

人乳头瘤病毒结构蛋白在病毒感染中的作用研究进展

孙媛媛, 苗季, 夏宁邵

(厦门大学 生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005)

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2008)01-0079-04

人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)属于乳多空病毒科(Papovaviridae)的乳头瘤病毒属,是一种无包膜的双链DNA病毒,能诱发人的皮肤或粘膜产生疣和乳头状瘤,某些基因型与子宫颈癌密切相关。病毒的基因组有7.2~8.0kb,编码了8个早期蛋白和两个晚期蛋白,早期蛋白功能主要涉及病毒基因组的复制、转录调控和诱导宿主细胞发生转化,晚期蛋白L1、L2为病毒的衣壳蛋白。天然的HPV病毒粒子由360个L1和12个L2组成,72个L1的五聚体模块组成了T=7的二十面体对称结构,一个L2分子与一个L1五聚体相互作用。体外表达的L1蛋白可独自组装成病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs),也可包裹外源报告基因,形成假病毒,L1 VLPs能模拟天然病毒的结构,并诱导高滴度中和抗体的产生。

HPV现有120余种型^[1],依据HPV的致癌性又可分为低危型和高危型,低危型常常在良性病灶中检测到,与外生殖器及肛门区的尖锐湿疣关系密切,常见的有HPV6、11等;高危型常存在于癌组织中,如宫颈癌、外生殖器癌,主要有HPV16、18、31等型。

HPV通过皮肤或口腔和生殖器粘膜感染,病毒粒子通常以物理方式进入皮肤或粘膜破损处暴露的基底细胞,基底细胞是病毒复制的场所,在非结构蛋白E1、E2的调控下,病毒借助细胞的DNA合成材料合成自身DNA,E6、E7抑制宿主细胞周期和细胞的分化,使之持续合成病毒DNA。直到基底细胞分化、上移成为成熟的角质细胞,并使皮肤增厚,成为疣(wart),DNA复制停止,晚期蛋白L1、L2合成并组装为成熟的病毒颗粒,并释放^[2]。

现在学术界普遍接受病毒与细胞膜受体结合主要由L1介导,细胞表面的 $\alpha 6$ 整联蛋白($\alpha 6$ integrin)、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(Surface heparan sulfate proteoglycans, HSPG)可能参与了这一过程^[3,4],L2在病毒基因组包装和病毒进入

细胞后的感染过程中发挥着重要作用,它不能单独形成病毒颗粒。L2上的相应结构域能够破裂病毒内体(eosome)、介导病毒基因向核内运输、辅助子代病毒基因组包装和结构蛋白的组装^[5,6]。

1 结构蛋白与病毒受体或辅助受体的相互作用

1.1 L1与细胞受体 L1在HPV各型之间是极为保守的,但各型所用的受体似乎并不一致,而且针对HPV是否有严格意义上的特异性细胞膜受体这一问题,学术界还存在着争议。早在1997年,Magnus Evander等用免疫共沉淀技术找到了能与HPV6 L1 VLP作用的 $\alpha 6$ 整联蛋白($\alpha 6$ integrin), $\alpha 6$ integrin和 $\beta 4$ integrin以复合物的形式共同作用, $\alpha 6$ integrin是L1的结合位点,二者在细胞表面的相互作用能被它们的特异性抗体所阻断。至此提出 $\alpha 6$ integrin是HPV6b的受体。作为进一步的验证,他们在阴性细胞DG75中感染表达了 $\alpha 6$ integrin,发现细胞对HPV6b L1 VLPs由不吸附变得可以吸附^[3,7],但由于缺乏真病毒的验证, $\alpha 6$ integrin的受体地位一度受到质疑。Elizabeth Payne^[8]和Thomas Fothergill^[9]等分别对HPV6的感染做了进一步的研究,发现病毒与受体结合后可以激活Ras-MAP Kinase途径,ras通过PI3释放抗凋亡信号。Ras-MAP kinase途径和PI3 kinase途径的激活可以促进细胞分裂,提供更有利与病毒感染的环境。

然而,Gary Sibbet等用BPV4感染人和牛的角质细胞的研究发现,病毒的感染不依赖于 $\alpha 6$ integrin的存在, $\alpha 6$ integrin似乎并不是HPV的唯一受体^[10]。HPV33、16、11等的L1能够结合HSPG^[11],一系列实验证明HSPG中的硫酸肝素聚糖侧链能够与L1相互作用,HSPG的表达能增强假病毒对COS-7和HaCat等细胞的感染,肝素酶能够阻断假病毒的感染和L1 VLPs的吸附^[4,12,13],在阴性细胞K512中分别表达硫酸肝素家族中的Syndecans1、Syndecans4和glypican1,HPV11感染3d后RT-PCR检测早期基因E1~E4的RNA,结果为阳性,证明硫酸肝素对HPV11的感染是必须的^[13]。此外细胞外基质中的一些未知物质也有辅助感染的作用^[14]。

L1也可与其他膜蛋白相互作用,但这些可能是受体的蛋白还未得到确定。Ricardo发现HPV16 L1的54~77和274~308多肽能够结合到69kD至54kD的3个膜蛋白上,并且阻断L1 VLPs的结合,但尚未确定该靶蛋白。对L1的

收稿日期:2007-07-06;修回日期:2007-09-26

基金项目:福建省科技重大专项(2004Y201);厦门市科技重大专项(3502Z20041008);福建省科技创新项目(2006F3124)

作者简介:孙媛媛(1982-),女,吉林白山市人,在读硕士研究生,生物化学与分子生物学。

通讯作者:夏宁邵,361005厦门,厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心。(E-mail:nsxia@jingxiang.xmu.edu.cn)

结构分析证明以上两个区段是暴露在病毒颗粒表面的,这两个区段很可能是受体结合位点,在 HPV 18 上与该区段同源的多肽也与细胞有较高的亲和力,提示 HPV 某些型很可能共用相同的受体^[15]。

1.2 次要衣壳蛋白 L2 与受体 最近的研究发现次要衣壳蛋白 L2 能够促进病毒的感染,以 L1 为衣壳的 HPV16 假病毒比 L1、L2 共组装形成的假病毒的感染效率高 60% 以上。L2 上有一段保守区(108~120)能够结合到 COS-1 和 HeLa 细胞的膜蛋白上,值得注意的是 HPV6 上有针对该区段的中和表位,它很可能也是病毒入侵的关键位点^[9]。2003 年 Rongcun 等用流式细胞技术发现 L2 的 13~31 区也能够结合到膜上,这种结合对肝素酶和胰酶是不敏感的。由于 L1 VLP 和二者共组装的 VLP 都对肝素酶和胰酶敏感,提示上述区段可能没有暴露在病毒表面。就此一种新的感染模型提出:HPV 首先借助 L1 吸附到肝素等初级受体上,导致衣壳蛋白的变构,使 L2 上的 13~31 区域被暴露出来,该区段能够与第二受体结合,介导病毒内化,这种第二受体对肝素酶和胰蛋白酶都是不敏感的^[16]。

无论是 $\alpha 6$ integrin 还是 HSPG 都被证明是一些病毒的辅助受体,在病毒感染中起到增强吸附作用,例如: HSPG 也是单纯疱疹病毒(HSV)的辅助受体分子,起到调节病毒入侵的作用。HPV 的受体是什么?受体与哪种结构蛋白相互作用?对以上问题还存在一定争议,L1 与蛋白多糖等物质的黏附在感染过程中是必须的,但他们可能只起到辅助作用,L2 能与细胞结合,但尚未发现其功能性受体,多数学者倾向于承认 L2 在病毒内化以后的过程发挥重要作用。

2 病毒的脱衣壳与基因组的核转运

2.1 两种可能的内吞途径 HPV 与受体结合后有两种可能的内吞途径,通过网格蛋白(clathrin)介导的内吞形成内体如:HPV 16、58 等,在 HPV 中对该途径的研究比较多。通过电镜观察形态特征、特异性药物对内吞途径的阻断等实验证明 HPV 31 和 BPV 1(Bovine papillomavirus 1)有不同的内吞及运输途径,他们采用陷穴蛋白(caveolae)介导的内吞机制^[17, 18]。Ioannis Bossis 发现 BPV1 L2 的 N 端 40~44 位(DKILK)能与锚定在 ER 上的 syntaxin18 蛋白相互作用。用 BPV1 的假病毒感染 293T 细胞,电镜观察 7 h 后在 ER 中发现了病毒粒子,同时发现含有大量病毒粒子的膜泡(vesicle),有些膜泡已经融解,把病毒粒子释放到核周区^[19]。由于在 HPV L2 的 N 端也发现 DKILK 序列,提示 HPV 也可能通过上述途径进行核运输。

无论通过何种途径,HPV 内化(internalization)进入细胞质后,都要脱衣壳释放出内部基因,病毒基因向细胞核运输,在核中完成子代病毒的基因复制和衣壳包装。

2.2 病毒脱衣壳和基因组的核运输 Rebecca M R 等人证明,L2 介导的病毒基因组的释放需要经过 furin 蛋白酶对 L2 N 端进行剪切才能完成,切割可能有以下几方面意义: ①使病毒基因得以释放; ②使 L2 更容易结合到下游蛋白(例如:syntaxin 18)上完成胞内运输; ③避免被 L2 N 端特异性

的中和抗体所识别,是一种免疫逃逸的表现^[20]。蛋白酶对 L2 的剪切可能发生在包膜外或早期内体中,随后衣壳蛋白解聚,L2/基因复合物在 L2 C 末端的具有强的裂膜活性(Membrane-disrupting activity)的功能域的辅助下,从内体中释放出来^[21]。

释放后 L2/病毒基因复合物在动力蛋白(dynein)和微管蛋白的协助下向核运输^[22],L2 上有两个核定位信号,能够通过核转运蛋白(Karyopherin Kap)家族介导的核运输途径,从核孔复合体进入细胞核^[23]。L1 不参与基因的运输。

3 子代病毒的颗粒包装

HPV 的在细胞核完成病毒基因的复制和 mRNA 的转录,mRNA 经核孔复合体进入细胞质,在胞质中翻译成各种功能性的蛋白质。L1 和 L2 都有核定位信号(NLS),翻译后能够进入核孔,在核内完成病毒的包装^[23, 24]。研究结果表明:L1 和 L2 是分别组装的,L2 先于 L1 进入细胞核内的 ND10(Nuclear domain 10),ND10 是大量细胞因子的聚集处,这个微环境有利于子代病毒的组装;L1 在细胞质内自发形成五聚体,然后入核参与组装。L2 向 ND10 的运输是在 Hsc70(Heat shock cognate protein 70)的介导下完成的^[25]。

L2 可与 ND10 区的多种蛋白相互作用,如转录抑制物 Daxx、转录激活因子 Sp100 等^[26]。L2 还可将 L1 和 E2 等病毒蛋白募集到核内^[27],E2 是病毒重要的调控因子,能够与病毒 DNA 特异结合。L2 与 Daxx 的结合位点与同 L1 的结合位点有重叠,因此 L1 可能替换 Daxx 与 L2 结合以启动结构蛋白的组装,进而包裹基因。总之 L2 与各种因子瞬时或持续的相互作用干扰了 ND10 区的蛋白分布,使之形成了新的布局,为子代病毒组装提供合适的条件,同时募集 L1、E2-病毒 DNA 复合物,促进病毒基因组的包裹和颗粒的组装。

4 总结

HPV 的衣壳蛋白 L1 与细胞膜上的 HSPG 和 $\alpha 6$ integrin 相互作用,介导病毒内吞形成内体,在 L2 C 端破膜区域的辅助下,内体破裂释放出 L2/病毒基因复合物,L2/基因复合物通过结合在 actin 和 dynein 上实现沿细胞骨架的运输,最后把基因带入核内。L1 蛋白进入细胞后的作用不为人知。病毒基因组复制、转录、表达蛋白产物后,L2 在胞质内 Hsc70 的作用下先于 L1 进入核内的 ND10 亚区,募集各种蛋白因子,调节微环境,然后再按比例与 L1 一起包装病毒基因组形成有感染性的病毒粒子。

5 研究难点与展望

结构蛋白 L1 和 L2 在病毒的感染过程中起着至关重要的作用,由于缺乏有效的体外培养模型,对 HPV 感染过程的研究主要限于用 VLP 和包裹外源报告基因的假病毒。病毒样颗粒和假病毒尽管与天然病毒具有相同的衣壳蛋白结构单元,但由于缺乏早期蛋白的调控,病毒衣壳蛋白的组装可能与天然病毒存在一定差异,它不能完全真实地模拟病毒的感染。HPV 有多种型,尽管结构蛋白的同源性较高,但他们与受体结合、内吞和胞内运输的机制都有所差异,根据血

清学分析,各型之间的中和抗体没有交叉反应,这为病毒诱发疾病的预防及治疗带来了难题,也给我们的研究工作提出了较高的要求。

深入了解 HPV 结构蛋白在病毒感染中的作用为抗病毒药物的设计提供了契机,例如,病毒与宿主细胞表面受体结合后进入细胞的过程是病毒生命周期中的一个关键步骤,以病毒受体为靶点的药物设计有望为 HPV 治疗另辟蹊径。由于 HPV 的 L1 蛋白能够形成 VLP, VLP 具有很强的免疫原性,能够诱导出高滴度的中和抗体,使用 L1 的 VLP 进行预防性疫苗的研究已获成功,含 HPV 16、18、6 和 11 型 L1-VLPs 的多价 HPV 疫苗已经上市。另一种是构建嵌合疫苗, L2 的 N 端具有很高的保守性,可以产生针对多种型的中和性抗体。把 L1 上的某个特定区段替换成 L2 的 N 端区域,免疫小鼠可以产生 L2 的保护性抗体^[28],这意味着 HPV 的通用疫苗有望成为可能。

参考文献:

- [1] Tindle R W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 59-65.
- [2] Frazer I H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(1): 46-54.
- [3] Evander M, Frazer I H, Payne E, et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses[J]. *J Virol*, 1997, 71(3): 2449-2456.
- [4] Shafti Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, et al. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses[J]. *J Virol*, 2003, 77(24): 13125-13135.
- [5] Yang R, Day P M, Yutzy W H T, et al. Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection[J]. *J Virol*, 2003, 77(6): 3531-3541.
- [6] Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, et al. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm[J]. *J Virol*, 2001, 75(5): 2331-2336.
- [7] McMillan N A, Payne E, Frazer I H, et al. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells[J]. *Virology*, 1999, 261(2): 271-279.
- [8] Payne E, Bowles M R, Don A, et al. Human papillomavirus type 6b virus-like particles are able to activate the Ras-MAP kinase pathway and induce cell proliferation[J]. *J Virol*, 2001, 75(9): 4150-4157.
- [9] Fothergill T, McMillan N A. Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding[J]. *Virology*, 2006, 352(2): 319-328.
- [10] Sibbet G, Romero-Graillet C, Meneguzzi G, et al. Alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 2): 327-334.
- [11] Girolglou T, Florin L, Schafer F, et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate[J]. *J Virol*, 2001, 75(3): 1565-1570.
- [12] Rommel O, Dillner J, Fligge C, et al. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA[J]. *J Med Virol*, 2005, 75(1): 114-121.
- [13] Joyce J G, Tung J S, Przysiecki C T, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(9): 5810-5822.
- [14] Culp T D, Budgeon L R, Christensen N D. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor[J]. *Virology*, 2006, 347(1): 147-159.
- [15] Vera-Bravo R, Ocampo M, Urquiza M, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 L1 protein peptide binding to VERO and HeLa cells inhibits their VLPs binding[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(3): 416-424.
- [16] Yang R, Yutzy W H T, Viscidi R P, et al. Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 12546-12553.
- [17] Bousarghin L, Touze A, Sizaret P Y, et al. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells[J]. *J Virol*, 2003, 77(6): 3846-3850.
- [18] Day P M, Lowy D R, Schiller J T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway[J]. *Virology*, 2003, 307(1): 1-11.
- [19] Bossis I, Roden R B, Gambhira R, et al. Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection[J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 6723-6731.
- [20] Richards R M, Lowy D R, Schiller J T, et al. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(5): 1522-1527.
- [21] Kamper N, Day P M, Nowak T, et al. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for

gress of papillomavirus genomes from endosomes[J]. J Virol, 2006, 80(2): 759-768.

[22] Florin L, Becker K A, Lambert C, et al. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2[J]. J Virol, 2006, 80(13): 6694-6696.

[23] Medha S, Darshan J L, Harding E, et al. The L2 minor capsid protein of human papillomavirus Type 16 interacts with a network of nuclear import receptors[J]. J Virol, 2004, 78(22): 12179-12188.

[24] Nelson L M, Rose R C, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV 16 L1 major capsid protein [J]. J Biol Chem, 2002, 277(26): 23958-23964.

[25] Florin L, Becker K A, Sapp C, et al. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70[J]. J Virol, 2004, 78(11): 5546-5553.

[26] Becker K A, Florin L, Sapp C, et al. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization[J]. Virology, 2003, 314(1): 164-167.

[27] Florin L, Sapp C, Streeck R E, et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins[J]. J Virol, 2002, 76(19): 10009-10014.

[28] Varsani A, Williamson A L, de Villiers D, et al. Chimeric human papillomavirus Type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16 [J]. J Virol, 2003, 77(15): 8386-8393.



“病毒性肝炎: 成就与挑战”国际研讨会

International Conference on Viral Hepatitis: Past Accomplishments and Unfulfilled Quests(ICVH2008)

“病毒性肝炎: 成就与挑战”国际研讨会(ICVH2008)经教育部批准将于2008年4月15日至17日在福建厦门举行(<http://nidvd.xmu.edu.cn/icvh2008.asp>)。此次会议由中国生物技术发展中心主办,由厦门市科技局、厦门大学、国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心、中国微生物学会病毒学专业委员会联合承办。会议由乙肝病毒发现者之一、美国科学院院士 Harvey J. Alter 担任大会主席,会议邀请在各型肝炎病毒的发现及预防领域做出重大贡献的科学家 Stephen M. Feinstone, John L. Gerin 等做特邀报告。会议将回顾60年多来人类与病毒性肝炎斗争中取得的标志性成果,探讨现有科技水平下病毒性肝炎研究依然面临的关键

科学和实践问题,预测病毒性肝炎研究发展的趋势,探讨发展中国家新发肝炎研究与防治策略,为未来病毒性肝炎基础及防治研究指引方向。会议将采取主题演讲与圆桌讨论相结合的方式,提供一个与世界各国科学家面对面交流的机会。欢迎在病毒性肝炎领域从事基础研究、临床研究、公共卫生、生物医药产业等方面的科学家、临床医生、卫生防疫工作者、企业技术骨干及科技决策部门、医疗卫生决策部门管理人员参加本次会议并投稿,会议论文一律用英文书写,把在病毒性肝炎研究领域取得的最新研究结果和技术方法等的论文和摘要,以WORD电子文档形式, E-mail 至 hldu@xmu.edu.cn 和 jwshih@xmu.edu.cn。