

# 蝙蝠来源的重症急性呼吸综合征样冠状病毒WIV1刺突蛋白利用浣熊狗血管紧张素转换酶Ⅱ受体侵入细胞能力的研究

郑梅 郑双丽 陈丹瑛 蒋栋 曾辉 赵学森

**【摘要】目的** 研究蝙蝠来源的重症急性呼吸综合征(SARS)样冠状病毒WIV1刺突蛋白利用浣熊狗血管紧张素转换酶Ⅱ(ACE2)受体侵入细胞的能力,并探究SARS样冠状病毒WIV1潜在的跨宿主传播风险。**方法** 构建来自浣熊狗、果子狸、中华菊头蝠和人等不同动物来源的ACE2表达质粒,转染至293T细胞并利用免疫印迹方法检测其在293T细胞中的表达水平;建立SARS冠状病毒(Tor2株系)及蝙蝠SARS样冠状病毒(WIV1株系)假病毒感染系统,并进行假病毒感染实验;利用假病毒感染系统及荧光素酶报告基因检测WIV1刺突蛋白对浣熊狗等不同动物来源ACE2受体利用能力;构建跨膜丝氨酸蛋白酶2(TMPS2)质粒,并转染至T Rex 293细胞,借助假病毒感染系统检测TMPS2对WIV1侵入能力的影响。**结果** 本研究所获赠及构建的不同动物来源的ACE2质粒可经瞬时转染至细胞进行表达;与pcDNA3.1载体相比,浣熊狗、中华菊头蝠、果子狸和人的ACE2均可使蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1侵入细胞的能力增加上万倍,上述ACE2组与载体组的荧光素酶活性差异均具有统计学意义( $t = 27.744$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 18.740$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 32.297$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 15.902$ 、 $P < 0.001$ );与TMPS2阴性组相比,TMPS2在靶细胞的表达可使WIV1假病毒的感染能力增加10倍以上,两组荧光素酶活性差异具有统计学意义( $t = 29.460$ 、 $P < 0.001$ )。**结论** 蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1的刺突蛋白除了利用人类、果子狸及中华菊头蝠的ACE2受体感染细胞,还可利用浣熊狗的ACE2受体侵入细胞,且TMPS2可显著促进其侵入能力,提示WIV1可能存在多种跨宿主传播的风险。

**【关键词】** 蝙蝠, 重症急性呼吸综合征样冠状病毒; WIV1; 浣熊狗; 人类血管紧张素转换酶Ⅱ; 跨膜丝氨酸蛋白酶2

**Ability of bat severe acute respiratory syndromes-like coronavirus (WIV1) to utilize raccoon dog angiotensin-converting enzyme Ⅱ as receptor for cellular entry** Zheng Mei, Zheng Shuangli, Chen Danying, Jiang Dong, Zeng Hui, Zhao Xuesen. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zhao Xuesen, Email: zhaoxuesen@ccmu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To investigate the ability of bat severe acute respiratory syndromes (SARS)-like coronavirus (WIV1 strain) to utilize angiotensin-converting enzyme Ⅱ (ACE2) from raccoon dog as a receptor for cellular entry, and to explore the potential cross-species transmissibility of WIV1. **Methods** Plasmids encoding ACE2 molecules from different animals including human (*Homo sapiens*), civet cat (*Paguma larvata*), Chinese horseshoe bat (*Rhinolophus sinicus*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) were constructed, and then transfected into 293T cells. The expressions of ACE2 proteins in 293T were detected by Western blot with anti-C9 antibody. The pseudoviral infection systems of SARS coronavirus (Tor2 strain) and bat SARS-like coronavirus (WIV1 strain) were established to detect receptor activity of different animals' ACE2 for WIV1 entry. The plasmid expressing transmembrane serine protease 2 (TMPS2)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2019.05.005

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81571976)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所

通信作者: 赵学森, Email: zhaoxuesen@ccmu.edu.cn

was constructed, and then transfected into T Rex 293 cells. The effect of TMPRSS2 on WIV1pp infectivity was examined by luciferase assay. **Results** ACE2 from raccoon dog, Chinese horseshoe bat, civet cat and human expressed well in 293T cells and supported cellular entry mediated by WIV1 S protein. Compared with pcDNA3.1 vector, ACE2 molecules from raccoon dog, Chinese horseshoe bat, civet cat and human increased the WIV1pp infection by thousands of times, all with significant differences in luciferase activity ( $t = 27.744, P < 0.001$ ;  $t = 18.740, P < 0.001$ ;  $t = 32.297, P < 0.001$ ;  $t = 15.902, P < 0.001$ ). Compared with the group without TMPRSS2, the expression of TMPRSS2 in target cells increased the infection mediated by WIV1-S protein by more than 10 folds, with significant difference in luciferase activity ( $t = 29.460, P < 0.001$ ). **Conclusions** The ACE2 molecules from raccoon dog served as a functional receptor for cellular entry mediated by WIV1 spike protein, which was activated by the TMPRSS2 protease. Our findings herein suggest that there may exist a risk of multiple cross-species transmission of WIV1 among human, bat and raccoon dog.

**【Key words】** Bat severe acute respiratory syndromes-like coronavirus; WIV1; Raccoon dog; Angiotensin-converting enzyme II; Transmembrane protease serine 2

重症急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndromes, SARS)是一种严重的新发突发呼吸道传染性疾病,曾于2002年至2003年于我国广东地区大暴发,其传染性广、致病性强,且病死率高,不仅给世界经济带来了极大损失,也给人类生命健康带来威胁<sup>[1-2]</sup>。研究人员发现,造成此疾病的病原体是一种新型冠状病毒——重症急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndromes coronavirus, SARS-CoV)<sup>[3-4]</sup>,该病毒可以利用来自不同动物的血管紧张素转换酶II(angiotensin-converting enzyme II, ACE2)作为受体来感染宿主<sup>[5-6]</sup>。SARS作为当下最受关注的公共卫生事件之一,自其暴发以来,对其病原溯源及跨宿主传播的研究一直是新发突发传染病领域的研究热点<sup>[7]</sup>。

自成功分离出SARS-CoV后,中国以及欧洲、非洲等国家的果子狸、浣熊狗及蝙蝠中也曾被报道多种具有遗传多样性的SARS样冠状病毒<sup>[8-12]</sup>。2013年,石正丽等<sup>[12]</sup>利用猴肾细胞(Vero E6)从中华菊头蝠的粪便样本中分离出1株蝙蝠SARS样冠状病毒,并命名为WIV1(武汉病毒研究所的英文简称)。WIV1是近年来报道的与人类SARS冠状病毒基因组高度相似的SARS样冠状病毒活毒株,具有典型的冠状病毒特征<sup>[12]</sup>。病毒感染实验证实其可利用来自人类、中华菊头蝠及果子狸的ACE2受体侵入宿主细胞<sup>[12]</sup>,但蝙蝠来源的WIV1是否可以利用其他动物(如浣熊狗)的ACE2受体侵入细胞仍有待研究。

冠状病毒侵入宿主细胞是其成功感染的关键一步,该过程主要依赖于病毒刺突蛋白,即S蛋白。研究表明,SARS-CoV的S蛋白属于I型融合蛋白,可分为S1和S2结构域<sup>[13]</sup>。S1结构域上的

受体结合区(receptor binding domain, RBD)与ACE2受体结合,此过程决定了SARS冠状病毒的宿主范围<sup>[14-15]</sup>。S2结构域主要介导病毒包膜与细胞膜的融合过程。在病毒入侵过程中,宿主组织蛋白酶或外源胰蛋白酶激活SARS-CoV的S蛋白可增强病毒的侵染能力<sup>[16-17]</sup>。既往研究表明,组织蛋白酶、胰蛋白酶和跨膜丝氨酸蛋白酶2(transmembrane protease serines 2, TMPRSS2)等均可切割并激活高致病性SARS-CoV毒株Tor2的S蛋白,从而增强SARS-CoV(Tor2株系)的感染力<sup>[18-22]</sup>。由此,本课题组推测TMPRSS2可激活SARS样冠状病毒WIV1的S蛋白,从而增强其感染能力。

为研究WIV1潜在的种间传播能力,比较WIV1病毒刺突蛋白利用不同种属来源ACE2受体能力差异,本研究利用本实验室所建立的Tor2及WIV1的假病毒感染系统,验证其利用不同动物(包括人、中华菊头蝠、果子狸和浣熊狗等)来源的ACE2受体的能力,并验证TMPRSS2对WIV1病毒侵入的作用,研究以WIV1为代表的SARS样冠状病毒利用ACE2受体,并经其他中间宿主传播的可能,现报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验材料

人类ACE2质粒(由本实验室提供)、果子狸ACE2质粒、浣熊狗ACE2质粒(由加拿大西安大略大学Dr. Hanxin Lin馈赠);中华菊头蝠ACE2质粒(由本实验室研究人员构建);Kpn I内切酶(NEB,货号0142V);Age I-HF内切酶(NEB,

货号R35525); T4DNA连接酶(Promega, 货号M1808); TMPrSS2质粒(由本实验室提供); DNA胶回收试剂盒(QIAGEN, 货号28706); 小提质粒盒(QIAGEN, 货号PLN350-1KT); 大提质粒盒(QIAGEN, 货号12162); Flp-In™ TREx™-293细胞系(本实验室提供); Super Script IV逆转录试剂盒(invitrogen, 货号18091050); SYRB® Green Supermix (BIO-RAD, 货号1725121); 细胞培养皿(CORNING, 货号430167); 0.05%胰蛋白酶(Gibco, 货号25300-54); PBS(CORNING, 货号21-040-CVR); DMEM高糖培养基(Gibco, 货号11995-065); 抗菌药物Penicillin-Streptomycin(invitrogen, 货号15140122); 胎牛血清(CORNING, 货号R35-076-CF); Lipofectemin™ 2000转染试剂盒(Invitrogen, 货号11668-019); OPTI-MEM培养基(Gibco, 货号31985-062); 磷酸钙转染试剂盒(Invitrogen, 货号44-0052); pNL4-3 Luc R<sup>-</sup>E<sup>-</sup>质粒(由首都医科大学附属北京佑安医院陈德喜教授惠赠); 荧光素酶Firefly luciferase报告基因检测试剂盒(Promega, 货号E1501)。

## 二、实验方法

### (一) 中华菊头蝠的ACE2表达质粒的构建

1. 来自人、果子狸和浣熊狗的ACE2分子已被克隆至修饰后的pcDNA3.1载体(pcDNA3.1-N-myc/C-C9), 该质粒由加拿大西安大略大学Dr. Hanxin Lin馈赠。从该载体表达的ACE2蛋白在氨基(N)末端含有myc标签, 在羧基(C)端含有C9标签。

2. 结合参考文献, 从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) GenBank数据库获得中华菊头蝠的ACE2碱基序列, 通过基因合成将其克隆至中间载体PUC57中。设计具有Age I克隆位点的正向引物和具有Kpn I克隆位点的反向引物, 利用PCR扩增全长的中华菊头蝠ACE2序列, 经Age I内切酶与Kpn I内切酶内切后, 将其连接至经Age I内切酶与Kpn I内切酶内切后的pcDNA3.1-N-myc/C-C9载体中, 而后经过测序确定其序列的正确性。

### (二) 免疫印迹(Western blot)

1. 293T细胞分12孔板: 消化并接种293T细胞于12孔板中, 置于37℃培养箱中过夜培养。

2. 转染ACE2质粒: 待12孔板293T细胞密度达70%~90%时, 利用Lipofectamine™ 2000转染方法

分别转染不同动物来源的ACE2质粒或PcDNA3.1空载质粒1.6 μg。

3. 收蛋白: 转染48 h后, 吸掉培养基, PBS洗涤细胞3次, 将PBS尽量吸净, 每孔各加入300 μl 2% SDS (1% SDS, 2.5% β-巯基乙醇, 0.001%溴甲酚蓝, 5%甘油, 0.25 mmol/L Tris HCl, pH6.8), 于摇床室温摇15 min。待细胞充分裂解后, 收至1.5 ml EP管中, 100℃煮沸10 min, 14 680 r/min离心5 min (离心半径r=8.4 cm)。

4. Western blot: 取20 μl上清上样, 用抗-C9标签抗体检测ACE2蛋白是否表达。

### (三) RT-qPCR

1. 293T细胞分12孔板: 消化并接种293T细胞于12孔板中, 置于37℃培养箱中过夜培养。

2. 转染ACE2质粒: 待12孔板293T细胞密度达70%~90%时, 利用Lipofectamine™ 2000转染方法分别转染不同动物来源的ACE2质粒或PcDNA3.1空载质粒1.6 μg, 每种质粒转染3个平行孔。

3. 提取RNA: 每孔用PBS洗1遍, 加入1 ml TRIzol试剂, 提取RNA。

4. RT-PCR: 按照invitrogen SuperScript IV逆转录试剂盒方案进行RT-PCR, 得到cDNA。

5. 对4种ACE2的cDNA序列引物序列比对分析, 选取保守区设计引物如下: 上游引物5'-GAGGTCGGCAAGCAGCTGAGGCC-3'; 下游引物5'-CCAATAATCCCCATAGTCCTC-3'; 另外, 以β-actin作为内参, 引物如下: 上游引物5'-CCCTTGGACCCAGAGGTTCT-3'; 下游引物5'-CGAGCACTTTCTTGCCATGA-3'。

6. qPCR: 反应参数: 95℃、10min, 95℃、15 s, 60℃、1 min。ABI-7500上机, 通过qPCR进行相对定量。

7. 采用2<sup>-ΔΔCT</sup>相对定量法, 评价mRNA水平。

### (四) 合胞体形成实验

1. 消化并接种293T细胞于12孔板中, 置于37℃培养箱中过夜培养。

2. 待12孔板293T细胞密度达70%~90%时, 利用上述Lipofectamine™ 2000转染法分别转染不同动物来源的ACE2质粒或PcDNA3.1空载质粒及SARS-CoV (Tor2株系)的S蛋白质粒1.6 μg。

3. 待转染24 h后, 用胰酶消化细胞, 并将转染了ACE2质粒的细胞和转染了SARS-CoV S蛋白质粒的细胞按照1:1比例接种到新的12孔板中, 置于37℃培



养箱中培养, 24 h后镜下观察合胞体形成情况。

#### (五) 制备蝙蝠SARS样冠状病毒假病毒

1. 用胰酶消化并接种Lenti-X 293T细胞至10 cm大皿中, 置37 °C培养箱中培养16~18 h。

2. 待细胞密度达80%~90%时, 按照磷酸钙转染方法转染10 µg Tor2或WIV1 S蛋白质粒及20 µg pNL4-3 Luc R<sup>-</sup>E<sup>-</sup>质粒。转染6~8 h后, 补液2 ml。

3. 转染24 h后, 更换15 ml新鲜DMEM高糖培养基。

4. 转染48 h后, 收取上清液并通过0.45 µm PES滤嘴过滤, 分装后置于-80 °C冰箱保存备用。

本研究使用的HIV/Luc (NL4-3 R<sup>-</sup>E<sup>-</sup> Luc) 报告基因载体是基于HIV-1 NL4-3毒株基因组改造的含有荧光素酶报告基因的复制缺陷型慢病毒载体, 其env和vpr蛋白编码区已经进行了分子突变失活, 使此载体不能表达包膜蛋白和vpr蛋白。因此, HIV/Luc载体与编码Tor2或WIV1 S蛋白质粒共转染细胞时, 包装出的Tor2或WIV1假病毒颗粒仅能完成第一轮感染, 而不能继续复制。从而保证了在BSL2二级生物安全实验室进行试验的安全性。

#### (六) 假病毒感染实验

1. 消化并接种T-Rex 293细胞于6孔板, 37 °C培养箱中过夜培养。

2. 待细胞密度达70%~90%时, 转染不同动物来源的ACE2质粒。

3. 转染24 h后, 消化并接种细胞至96孔板, 37 °C培养箱过夜培养。

4. 待细胞密度达80%~100%时, 弃掉培养基, 将假病毒按1:1比例进行稀释, 每孔加入150 µl假病毒。

5. 感染48 h后, 弃掉病毒液。每孔加入30 µl细胞裂解液, 摇床上摇15 min, 待细胞充分裂解, 每孔加入50 µl荧光素酶底物, 混匀后迅速置于荧光素发光仪器上读数。

本实验以所测得的荧光素酶活性代表假病毒的侵染能力。本研究虽采用复制缺陷型慢病毒感染系统, 但依然可能对实验人员存在潜在风险。实验过程中, 研究人员遵守BSL2实验室规章及操作流程。凡涉及假病毒的实验, 均在BSL2生物安全柜中规范操作。实验过程中产生的废物及用过的耗材于84消毒液中浸泡12 h后, 按医疗垃圾进行分类处理。

#### (七) TMPRSS2实验

1. 用胰酶消化并接种T-Rex 293T细胞至6孔板

中, 置37 °C培养箱中培养16~18 h。

2. 待细胞密度达到70%~90%时, 转染ACE2和TMPRSS2质粒各2 µg, 以转染ACE2和pcAGGS空载质粒作为对照。

3. 转染24 h后, 按照上述假病毒感染实验进行操作。

#### 三、统计学处理

本实验数据采用GraphPad Prism 5软件进行统计分析及绘图。Luciferase值为计量资料且呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用独立样本 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

一、ACE2真核表达质粒可经瞬时转染至293T细胞表达相应蛋白并可发挥受体功能

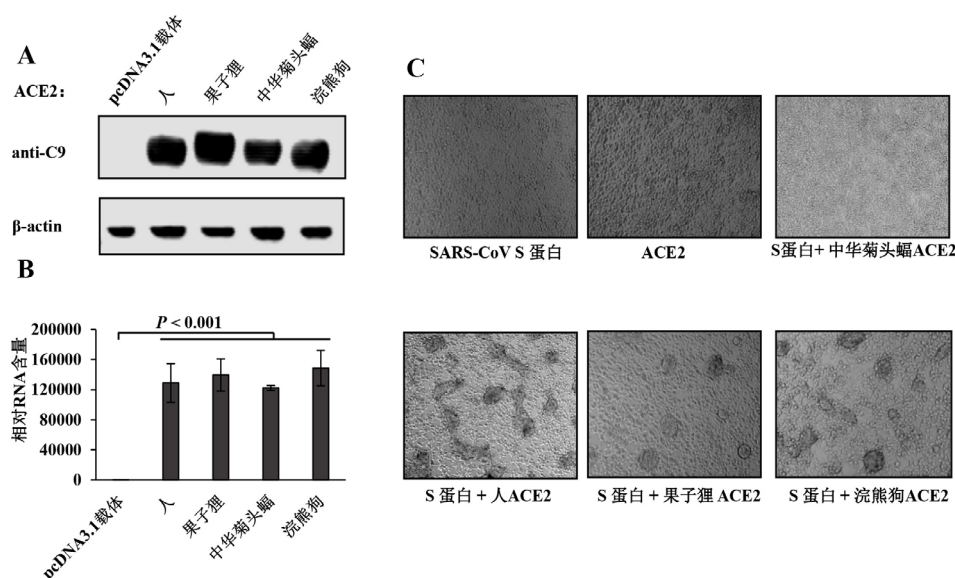
已有研究表明WIV1可利用来自人类、果子狸和中华菊头蝠的ACE2受体来感染宿主<sup>[12]</sup>。为证明WIV1对其他动物(如浣熊狗)来源的ACE2的利用能力, 探究WIV1的潜在跨宿主传播能力。本实验将上述提到的多种动物来源的ACE2质粒以瞬时转染的方法分别转染至293T细胞, 通过Western blot分析检测ACE2蛋白的表达(图1A); 并通过RT-qPCR检测其mRNA表达水平(图1B)。结果表明, 不同动物来源的ACE2质粒经瞬时转染至293T细胞, 48 h后可成功表达不同动物的ACE2蛋白, 来自人类、果子狸、中华菊头蝠、浣熊狗的ACE2 mRNA水平和pcDNA3.1载体组相比均有较高水平表达, 其mRNA表达水平差异均具有统计学意义( $t = 2.902$ 、 $P = 0.044$ ,  $t = 3.766$ 、 $P = 0.019$ ,  $t = 7.961$ 、 $P = 0.001$ ,  $t = 3.636$ 、 $P = 0.022$ )。此外, 为证明本研究所构建的ACE2质粒可正常发挥作为SARS-CoV的受体功能。分别将SARS-CoV (Tor2株系)的S蛋白质粒及来自不同动物的ACE2质粒瞬时转染于293T细胞, 进行合胞体形成实验。显微镜观察发现除来自中华菊头蝠的ACE2, 来自人类、果子狸和浣熊狗的ACE2均可与SARS-CoV (Tor2株系)的S蛋白相互作用, 并介导大量合胞体的形成(图1C)。证明本研究所构建的ACE2质粒可正常发挥受体功能。

二、蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1可利用来自浣熊狗的ACE2受体

为进一步探究蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1是

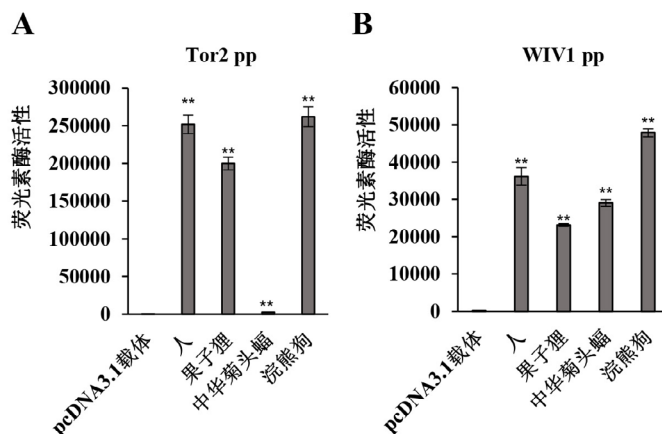
否可利用来自浣熊狗的ACE2受体,本研究制备了蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1假病毒及SARS-CoV (Tor2株系)假病毒(对照),并利用上述假病毒感染实验检测其对转染了不同动物来源ACE2质粒的T Rex293细胞的侵染能力。结果显示,SARS-CoV (Tor2株系)假病毒利用人、果子狸和浣熊狗ACE2侵入细胞的能力显著高于pcDNA3.1载体,上述ACE2组与载体组间荧光素酶活性差异均具有统计学意义( $t = 20.871$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 14.911$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 12.511$ 、 $P < 0.001$ );而仅能以极弱的能力利用中华菊头蝠

ACE2受体侵入细胞,且与载体组间的荧光素酶活性差异有统计学意义( $t = 7.619$ 、 $P < 0.001$ ) (图2A)。本实验与既往研究一致<sup>[5-6]</sup>,再次证明本实验室的ACE2质粒可正常发挥受体功能。此外,与pcDNA3.1载体组相比,浣熊狗、中华菊头蝠、果子狸和人的ACE2可使蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1侵入细胞的能力增加上万倍,上述ACE2组与载体组间荧光素酶活性差异均具有统计学意义( $t = 27.744$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 18.740$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 32.297$ 、 $P < 0.001$ ,  $t = 15.902$ 、 $P < 0.001$ ) (图2B)。



注: A: 转染不同动物来源ACE2表达质粒的293T细胞裂解物中ACE2蛋白的表达。B: 转染不同动物来源ACE2表达质粒的293T细胞中ACE2 mRNA水平的表达。C: 由SARS-CoV (Tor2株系) S蛋白和不同动物ACE2相互作用介导的合胞体形成实验。S蛋白: SARS-CoV (Tor2株系) 刺突蛋白

图1 ACE2蛋白表达及其介导的细胞融合

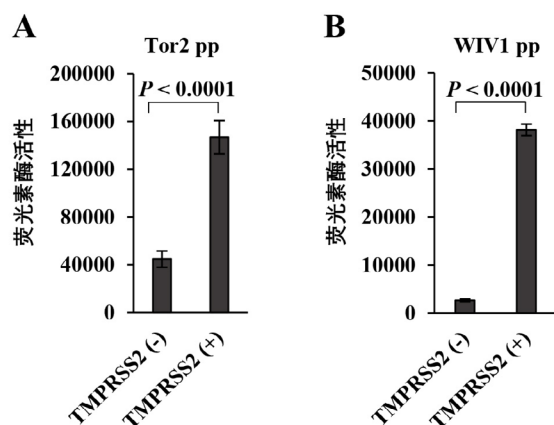


注: Tor2 pp: SARS-CoV (Tor2株系) 假病毒; WIV1 pp: 蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1假病毒; \*\*:  $P < 0.001$

图2 SARS-CoV (Tor2株系) 假病毒和SARS样冠状病毒WIV1假病毒利用不同动物来源ACE2受体侵入细胞的能力

### 三、TMPRSS2可显著增加蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1的侵染能力

为证明TMPRSS2可增加蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1的侵染能力,本研究利用TMPRSS2质粒和ACE2质粒共转染T-Rex 293细胞,并利用假病毒感染系统检测TMPRSS2对蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1感染能力的影响。结果显示,与TMPRSS2阴性组相比,TMPRSS2可使SARS-CoV (Tor2株系)假病毒的感染能力增加约4倍,两组间荧光素酶活性差异具有统计学意义( $t = 18.804$ 、 $P < 0.001$ ) (图3A),该结果与既往研究一致<sup>[19]</sup>;而TMPRSS2可以使蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1的感染力增加10倍以上,两组间荧光素酶活性差异具有统计学意义( $t = 29.460$ 、 $P < 0.001$ ) (图3B)。



注: Tor2 pp: SARS-CoV (Tor2 株系) 假病毒; WIV1 pp: 蝙蝠 SARS 样冠状病毒 WIV1 假病毒

图3 TMPRSS2对SARS-CoV (Tor2 株系) 假病毒及蝙蝠 SARS样冠状病毒WIV1假病毒感染能力的影响

## 讨 论

近些年来,新发突发传染病的暴发与流行一直是临床治疗及公共卫生防控领域面临的重大难题<sup>[23]</sup>,诸如重症急性呼吸综合征(SARS)、中东呼吸综合征(MERS)、新型禽流感(H5N1及H7N9)以及埃博拉疫情(Ebola)等新发突发传染病的出现让人们逐渐意识到病毒通过跨宿主传播导致流行病的风险之大<sup>[24-28]</sup>。虽然自2002年至2003年SARS暴发以后,SARS冠状病毒感染便销声匿迹,但这并不意味着SARS-CoV对人类的威胁不复存在。随着诸多基因多样性的SARS样冠状病毒被报道,SARS病毒的起源已被初步揭示<sup>[29]</sup>。WIV1作

为第一例从中华菊头蝠分离出的SARS样冠状病毒的活病毒株,已被证明可利用来自人类、果子狸和中华菊头蝠的ACE2受体侵入宿主细胞,表明WIV1存在感染人类的风险<sup>[30]</sup>。

本研究利用本实验室获得的多种动物来源的ACE2受体分子,结合WIV1假病毒感染系统,证实蝙蝠SARS样冠状病毒WIV1除了可利用来自人类、果子狸及中华菊头蝠的ACE2受体,并且还可有效利用来自浣熊狗ACE2受体分子侵入细胞。这意味着WIV1存在多种可能的跨宿主传播途径来感染人类。除WIV1毒株外,研究表明在中国云南野外蝙蝠群体中,存在多种SARS样冠状病毒,这些病毒的基因重组,可能为下一次SARS疫情的发生提供病毒基因库<sup>[28, 31-33]</sup>,表明我国仍旧存在与SARS类似的新发传染病暴发的风险,蝙蝠SARS样冠状病毒仍然是一个对全球公共卫生的重大威胁。但蝙蝠作为一种野生动物,在维持生态平衡中发挥着重要作用,只要人们和这些蝙蝠保持一定的距离,SARS样冠状病毒等其他蝙蝠携带的病毒由该生物溢出的可能性就很小。当然,作为中间宿主的果子狸、浣熊狗等其他野生动物亦应当受到重视,停止对这些野生动物的杀戮与贩卖,不仅可以维持自然界的生态平衡,也能在一定程度上预防新发传染病的暴发。

SARS-CoV利用不同动物来源ACE2受体的能力是由其刺突蛋白介导的,该过程是病毒成功侵入细胞的重要一步。既往研究表明,SARS-CoV (Tor2株系)的S蛋白在病毒颗粒入侵过程中可被多种蛋白酶(如cathepsin、trypsin、TMPRSS2等)切割并激活,从而增强SARS-CoV (Tor2株系)的侵入能力。由此,本研究证明TMPRSS2可以更大程度地增强SARS样冠状病毒WIV1的侵入能力,其机制是否与TMPRSS2增强SARS-CoV (Tor2株系)的机制一致,有待于进一步研究。但这一结果表明TMPRSS2或许可作为未来治疗SARS样冠状病毒感染的药物靶标。

## 参 考 文 献

- [1] Zhong N, Zheng B, Li Y, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003[J]. Lancet, 2003, 362(9393): 1353-1358.
- [2] Wang JT, Chang SC. Severe acute respiratory syndrome[J]. Curr Opin Infect Dis, 2004, 17(2): 143-148.
- [3] Ksiazek T. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1953-1966.

- [4] Drosten C, Günther S, Presler W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20):1967-1976.
- [5] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. *Nature (London)*, 2003, 426(6965):450-454.
- [6] Xu L, Zhang Y, Liu Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) from raccoon dog can serve as an efficient receptor for the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(11):2695-2703.
- [7] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3):181-192.
- [8] Menachery VD, Yount BL, Debbink K, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence[J]. *Nat. Med*, 2015, 21(12):1508-1513.
- [9] Tong S, Conrardy C, Ruone S, et al. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(3):482-485.
- [10] Yang XL, Hu B, Wang B, et al. Isolation and characterization of a novel bat coronavirus closely related to the direct progenitor of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *J Virol*, 2016, 90(6):3253-3256.
- [11] Lau SKP, Woo PCY, Li KSM, et al. Discovery of a novel coronavirus, China Rattus coronavirus HKU24, from Norway rats supports the murine origin of Betacoronavirus 1 and has implications for the ancestor of Betacoronavirus lineage A[J]. *J Virol*, 2015, 89(6):3076-3092.
- [12] Ge XY, Li JL, Yang XL, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor[J]. *Nature*, 2013, 503(7477):535-538.
- [13] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1):237-261.
- [14] Hulswit RJ, de Haan CA, Bosch BJ. Coronavirus spike protein and tropism changes[J]. *Adv Virus Res*, 2016, 96:29-57.
- [15] Li F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus[J]. *Antiviral Res*, 2013, 100(1):246-254.
- [16] Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis[J]. *Virus Res*, 2015, 202(1):120-134.
- [17] Millet JK, Whittaker GR. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells[J]. *Virology*, 2018, 517:3-8.
- [18] Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, et al. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection[J]. *J Virol*, 2019, 93(6):e01815-18.
- [19] Shirato K, Kawase M, Matsuyama S. Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry[J]. *Virology*, 2018, 517(1):9-15.
- [20] Shen LW, Mao HJ, Wu YL, et al. TMPRSS2 A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections[J]. *Biochimie*, 2017, 142(1):1-10.
- [21] Kawase M, Shirato K, Van d HL, et al. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry[J]. *J Virol*, 2012, 86(12):6537-6545.
- [22] Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, et al. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(1):e1001258.
- [23] 龚震宇, 龚训良. 21世纪新发和再发传染病的威胁[J]. *疾病监测*, 2016, 31(7):618-620.
- [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] Hui DS. Tracking the transmission and evolution of MERS-CoV[J]. *Lancet*, 2013, 382(9909):1962-1964.
- [26] Su S, Gu M, Liu D, et al. Epidemiology, evolution, and pathogenesis of H7N9 influenza viruses in five epidemic waves since 2013 in China[J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(9):713-728.
- [27] Merens A, Bigaillon C, Delaune D. Ebola virus disease: Biological and diagnostic evolution from 2014 to 2017[J]. *Med Mal Infect*, 2018, 48(2):83-94.
- [28] Paden CR, Yusof M, Al Hammadi ZM, et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE[J]. *Zoonoses Public Health*, 2018, 65(3):322-333.
- [29] Ben H, Zeng LP, Yang XY, et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(11):e1006698.
- [30] Menachery VD, Yount BL, Sims AC, et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2016, 113(11):3048-3053.
- [31] Lau SKP, Feng Y, Chen H, et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus ORF8 protein is acquired from SARS-related coronavirus from greater horseshoe bats through recombination[J]. *J Virol*, 2015, 89(20):10532-10547.
- [32] Wu Z, Yang L, Ren X, et al. ORF8-related genetic evidence for Chinese horseshoe bats as the source of human severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(4):579-583.
- [33] 田明明, 魏雪玲, 杨兴, 等. 云南新现蝙蝠SARS样冠状病毒密码子偏性及其聚类分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(12):1079-1086.

(收稿日期: 2019-04-08)

(本文编辑: 孙荣华)

郑梅, 郑双丽, 陈丹瑛, 等. 蝙蝠来源的重症急性呼吸综合征样冠状病毒 WIV1 刺突蛋白利用浣熊狗血管紧张素转换酶 II 受体侵入细胞能力的研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2019, 13(5):370-376.