

## 丙型肝炎中和抗体研究进展

### Advances in research of hepatitis C virus neutralizing antibodies

张久聪(ZHANG Jiu-cong), 孙利(SUN Li), 陈丽萍(CHEN Li-ping), 聂青和(NIE Qing-he)

(第四军医大学唐都医院 全军感染病诊疗中心, 陕西 西安 710038)

(PLA Centre for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[关键词] 肝炎病毒, 丙型; 丙型肝炎; 中和抗体; 免疫反应; 疫苗

[中图分类号] R512.6<sup>+</sup>3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2010)03-0215-04

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是1989年由美国学者 Choo 等首次从受感染的黑猩猩血液标本中分离。HCV 呈全球性流行, 根据世界卫生组织(WHO)的统计, HCV 在人群中的感染率约为 3%, 全球约有 1.8 亿人感染 HCV, 每年新发丙型肝炎病例约 300~500 万例。我国进行的全国 HCV 血清流行病学调查显示<sup>[1]</sup>, 我国一般人群抗 HCV 阳性率为 3.2%, 约有 4 000 万人感染 HCV; 70% 以上的感染者将发展成肝纤维化、肝硬化, 甚至肝细胞癌。常规的干扰素(IFN)单用或者 IFN 联合利巴韦林治疗的总体应答率比较低, 治疗费用颇高, 且具有明显的毒副作用<sup>[2]</sup>。据分析, 在未来的 10~20 年中, 将会出现一个因 HCV 感染而导致的肝硬化与肝癌高峰期。HCV 感染后缺乏有效的保护性免疫, 因此, HCV 中和抗体一直是近年来的研究热点<sup>[3]</sup>。近年来 HCV 体外培养系统的建立为 HCV 中和抗体相关研究提供了强有力的工具, 使人们对 HCV 的认识提升到新的层次, 为从根本上认识 HCV 和彻底防治丙型肝炎奠定了基础。本文就近年来在丙型肝炎中和抗体及机体抗 HCV 感染免疫方面的研究作一简要综述。

#### 1 HCV 的基本分子生物学特性

HCV 为单股正链 RNA 病毒, 黄病毒科嗜肝病毒属, 球形, 有包膜。其基因组全长约 9.6 kb, 由 5' 端与 3' 端的非编码区(non-translated region,

NTR)及其之间的一个编码 3 010 个氨基酸多肽蛋白前体的开放阅读框(open reading frame, ORF)组成。该多肽蛋白前体可被宿主信号肽酶和病毒基因编码的蛋白酶加工成结构蛋白(Core、E1、E2 和 p7)与非结构蛋白(NS2-NS5)。结构蛋白中核心蛋白 C、包膜蛋白 1(envelope 1, E1)和 E2 是病毒颗粒的主要组成部分, 而非结构蛋白 NS3-NS5 在 HCV 基因组复制过程中有着极其重要的作用。5'-NTR 位于 ORF 上游, 其中存在一个内部核糖体进入位点(internal ribosome-entry site, IRES), 内含与蛋白质翻译起始有关的顺式作用元件, 以内部调控介导 HCV 蛋白的翻译起始, 在翻译调控中具有重要作用。3'-NTR 位于 ORF 下游, 由 3 个部分构成, 即可变区、多聚嘧啶区及 98nt 高度保守末端, 实验证明除了可变区, 大部分 3'-NTR 序列是 HCV 基因组复制不可或缺的成分。基因组的 ORF 编码一个多聚蛋白前体, 通过宿主和病毒蛋白酶的裂解作用产生 10 个蛋白: 5'-NTR-核心蛋白(core)-E1-E2-p7-非结构蛋白 2(nonstructural protein 2, NS2)-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3'-NTR<sup>[4-5]</sup>。

#### 2 中和抗体及 HCV 中和抗体

中和抗体是指在体外细胞培养或动物模型中具有抑制病毒感染能力的保护性抗体。病原微生物侵入细胞时, 需要与一些靶细胞表面的受体结合后才能进入细胞内复制。中和抗体是由适应性免疫应答

[收稿日期] 2009-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30771891)

[作者简介] 张久聪(1985-), 男(汉族), 甘肃省景泰县人, 硕士研究生, 主要从事感染性疾病研究。

[通讯作者] 聂青和 E-mail: nieqinghe@163.com

细胞分泌产生的某些与病原微生物表面抗原相结合的抗体,由此包裹或者包被病毒衣壳,阻止了该病原微生物黏附靶细胞受体、侵入细胞<sup>[6]</sup>。由于中和抗体是在病毒进入细胞之前破坏病毒的,所以,如果机体在接触病毒之前体内就有抗体,就能够预防病毒感染。HCV 病毒基因虽然不能整合到宿主基因组中,但是却能持续逃避宿主天然与特异性免疫清除,抑制 I 型 IFN 产生,抑制自然杀伤(NK)细胞,产生突变,增加对细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)介导的细胞毒作用和抗体的中和作用。在持续 HCV 感染中,效应 T 细胞应答较弱,产生耐受甚至耗竭,部分与病毒逃避免疫清除有关,如宿主能激发早期广泛的 Th1 型 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞应答,并能激发天然免疫,则病毒就能被清除,而病毒中和抗体的存在能提高这一进程<sup>[7]</sup>。通过自然感染或人工免疫途径所建立的中和抗体反应是抗病毒免疫保护的重要组成部分。然而,由于黑猩猩是迄今为止唯一可靠的 HCV 易感动物模型,而稳定的 HCV 细胞培养系统直至最近才基本建立,缺乏简易有效的检测与评价手段长久以来一直是阻碍 HCV 中和抗体定性与定量研究的主要原因。

HCV 基因组存在很大的异源性,其至少有 6 种主要基因型和大约 70 种基因亚型。HCV 基因组两端的非编码区及编码核心蛋白和 NS4b 的区域是 HCV 基因组中最保守的区域。HCV 复制速度较快,每日有近  $10^{10} \sim 10^{12}$  的新病毒产生,加之其聚合酶缺乏校对功能,造成 HCV 基因的高度变异性,并由此产生一系列不同的抗原表位<sup>[8]</sup>。编码包膜蛋白、NS2 和 NS5a 的区域则是基因组中变异最大的区域,其中又以包膜蛋白 E2 基因 N 端的变异最大,胞膜蛋白 E2 基因 N 端含 27 个氨基酸的序列为高变区(HVR),即 HVR1、HVR2,其编码产生大量突变的 B 细胞抗原表位。病毒的包膜蛋白对于宿主产生体液免疫反应很重要,因为包膜蛋白的表达水平较高,且最先与宿主发生接触,宿主的保护性免疫常依赖于针对病毒表面蛋白的抗体,该抗体能阻断病毒与敏感细胞的结合,也可能通过加强细胞免疫清除病毒,但是大量突变的抗原表位不能被抗体有效地中和,尤其是高变区 HVR1。

HVR1 是 HCV 蛋白中变异频率最高的区域,易发生抗原漂移,有利于 HCV 逃避宿主的免疫监视功能以及宿主的免疫攻击,是公认的 HCV 中和抗体表位所在区域。然而,近年来以感染性 HCVpp 以及 HCVcc 为模型进行的病毒中和实验

发现,HVR1 并不是唯一的中和抗体表位所在区域,在 HCV 包膜 E2 蛋白中还存在保守的空间构象和线性中和抗体表位<sup>[9]</sup>。功能性的 HCV 包膜蛋白由 E1 和 E2 通过非共价键形成异源二聚体,其中 E2 蛋白介导 HCV 与肝细胞的结合,E1 的功能可能主要和病毒进入细胞内的膜融合(病毒包膜与核内体膜的融合)有关。因此,E2 蛋白理论上应该是最重要的中和抗体靶抗原,目前鉴定出的一些能中和 HCVpp 感染性的单克隆中和抗体也主要是针对 E2 蛋白的。研究发现<sup>[10]</sup>,在 HCV 感染早期产生包膜蛋白抗体与 HCV 的清除有直接关系,即使在慢性感染阶段,包膜蛋白抗体的升高往往与血清 HCV RNA 水平的降低在发生时间上相一致,这些现象提示抗体有利于 HCV 的清除,这对于认识 HCV 慢性感染的发生机制以及开发 HCV 疫苗有重要意义。

### 3 HCV 中和抗体作用的靶点和机制

HCV 有肝细胞嗜性及在体内与体外培养肝细胞中复制的特性。感染靶细胞是一个附着、融合和病毒内化的级联过程。包膜蛋白 E1、E2 是附着阶段必不可少的,其与不同细胞受体结合,如硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS),参与病毒停留细胞表面中<sup>[11]</sup>;CD81、SRB1 和 Claudin-1 参与了病毒的附着和入胞<sup>[12]</sup>。病毒进入的机制:通过内涵素依赖的内吞作用(clathrine-dependant endocytosis)和 pH 依赖的核内体与病毒包膜的融合机制,病毒 RNA 被释放入胞浆。与其他病毒感染过程相似,中和抗体抗 HCV 的作用可以针对感染的不同阶段(图 1)。被抗体结合的病毒可以阻止病毒结合并侵入靶细胞,从而限制病毒的蔓延、扩散。抗体的结合可以干扰入胞相关融合蛋白并且抑制融合过程所必需的蛋白构象变化。此外,抗体的中和作用还可以干扰病毒的脱衣壳和胞内病毒复制的早期阶段<sup>[13]</sup>。

### 4 中和抗体对 HCV 发病机制的影响

体液免疫尤其是以中和抗体为主的保护性抗体,在阻断病毒感染、抑制病毒复制的过程中发挥着关键作用,从而为细胞免疫最终清除病毒及感染细胞创造条件。但是,人们对于中和抗体在抗 HCV 感染免疫中的作用却知之甚少。HCV RNA 在感染后的一周内就已经可以检测到,尽管病毒复制十分迅速,但是 HCV 特异性 T 淋巴细胞和 HCV 特异

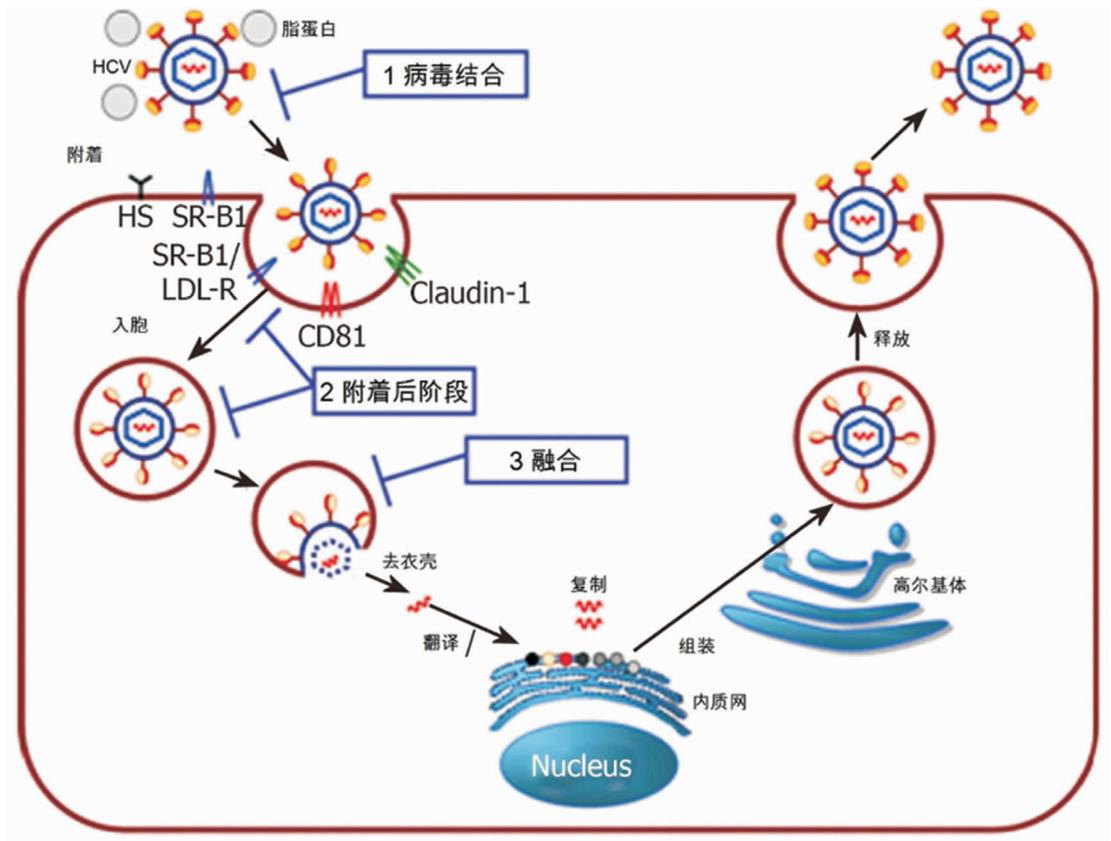


图 1 中和抗体在 HCV 生命周期中的潜在作用靶点

性抗体却延迟至感染后几周才能出现。HCV 感染中抗体介导的中和作用发生在体内,但是抗体对感染的控制作用却难以研究。已知的是 HCV 主要抗体缺陷的患者会发生疾病的迅速恶化,并且运用包含中和抗体 HCV RNA 阳性血浆的免疫球蛋白治疗 HCV 感染患者的研究已经有所报道<sup>[7]</sup>。但是,在大多数发病患者中,尽管针对多种表位 HCV 包膜糖蛋白的体液免疫诱导的发生,HCV 感染还是最终难以避免<sup>[6, 14]</sup>。

直到最近,利用 HCV 模型检测早期和慢性 HCV 感染中和抗体反应的功能性研究揭示了大多数患者在早期感染中中和抗体缺乏的事实<sup>[6, 13]</sup>。利用 HCVpp 模型,最近的 2 项研究结果证实中和抗体在早期被诱导,后期病毒被清除或感染得到控制。病毒清除与中和抗体早期的快速诱导紧密相关,同时中和抗体表现出针对早期感染的广谱、交叉的中和活性<sup>[15]</sup>。相比较,慢性 HCV 感染的特点是早期中和抗体的缺失或低梯度。早期感染中中和病毒能力的障碍直接导致了病毒对中和反应的逃逸和 HCV 感染的持续存在。这些结果表明,早期强大广谱的中和抗体反应能够控制 HCV 感染并且协助

细胞免疫对病毒的清除。这些结论在近期人免疫缺陷病毒(HIV)抗病毒反应中中和抗体控制 HIV 感染的发现得到进一步证实<sup>[16]</sup>。

然而,部分没有清除 HCV 的患者在感染慢性期体内出现了高滴度甚至交叉性抗体,令人费解的是,这些抗体却不能清除病毒<sup>[17]</sup>。这些在抗体介导的中和作用下发生的病毒逃逸可能与以下原因有关:(1) HCV 基因组准种的存在,准种(quasispecies)是指病毒在同一个体中以一群紧密相关但又互不相同的序列形式存在,准种的存在可能源于依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的校对功能不完善及宿主免疫压力的存在,是产生宿主免疫逃逸及容易导致慢性感染的机制之一;(2) HCV 糖蛋白与高密度脂蛋白和 SR-B1 的相互作用阻断了中和抗体的保护作用;(3)如同其他病毒(如 HIV)一样,中和抗体存在下的病毒逃逸可能通过不同机制的结合发生,如点突变、插入突变或者病毒包膜糖基化类型的改变等,从而阻止中和抗体的结合。

最近,一份慢性 HCV 感染患者随访 30 年的资料显示<sup>[18]</sup>,病毒通过重复突变导致抗体对 HCV 包膜糖蛋白识别的丧失,从而持续逃逸宿主的免疫系

统。资料显示,宿主针对病毒的中和抗体反应落后于 HCV 包膜糖蛋白序列准种的迅速演变,病毒包膜蛋白的序列和中和抗体特异性的改变提示中和抗体对 HCV 进化发挥选择性作用。与此假设相一致的是,准种的复杂性与 HCV 感染清除障碍和疾病慢性化已经得到了证实<sup>[19]</sup>。

## 5 结语

近年来,多种 HCV 感染培养模型的建立和发展为 HCV 感染中抗体介导的中和作用的研究打下了良好基础。自此,HCV 感染过程中的宿主中和反应的研究有了突飞猛进的发展,对抗体介导的中和反应分子机制的明确和宿主中和反应下病毒逃逸机制原因的研究都有了入手点。这些机制的最终阐明对理解 HCV 发病机制和发展新的控制 HCV 感染的预防性和治疗性策略有着举足轻重的作用<sup>[20-21]</sup>。我们有理由相信,在不久的将来,HCV 感染相关难题一定会为人类付诸的不懈探索及努力所攻克。

## [参考文献]

[1] Soriano V, Peters M G, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(3): 313 - 320.

[2] 聂青和,程勇前. 慢性丙型肝炎抗病毒失败者再治疗探讨[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(10): 2382 - 2385.

[3] 聂青和,罗新栋. 丙型肝炎疫苗研究及面临的挑战[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(10): 2405 - 2409.

[4] Webster D P, Klenerman P, Collier J, *et al.* Development of novel treatments for hepatitis C[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(2): 108 - 117.

[5] Barth H, Liang T J, Baumert T F. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications[J]. *Hepatology*, 2006, 44(3): 527 - 535.

[6] Logvinoff C, Major M E, Oldach D, *et al.* Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(27): 10149 - 10154.

[7] Yu M Y, Bartosch B, Zhang P, *et al.* Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(20): 7705 - 7710.

[8] Law M, Maruyama T, Lewis J, *et al.* Broadly neutralizing

antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge[J]. *Nat Med*, 2008, 14(1): 25 - 27.

[9] Codran A, Royer C, Jaeck D, *et al.* Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87 (Pt 9): 2583 - 2593.

[10] Hangartner L, Zinkernagel R M, Hangartner H. Antiviral antibody responses: the two extremes of a wide spectrum[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(3): 231 - 243.

[11] Barth H, Schnober E K, Zhang F, *et al.* Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction[J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10579 - 10590.

[12] Evans M J, von Hahn T, Tschernie D M, *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry [J]. *Nature*, 2007, 446(7137): 801 - 805.

[13] Netski D M, Mosbrugger T, Depla E, *et al.* Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(5): 667 - 675.

[14] Hadlock K G, Gish R, Rowe J, *et al.* Cross-reactivity and clinical impact of the antibody response to hepatitis C virus second envelope glycoprotein (E2) [J]. *J Med Virol*, 2001, 65 (1): 23 - 29.

[15] Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, *et al.* Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection[J]. *J Virol*, 2005, 79 (10): 6023 - 6034.

[16] Dreux M, Pietschmann T, Granier C, *et al.* High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(27): 18285 - 18295.

[17] Bowen D G, Walker C M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection[J]. *Nature*, 2005, 436 (7053): 946 - 952.

[18] von Hahn T, Yoon J C, Alter H, *et al.* Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 667 - 678.

[19] Farci P, Shimoda A, Coiana A, *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies [J]. *Science*, 2000, 288(5464): 339 - 344.

[20] Almasio P L, Ingrassia D, Vergara B, *et al.* New therapeutic prospects in HCV treatment[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008, 6(6): 775 - 779.

[21] 聂青和,李梦东. 加强病毒性肝炎的基础与临床研究[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2007, 16(1): 95 - 99.