

· 综述 ·

丙型肝炎病毒复制的研究进展

朱勇喆 戚中田

丙型肝炎病毒(HCV)感染是全球范围内导致慢性肝炎、肝硬化以及肝癌的重要原因。1989年,对一位输血后非甲非乙型肝炎患者的血清表达文库进行免疫筛选后,首次证实了HCV的存在^[1]。但HCV很难被直接观察到,也无法在体外进行有效的培养,这妨碍了病毒生命周期的阐明以及特异性抗病毒药物和预防性疫苗的发展。尽管存在种种障碍,在过去的18年中对HCV的研究还是取得了重大进展,主要通过异源表达系统、黑猩猩体内感染的功能性cDNA克隆、复制子(replicon)系统和假病毒(膜表面为功能性HCV包膜蛋白的逆转录病毒颗粒,HCVpp)以及HCVcc(细胞培养来源的HCV)等来实现的。本文就近年来HCV复制方面的研究进展作一综述。

一、病毒侵入

HCV只感染人类和黑猩猩,肝细胞是其主要靶细胞。现认为CD81、LDL受体(LDLR)、B族型清道夫受体(SR-BI)以及claudin-1都是HCV的受体。由于HCV能与LDL及VLDL结合,因此LDLR成为了备受关注的候选受体,但其功能的重要性还有待考证。与氨基葡聚糖一起,LDLR和其他血清中与脂蛋白结合及代谢有关的细胞表面蛋白,发挥初级收集器的作用,将HCV颗粒富集于肝细胞表面,从而促进CD81及其他受体与之结合。

CD81和SR-BI都与包膜蛋白E2结合。CD81是HCV感染必须依赖的分子,CD81抗体或CD81大胞外环重组蛋白均能有效阻断HCV的感染,用基因转染的方法使CD81阴性的肝癌细胞株HepG2表达CD81可赋予HCVpp和HCVcc易感性。E2蛋白中的高变区1(HVR1)是介导E2与SR-BI结合的重要肽段,HVR1高度变异的特点使不同基因型的HCVpp对SR-BI的依赖性有所差异。

最近鉴定出紧密连接蛋白claudin-1为HCV的辅助受体^[2]。claudin-1是HCV侵入肝细胞所必需的,并且能使HCV感染某些非肝源性细胞,其作用可能发生在CD81之后。然而某些细胞尽管表达CD81、SR-BI和claudin-1,但并不感染HCV,这说明还存在未知的HCV受体。HCV通过网格蛋白介导的内吞作用侵入细胞,早期内吞体内的低pH引起病毒包膜与内吞体膜融合,从而使病毒衣壳游离,进入胞浆内而起始HCV的复制过程。目前对HCV包膜蛋白中融合肽的定位以及膜融合机制尚不清楚。

二、IRES介导翻译的起始

内部核糖体进入位点(IRES)由5'-NCR的Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ结构域以及核心编码区

作者单位:200433 上海市,第二军医大学微生物学教研室

通讯作者:戚中田 Email: qizt@smmu.edu.cn

的最初 24 ~ 40 个核苷酸构成。IRES 和 40 S 核糖体亚单位相互作用,形成一个二元复合物,启动 HCV 翻译。在真核生物翻译起始因子 3(eIF3)和三元复合物(eIF2 • Met-tRNA • GTP)连接之后,于起始密码子 AUG 处开始 48 S 样复合物的装配。最后,60 S 亚单位通过 GTP 依赖的结合形成 80 S 复合物,此步为限速反应。

现已能够获得 HCV IRES 关键序列的高分辨结构。另外,利用低温电子显微镜可分辨出结合在 40 S 核糖体亚单位及 eIF3 上的 HCV IRES 三维结构。研究发现 IRES 的结合引起 40 S 亚单位的构象发生显著变化,这可能是 80 S 核糖体装配所必需的。此外,eIF3 • IRES • 40 S 复合物模型显示 eIF3 利用了 HCV IRES,或者说在帽依赖翻译过程中,经典翻译起始因子 eIF4F 也通过相似的结构决定了病毒单股正链 RNA 或细胞 mRNA 的位置,分别位于 40 S 核糖体亚单位移出位点附近,促进起始复合物的装配。

三、病毒蛋白的结构与功能

HCV 的单链 RNA 翻译产物为由 3010 个氨基酸残基组成的多肽,在宿主细胞信号肽酶以及多肽内部蛋白酶的作用下形成 3 种结构蛋白和 7 种非结构蛋白。

1. 核心蛋白:核心蛋白参与组成病毒的核衣壳,其羧基端为信号肽,作用是引导内质网膜上的新生多肽进入内质网腔内。信号序列被信号肽酶切割下来后形成未成熟的核心蛋白,含有 191 个氨基酸。未成熟的核心蛋白经过 C-端信号肽酶的进一步加工形成成熟的核心蛋白,含有 173 ~ 179 个氨基酸残基。

核心蛋白的氨基端亲水区(D1),碱性氨基酸残基所占比例较高,其主要参与 RNA 的结合以及蛋白质的同源寡聚化。核心蛋白与脂滴的结合是由中央的疏水区(D2)介导的,这种结合确保了蛋白质的正确折叠,可能在病毒复制和/或病毒体形态发生时起作用。

2. 包膜糖蛋白:包膜糖蛋白 E1 和 E2 为糖基化蛋白,可形成非共价异二聚体,E1 和 E2 蛋白羧基端的跨膜区参与异二聚体的形成,而羧基端的第二条疏水肽段则发挥 E2 和 p7 蛋白信号肽的作用。在信号序列切除前,E1 和 E2 的羧基端在内质网膜中形成发夹结构,信号序列被切除之后则重新定位,形成单次跨膜结构。

3. p7:p7 为含 63 个氨基酸残基的多肽,E2 的不完全分割体。据报道^[3]p7 能形成寡聚体并具有阳离子通道活性,这说明它属于病毒离子孔道蛋白家族,可能在病毒颗粒成熟和释放过程中起重要作用。p7 也许会因此成为抗病毒治疗的新靶位。

4. NS2-3 蛋白酶:该蛋白酶的催化活性部位位于 NS2 的羧基端 1/2 和 NS3 氨基端的 1/3 氨基酸残基中。与 HCV 的其他蛋白质一样,NS2 连接于细胞内的膜结构上。最近已经解析出 NS2 蛋白酶的晶体结构(NS2 的 94 ~ 217 位氨基酸残基),NS2 蛋白形成二聚体后具有 2 个复合活性位点,每个位点由来源于两个单体的氨基酸残基组成。形成二聚体后,NS2-3 蛋白酶才具有活性,这说明活性复合

物 NS2-3 的切割及其形成受 NS2 浓度的调节。NS2 的 N-端结构的解析有助于 NS2 的其他功能的认识。最近发现^[4] NS2 的氨基端为产生感染性子代病毒所必需,机理可能是其影响了病毒生命周期的晚期环节。在 NS2 中进行基因融合可构建高效 HCVcc 嵌合体。现已证实在 HCV 患者中,NS2 处存在基因型内和基因型间的重组位点^[5]。

5. NS3-4A 复合物: NS3 是一个多功能蛋白,其 N-端 1/3 含有丝氨酸蛋白酶, C-端 2/3 为 RNA 解旋酶/NTP 酶。NS4A 作为一个辅助因子,调节 NS3 丝氨酸蛋白酶的活性。NS3 解旋酶是 2DExH/D 盒解旋酶超家族的成员,偶联双链 RNA 或具有二级结构的单链 RNA 的解链和 ATP 的水解功能。丝氨酸蛋白酶为何会与 RNA 解旋酶连接目前尚不清楚,但最新证据显示两者之间确实存在相互作用^[7]。

6. NS4B: NS4B 是一个特征相对不明显的蛋白质,分子量 27 kD。其功能之一是诱导膜网的形成,这种特殊的膜结构可作为 HCV 复制复合物的支架。据预测,NS4B 含有 4 个跨膜片段,并通过羧基端的两个半胱氨酸形成寡聚体。

7. NS5A: NS5A 是一种磷酸化蛋白,包括基础磷酸化(56 kD)和高度磷酸化(58 kD)两种形式。细胞培养适应性突变常发生于中央的丝氨酸残基,而后者为高度磷酸化所必需,这提示 HCV RNA 的复制效率受到 NS5A 磷酸化状态的调节。丝氨酸的高度磷酸化可降低 NS5A 与人囊泡相关膜蛋白相关蛋白 A(hVAP-A)的相互作用。这种囊泡分选蛋白指导非结构蛋白向脂筏移动,而脂筏可能参与病毒 RNA 的复制^[8]。

NS5A 是通过 N-端兼性 α 螺旋定位于膜上的单蛋白。此螺旋的疏水面富含色氨酸,嵌入质膜界面之中;而带电的极性面则暴露于胞质中,可能参与特异性蛋白质间的相互作用,这种作用为功能性 HCV 复制复合物的形成所必需。

8. NS5B: HCV 的复制先以基因组 RNA 为模板合成互补的 HCV RNA 负链,再以此负链为模板合成子代 HCV RNA 正链。NS5B 为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp),是催化 HCV RNA 合成的关键酶。现已对此病毒结构和生物化学特性进行了较广泛的研究,并将其作为抗病毒治疗的主要靶位。HCV RdRp 又被称为“尾结合蛋白”,其与膜的结合作用由 C-端的 21 个氨基酸介导,这种结合对体外多聚酶活性的影响并不大,但却是体内 RNA 复制所必需的。

9. ARFP/F 蛋白: 已证实 HCV 核心编码区存在可变读框基因(ARF),来源于 -2/+1 位核糖体移码翻译的产物,含有 160 个氨基酸的蛋白质,称为可变读框蛋白(ARFP)或框架漂移蛋白(F 蛋白)。氨基酸测序显示框架漂移可能发生在或接近于核心蛋白序列的第 11 位密码子。研究显示,HCV 患者的血清中可检测到 F 蛋白抗体和特异性 T 细胞应答,提示在 HCV 感染过程中确有 F 蛋白的表达。但 ARFP/F 蛋白并非体内外 HCV RNA 复制所必需的。ARFP/F 蛋白在 HCV 生命周期和发病机制中的作用还有待进一步阐明。

四、病毒复制复合物

形成膜结合复制复合物是所有单股正链 RNA 病毒的共同特征,复合物由病

毒蛋白、复制 RNA 以及胞内的膜结构组成。对含有亚基因组 HCV 复制子的 Huh-7 细胞的研究发现, HCV 的复制发生于一种被称为膜网的特殊膜结构中^[9]。目前认为膜网来源于内质网膜。

HCV RNA 复制与细胞脂代谢间有着非常复杂的相互作用,可能是通过病毒和宿主蛋白质向细胞内膜运输并与之结合而实现的。在细胞培养中,饱和脂肪酸和单不饱和脂肪能刺激 HCV RNA 的复制,而多不饱和脂肪酸或脂肪酸抑制剂能抑制 HCV RNA 的复制。这些结果提示,膜的流动性影响复制复合物的功能。因此,脂代谢的药理学处理也可作为治疗 HCV 感染的方法之一。

最新研究已证实尚有其他宿主因子参与了 HCV RNA 的复制。起初观察到环孢素 A(CsA)可抑制 HCV RNA 的复制,现已证实 CsA 的作用靶点是亲环素 B^[10]。亲环素 B 与 NS5B 相互作用,刺激其 RNA 结合活性。亲环素 B 是一种肽酰脯氨酰顺反异构酶,在 HCV RNA 复制中的作用尚不确定。根据这些发现,开发无免疫抑制活性的 CsA 类似物作为抗丙型肝炎病毒药物的研究正在进行中。

五、HCV 的包装和装配及释放

对于病毒生命周期的晚期过程知之甚少,直至最近才有能力对其进行系统研究。NS2,可能还有其他非结构蛋白,以及尚未明确的 RNA 结构都参与了这些过程。据推测,病毒体的形成是通过出芽至内质网或内质网来源的区室,并经分泌途径释放出细胞的。脂蛋白代谢和病毒装配与释放之间可能存在着某种联系。

六、展望

HCV 细胞模型系统的发展使认识 HCV 的整个生命周期成为可能,但目前的研究还只是开始,我们对 HCV 复制周期中的很多步骤及其机制还不清楚,对这些问题的阐明对于研发 HCV 感染的预防和治疗方法有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989, 244:359-362.
- 2 Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 2007, 446:801-805.
- 3 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 2003, 535:34-38.
- 4 Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:7408-7413.
- 5 Noppornpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, et al. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol*, 2006, 80:7569-7577.
- 6 Dumont S, Cheng W, Serebrov V, et al. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature*, 2006, 439:105-108.
- 7 Frick DN, Rypma RS, Lam AM, et al. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J Biol Chem*, 2004, 279:1269-1280.
- 8 Gao L, Aizaki H, He JW, et al. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol*, 2004, 78:3480-3488.
- 9 Gosert R, Egger D, Lohmann V, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring

subgenomic replicons. J Virol, 2003, 77: 5487-5492.

- 10 Watahi K, Ishii N, Hijikata M, et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. Mol Cell, 2005, 19: 111-122.

(收稿日期: 2008-04-15)

(本文编辑: 温少芳)

朱勇喆, 戚中田. 丙型肝炎病毒复制的研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(4): 349-353.