

新近发现的冠状病毒研究进展

耿合员, 谭文杰*

(中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所病毒病应急技术中心, 北京, 102206)

摘要:冠状病毒是自然界中广泛存在的一大类家族,人和多种动物易感。人冠状病毒感染后,通常引起普通感冒症状,严重者能造成死亡。冠状病毒广泛的宿主性以及自身基因组的结构特征使其在进化过程中极易发生基因重组,呈现遗传多样性;新亚型及新的冠状病毒在此过程中不断出现。本文针对新近出现的冠状病毒,尤其是 SARS 样冠状病毒(SARS-like-CoVs)以及 2012 年发现的新型人冠状病毒 EMC(HCoV-EMC)的基因组结构特征及冠状病毒跨种属传播机制的最新研究进展作简要论述。

关键词:SARS 样冠状病毒;人冠状病毒 EMC;基因组结构;跨种属传播

中图分类号:R373.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2013)01-0065-06

冠状病毒(*Coronavirus*)是自然界广泛存在的一大类家族,人和多种动物易感,因其病毒粒子表面类似日冕状的纤突而被命名。冠状病毒属于冠状病毒科(*family Coronaviridae*)、巢式病毒目(*order Nidovirales*)。基于病毒核酸序列的系统发生分析,国际病毒分类委员会(International committee on taxonomy of viruses, ICTV)第九次报告中将冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 以及新假定的一个属共四大类^[1]。其中 α 类冠状病毒主要包括人冠状病毒 229E(HCoV-229E)、人冠状病毒 NL63(HCoV-NL63)、犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCoV)、猫传染性腹膜炎病毒(Feline infectious peritonitis virus, FIPV)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)以及一些蝙蝠类冠状病毒如长翼蝠冠状病毒 HKU8(Miniopiterus bat coronavirus HKU8, bat-CoV-HKU8)、菊头蝠冠状病毒 HKU2(Rhinolophus bat coronavirus HKU2, bat-CoV-HKU2)等。 β 类冠状病毒主要包括人冠状病毒 OC43(HCoV-OC43)、人冠状病毒香港 I(HCoV-HKU1)、鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV)、牛冠状病毒(Bovine coronavirus, BCoV)、SARS 冠状病毒(Severe

acute respiratory syndrome virus, SARS-CoV)以及 SARS 样冠状病毒(SARS-like-CoV),如菊头蝠冠状病毒 Rf1(Rhinolophus bat coronavirus Rf1, batCoV-Rf1)、HKU3(bat-CoV-HKU3)、HKU4(bat-CoV-HKU4)、HKU5(bat-CoV-HKU5)和狸猫冠状病毒(Palm civet coronavirus, CiCoV)等。 γ 类冠状病毒主要包括禽冠状病毒如鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)、白鲸冠状病毒 SW1(Beluga whale coronavirus SW1, BW-CoV-SW1)等。而新假定的第四类冠状病毒主要包括文鸟冠状病毒(Munia coronavirus, MuCoV)、鸚鵡冠状病毒(Parrot coronavirus, PaCoV)等。随着新的冠状病毒的不断出现,其分类也将会越来越细化。本文将对最近新发现的冠状病毒的基因组结构特征及冠状病毒跨种属传播机制的最新研究进展作简要论述。

1 新近发现的冠状病毒及其基因组

1.1 冠状病毒概述 冠状病毒是一类具有包膜、基因组为线性单股正链的 RNA 病毒。病毒粒子呈球形,直径为 120~160 nm。病毒基因组 5'端具甲基化的帽状结构,3'端具有 poly(A)尾,基因组全长约 27~32 kb,是目前已知 RNA 病毒中基因组最大的病毒。病毒基因组两端分别包含一个转录非译区(Untranslated region, UTR),即 5'-UTR 和 3'-UTR,其长度分别在 200~600 nt 和 200~500 nt 之间。其中,5'-UTR 包含核糖体结合位点和转录起始信号,3'-UTR 含有转录终止信号。距 5'端约 2/3 的基因组包含两个大的重叠的开放读码框(Open reading frame, ORF)ORF1a 和 ORF1b,主要负责编码与病毒复制转录有关的酶类等非结构蛋白。3'端约 1/3 的基因负责编码表面纤突蛋白(spike, S)、

收稿日期:2012-10-16;修回日期:2012-10-25

基金项目:国家 973 课题(2011CB504704),传染病重大专项(2011ZX10004-001)

作者简介:耿合员(1984-),男,山东聊城人,博士研究生,主要研究方向为病原生物学。Tel: 010-58900197; E-mail: ghy-08@163.com

*通讯作者:谭文杰,研究员,博士生导师, Tel: 010-58900878, E-mail: tanwj28@yahoo.com

膜蛋白(membrane, M)、小膜蛋白(Small membrane, E)以及核衣壳蛋白(nucleocapsid, N)等主要结构蛋白。在结构蛋白之间通常含有一些小的开放读码框 ORFs。尽管体外实验表明,有些 ORF 为病毒复制所非必须,但其与病毒的致病性有关,同时决定着病毒的群特异性^[2]。

1.2 SARS-like 冠状病毒

2002 年 11 月,一种新的冠状病毒首先在国内广东省暴发,并在短时间内迅速传遍全球。因该病毒主要引起人的严重急性呼吸综合征(Severe acute respiratory syndrome, SARS),故将其命名为 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)。SARS-CoV 主要流行于 2002~2003 年期间,共造成全球约 8 422 人感染,其中 916 人死亡^[3]。SARS-CoV 的直接宿主至今仍未有明确答案。但是,在 SARS-CoV 的溯源过程中,科学家们从多种蝙蝠类动物体内分离到多种冠状病毒。其中,从菊头蝠属(*Rhinolophus sinicus*)蝙蝠体内分离到的冠状病毒的基因组结构特征与 SARS-CoV 相似,而且核苷酸的一致性很高,在 88%~92%之间,故将该类冠状病毒称为 SARS 样冠状病毒(SARS-like-CoVs)或蝙蝠类 SARS 样冠状病毒(bat-SARS-like-CoVs)^[4]。目前已分离的 SARS 样冠状病毒主要有 bat-CoV-Rf1、bat-CoV-HKU3、bat-CoV-HKU4、bat-CoV-HKU5 等。

SARS-like-CoV 的基因组结构与 SARS-CoV 基本相同,基因组从 5' 端到 3' 端依次为:5'-UTR-ORF1ab-S-ORF3 (在 bat-CoV-Rf1 中为 ORF3a, 3b, 3c)-E-M-ORF6-ORF7a, 7b-ORF8-ORF9a (N), 9b, 9c-3'-UTR。两者基因组另一个典型的结构特征是在其每一个亚基因组 ORF 转录起始处有一段共有的保守序列(5'-ACGAAC-3'),即转录调控序列(Transcription regulatory sequence, TRS)^[5]。但是,SARS-like-CoV 基因组结构又有其多样性,与其它结构区域相比,ORF1ab、S、ORF3 和

ORF8 区域的核苷酸和氨基酸的变异性较高,而与 SARS-CoV 相比,基因组差异主要位于 ORF8 区^[6]。研究发现,大多数 SARS-like-CoV (bat-CoV HKU3-8 除外)和早期流行的 SARS-CoV 在 ORF8 区有一个 29 nt 的核苷酸序列,该序列将 ORF8a 和 ORF8b 融合成一个完整的 ORF8。而在后期流行的 SARS-CoV 分离株中,该 29 nt 已经缺失掉,ORF8 也被分成两个小的开放读码框 ORF8a 和 ORF8b。在分离的 bat-SARS-like-CoV HKU3-8 的 ORF8 区缺失了 26 bp 而将该区分成 8a、8b 和 8c 三个小的 ORF^[7]。

1.3 新出现的人冠状病毒 HCoV-EMC

目前已知的能感染人的冠状病毒共六种,分别为 20 世纪 60 年代发现的人冠状病毒 HCoV-229E 和 HCoV-OC43,2003 年新出现的 SARS(Severe acute respiratory syndrome)冠状病毒 SARS-CoV,2004 年发现的人冠状病毒 HCoV-NL63,2005 年新发现的人冠状病毒 HCoV-HKU1 以及 2012 年 7 月在中东地区出现的新型人冠状病毒 HCoV-EMC。

2012 年 9 月 24 日,世界卫生组织(WHO)报道称,在中东地区从一个患有急性呼吸道疾病的病人中发现了一种新的 SARS 样冠状病毒,病人的临床表现为急性呼吸道感染和肾功能衰竭。英国科学家通过对该病毒基因组测序及系统发生分析,发现该病毒为一种新的人冠状病毒。随后发现一例与 2012 年 7 月份因呼吸道疾病感染伴发肾衰竭导致死亡的沙特阿拉伯人为同一种病毒,该新型人冠状病毒命名为 HCoV-EMC(GenBank: JX869059)^[8]。病毒基因组全长 30 118 bp,基因组结构从 5' 端到 3' 端依次为:5'-UTR-ORF1ab-S-ORF3 (包含 ORF3a, 3b, 3c, 3d)-E-M-N-3'-UTR,与 HCoV-NL63 编码结构更为接近,但是 NL63 的 ORF3 是一个完整的读码结构(图 1)。

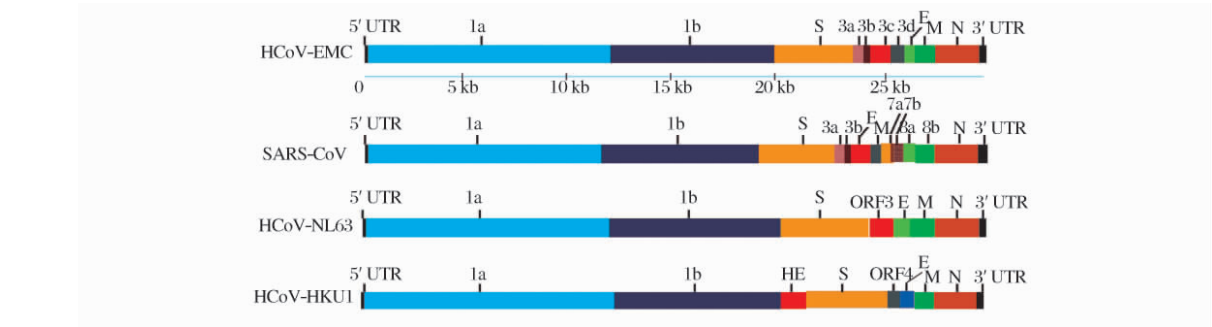
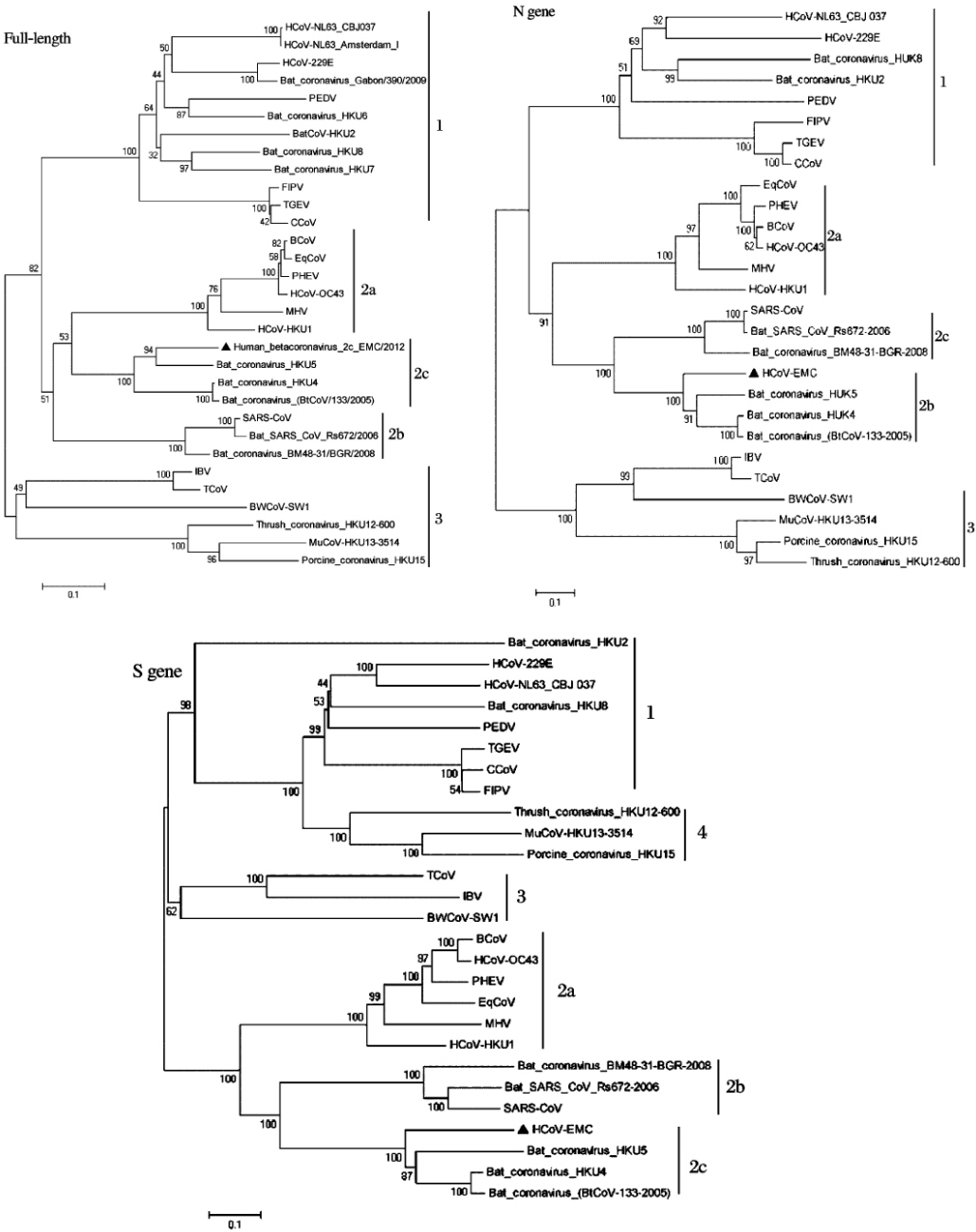


图 1 HCoV-EMC 及其它新型人冠状病毒基因组结构

从系统发生上看(图 2),该病毒与 bat-CoV-HKU4 和 bat-CoV-HKU5 的亲缘关系比较接近,基因组相似性都为 70.1%,属于 β 类冠状病毒的 2c 亚群,而与 SARS 基因组相似性为 54.9%。提示该病毒很可能为一跨越中间屏障,在适应新宿主过程中演变而来的新型冠状病毒,但其自然宿主仍有待进

一步研究。目前来看,已有两例病人确诊,其中一例在沙特阿拉伯,该病人已经死亡,另一例在英国。目前已经建立了针对该病毒的荧光定量(RT-PCR)检测方法^[9],但其感染致病与传播特性及分子流行病学等仍有待进一步研究阐明。



MHV. Mouse hepatitis virus; IBV. Avian infectious bronchitis virus; BCoV. Bovine coronavirus; CCoV. Canine coronavirus; FIPV. Feline infectious peritonitis virus; EqCoV. Equine coronavirus; TCoV. Turkey coronavirus; PHEV. Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; TGEV. Porcine transmissible gastroenteritis virus; PEDV. Porcine epidemic diarrhea virus; BWCoV-SW1. Beluga whale coronavirus sw1; MuCoV-HKU13. Munia coronavirus HKU13

图 2 新型冠状病毒 EMC 全基因组、N 基因、S 基因的系统发生分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of novel human coronavirus EMC/2012 with other coronaviruses reference strains based on full-length gene, N gene and S gene

在六种人冠状病毒中,SARS 冠状病毒目前已经在人群中消失。HCoV-229E、-OC43、-NL63 和-HKU1 分子流行病学研究表明,这四种冠状病毒在人群中普遍存在并呈全球性分布^[10]。SARS 冠状病毒感染主要引起成人急性呼吸道症状,严重者造成死亡。而 HCoV-229E、-OC43、-NL63 与-HKU1 四种常见冠状病毒通常引起人的普通感冒并能造成成人及婴幼儿的下呼吸道症状,临床表现主要为发热、咳嗽、流涕,严重者表现为喉炎、支气管炎、毛细支气管炎及肺炎等急性呼吸道症状,也有导致胃肠道与神经系统症状的报道^[11]。而新近发现的人冠状病毒 EMC,感染者的主要症状目前表现为重症急性呼吸道感染并伴发肾功能衰竭,已造成一例感染者死亡,其分子流行病学仍在进一步调查中。

2 冠状病毒跨种属传播机制研究

冠状病毒基于自身基因组的特点具有多样性。第一,冠状病毒作为 RNA 病毒,其 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP)具有较低的忠实性,在基因组复制过程中极易发生点突变,在每轮复制循环过程中基因组突变率在 $1/1\ 000 \sim 1/10\ 000$,这也是其基因组呈现遗传多样性的主要原因^[12]。第二,冠状病毒在基因组复制过程中存在一个复制中间体,即先以正链为模板合成一条全长负链,然后再以负链为模板合成正链。在此过程中可能会发生模板的转换作用,即模板的复制选择机制^[13],这就使冠状病毒在复制过程中发生重组的机会大大提高,从而导致新型别或新的冠状病毒不断出现。第三,冠状病毒作为目前已知 RNA 病毒中基因组最大的病毒,其本身为基因组的加工和修饰过程增加了不稳定性。

冠状病毒广泛的宿主性为其跨种属传播提供了条件。以 SARS 样冠状病毒为例,自 2005 年以来,从蝙蝠体内分离到多种 SARS 样冠状病毒。流行病学调查证实,蝙蝠是 SARS-like-CoVs 的自然宿主^[14],是否是人 SARS-CoV 或其它冠状病毒的直接宿主仍有待进一步证实。从目前分离的蝙蝠类冠状病毒中,与人 SARS-CoV 及其它冠状病毒相比在系统进化上仍存在一定的距离^[15]。但是,SARS-like-CoVs 已在亚洲、欧洲、美洲、非洲等不同地区不同种类的蝙蝠体内检测到。其遗传多样性提示该类病毒在适应宿主过程中正以极快的速度进化。蝙蝠种类繁多,其喜群居、食物谱广泛、能长途迁徙等特性使其地理分布极为广泛。这也使其成为多种动物性传染病病毒的自然宿主和储存库。研究发现,许

多感染人类的病毒如弹状病毒、副黏病毒、黄病毒、丝状病毒等都与蝙蝠有关^[16]。另一方面,2007 年 Crossley B. M 等又从羊驼体内分离出一种新的冠状病毒(Alpaca Coronavirus, ACoV),通过系统发生分析,发现该病毒与人冠状病毒 229E 比较接近^[17]。最近 Huynh J 等人采用分子钟分析法(Molecular clock analysis)对从北美三色蝙蝠(*Perimyotis subflavus*)中新近分离的 α 类冠状病毒序列与 HCoV-NL63 进行比较发现两者在 563~822 年前具有共同祖先,进一步发现 HCoV-NL63 可在该蝙蝠的肺永生细胞系中有效复制^[18]。这些证据提示,某些冠状病毒可在蝙蝠或其他哺乳动物中(包括人类)进行循环和遗传物质的交换,从而实现跨种属传播。因此,尽管目前很少有关于病毒从动物(蝙蝠、羊驼等)直接传染给人类的报道,但动物很可能是这些病毒的自然宿主,通过跨越种间屏障传给中间宿主,然后在适应中间宿主的过程中传染给人类^[19]。

3 小结与展望

首先,进一步开展冠状病毒及新近出现的冠状病毒的分子流行病学调查仍是研究冠状病毒的重点工作之一,这对阐释冠状病毒跨种属传播的分子机制,追溯人冠状病毒的自然宿主具有重要意义。其次是进一步建立新的快速、灵敏、准确的分子检测技术,以应对突发或新发的冠状病毒,满足快速诊断的要求。冠状病毒与宿主细胞的相互作用及致病机理同样是有待深入研究的重要领域。目前,国际上已有多个实验室成功建立了人类冠状病毒(SARS-CoV、HCoV-OC43、HCoV-NL63)和其它哺乳类动物冠状病毒(TGEV、MHV)及禽类冠状病毒(IBV)的反向遗传学系统^[20-25],这为研究冠状病毒基因组的结构及功能、病毒的复制和表达调控机理、研究病毒与宿主的相互作用、致病性以及开发候选疫苗、载体疫苗等方面提供了广阔的平台。例如人冠状病毒 NL63,有研究者发现该病毒中国分离株与欧洲分离株和北美分离株相比,在其基因组 1a 区有连续 15 bp 的缺失,而且该缺失现象普遍存在,是一个自然发生的过程^[26]。该 15 bp 的缺失对病毒的复制或致病性具体有何影响有待进一步的研究,而反向遗传学也必将成为该研究强有力的工具。

参考文献:

- [1] Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses, ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Academic Press,

- 2012.
- [2] Lai M C, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses[J]. *Adv Virus Res*, 1997, 48:1-100.
 - [3] World Health Organization (WHO). WHO final summary SARS, 15 August 2003: Summary table of SARS cases by country, 1 November 2002-7 August 2003. Geneva, WHO, 2003.
 - [4] Lau S K, Woo P C, Li K S, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats[J]. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2005, 102: 14040-14045.
 - [5] Woo P C, Wang M, Lau S K, et al. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features[J]. *J Virol*, 2007, 81(4):1574-1585.
 - [6] Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus[J]. *Virus Res*, 2008, 133(1):74-87.
 - [7] Li K S, Huang Y, Shek C T, et al. Ecoepidemiology and complete genome comparison of different strains of severe acute respiratory syndrome-related *Rhinolophus* bat coronavirus in China reveal bats as a reservoir for acute self-limiting infection that allows recombination events[J]. *J Virol*, 2010, 84(6):2808-2819.
 - [8] Ali Moh Zaki, Sander van Boheemen, Theo M Bestebroer, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia[J]. *N Engl J Med*, 2012, 10:1056-1063.
 - [9] Corman V M, Eckerle I, Bleicker T, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction[J]. *Euro Surveill*, 2012, 17(39):20285-20291.
 - [10] Patrick C Y Woo, Susanna K P Lau, Yi Huang, et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping[J]. *Exper Biol Med*, 2009, 234:1117-1127.
 - [11] Xiaoyan Yu, Roujian Lu, Zhong Wang, et al. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an emergency department in Beijing [J/OL]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32174.
 - [12] Duffy S, Shackelton L A, Holmes E C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9:267-276.
 - [13] Pastemak A O, Spaan W J, Snijder E J. Nidovirus transcription: how to make sense... ?[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87:1403-1421.
 - [14] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses[J]. *Science*, 2005, 310: 676-679.
 - [15] Wang L F, Shi Z, Zhang S, et al. Review of bats and SARS[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12:1834-1840.
 - [16] Calisher C H, Childs J E, Field H E, et al. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(3):531-545.
 - [17] Beate M Crossley, Richard E Mock, Scott A Callison, et al. Identification and characterization of a novel alpaca respiratory coronavirus most closely related to the human coronavirus 229E[J]. *Viruses*, 2012, 4: 3390-3404.
 - [18] Huynh J, Li S, Yount B, et al. Evidence Supporting a Zoonotic Origin of Human Coronavirus Strain NL63 [J]. *J Virol*, 2012, 10:1128-1142.
 - [19] Andrea Balboni, Mara Battilani, SantinoProsperi. The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationship with SARS coronavirus[J]. *New Microbiologica*, 2012, 35:1-16.
 - [20] Julien R St-Jean, Marc Desforges, Fernando Almazan, et al. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone[J]. *J Virol*, 2006, 80:3670-3674.
 - [21] Yount B, Curtis K M, Fritz E A, et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:12995-13000.
 - [22] Eric F Donaldson, Boyd Yount, Amy C Sims, et al. Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63 [J]. *J Virol*, 2008, 82: 11948-11957.
 - [23] Rosa Casais, Volker Thiel, Stuart G Siddell, et al. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus [J]. *J Virol*, 2001, 75: 12359-12369.
 - [24] Coley S E, Lavi E, Sawicki S G, et al. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers *in vitro* and is fully pathogenic *in vivo* [J]. *J Virol*, 2005, 79:3097-3106.
 - [25] Yount B, Curtis K M, Baric R S. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model[J]. *J Virol*, 2001, 74:10600-10611.
 - [26] Geng H Y, Cui L J, Xie Z D, et al. Characterization and complete genome sequence of human coronavirus NL63 isolated in China[J]. *J Virol*, 2012, 86:9546-9547.

Advances in Recently Identified Coronaviruses

GENG He-yuan, TAN Wen-jie*

*(Biotech Center for Viral Disease Emergency, National Institute for Viral Disease
Control and Prevention, China CDC, Beijing 102206, China)*

Abstract: Coronaviruses are a large family of viruses which include viruses that cause the common cold and severe acute respiratory syndrome (SARS) in humans and other diseases in animals. There are considerable genetic diversities within coronaviruses due to their wide range hosts and their special gene replication and transcription mechanisms. During this process, gene recombinations often occur, resulting in novel subtype or coronavirus emerge constantly. Of note are SARS-like-CoVs and novel HCoV-EMC identified in 2012. This minireview summarized major advances of recently identified coronaviruses, focusing on the genome structures and interspecies jumping mechanism of coronavirus.

Key words: SARS-like-CoVs; HCoV-EMC; Genome structure; Interspecies jumping

* Corresponding author: TAN Wen-jie, E-mail: tanwj28@yahoo.com