· 综 述 ·

人冠状病毒 HCoV-HKU1 研究进展

刘培林[1,2], 史蕾[2], 顾大勇[2], 胡龙飞[2,3]

摘 要: 人冠状病毒 HKU1 株(HCoV-HKU1)属于 β-冠状病毒,是人冠状病毒中相对神秘的一员,近年来在 HCoV-HKU1 的体外培养和细胞受体研究方面取得了较大进展。相关流行病学报道表明,HCoV-HKU1 的发病率低,各地流行季节不一,我国主要是冬春季节高发,并在内蒙古地区检出首例 HCoV-HKU1 患者。本文就 HCoV-HKU1 的流行病学、感染机制、细胞培养和检测技术方面作一简要综述。

关键词: HCoV-HKU1; 冠状病毒; 呼吸道病毒; 进展

中图分类号: R 512.93 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2017)08-1264-03 DOI: 10.11847/zgggws2017-33-08-27

Progress in researches on human coronavirus HKU1: a review

LIU Pei-lin*, SHI Lei, GU Da-yong, et al (* *School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province* 510030, China)

Abstract: Human coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1) belongs to β-coronavirus, a somewhat mysterious member of human coronavirus family and a great progress has been made in the research on HKU1 *in vitro* cell culture and cell receptor in recent years. Related epidemiological reports indicate that the incidence of HKU1 infection is low. There is region-related seasonal variation for the prevalence of HKU1 infection. Major prevalence seasons for HKU1 infection are winter and spring seasons in China and the first HKU1 infection case was detected in Inner Mongolia. The paper summarizes the researches on epidemiology, infection mechanism, cell culture and detection technology of HKU1 briefly.

Key words: human coronavirus HKU1; coronavirus; respiratory virus

2003 年人类冠状病毒(human coronavirus, HCoV)引起的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)世界大流行之后,人们发现 HCoV 除了引发轻微上呼吸道感染等自限性疾病外,还能引发严重的呼吸窘迫等症状[1-2], HCoV-HKU1 株首次于 2005 年从一名香港肺炎患者体内分离所得,由香港大学发现并命名[3],之后的研究发现,HCoV-HKU1 与儿童和成人多种疾病有关,在一些有基础疾患的病人身上甚至可能导致死亡[2,4],急需对 HCoV-HKU1 进一步深入研究;国内关于 HCoV-HKU1 这方面的综述较少,且重点主要论述病毒的基因组结构,可能病毒发现早期,由于缺乏合适的病毒分离培养技术,加上检出率较低(0.0% ~4.4%)[5],使得 HCoV-HKU1 其他方面研究进展较慢,近年来对 HCoV-HKU1 的研究取得较大进展,本文现就相关方面做一简要综述。

1 HCoV-HKU1 病毒生物学特性

冠状病毒属于套式病毒目,冠状病毒科,冠状病毒属,只感染哺乳动物和禽类等脊柱动物;冠状病毒的基因组为单股正链、无节段的 RNA,大小为 27 ~ 32 kb,是已知所有 RNA 病毒中基因组最大的,目前冠状病毒可分为 4 类:α-冠状病毒,β-冠状病毒,γ-冠状病毒和 δ-冠状病毒,其中 β-冠状病毒又有 A、B、C、D 4 系,到目前为止,已发现能感染人的冠状病毒有 6 种,分别是属于 α-冠状病毒的人冠状病毒 229E(human coronavirus 229E, HCoV-229E)和人冠状病毒 NL63(human coronavirus NL63, HCoV-NL63),属于 β-冠状病毒的人冠状病毒 OC43(human coronavirus OC43, HCoV-OC43)、HCoV-HKU1、SARS-CoV 和中东呼吸综合症病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)[6]。HCoV-HKU1 属于 β-冠状病毒 A 系,基因组长为 29 926 bp, GC 含量为 32%,是所有已知冠状病毒中 GC 含量最低的[3];同 β 群其它冠状病毒具有相似基因组结构,RNA 链前 2/3 编码开放阅读框(open reading frame, ORF) ORF 1a/1b,后 1/3 编码 HCoV-HKU1 的 4 种结构蛋白(核衣壳蛋白 N、刺突蛋白 S、跨膜蛋白 M、包膜蛋白 E)、β-冠状病毒特有的血凝素酯酶(haemaglutinin esterase, HE)蛋白和辅助蛋白(编码区为 ORF 4 和 ORF 8)。冠状病毒棘突蛋白(S)在病毒识别、侵入受体细胞的过程中起着重要作用;S 蛋白被宿主细胞弗林(furin)样蛋白酶切割成 S1 和 S2 两部分,S1 区变异大,各种属间不同,主要参与受体的识别和结合,S2 区则高度保守,介导病毒与受体细胞膜的融合。由于冠状病毒是单链 RNA 病毒,并且 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerse, RdRp)不

作者单位: 1. 中山大学公共卫生学院,广东 广州 510030; 2. 深圳国际旅行卫生保健中心卫生检疫实验室; 3. 深圳市检验检疫科学研究院
作者简介: 刘培林(1993 -),男,江西赣州人,硕士,研究方向:人类冠状病毒分子流行病。

数字出版日期: 2016 - 9 - 6 14:36
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160906.1436.020.html

具有校正功能,所以 HCoV 具有较高的基因突变率,HCoV-HKU1 拥有 A,B,C 3 种基因型,其中 C 型是由 A,B 型基因重组所成的新基因型别,基因重组是 HCoV-HKU1 流行的重要原因。美国科罗拉多州发现 A 基因型 HCoV-HKU1 中存在一个亚型,其 S 蛋白中 3 个氨基酸发生替换(W197F, F613Y, S752F),在 nsp3 子域的 N-末端表现出特有的氨基酸串联方式[7],目前该亚基因型只在美国发现。

2　HCoV-HKU1 体外培养技术

HCoV-HKU1 发现早期,限于没有合适的病毒体外细胞培养体系,对 HCoV-HKU1 的研究一直处于停滞状态,2010 年波兰学者 Pyrc 等[8]根据自然状态下 HCoV-HKU1 的人易感宿主细胞,找到了一种可体外培养 HCoV-HKU1 的体系——人类气道纤毛上皮细胞(human ciliated airway epithelial cell, HAE),这是至今为止发现的唯一可用于体外培养 HCoV-HKU1 的细胞株。之后,对人原代Ⅱ型肺泡上皮细胞(primary human type Ⅱ alveolar epithelial cells)研究发现,气-液交界处的Ⅱ型肺泡上皮细胞对 HCoV-HKU1 的易感性大大提高(Ⅰ型肺泡上皮细胞和巨噬细胞则没有),提示其可能是潜在的下呼吸道病毒体外培养细胞[9]。国内对 HCoV-HKU1 的体外培养技术研究发展较慢,2015 年,中国疾病预防控制中心病毒预防控制所朱娜研究组[10]首次用 HAE 培养法,从呼吸道样本中分离出 HCoV-HKU1 毒株,得到有持续复制活力的子代病毒。病毒体外培养技术的发展,为 HCoV-HKU1 流行病学、致病机制等的研究提供了基础。

3　HCoV-HKU1 流行病学与相关疾病

3.1　*HCoV-HKU1 全球流行情况*　HCoV-HKU1 在世界范围内普遍存在,4 个季节、所有年龄人群皆有感染病例出现,主要易感人群为儿童,各地检出率和流行季节报道不一。日本 2010—2013 年 4 342 份呼吸道样本显示,HCoV-HKU1 阳性率为 1.9%,历年检出率是 0.1% ~3.4%,流行季节在晚冬和早春(1 ~4 月)[11];美国 15 287 份呼吸道样本,阳性率为 0.5%,基因型 A,B 都有检出[7];韩国流行季节为冬季,检出率为 2.5%,本次监测结果未发现重组基因型 C 型[12];东南亚地区马来西亚 2012—2013 年 2 060 份成人急性呼吸道样本,HCoV-HKU1 检出率为 1.1%,其中 A 型 27.3%,B 型 72.7%,未发现重组 C 型,流行高峰为 3 月和 9 月[13],同其他东南亚地区一致;肯尼亚 2009—2012 年 417 份样本,HCoV-HKU1 检出率为 2.1%[14]。国内有关报道主要有:香港 2008—2014 年儿童回顾性调查表明,HCoV-HKU1 检出率 0.13%,冬季高发[15];北京 2008—2010 年 382 份儿童(<8 岁)急性呼吸道患者呼吸道样本,HCoV-HKU1 检出率 14.9%[16],检出率偏高的可能原因是运用了较高灵敏度的逆转录聚合酶链反应法(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR),提高了检出率;内蒙古地区从 10 例重症肺炎患者体内检出 1 例 HCoV-HKU1 阳性患者[17],为首次在内蒙古地区检测到 HCoV-HKU1。全球有报道的 HCoV-HKU1 检出率多在 0.0% ~4.4%,我国的流行季节主要是冬春季,病毒检出率的波动受观察季节、观察期限和检测方法的影响较大。

3.2　*HCoV-HKU1 相关疾病*　HCoV-HKU1 主要引发人轻微上呼吸道感染,主要症状有发烧、咳嗽、流涕和喘息;在老年人和有基础疾患患者中可引发重症肺炎甚至死亡;以往的报道称 HCoV-HKU1 还与儿童惊厥,胃肠道疾病相关[18-19],最近有研究表明,其可能是引发幼儿急性哮喘发作的潜在病因,能诱发幼儿急性哮喘患者哮喘的发作[20];一名 38 岁的系统红斑狼疮并接受胚胎干细胞移植患者体内不断分离出流感病毒,接受流感治疗无效死亡后,尸检结果显示肺内分离出 HCoV-HKU1 病毒,并发现其可能是致死病因[4]。因此,在一些复杂的病患中,对 HCoV-HKU1 与疾病的关联的研究还有待进一步的探索,同时也提示需要一种有效的检测方法,可以在病情复杂的患者体内检测病毒。

4　HCoV-HKU1 致病机制

同其他 HCoV 一样,HCoV-HKU1 的棘突蛋白(S)在病毒识别、侵入受体细胞的过程中起着重要作用,有报道称,S 蛋白在结合细胞受体前会发生构像改变,生成一种融合前体,为病毒结合受体、与细胞膜融合提供支撑作用[21];鼠类 β-冠状病毒利用 S 蛋白 N-端结构连接受体,同为 β-冠状病毒,HCoV-HKU1 却和 MERS-CoV、SARS-CoV 更为相近,受体结合区域在 S 蛋白的 C-末端区(C-terminal domain, CTD)[22],表明 HCoV-HKU1 作为一种新型冠状病毒,具有较多新的特质,有待进一步发现。HCoV-HKU1 是至今唯一细胞受体不明的人冠状病毒,中国微生物研究所的研究表明,9-O-乙酰唾液酸是 HCoV-HKU1 的受体,其 HE 蛋白与 HCoV-OC43 的 HE 蛋白功能类似,具有受体水解酶功能[23]。HCoV-HKU1 侵入机体后,相邻细胞间的传染可能是病毒体内扩散的重要原因,也是病毒躲避免疫攻击的原因之一[9]。对于 HCoV-HKU1 是否同 MERS-CoV, SARS-CoV 一样存在动物宿主,并在人畜间传播,学者们众说纷纭,2005—2007 年也是首次分离出 HCoV-HKU1 的前后几年间,对香港野生动物的监测中,没有发现 HCoV-HKU1 病毒[24],但并不表明动物中不存在 HCoV-HKU1 宿主,找到 HCoV-HKU1 的动物疫源,能帮助我们更好地理解

病毒传播、进化的历程,进而实现对病毒的防控。

5 HCoV-HKU1 病原学检测技术

目前对 HCoV-HKU1 的检测技术主要还是应用 RT-PCR 法,该法具有一定的局限性,由于检测结果受样本采集时间、部位及采集方法等多种因素的影响,检测结果阴性不能说明患者未感染病毒。建立血清学检测方法[25],构建 S,N 蛋白真核表达质粒转染细胞,再用间接荧光法建立抗体的检测方法,可获得 74% 的阳性检出率,血清学方法结合 RT-PCR 法使用可降低假阴性率,并且有利于感染流行规律的研究;同时,实践中发现在并发症复杂的患者中,需要一种灵敏度和特异度较高的方法,避免诊断失误错过治疗时机[22]。

6 小结

发现 HCoV-HKU1 已经有近 10 年的时间,但可以说,HCoV-HKU1 仍是 HCoV 家族中最神秘的一员,由于其检出率较低,早期缺乏相应的体外培养体系,对其研究仍是不够的,其是否存在人畜共患现象?是否有变异产生新型病毒引发流行的风险?这些问题都有待解决;有研究表明其与胃肠道疾病相关[18],提示应扩大检测样本范围,探讨其相关疾病谱。同时,在对病毒进行深入研究的时候,也可以进行回顾性调查,巴西在 1995 年冻存的儿童鼻咽拭子样本中找到 HCoV-HKU1,使得 HCoV-HKU1 的记录提前到 1995 年,并且进化树分析表明,病毒早期存在其它分支[26]。基因重组和基因突变是病毒进化的 2 种主要形式,人们从蝙蝠中找到了与 SARS-CoV 高度同源的冠状病毒,从而揭露了 SARS-CoV 跨种属界限传播的进化现象,这种现象同样可能发生在 HCoV-HKU1 身上;以往研究发现 HCoV 可能还能通过接触被感染者污染物品传播,并且 HCoV 具有一定的环境适应能力,医院等消杀场所存在选择抗性病毒的风险,不得不引起重视[27]。对于 HCoV-HKU1,至今仍没有这方面可用的疫苗,完善新发传染病监测体系,是应对此类传染病的重要一节[28]。

参考文献

[1] Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, et al. The severe acute respiratory syndrome[J]. N Engl J Med, 2003, 349(25): 2431 – 2441.

[2] 钱艺,谢正德. 四种人新型冠状病毒的研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2014, 32(9): 573 – 576.

[3] Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia[J]. J Virol, 2005, 79(2): 884 – 895.

[4] Uhlenhaut C, Cohen JI, Pavletic S, et al. Use of a novel virus detection assay to identify coronavirus HKU1 in the lungs of a hematopoietic stem cell transplant recipient with fatal pneumonia[J]. Transpl Infect Dis, 2012, 14(1): 79 – 85.

[5] Woo PC, Lau SK, Yip CC, et al. More and more coronaviruses: human coronavirus HKU1[J]. Viruses, 2009, 1(1): 57 – 71.

[6] Corman VM, 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) pii: 20285.

[7] Dominguez SR, Shrivastava S, Berglund A, et al. Isolation, propagation, genome analysis and epidemiology of HKU1 betacoronaviruses[J]. J Gen Virol, 2014, 95(4): 836 – 848.

[8] Pyrc K, Sims AC, Dijkman R, et al. Culturing the unculturable: human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures[J]. J Virol, 2010, 84(21): 11255 – 11263.

[9] Dominguez SR, Travanty EA, Qian Z, et al. Human coronavirus HKU1 infection of primary human type II alveolar epithelial cells: cytopathic effects and innate immune response[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e70129.

[10] 谭文杰,朱娜,牛培华,等. 人原代呼吸道上皮细胞体系分离人冠状病毒 HKU1 的方法及其复制特点[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(1): 80 – 82.

[11] Matoba Y, Abiko C, Ikeda T, et al. Detection of the human coronavirus 229E, HKU1, NL63, and OC43 between 2010 and 2013 in Yamagata, Japan[J]. Jpn J Infect Dis, 2015, 68(2): 138 – 141.

[12] Lee WJ, Chung YS, Yoon HS, et al. Prevalence and molecular epidemiology of human coronavirus HKU1 in patients with acute respiratory illness[J]. J Med Virol, 2013, 85(2): 309 – 314.

[13] Al-Khannaq MN, Ng KT, Oong XY, et al. Molecular epidemiology and evolutionary histories of human coronavirus OC43 and HKU1 among patients with upper respiratory tract infections in Kuala Lumpur, Malaysia[J]. Virol J, 2016, 13(1): 33.

[14] Sipulwa LA, Ongus JR, Coldren RL, et al. Molecular characterization of human coronaviruses and their circulation dynamics in Kenya, 2009 – 2012[J]. Virol J, 2016, 13(1): 18.

[15] Yip CC, Lam CS, Luk HK, et al. A six-year descriptive epidemiological study of human coronavirus infections in hospitalized patients in Hong Kong[J]. Virol Sin, 2016, 31(1): 41 – 48.

[16] Cui LJ, Zhang C, Zhang T, et al. Human coronaviruses HCoV-NL63 and HCoV-HKU1 in hospitalized children with acute respiratory infections in Beijing, China[J]. Adv Virol, 2011, 2011: 129 – 134.

[17] 雷霞,海岩,郭卫东,等. 人冠状病毒 HKU1 重症肺炎病原检测及鉴定[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(10): 1344 – 1346.

[18] Vabret A, Dina J, Gouarin S, et al. Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(5): 634 – 639.

[19] Woo PC, Yuen KY, Lau SK. Epidemiology of coronavirus-associated respiratory tract infections and the role of rapid diagnostic tests: a prospective study[J]. Hong Kong Med J, 2012, 18(Suppl 2): 22 – 24.

[20] Amini R, Jahanshiri F, Amini Y, et al. Detection of human coronavirus strain HKU1 in a 2 years old girl with asthma exacerbation caused by acute pharyngitis[J]. Virol J, 2012, 9: 142.

[21] Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein[J]. Nature, 2016, 531(7592): 118 – 121.

[22] Qian Z, Ou X, Goes LG, et al. Identification of the receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human betacoronavirus HKU1[J]. J Virol, 2015, 89(17): 8816 – 8827.

[23] Huang X, Dong W, Milewska A, et al. Human coronavirus HKU1 spike protein uses O-acetylated sialic acid as an attachment receptor determinant and employs hemagglutinin-esterase protein as a receptor-destroying enzyme[J]. J Virol, 2015, 89(14): 7202-7213.

[24] Yuen KY, Lau SK, Woo PC. Wild animal surveillance for coronavirus HKU1 and potential variants of other coronaviruses[J]. Hong Kong Med J, 2012, 18(Suppl 2): 25 – 26.

[25] 张陵林,王慧娟,周为民,等. 人冠状病毒 HKU1 血清学检测方法的建立及其初步应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(5): 376 – 379.

[26] Goes LG, Durigon EL, Campos AA, et al. Coronavirus HKU1 in children, Brazil, 1995[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(6): 1147 – 1148.

[27] Geller C, Varbanov M, Duval RE. Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies[J]. Viruses, 2012, 4(11): 3044 – 3068.

[28] Al-Tawfiq JA, Zumla A, Gautret P, et al. Surveillance for emerging respiratory viruses[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(10): 992 – 1000.

收稿日期: 2016-05-18 (吴少慧编校)