

DOI: 10.13376/j.cblls/2016044

文章编号: 1004-0374(2016)03-0357-10



陆路, 复旦大学研究员, 博士生导师。本科毕业于武汉大学生命科学院, 博士毕业于清华大学生命科学院。随后, 赴美开展博士后研究。长期从事抗病毒药物及免疫治疗的研究, 并在转化医学方面有专长。在复旦工作的4年来, 发表第一作者或通讯作者SCI论文33篇, 其中IF>10分的1篇, IF>9分的1篇, 10>IF>5分的共7篇。申请国家专利9项, 获得授权专利2项, 其中3项中国专利已转让, 2项已实施形成产品。作为课题负责人承担国家“863”青年科学家项目、自然科学基金等国家及各级课题9项。现已入选中国微生物学会医学微生物学及免疫学专委会青委会副主任委员, 中国微生物学会病毒学专业委员会全国青年委员和中华医学会微生物与免疫专业委员会全国青年委员, 上海市“青年拔尖人才”、“浦江人才”、“启明星”和“晨光”学者。

人类高致病性冠状病毒SARS-CoV和MERS-CoV的 流行与突变——共性与个性特征的启示

代嫣嫣¹, 夏 帅¹, 王 茜¹, 陆 路^{1*}, 姜世勃^{1,2*}

(1 复旦大学基础医学院医学分子病毒学教育部/卫生部重点实验室, 上海 200032;

2 纽约血液中心 Lindsley F. Kimball研究所, 纽约 10065)

摘 要: 人类高致病性冠状病毒目前主要包括严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV), 其广泛的流行、较强的致病性, 给全球的经济造成了较大损失, 也给人类的健康带来了严重威胁。虽然 SARS-CoV 和 MERS-CoV 都属于动物源性病毒, 但其流行与突变中都存在各自的特征。现着重就 SARS-CoV 与 MERS-CoV 的病原学、流行及基因突变等方面进行对比综述, 以分析揭示高致病性冠状病毒在以上方面的共性和个性特征, 为未来疫情的监测和防控提供新的思路。

关键词: 高致病性冠状病毒; MERS-CoV; SARS-CoV; 流行; 突变

中图分类号: Q939.47; R511 **文献标志码:** A

Epidemics and mutations of highly pathogenic human coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV: their common and distinct properties

DAI Yan-Yan¹, XIA Shuai¹, WANG Qian¹, LU Lu^{1*}, JIANG Shi-Bo^{1,2*}

(1 Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministries of Education and Health, Shanghai Medical College and Institute of Medical Microbiology, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2 Lindsley F. Kimball Research Institute, New York Blood Center, New York 10065, USA)

Abstract: The highly pathogenic human coronaviruses, mainly including severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), have posed great threat

收稿日期: 2014-09-01

基金项目: 上海浦江人才基金项目(13PJD004)

*通信作者: E-mail: lul@fudan.edu.cn(陆路); shibojiang@fudan.edu.cn(姜世勃)

to the public health and global economy. Although these zoonotic coronaviruses have common properties, each of them has their own characteristics in epidemics and mutations. This review focuses on the comparison of the pathogenicity, epidemiology and mutations of SARS-CoV and MERS-CoV to reveal their common and distinct properties, for the purpose of providing information for developing more advanced systems and strategies to monitor and control the future epidemics of the highly pathogenic human coronaviruses.

Key words: highly pathogenic human coronavirus; MERS-CoV; SARS-CoV; epidemic; mutation

1 病原学

冠状病毒是一类有包膜的单股正链 RNA 病毒。国际病毒学分类委员会于 2012 年将冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 和 δ 等 4 大类^[1-3], 其中 β 类冠状病毒又可分为 A、B、C、D 等 4 个谱系。目前共发现 6 种可以感染人类的冠状病毒, 分别是人冠状病毒 229E (HCoV-229E)、人冠状病毒 NL63 (HCoV-NL63)、人冠状病毒 OC43 (HCoV-OC43)、香港 I 型人冠状病毒 (HCoV-HKU1)、严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 及中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV)。其中, SARS-CoV 和 MERS-CoV 是目前发现的人高致病性冠状病毒, 给人类健康带来了严重危害^[4]。

1.1 SARS-CoV 的病原学研究

2002 年于广州首次发现一种新型病原体, 造成人的严重急性呼吸道综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS), 又被称为传染性非典型肺炎, 该病原体称之为严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)。SARS-CoV 是动物源性病毒, 其基因组全长约 29 727 bp, 编码 S、E、M、N 4 种结构蛋白, 其中 S 蛋白负责识别并结合 SARS-CoV 的受体——血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) (图 1)。SARS-CoV 流行早期, 因在中国广东活禽市场的果子狸等动物中检测到该病毒, 故推测果子狸是其中间宿主^[5-8]。随后, 血清学研究发现, SARS-CoV 抗体高频出现于菊头蝙蝠的血清中, 通过 PCR 等方法获得的该冠状病毒的全基因组与 SARS-CoV 高度相似, 仅在 S 蛋白的 S1 编码区和 N 基因上游序列的相似度稍低, 故称之为 SARS-CoV 类似冠状病毒, 即 SL-CoVs。随后, Ge 等^[9] 在中国的菊头蝙蝠中成功分离出活的 SL-CoV, 其 S 蛋白与 SARS-CoV 的 S 蛋白高度保守, 并可结合人和蝙蝠的 ACE2 受体, 这一发现进一步证明了蝙蝠是 SARS-CoV 的原始宿主。同时, 也提示 SARS-CoV 的传播可能不需要果子狸等中间宿

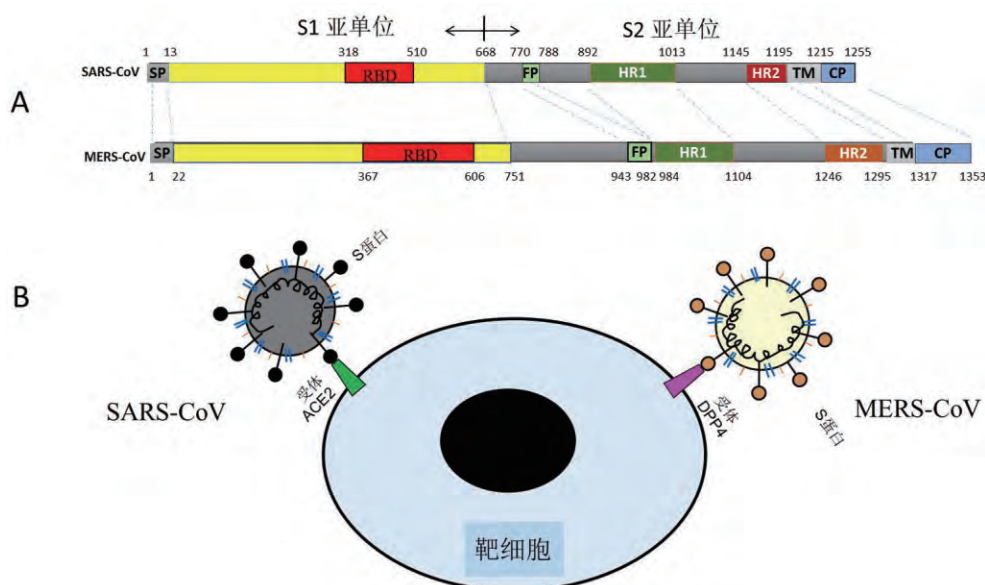
主, 也存在直接从蝙蝠传播到人类的可能 (图 2)。

SARS 患者的主要症状为传染性非典型肺炎。约 60% 的患者在感染第 2 周病情恶化, 出现持续性的发热, 呼吸困难, 血氧饱和度下降^[10], 其中 20%~30% 的患者随后采取重症监护治疗措施^[11], 60 岁以上的患者死亡率高达 50% 以上^[12-14]。SARS-CoV 传播速率快, 死亡率较高, 对人类健康产生了严重的威胁, 属于高致病性冠状病毒。

1.2 MERS-CoV 的病原学研究

2012 年, 中东地区出现一种与 SARS-CoV 类似的新型人冠状病毒 (erasmus medical center, hCoV-EMC/2012), 可造成人的中东呼吸综合征 (Middle East respiratory syndrome, MERS)。2013 年, 世界卫生组织命名其病原体为中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)。MERS-CoV 基因组全长约 30 119 bp, 包含 3 个开放阅读框, 与 SARS-CoV 类似, 编码 S、E、M、N 4 种结构蛋白, 其中 S 蛋白负责识别并结合受体二肽基肽酶 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4 或 CD26) (图 1B)。目前研究发现其天然宿主可能是蝙蝠, 而单峰骆驼 (dromedary) 则可能是其中间宿主^[15]。在骆驼的血清和奶中均发现有 MERS-CoV 的特异抗体和 RNAs, 且从感染骆驼体内分离出的 MERS-CoV 毒株基因组序列与人源毒株的基因序列几乎完全相同, 这直接证明了 MERS-CoV 的“骆驼-人”的传播途径^[16-21], 从而进一步确定了骆驼在 MERS-CoV 动物源性感染中的中间宿主地位。另外, 在蝙蝠体内也发现了与 MERS-CoV 相同或相似的基因片段。通过对蝙蝠受体 DPP4 的进化分析, 发现其与 MERS-CoV 相关病毒长期存在着密切的进化关系, 并且蝙蝠 DPP4 受体上出现的 3 个阳性选择氨基酸位点, 可直接与 MERS-CoV 表面糖蛋白相互作用, 进而暗示蝙蝠是 MERS-CoV 的自然宿主^[21-23] (图 2)。

与 SARS 类似, MERS 的临床表征有咳嗽、呼吸困难, 甚至肺衰竭等呼吸系统性症状, 但 MERS



(A) SARS-CoV与MERS-CoV的S蛋白结构图。S蛋白分为S1和S2两个亚单位。其中S1主要包括信号肽(SP)和N端的RBD; S2亚单位主要包括融合肽段(FP)、七肽重复序列(HR1、HR2), 跨膜区域(TM), C端多肽(CP)等。(B) SARS-CoV与MERS-CoV感染靶细胞模式图。SARS-CoV通过其表面的S蛋白上的RBD与呼吸道上皮细胞表面的ACE2受体(绿色)结合。MERS-CoV通过其表面S蛋白上的RBD与呼吸道及肺泡上皮细胞表面的DPP4受体(紫色)结合。

图1



图2 SARS-CoV与MERS-CoV的传播示意图

患者还常伴有其他并发症, 如肝、肾衰竭等, 这可能与 MERS-CoV 的受体 DPP4 在人体中分布较为广

泛有关^[24-25]。同时, 与 SARS 患者相比, MERS 患者的死亡率更高, 可能因为 MERS-CoV 可感染并诱

导患者体内的淋巴 T 细胞凋亡，而由于受体 ACE2 的表达量较少的原因，SARS-CoV 则感染不了淋巴 T 细胞^[26]。另外，MERS-CoV 更易于感染伴有糖尿病、高血压、心脏病等并发症的中老年患者^[25,27-29]。总体而言，SARS-CoV 和 MERS-CoV 在其病毒学、流行病学及临床表征等方面还有诸多不同（表 1）。

表1 SARS-CoV和MERS-CoV的病毒学、流行病学和临床症状的比较^[14,25,27,30-32]

病原	SARS-CoV	MERS-CoV
受体	ACE2	DPP4
自然宿主	蝙蝠	蝙蝠
中间宿主	果子狸等动物	单峰骆驼
首发地	中国广州	沙特
感染人数(统计时间)	>8 000(2003.7)	1 401(2015.8.17)
致死率	约10%	约36%
超级传播事件	较多	较少
患者性别比例(男：女)	0.75:1	1.74:1
患者平均年龄	40岁	48岁
平均潜伏时间	4(2~14) d	5(2~15) d
并发症患者比例	少于三分之一	四分之三
肺部病变	传染性非典型肺炎	以严重肺炎为主
常见的肺外症状	腹泻	腹泻、急性肾衰竭
呼吸衰竭	出现相对较晚	出现相对较早
出现症状到死亡平均时间	21 d	12 d

2 疾病的流行

2.1 SARS的流行

2002 年 11 月，SARS 首次在中国广东省爆发，且疫情于 2003 年 2 月中旬达到高峰（以广州为主）。截至 2003 年 7 月，已波及全世界 29 个国家和地区，累计确诊病例数超过 8 000 人，平均死亡率超过 10%^[14,33]。SARS-CoV 主要通过密切接触和呼吸道传播两种方式，且人传人的能力较强，在全球引起多次超级传播事件。如 2003 年 1 月于广州某医院，由 1 名患者引起了 82 名患者感染；在山西、香港、新加坡等地也有类似的超级传播事件发生^[34]。通过隔离等防疫措施，疫情被有效控制。另外，经进化分析发现，SARS-CoV 受体结合位点中的重要氨基酸和其他特征性基因片段出现逆向进化，且流行中的阳性选择压也逐渐下降，推测 SARS-CoV 非自然起源，无储存宿主，属于逆向进化，因而其流行在自然界中很快消失^[35]。

2.2 MERS的流行

MERS 在 2012 年首次爆发于中东地区^[36]，截至 2015 年 8 月 17 日，据世界卫生组织 (WHO) 报道，全球范围内已有 MERS-CoV 感染的确诊病例 1 401 例，其中死亡 500 例，致死率高达 36%^[31,37-38]。

大量的研究表明，MERS-CoV 可在人与人之间传播，但早期在沙特的流行中，多数 MERS-CoV 的分离株之间存在较多差异，表明早期的 MERS-CoV 感染多为相对独立的动物源性感染，而其人传人的能力是有限的^[15,39-40]。但 2015 年 MERS-CoV 在韩国流行中，则主要是以人传人的方式传播^[41]，且三代病例的人数迅速上升，甚至有四代病例的出现，同时还出现了类似于 SARS-CoV 的“超级传播事件”，由 1 名患者造成了 85 名患者的感染^[42]。由此推测，虽然 MERS-CoV 在人群中的传播能力较强，但尚不如 SARS-CoV。有研究学者认为，SARS-CoV 可能是通过基因突变使其更加适应在人类的传播，从而造成了严重的疫情，而 MERS-CoV 尚未发生这种情况，但也不排除这种发展的可能^[42-43]。

另外，与 SARS 相比，MERS 的流行时间较长，且存在明显的季节性相关的特点，在每年的 3 或 4 月份感染人数开始上升，这可能与宿主蝙蝠的“冬眠”有关^[44]。且在 20 年前，阿拉伯半岛骆驼的血清中已经出现 MERS-CoV 的特异性抗体^[45]，说明 MERS-CoV 在“蝙蝠-骆驼-人”的传播途径有着较长的进化时间。因此，与 SARS-CoV 不同，MERS-CoV 的传播有着稳定的“自然库”，其流行可能会延续更长时间。

3 跨种传播的突变特征

冠状病毒属于I型包膜病毒,该种病毒在入侵靶细胞的过程中,S蛋白发挥重要作用。S蛋白可分为S1亚单位和S2亚单位,首先S1亚单位负责与受体识别结合,然后S2亚单位负责改变构象从而拉近病毒和细胞膜之间的距离,最终导致病毒融合进入靶细胞(图1)。在病毒顺利感染的过程中,S蛋白在其特定的酶切位点进行酶切激活的过程也非常重要。因而,SARS-CoV和MERS-CoV跨种传播的进化,与其S蛋白与受体结合的特性及相应酶切位点的变化密切相关,本部分将主要从这个方面对两种病毒的进化策略进行比较和讨论。

3.1 SARS-CoV的跨种传播突变

SARS-CoV的受体分子是ACE2,因而其宿主范围直接与ACE2的分布和结构相关。果子狸和人的ACE2受体可被SARS-CoV准确识别,而鼠的ACE2受体的识别效率却很低,主要是由于鼠的ACE2受体中353位点不同。另外,ACE2的82位点的糖基化也可能会阻碍病毒的结合。若对鼠进行H353K突变,并去除其82位点的糖基化功能,则可能恢复SARS-CoV RBD结合鼠ACE2受体的能力^[15]。

S蛋白与受体ACE2的有效识别是SARS-CoV感染的前提,因而其S蛋白中受体结合域(receptor binding domain, RBD)的变化会影响SARS-CoV跨种传播的趋势。将从人分离出来的SARS-CoV毒株与从果子狸分别分离出来的SARS样冠状病毒(SL-CoV)毒株的RBD序列进行比较,发现存在6个氨基酸的改变。其中,K479N位点、S487T位点在跨种传播的进化过程中最为重要^[46]。含有K479和S487的S蛋白可很好地与果子狸的ACE2受体结合,但与人的ACE2受体的作用力很弱。而分别用N479和T487替换后,则与人的ACE2受体的亲和力有很大的提高^[46-47]。

另外,由于SARS-CoV的S蛋白缺少furin蛋白酶的酶切位点,故合成的S蛋白一般处于非裂解状态,一般需要被宿主内吞泡内的Cathepsin L裂解,进而诱导病毒融合进入靶细胞^[48-49]。SARS-CoV的S蛋白也可被胞外蛋白酶(如胰酶、胰凝乳蛋白酶、HAT)等作用,有研究表明TMPRSS2在SARS-CoV的体内扩散传播中起到了重要作用^[15,48,50-52]。但SARS-CoV跨种传播的进化是否与S蛋白酶切位点

改变有关,目前尚未有明确的报道。

3.2 MERS-CoV的跨种传播突变

目前的研究显示,MERS-CoV可感染单峰骆驼、恒河猴、绒猴、马、兔、猪等动物细胞,但不能感染鼠、仓鼠、雪貂等动物细胞^[15,53-54]。这可能与该病毒RBD和相应宿主受体分子的相互作用有关。MERS-CoV的RBD中存在18个重要的氨基酸,可与人DPP4受体分子中229~346区域的13个氨基酸直接作用。MERS-CoV敏感类动物的DPP4受体中,这13个氨基酸都比较保守,仅在267、288、291等位点存在1个或2个氨基酸的改变,而在不敏感类动物中则存在较多的氨基酸改变^[15]。同时,对不敏感类动物的DPP4受体中重要氨基酸进行人源化转换后,可以使它们易被MERS-CoV感染^[15],这些结果表明MERS-CoV的感染性依赖于RBD与相应宿主受体的结合能力,同时也表明MERS-CoV RBD的变化可能对其跨种传播具有较大的影响。

另一方面,与MERS-CoV比较亲缘的冠状病毒是hCoV-HKU4和hCoV-HKU5,其中hCoV-HKU4的S蛋白可与人DPP4受体相互作用,并通过胰酶的作用介导hCoV-HKU4假病毒融合进入人细胞^[55]。但与MERS-CoV相比,它们的RBD有较大的差异,18个重要氨基酸中,仅在499、502、506等7个位点存在相互对应的氨基酸^[55-56]。这表明,MERS-CoV对受体的构象要求较高,但其自身的RBD却可有较大的变化,且与受体直接相互作用的18个重要氨基酸并非都是完全必要的。这一点与SARS-CoV不同,SARS-CoV自身RBD的可变性非常小,而受体ACE2的变化范围较大^[15]。同时,也提示MERS-CoV的RBD的进化过程非常复杂,但目前在RBD中尚未发现与跨种族传播相关的重要氨基酸的自然突变,这部分工作仍在继续进行。已发现的18个重要氨基酸仍处于目前MERS-CoV流行株(包括人毒株和骆驼毒株)的主导地位,推测MERS-CoV的RBD构象已处于与受体(人和骆驼)相互结合的最佳状态之一^[15]。

S蛋白的酶切机制对于MERS-CoV跨种传播具有重要作用。MERS-CoV与hCoV-HKU4的同源性较强。Yang等^[55]比较了这两个病毒S蛋白的结构和功能后发现,虽然两者的RBD都可与人的DPP4分子结合,但hCoV-HKU4一般情况下并不感染人细胞,主要是由于hCoV-HKU4的S蛋白上缺少furin蛋白酶的酶切位点,从而不能被人细胞

的 furin 蛋白酶激活,不能介导假病毒侵染靶细胞,而 MERS-CoV 的 S 蛋白则完全可以;若 hCoV-HKU4 的 S 蛋白经过胰酶处理后,则可成功介导假病毒的感染。MERS-CoV 的感染也存在类似的现象,绵羊和牛的 DPP4 受体分子可成功介导 MERS-CoV 对 BHK 细胞的感染(源自仓鼠),但流行病学调查研究并没有发现 MERS-CoV 感染绵羊和牛,这可能与宿主细胞表面的蛋白酶有直接的关系^[15,57],暗示 MERS-CoV 跨种传播机制与其 S 蛋白的酶切有关。随后, Yang 等^[58]通过 MERS-CoV 和 hCoV-HKU4 同源性对比分析,发现在 MERS-CoV 的 S 蛋白存在两个重要的蛋白酶酶切位点(人前蛋白转化酶和人胞内丝氨酸蛋白酶),而 hCoV-HKU4 的 S 蛋白缺失相应的酶切位点,或可能存在糖基化的空间位阻。通过在 hCoV-HKU4 的 S 蛋白上引入突变 S746R 和 N762A,构成相应位置上的酶切位点后,其 S 蛋白可在无外源蛋白酶(如胰酶)的作用下,介导 hCoV-HKU4 假病毒感染人体细胞,且两个突变位点的促进感染效果能很好地叠加。同时,将 MERS-CoV 的 S 蛋白引入相应的突变 R748S 和 A763N/F764Y/N765T(即替换成 hCoV-HKU4 S 蛋白相应的氨基酸),MERS-CoV 的 S 蛋白则完全失去活性,进而表明了这些位点的突变是 MERS-CoV 相关病毒从蝙蝠传播到人类的重要原因。在 MERS-CoV RBD 可变性较大的情况下,其 S 蛋白的酶切位点的改变或许是从蝙蝠传播到骆驼或人的直接原因(图 2)。

4 在人类传播过程产生的基因突变特征

冠状病毒属于 RNA 病毒,在传播过程中会发生显著变异。维持种系和基因组的稳定性或稳定突变,对于病毒适应新宿主的传播极为重要^[40,59-60]。

4.1 SARS-CoV 的突变

在流行过程中,尽管 SARS-CoV 的基因突变速率处于 RNA 病毒突变速率的正常水平^[60],但还是具有较快的进化速率^[35]。在传播过程中, SARS-CoV 共出现了 360、480、609 等位点约 200 个单核苷酸的突变。其中, SARS-CoV 的 S 蛋白在选择压作用下,出现较多的氨基酸突变现象,包括 RBD 中重要氨基酸 479 位点等^[60]。另外,在基因的 Orf8 区域也出现较多的基因片段(如 29 nt、82 nt)丢失现象,其中特征性 29 nt 的缺失出现于 2002—2003 年 SARS-CoV 的大多数强毒性流行株中,与人类宿主的适应性有关,也可能是 SARS-CoV 在人群中大大

规模传播的重要原因,但在 2003-2004 广州流行中, SARS-CoV 流行株的基因中再次出现特征性 29 nt^[61]。这种特征性 29 nt 的回复性变化,可能与后期 SARS-CoV 流行株的致病力和传播能力减弱有关。如此大量的基因变化现象,暗示 SARS-CoV 在新的宿主(人和果子狸)中传播存在很强的不适应性^[61]。同时,根据 SARS-CoV 流行的选择压逐渐下降,以及其受体结合域中重要氨基酸(尤其 487、479 位点)和特征性 29 nt 出现逆向进化等现象,推测 SARS-CoV 可能为非自然起源,无储存宿主,属于逆向进化,因而其流行在自然界中很快消失^[35]。

4.2 MERS-CoV 的突变

相对于 SARS-CoV, MERS-CoV 的进化速率较慢,其基因组编码的区域以 $1.12 \times 10^{-3}/a$ 的速率变化,且呈非一致的分布^[62]。其中冠状病毒包膜蛋白的替换尤为重要,它对于病毒的宿主范围、病毒感染和免疫逃逸能力等都有重要影响^[63],如鼠肝炎病毒包膜蛋白中 HR1 的改变可能使其宿主的范围扩大^[63]。

MERS-CoV 包膜蛋白 S1 亚单位的 RBD 在传播过程中的突变是很重要的,特别是位于病毒-宿主交界面的蛋白,可能影响病毒与抗体的中和反应,以及病毒在人类中传播的特性^[62]。而突变位点 D509G 则是与包膜蛋白 -DPP4 结合交界面相邻,突变位点 S460F 和包膜蛋白 -DPP4 结合交界面也很接近,经分析推测这两个位点突变可能存在适度的正向选择压^[62]。研究还发现位于包膜蛋白 RBD 隐藏区域的位点突变,如氨基酸位点 482、506、534,出现功能上保守的非统一突变;但在 MERS-CoV 的 RBD 所发生的以上所有突变,并没有在大量的毒株中被检测到,暗示了这些突变是一种有限的传播^[62]。另外,靠近 S1 N 端的突变位点 D158Y 出现了持续存在的现象,暗示了可能是一种中性或者是正向选择的结果^[62]。在最近的韩国流行 MERS-CoV 毒株中,还发现了位于 S 蛋白的 137、530 位点突变^[64]。但经检测,均未发现这些突变对 MERS-CoV 的毒性和传播能力有明显影响,因此,对该突变的生物学特性还有待进一步的研究^[62,64]。

同样,在 S2 亚单位中,3 个氨基酸的改变(Q1020R 或 Q1020H、T1202I、Q1208H)是持续存在于 MERS-CoV 许多毒株中的,暗示这些改变可能是病毒突变中中立或者正向突变的结果^[65]。其中,1020 位点位于包膜蛋白的 HR1 区域,它的替换影响病毒刺突蛋白与靶细胞的膜融合活性^[65]。1020

位点突变为组氨酸可以提供一个胞内质子化的残基, 突变成精氨酸可以提供一个潜在的胞内蛋白酶切位点, 这些氨基酸的变化将可能影响病毒 S 蛋白的膜融合活性, 并推测该位点突变是在正向选择条件下发生的^[62]。但另有研究发现, Q1020R/H 的突变株在人 DPP4 转染小鼠模型的复制能力上却弱于野生株^[66], 因此, 有关该位点突变的意义还有待进一步研究。同时, 也有出现组合突变的现象, 如存在 D158Y 和 Q1020R 同时突变的毒株^[62]。

传播过程中, MERS-CoV 的 N 基因也出现 6 nt 的缺失现象, 但尚未发现对 MERS-CoV 的发展和传播有何意义^[62]。此外, 在 MERS-CoV 的非结构蛋白, 如类木瓜酶蛋白酶 (PLP) 中, 一些毒株出现 A160S 和 R911C 等稳定突变, ADP 核酸 1 单磷酸酶 (ADRP) 也存在一些氨基酸的持续改变现象^[62], 但目前均未发现这些突变有明确的生物学意义。另外, 对中国的一株韩国输入型 MERS 病例进行测序, 发现其与韩国的毒株相似度最高, 且与之前在数据库中的毒株相比, 仅发现在非结构蛋白中单个氨基

酸的突变, 如 D977G、T1833I、G6896S 位点, 未发现这些突变对 MERS-CoV 的毒性及传播的影响^[67]。同时, 通过基因序列分析, 在 S、E、M、N 基因上, 暂未出现影响病毒的装配或毒性的突变, 且目前 MERS-CoV 也未出现基因重组现象, 这些暗示了 MERS-CoV 在人与人之间的传播能力未有显著的变化, 目前在病毒学角度没有明显的爆发大规模疫情的征兆^[67]。

免疫逃逸突变也是病毒突变进化的因素之一。与 SARS-CoV 一样, MERS-CoV 的 S 蛋白也有很强的免疫原性, 尤其是在其受体结合域^[68]。有研究表明, 利用其 RBD 可筛选出有效的抗 MERS-CoV 单克隆抗体^[69-72]。同时, RBD 在宿主体内存在着较强的选择压, 易发生位点突变。有研究表明, 在抗体药物的作用下, RBD 可能会在 T512A、Y540C、R542G、L506F、P547S 等位点发生逃逸突变, 但大多数的逃逸突变会减弱病毒与受体的亲和力^[71]。另外, 其他有关 SARS-CoV 和 MERS-CoV 人传人的相关特征对比详见表 2。

表2 从突变特征对比SARS-CoV和MERS-CoV的人与人传播^[60-62,73-75]

病原	SARS-CoV	MERS-CoV
突变速率	3.01×10 ⁻³ 位点/a	1.12×10 ⁻³ /a
主要位点分布	S蛋白	S蛋白
片段缺失现象	较多(如29 nt、82 nt等)	较少(如6 nt等)
突变的可能意义	影响病毒的毒性和传播能力	暂不明确
可能出现免疫逃逸的突变位点	D1128A、D480G、P462L等	T512A、Y540C、R542G、L506F、P547S等

5 结束语

SARS-CoV 和 MERS-CoV 都属于动物源性冠状病毒, 其自然宿主都可能是蝙蝠, 但在流行和基因突变方面, 还存在各自的特性。通过对它们个性和共性的分析, 可得到一些启示。首先, 其跨种传播的进化突变方式不同: SARS-CoV 主要通过 S 蛋白 RBD 中重要氨基酸的突变, 增加与人 DPP4 受体的亲和力, 进而可感染人体; 而 MERS-CoV 在跨种传播的进化中, 可能是与 S 蛋白上重要酶切位点的形成有关(图 2)。其次, 通过进化分析, 发现 SARS-CoV 是非自然起源, 无储存宿主库, 故而很快消失; 相比之下, MERS-CoV 有天然动物储存库(如单峰骆驼), 则可能会存在较长时间。这些启示可帮助我们进一步认识高致病性冠状病毒, 但仍然

存在很多问题尚无明确的科学定论, 如 MERS-CoV 在人群中的传播力为何不如 SARS-CoV, 以及 MERS-CoV 能否直接在空气中传播等问题还需进一步的研究和揭示。目前, MERS-CoV 仍然对人类健康有很大威胁, 加强对其流行特征和基因变化的监控将对疫情的控制有非常重要的意义。

[参 考 文 献]

[1] Heinze C. A novel mycovirus from *Clitocybe odora*. Arch Virol, 2012, 157: 1831-4

[2] de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. J Virol, 2013, 87: 7790-2

[3] Woo PC, Lau SK, Lam CS, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus

- deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol*, 2012, 86: 3995-4008
- [4] Zhong NS, Zeng GQ. Our strategies for fighting severe acute respiratory syndrome (SARS). *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168: 7-9
 - [5] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, 2005, 310: 676-9
 - [6] Tu C, Crameri G, Kong X, et al. Antibodies to SARS coronavirus in civets. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 2244-8
 - [7] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 2003, 302: 276-8
 - [8] Wu D, Tu C, Xin C, et al. Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates. *J Virol*, 2005, 79: 2620-5
 - [9] Ge XY, Li JL, Yang XL, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 2013, 503: 535-8
 - [10] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361: 1319-25
 - [11] Nicholls JM, Poon LL, Lee KC, et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361: 1773-8
 - [12] Surjit M, Kumar R, Mishra RN, et al. The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol*, 2005, 79: 11476-86
 - [13] Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2003, 300: 1399-404
 - [14] In the Absence of SARS-CoV Transmission Worldwide: Guidance for Surveillance, Clinical and Laboratory Evaluation, and Reportin[EB/OL], (2003). <http://www.cdc.gov/sars/surveillance/absence.html>
 - [15] Lu G, Wang Q, Gao GF. Bat-to-human: spike features determining 'host jump' of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends Microbiol*, 2015, 23: 468-78
 - [16] Memish ZA, Cotten M, Meyer B, et al. Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20: 1012-5
 - [17] Chan RW, Hemida MG, Kayali G, et al. Tropism and replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus from dromedary camels in the human respiratory tract: an *in-vitro* and *ex-vivo* study. *Lancet Respir Med*, 2014, 2: 813-22
 - [18] Hemida MG, Perera RA, Wang P, et al. Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus seroprevalence in domestic livestock in Saudi Arabia, 2010 to 2013. *Eur Surveill*, 2013, 18: 20659
 - [19] Reusken CB, Farag EA, Jonges M, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Eur Surveill*, 2014, 19
 - [20] Reusken CB, Haagmans BL, Muller MA, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13: 859-66
 - [21] Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, et al. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med*, 2014, 370: 2499-505
 - [22] Cui J, Eden JS, Holmes EC, et al. Adaptive evolution of bat dipeptidyl peptidase 4 (dpp4): implications for the origin and emergence of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Virol J*, 2013, 10: 304
 - [23] Memish ZA, Mishra N, Olival KJ, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19: 1819-23
 - [24] Xia S, Liu Q, Wang Q, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein. *Virus Res*, 2014, 194: 200-10
 - [25] Mackay IM, Arden KE. Middle East respiratory syndrome: An emerging coronavirus infection tracked by the crowd. *Virus Res*, 2015, 202: 60-88
 - [26] Ying T, Li W, Dimitrov DS. Discovery of T-cell infection and apoptosis by Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis*, 2016, 213: 877-9
 - [27] Hui DS, Memish ZA, Zumla A. Severe acute respiratory syndrome vs. the Middle East respiratory syndrome. *Curr Opin Pulm Med*, 2014, 20: 233-41
 - [28] Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13: 752-61
 - [29] bdel-Moneim AS. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): evidence and speculations. *Arch Virol*, 2014, 159: 1575-84
 - [30] Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2015, 386: 995-1007
 - [31] Current outbreak situation in the Republic of Korea and China as of 17 August 2015[EB/OL]. (2015-8-17) <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>
 - [32] Eckerle I, Muller MA, Kallies S, et al. *In-vitro* renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virol J*, 2013, 10: 359
 - [33] Peiris JS, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med*, 2004, 10: S88-97
 - [34] WHO global conference on severe acute respiratory syndrome (SARS). *Wkly Epidemiol Rec*, 2003, 78: 299-303
 - [35] Xu D, Sun H, Su H et al. SARS coronavirus without reservoir originated from an unnatural evolution, experienced the reverse evolution, and finally disappeared in the world. *Chn Med J: Engl*, 2014, 127: 2537-42

- [36] Zaki AM, van BS, Bestebroer TM, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*, 2012, 367: 1814-20
- [37] Lee SS, Wong NS. Probable transmission chains of Middle East respiratory syndrome coronavirus and the multiple generations of secondary infection in South Korea. *Int J Infect Dis*, 2015, 38: 65-7
- [38] Gralinski LE, Baric RS. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J Pathol*, 2015, 235: 185-95
- [39] Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, et al. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl J Med*, 2013, 368: 2487-94
- [40] Cotten M, Watson SJ, Kellam P, et al. Transmission and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: a descriptive genomic study. *Lancet*, 2013, 382: 1993-2002
- [41] Ki M. 2015 MERS outbreak in Korea: Hospital-to-Hospital Transmission. *Epidemiol Health*, 2015, 37: e2015033
- [42] Choi JY. An outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in South Korea, 2015. *Yonsei Med J*, 2015, 56: 1174-6
- [43] Bauch CT, Oraby T. Assessing the pandemic potential of MERS-CoV. *Lancet*, 2013, 382: 662-4
- [44] Fakhoury H, Hajeer A. Re-emerging Middle East respiratory syndrome coronavirus: the hibernating bat hypothesis. *Ann Thorac Med*, 2015, 10: 218-9
- [45] Corman VM, Ithete NL, Richards LR et al. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J Virol*, 2014, 88: 11297-303
- [46] Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol*, 2010, 84: 3134-46
- [47] Qu XX, Hao P, Song XJ, et al. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *J Biol Chem*, 2005, 280: 29588-95
- [48] Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, et al. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 4240-5
- [49] Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11876-881
- [50] Choi SY, Bertram S, Glowacka I, et al. Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends Mol Med*, 2009, 15: 303-12
- [51] Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, et al. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12543-7
- [52] Zhou Y, Vedantham P, Lu K, et al. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res*, 2015, 116: 76-84
- [53] Eckerle I, Corman VM, Muller MA, et al. Replicative Capacity of MERS Coronavirus in Livestock Cell Lines. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20: 276-9
- [54] Chan JF, Chan KH, Choi GK, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging novel human betacoronavirus 2c EMC/2012: implications for disease pathogenesis and clinical manifestation. *J Infect Dis*, 2013, 207: 1743-52
- [55] Yang Y, Du L, Liu C, et al. Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 12516-21
- [56] Wang Q, Qi J, Yuan Y, et al. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host Microbe*, 2014, 16: 328-37
- [57] van DN, Miazgowicz KL, Milne-Price S, et al. Host species restriction of Middle East respiratory syndrome coronavirus through its receptor, dipeptidyl peptidase 4. *J Virol*, 2014, 88: 9220-32
- [58] Yang Y, Liu C, Du L, et al. Two mutations were critical for bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *J Virol*, 2015, 89: 9119-23
- [59] Li W, Zhang C, Sui J et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J*, 2005, 24: 1634-43
- [60] Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science*, 2004, 303: 1666-9
- [61] Song HD, Tu CC, Zhang GW, et al. Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2430-5
- [62] Cotten M, Watson SJ, Zumla AI, et al. Spread, circulation, and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *MBio*, 2014, 5: e01062-13
- [63] McRoy WC, Baric RS. Amino acid substitutions in the S2 subunit of mouse hepatitis virus variant V51 encode determinants of host range expansion. *J Virol*, 2008, 82: 1414-24
- [64] Kim YJ, Cho YJ, Kim DW, et al. Complete genome sequence of Middle East respiratory syndrome coronavirus KOR/KNIH/002_05_2015, isolated in South Korea. *Genome Announc*, 2015, 3: e00787-15
- [65] Gao J, Lu G, Qi J, et al. Structure of the fusion core and inhibition of fusion by a heptad repeat peptide derived from the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2013, 87: 13134-40
- [66] Channappanavar R, Lu L, Xia S, et al. Protective effect of intranasal regimens containing peptidic Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor against MERS-CoV infection. *J Infect Dis*, 2015, 212: 1894-903
- [67] Xie Q, Cao Y, Su J, et al. Genomic sequencing and analysis of the first imported Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS CoV) in China. *Sci Chn: Life Sci*, 2015, 58: 818-20

- [68] Zhang N, Channappanavar R, Ma C, et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol Immunol*, 2015, 13: 180-90
- [69] Ying T, Du L, Ju TW, et al. Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies. *J Virol*, 2014, 88: 7796-805
- [70] Jiang L, Wang N, Zuo T, et al. Potent neutralization of MERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 234ra59
- [71] Tang XC, Agnihothram SS, Jiao Y, et al. Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E2018-26
- [72] Du L, Zhao G, Yang Y, et al. A conformation-dependent neutralizing monoclonal antibody specifically targeting receptor-binding domain in Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol*, 2014, 88: 7045-53
- [73] Ng OW, Keng CT, Leung CS, et al. Substitution at aspartic acid 1128 in the SARS coronavirus spike glycoprotein mediates escape from a S2 domain-targeting neutralizing monoclonal antibody. *PLoS One*, 2014, 9: e102415
- [74] ter MJ, van den Brink EN, Poon LL, et al. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS Med*, 2006, 3: e237
- [75] Sui J, Deming M, Rockx B, et al. Effects of human anti-spike protein receptor binding domain antibodies on severe acute respiratory syndrome coronavirus neutralization escape and fitness. *J Virol*, 2014, 88: 13769-80