

丙型肝炎病毒 p7 蛋白研究进展

郭江, 成军, 赵龙凤

郭江, 成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
赵龙凤, 山西医科大学第一附属医院感染病科 山西省太原市 030001
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C39900130
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-05-11

摘要

p7 蛋白是一个介于丙型肝炎病毒(HCV)结构蛋白和非结构蛋白之间的一小蛋白, 在脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 在病毒的自然感染过程中起一定的作用。金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 p7 形成的阳离子通道, 从而对 HCV 的治疗发挥重要作用。本文就 p7 蛋白的基因组结构、合成与功能作一综述。

郭江, 成军, 赵龙凤. 丙型肝炎病毒 p7 蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1692-1694

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1692.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是慢性肝炎的主要病原之一, 约有 1.7 亿人被感染, 常导致肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[1-5]。HCV 的基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF), 编码一个约 3 010 个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白, 该多蛋白被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少 10 个病毒基因产物: 核心蛋白(core), E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 蛋白等^[6-9]。p7 是由 HCV 基因组 2 580-2 768 核苷酸(nt)之间的基因编码的由 63 个氨基酸残基(aa)组成的小蛋白。近年来对其基因组结构、合成与功能研究取得了一些进展, 本文就这方面的研究进展如下。

1 p7 蛋白的基因组结构与合成

p7 是一个小的疏水性多蛋白, 包括 63 个氨基酸残基, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间, 是膜相关性的, 定位在内质网内。他包括 2 个跨膜 α 螺旋, 与一小的带电细胞质环相连, 其氨基和羧基端尾朝向细胞内质网腔^[10]。这一带电环为亲水片段。p7 蛋白属于病毒孔道蛋白家族, 在细胞膜内其同源寡聚体形成水相孔道, 这些蛋白最具特征性的代表是流感 A 病毒的 M2 通

道。p7 通过与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)在大肠杆菌中的融合可获得高水平的表达, 二者之间被一 6 组氨酸(HIS)连接子所分离形成 GST-HIS-p7 复合结构。通过透射电子显微所成像发现, GST-HIS-p7 和裂解的近于天然 HIS-p7 均呈具有纬度的环状结构。化学交联数据表明 p7 形成五聚体或六聚体结构^[11]。Griffin et al^[11]研究表明在 HepG2 细胞中, 重组的 HCV p7 可交联成六聚体, 在体外大肠杆菌表达的 p7 亦可形成六聚体。

Carrere-Kremer et al^[10]通过分析融合在 p7 羧基端的报告糖蛋白的移位而确证 p7 的羧基端跨膜区是一信号序列。通过 CD4 的外功能区和 Myc 表位所标记这一 p7 多肽, 并经碱性提取证实其为一整合膜多肽。经非通透性细胞表面的免疫荧光检测 CD4-p7 嵌合体证明其可运输到质膜。然而脉冲追踪技术分析长的追踪时间后仅有 20% 的内切糖苷酶 H 抵抗性 CD4-p7 被检测到, 这表明 p7 的大部分存在分泌通路的早期间隔内。他们在 p7 的几个位置插入 Myc 表位, 分析这一表位在 HepG2 细胞膜上的通透性, 表明其是一双跨膜拓扑结构, 其氨基和羧基端朝向细胞外。这些研究表明 p7 是在分泌通道的几个区域有功能多分裂膜蛋白。

p7 基因定位在 E2 和 NS2 之间, p7 由位于内质网(ER, endoplasmic reticulum)的宿主信号肽酶催化形成的。p7 的羧基端跨膜区是一信号序列, 可促进 NS2 进入内质网腔被宿主信号肽酶进行合适的切割。而最近体外实验研究表明在 p7 缺乏的条件下, NS2 亦可与膜发生关联^[12]。虽然 HCV 大部分的多蛋白前体在翻译期间和翻译后被裂解的, 然而 E2-p7 和 p7-NS2 之间的裂解要延迟, 导致 E2-p7-NS2 前体的产生, 且产生 E2-p7 蛋白及单个蛋白的混合的不完全裂解。虽然 E2-p7 在 HCV-1 和 HCV-H 株相对稳定, 而在 HCV-BK 的研究表明, E2/p7 位点的加工更为有效, E1-E2 可能通过非共价键和共价二硫键结合两种方式相互作用折叠形成异源二聚体, 作为病毒的功能亚单位, 其形成速度依赖于 ER 中的“分子伴侣”(molecular chaperone)存在^[13-15]。E2-p7-NS2 前体的迅速形成、不存在 NS2/3 中间体表明 NS2/3 位点的加工运行着某种快速切割机制, 提示其作用方式为分子内顺式(intramolecular reaction, cis)切割行为。但在某些特定条件下, 酶切可由分子间的反式(intermolecular, trans)方式进行, 在一系列共转染实验中发现 NS2/3 位点可以反式方式切割, 即由 Cpro-1(Zn²⁺ 依赖性金属蛋白酶)进行切割^[16-18]。

2 p7 与 HCV 感染

关于p7的功能研究较少. p7可在黑脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 推测其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似, 可使细胞内膜结构不稳定化, 以利于成熟的病毒颗粒释放^[11, 19]. 与HCV基因结构相似的牛病毒性腹泻病毒(BVDV)的p7对产生子代病毒颗粒必不可少, 对相关病毒颗粒的感染性产生亦是必需的. 基环的连接子的突变可导致病毒无法存活^[20]. Sakai et al^[21]诱变了一个具有感染性基因型1a型cDNA克隆, 并通过黑猩猩的肝内转染检测A型感染的每一突变的RNA转录体. 在转染的哺乳动物细胞中证实了突变多肽恰当处理. p7的部分、完全删除和细胞质环状结构两个保守残基的替换突变的病毒均不能存活. 故认为p7对HCV感染是必需的. 1a克隆的p7嵌合体被感染型的2a克隆嵌合体替换病毒仍不能存活. 这表明p7和其他基因组区之间存在的基因型相关的相互作用. p7在这一相互作用中起关键作用. 他们研究了3个具有1A主链, 而p7特殊区域被2A的序列所替换的p7嵌合体: 具有2A的尾和跨膜区和1A细胞质环的p7嵌合体并不能存活. 具有1A的跨膜区和2A的尾和细胞质环的嵌合体亦不能存活. 具有2A的跨膜区和细胞质环和1A的尾p7嵌合体可以存活. 感染的黑猩猩在2wk时进入病毒血症期, 恢复期病毒中有嵌合体基序. 总之, p7胞腔内氨基和羧基端尾具有基因型相关功能的序列.

HCV的3个结构蛋白(核心蛋白C和两个包膜蛋白E1和E2), 6个非结构蛋白(NS2-NS5B)均与多蛋白的处理和RNA复制有关, 然而p7为结构蛋白或非结构蛋白仍不清楚. 通过对HCV亚基因组复制子的研究发现p7对RNA复制并不是关键的^[22]. 黄病毒属BVDV相应的蛋白对于细胞培养的感染性是关键^[20]. 以p7发生框内缺失和点突变感染性BVDV cDNA克隆的RNA转录体转染细胞研究表明: RNA复制并不受影响, 但感染性病毒不能产生. 但是在反转录时提供p7感染性可恢复. BVDV的E2-p7对细胞培养的活性并不重要, 这是因为RNA转录体形成双顺反子结构, 在这一结构上E2和p7分别表达, 从而产生感染性病毒^[20]. HCV p7有与病毒细胞外膜孔道蛋白相似的特征. 这些蛋白形成的离子通道病毒可能对病毒装配和释放, 且对病毒颗粒的成熟有重要作用^[11]. 而对HCV p7同一家族流感病毒B的NB蛋白的研究表明, 这些离子通道蛋白可能对于细菌的繁殖并不是关键的.

无p7的HCV病毒样颗粒可诱导Balb/c小鼠产生Th1占优势的细胞免疫. 有或没有p7的HCV病毒样颗粒(HCV-LPs)在形态学和生物物理学特性上是没有区别的, 这再一次证实了p7对于病毒的装配是不重要的. 无p7的HCV-LP可诱导Th1细胞占优势的免疫系统产生比有p7的HCV-LP更强烈免疫应答. 无p7的HCV-LP可诱导ADD小鼠产生体液和细胞免疫. p7-HCV-LP免疫的Balb/c小鼠可诱发T辅助细胞1产生 γ 干扰素^[23].

Saunier et al 研究发现, 3T3-22Z细胞可摄取染料标记包括p7的HCV结构蛋白即HCV-SP/p7(+), 而3T3-L1或3T3-24X无法摄取不包括p7的HCV结构蛋白既HCV-SP/p7(-). 故认为p7可调节HCV结构蛋白的内在化. HepG2对染料标记HCV-SP/p7(-)的摄取并不像HCV-SP/p7(+)那样有效, 这是由于p7的缺乏可导致包膜蛋白结构变化, 这在相关病毒亦得到验证. p7对于HCV病毒颗粒的细胞结合和进入是重要的^[15].

3 p7 蛋白与 HCV 的治疗

HCV感染世界上3%的人群, 在西方是肝移植的主要指征, 急性感染常是无症状的, 在大多数患者可持续导致慢性化. HCV抗病毒的治疗局限在1型干扰素(长效干扰素)或联合病毒唑、核苷类似物拉米夫定等, 这一治疗方案是昂贵的, 很少患者可以接受, 且只对50%的患者有效. 在病毒基因型中, 经常出现治疗耐药. 由于在体外不能成功培养病毒, 使的疫苗和新治疗方法研究受到阻碍. 所有这些使的对HCV离子通道p7的靶向抗病毒治疗显得尤为重要. 对与p7离子通道蛋白同一家族流感病毒A的M2孔道的研究发现: 金刚烷胺是第一个抗病毒药物^[11].

Griffin et al 研究发现HCV p7在哺乳动物细胞的测定中能代替流感病毒的M2的相应部分, 这在BVDV中亦得到了证明, 而且金刚烷胺在抑制M2的浓度时可使HCV的p7功能丧失. 定位在HCV p7两个跨膜 α 螺旋之间的保守的基环的突变可以使p7的离子通道功能丧失. p7的细胞内定位并不被这一突变影响, 且与线粒体相关膜明显重叠. Griffin et al^[11]在应用黑脂质膜(BLM)系统研究表明: 纯化HIS-p7在人工的脂质双分子层中形成离子通道, 与M2孔道相似. HIS-p7高效开放的通道被1 μ mol/L的金刚烷胺完全抑制, 这一浓度在体外可有效抑制M2. 这一效应是近于天然的HIS-p7特有的, 而GST-HIS-p7并不受这一药物的影响, 即使在1 mmol/L的浓度. 这一重组蛋白对于离子从HCV感染的宿主细胞内质网到细胞质的运输是重要的. p7离子通道具有对钙离子较钾离子优先通透性, 这与蛋白在活细胞中的网状定位相关, 而且HIS-p7高效开放的通道可被1 μ mol/L的金刚烷胺完全抑制, 这一浓度在体外可有效抑制M2. 这一效应是近于天然的HIS-p7特有的, 而GST-HIS-p7并不受这一药物的影响, 即使在1 mmol/L的浓度. 最近的临床研究表明这一药物与现在的治疗相结合对许多患者有效, 尤其对非应答患者, 如与聚乙二醇干扰素联合. 故认为p7是金刚烷胺的作用靶点. 由于膜渗漏, 在大肠杆菌中天然p7的诱导性表达可产生生长抑制效应, 且这一效应可被金刚烷胺所逆转. 而且p7带电荷环突变可抑制这一效应, 这与瘟病毒中的BVDV研究结果一致. p7可诱导哺乳动物细胞提高对潮霉素B的通透性. 在生物鉴定中, p7可替代流感A M2蛋白的功能, 亦可被金刚烷胺的加入所抑制. 基于

以上研究, 他们正在发展一新的抗 HCV 复合体.

HCV p7的离子通道受长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制, 这一衍生物具有针对 HCV 替代物 BVDV 的抗病毒活性^[19]. 在缺乏合适的HCV小动物模型和可靠的体外感染实验测定法的条件下, 可利用相关的 BVDV 实验潜在的抗病毒药物, 并通过与 HCV p7 相似 BVDV 的 70 aa 的蛋白获得大量资料. 用 BVDV 在体外感染测定中已证实: 长烷基链的亚氨基糖衍生物包括葡萄糖同功异质体脱氧野尻霉素(DNJ)或半乳糖同功异质体半乳糖酸野尻霉素(DGJ)都是有效的抗病毒抑制剂. DNJ 衍生物可抑制内质网- α -葡萄糖苷酶 I 和 II, 这一抑制可导致宿主和病毒编码糖蛋白(包括 BVDV 和 HCV)的包膜糖蛋白的错误折叠. 长烷基链衍生物 N-壬基-DNJ(NN-DNJ)抗病毒效果较短烷基链 N-丁基-DNJ(NB-DNJ)显著, 尽管后者在细胞内可更有效的抑制内质网- α -葡萄糖苷酶, 长烷基链 DGJ 衍生物不能被内质网葡萄糖苷酶识别, 故不能抑制内质网葡萄糖苷酶, 也显示了有效的抗病毒活性. 因此, 内质网葡萄糖苷酶的抑制与观察到的抗病毒效果无直接相关, 排除了其作为惟一抗病毒机制的可能. 另一作用机制与烷基侧链的长度明显相关, 因为这一短链 NB-DGJ 并没有出现抗病毒活性, 而长烷基链衍生物 NN-DGJ 是一有效抑制剂. 这是因为长烷基链的亚氨基糖衍生物影响病毒膜糖蛋白的二聚化和改变分泌 BVDV 病毒颗粒糖蛋白的构成, 但并不影响病毒 RNA 的复制或蛋白的合成. 小的跨膜蛋白 p7 可作为长烷基链的亚氨基糖衍生物的潜在靶, 因为黄病毒属如登革热病毒和日本脑炎病毒不包括 p7, 则不被长烷基链 DGJ 衍生物抑制, 而瘟病毒属如瘟病毒和嗜肝病毒包括 p7, 则可被抑制. 有趣的是, BVDV 经长烷基链的亚氨基糖衍生物治疗后可产生非感染性 BVDV 颗粒.

Pavlovic et al^[19]逐渐提高BLM一侧的亚氨基糖衍生物浓度, 观察 p7 诱发的离子通道效应. 当应用短烷基链衍生物 NB-DGJ 和 NB-DNJ 时, p7 的通道活性并不改变, 然而逐渐提高长烷基链衍生物 NB-DGJ、NB-DNJ、N-7-氧壬基-6-脱氧-DGJ 剂量导致剂量依赖性的离子通道的抑制. 在 140M NN-DGJ、105M NN-DNJ、180M N-7-氧壬基-6-脱氧-DGJ 时可致通道完全抑制. 总之, p7 蛋白是一个介于 HCV 结构蛋白非结构蛋白之间的一小蛋白, 在脂质膜中形成六聚体阳离子通道, 在病毒的自然感染过程中起一定的作用. 金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 p7 形成的阳离子通道, 从而对 HCV 的治疗发挥重要作用. 但关于 p7 的功能仍知之甚少, 需进一步研究.

4 参考文献

- 1 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 3 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变性的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003

- 4 刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 基因表达谱芯片筛选 NS5A TP3 转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:306-310
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 6 Majumder M, Steele R, Ghosh AK, Zhou XY, Thornburg L, Ray R, Phillips NJ, Ray RB. Expression of hepatitis C virus non-structural 5A protein in the liver of transgenic mice. *FEBS Lett* 2003;555:528-532
- 7 Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by single amino acid substitution. *Virology* 1994;199:124-131
- 8 Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 1995;213:455-461
- 9 Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443
- 10 Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002;76:3720-3730
- 11 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. 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
- 12 Yamaga AK, Ou JH. Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem* 2002;277:33228-33324
- 13 Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994;68:6147-6160
- 14 Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol* 1994;68:6215-6222
- 15 Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994;68:5063-5073
- 16 Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10583-10587
- 17 Hirowatari Y, Hijikata M, Tanji Y, Nyunoya H, Mizushima H, Kimura K, Tanaka T, Kato N, Shimotohno K. Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cells using baculovirus vector. *Arch Virol* 1993;133:349-356
- 18 Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:4665-4675
- 19 Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain minosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6104-6108
- 20 Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 2000;74:9498-9506
- 21 Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11646-11651
- 22 Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113
- 23 Lechmann M, Murata K, Sato J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001;34:417-423