

## 特约综述



我们实验室主要利用丙肝病毒复制的细胞模型, 结合细胞生物学、病毒学和分子生物学手段, 研究丙肝病毒生命周期的细胞生物学问题。目前, 研究的重点是PI4P相关蛋白和囊泡运输通路分子在病毒复制和组装中的作用。我们的研究将丰富丙肝病毒复制和组装的分子机制, 为寻找新的抗病毒靶标提供思路。

<http://www.ipbcams.cn/byshp/pages/fb/W11PageDetail.aspx?articleId=2969>

## 磷脂酰肌醇-4-磷酸与丙肝病毒相互关系的研究进展

杨广博 洪智 张磊亮\*

(中国医学科学院/北京协和医学院病原生物学研究所, 北京 100176)

**摘要** 丙型肝炎由丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)引起, 流行性很强。HCV主要通过毒品注射、输血或器官移植传播; 极少数情况下, HCV通过血透析、母婴垂直传染。少部分感染HCV的患者会产生急性丙型肝炎, 而大多数人会转变成慢性肝炎, 其中1/3的人群病情逐渐恶化, 严重时导致肝癌。除了肝脏病变, HCV感染还会引起其他组织和器官的损害。因此, 对于HCV感染机制的研究显得尤为重要。近年来, 寻找参与HCV复制的关键性宿主因子已成为研究热点, 磷脂酰肌醇-4-磷酸(phosphatidylinositol-4-phosphate, PI4P)就是其中之一。该文将着重介绍PI4P及相关蛋白参与HCV生命周期的研究进展, 并简要总结相关的鞘脂和胆固醇的生理功能。

**关键词** 丙型肝炎病毒; 磷脂酰肌醇-4-磷酸; 磷脂酰肌醇-4-激酶; 鞘脂; 胆固醇

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(简称丙肝病毒, hepatitis C virus, HCV)引起的危害人类健康的肝脏疾病。根据世界卫生组织统计, HCV的全球感染率约为3%, 估计约2亿人感染了HCV, 每年新发丙型肝炎病例约3.5万例<sup>[1]</sup>。血清流行病学调查资料显示, 我国内地约4 000万人感染了HCV。慢性丙型肝炎的后果是发展成为肝纤维化, 继而发展成为肝硬化、终末期肝病。基于丙型肝炎已成为肝硬化和纤维化的原因之一, 常导致严重的后果, 在目前还没有疫苗的情况下, 研究切实有效的防治措施成为备受关注的问题。目前, 常规的治疗方法是长效干扰素和利巴韦林(Ribavirin, RBV)联合治疗, 但该方法仅能够对约一半的病人产生持续病毒学应答(sustained virological response, SVR), 且有时产生严重的副作用<sup>[2]</sup>。

丙型肝炎病毒属于黄病毒科, 是正链RNA病毒, 基因组含有一个开放阅读框(open reading frame,

ORF), 编码10余种结构和非结构(nonstructure, NS)蛋白<sup>[3]</sup>。单正链RNA病毒会对宿主细胞的细胞质膜进行改造, 使其成为适合自己生存的细胞器, 这些特殊细胞器有的来自内体或线粒体膜, 有的来自分泌途径的膜腔, 例如内质网和高尔基网状系统。这些细胞器的确切功能尚不清楚, 已知单正链RNA病毒在复制过程中必须将RNA依赖的RNA多聚酶靶向并定位于膜内, 而这些专门改造后的膜, 可以将病毒复制复合物进行压缩, 从而为病毒复制提供一个稳定的微环境。此外, 这类细胞器还有助于隐藏病毒RNA, 以免被宿主细胞的免疫系统识别。丙型肝炎病毒复制过程中, 形成了一个类似于细胞器的特殊区域, 叫网状膜<sup>[4]</sup>, 在这里膜结构发生显著重排, 一

中国医学科学院病原生物学研究所基本科研业务费(No.2011IPB108)资助项目

\*通讯作者。Tel: 010-67837355, E-mail: zhangll@ipbcams.ac.cn

些宿主蛋白被招募到这里与病毒蛋白一起协助病毒复制。

近年来, 研究表明, 很多脂类参与了丙型肝炎病毒的生命周期。本文将PI4P为中心, 介绍PI4P的调节和生理功能以及PI4P参与HCV生命周期的研究进展, 同时介绍PI4P作用蛋白调控的脂类: 鞘磷脂和胆固醇。

## 1 PI4P

磷酸肌醇(phosphoinositide, PIs)是一类广泛分布于细胞膜结构上带有负电荷的磷脂, 它不但决定了膜的通透性, 而且在信号传导通路、膜运输系统、细胞骨架结构和细胞核活动中都发挥着作用。磷酸肌醇是磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PtdIns)的磷酸化产物。后者的肌醇部分包含有5个羟基, 其中, 3、4、5位羟基被激酶磷酸化后, 总共得到7种磷酸肌醇, 包括PI3P、PI4P、PI5P、PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3,5)P<sub>2</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub>和PI(3,4,5)P<sub>3</sub>。如图1所示, 这7种磷酸肌醇之间是可以相互转换的, 不同类型的激酶和磷酸酶参与了它们的动态转换过程<sup>[5]</sup>。

磷酸肌醇代谢最显著的特征是区域化, 包括激酶和磷酸酶的区域化及其产物磷酸肌醇的区域化。磷脂酰肌醇经内质网合成之后被分布于胞内各处的激酶或者磷酸酶修饰, 不同类型的磷酸肌醇分布各不相同。如图2所示, PI(4,5)P<sub>2</sub>主要分布于质膜, 高尔基体上也有部分分布<sup>[6]</sup>; PI4P主要位于高尔基体, 少量分布于质膜上<sup>[7]</sup>; PI3P在早期和晚期内体上都有分布, 在质膜上也有分布<sup>[8-9]</sup>; PI(3,5)P<sub>2</sub>主要分布于突触分泌小泡上<sup>[10]</sup>, 晚期内体上也有分布。

### 1.1 PI4P与小GTPase在反面高尔基网(trans-Golgi network, TGN)货物分选中的作用

质膜PI(4,5)P<sub>2</sub>的合成需要PI4P, 所以一开始人们认为PI4P是PI(4,5)P<sub>2</sub>的前体。后来有研究表明酵母细胞内存在两个不同的基本PI4P库, 一个存在于高尔基体, 由PIK1P合成; 另外一个存在于质膜, 由stt4p合成。在哺乳动物细胞中, PI4KIIIβ的失活破坏了高尔基体的形态和分泌功能, 敲除PI4KIIα扰乱了高尔基体的正常活性并且抑制了货物的运出。因为PI4KIIα是结合在膜上的而PI4KIIIβ需要被召集, 所以通常认为基础的PI4P水平是由PI4KIIα维持的, 而PI4KIIIβ则负责合成特定的PI4P库<sup>[11]</sup>, 这些研究表明PI4P在高尔基体中起重要作用, 能招募蛋白到其作

用位点。当前一个新兴的概念是特定的磷酸肌醇与小GTPase在膜运输分选中心合作来分选货物并调控运载体的形成和运输<sup>[12]</sup>。例如, PI3P和Rab5在内体中协同作用分选货物<sup>[13]</sup>, 而PI4P与ADP-核糖基化因子1(ADP-ribosylation factor 1, ARF1)以及Rab蛋白在TGN的货物分选中起中心作用。

第一个证明ARF1与PI4P有关系的发现是在哺乳动物细胞中激活的ARF1召集PI4KIIIβ到高尔基体上<sup>[14]</sup>。之后又有发现表明ARF1的效应分子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)可以直接与PI4P结合, 参与甘露糖6-磷酸(mannose 6-phosphate)受体收集可溶性的蛋白水解酶并将它们从反式高尔基体运输至早期内体<sup>[15-16]</sup>的活动。类似的, 介导从内体到溶酶体物质运输的GGA(Golgi associated gamma adaptin)也与PI4P结合<sup>[17-19]</sup>。Wang等<sup>[17]</sup>发现PI4P是招募GGA到高尔基体的关键调节因子, 而且PI4P协助GGA识别泛素分选信号。通过RNAi敲除PI4KIIα降低TGN上的PI4P水平会减弱GGA的招募。GGA主要通过其GAT结构域的羧基端与PI4P结合, 该结构域结合泛素但不结合ARF1, 它的突变会导致GGA蛋白功能丧失。AP-1与GGA在网格蛋白(clathrin)依赖的通路中的关系并不清楚, 因为它们虽然都与ARF1以及PI4P结合并定位于高尔基体上, 但是它们并没有共定位。敲除PI4KIIα削弱了所有3种GGA(GGA1, GGA2, GGA3)尤其是GGA1与高尔基体的结合能力, 这表明相对于PI4P, GGA1与泛素化货物的结合更紧密。另外发现EpsinR既与PI4P结合, 又与AP-1以及网格蛋白结合, 表明多方相互作用共同调节货物分选<sup>[20-21]</sup>。

FAPP1和FAPP2是定位于TGN上的PI4P结合蛋白<sup>[22]</sup>, 它们含有PH结构域, 并可以结合PI4P和ARF1-GTP。敲除FAPP1和FAPP2会阻断高尔基体到质膜的物质运输, 而过量表达FAPP1的PH结构域不仅影响了高尔基体的形态, 而且阻止了高尔基体去往质膜的物质运输。有研究表明通过RNAi敲除FAPP2可以阻断特定的货物运输而不阻断基础运输, 但是敲除FAPP1对特定的货物运输和基础运输都没有影响<sup>[22-23]</sup>。

哺乳动物细胞中, Rab11直接与PI4KIIIβ相互作用, 使其与高尔基体连接在一起。最近有研究表明PI4P和Rab11都参与了招募GBF1(Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1)到高尔基体的过程。PI4P与ARF1以及其他GTP结合蛋白例如Rab11一起召集效应因子来促进高尔基体

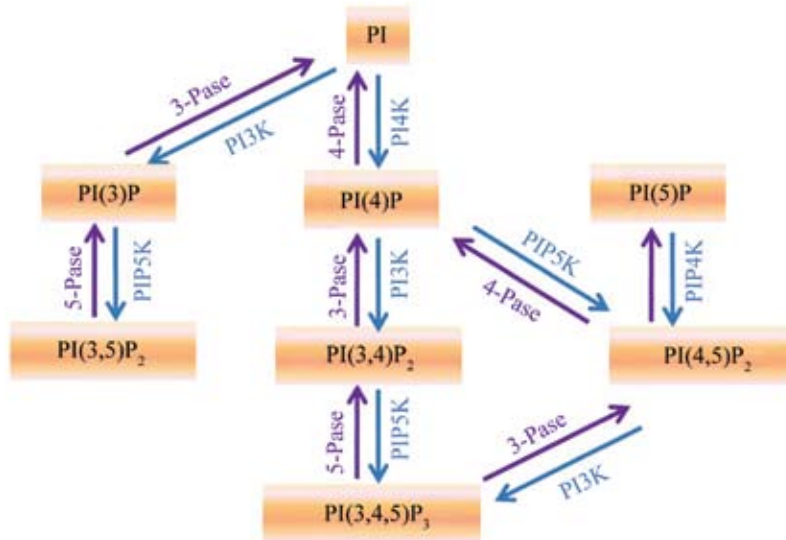


图1 磷酸肌醇代谢过程

Fig.1 Schematic representation of the PI metabolic cycle

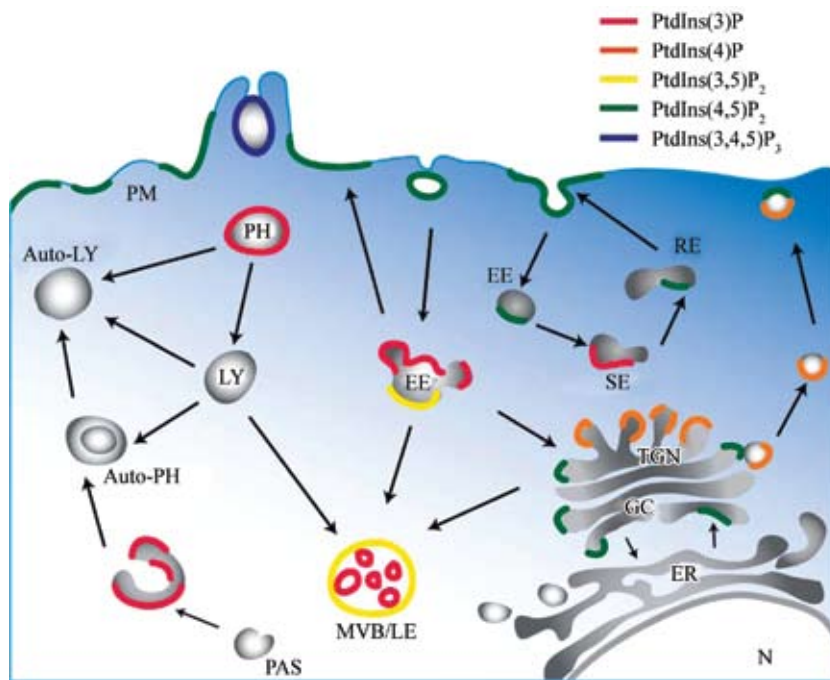


图2 磷酸肌醇及其激酶和磷酸酶的细胞内分布图

Fig.2 Subcellular distribution of the PIs and PI-metabolising enzymes

来源的运输小泡的出芽和分裂。分泌小泡的运输与MYO2P(myosin 2 protein)有关, 有研究表明Rab蛋白以及PI4P对于分泌小泡与MYO2P的连接是必需的<sup>[24]</sup>。有一类MYO2P突变体部分丧失了MYO2P与分泌小泡的连接功能, 而提升TGN上的PI4P水平可以恢复这种连接功能<sup>[25]</sup>, Rab蛋白Sec4P结构域的过表达也可以恢复MYO2P突变体与分泌小泡的连接

功能。总之, 这些证据表明MYO2P结合及运输晚期分泌途径组分是与Rab以及PI4P相关的。

### 1.2 PI4P的代谢

PI4K可以磷酸化肌醇分子4-位上的羟基, 从而催化磷酸肌醇形成PI4P。在细胞生理活动中, PI4K除了参与信号转导过程外, 也参与内膜系统更新和囊泡运输等过程。由于在磷脂酰肌醇代谢过程中

PI4P的产生是一个限速步骤,所以,PI4K被认为是磷酸肌醇信号过程中的一个重要调节因子。

PI4K存在多种亚型,它们的共同特征是羧基端是比较保守的催化亚膜序列,氨基端为变异性较大的调节亚膜序列。细胞中不同亚型的PI4K的亚细胞定位是不同的,这意味着不同的PI4K亚型可能参与了不同的信号转导过程。

哺乳动物细胞中已经发现有4种不同的PI4K,它们分别定位于不同的膜结构上,在囊泡运输以及高尔基体功能发挥中有特定作用<sup>[26]</sup>。PI4KIII $\alpha$ 主要定位于内质网上,有研究表明质膜PI4P库是由其介导产生的;PI4KIII $\beta$ 主要位于高尔基体,细胞核内也有发现,它主要调控高尔基体到质膜的物质运输,召集PI4KIII $\beta$ 到高尔基体是由ARF1调控的;PI4KII $\alpha$ 和PI4KII $\beta$ 主要位于质膜、内体和高尔基体上,调控内吞作用及AP-1介导的货物运输<sup>[26]</sup>。

根据结构特征可以将与激酶作用相反的磷酸肌醇磷酸酶分为3种类型,即CX5R家族的3-磷酸酶、4-磷酸酶和typeII家族的5-磷酸酶。Sac1(suppressor of actin 1)属于3-磷酸酶,它能够以多种磷酸肌醇分子为底物,包括PI3P、PI4P和PI(3,5)P<sub>2</sub>。Sac1是一种内质网膜蛋白,它能控制内质网、高尔基体以及质膜的PI4P水平。Sac1的失活会导致内质网以及高尔基体膜上的PI4P浓度大大上升。Stefan等<sup>[27]</sup>发现Sac1调节PI4P需要Osh、Scs2和Scs22蛋白的存在。在哺乳动物细胞中,因为Sac1的羧基端含有与coatomeer结合的KK模体,COPI囊泡运输调节了Sac1在内质网和高尔基体的循环<sup>[28]</sup>。

## 2 病毒侵染条件下PI4P的功能

通过全基因组siRNA筛选,Tai等<sup>[29]</sup>首先发现了PI4KIII $\alpha$ 是HCV复制的宿主因子。一系列siRNA筛选也发现PI4KIII $\alpha$ 参与了HCV的生命周期<sup>[30-34]</sup>。随后,又有人发现PI4KIII $\beta$ 也是HCV的宿主因子<sup>[35]</sup>。那么是否PI4P参与了病毒的复制呢?Hsu等<sup>[36]</sup>利用HCV的复制子系统首次探讨了这一问题。他们发现:在HCV感染过程中,PI4P水平上升。通过siRNA敲降PI4KIII $\beta$ 或用小分子抑制剂PIK93抑制PI4KIII $\beta$ 的活性会导致PI4P水平显著下降,进而抑制HCV的复制。过量表达PI4P的磷酸酶Sac1也会导致HCV复制显著下降,这证明PI4P对于HCV病毒的复制有重要作用。

PI4KIII $\alpha$ 的结构包含氨基端的SH3结构域、两

段富含脯氨酸的结构域、两个亮氨酸拉链结构、PH结构域以及羧基端的催化结构域。PI4KIII $\alpha$ 是由PI4KCA基因编码的脂激酶,它能磷酸化磷酸肌醇(PtdIns)形成PI4P,并可进一步将其磷酸化为PI(4,5)P<sub>2</sub>(主要定位于内质网,调控运输囊泡在内质网上的出口位点)。Reiss等<sup>[37]</sup>利用siRNA筛选人类激酶组并确定了13种不同的激酶是HCV复制所必需的,其中包括PI4KIII $\alpha$ 。在HCV感染的肝细胞以及慢性HCV病人肝脏组织中都检测到了PI4KIII $\alpha$ 产物PI4P含量的上升,这表明PI4KIII $\alpha$ 的酶活性对于HCV复制具有重要作用。

PI4KIII $\alpha$ 是如何参与调控HCV复制的呢?最早在酵母双杂交实验中发现PI4KIII $\alpha$ 与丙肝病毒非结构蛋白NS5A相互作用<sup>[38]</sup>。在感染细胞内,NS5A直接与PI4KIII $\alpha$ 结合。Berger等<sup>[39]</sup>发现在HCV感染的细胞中,PI4KIII $\alpha$ 与NS5A以及病毒dsRNA共定位。沉默PI4KIII $\alpha$ 改变了病毒复制蛋白在细胞中的定位。Lim等<sup>[34]</sup>证明NS5A通过其结构域1与PI4KIII $\alpha$ 的401~600位氨基酸结合,通过干扰二者的结合抑制了HCV的增殖。

Tai等<sup>[40]</sup>建立了一个非复制的网状膜形成模型来探索PI4KIII $\alpha$ 在病毒复制中的作用。研究发现:PI4KIII $\alpha$ 活性的丧失导致HCV病毒复制复合体膜结构形态的显著变化,而NS5A能够激活PI4KIII $\alpha$ ,这表明NS5A通过招募并激活PI4KIII $\alpha$ 来合成大量的PI4P,从而维持病毒复制区网状膜结构的完整性。PI4KIII $\alpha$ 和其产物PI4P富集在网状膜上。而siRNA沉默PI4KIII $\beta$ 后,虽然病毒复制受到抑制,但网状膜形态没有变化,PI4P仍然富集在网状膜上。在病毒侵染的细胞中,NS5A与PI4KIII $\alpha$ 结合而不与PI4KIII $\beta$ 相互作用。所以他们认为,PI4KIII $\alpha$ 和PI4KIII $\beta$ 可能产生不同区域的PI4P,从而在病毒复制的不同阶段起作用。

HCV复制的抑制剂4-氨基喹唑啉的作用靶标最初被认为是NS5A,但并没有严格的实验证据。而喹唑啉基团存在于许多激酶抑制剂中。因此,Francesco等<sup>[41]</sup>猜想4-氨基喹唑啉可能抑制了HCV复制相关的激酶。实验发现一个代表性的4-氨基喹唑啉类的化合物AL-9在抑制PI4KIII $\alpha$ 活性的同时也较少地抑制了PI4KIII $\beta$ 的活性;而在活细胞中,AL-9会减少质膜PI4P的含量却不会阻止高尔基体PI4P的富集。同时发现PI4P在HCV特异性的膜结构上的增加是伴

随着其在质膜中浓度的下降。这表明丙型肝炎病毒可能通过召集PI4KIII $\alpha$ 到复制复合体来重新分配膜网络上的PI4P。推测AL-9通过抑制PI4KIII $\alpha$ 来干扰PI4P的供应进而抑制丙型肝炎病毒的复制。

Bishe等<sup>[42]</sup>发现在细胞内过表达Sac1突变体(这种突变体能够选择性降低高尔基体上的PI4P水平),结果会导致HCV的分泌下降,而对HCV的RNA水平没有影响。这些研究表明TGN定位的PI4P以及参与PI4P代谢的脂酶在HCV的成熟及分泌过程中起重要作用。

### 3 PI4P结合蛋白

前面介绍了PI4P对于HCV病毒的复制非常重要,但PI4P是如何参与HCV的生命周期的犹未可知。要揭示这个机制,必需探讨PI4P结合蛋白。PI4P在膜运输蛋白和调控蛋白之间的相互作用中起着重要作用,许多高尔基体结合或者招募的蛋白在内质网和高尔基体的PI4P交换中起作用,这些蛋白大都含有PI4P结合区域。OSBP(oxysterol-binding protein)、CERT(ceramide transfer protein)、FAPP(four-phosphate-adaptor protein)和GOLPH3(golgi phosphoprotein 3)是目前四种研究得比较多的PI4P结合蛋白,其中OSBP、CERT和FAPP含有PH结构域,是脂质转运蛋白,分别参与非囊泡运输胆固醇(cholesterol)、神经酰胺(ceramide)和葡糖神经酰胺(glucosylceramide)的过程;GOLPH3不含经典的PI结合结构域,它参与高尔基囊泡运输。

#### 3.1 OSBP

OSBP在内质网到高尔基体的脂质转运中起作用,它通过FFAT结构域与内质网蛋白VAP相互作用<sup>[43]</sup>,通过PH结构域与高尔基体上的PI4P结合。OSBP及其相关蛋白在胆固醇平衡、磷脂代谢、囊泡运输、细胞信号转导中发挥着作用。研究表明,HCV的成熟以及释放需要宿主鞘磷脂的合成。根据细胞内胆固醇和氧化固醇的水平,OSBP可以激活鞘磷脂合成<sup>[44-45]</sup>。Amako等<sup>[46]</sup>利用两种shRNA敲除OSBP,shRNA1有效降低了HCV的复制(约85%),shRNA2只降低了HCV复制活性的14%;然而两种shRNA都显著降低了HCV的分泌(分别为99.8%和87.2%)。缺失PH区域的OSBP突变体不能定位于高尔基体上,过表达该突变体减少了HCV的分泌。他们还将NS5A的结构域I与OSBP结合,通过OSBP既结合内质网上

的VAP-A又结合PI4P的特性来调节HCV的释放。

#### 3.2 CERT

CERT负责神经酰胺从内质网到反式高尔基体的运输,这个过程是由磷酸化导致的CERT构象变化来调节的。在其PH结构域附近,有一个富含丝氨酸的磷酸化位点,可以反式调节CERT与PI4P的结合<sup>[47]</sup>。在高尔基体上,PKD磷酸化CERT会引起CK1 $\gamma$ 2对CERT上丝氨酸位点的磷酸化,从而削弱CERT在高尔基体的定位、神经酰胺的运输和鞘磷脂的合成<sup>[48-49]</sup>。在内质网中,磷酸酶PP2C $\epsilon$ 与VAP相互作用,去磷酸化CERT,从而增强神经酰胺在高尔基体的定位和鞘磷脂的合成<sup>[50]</sup>。抑制CERT的功能会减弱HCV的释放而不影响其复制<sup>[51]</sup>。在TGN,PKD激活PI4KIII $\beta$ 产生PI4P,PI4P进而招募含有PH结构域的OSBP和CERT。HCV感染会降低PKD1的活性,而抑制PKD1会促进HCV释放;反过来,过量表达PKD1会抑制HCV的释放,PKD抑制HCV的释放是通过磷酸化OSBP以及CERT来实现的<sup>[46]</sup>。

#### 3.3 GOLPH3

GOLPH3通过与PI4P结合从而定位于富含PI4P的高尔基体上,并能够结合肌动蛋白MYO18A,从而连接了高尔基体与F-actin。这种相互作用对于维持高尔基体的正常形态以及TGN产生有效的运输小泡是必需的。Dippold等<sup>[52]</sup>通过表达一种持续定位于高尔基体上的Sac1-K2A突变体从而持续消耗PI4P,在Hela细胞中这种突变体的表达导致GOLPH3从高尔基体上消失,这表明GOLPH3定位于高尔基体上依赖于PI4P的存在以及GOLPH3和PI4P之间的结合。另外的实验表明,GOLPH3与PI4P的结合需要30~293位氨基酸的存在<sup>[52]</sup>。GOLPH3在细胞内大量存在,它是PI4P的主要结合对象,其他PI4P结合蛋白包括OSBP、CERT以及FAPP,这些蛋白主要调控高尔基体膜的组成成分进而调整膜结构的机械力学特性。因而,PI4P可以同时调控高尔基体膜张力以及其力学特征,包括膜弹性以及弹性极限,进而决定膜在承受张力时的行为。

利用siRNA沉默HCV感染细胞中的GOLPH3或者MYO18A蛋白会减少分泌的病毒蛋白,但不会减少细胞内病毒RNA的复制。同时,细胞外病毒的感染性也降低了,而细胞内病毒的感染性上升,这表明感染性病毒留在了细胞内<sup>[42]</sup>。

酵母VPS74蛋白是GOLPH3的同源体,有研究



发现它与糖基转移酶质膜端尾部结合又与coatomer结合,并将糖基转移酶包装至COPI囊泡中<sup>[53-54]</sup>,从而维持了糖基转移酶的功能,而此过程需要PI4P结合并定位到高尔基体上。

### 3.4 FAPP

Godi等<sup>[22]</sup>确认了两种PI4P效应因子,四磷酸适配器蛋白1和2(FAPP1和FAPP2),这两种蛋白都定位于TGN上,并且通过其PH区域与PI4P以及ARF1结合。敲除FAPP或者改变FAPP的位置都会抑制高尔基体到质膜的货物运输。另外,过量表达FAPP的PH区域会抑制转运载体分裂。ARF1是HCV的宿主因子<sup>[55]</sup>,当用siRNA或者小分子抑制剂BFA抑制ARF1后,HCV的复制被阻断。FAPP是否与HCV复制有关系,还需要进一步研究。

## 4 PI4P作用蛋白调节的脂类

### 4.1 鞘脂

OSBP1和CERT这两个PI4P结合蛋白都参与了鞘脂的合成,而HCV病毒的复制会被鞘脂合成抑制剂所抑制。Sakamoto等<sup>[56]</sup>利用HCV亚基因组复制子细胞培养系统确定了一种亲油性的长链化合物NA255,这是一种新的针对HCV的小分子抑制剂。NA255阻断了鞘脂(脂筏的主要成分)的从头合成,进而抑制了丝氨酸棕榈酰转移酶的活性,扰乱了HCV非结构蛋白与脂筏间的联系。

Aizaki等<sup>[57]</sup>发现与HCV病毒颗粒相关的胆固醇以及鞘脂类化合物对病毒颗粒的成熟以及感染性具有重要作用。通过比较细胞膜与病毒的胆固醇和磷脂的比例,发现病毒颗粒富含胆固醇。去除病毒的胆固醇或者水解病毒相关的鞘脂几乎使病毒完全丧失了感染性,重新补充胆固醇使得病毒恢复了感染性。另外,发现鞘脂合成途径抑制剂阻断了病毒颗粒的生产,但并不阻止病毒RNA的复制,这意味着改变病毒的脂质组成可能是一种有效的治疗HCV感染的途径。

Weng等<sup>[58]</sup>发现鞘脂结合HCV基因型1b的NS5B,能够增强NS5B与模板结合的活性进而激活其聚合酶活性。在这个过程中,NS5B结合鞘脂必需先于或者同步于模板RNA的结合。鞘脂可以结合基因型1a的NS5B但是并不激活其RNA依赖的RNA聚合酶活性;有趣的是,鞘脂不结合基因型2a的NS5B。NS5B的鞘脂结合区域位于231~260位

氨基酸(螺旋-转角-螺旋结构)之间,其中241Q对于结合鞘脂是极其重要的。

### 4.2 胆固醇

OSBP参与非囊泡运输胆固醇,而胆固醇是HCV生命周期中不可或缺分子。HCV会改变宿主的脂质代谢以利于其自身生存,在临床上表现为脂肪变性和低胆甾醇血<sup>[59]</sup>,这主要是由于不正常的甘油三酯以及胆固醇代谢造成的。在慢性HCV病人中,表现为肝脏脂肪酸和甘油三酯含量上升。

已有研究表明HCV病毒颗粒富含胆固醇,而去除病毒的胆固醇会导致病毒完全丧失感染性<sup>[57]</sup>;另外,在丙型肝炎病毒株JFH1(Japanese fulminant hepatitis 1)中,胆固醇与磷脂的比例相对于细胞膜为高。胆固醇和磷脂的比例是表征膜粘性的参数<sup>[60]</sup>,比例下降会导致膜流动性增强,可能会改变病毒包膜构象进而降低病毒感染性。

肝脏中合成最多的脂蛋白是极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL),它包含一个富含中性脂质、甘油三酯以及胆固醇的中心,周围包含有磷脂层以及ApoB-100和ApoE<sup>[61]</sup>。有研究表明抑制ApoB-100<sup>[62-63]</sup>、ApoE<sup>[64-65]</sup>以及MTP<sup>[62-63,66]</sup>的活性会抑制感染性病毒颗粒的释放,这表明VLDL的合成在病毒释放过程中起重要作用。

HCV病毒如何进入细胞至今没有明确的答案。最近有研究表明,这是一个包含多种侵染因子的多步过程。HCV利用细胞表面的低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)、清道夫受体B1(scavenger receptor class B1, SRB1)以及粘多糖作为初始贴附因子。LDLR以及SRB1识别病毒颗粒的LDL(low density lipoprotein)、HDL(high density lipoprotein)和VLDL<sup>[67-68]</sup>。

尽管目前看来,血液中脂蛋白对于HCV的生命周期是必需的,但通常HCV感染会导致低胆甾醇血,这主要是由于LDL胆固醇减少造成的<sup>[69]</sup>;也有报道表明HDL胆固醇减少也会造成低胆甾醇血<sup>[70]</sup>。很多报道表明丙型肝炎患者在干扰素治疗前血液中的高胆固醇以及高含量低密度脂蛋白会导致高持续病毒学应答率<sup>[71-72]</sup>。而血液中的高胆固醇是与LDLR的下调相关的。Woodhouse等<sup>[73]</sup>发现HCV感染的Huh7.5细胞的胆固醇含量比未感染细胞上升了56%。HMGCR是胆固醇合成途径中的关键性酶,Nakamuta等<sup>[74]</sup>发现在慢性丙型肝炎病人肝细胞中,

HMGCR以及HMGCS的转录水平显著上升。

## 5 小结和展望

随着丙肝病毒细胞感染模型的建立, 丙肝病毒的研究进入快速发展的阶段, 这得益于全基因组siRNA筛选技术的广泛应用, 大量丙肝病毒复制宿主因子被发现, 其中, 包括许多与PI4P相关的蛋白。PI4P在丙肝病毒复制中起着非常重要的作用, 目前发现: NS5A可以激活PI4KIII $\alpha$ 而上调PI4P。这个模型与肠道病毒中PI4P的上调机制不太一样。不

过, GBF1、ARF1和PI4KIII $\beta$ 也是丙肝病毒的宿主因子, 笔者认为图3的模型也是可能存在的。也就是说GBF1和ARF1招募PI4KIII $\beta$ 到病毒复制的环境中, 产生PI4P, 而coatmer通过与Sac1的相互作用来减少对PI4P的消耗, 二者协同保持了病毒复制微环境中的PI4P水平。PI4P相互作用蛋白如OSBP和CERT会被招募到病毒复制微环境中, 发挥其促进病毒复制的作用。该领域未来的研究热点在于寻找与丙肝病毒复制相关的PI4P作用蛋白, 并阐明这些蛋白在丙肝病毒生命周期中的作用。

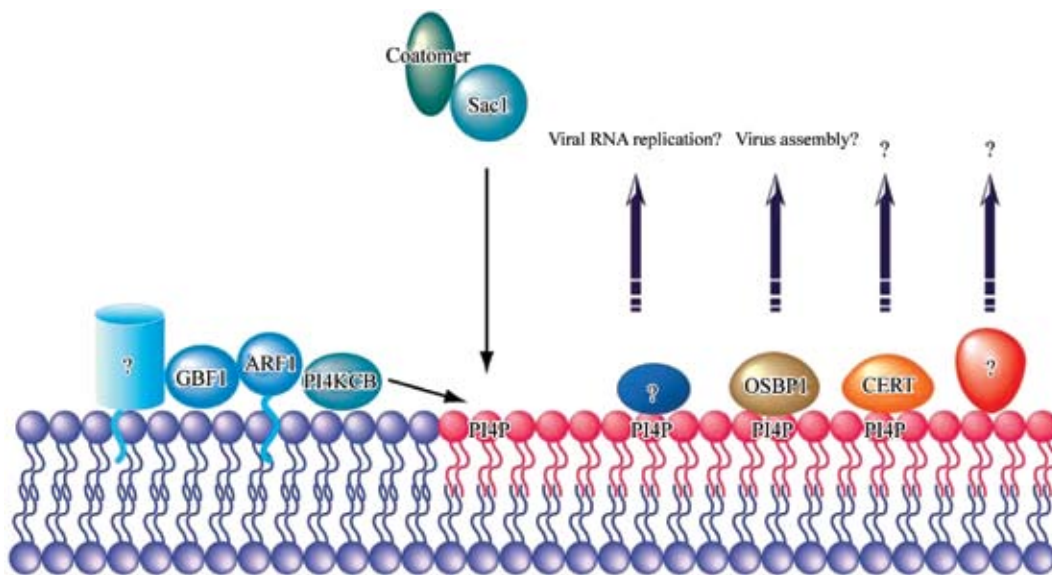


图3 丙肝病毒复制过程中COPI通路分子调控PI4P的模式图

Fig.3 Model of regulation of PI4P by COPI during HCV replication

## 参考文献 (References)

- Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: A devastating virus. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36(2): 91-133.
- Firpi RJ, Nelson DR. Current and future hepatitis C therapies. *Arch Med Res* 2007; 38(6): 678-90.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(6): 453-63.
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76(12): 5974-84.
- Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, de Matteis MA. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J* 2008; 27(19): 2457-70.
- Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J* 2002; 363(Pt3): 657-66.
- Roy A, Levine TP. Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of Osh2p. *J Biol Chem* 2004; 279(43): 44683-9.
- Falasca M, Hughes WE, Dominguez V, Sala G, Fostira F, Fang MQ, *et al.* The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J Biol Chem* 2007; 282(38): 28226-36.
- Lodhi IJ, Bridges D, Chiang SH, Zhang Y, Cheng A, Geletka LM, *et al.* Insulin stimulates phosphatidylinositol 3-phosphate production via the activation of Rab5. *Mol Biol Cell* 2008; 19(7): 2718-28.
- Osborne SL, Wen PJ, Boucheron C, Nguyen HN, Hayakawa M, Kaizawa H, *et al.* PIKfyve negatively regulates exocytosis in neurosecretory cells. *J Biol Chem* 2008; 283(5): 2804-13.
- Weixel KM, Blumental-Perry A, Watkins SC, Aridor M, Weisz OA. Distinct Golgi populations of phosphatidylinositol 4-phosphate regulated by phosphatidylinositol 4-kinases. *J Biol Chem*

- 2005; 280(11): 10501-8.
- 12 Santiago-Tirado FH, Bretscher A. Membrane-trafficking sorting hubs: Cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* 2011; 21(9): 515-25.
  - 13 Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1999; 1(4): 249-52.
  - 14 Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Di Tullio G, Iurisci C, *et al.* ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 1999; 1(5): 280-7.
  - 15 Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, *et al.* Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 2003; 114(3): 299-310.
  - 16 Austin C, Boehm M, Tooze SA. Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry* 2002; 41(14): 4669-77.
  - 17 Wang J, Sun HQ, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, *et al.* PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell* 2007; 18(7): 2646-55.
  - 18 Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD, Hartnell LM, *et al.* GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 2000; 149(1): 81-94.
  - 19 Bonifacino JS. The GGA proteins: Adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(1): 23-32.
  - 20 Mills IG, Praefcke GJ, Vallis Y, Peter BJ, Olesen LE, Gallop JL, *et al.* EpsinR: An AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol* 2003; 160(2): 213-22.
  - 21 Hirst J, Motley A, Harasaki K, Peak Chew SY, Robinson MS. EpsinR: An ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2): 625-41.
  - 22 Godi A, Di Campli A, Konstantakopoulos A, Di Tullio G, Alessi DR, Kular GS, *et al.* FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* 2004; 6(5): 393-404.
  - 23 Vieira OV, Verkade P, Manninen A, Simons K. FAPP2 is involved in the transport of apical cargo in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 2005; 170(4): 521-6.
  - 24 Santiago-Tirado FH, Legesse-Miller A, Schott D, Bretscher A. PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev Cell* 2011; 20(1): 47-59.
  - 25 Schott D, Ho J, Pruyne D, Bretscher A. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J Cell Biol* 1999; 147(4): 791-808.
  - 26 Balla A, Balla T. Phosphatidylinositol 4-kinases: Old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol* 2006; 16(7): 351-61.
  - 27 Stefan CJ, Manford AG, Baird D, Yamada-Hanff J, Mao Y, Emr SD. Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell* 2011; 144(3): 389-401.
  - 28 Rohde HM, Cheong FY, Konrad G, Paiha K, Mayinger P, Boehmelt G. The human phosphatidylinositol phosphatase SAC1 interacts with the coatamer I complex. *J Biol Chem* 2003; 278(52): 52689-99.
  - 29 Tai AW, Benita Y, Peng LF, Kim SS, Sakamoto N, Xavier RJ, *et al.* A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 2009; 5(3): 298-307.
  - 30 Li Q, Brass AL, Ng A, Hu Z, Xavier RJ, Liang TJ, *et al.* A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(38): 16410-5.
  - 31 Vaillancourt FH, Pilote L, Cartier M, Lippens J, Liuzzi M, Bethell RC, *et al.* Identification of a lipid kinase as a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 2009; 387(1): 5-10.
  - 32 Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011; 9(1): 32-45.
  - 33 Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, Jordan TX, *et al.* Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(18): 7577-82.
  - 34 Lim YS, Hwang SB. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation. *J Biol Chem* 2011; 286(13): 11290-8.
  - 35 Trotard M, Lepere-Douard C, Regeard M, Piquet-Pellorce C, Lavillette D, Cosset FL, *et al.* Kinases required in hepatitis C virus entry and replication highlighted by small interference RNA screening. *FASEB J* 2009; 23(11): 3780-9.
  - 36 Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, *et al.* Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 2010; 141(5): 799-811.
  - 37 Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011; 9(1): 32-45.
  - 38 Ahn J, Chung KS, Kim DU, Won M, Kim L, Kim KS, *et al.* Systematic identification of hepatocellular proteins interacting with NS5A of the hepatitis C virus. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37(6): 741-8.
  - 39 Berger KL, Kelly SM, Jordan TX, Tartell MA, Randall G. Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication. *J Virol* 2011; 85(17): 8870-83.
  - 40 Tai AW, Salloum S. The Role of the Phosphatidylinositol 4-kinase PI4KA in Hepatitis C virus-induced host membrane rearrange-



- ment. *PLoS One* 2011; 6(10): e26300.
- 41 de Francesco AB, Alvarez R, Fenu S, Reghellin V, Pagani M, Abrignani PN. Phosphatidylinositol 4-kinase III $\alpha$  is targeted by 4-aminoquinazoline compounds with anti-HCV activity. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011, O8.07.
- 42 Bishe B, Siddiqui A. HCV secretion through the trans-Golgi network requires a PI4P-binding protein, GOLPH3, and the unusual myosin MYO18A. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2011, P9.71.
- 43 Wyles JP, Ridgway ND. VAMP-associated protein-A regulates partitioning of oxysterol-binding protein-related protein-9 between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Exp Cell Res* 2004; 297(2): 533-47.
- 44 Perry RJ, Ridgway ND. Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol Biol Cell* 2006; 17(6): 2604-16.
- 45 Lagace TA, Byers DM, Cook HW, Ridgway ND. Chinese hamster ovary cells overexpressing the oxysterol binding protein (OSBP) display enhanced synthesis of sphingomyelin in response to 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res* 1999; 40(1): 109-16.
- 46 Amako Y, Syed GH, Siddiqui A. Protein kinase D negatively regulates hepatitis C virus secretion through phosphorylation of oxysterol-binding protein and ceramide transfer protein. *J Biol Chem* 2011; 286(13): 11265-74.
- 47 Kumagai K, Kawano M, Shinkai-Ouchi F, Nishijima M, Hanada K. Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT. *J Biol Chem* 2007; 282(24): 17758-66.
- 48 Fugmann T, Hausser A, Schoffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* 2007; 178(1): 15-22.
- 49 Tomishige N, Kumagai K, Kusuda J, Nishijima M, Hanada K. Casein kinase I $\gamma$ 2 down-regulates trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin. *Mol Biol Cell* 2009; 20(1): 348-57.
- 50 Saito S, Matsui H, Kawano M, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K, *et al.* Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J Biol Chem* 2008; 283(10): 6584-93.
- 51 Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, *et al.* Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 2008; 82(16): 7964-76.
- 52 Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, *et al.* GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* 2009; 139(2): 337-51.
- 53 Schmitz KR, Liu J, Li S, Setty TG, Wood CS, Burd CG, *et al.* Golgi localization of glycosyltransferases requires a Vps74p oligomer. *Dev Cell* 2008; 14(4): 523-34.
- 54 Tu L, Tai WC, Chen L, Banfield DK. Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science* 2008; 321(5887): 404-7.
- 55 Matto M, Sklan EH, David N, Melamed-Book N, Casanova JE, Glenn JS, *et al.* Role for ADP ribosylation factor 1 in the regulation of hepatitis C virus replication. *J Virol* 2011; 85(2): 946-56.
- 56 Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, *et al.* Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 2005; 1(6): 333-7.
- 57 Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, *et al.* Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82(12): 5715-24.
- 58 Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, *et al.* Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol* 2010; 84(22): 11761-70.
- 59 Honda A, Matsuzaki Y. Cholesterol and chronic hepatitis C virus infection. *Hepato Res* 2011; 41(8): 697-710.
- 60 Shinitzky M, Inbar M. Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1976; 433(1): 133-49.
- 61 Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 2002; 277(20): 17377-80.
- 62 Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M Jr, *et al.* Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(14): 5848-53.
- 63 Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008; 82(5): 2120-9.
- 64 Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* 2007; 81(24): 13783-93.
- 65 Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol* 2009; 83(24): 12680-91.
- 66 Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, *et al.* Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 2008; 47(5): 1437-45.
- 67 Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M Jr. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 2009; 394(1): 99-108.
- 68 van Eck M, Hoekstra M, Out R, Bos IS, Kruijt JK, Hildebrand RB, *et al.* Scavenger receptor BI facilitates the metabolism of VLDL lipoproteins *in vivo*. *J Lipid Res* 2008; 49(1): 136-46.
- 69 Marzouk D, Sass J, Bakr I, El Hosseiny M, Abdel-Hamid M, Rekecewicz C, *et al.* Metabolic and cardiovascular risk profiles and

- hepatitis C virus infection in rural Egypt. *Gut* 2007; 56(8): 1105-10.
- 70 Miyazaki T, Honda A, Ikegami T, Saitoh Y, Hirayama T, Hara T, *et al.* Hepatitis C virus infection causes hypolipidemia regardless of hepatic damage or nutritional state: An epidemiological survey of a large Japanese cohort. *Hepatol Res* 2011; 41(6): 530-41.
- 71 Gopal K, Johnson TC, Gopal S, Walfish A, Bang CT, Suwandhi P, *et al.* Correlation between beta-lipoprotein levels and outcome of hepatitis C treatment. *Hepatology* 2006; 44(2): 335-40.
- 72 Martinez-Bauer E, Crespo J, Romero-Gomez M, Moreno-Otero R, Sola R, Tesei N, *et al.* Development and validation of two models for early prediction of response to therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43(1): 72-80.
- 73 Woodhouse SD, Narayan R, Latham S, Lee S, Antrobus R, Gangadharan B, *et al.* Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection *in vitro*. *Hepatology* 2010; 52(2): 443-53.
- 74 Nakamuta M, Yada R, Fujino T, Yada M, Higuchi N, Tanaka M, *et al.* Changes in the expression of cholesterol metabolism-associated genes in HCV-infected liver: A novel target for therapy? *Int J Mol Med* 2009; 24(6): 825-8.

## Interplay between PI4P and Hepatitis C Virus

Yang Guangbo, Hong Zhi, Zhang Leiliang\*

(*Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100176, China*)

**Abstract** Hepatitis C is caused by Hepatitis C virus (HCV), and has strong epidemicity all over the world. The HCV is mainly spread by drug injection, blood-to-blood contact or organ transplantation. In rare case, HCV is spread through blood dialysis and maternal-infant vertical infection. Upon HCV infection, few patients get acute infection, whereas most of the patients turn to chronic infection, and roughly one-third progress to liver cirrhosis in less than 20 years, some of whom will get cancer. In addition to liver lesions, HCV infection can also cause damage to other tissues and organs. Thus, exploring the underlying mechanism of HCV infection is particularly important. In recent years, an emerging role for host factors including lipids in HCV infection has been discovered. Here, we discussed the recent progress of the role of PI4P and its associated proteins in HCV life cycle. The biological function of sphingomyelin and cholesterol is also briefly summarized in this review.

**Key words** Hepatitis C virus; PI4P; PI4K; sphingomyelin; cholesterol

---

This work was supported by Grants from Intramural Research Program of the Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences (No.2011IPB108)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-67837355, E-mail: zhangll@ipbcams.ac.cn