



新型冠状病毒来源、传播途径及易感动物模型研究进展

白亮^{1,2}, 刘宝宁^{1,2}, 赵四海^{1,2}, 刘恩岐^{1,2*}

(1. 西安交通大学医学部实验动物中心, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学医学部基础医学院, 陕西 西安 710061)

摘要:新型冠状病毒(SARS-CoV-2)继 2019 年 12 月以来在湖北省武汉市引发多例病毒性肺炎(COVID-19), 从武汉迅速传播到中国所有省份以及全球 20 多个国家, 导致死亡人数超过 1 000 例。鉴于 SARS-CoV-2 与蝙蝠冠状病毒(RaTG13)具有高度相似性, 推测 SARS-CoV-2 的源头是蝙蝠, 但蝙蝠通过何种中间宿主完成的跨物种感染尚不明确。目前, 全球医疗、科研工作者正在积极开展抗病毒药物筛选、疫苗研制和病毒致病机理研究, 递次推进动物实验和临床试验。靶向 SARS-CoV-2 的功能性受体—血管紧张素转化酶 2(ACE2), 建立啮齿类、非人灵长类等易感动物模型, 可助力攻克新型冠状病毒感染的肺炎疫情。

关键词: SARS-CoV-2; 易感动物模型; ACE2

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)属于 β 属冠状病毒, 有包膜, 病毒颗粒呈圆形或椭圆形, 常为多形性, 直径 60~140 nm^[1]。SARS-CoV-2 因 2019 年武汉病毒性肺炎病例而被发现, 是继严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)之后在人类出现的第三种致病冠状病毒^[1]。研究报告, SARS-CoV-2 发生人传人情况^[2,3], 所致肺炎表现有发热、咳嗽、气促和呼吸困难等呼吸道症状, 较严重感染病例可导致肺炎、严重急性呼吸综合征、肾衰竭, 甚至死亡^[4]。2020 年 1 月 30 日, 世界卫生组织(WHO)宣布, 将新型冠状病毒疫情列为国际关注的突发公共卫生事件。截至 2020 年 2 月 13 日 18 时, 中国报告确诊病例 59 901 例, 疑似病例 13 435 例, 累计死亡病例 1 369 例, 死亡率高于 2%。血管紧张素转化酶 2(Angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是 SARS-CoV-2 感染宿主细胞的功能性受体, 广泛存在于哺乳动物中, 是病毒能够完成感染的关键蛋白^[5]。本文就 COVID-19 爆发以来, 有关病毒源头、传播的中间宿主以及易感动物方面的最新研究进展作一综述, 同时展望 ACE2 人源化小鼠模型的建立, 以期加速抗病毒药物筛选、疫苗研制和病毒致病机制研究提供基础保障。

1 SARS-CoV-2 的源头及可能传播途径

2020 年 1 月 10 日, SARS-CoV-2 的第一个完整基因组序列数据在美国国立卫生研究院 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>) 上被公布, 随后有多个从患者身上分离的 SARS-CoV-2 的基因组序列发布, 目前版本编号为 MN908947.3。病毒基因组序列表明, 其基因特征与 SARSr-CoV 和 MER

Sr-CoV 有明显区别, 与前者的序列同源性为 75%~80%, 与后者的序列同源性为 40%^[6]。在新型肺炎疫情早期, Shi 等^[6]从 5 名患者体内获得该病毒的全基因组, 经分析发现 SARS-CoV-2 与云南菊头蝠上分离的病毒株 RaTG13 相似度高达 96.2%, 故推测 SARS-CoV-2 的源头是蝙蝠。Xu 等^[7]通过对武汉新型冠状病毒的进化及其棘突蛋白对人类传播风险的模拟分析表明, SARS-CoV-2 与 SARS/类 SARS 冠状病毒的共同祖先是类似于蝙蝠冠状病毒 HKU9-1, 故推论该病毒的原始宿主可能是蝙蝠。Zhang 等^[8]最新研究发现, SARS-CoV-2 与 SARS-CoV、MERS-CoV、HCoV-HKU1、HCoV-229E、HCoV-OC43 及 HCoV-NL63 6 种可以感染人类的冠状病毒, 以及蝙蝠冠状病毒(RaTG13)高度相似, 进一步表明 SARS-CoV-2 由蝙蝠冠状病毒 RaTG13 自然演化而来。蝙蝠是一个巨大的天然冠状病毒库, 其免疫系统对这些病毒不易感, 能够携带多种病毒, 但它本身并不发病^[9]。那么, SARS-CoV-2 的传播者究竟是哪种动物呢?

SARS-CoV-2 需要通过中间宿主才能感染人。比如 SARS 病毒的源头是蝙蝠, 但要通过果子狸才能传染人, MERS 病毒源自埃及墓蝠, 之后传给单峰驼, 进而感染人类^[10,11]。通过比较所有宿主在脊椎动物上的病毒传染模式, 发现水貂病毒的传染性模式更接近 SARS-CoV-2^[12]。根据 SARS-CoV-2 的基因序列, 结合不同物种之间的相对同义密码子使用偏好性分析表明, 蛇是 SARS-CoV-2 最有可能的野生动物携带者, 病毒棘突糖蛋白内的同源重组可能有助于蛇类向人类的跨物种传播^[13]。最新报道, 穿山甲为 SARS-CoV-2 的潜在中间宿主。通过 1 000 多份宏基因组样品分析发现穿山甲中 β

作者简介:白亮(1981-),女,汉族,副教授,博士。研究方向:基因修饰动物模型构建及脂质代谢方面的工作,尤其是动脉粥样硬化、脂肪肝等代谢性疾病的分子调控研究。

通讯作者:刘恩岐, E-mail: liuenqi@mail.xjtu.edu.cn.

基金项目:陕西省自然科学基金项目(2019JM-048)。



冠状病毒的阳性率为 70%；电镜观察分离的病毒呈典型的冠状病毒颗粒结构；病毒基因组分析发现分离的病毒株与 SARS-CoV-2 序列相似度高达 99% (<http://www.chinanews.com/sh/2020/02-07/9082215.shtml>)。这一最新发现将有利阻断病毒动物源，避免病原的长期传播，对新型冠状病毒的源头防控具有重大意义。但是，穿山甲如何传播至人以及是否存在其他中间宿主目前尚未明确。

2 SARS-CoV-2 感染的关键受体—ACE2

血管紧张素转换酶 2 (Angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是一种金属蛋白酶, 全长 805 个氨基酸, 包括 17 个氨基酸组成的 N 端信号肽序列和一个 C 端膜锚定区, 广泛表达于肺、胃、脾、肠、骨髓、肾脏、肝脏以及大脑中^[14,15]。在肺组织中, 它主要表达于血管内皮、I 型和 II 型肺泡上皮细胞、肺血管平滑肌细胞以及支气管上皮细胞中^[14,15]。Zhao 等^[16]利用在线数据库和单细胞 RNA 测序技术, 分析人正常肺组织中 ACE2 的 RNA 表达谱, 发现 ACE2 病毒受体的表达集中在少数 II 型肺泡细胞中, 且在亚裔男性标本的 ACE2 表达水平远高于其他所有人。ACE2 不仅在肺细胞、食管上皮细胞和复层上皮细胞中有高表达, 而且在回肠和结肠吸收性肠上皮细胞中也有高表达, 提示消化系统和呼吸系统是 SARS-CoV-2 感染的潜在途径^[17]。

研究表明, SARS 与 MERS 冠状病毒都依靠病毒表面 S 蛋白中的受体结合域 (RBD) 与宿主细胞表面的受体进行结合, 然后在细胞质中释放出 RNA, 指导合成新的病毒颗粒^[10,11]。不同的是 SARS 病毒识别 ACE2 受体, 而 MERS 病毒识别 DPP4 受体^[10,11,18]。SARS-CoV-2 表面的 S 蛋白由 S1 和 S2 两部分组成, S1 负责与细胞表面的受体结合, S2 负责病毒与宿主细胞的膜融合。根据计算机模拟和三维分子结构预测分析, SARS-CoV-2 和 SARS 的 S 蛋白同源性较低, 氨基酸序列相似度只有 76.47%, 但它保留了 SARS 感染的 5 个关键位点中的 1 个, 其余 4 个虽然有氨基酸的替换和变化, 却维持了 SARS 病毒 S 蛋白与 ACE2 蛋白作用的原结构构象^[5,19]。由于 RBD 结构域氨基酸变化, 丢失了一些氢键, 使其与 ACE2 蛋白互作能有所下降, 但仍然达到很强的结合自由能^[5,19]。这些研究结果表明, SARS-CoV-2 和 SARS 病毒一样, 通过结合 ACE2 受体进行病毒感染和传播^[5,18,19]。目前, 靶向 ACE2, 有关抗 SARS-CoV-2 的药物筛选、小分子化合物预测以及易感动物模型建立等相关研究工作正在开展。

3 SARS-CoV-2 易感动物模型

基于病毒 S 蛋白与 ACE2 蛋白复合体的三维分子结构预测模型, 研究发现除小鼠和大鼠外, SARS-CoV-2 能以相似的效率识别来自猪、雪貂、猫、猴子和猩猩的 ACE2, 因为这些物种 ACE2 蛋白在关键病毒结合残基中相同或相似^[19]。这些研究结果提示, 猪、雪貂、猫、猩猩和猴子可作为 SARS-CoV-2 感染的易感动物模型。根据 SARS 病毒感染动物经验, 病毒气管内接种非人灵长类动物模型似乎更能准确地模拟人类疾病^[20]。但考虑到灵长类动物伦理学问题、成本高、操作困难等因素, 建立 SARS-CoV-2 感染的啮齿类小动物模型可为加快抗病毒药物筛选、疫苗研制和病毒发病机制研究提供基础平台。

由于小鼠或大鼠 ACE2 在 353 位含有组氨酸, 不像赖氨酸那样适合病毒/受体相互作用, 因此普通小鼠或大鼠的 ACE2 不能作为 SARS-CoV-2 感染的受体^[19], 需要构建 ACE2 基因修饰小鼠或大鼠作为 SARS-CoV-2 的动物疾病模型。Jr 等^[21]2007 年建立人 ACE2 转基因小鼠模型, 可在小鼠的肺表达 ACE2 蛋白, 感染人 SARS-CoV 以后, 转基因小鼠会迅速死亡, 感染始于气道上皮, 随后肺泡受累, 肺外病毒扩散到大脑, 且导致肺中巨噬细胞和淋巴细胞的渗透, 肺和脑中炎症细胞因子和趋化因子上调。SARS-CoV 致死性感染的这种模型在发病机理的研究和抗病毒治疗的研发中起到了重要作用。

4 展望

2020 年 1 月 22 日, 国家自然科学基金委员会启动专项项目, 支持所在依托单位具有相关生物安全研究条件的科研人员, 紧密围绕新型冠状病毒感染的病原学、流行病学、发病机制、疾病防治等相关重大科学问题, 开展基础性、前瞻性的联合研究。实验动物相关的各科研院所、生物公司也相继启动 SARS-CoV-2 感染的动物疾病模型构建工作, 从实验动物水平为 SARS-CoV-2 疫情防控贡献一份力量。有关 ACE2 人源化小鼠、ACE2 基因敲除小鼠、ACE2 点突变小鼠、ACE2 转基因小鼠等, 以及 ACE2+ II 型肺泡细胞表达的与病毒组装复制相关的功能基因 (如 SLC1A5、CAV2、CXADR 和 HSPA1B 等) 修饰小鼠模型正在全力研发中, 助力于临床前药物筛选、新型抗病毒疗法, 并为后续深入探讨 SARS-CoV-2 发病机制、病毒变异与宿主适应关系、以及疫苗研发提供便捷有效的动物模型平台。



参考文献:

- [1] ZHU N,ZHANG D,WANG W,et al.A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 [J].N Engl J Med,2020 Jan 24.doi:10.1056/NEJMoa2001017.
- [2] CHAN JF,YUAN S,KOK KH,et al.A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J].Lancet, 2020,395(10223):514-523.
- [3] LI Q,GUAN X,WU P,et al.Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia[J].N Engl J Med,2020 Jan 29. doi:10.1056/NEJMoa2001316.
- [4] 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.
- [5] LU R,ZHAO X,LI J,et al.Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J].Lancet,2020 Jan 30.pii:S0140-6736(20) 30251-8.
- [6] ZHOU P,YANG XL,WANG XG,et al.Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin[J]. bioRxiv,doi:2020.01.22.914952.
- [7] XU X,CHEN P,WANG J,et al.Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission[J].Sci China Life Sci,2020 Jan 21.doi:10.1007/s11427-020-1637-5.
- [8] ZHANG C,ZHENG W,HUANG X,et al.Protein structure and sequence re-analysis of SARS-CoV-2 genome does not indicate snakes as its intermediate host or the unique similarity between its spike protein insertions and HIV-1[J].bioRxiv,doi: 2020.02.04.933135.
- [9] ZHANG G,COWLED C,SHI Z,et al.Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity[J].Science,2013,339(6118):456-460.
- [10] 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.
- [11] DROSTEN C,KELLAM P,MEMISH ZA.Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus [J].N Engl J Med, 2014,371(14):1359-1360.
- [12] GUO Q,LI M,WANG C,et al.Host and infectivity prediction of Wuhan 2019 novel coronavirus using deep learning algorithm [J].bioRxiv,doi:2020.01.21.914044.
- [13] JI W,WANG W,ZHAO X,et al.Homologous recombination within the spike glycoprotein of the newly identified coronavirus may boost cross-species transmission from snake to human[J].J Med Virol,2020 Jan 22.doi:10.1002/jmv.25682.
- [14] DONOGHUE M,HSIEH F,BARONAS E,et al.A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J].Circ Res,2000,87 (5):E1-9.
- [15] TIPNIS SR,HOOVER NM,HYDE R,et al.A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase [J].J Biol Chem, 2000,275(43):33238-33243.
- [16] ZHAO Y,ZHAO ZX,WANG YJ,et al.Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan SARS-CoV-2[J].bioRxiv,doi:2020:2020.01.26.919985.
- [17] ZHANG H,KANG Z,GONG H,et al.The digestive system is a potential route of SARS-CoV-2 infection: a bioinformatics analysis based on single-cell transcriptomes [J].bioRxiv,doi: 2020.01.30.927806.
- [18] LI W,MOORE MJ,VASILIEVA N,et al.Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. Nature,2003,426(6965):450-454.
- [19] WAN Y,SHANG J,GRAHAM R,et al.Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS [J].J Virol,2020 Jan 29.pii:JV1. 00127-20.
- [20] PERLMAN S,NETLAND J.Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J].Nat Rev Microbiol,2009,7 (6):439-50.
- [21] MCCRAY PB JR,PEWE L,WOHLFORD-LENANE C,et al.Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus [J].J Virol,2007,81 (2): 813-21.