

新型冠状病毒感染与复制的进展

何丽红^{1,2}, 刘文军^{1,2}, 李晶^{1,2}

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

何丽红, 刘文军, 李晶. 新型冠状病毒感染与复制的进展. 生物工程学报, 2020, 36(10): 1961–1969.

He LH, Liu WJ, Li J. Overview of novel coronavirus infection and replication. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 1961–1969.

摘要: 冠状病毒是一类具有囊膜包裹的线性单股正链 RNA 病毒, 在自然界广泛存在, 可引起不同程度的呼吸性传染病。新型冠状病毒是一种新发突发病毒, 对各类人群均易感。截止目前, 该病已经在世界范围内广泛流行, 对公共卫生安全构成极大的威胁。文中从冠状病毒及新型冠状病毒的基因组特征、关键蛋白、对宿主的感染和复制的角度加以综述, 旨在为获得病毒感染宿主细胞致病机制的探究提供理论依据, 也为特异的抗病毒药物的研发提供基础支持。

关键词: 新冠病毒, S 蛋白, 宿主, 血管紧张素转化酶 2, 非结构蛋白

Overview of novel coronavirus infection and replication

Lihong He^{1,2}, Wenjun Liu^{1,2}, and Jing Li^{1,2}

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Coronaviruses are a type of positive-sense single-stranded RNA virus with envelope and widely exist in nature to cause respiratory infectious diseases. The novel coronavirus is a new outbreak virus that is susceptible to all people. Up to now, the disease has been widely spread in the world and poses a great threat to public health. In this review, the genomic features, key proteins, host infection and replication of coronaviruses and novel coronaviruses are reviewed in order to provide theoretical basis for the study of the pathogenic mechanism of virus infection on host cells and to provide basic support for the development of specific antiviral drugs.

Keywords: SARS-CoV-2, S protein, host, angiotensin-converting enzyme 2, nonstructural protein

冠状病毒 (Coronavirus, CoV) 属于冠状病毒科、冠状病毒属, 是一类具有囊膜包裹的线性单股正链 RNA 病毒, 在自然界广泛存在, 是目前已知的 RNA 病毒中基因组最大的病毒^[1]。据世界卫

Received: June 2, 2020; Accepted: July 29, 2020

Supported by: Youth Innovation Promotion Association of CAS (No. 2019091).

Corresponding author: Jing Li. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lj418@163.com

中科院青年创新促进会会员基金 (No. 2019091) 资助。

生组织统计数据,在过去的20年里,有多次冠状病毒暴发,如2002年记载的严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)^[2]和2012年首次发现中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)^[3]。冠状病毒可感染人、蝙蝠、猫和小鼠等哺乳动物及鸟类,引起不同程度的呼吸系统、消化系统、神经系统症状等^[4]。该病毒的不断出现且流行,对公共卫生构成严重威胁。

人类冠状病毒(HCoVs)是一组重要的冠状病毒,与多种不同严重程度的呼吸系统疾病相关,包括普通感冒、肺炎和支气管炎^[5]。由于其基因组核苷酸高替换率和重组,HCoVs被认为是进化较快的病毒之一。截止目前,已报道了6种HCoVs,即HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU1、SARS-CoV和MERS-CoV;其中HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43和HCoV-HKU1在人群中广泛存在,约占人类普通感冒感染率的1/3^[6]。2019年12月,新型冠状病毒(SARS-CoV-2)首次暴发后迅速席卷全球。疫情发生后,我国多省市迅速启动I级预警。作为一种新型病毒,目前还没有针对SARS-CoV-2引发疾病的特效治疗方法。对SARS-CoV-2结构蛋白及受体功能的研究,包括与宿主互作致病机制研究,对预防和治疗具有重要的指导意义。本文对SARS-CoV-2感染和复制加以综述,旨在为获得病毒侵染宿主细胞致病机制的探究提供理论依据,也为特效药物的研发提供基础支持。

1 冠状病毒

1.1 冠状病毒形态结构

冠状病毒病毒粒子呈球状或椭圆形,具有多形性,直径为60–220 nm。病毒包膜上存在棘突,电镜下呈皇冠状,不同的冠状病毒的棘突存在差异。根据其形态学特征,1975年国际病毒命名委

员会正式命名为冠状病毒。

冠状病毒病毒粒子由包膜、透明中间带和内部核衣壳组成。包膜为双层脂,包括纤突蛋白(Spike protein, S)、包膜蛋白(Envelope protein, E)和膜蛋白(Membrane protein, M)三种主要糖蛋白,部分毒株还有HE蛋白(Haemagglutinin-esterase),属I型糖蛋白。病毒核酸可与核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, N)结合,N蛋白是一种碱性磷蛋白,主要与免疫机制相关。S蛋白为包膜外的棒-球形三聚体糖蛋白,其中S1亚基形成球状头结构,S2亚基形成跨膜柄。在冠状病毒感染宿主的过程中,大多数 β 属冠状病毒S蛋白在侵染过程中都会分裂为S1和S2,S1亚基与细胞表面受体结合,S2亚基则介导膜融合,协助病毒进入细胞。E蛋白散在分布于病毒包膜上,是一种膜整合蛋白。M蛋白是跨膜蛋白,在病毒的包膜形成与出芽过程中起重要作用^[1,7]。冠状病毒的主要结构蛋白基因一般按照5'至3'以S、E、M和N的顺序排列^[1]。

1.2 冠状病毒基因组特征

冠状病毒粒子内部有一个螺旋对称的核衣壳,包裹着单链正义RNA基因组,长度约为27–31 kb。RNA链5'端有甲基化帽子结构,3'端有polyA尾巴结构,其基因组RNA自身具有翻译模板的作用。复制酶和转录酶是由基因组编码、翻译形成的蛋白,下游开放阅读框的病毒产物均来自于亚基因组mRNA。在冠状病毒中,复制酶基因约占基因组5'端的2/3,由两个重叠的开放阅读框(ORFs)ORF1a和ORF1b组成,共编码16个非结构蛋白(Nsps)。其余的冠状病毒基因组RNA编码冠状病毒典型的4种结构蛋白。此外,在结构蛋白基因中还分布有多个副ORFs,其数量和位置因CoV的种类而异^[8-9]。

冠状病毒在侵染细胞时,通过膜融合内吞作用进入细胞,病毒的复制基本在胞浆内进行。从病毒RNA出发,完成宿主体内多蛋白1a/1ab

(pp1a/pp1ab) 的合成, 转录通过双膜囊泡中的复制转录复合物和亚基因组 RNAs 序列的合成进行。值得注意的是, 转录终止发生在转录调控序列上, 位于 ORFs 间, 作为亚基因组 mRNA 产生的模板。在非典型 CoV 基因组中, 至少有 6 个 ORFs 存在。其中, ORF1a 和 ORF1b 之间的移码指导 pp1a 和 pp1ab 多肽的产生, pp1a 和 pp1ab 多肽由病毒编码的类糜蛋白酶或主蛋白酶处理, 以及类木瓜蛋白酶用于产生 16 种 Nsp^s^[10]。

2 新型冠状病毒

Chan 等^[11]从非典型肺炎患者中分离出的 SARS-CoV-2 基因组与蝙蝠 SARS 样 CoVZXC21 的核苷酸同源性为 89%, 与人 SARS 样 CoVZXC21 的核苷酸同源性为 82%。SARS-CoV-2 感染者临床体征主要以发热和咳嗽为主^[12], 且重症患者更容易出现呼吸困难^[13]。在与流感病毒共感染的病例中, SARS-CoV-2 对上呼吸道的敏感性明显降低^[14], 提示对 SARS-CoV-2 的检测仍存在相当大的不确定性, 需要进行更广泛的病毒检测。

2.1 SARS-CoV-2 基因组特征

通过基因序列比对, 证实 SARS-CoV-2 与 SARS 同属冠状病毒 β 属。该病毒与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 具有同源性 (79% 和 51.8%)^[15]。Gianguglielmo 等^[16]对数据库中 52 株病毒进行了全基因组分析, 确定 SARS-CoV-2 基因组全长为 29.9 kb, 而 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的基因组分别为 27.9 kb 和 30.1 kb^[17]。SARS-CoV-2 基因组 mRNA 携带一个保守的前导序列, 9 个转录调控序列和 2 个末端非翻译区域 (UTRs), 9 个嵌套的亚基因组 mRNA 共表达 12 个假定的功能性 ORFs。5' 和 3' UTRs 分别为 265 和 358 个核苷酸, 5' 和 3' UTRs 序列与其他 β CoV 的核苷酸相似度为 83.6%。在基因组 5'-2/3 的区域内, 由部分重叠的 5' 端 ORF1a/b 编码的大型复制酶聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 被蛋白酶水解成 16 个 Nsp^s。4 个结构蛋

白按照 S、E、M、N 的顺序排列在后 1/3 处, 未发现 HE 蛋白编码基因^[11]。

目前, 对于 SARS-CoV-2 转录组分析尚不清晰。Narry 等^[18]利用 DNA 纳米球测序和纳米孔 RNA 直接两种互补的测序技术, 展示了高分辨率的 SARS-CoV-2 转录组和表位转录组。定量分析结果显示, N 是表达最丰富的转录本, 其次是 S、7a、3a、8、M、E、6 和 7b。同时, 借助纳米孔测序对单个分子“从头到尾”测序的优势, 研究人员发现病毒 RNA 的 poly(A) 尾巴平均由 47 个腺苷酸构成, 全长的病毒 RNA 比亚基因组 RNA 的 poly(A) 尾巴更长。修饰后的 RNA 的 poly(A) 尾巴比未修饰的 RNA 短, 证实修饰后的 RNA 与 3' 尾巴之间存在相关性。此外, 研究还发现病毒转录本上至少有 41 个 RNA 修饰位点, 其中 AAGAA 是较常见的基序。除了标准基因组和 9 个亚基因组 RNA 外, SARS-CoV-2 还产生编码未知 ORFs 的转录本。

2.2 SARS-CoV-2 编码蛋白特性

研究病毒蛋白结构特征是研究其发病机制的基础。S 蛋白由 S1 和 S2 亚基组成, S1 亚基包含 N 端结合域和受体结合域, 其中受体结合基序负责与受体相互作用以进入宿主体内。S2 亚基在整合病毒与宿主细胞膜融合过程起关键作用, 它包含融合肽、中心螺旋和连接域^[19]。当 SARS-CoV-2 的 S 蛋白处于融合后的状态, S1 分离, S2 发生构象变化, 从压缩的形态向柄状形态延伸。在 SARS-CoV-2 中, S2 亚单位高度保守。与受体的结合打开了 S1 的受体结合域, 从而促进 S1 复合物和 S1 单体从融合前的突起中释放出来, 触发融合前到融合后的构象转变^[20]。

Nsp^s 是重要的参与冠状病毒复制的酶, 但不参与病毒颗粒的组装^[1]。Yuan 等^[21-22]根据 SARS 冠状病毒基因组特征对 SARS-CoV-2 基因组的 16 个 Nsp^s 功能进行了初步分析和推断。这些假定的 Nsp^s 包括两种病毒半胱氨酸蛋白酶, 即 Nsp3

(木瓜蛋白酶样蛋白酶) 和 Nsp5 (糜蛋白酶样蛋白酶、3C 样蛋白酶或主蛋白酶)、Nsp12 (RNA 依赖性 RNA 聚合酶 RdRp)、Nsp13 (螺旋酶) 和其他可能参与病毒转录和复制的 Nsp。SARS-CoV-2 和 SARS 冠状病毒 ORFs 和 Nsp 之间没有显著差异, 主要区别在于 ORF3b、S 蛋白和 ORF8, 但在此前被认为是重组热点的 S1 蛋白和 ORF8 中变化尤为明显^[11]。在蛋白质水平上, Nsp7、Nsp13、包膜、基质或辅助蛋白 p6 和 8b 中没有发生氨基酸替换, 但在 Nsp2、Nsp3、S 蛋白、基础亚结构域, 即受体结合域中均有氨基酸突变。

3 SARS-CoV-2 感染与复制

病毒感染宿主细胞包括病毒吸附、入侵、遗

传物质释放、基因组转录和复制、组装和出芽等过程。这一过程对于病毒的生存和致病性至关重要, 这个过程需依赖宿主细胞蛋白的参与^[23]。作为细胞内专性寄生囊膜病毒, SARS-CoV-2 主要通过膜融合的方式利用宿主细胞机制完成自身复制^[6] (图 1)。

3.1 SARS-CoV-2 细胞受体

宿主受体是决定病毒致病性、组织趋向性和宿主范围的主要因素^[24]。冠状病毒感染有明显的宿主特异性和组织嗜性, 这主要取决于病毒囊膜表面的纤突蛋白 S 和宿主细胞膜表面受体的特异性结合和后续的膜融合过程^[25]。

ACE2 (血管紧张素转化酶, Angiotensin I converting enzyme peptidyl-dipeptidase A 2) 是目

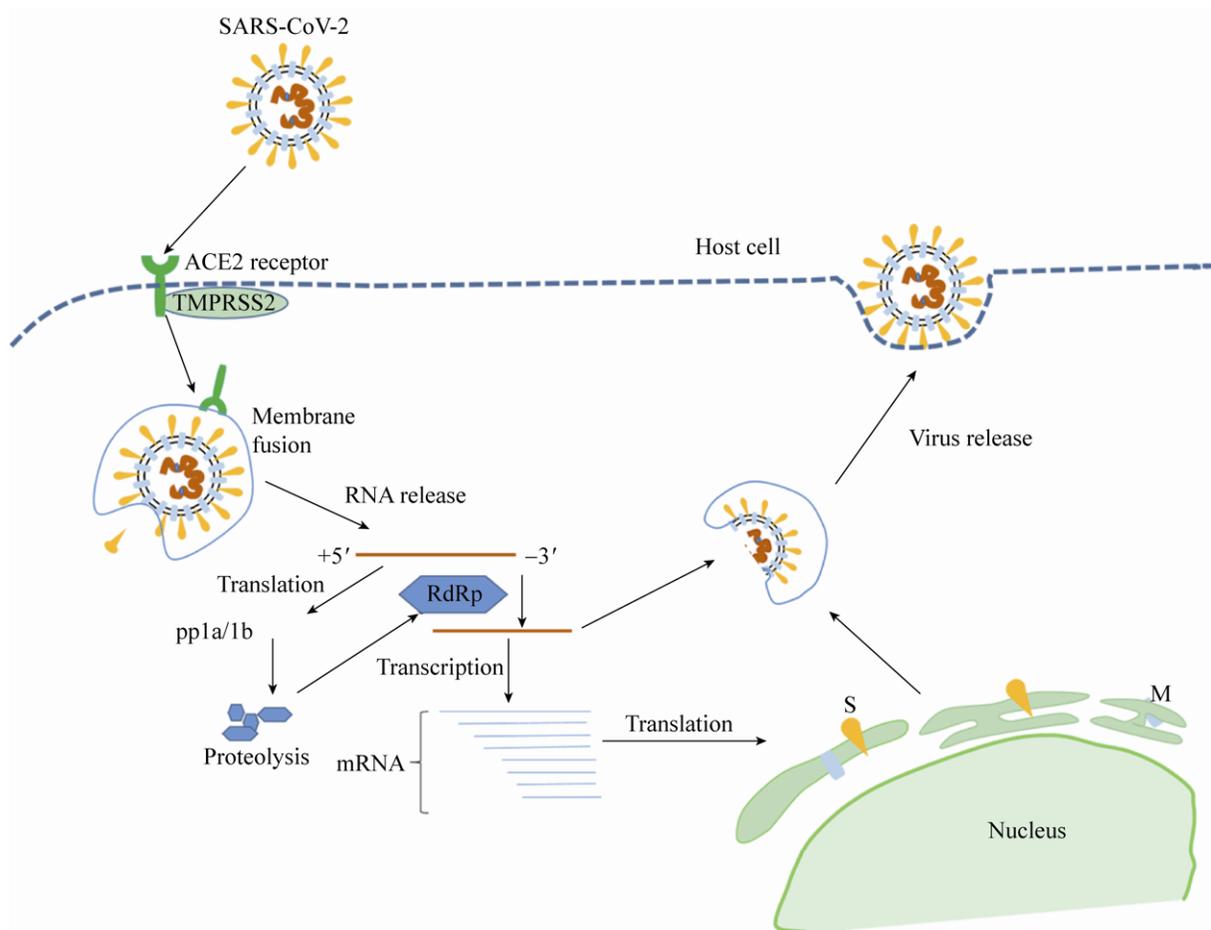


图 1 SARS-CoV-2 感染与复制模式图

Fig. 1 The model of SARS-CoV-2 infection and replication.

前发现的 SARS-CoV-2 吸附、入侵宿主细胞的主要受体^[26]。该基因编码的蛋白质属于血管紧张剂转化酶家族成员,在肺、心脏、肾脏和肠道广泛分布^[27]。截至目前,关于 ACE2 的功能主要分为 3 种,作为肾素-血管紧张素系统调节因子,靶向血管紧张素 II,保护心血管系统^[28];作为 SARS 病毒受体,在病毒感染后肺衰竭的致病机制中发挥作用^[20];与氨基酸转运蛋白结合,促进肾脏和肠道的氨基酸吸收^[29]。Yan 等^[30]利用冷冻电镜技术成功解析了人 ACE2 蛋白全长。ACE2 蛋白主要是以二聚体的形式存在,一个 ACE2 二聚体能同时结合两个病毒 S 蛋白三聚体,且开放和闭合两种构象都有与冠状病毒结合的界面。从 S 蛋白与 ACE2 蛋白的结合形态来看,病毒 S 蛋白横跨在 ACE2 蛋白的表面,与 SARS 病毒结合方式相似。

3.2 SARS-CoV-2 S 蛋白与受体互作

S 蛋白是位于冠状病毒最外层的多功能蛋白,促进病毒和细胞表面受体介导的抗原和膜融合,还是诱发细胞免疫和体液免疫的主要成分^[31]。冠状病毒 S 蛋白主要以三聚体的形式存在,每个单体中约 1/4 氨基酸构成了受体结合域^[20]。Whittaker 等^[32]提出了 S 蛋白的两个关键的裂解位点,一个发生在 S1/S1 边界,另一个发生在 S2 的 R797 处,共同介导了膜融合和病毒感染。CoV 进入细胞取决于 S 蛋白的表面单位 S1 与细胞受体的结合,这有助于病毒附着到靶细胞表面。此外,进入需要通过细胞蛋白酶启动 S 蛋白,这需要在 S1/S2 和 S2'位点进行蛋白质切割,并促进病毒和细胞膜融合,这一过程由 S2 亚单位驱动^[33]。SARS-CoV-2 S 蛋白的受体结合域由 4 个扭曲的反向平行 β 片 ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 和 $\beta 6$) 形成,以短螺旋和环为核心,在核心链 $\beta 3$ 和 $\beta 6$ 之间,有一个包含短 $\beta 4$ 和 $\beta 5$ 链、 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 螺旋和环的插入,该插入片段是细胞受体与 SARS-CoV-2 结合的大部分接触残基的受体结合基序^[34]。

研究表明 SARS-CoV 可利用 ACE2 作为受体^[35-36],通过跨膜蛋白酶/丝氨酸亚家族成员 2 (TMPRSS2) 与细胞表面的 ACE2 共域化^[32],并结合 CD209L 分子,形成 SACE2-CD209L 复合物,通过网格蛋白和窝蛋白非依赖型内吞途径发生入胞^[37]。MERS-CoV 则利用二肽酰基酶 4 (DPP4/CD26) 进入细胞^[38],DPP4 主要存在于下呼吸道、肾脏、小肠、肝脏和免疫系统的细胞中^[39]。基于上述研究结果,Hoffmann 等^[26]对 S 蛋白结合 ACE2 进入细胞过程中可能互作的宿主因子进行探究,结果证实 SARS-CoV-2 通过受体 ACE2 粘附细胞,丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 和胞内半胱氨酸蛋白酶组织蛋白酶 B 和 L (CatB/L) 均可用于 S 蛋白启动,抑制这两种蛋白酶是阻断病毒进入细胞的必要条件。然而,只有 TMPRSS2 活性对病毒在受感染宿主中的侵染和发病机制是必需的,而 CatB/L 活性则是非必需的。因此,TMPRSS2 抑制剂可以作为临床治疗的一种选择。宿主受体 CD26 从倒数第 2 位为 L-脯氨酸或 L-丙氨酸的多肽中切割氨基末端二肽,导致 T 细胞活化,从而在病毒感染中起免疫调节因子作用^[40]。Vankadari 等^[41]基于计算模型的选择性对接建立了 SARS-CoV-2 S 蛋白和 CD26 互作的三维结构模型,S 蛋白与 CD26 对接的复杂模型显示了蛋白间的大界面,这表明模型结构中的 S1 域环与 CD26 表面之间可能存在紧密的相互作用。

Wrapp 等^[42]利用冷冻电镜和表面离子共振技术测定了 S 蛋白的 3.5Å 分辨率,通过生物物理分析 S 蛋白与 ACE2 的亲合力。结果显示,SARS-CoV-2 S 蛋白与 ACE2 的平衡解离常数约是 15 nmol/L,比 ACE2 与 SARS-CoV 的亲合力高 10-20 倍,推测这可能是新冠肺炎的传播能力强于 SARS 的原因。研究发现,相较于 SARS-CoV 和 MERS-CoV 新冠病毒 S 蛋白存在 Furin 蛋白酶切位点,该突变是大部分冠状病毒 β 属所不具有的突变,这一发现暗示这种变异有可能增强 SARS-CoV-2 的传

播能力^[43]。随后, Hoffmann 等^[44]验证了该推测, 他们发现细胞蛋白酶 Furin 可以裂解 S1/S2, 而且这种裂解对于 S 蛋白介导的细胞融合和进入人肺细胞至关重要。此外, 优化 S1/S2 位点增加了细胞-细胞融合, 而非病毒-细胞融合, 这表明病毒的变异很可能表现出细胞-细胞扩散增加和潜在的毒性改变。但是, 通过对 Vero-E6 细胞培养的 SARS-CoV-2 的菌斑纯化, 发现了一系列含有在 S1/S2 连接处分别有 15–30 bp 的缺失或点突变的菌斑。值得注意的是, 某些缺失删除了 S 蛋白 S1/S2 连接区域的 PRRA 基序。SARS-CoV-2 的一个独特特征是在 S 蛋白的 S1 和 S2 亚基连接处的多碱性切割位点。缺失、突变或 S1/S2 连接处的其他突变体中缺失 30 bp 可能会减弱病毒的致病性^[45]。因此, 在无症状感染病例中筛选这些变异的流行是很有必要的, 评估其作为减毒疫苗或实验室工具的潜力。

3.3 Nsp 参与病毒复制过程

SARS-CoV-2 的复制是由 Nsp 的多亚基复制/转录复合物共同介导的^[46], 该复合物的核心成分是依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 的催化亚基 (Nsp12), 是重要的病毒靶点之一^[47-48]。Nsp12 活性小, 其功能需要包括 Nsp7 和 Nsp8 在内的辅助因子, 增加 RdRp 与模板绑定的过程^[49]。Yin 等^[50]在昆虫细胞共表达 Nsp12、Nsp7 和 Nsp8 复合物, 结果显示纯化后的 Nsp12 单独与 5'碱基的部分双链 RNA 模板引物结合时几乎没有活性, 类似于 SARS-CoV, 而 Nsp7 和 Nsp8 的存在增加了 Nsp12 的活性。Nsp12-Nsp7-Nsp8 复合物在加入三磷酸腺苷后, 在聚脲嘧啶核苷酸模板上也表现出 RNA 聚合活性, 与 SARS-CoV 的 RdRp 结构不同。模板 RTP-RdRp 结构在模板链中含有 14 个碱基 RNA, 在引物链中含有 11 个碱基 RNA, 双链 RNA 螺旋由模板引物 RNA 的 11 个碱基对组成。在模板引物 RNA 和 Nsp12 之间观察到广泛的蛋白质 RNA 相互作用, 共有 29 个 Nsp12 残基直接参与

RNA 的结合。值得关注的是, Nsp7 和 Nsp8 没有介导 RNA 相互作用, 尽管这两种蛋白质是 RdRp 结合 RNA 所必需的, 从 Nsp12 到模板引物 RNA 的任何碱基对都没有接触, 这说明 RdRp 与 RNA 的序列无关。这与 RdRp 在伸长阶段的酶活性不需要特定的序列是一致的。SARS-CoV-2 RNA 的合成与由修饰性内质网膜组成的复制细胞器有关, 它们被转化为含有病毒双链 RNA 的双膜囊泡和其他膜元素, 一起形成网状泡状网络, 且双膜囊泡的形成仅在冠状病毒中发现。含有跨膜结构域的 SARS-CoV 的 Nsp3、Nsp4 和 Nsp6 都是必需的^[51]。

除了在病毒复制和转录中的作用外, 一些 CoVs 的 Nsp15 及其同源物 Nsp11 在动脉病毒中的作用已被证实可拮抗先天免疫反应。过表达 SARS-CoV 的 Nsp15 可显著抑制 I 型干扰素的产生, 其机制可能是通过抑制 MAVS 诱导的细胞凋亡^[52]。Nsp 可在病毒致病性中起关键作用, Angeletti 等^[53]分析了新冠病毒 ORF1ab 编码 Nsp2 和 Nsp3 的跨膜螺旋段, 发现 723 (Nsp3-543) 的位置是丝氨酸而不是甘氨酸残基, 1010 (Nsp3-192) 的位置是脯氨酸而不是异亮氨酸。这两个突变位点均在与 SARS-CoV 中的磷酸酶相似的蛋白质附近, 在病毒感染细胞和复制过程中起关键作用^[54]。蝙蝠 SARS-CoV 501 位是非极性氨基酸, 而 SARS 和 SARS-CoV-2 在该位置是极性氨基酸, 推测其可以赋予蛋白质更高的稳定性。该突变位点落在 Nsp2 的区域内, 该区域与禽传染性支气管炎病毒相似的内分泌体相关蛋白同源, 在病毒致病性中起关键作用^[55]。Nsps 可参与 CoVs 的复制及致病过程, 研究 Nsps 与机体蛋白复合物的分子间相互作用, 探讨 Nsps 影响机体的致病机理和拮抗天然免疫反应机制, 也是重要的研究方向。

4 展望

新型冠状病毒作为一种新发传染病, 具有全球流行的能力, 还会引发较多的临床并发症。但

目前尚未研制出疫苗及特效药。除已知 ACE2 受体外,考虑到 CD26 与 S 蛋白之间的对接大界面,是否 CD26 有可能是潜在受体?与 CD26 的互作会不会影响与机体细胞免疫反应?S1/S2 裂解位点的氨基酸缺失、突变或 Furin 位点的增加,对 SARS-CoV-2 的复制都具有一定的影响,可能是作为疫苗或临床治疗干预的靶点选择。结合 Nsp5 在 CoVs 致病性中的关键作用,是否同样在 SARS-CoV-2 致病过程中也发挥作用?Nsp5 和 S 蛋白受体结合域的关键氨基酸位点的突变是否会导致病毒致病性增强和跨宿主传播?阐明 SARS-CoV-2 与病毒入侵、基因组复制等互作的细胞因子,可能为治疗靶点的发现提供新的思路。探索病毒与机体免疫相关的细胞因子的互作机制,将有利于筛选中和抗体等。

REFERENCES

- [1] Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. *Adv Virus Res*, 2011, 81: 85–164.
- [2] Otter JA, Donskey C, Yezli S, et al. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J Hosp Infect*, 2016, 92(3): 235–250.
- [3] Badawi A, Ryoo SG. Prevalence of Diabetes in the 2009 Influenza A (H1N1) and the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Public Health Res*, 2016, 5(3): 733.
- [4] Yin YD, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology*, 2018, 23(2): 130–137.
- [5] McKimm-Breschkin JL, Jiang SB, Hui DS, et al. Prevention and treatment of respiratory viral infections: presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral Res*, 2018, 149: 118–142.
- [6] Corman VM, Muth D, Niemeyer D, et al. Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Adv Virus Res*, 2018, 100: 163–188.
- [7] Luk HKH, Li X, Fung J, et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol*, 2019, 71: 21–30.
- [8] Hui DSC, Zumla A. Severe acute respiratory syndrome: historical, epidemiologic, and clinical features. *Infect Dis Clin North Am*, 2019, 33(4): 886–889.
- [9] Lim YX, Ng YL, Tam JP, et al. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases*, 2016, 4(3): 26.
- [10] Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(6): 439–450.
- [11] Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221–236.
- [12] Chen NS, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507–513.
- [13] Wang DW, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, 323(11): 1061–1069.
- [14] Wu XJ, Cai Y, Huang X, et al. Co-infection with SARS-CoV-2 and Influenza A virus in patient with pneumonia, China. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(6): 1324–1326.
- [15] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579(7798): 270–273.
- [16] Lai A, Bergna A, Acciarri C, et al. Early phylogenetic estimate of the effective reproduction number of SARS-CoV-2. *J Med Virol*, 2020, 92(6): 675–679.
- [17] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(8): 523–534.
- [18] Kim D, Lee YJ, Yang JS, et al. The architecture of

- SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 2020, 181(4): 914–921.e10.
- [19] Wang QH, Zhang YF, Wu LL, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 2020, 181(4): 894–904.e9.
- [20] Song WF, Gui M, Wang XQ, et al. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLOS Pathog*, 2018, 14(8): e1007236.
- [21] Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol*, 2020, 81: 104260.
- [22] Wu AP, Peng YS, Huang BY, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3): 325–328.
- [23] Garmaroudi FS, Marchant D, Hendry R, et al. Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis. *Future Microbiol*, 2015, 10(4): 629–653.
- [24] Maginnis MS. Virus-Receptor Interactions: The key to cellular invasion. *J Mol Biol*, 2018, 430(17): 2590–2611.
- [25] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 2020, 181(2): 281–292.e6.
- [26] 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(2): 271–280.e8.
- [27] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 2000, 87(5): E1–E9.
- [28] Anguiano L, Riera M, Pascual J, et al. Circulating ACE2 in cardiovascular and kidney diseases. *Curr Med Chem*, 2017, 24(30): 3231–3241.
- [29] Perlot T, Penninger JM. ACE2 - from the renin-angiotensin system to gut microbiota and malnutrition. *Microbes Infect*, 2013, 15(13): 866–873.
- [30] Yan RH, Zhang YY, Li YL, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, 367(6485): 1444–1448.
- [31] Du LY, He YX, Zhou YS, et al. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3): 226–236.
- [32] Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, et al. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol*, 2010, 84(24): 12658–12664.
- [33] Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(42): 11157–11162.
- [34] Lan J, Ge JW, Yu JF, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020, 581(7807): 215–220.
- [35] Wan YS, Shang J, Graham R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J Virol*, 2020, 94(7): e00127–20.
- [36] Xu XT, Chen P, Wang JF, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457–460.
- [37] Glowacka I, Bertram S, Müller MA, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol*, 2011, 85(9): 4122–4134.
- [38] Madani TA, Azhar EI, Hashem AM. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med*, 2014, 371(14): 1359–1360.
- [39] Li YC, Bai WZ, Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV-2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J Med Virol*, 2020, 92(6): 552–555.
- [40] Morimoto C, Schlossman SF. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev*, 1998, 16(1): 55–70.
- [41] Vankadari N, Wilce JA. Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 601–604.
- [42] Wrapp D, Wang NS, Corbett SK, et al. Cryo-EM

- structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367(6483): 1260–1263.
- [43] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell*, 2020, 78(4): 779–784.e5.
- [44] Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: a comparative overview. *Infez Med*, 2020, 28(2): 174–184.
- [45] Lau SY, Wang P, Mok BW, et al. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 837–842.
- [46] Ziebuhr J. The coronavirus replicase. //Enjuanes L ed. *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005, 287: 57–94.
- [47] Ahn DG, Choi JK, Taylor DR, et al. Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Arch Virol*, 2012, 157(11): 2095–2104.
- [48] Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv Virus Res*, 2016, 96: 59–126.
- [49] Kirchdoerfer RN, Ward AB. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat Commun*, 2019, 10: 2342.
- [50] Yin WC, Mao CY, Luan XD, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, 2020: eabc1560.
- [51] Oudshoorn D, Rijs K, Limpens RWAL et al. Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *mBio*, 2017, 8(6): e01658–17.
- [52] Liu XR, Fang PX, Fang LR, et al. Porcine deltacoronavirus nsp15 antagonizes interferon- β production independently of its endoribonuclease activity. *Mol Immunol*, 2019, 114: 100–107.
- [53] Angeletti S, Benvenuto D, Bianchi M, et al. COVID-2019: The role of the nsp2 and nsp3 in its pathogenesis. *J Med Virol*, 2020, 92(6): 584–588.
- [54] Saikatendu KS, Joseph JS, Subramanian V, et al. Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1"-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. *Structure*, 2005, 13(11): 1665–1675.
- [55] Yu K, Ming ZH, Li YY, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of nonstructural protein 2 (nsp2) from avian infectious bronchitis virus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*, 2012, 68(6): 716–771.

(本文责编 郝丽芳)