·综述·

人诺如病毒培养模型研究进展

于晴川[1,2,3,4],温才敏[1,5],刘　艳[1,2,3,4],高向东[5],胡忠玉[1,2,3,4]

(1 中国食品药品检定研究院,北京 102629; 2 药品监管科学全国重点实验室,北京 102629; 3 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京 102629; 4 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室,北京 102629; 5 中国药科大学,南京 211100)

[摘要] 诺如病毒是引发病毒性腹泻的主要病原体之一。由于缺少理想的体外细胞培养模型和动物模型,人诺如病毒(human norovirus,HuNoV)感染和复制机制、免疫应答、抗病毒药物筛选和疫苗评价等方面的研究均受到了一定阻碍。本文回顾了2003—2025年的相关研究,探讨细胞培养模型和动物模型这2类模型的可行性和优缺点。细胞模型方面,大部分传代细胞系无法支持HuNoV复制,在肠道类器官上培养成功但操作复杂且可能受限于伦理问题。近年来建立的人唾液腺细胞系可稳定支持HuNoV复制,成本低、易操作,成为重要替代体系。在动物模型方面,高昂的试验费用和与自然感染差之甚远的免疫反应限制了动物模型的推广使用。通过本文中对各培养模型的归纳和讨论,期望通过总结前人的研究成果,为改良现有培养模型及探索新培养模型提供方向。

[关键词] 人诺如病毒;细胞模型;动物模型;人肠道类器官;人唾液腺细胞系

[中图分类号] R972.6　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2026)15-1592-13

Research progress on human norovirus cultivation model

YU Qing-chuan[1,2,3,4], WEN Cai-min[1,5], LIU Yan[1,2,3,4], GAO Xiang-dong[5], HU Zhong-yu[1,2,3,4]

(1 *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*; 2 *State Key Laboratory of Drug Regulatory Science*, *Beijing* 102629, *China*; 3 *NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products Beijing* 102629, *China*; 4 *NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products*, *Beijing* 102629, *China*; 5 *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211100, *China*)

[**Abstract**] Norovirus is one of the main pathogens causing viral diarrhea. Due to the lack of ideal *in vitro* cell culture models and animal models, research on the mechanisms of human norovirus (HuNoV) infection and replication, immune response, antiviral drug screening, and vaccine evaluation had been hindered. This review covers studies from 2003 to 2025, examining the feasibility, advantages, and limitations of both cell culture models and animal models. For cell models, most immortalized cell lines fail to support HuNoV replication; while intestinal organoids have successfully supported virus culture, the procedure is complex and may face ethical constraints.

[基金项目] 药品监管科学全国重点实验室课题:基于类器官技术诺如疫苗有效性和破伤风疫苗安全性质量评价新技术研究(2026SKLDRS03091)

[作者简介] 于晴川,男,研究方向:轮状病毒和诺如病毒感染机制及疫苗质量评价研究。E-mail:yqc@nifdc.org.cn。共同第一作者:温才敏,女,硕士研究生,研究方向:诺如疫苗质量控制检测方法。E-mail:wencaimin88@163.com。

[通讯作者] *高向东,女,研究方向:生物新药研制、生物大分子结构与功能研究和衰老的分子生物学研究。E-mail:xdgao@cpu.edu.cn。*胡忠玉,女,研究方向:肝炎和肠道病毒疫苗、新型冠状病毒疫苗、新型佐剂质量控制与评价技术、方法及其标准化研究。E-mail:huzhy@nifdc.org.cn。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.15.004

Human salivary gland cell lines, established in recent years, can stably support HuNoV replication and are low-cost, easy to operate, thus serving as an important alternative system. For animal models, high costs and immune responses that differ markedly from natural infections have limited their widespread use. By the summarizing and discussing these culture models, this review aims to consolidate previous findings and offer directions for improving existing models and developing new ones.

[**Key words**] human norovirus; cell models; animal models; human intestinal enteroids; human salivary gland cell lines

诺如病毒(norovirus)属于杯状病毒科诺如病毒属。根据 VP1 氨基酸序列,可将诺如病毒分为 10 个基因组(GI-GX),49 个基因型[1-2]。根据 ORF 1 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)区域的核苷酸多样性,可至少分为 60 个 P 型[2]。在这些基因组里,GI 和 GII 组以感染人类为主,也被称为人诺如病毒(human norovirus,HuNoV),见图 1。

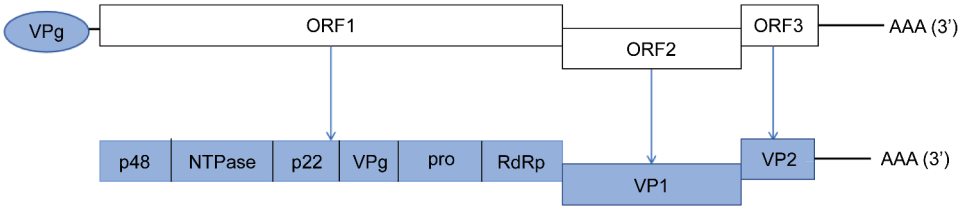


图 1 HuNoV 基因组结构

诺如病毒具有高度传染性,各年龄段人群均易感,尤其在儿童和老年人中发病率较高。流行病学研究显示,疫情多发生在秋冬季,暴发地点多为学校、养老院等人群密集的地方,传播途径为粪口传播。HuNoV 感染剂量低(18 ~ 2 800 个病毒粒子)且易变异,变异株能逃避人体免疫系统的攻击,导致周期性暴发[3]。GII 组是引起急性胃肠炎暴发的主要基因组。其中,*GII*.4 型因其高度变异性和传染性,一直是全球范围内引起疫情的主要基因型[4-5]。此外,*GII*.2 型在 2016—2018 年也曾是我国疫情的主要基因型。*GII*.17 型自 2014—2015 年冬季在亚洲地区引起暴发,并在我国的广东省和江苏省等地成为主要流行株[6-9]。

HuNoV 目前尚无特效治疗方法,疫苗可能是有效的预防手段。如今已有部分疫苗进入临床试验阶段,包括病毒样颗粒(virus-like particle,VLP)疫苗、腺病毒载体疫苗和 mRNA 疫苗等。Hillevax 的 GI.1/GII.4 双价 VLP 肌内注射疫苗(HIL-214)的Ⅰ期和Ⅱ期临床试验表明,肌内注射后 7 d 可诱导高滴度人组织血型抗原(histo-blood group antigens,HBGA)阻断抗体,单剂效果显著,无需第二剂强化,在 6 个月 ~85 岁人群中,无疫苗相关严重不良事件[10-13]。腺病毒载体疫苗常温稳定,可口服接种,Vaxart 公司开发的口服 5 型腺病毒载体疫苗最初为 GI.1 单价疫苗(VXA-GI.1-NN),临床结果表明该疫苗具有良好的安全性和耐受性,可诱导肠道黏膜免疫,Vaxart 公司目前正在进行 GI.1 和 GII.4 双价疫苗的临床试验[14]。Moderna 公司研发的 2 种 mRNA 疫苗,mRNA-1403 已经进入Ⅲ期临床试验阶段[15],mRNA-1403 和 mRNA1405 疫苗联合正在进行Ⅰ期和Ⅱ期的临床试验(ClinicalTrials.gov ID NCT05992935)。

因缺乏合适的细胞培养系统,疫苗研发平台受限且无法建立中和试验方法,疫苗效力评价方法主要依赖于体外阻断抗体检测(blocking titer 50% method,BT50 法)。BT50 法基于酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,Elisa)原理(见图 2A),用包被的 HBGA 检测诺如病毒抗原与抗血清反应后的混合物,通过竞争性抑制间接检测血清中阻断抗体。

HBGA 现在普遍被认为是 HuNoV 的主要受体,其常见型别有 A、B、H、Le^a 和 Le^b 型等。HBGA 的合成需要多种糖基转移酶作用于前体寡糖[16](见图 2B)。在岩藻糖基转移酶 2(fucosyltransferase 2,FUT 2)作用下,前体寡糖可转化为 H 型抗原结构,若 *FUT2* 基因突变致 FUT2 酶失活无法合成 H 型抗

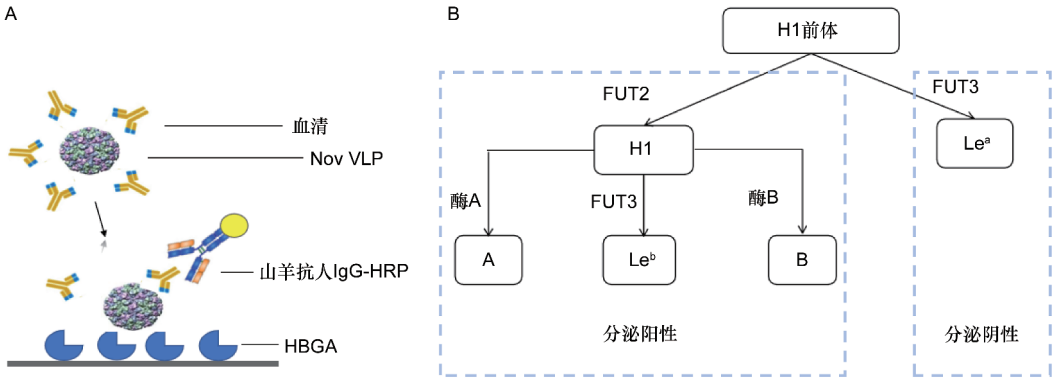


图 2 BT50 法原理示意图和 HBGA 分型

原则为分泌阴性[17]。在人体模型实验中发现 GI 组诺如病毒仅感染阳性个体，而 GII 组诺如病毒则感染所有个体。由于各型别 HBGA 与 HuNoV 结合模式与结合力存在差异，导致 HBGA 捕获血清抗原结合物效果存在差异，从而致使最终的评价效果存在差异[18-19]。BT50 法无法直接反映抗体中和效果，评价效果存在局限性，所以需要研究 HuNoV 细胞培养模型，建立更优的疫苗评价方法。

2004 年 Lisa Lindesmith 团队发现雪山病毒（snow mountain virus，SMV，一种 GII.2 的原型毒株）感染主要诱导 Th1 型免疫反应，激活的 T 细胞对 GI 组 HuNoV 无交叉反应性[20]。2022 年 Nadine Rouphael 团队推算 SWV 半数感染剂量（ID_{50}）为 5.1×10^5 基因组拷贝数（GCE）[21]。2003 年 Carol O. Tacket 团队发现 GI.1-VLP 疫苗能有效诱导体液、黏膜和细胞免疫反应，表明 VLP 具有作为疫苗的潜力[22]。2015 年 David I. Bernstein 团队志愿者注射 2 次 GI.1 和 GII.4 VLP 的双价疫苗或安慰剂，随后接种 GII.4 HuNoV，发现疫苗接种组的感染率和肠胃炎发生率低于安慰剂组，能减少呕吐和腹泻，表明 VLP 疫苗对 HuNoV 引起的急性胃肠炎具有一定保护作用[23]。以上所述人体攻毒实验涉及伦理问题，难以作为评价疫苗保护效力的模型进行推广。因此仍需要探索更为理想的动物模型和评价手段。本文总结了前人为 HuNoV 培养模型所做出的努力，并展望 HuNoV 培养模型未来的研究方向。

1 细胞模型

1.1 免疫细胞/BJAB 细胞系

2010 年 Maragarita 团队发现 HuNoV 无法在人来源的巨噬细胞和树突状细胞中复制[24]。

2010 年 Bok 团队在黑猩猩的十二指肠 B 细胞中发现了 HuNoV 的衣壳蛋白[25]。基于这一发现，2011 年，Jones 团队尝试在一种人类疱疹病毒（Epstein-Barr virus，EBV）阴性的非洲伯基特淋巴瘤来源的 B 淋巴母细胞[B cell was derived from the fresh biopsy material of an African patient (JA) with the diagnosis of Burkitt's lymphoma，BJAB]中培养 HuNoV，并成功实现了 GII.4 毒株的复制与传代[26]。同时发现阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）可以表达 H 型 HBGA，HuNoV 可以通过结合阴沟肠杆菌的 HBGA 从而增强对 BJAB 细胞的附着和感染。该实验接种的病毒滴度与病毒复制效率呈负相关，同时病毒复制效率较低（与病毒感染水平相比，基因组增量 0.5～3.5 lg）。在多次实验后该团队发现想要成功复制 HuNoV 较为困难。该团队发现 BJAB 和 EBV 阳性的非洲伯基特瘤来源的 B 淋巴母细胞（Raji B）同样能支持 GII.4 复制。1.5×10^6 个病毒拷贝数粪便样本感染 2×10^5 细胞，感染复数较大[27]。B 细胞培养系统仅支持低效、流产性复制，无法稳定传代，重复性极差，不具备实用培养价值，无法达到 HuNoV 培养的预期。有报道 HuNoV GII.6 在人原代 B 细胞模型中可以进行复制，感染 3 d 后（3 dpi）比起 0 dpi 基因组增长 3～5 倍，且供体间差异极大，18 例供体中只有 11 例能检出 *HuNoV* 基因组扩增，需外源 HBGA，同样无法进行传代[28]。2025 年进一步证实，B 细胞系因 CAR 受体主要位于细胞内、细胞膜表达极低，无法支持高效感染，已不推荐作为 HuNoV 培养模型[29]。

1.2 传统 2D 培养模型

2004 年 Duizer 团队使用 27 种细胞系模型包括模拟肠细胞分化不同阶段的肠细胞模型及其他细胞模型进行 HuNoV 培养，无一成功[30]。2017 年 To-

moichiro 团队在肠细胞系上培养 HuNoV 失败[31]。2020 年,Kyle 团队在绿猴肾细胞(Vero 细胞)上成功培养了 HuNoV,婴幼儿粪便中的外泌体介导的 HuNoV 同样能在 Vero 细胞上复制,同时发现在病毒培养物中添加胰蛋白酶或敲入或敲除 Vero 细胞特定宿主基因,可以提高复制效率,感染 72 h 后(72 hpi)比 0 dpi 病毒基因组扩增 3 倍,复制效率较低[32]。2021 年,Clara 团队发现分化后的 Caco-2 细胞能支持 HuNoV 复制,但病毒无法传代[33]。这些传统 2D 细胞系均不适合培养 HuNoV。

1.3 3D 肠上皮培养模型

美国国家航空航天局(National Aeronautics and Space Administration,NASA)建立了一种新的悬浮培养系统,旋转式生物反应器(rotating-wall vessel bioreactor,RWV),容器以特定的速度旋转使细胞在培养基中悬浮并受到均匀的剪切力,减少了细胞在培养过程中的沉降和聚集,从而促进了细胞的三维生长和分化。RWV 突破了 2D 细胞培养的界限,成功培养了 3D 人类上皮细胞[34]。2007 和 2011 年,Straub 团队利用 RWV 分别建立了 INT-407 和 Caco-2 的 3D 细胞聚集体,发现部分型别毒株可以复制,病毒滴度增加,但后续研究未能重复成功,RWV-3D 肠细胞模型不能成为可靠的 HuNoV 培养模型[35-40]。

1.4 人肠上皮类器官(human intestinal enteroids,HIE)培养系统及其影响因素和人肠道类器官(human intestinal organoid,HIO)培养系统

1.4.1 HIE 培养系统及其影响因素　荷兰 Clevers 团队创建的 HIE 是肠道隐窝分离的干细胞生成的人肠类上皮细胞,其中包含多种肠上皮细胞类型如肠上皮细胞、帕内特细胞和肠内分泌细胞等,缺乏间质、神经、肌肉等非上皮成分,适合作为研究上皮屏障、病毒-上皮相互作用及药物吸收的细胞模型[41]。HIE 能表达 HBGA,与 B 细胞系相比,无需细菌作为辅助因子。

2016 年 Ettayebi Khali 团队评估了 HIE 是否能支持 HuNoV 的培养,用 GII.4 感染 HIE,通过共聚焦显微镜检测到病毒的 VP1 和复制中的 RNA,RT-qPCR 检测基因组增量为 1.5 ~ 2.5 lg,且可以在空肠 HIE 中传代,传代病毒感染期间也能观测到 VP1 和 VPg 的表达[42]。在细胞模型方面,该研究是首个较为成熟并且后续得到多个团队验证的培养系统。该研究发现 HIE 单层培养物更容易被 HuNoV 感染,在培养时添加胆汁可使本不复制的 GII.1、GII.3 和 GII.17 复制,并且发现 HBGA 分泌状态影响 HuNoV 感染,GII.3 和 GII.4 均感染了分泌阳性的 J2 HIE,GII.3 感染了分泌阴性的 J8 HIE 却未感染同样分泌阴性的 J4 HIE,GII.4 不感染分泌阴性的 HIE。选取 2 份血清在 HIE 上进行中和试验,HuNoV 感染性降低 50% 所对应的血清稀释度大于其 BT50 值,提示病毒中和实验的灵敏度更高且除了 HBGA 结合表位可能还存在其他的中和表位。其他的类器官研究提示,比起普通细胞培养,类器官能更准确评估中和抗体效力[43]。表 1 总结了 HIE 培养系统的影响因素。

表 1　HIE 培养系统的影响因素

影响因素	结果	参考文献
胆汁	胆汁酸尤其是疏水性胆汁酸,如甘氨鹅去氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid,GCDCA)可以支持本不复制的 GII.3 等毒株复制,可以促进 GII.4 复制效率	Murakami 等(2020)[44]
神经酰胺	并不是 HuNoV 受体,但能促进 HuNoV 与细胞结合从而提高病毒复制效率	Murakami 等(2020)[44]
病毒来源	来源于儿童诺如患者的粪便样本比来源于成人诺如患者的粪便样本的复制效率更高	Lin 等(2019)[45]、Katie 等(2021)[46]
样本处理	Vertrel XF(一种环保清洗剂)、Vertrel XF 加 0.45 μm 过滤器过滤和 Vertrel XF、0.45 μm 过滤器过滤后超离心 3 种方式对于病毒复制没有明显影响	Katie 等(2021)[46]
	连续过滤处理的样本比连续离心样本复制效率高	Narwankar 等(2024)[47]
HIE 来源	GII.4 和 GII.3 HuNoV 可在源自十二指肠、空肠和回肠肠段的 HIE 中复制,但不能在源自结肠的 HIE 中复制	Ettayebi 等(2021)[48]
	与成人的 HIE 相比,早产儿 HIE 上的 HuNoV 复制效率低下	Ettayebi 等(2024)[49]
FUT2 基因	通过 CRISPR/Cas9 技术敲除了 HIE 系中的 *FUT2* 基因,GI.1、GII.4 和 GII.17 型 HuNoV 的复制显著减少,而 GII.3 型 HuNoV 复制效率不变	Haga 等(2020)[50]

续表 1

影响因素	结果	参考文献
HIE 传代代数,连续培养天数,冻存时间	无显著相关性	Katie 等(2021)[46]
培养基条件	市售的 INT 培养基(intesticult human organoid growth medium from Stem Cell Technologies)比 CMGF + 培养基(Clevers 团队报道的可用于培养 HIE 的培养基)能更好地促进毒株在 HIE 上复制	Ettayebi 等(2021)[48]
	Matrigel 基质胶 HIE 中的 *HuNoV* 基因组增量高于胶原Ⅳ的基因组增量	Katie 等(2021)[46]

1.4.2 基因编辑技术助力 HuNoV 培养 2020 年,Myra Hosmillo 团队发现 HuNoV 感染的 HIE 中调控干扰素(interferon,*IFN*)基因 mRNA 水平显著增高,通过慢病毒载体导入牛病毒性腹泻病毒(biovine viral diarrhea virus,BVDV)NPro 蛋白和副流感病毒 5(parainfluenza virus 5,PIV5)V 蛋白基因构建 IFN 缺陷型 HIE。与对照 HIE 相比,在表达 BVDV NPro 的 HIE 中,GII.3 毒株复制效率增长约 33 倍,在表达 PIV5 V 蛋白的 HIE 中,GII.3 毒株复制效率增长约 6 倍[51]。在长期培养过程中,基因编辑类器官的稳定性对实验结果的影响需进一步验证。

Ettayebi Khali 团队通过添加外源性 IFN,发现能显著抑制 GII.3 和 GII.4 复制。实验通过 CRISPR 敲除 HIO 中的干扰素通路基因,发现 GII.4 诺如病毒复制不受内源性干扰素影响,而 GII.3 病毒在 STAT1 敲除后复制增强百倍[52]。后续以此为基础,整理了一套通过 CRISPR-Cas9 结合慢病毒转导和单细胞克隆技术,生成和验证 HIE 敲除细胞系的完整实验方法,该方法可用于研究基因功能和肠道病毒的复制原理。但该技术操作复杂,验证敲除克隆的基因组序列和表型需要大量的实验工作,包括 PCR、测序和功能验证。随机插入可能导致基因组不稳定。另外,CRISPR-Cas9 系统可能存在脱靶效应[53]。

2020 年,Khalil Ettayebi 团队在他们 2016 年建立的 J2 HIE 和 J4 HIE 的基础上,通过 *CRISPR/Cas9* 基因编辑技术敲除了分泌阳性 J2 HIE 中的 *FUT2* 基因(J2 FUT2-KO-HIE),使用慢病毒载体在分泌阴性 J4 HIE 中引入了 *FUT2* 基因(J4 FUT2-KI-HIE)[54]。与原 J2 HIE 相比,在 J2 FUT2-KO-HIE 中 GI.1、GII.4 和 GII.17 与细胞结合显著减少,复制减少(<1 lg),GII.3 结合略降但在 24 h 复制与亲本相当(增高约 2 lg)。与原 J4 HIE 相比,在 J4 FUT2-KI-HIE 中 GI.1、GII.4 和 GII.17 结合显著升高,感染效率与原 J2 HIE 接近。该模型能更深入地探讨 FUT2 对 HuNoV 附着和进入细胞的影响。

1.4.3 HIO 培养系统 HIE 涉及伦理问题,而 HIO 通常由多能干细胞等干细胞来源在基质胶中生成的,不仅包含上皮细胞,还有间质、神经、肌肉等非上皮成分,形成比 HIE 更接近体内环境的肠道类器官[55]。用 GII.4 毒株感染 HIO,通过 PCR、免疫荧光等方法证实 GII.4 在 HIO 中复制,但仅产生少量复制,可能是因为 HIO 的成熟程度或分化水平对 HuNoV 有影响,也可能因为 HIE 比 HIO 更易感[56]。在 HIO 中接种 HuNoV,无胆汁培养,检测到 GII.3、GII.4、GII.6 和 GII.17 在 72 hpi 基因组当量比 3 hpi 增长约 1 ~ 2 个数量级,添加胆汁后可增强 GII.3、GII.6 和 GII.17 在 HIO 中的复制。GII.4 和 GII.17 可以在 HIO 中传代,但 GII.4 传代到第 3 代时复制效率显著下降[57]。

2024 年 Khalil Ettayebi 团队将 H9 人胚胎干细胞(H9hESC)移植到免疫缺陷小鼠体内培养 8 周,制成了一种特定的 HIO(H9tHIE)。H9tHIE 具有无限传代的特点,只含有上皮细胞而无外层间充质细胞,其形态类似于组织干细胞分化的 HIE。该团队用 GII.3 和 GII.4 毒株分别感染 H9tHIE 与前文中未经过改造的 J2 HIE(2016 年)以及 J4 FUT2-KI-HIE。GII.3 在 H9tHIE 中基因组增量(2.4 lg)比 J2 HIE(2.2 lg)略高,GII.4 在 H9tHIE 中复制后的基因组增量(2.1 lg)与在 J2 HIE 中复制增量(2.0 lg)相差无几,在 J4 FUT2-KI-HIE 中 GII.3 和 GII.4 增量最高,分别为 2.6 lg 和 2.9 lg(以上基因组增量均指 24 hpi 相对于 1 hpi 的增加量)。

1.5 人唾液腺细胞系培养模型

人唾液腺细胞系 NS SV TT AC(腺泡)、NS SV TT DC(导管)是近年来建立的新型 HuNoV 体外培养模型,均来源于正常人下颌下腺组织。研究证实,2 种细胞均可支持 HuNoV GI、GII 复制,使用 GII.4 型诺如病毒感染 NS SV TT DC,d 4 胞内病毒拷贝数可增加 3 lg 且培养出的病毒可复制传代,复制水平

与 HIE 接近。同时证实,囊泡包裹的 HuNoV 比游离病毒更易在唾液腺细胞中建立感染。该模型无须添加胆汁酸、肠道菌群,操作步骤较 HIE 和 HIO 更加简易且费用低,用于环境检测时可直接从粪便、污水样本中分离培养 HuNoV。唾液腺细胞系以其成本低、易培养、可重复、适配环境监测的优势,可作为 HIE 之外重要的替代培养体系[58-59]。

细胞模型汇总见表 2。

表 2 细胞模型汇总

细胞模型	细胞来源	HBGA 分泌状态	细胞培养方法	样品处理方法	接种方法	支持培养的毒株型别及特点
MΦ 模型[24]	人外周血单核细胞	阳性	传统 2D 培养	10%（*w*/*v*）悬液	37 ℃培养箱孵育 2 h	不支持诺如病毒培养
DC 模型[24]	人外周血单核细胞	阳性	传统 2D 培养	10%（*w*/*v*）悬液	37 ℃培养箱孵育 2 h	不支持诺如病毒培养
BJAB[26]	EBV 阴性的非洲伯基特淋巴瘤的人 B 淋巴母细胞	阴性	传统 2D 培养	未过滤的粪便样本	直接感染:通过移液器在离心管中混合 BJAB 细胞和粪便样本后在 37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育 2 h 细菌刺激的病毒感染:阴沟肠杆菌和粪便样本在 37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育 1 h 后加入 BJAB 细胞,将混合物在 37 ℃、5% CO_2 孵育 2 h	支持 GII.4、GII.6 毒株复制,与病毒感染水平相比,基因组增量 0.5 ~ 3.5 lg。复制效率低下,可重复性差,无法进行传代培养
Raji[27]	EBV 阳性的非洲伯基特淋巴瘤的人 B 淋巴细胞	阴性	传统 2D 培养	未过滤的粪便样本	同上	支持 GII.4、GII.6 毒株复制,与病毒感染水平相比,基因组增量 0.5 ~ 3.5 lg。复制效率低下,可重复性差,无法进行传代培养
CD19$^+$ B 细胞[28]	外周血/脾/淋巴结来源的人原代 B 细胞	阴性	传统 2D 培养	0.8 μm 滤膜过滤	32 ℃、5% CO_2 孵育 2 h	支持 GII.4、GII.6 毒株复制,基因组平均增加 3 倍。复制效率低下,供体间差异大,无法进行传代培养
INT-407[30]	人小肠上皮细胞	阴性	传统 2D 培养	10%（*w*/*v*）悬液以 3 000 × g 离心 10 min	在旋转容器中孵育;离心强化培养（20 ℃,1 000 × g 离心 1 h）;34 ℃孵育;添加细菌内毒素	不支持诺如病毒复制
Caco-2[30]	人结肠腺癌细胞	阳性	传统 2D 培养	10%（*w*/*v*）悬液以 3 000 × g 离心 10 min	在旋转容器中孵育;摇床孵育;离心强化培养（20 ℃,1 000 × g 离心 1 h）;34 ℃孵育;添加细菌内毒素孵育	不支持诺如病毒复制
Vero[32]	绿猴肾细胞	阴性	传统 2D 培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	37 ℃、5% CO_2 培养箱下孵育 30 min	支持 GII.4 复制。外泌体对于诺如病毒感染十分重要
HIEC[31]	人原代肠上皮细胞	暂无讨论	传统 2D 培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	接种病毒后不移除接种物,病毒与细胞共同孵育 4 ~ 9 d	不支持诺如病毒复制
HT-29[31]	人结肠上皮细胞	阳性	传统 2D 培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	接种病毒后不移除接种物,病毒与细胞共同孵育 4 ~ 9 d	不支持诺如病毒复制

续表 2

细胞模型	细胞来源	HBGA 分泌状态	细胞培养方法	样品处理方法	接种方法	支持培养的毒株型别及特点
IPEC-J2[31]	猪小肠(空肠)上皮细胞系	阳性	传统 2D 培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	同上	不支持诺如病毒复制
INT-407-3D[35-40]	人小肠上皮细胞	阴性	RWV-3D 培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	混合毒株接种,37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h	多次验证后,证实不支持诺如病毒培养
Caco-2-3D[35-40]	人结肠腺癌细胞	阳性	RWV-3D 培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h	多次验证后,证实不支持诺如病毒培养
HIE[42]	人肠道隐窝干细胞	阳性	3D 类器官培养/单层培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h	支持 GI.1、GII.1、GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.8、GII.12、GII.14、GII.17 毒株复制。病毒复制基因组增量 1.5 ~ 2.5 lg,支持诺如病毒传代培养
基因编辑 HIE[54]	人肠道隐窝干细胞	阳性	慢病毒转染,CRISPR-Cas9,单细胞克隆,3D 类器官培养	10% 粪便悬液	37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h	支持 GII.3,GII.4 复制,且 GII.3 复制效率增强
HIO[56-57]	人成体肠道干细胞、诱导多能干细胞或胚胎干细胞诱导得到	阳性	3D 类器官培养/单层培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	37 ℃、5% CO_2 培养箱下孵育过夜(16 h)	支持 GII.3、GII.4、GII.6 和 GII.17 复制
H9tHIE[49]	免疫小鼠体内培养的特殊 HIO	阳性	小鼠体内培养/类器官培养	粪便上清液通过 0.22 μm 孔径过滤器灭菌	37 ℃孵育 1 ~ 2 h,加入胆汁替代物	支持 GII.3,GII.4 复制
NS-SV-TT-DC[58-59]	人正常下颌下腺导管上皮细胞	—	单层贴壁培养;KGM-2 培养基;37 ℃、5% CO_2	粪便样本:氯仿处理、离心、过滤;污水样本:PEG 沉淀或超滤浓缩	病毒液加入细胞孔,37 ℃吸附 1 h,更换维持液,培养 96 h	支持 GI、GII(GII.4 Sydney 株)复制
NS-SV-TT-AC[58-59]	人正常下颌下腺腺泡上皮细胞	—	单层贴壁培养;K-SFM 无血清培养基;37 ℃、5% CO_2	粪便样本:氯仿处理、离心、过滤;污水样本:PEG 沉淀或超滤浓缩	病毒液加入细胞孔,37 ℃吸附 1 h,更换维持液,培养 96 h	支持 GI、GII 复制;可直接从粪便、污水分离病毒

2 动物模型

2.1 小鼠模型

HuNoV 无法在具备正常免疫能力的小鼠模型中复制,2013 年,Taube 团队建立了 BALB/c $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ 缺陷小鼠,实验发现人源化和非人源化的 BALB/c $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ 缺陷小鼠都支持 HuNoV 的 GII.4 株的复制,而野生型 BALB/c 小鼠(无免疫缺陷)未被感染,表明 HuNoV 在小鼠模型中复制依赖于宿主的免疫缺陷状态[60]。该实验没有病毒传代实验的结果,因此是否能够产生完整病毒尚不可知。

无菌小鼠模型可开展完全不存在微生物或仅有特定的微生物的研究。然而,饲养这些小鼠需专用设施,且基因型受到一定限制。通过喂养抗生素消耗小鼠肠道微生物群可实现类似效果[61]。2022 年 Cristina 团队用 100 μL、1.5×10^7 GCE 的 HuNoV 感染小鼠,对照组排毒为 5.8×10^4 GCE·g 粪便$^{-1}$,而抗生素治疗小鼠为 1.8×10^6 GCE·g^{-1}。通过改变肠道微生物群,消除遏制 HuNoV 复制的细菌,使 HuNoV 在具有免疫活性的小鼠中复制,为研究肠道微生物群和 HuNoV 复制水平之间的关系提出了一个新的小鼠模型系统[62]。虽然能证明消耗肠道微生物群能够促进病毒在小鼠中的复制,但是在人体中,百十个病毒粒子能够复制至 10^8 GCE,而在小鼠体内,10^7 GCE 的接种量复制后为 10^6 GCE,复制效率低下,小鼠模型并不能作为一个良好的 HuNoV 培养系统。

2.2 猪模型

HuNoV 抗原与猪诺如病毒抗血清之间存在抗原交叉反应,且 HuNoV 与猪诺如病毒氨基酸序列存在一定相似性,猪免疫系统的结构和功能与人类免疫系统的结构和功能有 80% 以上的相似性,猪拥有 *FUT2* 基因表达产物的同源物,其 α-2-岩藻糖基转移酶与人 H 型 α-2-岩藻糖基转移酶相似,表达的 A 或 H 型 HBGA 抗原与人类 A 和 O(H)型 HBGA 抗原相似[63-64]。因此,猪或许能成为一个研究 HuNoV 的良好模型。但猪的饲养成本较高,且猪的繁殖速度较慢,这可能限制了其在大规模实验中的应用。

2.2.1 无菌猪(gnotobiotic piglets,Gn 猪)模型 Gn 猪是健康妊娠母猪在隔离设施中剖宫产得到的。2006 年,Cheetham 团队用 HuNoV GII.4 毒株口服接种 Gn 猪,大部分猪出现腹泻,排毒约为 3 ~ 4 d,回肠壁变薄,绒毛萎缩,在空肠、回肠、结肠、脾脏淋巴结等能检测到病毒衣壳[65]。HuNoV 可以在 Gn 猪模型中传代,但传代病毒量低于病毒接种量。

目前,已有多个团队利用 Gn 猪评价疫苗并取得了良好结果。2007 年,Souza 团队报道了 Gn 猪体内能够产生血清抗体,抗体滴度与腹泻程度相关[66]。该团队利用 Gn 猪模型评估了添加佐剂的 GII.4 HS66 毒株 VLP 疫苗,VLP 疫苗能有效减少腹泻[67]。2019 年,Kelsey 团队以乳酸菌为载体构建了 GII.4 口服 VLP 疫苗,在 Gn 猪模型中诱导了特异性 IgG/IgA 应答并预防感染,证实其免疫原性与保护潜力[68]。

表 3 总结了部分在 Gn 猪模型培养 HuNoV 的影响因素。

表 3 Gn 猪培养 HuNoV 的影响因素

影响因素	结果	参考文献
HBGA 型别	在肠黏膜上表达 A 或 H 抗原的猪感染 HuNoV 毒株后比不表达 A 或 H 抗原的猪具有更高的腹泻率、血清转化率和粪便排毒率	Cheetham 等(2007)[69]
肠道菌群	鼠李糖乳杆菌、大肠埃希菌和米糠等混合喂养 Gn 猪能一定程度上减少排毒和腹泻时间	Lei 等(2016)[70]
	移植人肠道菌群能够增强 GII.4 对于 Gn 猪的感染	Lei 等(2019)[71]
	混合接种弗格森埃希菌(*E. fergusonii*)和 HuNoV 的 Gn 猪感染程度大于单独接种的 Gn 猪	Jung 等(2023)[72]
Gn 猪的年龄	新生猪(4 ~ 5 d)比年长猪(33 ~ 35 d)更易被感染	Bui 等(2013)[73]
辛伐他汀	辛伐他汀喂养的 Gn 猪平均排毒持续时间为 15 d,而单独接种 GII.4 毒株平均排毒时间为 9 d	Jung 等(2012)[74]
	辛伐他汀喂养猪的腹泻发生率(79%)高于非辛伐他汀喂养猪(38%)。使用辛伐他汀后,ID_{50}从 6.43×10^4 GCE 降至约 2.74×10^3 GCE	Bui 等(2013)[73]
	辛伐他汀会破坏疫苗的保护作用	Kocher 等(2021)[75]

2.2.2 免疫缺陷型猪 2016 年,Lei 团队通过基因工程生成 RAG 2/IL2RG 缺陷型猪,该模型去除了主要的淋巴细胞(B、T 和 NK 细胞)。*RAG2/IL2RG* 缺陷型猪接种 HuNoV 后排毒时间长达 27 d[76]。2019 年,Thavamathi 团队进一步探索了联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency,SCID)猪的发病机制,发现 $T^-B^-NK^+$(缺乏 B 和 T 细胞,但拥有 NK 细胞)的 SCID 猪的感染水平、血清 IFN-α、IL-17 和 TNF-α 等细胞因子和非 SCID 猪没有差别。免疫缺陷型猪模型可助力研究免疫受损宿主中病毒感染和发病机制[77]。

2.2.3 天然仔猪 HuNoV GII.3 和 GII.12 感染新生断奶仔猪,产生轻度腹泻,软便 3 d,未观察到其他临床症状,大小肠等组织形态正常,无病变,仅 1/5 的仔猪能检测到排毒,峰值为每克粪便 10^2 ~ 10^3 GCE,复制水平低于接种量。在 d 7 观察到 HuNoV 病毒血症,与住院儿童发生的 HuNoV 病毒血症相似。无菌猪模型缺乏正常菌群,天然仔猪模型可以弥补这一空缺[78]。但仔猪复制水平低下,恐不能广泛应用。

2.3 非人灵长类动物

2.3.1 黑猩猩 1978 年,Richard 团队用含有 HuNoV 的人粪滤液感染黑猩猩,未出现呕吐或腹泻等临床症状,但在粪便中可以检测到病毒,且其粪便可以感染健康黑猩猩[79]。2003 年 Baoming Jiang 团队在野生恒河猴和黑猩猩的血清样本中检测到诺如病毒抗体 IgG[80]。Karin Bok 评价了 GI 组和 GII 组 VLP 疫苗的保护效力,发现疫苗对不同型别的诺如病毒没有交叉保护作用。黑猩猩数量不多且饲养价格昂贵,不适宜作为诺如病毒感染的良好模型。

2.3.2 恒河猴 2005 年 Rockx 团队对 4 只恒河猴

胃内接种 GI、GII 组的人粪滤液,仅有 1 只恒河猴排毒,并产生血清抗体反应[81]。2024 年 Rimkute 团队通过优化感染剂量混合毒株(GI.1、GII.1、GII.3、GII.4、GII.17),提高了恒河猴排毒率和血清抗体检测率,但仍然存在部分恒河猴不排毒的情况[82]。2 次实验中恒河猴均未出现呕吐、腹泻等临床症状。

2.4 牛模型

Souza 团队用 HuNoV GII.4 毒株灌胃 5 头无菌牛(gnotobiotic calves,Gn 牛),所有接种小牛均有排毒,且能检测到血清抗体,可观测到肠道病变,仅 1 头 Gn 牛在空肠中能检测到病毒衣壳,出现病毒血症[83]。小牛模型排毒时间较短(4 d),且受设备限制,难以广泛使用。

2.5 斑马鱼(*Danio rerio*)模型

斑马鱼是鲤科的一种光学透明的热带淡水鱼,其维护和饲养成本较低。斑马鱼有 82% 的疾病相关基因与人类相似,是一种良好的动物模型[84]。在受精后 3 d,斑马鱼幼鱼已经孵化,形成包括胃肠道在内的器官。2019 年 Jana Van Dycke 团队将 GI.7、GII.2、GII.3、GII.4 和 GII.6 毒株注射至受精 3 d 的斑马鱼幼鱼的卵黄(卵黄较大易于注射,在受精 5 d 后,卵黄被斑马鱼完全吸收),可检测到病毒复制,传代 2 次。复制可能与斑马鱼的年龄相关,1 岁的斑马鱼接种 HuNoV 后并没有发现复制[84-87]。

斑马鱼中 HBGAs 的表达仅限于 Lewis 抗原,能够更加准确地检测 Lewis 抗原与诺如病毒感染之间的关系[88]。2022 年 Arno Cuvry 团队向斑马鱼幼鱼的培养基中加入岩藻糖类似物(2F-F)抑制岩藻糖基转移酶活性,经 2F-F 处理的幼鱼病毒复制比未经过 2F-F 处理的幼鱼少 2.6 lg,说明 HuNoV 感染需要岩藻糖。该团队发现 HuNoV 在常规饲养和无菌幼鱼中复制无差异,并尝试将幼鱼浸泡在含有阴沟肠杆菌的溶液中(受精 3 d 的幼鱼可以开口吸收外界的营养),发现阴沟肠杆菌不会增强 HuNoV 在幼鱼中的复制。

2023 年 Malcolm 团队用 3 nL、(1.6 ± 0.3) lgGCE 的 GII.2、GII.4 和 GII.17 粪便样品分别感染受精 3 d 后的斑马鱼幼鱼和受精 6 h 后的斑马鱼胚胎,幼鱼的病毒 GCE 在 2 dpi 显著增加[基因组总量为 (4.4 ± 0.8) lgGCE·10 条幼鱼$^{-1}$],病毒载量从 3 dpi 开始逐渐下降[89]。胚胎病毒复制至 6 dpi。在 3 dpi 检测到峰值[(7.7 ± 0.2) lgGCE·10 个胚胎$^{-1}$]。该团队推测可能是因为注射幼鱼比注射胚胎操作更难,阻力更大,病毒损失更多。幼鱼中复制的 GCE 不足以达到感染剂量,只能传代 2 次,而在胚胎中复制后拥有更高的 GCE,可传代 8 次。

斑马鱼模型体积较小,可以在 96 或 384 孔板中进行培养,适合高通量研究。由于注射进幼鱼或胚胎的接种物只有 3 nL,因此需要高滴度的 HuNoV 接种物,原始的粪便样本可能需要 1×10^9 GCE。无论是幼鱼还是胚胎,都只能研究先天性免疫(NK 细胞、树突状细胞等),因为斑马鱼的适应性免疫要在 4 ~ 6 周时才会生成[90]。且斑马鱼模型采用直接注射的接种方式,并未经过病毒-受体结合的过程,作为研究模型的使用受到限制。

动物模型汇总见表 4。

表 4 动物模型汇总

动物模型	毒株型别	感染方式	临床症状	排毒时间	免疫反应	模型特点
BALB/c Rag$^{-/-}$ γc$^{-/-}$ 缺陷小鼠[60]	GII.4	0.2 mL 腹腔注射/0.5 mL 口服感染(口服注射在组织内未检出病毒基因)	大部分小鼠无明显症状,只有一只小鼠水泻 24 h	联合注射组短暂排毒(1 ~ 2 d)	未检测到特异性抗体反应或适应性免疫应答,可能与小鼠免疫缺陷背景有关	小鼠具有免疫缺陷
免疫活性小鼠[61]	GII.4	口服接种	无临床症状	抗生素组排毒持续 4 d,其他组 1 ~ 2 d	细胞因子表达与野生组无差异	通过喂养抗生素达到改变小鼠肠道微生物群,复制效率低下
Gn 猪[65-68]	GII.4、GII.12	口服接种/静脉注射/自然感染	腹泻	3 ~ 4 d	NK 细胞介导的免疫应答;促炎细胞因子[包括 IFN-γ、白细胞介素-4(IL-4)、IL-6、IL-10 和 IL-12]表达升高 1.7 ~ 7 倍	饲养费用昂贵

续表 4

动物模型	毒株型别	感染方式	临床症状	排毒时间	免疫反应	模型特点
RAG 2/IL2RG 缺陷型猪[76]	GII.4	口服接种	无明显症状	27 d,实验终止时仍在排毒	双基因敲除猪由于缺乏免疫细胞,无法有效清除病毒,导致感染持续时间延长	去除了主要的淋巴细胞(B、T 和 NK 细胞)
免疫缺陷型猪[77]	GII.4	口服接种	轻度腹泻	平均排毒时间为 11 d	能产生先天免疫或促炎细胞因子的应答	研究免疫受损宿主中病毒感染和发病机制
天然仔猪[78]	GII.12/GII.3 重组株	口服灌胃	产生轻度腹泻,软便 3 d	粪便中 1、3、7 d 间歇性排毒	血清中 IFN-α 的表达升高 1.5 ~ 2.9 倍,没有观测到 IFN-γ 诱导的免疫反应	拥有正常肠道菌群
黑猩猩[79 - 80]	GI.1 和 GII.4	静脉注射	没有疾病症状	22 ~ 42 d	主要是血清抗体 IgG 和 IgA 引导的免疫应答	排毒时间长,但没有疾病症状,且饲养费用昂贵
恒河猴[81 - 82]	GI.1、GII.1、GII.3、GII.4、GII.17	口服灌胃	没有疾病症状	2 只排毒时间为 1 ~ 2 d,有 1 只在感染 19 d 后检测出诺如病毒	能够检测到病毒特异性 IgG、IgA 和 IgM	没有临床症状
Gn 牛[83]	GII.4	口服灌胃	腹泻	4 d	检测到血清抗体 IgM、IgA 和 IgG	模型较大,排毒时间短,饲养费用昂贵
斑马鱼幼鱼[84 - 87]	GI.7、GII.2、GII.3、GII.4、GII.6	向卵黄中注射病毒/将幼鱼浸泡在含有 HuNoV 的悬浮液中	没有疾病症状	—	干扰素 IFN 等因子表达上调	适合高通量研究,不受场地和设备限制,没有疾病症状,没有病毒-受体结合过程
斑马鱼胚胎[89]	GII.2、GII.4 和 GII.17	向卵黄中注射病毒	没有疾病症状	—	—	注射病毒操作比幼鱼模型更简单,传代次数更多

3 结语

HuNoV 感染性强、变异迅速且缺乏特效疗法,造成的健康问题和经济负担已成为全球公共卫生的重要挑战。理想的培养模型是阐明其感染机制、评价疫苗效力和筛选抗病毒药物的基础。过去 20 余年中,细胞与动物模型方面均取得了显著进展,但仍未建立起一种既高效又经济的普适性系统,在此背景下,各研究团队根据自己的研究目标选择合适的模型。

在细胞模型方面,研究焦点已从传统 2D 细胞系转向 3D 肠道类器官,近年来更建立了稳定的人唾液腺上皮细胞系培养模型,有望形成双主流培养体系。HIE 能够支持多种 *HuNoV* 基因型的复制与传代,并可用于中和试验,为研究病毒-宿主互作提供了关键平台。然而,其操作复杂、成本较高,且涉及组织来源的伦理考量。人唾液腺细胞系则操作简便、成本低廉、无伦理限制,可作为高通量培养与环境监测的首选替代模型。与 HIE 相比,由多能干细胞诱导的 HIO 在一定程度上规避了伦理问题,但其病毒复制效率通常低于 HIE。未来的突破可能在于对现有类器官模型的系统优化。例如:通过基因编辑技术(如 CRISPR-Cas9)定向改造宿主细胞,或通过添加特定辅助因子,有望构建出复制效率更高、稳定性更强的“增强型”类器官模型。这类优化模型不仅能用于基础研究,更有可能发展成为标准化、高通量的药物筛选和疫苗评价平台。

在动物模型方面,各模型系统也各具优劣势。小型动物模型中,斑马鱼模型以其成本低、繁殖快、通量高的独特优势脱颖而出,有希望在大规模抗诺如病毒药物的初步筛选中发挥作用。然而,其感染途径(注射而非自然感染)和免疫系统发育阶段(缺乏适应性免疫)与人类差异显著,限制了其在疫苗评价和完整发病机制研究中的应用,因此,难以作为终点评价模型。中型动物以猪模型为代表,特别是

Gn 猪和免疫缺陷猪,能够较好地模拟人类的临床症状和部分免疫反应,是目前评价疫苗保护效力的重要工具。但其高昂的饲养成本和复杂的实验条件制约了广泛应用。大型非人灵长类动物(如恒河猴)与人类亲缘关系最近,但同样存在成本高昂、感染率不稳定且常缺乏典型临床症状的问题,难以作为常规模型推广。

面对当前模型"优势各异,各有短板"的局面,我们可以寄希望于某一种研究模型的突破,以解决现在面临的研究困境,而仅利用现有条件,一种可行的策略是发展"分阶段、多层次"的整合研究体系。例如:可利用斑马鱼胚胎进行大规模药物初筛;随后在优化后的 HIE/HIO 模型中进行病毒复制机制验证和中和抗体评价;最终在猪模型中进行疫苗保护效力的综合评估。这种阶梯式策略能兼顾效率、成本与生理相关性,但对研究者和开发者的资源整合能力要求比较高。此外,随着类器官与器官芯片技术的融合,未来可能会出现更复杂的共培养系统,在体外部分模拟动物模型的免疫反应,推动现有类器官模型更深入的发展,建立的体外试验模型可以满足人们对诺如病毒研究的需要,从而减少对大型动物的依赖。

展望未来,模型系统的改进应与疫苗研发的迫切需求紧密结合。目前国内外有多家研发机构的多价重组/mRNA 诺如疫苗处于不同的临床研究阶段,中国已分别有 2 家企业的 2 价、4 价诺如病毒疫苗进入Ⅲ期临床试验,有 5 家获得临床试验许可。目前由于病毒无法培养,疫苗有效性评价无法采用经典的中和抗体检测方法,而其免疫原性现主要检测特异性 IgG 和体外阻断抗体水平。随着多价诺如病毒疫苗陆续进入临床,建立稳定、可靠且能反映真实保护力的中和评价方法至关重要。优化后的 HIE/HIO 系统有望弥补当前主要依赖 HBGA 阻断抗体检测(BT50 法)的不足。同时,在动物模型方面,应持续探索如何通过基因编辑或微生物组调控等手段,构建更贴近人类免疫反应的小型动物模型,以平衡研究需求与可行性。

综上所述,诺如病毒培养模型的探索已从"能否培养"步入"如何优化"的新阶段。未来的发展方向既可以推进某一模型改良完美化,从而使其能够在病毒机制研究、药物筛选、疫苗评价等多个阶段发挥作用;也可以不局限于单一模型,而是致力于构建一个优势互补、协同验证的模型生态系统,从而全方位推动对诺如病毒的研究,最终为控制诺如病毒的流行提供坚实的技术支撑。

[参 考 文 献]

[1] GLASS PJ, WHITE LJ, BALL JM, *et al*. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein[J]. *Virol*, 2000, 74(14): 6581 - 6591.

[2] CHHABRA P, GRAAF M, PARRA GI, *et al*. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(10): 1393 - 1406.

[3] 廖巧红, 刘娜, 段招军, 等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015 版)[J]. 中国病毒病杂志, 2015, 5(6): 7 - 16.

[4] LOPMAN B, VENNEMA H, KOHLI E, *et al*. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant[J]. *Lancet*, 2004, 363(9410): 682 - 688.

[5] VEGA E, BARCLAY L, GREGORICUS N, *et al*. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1): 147 - 155.

[6] 朱曦, 孔翔羽, 章青, 等. 2016—2019 年我国诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征分析[J]. 疾病监测, 2021, 36(8): 774 - 779.

[7] LU J, SUN LM, FANG L, *et al*. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014 - 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(7): 1240 - 1242.

[8] FU J, AI J, JIN M, *et al*. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015[J]. *Euro Surveill*, 2015, 20(24): pii: 21157.

[9] HAN J, JI L, SHEN Y, *et al*. Emergence and predominance of norovirus GII.17 in Huzhou, China, 2014 - 2015[J]. *Virol J*, 2015, 12(1): 139.

[10] TREANOR JJ, ATMAR RL, FREY SE, *et al*. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate: reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults[J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(11): 1763 - 1771.

[11] ATMAR RL, BAEHNER F, CRAMER JP, *et al*. Rapid responses to 2 virus-like particle norovirus vaccine candidate formulations in healthy adults: a randomized controlled trial[J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(6): 845 - 853.

[12] TREANOR J, SHERWOOD J, CRAMER JP, *et al*. A phase 2 study of the bivalent VLP norovirus vaccine candidate in older adults; impact of MPL adjuvant or a second dose[J]. *Vaccine*, 2020, 38(36): 5842 - 5850.

[13] LÓPEZ P, LÓPEZ-MEDINA E, SÁEZ-LLORENS X, *et al*. Immunogenicity and tolerability of a bivalent virus-like particle norovirus vaccine candidate in children from 6 months up to 4 years of age: a phase 2 randomized, double-blind trial[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2023, 19(1): 2204787.

[14] KIM L, LIEBOWITZ D, LIN K, *et al*. Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(13): e121077.

[15] TILL S, BOLLMAN BA, KEVIN M, *et al*. Safety and immunogenicity of mRNA-1403, a multivalent norovirus mRNA vaccine, in healthy adults: interim results of a phase 1/2, randomized, observer-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2025.

[16] CLAUSEN H, HAKOMORI S. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution[J]. *Vox Sang*, 1989, 56(1): 1 - 20.

[17] NORDGREN J, NITIEMA LW, OUERMI D, *et al*. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69557.

[18] FRENCK R, BERNSTEIN DI, XIA M, *et al*. Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans[J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(9): 1386 - 1393.

[19] HUANG P, FARKAS T, ZHONG W, *et al*. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns[J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 6714 -

6722.
[20] LINDESMITH L, MOE C, LEPENDU J, *et al*. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge[J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2900 – 2909.
[21] ROUPHAEL N, BECK A, KIRBY AE, *et al*. Dose-response of a norovirus GII. 2 controlled human challenge model inoculum [J]. *J Infect Dis*, 2022, 226(10): 1771 – 1780.
[22] TACKET CO, SZTEIN MB, LOSONSKY GA, *et al*. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers[J]. *Clin Immunol*, 2003, 108(3): 241 – 247.
[23] BERNSTEIN DI, ATMAR RL, LYON GM, *et al*. Norovirus vaccine against experimental human GII. 4 virus illness: a challenge study in healthy adults[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(6): 870 – 878.
[24] LAY MK, ATMAR RL, GUIX S, *et al*. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans[J]. *Virology*, 2010, 406(1): 1 – 11.
[25] BOK K, PARRA GI, MITRA T, *et al*. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(1): 325 – 330.
[26] JONES MK, WATANABE M, ZHU S, *et al*. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells[J]. *Science*, 2014, 346(6210): 755 – 759.
[27] JONES MK, GRAU KR, COSTANTINI V, *et al*. Human norovirus culture in B cells[J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(12): 1939 – 1947.
[28] MIRABELLI C, JONES MK, YOUNG VL, *et al*. Human norovirus triggers primary B cell immune activation *in vitro* [J]. *mBio*, 2022, 13(2): e0017522.
[29] FARKAS T. B cell lines fail to support efficient rhesus enteric calicivirus and human norovirus replication[J]. *J Virol*, 2025, 99(5): e00143 – 25.
[30] DUIZER E, SCHWAB KJ, NEILL FH, *et al*. Laboratory efforts to cultivate noroviruses[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 1): 79 – 87.
[31] OKA T, STOLTZFUS GT, ZHU C, *et al*. Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0178157.
[32] TODD KV, TRIPP RA. Vero cells as a mammalian cell substrate for human norovirus[J]. *Viruses*, 2020, 12(4): 439.
[33] POHL C, SZCZEPANKIEWICZ G, LIEBERT UG. Analysis and optimization of a Caco-2 cell culture model for infection with human norovirus[J]. *Arch Virol*, 2022, 167(6): 1421 – 1431.
[34] SCHWARZ RP, GOODWIN TJ, WOLF DA. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity[J]. *J Tissue Cult Meth*, 1992, 14(2): 51 – 57.
[35] STRAUB TM, HÖNER ZU BENTRUP K, OROSZ-COGHLAN P, *et al*. *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(3): 396 – 403.
[36] STRAUB TM, BARTHOLOMEW RA, VALDEZ CO, *et al*. Human norovirus infection of Caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure[J]. *J Water Health*, 2011, 9(2): 225 – 240.
[37] STRAUB TM, HUTCHISON JR, BARTHOLOMEW RA, *et al*. Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays[J]. *Water Sci Technol*, 2013, 67(4): 863 – 868.
[38] PAPAFRAGKOU E, HEWITT J, PARK GW, *et al*. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e63485.
[39] HERBST-KRALOVETZ MM, RADTKE AL, LAY MK, *et al*. Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(3): 431 – 438.
[40] TAKANASHI S, SAIF LJ, HUGHES JH, *et al*. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(2): 257 – 266.
[41] SATO T, VRIES RG, SNIPPERT HJ, *et al*. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459: 262 – 265.
[42] ETTAYEBI K, CRAWFORD SE, MURAKAMI K, *et al*. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids [J]. *Science*, 2016, 353(6306): 1387 – 1393.
[43] WAN Z, LI C, ZHOU Y, *et al*. Organoid-based neutralization assays reveal a distinctive profile of SARS-CoV-2 antibodies and recapitulate the real-world efficacy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(35): e2509616122.
[44] MURAKAMI K, TENGE VR, KARANDIKAR UC, *et al*. Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII. 3 human norovirus replication in human intestinal enteroids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(3): 1700 – 1710.
[45] LIN L, HAN J, YAN T, *et al*. Replication and transcriptionomic analysis of human noroviruses in human intestinal enteroids[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6): 3365 – 3374.
[46] OVERBEY KN, ZACHOS NC, COULTER C, *et al*. Optimizing human intestinal enteroids for environmental monitoring of human norovirus[J]. *Food Environ Virol*, 2021, 13(4): 470 – 484.
[47] NARWANKAR R, ESSEILI MA. Replication of human norovirus in human intestinal enteroids is affected by fecal sample processing[J]. *Viruses*, 2024, 16(2): 241.
[48] ETTAYEBI K, TENGE VR, CORTES-PENFIELD NW, *et al*. New insights and enhanced human norovirus cultivation in human intestinal enteroids[J]. *mSphere*, 2021, 6(1): e01136 – 20.
[49] ETTAYEBI K, KAUR G, PATIL K, *et al*. Insights into human norovirus cultivation in human intestinal enteroids[J]. *mSphere*, 2024, 9(11): e00448 – 24.
[50] HAGA K, ETTAYEBI K, TENGE VR, *et al*. Genetic manipulation of human intestinal enteroids demonstrates the necessity of a functional fucosyltransferase 2 gene for secretor-dependent human norovirus infection[J]. *mBio*, 2020, 11(2): e00251 – 20.
[51] HOSMILLO M, CHAUDHRY Y, NAYAK K, *et al*. Norovirus replication in human intestinal epithelial cells is restricted by the interferon-induced JAK/STAT signaling pathway and RNA polymerase II-mediated transcriptional responses[J]. *J Virol*, 2020, 94(2): e00823 – 19.
[52] LIN SC, QU L, ETTAYEBI K, *et al*. Human norovirus exhibits strain-specific sensitivity to host interferon pathways in human intestinal enteroids[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(38): 23782 – 23793.
[53] LIN SC, HAGA K, ZENG XL, *et al*. Generation of CRISPR-Cas9-mediated genetic knockout human intestinal tissue-derived enteroid lines by lentivirus transduction and single-cell cloning [J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(4): 1004 – 1027.
[54] HAGA K, ETTAYEBI K, TENGE VR, *et al*. Genetic manipulation of human intestinal enteroids demonstrates the necessity of a functional fucosyltransferase 2 gene for secretor-dependent human norovirus infection[J]. *mBio*, 2020, 11(2): e00251 – 20.
[55] SPENCE JR, MAYHEW CN, RANKIN SA, *et al*. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*[J]. *Nature*, 2011, 470(7332): 105 – 109.
[56] ZHANG DS, TAN M, ZHONG WM, *et al*. Human intestinal organoids express histo-blood group antigens, bind norovirus VLPs, and support limited norovirus replication[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 12621.
[57] SATO S, HISAIE K, KUROKAWA S, *et al*. Human norovirus propagation in human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(3): 686 – 688. e5.
[58] GHOSH S, KUMAR M, SANTIANA M, *et al*. Enteric viruses replicate in salivary glands and infect through saliva[J]. *Nature*, 2022, 607(7918): 345 – 350.
[59] KOSGEI SC, BIRCH ON, RODRIGUEZ RA, *et al*. Replication of human enteric viruses from wastewater in saliva cell lines[J]. *Sci Total Environ*, 2025, 991: 179915.
[60] TAUBE S, KOLAWOLE AO, HÖHNE M, *et al*. A mouse model for human norovirus[J]. *mBio*, 2013, 4(4): e00450 – 13.
[61] KENNEDY EA, KING KY, BALDRIDGE MT. Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1534.
[62] SANTISO-BELLÓN C, GOZALBO-ROVIRA R, BUESA J, *et al*. Replication of human norovirus in mice after antibiotic-mediated intestinal bacteria depletion[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18):

10643.
[63] WANG QH, HAN MG, CHEETHAM S, *et al*. Porcine noroviruses related to human noroviruses[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(12): 1874 – 1881.
[64] SEO DJ, JUNG D, JUNG S, *et al*. Experimental miniature piglet model for the infection of human norovirus GII[J]. *J Med Virol*, 2018, 90(4): 655 – 662.
[65] CHEETHAM S, SOUZA M, MEULIA T, *et al*. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs[J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10372 – 10381.
[66] SOUZA M, CHEETHAM SM, AZEVEDO MS, *et al*. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain)[J]. *J Virol*, 2007, 81(17): 9183 – 9192.
[67] SOUZA M, COSTANTINI V, AZEVEDO MS, *et al*. A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII.4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model[J]. *Vaccine*, 2007, 25(50): 8448 – 8459.
[68] CRAIG K, DAI X, LI A, *et al*. A lactic acid bacteria (LAB)-based vaccine candidate for human norovirus[J]. *Viruses*, 2019, 11(3): 213.
[69] CHEETHAM S, SOUZA M, MCGREGOR R, *et al*. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression[J]. *J Virol*, 2007, 81(7): 3535 – 3544.
[70] LEI SH, RAMESH A, TWITCHELL E, *et al*. High protective efficacy of probiotics and rice bran against human norovirus infection and diarrhea in gnotobiotic pigs[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1699.
[71] LEI SH, TWITCHELL EL, RAMESH AK, *et al*. Enhanced GII.4 human norovirus infection in gnotobiotic pigs transplanted with a human gut microbiota[J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(11): 1530 – 1540.
[72] JUNG K, WANG QH, CHANG KO, *et al*. Intestinal colonization with Escherichia fergusonii enhances infectivity of GII.12 human norovirus in gnotobiotic pigs[J]. *Virus Res*, 2023, 336: 199219.
[73] BUI T, KOCHER J, LI YR, *et al*. Median infectious dose of human norovirus GII.4 in gnotobiotic pigs is decreased by simvastatin treatment and increased by age[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 9): 2005 – 2016.
[74] JUNG K, WANG QH, KIM Y, *et al*. The effects of simvastatin or interferon-α on infectivity of human norovirus using a gnotobiotic pig model for the study of antivirals[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41619.
[75] KOCHER J, CASTELLUCCI TB, WEN K, *et al*. Simvastatin reduces protection and intestinal T cell responses induced by a norovirus P particle vaccine in gnotobiotic pigs[J]. *Pathogens*, 2021, 10(7): 829.
[76] LEI SH, RYU J, WEN K, *et al*. Increased and prolonged human norovirus infection in RAG2/IL2RG deficient gnotobiotic pigs with severe combined immunodeficiency[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25222.
[77] ANNAMALAI T, LU ZY, JUNG K, *et al*. Infectivity of GII.4 human norovirus does not differ between T-B-NK + severe combined immunodeficiency (SCID) and non-SCID gnotobiotic pigs, implicating the role of NK cells in mediation of human norovirus infection[J]. *Virus Res*, 2019, 267: 21 – 25.
[78] SEO DJ, JUNG D, JUNG S, *et al*. Experimental miniature piglet model for the infection of human norovirus GII[J]. *J Med Virol*, 2018, 90(4): 655 – 662.
[79] WYATT RG, GREENBERG HB, DALGARD DW, *et al*. Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk agent of epidemic viral gastroenteritis[J]. *J Med Virol*, 1978, 2(2): 89 – 96.
[80] JIANG BM, MCCLURE HM, FANKHAUSER RL, *et al*. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates[J]. *J Med Primatol*, 2004, 33(1): 30 – 33.
[81] ROCKX BHG, BOGERS WMJM, HEENEY JL, *et al*. Experimental norovirus infections in non-human primates[J]. *J Med Virol*, 2005, 75(2): 313 – 320.
[82] RIMKUTE I, CHAIMONGKOL N, WOODS KD, *et al*. A non-human primate model for human norovirus infection[J]. *Nat Microbiol*, 2024, 9(3): 776 – 786.
[83] SOUZA M, AZEVEDO MSP, JUNG K, *et al*. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus[J]. *J Virol*, 2008, 82(4): 1777 – 1786.
[84] HOWE K, CLARK MD, TORROJA CF, *et al*. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498 – 503.
[85] VAN DYCKE J, NY A, CONCEIÇÃO-NETO N, *et al*. A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(9): e1008009.
[86] VAN DYCKE J, CUVRY A, KNICKMANN J, *et al*. Infection of zebrafish larvae with human norovirus and evaluation of the *in vivo* efficacy of small-molecule inhibitors[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(4): 1830 – 1849.
[87] KIM S, VAIDYA B, CHO SY, *et al*. Human norovirus-induced gene expression biomarkers in zebrafish[J]. *J Food Prot*, 2022, 85(6): 924 – 929.
[88] KAGEYAMA N, NATSUKA S, HASE S. Molecular cloning and characterization of two zebrafish alpha(1,3) fucosyltransferase genes developmentally regulated in embryogenesis[J]. *J Biochem*, 1999, 125(4): 838 – 845.
[89] TAN MTH, GONG ZY, LI D. Use of zebrafish embryos to reproduce human norovirus and to evaluate human norovirus infectivity decay after UV treatment[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2023, 89(4): e00115 – 23.
[90] GOODY MF, SULLIVAN C, KIM CH. Studying the immune response to human viral infections using zebrafish[J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 46(1): 84 – 95.

编辑:刘卓越/接受日期:2026 – 04 – 15