

内质网应激在丙肝病毒感染发病学中的作用的研究进展

李明皓, 范亮亮, 项 荣*

(中南大学 湘雅医学院, 湖南 长沙 410013)

摘要:丙型肝炎病毒(HCV)常扰乱内质网稳态,其复制中间产物的积累可导致内质网应激(ERS),与多种疾病的发生密切相关。为了应对内质网应激所带来的有害影响,细胞激活未折叠蛋白反应(UPR)和凋亡通路。在病毒感染的初期,未折叠蛋白反应主要用于清除病毒产生的蛋白和其他中间产物;而当感染进一步深化,稳态不能维持时细胞则激活凋亡通路。但以上通路也可被病毒蛋白操纵而深化感染并减弱抗病毒反应。

关键词:内质网应激;未折叠蛋白反应;丙型肝炎病毒;凋亡

中图分类号:R512.6⁺3 文献标志码:A

Research progress on the role of endoplasmic reticulum stress in pathogenesis of hepatitis C virus infection

LI Ming-hao, FAN Liang-liang, XIANG Rong*

(Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: The infection caused by hepatitis C virus (HCV) often disturbs the homeostasis of endoplasmic reticulum. Accumulation of replication intermediates can lead to endoplasmic reticulum stress (ERS), which is closely related to the occurrence of many diseases. In order to prevent the harmful effects of endoplasmic reticulum stress, cells activate unfolded protein response (UPR) and apoptosis pathway. In early stage of virus infection, unfolded protein reaction is a main function to remove the proteins and other intermediates produced by the virus and when the infection deepens and the homeostasis is no longer to be maintained, the cell activates the apoptosis pathway. However, these pathways can also be manipulated by viral proteins to deepen infection and inhibit antiviral mechanism.

Key words: endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response; hepatitis C virus; apoptosis

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 属黄病毒科的包膜阳性 RNA 病毒^[1], 其遗传物质 9 500 ~ 10 000 bp, 通常不整合到宿主基因组, 能编码长为 3 014 个氨基酸的蛋白前体, 后者经过蛋白质水解产生核心蛋白、包膜蛋白 E1、E2 及非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B (表 1)^[2]。全世界

约有 3% 的人感染 HCV, HCV 感染可发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌^[3], 已成为重大的公共卫生问题之一。肝细胞内 HCV 基因组表达导致大量病毒蛋白和 RNA 复制中间产物在内质网中积累, 从而触发内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 为缓解 ERS, 细胞将激活未折叠蛋白反应

(unfolded protein response, UPR) 以消除感染促进细胞回归稳态;但 UPR 也可被病毒操纵,深化感染并减弱抗病毒反应^[4]。当 ERS 太剧烈难以通过 UPR 缓解时,细胞将激活凋亡通路。在 HCV 感染的过程中,ERS 介导的 UPR 可使肝细胞核因子 4 α 和其下游的具有抑癌作用的 miR-122 表达水平均被调低,从而导致肿瘤的发生,这也是 HCV 感染发展为肝细胞癌的原因^[5]。因此,探明病毒感染与宿主细胞内质网应激的作用机制对丙型肝炎病毒感染的治疗意义重大。

表 1 HCV 相关蛋白功能

Table 1 Functions of HCV related proteins

蛋白种类	功能
核心蛋白	与病毒基因组一起组成核衣壳,诱导细胞免疫
包膜蛋白 E1	通过自身变异导致免疫逃逸,使感染慢性化
包膜蛋白 E2	
非结构蛋白 NS2	HCV 基因组复制和病毒颗粒组装
非结构蛋白 NS3	具有解旋酶和丝氨酸蛋白酶的活性
非结构蛋白 NS4A	NS3 作为丝氨酸蛋白酶时的辅助因子
非结构蛋白 NS4B	HCV 基因组复制和病毒颗粒组装
非结构蛋白 NS5A	病毒复制,病毒颗粒组装及释放
非结构蛋白 NS5B	RNA 依赖的 RNA 合成酶

1 HCV 感染与 ERS 和 UPR

1.1 ERS 介导的 UPR 反应及其相关通路

为缓解 ERS 的有害影响,细胞会激活 UPR 通路。在人体细胞中,UPR 一般由 3 个分子介导:PERK(蛋白激酶 R 受体样内质网激酶)、IRE1(需肌醇酶 1)和 ATF6(激活转录因子 6)。这 3 个分子一般与 GRP78(内质网驻留伴侣分子葡萄糖调节蛋白 78)结合;当错误折叠的蛋白在内质网积累时,3 个分子与 GRP78 分离,激活下游相关通路^[6],分述如下。

当细胞发生 ERS 时,PERK 被激活,并使 eIF2(真核细胞翻译起始因子 2)的亚单位 eIF2 α 磷酸化。活化的 eIF2 α 可诱导翻译抑制并增加 ATF4(激活转录因子 4)表达,ATF4 可以激活 GADD34(增殖停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 34)的表达,从而招募 PP1 使 eIF2 α 去磷酸化并削弱其介导的翻译抑制,形成负反馈调节^[7]。ATF6 是一种 BZip 转录

因子,作为跨膜蛋白,当 ERS 发生时,其移入高尔基复合体并激活。活化 ATF6 可入核,激活内质网蛋白折叠相关基因表达:如 ER 伴侣、蛋白二硫化物异构酶等。IRE1-XBP1 通路起始于 IRE1 的激活,活化的 IRE1 从 XBP1(X 盒结合蛋白 1) mRNA 中剪除 26 个核苷酸的内含子^[8],剪切后的 XBP1 被翻译后作为转录因子,增强相关基因表达,促进 ER 相关蛋白降解(ER associated protein degradation, ERAD)。剪切后的 XBP1 还能够激活 p58^{ipk},而 p58^{ipk} 可削弱 PERK 磷酸化 eIF2 α 的能力^[9]。IRE1 的亚基 IRE1B 还可通过其 RNA 酶活性参与 IRE1 依赖性衰变(regulated IRE1 dependent decay, RIDD)途径,降解 ER 结合的 mRNA,减少蛋白质翻译并限制内质网腔中未折叠的蛋白质负荷,调节 ERS^[10]。

1.2 HCV 感染与 ERS 介导的 UPR

在晚期丙型肝炎患者和病毒性肝硬化患者中,HCV 的非结构蛋白 NS4B 对 UPR 通路的激活作用是目前已知最强的,其可使 ATF6 从内质网转移到高尔基复合体,可激活 ATF6;还可激活 XBP1 的剪切从而触发 UPR^[11]。此外,尚有研究表明 NS4b 还可以通过诱导 IRE1 的磷酸化从而诱导 UPR 的发生^[12]。在酵母模型中的研究还表明,HCV 未成熟的核心蛋白可通过 ERAD 诱发 UPR^[13]。当包膜蛋白 E1 和 E2 积聚在 ER 中时,GRP78 与其相互作用。从 E1 和 E2 中去除信号肽,可将这些蛋白质定向表达到细胞质,这些细胞质靶向的 E1/E2 可通过诱导 XBP1 的合成和剪切诱导 UPR^[14],此外,E1 还可以通过抑制 PERK 对 UPR 起到抑制作用^[15]。目前关于 HCV 其他蛋白组分激活 UPR 的机制尚不明确,通过已发现的 UPR 激活途径,可知病毒蛋白通过对 UPR 通路中各感知蛋白的活性调节,对 UPR 进程进行调节,在病毒减弱细胞抗病毒反应的同时,使感染细胞维持一定程度的稳态,以深化感染,增强侵袭力。

PERK-eIF2 α 途径能降低胞内蛋白质合成的整体水平,但 HCV 仍能翻译 mRNA,因为 HCV 能自行招募和组装起始核糖体复合物,并通过激活 eIF2 α 并磷酸化 PP1,诱导其调节亚单位 GADD34 来抑制 eIF2 α 活化;上调其抑制剂 p58^{ipk} 的转录来抑制 PERK 的活性,其包膜蛋白 E2 甚至可作为 PERK 的

伪底物来隔离其活性。

HCV 亚基因组复制子可通过抑制剪切后 XBP1 的合成来抑制 IRE1-XBP1 途径,这可能有助于增强病毒蛋白的合成和持续感染。

2 HCV 感染与 ERS 相关细胞凋亡

2.1 ERS 相关细胞凋亡通路

ERS 剧烈,在难以通过 UPR 缓解时,细胞便激活凋亡通路。PERK-eIF2a-ATF4 通过激活 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP),上调 BH3-only 蛋白表达和下调抗凋亡蛋白发挥促凋亡作用。此外,CHOP 可激活死亡受体 5、Tribbles 相关蛋白 3、GADD34 和内质网氧化酶 1a 触发凋亡,其中,GADD34 和内质网氧化酶 1a 通过影响活性氧物簇的积累调节凋亡。激活的 PERK 通过增强含有抗氧化反应元件基因表达来保护细胞。IRE1 也可通过 IRE1-TRAF2-JNK 通路促进凋亡。活性 IRE1 与肿瘤坏死因子受体相关因子-2 相互作用,然后磷酸化 JNK (Jun 氨基末端激酶)^[16],连接 JNK 与凋亡的介质是 Bcl-2 家族:抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1),促凋亡蛋白(Bax、Bak)和促凋亡的 BH3-only 蛋白(Bad、Bim、Bid、Noxa、Puma)^[17]。BH3-only 蛋白对于抗凋亡蛋白介导的 Ca^{2+} 释放是必要的,释放的 Ca^{2+} 可被线粒体吸收,导致细胞色素 C 外流,引起细胞凋亡。JNK 磷酸化抗凋亡蛋白以降低其活性,磷酸化 BH3-only 蛋白质以增强其活性^[18]。此外,RIDD 的持久激活可能通过降解基本蛋白的 mRNA 而引起凋亡^[10](图 1)。

2.2 HCV 蛋白对凋亡通路的调节

HCV 的不同蛋白组分可通过与凋亡通路之中的相关感知蛋白结合,进而调节病毒感染和细胞存活或凋亡之间的平衡,为病毒进行持续感染创造条件(图 1)。

2.2.1 HCV 核心蛋白与凋亡:核心蛋白构成的核衣壳可激活与各种细胞信号通路有关的不同的启动子,发挥不同的调节作用,核心蛋白通过阻止线粒体释放细胞色素 C 并抑制 caspase-9、caspase-3、caspase-7 的级联激活来抗凋亡;也可与 p53 结合,发挥抗凋亡作用^[19];核心蛋白还可通过磷酸化激活 STAT3 来抑制肝癌细胞凋亡^[20]。核心蛋白也可间接激活 Bax 来诱导凋亡。

2.2.2 包膜蛋白 E1 和 E2 与凋亡:E1 和 E2 是包膜蛋白,能介导病毒结合进入细胞^[21]。在表达 HCV 蛋白的转基因小鼠模型中,CD95 配体介导的肝细胞凋亡分别受到 E1 和 E2 的抑制,细胞色素 C 释放和 caspase-9 激活也受 E2 抑制;在表达 E1 的肝细胞中,E1 的 C 端跨膜域可能使膜通透性得以改变,从而导致凋亡。

2.2.3 非结构蛋白与凋亡:非结构蛋白 NS2 和 NS3 是蛋白裂解所需的两种蛋白酶^[22]。NS2 是一种跨膜蛋白,定位于 ER 内,其在肝细胞凋亡和病毒性肝炎中的作用仍不明确。

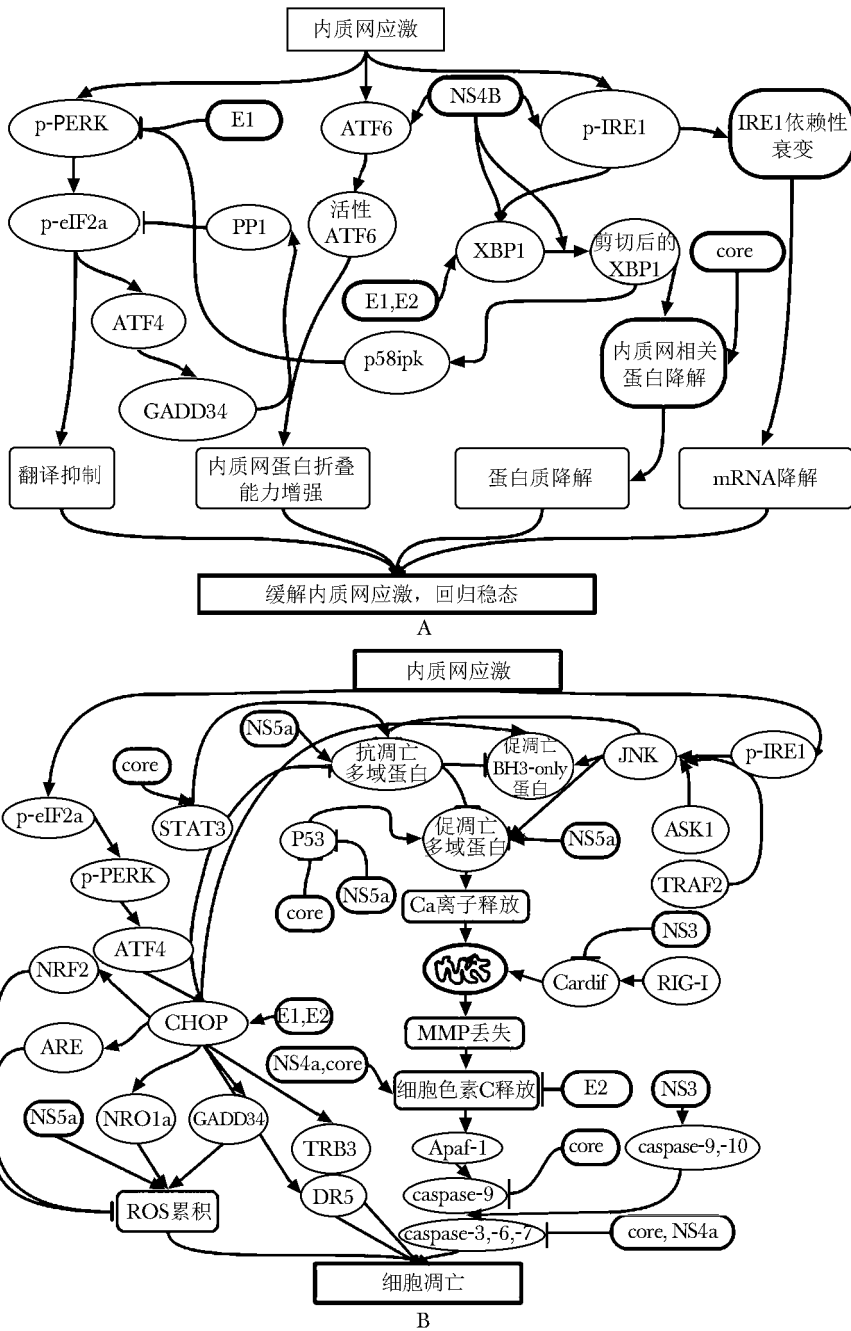
NS3 具有螺旋酶和三磷酸酶活性,通过抑制 ROS 累积与特异性分解下游 Cardif 蛋白可阻止病毒 RNA 诱导的 RIG-I 促凋亡效应。此外,NS3 在肝细胞和树突状细胞中诱导 caspase-8 依赖性凋亡^[23]。

NS4a 是一种与 NS3 结合的辅因子,可单独存在或与 NS3 复合存在,通过诱导细胞色素 C 释放和 caspase-3 激活凋亡^[24]。NS4b 是一种完整的 ER 膜蛋白,在锚定复制复合体中起到作用,在其凋亡信号通路中的作用尚未明确。

NS5a 可干扰对干扰素的反应,在病毒复制中起重要作用。NS5a 与 Bcl-2 序列同源,与 FKBP38 结合,可增强 Bcl-2 家族的抗凋亡作用^[25],抑制 Bax 在肝癌细胞中的促凋亡作用^[26]。NS5a 的抗凋亡作用还可通过 p53 的细胞质隔离过程等介导^[26]。NS5b 是病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶,暂时还没有 NS5b 在肝细胞凋亡中的研究。

3 问题与展望

ERS 可作为 HCV 病毒感染过程中的检测指标。ERS 相关基因的表达与病毒性肝炎发病机制密切相关,在病毒诱导的细胞凋亡和炎症反应中起重要作用,但目前对 HCV 中的一些蛋白(如 NS2 等)具体调控 ERS 相关通路的分子机制尚不明确,有待进一步研究。因此,未来可通过体内外实验,寻找更多与 HCV 感染和与病毒性肝炎发病相关的 ERS 靶基因并深入研究 HCV 中蛋白组分激活 ERS 的相关机制,从而探讨发掘出相应的基因治疗方法或靶点的可能性,以获得更有效、更有针对性的预防和治疗病毒性肝炎的药物和方法,减少甚至逆转病毒感染对人体细胞带来的损害。



A. HCV 中不同种类蛋白对 UPR 通路的调节; B. HCV 中不同蛋白对凋亡通路的调节^[27]

图 1 HCV 中不同种类蛋白对相关通路的调节

Fig 1 Regulation of correlated pathways by different proteins in HCV

参考文献:

[1] Alzahrani N, Wu MJ, Shanmugam S, *et al.* Delayed by design: role of suboptimal signal peptidase processing of viral structural protein precursors in flaviviridae virus assembly [J]. *Viruses*, 2020,12;1090. doi: 10.3390/v12101090.

[2] Ríos-Ocampo WA, Navas MC, Buist-Homan M, *et al.* Hepatitis C virus proteins core and NS5A are highly sensitive to oxidative stress-induced degradation after eIF2α/ATF4 pathway activation[J]. *Viruses*, 2020,12;425. doi: 10.3390/v12040425.

[3] D'souza S, Lau KC, Coffin CS, *et al.* Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2020,26;5759-5783.

- [4] Cansiz-Erson C, Kayisli UA, Guzel E. The role of unfolded protein response in the pathogenesis of endometriosis: contribution of peritoneal fluid[J]. *Reprod Biomed Online*, 2021,42:1-15.
- [5] Aydin Y, Kurt R, Song K, *et al.* Hepatic stress response in HCV infection promotes STAT3-mediated inhibition of HNF4A-miR-122 feedback loop in liver fibrosis and cancer progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2019,11:1407. doi: 10.3390/cancers11101407.
- [6] Huang W, Liao CC, Han Y, *et al.* Co-activation of Akt, Nrf2, and NF- κ B signals under UPRER in torpid *Myotis ricketti* bats for survival[J]. *Commun Biol*, 2020,3:658. doi: 10.1038/s42003-020-01378-2.
- [7] Hernandez C, Blanc EB, Pène V, *et al.* Impact of hepatitis C virus and alcohol, alone and combined, on the unfolded protein response in primary human hepatocytes [J]. *Biochimie*, 2020,168:17-27.
- [8] Bashir S, Banday M, Qadri O, *et al.* The molecular mechanism and functional diversity of UPR signaling sensor IRE1 [J]. *Life Sci*, 2020, 11: 118740. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118740.
- [9] Zhao D, Yang J, Han K, *et al.* The unfolded protein response induced by Tembusu virus infection[J]. *BMC Vet Res*, 2019,15:34. doi: 10.1186/s12917-019-1781-4.
- [10] Bao Y, Pu Y, Yu X, *et al.* IRE1B degrades RNAs encoding proteins that interfere with the induction of autophagy by ER stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Autophagy*, 2018,14:1562-1573.
- [11] Li S, Ye L, Yu X, *et al.* Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF- κ B activation[J]. *Virology*, 2009,391:257-264.
- [12] Zheng Y, Gao B, Ye L, *et al.* Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response[J]. *J Microbiol*, 2005,43:529-536.
- [13] Takahashi S, Sato N, Kikuchi J, *et al.* Immature core protein of hepatitis C virus induces an unfolded protein response through inhibition of ERAD-L in a yeast model system[J]. *Genes Cells*, 2017,22:160-173.
- [14] Chan SW, Egan PA. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response[J]. *FASEB J*, 2005,19:1510-1512.
- [15] Egan PA, Sobkowiak M, Chan SW. Hepatitis C virus envelope protein E1 binds PERK and represses the unfolded protein response[J]. *Open Virol J*, 2013,7:37-40.
- [16] Yi S, Chen K, Zhang L, *et al.* Endoplasmic reticulum stress is involved in stress-induced hypothalamic neuronal injury in rats via the PERK-ATF4-CHOP and IRE1-ASK1-JNK pathways[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019,13:190. doi: 10.3389/fncel.2019.00190.
- [17] Takaki H, Akazawa Y, Kido Y, *et al.* Hepatitis C virus infection increases c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation and accentuates hepatocyte lipoapoptosis[J]. *Med Sci Monit*, 2017,23:4526-4532.
- [18] Ma X, Yu M, Hao C, *et al.* Shikonin induces tumor apoptosis in glioma cells via endoplasmic reticulum stress, and Bax/Bak mediated mitochondrial outer membrane permeability[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020,263:113059. doi: 10.1016/j.jep.2020.113059.
- [19] Poole MI, Sorribes I, Jain HV. Modeling hepatitis C virus protein and p53 interactions in hepatocytes: Implications for carcinogenesis[J]. *Math Biosci*, 2018,306:186-196.
- [20] Yao Z, Song X, Cao S, *et al.* Role of the exogenous HCV core protein in the interaction of human hepatocyte proliferation and macrophage sub-populations[J]. *PLoS One*, 2014,9:e108278. doi: 10.1371/journal.pone.0108278.
- [21] Axley P, Ahmed Z, Ravi S, *et al.* Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: a narrative review[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018,6:79-84.
- [22] Boyer A, Dreneau J, Dumans A, *et al.* Endoplasmic reticulum detergent-resistant membranes accommodate hepatitis C virus proteins for viral assembly[J]. *Cells*, 2019, 8:487. doi: 10.3390/cells8050487.
- [23] Ríos-Ocampo WA, Daemen T, Buist-Homan M, *et al.* Hepatitis C virus core or NS3/4A protein expression preconditions hepatocytes against oxidative stress and endoplasmic reticulum stress[J]. *Redox Rep*, 2019,24:17-26.
- [24] Javed F, Manzoor S. HCV non-structural NS4A protein of genotype 3a induces mitochondria mediated death by activating Bax and the caspase cascade[J]. *Microb Pathog*, 2018,124:346-355.
- [25] Xie Z, Xiao Z, Wang F. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein (HCV-NS5A) inhibits hepatocyte apoptosis through the NF- κ B/miR-503/bcl-2 pathway [J]. *Mol Cells*, 2017,40:202-210.
- [26] Quan M, Liu S, Zhou L, *et al.* Hepatitis C virus nonstructural 5A protein inhibits the starvation induced apoptosis of hepatoblastoma cells by increasing Beclin 1 expression [J]. *Oncol Rep*, 2019,41:3051-3059.
- [27] Li S, Kong L, Yu X. The expanding roles of endoplasmic reticulum stress in virus replication and pathogenesis[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2015,41:150-164.