

[21] Yasuhara T, Kameda M, Agari T, et al. Regenerative medicine for Parkinson's Disease[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2015, 55(Suppl 1):113-123.

[22] Gaillard A, Jaber M. Rewiring the brain with cell trans-

plantation in Parkinson's disease[J]. Trends Neurosci, 2011, 34(3):124-133.

(收稿日期:2015-03-21 修回日期:2015-06-12)

• 综 述 •

棒状和环状蛋白在丙型肝炎病毒感染治疗中的研究进展

牛志立 综述, 张平安 审校(武汉大学人民医院检验科 430060)

【关键词】 丙型肝炎病毒; 聚乙二醇干扰素- α ; 利巴韦林; RR 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.23.065 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)23-3600-02

丙型肝炎病毒(HCV)是单股正链 RNA 病毒,全球超过 1.7 亿感染者,仅 15% 的感染者能自行清除 HCV,大部分发展为慢性持续性感染,部分患者可发展成为肝硬化和肝癌。临床治疗发现,标准化聚乙二醇干扰素(Peg-IFN- α)和利巴韦林联合用药,慢性丙型肝炎(简称丙肝)总体有效率不佳并且药物不良反应多。最近研究表明,HCV 感染者经 Peg-IFN- α 和利巴韦林联合治疗后,体内可出现棒和环状(RR)自身抗体,尤其在无应答和复发的患者中比率较高。本文将从 HCV、RR 结构,以及 HCV 治疗和 RR 抗体之间的关系进行分析,综述如下。

1 HCV

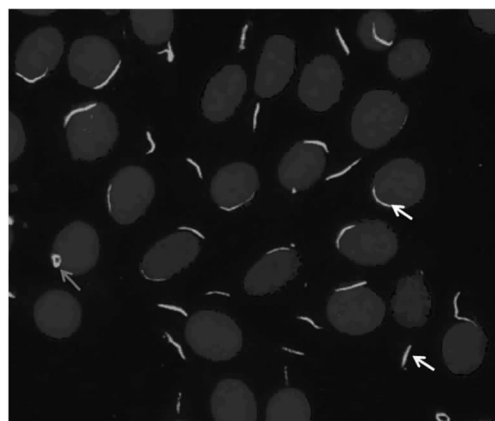
HCV 属于黄病毒科,是单股正链 RNA 病毒,其宿主限于人类和黑猩猩,可引起人类丙型肝炎[1]。HCV 基因全长约 9 600 kb,编码 3 014 个氨基酸多聚蛋白前体,经宿主细胞和病毒自身蛋白酶裂解成 3 种结构蛋白(核心蛋白、E1 和 E2)和 7 种非结构蛋白(P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)[2]。HCV 进入宿主细胞主要通过病毒蛋白和细胞表面分子 CD1、LDL 受体、清道夫受体 B1、紧密连接蛋白-1 和紧密连接蛋白 Occludin 相互作用,并借助细胞内机制完成自我复制[3]。由于其 RNA 依赖性 RNA 聚合酶缺乏 3'-5' 外切酶活性,从而导致 HCV-RNA 的高突变率[4]。目前研究发现,HCV 基因型有 6 型,其中基因型 1、2、4、5 普遍存在于非洲,而基因型 3 和 6 在亚洲较为常见[5]。

HCV 持续感染可能与病毒通过破坏宿主防御功能有关[6]。从 1990~2005 年,全球血清 HCV 抗体阳性率从 2.3% 上升至 2.8%。其中中亚和东亚、北非和中东患病率最高(>3.5%),东欧和西欧次之(1.5%~3.5%)。目前慢性丙型肝炎标准治疗方法是 Peg-IFN- α 和利巴韦林联合用药,但是总体有效率不佳,其中 HCV 1b 型慢性丙肝者仅为 50%[7]。同时, Peg-IFN- α 和利巴韦林联合治疗的不良反应和患者的耐受性差,以及治疗晚期患者的有效率较低的情况也不容忽视。近来研究发现,RR 自身抗体与 Peg-IFN- α 和利巴韦林联合治疗 HCV 感染具有一定的关系。

2 RR 结构

1987 年首次提出 RR 并命名为 Nematins,后被证实为棒状抗原。RR 是一种新型的细胞质结构,既不富含波形蛋白、微管蛋白或肌动蛋白,也没有与任何已知细胞质结构相关联,并且不具有脂质双层膜的 58×10^3 大小的蛋白质[8]。RR 形状主要包括棒状和环状。棒状蛋白在细胞质内的位置主要有两种,一种是沿着细胞核膜分布,另一种是散在分布在胞浆中,见图

1。RR 在大鼠(NRK)、大鼠(PTK2)和小鼠(3T3, RAW264.7)细胞系中较为常见,在人细胞株内还没有发现。到目前为止,RR 的组成部分主要包含 67×10^3 的胞苷三磷酸合成酶(CTPS)和 55×10^3 的肌苷单磷酸脱氢酶(IMPDH),有无其他成分尚有争议[8]。



注:红色箭头指环状蛋白,白色箭头指棒状蛋白紧贴细胞核膜,黄色箭头指棒状蛋白位于胞浆。

图 1 RR 在细胞中的免疫荧光模型

2.1 CTPS 和 IMPDH 人 CTPS 有 2 个亚型,即 CTPS1 和 CTPS2,具有 74% 相同的氨基酸[9]。CTPS 能够催化尿苷三磷酸生成胞苷三磷酸及核酸和磷脂的生物合成。目前,CTPS 主要作为抗病毒、抗肿瘤和抗寄生虫治疗的靶向分子。IMPDH 有 2 个亚型,即 IMPDH1 和 IMPDH2,具有 84% 相同的氨基酸序列[9]。IMPDH 能够催化肌苷单磷酸(IMP)转化为黄苷-5'-单磷酸,是启动合成鸟嘌呤核苷酸的限速步骤。IMPDH 是细胞增殖的重要调节器,是肿瘤和病毒性疾病的靶向分子。

2.2 RR 的其他成分 Stinton 等[10]利用 RR 阳性的血清和蛋白质芯片技术检测 RR 的其他靶抗原,结果发现 7 种蛋白阳性,包括 Myc 基因相关的锌指蛋白、电压依赖性阴离子通道 1、锚蛋白重复及 SAM 结构域蛋白 6、肌动蛋白相关蛋白 1 及 3 个未知功能的蛋白质。这 7 种蛋白在功能上具有相似性,均参与嘌呤代谢、蛋白质折叠和聚合。虽然蛋白芯片能检测 RR 相关蛋白,但是无法阐明这些蛋白质在 RR 结构中的定位,而且蛋白中表位互补的干扰不利于免疫荧光定位研究 RR 的立体结构,这需要结合其他技术对 RR 进一步研究,如采用质谱仪对 RR 结构进行分析鉴定。

3 RR 生物学功能

RR 结构在人细胞培养中很难找到,只有在 IMPDH 和 CTPS 抑制剂或营养缺乏条件下才会形成 RR,但是在非人细胞系,如大鼠 NRK 细胞和小鼠细胞系 3T3 等,即使不经过任何处理也会有 RR 结构。

3.1 棒与环的关系 通过记录活细胞免疫荧光时间点图像表明,RR 结构开始很小,随后逐渐增大至 5~10 μm 形成成熟尺寸^[11-12]。目前尚不清楚,棒和环是否具有相同的功能,以及两种结构间是否相互转换,见图 2。

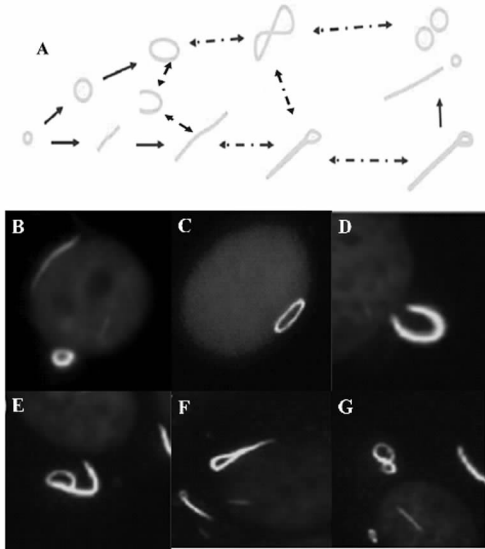


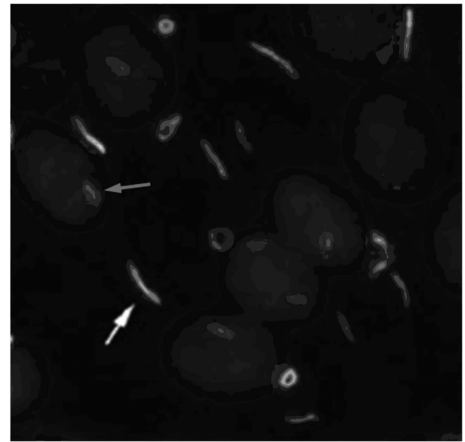
图 2 棒状和环状蛋白结构

3.2 RR 结构的形成 癌细胞和原代细胞使用 IMPDH 抑制剂如利巴韦林和霉酚酸(MPA),MPA 15~30 min,或 CTPS 抑制剂,如重氮氧代正亮氨酸和阿西维辛 2~3 h 均可诱导 RR 形成^[8]。甚至上述细胞株在无谷氨酰胺的培养基中培养 48 h 也可以获得 RR^[11]。经过无谷氨酰胺培养的小鼠未分化胚胎干细胞几乎可以 100% 观察到 RR 结构,这与小鼠胚胎干细胞具有高度增殖性有关。由于快速增殖的细胞会消耗 GTP/CTP,导致 GTP/CTP 数量减少而引起 RR 形成^[8]。然而, NRK 和 RAW264.7 细胞株较 3T3、PTK2 和 CHO 细胞株细胞增殖快,但是 NRK、PTK2、3T3、CHO 和 RAW264.7 细胞株不经过任何处理均可表现出 RR^[10]。这说明 RR 的形成可能并不只与细胞增殖速率和 GTP/CTP 消耗相关,还可能与宿主核苷酸代谢率和对 GTP/CTP 水平变化的敏感性有关。

用 CTPS 和 IMPDH 抑制剂或无谷氨酰胺培养的 mESCs 和 NRK、PTK2、3T3 和 RAW264.7 细胞株形成的 RR 可被抗 RR 血清、抗 IMPDH2 抗体或抗 CTPS1 抗体检测,这表明诱导的 RR 和天然 RR 在结构上是相似的。然而,目前还不清楚它们是否具有相同的分子组成。近来研究发现,诱导生成的 RR 与天然形成的 RR 存在棒和环的比率差异,天然 RR 在胚胎干细胞中 90% 是环,而被 CTPS 或 IMPDH 抑制剂或无谷氨酰胺培养的细胞中 90% 是棒。同时 CTPS 或 IMPDH 抑制剂诱导形成 RR 后,可导致有丝分裂细胞的增殖数量下降。

3.3 棒在细胞质和细胞核的差异 CTPS 或 IMPDH 抑制剂或无谷氨酰胺处理的细胞同样可以在细胞核中检测到 RR 结构,但是与细胞质中的 RR 结构具有一定差异。细胞核内的棒状结构比细胞质中的结构小,见图 3。核棒长度 1.6~4.5 μm,而同一细胞的细胞质中棒长度 2.5~16.8 μm^[9]。这表明核棒比细胞质棒短得多。虽然核棒和细胞质棒具有高度的相似结

构,但是由于其亚细胞定位差异,目前尚不清楚它们是否具有相同的功能。



注:红色箭头指细胞核内的棒状蛋白,白色箭头指细胞质内的棒状蛋白。

图 3 细胞核和细胞质内的棒状蛋白

3.4 RR 结构的检测 Probst 等^[13]用抗 RR 阳性患者血清与重组 IMPDH2 反应,但效果不佳。原因有 2 点,首先,检测患者血清中的 RR 抗体取决于所使用的商用抗核抗体玻片。迄今为止,大多数抗核抗体 HEp-2 玻片不具有可识别的 RR 结构。另外,不是所有的抗体都能检测到 RR 上的构象表位,这可能是重组 IMPDH2 与天然 IMPDH2 的构象和表位数量存在差异,使许多免疫荧光抗体无法识别 RR。然而,所有抗体可以通过 Western 印迹检测单体,而仅 IMPDH2 抗体通过免疫荧光能够检测到 3/4 的 RR 结构。因此,用抗体检测 RR 为阴性时,并不能排除 RR 结构的存在。

4 HCV 感染与自身免疫性抗体

慢性 HCV 感染者抗核抗体阳性率为 6%~22%,并且为低滴度(1:40~1:80),平滑肌抗体阳性率为 10%~66%,抗肝肾微粒体抗体检出率为 10%^[14-15]。其他抗体也可在 HCV 感染者中被检出,但是目前尚不清楚是否与 HCV 感染有关,如抗唾液酸糖蛋白受体、抗肝细胞膜抗原、抗肝细胞质溶胶抗原、抗肝细胞质膜、抗甲状腺球蛋白、抗甲状腺过氧化物酶、抗甲状腺微粒体、抗磷脂和抗中性粒细胞胞浆等^[16]。

4.1 RR 抗体与 HCV 感染的关系 最近,RR 抗体在 HCV 感染者中的研究备受关注。目前尚不清楚 RR 自身抗体的具体临床意义,但较为公认的是 RR 抗体的出现与干扰素和利巴韦林联合治疗丙型肝炎有关。Seelig 等^[17]利用放射免疫法首次证明了 IMPDH2 抗体在不同疾病中存在。IMPDH2 抗体在携带 HCV-RNA 患者(35.2%, $n=108$)、抗肌动蛋白阳性自身免疫性肝炎患者(31.0%, $n=42$)、HBV-DNA 阳性者(6.2%, $n=113$)、住院的 HCV-RNA 阴性患者(5.0%, $n=100$)、抗核抗体阳性患者(13.7%, $n=51$)、原发性胆汁性肝硬化并且 M2 型抗线粒体抗体阳性患者(3.2%, $n=31$)和健康人群(2.0%, $n=100$)中均有发现^[17]。需要强调的是,放射免疫法并非检测 IMPDH2 抗体最准确的方法,并且有可能导致假阳性,但是可在一定程度上反映 RR 抗体与利巴韦林治疗的关系。

美国健康和营养协会调查无 HCV 肝炎史的患者 4 754 例,其中 0.8% 呈 RR 抗体阳性^[18]。Stinton 等^[10]却发现,健康人群和未经治疗的丙型肝炎患者体内不存在 RR 抗体。但是, Feng 等^[19]在 1 例 HCV 阴性的系统性红斑狼疮患者体内发现 RR 抗体阳性,这可能与狼疮患者常常处于 I 型干(下转插 I)