

· 综 述 ·

眼表 β 属冠状病毒受体的研究进展尹小磊¹ 综述 张金萍² 审校¹中国人民解放军第 305 医院眼科, 北京 100017; ²中国人民解放军第 305 医院新冠病毒课题组, 北京 100017

通信作者: 张金萍, Email: yinxiaolei971221@163.com

【摘要】 造成我国自 2019 年 12 月份开始的全国性新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的病因是新型冠状病毒 (2019-nCoV) 感染。2019-nCoV 是目前已知所分 4 个属冠状病毒科的 β 属冠状病毒。对人类影响较大的 β 属冠状病毒, 除 2019-nCoV 外, 还有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)。2019-nCoV 的受体也是 SARS-CoV 的受体血管紧张素转换酶 2 (ACE2), MERS-CoV 的受体是二肽基肽酶 4 (DPP4, 或 CD26)。免疫组织化学检测发现, ACE2 在人类眼表的角膜和结膜上皮细胞、角膜内皮细胞均呈阳性表达, DPP4 在正常动物眼结膜上皮细胞及其下方结缔组织的成纤维细胞中活性较强, 在严重角膜损伤后整个角膜上皮和泪液中活性较强。两种受体均参与多个信号通路和多种病理生理过程, 它们在眼表的表达是冠状病毒眼部感染可能的途径, 为进一步研究冠状病毒眼部致病机制提供了线索。

【关键词】 冠状病毒; 受体; 血管紧张素转换酶 2; 二肽基肽酶 4; 眼表

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200223-00098

Advance in research of beta coronavirus receptors on ocular surface

Yin Xiaolei¹, Zhang Jinping²¹Department of Ophthalmology, 305 Hospital of PLA, Beijing 100017, China; ²Novel Coronavirus Research Group in 305 Hospital of PLA, Beijing 100017, China

Corresponding author: Zhang Jinping, Email: yinxiaolei971221@163.com

【Abstract】 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) caused an outbreak of corona virus disease 2019 (COVID-19) from December 2019 in China. 2019-nCoV which was identified as a kind of beta coronavirus belongs to one of four coronavirus genera. Except 2019-nCoV, two other beta coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are also quite harmful to human beings. 2019-nCoV uses the same cell entry receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), as SARS-CoV. And dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) or CD26 is the cell receptor for MERS-CoV. The expression of ACE2 was found to have obvious positive expression in human corneal and conjunctival epithelium, and corneal endothelium. DPP4 activity was presented in normal animal conjunctival epithelium and fibroblasts of the subjacent connective tissue. It was also presented in the whole corneal epithelium and tear fluid of animal with severe injured corneas. The two receptors, ACE2 and DPP4, are involved in many cellular signaling pathways and pathophysiological processes. Their expression in the cells of ocular surface may be an access route of corona virus in eye, which provides clues to elucidating the pathogenesis of corona virus in the eyeballs.

【Key words】 Coronavirus; Receptor; Angiotensin-converting enzyme 2; Dipeptidyl peptidase 4; Ocular surface

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200223-00098

2020 年 2 月 11 日, 国际病毒分类委员会正式将近期发现的新型冠状病毒 (2019 novel coronavirus, 2019-nCoV) 命名为 2 型严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), 同日世界卫生组织将新型冠状病毒肺炎命名为 2019 新型冠状病毒感染疾病 (corona virus disease-19, COVID-19)^[1]。2019-nCoV 造成了我国自 2019 年 12 月份开始的全国性 COVID-19 疫情^[2]。国家卫生健康委

员会于 2020 年 2 月 18 日发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第六版)》指出, 新型冠状病毒肺炎的主要传播途径是经呼吸道飞沫和密切接触传播, 在相对封闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶情况下存在经气溶胶传播的可能。眼表的黏膜经泪道与呼吸道黏膜物理相连, 角膜、结膜由外胚层和中胚层发育形成, 呼吸道黏膜也是由外胚层发育而来, COVID-19 有可能造成暴露的眼球感染或传播。本文对眼表冠

状病毒受体的研究进展进行综述。

1 冠状病毒的分类及特性

1937 年, Beaudet 和 Hudson 第一次从小鸡体内分离到了冠状病毒。随后几十年, 人们在对这些病毒进行形态学研究时通过电子显微镜发现, 这些病毒的包膜上有类似日冕棘突的形状, 结合且形态表现, 1975 年世界病毒命名委员会正式将其命名冠状病毒科。根据其基因组结构及系统发生学分析, 冠状病毒科可分为 4 个属, 分别是 α 属冠状病毒 (alpha coronavirus, α -CoV)、 β 属冠状病毒 (beta coronavirus, β -CoV)、 γ 属冠状病毒 (gamma coronavirus, γ -CoV)、 δ 属冠状病毒 (delta coronavirus, δ -CoV)。对人类造成影响的冠状病毒主要有 7 种: 人冠状病毒 229E (human coronavirus 229E, HCoV-229E)、人冠状病毒 HKU1 (human coronavirus HKU1, HCoV-HKU1)、人冠状病毒 NL63 (human coronavirus NL63, HCoV-NL63)、人冠状病毒 OC43 (human coronavirus OC43, HCoV-OC43)、严重急性呼吸道综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 以及 2019-nCoV^[3]。前 4 种冠状病毒, 仅在免疫低下者中引起一般性呼吸道感染, 或在婴儿及老年人中引起严重的呼吸道感染。SARS-CoV 和 MERS-CoV 致病性较强, 曾大规模暴发, 在感染者中病死率较高^[4], COVID-19 与 SARS 一样, 被纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病, 按甲类传染病管理。

冠状病毒有 4 种结构蛋白, 刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、膜蛋白、包膜蛋白和核衣壳蛋白。病毒成功入侵感染宿主细胞, 主要依赖于 S 蛋白。S 蛋白是三聚体糖蛋白, 为 I 类融合蛋白, 可被宿主的 furin 蛋白酶裂解为 S1 与 S2 两条多肽, S1 多肽与宿主受体结合, S2 多肽主要介导病毒包膜与细胞膜的融合过程^[5], 病毒不同 S 蛋白所含氨基酸不同。2019-nCoV 和 SARS-CoV 相比所含氨基酸明显不同, 例如, 尽管它们与血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 结合的受体结合模体 (receptor-binding motif, RBM) 氨基酸一致, 但在受体结合区 (receptor-binding domain, RBD) 的其他区域就有 6 个氨基酸不同。这些差异是否影响它们对宿主的趋向性和传染性, 尚有待于更多科研工作地开展来揭秘^[6]。

2 眼表 β 属冠状病毒受体

SARS-CoV、MERS-CoV 和 2019-nCoV, 是 3 种致病性比较强的 β 属冠状病毒。病毒学研究结果表明, SARS-CoV 的受体是 ACE2^[7], MERS-CoV 的受体为二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4, 或 CD26)^[8]。我国学者目前已证实 2019-nCoV 也可通过结合 ACE2 感染宿主细胞^[9], 但是否还存在其他受体尚不清楚。

2.1 ACE2 受体 ACE2 属于 M2 蛋白酶家族, 为 I 型膜结合糖蛋白, 是一种含锌离子的单羧基肽糖蛋白酶, 由 805 个氨基酸组成, 可分为 4 个部分, 由 17 个氨基酸组成的信号肽胞外段 N 端, 构成羧基肽酶活性中心的结构域, 疏水跨膜区和一个由

42 个氨基酸组成的胞内段 C 端。ACE2 仅有一个酶活性位点, 即 N 端结构域的 7 个糖基化位点, 对维持酶的活性和结构稳定至关重要^[10]。

2019-nCoV 和 SARS-CoV 两种冠状病毒与 ACE2 受体的结合, 既有相似点又有不同点。它们都通过 S 蛋白的 S1 多肽上受体结合区 (receptor-binding domain, RBD) 与 ACE2 结合。最新的结构研究表明, 2019-nCoV 有扭曲的 4 个反向平行的 β 片层 ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 和 $\beta 6$) 和短连接螺旋与环形成核心区。在 $\beta 3$ 和 $\beta 6$ 之间, 有一个扩展插入, 包含 $\beta 4$ 和 $\beta 5$ 短链、 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 螺旋、以及环^[11]。这个扩展插入就是受体结合模体 (receptor-binding motif, RBM), 其包含了大多数与 ACE2 结合的 2019-nCoV 氨基酸残基结合点。ACE2 的 N 末端肽酶结构域有两个凸起, 在它们之间形成肽底物结合部位。2019-nCoV 的 RBD 中扩展的 RBM 与 ACE2 小凸起底侧结合, RBM 的外表面有一个凹陷以容纳 ACE2 的 N 末端螺旋。2019-nCoV 的 RBD 和 SARS-CoV RBD 总体结构相似, 均方根偏差最小值为 1.2 Å, 两者的 RBM 虽有较多的序列差异, 总体结构仍旧高度相似, 均方根偏差最小值为 1.3 Å, 两者的不同只是在末端有一个明显的构象变化。2019-nCoV 的 RBD 与 ACE2 的结合模式和 SARS-CoV RBD 与 ACE2 的结合模式非常相似。RBM 外表面将 ACE2 的 N 末端螺旋卷起, 使得 RBD 和 ACE2 之间的接触面非常大, 冠状病毒与 ACE2 受体的亲和力也就很强。以 4 Å 的距离为界, 2019-nCoV RBD 有 18 个氨基酸残基和 ACE2 的 20 个残基相结合, 而 SARS-CoV RBD 有 16 个残基和 ACE2 的 20 个残基相结合。ACE2 与两种不同 RBD 相互作用的 20 个残基中有 17 个是共享的, 且多数位于 N 末端螺旋。两种 RBD 与 ACE2 相互作用的 14 个共享氨基酸位中, 8 个有相同的残基, 有 5 个位置的残基尽管侧链不同但生化特性相似, 两种 RBD 只是表面静电势有所不同。两种病毒具有的 RBD 的相近结构能够解释它们与 ACE2 受体的亲和力范围相同, 约 10~60 nM。但也有报道称 2019-nCoV S 蛋白与 ACE2 的亲和力是 SARS-CoV RBD-SD1 与 ACE2 亲和力的 10~20 倍, 这可能与在研究中使用不同的蛋白有关^[12]。

迄今为止, ACE2 眼表分布情况尚未检索到有国外学者的报道。国内学者柳林等^[13]的研究结果表明, ACE2 在人类眼表的角膜和结膜上皮细胞、角膜内皮细胞呈阳性表达, 角膜的成纤维细胞有弱阳性表达。角膜和结膜上皮细胞、结膜成纤维细胞的细胞质中也有明显的阳性表达, 但在细胞膜的表达弱于细胞质。关于 ACE2 在眼表的分布和表达相关研究文献极少, 当前的这些研究结果是否也适用于其他物种如兔、鼠等, 以及不同的种属间是否会存在差异目前均不明了, 有待于进一步深入研究。

ACE2 还大量表达于人类肺和小肠的上皮细胞, 在口腔、鼻黏膜、鼻黏部、胃、小肠、结肠、肝脏、肾脏、脾脏、脑、骨髓、皮肤、淋巴结等也有阳性表达^[14]。ACE2 通过作用 ACE1 和 ACE2 这两个底物参与肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 生理活动^[15], 而 RAS 对水盐代谢、维持血压稳定以及心血管、泌尿、生殖等系统的发育和功能调节, 甚至是炎症反应、损伤修复、愈合及造血等病理生理过程都发挥重要作用^[16]。

2.2 DPP4 受体 DPP4 属于丝氨酸蛋白酶家族,是一种多功能 II 型跨膜糖蛋白,常以同源二聚体的形式存在,含有 766 个氨基酸,包含胞质尾、跨膜部分和胞外部分 3 个区域。胞外部分由两部分组成,即三联体 Ser630-Asp708-His740 组成的催化区域和 N 端八叶型 β -螺旋区域及 C 端 α/β -水解酶区域,催化位点位于两个胞外区域之间的空腔内,这部分是化合物的活性结合位点^[17]。

研究发现,MERS-CoV RBD 包含一个核心结构域和一个受体结合结构域。核心结构域是 5 个反向平行的 β 片层($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 和 $\beta 9$)与在连接环中的 2 个短 α 螺旋,3 个二硫键维持核心结构域的折叠结构。受体结合结构域是 4 个反向平行的 β 片层($\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 和 $\beta 8$),位于核心结构域的 $\beta 4$ 和 $\beta 9$ 之间。 $\beta 6$ 和 $\beta 7$ 有一个连接环与 β 片层垂直交叉,该环通过二硫键与 $\beta 5$ 相连,为 β 片层与 DPP4 结合提供了结构基础。DPP4 的 N 端 β -螺旋区域有八叶,MERS-CoV RBD 与 4 叶和 5 叶相结合。在 3.6 Å 的距离内,MERS-CoV 的 14 个残基和 DPP4 的 15 个残基相结合^[18]。

关于 DPP4 在眼表组织中的分布目前主要是一些哺乳动物的研究结果。Cejková 等^[19]发现在猪和牛的角膜的上皮细胞及内皮细胞中均未检测 DPP4 活性,但在一些角膜上皮细胞下的组织中可检测到微弱的 DPP4 活性,而结膜上皮细胞及其下方结缔组织的成纤维细胞中 DPP4 活性较强。Stodůlka 等^[20]发现正常兔角膜检测不到 DPP4 的活性,但 LASIK 术后可在角膜中检测到。Cejková 等^[21]也发现正常兔角膜中检测不到 DPP4 的活性,只在泪液中有少许活性,而严重角膜损伤后整个角膜上皮和泪液中 DPP4 的活性较强。

除了眼表组织外,DPP4 在哺乳动物肾、肝、小肠、胰腺上皮细胞和血管内皮细胞、淋巴细胞以及细菌和植物中等均有表达^[17,22],通过其水解作用及参与腺苷酸活化蛋白激酶、Toll 样受体 4、丝裂原活化蛋白激酶、蛋白酪氨酸激酶信号转导和转录活化子、蛋白激酶 B、蛋白激酶 C 等多种信号通路而影响细胞的各种病理生理过程,与营养代谢性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病、肿瘤等疾病的发生和发展密切相关^[22-24]。

呼吸道病毒能够侵犯眼部,眼表两种 β 属冠状病毒受体的分布使得眼部作为 2019-nCoV 的传播途径成为可能,且两种受体蛋白都在淋巴系统有表达,结膜淋巴管也可能是感染的途径。由于两种受体蛋白的功能及作用的多样性,2019-nCoV 通过眼部发病的作用机制会比较复杂,目前要阐明其中的机制对眼科相关专业科研人员仍然是一个巨大的挑战。

利益冲突 本文作者不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Gorbalenya AE. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-The species and its viruses, a statement of the Coronavirus Study Group [J]. *BioRxiv*, 2020. 02. 07. DOI: 10. 1101/2020. 02. 07. 937862.
- [2] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020 - 01 - 24 [2020-02-22]. DOI: 10. 1016/S0140-6736 (20) 30183-30185.
- [3] 刘昌孝, 王玉丽, 闫凤英. 认识新型冠状病毒肺炎, 关注疫情防控药物研发 [J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(2): 1-10. DOI: 10. 13461/j. cnki. cja. 006858.
- [4] de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(8): 523-534. DOI: 10. 1038/nrmicro. 2016. 81
- [5] 闻玉梅. 冠状病毒的致病性及防控 [J]. *微生物与感染*, 2020, 15(1): 5-12.
- [6] Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China [J]. *Cell Host Microbe*. 2020. 02. 07. DOI: 10. 1016/j. chom. 2020. 02. 001.
- [7] 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. DOI: 10. 1038/nature02145.
- [8] Raj VS, Smits SL, Provacia LB, et al. Adenosine deaminase acts as a natural antagonist for dipeptidyl peptidase 4-mediated entry of the Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Virol*, 2014, 88(3): 1834-1838. DOI: 10. 1128/JVI. 02935-13.
- [9] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin [J]. *BioRxiv*, 2020. 01. 22. DOI: 10. 1101/2020. 01. 22. 914952.
- [10] 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. DOI: 10. 1161/01. res. 87. 5. e1.
- [11] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Crystal structure of the 2019-nCoV spike receptor-binding domain bound with the ACE2 receptor [J]. *BioRxiv* 2020. 02. 19. DOI: 10. 1101/2020. 02. 19. 956235.
- [12] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation [J]. *BioRxiv* 2020. 02. 11. DOI: 10. 1101/2020. 02. 11. 944462.
- [13] 柳林, 孙琰, 潘欣, 等. SARS-CoV S 蛋白功能性受体 ACE2 在人角膜、结膜中的表达 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2004, 22(6): 561-564.
- [14] Dan H, Gilbert M, Borman R, Clark KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme [J]. *FEBS Letters*, 2002, 532(1-2): 0-110.
- [15] Lelis DF, Freitas DF, Machado AS, Crespo TS, Santos SHS. Angiotensin-(1-7), Adipokines and Inflammation [J]. *Metabolism*, 2019, 95: 36-45. DOI: 10. 1016/j. metabol. 2019. 03. 006.
- [16] Rocha NP, Simoes ESAC, Prestes TRR, et al. RAS in the Central Nervous System: Potential Role in Neuropsychiatric Disorders [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(28): 3333-3352. DOI: 10. 2174/0929867325666180226102358
- [17] Hiramatsu H, Kyono K, Higashiyama Y, et al. The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed beta-propeller fold [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(4): 849-854. DOI: 10. 1016/S0006-291X(03)00258-4.
- [18] Wang N, Shi X, Jiang L, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4 [J]. *Cell Res*, 2013, 23(8): 986-993. DOI: 10. 1038/cr. 2013. 92.
- [19] Cejkova J, Loida Z. Histochemistry of some proteases in the normal rabbit, pig and ox corneas [J]. *Histochemistry*, 1986, 84(1): 67-71. DOI: 10. 1007/bf00493423.
- [20] Stodůlka P, Vaculik J, Lichnovsky V. Histochemical analysis of enzymes in the rabbit cornea after LASIK surgery [J]. *Cesk Slov Oftalmol*, 2000, 56(1): 53-55
- [21] Cejkova J, Zvarova Z, Cejka C. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) activity in the tear fluid as an indicator of the severity of corneal injury: a histochemical and biochemical study [J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(3): 669-676. DOI: 10. 14670/HH-19. 669.
- [22] Klemann C, Wagner L, Stephan M, von Horsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system [J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 185(1): 1-21. DOI: 10. 1111/cei. 12781.
- [23] Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(23): 2943-2951. DOI: 10. 2174/092986709788803114.
- [24] Scharpe S, De Meester I. Peptide truncation by dipeptidyl peptidase IV: a new pathway for drug discovery [J]? *Verh K Acad Geneesk Belg*, 2001, 63(1): 5-32; discussion 32-33.

(收稿日期: 2020-02-23 修回日期: 2020-02-26)

(本文编辑: 尹卫靖)