

病毒入胞机制研究方法及其研究进展

孙芳^{1,2} 李玉霞¹ 凌焱¹ 梁龙¹ 陈珊² 陈惠鹏^{1*}

(1. 军事医学科学院 生物工程研究所 北京 100071)

(2. 东北师范大学 吉林 长春 130024)

摘要: 多数病毒家族利用胞吞作为入侵宿主细胞的途径。胞吞既可以介导病毒内化,也可以将病毒运输到复制位点。已知的胞吞途径包括:网格蛋白依赖型内吞、小窝蛋白依赖型内吞、巨胞饮和网格蛋白、小窝蛋白非依赖型内吞。随着对胞吞过程中各组分结构和功能了解的日趋深入,研究胞吞过程以及病毒入侵过程的手段也变得更有效,特异性更高。目前,化学抑制剂的使用仍十分普遍,但该方法常非特异性地阻断细胞某些功能。一些分子抑制方法,如过表达显性负突变体和 siRNA 技术等,因其对单一途径的特异性阻断,使得应用分子型抑制剂逐渐取代了化学抑制剂。本文主要分析了研究病毒入侵途径时所使用的实验方法,并列举了一些实例。

关键词: 病毒入胞,胞吞,网格蛋白,小窝蛋白,巨胞饮

Experimental Approaches and the Development of Virus Entry

SUN Fang^{1,2} LI Yu-Xia¹ LING Yan¹ LIANG Long¹
CHEN Shan² CHEN Hui-Peng^{1*}

(1. Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

(2. Northeast Normal University, Changchun, Jilin 130024, China)

Abstract: Numerous virus families utilize endocytosis to infect host cells, mediating virus internalization as well as trafficking to the site of replication. The endocytic pathways utilized include clathrin-mediated endocytosis, caveolae, macropinocytosis and non-clathrin, non-caveolae pathways. The tools to study endocytosis and, consequently, virus entry are becoming more effective and specific as the amount of information on endocytic component structure and function increases. Now, the use of inhibitory drugs, although still quite common, often leads to non-specific disruptions in the cell. Molecular inhibitors in the form of dominant-negative proteins and siRNA have surpassed the use of chemical inhibitors in terms of specificity to individual pathways. This review focuses on the experimental approaches taken to examine virus entry and provides some examples on a variety of virus families.

Keywords: Virus entry, Endocytosis, Clathrin, Caveolae, Macropinocytosis

近年来, SARS、甲型流感 H5N1、H1N1 亚型等病毒性传染病对人类健康形成了巨大的威胁, 进一步深入了解病毒性病原体感染的分子机制是认识、控制及预防病毒性传染病的重要途径。作为一种专性细胞内寄生物, 每种病毒都拥有一套入侵靶细胞并起始复制的方式。病毒入胞通常由靶细胞表面的特异分子介导, 该分子作为病毒受体参与病毒的识别与结合等过程。对于动物细胞, 病毒主要通过 2 种方式完成这一过程: 一种是直接穿过细胞质膜; 另一种是通过形成细胞内颗粒的方式, 即利用胞吞作用入胞。后一种方式可以为病毒的产出性感染 (Productive infection) 提供许多益处: 对于不要求低 pH 环境的病毒来说, 内吞小体 (Endosomes) 可以为病毒提供方便快捷的运输载体, 使病毒顺利通过拥挤的细胞质; 对于需要低 pH 环境的病毒, 内吞小体内的低 pH 环境可以触发病毒表面蛋白的构象改变, 从而促进病毒穿透细胞质膜并完成脱壳。内吞小体中的病毒必须调节内吞小体的 pH 值以激活构象, 否则会被送入溶酶体中降解^[1]。病毒也经常利用胞吞作用定位于细胞内特殊位置以达到成功感染的目的。例如, 对于核内复制病毒, 内吞小体可以将病毒运输到核孔附近, 为病毒进入核质内做好准备^[2]。对病毒入胞机制研究的不断深入, 不仅可以使我们更好地理解、认识病毒的致病性, 而且可以使我们针对病毒生命周期中新的药物靶点设计抗病毒药物、研制疫苗等, 从而起到对病毒感染的预防和治疗作用。

本文简要概述了病毒利用胞吞途径入侵宿主细胞的一些研究进展, 包括一些经典途径以及近期发现的动物病毒入侵宿主细胞的非经典途径, 并概述了研究内吞途径的多种方法。

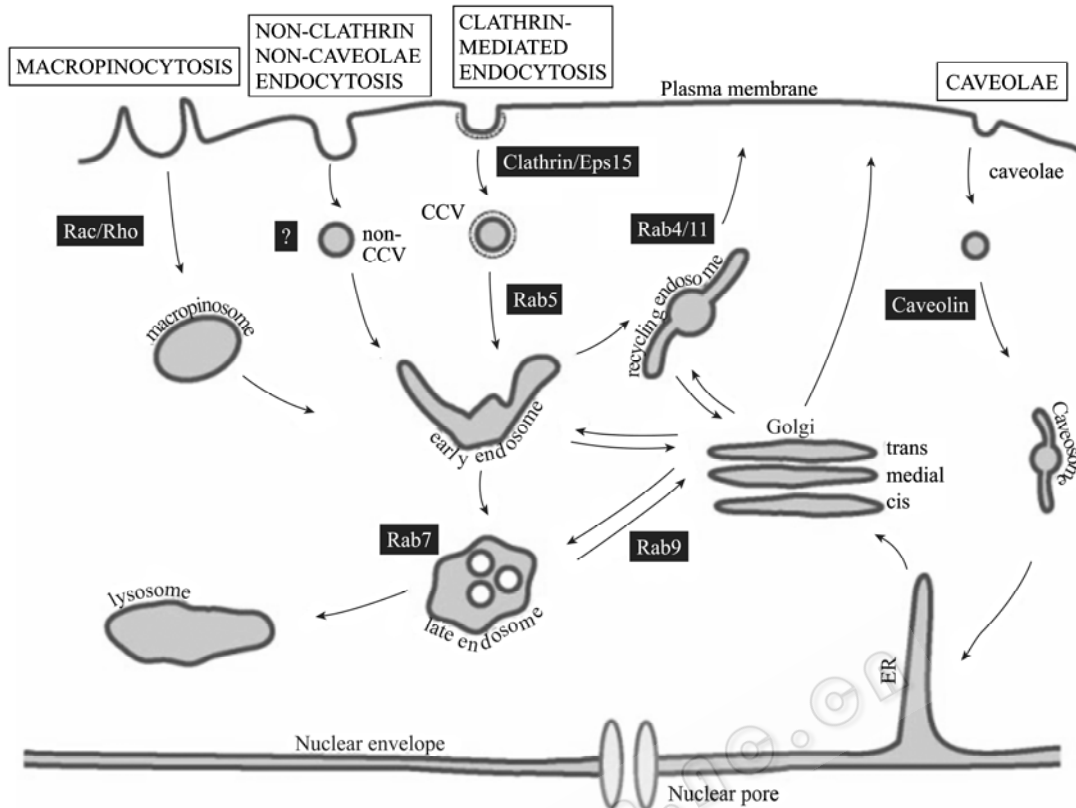
1 网格蛋白 (Clathrin) 依赖型内吞作用

网格蛋白在许多病毒的内化过程中扮演重要角色。目前, 对网格蛋白依赖型入胞的机制研究得较为清楚。细胞膜上的多种受体通过该途径摄取胞外大分子, 其中最典型的是转铁蛋白受体, 因此, 可以利用转铁蛋白作为标志分子研究网格蛋白依赖型内吞作用。简单的说, 披网格蛋白小泡是由网格蛋白包被, 里面为衔接蛋白 (Adaptor)。披网格蛋白小泡存在于所有具核的细胞中, 它们是蛋白质和脂类

从质膜运到胞内的方式, 也是蛋白质和脂类从反式高尔基网状物 (Trans-Golgi network, TGN) 到核内体的载体^[3]。网格蛋白小泡从质膜上分离需要发动蛋白 (Dynamin)、肌动蛋白 (Actin) 和它们的配体, 如 Intersectin、Syndapin、Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) 和 Cortactin 的共同参与^[4]。

病毒依赖网格蛋白入胞这一过程可概括为: 膜受体识别病毒上的受体配体并与之结合, 形成受体-配体复合物, 配体与受体结合激活某些蛋白激酶, 使膜受体分子上特定基序被磷酸化, 这些基序被称为入胞基序 (Motif)^[5]。入胞基序的磷酸化使膜受体分子构象发生改变, 暴露了受体上与适配子蛋白的结合部位——信号序列。受体的信号序列直接或间接地与一种适配子蛋白——接合素-2 (Adaptor protein, AP-2) 结合, 形成接合素-2-受体复合物, 接合素-2 又能结合网格蛋白, 从而使受体-配体复合物向衣被凹陷处集中。衣被凹陷的胞浆侧富含网格蛋白; 衣被凹陷进一步向胞浆侧凹入, 当接合素-2 受体复合物与网格蛋白相互作用, 使胞膜内陷处呈现囊泡状时, 一种名为发动蛋白 (Dynamin) 的 GTP 酶与接合素-2 发生作用, 发动蛋白能在囊泡与胞膜连接的颈部形成一个环状结构, 通过水解 GTP 改变自身构象, 使环状结构收缩, 实现囊泡与胞膜的脱离^[7]。网格蛋白依赖型入胞对许多包膜病毒的内化起重要作用, 其中包括 Semliki Forest virus^[8]、VSV^[9] 和 Junin virus^[10] 等 (图 1)。

最初, 阻断网格蛋白依赖型入胞主要通过 3 种方法: 低 pH 休克法、钾缺乏和用化学抑制剂处理细胞^[6]。钾缺乏和低渗休克, 曾被用来研究网格蛋白在人类鼻病毒感染中的作用, 这类方法可能特异性高一些。化学抑制剂包括布雷菲德菌素 A (BFA)^[5]、哌酮头孢菌素 (CPZ) 和氯丙嗪 (Chlorpromazine)^[11]。哌酮头孢菌素 (CPZ) 能引起网格蛋白网络在胞内体膜上的装配, 但同时阻止内陷小窝在细胞表面的装配。在研究 Junin arenavirus 入胞时, 用病毒感染 CPZ 处理过的细胞, 其感染率降低了 90% 以上^[12]。氯丙嗪是目前研究病毒入胞过程使用较广泛的一种化学抑制剂。在研究 Polyomavirus JC virus^[13]、Picornavirus parechovirus type 1^[14] 和 HPV16^[15] 等多种病毒的入胞途径时, 都曾用氯丙嗪阻断网格蛋白依赖型入胞。但是, 用化学抑制剂处理细胞可能特异性较差。

图 1 病毒借助胞吞作用入侵宿主细胞的主要途径^[6]Fig. 1 Summary of the major routes of endocytosis used by viruses^[6]

例如, BFA 以分泌途径中的 ADP 核糖基化因子 GTP 酶交换因子为靶点; 氯丙嗪则以多种细胞内酶和受体为靶点, 这可能会改变胞浆特性。所以, 化学抑制剂可能对细胞产生多重效应。例如, 曾有研究者用氯丙嗪阻断网格蛋白依赖型入胞来研究 HPV16 的入胞, 实验证明 HPV16 为网格蛋白依赖型入胞。但近期, 研究者又用构建显性负突变体 (Dominant-negative mutant versions) 的实验方法证明 HPV16 的入胞是非网格蛋白依赖型的^[16]。所以, 用化学抑制剂处理细胞可以一定程度上达到特异性阻断某一入胞途径的目的, 但应用此方法研究病毒入胞途径时需要谨慎, 应做好实验设计。

构建细胞内蛋白的显性负突变体为研究分析特定胞吞途径提供了一个更为特异的方法。显性负突变体既可由胞吞途径中的结构蛋白获得, 如发动蛋白 (Dynamin) 和小窝蛋白 (Caveolin), 也可由胞吞途径中起调节作用的蛋白获得, 主要的如小的 GTP 酶类和激酶类。当过表达这种显性负突变蛋白时, 它具有显性阻断完整野生型蛋白质功能的能力。这种

方法广泛用于研究细胞中 GTP 酶类的功能^[17]。显性负突变体可以隔离效应器和起调节作用的分子, 有效关闭内源性野生蛋白的功能。此方法的不足之处是: 由于细胞中各个分子的相互作用呈现网络结构, 所以过表达显性负突变体可能会对后续分子间相互作用产生间接的抑制作用。

研究病毒入胞的过程中, 常常应用构建显性负突变体的方法分析发动蛋白所起的作用。发动蛋白是一种与披网格蛋白小泡释放有关的 GTP 酶类。发动蛋白的显性负突变体 Dynamin K44A 对于研究病毒入胞过程十分有益。应用这种分子抑制剂研究病毒入胞的第 1 篇报道是关于牛败血病病毒, Sindbis 病毒和鼻病毒^[18]。随后, 对鼻病毒入胞过程的研究证实了这一显性负突变体的作用^[19]。但是认为 Dynamin K44A 的作用是改变胞内体的 pH 值。

由于发动蛋白具有多效性, 研究者还需要寻找针对网格蛋白依赖型入胞更为特异的分子抑制剂。其中一个例子是 Eps15 蛋白, 它具有多个结合位点, 既能与衣被凹陷处胞膜上的受体结合, 又能与衔接

蛋白 AP-2 相互作用, 而 AP-2 是参与网格蛋白包被小泡内化的。缺失 Eps15 的 EH 结构域可以改造出 Eps15 蛋白的显性负突变体, 该突变体可以阻止网格蛋白包被小泡的装配^[20], 也可以阻止网格蛋白依赖型入胞作用的分子标志物——转铁蛋白的内化。其他的一些抑制网格蛋白依赖型入胞的方法还包括: 过表达网格蛋白的中心结构域(Hub domain), 该方法可以抑制网格蛋白包被小泡的正常装配^[19]; 也可以过表达 AP-2 的 $\mu 2$ 亚基, 该方法可以特异性抑制识别 YXX Φ 基序信号序列的 AP-2 介导的内吞, 但并不抑制识别二亮氨酸“DPExxLL”信号序列介导的内吞^[21]。在这些特异性抑制网格蛋白和 AP-2 的方法中, 较常用的是 Eps15 蛋白的显性负突变体。研究乳头瘤病毒(Papillomavirus Type 16)入胞途径所用的方法就是过表达 Eps15 的显性负突变体, 然后根据细胞摄入转铁蛋白的效率来评价 Eps15 显性负突变的功能。研究者构建了 2 种不同的 Eps15 显性负突变体, 这 2 种突变体都是与 GFP 融合的。一种突变体为 ED95/295, 该突变体部分缺失 DI 结构域; 而另一种突变体缺失大段的 N 末端, 只留下 C 末端的 DIII 结构域。与以前的结果相似, 过表达这两种突变体都能有效地阻断网格蛋白依赖的转铁蛋白的内吞。而 HPV16 的入胞并不因细胞过表达这两种突变体而受到影响, 也就是说, HPV16 的入胞是不依赖网格蛋白的^[15]。

研究者期望可以发现更多有助于研究病毒入胞机制的分子抑制剂。上文提到的特异性抑制网格蛋白依赖型入胞的各种方法中, 因过表达显性负突变蛋白而被抑制的胞吞作用可能会通过不依赖网格蛋白的其他胞吞途径得到补偿。因此, 采用这一方法时也需要谨慎, 并且应该在尽可能短的时间内完成实验。另一点值得注意的是, 对发动蛋白功能的阻断可能会妨碍细胞表面病毒受体的功能, 结果导致吸附的病毒量增多^[22]。

2 膜穴样凹陷(Caveolae)依赖型内吞作用

最近, 膜穴样凹陷(Caveolae)介导的内吞成为病毒入胞的另外一条重要途径。Caveolae 是细胞表面特异性内陷结构, 小窝蛋白(Caveolin)是 Caveolae 的表面标记蛋白, 是许多信号分子的支架蛋白和负性调节蛋白, 属于高度保守的完整膜蛋白家族^[23]。

目前已确定的小窝蛋白家族成员有: Caveolin-1 α 、Caveolin-1 β 、Caveolin-2 和 Caveolin-3。Caveolins 二聚体相互作用促进 Caveolae 烧瓶状结构的形成。Caveolae 主要由胆固醇和神经鞘脂类构成。它的蛋白质分为结构蛋白和功能蛋白两种。结构蛋白包括 Caveolins、Flotillins、Cavatellins。Caveolins 通过脚手架结构域直接锚定到胞膜上, 有利于稳定 Caveolins 二聚体。功能蛋白包括 G 蛋白偶联受体、生长因子受体、受体酪氨酸激酶、蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)、一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)、腺苷酸环化酶、磷脂酶 D、G2 蛋白、Ras 和 MEK/ERK 等^[24]。Caveolae/Caveolins 的生理功能主要表现在维持细胞胆固醇进出平衡、调节 NOS 的功能、辅助脂质小滴的形成、参与细胞增殖、迁移和信号传递等^[24-26]。此外, Caveolae/Caveolins 还介导激素、毒素和病原体(包括细菌和病毒)等许多物质的内吞。

病毒首先吸附于易感细胞。吸附主要是通过病毒的包膜或无包膜病毒衣壳表面的配体与细胞表面的特异性受体结合。对于依赖 Caveolae 入胞的病毒, 一般在易感细胞 Caveolae 内富含它们的受体。许多肠道病毒如 Group B coxsackieviruses (CVBs), 首先结合到衰减加速蛋白(Decay-accelerating factor, DAF)——一种糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白, 病毒与 DAF 结合促使 DAF 聚集成簇, 进而诱发两种激酶的活化, 其中一种为 Fyn 激酶, 活化后的 Fyn 能使 Caveolin-1 磷酸化, 然后病毒由 Caveolae 介导侵入细胞^[27]。病毒转移到 Caveolae 后触发一系列信号转导, 从而诱发 Caveolae 的内陷、内吞小泡的形成和脱离。Caveolin 小泡脱离细胞膜时, 一种小分子 GTP 结合蛋白 DynaminII 被招募到 Caveolae 处, 在 Caveolae 颈部装配成环, Dynamin II 水解 GTP, 引起颈部缢缩, 最终脱离质膜形成 Caveola 囊泡(图 1)。

Caveolae 依赖型入胞被认为是病毒入胞的某种特殊方式, 无包膜病毒如 SV40^[28-29], Picornaviruses^[27,30]和 Polyoma-virus^[31]都采用这种方式入胞。对多瘤病毒属 Simian virus 40(SV40)的研究表明: 病毒与内源性小窝蛋白(Caveolin)共存; 利用绿色荧光蛋白(GFP)标签的 Caveolin-1 和电视显微镜检查技术, 观察到病毒从 Caveolae 直接到达内质网^[32]。与网格蛋白依赖型入胞相比: 小窝蛋白依赖型入胞

的速度慢,形成的囊泡不发生酸化;蛋白质磷酸酶抑制剂能促进入胞;而胆固醇抽提剂和 Ca^{2+} 、磷脂依赖的蛋白激酶(PKC)的激活剂则抑制入胞;Caveolae 依赖型内吞不是组成型表达的过程,它只在某种细胞刺激下才会发生^[33]。

Caveolae 依赖型入胞需要保持 Caveolae 的完整性,即 Caveolae 中存在胆固醇。所以,用胆固醇抽提剂——制霉菌素(Nystatin)、非律平(Filipin)、孕酮(Progesterone)和甲基- β -环糊精(Methyl- β -cyclodextrin, M β CD)处理易感细胞,病毒的感染数量会明显降低。这些化学抑制剂可以分离胆固醇,而胆固醇是 Caveolae 形成过程中脂筏的主要成分。甲基- β -环糊精被证明可以移除细胞膜上的胆固醇^[34-35]。制霉菌素、孕酮和非律平可以特异地结合于细胞膜上胆固醇富集区域,并分解胆固醇,同时也可以干扰胆固醇的合成。但是,现已发现甲基- β -环糊精对细胞有一些副作用,它能够影响病毒入胞后的下游事件,例如抑制钙通道^[36]。但是这些化学抑制剂对网格蛋白依赖型内吞都不起作用^[37]。Caveolae 依赖型内吞还需要酪氨酸激酶的活化。活化的酪氨酸激酶可以磷酸化 Caveolae 中的有关蛋白质以及微丝微管蛋白等,从而启动一系列的信号转导、微丝微管的解聚和装配,诱发内吞^[15]。所以,一些可以抑制酪氨酸激酶活性和抑制肌动蛋白、微管、微丝等装配的化学抑制剂,也可以用来研究 Caveolin 依赖型内吞。例如,STI571(Abl 激酶特异性抑制剂)、Genistein(酪氨酸激酶非特异性抑制剂)、PP2(Src 家族激酶特异性抑制剂)等^[27,38]。

Caveolins 是细胞质膜微囊形成过程中最具特征的蛋白。Caveolins 要行使其功能需要完整的 N 末端。删除 Caveolin-3 的 N 末端序列可以构建出该蛋白的显性负突变体。实验证明,过表达这种显性负突变体可以阻止 SV40^[39]和 Echovirus-1^[40]入胞。在对 SV40 和 HPV31 入胞机制的研究中,在 Caveolin-1 的 N 末端加上 GFP 标签可以达到相似的效果,而与 C 末端融合的嵌合蛋白得到的仍是野生型蛋白^[15]。在对旧大陆沙粒病毒(Old World arenaviruses)^[38]和 Cocksackievirus^[27]入胞机制的研究中,研究者构建出带 GFP 标签的 Caveolin-1 的显性负突变体 Cav-1Y14F,该显性负突变体将 Caveolin-1 的 Tyr¹⁴ 突变成苯丙氨酸。因此, Y14 位酪氨酸残基不能被磷

酸化,也就缺失了 Caveolin-1 的部分功能。

Fluorescent CTxB conjugate 是已确立的 Caveolin 依赖型内吞的标志分子,它可以用来验证细胞内 Caveolin 蛋白水平的降低或突变是否会导致 Caveolin 依赖型内吞作用的功能障碍。与对照细胞相比,在去除 Caveolin 的细胞周围吸附同等量 CTxB 的情况下,将细胞在 37°C 孵育 30 min 后,即允许细胞进行胞吞作用,对照细胞摄入 CTxB,而去除 Caveolin 的细胞内没有检测到 CTxB。这样可以证明依赖 Caveolin 的胞吞作用是否被抑制^[41]。

在研究 PICV 的入胞是否是由 Caveolin 介导时,研究者选择了 Human hepatoma 7 (Huh7) cells 作为研究对象,因为这种细胞天然缺乏功能性小窝蛋白,这就为研究提供了方便^[42-43]。

3 巨胞饮(Macropinocytosis)

巨胞饮是一种非特异的内吞形式,它不依赖于配体结合于特异性受体,而是在某些因素刺激下,细胞膜皱褶形成大且不规则的原始内吞小泡,这些原始内吞小泡被称为巨胞饮体。它为非选择性地内吞细胞外营养物质和液相大分子提供了一条有效途径。细胞膜皱褶的形成最初是由肌动蛋白驱使的,与吞噬作用相似,巨胞饮常发生在专性免疫细胞中参与免疫反应,如中性白细胞和吞噬细胞。细胞膜皱褶和巨胞饮体的形成对细胞质酸化非常敏感。在巨噬细胞中,巨胞饮体向细胞中心移动,由脱水而变小,酸化。在其短暂的存在期,它们从早期胞内体样的细胞器(Early-endosome-like organelle)转变成晚期胞内体样的细胞器(Late-endosome-like organelle),然后与溶酶体完全融合^[44]。这就为某些病原菌通过巨胞饮入侵宿主细胞提供了可能途径(图 1)。

巨胞饮体的形成主要在细胞膜皱褶部位,可受如 PI3 激酶、Rho 蛋白家族的成员之一 Rac、P21-活化的激酶(P21-activated kinases, PAKs)、肌球蛋白、WASP 相互作用蛋白(WASP-interacting protein, WIP)和胆固醇等调节^[45]。巨胞饮的形成存在 2 种机制。一种是磷脂酰肌醇(PI)3 激酶(PI3K)依赖的细胞膜环形皱褶关闭形成巨胞饮体,另一种是 PI3K 非依赖的,肌球蛋白 II 依赖的细胞膜皱褶关闭形成巨胞饮体。所以 PI 激酶的抑制剂,如渥曼青霉素(Wortmannin)和 LY294002^[46-47]可以用来阻断巨胞

饮。而肌球蛋白在巨胞饮中参与了细胞运动,所以细胞松弛素类药物也常被用做巨胞饮的抑制剂,特别是细胞松弛素 D^[48]。Rho 蛋白家族的小 GTPases 可以调节肌动蛋白的重排,Rho 蛋白家族小 GTPases 的活性也可以调节巨胞饮的过程,所以 Rho 蛋白家族小 GTPases 的抑制剂如毒素 B 和阿米洛利也可以用来抑制巨胞饮的过程,其中阿米洛利的作用是抑制 Na⁺/H⁺交换。

近几年出现了一些抑制巨胞饮的分子生物学手段,如以 ARF-和 Rho 家族蛋白 GTPases 为靶点。过表达 ARF6 可以使其“锁定”在 GTP 结合的形式^[49]。而过表达 Rho 家族蛋白 GTPases 的显性负突变体^[47]和依赖 Rac 的激酶 PAK1 的自抑区^[50]都可以阻断巨胞饮过程。但是,这些方法都没有应用于病毒入胞的研究,而且这些方法的有效性及其特异性还有待于检验。目前,基于光学或电子显微镜对细胞膜皱褶处的病毒颗粒或大且不规则的原始内吞小泡进行观察的传统方法仍是研究病毒通过巨胞饮入胞的较好方法。

4 网格蛋白和小窝蛋白非依赖型内吞

在受激的细胞中,除了已经建立的网格蛋白依赖型、小窝蛋白依赖型和巨胞饮的内吞途径,人们还发现了网格蛋白和小窝蛋白非依赖的内吞途径。Marsh 等基于电镜技术观察到某些病毒能够以无包膜颗粒(Non-coated vesicles)的形式入胞(例如,流感病毒和仙台病毒)^[51],但由于当时缺乏明确的证据和对这一途径分子标记,并没有得出一个明确的结论。

近期的一些报道开始阐明网格蛋白和小窝蛋白非依赖的内吞途径。这条途径与质膜上抗胆固醇抽提剂的微小区域密切相关。白细胞介素-2(IL-2)受体可能是这一途径最具特征的标记分子。在不表达小窝蛋白的 T 细胞中,通过过表达显性负突变体的方法可以看到 IL-2R β 的摄取以及传递到次级内体和溶酶体的过程并不依赖于网格蛋白。最近研究表明:IL-2R β 的入胞需要 Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) 的参与,它的下游靶点是 p21-activated kinases (Paks)。应用 RNA 干扰技术,研究者发现 Pak1 和 Pak2 在 IL-2R β 的入胞过程中都发挥了作用,这是与网格蛋白依赖型入胞不同的。同

时,皮层蛋白和发动蛋白也参与了该过程^[4,52]。运用带 GFP 标签的 PI 锚定蛋白对另一条网格蛋白和小窝蛋白非依赖型入胞途径进行研究。这种对胆固醇敏感的入胞途径可以将胞外物质直接递送到高尔基体,绕过网格蛋白和早期内涵体的作用^[53](图 1)。Old World arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)的入胞是网格蛋白和小窝蛋白非依赖型的,也不需要发动蛋白和肌动蛋白的参与。LCMV 的入胞仅依赖于胆固醇^[38]。

特殊配体可以不依赖网格蛋白入胞,这一过程很可能与网格蛋白介导的内吞是同时发生的。总的来说,非网格蛋白依赖的内吞途径只有在网格蛋白的功能被特异抑制后才能观察到,这一现象是在研究脂质类似物的摄取过程发现的^[54]。

结合新的技术手段和工具可以在分子水平上对病毒入胞过程进行分析,具有更高特异性的分子抑制技术和 siRNA 技术,正逐步取代化学抑制剂法。RNA 干扰(RNA interference)——这一技术的应用将会使这一研究领域飞速发展。研究表明,将与 mRNA 对应的正义 RNA 和反义 RNA 组成的双链 RNA(dsRNA)导入细胞,可以使 mRNA 发生特异性的降解,从而抑制其翻译或触发降解机制导致其丰度下降,产生如同目的基因突变的缺陷表型,导致其相应的基因沉默,并且这种效应可以传递到子代细胞中。这种转录后基因沉默机制(Post-transcriptional gene silencing, PTGS)被称为 RNA 干扰(RNAi)。这一技术可以使研究者针对内吞途径中的特异分子进行干扰,从而为特异性研究单一的内吞途径提供了可能。为了阐明 Chlamydia 衣原体属的入胞机理,对可能参与衣原体入胞的 4 种内吞途径都进行了独立分析。RNA 干扰技术被用来特异地削弱这些内吞途径中研究较成熟的 9 种标记基因(Signature genes): (1) 网格蛋白介导的内吞[网格蛋白重链(Clatrin heavy chain)、发动蛋白-2(dynamin-2)、Hsc70、Arp2 和 Cortactin]; (2) 小窝蛋白介导的内吞(Caveolin-1); (3) 吞噬作用(RhoA、dynamin-2、Rac1 和 Arp2); (4) 巨胞饮(Pak1、Rac1 和 Arp2)。研究表明,C. trachomatis 的入胞依赖于功能性网格蛋白介导的内吞过程,而在这一过程中,小窝蛋白介导的内吞,吞噬作用和巨胞饮在这一过程中不起作用^[41]。

应用特异地针对单一细胞功能起作用的分子工具, 我们可以研究特定的胞吞途径。尽管如此, 这些技术仍存在一定的歧义和不确定性, 所以选择方法时仍需谨慎, 应做好实验设计。另外, 细胞途径存在许多可变性, 这也使病毒在直接入胞途径被阻断的情况下, 可能通过非直接的其他途径入胞。而且, 一种病毒也有可能正是通过多种方式入胞的。研究病毒入胞的其他技术手段还有实时单分子成像(In real-time single molecule imaging)技术, 这项技术可以实时监控病毒的侵染以及其后的病毒运输过程, 它可以排除一些非特异因素, 使对病毒入胞的研究和亚细胞结构上的病毒运输精确度更高。

目前, 病毒感染已成为危害公众健康的重要传染性疾病。今年爆发的 EV71 和 H1N1 流行病对全球影响极大, H5N1 也频繁感染人类。由于流感病毒本身基因组特点, 重组和重配现象时有发生, 使人畜共患疾病成为公众健康的严重威胁者。H5N1 及 H1N1 进入宿主细胞依赖于病毒囊膜与细胞膜的融合。HA 在病毒吸附及穿膜过程中起关键作用。H5N1 及 H1N1 突破种属屏障感染人的机理非常复杂。可以从病毒与宿主细胞相互作用的层面上加以说明。禽/猪流感病毒如果能在人群中稳定存在并流行开来, 必须获得与人呼吸道上皮细胞病毒受体良好的亲和力。最先可能的屏障是宿主细胞上缺乏合适的受体, 因此一个来自于其他物种的病毒其 HA 不能与该宿主细胞相粘接。但由于猪上皮细胞具有唾液酸-a-2,6 半乳糖苷(SAa-2,6-Gal)和 SAa-2,3-Gal 受体位点, 人流感病毒可与前者结合, 而禽流感病毒与后者结合, 当 2 个或 2 个以上流感病毒同时感染一个猪体细胞时, 在增殖过程中不同病毒的基因组片段可以随机重新组合, 产生新的流感病毒亚型, 猪也就成为毒株间基因重组的活载体^[55-56]。所以, 深入研究病毒的感染特性, 对于认识病毒如何识别宿主细胞表面特异受体, 以及研究病毒如何起始入胞等过程就显得尤为重要。

随着对病毒入胞机制研究的深入, 研究方法也变得更精确和严谨。病毒入胞机制是复杂的, 随着人们对这一过程认识的逐步深化, 也势必会遇到一些新问题。但是, 随着现代分子生物学的日臻完善, 尤其是新技术的不断涌现, 对病毒保守的蛋白空间结构以及在入胞过程中这些空间结构的变化认识也

会逐步加深, 会有更多的抑制病毒入胞的药物被开发出来。人们对病毒的致病机制的认识以及对病毒性传染病的防治也将会取得突破性进展。

参 考 文 献

- [1] Dimitrov DS. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(2): 109-122.
- [2] Whittaker GR, Helenius A. Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology*, 1998(246): 1-23.
- [3] 姚鹏程, 叶恭银. 网格蛋白介导的内吞作用机制. *生命科学研究*, 2003, 7(2): 22-25.
- [4] Grassart A, Dujeancourt A, Lazarow PB, et al. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *European Molecular Biology Organization*, 2008, 9(4): 356-362.
- [5] Brodsky FM, Chen CY, Kneuhl C, et al. Biological basket weaving: Formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001(17): 517-568.
- [6] Sieczkarski SB, Whittaker GR. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology*, 2002(83): 1535-1545.
- [7] 杜长征, 张志文. 受体介导式入胞的分子机理. *生物学通报*, 2004, 39(11): 13-15.
- [8] Sieczkarski SB, Whittaker GR. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 2002(76): 10455-10464.
- [9] Sun X, Yau VK, Briggs BJ, et al. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology*, 2005(338): 53-60.
- [10] Martinez MG, Cordo SM, Candurra NA. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol*, 2007(88): 1776-1784.
- [11] Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *Journal of Cell Biology*, 1993(123): 1107-1117.
- [12] Martinez MG, Cordo SM, Candurra NA. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *Journal of General Virology*, 2007(88): 1776-1784.
- [13] Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. Virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 2000(74): 2288-2292.
- [14] Joki-Korpela P, Marjomaki V, Krogerus C, et al. Entry of human parechovirus 1. *Journal of Virology*, 2001(75): 1958-1967.
- [15] Jessica L Smith, Samuel K Campos, Michelle A Ozbun. Human papillomavirus type 31 uses a caveolin1- and dynamin2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *Journal of Virology*, 2007, 81(18):

- 9922–9931.
- [16] Spoden G, Freitag K, Husmann M, *et al.* Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16-involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE*, 2008, **3**(10): e3313.
- [17] Feig LA. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nature Cell Biology*, 1999(1): E25–E27.
- [18] DeTulleo L, Kirchausen T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO Journal*, 1998(17): 4585–4593.
- [19] Bayer N, Schober D, Huttinger M, *et al.* Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype-cell entry. *Journal of Biological Chemistry*, 2001(276): 3952–3962.
- [20] Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, *et al.* Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *Journal of Cell Science*, 1999(112): 1303–1311.
- [21] Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, *et al.* Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant $\mu 2$ subunit and its effects on endocytosis. *EMBO Journal*, 1999(18): 2489–2499.
- [22] Parker JS, Parrish CR. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *Journal of Virology*, 2000(74): 1919–1930.
- [23] Das K, Lewis RY, Scherer PE, *et al.* The membrane spanning domains of caveolins 1 and 2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes *in vivo*. *J Biol Chem*, 1999, **274**(26): 18721–18726.
- [24] Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, *et al.* Caveolins, liquid ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 1999(19): 7289–7304.
- [25] Felley-Bosco E, Bender F, Quest AF. Caveolin-1-mediated post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in human colon carcinoma cells. *Biol Res*, 2002(35): 169–176.
- [26] Cohen AW, Razani B, Schubert W, *et al.* Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*, 2004(53): 1261–1270.
- [27] Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, 2006(124): 119–131.
- [28] Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 2001(3): 473–483.
- [29] Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 2002(296): 535–539.
- [30] Pietiäinen V, Marjomäki V, Upla P, *et al.* Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell*, 2004(15): 4911–4925.
- [31] Gilbert J, Benjamin T. Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol*, 2004(78): 12259–12267.
- [32] Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA, *et al.* Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Virology*, 2002(76): 5156–5166.
- [33] Ceresa BP, Schmid SL. Regulation of signal transduction by endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000(12): 204–210.
- [34] Beer C, Pedersen L, Wirth M. Amphotropic murine leukaemia virus envelope protein is associated with cholesterol-rich microdomains. *J Virol*, 2005, **79**(16): 10776–10787.
- [35] Choi K, Aizaki H, Lai M. Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell–cell fusion but not for virus release. *J Virol*, 2005(79): 9862–9871.
- [36] Liu S, Rodriguez A, Tosteson M. Role of simvastatin and methyl- β -cyclodextrin on inhibition of poliovirus infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006(347): 51–59.
- [37] Orlandi PA, Fishman PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalisation and activation through caveolae-like domains. *Journal of Cell Biology*, 1998(141): 905–915.
- [38] Rojek JM, Perez M, Kunz S. Cellular Entry of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of Virology*, 2008, **82**(3): 1505–1517.
- [39] Roy S, Luetterforst R, Harding A, *et al.* Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nature Cell Biology*, 1999(1): 98–105.
- [40] Marjomaki V, Pietiainen V, Matilainen H, *et al.* Internalization of echovirus 1 in caveolae. *Journal of Virology*, 2002(76): 1856–1865.
- [41] Hybiske K, Stephens RS. Mechanisms of Chlamydia trachomatis Entry into Nonphagocytic Cells. *Infection and Immunity*, 2007(75): 3925–3934.
- [42] Vela EM, Zhang L, Colpitts TM, *et al.* Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism. *Virology*, 2007(369): 1–11.
- [43] Damm E, Pelkmans L, Kartenbeck J, *et al.* Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol*, 2005(168): 477–488.
- [44] Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, 1995(5): 424–428.
- [45] 秦绿叶, 刘爽, 汪沉然, 等. 巨胞饮的机制及功能的研究进展. *生理科学进展*, 2006, **37**(1): 41–44.
- [46] Araki N, Johnson MT, Swanson JA. A role for phospho-

- inositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *Journal of Cell Biology*, 1996(135): 1249–1260.
- [47] West MA, Prescott AR, Eskelinen EL, *et al.* Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Current Biology*, 2000(10): 839–848.
- [48] Maniak M. Macropinocytosis in endocytosis. Edited by M. Marsh. Oxford: Oxford University Press, 2001: 78–93.
- [49] Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends in Cell Biology*, 2001(11): 406–412.
- [50] Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, *et al.* Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Molecular Biology of the Cell*, 2000(11): 3341–3352.
- [51] Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research*, 1989(36): 107–151.
- [52] Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular Cell*, 2001(7): 661–671.
- [53] Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, *et al.* Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *Journal of Cell Biology*, 2001(153): 529–541.
- [54] Puri V, Watanabe R, Singh RD, *et al.* Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *Journal of Cell Biology*, 2001(154): 535–547.
- [55] Russella RJ, Gamblina SJ, Hairea LF, *et al.* H1 hemagglutinin receptor complexes. *Int Congr Ser*, 2004(1263): 191–195.
- [56] Ito T, Kawaoka Y, Vines A, *et al.* Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. *Arch Virol*, 1998, **143**(9): 1773–1782.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白组学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 更换了彩色封面, 纸张改用铜版纸, 由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本 (210×297), 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2010 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: (010) 64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413