

冠状病毒非结构蛋白 13 的研究进展

吴诚诚¹, 张帆帆¹, 汪娟², 李娜¹, 林翠^{1*}

1 江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330000

2 九江市动物疫病预防控制中心, 江西 九江 332000

吴诚诚, 张帆帆, 汪娟, 李娜, 林翠. 冠状病毒非结构蛋白 13 的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 419-433.
WU Chengcheng, ZHANG Fanfan, WANG Juan, LI Na, LIN Cui. Advances in the coronavirus nonstructural protein 13[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 419-433.

摘要: 冠状病毒能够引发多种传染性疾病, 给动物和人类的健康带来严重危害。研发有效的疫苗和抗病毒药物成为防治疾病的重要手段。冠状病毒基因组能够编码多种蛋白质, 包括结构蛋白、非结构蛋白和辅助蛋白。解旋酶非结构蛋白 13 (nonstructural protein 13, NSP13) 是冠状病毒编码的一种关键非结构蛋白, 能够调控病毒复制和宿主先天免疫反应。因此, NSP13 被认为是研发抗冠状病毒药物的重要靶点。本文结合国内外现有 NSP13 相关研究成果, 对冠状病毒解旋酶 NSP13 的来源与结构、序列保守性、解旋机制、酶抑制剂、蛋白互作以及免疫调控等方面进行综述, 并且分析了 NSP13 研究目前面临的问题, 为研发靶向 NSP13 的广谱抗冠状病毒药物提供了理论依据。

关键词: 冠状病毒; 非结构蛋白 13; 解旋机制; 酶抑制剂; 抗病毒药物

Advances in the coronavirus nonstructural protein 13

WU Chengcheng¹, ZHANG Fanfan¹, WANG Juan², LI Na¹, LIN Cui^{1*}

1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330000, Jiangxi, China

2 Jiujiang Animal Disease Prevention and Control Center, Jiujiang 332000, Jiangxi, China

Abstract: Coronaviruses pose significant threats to animal and human health, leading to the development of various infectious diseases. It is critical to develop effective vaccines and antiviral medicines to prevent and treat these diseases. The coronavirus genome encodes several types of proteins, including structural, nonstructural, and accessory proteins. Among them, nonstructural protein 13 (NSP13) helicase plays a crucial role in regulating viral replication and

资助项目: 国家自然科学基金(32160827); 江西现代农业科研协同创新项目(JXXTCXBSJJ202209)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160827) and the Modern Agricultural Scientific Research Collaborative Innovation Project of Jiangxi (JXXTCXBSJJ202209).

*Corresponding author. E-mail: lincui19880501@126.com

Received: 2023-07-04; Accepted: 2023-10-23

the innate immune response of the host. Therefore, it serves as a vital target for the development of anti-coronavirus drugs. This paper presents a comprehensive review of NSP13 research, covering its source, structure, sequence conservation, unwinding mechanism, enzyme inhibitors, protein interaction, and immune regulation. Additionally, the paper analyzes the current challenges in NSP13 research and aims to provide a theoretical foundation for the development of broad-spectrum antiviral drugs targeting NSP13.

Keywords: coronavirus; nonstructural protein 13 (NSP13); unwinding mechanism; enzyme inhibitors; antiviral drugs

冠状病毒在系统分类上属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属(Coronavirus),病毒包膜上有棘突,病毒颗粒在电镜下呈现皇冠状或日冕状^[1]。根据血清型和基因组特征,冠状病毒分为 α 、 β 、 γ 和 δ 这4个病毒属^[2],主要感染人类、鸟类和哺乳动物等^[3],引起宿主呼吸道、肠道、肝和神经系统疾病^[4]。 β 冠状病毒属的成员对人类危害最严重,例如2003年的严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)和2012年的中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)曾在全球暴发和流行^[5]。新型冠状病毒也被称为严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2),更是自2019年以来肆虐全球,给人类健康和世界经济带来了深重的灾难^[6-8]。 δ 属的猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种新兴的猪肠道致病性冠状病毒,但是2021年在海地3名儿童的血液中检测到PDCoV的变异株,说明猪冠状病毒PDCoV具备感染人的风险^[9]。

冠状病毒的基因组能够编码多种类型蛋白质,包括结构蛋白、辅助蛋白和非结构蛋白。其中,结构蛋白参与病毒对宿主的识别、侵入和释放等,辅助蛋白对病毒的复制具有重要影响^[10]。病毒基因组编码的多聚蛋白被蛋白酶水

解后产生15个或16个非结构蛋白(nonstructural proteins, NSP1-NSP16),以鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)为代表的 γ 属冠状病毒不产生NSP1^[11-12]。冠状病毒的非结构蛋白能够调控病毒基因组的复制与转录,参与蛋白翻译后的切割与修饰等过程^[13]。

解旋酶是一种能够利用三磷酸核苷(nucleoside triphosphate, NTP)水解产生的能量,重塑核酸或核酸-蛋白复合物构象的动力蛋白。解旋酶广泛存在于自然界几乎所有的生命体中,在许多细胞内生物学进程中都起着至关重要的作用,包括复制、转录、翻译、重组、DNA修复和核糖体生成等^[14-16]。多数病毒利用宿主的解旋酶进行复制,少数病毒能够直接编码解旋酶,例如冠状病毒编码的非结构蛋白NSP13就是一种解旋酶。通过对解旋酶结构和功能进行比较性分析,将解旋酶分为6个超级家族(superfamily, SF1-SF6)以及DnaB和Rho等小家族^[17-19]。冠状病毒编码的解旋酶NSP13属于SF1家族,是调控病毒复制的关键蛋白。NSP13能够水解NTP,并利用高能磷酸键断裂产生的能量解开核酸双链,且解旋过程具有一定的方向性^[20-21]。目前科研人员对不同冠状病毒的NSP13进行了研究,但研究的深入程度不尽相同,下面就冠状病毒非结构蛋白NSP13的研究进展进行综述。

1 NSP13 的来源和结构

冠状病毒是 RNA 病毒中基因组最长的病毒之一,基因组为全长 26–32 kb 不分节段的单股正链 RNA, 5'端具有甲基化的帽状结构, 3'端具有多聚腺苷酸[poly(A)]尾巴, 包含多个开放阅读框(open reading frames, ORFs)^[22–24]。以基因组长度为 28.5 kb 的猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)为例,绘制了 TGEV 基因组示意图(图 1A)。冠状病毒基因组中的 ORF1a 编码多聚蛋白 1a (polyprotein 1a), ORF1a 和 ORF1b 共同编码多聚蛋白 1ab (polyprotein 1ab)^[11–12]。多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab 被病毒编码的木瓜蛋白酶(papain-like protease, PLpro)和 3C 样蛋白酶(3-chymotrypsin-like protease, 3CLpro)水解产生多种非结构蛋白,包括解旋酶 NSP13^[25]。

冠状病毒编码的 NSP13 是一种高度保守的非结构蛋白, Adedeji 等^[26]将 MERS-CoV、SARS-CoV、鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)、TGEV 和 IBV 代表性毒株的 NSP13 氨基酸序列进行了比对,结果显示 MERS-CoV 与 SARS-CoV、MHV、TGEV 和 IBV 的 NSP13 序列一致性分别为 72.4%、67.2%、61.3%和 59.1%。Frick 等^[27]对 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的 NSP13 序列进行比对分析,发现 NSP13 序列相似性超过 90%, 两者只是相差一个第 570 位的氨基酸(V570I)。NSP13 具有 5 个结构域,分别是锌结合域(zinc-binding domain, ZBD)、Stalk 结构域、插入域 1B、“RecA-like”结构域 1A (Rec1A)和 2A (Rec2A), 目前并不完全清楚这些结构域的各自功能。Rec1A 和 Rec2A 是解旋酶的核心区域,其中 Rec1A 由 I、Ia、Ib、II 和 III 这 5 个保守的基序组成, Rec2A 由 IV、V 和 VI 这 3 个保守的基序组成。

Jia 等^[28]通过分析 SARS-CoV NSP13 的结构特征,发现 NSP13 的 5 个结构域之间相互配合完成 ATP 水解和核酸解旋过程,并且阐明了 NSP13 在核酸单链上的移位机制。Hao 等^[29]首次解析了 MERS-CoV NSP13 的晶体结构,揭示了 NSP13 由多个结构域构成,包括位于氨基(-NH₂)端的富含 Cys/His 残基的结构域(CH domain)、六链反向平行的 β -桶形结构域(1B domain)和位于羧基(-COOH)端的两个 RecA-like 解旋酶核心域(RecA1 和 RecA2), CH 和 RecA1 之间通过 2 个附加结构域组成的区域(Stalk domain)进行连接(图 1C)。Newman 等^[30]利用 X 射线晶体衍射技术,获得了 SARS-CoV-2 NSP13 在不同状态下的蛋白质三维结构,包括无配体结合状态、磷酸盐结合状态和非水解 ATP 类似物结合状态(图 1B),整体分辨率分别是 2.4、1.9、3.0 Å。结构分析揭示了在 AMP-PNP 复合物晶体中的 NSP13 呈现“开放”和“封闭”两种形式, NSP13 的 2 个药物可靶向口袋位于 SARS-CoV-2 蛋白质组中最保守的位点中。对冠状病毒 NSP13 结构生物学的研究,为深入探究 NSP13 作用机制和筛选靶向 NSP13 的抗病毒药物奠定了基础。

2 NSP13 解旋功能和影响因素

2.1 部分冠状病毒 NSP13 的解旋机制

解旋酶的常见解旋方式主要有两种,分别是局部扰动解旋和移位解旋。通过对来源于人类的 RNA 解螺旋酶 A (RNA helicase A, RHA) 进行研究,发现 RHA 是典型的移位解旋酶, RHA 需要先加载到双链核酸底物 3'端单链上,然后沿着 3'端到 5'端方向解旋,3'端单链及其长度对于 RHA 解旋功能的发挥至关重要^[31]。Yazdi 等^[32]研究揭示了 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的 NSP13 是一种定位在内质网膜上的动力蛋白,具有 NTP 依赖的解旋酶活性,能够利用 NTP

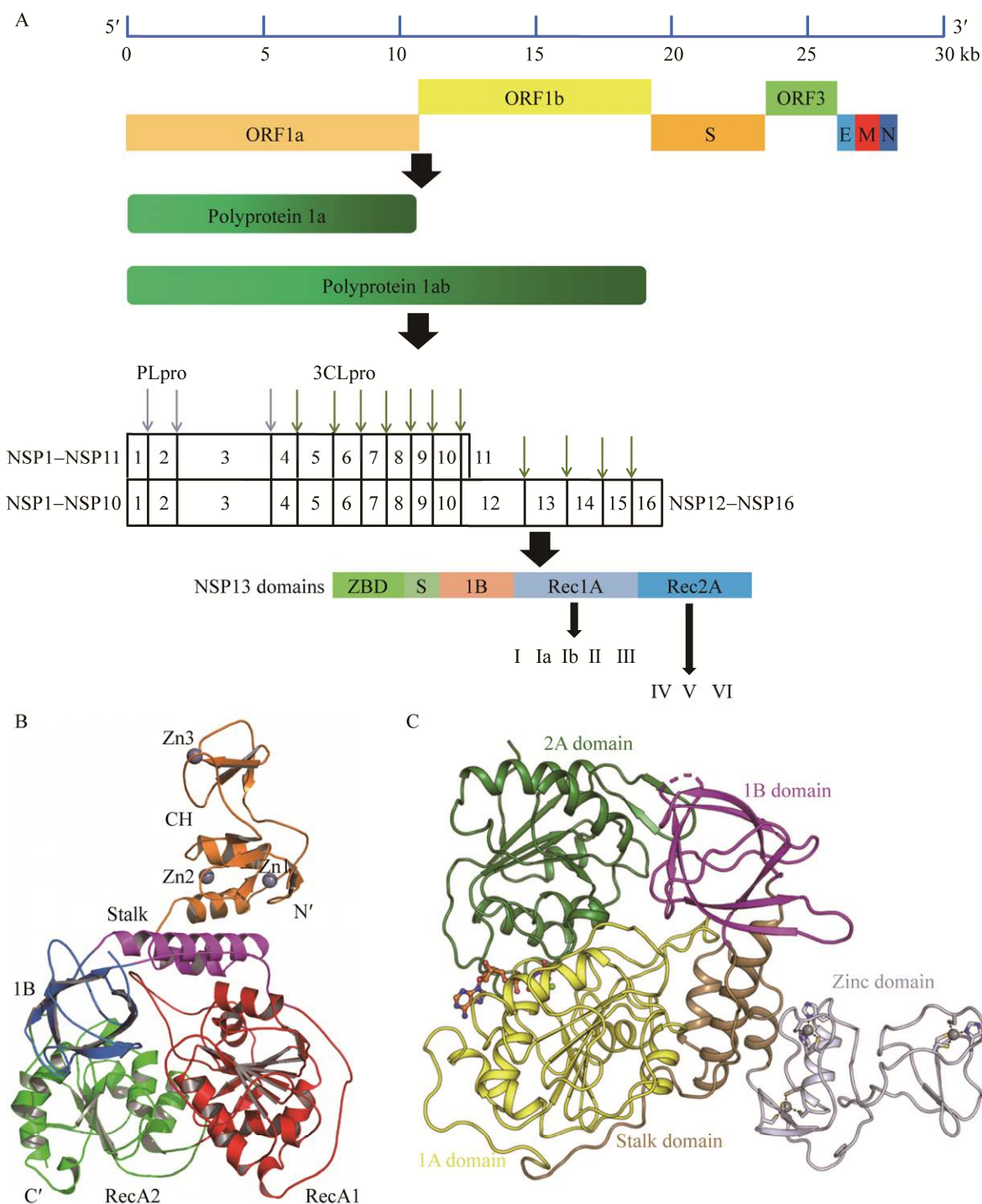


图1 冠状病毒非结构蛋白13的结构^[29-30] A: 猪冠状病毒 TGEV 基因组示意图. B: MERS-CoV NSP13 的整体结构^[29]. C: SARS-CoV-2 NSP13 的整体结构^[30]

Figure 1 The structure of coronavirus nonstructural protein 13^[29-30]. A: Schematic diagram of the porcine coronavirus TGEV genome. B: Overall structure of MERS-CoV NSP13^[29]. C: Overall structure of SARS-CoV-2 NSP13^[30].

水解产生的能量,从 5'到 3'定向移位解开双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)和 dsDNA。Adedeji 等^[20]发现 SARS-CoV 的 NSP13 能以约 280 bp/min 的速率解开 5'端单链长度至少是 5 nt 的双链核酸。MERS-CoV 的解旋酶 NSP13 也同样能够利用 NTP 水解供能,以 5'到 3'方向解开 dsRNA 和 dsDNA。MERS-CoV 的 NSP13 偏向解开 5'端单链较长的 dsRNA,5'端单链越长,dsRNA 解旋速率越快^[26]。上述研究均表明冠状病毒的 NSP13 也是一种移位解旋酶,但与 RHA 不同的是,NSP13 具有 5'→3'解旋极性,缺乏 5'端单链的双链核酸底物不能被 NSP13 解开。

Adedeji 等^[26]还发现 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 NSP13 解开 dsDNA 和 dsRNA 的速率和幅度相似,对底物没有偏好性。SARS-CoV NSP13 在解开 dsRNA 和 dsDNA 时具有近似相等的解旋初始速率^[20,33]。科研人员还探究了二价金属离子种类对 NSP13 解旋活性的影响,发现存在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 时, MERS-CoV NSP13 活性较强,能够解开超过 80%的 dsRNA,存在 Zn^{2+} 时则只有微弱的解旋活性,而存在 Ca^{2+} 时, NSP13 基本没有解旋活性^[26]。Sommers 等^[34]发现 dsRNA 的双链部分越长, NSP13 的解旋速率和最终解旋幅度越低,而且高浓度的 ATP 和 Mg^{2+} 也会抑制 NSP13 解旋活性。使用希尔方程 (Hill equation)拟合 NSP13 浓度和 dsRNA 解旋幅度呈现 S 型曲线,揭示了 SARS-CoV-2 NSP13 在发挥解旋活性时是多个蛋白分子协同作用。

NSP13 在底物的核酸链上移动解旋时,底物的核糖磷酸骨架的完整性影响 NSP13 的解旋能力。Sommers 等^[34]在底物 dsRNA 的加载链插入聚乙二醇链接器 (polyethylene glycol linker, PEG linker),破坏了 dsRNA 的核糖磷酸骨架的连续性,导致 NSP13 酶促的解旋幅度明显降低。Lee 等^[35]则是在底物双链上设计了多种间隙

(Gap),通过观察 SARS-CoV NSP13 对不同底物的解旋反应,发现多个 NSP13 蛋白分子可以通过间隙共同加载到底物上,而且间隙越大,底物被 NSP13 解开的比例越多,说明 NSP13 具有很强的持续解旋能力。

除了对人类冠状病毒的解旋酶 NSP13 进行研究外,学者们也对部分动物冠状病毒 NSP13 解旋机制展开了探索。猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是一种能够造成仔猪高死亡率的冠状病毒,严重危害养猪业发展。Ren 等^[36]发现在含有 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的反应溶液中, PEDV NSP13 能够水解任意 NTPs 释放能量,以 5'到 3'方向结合和解开 dsRNA 和 dsDNA,并且解开 dsDNA 的总体速率比 dsRNA 快,而存在 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 时, NSP13 几乎丧失水解 NTPs 和解旋活性,说明二价金属离子种类影响 PEDV 解旋酶 NSP13 的功能,而且 NSP13 的解旋具有 DNA 偏好性。通过研究发现 IBV NSP13 的解旋活性也具有 DNA 偏好性,高浓度 NSP13 具有促使解开的核酸单链重新退火形成双链的能力。除此,当溶液中存在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 时, dsRNA 和 dsDNA 都能够被 IBV NSP13 完全解开,当溶液中存在 Ca^{2+} 时, NSP13 发挥微弱解旋活性,而 NSP13 在含有 Zn^{2+} 溶液中则丧失了解旋活性 (相关研究结果待发表)。可见,在底物偏好性方面,动物与人类冠状病毒的解旋酶明显不同。根据上述关于 NSP13 的研究,绘制了冠状病毒 NSP13 解旋示意图 (图 2),解旋酶 NSP13 能够以 NTP 依赖的方式先定位在延伸出来的核酸单链上,然后依靠 NTP 水解产生的能量移位,逐渐解开双链核酸。

2.2 氨基酸突变和结构域缺失对 NSP13 功能的影响

非结构蛋白 13 结构域内部或者界面之间发生的氨基酸突变,对 NSP13 功能和病毒传播

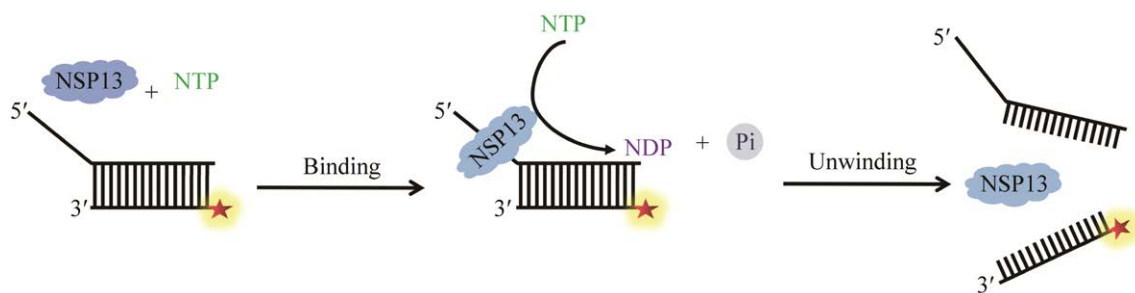


图 2 NSP13 解旋示意图

Figure 2 Schematic diagram of NSP13 unwinding.

有着破坏性影响^[37]。研究发现, MERS-CoV 和 SARS-CoV 非结构蛋白 NSP13 的第 288 位赖氨酸(lysine, K)是影响 NSP13 NTPase 活性和解旋酶活性的关键氨基酸^[28-29]。Ren 等^[36]将 PEDV NSP13 的第 289 位赖氨酸突变成丙氨酸(alanine, A), 发现 K289A 突变造成 NSP13 失去 NTPase 活性和解旋酶活性。而且, K289A 突变型 PEDV 难以被拯救成功, 表明 NSP13 的 K289 对病毒的存活也是至关重要^[36]。近年来禽传染性支气管炎(infectious bronchitis, IB)流行呈上升趋势, Fang 等^[38]发现 IBV NSP13 的第 132 位精氨酸(arginine, R)突变成赖氨酸或脯氨酸(proline, P), 导致 NSP13 丧失调控病毒复制的能力, 而且 IBV 丧失感染力, 病毒停止增殖。SARS-CoV-2 NSP13 能够与信号转导与转录激活因子 1 (signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) 发生相互作用, 阻止 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1) 磷酸化 STAT1。Fung 等^[39]发现 NSP13 的核酸结合缺陷突变体 K345A 和 K347A, 以及 NSP13 的 NTPase 缺陷突变体 E375A, 都失去了抑制 IFN- β 诱导 STAT1 磷酸化和转录激活的能力。

在冠状病毒 NSP13 的 5 个结构域中, 核心解旋域 Rec1A 和 Rec2A 也被称为经典解旋域, 结构域 ZBD 和 1B 之间通过 Stalk 相连接^[37]。Yue 等^[40]发现 Stalk 结构域的缺失会使 SARS-CoV-2

NSP13 丧失 NTPase 活性和解旋活性。而且, Stalk 结构域也为 ZBD 与核心解旋域之间提供了一个刚性连接, 此连接对于 NSP13 的解旋活性至关重要, 如果在两者间插入一个短的柔性接头, 破坏原有的刚性连接, 会使 NSP13 的热稳定性降低和结合 RNA 的能力减弱, 从而导致解旋活性受损, 但是 NTPase 活性没有变化^[40]。目前尚不完全清楚 NSP13 各种结构域的具体功能, 值得进一步深入研究, 这对解析 NSP13 的作用机制尤为重要。

2.3 NSP13 抑制剂的研究

冠状病毒引发了多种严重危害人类和动物健康的疾病, 研发有效的抗病毒药物对控制病毒传播和治疗疾病至关重要, 解旋酶 NSP13 被认为是研发抗冠状病毒药物最重要的靶标之一^[41-43]。设计可以竞争性结合 NSP13 的小分子化合物, 或者“老药新用”, 都是药物发现的重要策略。当靶向 NSP13 的药物与蛋白质的某些位点结合时, 可能会扰乱 NSP13 中多个结构域的通信网络, 导致 NSP13 结构和功能发生改变, 从而有效抑制冠状病毒的感染和复制。Wang 等^[44]发现天然化合物 ZINC12899676 能够直接靶向 PEDV NSP13 的 NTPase 活性区域, 导致酶蛋白构象改变, 进而通过降低 NSP13 的 NTPase 活性抑制病毒复制。

中药含有多种复杂的化学成分, 经过分离

与纯化可以得到具有多种功能活性的有效单体。研究发现杨梅黄酮和野黄芩素能够在体外实验中抑制 SARS-CoV 解旋酶 NSP13 的 NTPase 活性,但不影响解旋活性^[45-46]。纳摩尔浓度的杨梅黄酮、槲皮素、山奈酚和黄烷酮可抑制 SARS-CoV-2 NSP13 的解旋活性,微摩尔浓度的甘草黄酮 C 可同时阻断 SARS-CoV-2 NSP13 的解旋活性和 ATPase 活性^[47]。White 等^[41]发现鲁马卡托和千金藤素对 SARS-CoV-2 NSP13 的 ATPase 活性也存在抑制作用,两种药物的半抑制浓度(semi-inhibitory concentration, IC_{50})分别为 0.3、0.4 mmol/L。Ugurel 等^[48]应用高通量虚拟筛选和分子对接技术,从美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准的药物库中,筛选出 4 种针对野生型和突变型 SARS-CoV-2 NSP13 的候选抑制剂,分别是坎格雷洛、氟达拉滨、叶酸和虎杖苷。

SSYA10-001 是一种能够抑制 SARS-CoV NSP13 解旋活性的小分子化合物,但是 SSYA10-001 并不影响 NSP13 的 NTPase 活性,也不影响 NSP13 与核酸底物的结合,推测 SSYA10-001 可能是通过与 NSP13 特定位点结合,从而改变了 NSP13 在发挥解旋作用时的蛋白构象^[49-50]。枸橼酸铋钾(bismuth potassium citrate, BPC)、枸橼酸铋雷尼替丁(ranitidine bismuth citrate, RBC)和枸橼酸铋(bismuth citrate, BC)是常见的 3 种铋盐,其中 RBC 用于治疗胃肠疾病,BC 是 BPC 的中间体。Shu 等^[21]通过体外实验发现 3 种铋盐均能以剂量依赖性的方式抑制 SARS-CoV-2 NSP13 的 NTPase 活性和解旋活性,并且 BPC 和 RBC 抑制作用比 BC 强。Yuan 等^[51]发现 RBC 具有较低的细胞毒性,能够抑制 SARS-CoV-2 的复制,可使上呼吸道和下呼吸道的病毒载量明显减少,减轻肺炎症状。RBC 及其相关化合物通过铋(III)离子从酶中不

可逆地置换锌(II)离子,对 SARS-CoV-2 解旋酶 NSP13 的 ATPase 活性和解旋活性均有抑制作用。氯法齐明是一种具有良好安全性的抗麻风病药物,Yuan 等^[52]发现氯法齐明能够抑制冠状病毒 S 蛋白介导的细胞融合以及病毒解旋酶 NSP13 的活性,具有泛冠状病毒抑制作用,可以拮抗 SARS-CoV-2 和 MERS-CoV 在多个体外系统中的复制。氯法齐明也能够减少肺中的病毒载量和粪便中的病毒排出,并减轻与病毒感染相关的炎症。苯基吡啶酮衍生物 JIB-04 是一种 Jumonji 组蛋白去甲基化酶广谱抑制剂,具有显著的抗冠状病毒作用,并且能够改善因病毒感染引起的猪胃肠道组织损伤^[53-55]。格瑞弗森(Giffithsin, GRFT)是一种来源于红藻的外源凝集素,和 JIB-04 类似,也具有抗冠状病毒活性^[56]。推测 JIB-04 和 GRFT 的抗冠状病毒作用可能与调控 NSP13 活性有关,需要进一步实验研究和确认。

3 NSP13 与聚合酶 NSP12 相互作用

冠状病毒的非结构蛋白 12 是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp),NSP12 可以与解旋酶 NSP13 直接结合,调控病毒复制和转录^[28,37,57]。Subissi 等^[58]发现 SARS-CoV 的引物酶 NSP8、聚合酶 NSP12 和解旋酶 NSP13 等非结构蛋白共同组成病毒的复制-转录复合物(replication-transcription complex, RTC)(图 3),对病毒生命周期而言至关重要。

SARS-CoV-2 的基因组能够通过 RNA 依赖的 RNA 聚合酶全酶(RNA-dependent RNA polymerase holoenzyme, holo-RdRp)联合相关辅助因子进行复制和转录,解旋酶 NSP13 就是其中的辅助因子之一^[59]。Chen 等^[37]在获得稳定的

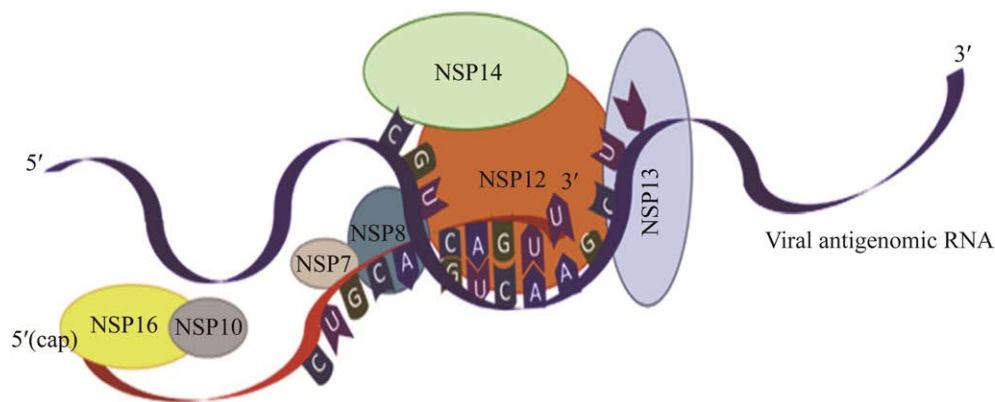


图3 NSP13参与组成复制-转录复合物^[58]

Figure 3 NSP13 is involved in the formation of replication-transcription complex^[58].

NSP13:holo-RdRp:RNA 复制/转录复合物后,通过冷冻电镜技术解析了复合物的三维结构,从结构上揭示 SARS-CoV-2 复合物中解旋酶与聚合酶的偶联机制,发现两者的相互作用发生在 NSP13 的 ZBD 区域和 NSP12 的 N 末端延伸片段之间。

Jia 等^[28]发现 SARS-CoV 的 RNA 聚合酶 NSP12 可以直接与解旋酶 NSP13 发生相互作用,从而增强 NSP13 的解旋活性。NSP12 能够提高核苷酸解旋的步长,增强 NSP13 的解旋效率。Adedeji 等^[20]使用口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)的聚合酶 3Dpol 代替反应体系中的 SARS-CoV 聚合酶 NSP12,发现解旋酶 NSP13 的活性无明显变化,说明 NSP12 对 NSP13 活性的增强作用具有特异性。有趣的是,在 SARS-CoV-2 基因组 RNA 合成过程中,NSP12 和 NSP13 协同作用,但 2 种酶的作用方向相反,NSP12 以 3'到 5'方向转录 RNA,NSP13 以 5'到 3'方向解开 RNA^[37]。

4 NSP13 调控宿主先天免疫

干扰素(interferon, IFN)是一组天然存在的细胞因子,具有调节免疫、抗肿瘤和抗病毒等多种活性。根据不同干扰素传递信号的受体差

异,将干扰素分为 I 型干扰素(IFN- α 和 IFN- β)、II 型干扰素 (IFN- γ) 和 III 型干扰素 (IFN- λ 1、IFN- λ 2 和 IFN- λ)。IFN 及其诱导的干扰素刺激因子是宿主抗病毒感染的重要防御机制,病毒为了能够有效感染宿主和增殖,进化出各种策略拮抗宿主 IFN 的抗病毒作用^[60-61]。

冠状病毒非结构蛋白 13 不仅能够促进病毒复制,还能够调节宿主抗病毒先天免疫反应。Li 等^[62]发现 SARS-CoV-2 NSP13 能够特异性抑制 RIG-I/MDA5 通路中不同组分因子的异位表达,而对这些基因的内源性表达没有影响。SARS-CoV-2 NSP13 可以通过抑制 IFN- β 的产生来拮抗宿主先天免疫反应,从而促进病毒复制^[63-65]。Vazquez 等^[66]发现 SARS-CoV-2 NSP13 能够通过限制 TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1)和干扰素调控因子 3 (interferon regulating factor 3, IRF3)的激活,下调 IFN 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)启动子信号传导,随着 NSP13 表达水平的升高,磷酸化的 TBK1 和 IRF3 蛋白水平降低。同时,NSP13 还可以通过限制 NF- κ B 磷酸化和核易位来抑制 NF- κ B 激活,下调干扰素诱导的四肽重复蛋白 1 (interferon-induced proteins with tetratricopeptide

repeats 1, IFIT1) 的表达^[66]。Sui 等^[67]发现 SARS-CoV-2 NSP13 具备招募激酶 TBK1 到 p62 的能力, 能够通过 p62 依赖的选择性自噬介导 TBK1 降解来抑制 IFN-I 产生, 从而使病毒逃避宿主先天免疫反应(图 4)。

IFN-I 的受体由 I 型干扰素受体 1 (interferon alpha and beta receptor subunit 1, IFNAR1) 和 IFNAR2 两个亚单位组成, Minkoff 等^[68]发现 SARS-CoV-2 NSP13 能够通过降低 IFNAR1 的表达, 干扰 IFN-I 信号传导, NSP13 也能与 STAT1 相互作用, 阻止 STAT1 与受体结合和磷酸化介导的激活。泛素化和去泛素化系统在多种信号通路中发挥着重要作用, 包括蛋白质的

降解、互作和激活^[69]。USP13 是宿主的去泛素化酶, 能够调控冠状病毒感染的细胞内 NSP13 泛素化和表达水平。USP13 能够与 SARS-CoV-2 NSP13 发生相互作用阻止 NSP13 降解, 未降解的 NSP13 通过破坏 TBK1 和 MAVS 之间的联系, 从而抑制 IFN-I 产生, 帮助病毒存活在宿主细胞中^[70-72]。作为先天免疫系统的一部分, 自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)能够帮助宿主抵抗病毒的感染。Hammer 等^[73]发现 SARS-CoV-2 NSP13 能够编码一种与人类白细胞抗原 E (human leukocyte antigen E, HLA-E) 稳定结合的肽, 促进 NK 细胞的活化, 加速 NK 细胞对病毒感染细胞的识别和清除。

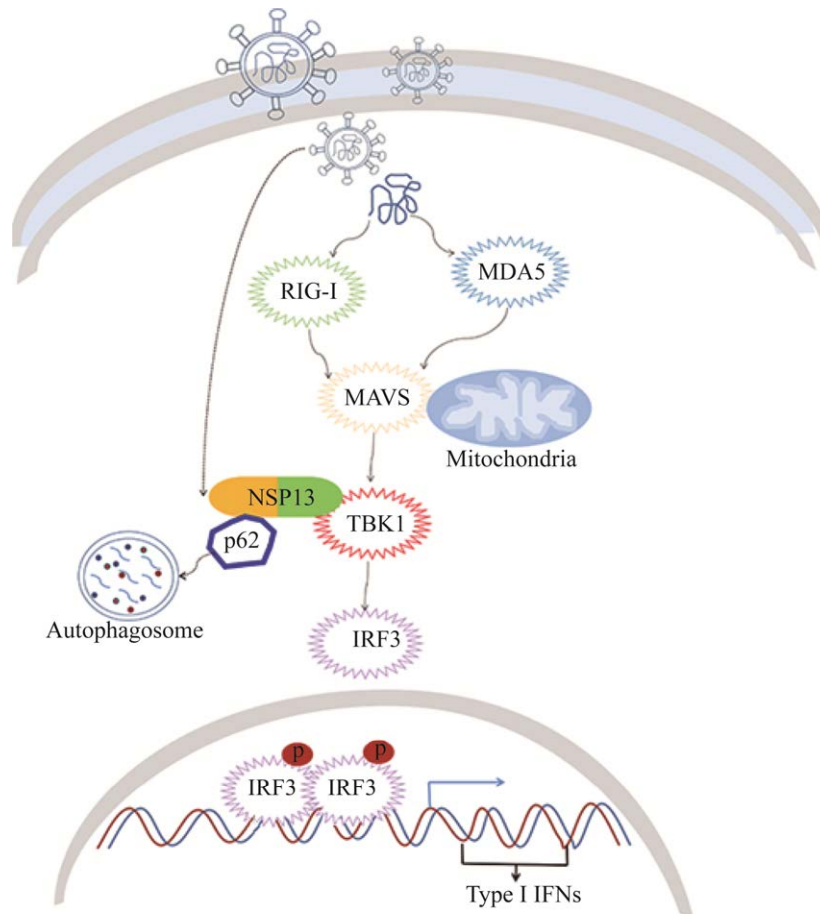


图 4 SARS-CoV-2 NSP13 通过降解 TBK1 来抑制 I 型干扰素的产生^[67]

Figure 4 SARS-CoV-2 NSP13 inhibits type I IFNs production by degradation of TBK1^[67].

5 展望

21 世纪以来, 冠状病毒引发了多种类型的传染病, 严重危害人类和动物的健康, 加之病毒基因组不断发生变异和重组, 冠状病毒的防控面临重大挑战。为了更好地应对冠状病毒的潜在威胁, 亟需研发有效的疫苗和抗冠状病毒药物。冠状病毒基因组能够编码多种蛋白质, 聚合酶、蛋白酶和解旋酶等非结构蛋白被认为是理想的药物靶点。然而, 对冠状病毒编码蛋白的研究多集中在结构蛋白, 对非结构蛋白的研究较少。

NSP13 是调控冠状病毒复制和宿主先天免疫的关键非结构蛋白, 不同冠状病毒的 NSP13 在序列上高度保守。NSP13 作为病毒编码的解旋酶, 由 5 个结构域构成, 但并不清楚这些结构域的具体功能, 可以通过构建缺失体等手段进行探究。NSP13 与 SF1 超家族中的其他成员类似, 具有水解 NTPs 和定向移位解旋的功能。二价金属离子种类与浓度、ATP 浓度和核糖磷酸骨架结构等都会影响 NSP13 的活性。当前, 关于 NSP13 的研究基本上来源于 SARS-CoV、SARS-CoV-2 和 MERS-CoV 等人类冠状病毒, 对动物冠状病毒 NSP13 的研究较少。

对于冠状病毒 NSP13 基本上是采用生物化学方法进行总体水平的研究, 缺少在单个分子水平阐明 NSP13 的作用机制。基于全内反射的单分子荧光共振能量转移技术(single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET), 近些年逐渐应用于信号通路^[74]、核酸构象变化^[75]和蛋白质折叠^[76]等生物学研究中, Wu 等^[31]利用该技术探究了解旋酶 RHA 的作用机制, Yu 等^[77]也采用 smFRET 技术首次实时观测了单个 SARS-CoV-2 NSP13 分子的解旋反应过程。期待更多学者能够利用 smFRET 技术在单个分子

水平探究 NSP13 作用机制, 包括 NSP13 与宿主蛋白互作、NSP13 解旋时酶与底物构象和 NSP13 结构域功能等。

接种疫苗是目前预防病毒的主要手段, 但由于冠状病毒存在重组或变异, 导致病毒感染仍然广泛存在, 商品化疫苗不足以提供完全的保护。而且截至目前, 尚无针对任何冠状病毒的特效药。因此, 药物治疗等替代策略的研发应该受到足够的重视, 包括靶向非结构蛋白 NSP13 的抗病毒药物等。抗病毒药物的研发策略包括设计和发现新药物, 或者老药新用。通过虚拟筛选、分子对接和分子动力学模拟等方法, 部分能够直接靶向 NSP13 的天然产物和小分子化合物逐渐被学者们发现, 这些药物有望通过调控 NSP13 功能从而达到抑制病毒复制和增殖的效果。本文作者也在药物库中筛选了 NSP13 的潜在抑制剂, 并且正在通过分子拼接和分子动力学模拟获取抑制剂与 NSP13 的具体结合位点信息。但是, 这些已有的研究基本上都是局限在体外, 后续需要通过更多的动物实验去证实药物的有效性。

通过对冠状病毒非结构蛋白 NSP13 功能及其作用机制等方面的研究, 有助于深入了解 NSP13 如何调控病毒复制和宿主先天免疫, 为研发靶向 NSP13 的广谱抗冠状病毒药物奠定理论基础。中药提取物具有抗氧化、免疫调节、抗病毒、抗菌和抑制酶活性等多种功能^[78-80], 随着分离提取、构效关系和抗病毒研究的不断深入, 加上多数中药提取物具有来源广泛、生物活性高、副作用低和廉价易得等诸多优点, 中药提取物在靶向 NSP13 抑制冠状病毒复制方面展现出潜在的研究价值和广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] CUI J, LI F, SHI ZL. Origin and evolution of pathogenic

- coronaviruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 181-192.
- [2] WU AP, PENG YS, HUANG BY, DING X, WANG XY, NIU PH, MENG J, ZHU ZZ, ZHANG Z, WANG JY, SHENG J, QUAN LJ, XIA ZX, TAN WJ, CHENG GH, JIANG TJ. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(3): 325-328.
- [3] ZHOU P, YANG XL, WANG XG, HU B, ZHANG L, ZHANG W, SI HR, ZHU Y, LI B, HUANG CL, CHEN HD, CHEN J, LUO Y, GUO H, JIANG RD, LIU MQ, CHEN Y, SHEN XR, WANG X, ZHENG XS, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [4] 陈嘉源, 施劲松, 丘栋安, 刘畅, 李鑫, 赵强, 阮吉寿, 高山. 2019 新型冠状病毒基因组的生物信息学分析[J]. *生物信息学*, 2020, 18(2): 96-102.
- CHEN JY, SHI JS, QIU DA, LIU C, LI X, ZHAO Q, RUAN JS, GAO S. Bioinformatics analysis of the 2019 novel coronavirus genome[J]. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 2020, 18(2): 96-102 (in Chinese).
- [5] FEHR AR, CHANNAPPANAVAR R, PERLAMN S. Middle east respiratory syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus[J]. *Annual Review of Medicine*, 2017, 68: 387-399.
- [6] WU F, ZHAO S, YU B, CHEN YM, WANG W, SONG ZG, HU Y, TAO ZW, TIAN JH, PEI YY, YUAN ML, ZHANG YL, DAI FH, LIU Y, WANG QM, ZHENG JJ, XU L, HOLMES EC, ZHANG YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
- [7] LU RJ, ZHAO X, LI J, NIU PH, YANG B, WU HL, WANG WL, SONG H, HUANG BY, ZHU N, BI YH, MA XJ, ZHAN FX, WANG L, HU T, ZHOU H, HU ZH, ZHOU WM, ZHAO L, CHEN J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [8] CHEN Y, LIU QY, GUO DY. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(4): 418-423.
- [9] LEDNICKY JA, TAGLIAMONTE MS, WHITE SK, ELBADRY MA, ALAM MM, STEPHENSON CJ, BONNY TS, LOEB JC, TELISMA T, CHAVANNES S, OSTROV DA, MAVIAN C, de ROCHARS VMB, SALEMI M, MORRIS JG. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children[J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 133-137.
- [10] ZHANG XY, GUO J, WAN X, ZHOU JG, JIN W, LU J, WANG WH, YANG AN, LIU D, SHÍ Z, YUAN ZM, LI XG, MENG SL, DUAN K, WANG ZJ, YANG XM, SHEN S. Biochemical and antigenic characterization of the structural proteins and their post-translational modifications in purified SARS-CoV-2 virions of an inactivated vaccine candidate[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9: 2653-2662.
- [11] ENJUANES L, DEDIEGO ML, ALVAREZ E, DEMING D, SHEAHAN T, BARIC R. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease[J]. *Virus Research*, 2008, 133(1): 45-62.
- [12] PUTICS Á, GORBALENYA AE, ZIEBUHR J. Identification of protease and ADP-ribose 1"-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(3): 651-656.
- [13] PRENTICE E, McAULIFFE J, LU XT, SUBBARAO K, DENISON MR. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(18): 9977-9986.
- [14] LÜKING A, STAHL U, SCHMIDT U. The protein family of RNA helicases[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 33(4): 259-296.
- [15] LINDER P, TANNER NK, BANROQUES J. From RNA helicases to RNPsases[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(6): 339-341.
- [16] ABDELHALEEM M. RNA helicases: regulators of differentiation[J]. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38(6): 499-503.
- [17] SINGLETON MR, DILLINGHAM MS, WIGLEY DB. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2007, 76: 23-50.
- [18] GORBALENYA AE, KOONIN EV. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, 3(3): 419-429.
- [19] FAIRMAN-WILLIAMS ME, GUENTHER UP, JANKOWSKY E. SF1 and SF2 helicases: family matters[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(3): 313-324.
- [20] ADEDEJI AO, MARCHAND B, TE VELTHUIS AJW,

- SNIJDER EJ, WEISS S, EOFF RL, SINGH K, SARAFIANOS SG. Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36521.
- [21] SHU T, HUANG MH, WU D, REN YJ, ZHANG XY, HAN Y, MU JF, WANG RB, QIU Y, ZHANG DY, ZHOU X. SARS-coronavirus-2 Nsp13 possesses NTPase and RNA helicase activities that can be inhibited by bismuth salts[J]. *Virologica Sinica*, 2020, 35(3): 321-329.
- [22] HARTENIAN E, NANDAKUMAR D, LARI A, LY M, TUCKER JM, GLAUNSINGER BA. The molecular virology of coronaviruses[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(37): 12910-12934.
- [23] KIM D, LEE JY, YANG JS, KIM JW, KIM VN, CHANG H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome[J]. *Cell*, 2020, 181(4): 914-921.e10.
- [24] GORBALENYA AE, ENJUANES L, ZIEBUHR J, SNIJDER EJ. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome[J]. *Virus Research*, 2006, 117(1): 17-37.
- [25] FREITAS BT, DURIE IA, MURRAY J, LONGO JE, MILLER HC, CRICH D, HOGAN RJ, TRIPP RA, PEGAN SD. Characterization and noncovalent inhibition of the deubiquitinase and deISGylase activity of SARS-CoV-2 papain-like protease[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2020, 6(8): 2099-2109.
- [26] ADEDEJI AO, LAZARUS H. Biochemical characterization of middle east respiratory syndrome coronavirus helicase[J]. *mSphere*, 2016, 1(5): e00235-e00216.
- [27] FRICK DN, VIRDI RS, VUKSANOVIC N, DAHAL N, SILVAGGI NR. Molecular basis for ADP-ribose binding to the Mac1 domain of SARS-CoV-2 nsp3[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(28): 2608-2615.
- [28] JIA ZH, YAN LM, REN ZL, WU LJ, WANG J, GUO J, ZHENG LT, MING ZH, ZHANG LQ, LOU ZY, RAO ZH. Delicate structural coordination of the severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp13 upon ATP hydrolysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(12): 6538-6550.
- [29] HAO W, WOJDYLA JA, ZHAO R, HAN RY, DAS R, ZLATEV I, MANOHARAN M, WANG MT, CUI S. Crystal structure of Middle East respiratory syndrome coronavirus helicase[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(6): e1006474.
- [30] NEWMAN JA, DOUANGAMATH A, YADZANI S, YOSAATMADJA Y, AIMON A, BRANDÃO-NETO J, DUNNETT L, GORRIE-STONE T, SKYNER R, FEARON D, SCHAPIRA M, von DELFT F, GILEADI O. Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4848.
- [31] WU CC, SHAN YK, WANG SY, LIU F. Dynamically probing ATP-dependent RNA helicase A-assisted RNA structure conversion using single molecule fluorescence resonance energy transfer[J]. *Protein Science*, 2021, 30(6): 1157-1168.
- [32] YAZDI AK, PAKARIAN P, PERVEEN S, HAJIAN T, SANTHAKUMAR V, BOLOTOKOVA A, LI FL, VEDADI M. Kinetic characterization of SARS-CoV-2 NSP13 ATPase activity and discovery of small-molecule inhibitors[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2022, 8(8): 1533-1542.
- [33] IVANOV KA, THIEL V, DOBBE JC, van der MEER Y, SNIJDER EJ, ZIEBUHR J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(11): 5619-5632.
- [34] SOMMERS JA, LOFTUS LN, JONES MP, LEE RA, HAREN CE, DUMM AJ, BROSH RM JR. Biochemical analysis of SARS-CoV-2 NSP13 helicase implicated in COVID-19 and factors that regulate its catalytic functions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(3): 102980.
- [35] LEE NR, KWON HM, PARK K, OH S, JEONG YJ, KIM DE. Cooperative translocation enhances the unwinding of duplex DNA by SARS coronavirus helicase NSP13[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(21): 7626-7636.
- [36] REN J, DING Z, FANG P, XIAO S, FANG L. ATPase and helicase activities of porcine epidemic diarrhea virus NSP13[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 257: 109074.
- [37] CHEN J, MALONE B, LLEWELLYN E, GRASSO M, SHELTON PMM, DOMINIC B OLINARES P, MARUTHI K, ENG ET, VATANDASLAR H, CHAIT BT, KAPOOR TM, DARST SA, CAMPBELL EA. Structural basis for helicase-polymerase coupling in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex[J]. *Cell*, 2020, 182(6): 1560-1573.e13.
- [38] FANG S, CHEN B, TAY F PL, NG BS, LIU DX. An arginine-to-proline mutation in a domain with undefined functions within the helicase protein (Nsp13) is lethal to the coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells[J]. *Virology*, 2007, 358(1): 136-147.
- [39] FUNG SY, SIU KL, LIN H, CHAN CP, YEUNG ML,

- JIN DY. SARS-CoV-2 NSP13 helicase suppresses interferon signaling by perturbing JAK1 phosphorylation of STAT1[J]. *Cell and Bioscience*, 2022, 12(1): 36.
- [40] YUE K, YAO B, SHI YC, YANG Y, QIAN Z, CI Y, SHI L. The stalk domain of SARS-CoV-2 NSP13 is essential for its helicase activity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 601: 129-136.
- [41] WHITE MA, LIN W, CHENG X. Discovery of COVID-19 inhibitors targeting the SARS-CoV-2 Nsp13 helicase[J]. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11: 9144-9151.
- [42] ROMEO I, ALESSANDRA AMBROSIO F, COSTA G, CORONA A, ALKHATIB M, SALPINI R, LEMME S, VERGNI D, SVICHER V, SANTORO MM, TRAMONTANO E, CECCHERINI-SILBERSTEIN F, ARTESE A, ALCARO S. Targeting SARS-CoV-2 nsp13 helicase and assessment of druggability pockets: identification of two potent inhibitors by a multi-site *in silico* drug repurposing approach[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7522.
- [43] VARDHAN S, SAHOO SK. Exploring the therapeutic nature of limonoids and triterpenoids against SARS-CoV-2 by targeting nsp13, nsp14, and nsp15 through molecular docking and dynamics simulations[J]. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2022, 12(1): 44-54.
- [44] WANG PC, WANG XW, LIU X, SUN M, LIANG X, BAI J, JIANG P. Natural compound ZINC12899676 reduces porcine epidemic diarrhea virus replication by inhibiting the viral NTPase activity[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 879733.
- [45] YU MS, LEE J, LEE JM, KIM Y, CHIN YW, JEE JG, KEUM YS, JEONG YJ. Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsp13[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(12): 4049-4054.
- [46] KEUM YS, LEE JM, YU MS, CHIN YW, JEONG YJ. Inhibition of SARS coronavirus helicase by baicalein[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2013, 34(11): 3187-3188.
- [47] CORONA A, WYCISK K, TALARICO C, MANELFI C, MILIA J, CANNALIRE R, ESPOSITO F, GRIBBON P, ZALIANI A, IACONIS D, BECCARI AR, SUMMA V, NOWOTNY M, TRAMONTANO E. Natural compounds inhibit SARS-CoV-2 nsp13 unwinding and ATPase enzyme activities[J]. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 2022, 5(4): 226-239.
- [48] UGUREL OM, MUTLU O, SARIYER E, KOCER S, UGUREL E, INCI TG, ATA O, TURGUT-BALIK D. Evaluation of the potency of FDA-approved drugs on wild type and mutant SARS-CoV-2 helicase (Nsp13)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 1687-1696.
- [49] ADEDEJI AO, SINGH K, CALCATERRA NE, DeDIEGO ML, ENJUANES L, WEISS S, SARAFIANOS SG. Severe acute respiratory syndrome coronavirus replication inhibitor that interferes with the nucleic acid unwinding of the viral helicase[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(9): 4718-4728.
- [50] ADEDEJI AO, SINGH K, KASSIM A, COLEMAN CM, ELLIOTT R, WEISS SR, FRIEMAN MB, SARAFIANOS SG. Evaluation of SSYA10-001 as a replication inhibitor of severe acute respiratory syndrome, mouse hepatitis, and middle east respiratory syndrome coronaviruses[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(8): 4894-4898.
- [51] YUAN SF, WANG RM, CHAN JFW, ZHANG AJ, CHENG TF, CHIK KKH, YE ZW, WANG SY, LEE ACY, JIN LJ, LI HY, JIN DY, YUEN KY, SUN HZ. Metallodrug ranitidine bismuth citrate suppresses SARS-CoV-2 replication and relieves virus-associated pneumonia in Syrian hamsters[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(11): 1439-1448.
- [52] YUAN SF, YIN X, MENG XZ, CHAN JFW, YE ZW, RIVA L, PACHE L, CHAN CCY, LAI PM, CHAN CCS, POON VKM, LEE ACY, MATSUNAGA N, PU Y, YUEN CK, CAO JL, LIANG RH, TANG KM, SHENG L, DU YS, et al. Clofazimine broadly inhibits coronaviruses including SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 418-423.
- [53] HE Y, YI X, ZHANG ZH, LUO HS, LI R, FENG X, FANG ZM, ZHU XH, CHENG WL, JIANG DS, ZHAO F, WEI X. JIB-04, a histone demethylase Jumonji C domain inhibitor, regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells[J]. *Clinical Epigenetics*, 2022, 14(1): 101.
- [54] 姚晨, 郭萌, 胡慧, 史晨曦, 杨国宇. 苯基吡啶酮衍生物影响猪 δ 冠状病毒复制的作用分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(9): 3190-3198.
- YAO C, GUO M, HU H, SHI CX, YANG GY. Effects of phenylpyridinone derivative on the replication of

- porcine deltacoronavirus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(9): 3190-3198 (in Chinese).
- [55] SON J, HUANG SM, ZENG QR, BRICKER TL, CASE JB, ZHOU JZ, ZANG RC, LIU ZM, CHANG XJ, DARLING TL, XU J, HARASTANI HH, CHEN L, GOMEZ CASTRO MF, ZHAO YX, KOHIO HP, HOU GP, FAN BC, NIU BB, GUO RL, et al. JIB-04 has broad-spectrum antiviral activity and inhibits SARS-CoV replication and coronavirus pathogenesis[J]. *mBio*, 2022, 13(1): e0337721.
- [56] TANG RF, GUO LJ, FAN QJ, ZHANG LY, WANG YM, ZHANG X, SHI D, WU Y, SHI HY, LIU JB, CHEN JF, FENG L. Porcine deltacoronavirus infection is inhibited by griffithsin in cell culture[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 264: 109299.
- [57] CHAN JFW, KOK KH, ZHU Z, CHU H, TO KKW, YUAN SF, YUEN KY. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 221-236.
- [58] SUBISSI L, IMBERT I, FERRON F, COLLET A, COUTARD B, DECROLY E, CANARD B. SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12–16: replicative enzymes as antiviral targets[J]. *Antiviral Research*, 2014, 101: 122-130.
- [59] MALONE B, URAKOVA N, SNIJDER EJ, CAMPBELL EA. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(1): 21-39.
- [60] MOUSTAQIL M, OLLIVIER E, CHIU HP, van TOL S, RUDOLFFI-SOTO P, STEVENS C, BHUMKAR A, HUNTER DJB, FREIBERG AN, JACQUES D, LEE B, SIERECKI E, GAMBIN Y. SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 178-195.
- [61] SHIN D, MUKHERJEE R, GREWE D, BOJKOVA D, BAEK K, BHATTACHARYA A, SCHULZ L, WIDERA M, MEHDIPOUR AR, TASCHER G, GEURINK PP, WILHELM A, van der HEDEN van NOORT GJ, OVAA H, MÜLLER S, KNOBELOCH KP, RAIALINGAM K, SCHULMAN BA, CINATL J, HUMMER G, et al. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity[J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 657-662.
- [62] LI AX, ZHANG B, ZHAO KT, YIN ZN, TENG Y, ZHANG L, XU ZC, LIANG KW, CHENG XM, XIA YC. SARS-CoV-2 nsp13 restricts episomal DNA transcription without affecting chromosomal DNA[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(7): e0051223.
- [63] LEI XB, DONG XJ, MA RY, WANG WJ, XIAO X, TIAN ZQ, WANG CH, WANG Y, LI L, REN LL, GUO F, ZHAO ZD, ZHOU Z, XIANG ZC, WANG JW. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3810.
- [64] YUEN CK, LAM JY, WONG WM, MAK LF, WANG X, CHU H, CAI JP, JIN DY, TO KK, CHAN JF, YUEN KY, KOK KH. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 1418-1428.
- [65] XIA HJ, CAO ZG, XIE XP, ZHANG XW, CHEN JYC, WANG HL, MENACHERY VD, RAJSBAUM R, SHI PY. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(1): 108234.
- [66] VAZQUEZ C, SWANSON SE, NEGATU SG, DITTMAR M, MILLER J, RAMAGE HR, CHERRY S, JURADO KA. SARS-CoV-2 viral proteins NSP1 and NSP13 inhibit interferon activation through distinct mechanisms[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253089.
- [67] SUI C, XIAO TY, ZHANG SY, ZENG HX, ZHENG Y, LIU BY, XU G, GAO CJ, ZHANG Z. SARS-CoV-2 NSP13 inhibits type I IFN production by degradation of TBK1 *via* p62-dependent selective autophagy[J]. *Journal of Immunology*, 2022, 208(3): 753-761.
- [68] MINKOFF JM, TENOEVER B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21(3): 178-194.
- [69] SUN H, ZHANG Q, JING YY, ZHANG M, WANG HY, CAI Z, LIUYU TZ, ZHANG ZD, XIONG TC, WU Y, ZHU QY, YAO J, SHU HB, LIN DD, ZHONG B. USP13 negatively regulates antiviral responses by deubiquitinating STING[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15534.
- [70] BLANCO-MELO D, NILSSON-PAYANT BE, LIU WC, UHL S, HOAGLAND D, MOLLER R, JORDAN TX, OISHI K, PANIS M, SACHS D, WANG TT, SCHWARTZ RE, LIM JK, ALBRECHT RA, TENOEVER BR. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19[J].

Cell, 2020, 181(5): 1036-1045.e9.

- [71] GUO GJ, GAO M, GAO XC, ZHU BB, HUANG JZ, LUO KT, ZHANG Y, SUN J, DENG M, LOU ZK. SARS-CoV-2 non-structural protein 13 (nsp13) hijacks host deubiquitinase USP13 and counteracts host antiviral immune response[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 119.
- [72] FANG R, JIANG Q F, ZHOU X, WANG CG, GUAN YK, TAO JL, XI JZ, FENG JM, JIANG ZF. MAVS activates TBK1 and IKK ϵ through TRAFs in NEMO dependent and independent manner[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(11): e1006720.
- [73] HAMMER Q, DUNST J, CHRIST W, PICARAZZI F, WENDORFF M, MOMAYYEZI P, HUHN O, NETSKAR HK, MALEKI KT, GARCÍA M, SEKINE T, SOHLBERG E, AZZIMATO V, AOUADI M, DEGENHARDT F, FRANKE A, SPALLOTTA F, MORI M, MICHAËLSSON J, BJÖRKSTRÖM NK, et al. SARS-CoV-2 Nsp13 encodes for an HLA-E-stabilizing peptide that abrogates inhibition of NKG2A-expressing NK cells[J]. Cell Reports, 2022, 38(10): 110503.
- [74] DURHAM RJ, LATHAM DR, SANABRIA H, JAYARAMAN V. Structural dynamics of glutamate signaling systems by smFRET[J]. Biophysical Journal, 2020, 119(10): 1929-1936.
- [75] CAI H, ROCA J, ZHAO YF, WOODSON SA. Dynamic refolding of OxyS sRNA by the Hfq RNA chaperone[J]. Journal of Molecular Biology, 2022, 434(18): 167776.
- [76] MARZANO NR, PAUDEL BP, van OIJEN AM, ECROYD H. Real-time single-molecule observation of chaperone-assisted protein folding[J]. Science Advances, 2022, 8(50): eadd0922.
- [77] YU J, IM H, LEE G. Unwinding mechanism of SARS-CoV helicase (nsp13) in the presence of Ca²⁺, elucidated by biochemical and single-molecular studies[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2023, 668: 35-41.
- [78] LUTHULI S, WU SY, CHENG Y, ZHENG XL, WU MJ, TONG HB. Therapeutic effects of fucoidan: a review on recent studies[J]. Marine Drugs, 2019, 17(9): 487.
- [79] CHEN BR, LI WM, LI TL, CHAN YL, WU CJ. Fucoidan from *Sargassum hemiphyllum* inhibits infection and inflammation of *Helicobacter pylori*[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 429.
- [80] GOU XY, NAWAZ MAH, LIU CY, YANG N, REN J, ZHOU HP, LI YH, ZHU JW, HAN WZ, YU C. Polypeptide induced perylene probe excimer formation and its application in the noncovalent ratiometric detection of matrix metalloproteinase activity[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10(30): 5774-5783.

(本文责编 陈宏宇)