

埃博拉病毒侵染细胞机制的研究进展

石明, 沈宇清*

(东南大学 医学院, 南京 210009)

摘要:埃博拉病毒能在人类和非人灵长类中引起严重的埃博拉出血热, 病死率可高达 90%, 并且目前还没有针对埃博拉病毒有效的疫苗或者是治疗手段。面对埃博拉病毒带来的挑战, 针对埃博拉病毒的相关研究已经成为病毒学的热点问题。其中, 关于埃博拉病毒侵染细胞机制的科学研究对于开发病毒疫苗以及新型治疗药物有非常关键的作用。因此, 本综述拟就埃博拉病毒侵染细胞机制方面的研究进展进行总结。

关键词:埃博拉病毒; 感染机制; 研究进展

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2013)01-0071-05

埃博拉病毒(Ebolavirus, EBOV)属于丝状病毒科(Filoviridae), 病毒体呈长丝状或杆状, 直径约 100nm, 长 300~1 500nm。病毒粒子有螺旋状核衣壳, 外有包膜。其基因组为单股负链 RNA, 全长约 19 kb, 共编码 7 种蛋白^[1-2]。目前埃博拉病毒可分为五种亚型: 扎伊尔型(Zaire Ebolavirus, ZEBOV), 科特迪瓦型(Cote d'Ivoire Ebolavirus, CEBOV), 苏丹型(Sudan Ebolavirus, SEBOV), 莱斯顿型(Reston Ebolavirus, REBOV)和本迪布焦型(Bundibugyo Ebolavirus, BEBOV)^[3]。埃博拉病毒能在人类和非人灵长类中引起严重的埃博拉出血热(Ebola hemorrhagic fever, EHF), 病死率可高达 90%^[2,4-5]。目前还没有针对埃博拉病毒有效的疫苗或者是治疗手段。也正是出于这些原因, 埃博拉病毒的生物安全级别为最高的 P4 级^[6-7]。

关于埃博拉病毒的研究还有许多未明之处。首先, 已有证据显示埃博拉病毒的自然宿主是非洲果蝠^[8]。但病毒跨物种传播到人或其他哺乳动物的过程还不明确, 且病毒传播非常迅速, 所以预防十分困难。其次, EBOV 的免疫机制还尚不明确, EBOV 所识别的细胞表面受体还未确定^[9], 因此目前还没有一种已批准的疫苗或者药物用于 EBOV 的预防和治疗^[10]。面对埃博拉病毒带来的挑战, 针对埃博拉病毒的相关研究已经成为病毒学的热点问题。其中, 关于埃博拉病毒侵染细胞机制的科学研究对于

开发病毒疫苗以及新型治疗药物有非常关键的作用^[11]。因此, 本综述拟就埃博拉病毒侵染细胞机制方面的研究进展进行总结。

1 埃博拉病毒的感染机制

病毒感染一般包括吸附、穿入、脱壳、生物合成、装配、成熟和释放等步骤, 虽然目前埃博拉病毒侵染细胞的机制尚未明确, 但其感染过程中一些具体步骤已逐渐被揭示。感染过程与病毒基因编码的 I 型跨膜蛋白 GP 有着密切的关系。GP 由两个亚单位 GP1 和 GP2 组成, 它们之间由二硫键相连接。GP 与病毒的侵入密切相关, 且与病毒逃避免疫反应、参与宿主细胞调控等均有一定关系。

1.1 侵入细胞机制

病毒进入细胞是病毒感染的第一步, 也就是说病毒能否进入细胞是病毒致病的一个先决条件^[12], 而宿主细胞摄取毒粒可能是通过多种不同的细胞依赖的内吞方式^[13]。真核生物的内吞作用有通过网格蛋白介导的内吞作用, 巨胞饮作用以及吞噬作用等^[14]。研究表明, EBOV 可能会根据宿主细胞大小以及毒粒大小的不同通过多种方式穿入细胞, 而且在宿主体内的多种组织和细胞内都能进行复制^[15]。

1.1.1 通过有被小凹和网格蛋白的内吞

内吞作用是生物体摄取生物大分子的主要形式, 其中网格蛋白介导的内吞作用由接头蛋白(Adaptor proteins)和网格蛋白(clathrin)的招募开始。网格蛋白是由 3 条重链和 3 条轻链构成的三聚物, 激活后在细胞膜内表面聚集。然后被网格蛋白包裹的有被小凹(caveolae)发生内陷、缢缩、包被液泡芽殖和包被液泡脱壳^[16]。最后脱壳后的网格蛋白会被胞膜上的接头蛋白迅速回收, 以便于下一次使用。

收稿日期 2012-05-07; 修回日期: 2012-09-27

基金项目: 东南大学教学改革研究项目(2010-079)、东南大学大学生科研训练(SRTP)项目(11412003)

作者简介: 石明(1990-), 男, 浙江人, 学士, Tel: 15051850275, E-mail: shimingseu@hotmail.com

* 通讯作者: 沈宇清(1976-), 女, 博士, 研究方向: 肿瘤免疫学, Tel: 15991389667, E-mail: yuqing.shen@yahoo.com.cn

抑制剂,如胆固醇螯合药物、佛波醇酯等能够抑制丝状假病毒进入人体细胞,以此推断丝状病毒可能是通过细胞表面有被小凹介导的内吞作用进入宿主细胞的。Bhattacharyya 等^[18]研究了一些抑制剂对含有埃博拉病毒包膜糖蛋白的 HIV 假病毒感染细胞的影响。其中一种抑制剂为氯丙嗪,它能够使网格蛋白在内体膜附近集聚,从而阻止网格蛋白的回收。实验证明 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯丙嗪就能强烈抑制网格蛋白介导的内吞作用,抑制含埃博拉病毒包膜糖蛋白的 HIV 假病毒对于细胞的感染,且该抑制作用没有细胞类型特异性。此外,Bhattacharyya 等用小干扰 RNA 敲除网格蛋白重链基因,对该假病毒侵染细胞也有抑制作用。以上实验结果说明 EBOV 可能是通过网格蛋白介导的内吞作用来感染细胞的。基于此,针对网格蛋白的抑制剂研究有望发现治疗 EBOV 的药物。

1.1.2 巨胞饮作用

巨胞饮作用 (macropinocytosis) 细胞内吞作用的一种形式,能够非选择性的吞入可溶性分子,营养物质和抗原等。巨胞饮作用依赖于肌动蛋白^[19],其过程开始于膜表面褶皱产生的巨噬泡。巨胞饮作用在许多生物学过程中起重要作用,在以其作为吞噬抗原的主要机制的巨噬细胞和树突状细胞内尤为活跃^[20]。

传统的网格蛋白和小凹蛋白 1 (caveolin-1) 介导的内吞作用的内吞泡直径通常分别小于 200nm 和 100nm^[21-22]。所以,推论 EBOV 这样较大的毒粒可能通过巨胞饮作用进入细胞。Aleksandrowicz 等^[12]发现埃博拉病毒样颗粒 (Ebola virus-like particles, EBOV-VLPs) 主要通过巨胞饮作用进入细胞。他们认为 EBOV-VLPs 可能刺激细胞发生褶皱,从而引发了巨胞饮作用将病毒样颗粒吞入细胞。几种巨胞饮作用的抑制剂:拉春库林 A (Latrunculin A)、钠/氢交换体阻滞剂 (EIPA) 和渥曼青霉素 (wortmannin) 可以抑制 EBOV-VLPs 进入细胞内部。Nanbo 等^[5]也发现 EBOV 的 GP 蛋白首先与细胞膜上受体结合,通过激活细胞膜表面肌动蛋白调节分子,引发细胞表面褶皱进而开始巨胞饮作用。此外,Saeed 等^[19]使用了具有复制和感染能力的 ZEBOV 来感染人胚胎肾细胞 (Human embryonic kidney 293 cells, HEK293) 和绿猴肾细胞,结果显示该病毒的穿入与网格蛋白、小凹蛋白、马达蛋白 (dynamin) 均无关,但显示出了巨胞饮作用的特征,病毒的结合直接刺激了细胞对液相的吸收以及局部

肌动蛋白的聚合。这些结果极大的拓展了我们对 ZEBOV 穿入机制的认识,有可能应用于研发新的治疗方法,并为研究其他丝状病毒的穿入机制提供新的切入点。

1.2 胞内融合机制

包膜病毒都需要将病毒包膜和宿主细胞膜或内体膜融合,然后将基因组释放到胞质中进行复制。融合是通过病毒表面的一种或几种跨膜糖蛋白介导的,不同的病毒融合蛋白有不同结构和不同激活模式,因而也就有不一样的融合机制^[23]。尽管如此,不同的融合机制都遵循以下大致的步骤:在激活剂的作用下,病毒融合蛋白与内体膜相接合,触发病毒融合蛋白构象改变,暴露出中心融合肽介导病毒包膜和内体膜融合,释放遗传物质入胞内。

1.2.1 组织蛋白酶

埃博拉病毒的糖蛋白为 I 型病毒融合蛋白,它由两个亚基组成:连接亚基 GP1 和融合亚基 GP2,两亚基之间以二硫键相连。Bale 等^[23]最新研究表明,埃博拉病毒 GP1 和 GP2 在内体 pH 较低时中并不能够独自完成构型变化和介导融合,可能还需要另外的激活信号如与其他的细胞内蛋白进行结合来触发构象改变,完成融合准备。Schornberg 等^[24]通过化学抑制剂和小干扰 RNA 的作用,确证了组织蛋白酶 B (CatB) 和组织蛋白酶 L (CatL) 在埃博拉病毒糖蛋白介导的感染中所起的作用。研究结果显示 CatB 和 CatL 将 GP1 切割为 19kD 大小的片段来为融合做好准备,但 19kD 的片段是如何触发膜的结合和诱导融合的机制还尚不明确。Brecher 等^[25]将不同形态的 GP 与脂质体结合,证明了 19kD 的片段与脂质体结合所需的激活温度最低,这说明它是最适宜融合形态。基于以上结果,如果能够人工合成抑制 CatB 和 CatL 的药物^[26],有可能成为对抗埃博拉病毒的新手段。但是在另一项研究中, Martinez 等^[27]却认为 CatL 对 ZEBOV 感染人树突状细胞中几乎没什么作用,说明对于 CatB 和 CatL 在 EBOV 感染细胞中的作用机制尚待进一步明确。

许多研究表明,埃博拉病毒除了表达膜融合蛋白 GP 外,还表达两种分泌型糖蛋白和一种 Δ -肽段 (Δ -peptides)。其中分泌型糖蛋白包括可溶糖蛋白 (Soluble GP, sGP) 和小分子可溶糖蛋白 (Small soluble GP, ssGP)。这些糖蛋白与 GP 蛋白相比具有相同的 N 端,其中包含受体结合区域 (Receptor-binding region, RBR),但 C 末端不同。Radoshitzky 等^[9]将合成的 sGP, ssGP 以及 Δ -肽段分别加入

Vero E6 和 HeLa 等细胞系中孵育,发现这些肽段能够抑制逆转录假病毒(Pseudotyped retroviruses)通过 GP 介导的方式穿入细胞。推测可能的机制是这些糖蛋白与 GP 蛋白竞争结合内体上丝状病毒的受体,或者是干扰了组织蛋白酶对 GP 的切割。然而这些假设还有待实验进一步明确。表达这些能干扰病毒穿入的蛋白相较其它的侵染细胞抑制剂来说具有更好的特异性,因此更适用于埃博拉病毒感染的预防和治疗。

1.2.2 NPC1

有相关研究认为埃博拉病毒进入细胞与 Niemann-Pick C1(NPC1)有关,NPC1 编码一种膜蛋白,参与细胞的胆固醇转运。Carette 等^[28]对 NPC1 突变细胞进行感染实验,发现携带埃博拉病毒包膜蛋白且有复制能力的水泡性口炎病毒(rVSV-GP-EboV)几乎不感染该细胞,而当细胞再次表达 NPC1 后它又恢复了对病毒的易感性。与此一致的是,Cote 等^[29]研究了一些 NPC1 的小分子抑制剂如苄基哌嗪金刚烷二酰胺衍生物(Benzylpiperazine adamantane diamide-derived compound),发现其对埃博拉病毒感染绿猴肾细胞有干扰作用。Cote 等应用另一种工具细胞(中国仓鼠卵巢细胞,CHO)进行了研究也得到相应的结果:没有 NPC1 的细胞完全不被感染,而当表达 NPC1 后易感性能得到恢复。由此,他们提出了相近的埃博拉病毒侵染细胞的可能机制:首先 EBOV 内吞进入细胞,然后在内体内被组织蛋白酶 B(CatB)剪切,接着剪切后的 EBOV 的 GP 得以与 NPC1 结合,最后膜融合,将遗传物质释放入胞质中。另外,Shimajima 等^[15]研究发现埃博拉病毒和马尔堡病毒(Marburg virus)穿入细胞的受体可能是酪氨酸激酶家族的几种成员。因此,如果需要应用融合受体抑制剂,就必需明确 EBOV 进入细胞所依赖的是一种或几种分子,以判断使用的是一种或者联用几种有效的抑制剂来干扰 EBOV 穿入敏感细胞。

2 总结与展望

虽然新的发现层出不穷,但是在科学界对于埃博拉病毒穿入的具体机制还是存在较大的争议,例如 Chan 等^[30]认为叶酸 α 受体(Folate receptor-alpha, FR-alpha)是埃博拉病毒穿入细胞的辅助因子,而 Simmons 等^[31]却提出埃博拉病毒感染的感染不需要 FR-alpha。就目前来说,还没有一种细胞表面受体或共受体能充分解释 EBOV 对宿主细胞的趋向性。虽然有数据显示 GP 上的粘蛋白样区域

(Mucin-like region, MLR)可能与粘附靶细胞有关,但是通过体外实验证明这个区域对于 GP 介导侵入细胞的基本功能并不是必须的^[32]。因此,尽管近年来在对埃博拉病毒的感染机制研究中取得了多项重大突破,但还有许多争议有待解决^[33]。总之,随着对于埃博拉病毒穿入机制的研究不断深入,将有更多的潜在治疗靶点浮出水面。这不仅有利于埃博拉病毒的疫苗研究和药物研发,也对其他丝状病毒或出血热病毒的研究有重要的启示作用。

参考文献:

- [1] Ascenzi P, Bocedi A, Heptonstall J, et al. Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family[J]. Mol Aspects Med, 2008,29(3):151-185.
- [2] Qiu X, Alimonti J B, Melito P L, et al. Characterization of Zaire ebolavirus glycoprotein-specific monoclonal antibodies[J]. Clin Immunol, 2011,141(2): 218-227.
- [3] Kuhn J H, Becker S, Ebihara H, et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations [J]. Arch Virol, 2010,155(12):2083-2103.
- [4] Leroy E M, Becquart P, Wauquier N, et al. Evidence for Ebola virus superantigen activity[J]. J Virol, 2011, 85(8):4041-4042.
- [5] Nanbo A, Imai M, Watanabe S, et al. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner[J/OL]. PLoS Pathog, 2010,6(9): e1001121.
- [6] Halfmann P, Kim J H, Ebihara H, et al. Generation of biologically contained Ebola viruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(4):1129-1133.
- [7] Wool-Lewis R J, Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines[J]. J Virol, 1998,72(4): 3155-3160.
- [8] Martinez O, Leung L W, Basler C F. The role of antigen-presenting cells in filoviral hemorrhagic fever: Gaps in current knowledge[J]. Antiviral Res, 2012,93(3): 416-428.
- [9] Radoshitzky S R, Warfield K L, et al. Ebolavirus delta-peptide immunoadhesins inhibit marburgvirus and ebolavirus cell entry[J]. J Virol, 2011,85(17):8502-8513.
- [10] Geisbert T W, Feldmann H. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections[J]. J Infect Dis, 2011,204 Suppl 3:S1075-1081.
- [11] Sanchez A. Analysis of filovirus entry into vero e6

- cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity[J]. *J Infect Dis*, 2007,196 Suppl 2:S251-258.
- [12] Aleksandrowicz P, Marzi A, Biedenkopf N, et al. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis[J]. *J Infect Dis*, 2011, 204 Suppl 3:S957-967.
- [13] Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2009,11(5):510-520.
- [14] Swanson J A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008,9 (8):639-649.
- [15] Shimojima M, Takada A, Ebihara H, et al. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses[J]. *J Virol*, 2006,80(20): 10109-10116.
- [16] 姚鹏程,叶恭银. 网格蛋白介导的内吞作用机制[J]. *生命科学研究*, 2003,7(2):22-25.
- [17] Empig C J, Goldsmith M A. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses[J]. *J Virol*, 2002,76(10):5266-5270.
- [18] Bhattacharyya S, Warfield K L, Ruthel G, et al. Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway[J]. *Virology*, 2010,401(1):18-28.
- [19] Saeed M F, Kolokoltsov A A, Albrecht T, et al. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes [J/OL]. *PLoS Pathog*, 2010,6(9):e1001110.
- [20] Lim J P, Gleeson P A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps [J]. *Immunol Cell Biol*, 2011,89(8):836-843.
- [21] Richter T, Floetenmeyer M, Ferguson C, et al. High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions [J]. *Traffic*, 2008,9(6):893-909.
- [22] Traub L M. Clathrin couture: fashioning distinctive membrane coats at the cell surface[J/OL]. *PLoS Biol*, 2009,7(9):e1000192.
- [23] Bale S, Liu T, Li S, Wang Y, et al. Ebola Virus Glycoprotein Needs an Additional Trigger, beyond Proteolytic Priming for Membrane Fusion [J/OL]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011,5(11): e1395.
- [24] Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, et al. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein[J]. *J Virol*, 2006,80(8): 4174-4178.
- [25] Brecher M, Schornberg K L, Delos S E, et al. Cathepsin Cleavage Potentiates the Ebola Virus Glycoprotein to Undergo a Subsequent Fusion Relevant Conformational Change[J]. *J Virol*, 2011,86(1):364-72.
- [26] Chandran K, Sullivan N J, Felbor U, et al. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection [J]. *Science*, 2005, 308 (5728): 1643-1645.
- [27] Martinez O, Johnson J, Manicassamy B, et al. Zaire Ebola virus entry into human dendritic cells is insensitive to cathepsin L inhibition [J]. *Cell Microbiol*, 2010,12(2):148-157.
- [28] Carette J E, Raaben M, Wong A C, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1[J]. *Nature*, 2011,477(7364):340-343.
- [29] Cote M, Misasi J, Ren T, et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection[J]. *Nature*, 2011,477(7364):344-348.
- [30] Chan S Y, Empig C J, Welte F J, et al. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses[J]. *Cell*, 2001,106(1):117-126.
- [31] Simmons G, Rennekamp A J, Chai N, et al. Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection[J]. *J Virol*, 2003,77(24): 13433-13438.
- [32] Takada A. Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry[J]. *Front Microbiol*, 2012,3:34.
- [33] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, et al. The natural history of Ebola virus in Africa[J]. *Microbes Infect*, 2005,7(7-8):1005-1014.

Research Progress of the Molecule Mechanisms of Ebola Virus Infection of Cells

SHI Ming, SHEN Yu-qing*

(*Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China*)

Abstract: Ebola virus can cause severe Ebola hemorrhagic fever. The mortality rate is 90 percent. Up till now, there is no effective vaccine or treatment of Ebola virus infection. Related researches on Ebola virus have become a hot topic in virology. The understanding of molecular mechanisms of Ebola virus infection of cells are important for the development of vaccine and anti-virus drugs. Therefore, this review summarized the recent research progress on the mechanisms of Ebola virus infection.

Key words: Ebola virus; Infection mechanism; Research progress

* *Corresponding author: Shen Yu-qing (1976 -), Female, Doctor, Research Area: Oncology, Tel: 15951889657, E-mail: yu_qing_shen@yahoo.com.cn*