

α 1-抗胰蛋白酶——一种可抵抗SARS-CoV-2细胞侵袭的多功能蛋白的研究进展

叶晓^{1,2} 凌雪¹ 林佳雨^{1,3} 张肖雅^{1,4} 张子怡^{1,4} 饶朗^{1*}

(¹中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学重点实验室, 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308; ²吉林大学生命科学学院, 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130012; ³天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; ⁴吉林大学药学院, 长春 130012)

摘要 α 1-抗胰蛋白酶(α 1AT)是一种由肝脏合成并分泌至外周血循环系统的多功能糖蛋白, 其主要功能是中和肺部组织蛋白酶从而保障肺部不受自体蛋白酶的攻击而引发病变; 此外在保持免疫平衡、控制炎症反应、抵御抗原侵袭等方面 α 1AT也发挥重要作用。近年来的研究发现 α 1AT具有良好的抗病毒功能, 在抵抗包括HIV、SARS等在内的高致病病毒时, α 1AT作为机体自身的天然防御分子发挥了很好的屏障作用。最新的研究显示, α 1AT通过抑制受体细胞表面跨膜丝氨酸蛋白酶2的活性来降低SARS-CoV-2病毒颗粒与宿主细胞的结合作用, 从而抑制SARS-CoV-2对细胞的侵袭。因此, α 1AT作为极具潜力的天然蛋白质药物被用于应对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的临床研究和治疗当中。该文从介绍 α 1AT天然生理学功能入手, 展开介绍其抗病毒功能, 着重归纳其在抵抗SARS-CoV-2细胞侵袭方面的机理研究进展。

关键词 α 1-抗胰蛋白酶; SARS-CoV-2; COVID-19; 蛋白酶; 跨膜丝氨酸蛋白酶2

Advances in the Study of α 1-Antitrypsin — a Multifunctional Protein Counteracts SARS-CoV-2 Cell Invasion

YE Xiao^{1,2}, LING Xue¹, LIN Jiayu^{1,3}, ZHANG Xiaoya^{1,4}, ZHANG Ziyi^{1,4}, RAO Lang^{1*}

(¹Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, National Technology Innovation Centre for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China; ²Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, the Ministry of Education, School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China; ³School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; ⁴Jilin University School of Pharmaceutical Sciences, Changchun 130012, China)

Abstract α 1AT (α 1-antitrypsin) is a multifunctional glycosylated protein synthesized by the liver and secreted into the peripheral blood circulation. Its primary role is to protect the lung from proteolytic attack by neutralizing pulmonary proteases. α 1AT also plays important roles in maintaining immune homeostasis, controlling inflammatory responses and pathogenic defending by interacting with various targets. α 1AT has recently been discovered to have potent antiviral properties and might be used as an anti-virus reagent in the defense of pathogenic viruses such as HIV and SARS infection. Newest studies found α 1AT prevented SARS-CoV-2 infection by inhibiting transmembrane serine protease 2, a cell surface protease involved in SARS-CoV-2 cell invasion. Therefore, α 1AT was studied as a viable antiviral drug for COVID-19 treatment. This review aims to summarize the recent findings of

收稿日期: 2022-10-24 接受日期: 2022-12-16

天津市合成生物技术创新能力提升行动(批准号: TSBICIP-CXRC-048)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-84861948, E-mail: raolang@tib.cas.cn

Received: October 24, 2022 Accepted: December 16, 2022

This work was supported by the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (Grant No. TSBICIP-CXRC-048)

*Corresponding author. Tel: +86-22-84861948, E-mail: raolang@tib.cas.cn

α 1AT's physiological functions, with a particular focus on the advance of mechanism study of α 1AT counteracting SARS-CoV-2 cell invasion.

Keywords α 1-antitrypsin; SARS-CoV-2; COVID-19; protease; transmembrane serine protease 2

α 1-抗胰蛋白酶(α 1-antitrypsin, α 1AT)是一种由 *SERPINA1* 基因编码的多功能糖蛋白, 其主要由肝脏组织合成并分泌至血液循环, 最终到达肺部充当以弹性蛋白酶为代表的蛋白酶抑制剂^[1-2]。人肺部弹性蛋白酶主要由活化的嗜中性粒细胞释放以协助免疫细胞消灭细菌等抗原物质从而起到保护宿主的作用。除了宿主防御的生理功能外, 弹性蛋白酶同样也对宿主组织基质蛋白具有极强的降解能力^[3]。正常情况下, 机体通过产生的一系列蛋白酶抑制剂分子中和抑制过量蛋白酶水解作用, 实现蛋白酶-蛋白酶抑制剂的动态平衡, 保护肺部组织不受自身蛋白酶的攻击而引发病变^[4-5](图1)。 α 1AT是功能最强也是血液中含有量最高的蛋白酶抑制剂分子, 因此血液中保持足够浓度的 α 1AT对维持机体肺部正常功能十分重要。

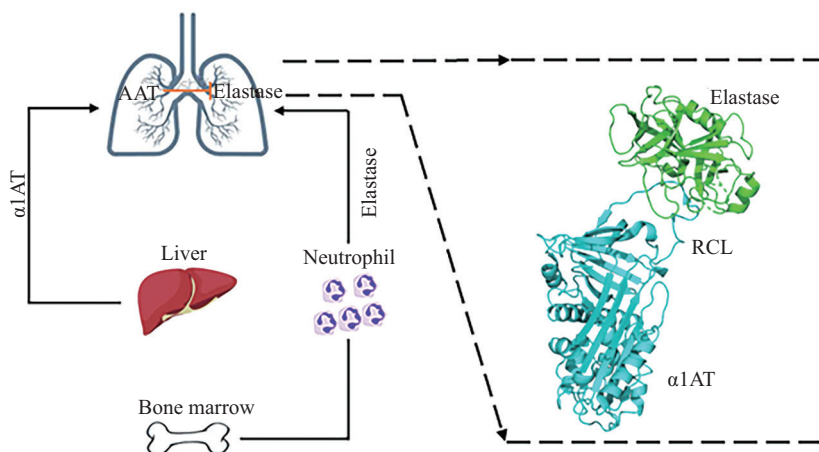
1 α 1AT的基因与调控

人源 α 1AT的编码基因 *SERPINA1* 位于第14条染色体14q32.1, 长约12 Kb, 全基因由3个非编码外显子(IA、IB和IC)、4个编码外显子(II到V)和6个内含子组成^[6](图2)。 α 1AT主要合成于肝脏细胞(>80%), 此外在巨噬细胞、中性粒细胞、胰腺细胞、支气管

上皮细胞和小肠上皮细胞中也都有少量表达^[7-8]。不同组织细胞中该基因的转录起始位点各不相同, 在肝脏细胞中转录起始位点位于外显子IC内, 而在巨噬细胞中转录却从2 000 bp上游的外显子IA或IB开始^[9]。肝脏细胞中成熟的抗胰蛋白酶mRNA长约1.3 Kb, 其中包含了来自IC外显子中不翻译的49个碱基和其他4个外显子编码序列。在肝脏细胞中 α 1AT转录起始位点上游DNA有包含TATA盒序列和B识别元素序列(B recognition element, BRE)在内多个顺式作用元件, 这些元件负责该基因的转录调控^[10](图2)。

2 α 1AT的蛋白分子结构和生理学功能

新生的 α 1AT蛋白由418个氨基酸组成, 其中包含一个由24个氨基酸组成的信号肽序列^[11]; 在信号肽引导下, 新生 α 1AT分子进入内质网进行N-糖基化修饰和信号肽切除, 之后该蛋白大分子被转运到高尔基体进一步完善糖基化修饰并最终生成由394个氨基酸组成的分子量约52 kDa的成熟 α 1AT糖蛋白^[12]。现已证实 α 1AT的糖基化位点分别为Asn-46、Asn-83和Asn-247(图3)。 α 1AT的糖基化修饰对于该蛋白分子发挥正常的生理学功能十分必要, 它能够增加 α 1AT可溶性有效防止蛋白分子聚集; 同时也

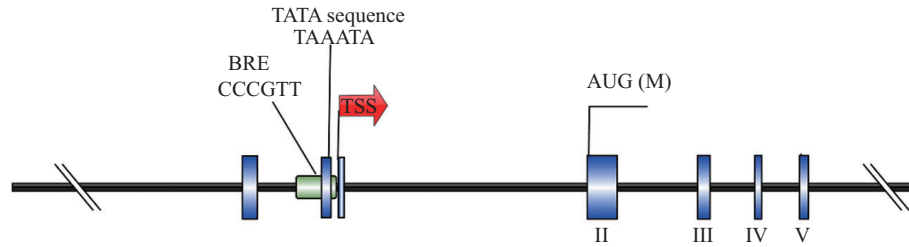


肝脏合成的 α 1AT分泌进入血液循环系统与嗜中性粒细胞分泌的弹性蛋白酶在肺部相遇并结合, α 1AT的反应中心环结构插进蛋白酶活性中心并使其失活。 α 1AT与蛋白酶的动态平衡作用维持肺的正常功能。

Hepatic synthesized α 1AT was secreted into the circulation and delivered to the lung where it binds and inhibits the elastase secreted by neutrophils. The dynamic balance of α 1AT and proteases maintains proper lung function.

图1 α 1AT保护肺部功能的主要原理

Fig.1 The mechanism of α 1AT protecting normal lung function

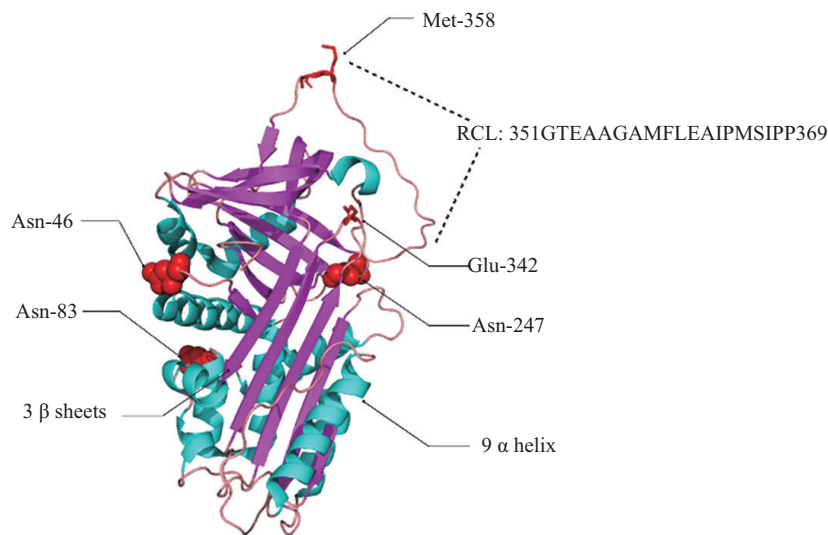


全基因包括4个编码的外显子(II~V)、3个非翻译外显子(IA~IC)和6个内含子。肝细胞*SERPINA1*启动子位于IC外显子内,在转录起始位点上游DNA含有TATA和BRE等转录调控元件。

The whole gene consists of four exons (II-V), three untranslated exons (IA-IC) and six introns. The hepatocyte *SERPINA1* promoter is located within exon IC. TATA box and BRE element located upstream of the transcription start site.

图2 *SERPINA1*基因示意图

Fig.2 Schematic diagram of the *SERPINA1* gene



α 1AT全蛋白由9个 α helix和3个 β sheet结构组成,反应中心环RCL由351—369氨基酸序列组成并形成松散loop环结构暴露于分子表面。活性位点氨基酸Met-358和突变位点Glu-342由红色棒状显示,糖基化位点氨基酸Asn-46、Asn-83和Asn-247由红色球状展示。

The whole protein consists with 9 α helix and 3 β sheet structures. The reaction center ring RCL consists of amino acids 351—369 and forms a loose loop structure exposed on the surface of the molecule. The active site amino acid Met-358 and the mutation site Glu-342 are shown in stick and the glycosylation sites Asn-46, Asn-83 and Asn-247 are shown in red spheres.

图3 α 1AT的分子结构图

Fig.3 Molecular structure of α 1AT

极大地提高了蛋白的抗降解能力和稳定性,以至于能够使该蛋白在血液中的半衰期长达4~5天;这种高稳定性是维持机体正常血液浓度 α 1AT的关键^[13-16]。

单个 α 1AT由9个 α -螺旋围绕3个 β -折叠片层骨架组成球状结构,该蛋白分子的第五股 α 片层结构延伸出来一个由20个氨基酸形成的反应中心环(reactive centre loop, RCL: 351GTEAAGAMFLEAIPMSIPP369)松散结构域,在催化过程中承担抑制蛋白酶活性的主要功能^[17-18]。 α 1AT与胰蛋白酶和弹性蛋白酶的蛋白共结晶和催化机理研究揭示,当 α 1AT与蛋白酶分子结合时,RCL环充当蛋白酶的诱饵底物插入其活性中心并被蛋白酶活性中心Ser亲核攻击

水解Met-358-Ser-359之间的肽键;当完成肽键裂解后, α 1AT的RCL中Met-358与蛋白酶Ser-359构成新的共价连接并引发蛋白酶分子的构象翻转,从而形成更为稳定的 α 1AT-蛋白酶复合物,其结果是蛋白酶分子由于结构巨变而无法与抑制剂解离,最终导致不可逆失活^[19-22](图3)。酶动力学分析显示天然状态下 α 1AT分子对弹性蛋白酶的抑制效果最佳,除此之外它对具有类似结构的蛋白酶-3、髓过氧化物酶、组织蛋白酶G、胰蛋白酶以及凝血酶都有抑制作用,但是针对不同蛋白的抑制效率却相差很大,这可能与每种酶独特的分子结构和与 α 1AT的不同相互作用方式相关^[23]。作为主要的蛋白酶抑制剂,在正常生理

条件下 α 1AT承担了血浆中绝大多数(约90%)蛋白水解酶类的抑制功能^[24]。

3 α 1AT与抗胰蛋白酶缺陷症

如前文所述, α 1AT是人体内最主要的蛋白酶抑制剂,因此人体内保持一定浓度的 α 1AT对维持机体正常功能十分重要。11 mmol/L血清浓度的 α 1AT被认为是抵抗肺蛋白酶水解攻击的最低保护阈值,而普通人的血液中通常会维持20 mmol/L的 α 1AT浓度^[25]。当血液 α 1AT浓度过低时,未被中和的蛋白酶会攻击并降解肺泡组织而引起肺气肿等慢性阻塞性肺功能障碍疾病,该症状被称为抗胰蛋白酶缺陷症(alpha-1 antitrypsin deficiency, AATD)。基因突变是引发AATD的最主要原因,目前已发现超过150种*SERPINA1*突变,但是大多数突变并不造成 α 1AT血液浓度的剧烈改变,因此被称为无义突变或者中性突变。少数突变例如Z型突变(Glu-342Lys)(图3)可造成血清 α 1AT水平降至正常水平的15%(5~6 mmol/L),从而引发肺气肿等典型的AATD症状。Z型突变所引起的 α 1AT血液浓度的减少是由于该突变造成了 α 1AT蛋白分子的错误折叠,从而导致该蛋白在胞内被降解或者形成聚集体不能够排出胞外;在肝脏中这种错误构象蛋白质的堆积会诱发肝硬化等症状,因此,AATD也是一种典型的蛋白质构象障碍疾病^[26]。鉴于AATD能够同时造成肺和肝脏两种器官的损伤,其治疗方法也都被针对性地开发出来。针对肺部损伤问题目前最有效的治疗方法是 α 1AT增补疗法,该方法是向患者注射从正常血清中纯化获得的活性 α 1AT蛋白^[27-28]。而针对AATD引起的肝脏损伤问题尚无有效治疗方法可循,肝脏移植往往成为严重AATD肝病患者的唯一选项;如何缓解突变 α 1AT聚集体造成的肝脏损伤依然是有效治疗AATD的难题,为此在全球范围内有大量研究工作在开展,在此不再赘述^[29]。

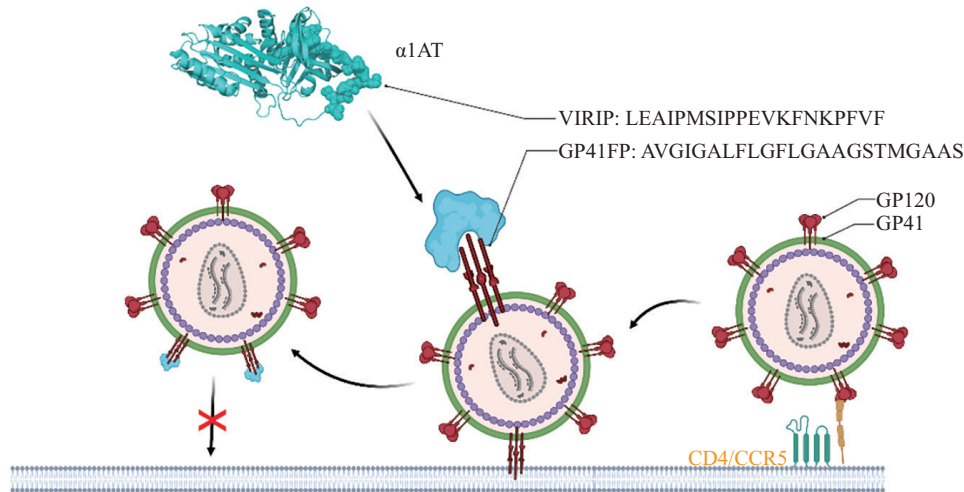
4 α 1AT的抗病毒作用

抗病毒作用是 α 1AT的又一大重要生理功能,通过影响病毒复制和侵袭 α 1AT参与抑制多种病毒的传播。例如人类疱疹病毒(human cytomegalovirus, HCMV)糖蛋白B(glycoprotein B, gB)的成熟需要依赖宿主弗林蛋白酶活性,而 α 1AT可以通过抑制这一关键弗林酶活性从而抑制gB的成熟进而影响HCMV病毒的复制^[30]。 α 1AT还通过抑制宿主蛋白酶SIP对拉

沙病毒包膜糖蛋白前体(glycoprotein complex, GPC)的水解活性来抑制拉沙病毒的传播^[31]。抗HIV-1病毒作用是近期研究发现的 α 1AT的新功能之一,早期的体外实验显示, α 1AT在易感细胞中对HIV-1的细胞感染和胞内病毒复制都有抑制作用^[32];之后多组临床数据显示感染HIV-1病人的血清 α 1AT浓度与其HIV-1临床症状严重性呈负相关,患有AATD的病人在感染HIV-1之后病情发展更加严重^[33],这些现象显示出机体内源 α 1AT参与了HIV-1病理学发展调控。在HIV-1入侵受体细胞时其病毒膜蛋白gp120/gp41负责与宿主细胞CD4受体结合并激活gp41蛋白N末端融合肽gp41FP继而引发病毒与细胞的膜融合(图4)。研究揭示 α 1AT抗HIV-1感染活性依赖于其蛋白分子C-端20个氨基酸片段(LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF), α 1AT正是通过这一段C-端氨基酸序列有效结合HIV病毒膜蛋白融合肽gp41FP从而干扰gp41介导的细胞融合过程^[33-35](图4)。德国Ulm大学KIRCHHOFF等^[33]通过进一步研究发现只需要 α 1AT的C-端氨基酸就足以实现与gp41蛋白的结合并发挥阻断病毒侵入细胞的作用;基于这一发现,他们体外合成这一段活性多肽并对其进行基于抗病毒活性的氨基酸序列优化,最后成功地开发了一款抗HIV-1的多肽类药物—病毒抑制肽(virus inhibitory peptide, VIRIP)。VIRIP及其衍生物在I、II期临床研究中表现出优异的抗HIV治疗效果^[33,36]。

5 冠状病毒与跨膜丝氨酸蛋白酶2

最新的研究显示, α 1AT在抵抗以SARS-CoV-2为代表的冠状病毒侵袭时表现出巨大的潜力^[37-38]。新冠病毒SARS-CoV-2与之前发现的SARS-CoV同属冠状病毒家族,在全基因组范围内享有较高的蛋白氨基酸序列和结构的同源性,并且两者都凭借由刺突蛋白S介导的方式入侵受体细胞^[39-40]。刺突蛋白S是冠状病毒颗粒表面广泛分布的一种高度糖基化跨膜蛋白,它以三聚体的形式聚集在病毒表面负责病毒与宿主细胞结合^[41-42]。根据功能不同,S蛋白分为S1和S2两个大的亚基,S1亚基的主要功能是识别并结合宿主细胞上膜的特异性蛋白受体血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2),研究显示,SARS-CoV-2相较于SARS-CoV具有明显更高的侵袭和传播效率,与其S1亚基对ACE2结合效率的提升直接相关^[43];S2亚基则负责介导病毒和宿



gp120/gp41与宿主细胞上CD4受体结合引发gp41FP的活化与细胞膜插入。 α 1AT通过C末端氨基酸(LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF)与gp41结合并掩盖gp41FP融合肽(AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAAS)从而阻断病毒入侵。

gp120/gp41 binding to the host cell's CD4 receptor causes the activation of gp41FP and insertion of the cell membrane. α 1AT binds to gp41 via the C-terminal amino acid and masks the gp41FP peptide thereby blocking viral invasion.

图4 α 1AT抑制HIV-1入侵细胞的机理

Fig.4 Mechanism of α 1AT inhibiting HIV-1 cell invasion

主细胞膜融合以及开启病毒的侵入过程^[42,44-45]。通常情况下,一个SARS-CoV-2病毒颗粒外表面分布有24到40个S蛋白复合物,当病毒颗粒接触入侵对象时,首先通过S1亚基的受体结合域RBD与目的细胞受体蛋白ACE2结合,从而固定病毒与细胞的连接形成稳定融合前状态;之后S2亚基经过跨膜丝氨酸蛋白酶2(transmembrane serine protease 2, TMPRSS2)的切割激活作用释放融合肽FP并开启融合肽FP对宿主细胞膜的嵌合以及下游的细胞融合过程^[42,45-46]。TMPRSS2作为S蛋白的主要激活剂在SARS-CoV和SARS-CoV-2的细胞侵袭过程中发挥着非常重要的作用,虽然冠状病毒颗粒可以不依赖于蛋白酶激活作用借助胞吞过程进入受体细胞,但是此途径的效率要远小于TMPRSS2激活的细胞入侵途径;以SARS-CoV为例,体外实验显示其胞吞侵袭途径效率是蛋白酶激活途径侵袭效率的0.1%~1.0%,因此无论是受体细胞TMPRSS2的表达缺失还是对其功能抑制都可以有效降低冠状病毒侵袭效率^[46-48]。

TMPRSS2是一个由492个氨基酸组成的典型胞外丝氨酸蛋白酶^[49],在人体肺部等多种组织器官中都有表达,其生理学功能与消化、炎症反应、肿瘤细胞侵袭等相关^[50]。但值得注意的是,TMPRSS2编码基因的敲除不会导致小鼠产生明显的病理学表型^[51],由于哺乳动物细胞表达多组跨膜丝氨酸蛋

白酶家族蛋白(type II transmembrane serine proteases, TTSP),因此有理论认为,TMPRSS2的编码基因敲除后其他的TTSP蛋白代偿了TMPRSS2的生理功能^[51]。体内实验显示相较于野生型小鼠,SARS-CoV-2^[52]、SARS-CoV^[53]和MERS-CoV^[54]对TMPRSS2编码基因敲除小鼠的侵袭效率都明显降低,且被感染后的小鼠的病理学严重程度明显减轻,可见TMPRSS2在多种冠状病毒的感染和传播中都扮演了重要角色。实际上不同的SARS-CoV-2病毒突变株传染率和致病率都会受TMPRSS2催化裂解病毒表面S蛋白效率的影响,最新研究表明,当前流行的新冠病毒Omicron(B.1.1.529)变种致病率的降低与其S蛋白不能被TMPRSS2有效利用直接相关^[55]。

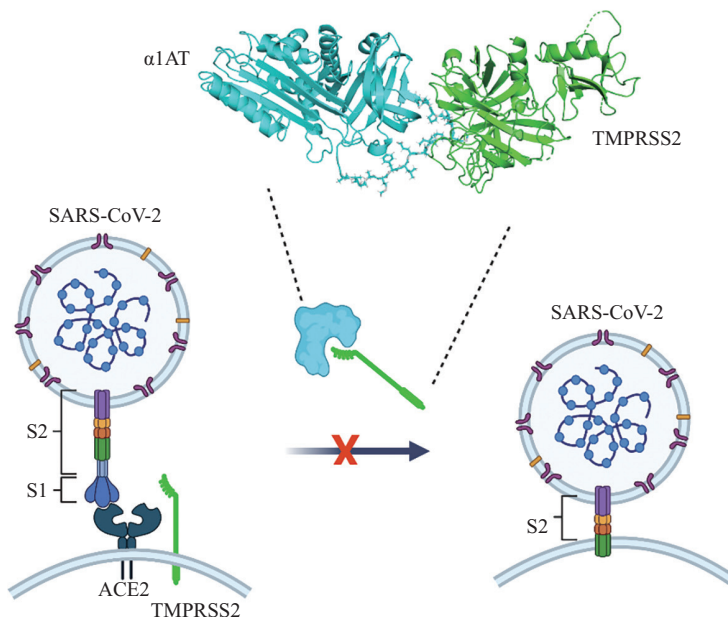
鉴于TMPRSS2在SARS-CoV-2侵袭侵袭过程中的重要作用,针对TMPRSS2的抑制剂药物开发成为对抗新冠病毒的研究热点。甲磺酸卡莫司他(camostat mesylate)是一种著名的口服丝氨酸蛋白酶抑制剂,它是最早被发现具有抑制TMPRSS2活性功能的药物之一;在细胞水平上甲磺酸卡莫司他的处理能够有效抑制多种表皮细胞TMPRSS2的水解活性从而阻断病毒与受体细胞的膜融合。以小鼠为对象的体内实验也证实该抑制剂的使用显著降低了由病毒感染引发的发病率和死亡率^[46-56]。分子水平上甲磺酸卡莫司他抑制TMPRSS2的具体机理尚不明确,但

是根据其与丝氨酸蛋白酶Prostain的蛋白共结晶结构信息推论甲磺酸卡莫司他抑制TMPRSS2活性可能与甲磺酸卡莫司共价结合TMPRSS2的活性氨基酸Ser441相关^[57]。以上证据表明,受体细胞表面蛋白TMPRSS2是影响新冠病毒传播的一个决定性因子,由于该蛋白的功能缺失对机体无明显副作用,针对TMPRSS2开发有效抑制剂是对抗SARS-CoV-2的一种有效策略。

6 α 1AT抑制SARS-CoV-2细胞侵袭

2021年WETTSTEIN等^[37]通过对COVID-19康复病人支气管肺泡灌洗液的短肽/蛋白质文库的筛选发现 α 1AT是一种人体自身携带的具有抵御SARS-CoV-2的有效活性蛋白;后续研究表明针对多种上皮细胞, α 1AT都能够以剂量依赖性方式抑制细胞表面的TMPRSS2活性并阻止SARS-CoV-2病毒对细胞的侵入、复制和传播^[37,58](图5)。对感染SARS-CoV-2病患血液样本的分析也显示血浆 α 1AT水平与COVID-19疾病的严重程度具有相关性,这些发现也正好表明 α 1AT是人体自身天然产生的冠状病毒拮抗剂^[59]。截止目前关于 α 1AT对TMPRSS2的抑制机理依然没有完全清楚,通过同源建模和分子对接的

方法,有研究组尝试对 α 1AT抑制TMPRSS2的作用机制进行推测,初步认为该抑制机理可能与抑制弹性蛋白酶相类似,首先由 α 1AT的RCL与TMPRSS2催化中心结合形成类似的酶与底物的复合物,当TMPRSS2活性Ser441完成催化裂解RCL中的肽键后与之形成更为稳定的共价连接最后导致TMPRSS2构象变化而失活^[37,58](图5)。目前这种机理假设还有待进一步研究加以证实,因为虽然TMPRSS2与弹性蛋白酶同属丝氨酸蛋白酶家族享有相似的催化机理,但是从蛋白结构上TMPRSS2与弹性蛋白酶催化结构域构象差别明显,在催化过程中TMPRSS2选择攻击RCL的哪个肽键并不清楚;此外除了丝氨酸蛋白酶催化结构域之外,全长的TMPRSS2分子还包含低密度脂蛋白受体蛋白A(LDL-receptor class A, LDLRA)和多半胱氨酸清道夫受体(scavenger receptor cysteine-rich, SRCR)两个功能迥异的结构域^[60],这些结构域如何影响TMPRSS2与 α 1AT的相互作用并影响抑制过程仍未可知,因此获得催化条件下 α 1AT与TMPRSS2蛋白质共晶体的结构信息成为解析该机理的关键。除了作为TMPRSS2的抑制剂直接调控SARS-CoV-2的细胞侵袭过程之外, α 1AT还通过其抗炎症功能影响COVID-19患者临床病理生理学



α 1AT通过反应中心环RCL与TMPRSS2水解酶活性位点结合阻碍TMPRSS2对S蛋白的切割作用减少S2的活化,进而阻止由S2亚基蛋白介导的病毒与宿主细胞的融合,从而起到抑制SARS-CoV-2的细胞侵袭效果。

The RCL of α 1AT inserted into the active site of TMPRSS2 suppresses S protein priming, resulting in impaired S2-mediated virus-host cell membrane fusion and thus inhibiting SARS-CoV-2 cellular invasion.

图5 α 1AT抑制TMPRSS2活性阻止SARS-CoV-2入侵细胞的机理

Fig.5 Proposed mechanism of α 1AT preventing SARS-CoV-2 cell invasion by inhibiting TMPRSS2

发展过程,最近的一项研究显示严重的COVID-19患者的血清白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)与 α 1AT的比率比普通患者高出2倍多,而IL-6被证实是COVID-19患者细胞因子风暴的重要组成成分^[61]。作为蛋白质药物, α 1AT自20世纪80年代末以来就被用于治疗慢性肺阻塞相关疾病,目前 α 1AT的增补疗法是唯一经过FDA批准的治疗AATD引起的肺部功能障碍的有效疗法^[27,62]。作为蛋白质药物, α 1AT的安全性经过了很好的检验和评估,研究表明在临床上静脉注射60~120 mg·kg⁻¹·w⁻¹不会引发机体的任何副作用^[63]。鉴于 α 1AT的抗SARS-CoV-2病毒能力和其良好的生物安全特性, α 1AT作为治疗急性COVID-19的药物在多个国家已经开展了临床试验和应用^[14,37,64]。

7 α 1AT的抗病毒应用前景

当前新型冠状病毒SARS-CoV-2依然是我国甚至全球社会面临的巨大威胁,一款有效的抗病毒药物的开发对抵抗疫情的重要性不言而喻。虽然针对SARS-CoV-2抗体的药物研发层出不穷,但是无奈该病毒的突变速率极其之快,病毒通过一次又一次的逃脱现有抗体的识别^[55]。面对不停出现的新型病毒突变体,传统的中和抗体类药物开发的严重滞后使得疫情控制陷入被动,因此新型的具有更普遍适用性的治疗方法亟待发明。鉴于TM-PRSS2在SARS-CoV-2入侵细胞时发挥的重要作用以及TM-PRSS2蛋白本身氨基酸序列的保守性,针对TM-PRSS2的抑制剂有望成为抗击冠状病毒的广谱新型药物。 α 1AT对TM-PRSS2的抑制功能的鉴定为抗击COVID-19提供了一个新的治疗选项。 α 1AT是目前发现的唯一一种人体自身产生的天然抗SARS-CoV-2血清蛋白,其低免疫原性和低副作用等特点是开发成应对COVID-19新药的独有优势,这也预示着将来 α 1AT在对抗SARS-CoV-2上的巨大应用潜力。当前纯化的 α 1AT作为蛋白质药物主要用于急性慢性阻塞性肺病的治疗,其在抗SARS-CoV-2上的应用属于旧药新用。虽然其具体的作用机理没有完全搞清楚,但是迫于COVID-19疫情的压力,在多个国家 α 1AT已经作为紧急用药用于治疗感染新冠病毒的重症,并取得了较好的效果^[14,37,64]。这一理想的临床应用结果更加凸显了 α 1AT抗病毒机理的基础研究的紧迫性,未来在分子尺度上进一步揭示 α 1AT抑制TM-PRSS2催化活性是机理研究的重要方向。除此

之外,进一步揭示 α 1AT如何影响COVID-19患者其他的生理反应的研究对其临床应用的推广也具有非常重要的意义。

参考文献 (References)

- [1] GOOPTU B, DICKENS J A, LOMAS D A. The molecular and cellular pathology of alpha(1)-antitrypsin deficiency [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(2): 116-27.
- [2] STOLLER J K, ABOUSSOUAN L S. A review of alpha1-antitrypsin deficiency [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(3): 246-59.
- [3] DORING G. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 150(6 Pt 2): S114-7.
- [4] PHAM C T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(7): 541-50.
- [5] KORKMAZ B, HORWITZ M S, JENNE D E, et al. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(4): 726-59.
- [6] SCHROEDER W T, MILLER M F, WOO S L, et al. Chromosomal localization of the human alpha 1-antitrypsin gene (PI) to 14q31-32 [J]. *Am J Hum Genet*, 1985, 37(5): 868-72.
- [7] GEBOES K, RAY M B, RUTGEERTS P, et al. Morphological identification of alpha-1-antitrypsin in the human small intestine [J]. *Histopathology*, 1982, 6(1): 55-60.
- [8] DE SERRES F, BLANCO I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease [J]. *J Intern Med*, 2014, 276(4): 311-35.
- [9] HAFEEZ W, CILIBERTO G, PERLMUTTER D H. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types [J]. *J Clin Invest*, 1992, 89(4): 1214-22.
- [10] KALSHEKER N. Chapter 3 Alpha-1-antitrypsin gene regulation [M]/KALSHEKER N, STOCKLEY R. Alpha-1-antitrypsin Deficiency. Boston: Academic Press. 2017: 25-35.
- [11] LONG G L, CHANDRA T, WOO S L, et al. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant [J]. *Biochemistry*, 1984, 23(21): 4828-37.
- [12] STRNAD P, MCELVANEY N G, LOMAS D A. Alpha(1)-antitrypsin deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(15): 1443-55.
- [13] CARRELL R W, JEPSSON J O, VAUGHAN L, et al. Human alpha 1-antitrypsin: carbohydrate attachment and sequence homology [J]. *FEBS Lett*, 1981, 135(2): 301-3.
- [14] LECHOWICZ U, RUDZINSKI S, JEZELA-STANEK A, et al. Post-translational modifications of circulating alpha-1-antitrypsin protein [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9187.
- [15] MARTIN S L, DOWNEY D, BILTON D, et al. Safety and efficacy of recombinant alpha(1)-antitrypsin therapy in cystic fibrosis [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2006, 41(2): 177-83.
- [16] JONES E A, VERGALLA J, STEER C J, et al. Metabolism of intact and desialylated alpha 1-antitrypsin [J]. *Clin Sci Mol Med*, 1978, 55(2): 139-48.
- [17] HUNTINGTON J A, READ R J, CARRELL R W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation [J]. *Nature*, 2000, 407(6806): 923-6.
- [18] LOEBERMANN H, TOKUOKA R, DEISENHOFER J, et al. Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary

- analysis of the implications for function [J]. *J Mol Biol*, 1984, 177(3): 531-57.
- [19] TRAVIS J, SALVESEN G S. Human plasma proteinase inhibitors [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 655-709.
- [20] ELLIOTT P R, LOMAS D A, CARRELL R W, et al. Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin [J]. *Nat Struct Biol*, 1996, 3(8): 676-81.
- [21] MARIJANOVIC E M, FODOR J, RILEY B T, et al. Reactive centre loop dynamics and serpin specificity [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3870.
- [22] DEMENTIEV A, DOBO J, GETTINS P G. Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3452-7.
- [23] MAAS C, DE MAAT S. Therapeutic SERPINS: improving on Nature [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 648349.
- [24] RAO N V, WEHNER N G, MARSHALL B C, et al. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(15): 9540-8.
- [25] STOLLER J K, SNIDER G L, BRANTLY M L, et al. AMERICAN THORACIC SOCIETY/EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY STATEMENT: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency [J]. *Pneumologie*, 2005, 59(1): 36-68.
- [26] LOMAS D A, EVANS D L, FINCH J T, et al. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver [J]. *Nature*, 1992, 357(6379): 605-7.
- [27] WEWERS M D, CASOLARO M A, SELLERS S E, et al. Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316(17): 1055-62.
- [28] CHAPMAN K R, BURDON J G, PIITULAINEN E, et al. Intravenous augmentation treatment and lung density in severe alpha1 antitrypsin deficiency (RAPID): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 360-8.
- [29] LORINCZ R, CURIEL D T. Advances in alpha-1 antitrypsin gene therapy [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 63(5): 560-70.
- [30] JEAN F, THOMAS L, MOLLOY S S, et al. A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(6): 2864-9.
- [31] MAISA A, STROHER U, KLENK H D, et al. Inhibition of Lassa virus glycoprotein cleavage and multicycle replication by site 1 protease-adapted alpha(1)-antitrypsin variants [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009, 3(6): e446.
- [32] SHAPIRO L, POTT G B, RALSTON A H. Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1 [J]. *FASEB J*, 2001, 15(1): 115-22.
- [33] FORSSMANN W G, THE Y H, STOLL M, et al. Short-term monotherapy in HIV-infected patients with a virus entry inhibitor against the gp41 fusion peptide [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(63): 63re3.
- [34] CONGOTE L F. The C-terminal 26-residue peptide of serpin A1 is an inhibitor of HIV-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(2): 617-22.
- [35] ZHOU X, LIU Z, ZHANG J, et al. Alpha-1-antitrypsin interacts with gp41 to block HIV-1 entry into CD4⁺ T lymphocytes [J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 172.
- [36] MUNCH J, STANDKER L, ADERMANN K, et al. Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 263-75.
- [37] WETTSTEIN L, WEIL T, CONZELMANN C, et al. Alpha-1 antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1726.
- [38] DE LOYOLA M B, DOS REIS T T A, DE OLIVEIRA G, et al. Alpha-1-antitrypsin: a possible host protective factor against Covid-19 [J]. *Rev Med Virol*, 2021, 31(2): e2157.
- [39] ALIPOOR S D, MORTAZ E, JAMAATI H, et al. COVID-19: molecular and cellular response [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 563085.
- [40] LUKASSEN S, CHUA R L, TREFZER T, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells [J]. *EMBO J*, 2020, 39(10): e105114.
- [41] LAN J, GE J, YU J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor [J]. *Nature*, 2020, 581(7807): 215-20.
- [42] WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1735.
- [43] 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): 1260-3.
- [44] WALLS A C, TORTORICI M A, BOSCH B J, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer [J]. *Nature*, 2016, 531(7592): 114-7.
- [45] WANG M Y, ZHAO R, GAO L J, et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 587269.
- [46] 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): 271-80, e8.
- [47] MATSUYAMA S, UJIKE M, MORIKAWA S, et al. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(35): 12543-7.
- [48] 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]. *J Virol*, 2019, 93(6): e01815-18.
- [49] BERTRAM S, GLOWACKA I, BLAZEJEWSKA P, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells [J]. *J Virol*, 2010, 84(19): 10016-25.
- [50] LAM D K, DANG D, FLYNN A N, et al. TMPRSS2, a novel membrane-anchored mediator in cancer pain [J]. *Pain*, 2015, 156(5): 923-30.
- [51] KIM T S, HEINLEIN C, HACKMAN R C, et al. Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(3): 965-75.
- [52] IWATA-YOSHIKAWA N, KAKIZAKI M, SHIWA-SUDO N, et al. Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6100.
- [53] GLOWACKA I, BERTRAM S, MULLER 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]. *J Virol*, 2011, 85(9): 4122-34.
- [54] SHIRATO K, KAWASE M, MATSUYAMA S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2 [J]. *J Virol*, 2013, 87(23): 12552-61.
- [55] SHUAI H, CHAN J F W, HU B, et al. Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron [J]. *Nature*, 2022, 603(7902): 693-9.
- [56] 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]. *J Virol*, 2012, 86(12): 6537-45.
- [57] SPRAGGON G, HORNSBY M, SHIPWAY A, et al. Active site conformational changes of prostaticin provide a new mechanism of protease regulation by divalent cations [J]. *Protein Sci*, 2009, 18(5): 1081-94.
- [58] AZOUZ N P, KLINGLER A M, CALLAHAN V, et al. Alpha 1 Antitrypsin is an Inhibitor of the SARS-CoV-2-Priming Protease TMPRSS2 [J]. *Path Immun*, 2021, 6(1): 55-74.
- [59] SHAPIRA G, SHOMRON N, GURWITZ D. Ethnic differences in alpha-1 antitrypsin deficiency allele frequencies may partially explain national differences in COVID-19 fatality rates [J]. *FASEB J*, 2020, 34(11): 14160-5.
- [60] FRASER B J, BELDAR S, SEITOVA A, et al. Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(9): 963-71.
- [61] MCELVANEY O J, MCEVOY N L, MCELVANEY O F, et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(6): 812-21.
- [62] BRANTLY M L, LASCANO J E, SHAHMOHAMMADI A. Intravenous alpha-1 antitrypsin therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency: the current state of the evidence [J]. *Chronic Obstr Pulm Dis*, 2018, 6(1): 100-14.
- [63] CAMPOS M A, GERAGHTY P, HOLT G, et al. The biological effects of double-dose alpha-1 antitrypsin augmentation therapy. a pilot clinical trial [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(3): 318-26.
- [64] YANG C, KESHAVJEE S, LIU M. Alpha-1 antitrypsin for COVID-19 treatment: dual role in antiviral infection and anti-inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 615398.