

· 药学前沿 ·

## 冠状病毒免疫逃逸机制研究进展

王荣花<sup>1#</sup>, 郑志慧<sup>1#</sup>, 张雨茜<sup>1</sup>, 闵锐<sup>1</sup>, 朱英<sup>1</sup>, 张评浒<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>扬州大学医学院转化医学研究院, 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 扬州 225009;

<sup>2</sup>扬州大学, 江苏省人兽共患病重点实验室, 扬州 225009)

**摘要** 冠状病毒是人和动物的重要致病原, 其中新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)给人类健康带来了致命威胁。宿主固有免疫反应是宿主抵抗病原体入侵的第一道防线, 但过激的免疫应答也会加重病毒感染和病理损伤。病毒免疫逃逸是冠状病毒的重要致病机制。本文主要从宿主免疫传感器、干扰素、细胞因子和冠状病毒免疫逃逸方面重点阐述了冠状病毒的致病机制, 以为抗冠状病毒药物的研发提供理论参考。

**关键词** 冠状病毒; COVID-19; 新型冠状病毒肺炎; 宿主固有免疫反应; 免疫逃逸; 免疫传感器; 干扰素; 细胞因子

中图分类号 R392.3 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)01-0001-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20210101

引用本文 王荣花, 郑志慧, 张雨茜, 等. 冠状病毒免疫逃逸机制研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 1-9.

Cite this article as: WANG Ronghua, ZHENG Zhihui, ZHANG Yuqian, *et al.* Progress of research on immune escape mechanism of coronavirus[J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(1): 1-9.

## Progress of research on immune escape mechanism of coronavirus

WANG Ronghua<sup>1#</sup>, ZHENG Zhihui<sup>1#</sup>, ZHANG Yuqian<sup>1</sup>, MIN Rui<sup>1</sup>, ZHU Ying<sup>1</sup>, ZHANG Pinghu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Geriatric Disease Prevention and Control of Jiangsu Province, Institute of Translational Medicine, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009; <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract** Coronavirus is an important pathogen of humans and animals. Among them, the novel coronavirus disease (COVID-19) breaking out in 2019 has brought a fatal threat to human health. The host's innate immune response is the host's first line of defense against pathogen invasion, but an excessive immune response can also aggravate viral infection and pathological damage. The immune escape of coronavirus is a critical pathogenic mechanism causing death. This work mainly reviews the pathogenic mechanism of coronavirus immune escape from several aspects such as host immunosensor, interferon, cytokine and coronavirus antagonizing host immune response, which provide a theoretical reference for the development of anti-coronavirus drugs.

**Key words** coronavirus; COVID-19; novel coronavirus pneumonia; host innate immune response; immune escape; immunosensor; interferon; cytokines

This study was supported by the Advanced Innovative Talents Project of Yangzhou University (No. 20180613) and the Open Project from Jiangsu Provincial Key Laboratory of Human Zoonosis (No. R1707)

\*WANG Ronghua and ZHENG Zhihui contributed equally to this work

冠状病毒(coronavirus, CoV)是具有囊膜的单股正链RNA病毒,囊膜表面覆有12~24 nm的棒状突起,形如花冠,故称冠状病毒。冠状病毒属于尼多病毒目冠状病毒科,根据基因组结构相似性及

收稿日期 2020-12-29 \*通信作者 Tel:17851976185 E-mail:zhangpinghu@163.com

基金项目 扬州大学高端创新人才资助项目(No. 20180613);江苏省人兽共患病学重点实验室开放课题资助项目(No. R1707)

#王荣花和郑志慧为共同第一作者

血清型不同,主要分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$  4个属。其中, $\alpha$ 属主要包括人冠状病毒(human coronavirus, HCoV-229E和HCoV-NL63)、猪传染性腹泻病毒(porcine epidemic virus, PEDV)及犬冠状病毒(canine coronavirus, CCoV)等。 $\beta$ 属主要包括2019年暴发的新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)、严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征(middle east respiratory syndrome, MERS)及小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)等。 $\gamma$ 属主要包括传染性支气管炎病毒(infection bronchitis virus, IBV)。 $\delta$ 属主要包括猪 $\delta$ 冠状病毒(porcine delta-coronavirus, PDCoV)<sup>[1]</sup>。

现已研究表明,与其他已知病毒相似,冠状病毒侵入宿主也主要通过宿主细胞表面的膜受体介导。随着近年来基因敲除技术与分子靶点技术的进步,多种介导冠状病毒入侵宿主的蛋白受体被发现,其中 $\alpha$ 属HCoV-229E和 $\delta$ 属PDCoV等冠状病毒主要通过宿主细胞表面的氨基肽酶N(amino-peptidase N, APN)受体介导入侵细胞,而SARS-CoV-2和SARS-CoV等 $\beta$ 属冠状病毒主要通过其囊膜表面的S刺突蛋白与宿主细胞膜表面的ACE2受体相结合而侵入宿主纤毛支气管上皮细胞和II型肺泡细胞<sup>[2-3]</sup>。最近研究证实,虽然SARS-CoV-2和SARS-CoV都是通过ACE2受体介导入侵宿主,但因S刺突蛋白受体结合区(receptor binding domain, RBD)存在氨基酸差异,SARS-CoV-2病毒与ACE2受体结合的亲和力比SARS-CoV高10~20倍,这可能是SARS-CoV-2比2003年流行的SARS-CoV更具传染性和致病性的主要原因之一<sup>[4]</sup>。与上述两种 $\beta$ 属冠状病毒不同,中东地区流行的MERS-CoV主要以二肽酰酶4(DPP4/CD26)为受体入侵宿主细胞<sup>[5]</sup>。此外, $\gamma$ 属冠状病毒IBV可通过多种受体入侵宿主细胞,目前已发现硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)、唾液酸以及APN 3种受体都可介导其感染宿主。除上述已证实的介导冠状病毒入侵宿主细胞的受体外,还有很多次要分子在介导冠状病毒感染宿主过程中发挥重要作用。例如最新的研究发现,SARS-CoV-2还可利用丝氨酸蛋白酶TMPRSS2激活S蛋白增强其与细胞表面的ACE2受体结合,从而增强其入侵宿主的概率<sup>[6]</sup>。随着科

学技术的进步,有关介导冠状病毒入侵宿主的受体将被逐一揭示。

冠状病毒为直径为60~220 nm的正链RNA病毒,其RNA长度为27~32 kb,5'端带有甲基化帽状结构,3'端具有多聚腺苷核糖核酸尾(PolyA),主要分为复制酶编码区和结构蛋白编码区。在受体介导下冠状病毒通过膜融合途径将携带的病毒RNA释放入宿主细胞中,首先通过复制酶编码区翻译成RNA依赖的RNA聚合酶,随即在RNA聚合酶作用下,以病毒基因组为模板合成负链RNA,然后再通过负链RNA合成新的病毒基因组和亚基因组,起始子代病毒和病毒基因组的合成。冠状病毒的5'端2/3部分的复制酶编码区含有2个关键开放阅读框(open reading frames, ORFs), ORF1a和ORF1b,它们可通过不同的剪切编码16个保守的非结构蛋白(nsp1-nsp16),其基因组后1/3部分主要编码4个结构蛋白:刺突蛋白(spike protein, S)、包膜蛋白(envelope protein, E)、膜糖蛋白(membrane glycoprotein, M)和核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N)<sup>[7]</sup>。S蛋白介导病毒与宿主细胞表面受体的特异性结合及与细胞膜的融合,促进病毒入侵;E蛋白和M蛋白主要参与病毒组装、出芽及包膜形成,而N蛋白主要通过参与冠状病毒RNA基因组结合保护病毒RNA的稳定性<sup>[8]</sup>。但有关新冠病毒的相关蛋白在其感染宿主与复制过程中扮演何种角色还有待深入研究。

冠状病毒入侵宿主引发过激的免疫反应是其临床高致死性的主要致病机制。现有的研究表明冠状病毒感染宿主后释放的病毒基因组及相关的病毒蛋白会被宿主细胞中的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)所识别,而宿主细胞感知病原微生物入侵后会通过调控体内免疫信号通路诱导如I型干扰素(interferon I, IFN-I)、促炎因子及多种抗病毒基因的表达而抑制病毒复制。然而,为对付宿主这种先天性抗病毒免疫反应,多数种类的冠状病毒在感染宿主的长期进化过程中逐渐形成了一套复杂的免疫逃逸机制,或通过自身编码的蛋白拮抗或延迟宿主抗病毒干扰素系统的表达<sup>[9]</sup>。鉴于此,本文对冠状病毒逃避宿主先天性免疫的致病机制进行了归纳总结,以期对人类防治冠状病毒及抗新冠病毒药物的研发提供理论参考。

## 1 宿主先天免疫传感器

天然免疫反应是机体在长期进化过程中形成的抵抗外源微生物入侵的第一道屏障。作为宿主固有免疫体系不可或缺的模式识别受体 PRR 在机体抵抗病原微生物感染过程中扮演关键作用。机体受到病原微生物感染后,细胞中的 PRR 能特异性识别病原微生物的携带的如细菌脂多糖、肽聚糖、脂蛋白、鞭毛蛋白、病毒双链 RNA、非甲基化 CpG DNA 等病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),进而诱导先天性免疫信号级联反应,继而启动宿主的先天性免疫反应<sup>[10]</sup>。目前研究发现哺乳动物中 Toll 样受体(toll like receptors, TLRs)和 RIG-I 样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)是介导宿主抵抗外源微生物感染的关键 PRR,两者在诱导宿主 IFN 等细胞因子表达中发挥关键作用。

### 1.1 Toll 样受体及其信号通路

TLRs 是一种跨膜蛋白模式识别受体,其胞内区含有 TLRs 和白细胞介素 1(IL-1)受体家族特有的结构域 TIR,其包外区含有富含亮氨酸重复序列,这是决定其特异性的关键结构域。TLRs 在细胞中的位置决定了它们识别不同 PAMP 的功能,内体中的 TLRs 主要负责识别核酸,如 TLR7/8 主要识别单链 RNA(ssRNA)、TLR9 主要识别 CpG DNA,而质膜上的 TLRs(TLR1 和 TLR2)主要负责识别病毒的蛋白和脂质等成分<sup>[11]</sup>。TLRs 介导的信号通路需要接头蛋白的参与,TLR7、TLR8 依赖髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)途径传递下游信号;TLR3 通过  $\beta$  干扰素结构域衔接蛋白(TIR domain containing adaptor inducing interferon  $\beta$ , TRIF)发挥作用<sup>[12]</sup>。TLR7 或 TLR8 与其特异性配体结合后,招募 MyD88 至其 TIR 结构域并与其相互作用,随即 TLR-MyD88 复合物募集 IL-1 受体相关激酶(IL-1R-associated kinase, IRAK),使其磷酸化而被激活。活化的 IRAK 与肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)结合并激活下游效应子,从而引起一系列细胞因子和 IFN 刺激基因(interferon stimulated genes, ISGs)的表达<sup>[13]</sup>。TLR3 通过 TRIF 通路招募肿瘤坏死因子受体相关因子 3(TRAF3)并使其活化,活化的 TRAF3 将信号传递

给下游的 TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TBK1)和激酶 IKK $\epsilon$ (I- $\kappa$ B kinase  $\epsilon$ ),激活干扰素转录因子 7(interferon regulatory factor, IRF7),活化的 IRF7 进入细胞核,诱导 IFN 的表达<sup>[14]</sup>。研究表明 TLRs 在限制冠状病毒复制和启动机体免疫应答中发挥关键作用。例如缺乏 TLR3 或 TLR4 的小鼠更容易感染 SARS-CoV,且与野生型小鼠相比,MyD88 缺失小鼠体重下降明显,病毒载量更高,肺部损伤程度也更显著,并于感染后第 6 天死亡<sup>[15]</sup>。全面分析所有 TLRs、TLRs 配体及 TLRs 转接分子在宿主固有免疫反应中的作用,不仅可以阐明 TLRs 途径对冠状病毒复制的影响,还有利于为抗冠状病毒药物的研发提供新策略。

### 1.2 RIG-I 样受体及其信号通路

RLRs 是一种细胞质传感器,包括 RIG-I、黑素瘤分化相关基因 5(melanoma differentiation factors 5, MDA5)和 LGP2(laboratory of genetics and physiology 2)3 种类型,此类传感器可特异性识别细胞中的多种病毒 dsRNA。RIG-I 含有 2 个 N 端招募激活结构域(caspase activation and recruitment domain, CARDs)、1 个中间解旋酶核心和 1 个 C 端结构域(c-terminal domain, CTD),其中间解旋酶核心区含有解旋酶结构 1(helicase 1, Hel-1)、解旋酶结构 2(helicase 2, Hel-2)和中间插入区(helicase 2i, Hel-2i)<sup>[16]</sup>。CARDs 是 RIG-I 的效应区,未受到刺激时, CARDs 与 Hel-2i 作用以保持抑制状态,而受到病毒感染时, CTD 可识别 dsRNA 并与之结合,随后 dsRNA-CTD 与 Hel-2i 交互,释放出游离的 CARDs,进而激活 RIG-I/MDA5,活化后的 RIG-I/MDA5 募集线粒体抗病毒相关蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)而发挥促进炎症因子的表达效应。MAVS 一方面可进一步招募 TRAF、TBK1 等,促进 IFN 调节因子 3/7(interferon regulatory factor 3 and 7, IRF3/7)磷酸化及二聚体形成;另一方面, MAVS 可与 TRAF-2/6 发生作用,激活核转录因子  $\kappa$ B(nuclear transcription factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),活化的 NF- $\kappa$ B 和 IRF3/IRF7 易位至细胞核与其他转录因子结合形成转录增强子,促进 IFN 和炎症因子的表达<sup>[17-18]</sup>。此外,虽然现已研究发现的 RIG-I 样受体主要通过上述信号传导通路发挥调控宿主抵抗外源微生物感染的作用,但即使是针对同一病原,在不同细胞类型也可由不同的 RIG-I 样受体介

导。例如在脑巨噬细胞和小胶质细胞中MHV可被MDA5识别,而在少突胶质细胞中可被RIG-I和MDA5同时识别<sup>[19]</sup>。近期研究发现RLRs能有效识别冠状病毒并诱导宿主产生过激IFN和促炎因子,这对早期控制新冠病毒的复制与扩散具有极其重要的作用,但目前有关RLRs如何识别冠状病毒及感染早期宿主如何启动炎症因子的转录表达的作用机制尚不清楚,尤其是哪些类型的炎症因子发挥抗病毒与抗炎的有益效应尚未阐明。此外,不同类型的冠状病毒例如SARS-CoV-2、SARS-CoV和MERS-CoV等感染后介导RLRs诱导细胞因子产生的强弱作仍不清楚,还有待进一步深入研究。

## 2 宿主的先天抗病毒免疫反应

### 2.1 干扰素

先天性免疫反应是机体抗冠状病毒感染的第一道防线。IFN-I是宿主抗病毒的先天性免疫调节因子,当细胞受到病毒感染时,IFN主要通过与其效应细胞表面的膜受体(IFNAR1和IFNAR2)结合,进而激活酪氨酸激酶与活化转录因子(janus kinases (JAKs)-signal transducer and activator of transcription (STAT), JAK-STAT)信号转导通路而发挥抗病毒活性。STAT由STAT1、STAT2和STAT3 3种亚型构成,受刺激活化的STAT1与STAT2可形成同源二聚体,募集IFN调节因子9(interferon regulation factor 9, IRF9),最终促进IFN刺激因子3(interferon stimulated genes factor 3, ISGF-3)的形成,活化的ISGF-3入核后与ISGs启动子中的IFN刺激的应答元件(interferon-stimulated response element, ISRE)结合,促进ISGs的表达。现已研究表明ISGs具有广谱的抗病毒活性和调节适应性免疫作用,在机体抵抗病毒入侵过程中扮演关键作用。例如,2',5'-寡聚腺苷酸合成酶(2',5'-oligoadenylate synthetase, OAS)和蛋白激酶(protein kinase, PKR)是最早发现的dsRNA依赖性激酶,其中OAS主要通过降解病毒和宿主的RNA,抑制蛋白合成,进而发挥抗病毒活性,而PKR主要通过磷酸化激活真核细胞翻译起始因子eIF2 $\alpha$ (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ),发挥抗病毒作用;人类MxA蛋白在进入细胞后立即与病毒核衣壳靶向结合,降低病毒核酸酶的活性,在感染早期干扰病毒复制;其他抗病毒ISGs产物,如干扰素诱导跨

膜蛋白(IFITM proteins)、25-羟基氧化酶(CH25H)、锌指抗病毒蛋白(ZAP)等也与冠状病毒感染高度相关<sup>[20]</sup>。近期研究发现尽管SARS-CoV-2比SARS-CoV在人体肺组织复制效率更高,但其对IFN的诱导明显减弱,这可能是SARS-CoV-2致病性比SARS-CoV更高的主要因素之一<sup>[21]</sup>。此外,在SARS-CoV感染小鼠模型中也研究证实,SARS-CoV可延迟肺泡灌洗液中IFN-I的表达,而IFN-I信号的滞后表达促使单核细胞巨噬细胞(IMM)聚集,进而引发血管渗漏和病毒特异性T细胞免疫异常反应。敲除IFN-I信号通路或IFNAR可保护小鼠免受致命感染,提高小鼠的存活率,降低肺部损伤<sup>[22]</sup>。因此,IFN是一种潜在的抗病毒靶点,确定IFN及其信号通路中冠状病毒复制和感染的具体机制将有利于开发针对IFN及其信号转导途径的特效抗病毒药物。

### 2.2 细胞因子

冠状病毒感染可诱发宿主产生过激细胞因子风暴(cytokine storm),导致严重的急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),甚至多器官功能衰竭和死亡。临床研究证实患者血清中细胞因子和趋化因子的表达水平与疾病预后密切相关。研究发现新冠病毒SARS-CoV-2感染患者血浆中存在白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-7(IL-7)、白细胞介素-10(IL-10)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、趋化因子CXCL-10(interferon-inducible protein-10, IP-10)、单核细胞趋化蛋白(membrane cofactor protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )及巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein-1 alpha, MIP-1 $\alpha$ )异常升高<sup>[23]</sup>;SARS-CoV感染患者血浆存在IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 、IP-10及MCP-1等细胞因子显著增加,而MERS-CoV感染患者普遍存在IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-15、IP-10、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-17等炎症因子异常表达<sup>[24]</sup>。上述细胞因子IP-10属于CXC类趋化因子,经IFN- $\gamma$ 诱导由中性粒细胞、酸性粒细胞、单核细胞、上皮细胞等30多种细胞产生,其异常升高表达是不同冠状病毒感染的共性特征,患者早期血清IP-10表达水平与疾病的危重程度密切相关,是预警SARS-CoV和SARS-CoV-2预后的关键细胞因子<sup>[25]</sup>。研究证实IP-10在

新冠肺炎的不同阶段扮演不同的角色,在病毒感染后的炎症早期阶段,IP-10 与其受体 CXCR3 结合,趋化天然杀伤细胞(NK 细胞)、活化 T 细胞和单核细胞至肺损伤组织,参与先天免疫和适应性免疫反应,同时 IP-10 与 IFN- $\gamma$  之间形成正反馈,促进后者的表达有利于机体发挥抗病毒作用。但 IP-10 持续高表达会趋化大量的炎症细胞往肺损伤部位聚集,而聚集的炎症细胞释放更多的炎症因子会加剧局部的炎症反应从而导致更严重的肺部损伤。在 SARS-CoV 病例中研究发现,IP-10 还可诱导募集在肺损伤部位的 T 淋巴细胞迅速凋亡,这可能与 SARS 患者体内淋巴细胞减少相关,即提示 IP-10 异常增加介导的急性肺损伤可能与其诱发淋巴细胞凋亡有关。在感染 SARS-CoV-2 患者外周血中也发现 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 数量明显下降,但呈高度激活状态,含有大量细胞毒性颗粒如穿孔素,颗粒酶在 CD8<sup>+</sup>T 呈阳性表达,且 T 淋巴细胞水平与冠状病毒患者的疾病进展与预后密切相关<sup>[26]</sup>。此外,促炎因子的滞后表达也与冠状病毒的高致病性有关。感染 SARS-CoV 与 MERS-CoV 的有些重症患者与轻中度患者相比,促炎因子的表达显著延迟。相较于 SARS-CoV,感染 SARS-CoV-2 血清中的炎症因子表达延迟更为显著,在感染后的 48 h 内仅能显著上调 IL-6、MCP1、CXCL1、CXCL5 和 IP10 等 5 种炎症因子的表达。在原代人类气道上皮细胞中也证实,在 SARS-CoV 和 MERS-CoV 感染后的第 3、6、12 h 都缺乏促炎因子的表达<sup>[27]</sup>。综上所述,炎症是机体免疫反应的重要组成部分,其在参与病原体的识别,免疫细胞募集及病原体消除等过程中发挥重要作用,但高致病性冠状病毒诱导过激免疫反应或延迟炎症细胞因子的产生会导致更为严重的病理损伤,加剧病程的进展,这可能是感染冠状病毒后重症患者预后较差的主要原因。因此,深入探讨冠状病毒感染宿主诱导过激免疫反应或延迟炎症因子表达的致病机制,进而探寻调控此类炎症反应的方法有可能成为攻克高致病性冠状病毒感染的新策略。

### 3 冠状病毒应对先天免疫反应的策略

在与宿主的长期斗争中,冠状病毒已进化多种应对天然免疫系统的机制,主要包括逃避和拮抗两种策略(图 1)。

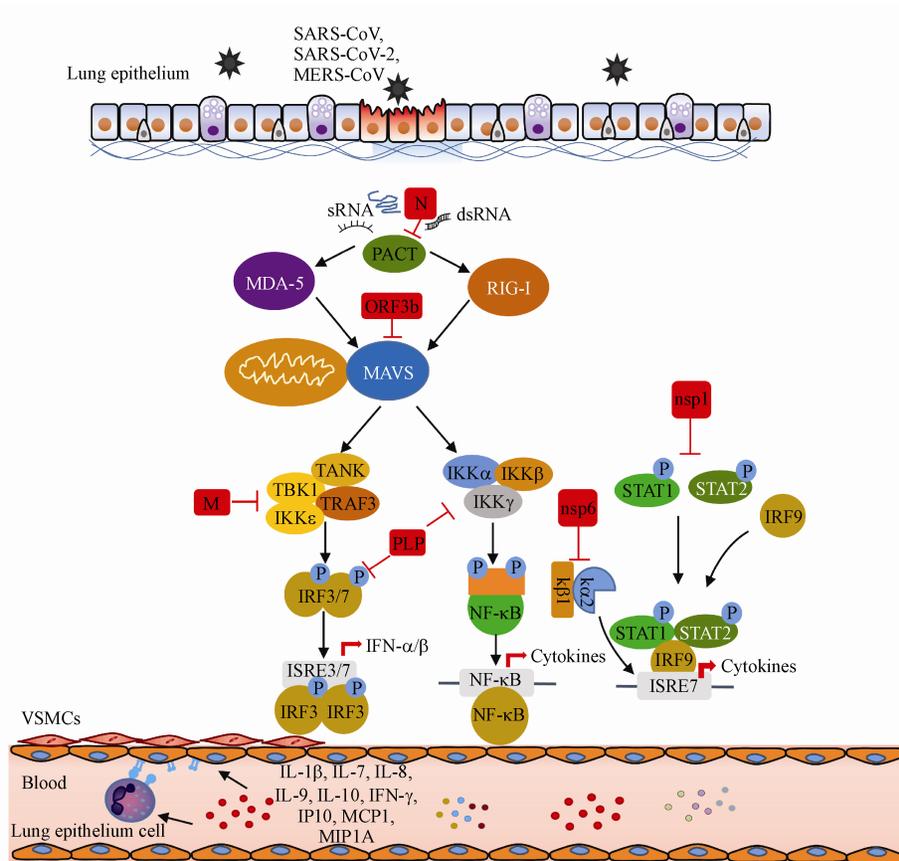
#### 3.1 逃避天然免疫系统识别

逃避宿主的天然免疫识别是外源微生物感染宿主的有效策略。冠状病毒复制时产生的大量中间体 dsRNA 会激活 PRR,使临近细胞启动先天性免疫反应。冠状病毒为了逃避先天性免疫反应必须躲过 PRR 的识别。研究发现,SARS-CoV、MHV 等多种冠状病毒可在一种具双层膜的小囊泡中进行复制,其有可能是为了掩藏了病毒 PAMP,避免被细胞质中 PRR 所识别。N7-鸟苷甲基化的帽子(cap,包括 cap-0 和 cap-1)是真核生物 mRNA 的结构特征和 RNA 聚合酶 II 转录产物的标志,宿主可用来识别自我与非我 RNA。为逃避宿主 PRR 识别,许多病毒模仿宿主加帽机制对自身 RNA 进行修饰。体外实验表明,SARS-CoV 的非结构蛋白 nsp14 和 nsp16/nsp10 复合物参与其 RNA 加帽过程<sup>[28]</sup>。RNA 帽子结构的合成,依赖于酶催化反应,整个过程需要 RNA 三磷酸酶、鸟苷转移酶和 N-7 鸟苷甲基转移酶的参与。SARS-CoV 加帽过程中,nsp14 发挥 N7-鸟苷甲基转移酶作用,将 RNA 鸟苷帽子的 N-7 位甲基化,形成 cap-0,该结构与宿主 RNA 帽子相似,使宿主难于区分自身 RNA 与病毒 RNA<sup>[29]</sup>。此外,nsp16 还具有 2'-O-甲基转移酶活性,能够进一步修饰病毒 RNA 帽子结构,协助病毒逃避先天性免疫反应<sup>[30-31]</sup>。

#### 3.2 拮抗先天免疫反应

拮抗宿主的先天性免疫反应也是外源微生物抵抗宿主免疫反应的有效策略。研究发现,冠状病毒蛋白可通过多种机制直接或间接抑制干扰素及其介导的免疫信号通路。临床研究表明冠状病毒感染患者的 IFN-I 水平普遍偏低,感染 SARS-CoV-2、SARS-CoV 和 MERS-CoV 的重症患者更甚<sup>[32]</sup>。体外研究也证实,SARS-CoV 和 MERS-CoV 能够不同程度的抑制细胞中 IFN-I 的表达,而外源性添加 IFN- $\alpha$  可抑制冠状病毒的复制<sup>[33]</sup>。临床研究也证实 IFN- $\alpha$  与其他抗病毒药物的联合应用可有效提高患者的生存率,这表明 IFN-I 在机体抗冠状病毒感染过程中发挥重要作用<sup>[34]</sup>。机制研究显示在与宿主的长期斗争中,冠状病毒已进化出许多应对天然免疫系统的策略,编码各种蛋白拮抗 IFN-I 产生及其诱导的信号传导途径是其重要策略之一。

##### 3.2.1 非结构蛋白介导的拮抗免疫机制 冠状



**Figure 1** Potential mechanism of coronavirus against innate immune response

病毒编码的非结构蛋白 nsps 能显著抑制 IFN-I 产生及其信号传导通路, 遏制宿主的先天性免疫反应。例如 SARS-CoV 的 nsp1 可选择性诱导细胞内核酸内切酶剪切宿主 mRNA 的 5'-UTR, 使宿主 mRNA 失去转录活性, 而与核糖体 40S 亚基结合, 可抑制核糖体 40S 亚基与 60S 亚基的结合, 进而抑制宿主 mRNA 的翻译功能<sup>[35-36]</sup>。MERS-CoV 编码的 nsp1 蛋白可促进细胞核中内切核酸酶裂解, 而对自身 RNA 无剪切效应。nsp3 是冠状病毒编码的最大非结构蛋白, 具有木瓜样蛋白酶 (papain-like proteinase, PLpro) 活性。PLpro 在细胞内具有去泛素化酶和去泛素样蛋白 ISG15 的活性, 其中 SARS-CoV 编码的 nsp3 可通过阻断 NF- $\kappa$ B 通路而抑制先天免疫反应<sup>[37]</sup>。众所周知 NF- $\kappa$ B 通路的激活需要多种激酶共同作用, NF- $\kappa$ B 的活化需要在激酶 IKK 的磷酸化和泛素化修饰下通过蛋白酶降解抑制因子 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B), 释放出游离态 NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B 入核后才可上调 IFN 的表达。SARS-CoV 可借助其 nsp3 的去泛素化酶活性抑制 I- $\kappa$ B,

阻滞 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化<sup>[38]</sup>。此外, 据报道 MERS-CoV 的 nsp3 还能抑制 RIG-I、MDA5 等 RLRs 介导的 IFN 表达及 NF- $\kappa$ B 的活化, 且其对于扰素的抑制作用高度依赖于蛋白酶的催化活性<sup>[39]</sup>。以上研究表明, 冠状病毒可通过编码 nsps 靶向调控 IFN-I 信号传导途径来发挥其拮抗宿主的免疫反应。因此, 深入研究冠状病毒的 nsps 的功能及其拮抗宿主免疫反应的机制, 不仅将有助于了解冠状病毒致病机制, 而且可为开发新型抗病毒药物提供筛选靶点。

**3.2.2 结构蛋白拮抗免疫机制** 冠状病毒的结构蛋白不仅是病毒结构必不可少的组分, 而且在拮抗宿主的干扰素传导途径中发挥重要作用。最新研究发现, SARS-CoV-2 编码的 M 蛋白可以与 RIG-I、MAVS 和 TBK1 相互作用, 阻止 RIG-I、MAVS、TRAF3 和 TBK1 蛋白复合体的形成, 进而抑制 IRF3 的磷酸化、入核, 以及 I 型和 III 干扰素诱导的转录激活<sup>[40]</sup>。SARS-CoV 编码的 M 蛋白可抑制 TRAF3-TANK-TBK1/IKK $\epsilon$  的形成, 抑制 IRF-3 的活

化,下调 IFN 的表达。据报道,SARS-CoV 编码的 M 蛋白还可通过一种整合模型抑制 IFN 的产生,它能特异性地将 TRAF3-TANK-TBK1/IKK $\epsilon$  复合物中的一些组分隔离到细胞特定位置,以阻碍该复合物的形成,从而遏制 IFN 的产生<sup>[41]</sup>。此外,SARS-CoV 编码的 N 蛋白可抑制仙台病毒和 dsRNA 类似物 poly (I:C) 所介导的 IFN 表达,但对其上游信号分子(如 RIG-1、MDA5)介导的 IFN 产生并没有抑制作用。MERS-CoV 编码的 M 蛋白对 IFN 的拮抗作用与 SARS-CoV 相似,其编码的 M 蛋白可与 TRAF3 互作,抑制 TRAF3-TBK1 的耦联,减少 IRF3 的活化和二聚化,导致 IFN 表达减少<sup>[42]</sup>。但是,冠状病毒 M 蛋白对 IFN 的拮抗作用具有病毒特异性,如冠状病毒 HCoV-HKU1 编码的 M 蛋白对 IFN 的产生没有任何抑制作用,相对于 MERS-CoV 或 SARS-CoV 感染而言,大部分人感染 HCoV-HKU1 后仅引起轻微的呼吸道症状<sup>[43]</sup>。虽然目前业已证实冠状病毒编码的结构蛋白在其致病过程中扮演重要作用,但详细的拮抗干扰素的作用机制仍需深入研究。

3.2.3 辅助蛋白拮抗免疫机制 冠状病毒编码的辅助蛋白具有广泛调控宿主免疫的功能,与病毒的致病性密切相关。SARS-CoV-2 编码的 ORF6、ORF8 和 ORF3b 是强效干扰素拮抗剂,在 SARS-CoV-2 感染早期,可阻碍 IFN 的释放,干扰宿主抗病毒免疫反应,促进病毒复制。SARS-CoV 编码的 ORF3a/3b、ORF6、ORF7a/7b、ORF8a/8b 和 ORF9b 等 8 种辅助蛋白中 ORF3b 和 ORF6 业已被证实具有拮抗 IFN 作用,其中 ORF3b 可抑制 RIG-I、MAVS 介导的转录因子 IRF3 和 NF- $\kappa$ B 的活化,拮抗 IFN 产生,而 ORF6 主要通过阻止 STAT1 与核转运蛋白  $\beta$ 1(KPNB1)结合形成复合物导致细胞质中 STAT1 无法入核而抑制 IFN 信号传导通路活化<sup>[44]</sup>。MERS-CoV 编码的 ORF3、ORF4a、ORF4b、ORF5 和 ORF8b 等 5 种辅助蛋白中 ORF4a、ORF4b 和 ORF5 具有抑制 IFN 的功能<sup>[45]</sup>,3 种辅助蛋白均能阻碍 IRF3 易位入核,抑制 IFN 启动子的活化<sup>[42]</sup>。此外,MERS-CoV 编码的 ORF4a 还能与 dsRNA 结合蛋白 PACT 相互作用,靶向抑制 PATC 介导 RIG-I/MDA5 的活化<sup>[46]</sup>。最近研究显示,MERS-CoV 的 ORF4b 可与细胞质中的 TBK1 互作进而抑制 IFN 产生,但详细的机制不清楚<sup>[47]</sup>。总之,现有研究显示冠状病毒辅助蛋白可通过多种途径拮抗机体免疫系

统,调节病毒复制,在病毒致病性和宿主病理进程中发挥重要作用,但目前人类对此类蛋白的功能研究甚少,还需要进一步研究其与宿主之间的相互作用,从而为抗病毒治疗和疾病控制提供有效的方案。

#### 4 问题与展望

冠状病毒是目前已知的拥有最长基因组的 RNA 病毒,其不仅在自然界广泛存在,而且是多种哺乳动物和鸟类的呼吸道常见病原。近十多年来,冠状病毒相继在人类引起 3 次世界范围内的流行,即 2003 年的 SARS-CoV,2012 年流行至今的 MERS-CoV 和 2019 年暴发至今的 SARS-CoV-2,其中 SARS-CoV-2 的传染性最强,迄今已致全球 8 000 多万人感染,170 多万人死亡,且全球感染仍未得到有效控制。新冠病毒 SARS-CoV-2 作为首次感染人类的新病原,人类目前对其宿主、传染源及致病机制等仍不十分清楚,迄今尚无防治的有效药物。据报道,SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 基因组序列相似率高达 79.5%,感染症状也极其相似。机体的免疫失调和病毒免疫逃避是 SARS-CoV 的主要致病机制,除了抗病毒治疗外,适度的免疫调节可改善重症患者的预后,降低病死率。同样的,SARS-CoV-2 患者体内多种细胞因子水平异常,大量免疫细胞和组织液聚集肺部,导致呼吸道阻塞和严重的肺损伤。借鉴 SARS-CoV 的致病机制和药物研发经验,有可能降低研发成本、缩短研发周期,早日开发出针对 SARS-CoV-2 的特效药物。

#### References

- [1] Cruz JL, Becares M, Sola I, et al. Alphacoronavirus protein 7 modulates host innate immune response[J]. *J Virol*, 2013, **87**(17): 9754-9767.
- [2] Othman H, Bouslama Z, Brandenburg JT, et al. Interaction of the spike protein RBD from SARS-CoV-2 with ACE2: Similarity with SARS-CoV, hot-spot analysis and effect of the receptor polymorphism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **527**(3): 702-708.
- [3] Shang J, Wan YS, Luo CM, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, **117**(21): 11727-11734.
- [4] Lan J, Ge JW, Yu JF, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor[J].

- Nature*, 2020, **581**(7807): 215-220.
- [5] Li K, Wohlford-Lenane C, Perlman S, *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus causes multiple organ damage and lethal disease in mice transgenic for human dipeptidyl peptidase 4[J]. *J Infect Dis*, 2016, **213**(5): 712-722.
- [6] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS<sub>2</sub> and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, **181**(2): 271-280.e8.
- [7] Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(6): 439-450.
- [8] Du LY, He YX, Zhou YS, *et al.* The spike protein of SARS-CoV: a target for vaccine and therapeutic development[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(3): 226-236.
- [9] Günther C, Josenhans C, Wehkamp J. Crosstalk between microbiota, pathogens and the innate immune responses [J]. *Int J Med Microbiol*, 2016, **306**(5): 257-265.
- [10] Rathinam VA, Fitzgerald KA. Cytosolic surveillance and antiviral immunity[J]. *Curr Opin Virol*, 2011, **1**(6): 455-462.
- [11] Wong LY, Lui PY, Jin DY. A molecular arms race between host innate antiviral response and emerging human coronaviruses[J]. *Virol Sin*, 2016, **31**(1): 12-23.
- [12] Durán A, Alvarez-Mon M, Valero N. Role of toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NLRs) in viral infections[J]. *Invest Clin*, 2014, **55**(1): 61-81.
- [13] Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, *et al.* Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, **14**(8): 546-558.
- [14] Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway[J]. *Rev Med Virol*, 2011, **21**(2): 67-77.
- [15] Mazaleuskaya L, Veltrop R, Ikpeze N, *et al.* Protective role of Toll-like Receptor 3-induced type I interferon in murine coronavirus infection of macrophages [J]. *Viruses*, 2012, **4**(5): 901-923.
- [16] Jiang FG, Ramanathan A, Miller MT, *et al.* Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I[J]. *Nature*, 2011, **479**(7373): 423-427.
- [17] Loo YM, Gale M Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors [J]. *Immunity*, 2011, **34**(5): 680-692.
- [18] Ford E, Thanos D. The transcriptional code of human IFN-beta gene expression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1799**(3/4): 328-336.
- [19] Li JF, Liu Y, Zhang XM. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5[J]. *J Virol*, 2010, **84**(13): 6472-6482.
- [20] Ma F, Li B, Liu SY, *et al.* Positive feedback regulation of type I IFN production by the IFN-inducible DNA sensor cGAS[J]. *J Immunol*, 2015, **194**(4): 1545-1554.
- [21] Chu H, Chan JF, Wang YX, *et al.* Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an *ex vivo* study with implications for the pathogenesis of COVID-19[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, **71**(6): 1400-1409.
- [22] Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, *et al.* Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, **19**(2): 181-193.
- [23] Huang C, Wang Y, Li X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, **395**(10223): 497-506.
- [24] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, *et al.* SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14**(8): 523-534.
- [25] Lo BK, Yu M, Zloty D, *et al.* CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas[J]. *Am J Pathol*, 2010, **176**(5): 2435-2446.
- [26] Xu Z, Shi L, Wang YJ, *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome[J]. *Lancet Respir Med*, 2020, **8**(4): 420-422.
- [27] Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, **39**(5): 529-539.
- [28] Bouvet M, Lugari A, Posthuma CC, *et al.* Coronavirus Nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289**(37): 25783-25796.
- [29] Chen Y, Cai H, Pan JA, *et al.* Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(9): 3484-3489.
- [30] Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members[J]. *Nature*, 2010, **468**(7322): 452-456.
- [31] Channappanavar R, Fehr AR, Zheng J, *et al.* IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes[J]. *J Clin Invest*, 2019, **129**(9): 3625-3639.
- [32] Kindler E, Thiel V. SARS-CoV and IFN: too little, too late[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, **19**(2): 139-141.
- [33] Kindler E, Jónsdóttir HR, Muth D, *et al.* Efficient replication of the novel human *Betacoronavirus* EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential[J]. *mBio*, 2013, **4**(1): e00611-e00612.
- [34] Omrani AS, Saad MM, Baig K, *et al.* Ribavirin and interferon Alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, **14**(11): 1090-1095.
- [35] Lokugamage KG, Narayanan K, Nakagawa K, *et al.* Middle

- east respiratory syndrome coronavirus nsp1 inhibits host gene expression by selectively targeting mRNAs transcribed in the nucleus while sparing mRNAs of cytoplasmic origin [J]. *J Virol*, 2015, **89**(21): 10970-10981.
- [36] Kamitani W, Huang C, Narayanan K, *et al.* A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16** (11): 1134-1140.
- [37] Clementz MA, Chen ZB, Banach BS, *et al.* Deubiquitinating and interferon antagonism activities of coronavirus papain-like proteases [J]. *J Virol*, 2010, **84**(9): 4619-4629.
- [38] Frieman M, Ratia K, Johnston RE, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF<sub>3</sub> and NF-kappaB signaling [J]. *J Virol*, 2009, **83**(13): 6689-6705.
- [39] Alfuwaires M, Altaher A, Kandeel M. Molecular dynamic studies of interferon and innate immunity resistance in MERS CoV non-structural protein 3 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, **40**(3): 345-351.
- [40] Liu G, Lee J H, Parker Z M, *et al.* ISG15-dependent activation of the RNA sensor MDA5 and its antagonism by the SARS-CoV-2 papain-like protease [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.10.26.356048.
- [41] Siu KL, Kok KH, Ng MH, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284** (24): 16202-16209.
- [42] Yang Y, Zhang L, Geng HY, *et al.* The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists [J]. *Protein Cell*, 2013, **4** (12): 951-961.
- [43] Siu KL, Chan CP, Kok KH, *et al.* Suppression of innate antiviral response by severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein is mediated through the first transmembrane domain [J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, **11**(2): 141-149.
- [44] Freundt EC, Yu L, Park E, *et al.* Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein [J]. *J Virol*, 2009, **83**(13): 6631-6640.
- [45] de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group [J]. *J Virol*, 2013, **87**(14): 7790-7792.
- [46] Niemeyer D, Zillinger T, Muth D, *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist [J]. *J Virol*, 2013, **87**(22): 12489-12495.
- [47] Siu KL, Yeung ML, Kok KH, *et al.* Middle east respiratory syndrome coronavirus 4a protein is a double-stranded RNA-binding protein that suppresses PACT-induced activation of RIG-I and MDA5 in the innate antiviral response [J]. *J Virol*, 2014, **88**(9): 4866-4876.

## ·本刊讯·

### 《中国药科大学学报》继续被收录为“中国科技核心期刊”

2020年12月29日,中国科学技术信息研究所“2019年中国科技论文统计结果发布会”在北京隆重召开。《中国药科大学学报》继续被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。

在此,衷心感谢以主编王广基院士领导的《中国药科大学学报》编辑委员会全体专家的正确引领和悉心指导,感谢广大审稿专家、作者、读者的长期关注和支持。今后编辑部将继续不断提高《中国药科大学学报》的创新力、引导力和影响力,成为医药科技创新必读的精品药学期刊。

(本刊编辑部)