

• 综 述 •

基于新型冠状病毒结构蛋白的诊疗技术的研究进展

杨田田¹, 薛松^{1,2*}, 秦蒙^{1,2*}

1. 北京化工大学 软物质科学与工程高精尖创新中心, 北京 100029

2. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029

摘 要: 近年来, 冠状病毒感染人体事件频繁发生, 给人类造成了巨大损失。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)不仅传播迅速, 而且具有致命性, 目前已构成全球大流行, 导致了数十万人的死亡。因此 SARS-CoV-2 的及时诊疗十分重要。由于冠状病毒的结构蛋白在病毒复制感染传播过程中发挥重要作用, 所以综述了基于此次 SARS-CoV-2 4 种结构蛋白 S、E、M、N 的相关诊断治疗预防技术的研究进展, 为更好地深入了解冠状病毒的致病机制以及为临床检出和药物疫苗研发提供有力支持。

关键词: 新型冠状病毒(SARS-CoV-2); 结构蛋白; 诊断; 治疗; 疫苗

中图分类号: R974 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)05-1015-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.05.041

Research progress on diagnosis and treatment technology based on structural protein of SARS-CoV-2

YANG Tian-tian¹, XUE Song^{1,2}, QIN Meng^{1,2}

1. Beijing Advanced Innovation Center for Soft Matter Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: In recent years, coronavirus infections have occurred frequently, causing huge losses to humans. The new coronavirus (SARS-CoV-2) not only spread rapidly, but is also lethal. It has now constituted a global pandemic, resulting in the death of hundreds of thousands of people. Therefore, the timely diagnosis and treatment of new coronavirus is very important. Since coronavirus structural proteins play an important role in the process of viral replication, infection and transmission. The research progress on diagnostic, therapeutic and prevention technologies based on this new coronavirus structural proteins S, E, M, and N is reviewed in this paper, in order to better understand the pathogenic mechanism of coronavirus as well as provide strong support for clinical detection, drug development, and vaccine preparation.

Key words: SARS-CoV-2; structural protein; diagnosis; treatment; vaccine

新型冠状病毒导致的新型冠状病毒肺炎是当前全球关注的公共健康问题。2020年2月11日, 这种新型冠状病毒被国际病毒分类委员会命名为 SARS-CoV-2, 同日, 世界卫生组织将该病毒所感染的肺炎命名为 COVID-19。SARS-CoV-2 与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合

征冠状病毒(MERS-CoV)都是源自动物的人畜共患病原体。尽管冠状病毒通常与人类急性呼吸道感染有关, 但其感染多种宿主物种的能力使其成为复杂的病原体^[1]。鉴于冠状病毒的高度流行和广泛分布、其基因组的遗传多样性和频繁重组以及人与动物之间的频繁互动, 新型的冠状病毒很可能会定期

收稿日期: 2020-04-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(21907007); 北京市自然科学基金青年项目(2204088)

作者简介: 杨田田, 女, 硕士, 研究方向为分子生物学。E-mail: 2019210885@mail.buct.edu.cn

*通信作者 薛松, 男, 副教授, 博士, 研究方向为蛋白的结构功能及改造。E-mail: xues@mail.buct.edu.cn

秦蒙, 女, 副教授, 博士, 研究方向为纳米药的载体构建及功能评价。E-mail: qinmeng212@mail.buct.edu.cn

在人体内周期出现^[2-3], 成为人畜共患病感染的常见来源。

SARS-CoV-2 传播迅速、危害极大, 针对该病毒的及时诊断和有效治疗预防十分重要。SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒, 核酸是病毒检测^[4-5]和治疗^[6]的重要途径。但是由于其核酸 RNA 的高突变率和不稳定性^[7], 因此开发基于病毒蛋白的诊断和治疗相关技术十分必要。SARS-CoV-2 的结构蛋白在病毒感染中发挥重要作用, 本文主要介绍 SARS-CoV-2 的 4 种结构蛋白的结构功能以及它们在病毒诊断治疗预防中的突出应用, 为更好地理解诊疗过程中 SARS-CoV-2 结构蛋白的重要性提供思路。

1 SARS-CoV-2 的生物学特征和结构蛋白

冠状病毒是一种有包膜的正义 RNA 病毒, 其特征是具有从其表面突出的棍棒状突刺。SARS-CoV-2 是典型的 β 属冠状病毒, 基因序列分别为 5'非翻译区 (UTR)、复制酶复合体 (orf1ab)、S 基因、E 基因、M 基因、N 基因、3'UTR 和一些不确定的非结构性开放阅读框^[8], 包含 4 个主要结构蛋白, 分别为刺突 (S) 蛋白、膜 (M) 蛋白、膜 (E) 蛋白和核衣壳 (N) 蛋白, 所有这些蛋白均在病毒基因组的 3'端编码^[9], 冠状病毒的结构示意图见图 1。

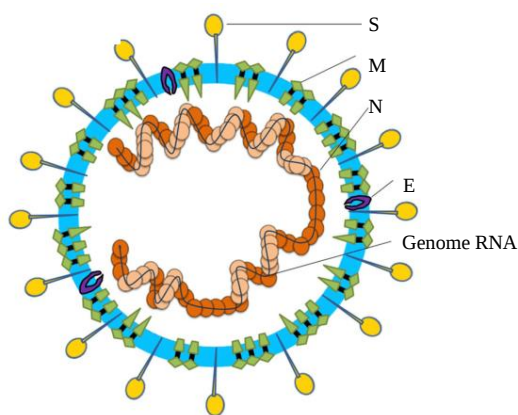


图 1 冠状病毒的结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the coronavirus

S 蛋白位于冠状病毒表面, 是典型的 I 型跨膜糖蛋白^[10], 组成了病毒表面上独特的穗状结构^[11-12], S 蛋白由 S1 和 S2 两个亚基组成, S1 形成了刺突蛋白的球状头, 包含 S 蛋白的大受体结合结构域 N 端结构域 (NTD) 和受体结合结构域 (RBD), 负责识别宿主细胞受体, 而 S2 形成了刺突蛋白的茎, 参与膜融合^[13]。S2 亚基包含 3 个功能域, 融合肽

(FP) 和肽重复序列 (HR1 和 HR2), 在 S1 尖端的 RBD 与受体结合后, S2 中的 FP 插入宿主细胞膜而改变构象, 刺激 HR1 和 HR2 形成六螺旋束 (6HB), 导致病毒膜与细胞膜融合^[10]。目前 SARS-CoV-2 S 蛋白的结构已经获得解析^[14]。

M 蛋白是病毒体中最丰富的结构蛋白, 有 3 个跨膜结构域^[15], 可以使病毒体形成其形状。它具有一个小的 N 端糖基化胞外域和一个更大的 C 端内域, 在病毒颗粒内延伸 6~8 nm^[16]。M 蛋白在病毒体中以二聚体形式存在, 并且可能采用两种不同的构象, 从而使其既能够促进膜弯曲又能与核衣壳结合^[17]。

病毒粒子中存在少量跨膜 E 蛋白。E 蛋白具有 N 端胞外域和 C 端内域, 并具有离子通道活性, 有助于病毒的组装和释放, 缺乏 E 蛋白的重组病毒会造成病毒致命性减弱^[18]。N 蛋白是存在于核衣壳中的唯一蛋白, 它由两个独立的结构域组成, 即 NTD 和 C 端结构域 (CTD), 两者在体外可使用不同的机制结合 RNA, 表明最佳的 RNA 结合需要两个结构域的参与^[19-20]。N 蛋白也与复制酶复合物的关键成分 nsp3^[20-21]和 M 蛋白^[22]结合, 这些蛋白质相互作用可能有助于将衣壳化的基因组包装成病毒颗粒^[23]。

2 基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的诊断技术

此次 SARS-CoV-2 潜伏期较长、初时发病症状不明显且传播迅速, 因此, 实现早期临床高效检出病毒感染是全面控制病毒的一个重要方面。关于病毒检出临床最常用的方法是核酸检测法和免疫学检测法, 核酸检测法虽然是检测的金标准, 但该方法也存在“假阴性”现象, 且具有操作人员限制、易污染等缺点, 相比之下基于病毒结构蛋白的免疫学检测抗体抗原法具有快速、方便的特点。对于 SARS-CoV-2 而言, 开发用于检测病毒特异性抗体抗原的免疫学检测方法主要是针对具有高免疫原性的结构蛋白 S 蛋白和 N 蛋白^[24-26]。

2.1 基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的抗体检测法

病毒抗体检测主要为 IgM 和 IgG, IgM 产生早但维持时间短, 可作为早期感染的指标, IgG 产生晚但维持时间长, 可作为感染和既往感染的指标。检测方法主要有化学发光免疫分析法^[27]、胶体金免疫层析法^[28-29]以及酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 等。解放军中部战区总医院在临床上分别采用最新建立的抗 SARS-CoV-2 S 蛋白和 N 蛋白 IgM 和 IgG 抗体 ELISA 法检测患者^[30-31], 结果发现这种免疫学

检测方法具有很高的灵敏度,特别是对于患病 10 d 后患者血清样品的检测,因此它可能是 COVID-19 诊断的重要补充方法。S 蛋白通过与细胞表面的靶受体结合,在病毒进入过程中起着非常重要的作用,并有研究显示重组 S 蛋白比重组 N 蛋白更利于血清学检测^[32],但 S 蛋白是一种高度糖基化的蛋白^[33],在哺乳动物细胞中表达 S 蛋白的成功率有限,因此免疫学诊断多用 N 蛋白,目前已批准上市新冠病毒抗体检测试剂盒的检测抗原也主要为 N 蛋白。

2.2 基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的抗原检测法

由于病毒特异性抗体通常在感染后 2~4 周内才产生,因此 IgM 和 IgG 抗体检测方法对早期病毒的灵敏度不高,而病毒抗原是病毒的特异性标志,在感染者体内出现在抗体之前,所以病毒的抗原检测相比于抗体检测更具有时间优势。有研究在只有基因序列信息的情况下,通过设计合成 SARS-CoV-2 N 蛋白具有抗原表位的多肽后免疫动物获得抗体,利用夹心 ELISA 法和基于量子点的快速免疫层析检测法检测 SARS-CoV-2 N 蛋白。发现 ELISA 检测限和快速免疫层析检测限均达 ng 级别,具有较高的灵敏性^[34]。解放军中部战区总医院也建立了在 10 min 内检测患者鼻咽拭子和尿液中 SARS-CoV-2 N 蛋白的荧光免疫层析法,发现该方法不仅具有较高的灵敏性和特异性,且能检测发烧 3 d 后的早期患者^[35]。这表明 N 抗原测定是一种准确,快速,早期和简单的 COVID-19 诊断方法,也意味着这种 N 抗原检测方法不仅可以保证医院的早期诊断,还可以在社区进行大规模筛查。

2.3 基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的抗体抗原交叉检测法

由于抗原检测需要更高的敏感性,而通常样品中含量很低,并且针对病毒的单克隆抗体等研制也需要时间,所以快速检测全病毒抗原的实现需要一段时间。为加快 SARS-CoV-2 的抗原诊断研究进展,研究人员也在探究 SARS-CoV 的 S 蛋白和 N 蛋白产生的抗体是否可以与 SARS-CoV-2 的抗原交叉反应。SARS-CoV S 蛋白的 S2 亚基中的免疫原性区域在 SARS-CoV-2 中高度保守,有研究发现利用 SARS-CoV 的 S2 亚单位中的一个免疫原性片段产生的一组鼠单抗可在 SARS-CoV-2 的感染细胞中检测到 S 蛋白^[36-37],表明 SARS-CoV S2 蛋白单克隆抗体可与 SARS-CoV-2 交叉反应用于临床诊断。同样发现 N 蛋白抗体也可能与 SARS-CoV-2 发生交叉

反应,虽然不能提供交叉免疫,但是可用于诊断方向^[38]。这些结果为 SARS-CoV-2 的检出提供了一个新方向,提示可利用已有的与 SARS-CoV-2 保守性较高的 SARS-CoV 的 S2 蛋白和 N 蛋白的特异性抗体检测 SARS-CoV-2 的抗原,可节省大量的研发时间。

综上所述,病毒的免疫学检测手段主要依靠免疫原性强的结构蛋白 S 蛋白和 N 蛋白,且 N 蛋白由于易表达,在血清学检测中相较于 S 蛋白应用更广泛。自此次 SARS-CoV-2 爆发以后,多家公司和科研机构致力于研发抗体抗原检测试剂盒。2020 年 3 月 4 日国家公布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》将抗体检测纳入诊断标准^[39]。截至 2020 年 4 月 25 日,国家药品监督管理局已批准 8 家抗体检测试剂盒的上市^[40]。抗体检测具有检测方式安全、检测快速、高通量、低成本等诸多优势,具有很好的应用前景,但也存在患病早期检出率不高的问题。抗原检测手段具有与抗体检测同样优势,但是研发周期长,需要更高的灵敏度,所以目前临床应用并不广泛。总之,患者病毒感染早期的核酸确认是重要的,但病毒感染 10 d 以后 RNA 的阳性率会迅速下降,此时诊断应主要依靠血清学检测。因此为实现最大化的病毒检出效果,应该将核酸检测和抗体(抗原)检测联合使用,互相补充互相辅助,以达到最优的灵敏度、特异性和准确性。

3 基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的治疗药物

目前关于 SARS-CoV-2 的特异性治疗主要包括病毒蛋白酶抑制剂干扰病毒感染^[41]、CRISPR 编辑病毒 RNA 基因组限制病毒复制^[42]、S 蛋白-血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 结合阻碍剂阻止 S 蛋白和 ACE2 有效结合以及药物直接作用于病毒结构蛋白从而改变病毒构象功能等方面^[43]。本文主要介绍与病毒结构蛋白相关的后两种治疗方法。

3.1 ACE2 结合阻碍剂

ACE2 是一种 I 型跨膜蛋白,是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的功能性受体,通过与冠状病毒结构蛋白 S 作用而介导病毒进入细胞。SARS-CoV-2 的 S 蛋白与人细胞受体 ACE2 的亲合力是 SARS-CoV 的 10~20 倍^[14],并且可能正是由于这种高亲合力使得 SARS-CoV-2 在人与人之间传播变得更容易。因此药物作用于 S 蛋白的 RBD 区从而阻碍病毒 S 蛋白和受体 ACE2 结合是治疗 COVID-19 的一个重要方向。首先思路为利用 ACE2 变体或部分 ACE2 结构结合病毒 RBD 区。Lei 等^[44]将人 ACE2 的胞外

区以及一个催化活性较低的 ACE2 突变体分别连接到人免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 区而产生了两种新的重组蛋白, 结果发现这两种融合蛋白都与 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的受体结合域 RBD 有很高的亲和力, 可有效中和 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2, 发挥了预期的药理作用。这种融合的免疫黏附素形式不仅可以延长循环分子的生命, 而且可以增强免疫系统对抗病毒的效应功能, 具有很高的应用价值^[45]。Zhang 等^[46]发现 ACE2 肽酶结构域 (PD) $\alpha 1$ 螺旋对于结合 SARS-CoV-2-RBD 很重要, 通过合成了针对 SARS-CoV-2 的 RBD 区域的 ACE2 PD $\alpha 1$ 螺旋的多肽, 发现该肽与 SARS-CoV-2-RBD 具有高亲和力的特异性结合, 因此这种多肽为 COVID-19 的治疗提供了新途径。其次特异性抗体结合病毒 RBD 区也是一个重要的治疗思路。中国科学院武汉病毒研究所联合其他机构将通过中国仓鼠卵巢细胞表达的 SARS-CoV-2 RBD 免疫马并去除所诱导的中和抗体的 Fc, 结果不仅从超免疫性马血浆中获得了针对 SARS-CoV-2 的高效价治疗性抗体, 而且有可能避免抗体依赖性增强作用, 因此这种抗 RBD 的马免疫球蛋白片段 F(ab')₂ 可作为治疗 COVID-19 的潜在药物^[47]。患者恢复期血浆也由于可提供针对 RBD 区的特异性抗体^[48], 从而具有广阔应用前景。同时为缩短药物研发时间, Tian 等^[49]比较了 SARS-CoV S 蛋白 RBD 区的单克隆抗体与 SARS-CoV-2 的作用效果, 结果发现 SARS 冠状病毒特异性的人单克隆抗体 CR3022 能与 SARS-CoV-2 RBD 有较强结合, 但结合位点与 ACE2 结合位点不重叠。因此说明 CR3022 有可能单独或与其他单克隆抗体联合应用作为治疗 COVID-19 感染的候选治疗药物, 但仍有必要开发能够与 SARS-CoV-2 RBD 的 ACE2 结合位点特异结合的新型单克隆抗体。除以上特异性治疗方法以外, 根据分子对接技术和结合 SARS-CoV 的研究经验, 氯喹、大黄素、丙嗪、烟碱胺及其他中西药等均可能干扰 S 蛋白与 ACE2 的相互作用, 有潜在的治疗价值^[50-52]。

3.2 直接作用于病毒结构蛋白的药物

药物直接作用于冠状病毒结构蛋白也可以通过改变蛋白正常功能而抑制病毒感染。Yan 等^[53]对 SARS-CoV-2 S 蛋白序列进行了生物信息学分析, 发现 SARS-CoV-2 的 S 蛋白在相互作用面上形成了相邻的由整合素识别的 RGD 基序, 由于 SARS-CoV-2 的 S 蛋白与整合素的结合可能促进病毒的感

染过程, 因此他们提出针对 SARS-CoV-2 S 蛋白界面的关键残基和相邻的 RGD 基序作为潜在结合位点进行高通量虚拟筛选的靶向药物 nadide 有望用于治疗 COVID-19。之前有研究报道在 SARS-CoV S 蛋白 S2 亚基的 HR2 区发现了一个抗 SARS-CoV 的多肽 (SC-1), SC-1 可与 HR1 结构域结合形成 6 螺旋束, 阻断 S 蛋白介导的膜融合, 抑制 SARS-CoV 感染^[54]。对比 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV, 发现两者 S 蛋白之间的 HR2 结构域上表现出 100% 的同源性, 在 HR1 的融合核心发现了 7 个位于 SC-1 结合基序的氨基酸的变化, 但是由于这些替换是保守的替换, 不会显著破坏 SC-1 和 HR1 之间的相互作用, 所以这意味着 SC-1 仍然有潜力成为 SARS-CoV-2 感染的有效抑制剂^[55]。N 蛋白也可能是潜在药物靶点, Kang 等^[56]通过表征 SARS-CoV-2 N-NTD 的晶体结构, 发现核糖核苷酸结合区域的几个残基能明显识别冠状病毒 RNA 底物, 该发现有助于干扰 SARS-CoV-2 中病毒 N 蛋白和病毒复制的药物开发。Ge 等^[57]提出目前处于 I 期临床试验的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP1) 抑制剂 CVL218 可能会被重新用于治疗 COVID-19, 分子对接模拟表明 CVL218 可能与 SARS-CoV-2 N 蛋白的 N 端结构域结合, 可能会抑制病毒复制和阻止核衣壳蛋白与病毒 RNA 的结合从而抑制病毒的生长。同时 SARS-CoV-2 的包膜 E 蛋白也有治疗潜力, E 蛋白具有两个完全保守的关键功能特征, 一个离子通道和一个 PDZ 结合基序 (PBM)^[58]。批准用于人类的金刚烷胺、六亚甲基阿米洛利和 SB2035805 3 种药物的前两种可作用于离子通道, 后一种作用于 PBM, 可能会抑制 SARS-CoV-2 E 蛋白的正常功能^[59], 从而提升患者存活率。

SARS-CoV-2 的感染趋势不断扩大, 关于治疗药物的研究也从未间断, 但目前临床使用的更多是现有广谱抗病毒药物, 由于缺少特异性抗 SARS-CoV-2 作用, 可能导致严重不良反应, 因此开发针对 SARS-CoV-2 的特异性药物至关重要。冠状病毒的结构蛋白是病毒治疗的主要药物靶点, 通过作用于结构蛋白可阻碍病毒与受体结合以及改变病毒正常功能, 从而实现特异性治疗, 具有很好的应用前景和研究潜力。

4 基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的预防疫苗

疫苗的研发对于从根本上预防冠状病毒至关重要。病毒疫苗主要包括全细胞灭活疫苗和减毒活疫

苗、亚单位疫苗、mRNA 疫苗、DNA 疫苗、活载体疫苗以及合成肽或表位疫苗等多种形式。由于冠状病毒的 S 蛋白在介导受体结合以及进入宿主中起着主要作用,是中和抗体的主要靶点,因此除灭活/减毒活疫苗设计针对病毒整体以及合成肽或表位疫苗设计针对病毒 4 种结构蛋白的多个抗原表位外,其他形式疫苗设计主要针对 S 蛋白。

4.1 针对 S 蛋白的疫苗

Trevor 等^[60]报道了一种针对 SARS-CoV-2 S 蛋白的合成 DNA 疫苗 INO-4800,工程构建的 INO-4800 在体外诱导了 S 蛋白的大量表达,并在小鼠和豚鼠中单次免疫后产生抗体和 T 细胞反应,这一数据初步确定 S 蛋白的 DNA 疫苗 INO-4800 可作为 COVID-19 的一种潜在候选疫苗。为更好的设计针对 S 蛋白的相关疫苗,北京航空航天大学 and 同济医学院的两个团队分别利用免疫信息学方法鉴定了 S 蛋白的抗原表位和通过分析 SARS-CoV S 蛋白的冷冻电镜结构^[61],使用同源性建模明确了 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 刺突蛋白的表面线性表位暴露列表^[62],这些发现对于疫苗的研发有重要的参考价值。

对比对 SARS-CoV 感染有效的中和抗体是否对 SARS-CoV-2 有作用有助于加快疫苗研发进度。对比发现两种病毒最可变的残基位于关键的疫苗靶点 S1 的受体结合基序(RBM),这意味着对 SARS-CoV RBM 区感染有效的中和抗体可能无法识别 SARS-CoV-2,在排除 RBM 区后的 SARS-CoV-2 RBD 区高度保守,所以从 SARS-CoV RBM 区外的表位产生的抗体有可能既显示交叉反应,又诱导中和抗体^[63]。但研究发现 SARS-CoV S1 蛋白的多克隆抗体与 SARS-CoV-2 仅显示有限的交叉中和反应^[64],因此仍有必要研发针对 SARS-CoV-2 的特异性中和抗体。除了 S1 蛋白,疫苗研发也可以考虑 S2 蛋白,由于 S2 蛋白在 SARS-CoV-2 病毒间具有很好的保守性,因此基于 S2 蛋白的疫苗设计可以增强广谱抗病毒效果,值得在动物模型中进行试验^[65]。

4.2 表位疫苗

冠状病毒疫苗研发除了只针对 S 蛋白以外,对其他结构蛋白的抗原表位的研究也有助于构建合成肽或表位疫苗。有研究识别出了一组 SARS-CoV 抗原表位与 SARS-CoV-2 完全相同,这些表位大量位于 S 蛋白和 N 蛋白,具有潜在的交叉反应,因此为指导开发 SARS-CoV-2 疫苗提供了重要参考^[66]。免

疫信息学在预测疫苗位点中起着重要作用。Sarkar 等^[67]利用反向疫苗学和免疫信息学的方法分别预测了 S 蛋白和 N 蛋白的有效抗原表位,并使用不同的佐剂和接头构建了 3 种可能的疫苗结构,浙江大学医学院和广西大学的两个团队使用相同方法在 S 蛋白、M 蛋白和 E 蛋白中确定了潜在的 B 细胞和 T 细胞表位^[68-69],这些研究可能为未来 COVID-19 疫苗开发提供初步表位序列。利用这些抗原位点可设计出在安全性和高免疫原性方面都优于传统疫苗的多表位疫苗^[70],具有广阔的应用前景。

由于疫苗作用的特殊性,在研发疫苗时必须考虑多种可能影响因素。据报道自 SARS-CoV-2 发现至今以来,其序列已逐步发生变化,提示着病毒在人体中不断进化,因此可能会造成病毒毒力的差异^[71],这是在设计疫苗过程中必须考虑到的问题。其次在设计疫苗过程中必须考虑到疫苗可能引发的抗体依赖性增强作用。当抗体促进病毒进入宿主细胞并增强这些细胞中的病毒感染时,就会发生抗体依赖性增强^[72-73]。美国明尼苏达大学兽医学院报道抗体依赖性增强作用与抗体的剂量、病毒和抗体的 Fc 受体的组织特异性表达等因素有关,并且发现如果针对病毒 S 蛋白的中和单抗不会触发刺突蛋白的构象变化,那么它们就不太可能介导抗体依赖性增强^[74],这为避免抗体依赖性增强的疫苗研发提供了一个可行的建议。疫苗的效力也是设计疫苗时需要考虑的问题,Bao 等^[75]使用非人灵长类动物模型发现 SARS-CoV-2 感染后的恒河猴不会出现再次感染,即表明最初的 SARS-CoV-2 感染对后续的暴露有保护作用。同时冠状病毒疫苗的生产和运输对于预防效果也有重要影响。疫苗的生产除可使用传统系统外,研究显示植物表达系统也有着明显的优势^[76]。对于生产的疫苗运输,如 SARS-CoV-2 在粪便中的发现所证明的那样^[77-78],口服或气雾剂途径接种疫苗可诱导黏膜免疫反应,是 COVID-19 疫苗免疫的可能方式。

冠状病毒的疫苗设计主要针对病毒的结构蛋白中的 S 蛋白。随着 SARS-CoV-2 病毒株的成功分离以及对该病毒了解程度的不断加深,有多家机构参与多种形式的疫苗研发。目前已有报道我国以腺病毒为载体可表达 SARS-CoV-2 S 抗原的疫苗以及 Moderna 公司研制的编码 S 蛋白的 mRNA 疫苗 mRNA-1273 等多项疫苗已进入临床试验阶段。由于疫苗的特殊作用方式,疫苗的研发需要考虑适当的

动物模型、抗体依赖性增强作用、DNA 疫苗是否可能会与其他病毒重组、自身免疫系统是否影响疫苗作用等多种因素以确保疫苗的安全性和有效性。

5 结语

SARS-CoV-2 现已造成全球性感染, 针对病毒的诊断、治疗和预防相关的研究也在不断进行。冠状病毒的结构蛋白在病毒的复制感染传播中十分重要, 因此本文综述了基于 SARS-CoV-2 结构蛋白的相关诊疗技术。病毒的免疫学诊断主要针对高免疫原性的 S 蛋白和 N 蛋白, 病毒的治疗可以通过阻碍 S 蛋白与受体结合以及直接作用于结构蛋白改变病毒的正常功能, 病毒的疫苗研发主要针对 S 蛋白, 因为 S 蛋白是中和抗体的主要靶点, 可诱导高度有效的中和抗体反应。总之, 结构蛋白与冠状病毒致病性十分密切, 因此在未来的研究中深入了解 SARS-CoV-2 结构蛋白的结构功能有助于进一步推动病毒高效检出、开发合适药物靶点以及研发高效疫苗等技术的发展。

参考文献

- [1] Fung T S, Liu D X. Human coronavirus: Host-pathogen interaction [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2019, 73(1): 529-557.
- [2] Cui J, Li F, Shi Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [3] Wong G, Liu W J, Liu Y X, et al. MERS, SARS, and Ebola: The role of super-spreaders in infectious disease [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(4): 398-401.
- [4] Corman V M, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [J]. *Eurosurveillance*, 2020, 25(3), doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- [5] 王露莹, 陈品儒, 郑国湾, 等. 新型冠状病毒检测方法的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(3): 411-416.
- [6] Nguyen T M, Zhang Y, Pandolfi P P. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCoV (SARS-CoV-2) and other RNA viruses [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 189-190.
- [7] Tang X, Wu C, Li X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2 [J]. *Natl Sci Rev*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.
- [8] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *New Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [9] Li G, Fan Y, Lai Y, et al. Coronavirus infections and immune responses [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 424-432.
- [10] Bosch B J, van der Zee R, de Haan C A M, et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex [J]. *J Virol*, 2003, 77(16): 8801-8811.
- [11] Beniac D R, Andonov A, Grudeski E, et al. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(8): 751-752.
- [12] Delmas B, Laude H. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression [J]. *J Virol*, 1990, 64(11): 5367-5375.
- [13] de Groot R J, Luytjes W, Horzinek M C, et al. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses [J]. *J Mol Biol*, 1987, 196(4): 963-966.
- [14] Wrapp D, Wang N, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [15] Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, et al. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus [J]. *Nature*, 1984, 308(5961): 751-752.
- [16] Nal B, Chan C M, Kien F, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(5): 1423-1434.
- [17] Neuman B W, Kiss G, Kunding A H, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology [J]. *J Struct Biol*, 2011, 174(1): 11-22.
- [18] DeDiego M L, Álvarez E, Almazán F, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo [J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1701-1713.
- [19] Chang C K, Sue S C, Yu T H, et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein [J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(1): 59-72.
- [20] Hurst K R, Koetzner C A, Masters P S. Identification of *in vivo*-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein [J]. *J Virol*, 2009, 83(14): 7221-7234.
- [21] Hurst K R, Koetzner C A, Masters P S. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex [J]. *J Virol*, 2013, 87(16): 9159-9172.
- [22] Sturman L S, Holmes K V, Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid [J]. *J Virol*, 1980, 33(1): 449-462.
- [23] Fehr A R, Perlman S. *Coronaviruses: an overview of their*

- replication and pathogenesis [M]. New York: Springer New York, 2015: 1-23.
- [24] Meyer B, Drosten C, Müller M A. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls [J]. *Virus Res*, 2014, 194: 175-183.
- [25] Tan Y J, Goh P Y, Fielding B C, et al. Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(2): 362-371.
- [26] Qiu M F, Shi Y L, Guo Z B, et al. Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(5/6): 882-889.
- [27] 李 泉, 刘钉宾, 乔正荣, 等. SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体检测在新型冠状病毒肺炎诊断中的价值 [J/OL]. 国际检验医学杂志, (2020-03-04) [2020-04-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200304.1041.006.html>.
- [28] 张稳健, 吕 欣, 黄 驰, 等. 胶体金免疫层析法检测新型冠状病毒 IgM/IgG 抗体的临床评价与应用 [J/OL]. 病毒学报, (2020-03-30) [2020-04-25]. <https://doi.org/10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003676>.
- [29] 邓杰伦, 王远芳, 王婷婷, 等. 胶体金免疫层析法检测 SARS-CoV-2 血清抗体的临床价值探讨 [J/OL]. 国际检验医学杂志, (2020-03-12) [2020-04-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200312.1011.002.html>.
- [30] Liu L, Liu W, Wang S, et al. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients [J]. *medRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.20031856>.
- [31] Liu W B, Liu L, Kou G M, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2 [J]. *J Clin Microbiol*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.00461-20>.
- [32] Zhang P, Gao Q, Wang T, et al. Evaluation of recombinant nucleocapsid and spike proteins for serological diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. *medRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.17.20036954>.
- [33] Marra M A. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus [J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1399-1404.
- [34] Li M, Jin R, Peng Y, et al. Generation of antibodies against COVID-19 virus for development of diagnostic tools [J]. *medRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.20.20025999>.
- [35] Diao B, Wen K, Chen J, et al. Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein [J]. *medRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.20032524>.
- [36] Lip K M, Shen S, Yang X M, et al. Monoclonal antibodies targeting the HR2 domain and the region immediately upstream of the HR2 of the S protein neutralize *in vitro* infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Virol*, 2006, 80(2):941-950.
- [37] Zheng Z, Monteil V M, Maurer-Stroh S, et al. Monoclonal antibodies for the S2 subunit of spike of SARS-CoV cross-react with the newly-emerged SARS-CoV-2 [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.980037>.
- [38] Gralinski L E, Menachery V D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV [J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 135.
- [39] 中华人民共和国卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）的通知（国卫办医函〔2020〕184 号） [EB/OL]. (2020-03-04) [2020-04-25]. http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/new_list.shtml.
- [40] 国家药品监督管理局. 国家药监局持续应急审批新型冠状病毒检测产品 [EB/OL]. (2020-03-27) [2020-04-25]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2578/376095.html>.
- [41] 李广平, 何清秀, 郭海琼, 等. 靶向木瓜样蛋白酶的抗 SARS-CoV-2 药物虚拟筛选 [J/OL]. 重庆理工大学学报: 自然科学, (2020-03-11) [2020-04-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2850.R.20200316.1306.002.html>.
- [42] Nguyen T M, Zhang Y, Pandolfi P P. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCoV (SARS-CoV-2) and other RNA viruses [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 189-190.
- [43] 邓卫宁, 王利娜, 崔艳丽. 抗新型冠状病毒肺炎药物靶点的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 401-404.
- [44] Lei C, Fu W, Qian K, et al. Potent neutralization of 2019 novel coronavirus by recombinant ACE2-Ig [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.01.929976>.
- [45] Kruse R L. Therapeutic strategies in an outbreak scenario to treat the novel coronavirus originating in Wuhan, China [J]. *F1000Research*, 2020, 9: 72.
- [46] Zhang G, Pomplun S, Loftis A R, et al. The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.999318>.
- [47] Pan X, Zhou P, Fan T, et al. Immunoglobulin fragment F (ab')₂ against RBD potentially neutralizes SARS-CoV-2 *in vitro* [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029884>.
- [48] Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma [J]. *JAMA*, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.4783.

- [49] Tian X, Li C, Huang A, *et al.* Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 382-385.
- [50] Zhang L, Liu Y H. Potential interventions for novel coronavirus in China: a systematic review [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(5): 479-490.
- [51] 沈亮亮, 李 勇, 周 明, 等. 基于分子对接技术筛选抗 2019 新型冠状病毒中药小分子化合物 [J/OL]. 中国新药杂志, (2020-03-16) [2020-04-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2850.R.20200316.1306.002.html>.
- [52] Senathilake K, Samarakoon S, Tennekoon K. Virtual screening of inhibitors against spike glycoprotein of 2019 novel corona virus: a drug repurposing approach [OL]. <https://www.researchgate.net/publication/340122235>.
- [53] Yan S, Sun H, Bu X, *et al.* An evolutionary RGD motif in the spike protein of SARS-CoV-2 may serve as a potential high risk factor for virus infection? [OL]. <https://www.researchgate.net/publication/339625974>.
- [54] Liu S W, Xiao G F, Chen Y B, *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 [J]. *Lancet*, 2004, 363(9413): 938-947.
- [55] Yu F, Du L Y, Ojcius D M, *et al.* Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China [J]. *Microbes Infect*, 2020, 22(2): 74-79.
- [56] Kang S, Yang M, Hong Z, *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.06.977876>.
- [57] Ge Y, Tian T, Huang S, *et al.* A data-driven drug repositioning framework discovered a potential therapeutic agent targeting COVID-19 [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.11.986836>.
- [58] Castaño-Rodríguez C, Honrubia J M, Gutiérrez-Álvarez J, *et al.* Role of severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporins E, 3a, and 8a in replication and pathogenesis [J]. *mBio*, 2018, 9(3): doi: 10.1128/mbio.02325-17.
- [59] Alam I, Kamau A K, Kulmanov M, *et al.* Functional pangenome analysis suggests inhibition of the protein E as a readily available therapy for COVID-2019 [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.952895>.
- [60] Trevor R F, Patel A, Ramos S, *et al.* Rapid development of a synthetic DNA vaccine for COVID-19 [OL]. <https://www.researchgate.net/publication/340196147>.
- [61] Li L, Sun T, He Y, *et al.* Epitope-based peptide vaccine design and target site characterization against novel coronavirus disease caused by SARS-CoV-2 [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.25.965434>.
- [62] Zhou D, Tian X, Qi R, *et al.* Identification of 22 N-glycosites on Spike glycoprotein of SARS-CoV-2 and accessible surface glycopeptide motifs: implications on vaccination and antibody therapeutics [OL]. <https://www.preprints.org/manuscript/202002.0381/v2>.
- [63] Chen W H, Hotez P J, Bottazzi M E. Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19 [J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2020: 1-4.
- [64] 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 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-12.
- [65] Shang W L, Yang Y, Rao Y F, *et al.* The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines [J]. *Npj Vaccines*, 2020, 5: 18.
- [66] Ahmed S F, Quadeer A A, McKay M R. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies [J]. *Viruses*, 2020, 12(3): 254.
- [67] Sarkar B, Ullah M A, Johora F T, *et al.* The essential facts of Wuhan novel coronavirus outbreak in China and epitope-based vaccine designing against 2019-nCoV [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.05.935072>.
- [68] Feng Y, Qiu M, Zou S, *et al.* Multi-epitope vaccine design using an immunoinformatics approach for 2019 novel coronavirus in China (SARS-CoV-2) [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.03.962332>.
- [69] ul Qamar M T, Shahid F, Ashfaq U A, *et al.* Structural modeling and conserved epitopes prediction against SARS-COV-2 structural proteins for vaccine development [OL]. <https://www.researchsquare.com/article/rs-14534/v1>.
- [70] Cicala C, Nawaz F, Jelacic K, *et al.* HIV-1 gp120: a target for therapeutics and vaccine design [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 17(1): 122-135.
- [71] Li Y, Liu B, Cui J, *et al.* COVID-19 evolves in human hosts [OL]. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3562070>.
- [72] Tirado S M C, Yoon K J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease [J]. *Viral Immunol*, 2003, 16(1): 69-86.
- [73] Takada A, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and *in vivo*

- implications [J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(6): 387-398.
- [74] Wan Y S, Shang J, Sun S H, *et al.* Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry [J]. *J Virol*, 2019, 94(5): doi:10.1128/jvi.02015-19.
- [75] Bao L, Deng W, Gao H, *et al.* Lack of reinfection in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2 [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.13.990226>.
- [76] Shanmugaraj B, Malla A, Phoolcharoen W. Emergence of novel coronavirus 2019-nCoV: need for rapid vaccine and biologics development [J]. *Pathogens*, 2020, 9(2): 148.
- [77] Li Q, Guan X, Wu P, *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia [J]. *New Engl J Med*, 2020, 382(13): 1199-1207.
- [78] Holshue M L, DeBolt C, Lindquist S, *et al.* First case of 2019 novel coronavirus in the United States [J]. *New Engl J Med*, 2020, 382(10): 929.