

DOI:10.14188/j.ajsh.20250911001

一种对新冠病毒易感的全身性表达人源ACE2的小鼠模型

陈菲^{1,2},余唯艺²,鲜巧阳²,张贞²,周立^{1,2,3*},王勇^{2*}

(1. 武汉大学 泰康医学院(基础医学院)免疫学系,湖北,武汉 430072;

2. 武汉大学 生命科学学院高致病性病毒与生物安全全国重点实验室,动物实验中心/ABSL-III实验室,湖北 武汉 430072;

3. 武汉大学 中国南极测绘研究中心 极地环境监测与公共治理教育部重点实验室,湖北 武汉 430072)

摘要: 本研究介绍了一种新型小鼠模型——全身性表达hACE2-luciferase转基因小鼠。该模型通过广泛表达人源ACE2受体,对SARS-CoV-2表现出高度敏感性。感染SARS-CoV-2原始毒株后,小鼠在6天内表现出100%的死亡率,并呈现明显的感染症状。肺部检测到高病毒载量(SARS-CoV-2 E基因, $10^{10.59\pm 0.27}$ copies/g)和严重肺炎,伴有中性粒细胞浸润,同时NF- κ B、肿瘤坏死因子等炎症信号通路显著激活。经mRNA疫苗免疫后,小鼠的体重变化与对照组无统计学差异,组织病理学检测结果显示仅伴有轻微的免疫细胞浸润。肺部和脑部的病毒载量显著降低(感染第6天和第14天肺部E基因的表达量分别为 $10^{5.24\pm 0.26}$ copies/g和 $10^{5.32\pm 0.17}$ copies/g),且能够完全避免死亡。此外,SARS-CoV-2 Omicron BA.1毒株感染该小鼠后,体重急剧下降,10天内小鼠全部死亡,且在肺部呈现高病毒载量(SARS-CoV-2 E基因, $10^{8.25\pm 0.07}$ copies/g)与严重病理损伤。综上所述,该小鼠模型在感染后表现出体重快速下降、高死亡率以及严重的肺部病理变化,在评估新冠病毒的病理机制及疫苗和药物治疗干预方面具有重要应用价值,是一种对新冠病毒非常易感的全身性表达人源ACE2小鼠模型。

关键词: 新型冠状病毒;全身性表达hACE2小鼠;小鼠模型;疫苗评估

中图分类号: R373

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2025)06-0556-09

A systemic human ACE2-expressing mouse model susceptible to SARS-CoV-2

Chen Fei^{1,2}, Yu Weiyi², Xian Qiaoyang², Zhang Zhen², Zhou Li^{1,2,3*}, Wang Yong^{2*}

(1. Immunology Department, Taikang Medical School (School of Basic Medical Sciences), Wuhan University, Wuhan 430072,

Hubei, China; 2. The National Key Laboratory of High Pathogenicity Viruses and Biosafety, College of Life Sciences, Animal Biosafety Level-III Laboratory at Center for Animal Experiments, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China;

3. Key Laboratory of Polar Environment Monitoring and Public Governance, Ministry of Education, Chinese Antarctic Center of Surveying and Mapping, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei, China)

Abstract: This study introduces a novel mouse model—the systemic hACE2-luciferase transgenic mouse. This model, through the widespread expression of the human ACE2 receptor, exhibits high susceptibility to the original SARS-CoV-2 strain. Following infection with the original SARS-CoV-2 strain, the mice demonstrated a 100% mortality rate within 6 days and presented notable infection symptoms. High viral loads (SARS-CoV-2 E gene, $10^{10.59\pm 0.27}$ copies/g) and severe pneumonia with neutrophil infiltration were detected in the lungs, alongside significant activation of inflammatory signaling pathways such as NF- κ B and tumor necrosis factor. After immunization with the mRNA vaccine, there was no significant difference in body weight between the immunized mice and the control group. Histopathological examination revealed only mild immune cell infiltration. The viral load in the lungs and brains of the mice

收稿日期: 2025-09-11 修回日期: 2025-10-30 接受日期: 2025-12-10

作者简介: 陈菲(2001-),女,硕士生,研究方向:病毒感染与天然免疫,E-mail: feichen@whu.edu.cn

*通信作者: 周立(1983-),男,副教授,研究方向:呼吸道病毒感染与天然免疫,E-mail: zhouli_jerry@whu.edu.cn; 王勇(1968-),男,实验师,研究方向:感染性动物实验管理,E-mail: wangyong@whu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2604100);湖北省自然科学基金(2024AFB906)

引用格式: 陈菲,余唯艺,鲜巧阳,等. 一种对新冠病毒易感的全身性表达人源ACE2的小鼠模型[J]. 生物资源, 2025, 47(6): 556-564.

Chen Fei, Yu Weiyi, Xian Qiaoyang, et al. A systemic human ACE2-expressing mouse model susceptible to SARS-CoV-2 [J]. Biotic Resources, 2025, 47(6): 556-564.

was significantly reduced (the expression levels of the E gene in the lungs on days 6 and 14 post-infection were 105.24 ± 0.26 copies/g and 105.32 ± 0.17 copies/g, respectively), and complete avoidance of mortality was achieved. Furthermore, infection with the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant in this mouse model resulted in drastic body weight loss and was uniformly fatal within 10 days. The lungs exhibited high viral loads (SARS-CoV-2 E gene, 108.25 ± 0.07 copies/g) and severe pathological damage. In summary, this mouse model exhibited rapid weight loss, high mortality, and severe pulmonary pathological changes post-infection, demonstrating significant application value in assessing the pathological mechanisms of SARS-CoV-2 and the interventions of vaccines and therapeutic drugs. It represents a systemic human ACE2-expressing mouse model that is highly susceptible to SARS-CoV-2.

Key words: SARS-CoV-2; systemic human ACE2-expressing mouse; mouse model; vaccine evaluation

0 引言

截至2025年9月,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的全球大流行已造成逾710万例死亡病例,对人类社会造成了深远影响^[1]。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是COVID-19的致病源,其在传播过程中经历了显著的进化。从最初的原始毒株开始,病毒逐步演化出多个变异株,包括Alpha(B.1.1.7)、Beta(B.1.351)、Gamma(P.1)和Delta(B.1.617.2)等关键变异株,最终形成了以Omicron(B.1.1.529)及其亚型为主的全球流行态势^[2]。值得注意的是,病毒的致病力呈现渐进性减弱趋势:相较于早期高致病性毒株(如Delta导致的重症率与死亡率较高^[2]),Omicron亚系(包括XBB.1.5、EG.5、BA.2.86和JN.1)引起的临床症状明显减弱,高度突变的刺突蛋白(Spike,S)赋予其更强的免疫逃逸能力^[3-4],使病毒的传播效率持续增强。近期国内流行的新冠毒株主要为XDV系列变异株和JN.1系列变异株,其中XDV系列以XDV.1为主,JN.1系列则涵盖KP.2、LB.1、JN.1.18、KP.3等亚分支^[5]。这些毒株的生物学特性表现为上呼吸道组织向性强化与肺实质感染能力减弱,中国疾控中心数据显示2024年9月以来国内感染率上升,但新变异株的致病力未明显增强,重症率显著低于早期毒株。

新冠病毒通过血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体感染多个器官。除肺和肠道外,病毒还可能攻击心脏、肾脏、大脑和眼睛等器官^[6]。研究表明,新冠病毒能够在全身组织中传播和复制^[7]。尽管肺上皮细胞是新冠病毒的主要靶细胞(通过ACE2受体感染),但其靶细胞范围更为广泛。例如,免疫细胞(如巨噬细胞和T细胞等)虽缺乏ACE2受体,但可通过Toll样受体1(toll-like receptor 1, TLR1)识别SARS-CoV-2的结构蛋白E(envelope protein)和M(membrane protein),引发“顿挫感染”(病毒无法复制但能激活炎症反应, abortive infection)。在感染后期,病毒通过“顿

挫感染”选择性表达新冠病毒的非结构蛋白14(non-structural protein 14, Nsp14),导致炎症因子风暴^[8]。

然而,由于小鼠与人类在ACE2蛋白结构上的差异,小鼠ACE2与新冠病毒原始毒株S蛋白的结合能力较弱,普通小鼠对SARS-CoV-2相对不易感。这限制了小鼠模型在相关研究中的应用。为解决这一问题,研究者开发了多种人源ACE2(hACE2)转基因小鼠模型,具体见表1。其中,人细胞角蛋白18启动子(KRT18 promoter, K18启动子)驱动的人源ACE2转基因小鼠(hACE2同源重组敲入, B6/JGpt-H11^{em1Cin(K18-ACE2)}/Gpt, 简称K18-hACE2 KI mice; hACE2非同源重组, B6.Cg-Tg(K18-hACE2)2Prln/J, 简称K18-hACE2 Tg mice)应用最为广泛,但存在非生理性过表达hACE2缺陷,且其hACE2仅在上皮细胞(如呼吸道、肠道、脑等)中表达,在上呼吸道和心脏表达偏低^[9-10],不利于模拟Omicron毒株感染及开展“长新冠”致心血管疾病的研究肺纤毛上皮细胞HFH4启动子驱动的人源ACE2转基因小鼠(HFH4-hACE2 mice)适用于轻症及传播研究,但其hACE2仅在纤毛上皮特异表达,与人生理状态下ACE2表达存在明显差异^[11]。逆转录病毒插入位点26基因驱动的hACE2转基因小鼠(CAG-loxp-stop-loxp-hACE2-IRES-tdTomato敲入Rosa26基因位点的转基因小鼠模型,简称R26-hACE2-tdTomato mice)全身可诱导表达ACE2,但需他莫昔芬激活,在不同小鼠中的诱导效率可能存在差异^[12]。小鼠ACE2基因的第2个外显子替换的hACE2转基因小鼠(hACE2 knock-in mice)最能模拟人类生理状态,支持老龄化研究,但其ACE2生理分布以血管内皮、肾、胃肠为主,在肺中低表达^[13]。全身性组成型表达hACE2的转基因小鼠模型可系统性模拟SARS-CoV-2的多器官感染病理特征,其受体分布模式更接近人类生理状态下的病毒感染进程,但目前关于这种hACE2小鼠的研究和应用较少,目前无研究系统和详细介

绍这种小鼠的特性。

本研究采用全身表达型hACE2转基因小鼠模型(C57BL/6-Tgtn^{CAG-human ACE2-IRES-Luciferase-WPRE-polyA}Smoc小鼠,简称hACE2-Luciferase小鼠)。通过将hACE2基因与荧光素酶报告基因整合,利用广泛活性启动子CAG驱动,实现了hACE2在全身范围内的稳定表达,并可通过生物发光成像技术实时监测hACE2的表达水平和分布。研究表明,该小鼠的呼吸道和胃肠道组织广泛表达人源ACE2受体,使其易于感染SARS-CoV-2,并能模拟人类患者的临床特征。感染SARS-CoV-2的小鼠均表现出明显的新冠病毒肺炎临床症状,全身性组成型hACE2的高表达促进了病毒在肺组织中的高效复制^[14]。

1 材料和方法

1.1 道德声明

涉及传染性SARS-CoV-2的实验操作流程在武汉大学动物实验中心/动物生物安全三级实验室(ABSL-III实验室)进行,且已获得机构动物使用与管理委员会的批准(AUP# WP2020-0819、WP2021-0007、WP2022-0044)。所有样品均按照机构生物安全委员会批准的程序进行灭活,以确保从实验室取出后能安全处理。

1.2 病毒

SARS-CoV-2野生型(WT)毒株为临床分离毒株(国家病毒资源库保藏编号:IVCAS 6.7512)。

1.3 hACE2表达的检测

(1)活体成像测定:在进行小鼠实验之前,首先采用小动物活体成像技术验证hACE2的表达。实验过程中,通过腹腔注射方式将荧光底物导入小鼠体内,该底物可特异性激活荧光素酶报告基因并实

现标记功能。在此基础上,使用专业的小动物活体成像仪对小鼠进行系统扫描,通过实时监测并记录荧光素酶(luciferase)表达区域所释放的荧光信号,实现对hACE2表达位点的空间定位及其表达水平的定量评估,具体实验操作流程如下所述。

采用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)作为溶剂,将D-荧光素钠盐(D-luciferin)配制成浓度为15 mg/mL的母液,并通过充分振荡混匀确保溶液均匀性,D-luciferin购自翊圣生物(YEASEN Biotech)。为确保溶液无菌状态,采用0.2 μm孔径滤膜进行过滤处理。经配制完成的溶液可立即使用,或分装后置于-20℃环境避光储存,在此过程中避免多次冻融以维持溶液稳定性。实验过程中,采用腹腔注射方式向小鼠体内注入荧光素溶液,注射剂量为150 mg/kg。在完成注射操作后,需静置10~15 min,待光学信号强度达到峰值并进入稳定平台期后进行成像分析。

(2)蛋白质印迹法(Western blot):取小鼠肺组织,按1 mL PBS/100 mg组织的比例进行机械匀浆。取100 μL匀浆液,加入400 μL含1%蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解30 min,以获取全蛋白裂解液。随后,在裂解液中加入10%十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并转印至硝酸纤维素膜。用5%脱脂牛奶封闭膜1 h后,与hACE2一抗(义翘神州,10108-RP01)于4℃孵育4 h。经TBST洗涤3次后,再与相应的二抗孵育。使用Bio-Rad的ChemiDoc MP化学发光成像系统对蛋白条带进行显影与检测。

1.4 小鼠感染和样品处理

hACE2-luciferase小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司提供。本研究使用5~6周龄小鼠,

表1 已研究的hACE2转基因小鼠感染新冠病毒结果的比较

Table 1 Comparison of the results of hACE2-luciferase transgenic mice infected with the COVID-19 virus

小鼠类型	接种剂量	病毒毒株	感染结果
B6.Cg-Tg(K18-hACE2)2Prlmn/J, 8-9-week-old, male and female	2.5×10 ⁴ PFU	2019n-CoV/USA_WA1/2019 isolate	致死率100%,大部分动物在感染后第7天体重下降约25% ^[10]
B6/JGpt-H11 ^{em1Cin(K18-ACE2)} /Gpt, 12-18-week-old, male	2.5×10 ² PFU	SARS-CoV-2 WT	感染后第3天开始体重急剧下降,感染后7天死亡 ^[11]
HFH4-hACE2 8-10-week-old, male and female	3×10 ⁴ TCID50	SARS-CoV-2 (IVCAS 6.7512)	感染后第4天开始体重急剧下降,感染后仍有小鼠存活 ^[12]
R26-hACE2-tdT at adult stage	2×10 ⁴ PFU	SARS-CoV-2 Delta	感染后第4天肺部出现多种病理表型,并与新冠患者病理特征类似,包括肺泡壁增厚、纤维化沉积、免疫细胞浸润及血细胞渗漏等。这些病理特征在第14天时得到明显缓解 ^[13]
hACE2-KI/NIFDC 4-5&30-week-old, female	4×10 ⁵ PFU	SARS-CoV-2 Beta CoV/Wuhan/AMMS01/2020	老龄化的小鼠在第3天时体重减轻10%,后面逐渐恢复。年轻和老年小鼠均检测到间质性肺炎 ^[14]

实验分为3组:阴性对照组(6只)、攻毒组(9只)和疫苗组(12只)。疫苗组小鼠在正式攻毒前第35天和第14天分别进行1次肌肉注射,接种一种基于mRNA-1273^[10,15]配方的mRNA疫苗(1 μg/只)。阴性对照组和攻毒组小鼠接种同体积的PBS。以末次免疫后14天作为攻毒第0天,使用异氟烷麻醉小鼠,通过滴鼻方式接种 2.5×10^2 PFU的SARS-CoV-2病毒。攻毒组小鼠同样使用异氟烷麻醉后,以相同剂量和方式接种病毒。对照组小鼠接种等体积基础培养基。实验期间每日监测小鼠的体重变化、临床症状及生存情况。当小鼠体重降至初始体重的80%时实施安乐死。攻毒组3只小鼠在感染后第3天统一取样,剩余小鼠则根据实际死亡时间收集肺和脑组织样本并称重;将疫苗组小鼠在第6天(攻毒组小鼠全部死亡时)和第14天实施安乐死,对照组小鼠在第14天实施安乐死,均收集肺和脑组织并称重。

同时使用5~6周龄小鼠进行新冠病毒Omicron BA.1毒株的感染实验,实验分为两组:阴性对照组(4只)、攻毒组(16只)。使用异氟烷麻醉小鼠,通过滴鼻方式接种 1×10^3 PFU的SARS-CoV-2 Omicron BA.1毒株。对照组小鼠接种等体积DMEM。实验期间每日监测小鼠的体重变化、临床症状及生存情况。当小鼠体重降至初始体重的80%时实施安乐死。攻毒组小鼠在感染的第3、6、9天分别处死($n=4$),收集肺和脑组织样本并称重,攻毒组剩余小鼠($n=4$)均都在第10天死亡或者达到安乐死标准,收集肺和脑组织样本并称重。

以上收集的的组织样本在PBS中匀浆后,5 000 rpm离心5 min,取上清液分装并保存于一80℃。对所有解剖动物、临终动物及死亡动物的左肺组织进行固定保存,并进行病理学检查。

1.5 病毒载量

取肺和脑组织的PBS匀浆液上清200 μL,加入3倍样本体积的Trizol LS,充分混匀后,按照Trizol LS说明书进行RNA提取。提取得到30 μL RNA后,取5 μL作为模板进行逆转录,获得40 μL cDNA。随后,取5 μL cDNA,采用基于荧光探针的qPCR方法对病毒进行定量检测。qPCR检测使用

新冠病毒E基因的引物序列见表2。后续检测体系及程序根据所选qPCR试剂盒说明书进行。采用标准曲线外标法计算样本中的病毒载量。

1.6 组织病理学分析

分离完整的左肺叶(1叶)并将其置于15 mL离心管内的甲醛固定液中充分浸润。样本固定7 d并完成生物安全处理后进行后续的固定、脱水、包埋、切片及染色等系列处理流程(由武汉赛维尔生物科技有限公司完成)。具体而言,固定后的肺组织经过修整取材后,依次通过梯度酒精脱水处理,随后进行石蜡包埋和切片(厚度约3 μm),最后采用苏木精-伊红染色法进行染色处理。在光学显微镜下,首先采用低倍镜观察左肺组织的整体病理变化,包括炎症细胞浸润、组织水肿及结构性损伤的分布特征;随后切换至高倍镜观察,重点评估肺泡结构的完整性并对肺组织损伤程度进行量化评分。

评分方法为选取6个视野观察出血及水肿情况,按下述标准进行系统性评分。0分:无损伤;1分:<25%的损伤面积(轻度损伤);2分:25%~50%的损伤面积(中度损伤);3分:50%~75%的损伤面积(中重度损伤);4分:>75%的损伤面积(重度损伤)。

1.7 统计分析

本研究采用均值±标准差(SD)或均值±标准误差(SEM)的形式呈现实验数据,所有统计分析均通过GraphPad Prism 8软件完成。为评估组间差异的统计学意义,采用学生t检验以及单因素/双因素方差分析,并辅以Tukey多重比较检验进行后续分析。统计学显著性判定标准如下:*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$ 。为确保研究结论的可靠性与可重复性,每个实验条件均设置不少于3次独立重复实验。

2 结果

2.1 全身性组成型表达hACE2小鼠的构建思路与表达验证

本研究采用广泛表达启动子CAG驱动hACE2基因的表达,并在hACE2基因下游通过内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)连接

表2 新冠病毒载量检测使用的探针引物序列

Table 2 Sequences of probes and primers used for SARS-CoV-2 viral load detection

引物	方向	序列
SARS-CoV-2 E	正向引物(F)	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'
	反向引物(R)	5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'
	探针(Probe)	5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-3'-BHQ1

Luciferase 基因,构建了全身性组成型表达 hACE2 小鼠模型。其构建表达盒示意图如图 1(a)所示。通过小动物活体成像技术对注射荧光底物的小鼠进行检测,结果显示小鼠的胸部、腹部、足部、尾部等多个部位均呈现出显著的荧光信号,证实了 hACE2 基因在小鼠全身范围内广泛表达,如图 1(b)所示。通过蛋白质印迹法对小鼠组织样本进行检测,发现 hACE2 蛋白在小鼠心、肝、肺、肾、脾和胃等多个器官中均有表达,表明其在小鼠体内的表达谱系较为广泛,如图 1(c)所示。

2.2 全身表达 hACE2 小鼠在新冠病毒原始毒株感染后 6 天内全部死亡

结果显示(图 2),整个免疫阶段,所有小鼠(包括对照组、攻毒组和疫苗组)的体重均呈上升趋势,并在第 3~5 周保持稳定,组间无显著差异,如图 2(b)所示。对照组小鼠(未接种疫苗)在感染阶段(未感染病毒),其体重保持稳定并略有上升。然而,从感染新冠病毒第 2 天起,攻毒组小鼠体重开始下降,且随着感染时间的延长,下降趋势愈加明显,如图 2(c)所示。攻毒组小鼠在感染第 5 天开始出现死亡,并于第 6 天全部死亡。相比之下,疫苗组小鼠体重变化与对照组相似,其体重仍然保持稳定并略有上升,且所有小鼠均存活,表明该 mRNA 疫苗对新冠病毒感染具有显著的保护作用。

2.3 SARS-CoV-2 感染后小鼠肺和脑部表现出较高的病毒载量

为了评估疫苗的保护效果,从小鼠右肺组织中提取 RNA,检测新冠病毒 E 基因的表达水平。结果显示,阴性对照组(未感染新冠病毒)右肺的病毒载量为阴性;攻毒组小鼠在感染第 3 天右肺 E 基因病

毒载量的平均值为 $10^{8.77}$ copies/g,在感染第 6 天为 $10^{10.59}$ copies/g。在感染后第 6 天和第 14 天,疫苗组小鼠右肺 E 基因病毒载量的平均值分别为 $10^{5.24}$ copies/g 和 $10^{5.32}$ copies/g,显著低于攻毒组,如图 2(e)所示。攻毒组小鼠在感染第 3 天脑 E 基因病毒载量的平均值为 $10^{8.77}$ copies/g,在感染第 6 天为 $10^{6.98}$ copies/g,如图 2(f)所示。与攻毒组相比,疫苗组小鼠脑部病毒载量显著降低(图 2(f)),感染后第 6 天和第 14 天的平均病毒载量(E 基因)分别为 $10^{4.14}$ copies/g 和 $10^{3.94}$ copies/g。这些结果表明, mRNA 疫苗对全身性表达 hACE2 的小鼠具有显著的保护作用。

2.4 病毒原始毒株感染后,小鼠出现严重肺炎

攻毒组小鼠在新冠病毒原始毒株感染 6 天内全部死亡,对其剖检后检查发现肺部明显充血。因感染后第 6 天,攻毒组全部死亡,将疫苗组一半的小鼠执行安乐死,取材后大体检查未发现明显肺部病变。感染后第 14 天,将阴性对照组和疫苗组剩余的小鼠全部执行安乐死,取材后大体检查也未发现明显肺部病变。阴性对照组小鼠的肺部苏木精-尹红染色法(H&E)染色结果显示,肺组织无炎症细胞浸润、水肿、渗出、肺泡壁断裂及肺大泡融合现象,病理评分为 0 分。感染新冠病毒的攻毒组小鼠肺部损伤明显:大体检查发现肺部充血,有明显肺部病变;组织病理学主要表现为严重的肺泡中性粒细胞及红细胞渗出,显著的炎症细胞浸润、水肿、渗出、肺泡壁断裂及肺大泡融合现象,病理评分为 4 分。相对于攻毒组小鼠,新冠病毒感染第 6 天,疫苗组小鼠的肺部损伤较轻,组织病理学主要表现为局部肺泡中性粒细胞及红细胞渗

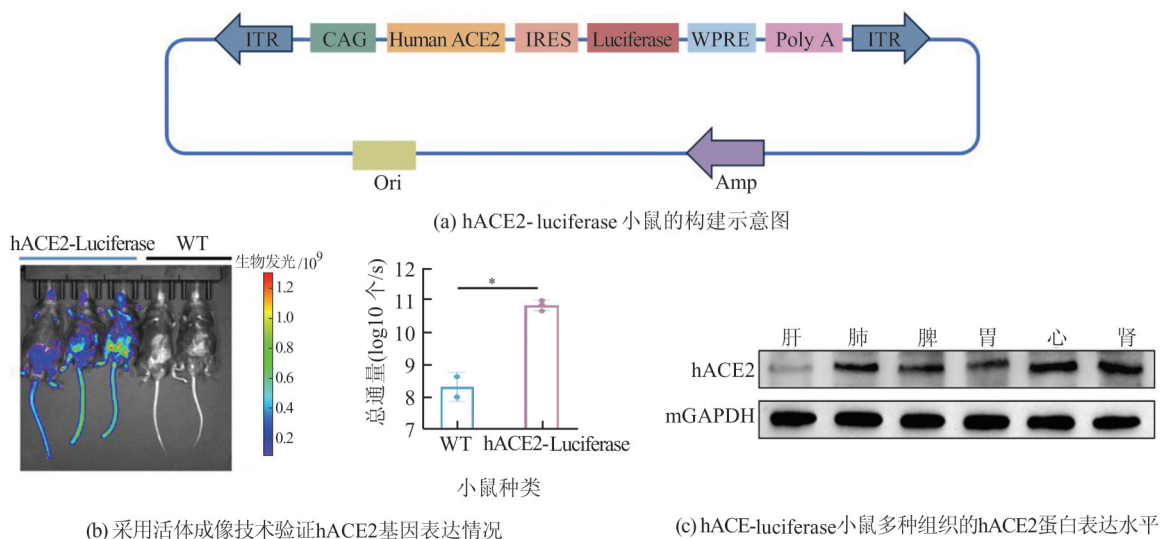


图 1 全身表达 hACE2 小鼠的构建思路和全身表达情况的验证

Figure 1 Construction of systemic hACE2-expressing mice and validation of systemic expression

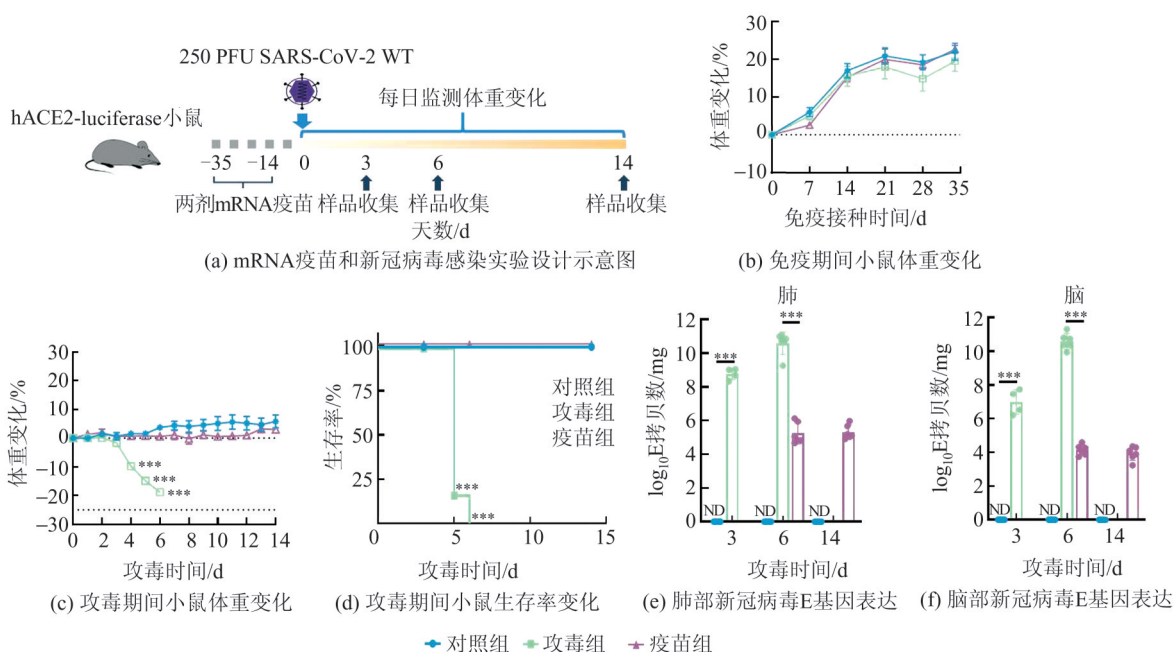


图2 全身表达hACE2-luciferase小鼠用于新冠病毒疫苗免疫和新冠病毒原始毒株感染的情况

Figure 2 Use of systemic hACE2-luciferase expressing mice for COVID-19 vaccine immunization and infection with the wild-type SARS-CoV-2 strain

注:ND(not detected)表示未检测到。数据分析使用了单因素方差分析和双因素方差分析,并进行Tukey多重比较检验。ns,不显著; $P>0.05$;*, $P<0.05$ **, $P<0.01$ ***, $P<0.001$ ****, $P<0.0001$, $n=6$ 。

Note:ND(not detected) means not detected. Data analysis was performed using one-way ANOVA and two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. ns, not significant; $P>0.05$ *, $P<0.05$ **, $P<0.01$ ***, $P<0.001$ ****, $P<0.0001$, $n=6$.

出,伴有轻微的炎症细胞浸润、水肿和渗出现象,其病理评分为2分。新冠病毒感染第14天,疫苗免疫的小鼠肺部损伤较第6天明显减轻,但仍有损伤,其病理评分为1分,如图3所示。

2.5 SARS-CoV-2感染严重激活全身表达hACE2小鼠肺部炎症相关信号通路和细胞因子的表达

通过对攻毒组和对照组小鼠的肺组织进行转录

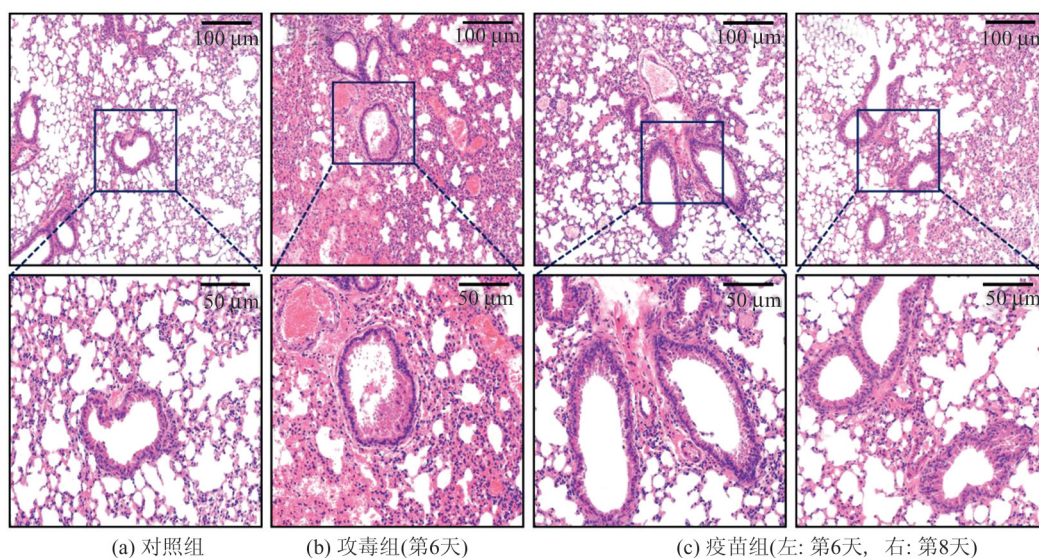


图3 对照组、攻毒组及疫苗组肺部石蜡组织切片H&E染色

Figure 3 Hematoxylin and eosin (H&E) staining of lung paraffin sections from control, infected, and vaccinated mice

组测序(RNA-seq)分析发现,感染原始毒株后,攻毒组小鼠的天然免疫相关信号通路显著激活(图4)。其中,Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)、NF-κB信号通路(NF-κB signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路(TNF signaling pathway)和白细胞跨内皮迁移(leukocyte transendothelial migration)等关键通路均表现出明显激活。这表明病毒感染后,小鼠的免疫系统迅速响应,天然免疫通路的激活促进了免疫细胞的调动和局部免疫反应的加强。为进一步研究 SARS-CoV-2 感染诱导的局部炎症反应,研究团队比较了攻毒组和对照组小鼠肺部典型细胞因子的表达水平。结果显示,与炎症相关的细胞因子和趋化因子如 *tnfa*、*il-6*、*cxcl10*、*ccl2* 和 *cc15* 的 mRNA 水平在攻毒组小鼠中显著上调。这些因子的增加有效促进了免疫细胞的迁移和招募,从而增强了小鼠的抗病毒免疫反应。

2.6 SARS-CoV-2 Omicron 感染全身表达 hACE2 小鼠在 10 天内全部死亡

SARS-CoV-2 Omicron 变异株感染全身表达 hACE2 小鼠的实验结果显示,从感染后第 5 天起,攻毒组小鼠的体重开始显著下降,且随时间推移下降趋势愈发明显,如图 5 所示。相比之下,对照组(未感染 Omicron 毒株)小鼠的体重保持稳定,并呈轻微上升趋势。攻毒组小鼠在感染后 10 d 内全部死亡或达到安乐死标准,提示 Omicron 感染在该模型中引发了急剧且严重的疾病进程。感染期间,攻毒组小鼠的病毒载量持续上升,至第 10 天时肺部病毒载量(基于新冠病毒 E 基因检测)达到 $10^{8.25}$ copies/g。

组织病理学分析显示,对照组小鼠肺组织 H&E 染色未见异常,病理评分为 0 分。攻毒组小鼠在感染第 3 天出现轻度肺部充血,病理评分为 1 分;从第 6 天起,肺部病变显著加重,表现为广泛充血、大量中性粒细胞和红细胞渗出,肺泡壁断裂、相邻肺泡融合扩张,并伴有显著炎症细胞浸润,病理评分升至 4 分。这些结果表明, Omicron 感染在该小鼠模型中引起了强烈的肺部炎症与免疫反应。

3 讨论和结论

动物模型是研究 COVID-19 病原学与治疗学的关键工具。本研究构建了全身性组成型 hACE2-luciferase 转基因小鼠品系。该品系通过 CAG 启动子广泛表达人源 ACE2 基因,并在 hACE2 下游通过 IRES 序列连接报告基因荧光素酶,实现了单拷贝 hACE2 基因的整合,为研究者提供了一种非侵入性的监测手段,能够实时追踪 hACE2 的动态变化。活体生物发光成像结果显示, hACE2 在肺、脑、肠及肾脏等多个器官中广泛分布,符合全身性受体分布特征。

该小鼠模型在感染 SARS-CoV-2 原始毒株后,体重显著减轻,肺部和脑部病毒载量较高,且感染后 6 天内死亡率达到 100%。病毒感染引发了严重的肺炎,导致肺组织结构异常,具体表现为肺泡壁增厚和破裂,并伴随以中性粒细胞和单核细胞为主的多样化细胞浸润以及红细胞渗出。RNA-seq 分析表明, SARS-CoV-2 感染后,小鼠肺部的天然免疫和炎症信号通路被过度激活。这些结果表明,该小鼠模型在感染新冠原始毒株后,炎症反应强烈,导致其

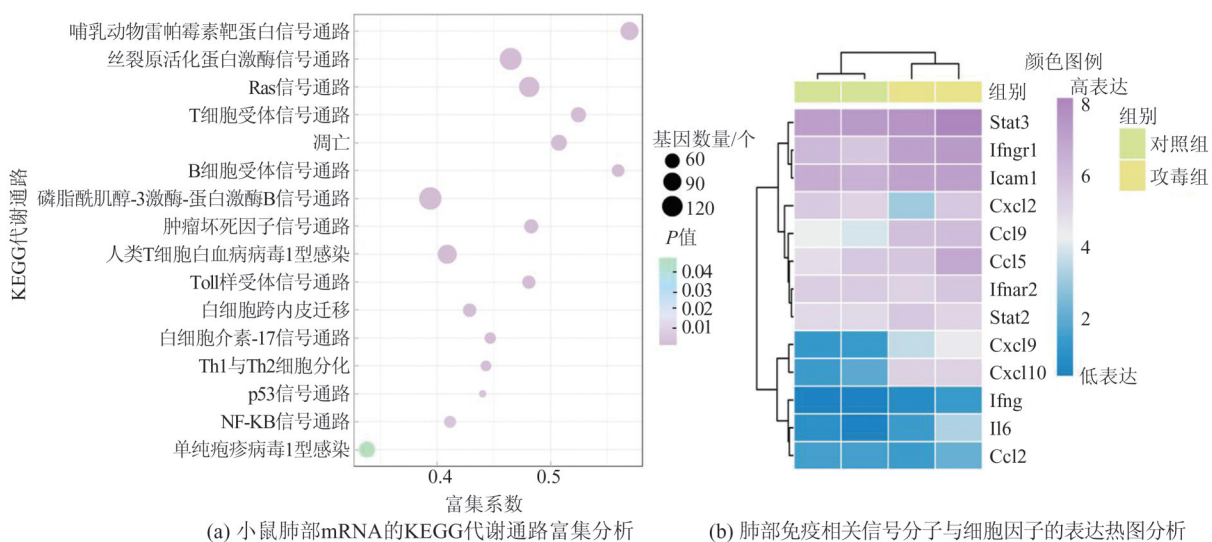


图4 全身表达 hACE2-luciferase 小鼠感染新冠病毒原始毒株后肺部 RNA-seq 分析

Figure 4 Lung RNA-seq analysis of systemic hACE2-luciferase expressing mice infected with the wild-type SARS-CoV-2 strain

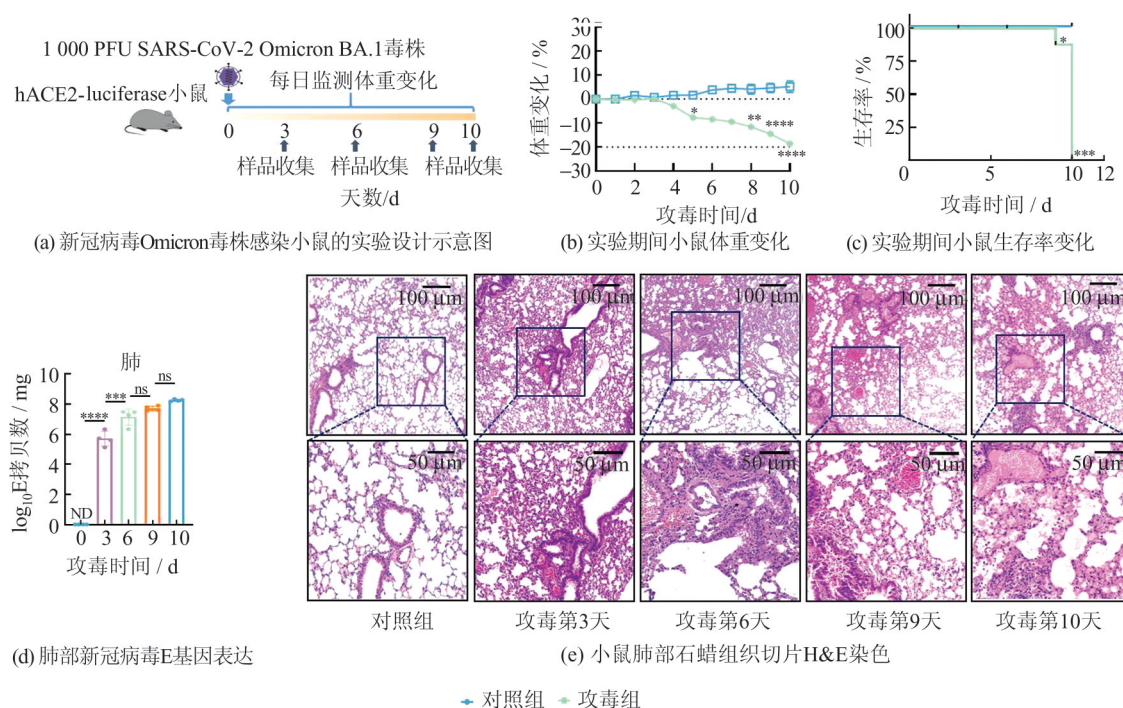


图5 全身表达hACE2-luciferase小鼠用于新冠病毒疫苗免疫和新冠奥密克戎毒株感染的情况

Figure 5 Use of systemic hACE2-luciferase expressing mice for COVID-19 vaccine immunization and infection with the SARS-CoV-2 Omicron strain

注:ND表示未检测到。数据分析使用了单因素方差分析和双因素方差分析,并进行Tukey多重比较检验。ns,不显著, $P > 0.05$;*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$, $n = 6$ 。

Note: ND means not detected. Data analysis was performed using one-way ANOVA and two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test. ns, not significant, $P > 0.05$;*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$;***, $P < 0.001$;****, $P < 0.0001$, $n = 6$.

迅速死亡。该模型可被视为对新冠病毒高度敏感的动物模型。

在提前接受mRNA疫苗免疫后,小鼠肺部损伤程度显著减轻。其他课题组研究表明,当用SARS-CoV-2感染该小鼠模型时,分别给予EK1肽、EK1C4(两种基于OC43冠状病毒HR2区域设计的抗病毒肽)和HLX71(一种中和抗体,属于VH3-30/VK1-39抗体家族衍生物,可与新冠病毒的受体结合域结合)治疗,能显著降低小鼠组织的病毒载量,并挽救小鼠生命^[14,16]。该小鼠模型在疫苗评价中具有显著优势,也适用于评估上述抗病毒肽和抗体在抵抗新冠病毒感染方面的效果,展示了良好的药用评价价值。然而,这些研究中所使用的SARS-CoV-2病毒剂量较高,可能会降低治疗的敏感性,在评估药物时可能会影响其效能范围。建议运用较低(例如250 PFU)剂量的病毒构建小鼠感染模型。

随着新冠病毒的变异,Omicron毒株已取代原始毒株成为主流^[17]。该毒株具有传染性强、致病力弱的特点^[18],尽管特殊人群在感染后仍可能出现重症。Omicron的生物学特性演化对动物模型提出了

新的需求。研究表明,SARS-CoV-2的持续进化推动了mRNA疫苗诱导的体液免疫逃逸^[3]。在几种常见的新冠感染小鼠模型中,相较于原始毒株及Delta等早期变异株,Omicron在小鼠上呼吸道和下呼吸道的病毒载量均明显降低,其肺部病理损伤程度显著减轻。与原始毒株及Alpha、Beta、Delta突变株相比,Omicron感染引起的体重减轻和致死率均显著下降^[19]。张贞等^[10]的研究表明,在K18 hACE2 KI小鼠中,相同剂量(250 PFU)的Omicron BA.2毒株感染后,其致死率下降,感染后12天的死亡率仅为40%。此外,Omicron引起的肺部炎症反应较弱,这使得针对Omicron毒株感染的疫苗和药物的保护效力差异难以评价。基于上述背景,需要思考,全身性表达hACE2-luciferase小鼠模型对新冠病毒的超高敏感性是否可转化为对Omicron毒株研究的独特优势。为此,本研究用新冠Omicron BA.1毒株感染小鼠,结果显示,感染第5天开始小鼠体重急剧下降,感染10 d内小鼠的死亡率为100%,肺部呈现出较高病毒载量。猜测Omicron在肺组织中的低复制力可能被全身高表达的hACE2所补偿,从而重建显著

的肺损伤表型。全身性表达 hACE2 小鼠模型有望成为适用于 Omicron 等冠状病毒疫苗与药物评价的高敏感性全身模型,解决当前领域因病理轻微导致的效力误判问题。后续实验将通过感染动力学、组织病理学量化及治疗干预研究,验证该小鼠对 Omicron 毒株感染后疫苗与药物评价的情况。

参考文献

- [1] World Health Organization. Number of COVID-19 deaths reported to WHO [EB/OL]. (2025-09-10) [2025-10-3]. [https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths? n=c](https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c).
- [2] Nyberg T, Ferguson N M, Nash S G, et al. Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 Omicron (B. 1.1.529) and Delta (B. 1.617.2) variants in England: a cohort study [J]. *The Lancet*, 2022, 399 (10332) : 1303-1312.
- [3] Roederer A L, Cao Y, St Denis K, et al. Ongoing evolution of SARS-CoV-2 drives escape from mRNA vaccine-induced humoral immunity [J]. *medRxiv*, 2024. DOI:10.1101/2024.03.05.24303815.
- [4] Qu P K, Evans J P, Kurhade C, et al. Determinants and mechanisms of the low fusogenicity and high dependence on endosomal entry of Omicron subvariants [J]. *mBio*, 2023, 14(1) : e03176-22.
- [5] Uriu K, Okumura K, Uwamino Y, et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 NB. 1.8.1 variant [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2025, 25 (8) : e443.
- [6] Liu J, Li Y F, Liu Q, et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection [J]. *Cell Discovery*, 2021, 7: 17.
- [7] Stein S R, Ramelli S C, Grazioli A, et al. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and Brain at autopsy [J]. *Nature*, 2022, 612 (7941) : 758-763.
- [8] Duan T H, Xing C S, Chu J J, et al. ACE2-dependent and -independent SARS-CoV-2 entries dictate viral replication and inflammatory response during infection [J]. *Nature Cell Biology*, 2024, 26(4) : 628-644.
- [9] Winkler E S, Bailey A L, Kafai N M, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function [J]. *Nature Immunology*, 2020, 21(11) : 1327-1335.
- [10] Zhang Z, Zhou L, Liu Q Y, et al. The lethal K18-hACE2 knock-in mouse model mimicking the severe pneumonia of COVID-19 is practicable for antiviral development [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13(1) : 2353302.
- [11] Jiang R D, Liu M Q, 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. e8.
- [12] Liu K, Tang M X, Xu W, et al. An inducible hACE2 transgenic mouse model recapitulates SARS-CoV-2 infection and pathogenesis *in vivo* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(25) : e2207210120.
- [13] Sun S H, Chen Q, Gu H J, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1) : 124-133. e4.
- [14] Xia S, Lan Q S, Zhu Y, et al. Structural and functional basis for Pan-CoV fusion inhibitors against SARS-CoV-2 and its variants with preclinical evaluation [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1) : 288.
- [15] Corbett K S, Edwards D K, Leist S R, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness [J]. *Nature*, 2020, 586(7830) : 567-571.
- [16] Liu J L, Chen Q, Yang S M, et al. hACE2 Fc-neutralization antibody cocktail provides synergistic protection against SARS-CoV-2 and its spike RBD variants [J]. *Cell Discovery*, 2021, 7: 54.
- [17] Wang X, Jiang S J, Ma W T, et al. Robust neutralization of SARS-CoV-2 variants including JN. 1 and BA. 2.87.1 by trivalent XBB vaccine-induced antibodies [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9: 123.
- [18] Markov P V, Katzourakis A, Stilianakis N I. Antigenic evolution will lead to new SARS-CoV-2 variants with unpredictable severity [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(5) : 251-252.
- [19] Shuai H P, Chan J F, Hu B J, et al. Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B. 1.1.529 Omicron [J]. *Nature*, 2022, 603(7902) : 693-699.