

α 疱疹病毒的神经传导——轴突上的“穿梭”

祁寒松, 吴红霞, 仇华吉, 孙元

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150069

祁寒松, 吴红霞, 仇华吉, 等. α 疱疹病毒的神经传导——轴突上的“穿梭”. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1361–1373.

Qi HS, Wu HX, Qiu HJ, et al. Transport of alphaherpesviruses in neurons——axonal “shuttling”. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1361–1373.

摘 要: α 疱疹病毒经过长期的进化与宿主形成了良好的相互适应关系。其中部分 α 疱疹病毒具有典型的嗜神经特性, 受到广泛的关注和深入的研究。嗜神经性 α 疱疹病毒能突破宿主屏障而感染神经元, 并在其胞体内大量繁殖进而完成进一步的扩散或在胞体中建立潜伏感染。病毒无论是感染神经元还是在进一步扩散的过程中都会经历沿轴突或树突的传导过程, 所以此过程是病毒生命周期中不可或缺的一部分, 同时也是影响病毒入侵神经系统的关键因素。对嗜神经性 α 疱疹病毒在神经元内传导过程的研究不仅能深入地了解病毒, 而且还能针对性地研发相应的疫苗或靶向性治疗药物, 同时还可利用其神经嗜性将病毒作为解析神经环路的有力工具。文中主要对 α 疱疹病毒在轴突中的传导机制进行了综述, 并提出病毒在轴突中传导的研究发展方向和应用价值, 可为防控 α 疱疹病毒感染提供参考。

关键词: α 疱疹病毒, 神经元, 轴突, 传导

Transport of alphaherpesviruses in neurons——axonal “shuttling”

Hansong Qi, Hongxia Wu, Hua-Ji Qiu, and Yuan Sun

State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: After a long-term co-evolution, alphaherpesviruses have established mutual adaptability with their hosts. Some alphaherpesviruses have typical neurotropic characteristics, which have received extensive attention and in-depth research. Neurotropic alphaherpesviruses can break through the host barrier to infect neurons and multiply in large numbers in the neuron cell body to complete further proliferation or establish latent infection in the cell body. Either in the process of infecting neurons or further spreading, alphaherpesviruses will undergo transmission along axons or dendrites, so this process is an integral part of the life cycle of the viruses, and is also a key factor for the viruses to

Received: January 26, 2019; **Accepted:** March 18, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31570149).

Corresponding authors: Yuan Sun. Tel/Fax: +86-451-51051709; E-mail: sunyuan@caas.cn

Hua-Ji Qiu. Tel/Fax: +86-451-51051708; E-mail: qiuhuaji@caas.cn

国家自然科学基金 (No. 31570149) 资助。

网络出版时间: 2019-04-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190408.1418.002.html>

spread in nervous system. Therefore, studies on transportation of alphaherpesviruses in neurons will provide new insights of the viruses and promote the development of corresponding vaccines or targeted therapeutic pharmaceuticals. In addition, the neurotropism of alphaherpesviruses is conducive to the analysis of nerve circuits. Herein, the mechanisms of alphaherpesvirus transport in axons were reviewed, and the research direction and application of the transport of alphaherpesviruses in axons were put forward, which can provide reference for the prevention and control of alphaherpesviral infections.

Keywords: alphaherpesviruses, neuron, axon, transport

α 疱疹病毒 (Alphaherpesviruses) 是哺乳动物重要的嗜神经性病原体。近年来随着超高分辨率显微技术的发展和荧光标记技术的广泛应用, 进一步解析了 α 疱疹病毒粒子及其亚单位结构在细胞内的行为方式。对嗜神经性 α 疱疹病毒的研究主要集中于病毒在神经系统中的潜伏感染和病毒粒子在神经元内的运行等方面。这些研究对于解析 α 疱疹病毒的生物学特性和致病机制都起着至关重要的作用。尤其体现在病毒粒子在轴突中的传导情况, 目前针对病毒在轴突中的传导过程研发了安全高效的疫苗和靶向药物。文中主要对 α 疱疹病毒在神经元中定向传导的研究进展及其应用进行了阐述和剖析。

1 α 疱疹病毒与神经系统

1.1 α 疱疹病毒的分类及特征

疱疹病毒科分为 3 个亚科: α 、 β 和 γ 疱疹病毒亚科 (图 1)。 α 疱疹病毒为双链 DNA 病毒, 其病毒粒子大小为 200–250 nm, 由核酸、衣壳、基质和囊膜组成^[1]。部分 α 疱疹病毒的宿主谱非常广, 能够在多种宿主中建立潜伏感染^[2]。人类 α 疱疹病毒包括单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1) 和单纯疱疹病毒 2 型 (Herpes simplex virus type 2, HSV-2) 及水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-zoster virus, VZV)。除此之外, 还包括动物疱疹病毒如牛疱疹病毒 1 型 (Bovine herpesviruses type 1, BHV-1)、马疱疹病毒 I 型 (Equine herpesviruses type 1, EHV-1)、伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV)、马立克氏

病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 和禽传染性喉气管炎病毒 (Avian infectious laryngotracheitis virus, AILT) 等。目前已对多数具有神经嗜性的 α 疱疹病毒进行了深入的研究, 包括 HSV、VZV、PRV、BHV-1, 但常作为模式病毒来研究的主要是 PRV 和 HSV-1。这类病毒具有广泛的组织嗜性和神经侵袭力, 病毒一旦进入外周或中枢神经系统, 就会在神经元间进行跨突触传播, 并对神经系统造成损伤或在感觉神经元胞体中建立终身潜伏感染^[3]。

1.2 神经元的结构

神经元是高度分化的细胞, 是神经系统最基本的结构和功能单位。神经元通常由突起和胞体组成, 突起分为轴突和树突两种。树突短而分枝多, 直接由胞体扩张突出形成树枝状, 其作用是接受其他神经元轴突传来的冲动并传给胞体。轴突长而分枝少, 为粗细均匀的细长突起, 常起于轴丘, 其作用是接受外来刺激再由胞体传出。轴突除分出侧枝外, 其末端形成树枝样的神经末梢, 分布于某些组织器官内形成各种神经末梢装置。根据胞体发出突起的多少将神经元分为 3 类: 假

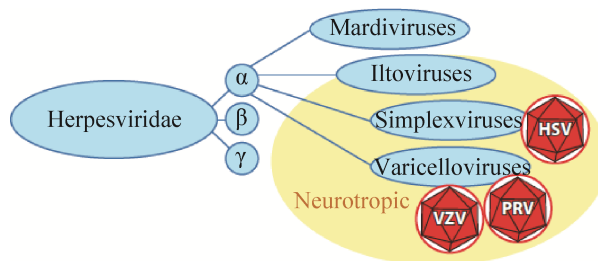


图 1 α 疱疹病毒的分类^[4]

Fig. 1 Classification of alphaherpesviruses^[4].

单极神经元、双极神经元和多极神经元。 α 疱疹病毒粒子在轴突和树突中的双向传导是病毒在宿主体内和宿主间传播必不可少的^[4]。

1.3 α 疱疹病毒在神经元之间的传播

α 疱疹病毒在神经系统中的扩散包括病毒在相邻神经元之间长距离的跨突触传播^[5-6]。在入侵神经系统之前, α 疱疹病毒通常感染体细胞, 如上皮细胞。病毒在这些细胞中复制后, 通过入侵分布于组织中的神经末梢而进入神经元。为了进一步入侵宿主的神经系统, 病毒粒子进入神经末梢后逆向传导进入胞体, 并在感觉神经元胞体中建立终身的潜伏感染^[7]。但在天然宿主中建立潜伏感染是基于入侵神经系统的病毒量较少, 若大量病毒粒子入侵神经元, 则会在胞体中进行复制并进一步传导^[8]。当宿主处于应激或某种特殊状态时潜伏感染可被再激活, 再激活后新合成的病毒粒子通过依赖于轴突分选的方式正向传导至外周, 通常可引起宿主上皮组织的病变 (图 2)^[9]。例如 HSV-1 和 HSV-2 感染导致的复发性表皮病变 (冷疮)。病毒再激活后偶尔会传播至中枢神经系统, 而这与 α 疱疹病毒感染导致的致死性后果具有很大关系, 如 PRV 感染引起猪只的脑炎^[10]。有报道称, PRV 引起猪只的死亡也与其诱导的系统性炎症因子有关, 其中包括神经系统的炎症因子风暴^[11]。虽然目前对 α 疱疹病毒粒子在神经元中的

定向传导了解甚少, 但它是 α 疱疹病毒完整生命周期的重要组成部分。

2 α 疱疹病毒在神经元中的复制周期

2.1 病毒粒子的吸附和入侵

α 疱疹病毒入侵神经系统是从感染外周神经元开始的, 而病毒感染宿主是由成熟的病毒粒子所发起的, 其具有复杂的多层结构, 这些结构在所有疱疹病毒中都是保守的^[3]。HSV-1 的感染过程, 首先是糖蛋白 gC 和 gB 介导病毒粒子吸附于细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖受体, 进一步的入侵依赖于糖蛋白 gD, 它与细胞膜表面的受体结合, 其中包括 Nectin-1、疱疹病毒入侵因子 (Herpesvirus entry mediator, HVEM) 和 3-O-硫酸化乙酰肝素 (3-O-sulfated heparan sulfate)^[12-15]。对于 PRV, gD 介导病毒粒子穿过细胞膜进入细胞中, 但不参与细胞间的传播和神经侵袭^[16]。而 VZV gE 在感染初期可能通过与胰岛素降解酶 (Insulin-degrading enzyme, IDE) 结合发挥与 gD 类似的功能, 因此认为 IDE 是 VZV 的一种受体^[17]。病毒粒子结合后由糖蛋白 gB、gH 和 gL 介导病毒囊膜与细胞膜的融合^[18-19]。

病毒粒子通过膜融合进入细胞后会经历一个基质蛋白解聚的过程, 促使大部分病毒基质蛋白进入细胞质中。然而, 某些特定的基质蛋白 (UL14、

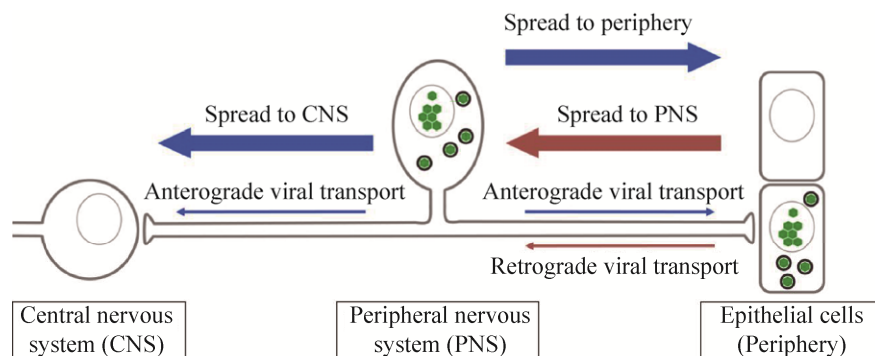


图 2 α 疱疹病毒在轴突中传导模式图^[9]

Fig. 2 Patterns of alphaherpesvirus transport in axons^[9].

UL16、UL21、UL36、UL37、US3 和 ICP0) 在进入细胞后仍附着在衣壳上 (图 3)^[20]。这些衣壳基质复合体会逆向沿轴突向胞体运输, 最终进入核周域与核孔对接。利用活细胞成像和电子显微镜技术发现 3 种蛋白 (UL36、UL37 和 US3) 与胞内的 PRV 衣壳粒子共转运^[21]。最近的研究主要集中在基质蛋白 UL36 和 UL37 在病毒入侵过程中的作用。UL36 和 UL37 在感染期间具有多种功能, 其中 UL37 在病毒粒子进入神经元后参与了病毒极早期基因 *IE180* 的表达调控以及病毒在轴突中的逆向传导^[22]; UL36 的功能包括运输衣壳至细胞核, 使衣壳对接到核孔并释放病毒基因组至核内。

2.2 病毒基因组的复制

病毒在入侵神经元后经过基质蛋白的解聚、轴突的逆向传导、衣壳与核孔的对接最终将病毒基因组释放入核。基因组进入细胞核后, 线性病毒基因组开始环化, 环形 DNA 作为模板进行病毒基因组的复制。最初为 θ 型复制, 然后转换为滚环复制, 最终合成的线性基因组包装进入衣壳^[1-2]。病毒基因组进入细胞核还启动了高度时序性的病毒基因转录级联反应, 这是疱疹病毒感染的特征。

病毒基因可以被细分为 3 类依次表达的转录物: 立即早期基因、早期基因和晚期基因。对于 PRV 来说, 基因转录的启动是通过表达立即早期基因 *IE180* (HSV *ICP4* 同源物) 开始的, *IE180* 是一种有效的转录激活因子, 可诱导病毒早期基因的表达^[1]。早期基因主要编码与核苷酸代谢有关的酶, 而晚期基因编码基因组包装和组装新合成病毒粒子所必需的结构成分。

2.3 病毒粒子的组装和释放

新复制的病毒基因组在细胞核内被包装到衣壳中, 这一过程涉及复制形成的多聚 DNA 被切割成单体线性基因组, 随后包装进入衣壳。包装后, PRV 核衣壳从细胞核中穿过核膜进入细胞质。目前的研究表明, 出核过程开始于核衣壳通过出芽的方式, 跨过内核膜进入核周质, 这个过程使衣壳被内核膜包裹, 这是第一次获得囊膜。随后囊泡与外核膜融合将核衣壳释放到细胞质中。疱疹病毒核衣壳的出核依赖于病毒蛋白 UL31、UL34 和 US3^[23]。但最近的研究表明, 其他的病毒基质蛋白和核膜糖蛋白也与病毒粒子第一次获得囊膜有关, 但这些蛋白在出核过程中的作用仍不清楚。

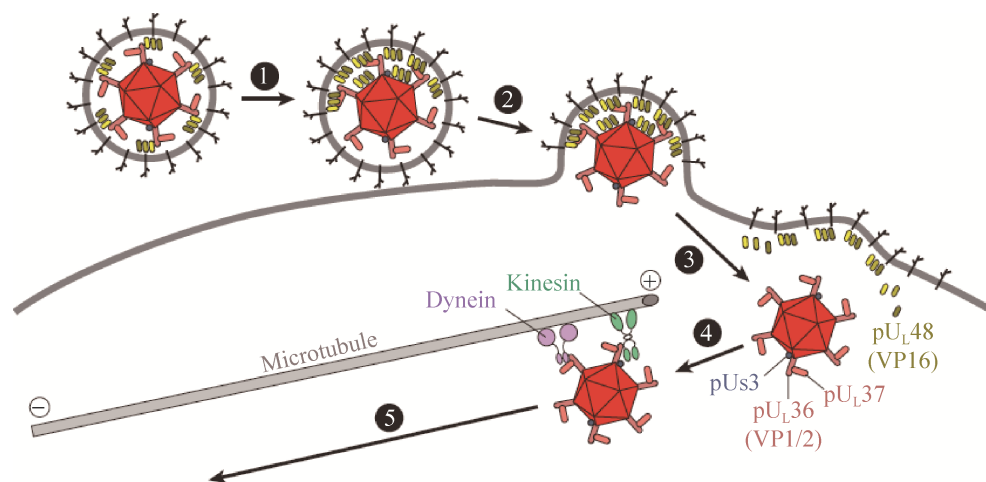


图 3 α 疱疹病毒早期入侵过程^[4]

Fig. 3 Early events in alphaherpesviral infection^[4].

病毒粒子出核之后在细胞质中经历组装和成熟,在胞质中它们获得了基质蛋白并出芽到囊泡中获得最终的囊膜^[24]。获得基质蛋白后的病毒粒子在运输囊泡中第二次获得囊膜。尽管用于二次囊膜装配的膜结构其确切细胞起源仍然未知,但这些膜结构包含一些病毒和细胞的蛋白,有利于病毒粒子的组装和释放。关于嗜神经性 α 疱疹病毒在轴突正向传导前病毒粒子的组装状态共有两种模型。其中“匹配模型”认为,在轴突分选和运输到细胞膜上释放位点之前,病毒粒子在胞体中发生组装和二次囊膜的装配^[25]。相反,“分离模型”认为,裸衣壳(核衣壳与部分基质蛋白组装,但还未获得囊膜)和用于二次囊膜装配的组分分别进行轴突分选和运输,这些组分最终在释放位点或靠近释放位点处进行组装^[26-27]。目前研究结果表明,PRV 感染后的组装过程符合匹配模型^[28]。

病毒粒子的出胞是通过运输囊泡膜与细胞膜融合将病毒粒子释放到细胞外。该过程的详细分子机制尚不清楚,但可能是依赖于介导细胞囊泡胞吐的可溶性 N-乙基马来酰亚胺附着蛋白受体(Soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor, SNARE)蛋白来完成的^[29-30]。在神经元中病毒的出胞过程有两种方式,一种是病毒粒子经轴突正向传导出胞进入外周组织,另一种是沿树突或轴突正向传导出胞,并通过跨突触传播进入更高级的神经元及入侵中枢神经系统,通过轴突正向传导进入中枢神经系统的神经元一般为假单极神经元。但关于树突传导的研究较少,大部分的研究都集中在轴突的传导上,因为轴突中的传导在病毒入侵细胞和释放病毒的过程中均起着重要的作用。

3 α 疱疹病毒在神经元中的定向传导

3.1 细胞骨架的组成与功能

细胞骨架作为细胞结构的重要组成部分,在细胞生命周期中起着重要的作用,它们不仅参与

维持细胞形态还参与胞内物质的运输,其主要由微丝、微管和中间纤维组成。包括 PRV 和 HSV 在内的许多 α 疱疹病毒依赖于病毒与宿主细胞骨架间的相互作用来进行有效的传播和转运。其中,微丝和微管骨架在 α 疱疹病毒感染过程中起着非常重要的作用。微丝主要由肌动蛋白组成,其中肌动蛋白丝(F 肌动蛋白)在短距离物质运输中起着至关重要的作用。蛋白丝由 G 肌动蛋白(球形肌动蛋白)单体亚基组成,形成两个相互缠绕的原丝。肌动蛋白丝直径在 5–9 nm 之间,通常在细胞内形成三维网络,但集中在细胞皮层。细胞中物质的定向转运是由动力蛋白中肌球蛋白超家族介导的,已证实动力蛋白家族的几个成员参与了蛋白在轴突中的靶向运输过程^[31-32]。

微管与微丝细胞骨架相反,其主要促进胞内物质的长距离运输。微管是由 α 微管蛋白和 β 微管蛋白异二聚体亚基组成的刚性圆柱体,它们通过头尾结合形成原丝。通常 13 条这种原丝结合形成中空微管,其外径为 25 nm。由于微管丝具有固定结构极性,所以微管具有高度动态的“正”极(通常朝向细胞外围)以及相对稳定的“负”极[朝向微管组织中心(Microtubule organizing center, MTOC)]^[33]。这也是病毒在神经元中传导方向的标识。在神经元中,微管的排布是高度特异性的,轴突中的微管几乎都只定向于轴突末端的正极,而树突中包含混合极性的微管,这种组织模式维持了不同神经元分室间的特性^[32-33]。有两类分子马达蛋白介导了微管依赖性的定向运输,动力蛋白马达促进逆向运输(朝向微管负极),而驱动蛋白家族马达促进顺向运输(朝向微管正极)^[35]。实质上驱动蛋白家族的分子马达更加多样化;哺乳动物基因组可编码多达 45 种不同的驱动蛋白马达,它们被分成 14 个不同的亚家族^[36]。肌动蛋白和微管细胞骨架通常协同作用以维持稳定的细胞极性和促进其动力学的改变。

3.2 病毒入侵过程中的逆向传导机制

为了进入细胞质,入侵的病毒粒子必须经过皮层肌动蛋白层。虽然病毒粒子结合细胞膜表面受体诱发肌动蛋白细胞骨架的重塑,但这个过程对于病毒入侵神经元的重要性目前尚不清楚^[37-38]。用肌动蛋白解聚剂细胞松弛素 D 对细胞进行预处理不影响病毒入侵中的动态变化。相比之下,用微管解聚剂诺可达唑 (Nocodazole) 或秋水仙素 (Colchicine) 预处理细胞,可阻断病毒衣壳粒子向细胞核的逆向转运,这表明在病毒入侵过程中微管细胞骨架起主要作用^[22]。荧光标记的 PRV 和 HSV-1 衣壳在培养神经元轴突中的活细胞成像表明,逆向转运是一个以约 1 $\mu\text{m/s}$ 的速率发生的稳定过程,该速度与逆行性动力蛋白的快速轴突运输速度一致^[39]。此外,衣壳在轴突中的运输虽具有逆行倾向性但仍具有双向性,即病毒在轴突中进行转运时不是单纯的逆向运输,而是同时具有短暂的正向运输过程,但正向运输在病毒通过轴突入侵细胞的过程中仅占极少部分,所以病毒通过轴突入侵胞体的过程具有逆行倾向性。同时这也表明驱动蛋白可能也参与了该过程。现已证实,存在于胞浆提取物中的驱动蛋白-1 和驱动蛋白-2 与病毒粒子入侵细胞后形成带有部分基质蛋白的衣壳粒子相互作用^[40]。

目前对于病毒粒子在轴突中的逆向转运机制仍处于探索阶段,其详细的机制尚不明确。在这个过程中,病毒利用宿主的动力蛋白马达来牵引其核衣壳沿着轴突进行逆向转运,同时在轴突中的转运受到宿主蛋白的调控。据报道,一小部分病毒衣壳蛋白和基质蛋白招募分子马达来促进逆向运输,其中包括 UL36、UL37 和 VP26 (UL35)^[41]。之前认为,UL36 为病毒直接招募动力蛋白的主要蛋白,而 UL37 或 VP26 在该过程中并没有起到关键性作用。因为 UL36 突变的病毒或注射 UL36 的抗体均可阻断衣壳粒子向细胞核的传递,与此

相反,UL37 或 VP26 的缺失或突变似乎不具有相同的特性^[42]。除此之外,近期的研究发现,UL36 在参与轴突传导过程中招募动力蛋白和动力蛋白激活蛋白来促进病毒粒子的运输,其在该过程中直接与动力蛋白的亚基 DIC (Dynein intermediate chain) 和动力蛋白激活蛋白的亚基 p150 和 p50 相互作用,并且 UL36 中的 S 区域在该过程中起到关键作用^[43]。最新的研究表明,在 UL37 蛋白 R2 区域中突变 5 个氨基酸后病毒也丧失了逆向传导能力,导致病毒衣壳不能进入胞体,同时在该过程中突变体病毒失去了逆行倾向性,在轴突中的正向传导过程增加而逆向传导过程减少,最终在轴突中的总位移几乎为零^[22]。该研究证明了 UL37 在逆向传导过程中的重要性,并且可能是通过调控病毒衣壳粒子与驱动蛋白的相互作用来发挥其功能。

病毒粒子在轴突中的逆向运输过程虽然主要由动力蛋白介导完成,但该过程仍需要多种轴突蛋白的参与,其中包括 LIS1、Anxa2 和 Prph 等。已有研究结果证实,敲低 LIS1、Anxa2 和 Prph 能显著降低 PRV 病毒粒子入侵神经胞体的效率,并且 LIS1 和 Anxa2 都是在 PRV 入侵神经细胞后经历轴突逆向传导过程中新合成的^[44]。这些轴突蛋白可能作为该过程的调控元件来影响 PRV 在轴突中逆向传导,但这种作用方式究竟是 PRV 特异性的,还是宿主物质转运所固有的调控机制,还有待进一步的探究。除了宿主蛋白分子的调控外,还包括病毒蛋白的化学修饰对传导过程的调控。已有研究表明,PRV UL36 蛋白动态泛素化修饰的过程显著影响了病毒入侵神经元,泛素化和去泛素化的动态变化直接参与了 PRV 突破宿主屏障从体细胞入侵到神经系统和在神经元中沿轴突传导的过程。其中,UL36 的去泛素化协助病毒突破宿主屏障进入神经系统,而泛素化过程驱使了病毒粒子沿轴突转运的过程,且其泛素化关键位点

为第 442 位赖氨酸^[45]。虽然 UL36 上关键赖氨酸位点的动态泛素化修饰显著影响了病毒在轴突中的传导过程,但泛素化和去泛素化的动态过程是如何被调控的仍需要进一步研究,其极有可能是通过对 UL36 上核定位信号中关键赖氨酸位点的泛素化来调控病毒沿轴突入核的过程。

目前对于 α 疱疹病毒逆向传导机制的认识仅限于病毒基质蛋白 UL36 与动力蛋白和动力蛋白激活蛋白相互作用,促使病毒核衣壳沿着微管移动至核周域。该过程中还涉及到 UL37 与宿主蛋白的相互作用及 LIS1、Anxa2 和 Prph 等蛋白与病毒粒子或动力蛋白间的相互作用,但其中具体的机制和作用方式及调控模式都未知。虽然已有证据表明动力蛋白和动力蛋白激活蛋白与 UL36 相互作用,但仍不能排除其他蛋白也与动力蛋白复合体相互作用的可能性。有研究表明,在缺失 UL37 之后病毒粒子在轴突中正向传导的比例明显变高,且总位移几乎为零^[22]。这暗示着 UL37 蛋白也可能与动力蛋白复合体或驱动蛋白存在相互作用,且作为病毒粒子沿微管移动的“方向盘”或是动力马达分子间的转换器。在缺失 UL37 后

病毒传导方向的变化呈随机分布,最终正向传导和逆向传导的比例几乎相等(图 4)。

3.3 病毒的正向传导和轴突分选机制

α 疱疹病毒经逆向传导进入神经元胞体内进行复制后,将会经历在神经元内的正向传导,而在感染神经元期间的正向传导取决于轴突分选和病毒粒子的长距离运输。病毒粒子的正向传导对于潜伏感染再激活之后病毒再次感染受神经支配的组织及在宿主之间的有效传播是必不可少的^[3]。 α 疱疹病毒的正向传导过程主要分为两个过程:首先是病毒粒子逆向传导至胞体进行复制,然后沿着轴突正向传导回到受神经支配的上皮组织。另一个过程则是病毒在胞体中复制后沿着轴突或树突向更高级的神经元正向传导,最终通过跨突触传播到达更高级的神经元。但这其中的具体分子机制仍然不清楚,还需要进一步的探索。

目前认为病毒粒子的轴突正向传导主要由病毒相关蛋白与驱动蛋白相互作用有关,驱动蛋白携带病毒粒子沿微管移动来完成正向传导过程。三种病毒膜蛋白(gE、gI 和 US9)是其在体内神经回路中正向传播所必需的蛋白^[47]。单独缺失 gE、

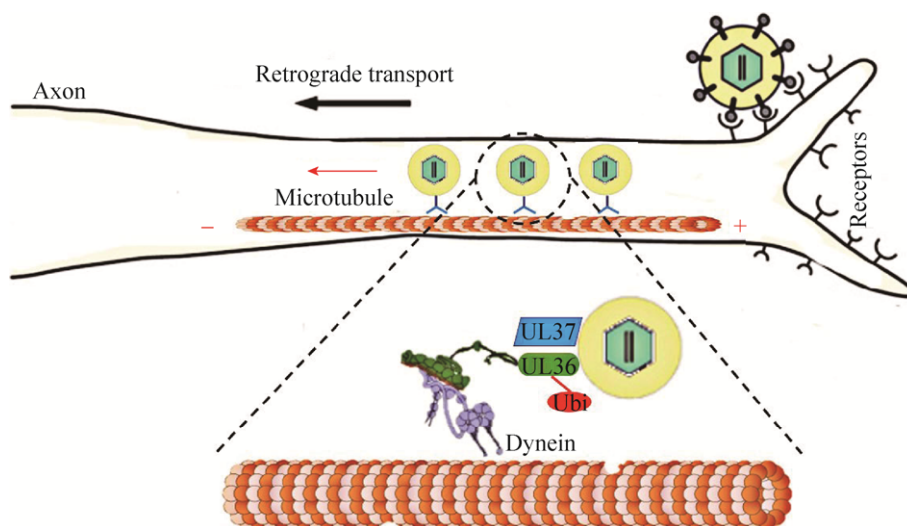


图 4 轴突逆向传导模型 (改编自 Orkide 等^[46])

Fig. 4 Retrograde transport model in axon (adapted from Orkide et al^[46]).

gI 或 *US9* 基因的突变体在体外表型差异较大。*US9* 基因缺失的突变体完全丧失了正向跨神经元传播的能力^[48]。*US9* 是一种小的 (106 个氨基酸) II 型尾锚定膜蛋白 (Type II tail-anchored membrane protein), 其表达具有晚期动力学效应, 且富含抗洗涤剂膜微结构域, 称为脂筏^[49]。在没有 *US9* 的情况下, 病毒粒子能在胞体中组装但不能分选到轴突, 但 *US9* 基因缺失的突变株具有神经元特异性。研究表明, *US9* 与 *KIF1A* 存在相互作用, 而 *KIF1A* 是驱动蛋白 3 (Kinesin-3) 家族中的微管依赖性分子马达^[50]。*KIF1A* 也是轴突分选和病毒粒子在轴突中病毒向释放位点长距离运输所必需的。*KIF1A* 已知的多种功能与其在介导病毒粒子轴突分选和转运中的作用一致^[51]。虽然介导该过程的病毒蛋白和宿主蛋白仍不太清楚, 但 Kinesin-1 是一个极佳的候选蛋白, 因为它在转运多种胞内物质方面发挥着重要的功能, 且在几乎所有哺乳动物细胞类型中广泛表达。尽管如此, 仍然不能排除其他细胞蛋白也可能介导募集 kinesin-1 或其他分子马达到囊膜化病毒粒子上。

对于 PRV *gE* 和 *gI* 基因缺失的突变体虽然能够进行正向传播, 但与野生型相比其传导能力降

低^[52]。*gE/gI* 都是 I 型膜蛋白, 其在内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 中形成异源二聚体, 在离开内质网后 *gE/gI* 主要定位于高尔基体、细胞质囊泡和细胞膜^[53]。已有研究通过对细胞表面蛋白的生物素标记或使用特异性抗体证明了 *gE/gI* 从细胞膜上进行内吞并积聚在较大的囊泡中^[53]。对于 PRV 来说, *gE/gI* 复合物在体内的跨神经元传播中是非必需的。但缺失 *gE* 的细胞质结构域或全长蛋白则导致病毒在非神经元细胞中形成的空斑变小, 这表明其参与了在不同类型细胞间的传播。相反, *US9* 缺失突变体形成的空斑与野生型 PRV 形成的大小一致^[54]。总体而言, 这些结果意味着 *gE/gI* 和 *US9* 在调节正向跨神经元的传播中具有不同的功能。

目前对于轴突正向转运调控方面的研究相对匮乏, 仍需不断摸索。有研究表明, 在病毒入侵神经元后, 轴突转运过程中 UL36 的 442 位赖氨酸泛素化使其正向传导速度明显降低, 在传导过程中静止的时间也明显增多, 但这并没有影响病毒入侵时逆向传导的过程。反而是 1 613 位赖氨酸的泛素化虽不影响正向传导的速度和静止时间, 但明显缩短了逆向传导的时间, 这可能是 1 613 位

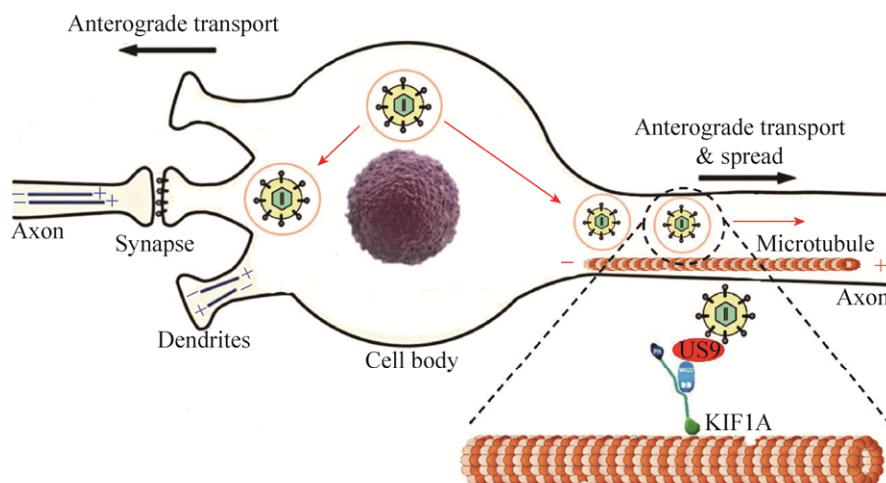


图 5 轴突正向传导模型 (改编自 Orkide 等^[46])

Fig. 5 Axonal anterograde spread model (adapted from Orkide et al^[46]).

氨基酸泛素化后加快了逆向传导速度或增加了逆向运输在传导过程所占的比例^[45]。与此同时,最近的研究结果显示 PRV UL37 R2 突变体在轴突逆向传导过程中显著增加了正向传导所占的比例^[22]。以上实验结果更加体现出 α 疱疹病毒在轴突中传导过程的复杂性,并不是单一的正向传导或是逆向传导,而是一个精细的动态化过程(图 5)。

4 α 疱疹病毒定向传导研究的意义

4.1 神经回路的解析

α 疱疹病毒在解析神经回路方面的应用通常与病毒标记示踪技术相结合,主要探究外周神经系统与中枢神经系统间的联系和中枢神经系统内局部环路两方面。此外, α 疱疹病毒作为解析神经回路的有效工具,优势是其能够在神经环路中复制,因此可以放大示踪信号,增加检测的灵敏度,同时使神经环路更好地实现可视化。PRV 通常作为神经逆向传导的示踪工具揭示传入神经通路^[55]。已有研究利用 GFP 与 β 半乳糖苷酶 (β -gal) 标记的 PRV 对中枢神经中神经元的功能进行了探究。将 GFP-PRV 接种入星状神经节,同时将 β -gal-PRV 注射入初级运动皮层,通过对双标记神经元的鉴定揭示了中枢神经元可能支配的神经通路^[56]。而 HSV-1 通常作为顺行的神经环路示踪工具揭示传出神经网络^[57-58]。利用细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 技术构建了能够同时表达 4 个 GFP 分子的 HSV-1 H129 株,高荧光强度使其能够有效标记神经元并实现了其形态的高度可视化,包括对树突、棘突和轴突纤维的可视化。将 TK 基因敲除后,可实现对单个突触的示踪,通过对神经环路细节的可视化以及对神经网络的标记,有助于提升对中枢神经系统内神经网络的认识,也为研究神经退行性脑疾病提供了参考和借鉴意义^[59]。

4.2 靶向抗病毒药物的研发

HSV-1 是引起复发性口炎和水疱的重要病原,其对人类健康造成了严重的危害。病原广泛存在于人体神经系统中,因为少量病毒感染机体后能在神经元胞体中建立终身的潜伏感染。在潜伏感染期间病毒仅表达极少量的基因且不进行复制,这极大程度上避免了被宿主免疫系统清除,所以即使用疫苗来对抗该病毒也不能起到良好的控制效果。在这种情况下,靶向神经的抗病毒药物显得尤为重要。潜伏感染的病毒被再激活后都会经历轴突或树突正向运输回到上皮组织或进入中枢神经系统,引起病理损伤。目前对于 HSV 的靶向治疗问题,多数科学家尝试通过对 HSV 病毒基因的编辑或阻断病毒在胞体内的复制来解决。例如通过灵长类解旋酶抑制剂靶向抑制灵长类 DNA 解旋酶的活性从而阻断病毒的复制,并探索了其在临床上应用的潜在价值^[60];再如通过 HSV-1 m5 核酸内切酶识别 HSV-1 的 UL19 基因,并对其进行靶向的切割使病毒的关键基因被破坏而不能存活,从而获得 HSV-1 靶向治疗效应^[61]。与此同时也可通过靶向神经的药物来抑制病毒的传导过程,从而阻止病毒的传播。在该过程中可以通过抑制或敲低参与轴突运输病毒蛋白的表达来抑制病毒传播的效率,从而对发病患者进行有效的治疗。虽然对于此类治疗策略还未见报道,但仍然是 HSV 靶向治疗药物开发的一个方向。

4.3 疫苗研发

在 PRV 疫苗上应用比较广泛的疫苗株为经典的 Bartha-K61 株,它是 PRV 强毒株(Becker 株)缺失了 *gE*、*gI*、*US9* 基因的弱毒株。该毒株在神经轴突上的传导能力与 Becker 株具有明显的差异,Becker 株能在神经轴突中双向传导,而 Bartha-K61 株仅能正向传导^[62]。*gE* 蛋白是 PRV 从视网膜、嗅觉上皮细胞和三叉神经节侵入中枢

神经组织所必需的,对 PRV 侵袭神经和沿着神经传递起着决定性的作用。其机制为 gE 与 gI 蛋白形成二聚体间接促进或稳定 US9 蛋白与驱动蛋白分子 KIF1A 之间的相互作用,使病毒核衣壳及其他蛋白分选至神经轴突中进行正向传导^[63]。其中 gE、gI 和 US9 三个基因均是病毒在神经元中传导相关的,这也说明了病毒在神经元中的传导过程影响了病毒的神经毒力。虽然该疫苗株具有良好的免疫原性和保护效力,但仍能入侵神经元胞体,因而具有潜在的风险。最近报道的 UL37 缺失突变株是一个良好的疫苗候选株,单独缺失 UL37 的突变株丧失了轴突中逆向传导的能力,即病毒无法进入胞体进行复制和潜伏感染,极大地提高了其作为疫苗株的安全性,同时在该研究中测试了其免疫原性,结果显示其具有良好的免疫原性和安全性^[22]。由于 HSV 感染人多处于潜伏感染状态,只有当处于应激等特定的环境下才会发病,而有效的 HSV 疫苗仍然处于研究阶段,所以靶向治疗性的药物开发显得更为重要。

5 总结及展望

α 疱疹病毒感染神经元后的定向运输对于病毒在宿主体内和宿主之间的复制和传播是必不可少的。病毒在神经系统内外的有效传播取决于病毒粒子在轴突和树突中的长距离运输,病毒粒子的运输像其他胞内物质的运输一样需要微管依赖的马达分子。逆向传导依赖于入侵病毒的衣壳和基质蛋白与动力蛋白之间的相互作用。对于感染的正向传导需要驱动蛋白促进病毒粒子向近膜端的释放位点运动。病毒粒子蛋白质的组成决定了募集和激活哪些马达分子,从而决定了这些病毒粒子在感染细胞中被运输到的最终位点。

要了解病毒复合体如何利用宿主蛋白在其宿主体内进行有效的长距离运输还需深入研究,例如:病毒蛋白如何与动力蛋白或驱动蛋白相互作用

用来行使其功能;病毒粒子在轴突中的传导如何受轴突中沿途表达的宿主蛋白分子来调控传导过程; α 疱疹病毒通过宿主细胞内的马达分子来进行其在胞内的运输是否具有特异性,抑或是轴突宿主蛋白对病毒传导过程的调控是靶向病毒分子还是马达分子等。这些都是目前亟待解决的问题,这对于认识 α 疱疹病毒在神经元轴突中的传导和宿主内在的物质转运机制都十分重要。此外,未来的研究还将探索病毒感染对细胞组分排布、动力学和内稳态改变的意义,这类研究对于理解 α 疱疹病毒在神经系统中传播的特性和发病机制都极为重要。

α 疱疹病毒作为嗜神经病毒中的一员,对其在神经元或神经系统中活动的深入研究除了探究其生活史和发病机理外,还希望能从研究中去探寻其嗜神经活动的生物学意义,以期对嗜神经病毒有一个更深层次的理解和认识。之前关于 α 疱疹病毒嗜神经的原因归结为逃避宿主的免疫系统,以此更好地进行病毒的复制和传播,但这与病毒在宿主体内建立潜伏感染似乎有些矛盾。 α 疱疹病毒在神经元中的潜伏状态似乎预示着这种病毒与宿主机体间“祥和”的相互作用,驱使着这两者未来的共生关系而不是单纯的寄生关系。 α 疱疹病毒背后蕴含的宝藏还有待深入挖掘。

REFERENCES

- [1] Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(3): 462–500.
- [2] Pellett PE, Roizman B. The Herpesviridae: a brief introduction//Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al, Eds. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007: 2479–2500.
- [3] Bloom DC. Alpha herpesvirus latency: A dynamic state of transcription and reactivation. Adv Virus Res, 2016, 94: 53–80.

- [4] Smith G. Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66: 153–176.
- [5] Chen SH, Yao HW, Huang WY, et al. Efficient reactivation of latent herpes simplex virus from mouse central nervous system tissues. *J Virol*, 2006, 80(24): 12387–12392.
- [6] Fekete R, Cserép C, Lénárt N, et al. Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y₁₂ signalling and recruit monocytes through P2Y₁₂-independent mechanisms. *Acta Neuropathol*, 2018, 136(3): 461–482.
- [7] Antinone SE, Smith GA. Retrograde axon transport of herpes simplex virus and pseudorabies virus: a live-cell comparative analysis. *J Virol*, 2010, 84(3): 1504–1512.
- [8] Koyuncu OO, MacGibeny MA, Hogue IB, et al. Compartmented neuronal cultures reveal two distinct mechanisms for alpha herpesvirus escape from genome silencing. *PLoS Pathog*, 2017, 13(10): e1006608.
- [9] Kramer T, Enquist LW. Directional spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Viruses*, 2013, 5(2): 678–707.
- [10] Steiner I, Kennedy PGE, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol*, 2007, 6(11): 1015–1028.
- [11] Laval K, Vernejoul JB, van Cleemput J, et al. Virulent PRV infection induces a specific and lethal systemic inflammatory response in mice. *J Virol*, 2018, 92(24): e01614–e01618.
- [12] Petermann P, Thier K, Rahn E, et al. Entry mechanisms of herpes simplex virus 1 into murine epidermis: involvement of nectin-1 and herpesvirus entry mediator as cellular receptors. *J Virol*, 2015, 89(1): 262–274.
- [13] Thier K, Möckel M, Palitzsch K, et al. Entry of herpes simplex virus 1 into epidermis and dermal fibroblasts is independent of the scavenger receptor MARCO. *J Virol*, 2018, 92(15): e00490–e00518.
- [14] Koujah L, Suryawanshi RK, Shukla D. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 76(3): 405–419.
- [15] Kopp SJ, Banisadr G, Glajch K, et al. Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(42): 17916–17920.
- [16] Ch'ng TH, Spear PG, Struyf F, et al. Glycoprotein D-independent spread of pseudorabies virus infection in cultured peripheral nervous system neurons in a compartmented system. *J Virol*, 2007, 81(19): 10742–10757.
- [17] Suenaga T, Satoh T, Somboonthum P, et al. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(2): 866–871.
- [18] Chowdary TK, Cairns TM, Atanasiu D, et al. Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(7): 882–888.
- [19] Heldwein EE, Krummenacher C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(11): 1653–1668.
- [20] Radtke K, Kieneker D, Wolfstein A, et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog*, 2010, 6(7): e1000991.
- [21] Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol*, 2009, 83(4): 1660–1668.
- [22] Richards AL, Sollars PJ, Pitts JD, et al. The pUL37 tegument protein guides alpha-herpesvirus retrograde axonal transport to promote neuroinvasion. *PLoS Pathog*, 2017, 13(12): e1006741.
- [23] Speese SD, Ashley J, Jokhi V, et al. Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell*, 2012, 149(4): 832–846.

- [24] Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*, 2009, 143(2): 222–234.
- [25] Wisner TW, Sugimoto K, Howard PW, et al. Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by both separate and married mechanisms. *J Virol*, 2011, 85(12): 5919–5928.
- [26] Ibricic I, Huiskonen JT, Döhner K, et al. Cryo electron tomography of herpes simplex virus during axonal transport and secondary envelopment in primary neurons. *PLoS Pathog*, 2011, 7(12): e1002406.
- [27] Taylor MP, Kramer T, Lyman MG, et al. Visualization of an alphaherpesvirus membrane protein that is essential for anterograde axonal spread of infection in neurons. *mBio*, 2012, 3(2): e00063–12.
- [28] Kratchmarov R, Taylor MP, Enquist LW. Making the case: married versus separate models of alphaherpes virus anterograde transport in axons. *Rev Med Virol*, 2012, 22(6): 378–391.
- [29] Curanovic D, Enquist LW. Directional transneuronal spread of α -herpesvirus infection. *Future Virol*, 2009, 4(6): 591–603.
- [30] Cai HQ, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rab, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 2007, 12(5): 671–682.
- [31] Lewis TL Jr, Mao TY, Arnold DB. A role for myosin VI in the localization of axonal proteins. *PLoS Biol*, 2011, 9(3): e1001021.
- [32] Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 2010, 68(4): 610–638.
- [33] Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 161–167.
- [34] Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(5): 319–332.
- [35] Bhabha G, Johnson GT, Schroeder CM, et al. How dynein moves along microtubules. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(1): 94–105.
- [36] Ogawa T, Saijo S, Shimizu N, et al. Mechanism of catalytic microtubule depolymerization via KIF2-Tubulin transitional conformation. *Cell Rep*, 2017, 20(11): 2626–2638.
- [37] Reuther C, Mittasch M, Naganathan SR, et al. Highly-efficient guiding of motile microtubules on non-topographical motor patterns. *Nano Lett*, 2017, 17(9): 5699–5705.
- [38] Zheng K, Xiang YF, Wang X, et al. Epidermal growth factor receptor-PI3K signaling controls cofilin activity to facilitate herpes simplex virus 1 entry into neuronal cells. *mBio*, 2014, 5(1): e00958–13.
- [39] Smith GA, Pomeranz L, Gross SP, et al. Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(45): 16034–16039.
- [40] Radtke K, Kienek D, Wolfstein A, et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog*, 2010, 6(7): e1000991.
- [41] Schipke J, Pohlmann A, Diestel R, et al. The C terminus of the large tegument protein pUL36 contains multiple capsid binding sites that function differently during assembly and cell entry of herpes simplex virus. *J Virol*, 2012, 86(7): 3682–3700.
- [42] Döhner K, Radtke K, Schmidt S, et al. Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: Efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26. *J Virol*, 2006, 80(16): 8211–8224.
- [43] Zaichick SV, Bohannon KP, Hughes A, et al. The herpesvirus VP1/2 protein is an effector of dynein-mediated capsid transport and neuroinvasion. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(2): 193–203.
- [44] Koyuncu OO, Perlman DH, Enquist LW. Efficient retrograde transport of pseudorabies virus within neurons requires local protein synthesis in axons.

- Cell Host Microbe, 2013, 13(1): 54–66.
- [45] Huffmaster NJ, Sollars PJ, Richards AL, et al. Dynamic ubiquitination drives herpesvirus neuroinvasion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(41): 12818–12823.
- [46] Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus infections in the nervous system. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(4): 379–393.
- [47] Brittle EE, Reynolds AE, Enquist LW. Two modes of pseudorabies virus neuroinvasion and lethality in mice. *J Virol*, 2004, 78(23): 12951–12963.
- [48] Lyman MG, Feierbach B, Curanovic D, et al. Pseudorabies virus Us9 directs axonal sorting of viral capsids. *J Virol*, 2007, 81(20): 11363–11371.
- [49] Lyman MG, Curanovic D, Enquist LW. Targeting of pseudorabies virus structural proteins to axons requires association of the viral Us9 protein with lipid rafts. *PLoS Pathog*, 2008, 4(5): e1000065.
- [50] Kramer T, Greco TM, Taylor MP, et al. Kinesin-3 mediates axonal sorting and directional transport of alphaherpesvirus particles in neurons. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(6): 806–814.
- [51] Maniar TA, Kaplan M, Wang GJ, et al. UNC-33/CRMP and ankyrin organize microtubules and localize kinesin to polarize axon-dendrite sorting. *Nat Neurosci*, 2011, 15(1): 48–56.
- [52] Ch'ng TH, Enquist LW. Neuron-to-cell spread of pseudorabies virus in a compartmented neuronal culture system. *J Virol*, 2005, 79(17): 10875–10889.
- [53] Howard PW, Wright CC, Howard T, et al. Herpes simplex virus gE/gI extracellular domains promote axonal transport and spread from neurons to epithelial cells. *J Virol*, 2014, 88(19): 11178–11186.
- [54] Miranda-Saksena M, Boadle RA, Diefenbach RJ, et al. Dual role of herpes simplex virus 1 pUS9 in virus anterograde axonal transport and final assembly in growth cones in distal axons. *J Virol*, 2015, 90(5): 2653–2663.
- [55] Nassi JJ, Cepko CL, Born RT, et al. Neuroanatomy goes viral! *Front Neuroanat*, 2015, 9: 80.
- [56] Krout KE, Mettenleiter TC, Loewy AD. Single CNS neurons link both central motor and cardiosympathetic systems: a double-virus tracing study. *Neuroscience*, 2003, 118(3): 853–866.
- [57] Wojaczynski GJ, Engel EA, Steren KE, et al. The neuroinvasive profiles of H129 (herpes simplex virus type 1) recombinants with putative anterograde-only transneuronal spread properties. *Brain Struct Funct*, 2015, 220(3): 1395–1420.
- [58] McGovern AE, Driessen AK, Simmons DG, et al. Distinct brainstem and forebrain circuits receiving tracheal sensory neuron inputs revealed using a novel conditional anterograde transsynaptic viral tracing system. *J Neurosci*, 2015, 35(18): 7041–7055.
- [59] Zeng WB, Jiang HF, Gang YD, et al. Anterograde monosynaptic transneuronal tracers derived from herpes simplex virus 1 strain H129. *Mol Neurodegener*, 2017, 12: 38.
- [60] James SH, Larson KB, Acosta EP, et al. Helicase-primase as a target of new therapies for herpes simplex virus infections. *Clin Pharmacol Ther*, 2015, 97(1): 66–78.
- [61] Aubert M, Boyle NM, Stone D, et al. *In vitro* inactivation of latent HSV by targeted mutagenesis using an HSV-specific homing endonuclease. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e146.
- [62] Ch'ng TH, Enquist LW. Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E. *J Virol*, 2005, 79(14): 8835–8846.
- [63] Kratchmarov R, Kramer T, Greco TM, et al. Glycoproteins gE and gI are required for efficient KIF1A-dependent anterograde axonal transport of alphaherpesvirus particles in neurons. *J Virol*, 2013, 87(17): 9431–9440.

(本文责编 郝丽芳)