

之一。虽然可能存在组织特异性,但表观遗传调节的研究仍为疾病治疗提供了潜在的新靶点。

#### 参考文献

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14
- Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16(1): 94-112
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *N Engl J Med*, 1993, 329(14): 977-986
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(25): 2643-2653
- Holman RR, Paul SK, Bethel MA, *et al.* 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2008, 359(15): 1577-1589
- Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, *et al.* Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial[J]. *Lancet*, 2010, 376(9739): 419-430
- Patel A, Macmahon S, Chalmers J, *et al.* Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(24): 2560-2572
- Duckworth WC, McCarren M, Abraira C. Glucose control and cardiovascular complications: the VA diabetes trial[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(5): 942-945
- Bird A. Perceptions of epigenetics[J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 396-398
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases[J]. *Annual*

*Review of Biochemistry*, 2001, 70: 81-120

- Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2011, 60(4): 1304-1311
- Zheng Z, Chen HB, Li J, *et al.* Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin[J]. *Diabetes*, 2012, 61(1): 217-228
- Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews*[J]. *Molecular Cell Biology*, 2005, 6(11): 838-849
- Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, *et al.* Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(26): 9047-9052
- El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, *et al.* Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(10): 2409-2417
- Olsen AS, Sarra MP Jr, Leontovich A, *et al.* Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression[J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 485-491
- Tewari S, Zhong Q, Santos JM, *et al.* Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(8): 4881-4888
- Long J, Wang Y, Wang W, *et al.* MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(13): 11837-11848

(收稿日期: 2013-07-19)

(修回日期: 2013-07-29)

## 汉坦病毒糖蛋白及其在细胞融合中作用的研究进展

盛 欣 兰英华 李用国

汉坦病毒(Hantavirus, HV)属于布尼亚病毒科分节段负链RNA病毒,基因组根据大小将其分为L、M、S。分别编码病毒RNA依赖的RNA多聚酶、两种包膜糖蛋白Gn、Gc和一个非结构蛋白以及病毒的核衣壳蛋白。目前国内外至少有30个血清型/基因型,代表型别有汉滩病毒(Hantann virus, HTNV)、汉城病毒(Seoul virus, SEOV)、辛诺柏病毒(Sin Nombre virus,

SNV)、普马拉病毒(Puumala virus, PUUV)、希望山病毒(Prospect Hill virus, PHV)、多布拉伐-贝尔格莱德病毒(Dobrava-Belgrade virus, DOBV)、泰山病毒(Thailand virus, THAIV)等<sup>[1,2]</sup>。其中引起汉坦病毒肺综合征(Hantavirus pulmonary syndrome, HPS)的病原体主要为(SNV),因为常常并发心力衰竭,故北美等国家现又将此病称为汉坦病毒心肺综合征(Hantavirus cardiopulmonary syndrome, HCPS)<sup>[3]</sup>。在我国引起肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syn-

drome, HFRS) 的主要病原体为 HTNV 和 SEOV。

HV 呈圆形或椭圆形, 表面有脂质双层包膜, 包膜表面可见 Gn 和 Gc 糖蛋白构成的突起。由于汉坦病毒的糖蛋白是重要的结构蛋白, 即组成成熟病毒颗粒的结构蛋白, 其具有融合肽位点介导与细胞的融合过程、病毒毒力位点、中和抗原决定簇和各型的特异性抗原位点等。由于病毒进入细胞的第 1 步即细胞融合, 所以了解这一发生机制对于疾病的治疗和预防有重大意义。本文就汉坦病毒糖蛋白的合成、生物学结构及在细胞融合中的作用进行简要综述。

### 一、HTNV 包膜糖蛋白(GP)的合成

GP 是由约 3616 个核苷酸的 M 片段编码而成的。M 片段上的开放阅读框(ORF)位于第 41 个核苷酸至第 3448 个核苷酸之间, 为一个连续性的 ORF, 其内含 3408 个核苷酸, 编码约 1135 个氨基酸的高甘露糖型 GP 前体(GPC)。该前体在内质网初级糖基化后裂解成两个包膜糖蛋白 Gn 和 Gc。Gn 起始于第 18 个氨基酸(苏氨酸), Gc 起始于第 649 个氨基酸(丝氨酸)。在不同型别的 HV 中, Gn 糖蛋白的 C 末端均具有一个稳定的氨基酸(aa)序列 WAASA, 并认为该序列是 GPC 的裂解位点, 其最后一个丙氨酸(A)残基为信号肽酶的作用位点, GPC 在细胞内信号肽酶的介导下, 切割并翻译成 Gn 和 Gc, 而后两者形成异二聚体, 并且共同转移至高尔基体, 在高尔基体内进行 N 连接的糖基化修饰<sup>[5]</sup>。

### 二、GP 的生物结构

GP 属于跨膜蛋白又称(镶嵌蛋白), 其 C 端位于包膜内, N 端位于病毒包膜的外面, 形成异二聚体。Gn 和 Gc 结构相似均由 3 部分组成: 胞外区、跨膜区、C 末端胞质尾区(GP-CT)。GP-CT 属于高度保守环指结构区域, 较长的 Gn-CT 由约 142 个半胱氨酸和组氨酸残基构成, 短的 Gc-CT 由约 8 个半胱氨酸和组氨酸残基构成<sup>[6]</sup>。Gn 和 Gc 上共有 5~7 个糖基化位点, 其中一个位于 Gc 上, 其余的均位于 Gn 上<sup>[7]</sup>。目前认为 Gn 和 Gc 的 N 末端糖基化后形成棘突复合体, 这种棘突复合体为病毒颗粒表面脂质双层包膜上的刺突, 现有两种棘突复合体形成的假说: 一种认为, 一个 Gn 与一个 Gc 结合成 Gn-Gc 异二聚体, 4 个 Gn-Gc 异二聚体再结合成 (Gn-Gc)<sub>4</sub>; 另一种假说认为 4 个 Gn 形成一个 Gn 四聚体, Gn 四聚体中每一个 Gn 单体再分别和一个 Gc 结合形成 Gn-Gc 八聚体。棘突复合体形成后便暴露的出 Gn-CT,

使其与病毒的核糖核蛋白相连, 进行病毒的组装<sup>[8,9]</sup>。

### 三、汉坦病毒糖蛋白在细胞融合中的作用

1. 细胞融合: 细胞融合即所有包膜病毒(包括 HV 在内)入侵细胞, 随后翻译, 进而复制、释放的重要过程, 是细胞信息传递的重要步骤, 并且是参与病毒毒力的决定因素之一。病毒包膜与宿主细胞包膜发生融合, 是导致病毒的蛋白质和基因组 RNA 进入宿主细胞, 开始病毒在宿主体内的复制的第 1 步。并且所有 HV 都通过细胞融合这一过程致宿主细胞发生病变。

2. 细胞融合的机制: 细胞融合的机制早在 1978 年 HV 被成功分离时, 曾一度是国内外学者们研究的热门, 虽然通过各方面的实验研究, 但进展缓慢。1985 年国外学者 Arikawa 在研究 HV 的细胞融合与中和抗体的关系时首次在体外实验中证明汉坦病毒在酸性的条件下可以与 Vero E6 细胞发生融合。1989 年, Tamura 在大阪大学的实验室通过研究 HV 在鼠身上的作用机制时发现细胞的融合活性与病毒的毒力呈正相关, 并且发现融合活性强的毒株还可以诱导细胞毒性 T 细胞的活性, 从而说明了细胞的融合活性和细胞毒性 T 细胞活性在 HV 的致病性方面都有重要作用。1994 年我国学者报道了感染的 Vero E6 细胞只有在偏酸性的情况下才能诱发细胞融合, 当 pH 值 >6.7 或者是 pH 值 <4.5 时, 不能诱发出细胞融合。1997 年我国学者在 HFRS 患者的尿液中发现存在融合细胞, 成为 HV 在体内微酸环境下致细胞融合的直接证据。后来发现 HFRS 患者尿液中融合细胞的指数与肾损伤程度呈正相关, 即病情重、预后差的患者尿液中融合指数高<sup>[10]</sup>。2004 年日本学者 Ogino 等<sup>[11]</sup>发现被 HV 感染的细胞可以与非感染的细胞发生融合并且发现抗 Gn、Gc 的中和抗体可以抑制细胞融合, 表明 HV GP 介导膜融合, 并且指出融合过程可受到很多因素的影响, 比如宿主的细胞因子等, 这种融合方式属于细胞系依赖型。这一点可以解释为什么人类感染 HV 后与啮齿动物感染后的致病性不一样。2007 年国内学者通过实验发现 GP 能够独立的介导细胞间的融合, 并且提出 HV 的细胞融合同时具有 PH 依赖性和细胞系依赖性<sup>[12]</sup>。

3. 细胞融合的过程: HV 的主要膜融合方式为 PH 依赖型, 即其必须在低 pH 值的环境下, 包膜糖蛋白 Gn 和 Gc 的结构发生改变, 在糖蛋白内部的融合肽才能暴露出来, 进而与细胞发生融合过程。目前研

究表明 Gn、Gc 具有结构依赖性,即它们只有共同表达出正确的结构构象,才有细胞融合的生物活性。如果单独表达时它们到达不了细胞膜的表面<sup>[13]</sup>。这提示病毒的融合蛋白存在于糖包膜蛋白上,整个融合过程都基于病毒融合蛋白的结构改变,如果能阻断其结构的改变,如应用糖蛋白的单抗封闭其抗原位点,就可以致其融合活性消失。

4. HV 糖蛋白糖基化对细胞融合的影响:HV 的细胞融合受很多因素影响,目前研究表明糖基化对细胞融合的影响较明显。Shi 等<sup>[14,15]</sup>认为 Gn 和 Gc 转移至高尔基复合体是糖基化所必需的过程,然而其转移至高尔基复合体的前提是 Gn 和 Gc 的异二聚体化,推导出 Gn 和 Gc 的异二聚体化是发挥细胞融合活性的前提。HV 的 Gn 和 Gc 都是通过 N-联糖基化修饰的,有很多报道表明 N-联寡糖链对蛋白的正确折叠非常重要并且与病毒的 GP 的很多功能相关。据报道某些病毒融合功能与其部分 N-联寡糖链的缺失有明显的联系,通过实验证明部分 N-联寡糖链的缺失可致病毒的细胞融合功能减弱或完全丢失<sup>[16,17]</sup>。中国学者通过 N-联糖基化位点突变实验发现,当 Gn 上的 N134A 发生突变时,其突变株的细胞表面不能表达 Gn 只能表达 Gc,推测是因为当 Gn 或 Gc 单独表达时,它们无法转移至细胞表面而只能滞留在内质网,所以未能发生细胞融合;当其他 Gn 上的糖基化位点发生突变时对细胞融合没有明显的影响;而当 Gc 上的 N928 发生突变时,细胞融合消失;后又将突变了了的 N928 引入 Gn 上的单个位点突变体,发现原来可以发生细胞融合的突变体不再具有细胞融合活性。从而证实了如果 Gc 上的 N928 位的 N-联寡糖链缺失就足以阻断细胞融合的发生<sup>[18]</sup>。并且推测 HV 细胞融合肽就位于 Gc 上。关于 HV 融合肽的报道甚少,但目前认为 HV 的融合蛋白属于 II 型融合蛋白,其融合肽位于融合蛋白内部,可能是 Gc 上高度保守的 aa763 ~ aa785,并有学者通过基因定点突变初步证实 aa763 ~ aa785 的 10 个特定的氨基酸突变可以致融合活动消失,而不影响糖蛋白的表达和转运。可以表明该保守区域与膜融合密切相关,可能就是 HV 病毒的融合肽<sup>[19]</sup>。

#### 四、展 望

综上所述,近些年经过国内外学者们的研究,汉坦病毒糖蛋白的结果和功能越来越多的被人们所认识。我们对糖蛋白是如何协助病毒入侵宿主细胞的也有了初步了解,但是对于汉坦病毒融合蛋白和融合

肽的确切基因位点还是缺乏实验和数据的支持,如果能明确的知道其基因位点并有针对性的改变它的基因,改变它的生物活性,从而便可以降低其致病性,甚至阻断其入侵细胞的机制。这对研制安全有效的基因工程疫苗和特异性的抗病毒药物有重要的意义。所以笔者将继续研究融合蛋白及融合肽的确定位点,这也将是今后研究的重要内容。

#### 参考文献

- 1 Hepojoki J, Strandin T, Lankinen H, *et al.* Hantavirus structure - molecular interactions behind the scene [J]. J Gen Virol, 2012, 93 (Pt 8):1631 - 1644
- 2 Klempa B, Radosa L, Kruger DH. The broad spectrum of hantaviruses and their hosts in Central Europe [J]. Acta Virol, 2013, 57 (2):130 - 137
- 3 Krautkrämer E, Zeier M, Plyusnin A. Hantavirus infection; an emerging infectious disease causing acute renal failure [J]. Kidney Int, 2013, 83 (1):23 - 27
- 4 Buranda T, Wu Y, Perez D, *et al.* Recognition of decay accelerating factor and avb3 by inactivated hantaviruses: toward the development of high - throughput screening flow cytometry assays [J]. Anal Biochem, 2010, 402 (2):151 - 160
- 5 Lober C, Anheier B, Lindow S, *et al.* The hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA [J]. Virology, 2001, 289 (2):224 - 229
- 6 Hepojoki J, Strandin T, Wang H, *et al.* Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein [J]. J Gen Virol, 2010, 91 (Pt 9):2341 - 2350
- 7 Shi X, Elliott RM. Analysis of N - linked glycosylation of hantaanvirus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking [J]. J Virol, 2004, 78 (10):5414 - 5422
- 8 Sen N, Sen A, Mackow ER. Degrons at the C terminus of the pathogenic but not the nonpathogenic hantavirus G1 tail direct proteasomal degradation [J]. J Virol, 2007, 81 (8):4323 - 4330
- 9 Hussein IT, Cheng E, Ganaie SS, *et al.* Autophagic clearance of Sin Nombre hantavirus glycoprotein Gn promotes virus replication in cells [J]. J Virol, 2012, 86 (14):7520 - 7529
- 10 马立宪,邵丽华,赵丽,等. 肾综合征出血热患者早期尿细胞融合程度与病情及预后的关系 [J]. 中华传染病杂志, 2001, 19 (1):35 - 37
- 11 Ogino M, YOshimatsu K, Ebihara H, *et al.* Cell fusion activities of Hantaan virus envelope glycoproteins [J]. J Virol, 2004, 78 (19):10776 - 10782
- 12 Zheng F, Ma L, Shao L, *et al.* Envelope glycoproteins of hantavirus can mediate cell - cell fusion independently [J]. New Microbiol, 2007, 30 (2):101 - 107
- 13 Geimonen E, LaMonica R, Springer K, *et al.* Hantavirus pulmonary syndrome associated hantaviruses contain conserved and function at ITAM signaling elements [J]. J Virol, 2003, 77 (2):1638 - 1643

(下转第 70 页)