

综述与专论

病毒离子通道

——一种新的抗病毒靶

袁玉华 王学谦 耿运琪 陈启民*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 病毒离子通道蛋白是一种在病毒生命周期中起多种作用的小跨膜蛋白, 可在宿主细胞膜上形成选择性离子通道, 一些离子通道阻滞剂能阻滞这些离子通道, 从而抑制这些病毒的繁殖, 因而病毒离子通道蛋白可作为新的抗病毒作用靶。

关键词 病毒, 离子通道, 抗病毒靶

学科分类号 Q6

病毒的高度重组和变异, 使许多针对病毒的靶向药物 (针对病毒的结构及调节蛋白, 酶类等) 难以发挥作用, 而联合用药 (如抗 AIDS 中的鸡尾酒疗法) 也不能避免病毒对药物的多重抵抗^[1]。这促使我们寻找病毒成分中更有效的抗病毒药物作用靶。

病毒离子通道蛋白是一种在病毒生命周期中起辅助作用的小的跨膜蛋白, 属于 viroporins (病毒孔蛋白) 家族^[2], 可在宿主细胞膜上形成选择性离子通道, 介导特殊离子 (如 Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, H⁺) 的输导从而对病毒的许多功能产生影响^[3]。它与包膜病毒粒子中的膜融合糖蛋白不同, 并不参与病毒入侵过程, 也非病毒颗粒的组成成分, 是病毒生命周期中病毒基因表达的蛋白质产物。

1 病毒离子通道的特征

病毒离子通道一般由 60 ~ 120 个氨基酸组成 (表 1), 至少含有一个高度疏水性 α 螺旋区, 病毒离子通道以寡聚体形式穿入细胞膜形成通道, 其中疏水性氨基酸面向磷脂双层, 亲水性氨基酸面向亲水孔, 在近螺旋区常常含有一些正电荷碱性氨基酸, 这些碱性氨基酸按 von Heijin 规则决定蛋白质在细胞膜上的拓扑定位, 此外, 在一些病毒离子通道还发现一种芳香族氨基酸富集区, 也能与细胞膜相互作用, 增加膜的通透性。

Table 1 List of several viroporins, indicating the number of amino acid residues^[2]

表 1 不同病毒孔蛋白氨基酸数量^[2]

Virus family	Viroporin	AA residues
Picornaviridae	Poliovirus 2B	97
	Coxsackievirus 2B	99
	Poliovirus 3A	87
Togaviridae	SFV 6K	60
	Sindbis virus 6K	55
	Ross River virus 6K	62
Retroviridae	HIV-1 Vpu	81
Paramyxoviridae	HRSV SH	64
Orthomyxoviridae	Influenza A virus M2	97
Reoviridae	ARV p10	98
Flaviviridae	HCV p7	63
Phycodnaviridae	PBCV-1 Kev	94
Rhabdoviridae	BEFV alpha 10p	88

SFV, Semliki forest virus; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HRSV, human respiratory syncytial virus; ARV, avian reovirus; HCV, Hepatitis C virus; PBCV-1, Paramecium bursaria chlorella virus; BEFV, bovine ephemeral fever virus.

在病毒感染过程中, 按照感染的时间进程, 发生两种不同模式的宿主膜通透性增加: 早期膜的修

* 通讯联系人。
Tel: 022-23501783, E-mail: yyhxxx39@sina.com
收稿日期: 2004-04-16, 接受日期: 2004-06-30

饰与病毒对宿主的入侵有关，是由于病毒颗粒成分（膜糖蛋白）而非病毒基因表达产物所引起；随着感染的继续，一些病毒的产物开始对细胞膜产生修饰作用，其中病毒离子通道在感染的晚期发挥它特有的作用。作为一种病毒感染过程中产生的膜作用蛋白，病毒离子通道与病毒粒子中的膜融合糖蛋白有相似的结构，例如，都含有疏水性穿膜 α 螺旋，以寡聚体形式与细胞膜发生作用等等。凭借其结构上的相似性，我们可以推测病毒离子通道能够行使与膜融合糖蛋白相似的功能，例如造成细胞膜对离子或小分子物质通透性增加，病毒膜融合糖蛋白在病毒的入侵及出芽过程中起关键作用，病毒离子通道能加速病毒的出芽，而离子通道并不参与病毒的复制，但能加速病毒的生长及影响糖蛋白的转运^[2]。许多缺乏离子通道蛋白的病毒，其功能被膜融合糖蛋白所取代^[2]，如 HIV-2 病毒并不含有 HIV 的 Vpu 蛋白，事实上缺乏 Vpu 的 HIV-2 和 SIV 病毒对宿主确实有更好的疾病预后，因而病毒离子通道可能是病毒进化过程的一个中间产物^[4]。免疫定位研究发现，多数离子通道蛋白位于感染细胞内部，很少在浆膜中见到，通过将某些离子通道蛋白滞留在细胞内部，发现能阻碍它的膜通透能力，这说明离子通道蛋白是通过从细胞内转运到浆膜而发挥作用。到目前为止，已陆续发现许多包膜病毒编码离子通道蛋白，如 HIV-Vpu、感冒病毒 M2、CM2、NB、HCVp7、chlorella virus PBCV-1 Kcv、Alphavirus 6K 和 rhinovirus 3AB，其中仅对 M2、Vpu 和 HCV p7 的结构和功能研究得比较清楚。

2 HIV-Vpu

Vpu 含有 81 个氨基酸，属于 I 类内膜蛋白，N 端 27 个氨基酸残基构成跨膜区，后 54 个氨基酸是胞内区，含有两个 α 螺旋，中部的保守区含有两个被磷酸化的丝氨酸，两个 B 细胞和一个 CTL 细胞作用表位（图 1）。N 端跨膜区的作用主要是增加感染细胞中病毒颗粒的释放。体外实验发现，该片段以五元束形式在细胞膜形成离子通道，许多实验证实，Vpu 表达增加了细胞膜对小分子的通透性，通道对一价阳离子如 K^+ ， Na^+ 选择性通透^[5]，Vpu 形成离子通道能力决定其促进病毒颗粒的释放能力，对 Vpu 跨膜区进行突变，使其丧失离子通道活性后，其对病毒颗粒促进释放的能力也丧失。因而很有可能是由于 Vpu 对细胞膜的修饰造成细胞整体环境改变，从而增加了病毒颗粒的释放。计算机模拟发现 23 位丝氨酸和 22 位色氨酸对离子通道的开关起关键作用，面向亲水孔的 Ser23 和面向疏水性脂质的 Try22 构成离子通道的开放状态，Vpu 五元束的扭曲使 Try22 转向亲水孔从而关闭了通道^[6]。最近发现 amiloride 衍生物能阻断 Vpu 的离子通道活性^[7]。

Vpu 还可通过触发一系列连续的反应引起被感染细胞表面 CD4 表达的下调^[8]，52 位和 56 位丝氨酸对 CD4 降解起关键作用^[9]，Vpu 通过它的胞内区与 CD4 的 402 位到 420 位氨基酸结合^[10]，导致 CD4 的降解，降低 CD4-gp160 复合物形成，使 gp160 重新转运到细胞表面而增加成熟病毒颗粒的释放。

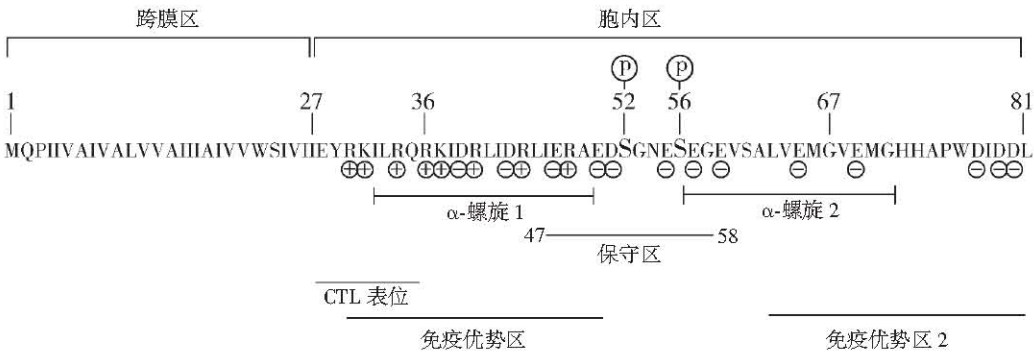


Fig. 1 Structure of HIV-Vpu
图 1 HIV-Vpu 结构

3 流感病毒 M2

M2 是由 92 个氨基酸组成的Ⅲ型内膜蛋白, 由 3 个区域构成: 23 个氨基酸的胞外区, 19 个氨基酸的跨膜区和 54 个氨基酸的胞内区. M2 蛋白通过 cysteine-17, 19 位氨基酸之间的二硫键形成同源四聚体结构, 跨膜区以左手螺旋四元束结构在细胞膜形成离子通道. M2 蛋白在流感病毒感染过程中有两个作用. 一是在病毒入侵过程中, M2 转运质子跨过病毒包膜, 使病毒颗粒内部 pH 降低, 从而加速 RNP 与基质蛋白的分离及进入细胞核^[11]. M2 的另一个作用是升高高尔基体反面的网络结构

(*trans* Golgi network) pH, 防止低 pH 条件下造成的未成熟构象改变^[12]. 位于 M2 蛋白 TM 区的 His37 和 Trp41, 它们之间的 pH 依赖性相互作用对离子通道的开放过程起重要作用^[13]. Takeuchi 等^[14]提出了 M2 离子通道作用模式: 在中性条件下, 四元束中的 4 个 His37 咪唑环形成环型氢键, 使质子通道关闭; 在低 pH 条件下, His37 咪唑环被质子化, 之间的氢键断裂, His37 咪唑环与相邻螺旋的 Trp41 吲哚环相互吸引, 使质子通道开放(图 2). 而金刚烷胺(amantadine)可阻断流感病毒的入侵及病毒颗粒正常的出芽^[15].

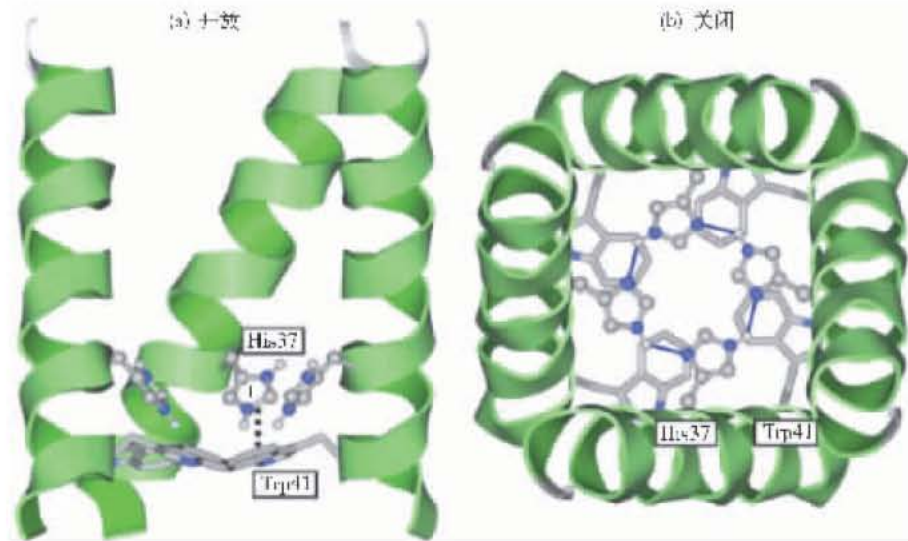


Fig. 2 Model of M2 Ion Channel

图 2 M2 离子通道模式图

- (a) 显示四螺旋束中的 3 个, 带正电荷的 His37 咪唑环与邻近螺旋的 Trp41 吲哚环相互吸引, 使质子通道开放;
(b) 4 个中性的 His37 咪唑环形成环型氢键, 阻止质子通过, 同时 Trp41 的较大吲哚环也阻止 C 端质子通过。

4 HCV p7

HCV 的 p7 基因位于 E2 和 NS2 之间, 编码一个 63 氨基酸组成的疏水蛋白, 通过研究 P7 在哺乳动物细胞中表达发现, P7 是一种锚定在内质网上的跨膜蛋白, 有两个跨膜区, 它们由一个胞内 LOOP 连接起来. 尽管对 p7 的研究不多, 但发现, 与 HCV 基因结构相似的牛病毒性腹泻病毒, p7 对产生子代病毒颗粒必不可少, HCV p7 并不影响病毒的复制, 但对病毒的感染性起着决定性作用^[16]. p7 的 C 端跨膜区可作为信号序列促进 NC2 转导到内质网上, 以利于宿主信号肽酶对其裂解, Griffin

等^[17]发现重组 p7 蛋白在 HepG2 细胞及人工质膜中形成六聚体阳离子通道, 负责宿主细胞中从内质网到胞浆的离子转运, 并造成细胞内膜结构不稳定化, 促进成熟的病毒颗粒释放. 发现其活性可被流感病毒离子通道抑制剂金刚烷胺及 long-alkyl-chain iminosugar 衍生物所阻断, 因此, p7 可能成为一个抗 HCV 治疗的靶位.

5 其他病毒离子通道蛋白

其他病毒离子通道蛋白如流感病毒 C 的 CM2 蛋白形成一种电压依赖的离子通道, 流感病毒 B 的 NB 蛋白形成 pH 依赖的阳离子 (Na^+ , Cl^-) 通

道, 两者均可被金刚烷胺抑制^[18]. Chlorella virus PBCV-1 编码一种 K 离子通道蛋白 Kcv, 在病毒生命周期中起很重要作用, 可能为病毒复制所需要, 同样可被金刚烷胺和钆所抑制^[19].

Alphavirus 6K 和 rhinovirus 3AB 通过对宿主细胞膜的修饰, 影响糖蛋白的加工、转运及膜表面受体的表达, 增加病毒感染性. Rhinovirus 3AB 也同时影响病毒的复制. 虽然 Alphavirus 6K 蛋白和 rhinovirus 3AB 蛋白均可以形成阳离子通道, 但由于通道的孔径较一般离子通道大, 也能透过一些小分子物质, 普通离子通道抑制剂不能发挥抗病毒作用, 实验也发现病毒可以通过扩大离子通道孔径来逃避通道封阻剂的作用^[20], 因而设计新型针对较大孔径病毒离子通道抑制剂是很有应用价值的.

病毒离子通道是一种非常有前途的抗病毒靶, 对病毒离子通道的抑制显然可以降低病毒的繁殖, 这对机体免疫系统最终清除病毒有非常重要的意义. 尽管对病毒离子通道结构及功能认识刚刚开始^[2], 但随着更多的病毒离子通道结构被解析, 将会发现并设计出新的和更有效的病毒离子通道阻抑剂.

参 考 文 献

- O'Hara B M, Olson W C. HIV entry inhibitors in clinical development. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, **2** (5): 523 ~ 528
- Gonzalez M E, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett*, 2003, **552** (1): 28 ~ 34
- Fischer W B, Sansom M S P. Viral ion channels: structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1561** (1): 27 ~ 45
- Bour S, Strebel K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes and Infection*, 2003, **5** (11): 1029 ~ 1039
- Ewart G D, Sutherland T, Gage P W, *et al.* The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol*, 1996, **70** (10): 7108 ~ 7115
- Grice A L, Kerr I D, Sansom M S. Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Lett*, 1997, **405**

- (3): 299 ~ 304
- Ewart G D, Mills K, Cox G B, *et al.* Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *Eur Biophys J*, 2002, **31** (1): 26 ~ 35
- Willey R L, Maldarelli F, Martin M A, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*, 1992, **66** (12): 7193 ~ 7200
- Schubert U, Strebel K. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J Virol*, 1994, **68** (4): 2260 ~ 2271
- Bour S, Schubert U, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J Virol*, 1995, **69** (3): 1510 ~ 1520
- Wharton S A, Belshe R B, Skehel J J, *et al.* Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. *J Gen Virol*, 1994, **75** (Pt 4): 945 ~ 948
- Takeuchi K, Lamb R A. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *J Virol*, 1994, **68** (2): 911 ~ 919
- Czabotar P E, Martin S R, Hay A J. Studies of structural changes in the M2 proton channel of influenza A virus by tryptophan fluorescence. *Virus Res*, 2004, **99** (1): 57 ~ 61
- Takeuchi H, Okada A, Miura T. Roles of the histidine and tryptophan side chains in the M2 proton channel from influenza A virus. *FEBS Lett*, 2003, **552** (1): 35 ~ 38
- Ruigrok R W, Hirst E M, Hay A J. The specific inhibition of influenza A virus maturation by amantadine: an electron microscopic examination. *J Gen Virol*, 1991, **72** (Pt 1): 191 ~ 194
- Sakai A, Claire M S, Faulk K, *et al.* The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (20): 11646 ~ 11651
- Griffin S D, Beales L P, Clarke D S, *et al.* The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*, 2003, **535** (1 ~ 3): 34 ~ 38
- Sunstrom N A, Premkumar L S, Premkumar A, *et al.* Ion channels formed by NB, an influenza B virus protein. *J Membr Biol*, 1996, **150** (2): 127 ~ 132
- Mehmel M, Rothermel M, Meckel T, *et al.* Possible function for virus encoded K⁺ channel Kcv in the replication of chlorella virus PBCV-1. *FEBS Lett*, 2003, **552** (1): 7 ~ 11
- Astrahan P, Kass I, Cooper M A, *et al.* A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug. *Proteins*, 2004, **55** (2): 251 ~ 257

Virus Ion Channels: a Kind of New Target for Antivirus Drug Action

YUAN Yu-Hua, WANG Xue-Qian, GENG Yun-Qi, CHEN Qi-Min*

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Viral ion channels are short transmembrane proteins, which have multifunctional roles in the life cycle of virus. It has been shown to form selective ion channel in host cell membrane. Some ion channel blockers are able to block the channels and inhibit the ion channels activity which may lead to diminished virus production. It suggests that the virus ion channels could be a kind of highly relevant target for antiviral drug action.

Key words virus, ion channel, target for antiviral drug action

* Corresponding author. Tel: 86-22-23501783, E-mail: yyhxxx39@sina.com

Received: April 16, 2004 Accepted: June 30, 2004