

DOI: 10.13376/j.cbls/2021037

文章编号: 1004-0374(2021)03-0337-09

· 评述与综述 ·

SARS-CoV-2入侵细胞相关分子结构与机制的研究进展

李沛霖, 刘海英*

(中山大学生命科学学院, 基因功能与调控教育部重点实验室, 广州 510275)

摘要: 新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)疫情的迅速发展与其病原体新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)具有的高传播、高感染能力关系密切。这是一种新型β属冠状病毒, 为了探究其高传染性的原因, 并为治疗药物和防控疫苗的开发提供理论依据, 研究人员迅速展开了针对新型冠状病毒入侵细胞分子机制的研究, 并取得了较多进展。该文以新型冠状病毒表面的刺突糖蛋白(spike glycoprotein, S protein)和宿主细胞表面的血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)的相互作用为重点, 介绍了此病毒入侵细胞的分子结构与机制的最新研究进展, 总结了病毒入侵环节中潜在的药物靶点, 并对新型冠状病毒的研究提出了展望。

关键词: 新冠肺炎; 新型冠状病毒; 刺突糖蛋白; 血管紧张素转换酶2; 病毒入侵

中图分类号: Q51; R373.1 **文献标志码:** A

Advances in molecular structure and mechanism of SARS-CoV-2 invading cells

LI Pei-Lin, LIU Hai-Ying*

(MOE Key Laboratory of Gene Function and Regulation, School of Life Sciences,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The rapid spread of pandemic corona virus disease 2019 (COVID-19) is ascribed to the high transmissibility and infectivity of its pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). To better understand the characteristics of this novel β-coronavirus and lay the foundation for COVID-19 prevention and treatment, many researchers focused on the molecular structure and mechanism of SARS-CoV-2 invading into host cells, and have made considerable progress. Here, we systematically reviewed the progressions on the interaction between spike glycoprotein (S protein) of SARS-CoV-2 and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) of host cells. In this review, we introduced the molecular structures and invasion mechanism of SARS-CoV-2, summarized the potential drug targets during the virus invasion process, and finally provided a view on the future development of SARS-CoV-2 research.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; spike glycoprotein; ACE2; virus invasion

据美国约翰斯·霍普金斯大学发布的实时统计数据, 截至北京时间2020年10月22日15时整, 全球累计确诊新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19; 下文简称“新冠肺炎”)病例超过4 100万例, 累计死亡病例超过113万例^[1]。新冠肺炎是一种由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2; 下文简称“新冠病毒”)感染引发的传染性肺炎。新冠肺炎

患者以发热、乏力、干咳为主要表现, 鼻塞、流涕等上呼吸道症状少见, 会出现缺氧低氧状态。约半数患者在感染一周后出现呼吸困难, 大多数感染者症状较轻且预后良好, 多在一周后恢复, 只有少数

收稿日期: 2020-09-04; 修回日期: 2020-11-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81771506)

*通信作者: E-mail: liuhy5@mail.sysu.edu.cn

严重者会快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍,甚至最终导致死亡^[2]。据统计,严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)的致死率约为11%^[3],中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)的致死率约为34.4%^[4];根据约翰斯·霍普金斯大学发布的实时统计数据粗略计算,新冠肺炎的致死率大约为2.7%,远低于SARS和MERS。但新冠肺炎具有较高的感染与传播能力,这些特性与新冠病毒入侵细胞的分子机制密切相关^[5]。

新冠病毒是一种新型的乙型 β 属冠状病毒,其RNA序列最早于2020年1月12日公布。基于冠状病毒全基因组的系统发育分析显示,新冠病毒与SARS样类型冠状病毒的同源程度最高,其中与SARS病毒的同源性为79%,而与其紧密相关的为蝙蝠来源的两种冠状病毒, bat-SL-CoVZC45和 bat-SL-CoVZXC21, 同源性分别为87.6%和87.5%^[6]; bat-CoV-RaTG13与新冠病毒的同源性高达96.2%,为目前发现与新冠病毒关系最紧密的冠状病毒^[7]。与同属的病毒相比,新冠病毒的特征突出表现为低免疫性和高传播性:低免疫性造成了感染者恢复的缓慢和无症状感染者数目的激增,同时很可能在一定程度上促进了病毒传播性的增加;而高传播性与病毒表面的刺突糖蛋白(spike glycoprotein, S protein; 简称“S蛋白”)的结构以及功能紧密相关^[8]。新冠疫情暴发后,研究者们迅速对新冠病毒的S蛋白进行了研究,包括S蛋白的结构、S蛋白与受体ACE2结合的分子机制及其介导的病毒入侵过程^[9-10],并针对该入侵过程开展了药物和疫苗的研发^[11-12]。本文对新冠病毒S蛋白介导的病毒入侵的分子机制以及入侵过程中重要的潜在分子药物靶点的研究进展进行了综述。

1 新冠病毒结合及入侵的分子结构与机制

1.1 刺突糖蛋白的结构

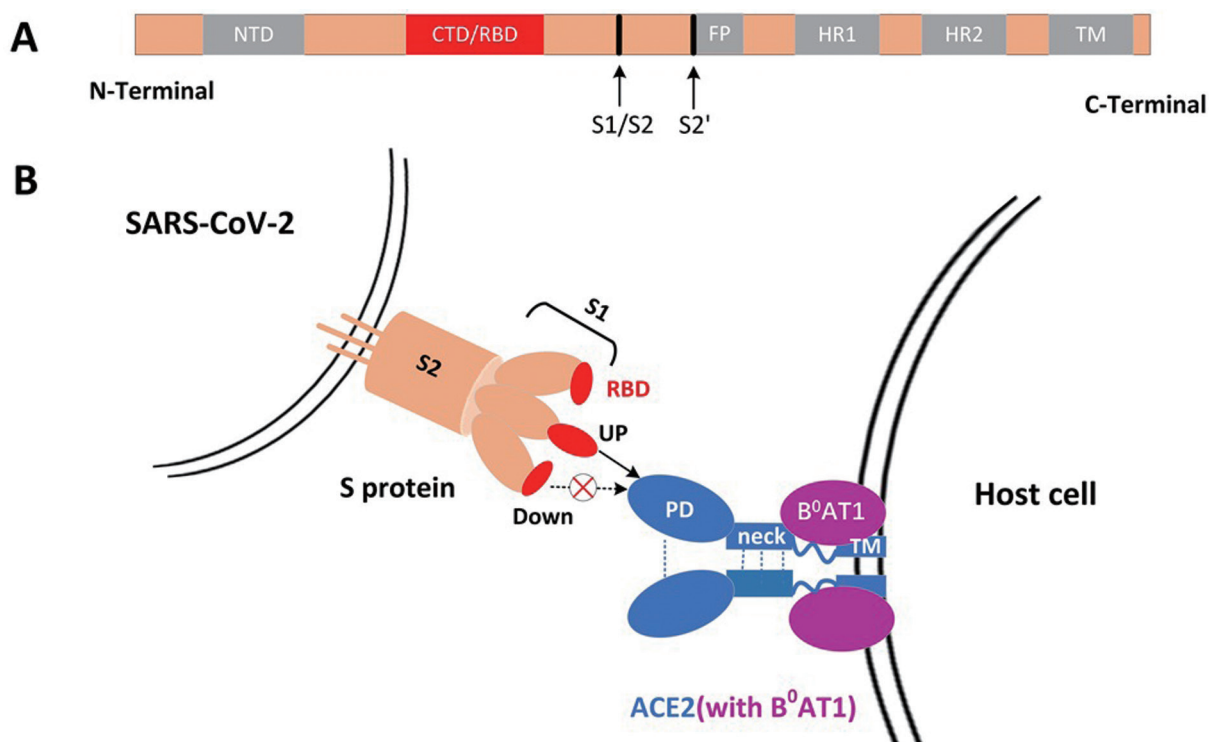
刺突糖蛋白,即S蛋白,是冠状病毒表面的膜融合蛋白。S蛋白与宿主细胞表面受体的结合涉及蛋白质构象的变化,因此解析S蛋白的结构是了解病毒入侵细胞的第一步,而基于已公布的病毒全基因组序列,S蛋白的结构、功能研究得以顺利推进。新冠病毒的S蛋白具有明显的 β 属冠状病毒S蛋白的结构特征^[9]:S蛋白分为S1和S2两个亚基。S1亚基包括N端结构域(amino-terminal domain, NTD)

和C端结构域(carboxy-terminal domain, CTD),其中CTD具有受体识别与结合的功能,也称为受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)。S2序列主要包括三个结构域:融合肽FP(fusion peptide)、七肽重复区1/2(heptad repeat-1/2, HR-1/2)。在S1与S2亚基之间以及S2内部分别存在酶切位点S1/S2和S2',此两位点的切割对新冠病毒从识别细胞向膜融合推进有重要意义。另外,S蛋白的C端还包含一个跨膜结构域TM(transmembrane)和胞质尾巴CT(cytoplasm tail)(图1A)。

为了解析新冠病毒S蛋白的三维结构,McLellan团队基于最早公布的新冠病毒基因组序列,在FreeStyle293细胞中成功表达了含1208个氨基酸残基的S蛋白胞外区域,并用冷冻电镜对该蛋白进行了观察^[9]。他们发现成熟的S蛋白以相对稳定的三聚体形式存在,S1亚基上的RBD结构域负责与宿主细胞的受体血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)结合。RBD结构与三聚体复合物的主体部分存在铰链状连接,使其可以处于“直立”和“躺下”两种状态。当RBD处于“直立”状态时,可以与受体ACE2结合;而若处于“躺下”状态时,则无法结合。在观察到的S蛋白三聚体三维结构中,仅有一个RBD处于“直立”状态,其他两个均处于无结合活性的“躺下”状态。在RBD与ACE2相结合的结构域中,新冠病毒的一些氨基酸残基与SARS病毒有所不同^[10],使得两种病毒的RBD与ACE2亲和力不同。表面等离子共振实验结果表明,新冠病毒RBD与ACE2结合的解离平衡常数 K_D 为44.2 nmol/L,而SARS病毒RBD与ACE2结合的解离平衡常数 K_D 为185 nmol/L,即前者与ACE2的亲和力约为后者的4倍,这与两种病毒在RBD-ACE2识别区的结构差异紧密相关^[13]。

1.2 ACE2-RBD复合物及RBD-ACE2识别区的结构

ACE2是一种I型膜蛋白,其正常功能是促进血管紧张素I转化为血管紧张素II,起到调控血管收缩和血压的作用,且广泛表达于肺、心脏、肾以及肠道中。此外,ACE2也是氨基酸转运蛋白 B^0AT1 的膜转运伴侣,实验表明 B^0AT1 会通过相互作用使ACE2稳定结合在细胞膜上。基于这一事实,西湖大学周强团队在293F细胞中同时表达了全长的 B^0AT1 和ACE2蛋白,并用冷冻电镜技术解析了 B^0AT1 -ACE2复合物的结构^[10]。 B^0AT1 -ACE2复合物中包含两个ACE2、两个 B^0AT1 。ACE2单体包含两个结构域:N端的PD(氨基酸序列19—615)和C端的



A: 新冠病毒S蛋白结构域组成示意图。B: S蛋白-ACE2-B⁰AT1三元复合物示意图。如图所示, 仅有处于“站立”构象的RBD才可与ACE2结合。

图1 新冠病毒S蛋白与ACE2结合模式图

CLD (616—768); 而后者包含单次跨膜结构域TM (726—768), 以及PD与TM之间的铁氧化还原蛋白样折叠结构域[也被称为“颈区(neck)” (616—726)]。ACE2通过“颈区”和TM区域与B⁰AT1结合, 形成异源二聚体。两个异源二聚体再通过ACE2的PD和“颈区”结合, 形成二聚化的ACE2-B⁰AT1异二聚体。在整个复合体中, 两个ACE2之间的“颈区”结合紧密, 而PD区域的结合较弱(仅有一对谷酰胺残基的相互作用), 因此该区域可在“开”和“关”的状态间转换。

为了研究新冠病毒 S蛋白与ACE2的结合, 研究人员在纯化的B⁰AT1-ACE2复合物中加入了S蛋白的RBD结构域, 得到了RBD-ACE2-B⁰AT1三元复合物^[10] (图1B)。冷冻电镜解析证实了ACE2的PD结构域正是RBD识别结合的位点。如前文所述, 新冠病毒的S蛋白以三聚体的形式存在, 其中2个RBD处于“躺下”型构象, 只有一个处于“直立”型构象的RBD才可以与PD结合, 且一个B⁰AT1-ACE2复合物上部的两个PD结构域推测可以分别结合一个S蛋白, 故最终形成的B⁰AT1-ACE2-S蛋白三元复合物包含一个(B⁰AT1-ACE2)₂复合物和两个S蛋白三聚体。该B⁰AT1-ACE2-S蛋白三元复合物模型还需要

实验进一步验证。

李放团队和王新泉团队则使用X射线衍射法解析了新冠病毒 RBD与ACE2识别区的精细结构^[13-14]。新冠病毒RBD具有由5股扭曲且反向平行的β折叠片(β1~β4、β7)组成的核心结构, 以及由短的β5、β6折叠片和α4、α5螺旋以及环组成的插入结构, 其中插入结构即为RBD与ACE2的关键结合区RBM (receptor binding motif)。研究证实, 相比SARS病毒, 新冠病毒部分氨基酸的改变一方面能使RBD的ACE2结合脊构象更为紧密, 能与ACE2的N端螺旋更好地结合; 另一方面, 产生了新的RBM-ACE2结合位点(如: 相比SARS病毒的Leu472, 新冠病毒相应的Phe486可插入ACE2的疏水口袋进而产生更强的接触), 并稳定了两个病毒结合热点位置。可见, 氨基酸差异导致的构象改变及结合位点的调整与稳定是新冠病毒RBD与ACE2亲和力更强的关键原因。

综上所述, 不同团队对新冠病毒 S蛋白识别ACE2的结构学研究获得了基本一致的结论^[8, 13-15], 包括: (1)新冠病毒与ACE2的结合依赖于前者S蛋白S1亚基中的RBD, 而RBD中的RBM是识别ACE2的关键部位, 新冠病毒与SARS病毒差异基本集中

在此；(2)新冠病毒RBD与ACE2的亲合力高于SARS病毒RBD；(3) SARS病毒RBD的中和抗体无法识别新冠病毒RBD，表明新冠病毒RBD具有特异性强的抗原表位，可作为抗体药物开发的重要靶点。

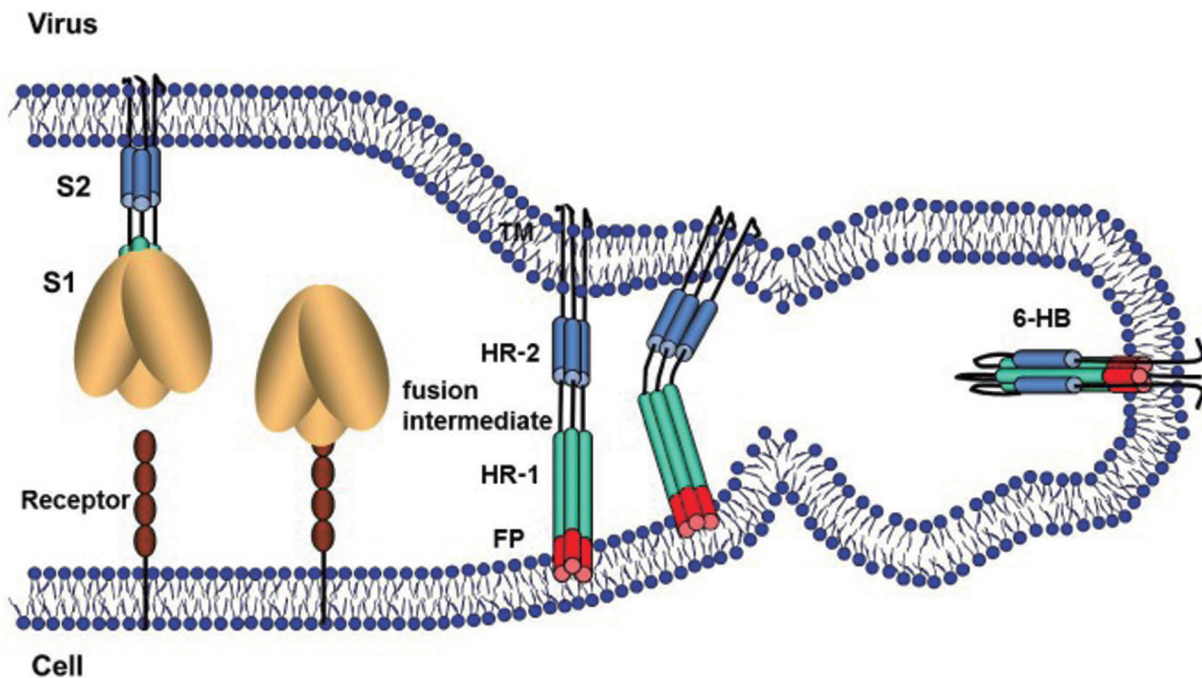
1.3 膜融合及内吞作用

当新冠病毒S1亚基的RBD成功识别并结合ACE2后，S2会经历构象转变进而执行膜融合功能。首先，RBD-ACE2的结合会诱发细胞表面蛋白酶TMPRSS2对S1/S2和S2'位点进行剪切^[16]，进而使S1片段从ACE2上脱离，S2片段内部的融合肽FP被暴露出来并插入宿主细胞膜；随后，S蛋白三聚体的HR-1三聚体与HR-2三聚体逐渐靠近以拉近病毒外膜与宿主细胞膜之间的距离；最终，形成HR-1、HR-2相间且反向平行排列的六螺旋束(6-helix-bundle, 6-HB)的膜融合后构象，使病毒在内吞作用下进入宿主细胞，释放遗传物质^[17](图2)。上述过程在多种β冠状病毒的入侵中被观察到，包括SARS病毒^[18]、MERS病毒^[19]。2020年，姜世勃以及石正丽团队的研究表明这种融合机制也存在于新冠病毒中^[20]。由此可见，以6-HB结构为核心的融合机制在β冠状病毒的入侵中发挥着保守且重要的作用，不仅可作为新冠病毒药物设计的基础，还是冠状病毒广谱药物研发的潜在靶点。

综上所述，冠状病毒与ACE2受体结合以后，入侵细胞还需要完成两个关键步骤：S蛋白的特异性酶切及构象变化(FP的暴露以及6-HB的形成)，这些同时也是影响病毒侵染能力的关键因素。因此，科研人员将新冠病毒病毒的这两个方面与SARS病毒进行了比较，进而寻找新冠病毒传染性强的原因。

一方面，李放团队对S蛋白切割相关的病毒入侵机制进行了研究^[8]。研究证实，在新冠病毒中，PPC (proprotein convertase, 蛋白质原转化酶)识别位点上存在的RRAR序列可以使S蛋白在病毒包装时被Furin蛋白酶识别并切割，产生预激活效应，提高病毒入侵细胞的能力。另有研究表明，其具体机制可能与Furin切割后形成的S1亚基C末端对宿主细胞NRP1/2 (neuropilin-1/2, 神经纤毛蛋白受体1/2)的识别有关^[21-22]。这一预激活效果可以与TMPRSS2以及组织蛋白酶B/L切割S1/S2、S2'位点对膜融合的激活效应相累加，降低新冠病毒的膜融合对细胞表面蛋白酶的依赖性，使其在TMPRSS2等蛋白酶表达较低的细胞中也能完成入侵^[8]。

另一方面，姜世勃、石正丽团队对S蛋白切割后的构象变化进行了研究^[23]。他们把表达新冠病毒S蛋白的细胞与表达ACE2的细胞共同培养，发现细胞会形成巨大的合胞体，而换成表达SARS病毒S蛋



冠状病毒入侵的膜融合机制，基本可分为三步(从左到右)：(1) S1亚基与细胞受体结合；(2) S蛋白被切割，S1亚基脱离，S2经历构象变化暴露出FP并插入细胞膜；(3) HR1三聚体与HR2三聚体拉近病毒与细胞间距离，最终形成6HB的融合后构象。

图2 冠状病毒入侵细胞膜融合示意图^[17]

白的细胞则不会有这种现象。这表明新冠病毒具有更强的膜融合能力。为了探究膜融合能力增强的机制,他们对新冠病毒的6-HB结构进行了序列及结构解析。结果表明,新冠病毒和SARS病毒在HR-1和HR-2上的同源性分别高达92%和100%;新冠病毒中HR-1膜融合核心区域有8个氨基酸残基发生了替换,而替换的氨基酸造成的结构以及极性的改变增强了HR-1与HR-2的相互作用,使得6-HB结构更加稳定,提高了病毒的膜融合能力。

1.4 存在的问题

虽然新冠病毒的RBD结构域对ACE2的高亲和力已经得到认可,但新冠病毒完整S蛋白与ACE2的结合能力类似甚至低于SARS病毒的完整S蛋白。这与S蛋白的RBD结构域所处构象有关:新冠病毒的S蛋白三聚体中更多的RBD处于“躺下”的构象,属于不可结合状态;而SARS病毒的RBD更多处于“直立”的构象,属于可结合状态。这一现象与新冠病毒具有更强的传染性不符。病毒通过什么机制来克服该“短处”尚不清楚。不过,从免疫的角度考虑,“躺下”的RBD结构免疫原性更低,更利于病毒逃避宿主细胞的免疫监视^[8]。

总体而言,相对于SARS病毒,支持新冠病毒传染性更强的证据有:第一,新冠病毒的S蛋白RBD对ACE2的亲合力更强;第二,新冠病毒的S蛋白S1/S2亚基之间具有Furin蛋白的识别位点,Furin蛋白对S蛋白的切割预激活可以增强新冠病毒侵染细胞的能力;第三,新冠病毒的HR-1与HR-2结合能力更强,6-HB结构更稳定,增强了病毒的膜融合能力。不利于新冠病毒入侵细胞之处在于S蛋白的

RBD大部分处于“躺下”的构象,不过该特征有利于病毒的免疫逃逸。与SARS病毒相比,保证了一定的细胞侵染能力,同时具备了免疫逃逸的属性,是新冠病毒传播能力更为突出的合理解释之一。

2 基于新冠病毒入侵细胞的潜在药物靶点

在新冠病毒入侵细胞的过程中,识别并结合细胞表面受体、S蛋白的酶切、蛋白质构象的变化以及细胞胞吞的过程不仅与病毒S蛋白的特异性紧密相关,还受到宿主细胞上多种分子,包括干扰素、蛋白酶、膜受体以及相关信号通路的调控。因此,针对这一入侵过程,病毒与宿主细胞上均存在有价值的药物靶点,可用于阻断新冠肺炎的进一步传播或治疗患者。目前,针对不同靶点的药物研究均取得了一定进展,各类型靶点在病毒入侵中发挥的作用以及相应的候选药物如表1所示。

2.1 针对病毒S蛋白的靶点

2.1.1 针对S蛋白-ACE2结合的靶点

特异性的中和抗体可直接阻断新冠病毒S蛋白与ACE2的结合,可作为临床上治疗感染患者的重要药物,故研究人员开展了从人源化小鼠以及康复患者中大规模寻找高亲和力的S蛋白中和抗体的工作^[11, 24, 26, 30-33]。针对S蛋白的中和抗体主要可分为两类:(1)靶向RBD位点的抗体,可竞争性地阻断RBD-ACE2的结合;(2)靶向非RBD位点的抗体,通过改变S蛋白三聚体构象或增加空间位阻抑制RBD-ACE2的结合。研究发现,使用单一类型抗体容易产生抗性突变体株,因此针对不同表位抗体的联合使用在临床治疗感染患者中具有重要价值^[30]。研究

表1 各类型靶点在新冠病毒入侵中发挥的功能及相应的候选药物

靶点类型	名称	在新冠病毒入侵中的作用	候选药物
病毒S蛋白	S1亚基RBD	识别宿主细胞ACE2	REGN-COV2 ^[24] 、 mNb6-tri ^[25] 、H014 ^[11] 等
	S1亚基非RBD位点	与S蛋白三聚体的构象以及RBD的可接触性有关	4A8 ^[26]
蛋白酶	HR-1/2	拉近病毒与细胞距离,启动膜融合	EK1C ^[23]
	TMPRSS2/TMPRSS4	切割S1/S2、S2'位点,促进膜融合	Camostat ^[27]
	Cathepsin L	切割S1/S2、S2'位点,促进膜融合	E-64d ^[27] 、Glycopeptide antibiotics ^[28] 等
	Furin	切割PPC位点,预激活S蛋白	Naphthofluorescein、 CMK ^[29] 等
细胞因子	IFN1/IFNIII	提高细胞膜表面的ACE2表达;参与抗病毒免疫过程	暂无报道
PI(3,5)P ₂ 信号通路	PIKfyve	合成PI(3,5)P ₂ ,介导含有病毒的早期内体向晚期内体转化	Apilimod ^[27]
	TPC2	作为PI(3,5)P ₂ 信号的效应钙离子通道,可促进病毒的入侵	Tetrandrine ^[27]
膜受体	NRP1/2	与Furin剪切后的S1片段结合,提高病毒入侵能力	EG00229 ^[22]

人员对从人源化小鼠和康复患者中筛选出的8种高效中和抗体进行鸡尾酒疗法实验,证实了由抗体REGN10987和REGN10933组成的联合抗体REGN-COV2可与S蛋白上非重叠的表位高亲和力结合,有效避免了病毒的突变逃逸,其效果也已在预防和治疗恒河猴、仓鼠的新冠病毒感染的实验中被证实^[24, 33]。Veesler团队从新冠肺炎康复患者的记忆B细胞中筛选出了两种抗体S2E12与S2M11, S2E12与S2M11组合可通过竞争性抑制S蛋白与ACE2结合、将S蛋白三聚体锁定在封闭状态(RBD均为“躺下”构象)、产生Fc介导的抗体依赖细胞毒性效应等多种机制发挥中和病毒的作用,且这种组合已在动物水平上被证实能抵抗新冠病毒的感染^[34]。

人工合成药物可通过三种机制阻断S蛋白-ACE2结合:(1)充当ACE2的诱饵分子;(2)靶向S蛋白的关键结合表位;(3)将病毒RBD稳定在无结合能力的“躺下”构象。Silva团队从头合成并筛选出了一种蛋白诱饵分子CTC-445.2,其二价体形式与新冠病毒的解离平衡常数低于3.5 nmol/L,单一鼻内预防性剂量注射可抵抗致死性剂量病毒对仓鼠的感染^[35]。通过整合ACE2的螺旋结构以及用旋转异构体相互作用场寻找RBD表面不同结合区域的先后策略,Baker团队则从头设计合成了大量竞争性抑制RBD-ACE2结合的小蛋白,并筛选出了几种亲和力高、结合稳定的设计物,它们抑制病毒入侵的 IC_{50} 值均处于24 pmol/L到35 nmol/L之间^[36]。2020年,不同团队通过蛋白质组学与结构分析技术筛选出了多种通过不同表位结合S蛋白的纳米抗体^[25, 37]。其中,Walter团队发现的Nb6可将病毒RBD锁在“躺下”的构象^[25],由此合成的Nb6三价体mNb6-tri与新冠病毒S蛋白的亲和力以及中和病毒感染的能力分别可以达到飞摩尔级和皮摩尔级,且可以在冻干、雾化、加热条件下保持稳定性,因此具有较高的临床潜在应用价值;Shi团队则从骆驼中筛选出了5类靶向S蛋白不同表位的纳米抗体,并合成了靶向同表位或不同表位的抗体组合体^[37],组合抗体中和病毒的 IC_{50} 可低至0.058 ng/mL。

虽然目前动物和临床实验药物仍是以中和抗体为主,但纳米抗体、蛋白诱饵等分子体积小、靶向精确、设计灵活性高且功能稳定的优势使其能作为预防和治疗新冠肺炎的候选药物^[38],并在未来有良好的发展前景。

2.1.2 针对病毒HR亚基的靶点

如上所述,S2亚基的HR-1、HR-2形成的6-HB

结构是新冠病毒发生病毒-细胞膜融合的基础,且新冠病毒的HR-1、HR-2结合能力更强,因此抑制HR亚基结合的药物具有一定的治疗潜力。姜世勃团队曾通过改造冠状病毒CoV-OC43的HR-2的特定片段研发出了一种名为EK1的抑制剂^[39]。EK1能够与HR-1结合,进而抑制6-HB结构的形成,阻断冠状病毒的入侵。EK1能够抑制多种 β 属冠状病毒的感染,包括SARS病毒、MERS病毒。2020年,该团队的研究表明,EK1也能阻断新冠病毒的入侵;他们还将EK1进行改造,得到了脂肽EK1C,其对新冠病毒具有更强的抑制效果,其中抑制效果最强的EK1C4抑制膜融合与假病毒入侵的 IC_{50} 分别为1.3 nmol/L和15.8 nmol/L,抑制效果分别是EK1的242倍和150倍;EK1C同时也对其他冠状病毒,如SARS病毒和MERS病毒,有相似的抑制效果^[23]。上述结果表明,EK1C是目前比较有潜力的广谱抗冠状病毒的候选药物。

2.2 针对宿主蛋白酶的靶点

已有的研究表明,在S蛋白识别ACE2受体后,丝氨酸蛋白酶TMPRSS2会对新冠病毒的S蛋白进行切割,激活膜融合反应^[16]。然而,2020年,Ding团队通过小鼠和细胞模型实验证实TMPRSS2和TMPRSS4(同家族的另一种丝氨酸蛋白酶)可协同作用增强新冠病毒对肠上皮细胞的入侵能力^[40]。组织蛋白酶L是一种pH依赖性的溶酶体蛋白酶,其对S蛋白的剪切作用可介导SARS病毒通过膜融合进入内体的过程^[41]。此前张辉教授团队已证实替考拉宁(一种糖肽类抗生素)可通过抑制组织蛋白酶L的活性进而阻断MERS病毒、SARS病毒以及埃博拉病毒(Ebola virus)对细胞的入侵^[28],而组织蛋白酶促进病毒入侵的机制在新冠病毒中同样存在^[42]。因此,抑制TMPRSS2、TMPRSS4以及组织蛋白酶L的活性在理论上可以有效阻止病毒的入侵。临床药物卡莫司他(Camostat mesylate)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,可以抑制TMPRSS2的活性,而E-64d是组织蛋白酶L的抑制剂。实验表明,Camostat和E-64d都可以有效抑制病毒对细胞的入侵,不过其作用在动物或人体水平是否有效尚待验证^[27]。

2.3 针对PIP2信号通路的靶点

新冠病毒入侵细胞主要通过胞吞的方式,干涉细胞的胞吞功能也可以抑制病毒的入侵。磷酸激酶PIKfyve和TCP2是调控胞吞的两个重要靶标分子。在早期内体中,PIKfyve是合成 $PI(3,5)P_2$ 的主要酶,而磷脂酰肌醇二磷酸 $PI(3,5)P_2$ 是调节早期吞饮泡转

化为晚期吞饮泡的关键分子。双孔通道蛋白亚型2 (TCP2)则是位于溶酶体上的PI(3,5)P₂下游效应分子。研究发现, PIKfyve的抑制剂阿匹莫德和YM201636, 以及TCP2的抑制剂汉防己甲素, 均可以有效抑制假病毒颗粒的入侵^[27]。这表明PI(3,5)P₂通路的相关分子是潜在的新冠病毒药物开发靶点。

2.4 针对干扰素的靶点

干扰素是特定诱导剂刺激后细胞表达分泌的一类糖蛋白型细胞因子, 在机体抵抗病毒的过程中发挥重要作用, 其主要机制是通过调节干扰素刺激基因(ISG)的表达, 产生具有抗病毒活性的蛋白。例如, 干扰素雾化治疗常被用于治疗病毒引起的呼吸道疾病。新冠疫情发生后, Shalek团队在细胞水平上的研究发现, 干扰素可以上调细胞表面蛋白ACE2的表达, 从而促进新冠病毒的入侵^[43]。该发现解释了临床上干扰素治疗新冠肺炎患者效果差异很大的原因, 且提示新冠肺炎治疗过程中干扰素的使用要更慎重; 同时, 研究人员还利用这一机制分析不同组织受干扰素诱导表达ACE2的水平以推断易感染部位, 结果表明II型肺泡上皮细胞、鼻杯状分泌细胞和回肠内的部分细胞表达的ACE2水平最利于新冠病毒的感染。另一项关于人体ACE2表达水平的研究也有相近结论^[44], 解释了新冠病毒为何主要通过呼吸系统和消化系统感染人体。此外, 研究还表明, 在病毒感染后, 持续的I型和III型干扰素过量表达会破坏肺上皮屏障^[45-46], 且降低其自我修复能力, 进而延缓新冠肺炎患者的康复时间, 甚至增加疾病严重程度和易感性。虽然如此, 干扰素在病毒感染后参与的固有免疫反应也是不可忽视的。研究表明, 先天的干扰素缺陷患者(患者体内具有识别自身干扰素的抗体)感染新冠肺炎后会受到更大的生命威胁^[47-48]。这些研究均暗示干扰素相比其他免疫因子, 可能是新冠肺炎患者临床治疗和康复中复杂且重要的可干预位点。

3 展望

经过一年多时间, 研究人员在新冠病毒S蛋白结构及其入侵细胞机制的研究中取得了一定进展, 部分解释了新冠病毒的低免疫性和高传播性特点, 同时也逐渐认识到新冠病毒在传播、感染能力上区别于其他冠状病毒的特性仅用病毒的结构差异来解释是不够的, 因此研究重点逐渐从对病毒与细胞识别结构(ACE2-RBD)的解析转向了对细胞表面分子或其他受体对病毒的识别与剪切、修饰作用, 但目

前人们对新冠病毒与不同宿主细胞间复杂的蛋白质-蛋白质互作机制的了解仍是有限的。尽管如此, 对入侵机制的研究还是极大地促进了对新冠病毒复制、致病、免疫响应等机制以及相关药物靶点的研究。因此, 未来新冠病毒的基础研究可从两面入手。一方面, 新冠病毒具有特殊性, 需要寻找更多新冠病毒特异存在的病毒-宿主互作机制, 以阐明该病毒具有突出感染、传播能力的原因, 促进靶向药物的开发。另一方面, 新冠病毒也具有β属冠状病毒的典型特点, 因此可将新冠病毒加入到不同冠状病毒的比较进化学研究中, 通过对入侵、复制、致病等不同机制的比较, 寻找适用于开发广谱药物的保守性位点。这不仅对相关领域的发展具有长远的意义, 而且有助于更加深入地理解病毒生物学特性, 是研发冠状病毒广谱药物以避免疫情再度爆发的重要途径。

[参 考 文 献]

- [1] 美国约翰斯·霍普金斯大学疫情实时监测系统[EB/OL]. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
- [2] Huang C, Wang Y, Li X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China (vol 395, pg 497, 2020). *Lancet*, 2020, 395: 496
- [3] 世界卫生组织关于SARS的统计数据[EB/OL]. <https://www.who.int/csr/SARS/en/>
- [4] 世界卫生组织关于MERS的统计数据[EB/OL]. <https://www.who.int/emergencies/MERS-cov/en/>
- [5] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579: 265-9
- [6] Lu RJ, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, 395: 565-74
- [7] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579: 270-3
- [8] Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 11727-34
- [9] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367: 1260-3
- [10] Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, 367: 1444-8
- [11] Lv Z, Deng YQ, Ye Q, et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science*, 2020, 369: 1505-9
- [12] Wang H, Zhang Y, Huang B, et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell*, 2020, 182: 713-21.e9

- [13] Shang J, Ye G, Shi K, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, 581: 221-4
- [14] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020, 581: 215-20
- [15] Wang Q, Zhang Y, Wu L, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 2020, 181: 894-904.e9
- [16] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, 181: 271-80.e8
- [17] Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*, 2012, 4: 557-80
- [18] Liu SW, Xiao GF, Chen YB, et al. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*, 2004, 363: 938-47
- [19] Lu L, Liu Q, Zhu Y, et al. Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor. *Nat Commun*, 2014, 5: 3067
- [20] Xia S, Zhu Y, Liu MQ, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17: 765-7
- [21] Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 2020, 370: 856-60
- [22] Daly JL, Simonetti B, Klein K, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 2020, 370: 861-5
- [23] Xia S, Liu M, Wang C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*, 2020, 30: 343-55
- [24] Baum A, Ajithdoss D, Copin R, et al. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science*, 2020: eabe2402
- [25] Schoof M, Faust B, Saunders RA, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*, 2020, 370: 1110-5
- [26] Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*, 2020, 369: 650-5
- [27] Ou X, Liu Y, Lei X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*, 2020, 11: 1620
- [28] Zhou N, Pan T, Zhang J, et al. Glycopeptide antibiotics potently inhibit cathepsin L in the late endosome/lysosome and block the entry of Ebola virus, Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), and severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). *J Biol Chem*, 2016, 291: 9218-32
- [29] Cheng YW, Chao TL, Li CL, et al. Furin inhibitors block SARS-CoV-2 Spike protein cleavage to suppress virus production and cytopathic effects. *Cell Rep*, 2020, 33: 108254
- [30] Baum A, Fulton BO, Wloga E, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*, 2020, 369: 1014-8
- [31] Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science*, 2020, 369: 643-50
- [32] Wec AZ, Wrapp D, Herbert AS, et al. Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies. *Science*, 2020, 369: 731-6
- [33] Hansen J, Baum A, Pascal KE, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science*, 2020, 369: 1010-4
- [34] Tortorici MA, Beltramello M, Lempp FA, et al. Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. *Science*, 2020, 370: 950-7
- [35] Linsky TW, Vergara R, Codina N, et al. *De novo* design of potent and resilient hACE2 decoys to neutralize SARS-CoV-2. *Science*, 2020, 370: 1208-14
- [36] Cao L, Goresnik I, Coventry B, et al. *De novo* design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *Science*, 2020, 370: 426-31
- [37] Xiang Y, Nambulli S, Xiao Z, et al. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science*, 2020, 370: 1479-84
- [38] Cannalire R, Stefanelli I, Cerchia C, et al. SARS-CoV-2 entry inhibitors: small molecules and peptides targeting virus or host cells. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 5707
- [39] Xia S, Yan L, Xu W, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav4580
- [40] Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol*, 2020, 5: eabc3582
- [41] Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11876-81
- [42] Liu T, Luo S, Libby P, et al. Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. *Pharmacol Ther*, 2020, 213: 107587
- [43] Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*, 2020, 181: 1016-35.e19
- [44] Li MY, Li L, Zhang Y, et al. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty*, 2020, 9: 45
- [45] Broggi A, Ghosh S, Sposito B, et al. Type III interferons disrupt the lung epithelial barrier upon viral recognition. *Science*, 2020, 369: 706-12
- [46] Major J, Crotta S, Llorian M, et al. Type I and III interferons

- disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. *Science*, 2020, 369: 712-7
- [47] Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020, 370: eabd4585
- [48] Zhang Q, Bastard P, Liu Z, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 2020, 370: eabd4570