

丙型肝炎病毒感染机制研究进展*

朱紫衣^{1,2}, 叶雨笙^{1,2}, 江忠勇²综述, 熊 杰^{2△}审校

(1. 西南医科大学临床医学院, 四川泸州 646000; 2. 成都军区总医院检验科, 四川成都 610083)

摘 要:丙型肝炎病毒(HCV)感染已经成为严重威胁人类健康的社会公共卫生问题, 经过长期的探索和研究, 仍缺乏高效的预防和治疗方法。HCV 是如何进入肝细胞, 如何在肝细胞复制及在肝细胞内持续存在等关键问题尚未清楚。了解 HCV 的感染机制, 有助于为新的抗 HCV 药物和策略的研发提供思路, 相信随着更深入研究的进行, 其感染机制会更加明了。

关键词:丙型肝炎病毒; 感染; 肝细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.06.021

文章编号:1673-4130(2018)06-0706-04

中图法分类号:R373

文献标识码:A

丙型肝炎病毒(HCV)感染是导致全世界慢性肝病的主要原因之一, 全球大约有 1.85 亿人感染该病毒^[1], 其中 80% 以上转为慢性肝炎, 20% 转为肝硬化, 且肝硬化患者中约 10% 转为肝癌^[2]。目前国际公认的丙型肝炎标准治疗方案为聚乙二醇干扰素 α 联合利巴韦林, 但该治疗方案的临床不良反应明显, 持续应答率(SVR)较低, 难以有效清除 HCV。近几年研发的直接抗病毒药物(DAA)主要针对 HCV 的 NS3/4A 蛋白酶、NS5A 蛋白酶及 NS5B 多聚酶, 但 DAA 上市时间较短费用昂贵, 且药物安全性和长效性有待报道。大量研究表明, HCV 感染机制的探寻是彻底解决治疗问题的突破口, 但由于缺乏理想的动物模型和体外培养体系^[3], 该病毒是如何进入肝细胞, 如何在肝细胞复制及在肝细胞内持续存在等关键问题尚未清楚。本文就目前 HCV 感染机制研究现状进行简要综述。

1 HCV 进入肝细胞过程

HCV 通过血流进入人体, 以肝细胞作为其主要靶细胞。病毒颗粒通过肝细胞膜是 HCV 感染肝细胞的第一个重要步骤, 其进入肝细胞是一个动态的过程, 涉及多个步骤、多个宿主细胞因子^[4]。有学者在以病毒基因组染色体 HCV RNA 转染的人肝癌细胞系-7 为模型的研究中指出, HCV 入胞机制的可能大致轮廓为: 病毒颗粒首先与宿主低密度脂蛋白受体黏附, 启动病毒进入的第一步, 而后 HCV 的 E2 糖蛋白和宿主的跨膜蛋白 CD81、清道夫受体 SR-B1 相互作用形成 HCV E2-CD81/SR-B1 复合体; E2-CD81/SR-B1 复合体诱导表皮生长因子(EGFR)及 Hras 信号通路的激活, 引起 HCV E2-CD81/SR-B1 复合体与肝细胞基底膜上紧密连接蛋白 CLDN1、OCLN 相互聚集

形成细胞群; CD81-CLDN1 细胞群的内在化由网格蛋白介导的胞吞诱导引起膜融合^[5]。

在受体、共受体及辅助因子的协同下, E1、E2 蛋白促进 HCV 和宿主胞内体的融合并内化入胞, 完成 HCV 对肝细胞的靶向结合。在 HCV 跨膜具体机制研究中, PÉREZ-BERNA 等^[6]通过对 HCV 包膜糖蛋白多肽库的分析, 鉴定出 E1 和 E2 中可能参与融合作用的肽段, 推测在 E1 和 E2 结构蛋白中都存在参与完成融合过程的功能区。关于 HCV 的融合机制可能与黄病毒类似, 在受体与低 pH 的双重诱导下, HCV E1、E2 糖蛋白发生构象转变, 暴露出融合肽/环并插入靶膜, 引起构象重排, 形成融合诱导型同源三聚体, 驱动病毒包膜与内体膜发生融合, 从而使病毒衣壳游离, 病毒 RNA 释放入胞^[7]。然而由于 E1 晶体结构的缺失及 E1、E2 蛋白体的复杂性, 加之 HCV 包膜蛋白三维立体结构的缺失, 大大阻碍了分子水平上 HCV 融合机制的研究。研究发现, NPC1L1 受体参与 HCV 在细胞间的传播, 以及晚期膜融合的重排、转铁蛋白-1 受体作为 E1/E2 蛋白特异性受体介导 HCV 的融合过程、血清反应因子结合蛋白 1 与 CD81 结合后参与 HCV 的膜融合并调节宿主细胞的渗透。因此, 在 HCV 进入肝细胞过程中, 细胞因子及其参与的信号通路机制对病毒进入细胞、病毒颗粒脂蛋白重排、CD81 诱导信号通路的理解至关重要。

2 HCV 在肝细胞内复制机制

HCV 进入肝细胞后, 经历多蛋白的翻译和加工、RNA 的复制及病毒颗粒的包装、装配和释放等过程完成其整个生命周期。基于 HCV 体外培养模型的限制性, 病毒的整个生命周期还未完全了解, 许多实验尝试建立 HCV 组织培养模型, 但迄今为止尚未成功

* 基金项目: 四川省科技厅资助项目(2013JY0173)。

△ 通信作者, E-mail: byx410@163.com。

本文引用格式: 朱紫衣, 叶雨笙, 江忠勇, 等. 丙型肝炎病毒感染机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(6): 706-709.

建立支持 HCV 装配和释放的模型。但随着 HCV 假病毒颗粒及 HCV 体外细胞培养模型的建立,关于 HCV RNA 复制的研究已取得了巨大的进步。首先, HCV RNA 附着于肝细胞核糖体上,经 5' UTR 的 IRES 介导直接结合起始因子 eIF,并利用 40S 核糖体亚单位开始翻译,在 eIF2-Met-tRNA-GTP 三元复合物、eIF3、60S 亚基共同形成的活性 80S 核糖体上完成装配后翻译出多聚蛋白,通过细胞信号肽酶及其裂解作用,使多聚蛋白 N-末端的结构蛋白与多聚蛋白分离,同时病毒编码的 NS2-3 蛋白酶自身催化 NS2/NS3 及 NS3-4A 丝氨酸蛋白酶在多聚蛋白下游 4 个位点处催化肽链的裂解。其次,多聚蛋白完成加工处理,产生并翻译 10 种成熟病毒蛋白(Core、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)组成病毒复制复合体。最后,病毒复制复合体在内质网膜结构衍生出的“膜网络”中进行复制,在依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的作用下^[8],HCV 以亲代 RNA 为模板形成负链复制中间体,再从互补的负链复制出多股子代正链 RNA,生成的子代 RNA 分子可进一步翻译成新的病毒蛋白质或合成复制型,起模板作用或组装成病毒。如此反复循环,生成大量 HCV。

在这个过程中,众多 microRNA 参与 HCV 复制的调节,比如肝脏特异高表达的 miR-122 可通过与 HCV 基因组 5' 非翻译区的两个结合位点相互作用来影响 IRES 的功能,增加 HCV 的翻译和复制,从而正向调节其表达^[9]。研究还发现,抑制 miR-122 表达的 ASO 转染 Huh-7 细胞后,miR-122 基因的表达抑制导致病毒 RNA 复制子的数目下降 80%,同时 HCV-RNA 复制子水平也明显降低,HCV 蛋白质表达下调。这提示 miR-122 表达的降低可导致 HCV-RNA 数目减少,并可影响 HCV-RNA 的复制和翻译^[10]。相反,miR-122 联合调节蛋白 Ago2,有助于增强 HCV 的嗜肝性,也通过核糖核酸外切酶 Xrn1 稳定病毒 RNA 并阻止其降解,从而促进病毒 RNA 的高效复制^[11]。最新研究表明,miR-122 调节的另一个核糖核酸外切酶 Xrn2 也可增强 HCV 病毒的复制,阻止 HCV RNA 的降解,然而 Xrn2 增强病毒复制可能只对少数基因型有影响,如复制力较强且产生细胞病变效应的 JFH1^[12]。这些研究提示了 microRNA 在 HCV 复制过程中的重要性,以及肝脏特异性 microRNA,如 miR-122,可能具有作为抗 HCV 靶作用位点的潜在价值。

此外,还有研究通过 RNA 干扰筛选试验发现了许多可能参与 HCV 复制的宿主辅助因子,如被认为是关键性宿主因子的磷脂酰肌醇 4-激酶 III (PI4K-III α)。TAI 等^[13]通过建立非复制的网状膜形成模型发现,PI4K-III α 活性的丧失会导致 HCV 病毒复制复合体膜结构形态的显著变化,抑制其表达会导致双层膜

囊泡和 HCV 复制复合体的聚集,影响膜网络的形成。有研究证实了 PI4K-III α 对维持病毒复制区网状膜结构的完整性起重要作用^[14]。PI4K-III α 磷酸化磷酸肌醇并形成磷脂酰肌醇 4-磷酸(PI4P)。在 HCV 感染过程中,PI4K-III α 和病毒 NS5A 蛋白相互作用引起 PI4P 水平增加,PI4P 对 HCV 病毒的复制有重要作用,其水平的下降或过量表达都将影响 HCV 的复制^[15]。

3 HCV 在肝细胞内持续存在机制

3.1 HCV 的高度变异性 由于 RNA 聚合酶缺乏 3'-5' 核酸外切酶校对功能,在 HCV 复制时会随机插入错误配对的核苷酸,导致其编码蛋白产生无义、同义或错义突变,从而改变蛋白氨基酸序列,产生复制频率高和能逃避宿主免疫监视的优势变异株。研究发现,HCV 高度变异,每一个复制周期约有 10^{-4} 个可替换位点,高度突变涉及整个基因组范围,包括 5' UTR、E2、NS2、NS3 和 NS5A 等区都存在,可产生基因型序列极为相似,仅一些位点存在差异的“准种”病毒群体^[16]。准种的存在使得病毒产生可逃避宿主体液和细胞免疫的逃逸突变株,也是导致抗 HCV 疫苗的失败及其耐药性的原因之一。此外,HCV 基因组的 E2 区含有两个高变区 HVR1 和 HVR2,极高突变率的高变区使得病毒可选择逃逸抗体中和。另外,慢性丙肝患者体内每天 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个病毒粒子的产生率和病毒极短的半衰期为病毒变异个体的产生提供了重要物质条件。

3.2 免疫清除能力有限 急性 HCV 感染者中,20%~30% 可以自发性清除病毒,然而绝大多数感染者都因为持续的固有免疫和适应性免疫反应而无法清除病毒,逐渐发展为慢性感染,导致病毒在机体内持续存在。固有免疫是宿主细胞抵御病毒感染的第一道防线,许多受体分子和免疫因子都参与了 HCV 的感染过程。Toll 样受体(TLRs)识别 HCV 双链 RNA 中间体,诱导免疫因子的产生,同时人视黄酸诱导基因 RIG-I 识别 HCV 3'-非编码区的 poly-u/uc 序列,诱导 IFNs 的产生,促进细胞的免疫反应和 CTL 应答,从而清除细胞内病毒^[17-18]。固有免疫细胞通过不同的作用机制来清除病毒,抑制病毒的复制和传播,但 HCV 核心蛋白通过阻断 JAK/STAT 信号传导通路负调控 IFN 反应途径^[19],诱导细胞因子信号抑制物-3 的表达,导致活化 STAT1 减少,并与 STAT1 直接结合阻止其磷酸化,激活下游抗 HCV ISGs,干扰 ISGs 的生成^[20];HCV 的 NS3-4A 蛋白酶可通过裂解宿主的转接蛋白 MAVS、TRIF,从而抑制感染细胞的 RIG-I 经典通路和 TLRs 介导的 I 型和 III 型 IFN 信号通路,削弱宿主细胞的免疫清除能力,达到逃逸宿主固有免疫应答的目的^[21];HCV NS4B 也可通过干扰 STING 与 MAVS、TBK1 的相互作用

来抑制 IFN 的产生^[22-23]。固有免疫还受到 IL28B 基因的调节, IL28B 基因的编码产物 IFN- λ 3 可与受体结合激发下游信号通路, 并激活 ISGF3 和 STAT1 二聚体, 诱导参与炎症与免疫反应基因的表达^[24]。在 Huh7 细胞中, HCV 及其病毒蛋白可干扰 TLR3 信号转导通路, 并且抑制胞内的 IFN- λ 1/ISG 表达, 损伤机体的固有免疫反应^[25], 导致适应性免疫的失活和功能障碍, 从而影响宿主的免疫清除能力, 引起慢性感染^[26]。

机体固有免疫抗病毒感染的失败诱导宿主适应性免疫的发生, CTL 对于控制 HCV 感染作用显著, 能够直接杀死感染的细胞, 并分泌多种抗病毒细胞因子。急性 HCV 感染者体内存在较强、较广的抗原特异性 CTLs, 并可通过 CTL 生成 IFN- γ 来清除病毒, 而慢性感染者通过连续的抗原刺激抑制了 CTLs 细胞受体的表达, 从而导致了 CTLs 功能失调。早期 HCV 感染诱发 CTL 反应, 但 CTL 的作用较弱, 不能杀伤表达相应抗原的靶细胞, 不能彻底清除病毒, 从而导致 HCV 病毒持续存在。HCV 病毒的 C 区、E 区、NS2、NS3 都含有 CTL 抗原表位, 但这些 CTL 抗原表位均呈现出较强的变异性, 通过 CTL 抗原表位的变异, 病毒可逃避细胞免疫监视, 实现免疫逃避^[27]。HCV E2 蛋白和其编码的一个短 RNA 片段可抑制 T 细胞受体介导的信号, 从而导致 T 细胞功能障碍和机体适应性免疫受损, 导致 HCV 慢性感染^[28]。E2 与 IFN 诱导的蛋白激酶 PRK 结合, 抑制了 PKR 的活性并阻止真核起始因子 2(eIF2 α) 的磷酸化, 从而干扰 PKR 对病毒翻译、增殖的调控, 阻止 IFN 介导的翻译关闭, 这也是病毒免疫清除能力受限的重要因素之一^[29]。修复 CD8⁺ T 细胞的免疫反应, 抑制干扰 T 细胞免疫功能的病毒复制, 从而恢复 T 细胞的功能是治疗 HCV 感染的重要途径。

3.3 肝外隐匿性感染 HCV 具有很强的嗜肝性, 然而通过检测外周血淋巴细胞(PBMC)、骨髓、中枢神经系统中 HCV 正链和负链 RNA 以及病毒蛋白, 证实了 HCV 存在着潜在的肝外复制场所^[30]。即使血清中检测不到 HCV RNA, PBMC 中可能仍存在 HCV。当患者免疫力受抑, HCV 则极可能再次被激活引起病毒血症。隐匿存在于 PBMC 中的 HCV 不足以引起强烈的 IFNs 免疫反应来清除病毒, 以致于 HCV 在 PBMC 中持续存在, 从而成为影响丙肝患者 SVR 和治疗后复发的重要因素^[31]。

4 小 结

HCV 感染已经成为严重威胁人类健康的社会公共卫生问题, 经过长期的探索和研究, 仍缺乏高效的预防和治疗方案。随着 HCV 感染机制的深入研究, 对其整个生命周期及其在体内持续存在的机制有了更进一步的认识, 但仍有很多问题尚待解决。了解

HCV 的感染机制, 有助于为新的抗 HCV 药物和策略的研发提供思路, 相信随着更深入研究的进行, 其感染机制会更加明了。

参考文献

- [1] THOMAS D L. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity[J]. Nat Med, 2013, 19(7): 850-858.
- [2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 丙型肝炎防治指南(2015 年版)[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2015, 7(3): 19-35.
- [3] BANAUDHA K, ORENSTEIN J M, KOROLNEK T, et al. Primary hepatocyte culture supports hepatitis C virus replication; a model for infection-associated hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2010, 51(6): 1922-1932.
- [4] DOUAM F, LAVILLETTE D, COSSET F L. The mechanism of HCV entry into host cells[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 129(12): 63-107.
- [5] DOUAM F, DING Q, PLOSS A. Recent advances in understanding hepatitis C[J]. F1000research, 2016, 5(4): 389-395.
- [6] PÉREZ-BERNA A J, MORENO M R, GUILLÉN J, et al. The membraneactive regions of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins[J]. Biochemistry, 2006, 45(11): 3755-3768.
- [7] 秦照玲, 鞠鹤鹏, 戚中田. 丙型肝炎病毒融合蛋白及融合机制[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2013, 7(6): 110-114.
- [8] PPLEBY T C, PERRY J K, MURAKAMI E, et al. Viral replication. Structural basis for RNA replication by the hepatitis C virus polymerase[J]. Science, 2015, 347(6223): 771.
- [9] MASAKI T, AREND K C, LI Y, et al. miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(2): 217.
- [10] CONRAD K D, NIEPMANN M. The role of microRNAs in hepatitis C virus RNA replication[J]. Arch Virol, 2014, 159(5): 849-62.
- [11] SHIMAKAMI T, YAMANE D, JANGRA R K, et al. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(3): 941-946.
- [12] SEDANO C D, SARNOW P. Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2[J]. Cell Host Microbe, 2014, 16(2): 257-264.
- [13] TAI A W, SALLOUM S. The role of the phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in hepatitis C virus-induced host membrane rearrangement[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26300.
- [14] REISS S, REBHAN I, BACKES P, et al. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is

- essential for integrity of the membranous replication compartment[J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(1): 32-45.
- [15] HSU N Y, ILNYTSKA O, BELOV G, et al. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication[J]. *Cell*, 2010, 141(5): 799-811.
- [16] YONGMIN X U, DUAN H, ZHENG L I, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies during natural disease progression of chronic hepatitis C and the clinical implications[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2014, 34(8): 1104.
- [17] LI K, LI N L, WEI D, et al. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates[J]. *Hepatology*, 2012, 55(3): 666-675.
- [18] SHEN Y, QIAN Y, SHEN L, et al. Cloning and expression of retinoic acid-induced gene-I and its effect on hepatitis C virus replication[J]. *Lab Med*, 2014, 45(2): 103-110.
- [19] YANG D R, ZHU H Z. Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: who wins at tug-of-war[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(13): 3786-3800.
- [20] HORNER S M, GALE M J. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29(9): 489-498.
- [21] DING Q, HUANG B, LU J, et al. Hepatitis C virus NS3/4A protease blocks IL-28 production[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(9): 2374-2382.
- [22] DING Q, CAO X, LU J, et al. Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 52-58.
- [23] NITTA S, SAKAMOTO N, NAKAGAWA M, et al. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 46-58.
- [24] HEIM M H. Innate immunity and HCV[J]. *J hepatol*, 2013, 58(3): 564-574.
- [25] WANG Y, LI J, WANG X, et al. Hepatitis C virus impairs TLR3 signaling and inhibits IFN-1 expression in human hepatoma cell line [J]. *Innate Immun*, 2014, 20(1): 3-11.
- [26] SAHA B, SZABO G. Innate immune cell networking in hepatitis C virus infection[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(5): 757-766.
- [27] OBENGADJEI N, CHOO D K, WEINER D B. Hydrodynamic immunization leads to poor CD8 T-cell expansion, low frequency of memory CTLs and ineffective antiviral protection[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2013, 20(10): 552-563.
- [28] BHATTARAI N, MCLINDEN J H, XIANG J, et al. Conserved motifs within hepatitis C virus envelope (E2) RNA and protein independently inhibit T cell activation [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(9): e1005183.
- [29] HANADI Q, AMANY A M, ADEEL C, et al. Understanding the molecular mechanism(s) of hepatitis C virus (HCV) induced interferon resistance[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 19(10): 113-119.
- [30] PAWELCZYK A, KUBISA N, JABLONSKA J, et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) negative strand RNA and NS3 protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMC); CD3⁺, CD14⁺ and CD19⁺ [J]. *Virol J*, 2013, 10(1): 346-346.
- [31] ZAMAN N, ASAD M J, RAZA A, et al. Presence of HCV RNA in peripheral blood mononuclear cells may predict patients response to interferon and ribavirin therapy[J]. *Ann Saudi Med*, 2014, 34(5): 401-406.

(收稿日期: 2017-06-24 修回日期: 2017-09-15)

(上接第 705 页)

- 瘤标志物检测在早期宫颈癌诊断中的意义[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2016, 26(13): 23-24.
- [9] WANG Q, QIN J, CHEN A, et al. Downregulation of microRNA-145 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(5): 3703-3708.
- [10] 王红霞, 丁晓萍, 侯庆香, 等. SCC-Ag 在宫颈癌新辅助化疗前后的改变及临床意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2015, 14(3): 229-232.
- [11] 赵德英, 张惠, 方红艳, 等. SCC-Ag 与宫颈癌临床病理特征的相关性及对淋巴结转移的预测价值[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2016, 37(5): 777-781.
- [12] 沈慧, 左绪磊. CEA、CA125、CA199 和 SCC 检测在宫颈癌和癌前病变诊断中的应用价值[J]. *中国初级卫生保健*, 2016, 30(9): 34-36.
- [13] 杨辉, 郑君. 联合检测血清 SCCA、CA19-9 及 CA125 对宫颈癌诊断及预后判断的临床意义[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(5): 772-774.
- [14] 胡跃华. 血清 CA125、CEA 水平与宫颈癌相关性分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2012, 18(17): 2596-2598.
- [15] 闫慧, 薛冰. 血清肿瘤标志物 CA125、CEA 联合检测在宫颈癌诊断中的临床价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(1): 134-135.

(收稿日期: 2017-06-04 修回日期: 2017-09-04)