

SARS-CoV-2 感染机制分析与 COVID-19 治疗药物研究进展

王康泓

(深圳大学 生命与海洋科学学院, 中国广东 深圳 518060)

摘要: 具有潜伏期长、感染性强、人群普遍易感和传播方式多样等特点的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 已在全球多个国家流行。然而, 当下并没有相关的特效药物和疫苗能对其引发的 2019 冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 进行针对性预防和救治。目前, 针对 SARS-CoV-2 及其引发的 COVID-19 的相关理论研究和临床分析已取得了一定进展。本文就 SARS-CoV-2 的基因组分析与溯源、受体血管紧张素转换酶 II (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 与病毒入侵过程和致病过程的关系以及当前 COVID-19 治疗药物等 3 个方面的研究进行综述, 以期在疫情后续发展存在的风险和 COVID-19 相关潜在药物的寻找提供参考。

关键词: 序列分析; 发病机制; 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2); 潜在药物

中图分类号: Q93, R373.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2020)06-0442-10

Research Progress of SARS-CoV-2 Infection Mechanisms and COVID-19 Therapeutic Medicines

WANG Kang-hong

(College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China)

Abstract: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been prevalent among more than 200 countries around the world. It has a long incubation period, strong infectivity, and various modes of transmission. People are generally susceptible to it. At present, there are no specific drugs and vaccines that can treat or prevent the coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the virus. However, notable progress has been achieved in theoretical researches and clinical analysis of SARS-CoV-2 and COVID-19. This article summarized the viral genome and origin analysis, the relationship between the receptor angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and the viral infection and pathogenesis, as well as current COVID-19 therapeutic drugs, in hope of providing a reference for awareness of future epidemic risks and searching for potential antiviral drugs.

Key words: sequence analysis; pathogenesis; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); potential medicines

(Life Science Research, 2020, 24(6): 442~451)

由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的疾病于 2020 年 2 月 11 日被世界卫生组织命名为 2019 冠状病毒病 (coronavirus

disease 2019, COVID-19)^[1-2], 其蔓延是近 20 年世界范围内第 3 次冠状病毒大流行。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV^[3] 和中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-

CoV)^[4]同为冠状病毒,但与它们相比,SARS-CoV-2 具有传染性强^[5-7]、潜伏期长^[6]、人群普遍易感^[7]、早期感染症状不明显及存在无症状感染者^[8]等特点,这些特点将更利于 SARS-CoV-2 在人群间传播。多项研究表明,在缺乏人为干预的条件下,SARS-CoV-2 的基本再生数(R_0)将高于 SARS-CoV 和 MERS-CoV^[5-7],这与目前 SARS-CoV-2 在世界范围内蔓延的现状相符。此外,SARS-CoV-2 可通过密切接触传播、飞沫传播、粪口传播等多种方式传播^[9-10],丰富的传播方式使 SARS-CoV-2 具有更强的适应能力,可广泛流行于不同国家和地区。截至 2020 年 11 月 25 日,全球范围内超 200 个国家出现了 COVID-19 患者 58 900 547 名,死亡人数达到 1 393 305^[11]。尽管 COVID-19 疫情在我国本土得到了较好的控制,但随着疫情在世界范围内的流行,防疫工作依旧严峻,对 SARS-CoV-2 的深入研究仍十分有必要。因此,本文将从 SARS-CoV-2 基因组序列分析及其溯源、由血管紧张素转换酶 II (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 介导的病毒入侵过程和《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(第三版至第七版)提出的 COVID-19 现有治疗药物 3 个方面,对 SARS-CoV-2 的遗传特点、传播方式、感染致病机理及其引起的 COVID-19 的现有及潜在有效药物展开综述。

1 SARS-CoV-2 的基因组序列分析及溯源

1.1 SARS-CoV-2 的序列分析

基于序列同源性比对及系统发育分析的生物信息学手段在预测病毒基因组结构及其编码产物、估算病毒突变速率、追溯病毒起源及其进化等过程中起到重要作用。通过对国家基因组科学数据中心早期发布的 5 株 SARS-CoV-2 毒株的基因组序列(序列号分别为 GWHABKF000000000、GWHABKG000000000、GWHABKH000000000、GWHABKI000000000、GWHABKJ000000000)进行分析可知,SARS-CoV-2 基因组全长约 29.8 kb,其正链编码 12 个氨基酸组成数超过 75 的蛋白质^[12]。研究表明,SARS-CoV-2 基因组从 5'端至 3'端的组成顺序为 5'非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)、病毒复制酶系(open reading frame 1ab, ORF-1ab)编码区、刺突蛋白(spike protein, S)编码区、包膜蛋白(envelope protein, E)编码区、膜蛋白(membrane protein, M)编码区、核衣壳蛋白(nucleopro-

tein, N)编码区和 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)^[9, 13]。值得一提的是,SARS-CoV-2 具有典型的 β -冠状病毒的序列末端特征^[9]。

针对上述 5 株 SARS-CoV-2 的基因组序列的比对结果显示,它们在非编码区的 104、111、112、119、120、124 位及编码区的 3 778、6 996、7 866、8 388、8 987 位存在核苷酸差异^[12],提示 SARS-CoV-2 基因组中某些位点易发生突变,且这些突变已出现在早期(2020 年 1 月 26 日前)分离的毒株中。其他研究结果显示,SARS-CoV-2 基因组在 6 943、8 737、8 789、11 739、20 646、20 655、24 031、27 469、28 120、28 151、28 299 位存在多个易突变位点^[14-15],进一步验证了该病毒的高突变率^[16]。进一步分析可知,除 3 778、6 943、11 739、27 469、28 120 位点发生同义突变外,其余突变位点的核苷酸变化将引起其编码蛋白质的一级结构发生改变,从而对蛋白质的极性、构象、活性产生影响。以上结果意味着 SARS-CoV-2 可能在传播的过程中通过变异产生多种特点各异的毒株,并相应地进化出新的传播途径和入侵逃逸机制。已有研究发现,SARS-CoV-2 通过自然突变引入了一个 β -冠状病毒所不具备的 Furin 蛋白酶切位点,该变异不但提升了病毒的入侵效率,而且对 SARS-CoV-2 的入侵机制具有一定影响,使其感染宿主的方式可能更接近于人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)和埃博拉病毒^[17]。可预见地,针对 SARS-CoV-2 的药物及疫苗研发将因为该病毒的突变而变得更加困难。

此外,基于基因组序列分析结果进行的 SARS-CoV-2 分型及病毒变异速率估算的相关研究也取得了一定的进展。一项以 103 个 SARS-CoV-2 基因组序列为样本的群体遗传学分析结果表明,可根据 SARS-CoV-2 基因组中 8 782 位和 28 194 位这一对关联性单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)将该病毒分为 S 与 L 两个亚型;与其他冠状病毒基因组序列的比对结果显示,S 型 SARS-CoV-2 为更古老的毒株;针对不同亚型毒株表达产物的分析结果显示,新产生的 L 型毒株具有更强的传染性 & 攻击性,在疫情流行初期传播得较为迅速,但随着“封城”等强力干预措施的执行,毒力较低的 S 型毒株可能因为其传播的隐蔽性而得到更广泛传播^[18]。早期的研究表明,在自然界的冠状病毒中每个核苷酸每年的平均突变速率约为 10^{-4} ^[15, 19]。根据已有

的 SARS-CoV-2 基因组数据推测, 该病毒的突变速率为 $1.19 \times 10^{-3} \sim 1.31 \times 10^{-3}$ [20], 与同为冠状病毒属的 SARS-CoV (每个核苷酸每年发生 $1.16 \times 10^{-3} \sim 3.30 \times 10^{-3}$ 次同义突变及 $1.67 \times 10^{-3} \sim 4.67 \times 10^{-3}$ 次非同义突变) 和 MERS-CoV (每个核苷酸每年发生 1.12×10^{-3} 次突变) 具有同一数量级的突变频率 [21-22], 提示 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的进化速率大致相同, 但快于自然界冠状病毒的平均进化速率。

综上所述, SARS-CoV-2 基因组序列的解析为病毒基因组结构及各基因表达产物的预测提供了直接证据, 其序列比对结果在揭示该病毒存在大量易突变位点的同时, 也为病毒的分型及进化速率的估算提供了数据支持。随着 COVID-19 流行时间的增加, SARS-CoV-2 将不可避免地产生大量突变。因此, 对 SARS-CoV-2 潜在突变位点进行监视并预测突变后病毒的表型对 COVID-19 的防控具有指导作用。更重要的是, 除了对已明确的 L 型和 S 型毒株进行监控外, 还需进一步检测是否有毒力更低的新型毒株出现。更具隐蔽性的低毒力毒株可能会造成大批无症状感染者的出现, 并引起 COVID-19 的二次流行。此外, 利用 SARS-CoV 和 MERS-CoV 基因表达产物构建无复制能力的高滴度假病毒的研究已经取得成功, 提示构建模拟 RNA 病毒状态的 SARS-CoV-2 假病毒具有一定可行性 [23-24]。假病毒的构建可推动 SARS-CoV-2 的免疫学研究, 为相关药物及疫苗的研发奠定基础。因此, 对 SARS-CoV-2 序列进行深入研究仍十分必要。

1.2 SARS-CoV-2 的溯源

SARS-CoV-2 及相关冠状病毒的基因组系统发育分析结果显示, SARS-CoV-2 是一种 *Sarbecovirus* 亚属的新型 β -冠状病毒 [15]。研究者对同为冠状病毒属的 SARS-CoV 和 MERS-CoV 进行传播途径溯源, 发现它们分别通过蝙蝠-果子狸-人途径和蝙蝠-骆驼-人途径进行传播并最终感染人类 [25-27]。基于上述结果推测 SARS-CoV-2 很可能也通过“天然宿主-中间宿主-人”的模式进行传播。

目前, 研究者普遍认为蝙蝠是 SARS-CoV-2 的天然宿主。全基因组序列分析结果显示, SARS-CoV-2 与 BatCoV RaTG13 的基因组相似性高达 96% 以上, 提示 SARS-CoV-2 大概率起源于蝙蝠 [18, 28]。另一项基于 β -冠状病毒基因组特有的互

补回文序列及其编码区的溯源分析结果显示, SARS-CoV-2 来自于菊头蝠 [26]。尽管目前仍不确定 SARS-CoV-2 具体源于哪一种蝙蝠, 但蝙蝠是该病毒天然宿主的结论基本没有争议。

对于 SARS-CoV-2 的中间宿主, 目前存在较大分歧。Yang 等 [9] 根据多种动物分离出的冠状病毒毒株序列的同源性比对结果得出, 蛇与穿山甲是 SARS-CoV-2 的潜在中间宿主, 但 Zhang 等 [29] 通过大数据集的生物信息学分析反驳了蛇是该病毒中间宿主的推断。尽管 SARS-CoV-2 与穿山甲冠状病毒具有较高的同源性 [18], 但有研究发现, SARS-CoV-2 具有穿山甲冠状病毒所不具备的 PRRA 肽段, 提供了感染人类的 SARS-CoV-2 并非直接来源于穿山甲的证据 [20]。此外, 一项基于密码子偏好性的研究发现, 在 SARS-CoV-2 基因组中编码精氨酸的“CGG”密码子的相对频率为 3.14%, 与蝙蝠的 2.59% 存在一定差距, 提示该病毒从天然宿主传播到人类的过程中存在至少 1 种利用“CGG”密码子相对频率较高的动物作为过渡; 该研究团队根据 SARS-CoV-2 检测阳性的动物样品及华南海鲜市场交易的动物推断, 狐狸和鹿可能是 SARS-CoV-2 的中间宿主 [17]。

在利用中间宿主作为传播媒介的同时, 冠状病毒在不同宿主体内发生的遗传重组将促进其进化, 进而产生对人类更具威胁的新表型 [9, 19]。此外, SARS-CoV-2 的长期流行可能使更多的动物成为宿主, 从而使其传播网络变得更加复杂。因此, 需要广泛地对不同国家和地区在不同时间分离的 SARS-CoV-2 毒株进行分析, 在明确该病毒中间宿主的同时根据宿主动物的活动轨迹及生活方式进行针对性防控。对 SARS-CoV-2 检测呈阳性的动物宜采取人为干预措施, 尽可能切断病毒的传播、进化途径。

2 ACE2 介导的病毒入侵机制

2.1 ACE2 的组织定位及生物学功能

刺突蛋白与宿主细胞表面受体的识别是冠状病毒侵入靶细胞的关键。针对 SARS-CoV-2 刺突蛋白结构模拟计算的结果显示, 该病毒具有与 SARS-CoV 相似的受体结合域 (receptor binding domain, RBD), 表明 SARS-CoV-2 也是通过宿主的 ACE2 侵入靶细胞 [25]。因此, 明确 ACE2 的组织定位及生物学功能对 COVID-19 发病机制的研究及相关药物的研发具有指导作用。

TCGA (The Cancer Genome Atlas)、FANTOM5 (Functional Annotation of the Mammalian Genome) 等数据库中单细胞 RNA 测序的结果显示, ACE2 在心脏的心肌细胞、肺泡的 II 型肺泡细胞(alveolar type II, AT2)、食道的层状上皮细胞、回结肠的上皮细胞、肾近端小管细胞、膀胱及尿路上皮细胞等多种细胞中高水平表达^[30-31], 提示以上多个器官或组织可能成为 SARS-CoV-2 的潜在感染位点。

ACE2 密切相关的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在人体内环境维持和炎症反应的过程中起重要的调节作用。该系统由 ACE-血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)-血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)轴与 ACE2-Ang1~7-Mas (Ang1~7 对应的受体) 轴组成, 且后者对前者具有拮抗作用^[32]。在 ACE2-Ang1~7-Mas 轴中, ACE2 作为经典 RAS 系统的拮抗剂, 通过降低 Ang II 的水平起到维护心血管功能、对抗炎症反应等作用; Ang1~7 可减少巨噬细胞的浸润并降低单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子的水平, 在炎症反应的对抗中起重要作用^[32]。正常条件下, RAS 轴间的活性水平处于动态平衡, 相应系统的功能也保持稳定^[33-34]。若 ACE2 的水平出现下降, RAS 轴间的动态平衡将因为 ACE2 拮抗作用的下调而打破, ACE-Ang II-AT1R 轴介导的炎症反应加重, 使机体受到相应的炎症损伤^[35]。综上所述, ACE2 作为经典 RAS 轴的抑制剂, 可通过减轻 ACE-Ang II-AT1R 介导的炎症反应降低机体受到的炎症损伤, 最终对相应器官或组织起到保护作用。

2.2 ACE2 在病毒入侵及 COVID-19 发展过程中行使的生物学功能

冠状病毒对宿主靶细胞的感染需先后经历 S1 蛋白介导的受体结合过程和 S2 蛋白介导的膜融合过程^[28], 前过程中病毒刺突蛋白与细胞受体的相互作用是病毒得以特异性侵入的关键。针对 SARS-CoV 感染机制的研究发现, ACE2 基因敲除小鼠对 SARS-CoV 的敏感性较低, 该小鼠因感染产生的肺损伤和病毒滴度远低于野生型小鼠^[36], 说明 ACE2 的表达是 SARS-CoV 入侵和致病的关键。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的 RBD 高度相似, 该特征在揭示 ACE2 是以上两种病毒的共同

入侵靶点的同时, 提示了它们可能具有相似的入侵机制和致病机理^[25]。因此, ACE2 的深入研究可进一步明确病毒入侵所造成的病理生理改变, 为 COVID-19 的诊疗提供支持。

COVID-19 患者的临床分析结果显示, 患者在出现发热、乏力、干咳、咽痛、腹泻、呼吸困难及双肺感染等临床症状的同时伴随着多种细胞因子水平升高^[5, 10, 37-39]。包括 IL-1B、IL-RA、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)、干扰素诱导蛋白-10 (interferon-inducible protein-10, IP-10)、MCP-1、巨噬细胞炎性蛋白 1A (macrophage inflammatory protein 1A, MIP1A)、MIP1B、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、TNF- α 、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在内的多种细胞因子的升高说明 COVID-19 患者免疫系统在对抗 SARS-CoV-2 感染的过程中引发了炎症因子风暴^[34, 37]。炎症因子风暴的引发将进一步造成急性肺损伤乃至器官衰竭, 使患者病情迅速恶化^[37]。对以上指标的进一步分析发现, ACE2 下调造成的 RAS 系统失衡的相关炎症因子 MCP-1、IL-6、TNF- α 参与了 COVID-19 炎症因子风暴的产生。此外, 有研究发现 COVID-19 患者血浆中 Ang II 的水平明显升高, 且该水平与 SARS-CoV-2 的滴度及肺损伤的严重程度密切相关^[37]。

以上研究结果表明, SARS-CoV-2 刺突蛋白与 ACE2 结合所产生的一系列病理生理改变是 COVID-19 发展的关键。SARS-CoV-2 感染后造成的改变如下: 在 SARS-CoV-2 感染的初期, 病毒的侵入及非特异性免疫系统的激活造成宿主相应组织中 ACE2 下调, 与之相关的 RAS 轴间的动态平衡随之被打破, 造成 Ang II 和包括 MCP-1、IL-6、TNF- α 在内的多种细胞因子的水平上升; 随着非特异性免疫系统的激活, 中性粒细胞和巨噬细胞向感染部位募集并活化, 在清除感染细胞的同时释放相应的炎症因子和趋化因子, 并在激发特异性免疫系统的同时进一步下调 ACE2 的表达水平^[34-35, 38, 40]。特异性免疫系统的激活将进一步扩大免疫反应, 引发炎症因子风暴, 最终造成

COVID-19 患者出现相应的脏器病变^[34-35]。因此,可尝试对 COVID-19 患者血浆的 Ang II、炎症因子风暴相关细胞因子和 C 反应蛋白、乳酸脱氢酶等肺部损伤相关指标进行检测,并根据这些指标的水平对 COVID-19 的发展做出预判,防止病情恶化^[36]。

为进一步揭示 ACE2 在 SARS-CoV-2 入侵及 COVID-19 发展过程中所行使的生物学功能,明确受体结合过程与 SARS-CoV-2 传染性、致病性的关系,研究者开展了针对冠状病毒刺突蛋白和受体 ACE2 的分子水平的研究。利用冷冻电镜对表达纯化的 S1 蛋白开展的生物物理分析显示, SARS-CoV-2 与人 ACE2 的结合能力是 SARS-CoV 的 10~20 倍^[41-42]。SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的同源性比对结果显示,尽管二者同源性高达 79%,但在其 RBD 的 6 个关键氨基酸残基中有 5 个不同,说明 SARS-CoV-2 与宿主的高亲和性与病毒 RBD 区域的进化相关^[18, 41, 43]。进一步的研究分析发现,包括 455 位亮氨酸残基、486 位苯丙氨酸残基、493 位谷氨酰胺残基和 494 位丝氨酸残基在内的多个 RBD 区域的氨基酸残基为病毒与人受体的结合提供了良好的相互作用;需要指出的是, RBD 区域 501 位的天冬酰胺残基与人 ACE2 的结合不理想^[44]。该结果说明, SARS-CoV-2 的 RBD 区域虽然对人 ACE2 受体具有一定的高亲和性,但仍存在一定的进化空间,当特定位点的氨基酸残基突变为与人 ACE2 亲和性更强的残基时,该病毒的感染能力和传播速度将进一步提升。

ACE2 及冠状病毒刺突蛋白相关分子水平的研究也有助于 COVID-19 潜在治疗方法的寻找。SARS-CoV 的早期研究显示,宿主的人肿瘤坏死因子- α 转化酶(tumor necrosis factor- α converting enzyme, TACE)、丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 和胰蛋白酶样蛋白酶 HAT 在病毒的入侵过程中起重要作用^[45-47]。TACE 是 SARS-CoV 入侵所必需的生物分子,体外细胞实验结果表明, TACE 抑制剂 TAPI-2 可通过阻断 SARS-CoV 受体结合过程中 TNF- α 产生的细胞信号降低病毒的感染能力^[47-48]。TMPRSS2 和 HAT 对冠状病毒刺突蛋白的切割为病毒活化所必需,且 TMPRSS2 对 ACE2 的切割将进一步促进病毒的进入^[46]。位于 ACE2 受体第 697~716 位的精氨酸残基和赖氨酸残基对 TMPRSS2 生物学功能的行使起重要作用,这些残基的突变将直接造成 TMPRSS2 对 ACE2 切割能力的下降^[46]。

由于 SARS-CoV-2 刺突蛋白与 ACE2 的结合也需要经历上述生物学过程,因此,对 TACE、TMPRSS2 和 HAT 具有抑制作用的相关药物可能对 COVID-19 的治疗具有较好的效果。此外,有研究根据 SARS-CoV-2 RBD 区域中保守的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartate, RGD)基序进行推测,认为整联蛋白可作为 SARS-CoV-2 入侵的替代受体,故该蛋白质也可能是 COVID-19 的潜在治疗靶点^[49]。

3 COVID-19 治疗药物的研究进展

3.1 《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》的推荐药物

国家卫生健康委员会于 2020 年 1 月 15 日至 3 月 3 日相继发布了七部试行版《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(下称《诊疗方案》),每一版《诊疗方案》的修订均结合了最新的治疗进展,其推荐的参考药物对 COVID-19 的治疗具有深刻的指导意义。

《诊疗方案》(试行第三版)在治疗 COVID-19 的推荐药物上提出了 4 点建议,分别是 α -干扰素的雾化吸入、使用洛匹那韦/利托那韦进行治疗、根据病情的进展使用糖皮质激素、根据基本病机特点推荐相应的中药处方^[50]。作为广谱的抗病毒药物, α -干扰素可通过诱导免疫系统和干扰病毒的复制阻止病毒的增殖^[51]。洛匹那韦是一种蛋白酶抑制剂,在艾滋病的治疗中得到广泛应用,该药物通过阻断 Gag-Pol 聚蛋白分裂使 HIV 无法产生有感染力的成熟病毒颗粒;利托那韦可抑制细胞色素 P450A 介导的洛匹那韦的快速代谢,提高血浆中洛匹那韦的浓度,二者常联合用药^[52]。冠状病毒基因组编码的木瓜样蛋白酶和 3C 样蛋白酶是冠状病毒增殖、侵染等生物学过程所必需的蛋白酶^[53-54],故推测洛匹那韦/利托那韦通过抑制 SARS-CoV-2 中毒蛋白酶的活性来阻止病毒的增殖和侵染。糖皮质激素的使用是一把“双刃剑”。一方面,糖皮质激素具有抗炎、免疫抑制、抗毒素的作用,早期合理的使用可减轻危重症 COVID-19 患者的炎症反应^[55-56]。另一方面,免疫抑制造成的 CD4 淋巴细胞下降不利于病毒的清除^[55],更严重的是,长期大剂量地使用糖皮质激素会造成股骨头坏死、骨质疏松等一系列严重的后遗症^[57-58]。因此,对于糖皮质激素的使用仍需要持谨慎的态度。《诊疗方案》(试行第四版)在明确洛匹那韦/利

托那韦具体用量的同时,提出恢复期血浆治疗、静脉注射血必净治疗、肠道生态调节剂治疗等治疗方案^[59]。此外,该版《诊疗方案》在中医药诊疗上明确了不同分型病人的临床表现,并根据病情进展的分型推荐了处方^[59]。《诊疗方案》(试行第五版及其修正版)提出了利巴韦林的使用并对其用量加以修正^[60-61]。利巴韦林的三磷酸代谢产物可作为病毒 RNA 合成的底物掺入到新合成的病毒基因组中,从而通过引发病毒的致死突变来抑制病毒的增殖^[51]。《诊疗方案》(试行第六版)在纳入阿比多尔和磷酸氯喹等推荐药物的同时,进一步明确了中西医结合的治疗方针^[62-63]。阿比多尔是一种膜融合抑制剂,该药物可能通过阻止 SARS-CoV-2 与人细胞膜的融合来阻断病毒的入侵^[51]。磷酸氯喹属于氨基喹啉类抗疟药物,可能通过干扰 ACE2 末端的糖基化和上调病毒膜融合过程的 pH 值来抑制 SARS-CoV-2 的感染;该药物的初步临床试验结果表明,磷酸氯喹在 COVID-19 的治疗中发挥了一定的作用^[51, 64]。《诊疗方案》(试行第七版)在进一步明确磷酸氯喹用量的同时提出,利用托珠单抗抑制 IL-6 引起的炎症因子风暴,以减轻炎症因子风暴造成的病情恶化^[65-66]。

结合了最新治疗进展的《诊疗方案》(试行第七版)对国内 COVID-19 的治疗具有深刻的指导作用。随着疫情在全球范围内的蔓延和国外对 COVID-19 研究的深入,其他国家发布的“诊疗指南”也具有一定的参考价值^[67]。疫情在不同国家和地区的时间流行,使得 SARS-CoV-2 因各地区环境及中间宿主的差异而进化出特点不同的新毒株。对其他国家的诊疗指南进行关注,可提前明确这些输入型新毒株的特点,并结合该地区的治疗方案对其引发的 COVID-19 进行治疗。此外,随着药物筛选及新药研发等工作的深入,国外“诊疗指南”中应用的药物也将为本土 COVID-19 的治疗提供更多的备选。

3.2 针对 ACE2 和毒蛋白酶等靶点的潜在药物

受体 ACE2 的存在和病毒基因组编码的毒蛋白酶生物学功能的行使是 SARS-CoV-2 得以入侵、增殖的关键。目前,针对 ACE2 受体和病毒毒蛋白酶等靶点的天然、人工合成药物在抑制 SARS-CoV 的研究中取得了一定进展^[68]。奈非那韦、缬氨霉素、氯硝柳胺、金精三羧酸、吡啶美辛等针对木瓜样蛋白酶和 3C 样蛋白酶的蛋白酶抑制剂在体外对 SARS-CoV 具有一定的抑制作用^[69]。一项基

于化学遗传学的研究对 50 240 个小分子进行了筛选,并初步鉴定出 104 种具有潜在抗 SARS-CoV 活性的小分子;进一步分析发现,化合物 MP576、VE607 分别对 SARS-CoV 的毒蛋白酶活性和病毒与 ACE2 的结合起抑制作用,而且体外活性鉴定结果显示,上述化合物具有一定的抗 SARS-CoV 能力^[70]。利用丙氨酸扫描技术对 ACE2 的带电氨基酸残基进行分析发现,ACE2 的第 26 位和第 30 位氨基酸残基对 SARS-CoV 与 ACE2 的结合十分重要^[71];基于此,该研究团队合成了一系列可能具有抗 SARS-CoV 的肽段,结果显示,由 ACE2 的第 22~44 位氨基酸残基组成的肽段和由 ACE2 第 22~57 位氨基酸残基组成的肽段具有明显的抗 SARS-CoV 活性,由 ACE2 第 22~44 位氨基酸残基和第 351~357 位氨基酸残基连接而成的肽段具有更加显著的抗病毒能力^[71]。

以上结果表明,包括小分子化合物和抗生素在内的蛋白酶抑制剂可能通过抑制冠状病毒基因组编码的木瓜样蛋白酶和 3C 样蛋白酶的催化活性来阻止病毒的增殖;具有与人 ACE2 功能性残基相似组成结构的人工肽可与病毒提前结合,通过阻断受体与病毒 RBD 区域的相互作用而达到抗病毒的效果。综上所述,基于 ACE2 和病毒毒蛋白酶等靶点的天然、人工合成药物可能成为 COVID-19 治疗的“特效药”,但鉴于 SARS-CoV-2 基因组的特异性,相关潜在药物的开发仍需要经历漫长的探索过程。

3.3 来源于中药的潜在活性成分

多项针对 COVID-19 患者进行的回顾性研究指出,中西医结合治疗能显著改善 COVID-19 患者的临床症状,在缩短轻重症患者治疗时间的同时降低重症的发生概率^[5, 72-73]。

随着网络药理学和生物信息学的发展,基于 TCMSP (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)、GeneCards、STRING、Enrichr、WebGestalt (WEB-based GENE Set Analysis Toolkit)等数据库进行的一系列药物网络构建、核心靶点和通路的筛选分析以及化合物分子对接模拟是目前对传统药方中潜在活性成分进行筛选的重要手段^[74-75]。研究者可根据生物利用度、类药性等条件在 TCMSP 数据库中获取药方的活性成分及药物作用的靶点;在 OMIM、GeneCards 等数据库中获取 COVID-19 相关靶点

并构建相应的药理网络;随后通过 STRING 等数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,并进一步利用 Enrichr、WebGestalt 等数据库进行 GO (Gene Ontology)功能富集分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)生物通路富集分析^[75-81]。经上述一系列分析可预测药方中的潜在有效化合物及其相应的调控靶点、相关通路等信息,并最终预测出最具治疗价值的核心成分。

目前,相关研究已对清肺排毒汤^[75]、三消饮^[76]、麻杏石甘汤^[77]、藿香正气汤^[78]、黄连解毒汤^[79]等多个传统药方进行了相应的网络药理学分析。研究结果表明,上述药方可能通过维持 RAS 相关通路的平衡、抑制补体系统激活、抑制炎症反应、参与免疫调节、抑制 SARS-CoV-2 3C 样蛋白酶活性和抑制 ACE2 与病毒的结合过程等多个方面抑制 COVID-19 的发展,揭示了中药在 COVID-19 治疗中发挥的多成分、多靶点、多通路的作用特点。

4 结语

SARS-CoV-2 具有潜伏期长、传染性强、人群普遍易感和传播方式多样等特点。随着全球范围内 COVID-19 患者的持续上升, SARS-CoV-2 的全球大流行已不可避免。更严重的是,从该病毒的特点和已有的抗病毒策略来看,距 SARS-CoV-2 的特效药物和相关疫苗的成功研发仍有一定距离。综上所述,对 SARS-CoV-2 的传播进行预防仍是现阶段阻止 COVID-19 蔓延的最有效方法。SARS-CoV-2 的传播方式提示:防止含病毒颗粒的飞沫及气溶胶的接触或吸入是阻止该病毒感染的关键^[82]。因此,可通过佩戴医用外科口罩及手部清洁等措施减少含病毒颗粒物质的接触与吸入;对于存在人员流动的密闭空间,可使用乙醚、75%乙醇、氯仿等消毒剂对病毒灭活^[83]。此外,随着复工复产工作的有序推进,完善疫情信息的监测更新、加快疑似病例的诊断等对现阶段所面临的聚集性疫情及院内感染的防止具有重要意义^[7]。

尽管目前对 SARS-CoV-2 的基因组及其传播途径有了初步的认识,但随着疫情在不同国家与地区的长时间流行,病毒不但会在人与人传播的过程中发生变异,而且“天然宿主-中间宿主-人”理论传播网络也将不可避免地因为其他物种的感染而变得更加复杂。不同中间宿主所介导的遗传重组将导致更多特点各异的毒株产生,使相关药物及疫苗的研发变得更加困难。因此,对不

同地区、不同时间段出现的毒株进行分离测序,对明确病毒的进化方向、寻找并切断病毒的进化传播途径具有重要意义。

针对 ACE2 及 SARS-CoV-2 刺突蛋白的研究表明,病毒刺突蛋白与受体结合后引发的一系列免疫反应和病毒本身造成的病理后果是 COVID-19 发展的关键。有关上述过程的分子生物学、细胞生物学、结构生物学和生物信息学的深入研究将进一步揭示 SARS-CoV-2 的传播、致病机制,为 COVID-19 控制及潜在药物的寻找提供思路。

《诊疗方案》推荐的药物结合了疫情发展过程中最新的研究进展,是目前 COVID-19 治疗中最可行有效的“武器”。随着 SARS-CoV-2 研究及相关药物临床试验的深入,潜在药物将得到进一步发掘^[84],从而为 COVID-19 的治疗提供更多备选药物。

此外, COVID-19 患者存在康复后复发和无症状感染等现象。一项基于 3 例 COVID-19 出院后核酸检测结果复阳患者的回顾性研究指出,在患者感染初期, SARS-CoV-2 *ORF1ab* 和 *N* 基因的核酸检测结果呈双基因强阳性,而二次入院时的报告显示双基因弱阳性,提示核酸检测结果复阳患者的病毒载量远低于其首次入院时的病毒载量^[85]。另一项回顾性研究指出, COVID-19 患者存在治愈后复发且病程与临床症状、实验室指标和影像学表现不同步的现象^[86]。也有研究发现, COVID-19 患者在病症消失后的一段时间内仍可检测出病毒的 RNA^[87-88]。以上信息提示, COVID-19 患者康复后复发可能与以下因素相关:第一, SARS-CoV-2 在体内的增殖存在消长过程,核酸检测的结果与病程不同阶段的核酸载量有关^[86];第二,患者症状消失后 SARS-CoV-2 的排毒仍在继续,患者体内仍携带有较低滴度的病毒;第三,核酸检测试剂的灵敏度、实验人员的操作手法、环境和唾液中的 RNA 酶导致病毒核酸降解及患者口腔、鼻咽部病毒量低等原因造成核酸检测漏检及假阴性,使部分患者在痊愈前出院,导致复发^[89]。一项基于 72 314 例 COVID-19 患者的流行病学调查显示,样本中约存在 1% (889 例)的无症状感染者^[90]。传染病中存在无症状感染者的现象已得到广泛认可, COVID-19 患者中无症状感染者的出现可能与人类基因的多态性、不同个体的抵抗力、不同毒株的毒力差异和处于潜伏期感染者被快速筛查等因素相关^[91]。

参考文献(References):

- [1] World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance, 28 January 2020[EB/OL]. [2020-04-16]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330893>.
- [2] World Health Organization. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020[EB/OL]. [2020-04-16]. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.
- [3] 祝庆余, 秦鄂德, 王翠娥, 等. 非典型肺炎病例标本中新型冠状病毒的分离与鉴定[J]. 中国生物工程杂志(ZHU Qing-yu, QING E-de, WANG Cui-e, *et al.* Isolation and identification of a novel coronavirus from patients with SARS[J]. China Biotechnology), 2003, 23(4): 106-112.
- [4] 耿兴义, 张济, 贾堂宏, 等. 中东呼吸综合征最新研究进展[J]. 山东大学学报(医学版) (GENG Xing-yi, ZHANG Ji, JIA Tang-hong, *et al.* Latest research progress of Middle East respiratory syndrome[J]. Journal of Shandong University (Health Sciences)), 2014, 52(7): 106-108.
- [5] 姚开涛, 刘明瑜, 李欣, 等. 中药连花清瘟治疗新型冠状病毒肺炎的回顾性临床分析[J]. 中国实验方剂学杂志(YAO Kai-tao, LIU Ming-yu, LI Xin, *et al.* Retrospective clinical analysis on treatment of coronavirus disease 2019 with traditional Chinese medicine Lianhua Qingwen[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae), 2020, 26(11): 8-12.
- [6] LI J Y, YOU Z, WANG Q, *et al.* The epidemic of 2019-novel-coronavirus (2019-nCoV) pneumonia and insights for emerging infectious diseases in the future[J]. Microbes and Infection, 2020, 22(2): 80-85.
- [7] 中华预防医学会新型冠状病毒肺炎防控专家组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征的最新认识[J]. 中国病毒病杂志(Special Expert Group for Control of the Epidemic of Novel Coronavirus Pneumonia of the Chinese Preventive Medicine Association. An update on the epidemiological characteristics of novel coronavirus pneumonia (COVID-19)[J]. Chinese Journal of Viral Diseases), 2020, 10(2): 86-92.
- [8] 李锦成, 徐勤, 王艳, 等. 江苏省扬州市新型冠状病毒肺炎无症状感染者特征分析[J]. 实用临床医药杂志(LI Jin-cheng, XU Qin, WANG Yan, *et al.* Analysis in characteristics of asymptomatic infection patients with coronavirus disease 2019 in Yangzhou City of Jiangsu Province[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice), 2020, 24(5): 10-13.
- [9] YANG Y, PENG F, WANG R, *et al.* The deadly coronaviruses: the 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China[J]. Journal of Autoimmunity, 2020, 109: 102434.
- [10] HOLSHUE M L, DEBOLT C, LINDQUIST S, *et al.* First case of 2019 novel coronavirus in the United States[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(10): 929-936.
- [11] World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard[EB/OL]. [2020-11-26]. <https://covid19.who.int/>.
- [12] 苏嘉洛, 王康泓, 杜成林. 2019 新型冠状病毒基因组序列分析对比及其可能药物的寻找[J]. 华西医学(SU Jia-luo, WANG Kang-hong, DU Cheng-lin. Genomic sequence analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and search for possible medicines[J]. West China Medical Journal), 2020, 35(3): 269-273.
- [13] WU F, ZHAO S, YU B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. Nature, 2020, 579(7798): 265-269.
- [14] CERAULO C, GIORGI F M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus[J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(5): 522-528.
- [15] LU R, ZHAO X, LI J, *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. The Lancet, 2020, 395(10224): 565-574.
- [16] WANG C, HORBY P W, HAYDEN F G, *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern[J]. The Lancet, 2020, 395(10223): 470-473.
- [17] 李鑫, 段广有, 张伟, 等. 2019 新型冠状病毒 S 蛋白可能存在于 furin 蛋白酶切位点[J]. 生物信息学(LI Xin, DUAN Guang-you, ZHANG Wei, *et al.* A furin cleavage site was discovered in the S protein of the 2019 novel coronavirus[J]. Chinese Journal of Bioinformatics), 2020, 18(2): 103-108.
- [18] TANG X, WU C, LI X, *et al.* On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2[J/OL]. National Science Review, 2020. DOI: 10.1093/nsr/nwaa036.
- [19] SU S, WONG G, SHI W, *et al.* Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses[J]. Trends in Microbiology, 2016, 24(6): 490-502.
- [20] LI X, ZAI J, ZHAO Q, *et al.* Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2[J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(6): 602-611.
- [21] ZHAO Z, LI H, WU X, *et al.* Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications[J]. BioMed Central Evolutionary Biology, 2004, 4: 21.
- [22] COTTEN M, WATSON S J, ZUMLA A I, *et al.* Spread, circulation, and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus[J]. mBio, 2014, 5(1): e01062-13.
- [23] 马建, 贺鹏飞, 赵晨燕, 等. SARS 和 MERS 中和抗体假病毒检测方法的建立[J]. 病毒学报(MA Jian, HE Peng-fei, ZHAO Chen-yan, *et al.* Development of SARS and MERS neutralization methods based on pseudoviruses[J]. Chinese Journal of Virology), 2019, 35(2): 189-195.
- [24] 黄维金, 王佑春. 假病毒技术在新发病毒性传染病防控产品评价中的应用[J]. 病毒学报(HUANG Wei-jin, WANG You-chun. The application of pseudotyped virus technology in the evaluation of prevention and control products for new emergent viral infectious disease[J]. Chinese Journal of Virology), 2020, 36(6): 1177-1186.
- [25] 朱小丽, 黄翠, 马丽丽, 等. 新型冠状病毒病(COVID-19)研究进展[J]. 中国生物工程杂志(ZHU Xiao-li, HUANG Cui, MA Li-li, *et al.* Research advances of novel coronavirus disease (COVID-19)[J]. China Biotechnology), 2020, 40(Z1): 38-50.
- [26] 陈嘉源, 施劲松, 丘栋安, 等. 2019 新型冠状病毒基因组的生物信息学分析[J]. 生物信息学(CHEN Jia-yuan, SHI Jin-song, QIU Dong-an, *et al.* Bioinformatics analysis of the 2019 novel coronavirus genome[J]. Chinese Journal of Bioinformatics), 2020, 18(2): 96-102.
- [27] 阮红梅, 张健之. 中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报(RUAN Hong-mei, ZHANG Jian-zhi. Research progress of Middle East respiratory syndrome-coronavirus (MERS-CoV)[J]. Chinese Journal of Zoonoses), 2014, 30(8): 848-854.
- [28] PARASKEVIS D, KOSTAKI E G, MAGIORKINIS G, *et al.* Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2020, 79: 104212.
- [29] ZHANG C, ZHENG W, HUANG X, *et al.* Protein structure and sequence reanalysis of 2019-nCoV genome refutes snakes as its intermediate host and the unique similarity between its spike protein insertions and HIV-1[J]. Journal of Proteome Research, 2020, 19(4): 1351-1360.
- [30] XU H, ZHONG L, DENG J, *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa[J]. International Journal of Oral Science, 2020, 12: 8.
- [31] ZOU X, CHEN K, ZOU J, *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection[J]. Frontiers of Medicine, 2020, 14(2): 185-192.
- [32] 陈皓, 姚思宇, 郑博文, 等. RAS 系统新通路 ACE2-Ang1-7-Mas 轴与心血管疾病的研究进展[J]. 慢性病学杂志(CHEN Hao, YAO Si-yu, ZHENG Bo-wen, *et al.* Research progress of ACE2-Ang1-7-Mas axis, a new pathway of RAS system, and cardiovascular diseases[J]. Chronic Pathematology Journal), 2019, 20(8): 1154-1158.
- [33] 刘映霞, 杨扬, 张聪, 等. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染患者肺损伤相关的临床及生化指标研究[J]. 中国科学: 生命科学(LIU Ying-xia, YANG Yang, ZHANG Cong, *et al.* Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury[J]. Scientia Sinica (Vita), 2020, 50(3): 258-269.

- [34] 张岩,唐德志,舒冰,等.基于肾素-血管紧张素系统评析新冠病毒致多脏器损伤作用及中药干预作用[J].世界科学技术-中医药现代化(ZHANG Yan, TANG De-zhi, SHU Bing, *et al.* Evaluation and analysis on the SARS-CoV-2-induced injuries in multiple organs and the intervention of traditional Chinese medicine based on renin-angiotensin system[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology), 2020, 22(2): 264-269.
- [35] 唐子健,李树仁,许文华,等.从2019-nCoV和SARS-CoV的侵袭靶点血管紧张素转化酶2寻找新型冠状病毒肺炎的救治策略[J].中国全科医学(TANG Zi-jian, LI Shu-ren, XU Wen-hua, *et al.* Searching therapeutic strategies of COVID-19 from angiotensin-converting enzyme 2: the receptor of 2019-nCoV and SARS-CoV[J]. Chinese General Practice), 2020, 23(9): 1071-1077.
- [36] KUBA K, IMAI Y, RAO S, *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury[J]. Nature Medicine, 2005, 11(8): 875-879.
- [37] HUANG C, WANG Y, LI X, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. The Lancet, 2020, 395(10223): 497-506.
- [38] 吴润东,尹梅梅,张凌娟.冠状病毒感染导致急性肺损伤的天然免疫机制研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版)(WU Run-dong, YIN Mei-mei, ZHANG Ling-juan. Research progresses in the innate immune mechanisms of acute lung injury by coronavirus infection[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science)), 2020, 59(3): 341-346.
- [39] 张维,侯维,李侗曾,等.74例新型冠状病毒肺炎临床特征分析[J].首都医科大学学报(ZHANG Wei, HOU Wei, LI Tong-zeng, *et al.* Clinical characteristics of 74 hospitalized patients with COVID-19[J]. Journal of Capital Medical University), 2020, 41(2): 161-167.
- [40] DE LANG A, OSTERHAUS A D, HAAGMANS B L. Interferon- γ and interleukin-4 downregulate expression of the SARS coronavirus receptor ACE2 in Vero E6 cells[J]. Virology, 2006, 353(2): 474-481.
- [41] LIU C, ZHOU Q, LI Y, *et al.* Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases[J]. ACS Central Science, 2020, 6(3): 315-331.
- [42] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. Science, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [43] XU X, CHEN P, WANG J, *et al.* Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission[J]. Science China (Life Sciences), 2020, 63(3): 457-460.
- [44] WAN Y, SHANG J, GRAHAM R, *et al.* Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus[J]. Journal of Virology, 2020, 94(7): e00127-20.
- [45] 郭俞利,卜敬华.冠状病毒感染过程中血管紧张素转换酶2作用的研究进展[J].厦门大学学报(自然科学版)(GUO Yu-li, BU Jing-hua. Research progress in the roles of angiotensin-converting enzyme 2 involving in coronavirus infection[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science)), 2020, 59(3): 334-340.
- [46] HEURICH A, HOFMANN-WINKLER H, GIERER S, *et al.* TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein[J]. Journal of Virology, 2014, 88(2): 1293-1307.
- [47] HAGA S, YAMAMOTO N, NAKAI-MURAKAMI C, *et al.* Modulation of TNF- α -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF- α production and facilitates viral entry[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2008, 105(22): 7809-7814.
- [48] HAGA S, NAGATA N, OKAMURA T, *et al.* TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds[J]. Antiviral Research, 2010, 85(3): 551-555.
- [49] SIGRIST C J, BRIDGE A, LE MERCIER P. A potential role for integrins in host cell entry by SARS-CoV-2[J]. Antiviral Research, 2020, 177: 104759.
- [50] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第三版)的通知[EB/OL]. [2020-04-16]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/f492c9153ea9437bb587ce2ffcbec1fa.shtml>.
- [51] 辛家东,王泽鹏,张法荣.中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎概述[J].安徽中医药大学学报(XIN Jia-dong, WANG Ze-peng, ZHANG Fa-rong. An overview of new coronavirus pneumonia treated by integrated traditional Chinese and western medicine[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine), 2020, 39(2): 4-8.
- [52] 沐俊,孙骥,马芳,等.洛匹那韦药代动力学的研究进展[J].药学实践杂志(MU Jun, SUN Ji, MA Fang, *et al.* Progress on pharmacokinetics of lopinavir[J]. Journal of Pharmaceutical Practice), 2012, 30(5): 336-339.
- [53] 杨宇东,孙莉,陈忠斌. SARS 冠状病毒 PLpro 蛋白酶的结构与功能[J].中国生物化学与分子生物学报(YANG Yu-dong, SUN Li, CHEN Zhong-bin. Structure and functions of papain-like protease of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 2010, 26(1): 15-21.
- [54] 童国珍,单玉飞,丁建芳,等. SARS 冠状病毒 3CL 蛋白酶多克隆抗体的制备及纯化[J].浙江理工大学学报(TONG Guo-zhen, SHAN Yu-fei, DING Jian-fang, *et al.* Preparation and purification of SARS-CoV 3CL protease polyclonal antibody[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University), 2008, 25(5): 543-546.
- [55] 张胜,李丹萍,陈华忠,等.糖皮质激素治疗一例危重型 COVID-19 患者炎症反应动态观察[J].浙江大学学报(医学版)(ZHANG Sheng, LI Dan-ping, CHEN Hua-zhong, *et al.* Dynamic inflammatory response in a critically ill COVID-19 patient treated with corticosteroids[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)), 2020, 49(2): 220-226.
- [56] 王伟良,郑宏,王雪涛,等.糖皮质激素在 SARS 治疗中的应用体会[J].中国药理学杂志(WANG Wei-liang, ZHENG Hong, WANG Xue-tao, *et al.* Application experience of glucocorticoid in the treatment of SARS[J]. Chinese Pharmaceutical Journal), 2006, 41(12): 956-957.
- [57] 王倩,张洁. SARS 治疗中应用糖皮质激素的不良反应[J].天津药学(WANG Qian, ZHANG Jie. Adverse effects of glucocorticoids in SARS treatment[J]. Tianjin Pharmacy), 2005, 17(4): 56-59.
- [58] 李光伟. SARS 治疗中应用糖皮质激素致糖尿病危险应予以重视[J].中华内分泌代谢杂志(LI Guang-wei. Be alert of the risk of glucocorticoid-induced diabetes in the management of severe acute respiratory syndrome[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism), 2004, 20(1): 1-2.
- [59] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第四版)的通知[EB/OL]. [2020-04-16]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/4294563ed35b43209b31739bd0785e67.shtml>.
- [60] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版)的通知[EB/OL]. [2020-04-16]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.
- [61] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版 修正版)的通知[EB/OL]. [2020-04-16]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/d4b895337e19445f8d728fc1e3e13a.shtml>.
- [62] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知[EB/OL]. [2020-04-16]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [63] 李修洋,宋斌,雷烨,等.《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)》中医诊疗方案解读[J].吉林中医药(LI Xiu-yang, SONG Bin, LEI Ye, *et al.* Interpretation of traditional Chinese medicine diagnosis and treatment program of Diagnosis and Treatment Program of COVID-19 (Trial Version 6)[J]. Jilin Journal of Chinese Medicine), 2020, 40(6): 701-708.
- [64] 臧明泉,任建琳,张莹瑄,等.中西医结合防治新型冠状病毒肺炎的研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化(ZANG Ming-quan, REN Jian-lin, ZHANG Ying-xuan, *et al.* Research progress of traditional Chinese medicine and modern medicine in prevention and treatment of the novel coronavirus pneumonia[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology), 2020, 22(3): 718-727.

- [65] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. [2020-04-16]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [66] 周密, 韩玲样, 胡必杰. 从《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》修订更新解析疾病认识进展[J]. 中华医院感染学杂志(ZHOU Mi, HAN Ling-yang, HU Bi-jie. Progress in cognition of revised and updated 'Guidelines for Diagnosis and Treatment of COVID-19'[J]. Chinese Journal of Nosocomiology), 2020, 30(13): 1921-1926.
- [67] 张飞扬, 陈刚. 中外新型冠状病毒肺炎的肺炎诊疗指南之异同[J]. 福建医药杂志(ZHANG Fei-yang, CHEN Gang. Similarities and differences in diagnosis and treatment guidelines for pneumonia caused by new coronavirus infections at home and abroad[J]. Fujian Medical Journal), 2020, 42(2): 12-15.
- [68] ZUMLA A, CHAN J F, AZHAR E I, *et al.* Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options[J]. Nature Reviews Drug Discovery[J]. 2016, 15(5): 327-347.
- [69] CHENG V C, LAU S K, WOO P C, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and re-emerging infection[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(4): 660-694.
- [70] KAO R Y, TSUI W H, LEE T S, *et al.* Identification of novel small-molecule inhibitors of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus by chemical genetics[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11(9): 1293-1299.
- [71] HAN D P, PENN-NICHOLSON A, CHO M W. Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor[J]. Virology, 2006, 350(1): 15-25.
- [72] 杨倩, 孙勤国, 江波, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎重症患者的回顾性临床研究[J]. 中草药(YANG Qian, SUN Qin-guo, JIANG Bo, *et al.* Retrospective clinical study on treatment of COVID-19 patients with integrated traditional Chinese and western medicine[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 2020, 51(8): 2050-2054.
- [73] 夏文广, 安长青, 郑娟娟, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎 34 例临床研究[J]. 中医杂志(XIA Wen-guang, AN Chang-qing, ZHENG Chan-juan, *et al.* Clinical observation on 34 patients with novel coronavirus pneumonia (COVID-19) treated with integrated traditional Chinese and western medicine[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine), 2020, 61(5): 375-382.
- [74] 牛明, 王睿林, 王仲霞, 等. 基于临床经验和分子对接技术的抗新型冠状病毒中医组方快速筛选模式及应用[J]. 中国中药杂志(NIU Ming, WANG Rui-lin, WANG Zhong-xia, *et al.* Rapid establishment of traditional Chinese medicine prevention and treatment of 2019-nCoV based on clinical experience and molecular docking[J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2020, 45(6): 1213-1218.
- [75] 吴昊, 王佳琪, 杨雨薇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术初步探索“清肺排毒汤”抗新型冠状病毒肺炎作用机制[J]. 药学报(WU Hao, WANG Jia-qi, YANG Yu-wei, *et al.* Preliminary exploration of the mechanism of Qingfei Paidu decoction against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology[J]. Acta Pharmaceutica Sinica), 2020, 55(3): 374-383.
- [76] 贺红安, 王晓, 宋哲, 等. 三消饮治疗新型冠状病毒肺炎的分子机制探究[J]. 中药材(HE Hong-an, WANG Xiao, SONG Zhe, *et al.* Study on the molecular mechanism of Sanxiao decoction in the treatment of novel coronavirus pneumonia[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials), 2020, 43(7): 1772-1776.
- [77] 张宏亮, 黄振光, 蒋霞, 等. 基于网络药理学研究加减麻杏石甘汤治疗重型新冠肺炎的作用机制[J]. 中药材(ZHANG Hong-liang, HUANG Zhen-guang, JIANG Xia, *et al.* Study on the mechanism of maxing shigan decoction in the treatment of the severe novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials), 2020, 43(7): 1777-1783.
- [78] 杜海涛, 王平, 马青云, 等. 藿香正气汤抑制新型冠状病毒复制过程的有效成分及机制初探[J]. 世界科学技术-中医药现代化(DU Hai-tao, WANG Ping, MA Qing-yun, *et al.* Preliminary study on the effective components and mechanism of Huo-xiang Zhengqi decoction in inhibiting the replication of novel coronavirus[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica—World Science and Technology), 2020, 22(3): 645-651.
- [79] 黄浪浪, 王建安, 徐弘, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制研究[J]. 中药材(HUANG Lang-lang, WANG Jian-an, XU Ri, *et al.* Study on mechanism of Huang-lianJiedu decoction in treating novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials), 2020, 43(3): 779-785.
- [80] 李嘉丽, 杨良俊, 周恒立, 等. 网络药理学及分子对接法探讨三仁汤主要成分对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的机制研究[J]. 中草药(LI Jia-li, YANG Liang-jun, ZHOU Heng-li, *et al.* Mechanism of sovereign medicines in Sanren decoction on COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 2020, 51(9): 2345-2353.
- [81] 刘静, 范梦月, 孙凯滨, 等. 基于分子对接柴胡桂枝干姜汤干预初期寒湿郁肺型新型冠状病毒肺炎的活性成分及功效作用机制探讨[J]. 中草药(LIU Jing, FAN Meng-yue, SUN Kai-bin, *et al.* Exploring active ingredients and function mechanism of Chaihu Guizhi Ganjiang decoction against coronavirus disease 2019 based on molecular docking technology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 2020, 51(7): 1704-1712.
- [82] 王鹏, 叶丹, 郑则广. 口罩在预防新型冠状病毒感染中的作用及其选择与使用[J]. 广东医学(WANG Peng, YE Dan, ZHENG Ze-guang. The role of masks in preventing new coronavirus infections and their selection and use[J]. Guangdong Medical Journal), 2020, 41(9): 865-868.
- [83] 李昌海, 李波, 雷珊珊, 等. 新型冠状病毒肺炎感染防治研究进展[J]. 中国药师(LI Chang-hai, LI Bo, LEI Shan-shan, *et al.* Advances in the prevention and treatment of corona virus disease 2019[J]. China Pharmacist), 2020, 23(6): 1168-1174.
- [84] WANG M, CAO R, ZHANG L, *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*[J]. Cell Research, 2020, 30(3): 269-271.
- [85] 秦维超, 孙贵银, 张运洪, 等. 3 例 COVID-19 出院后核酸复检阳性患者的检测分析[J]. 病毒学报(QING Wei-chao, SUN Gui-yin, ZHANG Yun-hong, *et al.* Patients with COVID-19 testing positive for nucleic acids of SARS-CoV-2 in re-examination after discharge from hospital: an analysis of three cases[J]. Chinese Journal of Virology), 2020, 36(4): 554-559.
- [86] 李玉柱, 师凌昊, 梁冬, 等. 症状好转后影像加重复检阳性新型冠状病毒肺炎 1 例思考[J]. 中华医院感染学杂志(LI Yu-zhu, SHI Ling-hao, LIANG Dong, *et al.* Imaging plus repeated positive test of COVID-19 of one patient after improvement of symptoms[J]. Chinese Journal of Nosocomiology), 2020, 30(17): 2588-2591.
- [87] ZHOU F, YU T, DU R, *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study[J]. The Lancet, 2020, 395(10229): 1054-1062.
- [88] ARASHIRO T, FURUKAWA K, NAKAMURA A. COVID-19 in 2 persons with mild upper respiratory tract symptoms on a cruise ship, Japan[J]. Emerging Infectious Diseases, 2020, 26(6): 1345-1348.
- [89] 李佳, 李霖, 李春辉, 等. 咽拭子新型冠状病毒核酸检测的临床价值[J]. 中国感染控制杂志(LI Jia, LI Lin, LI Chun-hui, *et al.* Clinical value of pharyngeal swab nucleic acid test of SARS-CoV-2[J]. Chinese Journal of Infection Control), 2020, 19(7): 585-590.
- [90] WU Z, MCGOOGAN J M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention[J]. JAMA, 2020, 323(13): 1239-1242.
- [91] 李凯, 廖端芳, 戴爱国. 无症状感染者与不可溯源病例在 SARS-CoV-2 感染和防控中的地位分析[J]. 中国动脉硬化杂志(LI Kai, LIAO Duan-fang, DAI Ai-guo. Analysis of the roles of asymptomatic and untraceable cases in SARS-CoV-2 spreading[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis), 2020, 28(5): 386-389.