前 ZIKV 的毒力机制及其介导的免疫效应尚不清晰, 嵌合减毒活疫苗较 DNA 疫苗、灭活疫苗来

基金项目: 四川省南充市川北医学院市校合作项目(No. 20SXQT0338; No. 18SXHZ0495)

作者简介: 黄荣(1992-), 女, 硕士, 讲师。E-mail: 422727230@qq.com

通讯作者: 杨健。E-mail: jiany74@163.com

说,免疫原性更强,安全性更高,更适合作为 ZIKV 疫苗研发的发展方向。自 90 年代来,嵌合疫苗技术已用于开发了多种不同血清型的黄病毒疫苗候选株<sup>[7-8]</sup>,该方法将黄病毒的 prM/E 序列嵌合已许可上市的其他黄病毒减毒活疫苗的骨架中,均获得良好的结果。本课题组在前期以乙脑疫苗株 SA14-14-2 为骨架嵌合 ZIKV 的 prM/E 序列,成功构建并拯救乙脑/寨卡嵌合病毒 JE/ZIKA,本研究以此为基础,进一步探索该嵌合病毒作为疫苗候选株的安全性和有效性,分析 JE/ZIKA 作为 ZIKV 嵌合疫苗的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

地鼠肾(BHK21)细胞为川北医学院病原中心实验室保存,嵌合病毒 JE/ZIKA 为本室拯救保存。清洁级昆明鼠,体重 10~14 g,由川北医学院实验动物中心提供。病毒学实验于川北医学院病原中心 BSL-2 实验室进行,动物实验方案经川北医学院动物实验伦理委员会批准通过。

### 1.2 方 法

1.2.1 病毒的噬斑形态鉴定 将连续 10 倍等比稀释的嵌合病毒液和乙脑疫苗株 SA14-14-2 病毒液分别接种于铺满 BHK21 细胞的 6 孔板中,0.4 mL/孔,每个梯度设置复孔,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 1 h,每隔 20 min 摇晃 6 孔板 1 次,使得病毒液与细胞均匀吸附。吸掉病毒液,将含 4% FBS MEM 培养基和 2% 低熔点琼脂糖等体积混合后加入 6 孔板中覆盖细胞,2 mL/孔,待孔中覆盖物冷却后将 6 孔板放置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4~5 d,用 4% 甲醛溶液固定 30 min,接着用 10 g/L 结晶紫染色 10 min,流水冲洗,比较嵌合病毒和 SA14-14-2 的噬斑大小。

1.2.2 复制能力检测 分别以 MOI = 0.1、0.01、0.001 将嵌合病毒接种到铺满单层 BHK21 细胞的 75 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中,以 MOI = 0.01 将 SA14-14-2 同样接种 BHK21 细胞作为对照组,继续培养,每隔 12 h 取 200 μL 上清液于 -80 °C 冻存,直到细胞全部病变死亡。收集 1~7 d 样本,用噬斑实验逐一检测各个上清样本中病毒的滴度,以感染时间为横坐标,病毒滴度为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.3 神经毒力 LD50 和神经侵袭力检测 用嵌合病毒 JE/ZIKA(2.7 × 10<sup>6</sup> PFU/mL)分别通过皮下和腹腔途径(辅脑内空刺)、脑内途径接种昆明鼠,乙脑疫苗株 SA14-14-2 做对照,观察 14 d,计算小鼠死亡率。10 倍系列稀释嵌合病毒至 10<sup>-7</sup>,从 10<sup>-2</sup>稀

释度开始,每个稀释度脑内接种昆明鼠各 6 只,0.03 mL/只,接种后 3 d 内死亡者不计,饲养 14 d,用 Reed-Muench 法计算神经毒力 LD50。

1.2.4 免疫原性分析 嵌合病毒 JE/ZIKA(2.7 × 10<sup>6</sup> PFU/mL)分别以皮下和腹腔途径各接种 50 只成鼠,皮下途径 0.1 mL/只,腹腔途径 0.5 mL/只。于免疫后第 1~10 周每周采血(每次各采集 5 只小鼠),分离血清,测定中和抗体效价(PRNT50),以 PRNT 50 > 10 为阳转,计算 GMT。

1.2.5 嵌合病毒 JE/ZIKA 免疫对自身的免疫保护 嵌合病毒 JE/ZIKA(2.7 × 10<sup>6</sup> PFU/mL)用不含血清的 MEM 进行 10 倍系列稀释至 10<sup>-5</sup>,分别用原倍病毒、10<sup>-1</sup>、10<sup>-3</sup>和 10<sup>-5</sup>倍稀释病毒免疫体重为 10~12 g 的昆明鼠共 40 只,每组各 10 只,每只皮下注射 0.1 mL,免疫 14 d 后,小鼠脑内注射 0.03 mL(滴度为 100 LD50)嵌合病毒,观察 14 d,计算 5 组小鼠的死亡率。

1.2.6 嵌合病毒接种对小鼠乙脑病毒脑炎的交叉保护 嵌合病毒 JE/ZIKA(3.45 × 10<sup>6</sup> PFU/mL)皮下免疫昆明鼠 10 只,0.1 mL/只,免疫 14 d 后,用乙脑野毒株 SA14(滴度为 100LD50)腹腔攻击,观察 14 d,记录小鼠死亡情况。

## 2 结 果

### 2.1 嵌合病毒噬斑鉴定结果

将嵌合病毒 JE/ZIKV 和乙脑疫苗株病毒 JEV SA14-14-2 在 BHK21 细胞上噬斑进行比较,发现嵌合病毒 JE/ZIKA 噬斑直径小于 JEV SA14-14-2 的噬斑直径。见图 1。

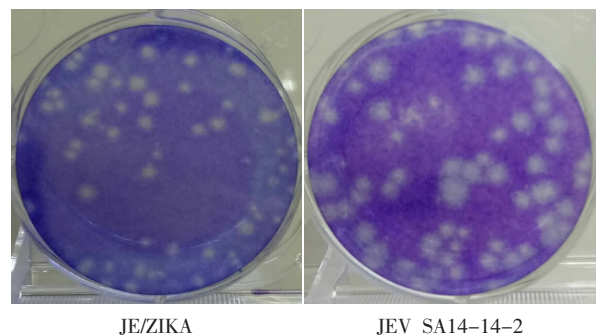


图 1 嵌合病毒和疫苗株 SA14-14-2 的噬斑鉴定

嵌合病毒 JE/ZIKA 与 JEV SA14-14-2 分别在同一 6 孔板 BHK21 细胞中形成的噬斑大小比较。

### 2.2 病毒的增殖曲线

不同 MOI 收获的嵌合病毒峰值均可达到 6.5 lg PFU/mL 左右,滴度均在接种后第 108 h 左右达到高峰,随后滴度缓慢下降。MOI = 0.001 接种组病毒滴度上升较慢,但高峰滴度较另外两组略高。用 JE/ZIKA 和 JEV SA14-14-2 分别接种 BHK21 细胞(MOI

=0.01), JEV SA14-14-2 于接种后 60 h 内病毒增殖较快,在 60 h 出现复制高峰后开始缓慢下降,而 JE/ZIKA 在接种后增殖速度较 JEV SA14-14-2 快,接种 96 h 也未达到高峰滴度。见图 2 及图 3。

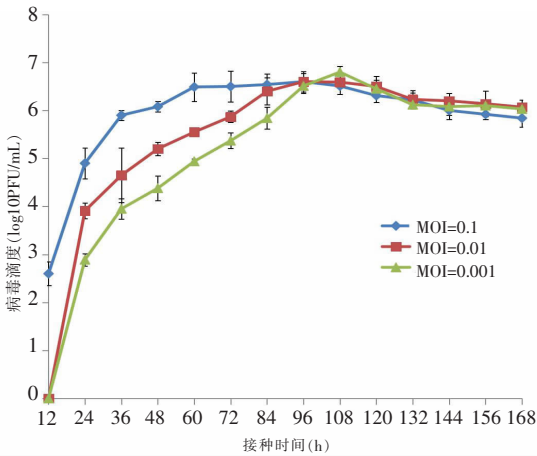


图 2 嵌合病毒在 BHK21 细胞中的生长曲线

嵌合病毒 JE/ZIKA 以不同 MOI 接种 BHK21 细胞收获的生长曲线。

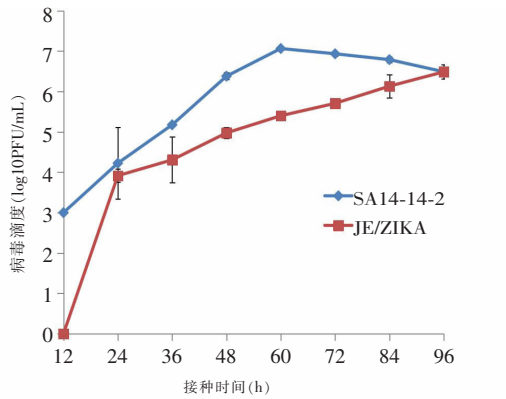


图 3 嵌合病毒和 SA14-14-2 在 BHK21 细胞中的生长曲线

在 BHK21 细胞中,以 MOI=0.01 分别接种嵌合病毒 JE/ZIKA 和 JEV SA14-14-2 收获的生长曲线比较。

### 2.3 神经毒力和神经侵袭力检测结果

通过皮下及腹腔途径接种嵌合病毒,各组昆明鼠均未出现发病或死亡情况,而脑内途径接种组小鼠于 14 d 全部死亡,SA14-14-2 接种组小鼠均健存。分别用 10 倍梯度系列稀释 JE/ZIKA 脑内接种昆明鼠,测定 JE/ZIKA 对 3 周龄昆明鼠的 LD50 为 2.4 PFU(0.03 mL),见表 1 及表 2。

### 2.4 免疫原性分析

对皮下和腹腔接种嵌合病毒小鼠分别每周采血分离血清,皮下途径免疫的小鼠,中和抗体效价在免疫后第 6 周达到高峰,GMT 达到 109;腹腔免疫组,在免疫后两周达高峰,GMT 为 107,但以后迅速下降。所有样本 PRNT50 ≥ 10,阳转率为 100%。见图 4 及表 3。

### 2.5 嵌合病毒 JE/ZIKA 免疫对自身的免疫保护

稀释度为 10<sup>-6</sup>和 10<sup>-5</sup> PFU 量的嵌合病毒可以对小鼠产生 90%的脑内攻击保护,随着病毒量的降低,保护效力也随之降低,说明病毒颗粒量与小鼠免疫保护效力的产生存在正相关关系。见图 5。

表 1 嵌合病毒对 3 周龄小鼠的神经毒力和神经侵袭力检测结果

| 稀释倍数            | 死亡数/小鼠总数 |           |         |           |         |           |
|-----------------|----------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
|                 | 脑内注射     |           | 皮下注射    |           | 腹腔注射    |           |
|                 | JE/ZIKA  | SA14-14-2 | JE/ZIKA | SA14-14-2 | JE/ZIKA | SA14-14-2 |
| 原倍              | -        | -         | 0/6     | 0/6       | 0/6     | 0/6       |
| 10              | -        | -         | 0/6     | 0/6       | 0/6     | 0/6       |
| 10 <sup>2</sup> | 6/6      | -         | 0/6     | 0/6       | 0/6     | 0/6       |
| 10 <sup>3</sup> | 6/6      | 0/6       | 0/6     | 0/6       | 0/6     | 0/6       |
| 10 <sup>4</sup> | 5/6      | 0/6       | 0/6     | 0/6       | 0/6     | 0/6       |
| 10 <sup>5</sup> | 2/6      | 0/6       | 0/6     | 0/6       | 0/6     | 0/6       |
| 10 <sup>6</sup> | 0/6      | 0/6       | -       | -         | -       | -         |
| 10 <sup>7</sup> | 0/6      | 0/6       | -       | -         | -       | -         |
| 10 <sup>8</sup> | -        | 0/6       | -       | -         | -       | -         |

表中嵌合病毒 JE/ZIKA 的滴度为 2.2 × 10<sup>6</sup> PFU/mL,疫苗株 SA14-14-2 的滴度为 3.5 × 10<sup>6</sup> PFU/mL;“-”表示该稀释度病毒未进行毒力测定。

表 2 嵌合病毒对 3 周龄小鼠的神经毒力 LD50

| 病毒        | 神经毒力 LD50 (PFU)          | 体积 (mL) |
|-----------|--------------------------|---------|
| JE/ZIKA   | 2.4                      | 0.03    |
| SA14-14-2 | > 1.05 × 10 <sup>5</sup> | 0.03    |

“> 1.05 × 10<sup>5</sup>”表示该滴度病毒未造成半数小鼠死亡。

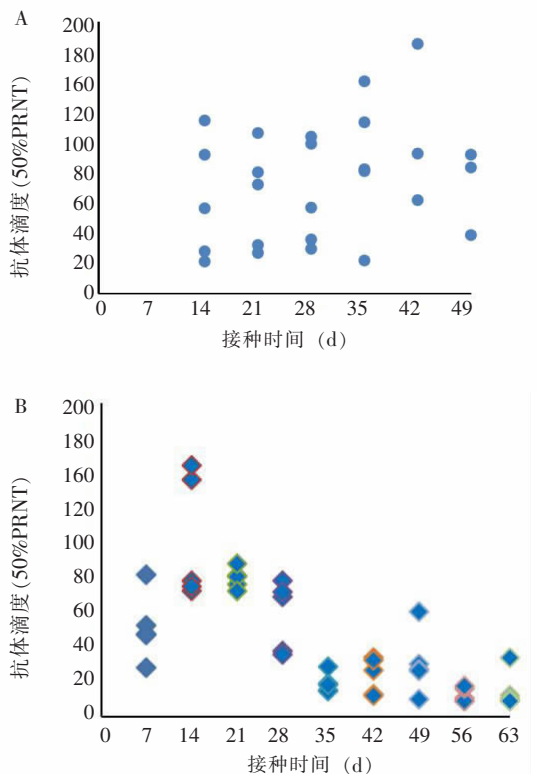


图 4 JE/ZIKA 在昆明鼠体内的免疫原性

A.皮下途径免疫小鼠获得的中和抗体效价;B.腹腔途径免疫小鼠获得的中和抗体效价。

表 3 嵌合病毒皮下、腹腔免疫后小鼠中和抗体产生情况

| 免疫后周数(周) | 皮下免疫 50% PRNT | 腹腔免疫 50% PRNT |
|----------|---------------|---------------|
|          | 平均几何均数(GMT)   | 平均几何均数(GMT)   |
| 1        | -             | 54            |
| 2        | 57            | 107           |
| 3        | 62            | 88            |
| 4        | 63            | 61            |
| 5        | 83            | 21            |
| 6        | 109           | 24            |
| 7        | 74            | 29            |
| 8        | -             | 13            |
| 9        | -             | 14            |

“-”表示未进行该时间点抗体检测。

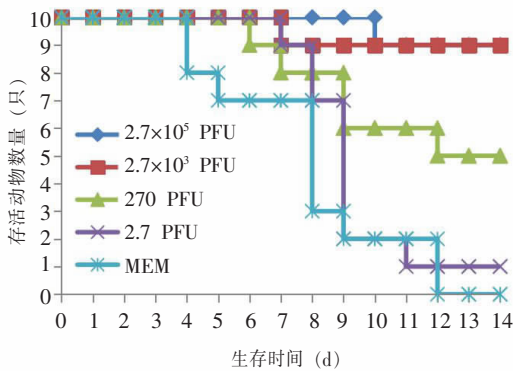


图 5 JE/ZIKA 对自身的免疫保护

分别使用原倍、10-1、10-3 和 10-5 倍稀释嵌合病毒免疫小鼠 14 d 后, 使用 100LD50 嵌合病毒 JE/ZIKA 进行颅内攻击, 不同实验组及对照组小鼠 14 d 的生存情况。

### 2.6 嵌合病毒接种对小鼠乙脑病毒脑炎的交叉保护作用

滴度为  $3.45 \times 10^6$  PFU/mL 的嵌合病毒 JE/ZIKA 免疫, 可对小鼠受致死量乙脑野毒株 SA14 的腹腔攻击产生 40% 保护率。见图 6。

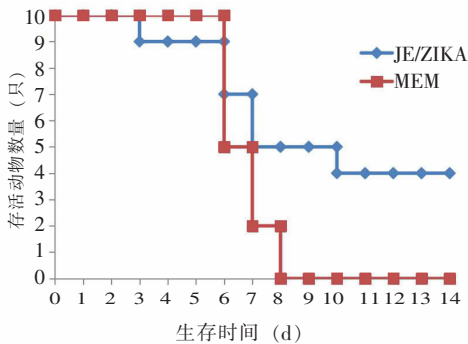


图 6 JE/ZIKA 免疫小鼠对乙脑野毒株 SA14 的免疫保护

分别用嵌合病毒 JE/ZIKA 和不含血清的 MEM 免疫小鼠 14 d 后, 使用 100LD50 乙脑野毒株 SA14 进行腹腔攻击, 实验组和对照组小鼠的生存情况。

### 3 讨论

本课题组前期采用反向遗传学技术用相应

ZIKV 标准株 MR766 序列替换了乙脑疫苗株 SA14-14-2 的 prM/E 序列, 构建并拯救获得稳定的嵌合病毒 JE/ZIKA, 进行初步毒力检测发现该重组嵌合病毒对昆明鼠有较强的脑内神经毒力<sup>[9]</sup>, 以此为基础, 本研究对嵌合病毒 JE/ZIKA 的安全性和有效性进行了进一步评价。在 BHK21 细胞中进行生物学特性检测, 发现相对于骨架乙脑疫苗株 SA14-14-2, 嵌合病毒 JE/ZIKA 表现出更小的噬斑, 为类似母本株 MR766 的小噬斑<sup>[10]</sup>, 说明 JE/ZIKA 可能具有较弱的细胞浸润能力, 其感染细胞后形成的噬斑形态主要由结构蛋白的特征决定。对比骨架株 SA14-14-2, 嵌合病毒生长曲线相对更平缓, 峰值出现较晚, 提示其具有较慢的复制效率。Yang 等<sup>[11]</sup> 研究结果显示, 嵌合病毒 JE/DENV2 在细胞中的复制效率明显低于两种母本株病毒, 由于不同黄病毒的蛋白结构及信号序列特点不同, 导致黄病毒的种间嵌合可能表现出比母本病毒更低的复制效率。随后本研究小组对嵌合病毒的神经侵袭力进行了评价, 发现 JE/ZIKA 皮下注射(辅脑内空刺)或腹腔途径接种小鼠均无发病, 说明该嵌合病毒皮下和腹腔神经侵袭力弱, 猜测可能与其母本病毒 MR766 神经侵袭力较弱有关<sup>[12]</sup>。进一步对该嵌合病毒进行免疫原性评估, 发现在使用 JE/ZIKA 免疫昆明鼠后第 1 周, 小鼠血清中即检测出具有保护效力的中和抗体, 抗体在单次免疫 7 周后保护效果依然可观, 由于课题组无 ZIKV 野毒株 MR766 及 ZIKV 其它野毒株, 该中和抗体效力仅针对嵌合病毒本身, 但依然可认为 JE/ZIKA 具有良好的免疫原性。该结果在昆明鼠体内实验中得到进一步证实, 中高浓度的病毒量能够保护 90% 的小鼠免受病毒的致死性攻击, 而随着免疫原病毒量降低, 其对小鼠的保护效力也随之下降, 说明病毒颗粒量与小鼠抗体产生存在一定范围内的剂量依赖性。

有研究<sup>[11, 13-14]</sup> 以 SA14-14-2 为骨架嵌合 DENV 不同血清型拯救的嵌合病毒在动物模型中均表现出良好的免疫原性, 而且同时具有良好的抗 JEV 和抗 DENV 感染免疫保护效果。为了检测嵌合病毒 JE/ZIKA 是否具有该特性, 使用 JE/ZIKA 免疫小鼠后, 用乙脑野毒株 SA14 进行腹腔攻击, 结果显示嵌合病毒 JE/ZIKA 可对 SA14 产生 40% 的保护效力。Li 等<sup>[15]</sup> 报道 JEV NS1 蛋白在抗病毒免疫中有重要作用, 因此推测可能是由于 JE/ZIKA 骨架区 SA14-14-2 的非结构蛋白 NS1 诱发了免疫保护力。ZIKV 与 JEV 同属黄病毒属, E 蛋白是关键的保护性抗原<sup>[16]</sup>, 不同黄病毒间 E 蛋白结构相似, 其中 ZIKV 的结构与 DENV 存在高度同源性, DENV2 序列与

ZIKV 一致性高达 54%<sup>[17]</sup>,有学者<sup>[18]</sup>报道,ZIKV 与其他黄病毒间存在较大的交叉反应,因此也不排除交叉反应的可能性。

Li 等<sup>[19]</sup>使用 ZIKV 亚洲分离株 FSS13025 的 prM/E 替换 SA14-14-2 中的相应区域,成功获得嵌合型 chinZIKV,该嵌合病毒与本研究所获嵌合病毒 JE/ZIKV 相比较,于埃及伊蚊体内未检测到传染性,在 Balb/c 小鼠体内神经毒力弱,同时免疫原性强,可以产生垂直保护。本实验选用的非洲标准株 MR766 神经毒力强<sup>[20]</sup>,这可能是导致嵌合病毒 JE/ZIKA 对小鼠脑内毒力强的主要原因之一,但对小鼠基本无神经侵袭力,具有良好的免疫原性。此外,ZIKA 动物模型及免疫策略的选择会对嵌合病毒的免疫原性和保护效力评价产生一定影响。本实验选用动物为清洁级昆明鼠,是神经系统损伤性疾病的重要造模动物,对神经细胞损伤易感,在脑内接种病毒后较 Balb/c 小鼠神经系统症状明显且发病率高,更适合用于 ZIKV 引起的中枢神经系统损伤机制研究,但昆明鼠并非 ZIKV 感染的敏感动物模型<sup>[21]</sup>。

综上所述,嵌合病毒 JE/ZIKA 具有良好的免疫原性,可作为潜在的疫苗候选株,但神经毒力较强,在后续实验中我们还将进一步尝试对该嵌合病毒进行位点改造以期降低其神经毒力,同时探索 JE/ZIKA 在 ZIKV 敏感动物模型中的免疫原性和安全性。

#### 参考文献

[1] Sirohi D, Chen Z, Sun L, *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus[J]. *Science*, 2016, 352(6284): 467–470.

[2] Song BH, Yun SI, Woolley M, *et al.* Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation[J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 308: 50–64.

[3] Mlakar J, Korva M, Tul N, *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(10): 951–958.

[4] Parra B, Lizarazo J, Jimenez-Arango J A, *et al.* Guillain-Barre Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(16): 1513–1523.

[5] Messina JP, Moritz UK, Brady OJ, *et al.* Mapping global environmental suitability for Zika virus[J]. *eLife Sciences*, 2016, 5: e15272.

[6] Poland GA, Kennedy RB, Ovsyannikova IG, *et al.* Development of vaccines against Zika virus[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2018, 18(7): e211–e219.

[7] Monath TP, Mccarthy K, Bedford P, *et al.* Clinical proof of principle for ChimeriVax?: Recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections[J]. *Vaccine*, 2002, 20(7–8): 1004–1018.

[8] Scott LJ. Tetravalent Dengue Vaccine: A Review in the Prevention of Dengue Disease[J]. *Drugs*, 2016, 76(13): 1301–1312.

[9] 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): 23–28.

[10] Konstantin A, Heather Kenney T, Chen R, *et al.* A Full-Length Infectious cDNA Clone of Zika Virus from the 2015 Epidemic in Brazil as a Genetic Platform for Studies of Virus-Host Interactions and Vaccine Development[J]. *Mbio*, 2016, 7(4): 1114–1116.

[11] Yang J, Yang HQ, Li ZS, *et al.* The chimeric Japanese encephalitis/Dengue 2 virus protects mice from challenge by both dengue virus and JEV virulent virus[J]. *Protein & cell*, 2017, 8(3): 225–229.

[12] Tsunoda I, Omura S, Sato F, *et al.* Neuropathogenesis of Zika Virus Infection: Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology[J]. *Acta Med Kinki Univ*, 2016, 41(2): 37–52.

[13] Li ZS, Yang HQ, Yang J, *et al.* Construction and preliminary investigation of a novel dengue serotype 4 chimeric virus using Japanese encephalitis vaccine strain SA14–14–2 as the backbone[J]. *Virus Research*, 2014, 191: 10–20.

[14] Yang H, Li Z, Lin H, *et al.* A novel dengue virus serotype 1 vaccine candidate based on Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as the backbone[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(6): 1517–1526.

[15] Li Y, Counor D, Lu P, *et al.* Protective immunity to Japanese encephalitis virus associated with anti-NS1 antibodies in a mouse model[J]. *Virol J*, 2012, 9(1): 135.

[16] Pierson TC, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering[J]. *Current opinion in virology*, 2013, 3(1): 3–12.

[17] Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, *et al.* Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(28): 7852–7857.

[18] Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gómez Wilmer E, Franco-Paredes C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas[J]. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2016, 14(3): 177–179.

[19] 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.

[20] Morrison TE, Diamond MS, Pierson TC. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(8): 9–17.

[21] Jianhai Y, Xuling L, Changwen K, *et al.* Effective Suckling C57BL/6, Kunming, and BALB/c Mouse Models with Remarkable Neurological Manifestation for Zika Virus Infection[J]. *Viruses*, 2017, 9(7): 165.

(收稿日期:2022–03–02

修回日期:2022–04–11)