

DOI:10.13350/j.cjpb.230424

• 综述 •

病毒感染引起的内质网应激对不同生物学功能的影响研究进展*

田丽平¹,冯冠榕¹,鲁会军^{1,2},肖朋朋^{1**},李楠^{1**},金宁一^{1,2**}

(1.温州大学病毒学研究所,浙江温州 325000;2.军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所)

【摘要】 内质网(endoplasmic reticulum stress, ER)是蛋白质合成基地,也是蛋白质翻译后修饰、折叠和转运的重要场所。当细胞合成大量蛋白质、受到病毒感染、细胞缺氧、氧化应激等,都会致使未折叠/错误折叠蛋白在 ER 中大量积累,导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。近年来,研究人员对病毒感染引起的 ERS 及其对细胞自噬、凋亡、炎症等生物学功能的影响做了大量研究,取得了突破性的进展。本篇综述旨在对近年来关于病毒感染引起的 ERS 及其对多种生物学功能影响的研究现状进行总结归纳,从 ERS 视角为预防及治疗病毒感染性疾病提供新方向和干预措施。

【关键词】 内质网应激;自噬;凋亡;炎症反应;综述

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)04-0486-03

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Apr;18(4):486-488.]

Research progress on the effects of endoplasmic reticulum stress caused by virus infection on different biological functions

TIAN Li-ping¹, FENG Guan-rong¹, LU Hui-jun^{1,2}, XIAO Peng-peng¹, LI Nan¹, JIN Ning-yi^{1,2} (1. Institute of Virology, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Sciences)

【Abstract】 The endoplasmic reticulum (ER) is the base of protein synthesis and its an crucial place for protein post-translational modification, folding and transport. When cell synthesizes a large number of proteins, or infected by virus, cell hypoxia, oxidative stress, etc., it will cause a large amount of unfolded/misfolded protein to accumulate in the ER, leading to endoplasmic reticulum stress (ERS) and activating unfolded protein response (unfolded protein response, UPR). In recent years, researchers have done a lot of research on ERS caused by virus infection and its influence on the biological functions of cell autophagy, apoptosis, inflammation, and achieved a lot of breakthrough progress. This review aims to summarize the current research status of ERS caused by viral infections and its effects on various biological functions in recent years, and provide a new directions and intervention measures for the prevention and treatment of viral infectious diseases from the perspective of ERS.

【Key words】 endoplasmic reticulum stress; autophagy; apoptosis; inflammatory reaction; review

***内质网(endoplasmic reticulum, ER)是蛋白质合成、加工的重要细胞器^[1],其在维持蛋白质稳态中起着重要的作用。当细胞内刚合成的未折叠蛋白出现异常堆积/错误折叠时,倘若其堆积超过 ER 处理能力,ER 便会通过未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)的一系列信号级联反应减少新生蛋白质合成,加快其折叠、降解以保持细胞内环境的稳定^[2]。真核生物中,UPR 信号是由 ER 上三个跨膜蛋白所参与,分别为:肌醇需求酶 1(inositol requiring protein 1, IRE1),转录激活因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)和蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase RNA-like ER kinase, PERK)。这 3 个跨膜蛋白行使监视蛋白质折叠情况的职责,在正常生理状态下,IRE1、ATF6 和 PERK 与 ER 分子伴侣结合免疫球蛋白(binding immunoglobulin protein, BIP)结合处于失活状态;当蛋白质错误折叠/发生未折叠蛋白异常积聚时,BIP 会从这三种跨膜蛋白上解离,使其接收到这种异常信号,进而诱导 ERS 下游的相关基因表达^[3]。ERS 已被证实与细胞自噬、凋亡、炎症等生物学功能密切相关。本篇综述旨在总结归

纳近年来关于病毒感染引起的 ERS 及其对多种生物学功能的影响,有助于为病毒感染相关疾病的治疗提供新思路。

1 ERS 与自噬

在早期研究中,ERS 和自噬一直被大家认为是两个独立的生物学机制,然而越来越多的研究表明,ERS 能够引起细胞自噬的发生^[4]。

1.1 自噬 自噬是一种保守的溶酶体降解过程,对细胞稳态和适应应激至关重要^[5]。目前已经发现了 30 多种调控自噬的蛋白(autophagy related gene, ATG)^[6]。自噬对细胞和生物体

* **【基金项目】** 传染病防治科技重大专项(No. 2018ZX10102001)。

** **【通讯作者】** 金宁一, E-mail: ningyik@126.com

李楠, E-mail: linan0912@126.com

肖朋朋, E-mail: xiaopengpeng1010@126.com

【作者简介】 田丽平(1997-),女,贵州铜仁人,在读硕士研究生,主要从事分子病毒学研究。E-mail: 1694593631@qq.com

是有益的,因为它能防止对机体有害的蛋白质聚集体的积累,去除受损的细胞器,并为细胞和生物体提供生存所需的生物能量底物^[7]。依据参加自噬的核心蛋白的作用,可将 ATG 分为 5 大类,分别为:ULK1 激酶复合物,III 型磷脂酰肌醇 3-激酶复合物(class III phosphatidylinositol 3-kinase complex, class III PI3K/VPS34 复合物),ATG12 复合物,LC3 复合物,ATG9 转运复合物^[8]。当自噬发生时,ATG4 切割自噬相关蛋白 LC3,产生 LC3-I,LC3-I 随即发生脂质化转变为 LC3-II,LC3-II 可参与自噬体形成。所以,脂化的 LC3-II 上调或 LC3-II/LC3-I 的比值变大是自噬发生的重要信号。ULK1 复合物由 ULK1 或 ULK2、ATG13、FIP200 和 ATG101 组成,ULK1 复合物参与自噬的起始,自噬时,ULK1 发生自身磷酸化后被激活,随即 ULK1 磷酸化 ULK1/2 与 FIP200,ULK1 复合物聚集在自噬体形成位点,诱导自噬的产生^[8]。自噬相关信号通路主要包括 mTOR(the mechanistic target of rapamycin,mTOR)通路 和 AMPK 通路。mTOR 通路是调控自噬的经典信号通路之一,PI3K-AKT 信号通路磷酸化 mTORC1 的第 2 448 位丝氨酸,磷酸化后的 mTORC1 具备激酶活性,可以通过多种方式抑制自噬的发生;AMPK 则可以被多种途径激活,当 ATP/AMP 的比率降低时(即在能量缺乏的情况下),AMPK 发生磷酸化而被激活,AMPK 活化后通过抑制 mTOR 活性/增强 ULK1 激酶活性等途径诱导自噬的产生^[9]。

1.2 病毒感染通过 ERS 诱导自噬 ERS 和自噬是两个独立的生物学机制,然而越来越多的研究表明 ERS 能够引起自噬^[4]。有研究人员发现,自噬可通过降解错误/未折叠蛋白的方式来缓解 ERS,以恢复 ER 稳态^[10],ERS 的 3 条 UPR 通路都可参与诱导自噬的发生,在 ERS 时,PERK-eIF2 α 信号通路使转录因子 ATF4 的表达上调,随即 ATF4 激活作为转录因子的 CCAAT/增强子结合蛋白(CHOP),ATF4 和 CHOP 转移至细胞核并且上调自噬相关基因的表达^[11]。

有研究发现,当 HeLa 细胞被柯萨奇病毒 B3 型(CVB3)感染后,细胞中作为 ERS 发生标志物的 BIP 蛋白表达增加,提示 CVB3 感染 HeLa 细胞可导致 ERS。HeLa 细胞被 CVB3 病毒感染后还会上调 PERK 和 eIF2 α 的磷酸化水平。IRE1 跨膜蛋白的磷酸化水平也出现了上调的趋势,并且还引起 XBP1 mRNA 的特异性切割。同时 ER 的 ATF6 跨膜蛋白也发生切割,提示 HeLa 细胞被 CVB3 感染后导致 ERS 并且激活了 UPR 的 PERK-eIF2 α 、IRE1-XBP1 和 ATF6 信号通路。此外,感染 CVB3 后还引起自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 的表达比值上调和 LC3 蛋白细胞质定位发生变化,同时激活了 ULK1 活性,诱导 HeLa 细胞自噬的发生。HeLa 细胞被 CVB3 病毒感染后还可抑制 mTORC1 活性并且激活 AMPK 信号通路共同促进自噬的发生。深入研究发现,使用 ERS 三条信号通路的抑制剂干扰 ERS 的发生后,细胞中 LC3-II/LC3-I 比值显著降低,提示抑制了自噬的发生。研究提示感染 CVB3 后通过 ATF6、PERK 和 IRE1 三条 UPR 信号通路参与细胞自噬的过程^[8]。

2 ERS 与细胞凋亡

病毒感染细胞后不仅会大量扩增其遗传信息,而且会不断地生产病毒蛋白,使未折叠蛋白在 ER 上大量聚集,超出 ER 折叠能力,引起 ERS。ERS 一开始会启动细胞保护反应以恢复

ER 稳态,但在无法解决的应激下会促发凋亡程序^[12]。

2.1 细胞凋亡及其 ERS 通路 细胞凋亡亦称细胞程序性死亡,具体指的是生理/病理性原因所导致的细胞内预存死亡程序,致使细胞自主有序死亡的生物学过程。与细胞坏死相区别的是,凋亡的本质是一种主动过程,有一系列信号通路参与调控其发生,同细胞增殖一起维持机体内细胞数量的动态平衡。细胞凋亡表现为细胞收缩、染色质凝聚、细胞核碎裂等。研究发现,线粒体通路、死亡受体通路及 ERS 通路等均参与了细胞凋亡的发生和发展,下文将详细介绍细胞凋亡的 ERS 通路^[13,14]。

ERS 引起的凋亡主要包括两条信号通路,其一由 IRE1 α 诱导;其二是 CHOP 诱导。研究表明,IRE1 与 CHOP 长时间激活可以诱导细胞凋亡。在正常生理状态下,UPR 诱导的细胞凋亡可用于消除 ERS 环境中的少数细胞,而受损但并未凋亡的细胞可以引起炎症,而凋亡通常伴随着细胞的吞噬清除,这两者都可以防止凋亡后坏死,并诱导抗炎反应^[15]。

IRE1 和 ERS 诱导的细胞凋亡之间的联系涉及 IRE1 与参与凋亡信号蛋白的相互作用。例如,免疫共沉淀实验表明,哺乳动物 IRE1 α 结合 Bak 和 Bax 两种蛋白质参与了线粒体凋亡途径。这种相互作用参与了 IRE1 α 激活。磷酸化、活化的 IRE1 还与适配器蛋白肿瘤坏死因子受体相关因子-2(TRAF2)相互作用,并促进磷酸化的级联,最终激活 Jun 氨基末端激酶(JNK)。CHOP 诱导细胞凋亡的机制之一是抑制促存活蛋白 Bcl-2。一项研究发现,Bcl-2 的基因修复使 CHOP 转染的细胞从氧化应激和凋亡中获得拯救。该机制可能涉及 CHOP 与一个或多个转录抑制因子相互作用以减少 Bcl-2 转录的能力;另一个与 CHOP 诱导的细胞凋亡有关的机制是氧化应激。长时间的 ERS 能使 ER 腔过度氧化。研究表明,CHOP 过度表达可以耗竭谷胱甘肽并通过诱导内质网氧化酶 1 α (ERO1 α)增加过氧化物的产生,使内质网产生一个过氧化环境^[15]。此外,CHOP 诱导的细胞凋亡涉及激活促凋亡细胞质钙信号通路。CHOP 诱导的细胞凋亡可以通过细胞质钙而被阻断。细胞质钙通过激活钙依赖性蛋白酶而触发细胞凋亡,进而触发许多下游凋亡途径^[16]。

2.2 病毒感染通过 ERS 诱导细胞凋亡 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)入侵宿主细胞会引起 ERS,且在 ERAD 仍无法缓解细胞内未折叠蛋白堆积的压力时,UPR 会激活细胞凋亡信号通路^[17]。还有研究发现,PK-15 细胞被猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)感染后 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白 Bcl-2 与 Bcl-XL 表达显著下调,还导致蛋白酶 caspase-3 发生剪切;流式细胞术和 TUNEL 法检测凋亡实验也验证了感染 PCV2 后会诱导细胞早期凋亡和 DNA 发生断裂。使用化学分子伴侣缓解 ERS 后能够下调 PCV2 诱导的 CHOP 表达和蛋白酶 caspase-3 的剪切,提示 ERS 和凋亡之间有联系。ERS 激活了 UPR 的 PERK 通路和致使 Ca²⁺ 外流进而介导内源性线粒体途径的凋亡,并激活凋亡执行者 caspase-3。该课题组前期已经证实感染 PCV2 后可以选择性激活 UPR 的 PERK 途径,以及通过 ER 上的 IP3R 受体诱导 Ca²⁺ 外流至细胞质,通过化学抑制剂或 RNA 干扰抑制 PERK 或 IP3R 能够减轻 PCV2 感染诱导的凋亡。PERK 下游的促凋亡分子 CHOP 可以通过抑制 Bcl-2 的活性进而诱导凋亡。深入研究发现,通过

沉默 CHOP 能相对上调 Bcl-2 的表达水平,提示 PCV2 感染可能通过 PERK/eIF2a/CHOP/Bcl-2 途径引起凋亡^[18]。

3 ERS 与炎症反应

炎症是机体的一种防御反应,主要用于应对刺激,会引起红、肿、热、痛等症状。研究表明,炎症反应会导致 ERS,ERS 反过来也会促使炎症反应的发生。

3.1 ERS 激活炎症信号通路 炎症信号通路主要包括核因子 κ B(NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)通路。NF- κ B 属于转录因子蛋白家族,能够调节固有免疫和获得性免疫反应,如细胞分化和促炎细胞因子的产生等多个阶段。有研究发现,ERS 可通过 Ca^{2+} 和活性氧(ROS)进一步参与 NF- κ B 的激活^[19]。在 ERS 状态下,活化的 IRE1 α 通过与肿瘤坏死因子受体相关因子-2(TNF-receptor associated factor 2, TRAF2)结合,募集 NF- κ B 激酶抑制剂(IKK)至 ER 附近。该复合物致使 I κ B 磷酸化并通过泛素化修饰后最终被蛋白酶所降解,进而导致 NF- κ B 发生游离并转移到细胞核内,并诱导促炎细胞因子 TNF- α 的产生,加速 ERS 诱导的细胞死亡过程^[20]。MAPKs 是属于细胞内的丝/苏氨酸蛋白激酶家族,主要包括 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 和 ERK。一旦它们发生磷酸化,就能够参与细胞增殖与分化、自噬和炎症反应等多种生理过程。研究表明,在小鼠胚胎成纤维细胞中,ERS 可以激活 MAPK 信号通路,促进炎症的发生^[21]。磷酸化的 IRE1 α 与 TRAF2 和凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)结合能直接活化 JNK;在 IRE1 α 持续活化状态下,可通过激活 JNK 而加剧组织炎症反应和促炎趋化因子的产生。

3.2 病毒感染通过 ERS 促使炎症反应 病毒性心肌炎主要由 CVB 感染引起,以心肌炎症为主要临床特征。研究发现,两种 ERS 标志物 GRP78 和 GRP94 在 CVB3 感染后表达显著升高,同时还检测了 CVB 感染后对 ERS 的 3 个 UPR 传感器(PERK、ATF6 和 IRE)的影响,发现 IRE1 的上调最为明显,提示 ERS 可能主要通过 IRE1 通路影响炎症发生。抑制 IRE1 的活性可明显减少心肌炎性细胞因子的产生,缓解心肌炎,其主要是通过抑制 NF- κ B 的激活。深入研究发现,ERS 通过 IRE1 相关的 NF- κ B 通路进而提高炎症反应,加重病毒性心肌炎的发生^[22]。

4 展望

通过对近年来的研究成果归纳总结,发现病毒感染会导致 ERS,而 ERS 会激活相关信号通路影响细胞自噬、凋亡等生物学功能,影响细胞生存状态。因此,深入探讨 ERS 与病毒感染的相关调控机制,有助于从 ERS 角度为病毒感染疾病的预防及治疗策略提供新方向和干预措施。

【参考文献】

[1] Wang HG, Shi XZ, Qiu MY, et al. Hydrogen sulfide plays an important protective role through influencing endoplasmic reticulum stress in diseases[J]. Int J Bio Sci, 2020, 16(2): 264-271.
[2] 刘莹,姜晓峰,梁红艳,等. 未折叠蛋白反应-细胞蛋白质的传感器与调配器[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(2): 326-329.
[3] Bertolotti A, Zhang YH, Hendershot LM, et al. Dynamic

interaction of BIP and ER stress transducers in the unfolded protein response[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(6): 326-332.
[4] Smith M, Wilkinson S. ER homeostasis and autophagy[J]. Essays Biochem, 2017, 61(6): 625-635.
[5] Leidal AM, Levine B, Debnath J. Autophagy and the cell biology of age-related disease[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(12): 1338-1348.
[6] Yoshinori O. Historical landmarks of autophagy research[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 9-23.
[7] Johnna D, Eric HB. Life, death and autophagy[J]. Nat Cell Bio, 2018, 20(10): 1110-1117.
[8] Nienke van B, Daniel JK, Fulvio R. Genetic aberrations in macroautophagy genes leading to diseases[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(5): 803-816.
[9] 罗小暖. 柯萨奇病毒 B3 型通过内质网应激引起自噬的研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2018.
[10] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2009, 90(4): 1383-1435.
[11] Alexis B, Jessica C. Activation of the EIF2AK4-EIF2A/eIF2 α -ATF4 pathway triggers autophagy response to Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* infection [J]. Autophagy, 2016, 12(5): 770-783.
[12] Mable L, Scot AM, Avi A, et al. Misfolded proteins bind and activate death receptor 5 to trigger apoptosis during unresolved endoplasmic reticulum stress[J]. Elife, 2020(9): e52291.
[13] Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(1): e996.
[14] Aitor A, Antonio C, Chetan C, et al. Endoplasmic reticulum stress signaling from basic mechanisms to clinical applications [J]. FEBS J, 2019, 286(2): 241-278.
[15] McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(4): 1249-1259.
[16] Ira T, David R. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Bio, 2011, 13(3): 184-190.
[17] Pe a J, Harris E. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner[J]. Bio Chem, 2011, 286(16): 14226-14236.
[18] 周莹珊. 猪圆环病毒 2 型感染诱导 PK-15 细胞内质网应激与凋亡的机制研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2016.
[19] Pahl HL, Baeuerle PA. Activation of NF- κ B by ER stress requires both Ca^{2+} and reactive oxygen intermediates as messengers[J]. FEBS Lett, 1996, 392(2): 129-136.
[20] Hu P, Han Z, Couvillon AD, et al. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 3071-3084.
[21] Tan YF, Dourdin N, Wu C, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(23): 16016-16024.
[22] Zha X, Yue Y, Dong N, et al. Endoplasmic reticulum stress aggravates viral myocarditis by raising inflammation through the IRE1-associated NF- κ B pathway[J]. Can J Cardiol, 2015, 31(8): 1032-1040.

【收稿日期】 2022-11-20 【修回日期】 2023-02-10