

·新冠肺炎专栏·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2021.09.0212

TMRSS2 重组蛋白阻断 SARS-CoV-2 假病毒的感染

潘 婷¹, 彭倩文¹, 杜艳芸¹, 王晨辉^{1, 2, 3*}

(1. 华中科技大学 生命科学与技术学院, 中国湖北 武汉 430074; 2. 四川省医学科学院 四川省人民医院 人类疾病基因研究四川省重点实验室, 中国四川 成都 610031; 3. 电子科技大学, 中国四川 成都 611731)

摘要:为了探究Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶(type II transmembrane serine protease, TMRSS2)重组蛋白阻断严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染宿主的能力,在体外构建假病毒感染细胞的体系,使用SARS-CoV-2 S (spike glycoprotein)蛋白携带水疱性口炎病毒(ΔG -VSV/荧光素酶)感染细胞,利用293F细胞体外纯化酶活及自身剪切位点突变的TMRSS2 重组蛋白,发现纯化的剪切位点R255Q 和酶活位点S441A 双突变的TMRSS2 重组蛋白,能够有效降低S 蛋白与宿主细胞表面TM-RSS2 的结合,进而阻断SARS-CoV-2 假病毒对Calu3 肺癌细胞系的感染。实验结果表明,使用突变的TM-RSS2 重组蛋白竞争性结合病毒的刺突蛋白S,同抑制TMRSS2 蛋白酶的活性一样,都能阻断S 蛋白的切割活化,抑制病毒与宿主细胞的膜融合,最终达到阻止病毒入侵的目的,这为阻断SARS-CoV-2 感染提供了新的潜在靶点和思路。

关键词:严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2); Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶(TMRSS2); 假病毒感染; 重组蛋白

中图分类号: Q771

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2022)04-0283-08

Recombinant TMRSS2–Fc Protein Blocks SARS–CoV–2 Pseudovirus Infection

PAN Ting¹, PENG Qian-wen¹, DU Yan-yun¹, WANG Chen-hui^{1, 2, 3*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China; 2. The Key Laboratory for Human Disease Gene Study of Sichuan Province, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610031, Sichuan, China; 3. University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, Sichuan, China)

Abstract: In order to explore the effect of type II transmembrane serine protease (TMRSS2) recombinant protein on blocking severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, a pseudovirus infected cell system was constructed *in vitro*, and vesicular stomatitis virus (ΔG -VSV/luciferase) pseudovirus carrying SARS-CoV-2 spike glycoprotein (S protein) was used for evaluating cell infection efficiency. The recombinant TMRSS2–Fc protein with enzyme activity and self-shearing site mutation was purified from 293F cells *in vitro*. It was found that the purified TMRSS2–Fc recombinant protein with two mutations of shearing site R255Q and enzyme activity site S441A could effectively reduce the binding of S protein to TMRSS2 on the surface of host cells, and block the infection of Calu3 lung cancer cell line with pseudovirus. These results indicated that the recombinant TMRSS2–Fc protein could compete with the host co-receptor TMRSS2 to bind to the S protein, blocking the cleavage and activation of S protein and inhibiting the membrane fusion between the virus and host cells, therefore stopping virus invasion. Overall, this study

收稿日期: 2021-09-25; 修回日期: 2022-02-10; 网络首发日期: 2022-04-22

基金项目: 四川省重点研发项目(22ZDZF3738); 华中科技大学新冠肺炎应急项目(2020kfyXGYJ110)

作者简介: 潘婷(1997—),女,河南驻马店人,硕士; *通信作者: 王晨辉(1978—),男,甘肃天水人,博士,教授,主要从事免疫学研究, Tel: 027-62432072, E-mail: wangchenhui@hust.edu.cn。

provides a new clue for preventing SARS-CoV-2 infection.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); type II transmembrane serine protease (TMPRSS2); pseudovirus infection; recombinant protein

(*Life Science Research*, 2022, 26(4): 283~290)

2019年底出现的新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)在国内和国际上的快速传播导致了全球卫生紧急事件。严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)入侵宿主细胞首先依赖于病毒刺突蛋白 S (spike glycoprotein)与细胞表面受体血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的结合, 随后宿主细胞蛋白酶对 S 蛋白进行切割激活, 进而促进病毒与宿主细胞膜融合, ACE2 与宿主细胞蛋白酶在病毒入侵宿主细胞的过程中都发挥了关键作用^[1]。Glowacka 等^[2]曾报道, II型跨膜丝氨酸蛋白酶(type II transmembrane serine protease, TMPRSS2)的分布与 SARS-CoV 在肺部的感染相关, 该蛋白酶可以有效地激活冠状病毒的 S 蛋白, 在细胞表面诱导病毒与细胞膜融合。

1997 年, TMPRSS2 基因通过系统外显子捕获实验在人类 21 号染色体上首次被发现。其全长 cDNA 编码由 492 个氨基酸组成的蛋白质^[3], 该蛋白固定在质膜上, 属于 TTSPs 家族(II型跨膜丝氨酸蛋白酶)。TTSPs 的特征是包含一个短的细胞内 N 端结构域、一个跨膜结构域和一个大的胞外结构域, 其中胞外结构域由一个可变茎区和一个糜蛋白酶 S1 折叠的 C 端丝氨酸蛋白酶结构域构成^[4-5]。根据丝氨酸蛋白酶结构域的茎区组成和系统发育分析, TTSPs 被分为人气道胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶(human airway trypsin-like protease, HAT)、蛋白质裂解酶(matriptase)、跨膜丝氨酸蛋白酶(TMPRSSs)和丝氨酸酶 4 个亚家族^[6]。

SARS-CoV-2 是一种主要通过呼吸途径传播的急性传染病的病原体。尽管 ACE2 存在于所有器官的血管内皮细胞中, 但 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 仅在肺部具有高致病性^[7-8]。此外, 虽然在 I 型和 II 型肺细胞中均有 ACE2 的表达^[9], 但 SARS-CoV-2 的细胞向性与 ACE2 的表达并不严格相关, 这表明 COVID-19 的发病机制还需要其他因素来解释^[9]。TMPRSS2 在人肺的上皮细胞中高度表达^[10]。已知各种蛋白酶, 如胰蛋白酶、类胰蛋白酶、人气道胰蛋白酶和 TMPRSS2, 都能够裂解甲

型流感病毒血凝素的糖蛋白, 并且 TMPRSS2 是病毒和宿主细胞膜融合的先决条件^[11]。许多病毒, 如人类免疫缺陷病毒(HIV)和尼帕病毒, 在感染细胞过程中由细胞蛋白酶(如弗林蛋白酶或组织蛋白酶)切割病毒糖蛋白, 从而分离病毒的受体结合亚基和膜融合亚基, 并将糖蛋白前体转化为融合状态^[12]。对于埃博拉病毒和 SARS 冠状病毒, 病毒糖蛋白被内吞体蛋白酶裂解, 在病毒进入细胞过程中, 诱导受体结合或内吞作用导致的构象变化^[13]。有 3 种蛋白酶, 即胰蛋白酶、组织蛋白酶 L 和弹性蛋白酶, 曾被报道能够激活 SARS 冠状病毒的 S 蛋白^[14-16]。在细胞表面缺乏上述蛋白酶的情况下, SARS 冠状病毒通过内吞体途径进入细胞, S 蛋白被内吞体中的组织蛋白酶 L 激活^[17-18]。相反, 在细胞表面存在上述蛋白酶(如胰蛋白酶和弹性蛋白酶)时, 附着在宿主细胞表面受体上的病毒 S 蛋白会被这些蛋白酶激活, 诱导包膜-质膜融合, 随后介导 SARS 冠状病毒直接进入细胞^[19]。后一种情况下的病毒复制效率更高, 比内吞体途径的复制效率高 100 倍^[19], 这表明, SARS 冠状病毒引起的严重急性呼吸道综合症可能是蛋白酶介导的病毒直接进入细胞导致的复制增强。

TMPRSS2 在病毒感染宿主细胞的过程中发挥重要作用。类似地, 人偏肺病毒(human metapneumovirus, HMPV)的融合蛋白 F 是作为单一表面糖蛋白合成的, 需要被宿主细胞蛋白酶裂解才能使病毒繁殖^[20]。这种病毒主要在幼儿中引起严重的毛细支气管炎和肺炎。既往研究表明, TMPRSS2 是 HMPV F 蛋白的有效激活剂^[21]。此外, 研究还发现, 除了组织蛋白酶 L 外, TMPRSS2 也能激活 SARS-CoV 的刺突蛋白 S^[22]。TMPRSS2 对 S 蛋白的切割促进了 SARS 冠状病毒从细胞表面直接进入宿主细胞, 而不依赖于内吞体途径中组织蛋白酶 L 的活性^[23]。之前的一项研究发现, 非特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂 camostat 处理后, SARS 冠状病毒对 Calu3 细胞的感染相比较未处理的对照组降低了 90%^[24]。

基于以上信息, 我们推测 TMPRSS2 可能成为抗 SARS-CoV-2 感染的潜在靶点。我们前期通

过研究 TMPRSS2 蛋白酶存在的几种形式,发现 TMPRSS2 会通过自剪切发挥酶活,并且确认了野生型 TMPRSS2 在具有酶活的状态下仍然锚定在膜上,提示 TMPRSS2 可以作为一种阻断病毒进入的细胞表面靶点。因此,我们纯化了酶活位点和剪切位点双突变的 TMPRSS2 重组蛋白,该重组蛋白通过与 Calu3 细胞表面具有酶活性的 TM-PRSS2 竞争性结合 SARS-CoV-2 的 S 蛋白,抑制宿主细胞表面的 TMPRSS2 对病毒 S 蛋白的裂解激活,从而阻断病毒与宿主细胞的膜融合,进而阻断 SARS-CoV-2 的感染。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人胚肾细胞系 HEK293T 购自武汉普建生物科技有限公司,在 37 °C、5% CO₂ 培养条件下,传代于有 1% 青霉素-硫酸链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基中。人肺腺癌细胞系 Calu3 购于上海富衡细胞库,在 37 °C、5% CO₂ 培养条件下,传代于有 1% 青霉素-硫酸链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 MEM (Modified Eagle's Medium) 培养基中。HeLa 细胞购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC),在 37 °C、5% CO₂ 培养条件下,传代于有 1% 青霉素-硫酸链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中。人结肠腺癌细胞系 Caco2 购自 ATCC,在 37 °C、5% 的 CO₂ 培养条件下,传代于有 1% 青霉素-硫酸链霉素、10% 胎牛血清和 1% 丙酮酸钠的 MEM 培养基中。人胚肾悬浮细胞 FreeStyle™ 293F 购于赛默飞世尔科技公司,利用缓冲底三角培养瓶,在 37 °C、5% 的 CO₂、120 r/min 悬浮培养箱条件下,传代于 FreeStyle™ 293F 表达培养基中。

1.2 质粒构建

PLVX-FLAG-TMPRSS2-Puro 购自武汉森灵生物科技有限公司,在它的基础上将 255 位氨基

酸 AGG 点突变为 CAG, 得到 PLVX-FLAG-TM-PRSS2-R255Q-Puro 质粒, 在此突变的基础上将 441 位氨基酸 AGT 点突变为 GCT, 得到 PLVX-FLAG-TMPRSS2-R255Q+S441A-Puro。随后, 以双突变的 PLVX-FLAG-TMPRSS2-R255Q+S441A-Puro 为模板, 使用限制性内切酶 *Sac* I (GAGCTC) 和 *Xho* I (CTCGAG), 将双突变的 TMPRSS2 构建到 pINFUSE-hIgG2-FC 蛋白表达载体(购自 Invivo-GEN 公司)上。所需引物见表 1。

1.3 TMPRSS2 重组蛋白的表达和纯化

为制备 TMPRSS2(106–492)R225Q+S441A-FC 蛋白, 将 293F 细胞扩培至 300 mL, 当密度达到 2×10^6 mL⁻¹ 时平均分到两个摇瓶中, 每个摇瓶中 150 mL, 向每个摇瓶中各补 120 mL 新鲜培养基至 270 mL 的终体积。随后, 使用转染试剂 Polyplus FectoPRO (购自法国 Polyplus Transfection 公司), 按照如下条件: 转染的质粒(μg): 总培养基(mL)=1:2; 转染试剂(μL): 质粒(μg)=1.5:1; 辅助转染试剂 Booster 在培养基中的用量为 0.45 μL/mL, 瞬时转染表达质粒 pINFUSE-TMPRSS2 (106–492) R225Q+S441A-hIgG2-FC (含该蛋白质编码序列)。处理 3 d 后, 检测细胞活率, 收集部分上清液, 初步检测蛋白质在上清中的表达; 6 d 后, 收集上清液, 用 Protein G 柱(GE Healthcare)经亲和层析纯化可溶性蛋白。

1.4 免疫印迹

向瞬时转染了 TMPRSS2 三种突变体的 HEK-293T 细胞中加入 IP-Buffer 裂解液(本实验室配制), 冰上裂解 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液到新的 EP 管中, 弃沉淀, 加适量的 5×上样缓冲液(本实验室配制), 95 °C 加热 5 min, 通过 SDS-PAGE 将蛋白质条带分离开来。将凝胶上的蛋白质条带转移到甲醇激活的 PVDF 膜上, 转膜完成后分别使用脱脂牛奶封闭 1 h, 采用特异性的一抗(图 1A 中的一抗为购自日本 GNI 公司的 anti-Flag monoclonal antibody; 图 1B 中的一抗为购自

表 1 主要引物信息
Table 1 The sequences of primers in this study

Primer	Sequence (5'→3')
TMPRSS2-R255Q-F	GAACCTCAAGCCGCCAGAGCCAGATCGTGGCCGGCGAGAGCCGC
TMPRSS2-R255Q-R	GCTCTCGCCGCCACGATCTGGCTCTGGCGCTTGAGTTCAAGTT
TMPRSS2-S441A-F	CGTCGATTCTGCCAGGGTGACGCTGGAGGGCCTCTGGTCACCTTC
TMPRSS2-S441A-R	GACCAGAGGCCCTCCAGCGTCACCTGGCAAGAACATCGACGTTTC
pINFUSE-TMPRSS2- FC-F (<i>Sac</i> I)	TCACGAATTCTCGACGAGCTCGTGGAAAGTTCATGGCAGCAACTG
pINFUSE-TMPRSS2- FC-R (<i>Xho</i> I)	CACTCCACAGATCTCTCGAGGCCGTCTGCCCTCATTT

武汉普建生物科技有限公司的 anti-mouse IgG-FC antibody), 按照 1:1 000 的比例用脱脂牛奶配制后于 4 ℃孵育过夜, 利用对应的二抗(图 1 中的二抗都是购自赛默飞世尔科技公司的 goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, HRP), 按照 1:2 000 的比例用脱脂牛奶配制后在常温孵育 2 h, 随后使用化学发光显影液, 将 PVDF 膜置于 ChemiDoc™ XRS+ 化学发光成像系统进行曝光, 结果图片使用 Image Lab 进行分析。

1.5 免疫荧光显微技术

将 HeLa 细胞种至直径 1.5 cm 的孔板中, 待细胞密度达到 40%~50% 时, 用 pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤。用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 再用 0.5% Triton X-100 溶液处理细胞 20 min, 然后加入 5% 的牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)作为阻断缓冲液, 室温封闭 1 h。加入用 5% BSA 溶液稀释的一抗(1:1 000)于 4 ℃孵育过夜, 吸弃一抗后, 加入带荧光的二抗 FITC。实验所用的一抗为 Abclonal-hTMPRSS2 Ab, 相应的 FITC 标记的二抗(1:500)购自 Beyotime Biotechnology。细胞核使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)于室温下避光染色 15 min, 然后在 OLYMPUS FV3000 共聚焦显微镜下进行观察。

1.6 SARS-CoV-2 假病毒的包装

SARS-CoV-2 假病毒是使用 VSV 假病毒系统生产的^[25]。在转染前一天, 制备 HEK293T 细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 mL⁻¹, 其中 15 mL 转入 T75 细胞培养瓶中, 在 37 ℃、5% 的 CO₂ 条件培养箱中孵育过夜。当过夜培养的细胞达到 70%~90% 的密度时, 将表达刺突蛋白 S 的 DNA 质粒(购自北京义翘神州科技有限公司)与 psPAX2 (购自 Addgene 公司)、pLenti-Luc2 (购自武汉森灵生物科技有限公司)按照 1:1:2 的质量比进行转染。6 h 后, 用新鲜的含有 1% 青霉素-硫酸链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基替换, 再孵育 36 h, 收集含有假病毒的培养上清液, 离心后过滤(孔径为 0.45 μm), 并在 -80 ℃ 下保存待用。

1.7 感染程度的测定

在假病毒的包装过程中, 我们将荧光素酶的序列加入到系统, 故该假病毒也可以表达荧光素酶, 该荧光素酶可以与荧光素酶的底物反应, 通过荧光强度显示病毒感染细胞的效率。假病毒感染前 24 h, 将 HEK293T、Calu3 或 Caco2 细胞接种

于 96 孔板(JET BIOFIL), 每孔 1×10^4 个细胞。待第 2 天细胞贴壁后, 将包装好的假病毒上清每孔 100 μL 加入到种好细胞的 96 孔板内, 细胞培养箱中培养 36 h 后, 吸弃上清, 再向 96 孔板中每孔加入 30 μL 的细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 随后收集裂解液到 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 5 μL 上清液与荧光素酶底物 20 μL 混合, 15 s 内用 LUMINOMETER 机器检测混合物的荧光。

1.8 中和实验测试

在假病毒感染前, 每孔 1×10^4 个 Calu3 细胞接种于 96 孔板(JET BIOFIL)。将 TMPRSS2 重组蛋白按照 30 μg/mL 的量加入 Calu3 细胞中。37 ℃ 孵育 1 h 后, 将 100 μL 的 SARS-CoV-2 假病毒加入混合物中孵育 36 h。取荧光素酶底物(20 μL/孔)至 1.5 mL EP 管中, 再向 EP 管中加 5 μL 细胞裂解上清。混匀后将 EP 管转移到 LUMINOMETER 中, 通过测定生物发光来确定其感染能力。

1.9 数据分析

所有数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。采用 Prism 计算机软件制图。

2 结果

2.1 TMPRSS2 突变体的构建及蛋白质纯化

报道显示, TMPRSS2 的实际裂解位点是 Arg-255-Ile-256 键, 如果蛋白酶活性结构域催化三联体中的第 441 位丝氨酸突变为丙氨酸(S441A), 则 TMPRSS2 失去蛋白酶活性^[26]。

基于这一报道, 我们构建了 TMPRSS2 突变体重组蛋白。该重组蛋白不具有蛋白酶活性, 也不会发生自剪切, 是 TMPRSS2 全长的胞外段。我们在 HEK293T 中分别过表达野生型和突变型的 TMPRSS2, 结果显示, 在野生型的 TMPRSS2 (WT-TMPRSS2) 中明显观察到细胞相关的 C 端切割片段, 但在 TMPRSS2 的 R255Q (剪切位点) 突变体和 S441A (酶活位点) 突变体以及二者的双突变体中只能观察到很少的切割(图 1A), 这证实了 TTSP-TMPRSS2 的剪切形式确实是通过自催化活性产生的。我们在 HEK293T 中过表达 R255Q、S441A 和 R255Q+S441A 这 3 种 TMPRSS2 突变体蛋白, 发现这 3 种蛋白质大多数都作为全长 70 kD 的酶原形式存在(图 1A)。该结果与之前的报道相一致, TTSPs 是作为非活性的单链原酶(酶原)合成

的, 在运输到细胞表面期间或之后发生自裂解, 形成活性形式^[26-27]。

随后, 我们在真核细胞 293F 中表达双突变体的 TMPRSS2 蛋白, 转染 6 d 后收集细胞上清, 发现双突变的 TMPRSS2 重组蛋白能正常表达, 并且以全长二聚体的形式分泌到上清中(图 1B)。

2.2 假病毒感染宿主细胞体系的建立

为了研究纯化的 TMPRSS2 突变体重组蛋白对 SARS-CoV-2 的抑制活性, 我们在体外构建了假病毒感染细胞的体系: 构建 SARS-CoV-2 S 蛋白携带水疱性口炎病毒(ΔG-VSV/荧光素酶)假病毒用作细胞感染。VSVG (疱疹性口腔炎病毒糖蛋白 G)是一种包膜蛋白, 因为这种抗原在很多细胞表面都能找到对应的受体, 所以这个包膜蛋白具有广泛的宿主范围。病毒通过包膜蛋白与宿主细胞识别后, 继而通过内吞作用进入细胞。因此, 本研究使用 VSVG 作为病毒能够感染进宿主细胞的阳性对照。

用包装好的 VSVG 和 SARS-CoV-2 假病毒分别感染 HEK293T 细胞系、Calu3 细胞系和 Caco2 细胞系。曾有文献报道, ACE2 的融合蛋白对病毒感染具有显著的阻断效果^[28]。因此我们使用纯化的人的 ACE2 融合蛋白作为阻断病毒感染的阳性对照。图 2 的结果显示: 在 HEK293T 细胞系和 Calu3 细胞系中, 病毒感染率较高, 且感染能被 ACE2 融合蛋白显著阻断。相关文献报道, Calu3 细胞系中有内源性的 TMPRSS2 稳定表达, 而 HEK293T 中没有 TMPRSS2 的表达^[1]; 在本研究中, 图 2 的结果显示, 假病毒感染 Caco2 细胞的效率较低。因此, 我们最终选定 Calu3 细胞系作为 TMPRSS2 研究的主要细胞载体, 并使用目前的病毒感染体系用于后续的研究。

2.3 TMPRSS2 重组蛋白能够阻断 SARS-CoV-2 假病毒的感染

相关研究报道, 非特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂 camostat 处理, 可使 SARS 冠状病毒对 Calu3

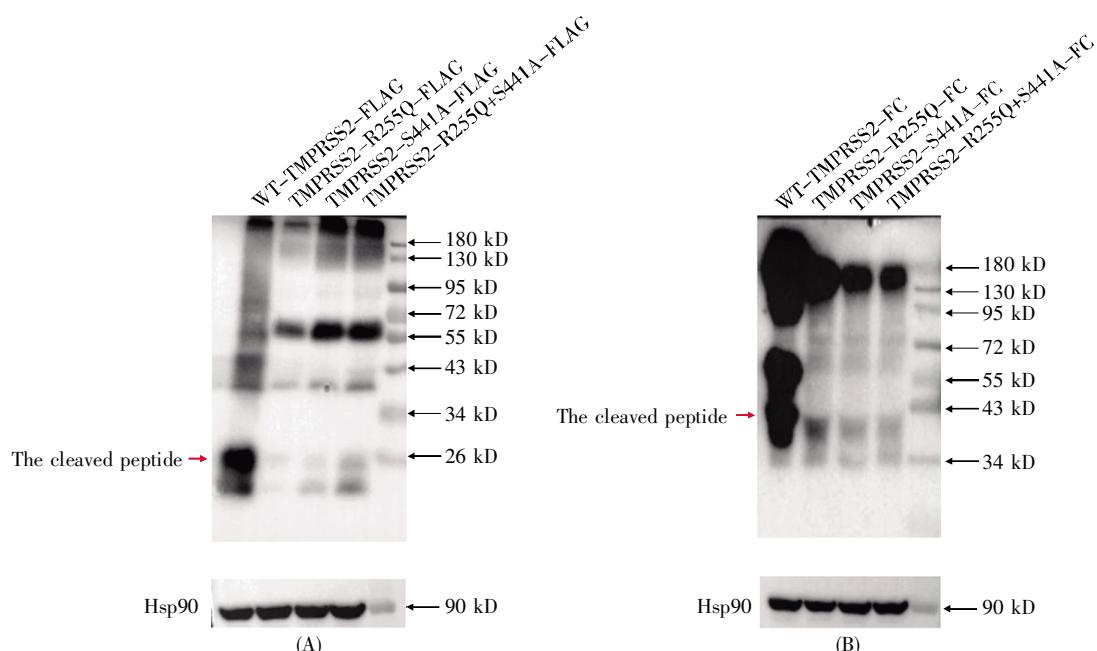


图 1 TMPRSS2 突变体的构建及蛋白质纯化

(A) TMPRSS2 的自剪切形式。将野生型 TMPRSS2 及 3 种突变体瞬时转染进 HEK293T 细胞, 48 h 后收集细胞冰上裂解, Western-blot 技术分析带 FLAG 标签的几种 TMPRSS2 突变体蛋白质条带的位置, 最右侧条带为蛋白质 marker; (B) TMPRSS2 重组蛋白的纯化。将构建成功的(从左到右) WT-TMPRSS2-FC、TMPRSS2-R255Q-FC、TMPRSS2-S441A-FC 和 TMPRSS2-R225Q+S441A-FC 的 pINFUSE 表达质粒转染到 293F 细胞中, 6 d 后收集细胞培养上清, 提纯蛋白质后进行 Western-blot 分析, 最右侧条带为蛋白质 marker。

Fig.1 Construction and protein purification of TMPRSS2 mutant

(A) Self-shearing form of TMPRSS2. The wild-type TMPRSS2 and three mutants were transiently transfected into HEK293T cells. The cells were collected for ice lysis 48 h later. The TMPRSS2 mutants labeled with FLAG were analyzed by Western-blot. The rightmost lane is the protein marker; (B) Purification of TMPRSS2 recombinant protein. The constructed pINFUSE plasmids expressing WT-TMPRSS2-FC, TMPRSS2-R255Q-FC, TMPRSS2-S441A-FC and TMPRSS2-R225Q+S441A-FC were transfected into 293F cells. Six days later, the purified proteins were collected from the supernatants of cell cultures and analyzed by Western-blot. The right most lane is the protein marker.

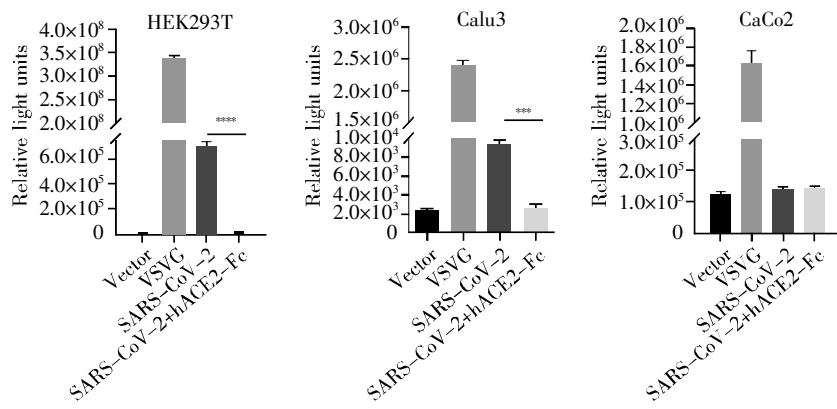


图 2 假病毒感染宿主细胞体系的建立

SARS-CoV-2 假病毒是使用 VSVG 假病毒系统生产的^[25]。用包装好的 VSVG 和 SARS-CoV-2 假病毒依次感染 HEK293T、Calu3 和 Caco2 这 3 种细胞系，将 hACE2-Fc 融合蛋白按照 30 μg/mL 的量加入宿主细胞以阻断 SARS-CoV-2 假病毒的感染，vector 和 VSVG 分别用作病毒感染进细胞的阴性和阳性对照(***: P<0.001; ***: P<0.000 1)。

Fig.2 Establishment of host cell system infected with pseudovirus

SARS-CoV-2 pseudovirus was produced using VSVG pseudovirus system^[25]. The HEK293T, Calu3 and Caco2 cell lines were infected with packaged VSVG and SARS-CoV-2 pseudovirus successively. The hACE2-Fc fusion protein was added into host cells at a concentration of 30 μg/mL to block the infection of SARS-CoV-2 pseudovirus. The vector and VSVG were used as negative and positive controls, respectively, for virus infection of cells (***: P<0.001; ***: P<0.000 1).

细胞的感染相比较未处理的对照组降低 90%^[24]。这在我们的实验结果中也得到了证实：camostat 抑制剂能够显著阻断 SARS-CoV-2 假病毒感染细胞(图 3A)。图 3B 显示，我们纯化的人的 R255Q 和 S441A 双突变 TMPRSS2 重组蛋白(hTMPRS-S2-Fc)也能抑制 SARS-CoV-2 病毒的感染，但是其抑

制效果并不像 camostat 抑制剂那样显著，其原因可能是：在病毒感染的过程中，S 蛋白的激活除了依赖 TMPRSS2 蛋白酶，还有可能依赖其他的蛋白酶，例如组织蛋白酶 B/L (已有文献报道，组织蛋白酶 B/L 的抑制剂也能有效阻断 SARS-CoV-2 病毒的感染)^[16]。综上所述，TMPRSS2 在病毒感染

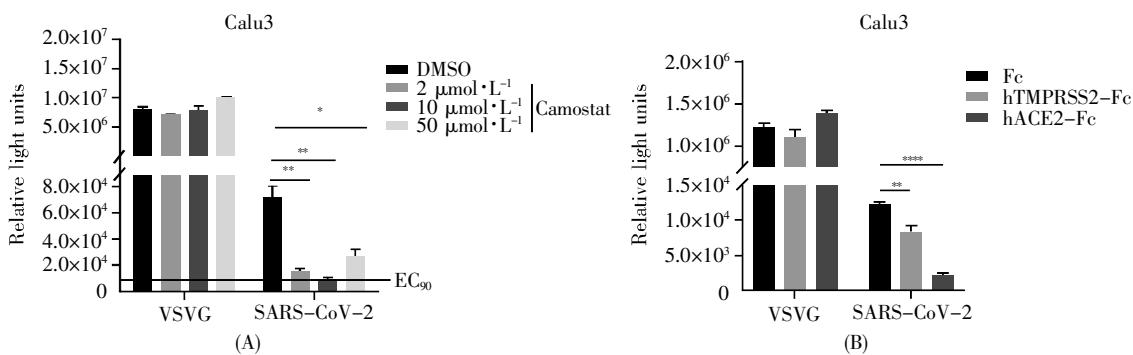


图 3 TMPRSS2 重组蛋白阻断假病毒的感染

(A) TMPRSS2 抑制剂阻断 SARS-CoV-2 假病毒感染的效果。将 TMPRSS2 抑制剂 camostat 按照 2 μmol/L、10 μmol/L 和 50 μmol/L 的梯度加到铺有 Calu3 细胞的 96 孔板中，37 °C 孵育 1 h 后，将 100 μL 的 SARS-CoV-2 假病毒上清加入混合物中孵育 36 h，通过测定生物发光来确定其感染能力。^{*}: P<0.05, ^{**}: P<0.01; (B) TMPRSS2 重组蛋白阻断 SARS-CoV-2 假病毒感染的效果。将 TMPRSS2 双突变重组蛋白和 hACE2-Fc 融合蛋白按照 30 μg/mL 的量加到铺有 Calu3 细胞的 96 孔板中，37 °C 孵育 1 h 后，将 100 μL 的 SARS-CoV-2 假病毒上清加入混合物中孵育 36 h，通过测定生物发光来确定其感染能力。^{**}: P<0.01, ^{****}: P<0.000 1。

Fig.3 Prevention of pseudovirus infection by TMPRSS2-Fc protein

(A) The blocking effect of TMPRSS2 inhibitors on pseudovirus infection. Camostat, a TMPRSS2 inhibitor, was added into the 96-well plate of Calu3 cells at a gradient level (2 μmol/L, 10 μmol/L and 50 μmol/L). After incubation at 37 °C for 1 h, 100 μL SARS-CoV-2 pseudovirus supernatant was added into the mixture and incubated for 36 h. The infectivity was determined by bioluminescence measurements. ^{*}: P<0.05, ^{**}: P<0.01; (B) The blocking effect of TMPRSS2-Fc protein on pseudovirus infection. The double mutated TMPRSS2 recombinant protein and hACE2-Fc fusion protein were added into the 96-well plate of Calu3 cells at a concentration of 30 μg/mL. After incubation at 37 °C for 1 h, 100 μL SARS-CoV-2 pseudovirus supernatant was added into the mixture and incubated for 36 h. The infectivity was determined by bioluminescence measurements. ^{**}: P<0.01, ^{****}: P<0.000 1.

过程中发挥了重要的作用,很有可能成为阻断病毒感染的潜在靶点。

2.4 野生型 TMPRSS2 定位在 HeLa 细胞表面

TMPRSS2 是Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶,属于TTSPs家族,表达在细胞质膜上,其丝氨酸蛋白酶活性区域位于C端胞外段^[3]。TMPRSS2作为一种膜蛋白,在病毒入侵宿主细胞时发挥酶活,切割并激活病毒的S蛋白。我们假设TMPRSS2作为一种膜蛋白,能够成为宿主细胞表面阻断病毒感染的靶点。因此,我们在HeLa细胞中过表达野生型的TMPRSS2,并使用TMPRSS2的特异性一抗与HeLa细胞孵育,随后用FITC绿色荧光二抗标记TMPRSS2,最后在FV3000共聚焦显微镜下观察TMPRSS2的细胞定位情况。我们发现,野生型的TMPRSS2定位在细胞膜表面(图4),证明TMPRSS2在细胞膜上的稳定表达确实能够作为阻断病毒入侵的潜在靶点,这为未来针对TMPRSS2的药物研发提供了新的思路。

3 讨论

本研究表明,TMPRSS2双突变的重组蛋白能有效抑制SARS-CoV-2假病毒感染Calu3细胞,这和非特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂camostat的功能基本一样,二者都能够有效抑制SARS-CoV-2假病毒感染细胞。有报道称,在TMPRSS2敲除的细胞中,SARS-CoV的S蛋白可以利用内吞体半胱

氨酸蛋白酶CatB/L启动S蛋白^[16]。然而,由TM-PRSS2,而不是CatB/L,启动的S蛋白是病毒通过受体进入原代靶细胞感染宿主细胞的必要条件^[1]。我们的研究发现,SARS-CoV-2假病毒感染Calu3细胞能够被TMPRSS2重组蛋白和camostat不同程度的抑制,但不能完全阻断,这可能是因为除了TMPRSS2以外,CatB/L也可以激活SARS-CoV-2的S蛋白,从而促进SARS-CoV-2病毒的感染^[16]。总的来说,根据已有的文献,TMPRSS2是一种宿主细胞因子,对包括甲型流感病毒和冠状病毒在内的几种临床相关病毒的传播至关重要^[29-30];相比之下,TMPRSS2对于宿主细胞的发育和稳态并不是不可或缺的^[31],因此,封闭或者干涉TMPRSS2的功能为抗新型冠状病毒感染的研究提供了新的思路。虽然丝氨酸蛋白酶抑制剂camostat可以阻断TMPRSS2的活性,在日本也已被批准用于人新型冠状病毒感染治疗的临床试验,但患者出现了严重的副反应。因此,该化合物仍需进行改构以降低副作用,从而用于治疗SARS-CoV-2感染患者^[32]。相比较之下,TMPRSS2蛋白显示出较好的阻断效果。TMPRSS2重组蛋白的治疗可能规避掉抑制剂化合物对人体造成的严重副作用。在未来,研究人员还可以筛选出TMPRSS2特异性的封闭抗体,从而阻断病毒的感染。总之,该研究为阻断SARS-CoV-2感染的第一步——病毒进入细胞提供了新的见解,并确定了TMPRSS2很有可

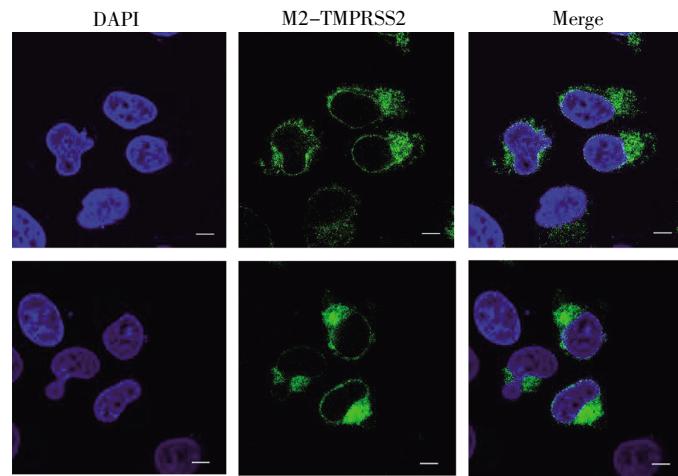


图4 野生型 TMPRSS2 定位在 HeLa 细胞表面

瞬时转染PLVX-M2-FLAG到HeLa细胞,使用Abclonal-hTMPRSS2 Ab一抗及相应的FITC标记的二抗进行免疫荧光染色,然后在FV3000共聚焦显微镜下进行观察。比例尺: 5 μm。

Fig.4 Wild-type TMPRSS2 localization on the surface of HeLa cells

PLVX-M2-FLAG was transiently transfected into HeLa cells. The primary antibody was Abclonal-hTMPRSS2 Ab, and the corresponding FITC-labeled secondary antibody was used for immunofluorescence staining. Then observation was performed under FV3000 confocal microscope. Scale bar: 5 μm.

能成为抗新型冠状病毒干预的潜在靶点。

参考文献(References):

- [1] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271–280.e8.
- [2] GLOWACKA I, BERTRAM S, MÜLLER M A, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(9): 4122–4134.
- [3] PAOLONI-GIACOBINO A, CHEN H M, PEITSCH M C, et al. Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA, and SRCR domains and maps to 21q22.3[J]. *Genomics*, 1997, 44(3): 309–320.
- [4] NETZEL-ARNETT S, HOOPER J D, SZABO R, et al. Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer[J]. *Cancer Metastasis Reviews*, 2003, 22(2/3): 237–258.
- [5] SZABO R, BUGGE T H. Type II transmembrane serine proteases in development and disease[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40(6/7): 1297–1316.
- [6] SZABO R, WU Q Y, DICKSON R B, et al. Type II transmembrane serine proteases[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 90(2): 185–193.
- [7] HAMMING I, TIMENS W, BULTHUIS M L C, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis[J]. *The Journal of Pathology*, 2004, 203(2): 631–637.
- [8] DING Y Q, WANG H J, SHEN H, et al. The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China[J]. *The Journal of Pathology*, 2003, 200(3): 282–289.
- [9] TO K F, LO A W I. Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)[J]. *The Journal of Pathology*, 2004, 203(3): 740–743.
- [10] DONALDSON S H, HIRSH A, LI D C, et al. Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(10): 8338–8345.
- [11] KIDO H, OKUMURA Y, TAKAHASHI E, et al. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses[J]. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 2008, 3(1): 167–175.
- [12] WHITE J M, DELOS S E, BRECHER M, et al. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 43(3): 189–219.
- [13] MATSUYAMA S, TAGUCHI F. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(21): 11133–11141.
- [14] BOSCH B J, BARTELINK W, ROTTIER P J M. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(17): 8887–8890.
- [15] HUANG I C, BOSCH B J, LI F, et al. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(6): 3198–3203.
- [16] SIMMONS G, GOSALIA D N, RENNEKAMP A J, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(33): 11876–11881.
- [17] SIMMONS G, REEVES J D, RENNEKAMP A J, et al. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, 101(12): 4240–4245.
- [18] YANG Z Y, HUANG Y, GANESH L, et al. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(11): 5642–5650.
- [19] MATSUYAMA S, UJIKE M, MORIKAWA S, et al. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(35): 12543–12547.
- [20] SCHOWALTER R M, SMITH S E, DUTCH R E. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(22): 10931–10941.
- [21] SHIROGANE Y, TAKEDA M, IWASAKI M, et al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(17): 8942–8946.
- [22] MATSUYAMA S, NAGATA N, SHIRATO K, et al. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(24): 12658–12664.
- [23] SHULLA A, HEALD-SARGENT T, SUBRAMANYA G, et al. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(2): 873–882.
- [24] KAWASE M, SHIRATO K, VAN DER HOEK L, et al. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(12): 6537–6545.
- [25] NIE J H, LI Q Q, WU J J, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 680–686.
- [26] AFAR D E, VIVANCO I, HUBERT R S, et al. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(4): 1686–1692.
- [27] MIYAKE Y, YASUMOTO M, TSUZUKI S, et al. Activation of a membrane-bound serine protease matrيلpase on the cell surface[J]. *Journal of Biochemistry*, 2009, 146(2): 273–282.
- [28] LEI C H, QIAN K W, LI T, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2070.
- [29] IWATA-YOSHIKAWA N, OKAMURA T, SHIMIZU Y, et al. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection [J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(6): e01815–e01818.
- [30] GIER S, BERTRAM S, KAUP F, et al. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies[J]. *Virology*, 2013, 87(10): 5502–5511.
- [31] KIM T S, HEINLEIN C, HACKMAN R C, et al. Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(3): 965–975.
- [32] YAMAMOTO M, MATSUYAMA S, LI X, et al. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of Middle East respiratory syndrome coronavirus S protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(11): 6532–6539.