

- 13 Liu J, Ye F, Chen H, *et al.* Expression of differentiation associated protein Hes1 and Hes5 in cervical squamous carcinoma and its precursors [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2007, 17(6): 1293 – 1299
- 14 Liu J, Lu WG, Ye F, *et al.* Hes1/Hes5 Gene Inhibits Differentiation via Down – Regulating Hash1 and Promotes Proliferation in Cervical Carcinoma Cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(7): 1109 – 1116
- 15 Liu W, Xing F, Iizumi – Gairani M, *et al.* N – myc downstream regulated gene 1 modulates Wnt – β – catenin signalling and pleiotropically suppresses metastasis [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(2): 93 – 108
- 16 马少飞, 陈嘉薇, 祝峰. NDRG1 基因与宫颈鳞癌发生发展及转移的关系[J]. *肿瘤*, 2008, 28(3): 238 – 241
- 17 Song JY, Lee JK, Lee NW, *et al.* Microarray analysis of normal cervix, carcinoma in situ, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18(5): 1051 – 1059
- 18 Nishio S, Ushijima K, Tsuda N, *et al.* Cap43/NDRG1/Drg – 1 is a molecular target for angiogenesis and a prognostic indicator in cervical adenocarcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2008, 264(1): 36 – 43
- 19 王静, 蔡晶, 李智敏, 等. NDRG1 在宫颈癌中的表达及其生物学特性和调节机制的研究 [J]. *华中科技大学学报 · 医学版*, 2010, 30(6): 771 – 776
- 20 Zhao G, Chen J, Deng Y, *et al.* Identification of NDRG1 – regulated genes associated with invasive potential in cervical and ovarian cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(1): 154 – 159
(收稿日期:2013 – 05 – 06)
(修回日期:2013 – 06 – 25)

HCV 入侵机制及其对机体免疫系统的影响

王 萍 董艳迎 韩玲娜 李晓丽 刘小静

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是引起肝脏疾病的一个重要病因。HCV 感染面广,呈全世界分布,根据 WHO 统计目前在世界范围内有 1.5 亿人感染 HCV,并且发展中国家高于发达国家,其中我国的慢性感染率约占总人口的 3.2%。HCV 感染机体后,即可表现为急性肝炎,也可表现为慢性携带状态或者慢性活动性肝炎,甚至重型肝炎。HCV 感染极易慢性化并可发展为肝硬化,与原发性肝细胞癌有密切关系。只有 15% ~ 20% 的新感染个体能成功的清除病毒,其余均发展成慢性感染患者^[1]。HCV 能在机体中持续存在归结于它能有效的逃避机体免疫系统的监视。目前研究认为,丙型肝炎患者影响疾病进程与治疗的因素较多,尚缺乏特效药物和预防疫苗。因此进一步了解 HCV 是如何入侵进入宿主细胞以及 HCV 是如何影响机体获得性免疫系统,能有利于发展新的抗 HCV 病毒治疗方案。

一、HCV 入侵进入宿主细胞

目前的研究认为病毒要进入宿主细胞需要具备以下几个条件:(1)细胞表达 CD81:CD81 是 1 个膜蛋白,包含 4 个跨膜区和 2 个细胞外环状结构。CD81 能在多种细胞如肝细胞和 B 淋巴细胞膜表面

表达,其作用主要参与免疫系统和神经系统中不同细胞间的相互作用,以及参与细胞间的融合。研究发现 HCV 的胞膜蛋白 E2 能结合 CD81,具体结合部位是 CD81 的细胞外环状结构。使用重组 CD81 分子或者使用 CD81 的抗体能明显阻止 HCV 进入宿主细胞, HCV 对敲出 CD81 的肝细胞感染也不敏感^[2]。对于 E2 蛋白来说,其 W420, Y527, W529, G530 和 D535 等保守序列是重要的 CD81 结合位点,如果这些位点发生突变,将影响病毒进入宿主细胞^[3]。研究还发现利用分泌型 E2 蛋白的细胞外功能区域,能结合 CD81 分子,能阻止 HCV 进入细胞内,另外还能使 HCV 慢性感染患者产生识别 HCV 的抗体^[4]。这些研究充分说明了 CD81 对于 HCV 进入宿主细胞来说是必要的。(2)清道夫受体 B1 (scavenger receptor class B type 1, SR – B1):SR – BI 是高密度脂蛋白(HDL)的主要受体,能介导 HDL – 胆固醇的吸收。目前的研究认为 SR – BI 是介导 HCV 进入细胞的一个重要因素,它能够与 E2 糖蛋白结合从而辅助 CD81 介导 HCV 进入宿主细胞^[5]。Murao 等^[6]研究发现,当使用 IFN – α 时,能通过活化 STAT1/STAT2 途径,从而抑制肝细胞表达 SR – B1,抑制 HCV 进入宿主细胞,这就说明 SR – B1 的表达与 HCV 进入细胞有关,IFN – α 可以通过抑制 SR – B1 的表达而起到抗病毒的作用。(3)CLDN1 和 occludin:对于 HCV 进入宿主细胞

作者单位:712061 西安交通大学(王萍、董艳迎、韩玲娜、李晓丽、刘小静);712046 咸阳,陕西中医学院(王萍)

通讯作者:刘小静,电子信箱:xiaojing406@163.com

来说,仅表达 SR-B1 和 CD81 并不能使 HCV 进入细胞,还需要 CLDN1 (claudin1) 和 occludin 的存在^[7]。CLDN1 是紧密连接蛋白的重要组成部分,具有 4 个跨膜区域,其 N 端和 C 端均在细胞内,高表达于肝细胞膜表面。CLDN 蛋白的胞外环状结构 (extracellular loop, EL1) 是 HCV 进入宿主细胞重要结构,使用 CLDN 的 EL1 的特异性抗体能降低 HCV 的感染率,这些研究说明对于 HCV 进入宿主细胞,CLDN1 也是一个关键性的因素^[8]。除了 CLDN1 以外,OCN (human occludin) 也是一个重要的影响 HCV 感染的因素。研究发现在非感染细胞表面过量表达 OCN 能增加 HCVpp 的感染率^[9]。(4) 其他因子: NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) 胆固醇吸收受体,是人体对胆固醇吸收和运输的重要分子,近年来发现它同时与 HCV 感染密切相关,是 HCV 入侵宿主细胞的关键因子^[10]。EGFR 和 EPHA2 同属于受体酪氨酸激酶 (PKT),他们通过调节宿主细胞的一些关键功能,从而影响 HCV 对细胞的入侵作用。PKT 能辅助性调节 CD81-claudin1 受体和 HCV 病毒性糖蛋白融合,因此 PKT 可能是 HCV 治疗和预防的新靶点^[11]。

二、HCV 对机体获得性免疫系统的影响

HCV 易引起慢性感染,HCV 入侵进入宿主细胞后,能限制宿主产生有效的保护性免疫反应,影响机体的获得性免疫系统,从而达到逃避机体免疫系统监视的作用。虽然对于 HCV 如何逃避机体的获得性免疫系统监视的具体机制还不是非常清楚,但是目前的研究认为主要是由于机体免疫应答出现缺陷以及一些免疫细胞,如抗原递呈细胞、T 细胞和 B 细胞等功能受到影响所导致的。

1. 影响树突状细胞 (dendritic cells, DC): 抗原递呈细胞 (antigen-presenting cells, APC) 如树突状细胞在病毒感染初期具有重要作用,DC 是具有最递呈抗原功能的专职 APC,其在体内的数量较少。DC 作为专职 APC 具有以下的特点:①能有效活化未致敏 T 细胞;②能高水平表达 MHC II;③可表达参与抗原摄取和转运的特殊膜受体;④能有效摄取和处理抗原,然后前迁移至 T 细胞区;⑤抗原递呈效率高,少量抗原和少量 DC 即足以激活 T 细胞。DC 是机体适应性免疫应答的主要启动者,在适应性免疫应答的诱导中起关键作用。因此在抗原递呈细胞与 T 细胞接触时的任何环节出现问题,就不能有效的激活 T 细胞,严重影响宿主清除病毒的能力,从而更容易造成持续性感染。

很多实验发现 HCV 能影响 DC 的功能,从而在早期就抑制机体产生获得性免疫反应。Della 等通过分析 HCV 慢性感染患者和正常人外周血 DC、CD4⁺T 细胞和调节性细胞因子,发现当有 HCV 病毒多肽存在时,树突状细胞数目减少,IL-12 分泌减少,而 IL-10 分泌增加,导致 HCV 特异性 CD4⁺T 细胞活化程度降低,说明 HCV 能影响 DC,使其不能有效的活化抗原特异性免疫应答反应,发挥 T 细胞的抗病毒效应。这种缺陷是由于树突状细胞所分泌的细胞因子发生改变所导致的^[12]。细胞因子能影响免疫系统的成熟和分化,在获得性免疫应答过程中具有极其重要的作用,在获得性免疫应答过程中,T 细胞的活化依赖于 DC 发挥正常的生理功能。当发生 HCV 感染时,由于树突状细胞的缺陷,能引起的调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 活化不足。有研究利用流式细胞仪技术分析 HCV 慢性感染患者骨髓 DC 和各种 T 细胞的数量,以及利用 ELISA 技术分析细胞因子的含量,发现 DC 不能有效的活化 CD4⁺T 细胞,但是却能刺激调节性 T 细胞增殖。调节性 T 细胞的具有负调节作用,能抑制 HCV 特异性 T 细胞活化,从而使机体不能有效清除 HCV^[13]。这些研究均说明 HCV 能通过影响 DC 的功能,而逃避机体的免疫监视和免疫清除。但是目前对于 HCV 引起 DC 功能发生改变的具体机制并不特别的清楚,还期待进一步的研究与发现。

2. 影响体液免疫反应:体液免疫系统是指 B 细胞遭遇特异性抗原,发生活化、增殖,并分化成浆细胞,通过产生、分泌抗体而清除病原体的过程。体液免疫反应是获得性免疫系统的另外一个重要方面。很多研究发现 HCV 能够抑制 B 细胞介导的体液免疫反应。当机体感染 HCV 时,机体的体液免疫反应与其他病毒性疾病并不相同。当机体感染其他病毒性疾病时,机体能产生有效的抗体,这些抗体能通过中和病毒从而达到清除病毒的作用;而在 HCV 感染时,抗体并不能有效的清除病毒。其具体原因是机体产生的抗体并不能有效的与 HCV 的胞膜蛋白 (E1、E2) 尤其是 E2 蛋白相结合。HCV 的 E1 和 E2 蛋白是中和抗体的靶向目标。在编码 E2 的基因序列中发现了 2 个高变区 (HVR),而 N 端的 HVR 是病毒结合和入侵宿主细胞的重要结构区域。但是由于 HVR 很容易发生突变,而机体产生的抗体只能针对某一种突变的表型,而对于其他的表型,并不能与这种抗体相结合。正由于 HVR 容易发生突变,从而影响机体产生

的对抗病毒的中和抗体及保护性抗体^[14]。另外, HCV 的胞膜蛋白能被高度糖基化, E1 和 E2 蛋白有 5 ~ 11 个糖基化位点。胞膜蛋白的有些糖基化位点发生糖基化在蛋白折叠以及 HCV 入侵宿主细胞中发挥重要作用^[15]。E2 蛋白的糖基化位点与 CD81 的结合位点靠近, 当其发生糖基化后, 能调节 CD81 分子的表达, 并且使中和抗体不能有效的与 E2 蛋白结合, 从而使 HCV 更易于进入宿主细胞, 逃避机体的免疫清除^[16]。虽然机体存还存在有针对 HCV 其他蛋白的特异性抗体, 如抗核心蛋白抗体, 抗非结构蛋白抗体, 但是这些抗体能不能有效的中和病毒, 并不能起到保护作用。

3. 影响 T 细胞功能: T 淋巴细胞来源于骨髓的淋巴样干细胞, 在胸腺发育成熟为 T 细胞, 随后移行至外周淋巴组织。T 淋巴细胞执行特异性细胞免疫应答, 并在体液免疫应答中发挥一定作用。CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞在控制病毒感染方面具有重要的作用。有研究利用黑猩猩模型发现在 HCV 感染的早期, HCV 的复制速度就超过了肝脏中 T 细胞的活化和反应速度^[17]。辅助性 T 细胞 (help T lymphocyte, Th) 是机体获得性免疫反应的主要组成部分。研究发现, 当出现 CD4⁺ T 细胞缺乏后, 会造成效应性 T 细胞 (effector T cell) 活化不足, 从而导致持续性病毒血症的产生。另外, T 细胞介导的抑制病毒复制能力的降低, 会使 MHC I 类分子突变率增加, 从而更容易发生病毒的免疫逃逸现象^[18]。显然, 活化的、具有正常生理功能的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞的存在对于机体控制急性和慢性 HCV 感染极为重要。

CD4⁺ T 细胞又分为 2 个亚群, Th1 和 Th2 型。这两型 T 细胞的生物功能并不相同。Th1 细胞能被 Th1 相关的细胞因子 (IL-2, IL-12 和 IFN) 活化, 主要参与杀伤性 T 细胞的增殖和活化, 而 Th2 细胞能被 Th2 相关的细胞因子 (IL-4, IL-6 和 IL-10) 激活, 主要与 B 细胞增殖、成熟和促进抗体生成有关, 可增强抗体介导的体液免疫应答。CD4⁺ T 细胞的分化程度能严重影响 HCV 感染的临床过程。HCV 在机体内能持续存在与 Th1 和 Th2 细胞的比例有很大关系。研究发现在 HCV 感染时, 树突状细胞的 gC1q 受体能与 HCV 的核心蛋白结合, 导致 IL-12 的分泌减少, 而 IL-12 对于 Th1 细胞的分化来说相当重要。当树突状细胞 IL-12 分泌减少时, 促使 CD4⁺ T 细胞分化成 Th2 细胞, 而不能分化成 Th1 细胞。通过这种机制, HCV 能间接的影响 CD4⁺ T 细胞的功能^[19]。另外

HCV 的 NS3 蛋白也能影响 CD4⁺ T 细胞的分化。NS3 蛋白是 HCV 的非结构蛋白 3, 具有 3 个活化中心, N 端有丝氨酸蛋白酶活性中心, C 端有 ATP 依赖的 RNA 解旋酶活性中心, NS3 蛋白对于 HCV 的感染和复制具有相当重要的作用。NS3 蛋白的有些表位能使 IL-2 的分泌增加, 促使 CD4⁺ T 细胞分化成 Th1 细胞, 产生 Th1 相关的免疫应答反应。由于病毒发生突变, 病毒 NS3 蛋白的氨基酸序列发生替换, 表位发生变化, 造成 CD4⁺ T 细胞反应减弱或者消失, 从而不能产生有效的细胞免疫反应^[20]。当病毒多肽序列发生突变能影响到 MHC-多肽复合物与 T 细胞受体之间的相互作用时, MHC-多肽复合物与 CD4⁺ T 细胞结合后, 能改变 T 细胞分泌的细胞因子, 促使 T 细胞分化成 Th2 细胞, 而不能分化成 Th1 细胞^[21]。因此, 这些研究均能说明 HCV 能通过影响 Th1 和 Th2 细胞的分化, 从而达到逃避机体免疫反应的效果, 使其能在机体中持续存在。

CD4⁺ T 细胞的主要功能是促进免疫反应, 而 CD8⁺ T 细胞则是最重要的介导直接和间接抗原特异性免疫效应细胞。HCV 感染能通过影响 CD8⁺ T 细胞的成熟或者改变 CD8⁺ T 细胞的功能, 达到破坏 CD8⁺ T 细胞免疫应答的效果。研究发现 HCV 感染者肝脏和外周血液中 HCV 特异性 CD8⁺ T 细胞出现各式各样的不足。这些不足包括细胞成熟表位被改变, 导致 CD8⁺ T 细胞不能成熟和增殖; 特异性杀伤细胞的能力降低。IFN- γ 和肿瘤坏死因子分泌减少; 穿孔素和颗粒酶 A 的产生减少, 以及 Fas 表达水平降低^[22]。总之, 这些改变均能使 T 细胞不能有效的启动细胞内部的一些反应从而不能有效清除病毒和被感染的细胞。HCV 逃避 CD8⁺ T 细胞免疫应答的另外一种机制就是基因突变。其具体机制包括: T 细胞识别 HCV 表位的能力降低, 影响 MHC 分子与病毒多肽结合形成复合物, 影响病毒抗原的递呈^[23]。病毒过多的突变使这些 HCV 特异性 CD8⁺ T 细胞不能有效的产生抗病毒作用。

三、展 望

HCV 具有一系列的存活机制去逃避机体获得性免疫系统的免疫监视。这些机制包括 HCV 可改变抗原表位, 使病毒不能被 T 细胞和中和抗体识别, 逃脱变异是 HCV 最有力的免疫逃避策略之一。能干扰宿主细胞的细胞成分和信号通路, 影响宿主细胞抗病毒因子的产生, 另外 HCV 还能够破坏机体的细胞和体液免疫反应, 从而最终达到免疫逃逸的目的。

虽然目前有越来越多的研究去发现 HCV 逃避机体免疫监视和清除的分子机制,但是引起 HCV 持续感染的具体机制还有待于进一步研究,最主要的难点在于缺乏合适的动物模型。进一步研究 HCV 的免疫逃逸的分子机制,对于 HCV 感染的治疗和新疫苗的研发具有很重要的作用。

参考文献

- Shepard CW, Finelli L, Alter MJ, *et al.* Global epidemiology of hepatitis C virus infection[J]. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(9):558-567
- Akazawa D, Date T, Morikawa K, *et al.* CD81 expression is important for the permissiveness of huh7 cell clones for heterogeneous hepatitis C virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(10):5036-5045
- Owsianka AM, Timms JM, Tarr AW, *et al.* Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(17):8695-8704
- Jillian W, Guaniri M, Hannah S, *et al.* Blocking hepatitis C virus infection with a recombinant form of envelope 2 ectodomain[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(21):11078-11089
- Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, *et al.* A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo[J]. *Hepatology*, 2012, 55(2):364-372
- Murao K, Imachi H, Yu X, *et al.* Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class Bi, a possible HCV receptor in hepatocytes[J]. *Gut*, 2008, 57(5):664-671
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry[J]. *Nature*, 2007, 446(7137):801-805
- Fofana I, Krieger SE, Grunert F, *et al.* Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139:953-964
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells[J]. *Nature*, 2009, 457(7231):882-886
- Sainz Jr, Barretto N, Martin DN, *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor[J]. *Nature Medicine*, 2012, 18(2):281-285
- Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(5):589-595
- Della B, Silvia, Crosignani, *et al.* Decrease and dysfunction of dendritic cells correlate with impaired hepatitis C virus? Specific CD4⁺ T-cell proliferation in patients with hepatitis C virus infection[J]. *Immunology*, 2007, 121(2):283-292
- Dolganiuc A, Paek E, Kodys K, *et al.* Myeloid dendritic cells of patients with chronic HCV infection induce proliferation of regulatory T lymphocytes[J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(2):2119-2127
- Zeisel MB, Cosset FL, Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology*, 2008, 48(1):299-307
- Vieyres G, Thomas X, Descamps V, *et al.* Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(19):10159-10168
- Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, *et al.* Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(22):12048-12057
- Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, *et al.* Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24):15661-15668
- Spaan M, Janssen HL, Boonstra A, *et al.* Immunology of hepatitis C virus infections[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2012, 26(4):391-400
- Waggoner SN, Hall CH, Hahn YS, *et al.* HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits TH1 differentiation of CD4⁺ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production[J]. *Leukoc Biol*, 2007, 82(6):1407-1419
- Petrovic D, Dempsey E, Doherty DG, *et al.* Hepatitis C virus - T-cell responses and viral escape mutations[J]. *European Journal of Immunology*, 2012, 42(1):17-26
- Wang JH. Modulation of the peripheral T-cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus transition from a TH1 to a TH2 response. *Hum Immunol*, 2003, 64(7):662-673
- Penna A, Pilli M, Zerbin A, *et al.* Dysfunction and functional restoration of HCV? Specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology*, 2007, 45(3):588-601
- Petrovic D, Dempsey E, Doherty DG, *et al.* Hepatitis C virus - T-cell responses and viral escape mutations[J]. *European Journal of Immunology*, 2012, 42(1):17-26

(收稿日期:2013-05-27)

(修回日期:2013-07-02)