

基于病毒宿主相互作用的抗流感病毒宿主靶标的研究进展

段 铭综述 王升启* 审校

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850)

摘要:流感病毒是严重危害人类健康与生命的主要病毒之一。流感病毒感染致病涉及到病毒与机体二者之间的相互作用,其复制和致病都需要宿主细胞因素的参与。病毒与宿主相互作用研究可为病毒性疾病的预防和治疗提供理论依据,有助于发现来源于宿主系统的抗流感病毒药物靶标。基于病毒与宿主相互作用,本文就流感病毒感染过程各环节中宿主细胞潜在药物靶标的研究进展做一综述。

关键词:流感病毒;宿主;靶标

中图分类号:R511.7 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2006)05-0365-04

流感病毒可引起急性呼吸道传染病,以A型流感威胁最大,且易发生变异。目前临床批准使用的抗流感病毒药物有:阻断流感病毒基质蛋白 α (matrix protein 2, M2)离子通道活性的金刚烷胺类化合物(金刚烷胺和金刚乙胺)和阻断病毒神经氨酸酶(neuraminidase, NA)与其受体结合的NA抑制剂。前者只能特异抑制A型流感病毒而对B型流感病毒无效,且可产生恶心、呕吐、消化不良,以及抑郁、焦虑等神经系统的副作用,33%的患者在用药5d后会由于M2蛋白单个氨基酸突变而产生耐药性^[1]。NA抑制剂高效、低毒、极少产生耐药性,对A和B型流感病毒均有效,但是随着临床上的广泛使用,目前已有相关耐药毒株的报道^[2]。

病毒感染致病涉及病毒与机体两个复杂生物系统及其二者间的相互作用。一方面,宿主表现出对病毒感染的主动限制;另一方面,病毒会主动地使宿主细胞为其感染和复制提供必需的细胞机器^[3]。尽管流感病毒的受体遍布于许多细胞,但并非所有的细胞都能有效地被感染,说明有些宿主因子在流感病毒感染致病过程中的重要性。因此,更好地了解病毒感染所需的细胞辅助因子将有助于推动新型抗流感病毒治疗和辅助治疗方法的研究。

1 蛋白激酶C和活化的激酶C受体

流感病毒通过细胞内吞进入被感染的细胞,后从内吞体中释放。蛋白激酶的活性在细胞内吞过程中具有重要的作用。蛋白激酶C(PKC)超家族至少有12个不同的异构体,在许多细胞生化进程中起着多样化的调控作用。

流感病毒血凝素(hemagglutinin, HA)可以快速激活PKC^[4]。Kunzelmann等^[5]发现流感病毒进入细胞时可激活PKC,并使PKC与其细胞表面的受体相结合。PKC抑制剂双吡啶马来酰亚胺I(bisindolylmaleimide I)能抑制A型流感病毒在细胞内的复制,且抑制呈现剂量依赖和可逆的作用方式,对B型流感病毒同样有效。而在感染病毒2h后使用双吡啶马来酰亚胺I对病毒增殖的影响则较小,可见PKC主要作用于流感病毒感染进入细胞的初始阶段^[6]。Sieczkarski等^[7]使用PKC β II磷酸化缺陷细胞的研究表明,PKC β II特异地为流感病毒内吞运输所需。细胞缺乏PKC β II活性时流感病毒会集聚在内吞体中,PKC β II是流感病毒进入细胞后内吞过程中的一个调控蛋白。此外,Chen等^[8]证实流感病毒降低大鼠肺泡II型细胞Na⁺通道的打开,抑制了肺泡腔内液体的清除,进而引起肺泡性水肿和气体交换困难。使用磷脂酶C抑制剂(U-73122)、Src抑制剂(PP2)和PKC抑制剂(GF-109203X)的进一步实验说明,流感病毒抑制上皮Na⁺通道是通过磷脂酶C和Src介导的PKC的激活。因此特异的药物干扰PKC可能有助于在病毒进入靶细胞的起始阶段就阻止流感病毒的感染,并控制感染后期肺泡腔内的炎性渗出。常用的PKC抑制剂有PKC412,UCN01,Go6976,

收稿日期:2006-01-19

基金项目:国家科技攻关计划高致病性禽流感防治技术研究与开发(2004BA519A35)资助

作者简介:段铭,男,在读博士研究生,研究方向:抗病毒反义药物, Tel: 010-66931422, E-mail: duanmingjdx2000@163.com

* 通讯作者:王升启,男,研究员,研究方向:药物分析, Tel: 010-66932211, E-mail: Sqwang@nic.bmi.cn

LY333531,反义寡核苷酸等,其中有的已用于治疗目的的研究,例如 Ro318220 可以抑制人脑和胃肿瘤细胞的生长^[9],UCN-01 在体内外具广谱地抗肿瘤作用^[10]。目前进入临床阶段研究的 PKC 抑制剂还不能特异抑制 PKC 的某一种功能或某个异构酶,所以靶向某个异构酶特异位点、不同激活通路或特异膜相互作用(例如与活化的激酶 C 受体 RACK 相互作用)的小分子抑制物则是研究的方向。

RACK1 是一个细胞内受体,可以与激活型的 PKC 结合,锚定细胞膜和细胞骨架上丝氨酸/苏氨酸特异的 PKC,使其最大限度地接近底物(包括流感病毒 M1 蛋白)。流感病毒的 M1 蛋白在病毒感染周期中有多样化的调控功能,包括介导病毒 RNA 从细胞核中运出和病毒的组装、出芽等。Reinhardt 等^[11]利用酵母双杂交发现,RACK1 可以和流感病毒的 M1 蛋白相互作用,从而参与介导 M1 蛋白行使功能。RACK1 可与禽、猪和人源 A 型流感病毒的 M1 蛋白相互作用,说明了 M1-RACK1 相互作用的保守性。磷酸化为目前已知的 M1 蛋白的修饰方式,且 PKC 为 M1 在细胞内主要的磷酸化酶,M1 蛋白的磷酸化会因 PKC 抑制剂的存在而显著下降。RACK1 使得 PKC 更加有效地接近 M1 蛋白,从而完成对其的磷酸化修饰。干扰 RACK1 可能是 PKC 通路中另一个抗流感病毒的切入点。

2 Raf/MEK/ERK 信号通路

Raf/MEK/ERK 信号通路是由一个小 GTP 结合蛋白连接活化的受体酪氨酸激酶和胞浆蛋白激酶级联反应,是“丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)”众多通路中的一个。

流感病毒的转录发生在感染细胞的细胞核中,病毒基因组 RNA 与核蛋白形成核糖核蛋白体(ribonucleoproteins, RNP)。组装成子代病毒颗粒前,RNP 要运出细胞核进入细胞质。流感病毒感染可导致细胞 Raf/MEK/ERK 通路激活。使用特异的抑制剂(U0126)阻断此通路后,病毒 RNP 会大量滞留在细胞核中,核运出蛋白(NEP/NS2)的功能受损,病毒复制被抑制,说明 Raf/MEK/ERK 信号通路为流感病毒 RNP 运出细胞核和病毒增殖所必需^[12]。Olschlager 等^[13]在犬肾细胞(Madin Darby Canine kidney, MDCK)内瞬时表达了有活性的和显性抑制突变的 Raf 或 MEK,结果显示,表达有活性的 Raf 或 MEK 后病毒的增殖明显增加,而显性抑制突变体的

表达产生了与之相反的结果。流感病毒感染的肺脏中表达活性 Raf 的 Raf-BxB 转基因小鼠,表现出比野生型小鼠更严重的临床症状和死亡率。免疫组化结果显示,流感病毒在 Raf-BxB 小鼠肺中更多地定位于肺泡上皮细胞,说明流感病毒对于表达活性 Raf 的细胞具有强烈的趋向性。B 型流感病毒同样可以激活 Raf/MEK/ERK 信号通路,且 Raf 和 ERK 显性抑制突变体的表达或使用 U0126 处置后可强烈地抑制 B 型流感病毒的增殖^[14]。MEK 抑制剂满足了抗流感病毒药物的两个要求,即在各种类型细胞中均未表现出明显的细胞毒性和未发现耐药毒株产生的趋势^[12,14],说明流感病毒不能轻易适应 Raf/MEK/ERK 信号通路的缺失。目前 Raf/MEK/ERK 通路抑制剂在肿瘤、慢性髓细胞性白血病的治疗研究中取得了一定的进展,且 MAPK 抑制剂抗白血病的活性已进入临床前研究^[15,16],说明激酶信号通路有作为治疗靶点的可能。

3 半胱天冬酶 3

流感病毒感染细胞的凋亡是有利于病毒的复制还是有利于宿主细胞的防御尚存在争论。半胱天冬酶 3(caspase-3)是一个主要的广受关注的效应 caspase,其在凋亡调控中具有核心作用。

Wurzer 等^[17]通过 caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK 和 siRNA 抑制了 MDCK、非洲绿猴肾细胞(Vero)和人肺上皮细胞 A549 内 caspase-3 的活性,流感病毒的增殖随后受到了抑制,病毒的 RNP 滞留在细胞核中,子代病毒颗粒不能正常形成,说明 caspase-3 的凋亡活性为流感病毒有效增殖所必需,病毒 RNP 从细胞核至细胞质的迁移是一个 caspase 依赖的过程。caspase 的活性本身与核运输装置无关,但是有报道,激活的 caspase 直接或间接地增加了核孔复合体的扩散能力,可以允许大分子蛋白的被动扩散^[18]。流感病毒可能利用了凋亡的早期事件(例如 caspase-3 的活性)促进自身的增殖,细胞的这种应答在某个时间点支持了病毒的感染进程。caspase 依赖的 RNP 迁移的机制不同于 Raf/MEK/ERK 信号通路,两者并不彼此影响,却协同支持了病毒生活周期中的同一环节。MEK 抑制剂对于病毒 RNP 运出的抑制存在一定程度的泄漏^[12],这种泄漏可能是由于 caspase 介导的 RNP 的被动扩散。尽管 caspase3 的抑制可以降低病毒滴度,但同时也会延长细胞的存活,剩余病毒可能会在更多的细胞内达到一个更高

的病毒滴度,因此 caspase-3 抑制剂能否用于抗流感病毒目前仍不能确定,还需要在动物模型上验证以得出结论。

4 核运出受体蛋白

核运出受体蛋白(CRM1)可与核质中富含亮氨酸的核运出信号(nuclear export signals, NES),以及 Ran-GTP 形成复合体,介导底物的运出^[19]。许多包含核运出信号的病毒蛋白都可与 CRM1 发生相互作用。

使用 CRM1 抑制剂 leptomycin B(LMB)后,流感病毒的核蛋白(nucleoprotein, NP)会滞留在细胞核中,而 CRM1 的过表达则引起 NP 蛋白在细胞质中集聚。在感染早期 NP 蛋白分布于整个受感染细胞的核中,LMB 处置后 NP 重分布于核质的外周,但 M1 或非结构蛋白 2(nonstructural protein 2, NS2)在细胞核中的分布不受此影响^[20]。流感病毒的 NS2 蛋白为病毒 RNP 运出细胞核所需,改变 NS2-NES 可以影响 RNP 的运出和流感病毒的增殖。NS2 蛋白可与 CRM1 相互作用,但却不依赖于 NS2 的 NES,说明 NS2-NES 对于其与 CRM1 之间的相互作用并不关键,但可能在与 Ran-GTP 形成运输复合体中有着关键作用^[21]。Paragas 等^[22]使用酵母双杂交实验证实,B 和 C 型流感病毒的 NS2 蛋白可以与个别亚群核孔蛋白和 CRM1 相互作用,CRM1 也参与了 B 和 C 型流感病毒的核质运输。影响核运出后,病毒的组件不能运出细胞核,进而成熟病毒粒子的组装就会受到抑制,这是病毒生活周期中的重要一环,也为抑制流感病毒提供了新的着眼点。

5 IKK-NF- κ B 通路

核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)的激活是包括流感病毒在内的大多数病毒感染的标志之一,是宿主应答病毒感染的重要组件。流感病毒的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA),HA, NP 或 M1 蛋白的过表达均能够激活 IKK-NF- κ B 通路^[23]。许多炎症因子或抗病毒细胞因子的表达都由 NF- κ B 所调控,例如干扰素(IFN) β 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[24]。

激活的 NF- κ B 信号通路为流感病毒感染所必需,低 NF- κ B 活性的细胞能有效抗流感病毒感染的感染,反之则使得细胞更加易感。阻断人肺上皮细胞 A549 和 U1752 中 NF- κ B 的激活可以抑制流感病毒的感染和增殖^[25]。此外,NF- κ B 还可以负调控 IFN

所诱导基因的表达和生物活性,由此通过调控 NF- κ B 的活性还可提高 IFN 的治疗效果或减小 IFN 的用量^[26]。NF- κ B 抑制剂目前已用于治疗炎症疾病和自身免疫性疾病^[27],而局部使用 NF- κ B 抑制剂可作为一个治疗手段来阻止流感病毒在呼吸道上皮组织中的进一步扩散,但这还需要在动物模型上的进一步验证。

6 OX40

虽然流感病毒的清除是抗病毒的核心,但是 T 细胞应答过激也会导致呼吸道阻塞,以及一系列病理改变。因此抑制 T 细胞可能成为治疗流感病毒感染的新方法。OX40 又称 CD134,是 TNF 受体家族的成员之一,属活化后诱导表达,即只表达于活化的 T 细胞表面,且主要是 CD4⁺ T 细胞,CD8⁺ T 细胞表面有少量表达。表达 OX40 的 T 细胞只在炎症处存在,其生物学功能主要限于效应性 CD4⁺ T 细胞,以 OX40 为靶点不会影响其他正常部位和外周 T 细胞库。

用 OX40 :Ig 融合蛋白治疗因流感病毒感染所致肺部出现过度免疫应答而导致呼吸窘迫的小鼠时显示了明显的优势。一方面它能减轻因过度的免疫应答而出现的呼吸困难,另一方面又不影响机体对病毒的清除。OX40 在炎症情况下通常在 T 细胞激活后 24 h 内会表达于 T 细胞的表面。OX40 表达动力学显示,流感病毒感染 4 d 后其表达量达到最高,阻止 OX40 与其配体间的相互作用可以减轻体重下降趋势和炎症症状,同时并不影响病毒的清除^[28-29],这为流感病毒引起的肺脏免疫应答失调的治疗提供了新的思路。

7 结语

目前的抗病毒药物通常靶向病毒的组件,而病毒总是能够很快地适应和逃避来自药物施加的选择压力。通过不断地了解和认知支持病毒感染的宿主的基因,人们已经认识到这些基因可以作为潜在的治疗靶标,以便于更好地应对病毒的突变、逃避和新发传染病。流感病毒感染细胞后会引发细胞内许多生化通路的级联反应,其中有些通路是纯粹的抗病毒,而有的通路可能会支持病毒的复制。在短时间内不影响细胞存活且能为宿主细胞所能容忍的前提下,增强抗病毒信号或者阻断病毒复制所需的宿主细胞因子可以有效地抗病毒及降低耐药毒株产

生的频率。尽管靶向宿主因子可能会产生副作用，但是局部给药则常常可以接受。

基于宿主靶点抗艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎病毒的研究近年来进展较快，其思路和研究方法都可作为流感病毒的研究所借鉴。随着流感病毒与宿主相互作用研究的不断深入，有可能发现更加有效和低副作用的宿主靶点，而特异有效的小分子抑制剂的开发，将使得基于宿主抗病毒的可能成为现实。

参 考 文 献

- [1] Stiver G. The treatment of influenza with antiviral drugs[J]. *CMAJ* , 2003 , 168(1) :49 - 56 .
- [2] de Jong MD , Tran TT , Truong HK , et al . Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection[J]. *N Engl J Med* , 2005 , 353(25) :2667 - 2672 .
- [3] Casadevall A , Pirofski LA . Host-pathogen interactions : redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity[J]. *Infect Immun* , 1999 , 67(8) :3703 - 3713 .
- [4] Arora DJ , Gasse N . Influenza virus hemagglutinin stimulates the protein kinase C activity of human polymorphonuclear leucocytes[J]. *Arch Virol* , 1998 , 143(10) :2029 - 2037 .
- [5] Kunzelmann K , Beesley AH , King NJ , et al . Influenza virus inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in respiratory epithelia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , 97(18) :10282 - 10287 .
- [6] Root CN , Wills EG , McNair LL , et al . Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor [J]. *J Gen Virol* , 2000 , 81(Pt11) :2697 - 2705 .
- [7] Siczekarski SB , Brown HA , Whittaker GR . Role of protein kinase C beta II in influenza virus entry via late endosomes[J]. *J Virol* , 2003 , 77(1) :460 - 469 .
- [8] Chen XJ , Seth S , Yue G , et al . Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* , 2004 , 287(2) :L366 - L373 .
- [9] Barry OP , Kazanietz MG . Protein kinase C isozymes , novel phorbol ester receptors and cancer chemotherapy[J]. *Curr Pharm Des* , 2001 , 7(17) :1725 - 1744 .
- [10] Maioli E , Fortino V . Protein kinase C : a target for anticancer drugs ? [J]. *Endocr Relat Cancer* , 2004 , 11(2) :161 - 162 .
- [11] Reinhardt J , Wolff T . The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C[J]. *Vet Microbiol* , 2000 , 74 (1/2) :87 - 100 .
- [12] Pleschka S , Wolff T , Ehrhardt C , et al . Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade [J]. *Nat Cell Biol* , 2001 , 3(3) :301 - 305 .
- [13] Olschlager V , Pleschka S , Fischer T , et al . Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice[J]. *Oncogene* , 2004 , 23(39) :6639 - 6646 .
- [14] Ludwig S , Wolff T , Ehrhardt C , et al . MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants [J]. *FEBS Lett* , 2004 , 561(1 - 3) :37 - 43 .
- [15] Adjei AA . The role of mitogen-activated ERK-kinase inhibitors in lung cancer therapy[J]. *Clin Lung Cancer* , 2005 , 7(3) :221 - 223 .
- [16] Milella M , Kornblau SM , Andreeff M . The mitogen-activated protein kinase signaling module as a therapeutic target in hematologic malignancies[J]. *Rev Clin Exp Hematol* , 2003 , 7(2) :160 - 190 .
- [17] Wurzer WJ , Planz O , Ehrhardt C , et al . Caspase-3 activation is essential for efficient influenza virus propagation[J]. *EMBO J* , 2003 , 22(11) :2717 - 2728 .
- [18] Faleiro L , Lazebnik Y . Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier[J]. *J Cell Biol* , 2000 , 151(5) :951 - 959 .
- [19] Fornerod M , Ohno M , Yoshida M , et al . CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals[J]. *Cell* , 1997 , 90(6) :1051 - 1060 .
- [20] Elton D , Simpson-Holley M , Archer K , et al . Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1 - mediated nuclear export pathway[J]. *J Virol* , 2001 , 75(1) :408 - 419 .
- [21] Neumann G , Hughes MT , Kawaoka Y . Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1[J]. *EMBO J* , 2000 , 19(24) :6751 - 6758 .
- [22] Paragas J , Talon J , O'Neill RE , et al . Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities[J]. *J Virol* , 2001 , 75(16) :7375 - 7383 .
- [23] Flory E , Kunz M , Scheller C , et al . Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase[J]. *J Biol Chem* , 2000 , 275(12) :8307 - 8314 .
- [24] Chu WM , Ostertag D , Li ZW , et al . JNK2 and IKKb are required for activating the innate response to viral infection[J]. *Immunity* , 1999 , 11(6) :721 - 731 .
- [25] Nimmerjahn F , Dudziak D , Dirmeier U , et al . Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection[J]. *J Gen Virol* , 2004 , 85(Pt 8) :2347 - 2356 .
- [26] Wei L , Sandbulte MR , Thomas PG , et al . NF-kB negatively regulates interferon-induced gene expression and anti-influenza activity [J]. *J Biol Chem* , 2006 , 281(17) :11678 - 11684 .
- [27] Pierce JW , Schoenleber R , Jesmok G , et al . Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaB alpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*[J]. *J Biol Chem* , 1997 , 272(34) :21096 - 21103 .
- [28] Hussell T , Snelgrove R , Humphreys IR , et al . Co-stimulation : novel methods for preventing viral-induced lung inflammation[J]. *Trends Mol Med* , 2004 , 10(8) :379 - 386 .
- [29] Humphreys IR , Walz G , Edwards L , et al . A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection[J]. *J Exp Med* , 2003 , 198(8) :1237 - 1242 .