

埃博拉出血热及靶向药物开发研究进展

摘要 自2013年12月开始相继在非洲国家爆发的埃博拉出血热引起国际关注。EBOV起源宿主为非洲果蝠，能够跨越物种向灵长类动物包括人类传播，目前没有有效的治疗或预防方案，各制药机构均滞留在研发和测试阶段。本文将结合埃博拉病毒感染细胞相关分子机制和药物开发现状对抵抗病毒疫情做出新的思考。

关键词 埃博拉 分子机制 药物 病毒蛋白

自2013年12月开始相继在非洲国家爆发的埃博拉出血热引起国际关注。埃博拉病毒有五种亚型：扎伊尔埃博拉(Ebola-Zaire EBOV-Z)、苏丹埃博拉(Ebola-Sudan EBOV-S)、科特迪瓦埃博拉(Ebola-Coted Ivoire EBOV-C)、本迪布焦埃博拉(Ebola-Bundibugyo EBOV-B) 和莱斯顿埃博拉(Ebola-Reston EBOV-R)^[1]。此次大面积肆虐非洲的病毒为扎伊尔型。病人感染数天后发热，两周左右死亡，起初症状不明显，易被误诊为流感。埃博拉出血热发病症状包括发烧、疼痛，病毒进入血液后合成凝血蛋白引发凝血机制，几天后人体组织出现内出血、皮下红斑、便血、尿蛋白等症状，而且肾、肝、脾等多器官会衰竭和溃烂。

该病毒传播方式有多种且令人发指，可以经血液、体液传播，也可直接接触传播，例如与患者血液、分泌物、器官及其它体液直接接触，病毒甚至可通过接触被体液污染的环境传播。

埃博拉病毒在1976年第一次成功分离，起源宿主为非洲果蝠^[2]，能够跨越物种向灵长类动物包括人类传播，目前没有有效的治疗或预防方案，制药机构目前还在药物研发和测试阶段。

1. 病毒形态

埃博拉病毒(Ebola Virus, EBOV)直径约80nm，属于丝状病毒科丝状病毒属，该属大部分病毒为生物安全四级病毒，具有高度致命性。EBOV基因组是不分节段的单股负链RNA，依次编码NP核蛋白、GP糖蛋白、SGP分泌型糖蛋白、复制转录蛋白VP30、基质蛋白VP40、基质蛋白VP24、磷蛋白VP35、和RNA依赖型RNA聚合酶^[3]。



图1 EBOV病毒形态^[4]

2. 致病机理的近期研究

EBOV各糖蛋白在病毒装配、出芽、攻击宿主过程中发挥重要作用。病毒进入细胞后需大量复制，其蛋白外壳主要在宿主细胞核周围的包含物内组装，这些包含物也是各病毒蛋白的结合位点。EBOV的复制过程显示VP35、VP30、VP40、VP24、GP蛋白等在细胞质包含物中大量聚集并在核周围扩大募集范围随后将病毒转运到细胞膜上，细胞膜在病毒颗粒末端开始参与病毒组装，该过程结束后细胞膜裂解病毒释放。

2.1 SGP蛋白和GP蛋白致病机理

病毒在宿主细胞中出芽并颗粒状生长，VP40和VP30是病毒内膜蛋白，在组装病毒和出芽时发挥重要作用。病毒进入宿主体内攻击巨噬细胞和干细胞，利用这些细胞大量生成两种蛋白：SGP蛋白（Surface Glycoprotein）和GP蛋白（Glycoprotein）^[5]，使巨噬细胞和肝细胞几乎丧失功能。GP蛋白是病毒表面棘突的唯一蛋白结构，能够形成三聚体黏着在血管表面，结合对应受体，介导病毒进入宿主细胞。在病毒进入细胞后GP蛋白介导病毒与血管内皮细胞的结合从而损伤血管机械强度并引起渗血，造成器官衰竭和溃烂。SGP蛋白形成二聚体攻击中性粒细胞，人体免疫系统遭受重创。此外宿主内皮细胞逐渐病理性脱落，黏着的GP蛋白三聚体影响整联蛋白的修复效果，导致血管解体，血液组织液流出，因此血运减少引起器官衰竭，同时触发凝血机制。

2.2 病毒蛋白40（Virus Protein40，VP40）致病功能：

EBOV结合嵌入细胞膜的糖蛋白进入宿主细胞，并利用反链RNA进行复制。VP40主要调控EBOV在细胞膜内叶的出芽并促进病毒颗粒结合哺乳动物细胞阴离子脂质膜^[6]。EBOV出芽时，VP40的C末端区和PS脂质体整合交联为六聚体，该六聚体在病毒丝状伪足上出现，可让病毒在细胞膜中贯穿运输。在出芽和病毒运输过程中，VP40蛋白沿肌动蛋白微丝运动，且VP40的活动依赖肌动蛋白丝IAP1以及微管的调控，它们不断规律和修正VP40的冲击运动^[7]。

EBOV基质蛋白具有构象可塑性，科学家可以在电镜下观察VP40蛋白各种存在形式推测病毒的生命周期中各个形态，结合VP40的变化过程为靶向新药位点提供思路。VP40在协助病毒运输的过程中，从单体变成二聚体、六聚体、结合RNA的八聚体^[8]，这种丝状病毒以及轮状病毒基质蛋白中常见的构象灵活性能够让结合位点处更加稳定多样。

此外，VP40可嵌入细胞膜糖蛋白的核心部位，通过嵌入足够深度而限制细胞膜的曲率变化从而降低细胞膜伸缩能力，并且能够通过限制磷脂翻转酶的能力降低磷脂层的流动性^[9]、加大细胞膜的不对称性导致膜结构不稳定，这也能够解释EBOV破坏血管弹性的病理现象。

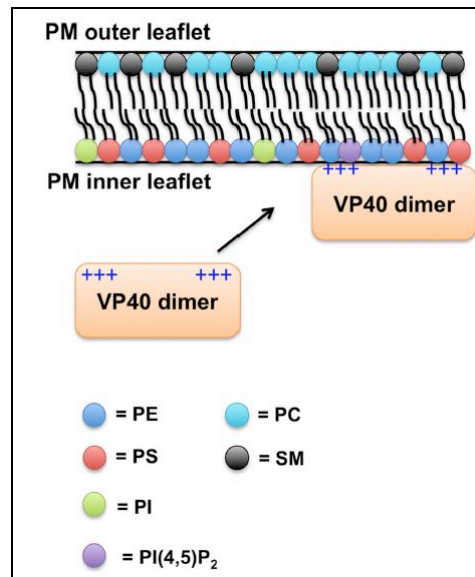


图2 VP40结合细胞膜内叶降低膜弹性^[9]

2.3 EBOV对抗免疫系统

干扰素(IFN)处理细胞时会引起经由核转运酪氨酸磷酸化的STAT1(PYSTAT1)，该过程由核转运蛋白KPNA介导实现^[10]，用以加强细胞的免疫能力。

研究人员发现，EBOV会抑制STAT1信号通路并中和IFN的抗病毒效用。VP24

蛋白能够约束KPNA活动而抑制PYSTAT1的核转运，导致细胞抵抗干扰素的免疫能力。人的KPNA5的C端和EBOV的VP24形成复合物，VP24在复合物中用独特的非经典核定位方式（NLS）结合在KPNA5上，使得VP24蛋白和KPNA5结合极为紧密，能够有效抑制PYSTAT1与KPNA5的结合过程，从而打击细胞的先天性免疫能力。VP24主要结合在KPNA5的C端小臂8、9、10上^[11]，该内源性机制导致细胞对IFN治疗产生耐性，加强病毒破坏能力，也部分阐释了高致死率的原因。

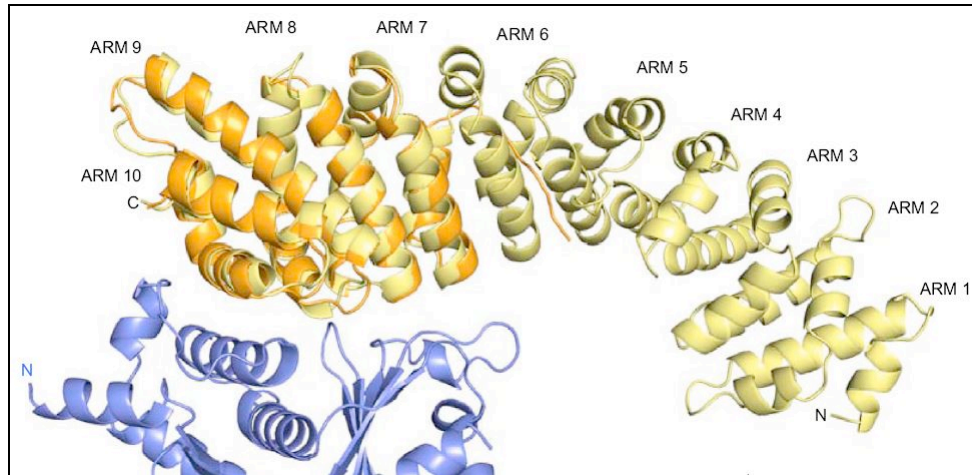


图3 VP24结合KPNA5的C端小臂8、9、10^[11]

3.疫苗与药物研究开发现状

2004年科学家利用抗凝血酶抵抗病毒的抗凝血机制但后续效果不如人意。近期研发的药物分为五类：疫苗、核苷酸药物、中和抗体、小分子抗病毒药物、siRNA干扰技术药物^[12]。

病毒疫苗目前无上市品种，测试阶段的疫苗共有五类：

- 1.传统病毒疫苗。目前研究表明灭活或毒性减小的病毒会重新变回野生型，潜在的危险性让传统疫苗失去价值；
- 2.病毒载体疫苗。科学家利用重组载体构建疫苗成分，加拿大研发的 α -干扰素腺病毒载体疫苗在动物测试阶段表现良好；
- 3.DNA疫苗。该种疫苗表达蛋白比细菌或酵母生产的重组蛋白更适应人体环境；
- 4.类病毒颗粒疫苗。类病毒颗粒是不含核酸的空壳，可特异性提高个体免疫水平；
- 5.复制缺陷型病毒疫苗。利用反转录产生有缺陷的病毒复制体，灭活病毒激

活宿主特异性免疫。

目前在人体测试中效果较好的为中和抗体ZMapp^[13]，该疫苗使用3株人源单抗利用鸡尾酒疗法使人体产生免疫，多抗体治疗的效果可以更全面的抵抗病毒毒效。

另外，反义寡核苷酸药物AVI-7537由于项目巨大不可实施而被美国军方叫停^[14]，其后续效果也尚未见报。

除上述几种药物以外，制药机构也在研发小分子治疗药物。该药物机制主要是抵抗病毒外壳组装、减少细胞摄取病毒、调节Caspase-2酶活性、抑制STAT蛋白合成、抑制RNA聚合酶活性^[14]。其中，RNA聚合酶抑制剂能够利用两次磷酸化降低聚合酶活性从而形成呋核亚硝脒三磷酸盐，最终选择性抑制细胞内所有RNA聚合酶的活性，以此抑制病毒复制。

近期报道显示，第五种类型药物——siRNA基因治疗药物TKM-EBOLA能够针对EBOV的VP24、VP35和L的基因进行干扰，抑制病毒转录和复制^[15]。

然而，目前所有药物均在研发、动物测试或临床一期测试阶段。项目经费和实验室研发难度极高，药物生产和上市速度有待提高。

4. 分析与反思

从目前的病毒研究来看，EBOV怎样选择性结合细胞膜内叶并组装为丝状包被型病毒颗粒的机制未知；EBOV攻击KPNAS核转运蛋白的NPI亚群的分子机制尚未研究透彻；VP40的326氨基酸如何通过末端蛋白在细胞膜内侧落地的分子机制并不清楚，只能通过细胞膜结合过程显示出芽推测位点位置。还有很多病毒蛋白相关分子机制未能掌握，而且EBOV损坏吞噬细胞呈递抗原的机理没有研究透彻，并不能完全了解EBOV损伤树突状细胞的具体机制。笔者认为可利用冷冻电子显微镜技术和X-射线衍射晶体分析法高分辨率揭示病毒的关键结构，观察关键结构域与细胞的融合。此外，可以研发一种新的融合蛋白稳定各病毒蛋白如VP40的构象，同时在计算机模拟、化合物合成和药理功能筛选等方面进行研究，获得高质量的蛋白质晶体从而解析某种特定蛋白的三维结构。同时，可以多观察病毒如何在感染细胞的过程中拆开衣壳，这是一个时间较长、进程复杂的过程，可以利用拆开外壳的具体机制抵制其复制的源头。并且，在保证实验室安全条件的情况下可体外培养神经细胞，检测EBOV对神经系统能力的干扰，为EBOV攻击宿主机

制开辟新的思路。另外，针对吞噬细胞能力减弱的研究可以利用病毒外壳转染细胞观察二者融合过程从而揭示药物靶点。

新药设计可以让药物与细胞膜上受体产生竞争性，让药物与病毒结合从而减少细胞的暴露，并通过各蛋白清晰构象逐渐深入具体分子机制，从而具体设计药物结构和结合靶点。例如，药用靶点可设在EBOV的VP24和KPNA交界处使病毒结合失败让EBOV再次曝光，再用特异性竞争受体结合病毒保护细胞不受感染。

众所周知，扎伊尔型病毒杀死宿主速度很快，每次爆发都会清空人群集落。如果现有埃博拉病毒在感染过程中出现变异，例如介于雷斯顿埃博拉病毒和扎伊尔型之间的新种出现，全球生物和人类的健康会受到极大威胁。目前的研究主要集中在与扎伊尔型EBOV，且对临床测试的推进极为缓慢，需要考量疫苗和药物对其他种EBOV病毒的反应，并加强实验动物病原学的研究。现在研究的最大困难除了经费和人力投入，还有实验室安全保护能力不足、测试人群安全性的不确定，可以加强灵长类动物的测试从而让药物作用更有针对性。

埃博拉在生物安全等级中为第四级，因此对实验室的防护标准要求极其严格，全世界能够做研究的实验室很少。此外，巨额经费需要强大支持，欧盟已筹集科研经费用于药物研发，美国军方、政府和制药公司三方合作抵制埃博拉病毒，在危险疫情和需求市场扩大的情况下需要全球相关机构减少对药物利润的期待，投身于抵抗危机的工作中。

参考文献

- [1] Xu W, Edwards M R, Borek D M, et al. Ebola virus VP24 targets a unique NLS binding site on karyopherin alpha 5 to selectively compete with nuclear import of phosphorylated STAT1[J]. *Cell host & microbe*, 2014, 16(2): 187-200.
- [2] Olival K J, Hayman D T S. Filoviruses in bats: current knowledge and future directions[J]. *Viruses*, 2014, 6(4): 1759-1788.
- [3] Stahelin R V. Membrane Binding and Bending in Ebola VP40 Assembly and Egress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 300.
- [4] Qiu X, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp[J]. *Nature*, 2014.
- [5] Feldmann H, Jones S, Klenk H D, et al. Ebola virus: from discovery to vaccine[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(8): 677-685.
- [6] Bale S, Liu T, Li S, et al. Ebola virus glycoprotein needs an additional trigger, beyond proteolytic priming for membrane fusion[J]. *PLoS neglected tropical diseases*, 2011, 5(11): e1395.
- [7] Bornholdt Z A, Noda T, Abelson D M, et al. Structural rearrangement of Ebola Virus VP40

- begets multiple functions in the virus life cycle[J]. *Cell*, 2013, 154(4): 763-774.
- [8] Hoenen T, Biedenkopf N, Zielecki F, et al. Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription[J]. *Journal of virology*, 2010, 84(14): 7053-7063.
- [9] Radzimanowski J, Effantin G, Weissenhorn W. Conformational plasticity of the Ebola virus matrix protein[J]. *Protein Science*, 2014, 23(11): 1519-1527.
- [10] Xu W, Edwards M R, Borek D M, et al. Ebola virus VP24 targets a unique NLS binding site on karyopherin alpha 5 to selectively compete with nuclear import of phosphorylated STAT1[J]. *Cell host & microbe*, 2014, 16(2): 187-200.
- [11] Zhang A P P, Bornholdt Z A, Abelson D M, et al. Crystal structure of Marburg virus VP24[J]. *Journal of virology*, 2014, 88(10): 5859-5863.
- [12] 程颖, 刘军, 李昱, 等. 埃博拉病毒病: 病原学, 致病机制, 治疗与疫苗研究进展[J]. *科学通报*, 2014, 30: 001.
- [13] Pettitt J, Zeitlin L, Kim D H, et al. Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail[J]. *Science translational medicine*, 2013, 5(199): 199ra113-199ra113.
- [14] Falzarano D, Feldmann H. Possible leap ahead in filovirus therapeutics[J]. *Cell research*, 2014.
- [15] Geisbert T W, Hensley L E, Kagan E, et al. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193(12): 1650-1657.