

小 RNA 病毒致病机理的研究

张峰^{1,2}, 张瑜¹, 王树瑜¹, 张勇^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070; 2. 中农威特生物科技股份有限公司, 甘肃兰州 730046)

摘要 很多小 RNA 科病毒感染宿主细胞后可通过自身的核酸序列或病毒性蛋白产物控制靶细胞的生命活动, 而被感染细胞也会通过自身的调控机制对感染的病毒进行有限的反击, 这种现象被认为是宿主细胞对抗小 RNA 科病毒感染的防御机制。这种侵袭与抵抗的互作机制可由某些病毒蛋白对细胞产生信号干扰或细胞自身翻译合成的细胞因子对病毒的复制路径进行封堵来实现。虽然这些信号通路的上游事件是不同的, 但最后的效应却很统一, 即使细胞崩解或者细胞将自身按照一定程序与所侵入的病毒同归于尽。此外, 一些病毒蛋白具有抑制细胞程序性自杀的功能, 它们能够令感染病毒后的细胞不死亡, 形成病毒与宿主细胞共存的持续性感染状态。

关键词 小 RNA 病毒; 病毒性蛋白产物; 细胞因子; 持续性感染

中图分类号 S852.65 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)23-09541-03

Study on the Pathogenesis of Picornaviruses

ZHANG Feng et al (College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract Many RNA viruses could control the life actions of the target cells by self nucleotide sequences or viral protein products after infecting the host cells. And the infected cells could beat back limitedly on the infecting viruses by their own regulation system. The phenomenon was regarded as the defense mechanism of host cells against the infection of picornaviruses. The interaction mechanism between infection and resistance could be realized by signal interference of some viral proteins to cells or the plug of virus copy path by the cell factors that were translated and synthesized by cells. Though the upstream events of these signal pathways were different, but the final effects that made cell collapse or suicide with the infecting virus were consistent. In addition, some viral proteins could suppress the cell programmed death and inhibit the cell death after virus infection to form the persistent infection with the coexistence between viruses and host cells.

Key words Picornaviruses; Viral protein products; Cellular factor; Persistent infection

小 RNA 病毒感染自然宿主的体细胞后所导致的细胞死亡现象是由病毒蛋白或其自身核酸序列影响宿主细胞的正常生理功能导致的。从宿主细胞和小 RNA 病毒之间的防御与感染关系来看, 很多小 RNA 病毒感染可引起细胞程序性死亡, 而不是坏死。在到目前为止的研究中, 小 RNA 病毒家族的很多成员在感染宿主细胞后可诱导细胞凋亡^[1]。在研究人员研究利用何种方法来应对小 RNA 病毒家族成员对高等动物纪念性感染的过程中, 要想在小 RNA 科病毒的治疗方面取得突破性进展, 人们需对小 RNA 病毒家族各成员的病毒性产物在利用或破坏感染细胞生理活动的各种分子信号等方面进行深入研究和探讨。

小 RNA 病毒家族成员的基因组由一条正链 RNA 核酸序列构成, 这条 RNA 序列可直接被宿主细胞的翻译系统进行相关病毒性蛋白的合成, 有 4 种结构蛋白可组成病毒的蛋白衣壳。在感染的宿主细胞内, 病毒基因组可在细胞翻译系统的指导下合成一条无活性的多聚蛋白前体物。这一前体物在形成有病毒活性的多种非结构蛋白和结构蛋白前要经历多聚蛋白前体物质的多级裂解, 进而将无活性的前体蛋白转化为有活性的病毒结构蛋白和非结构蛋白。目前的研究表明, 所有 RNA 病毒均具有很强变异性, 这也是为了使 RNA 病毒自身可顺利适应宿主细胞而呈现出的遗传特性^[2-3]。值得注意的是, 小 RNA 科病毒的结构蛋白比非结构蛋白在遗传变异性性和分子致病性上的保守性差, 且很多种病毒性非结构蛋白的生物学功能具有一定程度的“通用性”^[4]。小

RNA 病毒性非结构蛋白的高度保守和通用性反映出侵袭的宿主细胞将在自然选择压力下迫使小 RNA 病毒变异性的可选择性, 这一特点可直接形成小 RNA 病毒对宿主细胞的持续性感染。通过分析小 RNA 家族的若干病毒性蛋白产物和靶细胞在受到病毒感染后产生的细胞因子的发生机理, 有助于深入理解小 RNA 科病毒感染宿主细胞的分子性致病机理和持续性感染机理。从病毒增殖的动力学角度去分析, 虽然小 RNA 科病毒增殖子代病毒的周期很短, 但以脊髓灰质炎病毒 (poliovirus) 和口蹄疫病毒 (foot - and - mouth disease virus, FMDV) 为代表, 其病毒粒子可持续存在于宿主体内^[5]。小 RNA 病毒所引起的持续性感染现象目前还没有一个系统的解释, 只有研究表明持续性感染是小 RNA 病毒在感染细胞中与细胞凋亡平衡机制和宿主免疫系统相互作用的表型反映^[6-7]。

1 小 RNA 病毒性蛋白与细胞凋亡的互作

当小 RNA 病毒感染宿主细胞后所要面临的问题就是: 如何最大程度地抵抗细胞的防御机制及逃避机体的免疫系统对入侵病毒粒子的免疫监视和清除。其中, 脊髓灰质炎病毒、脑心肌炎病毒和甲型肝炎病毒在侵袭不同靶细胞后可使肿瘤坏死因子诱导凋亡配体结合的受体表达量急剧下降^[8]。此外, 一些非结构蛋白 (如 2B、前导蛋白、3B 蛋白等) 可明显抑制山梨醇介导的细胞凋亡^[9], 这表明一部分小 RNA 病毒侵袭细胞后可产生几种协助病毒粒子逃避或压制感染细胞发生凋亡的能力。与此相反, 不同小 RNA 病毒的特异性蛋白具有启动或调控感染细胞程序性死亡的级联反应。一些报道指出一些小 RNA 病毒 (如口蹄疫病毒、脑心肌炎病毒、猪水疱病病毒等) 侵袭细胞后可直接诱导细胞发生细胞凋亡^[10-11]。

基金项目 甘肃省生物技术专项。

作者简介 张峰 (1982 -), 男, 吉林辉南人, 硕士研究生, 研究方向: 动物医学。* 通讯作者, 教授, 从事动物生殖生理研究, E-mail: zhangyong@gsau.edu.cn。

收稿日期 2013-06-30

2 小 RNA 病毒蛋白对细胞生理活性的影响

小 RNA 病毒家族成员在各自基因组的 5' 端编码序列上翻译的第一个蛋白质是一种非结构蛋白,但由于不同病毒成员所合成的这种称为前导肽的蛋白的长度差异较大,所以其中一些前导肽已具有了蛋白水解酶的生物活性。例如,猪水疱病毒和口蹄疫病毒的前导肽就是一种水解蛋白酶,它依赖组氨酸-半胱氨酸催化活性集团来裂解宿主细胞内的真核翻译起始因子,从而在翻译层面上阻遏与真核细胞生理活动有关的蛋白分子信息的产生。

由于病毒通过自身前导蛋白酶的水解酶活性来控制宿主细胞自身蛋白质的翻译系统,使翻译系统为病毒的复制和翻译提供生产场所和材料^[12],虽然,郝峰强等在观察前导蛋白对牛肾细胞的致病作用过程中发现了细胞凋亡的现象^[13],但有国外学者指出前导蛋白不能引起细胞凋亡。这种令人费解的生物学现象可被解释为:FMDV 感染宿主细胞,通过前导蛋白阻遏了细胞凋亡的发生,致使病毒子代粒子的大量产生,病毒持续性感染机理就是在子代病毒粒子与感染细胞共存时是以抑制宿主细胞凋亡为主,而当病毒在感染细胞中所处的生理环境不利于其复制的时候,则以引发程序性细胞死亡来避免自身被宿主免疫细胞所清除。脑心肌炎病毒所具有的前导肽可在宿主细胞受到病毒侵染后诱发细胞凋亡的过程中起决定性作用;泰勒病毒的前导蛋白能阻断细胞质与细胞核之间的相连通道核空而导致之间的物质运输受阻,从而使凋亡效应蛋白因子无法准确定位于细胞质的特定区域中,从而干扰细胞凋亡的发生。

小 RNA 病毒成员的病毒自身结构蛋白通过有序的 32 面体组装方式将病毒核酸包裹在非糖基化的病毒衣壳中。另外,小 RNA 病毒家族成员的结构蛋白可与整合素受体结合从而激发受体途径或线粒体途径的细胞凋亡。例如,口蹄疫病毒的可溶性 VP1 蛋白或其灭活的病毒粒子可代表几种癌细胞或 BHK 细胞的磷酸化细胞凋亡信号,使苏氨酸或丝氨酸激酶与细胞膜的脂类物质结合,从而激发肌醇类激酶活性来诱导细胞程序性死亡^[14]。泰勒病毒可直接通过活化肿瘤坏死因子受体来诱导细胞程序化死亡,虽然利用特异性抗体来封阻泰勒病毒的结构蛋白也可有效抑制细胞凋亡^[15]。在针对柯萨奇病毒致细胞凋亡的研究中发现,结构蛋白 V2 可与 E2F 转录因子和 P53 激活的凋亡蛋白激酶作用而开启细胞程序性死亡^[16]。

小 RNA 病毒的 2A 多肽序列对于不同病毒有着不同的生物学活性。例如,肠道病毒 EV71 和脊髓灰质炎病毒的 2A 多肽是一种蛋白水解酶,而口蹄疫病毒的 2A 短肽只是一条由 18 个氨基酸构成的具有自动断裂的分子开关。脊髓灰质炎病毒的 2A 蛋白酶能裂解翻译起始因子,但其对翻译起始因子的裂解位点与细胞凋亡效应分子胱冬酶-3 对翻译起始因子的裂解位点是不同的^[17],但可导致癌细胞产生染色质浓缩和基因组 DNA 片段化等细胞程序性死亡的生理特点^[18]。同样地,尼诺病毒、手足口病毒和脑心肌炎病毒的 2A 蛋白酶也能导致 DNA 片段化这一细胞凋亡的生理现

象^[19-20],且细胞凋亡效应分子抑制剂可抑制尼诺病毒 2A 蛋白的酶学活性^[21]。

小 RNA 病毒所翻译合成的 2B 非结构蛋白可协助小 RNA 类型的病毒以囊泡的形式从宿主细胞中转运释放,但其转运机制还有待于深入研究。脊髓灰质炎病毒和科萨奇病毒的 2B 蛋白具有较强的自我结合成二聚体的能力,这种 2B 的多聚体可在细胞膜上形成通道进而使子代粒子从细胞内转运至细胞外,同时这种 2B 聚合体影响了有膜细胞器的通透性,从而影响了有膜细胞器膜电位的改变^[21-22]。科萨奇病毒 2B 蛋白可通过改变细胞器膜通透性来改变有膜细胞器(内质网、高尔基体、线粒体)之间的 Ca^{2+} 信号。此种病毒 2B 蛋白可通过调节感染细胞胞器或细胞质内的 Ca^{2+} 浓度来阻遏细胞凋亡通路^[23]。

2C 蛋白序列的分子进化速率很低且承担着多种生物学功能,这些功能与小 RNA 病毒在病毒侵染细胞和自身复制过程中所遇到的自然选择压力相关。例如,口蹄疫病毒和脊髓灰质炎病毒 2C 蛋白散落在细胞质中有助于负链 RNA 的形成^[24],说明 2C 蛋白散落在细胞质中可有效阻遏细胞凋亡信号同路的顺利形成。此外,利用计算机模拟技术发现口蹄疫病毒 2C 的 N 端处存在 CTL 抗原表位,能诱导 II 型干扰素大量表达,从而促进 CTL 细胞成熟,启动细胞凋亡程序识别并摧毁感染细胞^[25-26]。

很多小 RNA 病毒编码的 3A 蛋白的毒性不是随着病毒在宿主细胞内复制的增多而增强,而是少量的 3A 蛋白就能阻止宿主细胞内质网上细胞自身合成蛋白向高尔基体运输,从而阻止多种与机体免疫有关的细胞因子(IL-6、 β -干扰素、IL-8 等)的正常分泌,并阻止 TNF 受体和 MHC I 类受体在细胞中的表达。此外,3A 蛋白可提高膜通透性,使胞内 Ca^{2+} 外泄,这在一定程度上抑制了通过膜点位变化而产生的内源性细胞凋亡事件的发生^[28]。

3C 糜蛋白酶担负着小 RNA 病毒基因编码出的多聚蛋白的多级裂解任务,并指导裂解的结构蛋白组装成病毒衣壳。由于 3C 蛋白酶具有酶切位点较广泛的特点,使得 3C 蛋白酶裂解感染细胞中染色体的组蛋白 H3 可开启潜在的凋亡信号通路。脊髓灰质炎病毒的 3C 蛋白酶可激活细胞凋亡的效应分子胱冬酶-3,并以 DNA 片段化的方式激发细胞程序性死亡^[29],这种分子致病机制可能与 3C 蛋白指导 TATA 结合蛋白的裂解而影响细胞正常生理活性周期有关;手足口病毒 3C 蛋白具有的诱导细胞凋亡的机制与 Poliovirus 3C 蛋白类似。此外,与尼诺病毒和艾柯病毒相似,脊髓灰质炎病毒 3C 蛋白酶也能破坏细胞因子(NF- κ B),从而干扰以 NF- κ B 因子介导的机体免疫监视系统的非特异性免疫反应,并且具有裂解 p53 蛋白因子(在 DNA 损伤的情况下诱导细胞凋亡的关键因子)的活性^[30]。

小 RNA 病毒的 3D 蛋白酶被认为是一种保真性低的 RNA 依赖性聚合酶。低保真性的 RNA 依赖性聚合酶为小 RNA 病毒基因组分子进化提供了动力,即 3D 蛋白酶在合成负链 RNA 时,小 RNA 病毒基因组多个区段突变的“痕迹”留

于病毒基因组 RNA 中^[31]。

3 研究小 RNA 病毒蛋白致病性的意义

RNA 病毒在整个病毒家族中占有重要地位,对人类和动物健康造成了严重的威胁。各种 RNA 病毒疫苗研发一直被科学工作者列为优先研究方向,并已取得了令人鼓舞的成果,但至今仍有一些重要的 RNA 病毒疫苗未研制成功。RNA 病毒不仅严重危害人类健康,而且给畜牧业带来了不可估量的损失。RNA 病毒的分子致病机理及其基因组翻译调控的研究是国际上生物学和医学领域研究的热点。阐明 RNA 病毒翻译机制有助于实现病毒抗原基因在真核细胞内高效表达,从而使有效的 RNA 病毒疫苗的研制成为可能。小 RNA 病毒所翻译合成的多种病毒蛋白在抑制或介导感染细胞发生程序性死亡的过程中发挥着重要作用。病毒感染诱导的细胞凋亡作用可能是机体对病毒侵染的防御机制,也可能是病毒感染导致宿主细胞严重损伤的重要机制。但小 RNA 病毒基因组不同区段的分子进化和感染宿主细胞的共进化过程对小 RNA 病毒所翻译合成的病毒蛋白功能的选择压力是带病毒分子致病性的重要因素。这就使得小 RNA 病毒家族成员中的一些病毒同时具有阻遏和激发感染宿主细胞产生细胞程序性死亡的病毒性蛋白,也就是说病毒蛋白依靠自身的生物学活性来干扰感染细胞产生细胞凋亡的各种信号通路,或者病毒蛋白可诱导感染细胞的程序性死亡。值得注意的是,小 RNA 病毒由于其基因组中含核糖体内部进入位点这一特殊的顺势作用元件而使得小 RNA 病毒基因组即使是在细胞受到外部刺激而产生程序性死亡事件的过程中,其利用核糖体内部进入位点可摆脱宿主细胞自身的翻译起始机制的约束而继续合成病毒蛋白,从而产生大量自带病毒粒子进而侵染更多的宿主细胞。对于细胞凋亡和病毒侵染来说,两者相互依存相互制约,从而实现小 RNA 病毒逃避宿主细胞免疫系统的监视和形成持续性感染这一病毒与宿主细胞共生的生物学现象,以确保小 RNA 病毒在靶细胞内的大量增殖。总之,针对小 RNA 病毒多种病毒蛋白生物学特性及其在感染细胞中所发挥的分子致病作用中所起作用的研究是解释病毒感染宿主细胞形成持续性感染与细胞程序性死亡通路的重要研究方向,这将有助于进一步认识小 RNA 病毒感染性的发生、发展及转归机制,为病毒病的防治提供一些新的思路。

参考文献

- CECCALDI P E, LUCAS M, DESPRES R. New insights on the neuropathology of West Nile virus[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 233: 1-6.
- ZHOU J H. Analysis of synonymous codon usage in foot-and-mouth disease virus[J]. *Vet Res Commun*, 2010, 34: 393-404.
- ZHOU J H, GAO Z L, ZHANG J, et al. The analysis of codon bias of foot-and-mouth disease virus and the adaptation of this virus to the hosts[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 14: 105-110.
- ZHOU J H, ZHANG J, CHEN H T, et al. The codon usage model of the context flanking each cleavage site in the polyprotein of foot-and-mouth disease virus[J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(7): 1815-1819.
- LIU Y S. The characteristic of the synonymous codon usage in enterovirus 71 virus and the effects of host on the virus in codon usage patterns[J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11: 1168-1173.
- O' BRIEN V. Viruses and apoptosis[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 1833-1845.
- ROULSTON A, MARCELLUS R C, BRANTON P E. Viruses and apoptosis[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 577-628.
- NEZANOV N, AXEL U. Unstable receptor disappears from the cell surface during poliovirus infection[J]. *Med Sci*, 2004, 8: 391-396.
- KOYAMA A H, IRIE H, UENO F, et al. Suppression of apoptotic and necrotic cell death by poliovirus[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2965-2972.
- BOK-KYUNG, SOON-BOK, OUN-KYEONG. Role of Apoptosis in the Pathogenesis of Asian and South American Foot-and-Mouth Disease Viruses in Swine[J]. *Pathology*, 2005, 67: 1081-1088.
- LYUDMILA I R, GEORGE A B, PETER V L, et al. Variability in apoptotic response to poliovirus infection[J]. *Virology*, 2005, 331: 292-306.
- GRADI A, FOEGER N, STRONG R, et al. Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro[J]. *J Virol*, 2004, 78: 3271-3278.
- 郝峰强, 从国政, 高闪电, 等. 口蹄疫病毒前导蛋白致牛肾细胞作用的形态学观察[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 387-392.
- JEI M P, SHU M L, CHI M L. VP1 of Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Apoptosis via the Akt Signaling Pathway[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 52168-52174.
- RUBIO N. High-neurovirulence GDVII virus induces apoptosis in murine astrocytes through tumor necrosis factor (TNF)-receptor and TNF-related apoptosis-inducing ligand[J]. *Virology*, 2003, 311: 366-375.
- MARTIN U, NESTLER M, MUNDER T, et al. Characterization of coxsackievirus B3-caused apoptosis under in vitro conditions[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2004, 193: 133-139.
- ROBERTS L O, BOXALL A J, LEWIS L J. Caspases are not involved in the cleavage of translation initiation factor eIF4GI during picornavirus infection[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1703-1707.
- ANGEL B, ELENA F, LUIS C. A stable HeLa cell line that inducibly expresses poliovirus 2A^{PRO}; effects on cellular and viral gene expression[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74: 2383-2392.
- KUO R L, KUNG S H, HSU Y Y, et al. Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1367-1376.
- SEIPELT J, LIEBIG H D, SOMMERGRUBER W, et al. 2A proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 20084-20089.
- DESZCZ L, CENCIC R, SOUSA C, et al. Antiviral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase[J]. *FEBS Lett*, 2004, 560: 51-55.
- AGIRRE A, BARCO A, CARRASCO L, et al. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 40434-40441.
- CAMPANELLA M, DE-JONG A S, LANKE K W H, et al. The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18440-18450.
- MERCEDES G B, MARIA F R, MONICA G M, et al. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells[J]. *Virology*, 2006, 349: 409-421.
- ANNETTE M B, FERNANDO R, DOMINIC T, et al. DNA immunization with 2C FMDV non-structural protein reveals the presence of an immunodominant CD8⁺, CTL epitope for Balb/c mice[J]. *Anti viral Research*, 2006, 72: 178-189.
- LIU J, WEI T, AND KWANG J. Avian encephalomyelitis virus nonstructural protein 2C induces apoptosis by activating cytochrome c/caspase-9 pathway[J]. *Virology*, 2004, 318: 169-182.
- CHOE S S, DODD D A, KIRKEGAARD K, et al. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins[J]. *Virology*, 2005, 337: 18-29.
- PACHECO J M, HENRY T M, O'DONNELL V K, et al. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus[J]. *J Virol*, 2003, 77: 13017-13027.
- BARCO A, FEDUCHI E, CARRASCO L. poliovirus protease 3Cpro kill cells by apoptosis[J]. *Virology*, 2000, 266: 352-360.
- NEZANOV N. Proteolytic cleavage of the p65-RelA subunit of NF-κB during poliovirus infection[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 24153-24158.
- DOMINGO E. Viruses at the edge of adaptation[J]. *Virology*, 2000, 270: 251-253.