

## · 综述 ·

# 丙型肝炎病毒细胞侵入机制研究进展

童一民 赵平 戚中田

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是经血液传播的急、慢性肝炎的主要致病因子之一,目前全球约有1.7亿HCV感染者,每年新增感染者逾300万<sup>[1]</sup>。HCV感染的慢性化率高达70%,发病隐匿,感染者在相当长时间内是隐匿性的传染源。HCV慢性感染不仅可发展成肝硬化、肝细胞癌,并且还常并发肝外损害,如冷球蛋白血症、淋巴瘤、糖尿病以及神经系统疾病等。HCV的细胞侵入过程由多分子介导、多因素参与,是目前HCV研究领域的焦点,认识HCV的细胞侵入过程对于开发HCV感染的防治药物以及疫苗具有重要意义。

## 一、HCV 模型

研究HCV的侵入机制需要以病毒和敏感细胞作为基本工具,然而缺乏HCV感染的细胞(或动物)模型一直是严重遏制HCV研究进展的瓶颈问题。感染者血浆中的HCV虽然是天然病毒,但在细胞培养中的感染和复制水平极低,也难以观察病毒与细胞的吸附以及随后的穿入过程<sup>[2,4]</sup>。因此,早期研究主要用哺乳动物细胞表达的HCV包膜蛋白(主要为分泌表达的可溶性E2蛋白)和杆状病毒-昆虫表达系统表达的具有HCV包膜蛋白的病毒样颗粒(VLP)作为HCV包膜或HCV病毒颗粒的模拟物筛选HCV受体分子并研究病毒与细胞的吸附<sup>[5-7]</sup>。近年来建立的含逆转录病毒核心颗粒,表面装配有功能性HCV包膜E1/E2糖蛋白的HCVpp<sup>[8]</sup>和用引起暴发性肝炎的JFH-1株(2a型)HCV RNA转染人肝癌Huh7细胞而产生的HCVcc<sup>[9]</sup>则为研究HCV的侵入机制提供了更逼真的模型。

## 二、HCV 受体

1. HCV为多受体病毒:肝脏是HCV感染和复制的主要场所,此外,HCV也可感染一些免疫细胞,如B细胞、T细胞、树突状细胞等。目前所了解的HCV侵入宿主细胞的基本过程包括HCV与肝细胞表面受体的结合,随后病毒体通过网格蛋白介导的细胞内吞作用进入胞内<sup>[2,3]</sup>。目前鉴定出的HCV受体包括紧密连接蛋白claudin-1(CLDN1)<sup>[10]</sup>、CD81<sup>[11,12]</sup>、SR-BI<sup>[5,12]</sup>和occludin(OCN)<sup>[14]</sup>。无论是感染者血浆来源的HCV还是细胞培养产生的HCVcc,病毒体表面均结合有LDL和(或)VLDL。HCV与宿主细胞的结合是引起HCV侵入细胞的第一步,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.020

基金项目:国家十一五传染病重大专项(2008ZX10002-013);上海市基础研究重点项目(08JC1405000);上海市重点学科建设项目(B901)

作者单位:200433 上海市,第二军医大学微生物学教研室(上海市医学生物防护重点实验室)

通讯作者:戚中田,Email:qizt@smmu.edu.cn

HCV 表面的脂蛋白是否参与 HCV 的侵入尚不完全清楚,但大量证据表明 HCV 包膜糖蛋白与受体分子的结合可引起随后的病毒侵入过程<sup>[4]</sup>。HCV 包膜糖蛋白由 E1、E2 两种分子经非共价键形成的异二聚体组成,E1、E2 均为 I 型跨膜糖蛋白,分别有 4 个和 11 个 N-糖基化位点。截除羧基端表达的可溶性 E2 可结合 HCV 的两种受体分子:CD81 和 SR-B I,因此,E2 蛋白可能是主要的受体结合蛋白。在 E1 和 E2 中均可能有疏水性的 II 型融合肽,因而均可能参与发生于内吞体内的膜融合过程。目前被公认的 HCV 特异性受体中,CD81 表达于所有的有核细胞,SR-B I 除了高表达于肝组织外,还高表达于合成类固醇激素的组织,CLDN 1 及 OCLN 表达于多种上皮组织,但在肝组织的表达水平最高。

2. CD81:靶细胞表面表达 CD81 是游离 HCV 感染的必需条件。CD81 为四次跨膜素家族成员,由四个跨膜区、两个胞外环、一个胞内环和氨基端、羧基端的各一个胞浆区组成,其大胞外环(LEL)是介导 HCV 感染的关键区域<sup>[11]</sup>。HCVcc、各种基因型的 HCVpp 以及血浆 HCV 的感染性均必须依赖靶细胞表面 CD81 的表达。EWI-2 和 EWI-F 是 CD81 的两种直接伴侣蛋白,属于免疫球蛋白的一个新家族。最近报道,缺失免疫球蛋白第一功能区的 EWI-2 切割产物 EWI-2wint 能抑制 HCV 包膜蛋白与 CD81 的结合,从而抑制 HCV 感染<sup>[13]</sup>。EWI-2wint 在多种组织细胞系表达,但不表达于肝细胞,这提示肝细胞不存在抑制性因子可能是允许 HCV 感染的原因之一。

3. SR-B I:SR-B I 是 HDL 的主要受体,主要功能是从 HDL 颗粒中选择性摄取胆固醇酯进入胞膜,其分子由一个大的胞外环、氨基端和羧基端的各一个跨膜区以及胞浆末端组成。SR-B I 是一种多配体受体,还能结合天然 LDL、VLDL 以及化学修饰的 HDL、LDL。HCV 可通过包膜糖蛋白与 SR-B I 结合,也可能通过表面的脂蛋白与 SR-B I 结合<sup>[5]</sup>。SR-B I 抗体以及用 siRNA 下调 SR-B I 的表达均显著抑制 HCVpp、HCVcc 以及血浆来源的 HCV 对靶细胞的感染性。SR-B II 是 SR-B I 的剪接异构体,与 SR-B I 的差异仅在于羧基末端的胞浆尾部氨基酸序列不同,也能介导 HCV 的感染。SR-B I 可能是 HCV 首先结合的膜受体,而 HCV 与 CD81 的结合发生于与 SR-B I 结合之后<sup>[12]</sup>。血液中的 SR-B I 各种配体成分复杂而影响 HCV 的感染性,如 HDL 增强 HCV 的感染性,而氧化的 HDL/LDL 以及 SAA 则抑制 HCV 的感染,其机制可能与病毒、脂蛋白和 SR-B I 三者的相互作用有关,而并非这些脂蛋白与 HCV 共同竞争受体。认识这些配体分子影响 HCV 感染性的分子机制,可为揭示 HCV 侵入途径提供重要线索。

4. Claudin 1: Claudin 1 是一种细胞间紧密连接(TJ)蛋白,由四个跨膜区、两个胞外环、一个胞内环以及位于胞浆的氨基末端和羧基末端组成。CLDN 1 可使表达 CD81 和 SR-B I 的非肝源细胞系 293T(人胚肾细胞系)和 SW13(人肾癌细胞系)细胞感染 HCV。此外,Claudin 1 家族 24 个成员中的 CLDN 6 和 CLDN 9 也能介导 HCV 感染。CLDN 1 的第一胞外环(EL1)是 HCV 感染所必需的,用抗体封闭 EL1 可阻断 HCV 的感染。由于未发现 CLDN 1 分子与 HCVcc 或 HCV 病毒

体成分的直接作用,因此 CLDN 1 可能与膜外的某种中间成分结合,或者与侵入而改变构象的病毒体结合<sup>[10]</sup>。CLDN 1 羧基端胞内区和十六酰化位点涉及该蛋白与 TJ 其他蛋白质的相互作用,但并非介导 HCV 感染所需,提示 TJ 的存在与否则可能不影响 HCV 的侵入。然而,肝细胞为高度极化的细胞,一般情况下,CLDN 1 严格位于 TJ 区域,而 CD81 和 SR-B I 位于基底外侧。因此,CD81 和 SR-B I 可结合 HCV,而结合于胞膜基底外侧的病毒体侧向移动至 TJ 才可能与 CLDN 1 发生作用。但最近有报道在正常的肝组织中,这三种分子可共定位于肝细胞膜的基底外侧,从而与来自肝血窦的 HCV 结合。有必要进一步确证生理情况下 HCV 各受体的分布情况,这对于理解 HCV 的入侵机制有重要帮助。

5. Occludin: Occludin 也是四次跨膜的 TJ 蛋白,最近鉴定出人 Occludin 是 HCV 细胞侵入的第四种必需分子,将该分子导入同时转染了人 CD81、SR-B I 及 CLDN 1 分子的小鼠成纤维细胞和仓鼠卵巢细胞可使这两种细胞被 HCVpp 感染。Huh7.5 和 Hep3B 细胞为 HCV 的易感细胞,用小干扰 RNA 可显著抑制 Occludin 在这两种细胞的表达,二者对 HCVpp 以及 HCVcc 的易感性。用人源和鼠源 Occludin 嵌合后检测其介导 HCVpp 入侵的能力,表明第二胞外环(EL2)是 HCV 侵入所必需依赖的功能区<sup>[14]</sup>。Occludin 和 Claudin 1 同为 TJ 蛋白,这更加引起了研究者对 TJ 这一胞膜特殊结构在 HCV 细胞侵入过程中可能扮演角色的重视。

### 三、有助于 HCV 感染的其他膜分子

除了目前公认的三种受体外,还有其他分子也可能参与 HCV 的细胞侵入过程,如氨基葡聚糖(GAGs)、LDLr、凝集素分子 DC-SIGN 和 L-SIGN 等。HCV 病毒体能通过 E2 蛋白与 GAGs 结合,尤其是高度硫酸化的 GAGs,如肝素。GAGs 可能只暂时吸附 HCV 于细胞表面,从而促进病毒与特异性受体的结合。LDLr 是 LDL 和某些 VLDL 的受体,LDLr 可能通过与病毒体表面的脂蛋白结合而吸附 HCV 于肝细胞表面,但目前还没有充足的证据表明 LDLr 介导 HCV 的侵入过程,如 HCVpp 的感染并不依赖于 LDL/VLDL,因而 LDLr 对于 HCV 感染的作用可能类似于 GAGs。DC-SIGN 和 L-SIGN 能结合 HCV 包膜糖蛋白,但两种分子均不表达于肝细胞表面,L-SIGN 在肝窦状隙上皮细胞表达,因而可捕获和传递 HCV 至肝细胞,促进 HCV 与肝细胞表面特异受体的结合<sup>[2,3]</sup>。

### 四、HCV 的入胞途径

HCV 与肝细胞膜表面受体结合以后,被网格蛋白依赖的细胞内吞机制所摄取而进入早期内吞体,早期内吞体内的低 pH 值引起 HCV 包膜与内吞体膜融合,使 HCV 衣壳游离而进入胞浆,开始基因的复制和表达<sup>[24]</sup>。此为膜病毒侵入细胞的一种最常见机制,然而与其他以类似途径侵入的病毒相比,HCV 的内吞与膜融合之间是一个明显缓慢的过程<sup>[15]</sup>,这提示 HCV 的膜融合过程中有更多的事件发生。HCV 与受体的结合通过何种途径引发网格蛋白依赖的细胞内吞? 是否有受体被共同内吞以及参与随后的膜融合? 这些显然也是揭示 HCV 入侵机制的关键问题。除了游离的病毒可以通过与受体结合途径侵入靶细胞外,HCV 还可能在



细胞-细胞之间直接传播,HCV以这种途径传播的分子机制与胞外游离病毒的侵入方式应有显著区别,阐明其机制对于理解体内HCV的传播方式和HCV感染和致病特征有重要意义。

### 五、展望

虽然近年来人们对HCV入胞机制的认识获得了一些重要进展,但还有一些关键问题有待阐明,如各受体的作用机制、可能存在的未知受体、细胞内吞的引发信号、HCV与内吞体膜融合的分子机制等。对该研究领域理论认识的深入和更多技术方法在该研究领域的应用将有力推进对这些问题的阐明,而阐明这些问题,不仅对于认识HCV的整个感染周期有重要意义,而且可为抗HCV药物和疫苗的开发提供有效靶点。

### 参 考 文 献

- 1 Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*,2005,5:558-567.
- 2 Von Hahn T, Rice CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem*,2008,283:3689-3693.
- 3 Diedrich G. How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J*,2006,273:3871-3885.
- 4 Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, et al. Time-and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol*,2006,80:1734-1741.
- 5 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*,2002,21:5017-5025.
- 6 Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, et al. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol*,1997,78:2299-2306.
- 7 Drummer HE, Maerz A, Pountourios P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett*,2003,546:385-390.
- 8 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*,2003,197:633-642.
- 9 Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*,2006 103:3805-3809.
- 10 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.
- 11 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*,1998,282:938-941.
- 12 Kapadia SB, Barth H, Baumert T, et al. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol*,2007,81:374-383.
- 13 Sala-Valdes M, Ursa A, Charrin S, et al. EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem*,2006,281:19665-19675.
- 14 Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*,2009,457:882-886.
- 15 Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol*,2006,80:11571-11578.

(收稿日期:2009-08-04)

(本文编辑:孙荣华)

童一民,赵平,戚中田. 丙型肝炎病毒细胞侵入机制研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(3):327-330.