

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00892

• 综 述 •

细胞极性与丙型肝炎病毒受体介导的细胞入侵

关 默, 戚中田*

第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200443

[摘要] 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的细胞入侵过程由多因素介导, 包括多种受体及触发病毒内吞入胞的细胞因素。新发现的受体分子 occludin 已被证明与 SR-B1、CD81、claudin 同介导 HCV 细胞入侵, occludin 和 claudin 同为组成细胞间紧密连接的整合蛋白, 引起了研究者们对紧密连接及细胞极性对 HCV 入侵影响的广泛关注。对细胞极性及其紧密连接的研究, 有助于发现新的 HCV 治疗药物的作用靶点, 从而干预其细胞入侵及细胞间蔓延。本文从肝细胞极性特点、紧密连接及主要整合蛋白 claudin 和 occludin、极性细胞模型及与 HCV 入侵的关系等几个方面综述了近来的最新进展。

[关键词] 丙型肝炎病毒; 细胞极性; 紧密连接; 细胞入侵; occludin

[中图分类号] Q 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0892-04

Cell polarization and hepatitis C virus receptor-mediated cell entry

GUAN Mo, QI Zhong-tian*

Department of Microbiology, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Hepatitis C virus cell entry is mediated by multiple factors, including various receptors and cellular factors that trigger virus uptake by the hepatocyte. Occludin is a newly identified essential co-receptor for HCV entry together with CD81, SR-B1 and CLDN1. CLDN1 and occludin highlight the importance of studying the effects of tight junction and cell polarization on HCV entry. Study on cell polarization and tight junction can help to discover new targets for HCV therapy, and therefore interfere the cell entry and cell-cell spread of HCV. This review summarizes the current knowledge of hepatocyte polarization, tight junction and its major integral proteins CLDN1 and occludin, polarized cell culture system and its relation with HCV entry.

[Key words] hepatitis C virus; cell polarization; tight junction; cell entry; occludin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):892-895]

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)自 1989 年被鉴定命名至今已有 20 多年历史, 目前对其生命周期依然了解甚少, 至今仍无有效的特异预防方法。HCV 为单正链 RNA 病毒, 属于黄病毒科、丙型肝炎病毒属。HCV 基因组含有约 9 600 个碱基, 单一的开放读码框, 编码 1 条约 3 010 个氨基酸的多蛋白前体。该多蛋白在翻译的同时或之后被宿主和病毒的蛋白酶剪切加工至少 10 种成熟蛋白, 包括结构蛋白质 core、E1、E2、p7, 以及非结构蛋白质 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B。包膜蛋白 E1 和 E2 为 I 型膜蛋白, 其胞外区高度糖基化, 两者相互作用形成非共价异二聚体, 存在于病毒颗粒的表面参与 HCV 受体结合。目前已发现 4 种受体与 HCV 入侵宿主细胞相关, 分别是 CD81^[1], SR-B1^[2-3], claudin 1 (CLDN1)^[4] 和 occludin (OCLN)^[5], 其中

CLDN1 和 OCLN 同为构成紧密连接的整合蛋白引起研究者们对肝细胞紧密连接以及极性对 HCV 入侵影响的广泛关注。

1 肝细胞的极性与紧密连接

肝脏是机体最大的器官, 具有代谢、合成、储存、生物转化等功能。肝小叶是肝脏基本结构单位, 肝小叶中央有 1 条沿其长轴走行的中央静脉, 中央静脉周围是大致呈放射性排列的肝细胞和肝血窦。肝细胞以中央静脉为中心, 向周围呈放射状排列成板状结构, 成为肝板, 肝板之间的空隙为肝血窦。

1.1 肝细胞的极性 细胞极性指细胞中某些胞质成分按一定空间顺序分布并形成浓度梯度, 细胞的两端在结构和功能

[收稿日期] 2009-12-22 **[接受日期]** 2010-01-15

[基金项目] 国家传染病重大专项课题(2008ZX10002-013), 上海市基础研究重点项目(08JC1405000), 上海市重点学科建设项目(B901), Supported by Special Project of Important National Science and Technology for Prevention and Treatment of Major Infectious Diseases (2008ZX10002-013), Shanghai Key Basic Research Project (08JC1405000), and Shanghai Key Subject Construction Project (B901).

[作者简介] 关 默, 硕士生. E-mail: candygogomo@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870988, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

上具有明显的差异。上皮细胞为极性细胞,由细胞间连接分为1个顶面和1个基底面,而肝细胞的极性较为特异及复杂,肝细胞紧密排列成肝板且具有多个顶面和基底面;相邻肝细胞膜凹陷形成微管道称胆小管(bile canaliculus, BC),此部分细胞膜为顶面;暴露于肝板表面的肝细胞膜直接与肝血窦接触为基底面又称窦状膜,此膜区与血液发生物质交换,并合成多种蛋白质在此分泌入血;细胞间紧密连接将细胞顶面与细胞基底面分隔开^[6]。见图1。

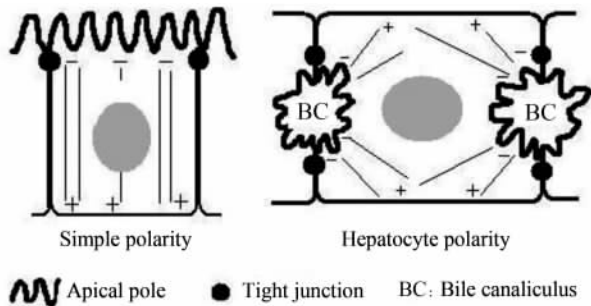


图1 肝细胞的极性^[6]

Fig 1 Hepatocyte polarity^[6]

1.2 肝细胞间紧密连接 肝细胞连接面上存在连接复合体,由紧密连接(TJ)、桥粒和缝隙连接组成。细胞连接对维持肝细胞的多种生理功能起重要作用,包括胆汁的分泌及运输,细胞色素P450同工酶的表达以及糖原分解等。其中紧密连接的作用尤为重要,被称为“血胆屏障”,保证胆小管中的胆汁不溢入肝血窦。紧密连接位于相邻肝细胞靠近顶极的侧膜上^[6-7],连接区域形成嵴线,嵴线主要由整合蛋白CLDN、OCLN和外周蛋白ZO组成。

紧密连接在对抗病原体感染的天然防御中起重要作用,曾有人用病毒作为载体将治疗性基因作用于气道上皮,结果并未显示任何治疗作用^[7],这提示紧密连接在上皮细胞抵挡病毒入侵中的重要作用。有报道许多病原体编码蛋白可以破坏紧密连接的完整性以利于入侵宿主细胞;产气荚膜梭菌肠毒素将CLDN3和CLDN4从紧密连接中移除从而促进细菌的入侵^[8],腺病毒在病毒释放的过程中编码一种纤维蛋白短暂性地破坏细胞间紧密连接的完整性^[9]。近来研究显示紧密连接整合蛋白CLDN1和OCLN在HCV内化过程中起到了至关重要的作用^[4-5],提示我们去探究紧密连接以及细胞极性究竟在HCV入侵过程中扮演着什么样的角色。

2 HCV入侵机制及研究手段

HCV主要经血液传播,其主要靶细胞为肝细胞,肝细胞是公认的HCV主要复制场所。HCV入侵肝细胞是多因子共同介导的过程,在血液中,HCV常与脂蛋白相黏附,病毒表面包膜蛋白可与细胞表面受体结合,树突细胞特异性细胞黏附分子-3结合非整合素分子(dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN)、淋巴结特异性细胞内黏附分子(lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, L-SIGN)、聚糖以及低密度脂蛋白受体能为下一步靶向结合CD81和SR-B1起到富集HCV病毒颗粒的作用,HCV先经血液接触肝细胞的基底面,在此处与CD81、SR-B1

结合,HCV包膜蛋白2与CD81的结合已被证实可以激活GTPase依赖信号转导通路,并引导HCVE2-CD81复合体重重新定位到细胞间连接处与紧密连接蛋白CLDN1和OCLN相互联系,而后的入胞过程推测为病毒颗粒被运送至内吞小体在低pH值情况下引发的膜融合作用。

2.1 研究入侵的手段 近年来HCV假病毒颗粒(HCV pseudovirus particles, HCVpp)^[10]及HCVcc(HCV grown in cell culture)^[11-12]模型的建立大大推动了对HCV入侵机制的研究,这有助于在HCV入侵的各个环节进行阻断。

HCVpp是一种重组病毒,其衣壳来自于逆转录病毒人体免疫缺陷病毒或小鼠白血病病毒,包膜蛋白是HCV包膜蛋白E1和E2。HCVpp很好地模拟了天然HCV颗粒的细胞入侵过程,其携带的绿色荧光蛋白或荧光素酶报告基因方便了HCV的观察和定量检测。

2005年,一种新的HCV体外细胞培养模型HCVcc构建成功。日本Wakita实验室从1例非常罕见的暴发性丙型肝炎患者体内分离出HCV JFH-1株(HCV 2a型),随后研究发现,JFH-1亚基因组复制子无需适应性突变就能在体外培养的肝细胞系中高效复制;JFH-1体外转录出的基因组RNA转染的Huh-7细胞能分泌产生低水平的感染性病毒颗粒^[12]。因此,能自我复制并具感染性的JFH-1的发现开辟了有效的HCV体外培养系统。但是这个系统基于体外培养的非分化细胞系,难以重现HCV在体内感染肝细胞的自然情况。

2.2 入侵受体

2.2.1 CD81和SR-B1 CD81为4次跨膜素,相对分子质量26 000,由4个跨膜区组成,其中第三、四跨膜区间形成的细胞外大环(LEL)在HCV入侵和感染中发挥重要作用。CD81在大多数组织中均有表达,有报道称其定位于极性细胞的基底面。SR-B1为B族1型清道夫受体,含有509个氨基酸残基,有一个大胞外环,报道称其多表达于类固醇组织、巨噬细胞和肝脏,定位于极性细胞的顶面和基底面。

2.2.2 CLDN1 CLDN1是一种在肝细胞高表达的胞间紧密连接组分,Claudin家族共有24个成员,相对分子质量20 000~27 000,由4个跨膜区组成,氨基和羧基末端都在细胞质内,该分子与HCV入胞密切相关,并可以通过异位表达于非肝源细胞使该细胞对HCV易感;在人胚肾细胞293T表达CLDN1后,不同基因型的HCVpp对该细胞的感染性均增加了100多倍。CLDN1第一胞外大环(EL1)的部分残基对于HCV的入侵至关重要,针对CLDN1 EL1嵌合的一个表位抗体能抑制HCV入胞。动力学研究表明,CLDN1参与晚期HCV入胞过程,在HCV同CD81、SR-B1相互作用之后发挥相应作用^[4]。

2.2.3 OCLN OCLN与CLDN1同为紧密连接整合蛋白,定位于细胞侧膜的近顶面处,相对分子质量65 000,4次跨膜结构将其分为2个细胞外环和2个细胞内环。OCLN是紧密连接中最重要的结构蛋白,不仅能通过外环以拉链式结合产生严密的细胞旁封闭,还与不同分子结合,参与紧密连接形成的信号调节。大部分OCLN蛋白位于紧密连接纤维内,只有少数蛋白分布在细胞侧膜上而不参与紧密连接形成。

Occludin 作为第 4 个 HCV 入侵必要因子的重大发现引发研究者们对 HCV 的重新认识。Ploss 等^[13]为探究其表达对 HCV 入侵是否为必需因素,将 HCV 两种允许细胞 Huh7.5 和 Hep3B 细胞 OCLN 分子表达沉默,而后观察到 2 种细胞被 HCV_{pp} 和 HCV_{cc} 感染能力均有丢失,随后又将 OCLN 分子导入表达 CD81、SR-B1 以及 CLDN1 不能被 HCV 感染的肾癌细胞 786-O,随即该细胞可被 HCV 感染。除此之外,将人源及鼠源性的 HCV 4 种受体排列组合表达于中国仓鼠卵巢细胞 CHO 中,结果显示 CD81 和 OCLN 具有明显的种属特异性,用人源和鼠源的嵌合 OCLN 分子检测到其人特异结合位点是在第二个胞外环。这些数据向人们揭示:OCLN 也许是 HCV 入侵宿主细胞的最后一个细胞关键因子。HCV 细胞入侵受体的过程见图 2。

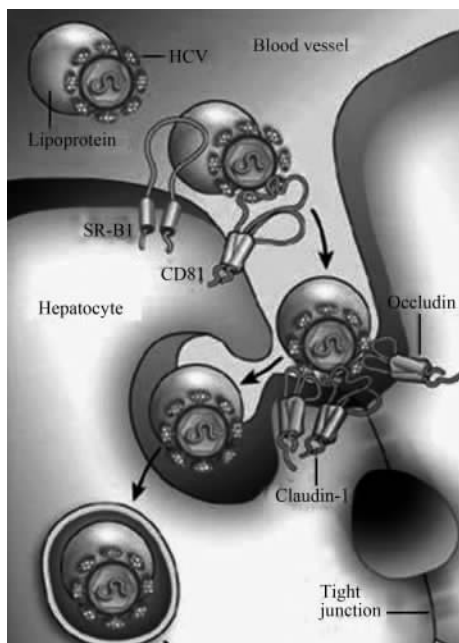


图 2 HCV 细胞入侵受体^[14]

Fig 2 HCV cell entry receptors^[14]

有研究表明 HCV 能在相邻易感细胞间传播,这种传播途径不能被 HCV 感染中和抗体阻断,所以能够部分解释 HCV 在人体内的免疫逃避^[15],在此过程中,CLDN1 和 OCLN 这 2 种受体很有可能参与其中,如果事实真的如此,就不得不让研究者们思考抑制血液中游离病毒入侵的药物能否成为有效的抗病毒药物。

3 现有细胞模型

体外培养细胞目前是研究 HCV 入侵及复制的重要手段,这些细胞虽允许 HCV 入侵及复制,但与体内肝细胞真正的生长状态相差甚远,因此亟待构建一个可以模拟肝细胞在体内极性生长的理想细胞模型。

3.1 Huh-7 Huh-7 是人类肝癌细胞系,可被 HCV 感染并支持 HCV 复制,现为国际上培养 HCV 最常用的细胞系,在 Huh-7 基础上又建立了 Huh-7.5 和 Huh-7.5.1 细胞系,这些细胞系在研究 HCV 入侵和复制中发挥了重要作用。但正如大多癌细胞,Huh-7 细胞系分化程度低,缺乏极性特点,有人

根据细胞顶面氨肽酶 N 的定位判断 Huh-7 细胞很少有胆小管形成,而且紧密连接 ZO-1 蛋白也不定位在胆小管结构上^[16],表明 Huh7 细胞不能形成成熟的紧密连接。

3.2 HepG2 HepG2 细胞系具有良好的极性生长特点,可形成胆小管结构,并由紧密连接密封,但只有 20%~40% 的 HepG2 细胞表现为极性生长^[17],而且胆小管结构难被检测到,顶极标志蛋白也会发生错误定位^[18]。最为重要的是由于缺乏 HCV 入侵的重要受体 CD81 而不能被 HCV_{pp} 或者 HCV_{cc} 感染。

3.3 HepaRG HepaRG 细胞系既有肝细胞样表型又有胆管上皮样表型^[19],其肝细胞样细胞可以形成胆小管样结构并已被证实为功能性的。该细胞上许多极性标记蛋白具有正确的细胞定位,如:DPP IV、E-钙黏蛋白、ZO-1 和细胞角蛋白 18^[20]。但只有 55% 的 HepaRG 细胞表现为肝细胞样,并需要在其培养基中添加 2% 二甲亚砜及表皮生长因子。目前大多数人认为其并不能被 HCV 感染。

其他还有通过杂交融合方法得到的极性细胞系,如 WIF-B、WIF-B9,以及从转基因小鼠肝脏中获得的极性肝细胞样细胞,如 mhAT3F、AML12 等。

4 细胞极性模型与 HCV 入侵

在体外细胞培养模型中,研究人员通过各种培养方法模拟肝细胞极性,Mee 等^[21]选用大肠腺癌细胞 Caco-2 作为研究模型,Caco-2 为公认的极性生长细胞,将 Caco-2 细胞培养在 0.4 μm 孔径的渗透性滤膜上,以利于收集细胞顶面与基底面培养室中的培养基。将 HCV_{pp} 分别加到顶面和基底面孵育 8 h,收集 2 个培养室中的培养基进行二次感染 Huh7.5 来检测剩余病毒的感染效力,结果发现 99.6% 的病毒仍集中在加样面培养基中,表明 HCV_{pp} 不能跨越极化的 Caco-2 单层细胞层。而后用钙饥饿法破坏 Caco-2 细胞极性,暴露几种受体从而使 HCV 更易接近,结果显示 HCV_{cc} 对极性破坏后的 Caco-2 比正常极化者的感染能力增加 10 倍,而破坏已感染 HCV_{cc}-JFH 的 Caco-2 细胞极性却并未促进 HCV_{cc} 的继续蔓延。以上结果揭示细胞极性生长限制了 HCV 的入侵,细胞间紧密连接提供一个天然的物理屏障阻碍病毒接近表达在细胞连接面的受体但却不直接阻碍 HCV 的蔓延。与此同时,Mee 等^[22]用 HepG2 细胞,通过检测胆小管标记蛋白判定细胞已极化,而后用慢病毒整合宿主基因使其表达 CD81 作为 HCV 入侵细胞模型,研究发现 HepG2-CD81 的极化与 HCV_{pp} 感染呈反比关系,用佛波酯激活 PKC 从而破坏紧密连接的完整性,干扰了 HepG2 细胞极性,结果发现这刺激了 HCV 入侵。初步推断细胞的极性对于 HCV 入侵是不利的,如果破坏了肝细胞极性可促进 HCV 感染。

然而 Sainz 等^[23]用三维细胞培养系统 RMV 培养 Huh 7 细胞使其极化,结果显示 HCV_{cc} 感染极化的 Huh 7 能力强于非极化 Huh 7,用紧密连接破坏因子 PMA 破坏 Huh7 胞间紧密连接,发现 HCV_{cc} 对其感染能力大大降低,说明极化 Huh 7 细胞的紧密连接屏障并不阻止 HCV 的入侵,如果被破坏反而会抑制 HCV 的入侵。

5 展 望

综上所述,目前的研究表明细胞极性与 HCV 入侵存在一定关系,其具体机制有待进一步研究。自 CLDN1 和 OCLN 两种受体被发现,对 HCV 入侵因素的研究日臻完善。为了更好地探究 HCV 入侵与肝细胞极性的相互联系以及 HCV 细胞间蔓延与紧密连接的关系,亟待构建一个可以模拟肝细胞生理状态的细胞模型,同时紧密连接可能是 HCV 治疗的潜在靶点,针对紧密连接的复合手段也许会成为今后 HCV 治疗的有效方法。

[参 考 文 献]

- [1] Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81[J]. *Science*, 1998, 282: 938-941.
- [2] Grove J, Huby T, Stamataki Z, Vanwolleghem T, Meuleman P, Farquhar M, et al. Scavenger receptor B I and B II expression levels modulate hepatitis C virus infectivity[J]. *J Virol*, 2007, 81: 3162-3169.
- [3] Kapadia S B, Barth H, Baumert T, McKeating J A, Chisari F V. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I [J]. *J Virol*, 2007, 81: 374-383.
- [4] Evans M J, von Hahn T, Tscherner D M, Syder A J, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry[J]. *Nature*, 2007, 446: 801-805.
- [5] Liu S, Yang W, Shen L, Turner J R, Coyne C B, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent super-infection[J]. *J Virol*, 2009, 83: 2011-2014.
- [6] Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D. Which *in vitro* models could be best used to study hepatocyte polarity[J]? *Biol Cell*, 2008, 100: 387-398.
- [7] Pickles R J, Fahrner J A, Petrella J M, Boucher R C, Bergelson J M. Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer[J]. *J Virol*, 2000, 74: 6050-6057.
- [8] Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, et al. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier [J]. *J Cell Biol*, 1999, 147: 195-204.
- [9] Walters R W, Freimuth P, Moninger T O, Ganske I, Zabner J, Welsh M J. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape[J]. *Cell*, 2002, 110: 789-799.
- [10] Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein

complexes[J]. *J Exp Med*, 2003, 197: 633-642.

- [11] Lindenbach B D, Evans M J, Syder A J, Wolk B, Tellinghuisen T L, Liu C C, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture[J]. *Science*, 2005, 309: 623-626.
- [12] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome[J]. *Nat Med*, 2005, 11: 791-796.
- [13] Ploss A, Evans M J, Gaysinskaya V A, Panis M, You H, de Jong Y P, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells[J]. *Nature*, 2009, 457: 882-886.
- [14] Pietschmann T. Virology: Final entry key for hepatitis C[J]. *Nature*, 2009, 457: 797-798.
- [15] Timpe J M, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar M J, Harris H J, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 17-24.
- [16] Harada M, Sakisaka S, Terada K, Kimura R, Kawaguchi T, Koga H, et al. Role of ATP7B in biliary copper excretion in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes[J]. *Gastroenterology*, 2000, 118: 921-928.
- [17] Theard D, Steiner M, Kalicharan D, Hoekstra D, van Ijzendoorn S C. Cell polarity development and protein trafficking in hepatocytes lacking E-cadherin/beta-catenin-based adherens junctions [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 2313-2321.
- [18] Zegers M M, Zaal K J, van Ijzendoorn S C, Klappe K, Hoekstra D. Actin filaments and microtubules are involved in different membrane traffic pathways that transport sphingolipids to the apical surface of polarized HepG2 cells[J]. *Mol Biol Cell*, 1998, 9: 1939-1949.
- [19] Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 15655-15660.
- [20] Parent R, Marion M J, Furio L, Trepo C, Petit M A. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126: 1147-1156.
- [21] Mee C J, Grove J, Harris H J, Hu K, Balfe P, McKeating J A. Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry[J]. *J Virol*, 2008, 82: 461-470.
- [22] Mee C J, Harris H J, Farquhar M J, Wilson G, Reynolds G, Davis C, et al. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells[J]. *J Virol*, 2009, 83: 6211-6221.
- [23] Sainz B Jr, TenCate V, Uprichard S L. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection [J]. *Virol J*, 2009, 6: 103.

[本文编辑] 尹 茶