

ma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening; a correlative MILD trial study[J]. Journal of Clinical Oncology, 2014, 32(8): 768-773.

[13] Cui E, Li H, Hua F, et al. Serum microRNA 125b as a diagnostic or prognostic biomarker for advanced NSCLC patients receiving cisplatin-based chemotherapy[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2013, 34(2): 309-313.

[14] Powrozek T, Krawczyk P, Kowalski DM, et al. Plasma circulating microRNA-944 and microRNA-3662 as potential histologic type-specific early lung cancer biomarkers [J]. Translational Research, 2015, 166(4): 315-323.

[15] Li J, Tan Q, Yan M, et al. miRNA-200c inhibits invasion and metastasis of human non-small cell lung cancer by directly targeting ubiquitin specific peptidase 25[J]. Molecular Cancer, 2014(13): 166-179.

[16] Loriot A, Tongelen AV, Blanco J, et al. A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and TET-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors[J]. Epigenetics, 2014, 9(8): 1163-1171.

[17] Mascaux C, Feser WJ, Lewis MT, et al. Endobronchial miRNAs as biomarkers in lung cancer chemoprevention [J]. Cancer Prevention Research, 2013, 6(2): 100-108.

[18] Salim H, Akbar NS, Zong D, et al. miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells

through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence[J]. British Journal of Cancer, 2012, 107(8): 1361-1373.

[19] Rui W, Bing F, Hai-Zhu S, et al. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells(SPC-A1)[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2010, 14(1/2): 206-214.

[20] Feng B, Wang R, Song HZ, et al. MicroRNA-200b reverses chemoresistance of docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells by targeting E2F3 [J]. Cancer, 2012, 118(13): 3365-3376.

[21] Li X, Shi Y, Yin Z, et al. An eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in lung adenocarcinoma [J]. Journal of Translational Medicine, 2014 (12): 159-170.

[22] McNally ME, Collins A, Wojcik SE, et al. Concomitant dysregulation of microRNAs miR-151-3p and miR-126 correlates with improved survival in resected cholangiocarcinoma[J]. HBP, 2013, 15(4): 260-264.

[23] Navarro A, Diaz T, Gallardo E, et al. Prognostic implications of miR-16 expression levels in resected non-small-cell lung cancer [J]. Journal of Surgical Oncology, 2011, 103(5): 411-415.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2016-01-14)

• 综述 •

流感病毒与唾液酸相互作用机制的研究*

熊 格 综述, 李 艳[△] 审校(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

【关键词】 流感病毒; 唾液酸; 细胞表面受体; 抗病毒药物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.050 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)09-1273-03

病毒感染是由病毒颗粒与宿主细胞表面的特异性受体结合引起, 因此病毒受体决定其感染宿主的范围并支配病毒-宿主细胞结合特异性。对许多病毒而言, 主要受体为糖蛋白或糖脂。末端带唾液酸或唾液酸衍生物的糖蛋白或糖脂是大量病毒受体, 如致病性流感病毒 A、B、C 和副流感病毒^[1-3], 引起人类急性出血性结膜炎的柯萨奇病毒 A24 和肠道病毒 70^[4], 导致流行性角膜炎的人类 D 型腺病毒, SV40、人类 JC 病毒和 BK 病毒等^[5]。以往研究人员对聚糖与宿主细胞作用机制还不了解, 直到聚糖微阵列(糖基因芯片)筛选技术问世, 提高了研究人员对聚糖受体识别及鉴定分析能力, 使其能进一步详细分析病毒黏附聚糖受体方式及两者相互作用。本文将着重对流感病毒与唾液酸间相互作用进行综述, 从而为防治病毒感感染和设计改良用于临床治疗的病毒载体提供依据。

1 唾液酸受体的作用

唾液酸是 1 种九碳单糖的神经氨酸衍生物, 存在于所有细胞表面及大多数脊椎动物糖蛋白和糖脂末端^[6]。最主要的 2

种唾液酸为 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)和 N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc), 两者差别在于 N-酰基上多余的 1 个氧原子。Neu5Ac 在细胞中可以通过 CMP-Neu5Ac 羟化酶(CMAH)羟化形成 Neu5Gc。神经氨酸的修饰方式还包括乙酰化、甲基化和羟基硫酸化。唾液酸通常以 C2 位碳原子 α -连接方式与糖蛋白和糖脂的糖链连接, 形成 $(\alpha-2, 3)$ 、 $(\alpha-2, 6)$ 或 $(\alpha-2, 8)$ 连接, 其连接方式差异造成末端唾液酸空间构象不同, 从而决定受体结合特异性。对宿主细胞而言, 唾液酸主要功能是细胞-细胞黏附作用和细胞间信号传导作用(特别是在免疫系统)。一般情况下, 病毒表面蛋白血凝素与宿主细胞表面唾液酸的结合为低亲和力、单个受体配体结合, 但某些病毒为高亲和力、多个 HA/配体结合, 使病毒能优先结合相应受体细胞^[7]。

2 流感病毒与唾液酸受体

流感病毒是正粘病毒科家族分节段、单链 RNA(ssRNA) 病毒, 能引起流行性感冒的人畜共患传染病病原体。根据流感病毒核蛋白抗原性分为甲(A)、乙(B)、丙(C)3 型; 也能根据感

* 基金项目: 国家重点专科项目[财社(2010)305 号]。

[△] 通讯作者, E-mail: yanlitf1120@163.com。

染宿主不同分为人、猪流感病毒等。流感病毒表面有 2 种重要糖蛋白:血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA),HA 可识别并结合宿主细胞表面的唾液酸受体;而 NA 具有水解唾液酸活性。

流感病毒感染宿主细胞步骤如下:(1)吸附。HA 与细胞表面唾液酸受体结合,其中,HA 可与(α -2,3)、(α -2,6)连接唾液酸结合,从而黏附于宿主细胞表面[禽流感病毒主要与(α -2,3)连接唾液酸结合,人流感病毒优先与(α -2,6)连接唾液酸结合][8]。(2)侵入。病毒与唾液酸受体结合后,还需要宿主整合蛋白等其他共同受体发挥病毒细胞内化作用。(3)释放。病毒在宿主细胞完成复制循环,NA 水解细胞表面和病毒糖蛋白上的唾液酸,切断病毒与细胞联系,使新病毒颗粒从宿主细胞释放,继而感染其他宿主细胞。可见,流感病毒感染是宿主细胞唾液酸受体、病毒 HA 和 NA 协同作用的结果。

2.1 HA 与唾液酸受体的结合 HA 存在于病毒包膜外,呈柱状。HA 蛋白以三聚体形式分布于病毒衣壳表面,能被碱性蛋白酶水解为 HA1(球状头部)和 HA2(杆状基底膜分布)2 个亚单位。HA1 头部球形区域含有唾液酸受体结合位点,负责病毒与宿主细胞表面受体结合;HA2 则有利于病毒包膜与宿主细胞膜融合。流感病毒菌株受体结合位点均位于 HA1 结构域浅槽内,是 1 个高度保守区域。唾液酸与所有已知结构的 HA1 结合模式相似,同为高度保守。流感病毒 HA 与唾液酸结合机制为:Neu5Ac 羧基插入 HA1 结构域内的受体结合位点,与相邻残基形成 2 个氢键;甘油、N 乙酰基链与病毒 HA 剩余残基形成氢键;N 乙酰基链的甲基团插入病毒结合位点疏水区域——此为病毒-聚糖相互作用过程中的特征反应。

研究发现,旋转糖苷键能够使半乳糖分子通过 1 个相对于 Neu5Ac-N-乙酰基位置,顺式或反式构象适合不同 HA 分子模式[8]。在已知 HA-受体复合物晶状体结构中,禽流感病毒 HA 分子结合受体为(α -2,3)反式构象,而人类流感病毒结合受体则多为(α -2,6)顺式构象。禽流感病毒 H5 和 H7 毒株结构分析表明,HA 蛋白受体结合位点发生突变能改变结合构象,使其从反式构象变为顺式构象,获得与(α 2,6)连接唾液酸的亲和力[9-10]。

2.2 HA 与唾液酸受体结合的决定因素 所有流感病毒株都与唾液酸结合,但唾液酸复合糖结构因单糖排列方式不同而呈多样性。研究发现,HA 蛋白受体结合位点的多糖与(α -2,3)连接唾液酸结合为保守型构象,呈圆锥形状;而与(α -2,6)连接唾液酸结合为开放型构象,呈伞状[11]。受体分子结构上半乳糖与唾液酸的连接方式决定 HA1 与多聚糖拓扑结构上特定寡糖的亲和力。通过对 1918 年(H1N1)、1957 年(H2N2)、1968 年(H3N2)和 2009 年(H1N1)等历史上著名禽流疫情研究,证实导致上述大疫情的流感病毒并非人源性流感病毒,而是禽流感病毒 HA 蛋白受体结合位点发生突变,获得结合(α -2,6)连接唾液酸能力[12]。有研究发现,人类呼吸道存在(α -2,3)连接唾液酸,吸入一定剂量禽流感病毒可能到达下呼吸道,受到感染[13-14]。

通过糖基因芯片技术对流感病毒偏好性结合受体进行分析,可解释跨种传播机制。1918 年流感病毒株 H1N1(A/South Carolina/1/1918),与禽流感病毒共有氨基酸序列不同,其 HA 蛋白受体结合位点的氨基酸序列 E190D 和 G225D 发生突变,增强病毒与(α -2,6)连接唾液酸的亲和力。相反,流感病毒株(A/New York/1/1918)则是共有序列被 E190D 替代,能同时与(α -2,3)和(α -2,6)连接唾液酸结合。若禽类和人类流感病毒 HA 基因第 225 位为甘氨酸,则有与(α -2,3)连接唾液酸结合能力;若 HA 基因第 225 位为天冬氨酸,则不能与受

体结合[15]。此外,流感病毒株(A/New York/1/1918)由于 HA 基因第 190 位氨基酸突变,具有(α -2,3)连接唾液酸结合能力[16]。因此,第 190、225 位 2 个位点氨基酸性质决定流感病毒受体的特异性。通过糖基因芯片技术研究发现,2009 年分离某些 H1N1 菌株 HA 基因第 225 位甘氨酸,却具有与(α -2,3)连接唾液酸结合的能力,并证明该病毒受体结合偏好性更类似于猪流感病毒,而非人类季节性流感病毒[17-18]。故仅仅通过流感病毒株与(α -2,3)或(α -2,6)连接唾液酸结合方式进行分类过于简单,有学者利用糖基因芯片技术对 1968~2012 年从哺乳动物细胞分离的季节性 H3N2 流感病毒株进行筛选,发现 45 株流感菌株 HA1 序列并非完全相同,说明随着时间变化,抗原漂移导致不同病毒受体结合特异性和亲和性发生变化。进一步对 H3N2 流感病毒结合特异性研究发现,早期分离菌株优先结合短支链唾液酸糖链,而新近分离菌株则对长链多聚唾液酸表现出高亲和力。

尽管已经证实人流感病毒偏好与(α -2,6)连接唾液酸结合,但其不能解释菌株结合的特异性。HA 与(α -2,3)或(α -2,6)连接唾液酸的亲和力还无法完全解释,不同受体配体连接方式如何影响流感病毒传播[19]。流感病毒主要与含有(α -2,3)连接唾液酸的聚糖结合,但更易与糖链末端第 2、3 位发生硫酸化和唾液酸化的多糖结合。如果该位点发生岩藻糖基化,亲和力将显著减弱[16,20]。上述研究表明,流感病毒和唾液酸的特异性结合主要由糖链末端唾液酸与糖链连接方式决定,但其并非唯一决定因素,糖链长度、唾液酸糖复合物修饰方式及唾液酸受体拓扑结构差异也会影响结合。

2.3 唾液酸受体结合位点对病毒传播的影响 流感病毒 HA 受体结合位点的氨基酸发生突变能引起受体结合特异性改变,而 HA 某些残基和其他病毒蛋白发生突变也能影响流感病毒的传播。由于雪貂感染病毒的组织嗜性和致病机制与人类相似[21],研究人员通常利用雪貂作为流感病毒感染动物模型。有研究表明 H5 亚型 HA 突变导致受体特异性结合方式从(α -2,3)连接唾液酸转变为(α -2,6)连接唾液酸,从而使病毒能黏附在鼻腔,影响了流感病毒在雪貂间的传播[22-23]。此外,糖结合位点突变会导致受体特异性结合的偏向性改变,而病毒蛋白复制或转录过程中发生突变则会影响传播表型[24]。因此,HA 特异性结合虽然会影响流感病毒的传播,但它并非唯一决定因素。研究人员对多聚糖在流感病毒发病机制中作用的研究还在进一步深入。

2.4 流感病毒的靶向抑制剂 现有研究表明,多数病原体将唾液酸作为受体,其中不乏导致人类疾病病原体,如流感病毒、腺病毒和轮状病毒等,故有研究开始将病毒-唾液酸结合作用机制应用于病毒治疗,将连接唾液酸作为基因传递载体或溶瘤剂。若能操控病毒与唾液酸的相互作用,将有望改善治疗效果。流感病毒感染细胞及从细胞释放病毒颗粒与唾液酸紧密关联,故可将两者形成的复合结构作为抗病毒靶标。奥塞米韦和扎那米韦基于流感病毒和唾液酸的复合结构设计,属于唾液酸衍生物抗病毒药物,用于抑制流感病毒 NA 和阻止子代病毒粒子在细胞的释放。流感病毒 NA 9 种亚型依据一级结构可分为:第 1 组(N1, N4, N5 和 N8)、第 2 组(N2, N3, N6, N7 和 N9)及 N10(新近发现,但已用体外酶试验显示 N10 无 NA 活性)。通过晶状体模拟分析研究显示,第 1 组 NA 酶活性区域有 1 个 150-洞,且第 1 组唾液酸结合位点比第 2 组大,表明第 1 组 NA 可能产生特定 NA 抑制剂活性部位,使结合更紧密。根据第 2 组神经氨酸蛋白设计的奥塞米韦和扎那米韦,近年多次出现口服生物利用率低、耐药株等现象,表明现有抑制剂在设

计方面存在不足。已有科学家发现新型 NA 抑制剂,用小鼠实验证明该新型抑制剂能与 NA 形成稳定的共价中间体,通过延长结合时间间隔,抑制 NA 活性,有效预防和治疗流感病毒^[25]。流感病毒 HA 也能作为药物靶点,但 HA 与唾液酸受体结合的亲和力较低,单价唾液酸衍生物的生产较困难,而多价唾液酸衍生物又难以与宿主细胞结合且具有毒性,故 HA 较少用作药物靶标。

3 小 结

流感病毒属于 RNA 病毒,由于其 RNA 酶缺乏校对功能,病毒在复制或转录时容易出现错配引起突变,形成新亚型,所以目前对流感病毒与唾液酸研究较少。

近年来,已有研究人员通过糖基因芯片技术和“散弹糖组学”对聚糖进行研究。利用“散弹糖组学”可分离并显示细胞内所有聚糖,使研究人员能检测,并能对其结构进行分析。未来可结合 2 种技术研究流感病毒与多聚糖结合偏好性,有助于进一步了解流感病毒与细胞受体的相互作用,为流感病毒的预防和治疗开辟新途径。

参考文献

[1] Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, et al. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(11): 739-749.

[2] Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28403-28409.

[3] Iorio RM, Mahon PJ. Paramyxoviruses: different receptors-different mechanisms of fusion[J]. *Trends Microbiol*, 2008, 14(4): 135-137.

[4] Mistry N, Inoue H, Jamshidi F, et al. Coxsackievirus A24 variant uses sialic acid-containing O-linked glycoconjugates as cellular receptors on human ocular cells[J]. *J Virol*, 2011, 85(21): 11283-11290.

[5] Nilsson EC, Storm RJ, Bauer J, et al. The GD1a glycan is a cellular receptor for adenoviruses causing epidemic keratoconjunctivitis[J]. *Nat Med*, 2011, 17(1): 105-109.

[6] Varki NM, Strobert E, Dick EJ, et al. Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 365-393.

[7] Stroh LJ, Maginnis MS, Blaum BS, et al. The Greater affinity of JC polyomavirus capsid for $\alpha 2, 6$ -Linked Lactoseries tetrasaccharide c than for other sialylated glycans is a major determinant of infectivity[J]. *J Virol*, 2015, 89(12): 6364-6375.

[8] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. *Nature*, 2006, 440(7083): 435-436.

[9] 张蔚,施一. 禽流感病毒跨种传播的分子机制[J]. *生命科学*, 2015, 27(5): 539-548.

[10] Lu X, Shi Y, Zhang W, et al. Structure and receptor-binding properties of an airborne transmissible avian influenza A virus hemagglutinin H5 (VN1203mut) [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(7): 502-511.

[11] Viswanathan K, Chandrasekaran A, Srinivasan A, et al.

Glycans as receptors for influenza pathogenesis[J]. *Glycoconj J*, 2010, 27(6): 561-570.

[12] Varki A. Sialic acids in human health and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(8): 351-360.

[13] Zhou J, Wang D, Gao R, et al. Biological features of novel avian influenza A (H7N9) virus [J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 500-503.

[14] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway[J]. *Nature*, 2006, 440(7083): 435-436.

[15] Tumpey TM, Maines TR, Van hoeven N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission[J]. *Science*, 2007, 315(5812): 655-659.

[16] Stevens J, Blixt O, Glaser L, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities [J]. *J Mol Biol*, 2006, 355(5): 1143-1155.

[17] Xu R, McBride R, Nycholat CM, et al. Structural characterization of the hemagglutinin receptor specificity from the 2009 H1N1 influenza pandemic[J]. *J Virol*, 2012, 86(2): 982-990.

[18] Zhao G, Fan Q, Zhong L, et al. Isolation and phylogenetic analysis of pandemic H1N1/09 influenza virus from swine in Jiangsu province of China [J]. *Res Vet Sci*, 2012, 93(1): 125-132.

[19] Xiong X, Martin SR, Haire LF, et al. Receptor binding by an H7N9 influenza virus from humans[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 496-499.

[20] Xu D, Newhouse EI, Amaro RE, et al. Distinct glycan topology for avian and human sialo-pentasaccharide receptor analogues upon binding different hemagglutinins: a molecular dynamics perspective[J]. *J Mol Biol*, 2009, 387(2): 465-491.

[21] Maines TR, Lu XH, Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals[J]. *J Virol*, 2005, 79(18): 11788-11800.

[22] Xiong XL, Coombs PJ, Martin SR, et al. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus[J]. *Nature*, 2013, 497(7449): 392-396.

[23] Kim HM, Kim CK, Lee NJ, et al. Pathogenesis of novel reassortant avian influenza virus A(H5N8) isolates in the ferret[J]. *Virology*, 2015, 481(7): 136-141.

[24] Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1534-1541.

[25] Vavricka CJ, Liu Y, Kiyota H, et al. Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1491.