

# 埃博拉病毒入侵宿主细胞的分子机制

王寒<sup>1,2,3</sup>, 宋健<sup>2,3</sup>, 高福<sup>1,2,3,4</sup>, 施一<sup>2,3</sup>

1. 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101
2. 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101
3. 中国科学院大学, 北京 100049
4. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206

**摘要** 埃博拉病毒是一类能够感染并引起人和灵长类动物发生埃博拉出血热的烈性囊膜病毒。发现近40年中,埃博拉病毒给人类生命带来了极大威胁。然而,目前人们对于埃博拉病毒的了解非常有限,尤其是病毒与其宿主细胞受体的结合机制和膜融合机制相关信息的缺失,使得针对埃博拉病毒的特效药物的设计和研发工作阻碍重重。本文综述了埃博拉病毒分类、形态、病毒蛋白和病毒生命周期,着重介绍了高福院士团队在埃博拉病毒入侵宿主细胞的分子机制研究中的成果。通过结构学手段解析了埃博拉病毒激活态囊膜糖蛋白GPc1与宿主细胞受体NPC1分子的复合物结构,从原子水平上阐明了埃博拉病毒与宿主细胞相互识别的机制,并在结构基础上对病毒的膜融合促发机制做出推测,提出以埃博拉病毒为代表的新的(第5种)囊膜病毒膜融合激发机制,为抗埃博拉病毒药物和疫苗的设计提供了结构基础。

**关键词** 埃博拉病毒;GP;NPC1;晶体结构

## 1 埃博拉病毒——隐藏在非洲丛林中的黑色幽灵

2013年底至2014年初,一场病毒疫情悄然降临西非国家几内亚。在随后的短短数月间,这场疫情迅速蔓延至邻国塞拉利昂和利比里亚。2014年底,随着美国、西班牙、印度等国相继出现输入型病例,此次疫情所带来的恐慌从西非扩散至全世界。截至2016年初,世界卫生组织宣告疫情结束之时,这场疫情共波及全球10个国家和地区,导致28646人感染,死亡人数高达

11323人<sup>[1]</sup>。这次事件的“始作俑者”就是埃博拉病毒。埃博拉病毒在分类学上属于单股负链病毒目(Mononegavirales)丝状病毒科(Filoviridae)埃博拉病毒属(Ebolavirus)。埃博拉病毒属包括5个不同的种,分别为扎伊尔型(Zaire ebolavirus, EBOV)、苏丹型(Sudan ebolavirus, SUDV)、莱斯顿型(Reston ebolavirus, RESTV)、塔伊森林型(Tai Forest ebolavirus, TAFV)和本迪布焦型(Bundibugyo ebolavirus, BDBV)<sup>[2]</sup>。此次疫情就是由扎伊尔型埃博拉病毒引发的。

丝状病毒科中第一个被发现并分离的成员并不是

收稿日期:2018-02-16;修回日期:2018-03-23

基金项目:国家自然科学基金项目(31700149, 81622031);中国科学院卓越青年科学家项目;中国科学院青年创新促进会项目(2015078);中国博士后创新人才支持计划(BX201600162)

作者简介:王寒,博士研究生,研究方向为囊膜病毒与宿主互作的分子机制,电子信箱:wangh@biols.ac.cn;施一(通信作者),研究员,研究方向为为病原感染调控的分子机制、免疫细胞受体与配体相互作用研究及其识别机制、药物研发,电子信箱:shiyi@im.ac.cn

引用格式:王寒,宋健,高福,等.埃博拉病毒入侵宿主细胞的分子机制[J].科技导报,2018,36(7):56-63;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2018.07.009

埃博拉病毒。历史上首次有记载的丝状病毒感染发生于1967年的德国城市马尔堡、法兰克福以及时属南斯拉夫城市贝尔格莱德。这次的感染事件是由实验室工作人员接触了乌干达进口的非洲绿猴引发的,共导致了31人感染,其中7人死亡。随后,马尔堡病毒(Marburg virus, MARV)从感染者的血液和组织中被分离出来,并以发现地——马尔堡市命名。发现之初,马尔堡病毒曾一度因其形态特征被归类为弹状病毒科(*Rhabdoviridae*)<sup>[3]</sup>。1976年,在非洲撒哈拉沙漠以南的两个临近地区同时暴发了两场出血热疫情,其中一场疫情发生于苏丹国,另一场疫情发生于刚果民主共和国(时为扎伊尔国)境内。随后,病毒学家分别从两场疫情的病人体内分离到了2种形态学上与马尔堡病毒极为相似但血清学上存在明显差异的病毒,这两种病毒被命名为埃博拉,名字来源于一条流经疫情暴发地的小河。这就是埃博拉病毒属中暴发次数最多、引发死亡率最高的两个种——苏丹型埃博拉病毒和扎伊尔型埃博拉病毒<sup>[4]</sup>。埃博拉病毒的首次亮相,就导致两个疫情区284人和318人感染,死亡率分别高达53%和88%。随

着埃博拉病毒的发现以及对埃博拉病毒和马尔堡病毒的形态学、遗传学、生化学和病毒学研究的深入,这2种极具独特性的病毒最终被重新划分为丝状病毒科。除苏丹型和扎伊尔型外,本迪布焦型埃博拉病毒也能引起大规模的病毒疫情,作为最晚被发现的埃博拉病毒,2007年本迪布焦型埃博拉病毒在乌干达的本迪布焦地区暴发,共导致了149人感染,37人死亡<sup>[5]</sup>。除此之外,塔伊森林型埃博拉病毒发现于1994年<sup>[6]</sup>,一位人种学者在科特迪瓦的塔伊森林国家公园中解剖一只死去的黑猩猩时被其感染。莱斯顿型埃博拉病毒是埃博拉病毒中唯一一种只引发人类隐性感染的病毒,于1989年在美国弗吉尼亚州莱斯顿市的检疫所发现,当时从菲律宾进口的猕猴在入境检疫时出现大量死亡,之后从病死猕猴中检出该型病毒<sup>[7]</sup>。2014年,国际病毒分类命名委员会(International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV)将一类从西班牙山洞中的食虫蝙蝠体内鉴定出新的病毒列入丝状病毒科,并将其确定为一个新型丝状病毒属——奎瓦病毒属,该属只包含一个种,即Lloviu奎瓦病毒(Lloviu cuevavirus, LLOV)<sup>[8-9]</sup>(表1)。

表1 丝状病毒分类

Table 1 Taxonomy of filoviruses

目(Order)	科(Family)	属(Genus)	种(Species)	病毒(Virus)
			扎伊尔埃博拉病毒 ( <i>Zaire ebolavirus</i> )	埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV)
			苏丹埃博拉病毒 ( <i>Sudan ebolavirus</i> )	苏丹病毒 (Sudan virus, SUDV)
		埃博拉病毒属 ( <i>Ebolavirus</i> )	雷斯顿埃博拉病毒 ( <i>Reston ebolavirus</i> )	雷斯顿病毒 (Reston virus, RESTV)
			塔伊森林埃博拉病毒 ( <i>Tai Forest ebolavirus</i> )	塔伊森林病毒 (Tai Forest virus, TAFV)
单股负链病毒目 ( <i>Mononegavirales</i> )	丝状病毒科 ( <i>Filoviridae</i> )		本迪布焦埃博拉病毒 ( <i>Bundibugyo ebolavirus</i> )	本迪布焦病毒 (Bundibugyo virus, BDBV)
		马尔堡病毒属 ( <i>Marburgvirus</i> )	马尔堡病毒 ( <i>Marburg marburgvirus</i> )	马尔堡病毒 (Marburg virus, MARV)
				拉文病毒 (Ravn virus, RAVV)
		奎瓦病毒属 ( <i>Cuevavirus</i> )	Lloviu 奎瓦病毒 ( <i>Lloviu cuevavirus</i> )	Lloviu 病毒 (Lloviu virus, LLOV)

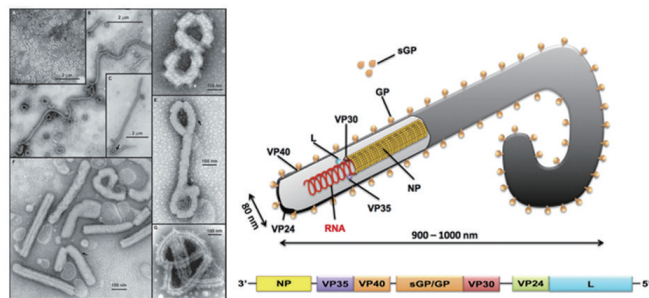
自1976年首次发现,埃博拉病毒就如黑色幽灵般始终徘徊于非洲中南部上空,它来去无踪、时隐时现。据统计,在过去的40年间,有报告的埃博拉病毒疫情总共约22次,其中大规模疫情(感染人数超过3位数)有8次,死亡率高达25%~88%<sup>[2]</sup>。就感染人数、波及范围和

造成恐慌的程度而言,2014—2016年的疫情是埃博拉病毒发现至今规模最大的一次。除重灾区西非三国(几内亚、塞拉利昂和利比里亚)外,非洲国家马里、尼日利亚和塞内加尔均有感染病例,其他出现输入型病例的国家还包括意大利、西班牙、英国和美国等发达国家<sup>[1]</sup>。

## 2 “解剖”埃博拉病毒

电镜照片证实丝状病毒呈现出极具特色的短如杆状长如丝状的形态特征。从组织培养物中分离到的马尔堡病毒和埃博拉病毒形态多样,包括U形、6形、分枝形、环形或长短不一、最长可到14000 nm的丝线形(图1(a)<sup>[2]</sup>),且病毒表面粗糙,呈“虫蛀”状<sup>[10]</sup>。

相对于多态性的病毒长度,埃博拉病毒的直径较固定,约为80 nm,组成成分简单、但却结构精密(图1(b)<sup>[10]</sup>)。埃博拉病毒的遗传信息由一条不分节段的单股负链RNA携带,病毒核蛋白NP和VP30围绕病毒RNA形成螺线管状的核衣壳,直径约为50 nm。核衣壳内部中空的内轴直径约为20 nm,螺距约为5 nm。丝状病毒粒子的最外层为来源于宿主细胞质膜的病毒囊膜(Envelope)。核衣壳与病毒囊膜之间为同轴的圆柱形基质层(Matrix protein),由基质蛋白VP40、VP24构成。基质蛋白向内与病毒核衣壳结合,向外与病毒囊膜结合,维持了病毒粒子结构的完整性。埃博拉病毒内部还有由L蛋白和VP35蛋白组成的聚合酶复合体,用于介导病毒基因组转录和复制<sup>[2]</sup>。



(a) 埃博拉病毒电镜照片 (b) 埃博拉病毒结构及基因模式

图1 埃博拉病毒电镜照片及其结构、基因模式

Fig. 1 Electron microscope picture, structure and genome of Ebola virus

除病毒核蛋白NP、VP30,基质蛋白VP40、VP24及聚合酶复合体L蛋白、VP35蛋白以外,埃博拉病毒的GP基因能够通过转录编辑编码3种病毒蛋白。由于埃博拉病毒的GP基因含有一段连续7个尿嘧啶核糖核苷酸U的序列,导致该基因在转录过程中会经历位点特异性的编辑过程,从而产生了3个不同长度的RNA转录本并编码3种不同大小的病毒蛋白。

以埃博拉病毒为例,GP基因的主要产物为sGP(souple GP),是一种共含有364个氨基酸残基的非结构

糖蛋白。同时,在RNA聚合酶转录GP基因的过程中,有一定的概率在mRNA的连续7个腺嘌呤核糖核苷酸A的序列中插入1个A,使开放阅读框向下游移动1位,从而表达含有676个氨基酸残基囊膜糖蛋白(Glycoprotein, GP)。这一转录编辑过程也会有一定概率在该段序列中插入了2个腺嘌呤核糖核苷酸A,使开放阅读框向下游移动2位,从而表达含有297个氨基酸残基的小型可溶糖蛋白ssGP(small soluble GP)。

埃博拉病毒囊膜外表面分布着大量高度约14 nm的膜粒,由GP蛋白构成。GP蛋白是埃博拉病毒囊膜表面唯一的病毒蛋白,因而其在病毒对宿主细胞的识别和入侵过程中发挥着重要的作用。2008年,美国科学家Erica Ollmann Saphire及其领导的团队通过晶体学手段解析埃博拉病毒GP蛋白的结构,将其三维构象直观地呈现在我们眼前<sup>[11]</sup>。埃博拉病毒的膜粒结构由3个GP蛋白彼此环绕构成,型如“酒杯”状。每个GP蛋白包含两个结构亚基,GP1和GP2(图2)。GP1亚基位于“酒杯”的杯壁部分,其内部含有一段受体结合区域,这个区域的构象和氨基酸性质决定了病毒能够结合的受体类型。换句话说,病毒的感染就是病毒对宿主细胞的入侵。然而,病毒并非能够入侵宿主体内的所有细胞类型,这种对不同类型细胞的选择性就取决于细胞表面是否具有病毒能够结合的受体分子。GP2亚基位于“酒杯”的杯柄部分,其内部含有一段疏水氨基酸构成的融合肽,在病毒的膜融合过程中发挥重要作用。

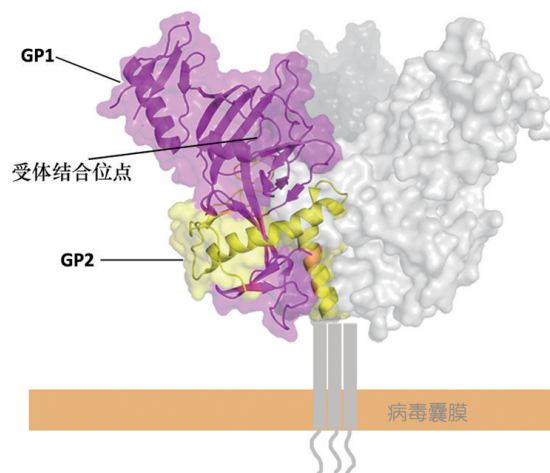


图2 埃博拉病毒囊膜糖蛋白GP结构模式

Fig. 2 Structural schematic of Ebola virus envelope protein GP

### 3 埃博拉病毒的生命周期

当埃博拉病毒进入到宿主体内后,首先感染树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞等免疫细胞,在感染后期,丝状病毒可以感染多数非淋巴细胞系<sup>[12]</sup>。与大多数囊膜病毒相似,埃博拉病毒生命周期可以概括为:吸附到宿主细胞表面、进入宿主细胞并发生膜融合释放病毒基因组、病毒RNA复制和病毒蛋白表达、病毒颗粒组装、出芽和释放(图3)<sup>[13]</sup>。

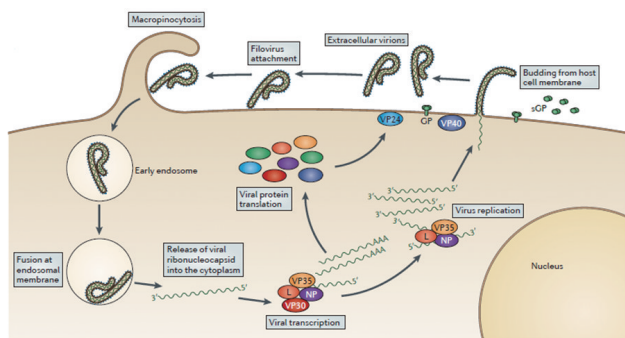


图3 埃博拉病毒生命周期

Fig. 3 Life cycle of Ebola virus

囊膜病毒的感染过程起始于病毒对宿主细胞的吸附。通常由病毒囊膜上的糖蛋白与宿主细胞表面的特异性受体分子结合所介导,例如流感病毒表面的糖蛋白HA特异性识别敏感细胞上的唾液酸受体。埃博拉病毒对多种细胞的广谱感染能力预示可能存在一种在多种细胞上广泛分布的受体分子,然而GP蛋白作为丝状病毒囊膜上唯一的病毒蛋白,其宿主细胞表面的特异性受体仍然未知。目前已知宿主细胞表面存在一类黏附分子,它们通过与埃博拉病毒GP蛋白上的糖组分非特异结合的方式介导病毒吸附并增强病毒感染能力。这类分子主要包括整合素 $\beta$ 1、C-型凝集素(如DC-SIGN和L-SIGN)和叶酸受体 $\alpha$ 等<sup>[14-16]</sup>,除此之外,T细胞免疫球蛋白黏蛋白家族分子(T-cell immunoglobulin and mucin domain molecules, TIM)具有通过识别病毒囊膜上的磷脂酰丝氨酸分子(phosphatidylserine, PtdSer, PS)非特异性的增强包括埃博拉病毒在内的多种囊膜病毒入侵宿主细胞的能力<sup>[17-19]</sup>。通过类似机制,其他能够识别PS的受体分子,如Tyro3家族受体Gas6/Axl等也能有效促进埃博拉病毒的感染<sup>[20]</sup>。

吸附在宿主细胞表面后,埃博拉病毒被宿主细胞的大胞饮作用吞到宿主细胞内部。此时的埃博拉病

毒只是静静地潜伏在宿主细胞的内吞体中,内吞体的膜包裹着它,使其不能进入到宿主细胞质中完成它的使用寿命。然而,随着病毒被转运到晚期胞内体和溶酶体(Late endosome/ Late lysosome, LE/LY)中,LE/LY中的酸性环境激活了低pH值依赖的组织蛋白酶B和组织蛋白酶L。组织蛋白酶切割埃博拉病毒表面GP蛋白,使得隐藏在GP1亚基内部的受体结合区域暴露出来,我们称此时的GP蛋白为激活态GP蛋白(cleaved GP, GPcl)<sup>[21]</sup>。激活后的埃博拉病毒又是通过什么方式突破内吞体的束缚进入宿主细胞并完成其后的复制和增殖过程呢?这个问题在2011年之前,一直是困扰研究人员的谜团。

2011年9月,2篇同期发表在《Nature》期刊上的文章首次报道了埃博拉病毒的宿主细胞受体,一种在人体各组织细胞内广泛分布、特异性表达在内吞体中的分子——C型尼曼匹克蛋白1(Niemann Pick C1, NPC1)<sup>[22-23]</sup>。NPC1是一种C型尼曼匹克病相关蛋白,分布于各个组织细胞中的LE/LY膜上,能够与C型尼曼匹克病另一相关蛋白NPC2共同作用,负责胆固醇分子在内吞体中的转运过程。NPC1和NPC2基因上的功能缺失性突变可导致胆固醇等脂类分子在内吞体中大量累积,引发一种致死性的常染色体隐性遗传病——C型尼曼匹克病<sup>[24]</sup>。NPC1分子是一种13次跨膜蛋白,在内吞体腔内形成3个大的腔内结构域:A结构域、C结构域和I结构域(图4)。James Cunningham和Thijn R. Brummelkamp团队的研究发现,将NPC1表达质粒转染到埃博拉病毒非敏感细胞系后,明显提高了埃博拉病毒对该细胞系的感染能力。随后,Kartik Chandran团队进一步研究发现,在NPC1的3个腔内结构域中,结构域C(NPC1-C)能够与埃博拉病毒激活态糖蛋白GPcl发生特异性结合<sup>[25]</sup>。而不同物种间NPC1-C的序列差异(如503位的苯丙氨酸),极大地影响了NPC1-C与GPcl的结合能力以及埃博拉病毒对不同种细胞的感染能力<sup>[26]</sup>。

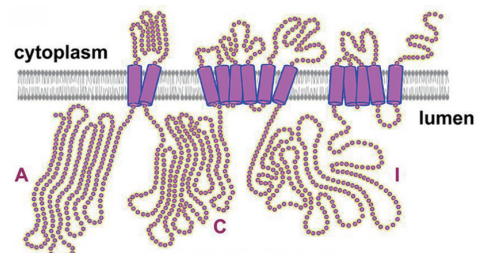


图4 NPC1分子的结构模式图

Fig. 4 Structural schematic of NPC1

## 4 埃博拉病毒入侵宿主细胞的机制

上述的研究首次确定了 NPC1 分子是埃博拉病毒入侵宿主细胞的必要受体,并在埃博拉病毒对宿主细胞的入侵过程中起到了关键性作用。而不同物种间 NPC1 分子序列差异对埃博拉病毒入侵能力的影响暗示了其一定程度上决定了埃博拉病毒在自然环境中的宿主范围。这些研究成果是埃博拉病毒研究领域的一大突破,然而却并未将埃博拉病毒入侵宿主细胞的故事写完。

埃博拉病毒想真正进入到宿主细胞内,必须将自身的囊膜与包裹病毒的 LE/LY 的膜融合在一起,进而将病毒基因组释放到宿主细胞内,完成病毒的生命周期,达到病毒增殖的目的。然而,激活态的糖蛋白 GPcl 是如何结合受体 NPC1,并导致病毒膜融合过程的发生呢?这个科学问题的阐明,可以将埃博拉病毒入侵宿主细胞的细节直观地呈现在我们眼前,进而找到埃博拉病毒膜融合的激发机制,为抗埃博拉病毒的药物设计提供理论依据。

高福团队从 2011 年开始致力于解释这个关键的科学问题。为此,他们选择用结构学手段解析 GPcl 与 NPC1 分子的复合物结构,直观地将两者互作的模式呈现。从原子水平上将蛋白质的三维结构直观地呈现出来,主要的方法有 3 种: X 射线晶体法、核磁共振法和电子显微镜三维重构法。尽管随着直接电子探测器的发现和随之而来的算法的革新,冷冻电镜技术异军突起,然而在蛋白质结构解析中,尤其对于分子量较小的蛋白质,应用最为广泛仍然是 X 射线晶体衍射法。在高浓度的蛋白质溶液中加入沉淀剂,使蛋白质的溶解度慢慢降低、接近自发性的沉淀状态,此时,蛋白质分子整齐的堆积在一起,形成蛋白质晶体, X 射线照射到晶体上会发生衍射,通过对蛋白质晶体 X 射线衍射数据的计算,可以得到晶体内原子排布的三维信息,从而解析出蛋白质分子的结构(图 5)。

高福团队首先在体外表达并纯化了埃博拉病毒的激活态糖蛋白 GPcl 及 NPC1-C 结构域蛋白,并通过表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术检测了 GPcl 和 NPC1-C 相互作用的动力学参数。SPR 数据分析表明,在中性环境中(pH 7.4), NPC1-C 蛋白能够结合 GPcl,但两者间的亲和力较弱,约为 158  $\mu\text{mol/L}$ (图 6)。这一测定的病毒与宿主受体间的亲和力水平

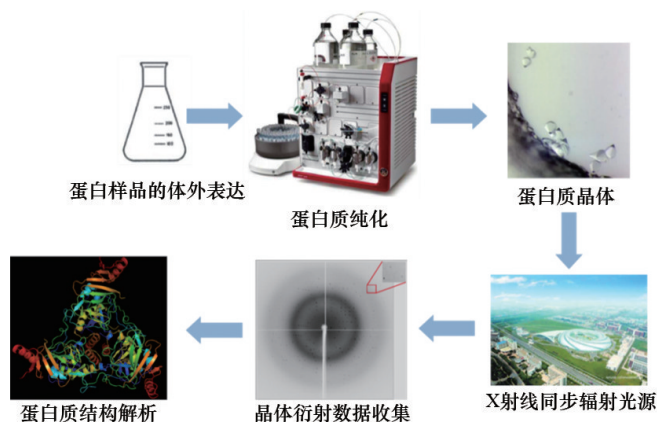


图 5 X 射线晶体法解析蛋白质结构流程示意

Fig. 5 Flow chart of the crystal structure determination by X-ray

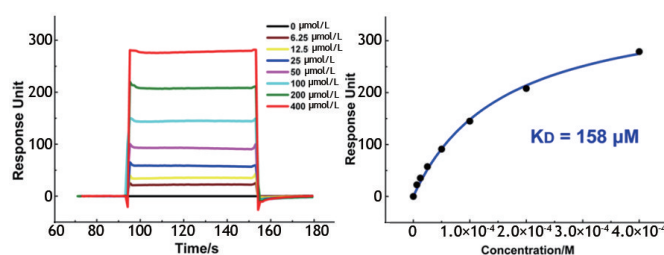


图 6 中性条件下测定 NPC1-C 与 GPcl 间的亲和力

Fig. 6 Binding affinity between NPC1-C and GPcl in neutral environment

远远低于其他多种已知的高致病性病毒(如 MERS-CoV 和 SARS-CoV)与各自受体间约为 nmol/L 级别的亲和力。在后续的研究中,高福团队与颜宁课题组合作,发现 NPC1 与 GPcl 的结合存在 pH 依赖性,即相较于中性环境中 100  $\mu\text{mol/L}$  左右的亲和力,二者在酸性环境中(pH6)亲和力提升近 50 倍,约为 2  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[27]</sup>。

而后,高福团队利用蛋白质晶体学手段,对 GPcl 与 NPC1-C 的复合物蛋白进行结晶并成功解析了复合物的高分辨率三维结构(图 7(a)),从分子水平上展示了两者的如同“锁钥”的互作模式。对复合物结构的分析发现,GPcl 的受体结合位点是由疏水氨基酸形成的一个疏水凹槽,形同锁头状。NPC1-C 利用其结构中的 2 个突出的环结构(loop1 和 loop2)上的疏水氨基酸(P424、Y423、F503、F504 和 Y506)插入 GPcl 的疏水凹槽中,正如钥匙插入锁孔一般(图 7(b))。GPcl 的疏水凹槽由氨基酸 V79、P80、T83、W86、G87、F88、L111、E112、I113、V141、G145、P146、C147、A152 和 I170 构成,而凹槽上壁的氨基酸 K114、G118、S142、G143 和 T144 则构

成了一块亲水区域。当与NPC1-C结合时,GPcl的疏水凹槽与NPC1-C的loop 1和loop 2上的疏水氨基酸形成一组稳定的疏水相互作用;同时,GPcl疏水凹槽附近的亲水区域通过极性相互作用稳定loop 1的结合。

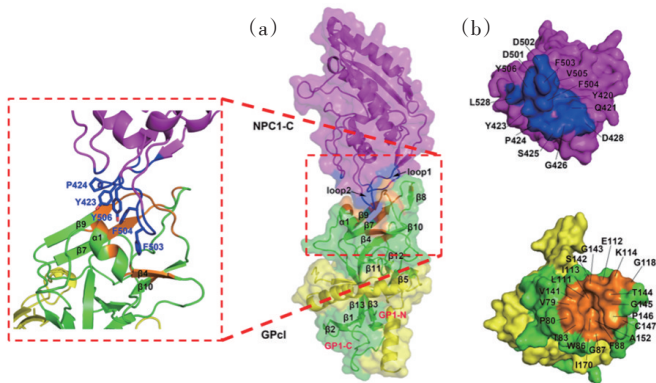


图7 埃博拉病毒识别宿主细胞受体的结构细节

Fig. 7 Detail structure of NPC1 bound to the primed EBOV GP

在对GPcl结合NPC1-C前后的结构变化进行比较分析后,高福团队发现GPcl在结合NPC1后其结构中存在多处构象变化。其中2个主要的构象变化位于与NPC1-C蛋白的结合位点处,包括 $\beta 7$ - $\beta 8$ 环和 $\alpha 1$ 螺旋束(图8(a))。与结合NPC1分子前的GP结构相比,结合NPC1-C后,GPcl的 $\beta 7$ - $\beta 8$ 环向下方发生了位移,而 $\alpha 1$ 螺旋束向上方移动。随着 $\alpha 1$ 螺旋束的移动, $\beta 3$ - $\alpha 1$ 环上的 $\beta$ 转角也发生了向上的位移。从氨基酸层面看,在结合NPC1-C前,GP蛋白 $\beta$ 转角上的氨基酸N73与GP蛋白融合肽(internal fusion loop, IFL)氮端氨基酸K510主链上的羧基氧之间形成了氢键相互作用,两者

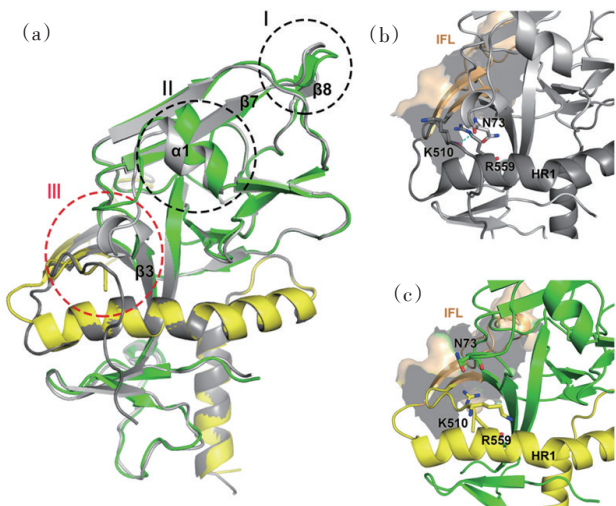


图8 结合NPC1-C前后GPcl蛋白的构象变化  
Fig. 8 Conformational changes in the GPcl upon enzymatic cleavage and NPC1-C engagement

的相互作用可以抵消掉K510和位于融合肽下游的七肽重复区域(Heptad repeated 1, HR1)上的氨基酸R559之间的电荷排斥(图8(b))。而结合NPC1-C后,由于GPcl的 $\beta$ 转角向上移动,导致N73不能再与K510相互作用。失去N73束缚后,K510带正电荷的侧链指向了位于其内侧同样带有正电荷侧链的氨基酸R559,从而导致二者产生电荷排斥(图8(c))。研究人员推测这两个氨基酸之间的电荷排斥将导致两者所在的结构单元(IFL和HR1)彼此远离,进而促进GP蛋白的变构和IFL的释放,并最终促发了病毒与LE/LY的膜融合。

根据囊膜病毒膜融合发生的位置、介导膜融合的囊膜蛋白个数以及膜融合是否由特定受体介导,目前已知的囊膜病毒与宿主细胞发生膜融合的激发机制可综合归纳为以下4种:以人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)为代表的单个蛋白介导的细胞表面膜融合模型、以单纯疱疹病毒I型(Herpes simplex virus-1, HSV-1)为代表的多个蛋白介导的细胞表面膜融合模型、以登革病毒(Dengue virus, DENV)为代表的无特定受体介导的内吞体内(低pH值)膜融合模型和以流感病毒为代表的细胞膜表面特定受体介导的内吞体内(低pH值)膜融合模型(图9)。

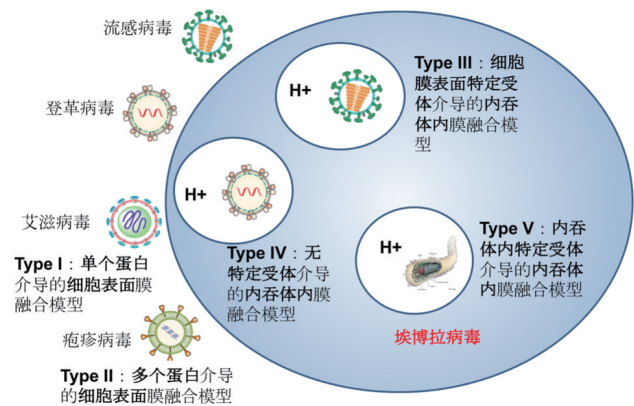


图9 5种病毒受体结合和膜融合激发机制

Fig. 9 Five kinds of binding and fusion trigger mechanisms between viruses and receptors

具体来说,HIV膜融合发生于宿主细胞表面,由其单一囊膜蛋白gp120-gp41介导。gp120结合宿主细胞表面的受体CD4分子和共受体CXCR4或CCR5分子,诱导gp120-gp41发生构象变化,促使膜融合的发生。HSV-1的膜融合也发生于宿主细胞表面,但与HIV不同的是,HSV-1的膜融合由多种囊膜蛋白共同介导。

HSV-1 首先通过囊膜蛋白 gB 和 gC 与宿主细胞表面蛋白聚糖上的硫酸乙酰肝素或者 p1lr $\alpha$  等分子结合使病毒黏附到细胞表面。随后通过囊膜蛋白 gB、gD 和 gH/gL 与其各自受体的相互作用共同启动膜融合过程。与上述 2 种病毒不同, DENV 和流感病毒的膜融合发生于内吞体中, 并在内吞体中的酸性环境诱导下由单一融合蛋白(DENV 的 E 蛋白, 流感病毒的 HA 蛋白)介导完成。流感病毒 HA 蛋白首先通过细胞表面唾液酸受体将病毒吸附于宿主细胞膜外, 随后经内吞的方式进入细胞内并形成内吞体。在内吞体中, HA 被酸性环境诱导变构, 从而引起了膜融合的发生。与流感病毒不同的是, DENV 对宿主细胞表面的吸附过程主要通过 DC-SIGN/L-SIGN 和硫酸乙酰肝素等黏附分子非特异结合完成, 目前尚无研究表明其存在特定的特异性受体促发其膜融合发生<sup>[28]</sup>。

而通过对埃博拉病毒受体结合机制的阐明以及对膜融合机制的推测, 高福团队将埃博拉病毒的病毒膜融合激发机制总结为: 融合发生于宿主细胞的内吞体中, 由位于宿主细胞内吞体膜上的特异性受体所介导。这与上述其他囊膜病毒的受体结合和膜融合激发机制都不同, 因而将其定义为一种新的(第 5 种)囊膜病毒膜融合模型(图 9)。

## 5 结论

当今世界, 人口密集、交往频繁, 这对于病毒的传播是极为有利的。近年来, 世界范围内新发突传传染病疫情的频发也印证了这一观点。就在人们仍对 2013 年的疫情的疫情心有余悸之时, 埃博拉病毒并没有放缓它前进的步伐。2017 年 5 月, 埃博拉病毒又将其的魔爪伸向了刚果民主共和国。然而与如此紧急的病毒防控形势相对的, 是目前仍无批准上市的抗击埃博拉病毒感染的特效药物和疫苗的现状。在 2014—2016 疫情暴发期间, 抗体类药物 ZMapp<sup>TM</sup> 被用于感染病人的人道性救治, 并展现出一定的治疗效果<sup>[29]</sup>。然而, 埃博拉病毒的抗体疗法仍需大量的实验数据和临床数据验证其安全性和有效性。此外, 埃博拉病毒的抗体疗法仍存在诸多瓶颈, 如单克隆抗体的生产是一个复杂的生物制药工程问题, 目前的生产平台不能够满足快速应对突发疫情的需求。严峻的防疫形势表明特效药物的设计和研发迫在眉睫。

本研究直观地展示了埃博拉病毒结合其宿主细胞

受体的分子机制, 在扩展了人们对埃博拉病毒入侵机制的认识的同时, 更为抗埃博拉病毒药物的设计提供了结构基础。后续的研究可根据 GPc1 与 NPC1-C 的复合物结构, 设计和研发能够阻断二者结合进而抑制埃博拉病毒入侵的小分子化合物或多肽类药物, 这将极大程度上缓解埃博拉病毒特效性药物的匮乏。最后, 我们相信充分地了解埃博拉病毒的生命周期中的各个阶段将帮助我们找到其致病机制, 为最终战胜病魔提供了重要方向。

## 参考文献(References)

- [1] World Health Organization. Ebola response roadmap situation report: 30 March 2016[EB/OL]. (2016-03-30). <http://apps.who.int/ebola/ebola-situation-reports>.
- [2] Knipe D M, Howley P M. Fields virology[M]. 6th edition (volumes 2). Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [3] Beer B, Kurth R, Bukreyev A. Characteristics of filoviridae: Marburg and Ebola viruses[J]. *Naturwissenschaften*, 1999, 86(1): 8-17.
- [4] Bres P. The epidemic of Ebola haemorrhagic fever in Sudan and Zaire, 1976: Introductory note[J]. *Bull World Health Organ*, 1978, 56(2): 245.
- [5] Wamala J F, Lukwago L, Malimbo M, et al. Ebola hemorrhagic fever associated with novel virus strain, Uganda, 2007—2008 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(7): 1087-1092.
- [6] Le Guenno B, Formenty P, Wyers M, et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus[J]. *The Lancet*, 1995, 345(8960): 1271-1274.
- [7] Jahrling P B, Geisbert T W, Dalgard D W, et al. Preliminary report: Isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA [J]. *The Lancet*, 1990, 335(8688): 502-505.
- [8] Negrodo A, Palacios G, Vazquez-Moron S, et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(10): e1002304.
- [9] Bukreyev A A, Chandran K, Dolnik O, et al. Discussions and decisions of the 2012—2014 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Filoviridae Study Group, January 2012—June 2013[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(4): 821-830.
- [10] Rougeron V, Feldmann H, Grard G, et al. Ebola and marburg haemorrhagic fever[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2015, 64: 111-119.
- [11] Lee J E, Fusco M L, Hessel A J, et al. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor[J]. *Nature*, 2008, 454(7201): 177-1782.
- [12] Mohamadzadeh M, Chen L, Schmaljohn A L. How Ebola and Marburg viruses battle the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(7): 556-567.
- [13] Messaoudi I, Amarasinghe G K, Basler C F. Filovirus pathogenesis and immune evasion: Insights from Ebola virus and Marburg virus[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11):

- 663–676.
- [14] Quinn K, Brindley M A, Weller M L, et al. Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(19): 10176–10186.
- [15] Simmons G, Rennekamp A J, Chai N, et al. Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(24): 13433–13438.
- [16] Schornberg K L, Shoemaker C J, Dube D, et al. Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins[J]. *PNAS*, 2009, 106(19): 8003–8008.
- [17] Jemielity S, Wang J J, Chan Y K, et al. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(3): e1003232.
- [18] Moller-Tank S, Kondratowicz A S, Davey R A, et al. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(15): 8327–8341.
- [19] 王寒, 齐建勋, 刘宁宁, 等. 埃博拉病毒入侵: 人TIM 分子的结构与结合 PS 的分子基础[J]. *科学通报*, 2015, 60(35): 3438–3453.  
Wang Han, Qi Jianxun, Liu Ningning, et al. Crystal structures of human TIM members: Ebolavirus entry-enhancing receptors[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, 60(35): 3438–3453.
- [20] Shimojima M, Ikeda Y, Kawaoka Y. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2007, 196(Suppl 2): 259–263.
- [21] White J M, Schornberg K L. A new player in the puzzle of filovirus entry[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(5): 317–322.
- [22] Carette J E, Raaben M, Wong A C, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1[J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 340–343.
- [23] Cote M, Misasi J, Ren T, et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann–Pick C1 is essential for Ebola virus infection[J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 344–348.
- [24] Cruz J C, Sugii S, Yu C, et al. Role of Niemann–Pick type C1 protein in intracellular trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(6): 4013–4021.
- [25] Miller E H, Obermosterer G, Raaben M, et al. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor[J]. *The Embo Journal*, 2012, 31(8): 1947–1960.
- [26] Ndungo E, Herbert A S, Raaben M, et al. A single residue in ebola virus receptor NPC1 influences cellular host range in reptiles[J]. *mSphere*, 2016, 1(2): e00007–16.
- [27] Gong X, Qian H, Zhou X, et al. Structural insights into the Niemann–Pick C1 (NPC1)-mediated cholesterol transfer and Ebola infection[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1467–1478.
- [28] White J M, Delos S E, Brecher M, et al. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: Multiple variations on a common theme[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 43(3): 189–219.
- [29] Qiu X, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp[J]. *Nature*, 2014, 514(7520): 47–53.

## The molecular basis of Ebola virus entry into host cells

WANG Han<sup>1,2,3</sup>, SONG Jian<sup>2,3</sup>, Gao George Fu<sup>1,2,3,4</sup>, SHI Yi<sup>2,3</sup>

1. Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

**Abstract** Belonging to *Filoviridae* family, Ebola virus is a type of enveloped virus that can cause Ebola hemorrhagic fever in humans and primates. Because of its high mortality rate, Ebola virus now is listed as the most virulent pathogens by the World Health Organization. Since it was first found in 1976, Ebola virus has killed tens of thousands of people in Africa, brought great threat to human life and caused enormous economic losses. Therefore, prevention and control of Ebola virus have always been an important part of scientific researches. However, the understanding of Ebola virus is very limited especially in the cell surface receptors and the membrane fusion mechanism, which has hindered antiviral drug design and development. In this paper, we summarize Ebola virus in terms of taxonomy, morphology, viral proteins and viral life cycle, and highlight the achievements made by George Fu Gao's group in the study of molecular basis of Ebola virus entry into host cells. They include the determination of the crystal structures of NPC1–C and its complex with GP1, which clarifies the recognition mechanism of Ebola virus and its host cell receptor at atomic level. Furthermore, their results reveal the molecular basis of GP1/NPC1 interactions, thereby shedding light on the mechanism of Ebola virus membrane fusion, which will guide further development of small antiviral molecules and peptides for prevention and/or treatment of Ebola virus infection.

**Keywords** Ebola virus; GP; NPC1; crystal structure ●



(责任编辑 卫夏雯)