



冠状病毒辅助蛋白功能研究进展

赵秀美¹, 赵海娜⁴, 华 姝⁴, 程 旭², 陈 祥³, 姜 逸^{2*}

(1. 江苏农林职业技术学院, 镇江 212400; 2. 江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125; 3. 江苏省人兽共患病学重点实验室(扬州大学), 扬州 225009; 4. 江苏省苏北人民医院, 扬州 225001)

摘 要: 冠状病毒RNA基因组由多个开放阅读框组成,除了表达结构蛋白和非结构蛋白外,还可以表达辅助蛋白。冠状病毒辅助蛋白具有种属特异性,不同冠状病毒编码数量不等的辅助蛋白。冠状病毒辅助蛋白不是病毒复制所必需的,但是部分辅助蛋白参与宿主免疫反应,在病毒发病机制和病毒毒力中起重要作用。冠状病毒辅助蛋白研究为开发治疗药物提供新的潜在靶点,为疾病预防和治疗提供理论指导。本文对几种具有代表性冠状病毒的辅助蛋白的功能进行综述,重点介绍辅助蛋白与病毒-宿主相互作用的关系,包括辅助蛋白在促进宿主细胞凋亡、宿主天然免疫调节,以及在宿主体内致病性的作用,有助于了解冠状病毒的感染和发病机制,为研制新型疫苗和抗病毒药物提供参考。

关键词: 冠状病毒;辅助蛋白;细胞凋亡;天然免疫;致病性;疫苗

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0096-12

Research Progress on the Functions of Coronavirus Accessory Proteins

ZHAO Xiumei¹, ZHAO Haina⁴, HUA Shu⁴, CHENG Xu², CHEN Xiang³, JIANG Yi^{2*}

(1. Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China; 2. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China; 3. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 4. Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, China)

Abstract: The RNA genome of coronavirus contains multiple open reading frames, coding for structural proteins, non-structural proteins, as well as accessory proteins. The accessory proteins of coronavirus are species specific, and the amounts of accessory proteins differ between the species. Coronavirus accessory proteins are not necessary for viral replication, but some of them are involved in the host immune response, viral pathogenesis and virus virulence. Research on coronavirus accessory proteins will provide new potential targets for the development of therapeutic drugs and theoretical guidance for disease prevention and treatment. In this paper, the functions of several representative accessory proteins of coronaviruses are reviewed. It focuses on the relationship between accessory proteins and virus-host interactions, including the role of accessory proteins in promoting host cell apoptosis, host innate immune regulation, and pathogenicity in the host. This will help to investigate the infection and pathogenesis of coronavirus, and provide reference for developing new vaccines and antiviral drugs.

收稿日期: 2025-04-09

基金项目: 江苏农林职业技术学院科技项目(2021kj25); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20241979); 江苏省人兽共患病学重点实验室资助项目(R2306)

作者简介: 赵秀美, 讲师, 主要从事禽病病原学研究, E-mail: zhao_xiumei@126.com

* 通信作者: 姜 逸, 主要从事家禽疾病诊断与防控技术研究, E-mail: yijiang620@126.com

Keywords: coronavirus; accessory protein; cell apoptosis; innate immunity; pathogenicity; vaccine

*** Corresponding author:** JIANG Yi, E-mail: yijiang620@126.com

冠状病毒(coronavirus, CoV)在分类上属于套式病毒目/冠状病毒科/冠状病毒属。根据基因组和抗原交叉反应性,冠状病毒主要分为 α 、 β 、 γ 、 δ 4个亚属。其中, α 冠状病毒主要感染猪和猫,包括猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)等。PEDV主要引起猪的肠道疾病,仔猪感染的症状较为严重,一般表现为呕吐、水样腹泻、脱水、厌食和体重减轻等症状。TGEV主要引起仔猪的病毒性肠炎和严重腹泻,新生仔猪感染死亡率高。TGEV与PEDV在血清学上没有相关性,但它们引起的肠道感染在临床上很难区分。流行病学调查显示,TGEV常与PEDV混合感染,给养猪场造成重大经济损失。猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)主要引起猫科动物的腹膜炎,导致大量腹水聚积等,死亡率高。 β 冠状病毒包括SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2等,该亚属病毒主要感染人类,引发严重呼吸道疾病与死亡。呼吸道感染包括上呼吸道感染和下呼吸道感染,上呼吸道感染与普通感冒类似,下呼吸道感染包括支气管炎、肺炎,甚至严重急性呼吸综合征。SARS-CoV-2作为一种新出现的高致病性呼吸道疾病病原体,2019—2020年,在全球范围内造成了100多万例感染病例,死亡率很高,对公共卫生和世界经济产生了破坏性影响^[1]。尽管之前针对SARS-CoV和MERS-CoV的研究较多,但当SARS-CoV-2暴发时,缺乏有效的药物或疫苗来治疗或预防该病^[2]。 γ 冠状病毒主要感染禽类,鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)是一种研究较多的禽冠状病毒,主要引起鸡的呼吸道症状、肾脏损伤、生殖系统症状和肠炎症状,导致产蛋鸡的产蛋量下降,蛋壳质量变差。肾型毒株致病性强,导致尿酸盐沉积,如果继发细菌感染导致死亡率升高^[3]。 δ 冠状病毒包括夜莺冠状病毒(bulbul coronavirus, BuCoV) HKU11和猪 δ 冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)等,主要感染禽类和哺乳动物^[4]。 δ 冠状病毒能跨物种感染鼠、牛、鸡等动物,甚至能感染人。PDCoV是基因组最小的

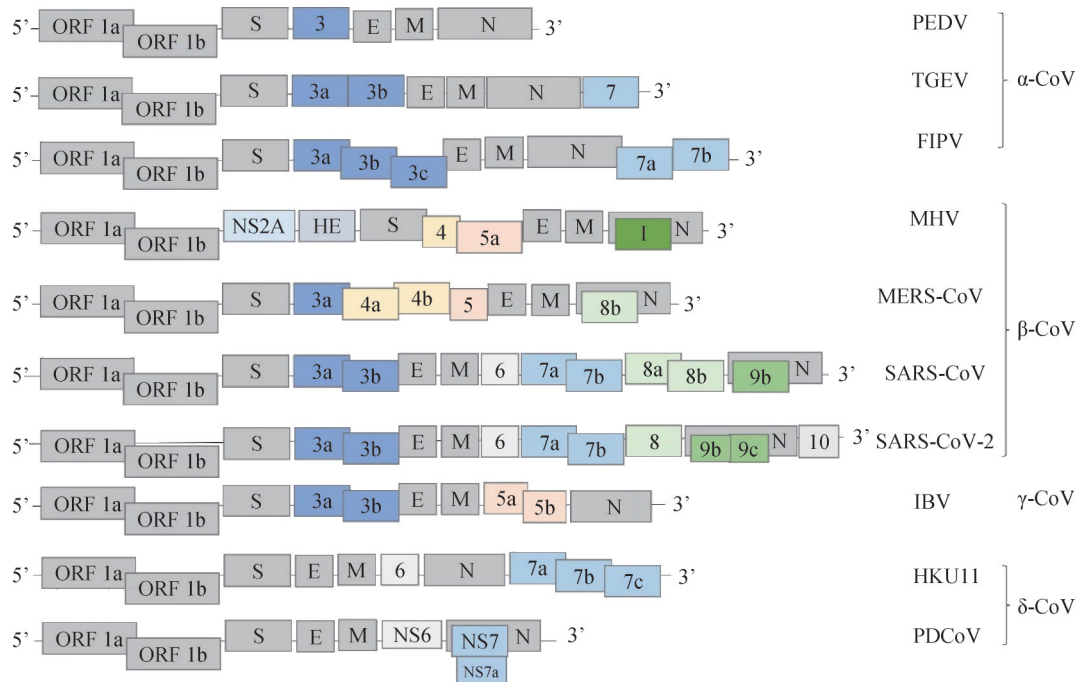
冠状病毒,可以在体外连续传代。PDCoV甚至能够跨物种传播感染人类,导致人与人之间的传播,威胁人类和动物的健康^[5]。因此,冠状病毒的流行严重威胁人类和动物的生命健康以及农业经济的发展,亟需研究新型抗病毒药物、疫苗以及新型治疗方法来抵抗冠状病毒感染。

除了表达结构蛋白和非结构蛋白外,冠状病毒在疾病感染过程中还能表达辅助蛋白。辅助蛋白在病毒与宿主的相互作用中起重要作用,与蛋白质进入病毒颗粒、细胞凋亡和炎症诱导以及宿主抗病毒反应调节有关,从而影响病毒的发病机制和疾病走向^[6]。本文综述了几种常见冠状病毒辅助蛋白在促进宿主细胞凋亡,对宿主天然免疫反应以及病毒致病性等方面的作用,有助于了解冠状病毒的感染和发病机理以及免疫机制,为研制新型疫苗和抗病毒药物提供参考。

1 冠状病毒辅助蛋白结构

冠状病毒是一种单股正链RNA病毒,基因组全长26~32 kb,由多个开放阅读框(ORF)组成,其基因顺序为5'-ORF1a-ORF1b-S-E-M-N-3'。冠状病毒基因组靠近5'端2/3区域编码复制酶基因,翻译多聚蛋白ORF1a、ORF1ab,经蛋白酶水解为15或16个非结构蛋白,主要参与病毒基因组复制和早期转录调控^[7]。基因组3'端1/3区域主要编码结构蛋白,如棘突蛋白(S)、膜蛋白(M)、核衣壳蛋白(N)、包膜蛋白(E),少数种类的冠状病毒还含有血凝素蛋白(HE)。

在结构蛋白基因之间或内部散布着一些辅助蛋白基因,部分辅助蛋白基因与结构蛋白基因发生重叠,这是由于原有框架里核苷酸发生替换,替代框架中诱导表达新的蛋白^[8]。不同冠状病毒编码数量不等的辅助蛋白基因(图1)。辅助蛋白具有种属特异性,与其他病毒蛋白无同源性,不同亚属的冠状病毒辅助蛋白基因片段存在巨大差异,它们的数量、位置和大小各不相同^[9]。例如,作为 α 冠状病毒成员,PEDV只编码一个辅助基因ORF3,TGEV编码3个辅助蛋白,而FIPV编码5个辅助蛋白。 β 冠状病毒SARS-CoV编码8个辅助蛋白,现有研究表明SARS-CoV-2编码9个辅助蛋白^[10]。 γ 冠状病毒



ORF. 开放阅读框;HE. 血凝素-酯酶;NS. 非结构蛋白;S. 刺突蛋白;N. 核衣壳蛋白;M. 膜蛋白;E. 包膜蛋白
ORF. Open reading frame; HE. Hemagglutinin-esterase; NS. Non-structural proteins; S. Spike protein; N. Nucleocapsid protein; M. Membrane protein; E. Envelope protein

图1 冠状病毒基因组结构
Fig. 1 Genome structure of coronavirus

IBV 编码4种辅助蛋白,ORF3a、ORF3b、ORF5a和ORF5b,其中ORF3a和ORF3b基因序列在不同血清型IBV之间高度保守。PDCoV作为一种具有代表性的δ冠状病毒编码3种辅助蛋白。几种常见的冠状病毒的辅助蛋白的数量及主要功能见表1。本文就辅助蛋白的几种具有代表性的功能进行阐述。

表1 冠状病毒辅助蛋白数量及主要功能
Table 1 The quantity and main functions of coronavirus accessory proteins

种属 Genera	病毒 Virus	数量 Quantity	主要功能 Main functions
α-CoV	PEDV	1	调节宿主免疫反应与病毒毒力
	TGEV	3	调控宿主免疫反应、病毒毒力与组织嗜性
	FIPV	5	调控宿主免疫反应、炎症反应与病毒毒力
β-CoV	MHV	4	免疫抑制与病毒毒力
	MERS-CoV	5	免疫抑制、炎症反应、病毒毒力
	SARS- CoV	8	炎症反应、细胞凋亡、免疫抑制与病毒毒力
	SARS- CoV-2	9	炎症反应、细胞凋亡、免疫抑制与病毒毒力
γ-CoV	IBV	4	免疫抑制、发病机理与病毒毒力
δ-CoV	PDCoV	3	免疫抑制与病毒毒力

2 辅助蛋白的功能

2.1 促进宿主细胞凋亡

细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种形式,介导

凋亡的信号通路主要包括线粒体通路(内在途径)、死亡受体通路(外在途径)以及内质网通路。内在途径是由B细胞淋巴瘤2(Bcl2)家族蛋白调控^[11]。其中BAX和BAK是促凋亡的通道形成蛋白,能够

增加线粒体外膜的通透性(MOMP),而Bcl2样蛋白(如Bcl2、Bcl-xL和Mcl-1)则属于抑制该过程的抗凋亡因子。SARS-CoV ORF3a通过激活线粒体死亡通路的p38 MAPK触发细胞凋亡^[12]。ORF7a蛋白通过抑制Bcl-XL与内质网的作用,从而激活内在途径的细胞凋亡^[13],还可以通过caspase依赖性途径诱导细胞凋亡^[14]。ORF6诱导细胞凋亡的途径和ORF-7a相似^[15]。ORF8a蛋白通过线粒体依赖途径诱导caspase 3活化和细胞凋亡,促进病毒感染^[16]。

外在途径中,死亡配体(FasL和TNF- α)与细胞表面的死亡受体(Fas和TNFR1)结合,导致死亡诱导信号复合物的形成与Caspase 8的活化。Caspase 8能够直接激活caspase效应蛋白,或通过激活BH3结构域凋亡诱导蛋白Bid与内源性途径相互作用^[11]。SARS-CoV-2编码的ORF3a可以诱导多种细胞caspase依赖性细胞凋亡^[17]。SARS-CoV的ORF3b与Runt相关转录因子1(RUNX1)相互作用调控NF- κ B介导的凋亡反应^[18]。

内质网是细胞中蛋白合成、加工和修饰的主要场所。在病毒感染、钙稳态失调等的情况下,致使非折叠蛋白的累积和聚集,引起内质网应激反应。内质网应激是冠状病毒感染细胞中的一种普遍现象^[6]。由于长期和不可补救的内质网应激,非折叠蛋白反应的加剧导致细胞凋亡途径的激活。冠状病毒的不同辅助蛋白能够通过不同的途径诱导细胞凋亡(图2)。SARS-CoV ORF3a诱导内质网应激,下调I型干扰素(interferon, IFN)受体表达,导致IFN应答受到抑制^[19]。SARS-CoV ORF6触发caspase-3介导和内质网应激反应性细胞凋亡^[20]。

在冠状病毒感染期间,多种宿主细胞信号通路之间发生串扰。IBV感染时,ERK和IRE1参与自噬诱导的调节^[21],激活的IRE1作为存活因子拮抗IBV诱导的细胞凋亡,确保细胞存活^[22]。PEDV的ORF3定位于内质网,通过上调GRP78蛋白表达和激活PERK-eIF2 α 信号通路触发内质网应激反应,从而诱导LC3-I向LC3-II转化来诱导细胞自噬,但不影响细胞凋亡^[23]。关于冠状病毒辅助蛋白参与细胞信号调节、促进宿主细胞凋亡还需要进行深入研究,有助于进一步了解病毒与宿主之间的相互作用,并发现潜在的抗病毒靶点。

2.2 对宿主天然免疫反应的影响

I型IFN介导的免疫反应是宿主抵抗病毒感染的第一道防线。天然免疫过程中,I型IFN的产

生在机体抗病毒感染过程中发挥至关重要的作用。病毒在感染早期逃避宿主的免疫反应,促进更多病毒粒子的产生。天然免疫反应的减弱导致病毒数量增加,这在病毒感染的发病机制中非常重要。冠状病毒辅助蛋白在病毒感染期间,干扰先天性免疫的几个反应阶段,调节宿主先天免疫,在宿主免疫逃逸过程中起重要作用^[24]。

首先,天然免疫的有效激活依赖于模式识别受体(PRRs)对病原相关分子模式(PAMP)的识别,如Toll样受体(TLRs)和RIG-I样受体(RLRs)。一些辅助蛋白直接与细胞质受体相互作用,例如,MERS-CoV ORF8b与RIG-I相互作用^[25],MERS-CoV NS4a能够阻断MDA5识别dsRNA,从而抑制dsRNA结合蛋白与RIG-I/MDA5的相互作用^[26]。PDCoV NS6蛋白削弱RIG-I/MDA5与dsRNA的结合,从而抑制IFN- β 的生成^[27]。激活后的PRRs招募接头蛋白(如MAVS),启动多种激酶介导的复杂信号通路。SARS-CoV-2 ORF7b能够特异性的与MAVS结合,削弱K63连接的MAVS多泛素化及其下游蛋白的招募,从而抑制RLR信号通路^[28]。ORF10通过诱导线粒体自噬降解MAVS,拮抗I型IFN和ISG的表达,从而抑制先天免疫反应^[29]。ORF9b作用于线粒体,通过诱导MAVS信号体(MAVS、TRAF3和TRAF6)的降解,抑制IFN的产生^[30]。此外,SARS-CoV-2 ORF9b与锚定在线粒体膜上的TOM70相结合,阻断TOM70对热休克蛋白HSP90的募集^[31]。ORF9b还可以通过阻断k63连接的NEMO泛素化,抑制RIG-I-MAVS通路,抑制I型IFN的产生^[32]。SARS-CoV-2 ORF3a通过增强IKK- β 和NEMO的相互作用,正向调节NF- κ B的活性,导致多种细胞因子表达量升高,诱发炎症反应^[33]。另一方面,SARS-CoV-2的ORF3a蛋白通过与STING相互作用,抑制STING激活下游NF- κ B介导的先天性免疫反应,促进病毒复制^[34]。这可能与病毒感染的不同阶段的作用有关,比如感染早期抑制免疫反应,后期诱导产生炎症反应,导致组织损伤。

此外,一些冠状病毒的辅助蛋白还可与下游的蛋白相互作用,干扰IFN的表达(图3)。PDCoV NS7a能够特异性的与下游IKK ϵ 的相互作用,干扰该蛋白与其上游TRAF3以及下游IRF3的相互作用,从而抑制IFN- β 的产生^[35]。MERS-CoV NS4b能够与IKK ϵ 、TBK1直接作用^[36],ORF8b则通过与

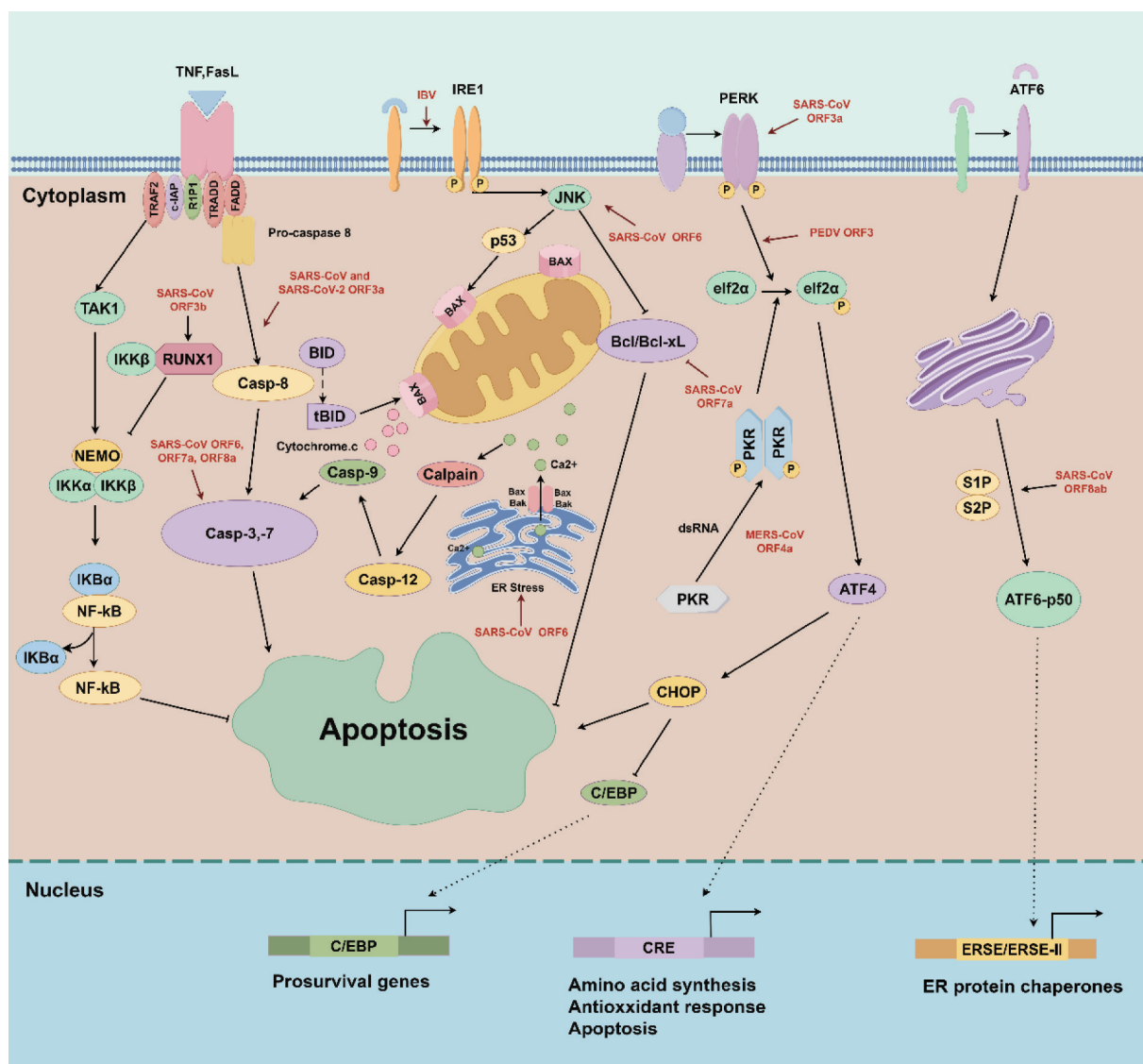


图2 冠状病毒辅助蛋白介导的细胞凋亡信号通路

Fig. 2 Cell apoptosis signaling pathway mediated by accessory proteins of coronavirus

HSP70的相互作用,干扰了HSP70与IKK ϵ 结合,抑制IFN- β 的产生^[37]。冠状病毒的辅助蛋白还可以抑制I型IFN的生成。SARS-CoV ORF8b和ORF8ab通过降解IRF3抑制IFN的生成^[38]。MERS-CoV NS4b能够取代NF- κ B与核转运蛋白KPNA α 4的结合,抑制NF- κ B入核以及IFN的生成^[39]。PEDV的辅助蛋白ORF3在细胞中过表达,可以抑制IFN- β 和IRF3启动子活性^[40]。ORF3也可抑制IRF3的磷酸化及核移位,抑制I型IFN的信号转导^[41]。SARS-CoV-2 ORF6能够与核转运蛋白KPNA2结合,抑制IRF3的核转运^[42]。ORF8通过靶向HSP90B1,抑制IRF的核移位,拮抗RIG-I/MDA-5信号通路,进而抑制IFN-I的产生^[43]。

细胞中表达的I型IFN被分泌至细胞外,通过与IFN受体结合,经一系列信号转导进一步通过激活IFN刺激因子(ISG)的表达而发挥抗病毒作用。冠状病毒多种辅助蛋白能够以不同的策略阻碍IFN信号转导,促进病毒的免疫逃逸。SARS-CoV通过ORF3a抑制IFNAR的表达^[19]。NMI作为N-Myc和STATs互作分子,SARS-CoV ORF6能够促进NMI的泛素依赖性蛋白体降解,阻止STAT1的核移位,限制IFN信号传递^[44],另外NMI也能够促进IFN关键转录因子IRF7的泛素化,从而抑制I型干扰素的表达^[45]。SARS-CoV-2 ORF6也可以抑制STAT1核移位,研究发现,ORF6定位于核孔复合体处,通过与NUP98和RAE1形成复合物,阻塞核

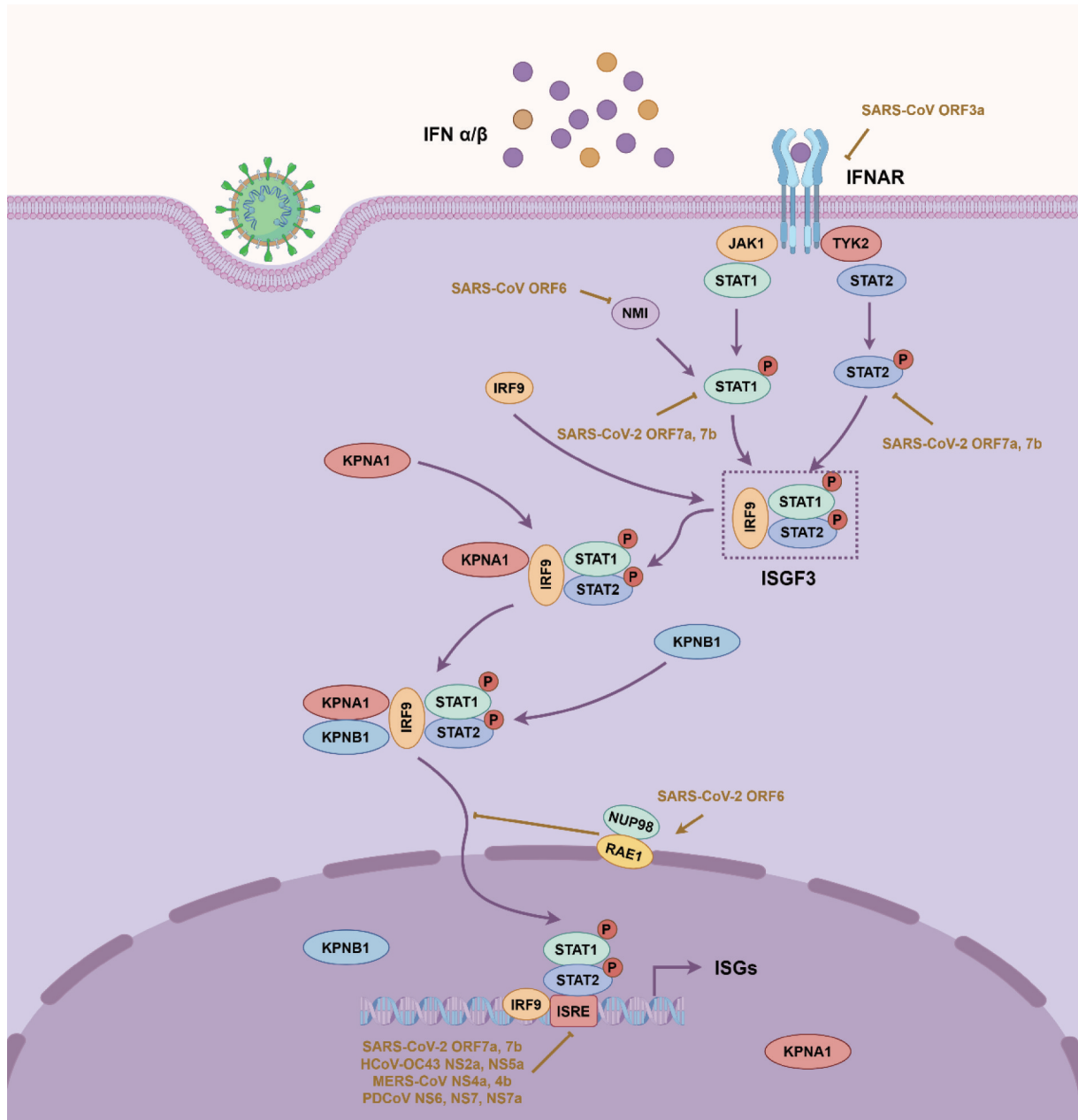


图4 冠状病毒辅助蛋白影响IFN- α/β 信号转导通路

Fig. 4 IFN- α/β signaling transduction pathway infected by accessory proteins of coronavirus

响不明显,但FIPV的ORF7单独缺失或者ORF3、ORF7共同缺失对病毒在单核细胞上复制产生影响,证明ORF7对FIPV在体外复制起重要作用^[53]。同样,TGEV ORF7缺失株感染新生仔猪后,病毒的增殖速度高于亲本株,仔猪产生的病理变化也较为明显,表明ORF7与TGEV的毒力有关^[54]。

ORF3a是 β 冠状病毒SARS-CoV和SARS-CoV-2基因组中最大的辅助蛋白,调节宿主针对病毒感染的应答反应,在发病机制中起重要作用。SARS-CoV-2 ORF3a存在6个功能域,它们分别与

病毒的毒力、传染性、离子通道形成和病毒释放有关^[55]。ORF3a基因突变会导致病毒毒力发生改变。在印度患者感染的SARS-CoV-2基因组中,ORF3a基因出现了单点和双点突变,导致病毒在患者体内的毒力特性发生了变化^[56]。SARS-CoV-2 ORF3a中W131C、T151I、R134L、D155Y的突变促进了ORF3a蛋白的四聚体化,有助于离子通道的形成,增加了病毒的传染性^[57]。ORF3a、ORF6、ORF7a、ORF7b和ORF8缺失后,重组病毒在Vero E6单层细胞上产生的空斑直径均小于其亲本株^[58]。在体

内研究中,用重组病毒感染 K18 hACE2 转基因小鼠,发现 ORF3a 和 ORF6 是病毒引起发病的主要因素,在病毒致病机制中起重要作用^[58]。SARS-CoV-2 ORF8 基因与病毒毒力相关,在病毒流行过程中,部分毒株 ORF8 基因发生了 382 个核苷酸的缺失,相比于亲本株,感染该缺失株的患者促炎性细胞因子的释放减少,出现缺氧症状的比例也显著降低^[59]。通过感染 K18 hACE2 转基因小鼠发现,同时删除 SARS-CoV-2 辅助蛋白 ORF3、ORF6、ORF7、ORF8 会导致该病毒在仓鼠和 K18-hACE2 小鼠模型中毒力减弱^[60],ORF6、ORF7a 或 ORF7b 单缺失株对 SARS-CoV-2 病毒致病性并没有显著影响,但 ORF8 的单独缺失会导致感染小鼠肺部病理变化减少,死亡率降低,这表明 ORF8 是 SARS-CoV-2 发病机制的决定因素^[61]。嵌合表达 SARS-CoV ORF6 的 MHV 重组病毒在细胞中的病毒滴度高于亲本株^[62],且在小鼠体内的毒力也显著增强。删除了辅助基因的 MHV 重组病毒在小鼠体内的毒力显著减弱^[63]。此外,辅助蛋白 ORF3、ORF4a、ORF4b、ORF5 的缺失会显著影响 MERS-CoV 的复制和发病机制^[64]。通过在 MHV 毒株中嵌合表达 MERS-CoV 辅助蛋白 8b,发现辅助蛋白 8b 可显著增强重组病毒在体内和体外的复制能力,提高对感染小鼠的致死率^[65]。

将 IBV H52 株 ORF3ab 和 ORF5ab 删除,拯救获得的重组病毒感染后气管环纤毛活性低于亲本株^[66]。进一步将 H52 株 ORF3a、ORF3b、ORF5a、ORF5b 单缺失株分别感染 1 日龄雏鸡后,其气管环纤毛活性均低于亲本株,说明上述辅助蛋白均与 IBV 毒力有关^[67]。对 QX 型强毒株 IBYZ 株进行 ORF3a、ORF3b 单缺失或双缺失,发现两个辅助蛋白的缺失均可导致病毒在雏鸡体内的致病性下降,且 ORF3b 对致病性的影响大于 ORF3a 蛋白^[68]。通过对 QX 型强毒株 YN 株的 ORF5a 进行突变,拯救获得的重组病毒对雏鸡致死率、感染组织损伤程度以及组织中病毒载量均显著下降,进一步证实了 IBV ORF5a 与病毒致病性有关^[69]。

PDCoV 的辅助蛋白 NS6 缺失株 rPDCoV-ΔNS6-GFP 感染仔猪没有出现腹泻等临床症状,而 NS7 缺失株 rPDCoV-ΔNS7 与野生型 PDCoV 和 rPDCoV 感染的仔猪出现严重的腹泻,说明辅助蛋白 NS6 与 PDCoV 的毒力有关,PDCoV NS6 蛋白的缺失可显著降低病毒对仔猪的致病性^[70]。

3 辅助蛋白的应用与展望

3.1 疫苗

减毒活疫苗可以诱导机体产生体液免疫和细胞免疫,为机体提供广泛和长期的免疫保护。减毒活疫苗诱导的免疫反应最接近自然感染,是较为有效的疫苗。冠状病毒辅助蛋白与病毒致病性相关,但不是诱导宿主体液免疫的主要因素,因此自然或人工缺失辅助蛋白的冠状病毒毒株有望成为减毒活疫苗的候选株。利用缺失 ORF3abc 或 ORF7ab 的重组 FIPV 接种猫,两种重组病毒均在猫体内表现出减毒表型,并且能够诱导产生较高水平的中和抗体,抵御同源毒株的攻击,具备作为疫苗候选株的潜力^[52]。单剂量接种 ORF3、ORF6、ORF7、ORF8 同时缺失的毒株 Δ3678 SARS-CoV-2 可保护仓鼠免受野生型病毒的攻击和传播,说明 Δ3678 SARS-CoV-2 能够作为减毒活疫苗候选株^[60]。SARS-CoV-2 的辅助蛋白双缺失株,如 ORF3a/ORF6、ORF3a/ORF7a 和 ORF3a/ORF7b,在 K18 hACE2 转基因小鼠和仓鼠中均表现出毒力减弱,其中 ORF3a/ORF7a 双缺失株的毒力完全丢失,在 K18 hACE2 转基因小鼠中表现出 100% 的同源保护力,并能有效阻断病毒在仓鼠之间的传播,因此,ORF3a/ORF7a 双缺失的 SARS-CoV-2 毒株有望用于开发安全性高、免疫原性和保护性强的减毒活疫苗^[71]。将 IBV H52 株辅助蛋白 ORF3ab 和 ORF5ab 删除后,病毒也表现为减毒表型,并且在 1 日龄雏鸡攻毒试验中,可以为雏鸡提供免疫保护^[66]。针对 QX 型强毒株 YN 株,ORF5a 删除后,重组病毒 rYN-5a-aYN 在鸡胚中表现为减毒表型^[69],可以用来制备减毒活疫苗。在另一株 QX 型强毒株 IBYZ 的研究中,ORF3a、ORF3b 分别缺失能够导致病毒的致病性下降,且 ORF3b 缺失的效果较为明显,提示 rIBYZ-ScAUG3a、rIBYZ-ScAUG3b 株可以作为 QX 型强毒株的疫苗候选株^[68]。作为 δ 冠状病毒 PDCoV 的重要毒力因子,NS6 缺失突变病毒丧失了对仔猪致病性,有望作为 PDCoV 减毒活疫苗候选株^[70]。

3.2 药物靶点

针对病毒蛋白进行靶向治疗,可以高度特异性地抵抗病毒感染,同时减少对机体的伤害。辅助蛋白具有作为治疗靶点的潜在特性:1)通过对辅助蛋白的氨基酸序列进行比对分析发现,辅助蛋白与人

类蛋白之间没有相似之处。针对辅助蛋白开发药物具有特异性强、副作用小的优点。2)辅助蛋白在感染期间表达,感染者可以产生针对某些辅助蛋白的抗体。SARS-CoV-2 ORF3a在病毒发病机制、细胞因子风暴、疾病严重程度和死亡率等多个方面起重要作用,可作为抗病毒治疗的潜在靶点。SARS-CoV-2 ORF3a蛋白可以独立诱导肾细胞特异性细胞凋亡,天然化合物甘草酸(GL4419)不仅可以阻断病毒在肾细胞中的复制,还可以减轻ORF3a诱导的肾细胞死亡。ORF3a与肾损伤之间存在直接的功能联系,是一种治疗COVID-19相关的肾脏损伤的独特靶点^[72]。开发针对ORF3a抑制剂药物,能够减轻组织损伤,降低COVID-19感染的严重程度并减少并发症^[73]。SARS-CoV-2 ORF8是一种多功能蛋白,可下调MHC-I介导的病毒抗原呈递,降低宿主先天免疫反应,并作为I型IFN的拮抗剂^[74]。在人源化K18-hACE2转基因小鼠和人类气道细胞两种实验系统中,ORF8参与炎症和巨噬细胞的激活^[61],根据SARS-CoV-2的ORF8的晶体结构开发药物,能够扰乱其与多种宿主蛋白(如IL17RA、LOX、GDF15)的相互作用^[75],说明ORF8蛋白也可以作为治疗COVID-19的潜在靶点。SARS-CoV-2 ORF9b定位于线粒体膜上,通过与TOM70的关联抑制I型IFN反应,而TOM70的过表达可以在很大程度上缓解这种抑制作用^[76]。因此,靶向ORF9b-TOM70相互作用可能作为一种治疗COVID-19的新的策略。此外,将多种辅助蛋白作为药物靶点,能够克服单个靶点药物治疗效果不理想等问题,产生更好的治疗效果。

4 小 结

冠状病毒可以在包括人类在内的多种哺乳动物之间传播,对人类和动物生命健康造成巨大威胁。随着病毒基因组的不断变异和重组,未来我们还可能面临更多由冠状病毒带来的挑战。目前,对于病毒性传染病的防治策略主要集中于疫苗及抗病毒药物的开发,对病毒的蛋白结构及其功能的研究尤为重要。冠状病毒辅助蛋白广泛参与宿主先天性免疫反应,并与病毒毒力有关。因此,辅助蛋白功能的研究成为近年来冠状病毒研究领域的热点。本文综述了几种具有代表性的冠状病毒附属蛋白的功能研究,以及辅助蛋白在疫苗研制和靶向药物治疗方面的应用研究进展。辅助蛋白缺失可

以用于减毒型或复制缺陷型毒株的构建,为减毒活疫苗的研制打下基础,为以减毒株为骨架的灭活疫苗的研制提供更安全、便捷的途径。然而,目前关于冠状病毒辅助蛋白缺失株的传代稳定性尚不清楚,减毒活疫苗的安全性也有待进一步研究。针对辅助蛋白作为药物靶点,有助于设计广谱、高效的抗病毒药物,更好地应对未来可能出现的病毒大流行。相较于其它结构蛋白,目前对于冠状病毒辅助蛋白的结构及功能研究尚且不足。SARS-CoV和SARS-CoV-2的辅助蛋白研究较多,但辅助蛋白在感染中的病理学作用尚不清楚。其他冠状病毒辅助蛋白的研究更为有限,辅助蛋白在病毒感染动物机体过程中起的作用还需要进一步研究。

参考文献(References):

- [1] ASHOUR H M, ELKHATIB W F, RAHMAN M M, et al. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks[J]. *Pathogens*, 2020, 9(3):186.
- [2] KIRTIPAL N, BHARADWAJ S, KANG S G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses[J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 85: 104502.
- [3] HOERR F J. The pathology of infectious bronchitis [J]. *Avian Dis*, 2021, 65(4):600-611.
- [4] WILLE M, HOLMES E C. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses [J]. *FEMS Microbiol*, 2020, 44:631-644.
- [5] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, et al. Emergence of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution [J]. *Nature*, 2021, 600(7887):133-137.
- [6] FANG P, FANG L, ZHANG H, et al. Functions of coronavirus accessory proteins: overview of the state of the art[J]. *Viruses*, 2021, 13(6):1139.
- [7] YOSHIMOTO F K. The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or N-COV19), the cause of COVID-19[J]. *Protein J*, 2020, 39(3):198-216.
- [8] MICHEL C J, MAYER C, POCH O, et al. Characterization of accessory genes in coronavirus genomes[J]. *Virol J*, 2020, 17(1):131.
- [9] LIU D X, FUNG T S, CHONG K K, et al. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses [J].

- Antiviral Res*, 2014, 109: 97-109.
- [10] 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, 27(3): 325-328.
- [11] TAYLOR R C, CULLEN S P, MARTIN S J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 231-41.
- [12] PADHAN K, MINAKSHI R, BIN TOWHEED M A, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein activates the mitochondrial death pathway through p38 MAP kinase activation [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89: 1960-1969.
- [13] TAN Y X, TAN T H, LEE M J, et al. Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein [J]. *J Virol*, 2007, 81: 6346-6355.
- [14] TAN Y J, FIELDING B C, GOH P Y. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway [J]. *J Virol*, 2004, 78: 14043-14047.
- [15] YE Z D, WONG C K, LI P, et al. The role of SARS-CoV protein, ORF-6, in the induction of host cell death [J]. *Hong Kong Med J*, 2010, 16(5 Suppl 4): 22-6.
- [16] CHEN C Y, PING Y H, LEE H C, et al. Open reading frame 8a of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus not only promotes viral replication but also induces apoptosis [J]. *J Infect Dis*, 2007, 196: 405-415.
- [17] REN Y, SHU T, WU D, et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17: 881-883.
- [18] VARSHNEY B, AGNIHOTHRAM S, TAN Y J, et al. SARS coronavirus 3b accessory protein modulates transcriptional activity of RUNX1b [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29542.
- [19] MINAKSHI R, PADHAN K, RANI M. The SARS coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type 1 interferon receptor [J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8342.
- [20] YE Z, WONG C K, LI P, et al. SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(12): 1383-1387.
- [21] FUNG T S, LIU D X. The ER stress sensor IRE1 and MAP kinase ERK modulate autophagy induction in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus [J]. *Virology*, 2019, 533: 34-44.
- [22] FUNG T S, LIAO Y, LIU D X. The endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 protects cells from apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus [J]. *J Virol*, 2014, 88: 12752-12764.
- [23] ZOU D, XU J, DUAN X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein causes endoplasmic reticulum stress to facilitate autophagy [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 235: 209-219.
- [24] V' KOVSKI P, KRATZEL A, STEINER S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 155-170.
- [25] YOO J S, KATO H, FUJITA T. Sensing viral invasion by RIG-I like receptors [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 20: 131-138.
- [26] SIU K L, YEUNG M L, KOK K H. Middle east respiratory syndrome coronavirus 4a protein is a double-stranded RNA-binding protein that suppresses PACT-induced activation of RIG-I and MDA5 in the innate antiviral response [J]. *J Virol*, 2014, 88: 4866-4876.
- [27] FANG P, FANG L, REN J, et al. Porcine deltacoronavirus accessory protein NS6 antagonizes interferon beta production by interfering with the binding of RIG-I/MDA5 to double-stranded RNA [J]. *J Virol*, 2018, 92(15): e00712-18.
- [28] XIAO X, FU Y, YOU W. Inhibition of the RLR signaling pathway by SARS-CoV-2 ORF7b is mediated by MAVS and abrogated by ORF7b-homologous interfering peptide [J]. *J Virol*, 2024, 98(5): e0157323.
- [29] LI X, HOU P, MA W. SARS-CoV-2 ORF10 suppresses the antiviral innate immune response by degrading MAVS through mitophagy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(1): 67-78.
- [30] SHI C S, QI H Y. SARS-Coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome [J]. *J Immunol*, 2014, 193: 3080-3089.
- [31] GAO X, ZHU K, QIN B. Crystal structure of SARS-CoV-2 ORF9b in complex with human TOM70 suggests unusual virus-host interactions [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2843.
- [32] WU J, SHI Y, PAN X. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-

- linked ubiquitination of NEMO[J]. *Cell Rep*, 2021, 34(7):108761.
- [33] NIE Y, MOU L, LONG Q. SARS-CoV-2 ORF3a positively regulates NF- κ B activity by enhancing IKK β -NEMO interaction[J]. *Virus Res*, 2023, 328:199086.
- [34] RUI Y, SHEN S, WANG Y, et al. HIV-1 vpu and SARS-CoV-2 ORF3a proteins disrupt STING-mediated activation of antiviral NF- κ B signaling[J]. *Sci Signal*, 2025, 18(870):eadd6593.
- [35] FANG P, FANG L, XIA S. Porcine deltacoronavirus accessory protein NS7a antagonizes IFN- β production by competing with TRAF3 and IRF3 for binding to IKK ϵ [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10:257.
- [36] YANG Y, YE F, ZHU N, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus ORF4b protein inhibits type I interferon production through both cytoplasmic and nuclear targets[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17554.
- [37] WONG L R, YE Z W, LUI P Y, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus ORF8b accessory protein suppresses type I IFN expression by impeding HSP70-dependent activation of IRF3 kinase IKK ϵ [J]. *J Immunol*, 2020, 205:1564-1579.
- [38] WONG H H, FUNG T S, FANG S, et al. Accessory proteins 8b and 8ab of severe acute respiratory syndrome coronavirus suppress the interferon signaling pathway by mediating ubiquitin-dependent rapid degradation of interferon regulatory factor 3 [J]. *Virology*, 2018, 515:165-175.
- [39] CANTON J, FEHR A R, FERNANDEZ-DELGADO R, et al. MERS-CoV 4b protein interferes with the NF-kappaB-dependent innate immune response during infection[J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(1):e1006838.
- [40] ZHANG Q, SHI K, YOO D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1 [J]. *Virology*, 2016, 489:252-68.
- [41] ZHENG L, LIU H, TIAN Z. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) ORF3 protein inhibits cellular type I interferon signaling through down-regulating proteins expression in RLRs-mediated pathway [J]. *Res Vet Sci*, 2023, 159:146-159.
- [42] LEI X, DONG X, MA R. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):3810.
- [43] CHEN J, LU Z, YANG X. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 ORF8 protein inhibits type I interferon production by targeting HSP90B1 signaling [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:899546.
- [44] CHENG W, CHEN S, LI R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 mediates ubiquitin-dependent proteosomal degradation of N-Myc (and STAT) interactor[J]. *Virol Sin*, 2015, 30(2):153-161.
- [45] WANG J, YANG B, HU Y, et al. Negative regulation of Nmi on virus-triggered type I IFN production by targeting IRF7 [J]. *J Immunol*, 2013, 191(6):3393-3399.
- [46] MIORIN L, KEHRER T, SANCHEZ-APARICIO M T, et al. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2020, 117(45):28344-28354.
- [47] XIA H, CAO Z, XIE X, et al. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2 [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(1):108234.
- [48] BEIDAS M, CHEHADEH W. Effect of human coronavirus OC43 structural and accessory proteins on the transcriptional activation of antiviral response elements[J]. *Intervirology*, 2018, 61(1):30-35.
- [49] YANG Y, ZHANG L, GENG H, et al. The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are potent interferon antagonists [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(12):951-961.
- [50] LU Y, SU X, DU C. Genetic diversity of porcine epidemic diarrhea virus with a naturally occurring truncated ORF3 gene found in Guangxi, China [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7:435.
- [51] ZHANG Y H, LI H X, CHEN X M. Genetic characteristics and pathogenicity of a novel porcine epidemic diarrhea virus with a naturally occurring truncated ORF3 gene[J]. *Viruses*, 2022, 14(3):487.
- [52] HAIJEMA B J, VOLDERS H, ROTTIER P J M. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis [J]. *J Virol*, 2004, 78:3863-3871.
- [53] DEDEURWAERDER A, DESMARETS L M, OLYSLAEGERS D A. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162:447-455.
- [54] CRUZ J L, SOLA I, BECARES M. Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(6):e1002090.

- [55] ISSA E, MERHI G, PANOSSIAN B, et al. SARS-CoV-2 and ORF3a: nonsynonymous mutations, functional domains, and viral pathogenesis [J]. *mSystems*, 2020, 5(3):e00266-20.
- [56] HASSAN S S, CHOUDHURY P P, BASU P, et al. Molecular conservation and differential mutation on ORF3a gene in Indian SARS-CoV2 genomes [J]. *Genomics*, 2020, 112(5):3226-3237.
- [57] HASSAN S S, ATTRISH D, GHOSH S, et al. Pathogenic perspective of missense mutations of ORF3a protein of SARS-CoV-2 [J]. *Virus Res*, 2021, 300:198441.
- [58] SILVAS J A, VASQUEZ D M, PARK J G, et al. Contribution of SARS-CoV-2 accessory proteins to viral pathogenicity in K18 human ACE2 transgenic mice[J]. *J Virol*, 2021, 95(17):e0040221.
- [59] YOUNG B E, FONG S W, CHAN Y H, et al. Effects of a major deletion in the SARS-CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response: an observational cohort study [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251):603-611.
- [60] LIU Y, ZHANG X, LIU J. A live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate with accessory protein deletions[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):4337.
- [61] BELLO-PEREZ M, HURTADO-TAMAYO J, MYKYTYN A Z. SARS-CoV-2 ORF8 accessory protein is a virulence factor[J]. *mBio*, 2023, 14(5):e0045123.
- [62] PEWE L, ZHOU H, NETLAND J, et al. A severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific protein enhances virulence of an attenuated murine coronavirus[J]. *J Virol*, 2005, 79(17):11335-11342.
- [63] DE HAAN C A, MASTERS P S, SHEN X, et al. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host[J]. *Virology*, 2002, 296(1):177-189.
- [64] MENACHERY V D, MITCHELL H D, COCKRELL A S. MERS-CoV accessory ORFs play key role for infection and pathogenesis [J]. *mBio*, 2017, 8(4):e00665-17.
- [65] LI Y, JIN Y, KUANG L. The N-terminal region of middle east respiratory syndrome coronavirus accessory protein 8b is essential for enhanced virulence of an attenuated murine coronavirus [J]. *J Virol*, 2022, 96(3):e0184221.
- [66] VAN BEURDEN S J, BERENDS A J, KRÄMER-KÜHL A, et al. Recombinant live attenuated avian coronavirus vaccines with deletions in the accessory genes 3ab and/or 5ab protect against infectious bronchitis in chickens[J]. *Vaccine*, 2018, 36(8):1085-1092.
- [67] LACONI A, VAN BEURDEN S J, BERENDS A J, et al. Deletion of accessory genes 3a, 3b, 5a or 5b from avian coronavirus infectious bronchitis virus induces an attenuated phenotype both *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(10):1381-1390.
- [68] ZHAO X, JIANG Y, CHENG X, et al. Pathogenicity of a QX-like strain of infectious bronchitis virus and effects of accessory proteins 3a and 3b in chickens[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 239(4):108-114.
- [69] ZHAO Y, CHENG J, YAN S, et al. S gene and 5a accessory gene are responsible for the attenuation of virulent infectious bronchitis coronavirus [J]. *Virology*, 2019, 533(2):12-20.
- [70] ZHANG M, LI W, ZHOU P, et al. Genetic manipulation of porcine deltacoronavirus reveals insights into NS6 and NS7 functions: a novel strategy for vaccine design[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 9(1):20-31.
- [71] YE C, PARK J G, CHIEM K. Immunization with recombinant accessory protein-deficient SARS-CoV-2 protects against lethal challenge and viral transmission [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(3):e0065323.
- [72] ZHANG C, GERZANICH V, CRUZ-COSME R, et al. SARS-CoV-2 ORF3a induces COVID-19-associated kidney injury through HMGB1-mediated cytokine production [J]. *mBio*, 2024, 15(11):e0230824.
- [73] ZHANG J, HOM K, ZHANG C. SARS-CoV-2 ORF3a protein as a therapeutic target against COVID-19 and long-term post-infection effects [J]. *Pathogens*, 2024, 13(1):75.
- [74] ZHANG Y, CHEN Y, LI Y. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(23):e2024202118.
- [75] ZINZULA L. Lost in deletion: the enigmatic ORF8 protein of SARS-CoV-2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538:116-124.
- [76] JIANG H W, ZHANG H N, MENG Q F. SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(9):998-1000.