

· 综述 ·

丙型肝炎病毒与细胞自噬相互作用研究进展

全敏 王琦 成军

细胞自噬 (autophagy) 是细胞降解受损细胞器和错误折叠的蛋白分子, 以及作为固有免疫应答的一部分来清除入侵病原体的一个动态连续的生理过程。自噬相关蛋白参与其吞噬底物的双层膜结构 (double membrane vesicles, DMVs) 的形成, 自噬体与溶酶体融合完成自噬溶酶体的成熟, 由自噬溶酶体来最终完成降解底物的过程。多种因素可诱导自噬发生, 如饥饿、药物、受损细胞器以及病原体等。在真核生物中细胞自噬已演变为一种应激反应, 能调节细胞内能量和监控细胞器质量; 同时自噬组件得到更高的分化, 功能得到更好的完善, 与细胞内广泛存在的信号通路相互作用并参与调节应激反应的多种防御机制。

病原体入侵细胞, 自噬会参与提呈病原体抗原给免疫应答细胞的过程, 部分病毒会利用这一保护性生理过程, 亦是目前受关注的热点。丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是世界范围内引起急性和慢性肝病的主要因素之一, 约 1.7 亿人口持续感染 HCV, 且存在发展为肝硬化和肝癌的高风险^[1]。80% ~ 90% 感染者不能自发清除病毒而发展为慢性感染者。HCV 基因组全长 9600 nt, 为单股正链黄病毒科 RNA 病毒, 有一个长的开放读码框架, 在翻译过程中或翻译后由细胞内或病毒的蛋白酶裂解成结构蛋白 (core、E1 和 E2) 组成病毒感染颗粒, 及非结构蛋白 (p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B) 从而在病毒生活周期的各个水平发挥作用, 包括病毒 RNA 复制及病毒颗粒组装。多项报道 HCV 感染细胞后会出现自噬泡累积, HCV 需要自噬蛋白以前病毒因子的角色参与复制并对其生活周期发挥着不可或缺的作用。本文就目前关于 HCV 与自噬相互作用的机制研究作一综述。

一、HCV 调控自噬通路

1. HCV 诱导自噬的发生: 多种 DNA 和 RNA 病毒感染细胞后会出现自噬泡或自噬相关空泡结构的累积^[2,5]。Goughoulte 等^[6]首次用 HCV 1a 型 (H77) 感染永生型肝细胞, 电镜下可观察到自噬空泡的累积, 荧光显微镜下观察到自噬标记物 LC3 (microtubule-associated protein-1 light chain-3) 和自噬相关基因 Atg5 表达增加。目前, HCV 不同病毒株感染非肝源细胞系后也出现自噬泡的累积^[2,3,5,7]。HCV 亚基因组结构在肝细胞能够进行复制和表达, 虽然 HCV 非结构蛋白进入细胞后不能产生病毒颗粒, 但仍可诱导自噬泡累积,

如 NS4B 转染细胞后可与 Rab5 和 III 型 PI3K 形成复合体而独立诱导自噬的发生^[2,8,9]。Sir 等^[2]研究发现, HCV 感染后自噬相关基因如 Atg5、7、12 和 Beclin-1 的表达会上调, 但是标记自噬功能的蛋白如长寿蛋白及 p62 (聚泛素结合蛋白) 等的降解未发生明显改变。故推测 HCV 诱导的自噬不完全, 或者 HCV 抑制了自噬体和溶酶体融合进而阻断了自噬溶酶体内蛋白的降解。另一种观点认为 HCV 诱导的自噬是完全的, Mizui 等^[10]在 HCV 感染细胞的同时加入溶酶体蛋白酶抑制剂氯喹 (chloroquine, CQ) 抑制自噬成熟, 发现细胞内 HCV 复制下降且与 CQ 呈剂量依赖性。后来多项研究均证实自噬的成熟对 HCV 复制很重要, 只是自噬溶酶体降解的底物不是长寿蛋白和 p62 等^[11-12]。因此, HCV 复制并不仅利用自噬 DMVs, 自噬溶酶体降解的过程也参与了对 HCV 复制的调控。这提示, 溶酶体蛋白酶抑制剂能够降低 HCV 复制, 有可能作为抗 HCV 复制的新药研究的靶点。

2. HCV 通过 UPR 诱导自噬: 内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激, 既未折叠蛋白应答 (unfolded protein response, UPR), 可通过增强蛋白质折叠能力、阻滞蛋白质翻译及加速蛋白质降解等使细胞从 ER 应激中恢复。病毒多聚蛋白在 ER 或 ER 来源的结构中合成, 所以多种病毒可诱导细胞出现 UPR^[2,11,13]。体外研究证实 HCV 可诱导 UPR, 在 HCV 感染者的肝脏组织活检标本中也得到证实, 但是诱导机制尚不明确^[2,11,14]。已有研究显示 NS4B 的独立表达可反式激活激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和肌醇需求酶-1/X 盒结合蛋白 (inositol-requiring enzyme 1/X-box-binding protein 1, IRE1/XBP1), 可能是 HCV 激活 UPR 的机制之一^[14]。另外, HCV E2 糖蛋白在跨膜区存在保守模体, 与 E1 糖蛋白形成复合物, 主要存在并累积于 ER, 可激活 UPR^[15]。不同 UPR 调节因子 (如 PERK、IRE1 α 、CHOP 和 ATF6) 的下调会抑制 HCV 诱导的 LC3 与磷脂酰乙醇胺结合^[2,11]。类似于缺氧启动 UPR 诱导自噬的机制, HCV 诱导 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 表达上调可促进 Atg5 和 LC3B 的表达, 进而激活自噬^[11]。HCV 也可能通过内质网类似激酶 (protein kinase-like ER kinase, PERK) 诱导真核细胞翻译起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) 磷酸化, 进而激活自噬^[2,16]。UPR 调节因子表达下调的细胞中 HCV 复制和 HCV 相关蛋白减少, 但是相关 HCV 蛋白或 HCV RNA 调节自噬通路是直接还是间接通过激活 UPR 途径还有待深入研究。

二、自噬对 HCV 生活周期的影响

1. 自噬调节 HCV 复制: 自噬能降解入侵细胞的微生物, 包括病毒、细菌和原生动物^[16]。在宿主细胞对病原体的应答过程中自噬蛋白可调节抗病毒效应和炎症应答之间的平衡^[17]。病毒和自噬的相互作用会影响感染的严重性和最终

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.031

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才“领军人才”项目 (No. 2009-1-09)

作者单位:100015 北京, 北京大学北京地坛医院教学医院 (全敏); 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 (王琦、成军); 新发突发传染病研究北京市重点实验室 (王琦、成军)

通讯作者:成军, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

结局,包括病毒的存活和持续感染^[16]。多项研究显示,HCV 大量复制需要自噬蛋白如 Beclin-1、LC3、Atg4B、Atg5、Atg7 和 Atg12 的表达^[3,5,7,11,18]。其能特异性调节 HCV RNA 转录起始以及 HCV 生存的各个阶段。Dreux 等^[3]用 HCV 基因直接感染自噬蛋白(Beclin-1、Atg4B 和 Atg12)表达下调的细胞后病毒复制不能启动,新的感染也不能建立。Tanida 等^[5]也观察到 HCV 感染 Beclin-1 和 Atg7 基因敲除的细胞后,核心蛋白和感染颗粒会下降,推测自噬蛋白除了在病毒复制建立时发挥作用外,也在 HCV 病毒颗粒组装和释放时发挥作用。但 Dreux 等^[3]认为 HCV 病毒颗粒的入侵和释放并不依赖于自噬,仅在新入侵 HCV 复制建立或将 HCV RNA 转运到复制结构中发挥作用。此结论与 Guevin 等^[7]发现 NS5B 与 Atg5 相互作用,并共定位于自噬 DMVs 结构上的现象在感染 JFH1 2 d 后出现在 80% 的细胞内,但在感染 5 d 时几乎检测不到共定位现象相一致。所以,HCV 复制的建立需要自噬,但复制的维系并不依赖于自噬。

2. 自噬蛋白对固有免疫应答信号通路的调节:固有免疫受体识别病毒 RNA 后,会产生抗病毒因子如 I 型干扰素(IFN- α 和 IFN- β)、免疫因子及免疫应答相关因子^[19]。细胞内受体如维甲酸诱导基因 I (retinoid acid-inducible gene I, RIG-I)、黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5) 及 TLRs 识别病毒 RNA 后提呈给胞内内体(溶酶体)。在 HCV 感染的细胞内自噬蛋白作为固有免疫应答抗病毒(通过激活或不激活抗病毒分子)的主要调节分子,既要限制病毒传播又要防止宿主出现过强的病理性应答^[16,20,21]。如在水泡性口膜炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)感染的细胞内 Atg5 可抑制 RIG-I 触发 IFN- α/β 产生^[20,22]。IFN- β 启动子刺激因子 1 (IFN- β promoter stimulator 1, IPS-1) 是 RIG-I 的下游协作分子,Journai 等^[20]发现 Atg5-Atg12 共轭体通过 caspase 招募位点(caspase recruitment domains, CARDs)与 RIG-I 和 IPS-1 相互作用。笔者推测 Atg5-Atg12 共轭体通过直接嵌入到 RIG-I 和 IPS-1 CARD 位点来阻止信号转导,抑制 I 型 IFN 的产生。Tal 等^[22]研究显示细胞自噬通过清除功能紊乱的线粒体来限制 RIG-I 诱导 I 型 IFN 启动子激活。Shrivastava 等^[18]认为 Beclin-1 和 Atg7 有可能降低了 IFN- β 和干扰素刺激基因(interferon-stimulated gene, ISG)的表达。Ke 等^[11]研究显示下调 Atg5 表达能显著增强 IFN- β 启动子活性,自噬溶酶体的成熟对抑制 HCV 相关分子膜式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)诱导 RIG-I 信号发挥重要作用,也有研究证实 HCV 3'-UTR 基因组序列中包含多聚尿嘧啶和胞嘧啶(poly-U/UC)模体,此模体是公认的 RIG-I 主要配体^[23]。Ke 等^[11]推测 UPR 调节因子(如 PERK、IRE1 α 、CHOP 和 ATF6)也可能抑制 RIG-I 的信号转导。提示自噬相关蛋白和 UPR 调节因子在抑制由黄病毒科膜元件 PAMPs 诱导产生的抗病毒信号转导过程中起重要作用。

HCV 可通过 NS3/4A 的蛋白酶水解 IPS-1 而抑制 RIG-I 诱导的固有免疫应答^[24-26],也可不通过 NS3/4A 来抑制干扰素应答,但是机制尚不清楚^[26]。Ke 等^[11]发现在自噬蛋白缺乏的细胞内过表达 RIG-I 和转染 HCV PAMP 都不能启动 IFN- β 和 ISG 的表达。自噬蛋白调控 RIG-I 信号对 HCV 复

制的影响程度还不明确,自噬蛋白也可能通过 RIG-I 以外的机制调节 HCV 复制。

3. 自噬对 HCV 感染细胞后脂代谢的调节:HCV 感染与脂质合成增多、 β 氧化减少及载脂蛋白分泌减少相关^[27]。HCV RNA 的复制依赖于宿主细胞脂代谢,其中胆固醇的合成至关重要。然而,Vescovo 等^[12]发现 HCV 感染者肝组织中自噬发生的水平与微泡脂肪变呈负相关,在非 HCV 感染者肝组织中并无此相关性。进一步研究发现 HCV 感染细胞内自噬的发生是脂质选择性的过程,在 HCV 感染的细胞内加入胆固醇合成抑制剂后自噬发生水平显著下降。说明 HCV 诱导的自噬有调节胆固醇代谢的作用。令人困惑的是自噬对胆固醇的调节对 HCV 生活周期是利还是弊。Heaton 等^[28]发现登革热病毒感染细胞后同样出现自噬泡累积,吞噬的脂滴也增加,结果证实自噬对脂滴的这种吞噬作用有利于病毒复制。另外,HCV 诱导自噬对脂滴的吞噬也有可能是为了自身更好复制。

4. 自噬双层膜结构对 HCV 复制的影响:HCV 在胞浆内膜结构上复制和重组,研究推测自噬 DMVs 为细胞内膜相关 RNA 病毒复制的工厂提供支架。自噬体 DMVs 的起源仍未知,目前研究显示 ER 对自噬体的形成极其重要。ER 的特定位点或相连接的结构会招募自噬蛋白,而且 ER 和自噬体膜可直接连接^[31]。通过重建 ER 膜,自噬蛋白或自噬空泡可能会给入侵病毒 RNA 转录和复制提供起始膜结构,也可能对病毒 RNA 从胞浆到转录结构的运输起作用。一些病毒 RNA 复制/转录的复合物,如:巢状病毒(nidoviruses)和轮状病毒(rotaviruses)锚定在类似附着有 LC3 的自噬 DMVs 上^[29]。HCV 感染的细胞也会出现 LC3 和病毒蛋白共定位^[2,3,5,6]。不连续蔗糖梯度分析显示,DMVs 碎片中 HCV RNA 和蛋白与 LC3 共沉淀^[29,30]。运用免疫荧光观察到在 HCV 亚基因组复制的细胞中一些 DMVs 包含 HCV NS5A 蛋白。提示在 HCV 复制的细胞内,一些病毒成分有可能出现在自噬空泡的重组结构中^[30]。Guevin 等^[7]报道在异源酵母系中,HCV NS5B 通过高度保守的氨基酸 C-端与 Atg5 相互作用,出现共定位。自噬 DMVs 是为 HCV 的复制提供场所还是另有用途有待深入研究。

总之,自噬组件和 HCV 之间的相互关系已经成为倍受关注的热点,HCV 利用细胞自噬为其生活周期服务^[2,3,5]。无论是体外实验还是临床研究都证实 HCV 感染可诱导细胞自噬。Rautou 等^[32]报道,与健康对照、非酒精性脂肪肝、酒精性脂肪肝和慢性 HBV 感染者的肝组织相比,慢性 HCV 感染者肝组织中自噬活性增高。然而 HCV 是如何调节自噬通路,如何利用自噬蛋白启动复制,如何削弱 RIG-I 信号都不是很清楚,所以自噬在 HCV 感染后所充当的各种角色仍需深入研究。

目前证实药物调节自噬能增强抗肿瘤药物疗效^[33]。阻断自噬溶酶体的成熟有可能直接或间接通过增强 RIG-I 信号,抑制 HCV 的复制^[11]。自噬也有可能成为抗菌药物的合理作用靶点^[34]。然而,现在对自噬在病毒感染和增殖方面所发挥作用的认知只是个开始,需要更深入的研究才能更好的为 HCV 及其他病毒的防治提供帮助。

参 考 文 献

- 1 Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(9):558-567.
- 2 Sir D, Chen WL, Choi J, et al. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*, 2008, 48(4):1054-1061.
- 3 Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, et al. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33):14046-14051.
- 4 Tang H, Da L, Mao Y, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*, 2009, 49(1):60-71.
- 5 Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, et al. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy*, 2009, 5(7):937-945.
- 6 Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, et al. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J Virol*, 2008, 82(5):2241-2249.
- 7 Guevin C, Manna D, Belanger C, et al. Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology*, 2010, 405(1):1-7.
- 8 Lee DY, Sugden B. The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene*, 2008, 27(20):2833-2842.
- 9 Su WC, Chao TC, Huang YL, et al. Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. *J Virol*, 2011, 85(20):10561-10571.
- 10 Mizui T, Yamashina S, Tanida I, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*, 2010, 45(2):195-203.
- 11 Ke PY, Chen SS. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest*, 2011, 121(1):37-56.
- 12 Vescovo T, Romagnoli A, Perdomo AB, et al. Autophagy protects cells from HCV-induced defects in lipid metabolism. *Gastroenterology*, 2012, 142(3):644-653.
- 13 He B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ*, 2006, 13(3):393-403.
- 14 Zheng Y, Gao B, Ye L, et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J Microbiol*, 2005, 43(6):529-536.
- 15 Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, et al. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol*, 1998, 72(3):2183-2191.
- 16 Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle*, 2010, 9(7):1295-1307.
- 17 Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011, 469(7330):323-335.
- 18 Shrivastava S, Raychoudhuri A, Steele R, et al. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology*, 2011, 53(2):406-414.
- 19 Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, 2009, 21(4):317-337.
- 20 Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, et al. The Atg5-Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(35):14050-14055.
- 21 Saitoh T, Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol*, 2010, 189(6):925-935.
- 22 Tal MC, Sasai M, Lee HK, et al. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(8):2770-2775.
- 23 Saito T, Owen DM, Jiang F, et al. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*, 2008, 454(7203):523-527.
- 24 Foy E, Li K, Sumpter R Jr, et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8):2986-2991.
- 25 Li XD, Sun L, Seth RB, et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(49):17717-17722.
- 26 Cheng G, Zhong J, Chisari FV. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(22):8499-8504.
- 27 Piver E, Roingeard P, Pages JC. The cell biology of hepatitis C virus (HCV) lipid addiction: molecular mechanisms and its potential importance in the clinic. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(6):869-879.
- 28 Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(5):422-432.
- 29 Berkova Z, Crawford SE, Trugnan G, et al. Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J Virol*, 2006, 80(12):6061-6071.
- 30 Ferraris P, Blanchard E, Roingeard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol*, 2010, 91(9):2230-2237.
- 31 Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, 2010, 6(6):764-776.
- 32 Rautou PE, Cazals-Hatem D, Feldmann G, et al. Changes in autophagic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Pathol*, 2011, 178(6):2708-2715.
- 33 Chen N, Karantza V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(2):157-168.
- 34 Subauste CS. Autophagy as an antimicrobial strategy. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7(6):743-752.

(收稿日期:2012-06-14)

(本文编辑:孙荣华)