

丙型肝炎病毒感染机制的相关研究进展

杨文祥, 熊威, 杨洁, 樊柏林

杨文祥, 樊柏林, 湖北省疾病预防控制中心 湖北省武汉市 430079

熊威, 杨洁, 武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室 湖北省武汉市 430079

作者贡献分布: 论文由杨文祥与熊威共同撰写完成; 论文审校由樊柏林与杨洁完成。

通讯作者: 樊柏林, 主任医师, 430079, 湖北省武汉市, 湖北省疾病预防控制中心. vanbolin@yahoo.com.cn
电话: 027-87652091

收稿日期: 2011-02-18 修回日期: 2011-06-21

接受日期: 2011-06-28 在线出版日期: 2011-07-18

Mechanism of hepatitis C virus infection

Wen-Xiang Yang, Wei Xiong, Jie Yang, Bo-Lin Fan

Wen-Xiang Yang, Bo-Lin Fan, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Wei Xiong, Jie Yang, State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430079, Hubei Province, China

Correspondence to: Bo-Lin Fan, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei Province, China. vanbolin@yahoo.com.cn

Received: 2011-02-18 Revised: 2011-06-21

Accepted: 2011-06-28 Published online: 2011-07-18

Abstract

About 170 million persons are infected with hepatitis C virus (HCV) around the world, and nearly 80% of infected patients develop chronic liver disease that may eventually lead to liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma. The mechanisms underlying the life cycle of HCV in the host are still largely unknown and the efforts made by researchers have been hampered by the absence of a robust system reproducing HCV infection. Moreover, there are no effective vaccines or drugs available to defend or exclude viruses because of frequent viral mutation. In 2005, several research groups have successfully established cell culture systems for HCV, pushing the basic research on HCV to a new stage. This paper will focus on HCV genome diversity, progress in culture models, HCV life cycle, and protein function to highlight the mechanism of HCV infection.

Key Words: Hepatitis C virus; Infection mechanism;

Genome diversity; Research model; Virus life cycle

Yang WX, Xiong W, Yang J, Fan BL. Mechanism of hepatitis C virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(20): 2133-2140

摘要

丙型肝炎在全世界约有1.7亿的感染人群, 将近80%的患者会发展成慢性肝炎, 最终导致肝硬化和肝癌。由于缺乏高效的细胞培养传代模型, 使得丙型肝炎病毒(HCV)的生命周期的研究一直处于瓶颈, 同时病毒自身高频突变, 使得目前没有有效的疫苗药物进行预防和治疗。2005年Takaji Wakita, Charles M. Rice, Francis V. Chisari 3个研究组建立了HCV cell culture体系, 将HCV的研究推上新的阶段使得机制研究更加深入。本文将就HCV的基因组多样性, 研究模型的进展, 病毒生活周期以及相关蛋白研究方面, 全面讲述HCV感染机制的进展。

关键词: 丙型肝炎病毒; 感染机制; 基因组多样性; 研究模型; 病毒生活周期

杨文祥, 熊威, 杨洁, 樊柏林. 丙型肝炎病毒感染机制的相关研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(20): 2133-2140

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2133.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)作为一种世界范围内流行的病毒, 由于该病毒的高突变性, 缺乏有效地疫苗和体外培养研究模型, 使其已经严重影响了大众的健康, 因而对于他的研究刻不容缓。据估计全球约有3%的人口感染了HCV, 而其中有将近50%-80%的感染患者逃避了宿主的免疫, 而由急性感染转入慢性感染, 进一步恶化为肝硬化直至肝癌^[1]。目前对于HCV唯一有效地治疗是聚乙二醇化IFN α 联合病毒唑, 但是其不良反应很大且对于1型病毒的治愈效率低下, 因此对于病毒的复制机制的研究将有助于针对该类药物的筛选和研发^[2]。在本篇文章中将介绍HCV的研究模型进展, HCV的复制周期以及各功能性蛋白的研究。使读者对HCV有一

■背景资料

丙型肝炎在全世界约有1.7亿的感染人群, 将近80%的患者会发展成慢性肝炎, 最终导致肝硬化和肝癌。由于缺乏高效的细胞培养传代模型, 使得丙型肝炎病毒的生命周期的研究一直处于瓶颈, 同时病毒自身高频突变, 使得目前没有有效的疫苗药物进行预防和治疗。

■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科

■ 研发前沿

虽然HCVcc系统的建立有利于推动病毒装配和成熟机制的研究,但影响毒粒成熟和生化特性的关键因素依旧是研究的热点。

个全面的了解。自1989从患者血清中通过免疫筛选的方法获得非甲非乙的HCV的cDNA以来已经有20年的时间了^[3],但是对于病毒的机制还没有完全了解,也没有针对病毒有效疫苗的研发成功,而且对于HCV活体病毒的获得途径的缺乏和低的病毒滴度,没有体外有效培养系统的支持,大大延缓了研究的进程。尽管存在的以上的阻碍,仍然有许多令人振奋的进程推动的HCV的研究,如,从黑猩猩中获得全长的HCV基因组克隆,亚基因复制子模型的建立^[4],研究病毒入侵吸附HCV假颗粒模型^[5],以及2005年的病毒细胞传代培养系统可以获得成熟的具感染性的病毒颗粒^[6],还有就是2009年让转基因小鼠成为除黑猩猩以外第2个有效的候选体内研究模型^[7],因此HCV的研究将会进入新的高峰。

1 病毒的分类学和基因组多样性

HCV是单链正义病毒,隶属于黄病毒科肝病病毒属,与他同科的病毒还有瘟病毒属的病毒如:黄热病毒、博尔那病毒、牛腹泻病毒等,他们的基因组是由5'和3'端非翻译序列和一个开放性阅读框构成。而值得一提的是由于基因组并没有帽子结构,在5'端存在有4个颈环结构域组成的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)。而紧邻的5'端的依次是作为结构蛋白的核心蛋白以及包膜蛋白1, 2。而非结构蛋白有p7离子通道, NS2-3蛋白酶, NS3-4丝氨酸蛋白酶及解旋酶, NS4B, NS5A, RNA复制酶NS5B以及3'UTR。

HCV的感染增殖是一个迅速的过程,在感染人类或者黑猩猩后约2 mo病毒复制数量将达到峰值^[1]。但是这种高的复制效率,却由于RdRp缺乏有效地校检机制,使得HCV的基因组表现的高突变率,使得对HCV的研究和抗病毒药物的开发是个严峻的挑战。根据HCV的序列的多样性国际上分类观点主要是采用simmonds系统^[8],利用5'UTR, core, NS5B的序列分析,将其分为6个主要型和约12个亚型,并且对于多样性的水平分为4个水平, >30%为型, >20%为亚型, >10%为分离株。同时现在有效地干扰素治疗1型没有2, 3型来的疗效好。另外还提出了准型的概念:即是对感染HCV个人中存在的多种突变基因组的共存状态的表述(其中相似性>95%)^[9]。现在已经有将近40 000多病毒株获得并上传数据库,同时对于机体的免疫CD8, CD4 T淋巴细胞表位分析也纳入进来。

2 研究模型

自1989年首个cDNA从患者血清中获得,对病毒生活周期也一步一步,但是有些复制系统不被学界所接受。直到1997年全长的基因组才准确的获得。但是由于缺乏允许的细胞系的支持,感染性转录未获得,只有通过接种黑猩猩而获得,昂贵且受到道德和法律的限制。尽管用于细胞传代培养的RNA复制模型的并没有成功,但是一些替代的表达系统和生物信息方法,生化分析,对基因组,蛋白加工,蛋白功能了解了一些。直到1999年1b型亚基因(con1)^[4]复制子模型的建立,使得这个双顺反子结构的转录本可以在Huh7人类肝癌细胞系中检测到复制并表达出相应的非结构蛋白。但是其的缺点是并非全长的基因组,只能支持病毒的复制而对于其他的过程却不能够介入。但是在con1的基础上,先天性免疫通路上的视黄酸诱导基因缺失的细胞系Huh7.5^[10]的建立更加支持了病毒的复制。但是在这些传代细胞中检测到HCV的序列却发现了主要集中在E2、NS3、NS4A等序列的适应性突变。接着对NS5A的突变可以有效地提高病毒的复制水平^[11],但是却不能产生成熟的毒粒,这可能是毒粒产生的相关基因的突变而打破了复制和翻译的平衡。

虽然不能产生全长的成熟病毒,但是利用截断的包膜E2蛋白C段来筛选得到了如CD81, SR-B1等病毒吸附的潜在受体。但是最主要的成果是构建了利用逆转录病毒载体而表达产生了包含有HIV部分基因组却有着HCV包膜的假病毒颗粒(HCVpp)^[5]。其构建的策略是将: (1)HCV-E1E2; (2)HIV或者鼠源白血病病毒的gag-pol; (3)带有报告基因逆转录载体共转染293T细胞。产生的假毒粒就可以作为吸附受体检测的试金石。

就在2005年Wakita等^[12]利用来自日本的JFH-1(2a型HCV恶性患者的全长克隆),在不需适应性突变的情况下,成功的转染了Huh7细胞系,并能复制且产生具有侵染性的毒粒。这是第1次可以用来了解HCV的全部复制周期的体外模型,具有划时代的意义。与此同时Rice工作组^[6]利用JFH-1的NS3到NS5B片段嵌合另外一个2a型患者J6全长克隆的IRES到NS2的片段可以在Huh7.5.1(对于Huh7改造的亚系,先天免疫RIG-1缺失)更有效地复制。而从中获得的毒粒可以感染黑猩猩,免疫缺陷小鼠和一部分的人种。因此利用传统病毒学方法,全面的了解病毒的周期成为可能。而分布更加广泛具有更强的IFN抵

抗能力的1a型感染型毒粒却得到较低滴度并且伴有5个适应性突变^[13], 所以建立所有型感染模型依旧存在挑战。

而在体内模型研究方面, 由于黑猩猩和人类有着超过98%的序列同源性, 无疑是人类疾病研究最好动物模型。人类和黑猩猩都可以在感染HCV几天后检测到HCV复制, 最大的病毒滴度可以达到 10^5 - 10^7 copies/mL血液。感染的2-12 wk不会有明显的症状, 8 wk后血清中会检测到HCV特异性抗体^[14]。就在研究病毒的早期, 黑猩猩就作为非甲非乙型肝炎病毒传播和建立持续性感染以及慢性肝炎发生的天然模型, 病毒的大小, 包膜蛋白的类型以及HCV克隆基因组数据都是在实验黑猩猩中获得^[3,15,16]。由于人类在感染的早期现象不明显, 所以早期实时监测病毒动力学, 宿主免疫以及病理症状都依赖于黑猩猩的样本研究^[17-19]。但是由于道德和经济的限制, 不可能将所有的实验应用于黑猩猩, 所以研究人员也在寻找其他的灵长类模型, 如食蟹猴、绿猴、恒河猕猴和日本猴等, 都被接种丙型肝炎病毒, 但这些物种都无法建立感染^[20]。而做为攀缘目啮齿类动物的树鼩被认为是最有潜力感染动物小模型^[21,22], 有的课题组发现用患者血清和细胞培养上清感染都可以得到很高的滴度^[23], 也有人认为在20%-30%的群体有明显的感染体征, 而且体内只有较低的病毒载量^[24]。因此树鼩作为黑猩猩的替代模型还需实验的证明。Wu等建立了新颖的大鼠模型, 是通过将肝细胞瘤细胞注射到怀孕母鼠子宫内, 当子代出生1 wk后感染病毒, 经检测RNA可以到达 2×10^4 copies/mL, 但是由于人源和大鼠MHC的差异性而使得其不能成为获得性免疫的模式^[25]。许多研究组也将丙型肝炎的各个蛋白或者全基因组利用胚胎微注射进入小鼠, 利用转基因来研究机体的影响, 如转入包膜E1、E2蛋白并不会诱导肝类疾病, 而当NS5A转入小鼠中会抑制TNF介导的肝细胞凋亡^[26]。而时下嵌合人类肝脏的uPA-SCID小鼠可能是比较合适的丙肝病毒小动物模型, Kneteman等在2001年通过将人类肝脏异源移植入携带纤溶酶原激活物转基因的SCID小鼠免疫缺陷模型中, 感染丙型肝炎患者血清可以检测到高滴度的病毒水平, 并发现病毒蛋白定位于肝细胞根瘤处, 而且在正常传代下, 都可以检测到负链的表达和成熟毒粒的释放, 这标志着体内嵌合人源肝脏小鼠研究丙型肝炎病毒模型的建立^[27]。这些体内模型的发展无疑将推动抗HCV药物的筛选

和肝脏毒性试验平台的建立。

3 病毒的复制周期

3.1 病毒的结构 HCV的颗粒在电镜下观察使约40-70 nm的颗粒^[6], 据推测其是由镶嵌着的包膜蛋白E1E2锚定于同源细胞表面的双分子脂层。而在脂层的内部包裹的多层拷贝的核心蛋白以及中心的病毒RNA基因组。而在体液循环中的毒粒往往是和低密度脂蛋白结合的形式存在^[28], 这也可以很好地解释了病毒的低浮力密度和异源性。

3.2 病毒的入侵 HCV作为仅仅侵染人和黑猩猩的病毒, 除去干细胞外, B淋巴细胞, 树突状细胞等等细胞也被报道可以被感染。而广泛存在于细胞表面的CD81^[29]、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)^[30]、SR-B1^[31]以及最近发现紧密连接蛋白-1^[32]都被推测为HCV侵染所必须受体。LDLR作为受体可能是由于HCV病毒是往往和低密度脂蛋白结合, 而作为早期的吸附过程。另外DC-SIGN和L-SIGN均为3型钙依赖性植物凝集素, 分别表达与树突状细胞核肝窦内皮细胞表面, 但是不在肝细胞表面表达, 所以可能作为临近细胞受体协助病毒的入侵^[33]。而CD81和SR-B1却是病毒进入的必要非充分条件, 在非肝源细胞系中表达CD-81等受体并不能使HCVpp和HCVcc感染, 而对于该受体的siRNA干扰或者特异抗体抑制将会降低允许细胞的感染率, 所以存在一定另外的细胞受体介导吸附。Rice研究组^[6,34]分别在2005和2009年利用Huh7.5 cDNA文库和循环包装救援(cyclic packaging rescue, CPR)方法刷选到了介导病毒晚期入侵的两个关键受体claudin-1和occludin, 且均是细胞紧密连接的蛋白受体。至此在非允许性感染HCV的细胞系中表达上述4个基因将可以使细胞成为敏感性宿主。而这项研究同时也推动了转基因小鼠成为下一个动物体内模型的可能。受体的结合不但介导了吸附而且也引发了由网格蛋白所介导的胞吞作用进入到内涵体中^[35], 而内涵体中的低pH诱导了HCV包膜糖蛋白与内涵体的融合^[36], 从而释放核壳与胞质中, 这一过程与HCV同为黄病毒科的病毒类似。

3.3 翻译的起始 由于HCV的转录本并不存在5'端“帽子”结构, 因此在HCV定位于5'UTR的IRES介导了翻译的起始, 主要是由3个颈环结构(domain II, III, IV)组成。但在IRES的上游48

■相关报道
已有研究组建立了HCV cell culture体系, 将丙型肝炎病毒的研究推上新的阶段使得机制研究更加深入。

■应用要点

本文中介绍HCV的研究模型进展, HCV的复制周期以及各功能性蛋白的研究, 使读者对HCV有一个全面的了解.

bp的domain I 发现与病毒复制相关, domain II 介导了60 s结合过程中eIF2的释放. 当前主流的翻译起始模型是首先40 s亚基IRES结合, 定位于P位点. 接着翻译起始因子eIF3和eIF2-MET-tRNA结合形成48 s复合体, 接着GTP水解60 s亚基结合IRES形成80 s核糖体结构^[37]. 但是具体的机制还得需要冷冻电镜技术^[38]的深入, 揭示IRES和核糖体结合中构象的改变, 来比较了与细胞内源mRNA翻译的不同. 同时在肝源细胞中发现了特异性的miR122^[39], 对于其的抑制将影响HCV RNA总量水平, 但对其与5'UTR位点结合区域的突变并不影响病毒蛋白的表达, 而另一项研究证明了其通过增强核糖体和RNA的结合来提高蛋白的翻译. 5'UTR与miR122(22-40 bp)配对区域同时也和core编码区碱基互补, 这种RNA相互作用将抑制IRES功能^[40].

3.4 多聚蛋白的加工 通过翻译HCV开放阅读框将会得到多聚体蛋白前体, 需要通过内质网上信号肽酶, NS2-3和NS3-4丝氨酸蛋白酶的切割成熟^[1].

3.5 病毒复制复合体 病毒蛋白翻译成熟后, 将组成病毒复制复合体进行复制, 而类似于其他正链RNA病毒^[41], 该过程和细胞内的膜性结构紧密相关, 据推测可能是为了支持高浓度的复合体的合适构象^[42], 并且保护合成的RNA免受内源酶切和RNA的干扰^[43]. 通过超薄切片观察在huh-7亚克隆复制子中, 病毒的复制会引起名为membranous web膜性结构改变, 通过单蛋白表达发现是由于NS4B蛋白所引起, 且在感染猩猩后体内出现的“海绵状”融合大小相一致, 推测可能其中包含有复制复合体^[44].

另外, 发现病毒的复制是受宿主内脂肪代谢影响, 可能是病毒蛋白和宿主内通路蛋白相互作用的关系. 如在HCVcc中, 饱和脂肪酸和宿主内有些需要经过geranylgeranylation的修饰的蛋白将刺激病毒的复制, 而不饱和的则相反抑制. 拥有F-BOX和CAAX结构域的FBL2蛋白便是其中之一可以和NS5A相互作用, 利用干扰F-box的mRNA将大幅降低病毒的复制. 但是其中具体机制还不是很清楚, 但操控脂肪代谢可以作为药物治疗的可能途径^[45,46].

3.6 病毒的装配、成熟与释放 虽然HCVcc系统的建立有利于推动病毒装配和成熟机制的研究, 但影响毒粒成熟和生化特性的关键因素依旧是研究的热点. 首先, 细胞环境因素如在Huh7.5细胞比在Huh7中产生更高的感染滴度^[6], 且随着

细胞的传代, 会出现更多的适应性突变^[11], 而研究发现其中在E2蛋白位点G451R处的突变将增加病毒颗粒的产生但不影响病毒的复制^[47]; 其次, 基于HCV多种型而成的多种嵌合全长克隆的感染颗粒效率的研究表明, NS2片段的N端第一个跨膜结构域将影响病毒的包装^[48], 类似的特点同科的黄病毒和瘟病毒中找到^[49]; 再者, 关于成熟的病毒分泌是和脂类或脂蛋白密切相关, 通过胞内胞外颗粒分析表明胞外颗粒具有更低的浮力密度, 且在动物体内和在细胞传代培养中也得到了相似的结论, 动物体内具备更低的浮力密度, 由此推测病毒的成熟需要低密度脂蛋白^[50,51]. 最近又研究表明了抑制低密度脂蛋白(载脂蛋白B和三酰甘油)的合成将降低HCV感染颗粒的分泌是进一步的证明^[52]. 最后关于核壳的包装, 出芽机制, 成熟以及分泌途径仍旧不清楚, core蛋白在无细胞培养物系统中的组装起了一定的作用但是在HCVcc中是否结果类似还有待商榷, 而p7作为离子通道也参与了毒粒的释放^[53], 随着HCVcc的进一步研究所阐述.

4 病毒的基因组

HCV共计编码10个蛋白, 且均是定位于内质网膜上, 根据特性分为结构蛋白和非结构蛋白.

4.1 结构蛋白 core是基因组编码的第1个蛋白, 组成病毒的壳体. 其存在的信号肽序列位于C末端与E1连接处被信号肽酶sp切割, 而跨膜区被定为于双层膜内的spp切割成熟为173-179 aa的序列^[54]. 将成熟的core是个 α 螺旋蛋白, 可分为N端的D1和C的D2两个结构域, 定位与ER或者脂质小滴表面上. D1含有富含碱性氨基酸残基, 利于RNA的结合以及蛋白的聚合化. D2是一个疏水链接的2个单环结构, 通过突变表明两单环上的疏水残基表面与core结合脂质小滴相关, 且D2的疏水残基关系蛋白折叠和稳定^[55]. 另外发现, core可以影响脂类代谢中相关因子(如微粒体三酰甘油转移蛋白MTP), 可能是诱导脂肪变性^[56], 转向肝硬化的原因. 而有人认为core是病毒免疫逃逸的核心, 如减少脾抗原递呈细胞pDC的数量从而抑制IFN α 的效力^[57], 以及降低SOCS的表达阻碍干扰素下游JAK-STAT抗病毒通路^[58].

E1, E2分别是192, 363个氨基酸的蛋白, 以非共价形式结合形成异源二聚体作为保护病毒以及作为入侵的识别配体^[56]. 且他们均含有跨膜结构, 是由两段疏水残基连接而成, 并且信号肽定位于他们的第2段区. 在没有信号肽酶切割

时, 他们定位于ER上的转运子上, 而切割后, 将使得他们的拓扑学改变, 信号序列转向胞质形成跨膜的单通道. HCV糖蛋白的成熟及正确的折叠则需要ER的伴侣和二硫基化系统^[56]. E2可以抑制干扰素诱导蛋白激酶PKR的活化和抑制eIF2a磷酸化从而抑制宿主内蛋白的合成, 以达到免疫逃逸^[59]. 另外E2参与了与CD81的结合, 介导了进一步的入侵^[60]. 而包膜蛋白及其受体作为疫苗研究的靶点, 但是归咎于E2d的HVR的高突变率, 一直没有有效地疫苗研发, 但2007年Owsianka发现抗体CBH-5能够抑制E2于CD81结合, 体外的实验使得研究又有了新的曙光^[61].

4.2 非结构蛋白 P7是63个氨基酸的多肽形成的五聚体蛋白, 含有两个跨膜区由一个跨膜质环连接, 且朝向ER腔. P7影响病毒的感染并且寡聚化形成离子通道, 通过对其的2个保守碱性残基突变会发现其影响了病毒毒粒的成熟和释放. 因此p7可作为抗病毒的下一个方向^[62]. 但是对于离子通道的具体意义还不是很清楚.

4.2.1 NS2-3: NS2是一个23 000 Da的疏水膜蛋白, 只有组成NS2-3时才执行自切割酶功能, 虽然不是RNA复制所必须但却影响着病毒的全部周期^[4], 是由NS2的C端与NS3 1/3的N端组成. 通过诱变表明His143、Glu163、Cys184是蛋白水解活性位点^[63]. 而2006年Rice^[64]研究组解析了其的催化结构域为一种新的半胱氨酸蛋白酶. 催化域是一个二聚体, 且每个单体中都含有催化活性的三联体, 只有在哺乳动物细胞中表达出复合结构时才表现其活性. 而另外通过研究HCV其他酶蛋白如NS3-4A, NS5B均存在受到PPI(脯氨酰顺-反异构酶)活PPI类似物的调控的现象, 因此是否也存在内源性PPI调节NS2蛋白酶也是一个热点.

4.2.2 NS3-4A: NS3-4A蛋白酶是病毒周期中比较重要的蛋白酶, 是多聚体蛋白成熟的关键所以也是药物研发的靶点. 其时一个多功能蛋白, 拥有的丝氨酸蛋白酶和NTP解旋酶功能, 而两个功能结构域分别位于N端和C端. 而NS4A作为协助因子结合N端是膜结合所必需的^[44]. 所以NS3-4A一直作为药物开发的靶点^[65], 尤其是他的催化三联体位点(His57、Asp81、Ser139). 但是底物结合区需要一个比较大面积的接触位点, 这成为研究的瓶颈. 而且蛋白酶活性还阻断了先天免疫的TLR3和RIG-1通路切割TICAM-1和VISA两个关键的接头蛋白^[66,67]. 而解旋酶的NS3-4A属于DExH/D-box解旋酶2型超家族, 利用

ATP水解活性解旋双链RNA, 其中据估计有11 bp的距离^[68], 但具体其的解旋是辅助复制中间体还是移除相关结合蛋白的原理还不是很清楚.

4.2.3 NS4B: 其是一个还有多重跨膜结构的27 000 Da蛋白, 经过棕榈酰化和多聚化得修饰和成熟^[69], 形成membranous web的结构^[44]. 而这种膜性结构是来源于ER, 据推测起支撑RNA复制复合体的作用. 并且鉴定出其含有一个质环结构的核苷酸结合基序具有GTP水解酶活. 此外NS4B与初级胞内体蛋白Rab5有相互作用, 对Rab5干扰将抑制病毒的复制^[70]. 更具吸引的是由于病毒的侵染导致内质网应激反应, NS4B蛋白参与了其中降解非折叠蛋白使细胞免于死亡间接地支持了膜性结构的完整^[71].

4.2.4 NS5A: 其是一个约56-58 000 Da的磷酸化蛋白, 生化分析表明细胞内源 α 蛋白激酶CKI异型体介导了其的磷酸化^[72], 但是是否有其他的蛋白参与还不是很清楚. 结构分析表明NS5A除有一个介导包膜锚定的N段兼性氨基酸螺旋镶嵌于双层脂膜^[73], 另外含有3个结构域, 其中保守的domain I 研究比较清楚, 包含一个介导NS5A折叠的锌原子, 而且是以二聚体的形式形成一个类似“夹子”的结构来与RNA结合^[74], 更倾向于RNA的富UG区, 据推测其的作用类似于一个“碱基轨道”用于RNA的复制滑动. 而domain II, III表现出更多的可变性可以忍耐碱基插入或者其他的突变对病毒的复制所带来的影响. 总体来说NS5A的磷酸化是黄病毒科中保守的特征, 细胞传代中的突变往往集中在丝氨酸残基而提高病毒的复制效率^[11], 而其的过磷酸化将抑制与人源囊泡结合蛋白A(hVAP-A)相互作用^[75], 而影响到病毒的复制. 另外其还参与影响了细胞多条代谢途径和抗病毒通路如: NS5A抑制双链病毒RNA触发的PKR的激活, 而降低依赖IRF-1相关基因的表达^[76]以及诱导IL-8的分泌而负调节干扰素系统^[77].

4.2.5 NS5B: NS5B是病毒的RNA复制聚合酶, 是一种尾部锚定质膜蛋白, 其C段约21个残基插入膜中而对蛋白的定位有决定作用, 但是却不影响酶活位点^[78]. 和其他的RNA聚合酶类似含有经典的手指, 拇指以及手掌的亚结构域结构, 而手指和拇指两域形成一个密封的活性环境^[79], 而且与脊髓灰质炎病毒类似的RdRps类似^[42], 会形成寡聚体而影响关键的复制过程. 最近发现内源性亲环素A, 一类脯氨酰顺-反异构酶由于阻止了RdRp与亲环素B的相互结合, 而大幅降低了胞

■同行评价

本文选题较好, 具有一定的可读性和科学价值.

内病毒RNA的总量,而广谱的敲除所有的亲环素也会带来这样的效应,进一步表明是亲环素B增加了聚合酶与RNA结合效率^[80,81]。总的来说将一直作为热门药物的NS5B带来新的思路。

5 结论

HCV的感染是个极其复杂的过程,所带来的多重的病理学效应。由于缺乏高效的体外培养体系,在过去的十几年里,研究人员对于建立支持HCV进行体外复制的细胞模型做了大量努力,高效的转染系统成为研究的主流平台,对病毒自身的复制周期有了一个全新的认识,以上大多研究的结果就是基于先期的体外系统的研究结果而对于体外水平药物筛选也起了极大地促进。但在这里也出现了许多问题即体内体外的结果出现相悖的结果。因此HCV的研究将朝向更近于体内的系统出发,更加深刻的阐述病毒的增殖和致病机制。

6 参考文献

- Racanelli V, Rehmann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003; 24: 456-464
- De Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 953-960
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362
- Lohmann V, Körner 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
- 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
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309: 623-626
- Pietschmann T. Virology: Final entry key for hepatitis C. *Nature* 2009; 457: 797-798
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 11): 2391-2399
- 李伟琴, 徐光华, 吴殿磊, 袁致海. 丙型肝炎基因分型进展及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 589-593
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9294-9299
- Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-1974
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791-796
- Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM. Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2310-2315
- Bassett SE, Brasky KM, Lanford RE. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 1998; 72: 2589-2599
- Watanabe T, Katagiri J, Kojima H, Kamimura T, Ichida F, Ashida M, Hamada C, Shibayama T. Studies on transmission of human non-A, non-B hepatitis to marmosets. *J Med Virol* 1987; 22: 143-156
- Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, Schable CA, Fields HA. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* 1983; 148: 254-265
- Abe K, Inchauspe G, Shikata T, Prince AM. Three different patterns of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Hepatology* 1992; 15: 690-695
- Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J, Wong DC, Shapiro M, Popkin T, Houghton M, Alter HJ, Purcell RH. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6441-6444
- Farci P, London WT, Wong DC, Dawson GJ, Valeri DS, Engle R, Purcell RH. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. *J Infect Dis* 1992; 165: 1006-1011
- Abe K, Kurata T, Teramoto Y, Shiga J, Shikata T. Lack of susceptibility of various primates and woodchucks to hepatitis C virus. *J Med Primatol* 1993; 22: 433-434
- Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri. *J Virol* 2010; 84: 303-311
- Li Y, Dai JJ, Sun XM, Xia XS. [Progress in studies on HCV receptor of Tupaia as a potential hepatitis C animal model]. *Dongwuxue Yanjiu* 2011; 32: 97-103
- Xu X, Chen H, Cao X, Ben K. Efficient infection of tree shrew (Tupaia belangeri) with hepatitis C virus grown in cell culture or from patient plasma. *J Gen Virol* 2007; 88: 2504-2512
- Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 1998; 244: 513-520
- Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1416-1423
- Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Zhou XY, Phillips NJ, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis,

- but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* 2002; 294: 94-105
- 27 Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7: 927-933
 - 28 André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 93-104
 - 29 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941
 - 30 Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12766-12771
 - 31 Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocomo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-5025
 - 32 Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007; 446: 801-805
 - 33 刘媛, 丁惠, 戚中田. 丙型肝炎病毒的细胞入侵和相关受体. *生命的化学* 2008; 28: 36-39
 - 34 Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457: 882-886
 - 35 Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006; 80: 6964-6972
 - 36 Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006; 80: 5308-5320
 - 37 Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 29-38
 - 38 Valle M, Zavialov A, Sengupta J, Rawat U, Ehrenberg M, Frank J. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 2003; 114: 123-134
 - 39 Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, Jünemann C, Niepmann M. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008; 27: 3300-3310
 - 40 Kim YK, Lee SH, Kim CS, Seol SK, Jang SK. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' non-translated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 2003; 9: 599-606
 - 41 Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 285: 139-173
 - 42 Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K. Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* 2002; 296: 2218-2222
 - 43 Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 2002; 9: 505-514
 - 44 Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76: 5974-5984
 - 45 Kapadia SB, Chisari FV. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2561-2566
 - 46 Wang C, Gale M, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, Ye J. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005; 18: 425-434
 - 47 Zhong J, Gastaminza P, Chung J, Stamataki Z, Isogawa M, Cheng G, McKeating JA, Chisari FV. Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J Virol* 2006; 80: 11082-11093
 - 48 Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002; 76: 4008-4021
 - 49 Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 2002; 76: 4773-4784
 - 50 Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwoledge T, Syder AJ, McKeating JA, Lanford RE, Feinstone SM, Major ME, Leroux-Roels G, Rice CM. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3805-3809
 - 51 Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *J Virol* 2006; 80: 11074-11081
 - 52 Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, Ye J. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5848-5853
 - 53 Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 2007; 81: 8374-8383
 - 54 McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002; 21: 3980-3988
 - 55 Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratnien M, Targett-Adams P, Laverne JP, Penin F, McLauchlan J. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006; 281: 22236-22247
 - 56 Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 517-523
 - 57 Lanford RE, Guerra B, Bigger CB, Lee H, Chavez D, Brasky KM. Lack of response to exogenous interferon-alpha in the liver of chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2007; 46: 999-1008
 - 58 Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Ehrhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Häussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein

- involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 2003; 17: 488-490
- 59 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110
- 60 Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 2004; 78: 1448-1455
- 61 Owsianka AM, Tarr AW, Keck ZY, Li TK, Witteveldt J, Adair R, Fong SK, Ball JK, Patel AH. Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Gen Virol* 2008; 89: 653-659
- 62 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
- 63 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
- 64 Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 2006; 442: 831-835
- 65 Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, Bös M, Cameron DR, Cartier M, Cordingley MG, Faucher AM, Goudreau N, Kawai SH, Kukulj G, Lagacé L, LaPlante SR, Narjes H, Poupert MA, Rancourt J, Sentjens RE, St George R, Simoneau B, Steinmann G, Thibeault D, Tsantirizos YS, Weldon SM, Yong CL, Llinàs-Brunet M. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426: 186-189
- 66 Li K, Foy E, Ferreón JC, Nakamura M, Ferreón AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Lemon SM. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2992-2997
- 67 Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005; 19: 727-740
- 68 Serebrov V, Pyle AM. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 2004; 430: 476-480
- 69 Yu GY, Lee KJ, Gao L, Lai MM. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol* 2006; 80: 6013-6023
- 70 Stone M, Jia S, Heo WD, Meyer T, Konan KV. Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* 2007; 81: 4551-4563
- 71 Zheng Y, Gao B, Ye L, Kong L, Jing W, Yang X, Wu Z, Ye L. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J Microbiol* 2005; 43: 529-536
- 72 Quintavalle M, Sambucini S, Di Pietro C, De Francesco R, Neddermann P. The alpha isoform of protein kinase CKI is responsible for hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation. *J Virol* 2006; 80: 11305-11312
- 73 Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2004; 279: 40835-40843
- 74 Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 36417-36428
- 75 Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13038-13043
- 76 Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter R, Wang C, Ware F, Sodora DL, Gale M. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4650-4655
- 77 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretsch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; 75: 6095-6106
- 78 Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004; 78: 13278-13284
- 79 Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 2001; 410: 235-240
- 80 Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* 2005; 19: 111-122
- 81 Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Kanazawa N, Koyama T, Kurosaki M, Maekawa S, Yamashiro T, Chen CH, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 42-47

编辑 李薇 电编 何基才