

## 树鼩作为丙型肝炎动物模型的 HCV 受体研究进展

BACK

李尧<sup>1</sup>, 代解杰<sup>2</sup>, 孙晓梅<sup>2</sup>, 夏雪山<sup>1,\*</sup>

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国医学科学院/中国协和医科大学 昆明医学生物研究所, 云南 昆明 650118)

**摘要:** 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)全球流行、危害严重, 合适的小动物模型的缺乏严重阻碍了药物和疫苗的研发。该文介绍丙型肝炎危害与病毒复制特点, 以 HCV 入胞受体为重点, 通过比较现有丙型肝炎动物模型, 从分子水平探讨树鼩作为丙型肝炎动物模型的可能性。

**关键词:** 丙型肝炎; 树鼩; 动物模型; 受体

**中图分类号:** R-332; R373.21; Q959.832 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2011)01-0097-07

## Progress in studies on HCV receptor of *Tupaia* as a potential hepatitis C animal model

LI Yao<sup>1</sup>, DAI Jie-Jie<sup>2</sup>, SUN Xiao-Mei<sup>2</sup>, XIA Xue-Shan<sup>1,\*</sup>

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan 650224, China;

2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Kunming Yunnan 650018, China)

**Abstract:** Hepatitis C virus is a prevalent and globally distributed human pathogen that seriously harmful to public health. However, the development of therapy and vaccine was impeded by the lack of suit small animal models. Herein, we introduce the characters of HCV replication. Taken the HCV cellular receptors as the viewpoint, the potentiality of tupaia as hepatitis C animal model is discussed at the molecular level by comparing of present animal model.

**Key words:** Hepatitis C; *Tupaia*; Animal model; Receptor

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)作为致非甲、非乙型肝炎的主要病原体(Choo et al, 1989), 到 1989 年才完成其全长基因组测序并正式命名。由于 HCV 基因组结构与黄病毒类似, 核酸序列也有较高的同源性, 将其分类为黄病毒科(Lindenbach & Rice, 2001)。已确定的 HCV 主要传播途径有血液传播和母婴传播, 有研究报道, HCV 也可通过性行为传播, 并可能存在其他不明传播途径。据 WHO 报道, 全球有 1.7~2 亿 HCV 感染者, 我国属 HCV 的中高度感染区, 有 3800~4000 万人感染 HCV(Alter & Seeff, 2000)。HCV 一经感染, 75%~85% 急性感染者发展为慢性丙型肝炎, 慢性感染期无明显临床症状, 经过 10~30 年的病程进展, 约 5% 的慢性丙型肝炎患者最终会发展为肝硬化和肝细胞癌

(Shimotohno, 2000; Poynard et al, 2003)。由于疾病的全球性流行和高度慢性化致病过程, 丙型肝炎已成为一严重危害人民健康的重大疾病。

目前, 对丙型肝炎病毒最有效的治疗方法是干扰素与利巴韦林联合疗法, 然而, 该疗法对不同的基因型 HCV 感染者的治疗反应性差异很大, 医疗费用高, 并有部分用药者表现出明显的副作用, 亟待研究更有效地治疗方法(Locamini & Bartholomeusz, 2002)。疫苗是保护易感者、控制病毒传播的最有效手段, 但由于对 HCV 感染机制不清楚, 尤其是合适小动物模型的缺乏, 导致丙型肝炎疫苗研制受到严重制约(Bartenschlager & Lohmann, 2001)。

本综述围绕 HCV 感染肝细胞的关键分子——受体, 从受体同源性及功能相似性的角度, 探讨树

收稿日期: 2010-12-03; 接受日期: 2011-01-20

基金项目: 国家重点基础研究计划项目(2009CB522502); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BAI83B02)

\*通讯作者(Corresponding author), E-mail: oliverxia2000@yahoo.com.cn

第一作者简介: 李尧(1986—), 男, 硕士, 主要研究方向: 分子病毒学, E-mail: liyao420420@163.com

鼠作为丙型肝炎小动物模型的可能性。

## 1 HCV 复制与主要细胞受体

### 1.1 HCV 的感染与复制周期

HCV 为单股正链 RNA 病毒, 病毒颗粒直径小于 80 nm, 中心为致密核衣壳包裹的单股正链 RNA, 核衣壳外包绕含脂质的囊膜, 囊膜上有刺突 (Lindenbach & Rice, 2001), 是病毒与细胞膜表面受体结合的主要组分。病毒基因组全长约 9.6 kb, 5'端非翻译区(non-translated region, NTR)结构较为保守, 对 HCV 基因组起始复制作用重要。HCV 基因的开放读码框架被翻译为 3 010 个氨基酸的多聚蛋白前体(Choo et al, 1991), 在宿主和病毒编码蛋白酶的共同作用下, 生成 3 种结构蛋白(核心蛋白 C、包膜蛋白 E1 和 E2)和 6 种非结构蛋白(NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a 和 NS5b)(Bartenschlager & Sparacio, 2007)。结构蛋白是 HCV 的主要组成部分(Hassan et al, 2009), 非结构蛋白在 HCV 基因组复制过程中有着重要作用。HCV 基因组 3'端还有一个 27~55 nt 的非编码区(3'NTR), 对病毒基因组复制或翻译效率有重要调节作用(Suzuki et al, 2007; Ebihara et al, 2008)。

目前, 对 HCV 的感染与复制机制尚不清楚, 但通过与 HCV 相近的其他黄病毒科的病毒感染机制比较分析, 可推测知道 HCV 复制周期的大致情况 (Birke & FrancoisLoic, 2006)。认为 HCV 首先与肝细胞表面的特异性受体结合, 在肝细胞表面“抛锚”停下。然后, 肝细胞膜将病毒包裹起来, “吞”入细胞浆内。病毒进入肝细胞浆后, 其衣壳和囊膜被包裹它的肝细胞膜融合, 将其遗传物质 RNA 和非结构蛋白质释放到胞浆内。病毒 RNA 具备 mRNA 的所有功能, 利用宿主细胞的核糖体翻译成前体蛋白, 前体蛋白经过剪切、加工, 产生各种结构蛋白与非结构蛋白。病毒 RNA 在自有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的催化下, 复制出多个互补的负链 RNA, 负链 RNA 又可作为合成更多正链 RNA 的模板。肝细胞浆内新合成的蛋白质和正链 RNA 一起, 自组装为病毒颗粒, 进入胞浆的空泡内, 并将空泡的膜覆盖与表面, 组装成完整的病毒颗粒。新组装成的病毒颗粒, 以“出芽”的方式, 从肝细胞释放出去 (Denise et al, 2004; Bartenschlager & Lohmann, 2000)。丙型肝炎病毒就这样周而复始, 不断感染新的肝细胞, 产生更多的病毒。

### 1.2 HCV 主要受体

病毒通过囊膜蛋白与宿主细胞膜表面受体结合是病毒感染的第一步, 受体也被认为是决定病毒感染宿主特异性和组织特异性的主要因素。目前, 已经确定在 HCV 病毒感染细胞过程有介导功能的受体有 CD81、SR-BI、LDLr、Claudin-1、Occludin 等分子。

#### 1.2.1 CD81 分子

CD81 基因组 DNA 由 8 个外显子和 7 个内含子组成, 全长为 1 500 bp, 位于人第 11 号染色体上。CD81 的 cDNA 含有惟一的开放读码框架, 编码 236 个氨基酸 (Levy et al, 1998)。CD81 是一种非糖基化膜蛋白, 属于四次跨膜蛋白超家族(transmembrane-4 superfamily, TM4SF), 由 4 个跨膜区、2 个胞外区和 2 个胞浆内末端组成。CD81 的两个膜外区是 HCV 病毒囊膜蛋白结合的主要位点, 其中胞外小环有 28 个氨基酸残基, 序列高度保守; 胞外大环(LEL)有 80 个氨基酸残基, 物种间差异较大。胞外大环中的高变区 EC2 也是 HCV 膜蛋白 E2 结合的位点 (Higginbottom et al, 2000), 主要体现 CD81 感染的种属特异性。有报道发现, 胞外小环的含有 4 个保守半胱氨酸形成的 2 个二硫键, 还原条件所引起二硫键就被破坏, 可导致 CD81 分子丧失与 HCV 囊膜结合的能力。因此, Tseng et al (2001)认为胞外小环对 CD81 正常结构的维持和功能的发挥也是必需的。

最早, 由于发现分泌表达的 HCV E2 可以与细胞表面蛋白 CD81 相结合, 从而推断 CD81 可能是 HCV 受体 (Piled et al, 1998)。在此启示下, Meola et al (2000)对 CD81 在 HCV 的入胞过程中的作用进行了实验验证: 将 CD81 表达载体转入 HepG2 细胞, 使其获得了对 HCVpp 的易感性, CD81 抗体可阻断至少 90% 的 HCVpp 感染, CD81 特异性 siRNA 使 CD81 表达下调 70% 情况下, HCVpp 感染被阻断。病毒与 CD81 结合, 主要通过 E2 糖蛋白的关键位点 (420~535 位) 实现, 糖基化情况及正常蛋白结构是影响结合的主要因素 (Tan et al, 2003; Chen & He, 2003)。

#### 1.2.2 SR-BI 受体

SR-BI 受体又称 B 类 I 型清道夫受体, 其基因组位于人 12 号染色体上, 长度约为 7.5 kb, 编码 509 个氨基酸组成的细胞表面糖蛋白, 其相对分子质量约为 54 k, 包括 2 个短胞质域、2 个跨膜区以 1 个膜外区 (Kapadia et al, 2007; Connelly & Williams,

2004)。Scarselli et al (2002)发现不同基因型 HCV 的 E2 蛋白均能够与不表达 CD81 的 HepG2 细胞结合, 说明除 CD81 外还有其他分子可介导 HCV 感染细胞。进而, 用免疫沉淀及 Western blot 法发现可与 HCV 特异结合的 SR-BI 分子。同时, 表达 SR-BI 的 CHO 细胞也能够被 E2 结合, 并进一步证实 SR-BI 在 HCV 感染过程中可能起重要作用。Grove et al (2007)研究发现, HVR1 抗体和 SR-BI 对 E2 的高度可变区 1 (HVR1)的竞争性结合表明, SR-BI 和与 HCV 的主要结合位点在囊膜蛋白 2 的高变区 1 (HVR1)。

SR-BI 是一多配体受体, 可与包括 HDL、LDL、VLDL 在内的多种脂蛋白结合, 并且还可与  $\beta$  淀粉状蛋白和马来酰牛血清蛋白结合 (Varban et al, 1998)。LDL 通过与 SR-BI 结合, 完成受体介导的细胞内吞作用, 最终进入细胞为溶酶体所降解。SR-BI 可选择性地摄取 HDL 中的脂质并且把无脂质 HDL 释放入细胞外, 此一转脂过程也增强了 HCV 的入侵作用。SR-BI 与多种脂蛋白的结合和介导入胞, 提示 SR-BI 也能够介导脂蛋白相关结合物进入细胞, 可能参与 HCV 与易感细胞的黏附及入胞。

Bartosch & Cosset (2006)研究发现, CD81 和 SR-BI 的同时存在是 HCVpp 感染肝细胞的必要条件, 但同时表达 CD81 和 SR-BI 的非肝源性细胞不能被 HCVpp 感染, 提示 HCV 感染肝细胞可能需要 CD81、SR-BI 及某些肝特异性因子的共同参与。

### 1.2.3 LDLr

低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLr), 是一种细胞表面糖蛋白, 其相对分子质量为 115 k, LDLr 前体由 860 个氨基酸残基组成, 经过加工后的 LDLr 具有 839 个氨基酸, 整个蛋白质结构可分为 5 个区域: 配体结合结构域、EGF 前体结构域、含糖基结构域、跨膜结构域、胞浆结构域 (Molina et al, 2007; Wünschmann et al, 2006)。

对于 LDLr 的促进 HCV 感染细胞的机制, 目前尚不明确, 但初步认为细胞膜上的 LDLr 主要结合 LDL, 间接介导 HCV 感染细胞 (Andréo et al, 2007)。HCV 首先与血浆中低密度脂蛋白结合, 利用它们与靶细胞表面的 LDLr 相互作用进入细胞 (Wünschmann et al, 2006)。LDLr 的抗体以及载脂蛋白 B 抗体能抑制 HCV 对细胞的入侵, 进一步说明 LDLr 在 HCV 的感染机制中起到至关重要的作用, 但 LDLr 对 HCV 感染的介导作用需要 CD81 和

SR-BI 的协助完成 (Monazahian et al, 2000)。

### 1.2.4 Claudin-1 受体

Claudin 属于一个多基因家族, 目前已发现 20 种 Claudin 成员, 是相对分子质量为 22~27 k 的跨膜蛋白。该蛋白由 4 个疏水的跨膜区、2 个胞外环和 3 个胞内区域组成。Claudin 蛋白的胞外环对于细胞间紧密连接条带形成和细胞对离子通透的选择性具有重要作用。Claudin-1 是 Claudin 家族成员之一, 表达于所有上皮细胞中, 在肝脏细胞的表达量最高 (Evans et al, 2007)。研究证实, Claudin-1 是 HCV 入胞所需的必要蛋白质, HCV 先通过特定的受体结合于肝细胞上, 然后与 Claudin-1 蛋白结合, 利用细胞的内吞作用进入细胞内。尽管对 Claudin-1 介导 HCV 感染的细节还不清楚, 但 Claudin-1 受体被敲除, 会导致细胞对 HCV 的易感性大大降低。研究进一步发现, Claudin-1 在 HCV 与 CD81 结合后, 对病毒入胞过程起到明显的促进作用, Claudin-1 可能参与 HCV 的免疫逃逸 (Evans et al, 2007; Blackard et al, 2006)。

### 1.2.5 Occludin 受体

跨膜蛋白 Occludin 是 2009 年新发现的可介导 HCV 入胞的紧密连接蛋白受体, 其相对分子质量约为 60 k, 含有 4 个跨膜区。由于是新发现的受体, 对该受体认识还处于初期, 只知道 Occludin 会与 HCV 的 E2 作用, 在 HCV 和 CD81 等其它受体结合后协同介导 HCV 入胞 (Alexander et al, 2004; Thomas, 2009)。

目前, 我们对 HCV 细胞受体及其介导病毒感染机制的了解并不透彻, 同时, HCV 的入胞过程并不是某一个受体所能完成的, 而是多种受体及其复合物共同完成。但是, 已有受体在 HCV 入胞过程中都起到一定作用, 不同物种 HCV 受体同源性的研究对发现、开发新的丙型肝炎动物模型具有重要意义。

## 2 丙型肝炎的动物模型

自从 HCV 的发现之初, 缺乏有效的 HCV 体外培养体系和合适的动物模型, 一直阻碍着对 HCV 研究的深入。Wakita et al (2005)获得急性丙型肝炎患者 HCV 全序列, 建立了 HCV 全基因组复制子系统, 实现了 HCV 体外培养, 并可高效产生感染性病毒颗粒。美国 Rice 和 Chisari 的两个研究组在特定的细胞系中获得全序列 HCV 基因组的表达及感染

性 HCV 颗粒, HCV 的体外培养问题得到根本性解决 (Lindenbach et al, 2005; Zhong et al, 2005)。合适小动物模型的发现与建立, 成为 HCV 研究中迫切需要解决的问题。

理想的 HCV 动物模型的建立, 不仅有利于丙型肝炎疫苗的研究, 同时对深入研究丙型肝炎的慢性化致病机制, 包括研究病毒变异特性与宿主免疫应答规律等, 具有重要意义。除人和黑猩猩是 HCV 的自然宿主外, 至今尚未发现其他自然动物对 HCV 易感(Lanford et al, 1994)。现在可用于 HCV 感染的动物模型包括: 黑猩猩、猴、树鼩、转基因鼠以及人鼠嵌合肝模型等(Carloni et al, 1993)。

### 2.1 黑猩猩

黑猩猩(*Chimpanzee, Pan troglodytes*)是目前发现除人以外 HCV 的惟一自然感染动物。HCV 在黑猩猩体内引起的免疫应答与人的极为相似, HCV 可以在黑猩猩体内复制, 复制效率与在人体内非常相似, 但黑猩猩对 HCV 的免疫选择性压力较低。因此, 造成的可检测到的 HCV 基因变异也较少(Bassett et al, 1999)。HCV 感染黑猩猩后, 会出现自限性感染的暂时性病毒血症、间歇性病毒血症和持续性病毒血症三种情况。目前有关 HCV 病毒的感染与复制特性、致病机制等相关领域获得的重大突破, 大多以黑猩猩为模型完成 (Ray et al, 2000; Larsson et al, 2004), 但由于全球黑猩猩资源匮乏, 研究费用昂贵。另外, 由于黑猩猩为人类“近亲”的道德伦理问题, 黑猩猩作为丙型肝炎动物模型的应用受到严重限制。

### 2.2 猴类

与人类亲源关系相近的另外一种灵长类动物——猴类, 在艾滋病等其他人类病毒性疾病研究的应用较为广泛, 但有关猴类作为 HCV 的动物模型的研究报道并不多见。主要原因在于 HCV 对不同种类猴子感染的稳定性差, 感染后致病效果和临床症状不明显, 猴能否成为 HCV 的动物模型还有待考证, 在猴体内植入人肝细胞及对猴进行基因工程改造, 是建立猴丙型肝炎动物模型的有效途径(Xia et al, 1995, 1996)。

### 2.3 人工改造的小鼠模型

小鼠作为生物实验的成熟的动物模型, 广泛应用于各种研究。有研究者也将小鼠模型应用于丙型肝炎研究, 但由于鼠的 SR-BI、CD81、CLDN1 等关键受体分子的基因序列与蛋白结构与人类有明显

差异, 尤其鼠的 CD81 分子胞外大环第 182、184、186 及 196 位的氨基酸等与 E2 结合的关键位点, 与人完全不同, 导致 HCV 囊膜蛋白与鼠肝细胞的结合力大大下降, HCV 对自然小鼠基本无感染性(Meuleman et al, 2005; Ploss & Rice, 2009)。随着现代生物技术的发展, 人们可通过各种技术手段改造小鼠, 使之具有与人相同的肝脏组织环境, 可用于 HCV 的研究。丙型肝炎小鼠动物模型主要有转基因小鼠和肝移植小鼠, 前者是将 HCV 的基因片段转至小鼠, 使其在小鼠体内表达, 从而得到转基因小鼠, 如 HCV 三聚体小鼠(Meuleman et al, 2005); 后者人肝细胞的移植到免疫缺陷小鼠, 使之拥有人的肝环境和免疫系统, 如白蛋白-尿激酶型纤溶酶原激活物/严重合并的免疫缺陷疾病(Alb-uPA/SCID)小鼠、人肝嵌合体小鼠。尽管这些类型小鼠建模所用方法不同, 但目的都是一样的, 让小鼠的肝组织和免疫系统能模拟人的肝环境, 使其对 HCV 易感(Chang et al, 2006), 但由于鼠与人之间的较大物种差异性, 体内环境及病理机制差异的固然存在, 导致鼠要作为丙型肝炎的动物模型的使用范围受到较大限制。

### 2.4 树鼩作为丙型肝炎模型的可能性

树鼩(*Tupaia belangeri, tree shrew*)是形似松鼠的小型哺乳动物, 主要分布于亚洲东南部的热带和亚热带地区, 我国的云南、广西、广东和海南等地都广泛分布。树鼩体型小, 生长繁殖快, 易于捕捉、驯养和繁殖, 成本低, 其新陈代谢和大体解剖比啮齿类动物更接近人类。树鼩成为研究人类相关疾病的动物模型, 广泛应用于病毒、神经、心理、糖尿病、脑缺血、血管、肿瘤、寄生虫等方面的研究。Wang et al (1997)用 HCV-RNA 阳性人血清静脉接种成年树鼩, 出现间歇性病毒血症, ALT 水平升高及人类相似的肝组织病变现象, 提示树鼩可成为 HCV 易感动物。Xie et al (1998, 2000)用不同亚型 HCV 感染正常和经过辐射的树鼩, 结果发现辐射的树鼩出现的明显病毒血症, 34.8%的被感染树鼩(8/23)血清中可检出 HCV RNA, 部分阳性树鼩均有不同程度的谷丙转氨酶异常升高和肝组织病理炎症反应, 表明树鼩可感染 HCV, 有可能成为丙型肝炎小动物模型。Zhao et al (2002)对树鼩感染 HCV 后病毒准种分析显示, 树鼩肝细胞可被特定的准种选择性感染, 传代感染后肝细胞可检出新的准种。Amako et al (2010), 用 HCV 临床病毒株和培养体系

产生的 HCV 感染树鼩, 发现树鼩不但能被 HCV 感染, 而且感染后得到的第二代血清仍具有感染性, 感染树鼩产生明显的肝组织病变。

我们研究组在建立 HCV 体外培养体系 (J6/JFH-1) 的基础上, 获得大量高滴度的培养病毒上清, 用于感染体外培养的原代肝细胞和树鼩活体, 发现被感染树鼩原代肝细胞可产生对 Huh7 细胞具有感染力的病毒颗粒, 近 30% 的接种树鼩出现间歇性的病毒血症和轻度肝脏组织病理变化。这些都是进一步证明了 HCV 能感染树鼩, 树鼩具有成为丙型肝炎的动物模型的可能性; 但是由于树鼩个体背景复杂等原因, 导致受试树鼩对 HCV 感染情况不一致、不稳定, 需要从树鼩品种选育、实验动物化, 以及树鼩适应 HCV 病毒选择等不同角度开展工作, 以建立丙型肝炎树鼩动物模型。

### 3 树鼩的主要 HCV 受体研究

作为可能的丙型肝炎动物模型, 树鼩主要 HCV 受体的基因扩增、序列测定及同源关系分析, 这些基因的表达以及其对 HCV 介导感染功能的确定, 对建立树鼩丙型肝炎动物模型, 解释 HCV 对树鼩的感染机制, 具有重要的佐证作用。我们从树鼩肝组织提取 RNA, 扩增树鼩 CD81、SR-BI、Claudin-1 和 Occludin 等主要 HCV 受体 cDNA, 序列同源关系分析发现这些分子与人相应分析的核酸序列具有较高同源性。最新研究发现, 将这些分子在对 HCV 不感染细胞系中表达, 可介导 HCV 包膜糖蛋白假病毒颗粒(HCVpp)和体外培养体系产生 HCV 病毒(HCVcc)对细胞的感染。

#### 3.1 树鼩的 CD81 受体

人的 CD81 可以被 HCV 囊膜蛋白有效结合, 胞外大环(LEL)是结合的关键区域, 该区具有 4 个关键位点: CD81 LEL 的第 162、182、184 和 186 位点氨基酸, 直接关系到 E2 和 CD81 的紧密结合(Higginbottom et al, 2000)。研究表明, 树鼩与人 CD81 分子的氨基酸序列同源性高达 96%, LEL 的氨基酸序列同源性也有 93%, 4 个关键氨基酸位点上树鼩和人的 CD81 受体完全相同, 尽管 CD81 LEL 上也有 6 个氨基酸树鼩不同于人, 但这 6 个位点并非 HCV 囊膜蛋白结合的关键位点(Zhao et al, 2002; David et al, 2004)。与之比较, 非洲绿猴在关键的 186 位氨基酸发生点突变, 明显减少了与 HCV 囊膜蛋白的结合能力。用重组表达的可溶性 HCV 囊膜

蛋白 E2 与细胞相互作用研究发现, 其与树鼩的肝细胞结合作用与人源肝细胞相当, 远高于鼠源肝细胞。我们将树鼩 CD81 分子的 cDNA 转染至 HepG2 细胞, 发现树鼩 CD81 分子可有效介导 HCVpp 进入 HepG2 细胞, 其介导作用甚至高于人的 CD81 分子。抗体阻断实验发现, 人 CD81 单克隆抗体与兔抗人 CD81 多抗可以抑制, 但不能完全阻断 HCVpp 感染树鼩 CD81 的 HepG2 细胞, 预示除 CD81 外, 树鼩肝细胞上还可能存在其他受体参与 HCV 的感染和 E2 的结合 (Zhao et al, 2002; Tong et al, 2010)。

#### 3.2 树鼩 SR-BI 受体

SR-BI 是 HCV 进入宿主肝细胞的另一重要的糖蛋白受体, 树鼩 SR-BI 受体与人的氨基酸同源性为 88%, 胞外环同源性为 82%。Barth et al (2005)将树鼩 SR-BI 基因转染至 CHO 细胞, 使其可与 HCV E2 蛋白结合, 并证实 HVR1 区是病毒与树鼩受体结合的关键部位。用抗树鼩 SR-BI 抗体处理体外培养原代肝细胞, 其对 HCV 的感染性大大降低。Tong et al (2010)利用慢病毒载体将树鼩 SR-BI 分子转染至 CHO 细胞, 使其获得对 HCVpp 和 HCVcc 的感染性, 此种感染可以被经 DNA 免疫获得的 SR-BI 单抗的部分阻断。然而, 以上抗体处理不能完全阻断 HCVpp 对细胞的感染, 说明树鼩原代肝细胞上除 SR-BI 之外, 还有其他受体分子介导 HCVpp 的进入。

#### 3.3 树鼩 Claudin-1 受体

尽管紧密连接蛋白 Claudin-1 至今仍是需要进一步验证的 HCV 受体, 但由于其作为介导 HCV 入胞的多受体组合的重要一员, 已受到广泛关注。我们扩增、克隆得到树鼩 Claudin-1 分子 cDNA, 经序列测定与分析发现, 树鼩和人之间该分子的氨基酸序列的同源性高达 93%。人和树鼩 Claudin-1 的胞外环氨基酸序列胞外环只有 3 个位点的差异, 在认为是 HCV 感染的关键位点(I32 和 E48), 树鼩和人完全一样(Zhao et al, 2002)。Tong et al (2010)利用慢病毒载体将 Claudin-1 转入 293T 细胞表达, 使其获得对 HCVpp 的易感性, 初步证实树鼩 Claudin-1 分子可以支持 HCV 的感染。

#### 3.4 树鼩的 Occludin 受体

我们扩增、克隆得到树鼩 Occludin 受体, 序列分析发现树鼩和人该受体的氨基酸序列同源性高达 88%。HCV 结合关键区域(第二膜外区, EL2)的氨基酸序列同源性达到 91%, 45 个位点中只有 4 个位点不同。与之比较, 鼠和人的 EL2 区同源性只有

86%, 有 6 个位点发生突变。将树鼩 Occludin 分子与人的 CD81、SR-BI、Claudin-1 分子共转染的 NIH3T3 细胞, 可以被 HCVpp 感染。用树鼩 Occludin 分子的 EL2 替换人该分子的 EL2, 这个嵌合型 Occludin 分子同样可介导 HCVpp 进入 NIH3T3 细胞, 表明树鼩 Occludin 分子对 HCV 介导进入细胞作用与人的 Occludin 分子无明显差别(Tong et al, 2010)。

#### 4 展望

从分子水平上来看, 树鼩的现有 HCV 受体与人的同源性较高, 尤其介导 HCV 入胞的功能区段

的关键氨基酸位点与人基本抑制, 功能验证发现树鼩这些受体可成功介导 HCV 的感染与入胞, 为树鼩有可能开发成为丙型肝炎小动物模型提供了良好佐证。我们也证实了 HCV 病毒对树鼩的原代肝细胞的感染性, 动物活体病毒感染实验初步证实树鼩可被体外培养大量获得的 HCV 感染。然而, 动物总体感染率较低, 尚不足以建立可满足研究需要的动物模型, 有待通过动物辅助生殖、易感家系选育与实验动物化、动物免疫致弱、适应性病毒筛选等不同学科领域研究工作的联合攻关, 以最终建立丙型肝炎树鼩动物模型。

#### 参考文献:

- Alexander DM, Bourke PD, Sheridan P, Konstandatos O, Wright JJ. 2004. Intrinsic connections in tree shrew V1 imply a global to local mapping [J]. *Vision Res*, **44**(9): 857-876.
- Alter HJ, Seeff LB. 2000. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on the long-term outcome [J]. *Semin Liv Dis*, **20**(1): 17-25.
- Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, Kohara M. 2010. Pathogenesis of hepatitis C Virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. *J Virol*, **84**(1): 303-311.
- Andréo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, Marcellin P, Budkowska A. 2007. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection [J]. *Cell Microbiol*, **9**(10): 2445-2456.
- Bartenschlager R, Lohmann V. 2000. Replication of hepatitis C virus [J]. *J Gen Virol*, **81**(7): 1631-1648.
- Bartenschlager R, Lohmann V. 2001. Novel cell culture system for the hepatitis C virus [J]. *Antiviral Res*, **52**(1): 1-17.
- Bartenschlager R, Sparacio S. 2007. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity *in vivo* and in cell culture [J]. *Virus Res*, **127**(2): 195-207.
- Barth H, Cerino R, Arcuri M, Hoffmann M, Schürmann P, Adah MI, Gissler B, Zhao X, Ghisetti V, Lavezzo B, Blum HE, von Weizsacker F, Vitelli A, Scarselli E, Baumert TF. 2005. Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes [J]. *J Virol*, **79**(9): 5774-5785.
- Bartosch B, Cosset FL. 2006. Cell entry of hepatitis C virus cell entry of hepatitis C virus [J]. *Virology*, **348**(1): 1-12.
- Bassett SE, Thomas DL, Brasky KM, Lanford RE. 1999. Viral persistence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees [J]. *J Virol*, **73**(2): 1118-1126.
- Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. 2006. Extrahepatic replication of HCV: Insights into clinical manifestations and biological consequences [J]. *Hepatology*, **44**(1): 15-22.
- Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, Battaglia M. 1993. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection [J]. *Arch Virol Suppl*, **8**: 31-39.
- Chang KS, Cai ZH, Zhang C, Sen GC, Williams BR, Luo GX. 2006. replication of hepatitis c virus (HCV) RNA in mouse embryonic fibroblasts: protein kinase R (pKR)-dependent and pKR-independent mechanisms for controlling HCV RNA replication and mediating interferon activities [J]. *J Virol*, **80**(15): 7364-7374.
- Chen RL, He YW. 2003. Relationship of CD81 and E2 envelope glycoprotein with HCV-infectious host cells [J]. *World J Infect Vol*, **6**(3): 3-6. [陈瑞烈, 贺永文. 2003. CD81 及 E2 包膜糖蛋白与 HCV 感染宿主细胞的关系. 世界感染杂志, **6**(3): 3-6.]
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [J]. *Science*, **244** (4902): 359-362.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**(6): 2451-2455.
- Connelly MA, Williams DL. 2004. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids [J]. *Curr Opin Lipidol*, **15**(3): 287-295.
- Ebihara T, Matsumoto M, Seya T. 2008. HCV and innate immunity [J]. *Virusu*, **58**(1): 19-26.
- Evans MJ, von Hahn T, Tsehe DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus coreceptor required for a late step in entry [J]. *Nature*, **446**(7137): 801-805.
- Grove J, Huby T, Stamatakis Z, Vanwolleghem T, Meuleman P, Farquhar M, Schwarz A, Moreau M, Owen JS, Leroux-Roels G, Balfé P, McKeating JA. 2007. Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity [J]. *J Virol*, **81**(7): 3162-3169.
- Hassan M, Selimovic D, Ghazlan H, Abdel-kader O. 2009. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways [J]. *Hepatology*, **49**(5): 1469-1482.
- Higginbottom A, Quinn ER, Kuo CC, Flint M, Wilson LH, Bianchi E, Nicosia A, Monk PN, McKeating JA, Levy S. 2000. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 [J]. *J Virol*, **74**(8): 3642-3649.
- Kapadia SB, Barth H, Baumert T, McKeating JA, Chisari FV. 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I [J]. *J Virol*, **81**(1): 374-383.
- Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. 1994. Demonstration of *in vitro* infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT-PCR [J]. *J Virol*, **202**(2): 606-620.
- Larsson M, Babcock E, Grakoui A, Shoukry N, Lauer G, Rice C, Walker C, Bhardwaj N. 2004. Lack of phenotypic and functional impairment in

- dendritic cells from chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus [J]. *J Virol*, **78**(12): 6151-6161.
- Levy S, Todd SC, Maecker HT. 1998. CD81(TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, **16**: 89-109.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture [J]. *Science*, **309** (5734): 623-626.
- Lindenbach BD, Rice CM. 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication [J]. *Fields Virol*, **1**(3): 991-1041.
- Locamini SA, Bartholomeusz A. 2002. Advances in hepatitis C: What is coming in the next 5 years? [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**(4): 442-447.
- Meola A, Sbardellati A, Bruni Ercole B, Cerretani M, Pezzanera M, Ceccacci A, Vitelli A, Levy S, Nicosia A, Traboni C, McKeating J, Scarselli E. 2000. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection [J]. *J Virol*, **74**(13): 5933-5938.
- Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, de Hemptinne B, Gevaert K, Vandekerckhove J, Roskams T, Leroux-roels G. 2005. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a UPA-SCID mouse chimera [J]. *Hepatology*, **41**(4): 847-856.
- Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitman J, Barbaras R, Graber P, Ghersa P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P. 2007. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus [J]. *J Hepatol*, **46**(3): 411-419.
- Monazahian M, Kippenberger S, Muller A, Seitz H, Bohme I, Grethe S, Thomssen R. 2000. Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus [J]. *Med Microbiol Immunol*: Berl, **188**(4): 177-184.
- Ploss A, Rice CM. 2009. Towards a small animal model for hepatitis C [J]. *EMBO reports*, **10**(11): 1220-1227.
- Poynard T, Yuen MF, Ratzin V, Lai CL. 2003. Viral hepatitis C [J]. *Lancet*, **362**(9401): 2095-2100.
- Ray SC, Mao Q, Lanford RE, Bassett S, Laeyendecker O, Wang YM, Thomas DL. 2000. Hypervariable region 1 sequence stability during hepatitis C virus replication in chimpanzees [J]. *J Virol*, **74**(7): 3058-3066.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus [J]. *EMBO J*, **21**(19): 5017-5025.
- Shimotohno K. 2000. Hepatitis C virus and its pathogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, **10**(3): 233-240.
- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. 2007. Molecular biology of hepatitis C virus [J]. *J Gastroenterol*, **42**(6): 411-423.
- Tan YJ, Lim SP, Ng P, Goh PY, Lim SG, Tan YH, Hong W. 2003. CD81 engineered with endocytotic signals mediates HCV cell entry: implications for receptor usage by HCV *in vivo* [J]. *Virology*, **308**(2): 250-269.
- Tong Y, Zhu Y, Liu Y, Feng Y, Hua X, Chen Z, Ding H, Gao L, Wang Y, Feitelson MA, Xia X, Zhao P, Qi Z. 2010. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection [J]. *J Virol*, **10**(1128): 01818-10.
- Tsong CT, Miskovsky E, Klimpel GR. 2001. Crosslinking CD81 results in activation of TCR $\gamma$ delta T cells [J]. *Cell Immunol*, **207**(1): 19-27.
- Varban ML, Rinninger F, Wang N, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Gosselin ML, Dixon KL, Deeds JD, Acton SL, Tall AR, Huszar D. 1998. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(8): 4619-4624.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome [J]. *Nat Med*, **11**(7): 791-796.
- Wang HP, Zhou YX, Yao ZQ, Hong S, Li GY. 1997. Preliminary study of HCV infected adult tree shrews [J]. *J Fourth Mili Med Univ*, **18**(4): 375-376. [王海平, 周永兴, 姚志强, 洪沙, 李光玉. 1997. 成年树鼩实验感染 HCV 的初步研究. 第四军医大学学报, **18**(4): 375-376.]
- Wünschmann S, Müller HM, Stipp CS, Hemler M. 2006. *In vitro* interaction between hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs [J]. *J In Let Dis*, **194**(8): 1058-1067.
- Xia NS, Bi SL, Yang YP, Zhao TX, Jin DY, Ji WZ, Hong N, Tian BP, Tang Q, Liu M, Xie DS, Zhan MY. 1995. Preliminary results of 3 macaques infecting with China strains hepatitis C virus [J]. *Sci Chin: Series B*, **25**(7): 732-739. [夏宁邵, 毕胜利, 杨永平, 赵同兴, 金冬雁, 季维智, 洪宁, 田保平, 汤权, 刘敏, 谢德胜, 詹美云. 1995. 中国株 HCV 实验感染 3 种猕猴的初步结果. 中国科学: B 辑, **25**(7): 732-739.]
- Xia NS, Wang HL, Bi SL, Hong L, Tian BP, Zheng YS, Ji WZ, Hou YD. 1996. Analysis of 5' NTR - area C genome's cDNA sequence in China strains hepatitis C virus infection to macaques [J]. *Chn J Virol*, **12**(2): 111-117. [夏宁邵, 王海林, 毕胜利, 洪宁, 田保平, 郑延硕, 刘敏, 季维智, 侯云德. 1996. 中国 HCV 感染猕猴后 5' NTR-C 区基因组的 cDNA 序列分析. 病毒学报, **12**(2): 111-117.]
- Xie ZC, Gao WZ, Su HJ, Wu ZB, Xu GC, Ignacio J, Boj R, Prieto J. 2000. Tree shrews susceptibility to hepatitis C virus [J]. *J Guangxi Med Univ*, **17**(3): 347-350. [谢志春, 高伟志, 苏洁寒, 鄂质彬, 徐国城, Ignacio J, Boj R, Prieto J. 2000. 树鼩对 HCV 的易感性研究. 广西医科大学学报, **17**(3): 347-350.]
- Xie ZC, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J. 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews [J]. *Virology*, **244**(2): 513-520.
- Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF. 2002. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. *J Clin Invest*, **109**(2): 221-232.
- Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wieland SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV. 2005. Robust hepatitis C virus infection *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(26): 9294-9299.