

领域前沿 · 中国



王延轶, 中国科学院武汉病毒研究所研究员。国家杰出青年科学基金获得者, 国家重点研发计划项目首席科学家。主要从事病毒与宿主相互作用研究, 在*Mol Cell*、*Cell Host Microbe*、*Cell Res*、*PNAS*等期刊发表SCI论文近60篇。曾获中国青年女科学家奖、中国科学院杰出青年、中国免疫学青年学者奖等荣誉。

克里米亚-刚果出血热病毒受体LDLR的发现

徐智圣 王延轶*

(中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430207)

摘要 克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV)是一种布尼亚病毒目内罗病毒科正内罗病毒属、蜱虫传播的负链RNA病毒, 能引起严重的出血热, 病死率约为30%。目前临床上尚无针对CCHFV的疫苗和抗病毒药物, 因此, 各国普遍将CCHFV列为生物安全风险等级最高的病原之一, 世界卫生组织也连续多年将其列入优先研究病原名录。然而, 自1956年CCHFV被发现以来, 其受体一直未被鉴定。该研究团队根据CCHFV感染细胞的特点进行分析, 通过筛选发现低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)是CCHFV的一个入侵受体。该受体的发现, 对CCHFV感染致病机制的理解和防控策略的研发具有重要的科学意义和应用价值。

关键词 CCHFV; LDLR; 受体

Identification of LDLR as an Entry Receptor of CCHFV

XU Zhisheng, WANG Yanyi*

(State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430207, China)

Abstract CCHFV (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus), a member of the *Orthonairovirus* genus in the *Nairoviridae* family of the *Bunyvirales* order, is a tick-borne RNA virus that causes severe hemorrhagic disease in humans, with fatality rate around 30%. It has been shortlisted as a priority pathogen according to the WHO R&D Blueprint. So far, there is no effective antivirals or vaccines for CCHFV infection. For more than 60 years

国家重点研发计划(批准号: 2023YFC2306100、2022YFC2303302)、国家自然科学基金联合基金重点项目(批准号: U23A20168)、中国科学院战略性先导科技专项(批准号: XDB0490000、XDB29010302)和湖北省重大科技专项(批准号: 2022ACA005)资助的课题

*通信作者。Tel: 027-87998580, E-mail: wangyy@wh.iov.cn

This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No.2023YFC2306100, 2022YFC2303302), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.U23A20168), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB0490000, XDB29010302), and the Major S&T Projects of Hubei Province (Grant No.2022ACA005)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87998580, E-mail: wangyy@wh.iov.cn

since the discovery of CCHFV, the cellular entry receptor(s) have not yet been identified. In this study, WANG and colleagues have identified LDLR (low density lipoprotein receptor) as an entry receptor for CCHFV. This study will not only shed light on the mechanism of CCHFV infection, but also provide antiviral targets and potential therapeutic strategies against CCHFV.

Keywords CCHFV; LDLR; receptor

1 克里米亚-刚果出血热病毒

克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV)是一种蜱虫传播病毒,广泛分布在亚洲、非洲、欧洲等地区的30多个国家^[1]。CCHFV于1956年在刚果被首次发现,在1969年被确认为引起克里米亚-刚果出血热的病原体^[2]。在我国,CCHFV最早在新疆被发现,因此,该病毒在我国也被称为新疆出血热病毒^[3]。CCHFV感染可以引起出血热疾病,临床主要表现为头痛、发热、呕吐、出血、休克等症状,严重时可导致死亡,病死率约为30%^[4-5]。目前临床上尚无预防CCHFV的疫苗以及针对CCHFV的抗病毒药物,因此,CCHFV被很多国家列为生物安全风险等级最高的病原之一,也连续多年被世界卫生组织列入优先研究病原名录^[6]。

CCHFV是布尼亚病毒目(*Bunyavirales*)内罗病毒科(*Nairoviridae*)正内罗病毒属(*Orthonairovirus*)的成员,其病毒粒子呈球形,直径为80~100 nm。CCHFV的基因组为单股负链RNA,含有L、M和S三个片段,分别编码病毒RNA依赖的RNA聚合酶L蛋白、包膜糖蛋白前体(glycoprotein precursor, GPC)和核衣壳蛋白(nucleoprotein, NP)^[5,7]。病毒的NP蛋白能结合病毒基因组,与L蛋白组成核糖核蛋白复合体,参与病毒基因组的复制和病毒基因的转录。病毒的GPC在细胞的内质网和高尔基体上被合成,进一步被加工为病毒包膜蛋白Gn、Gc和其他一些非结构蛋白^[8-10]。Gn与Gc形成异源二聚体,构成病毒表面的刺突,介导病毒的入侵^[7]。

CCHFV具有较广的感染谱,在体外和体内可以感染多种细胞^[11]。CCHFV与未知的细胞受体结合后,以网格蛋白介导的内吞途径进入宿主细胞,随后被依次转运到早期内吞体(early endosomes, EEs)和多囊泡体内(multivesicular bodies, MVBs),并在MVBs内发生膜融合^[12-14]。在这个过程中,定位于EE上的小GTPase Rab5和内吞体分选转运复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)起重要

作用。此外,有研究发现Gc的单抗具有能够中和病毒感染的能力,提示Gc可能负责病毒与细胞受体的结合^[15-17]。然而,CCHFV的细胞受体一直未被发现。因此,鉴定CCHFV的入侵受体是目前亟待解决的关键科学问题。

2 LDLR是CCHFV入侵细胞的受体

鉴定CCHFV的受体是CCHFV研究领域的一个难点。此前有研究人员将体外表达的病毒包膜蛋白Gc和Gn与细胞裂解液进行孵育,通过免疫共沉淀实验和质谱技术鉴定出了可以与Gc互作的蛋白Nucleolin^[18],但目前仍不清楚Nucleolin在CCHFV感染过程是否发挥功能。此外,也有研究人员利用水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)假病毒包装系统构建出CCHFV假病毒,并发现DC-SIGN能够促进CCHFV假病毒的感染,提示DC-SIGN可能是一个潜在的CCHFV受体^[19]。然而,DC-SIGN在CCHFV活病毒感染过程中的功能,未被进一步确定。另外,考虑到CCHFV广泛的嗜性、DC-SIGN的特异性表达谱以及DC-SIGN可以非特异性结合病原微生物表面的糖链,DC-SIGN作为CCHFV的入侵受体还有待进一步验证。

我们团队前期尝试通过表达克隆的方法筛选CCHFV的受体。我们在细胞中过量表达膜蛋白cDNA克隆,利用基于VSV假病毒包装系统包装出来的能表达GFP的CCHFV假病毒(VSV-ΔG/GFP-GPC_{CCHFV})进行感染,以期筛选得到影响CCHFV入侵的候选蛋白或受体。遗憾的是,我们未能得到功能显著的候选分子。随后,我们检测了一些CCHFV的中和抗体对CCHFV假病毒和活病毒的中和效果,发现某些中和抗体对CCHFV假病毒和活病毒感染的抑制效果存在差异,提示CCHFV假病毒和活病毒的包膜蛋白的构象可能存在差异。这些结果促使我们利用CCHFV活病毒开展后续的研究。

在寻找受体的研究过程中,我们关注到CCHFV感染途径和特性。已有的研究报道,在极化的上皮

细胞如MDCK-1等细胞中,CCHFV主要是通过细胞基底部进行感染的^[20-21]。而有研究报道LDLR在MDCK-1细胞基底部的表达水平显著高于顶端部分^[22]。此外,VSV也被报道主要是从极化细胞的基底部进行感染^[23-24],而LDLR及其家族蛋白被鉴定为VSV的受体^[25]。这些前期的发现促使我们探究LDLR及其家族蛋白在CCHFV感染复制过程中的功能。我们建立LDLR及其家族蛋白敲除的细胞系,并利用CCHFV进行感染,结果发现,敲除*LDLR*和*LDLRAP1*可显著抑制CCHFV感染^[26]。LDLR是一个膜蛋白,主要介导胆固醇内吞;而*LDLRAP1*则主要在细胞质内,可以与LDLR的胞质区结合,促进LDLR的内吞。流式染色分析表明细胞膜上的LDLR表达水平与CCHFV的感染效率呈正相关。在人、猴子和小鼠来源的多种细胞中敲除*LDLR*均可以显著抑制CCHFV的感染,但对其他布尼亚病毒如RVFV、EBIV的感染没有影响。此外,在感染较差的DLD1细胞中过量表达LDLR则可以促进CCHFV的感染。这些结果表明,LDLR是CCHFV的一个关键宿主因子^[26]。

由于LDLR是一个膜蛋白,我们设想LDLR可能在病毒入侵过程中发挥功能。敲除*LDLR*可以抑制CCHFV的吸附和内化,而敲除*LDLRAP1*则只抑制病毒的内化。进一步的实验发现,靶向LDLR的阻断抗体和可溶性LDLR蛋白均能显著抑制CCHFV的感染。我们也发现LDL能显著抑制CCHFV的感染,这可能是因为LDL可以与LDLR结合,从而竞争性抑制了CCHFV与LDLR的结合。随后我们检测了LDLR是否可以与病毒直接相互作用。我们通过pull-down和ELISA实验发现,LDLR可以与CCHFV的病毒粒子直接结合。此外,我们也检测了LDLR是否与CCHFV的包膜蛋白Gc和Gn存在直接相互作用。Pull-down和BLI实验发现,LDLR可以与Gc以依赖Ca²⁺的方式直接相互作用,而且两者之间具有较高的亲和力。这些结果表明,LDLR通过与病毒包膜蛋白Gc相互作用,介导CCHFV入侵^[26]。

为了研究LDLR在CCHFV感染致病过程的功能,我们利用*LDLR*敲除小鼠,并建立小鼠感染模型。结果发现,敲除*LDLR*的小鼠在感染CCHFV后,体重下降,致死率、体内病毒滴度和组织病变程度均明显降低。此外,利用靶向LDLR的阻断抗体处理小鼠也能有效降低CCHFV复制能力,显著减少组织病变,

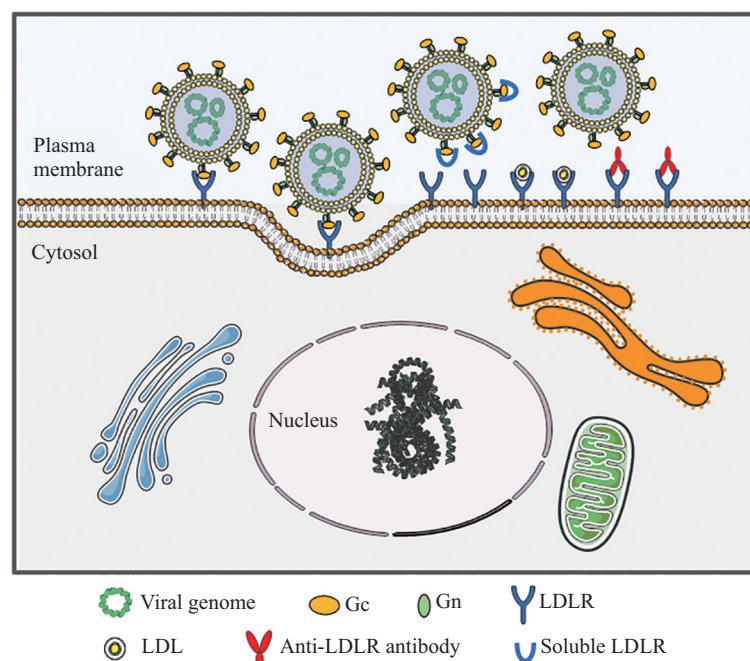
降低致死率。这些结果表明,LDLR在CCHFV感染致病过程中起重要作用^[26]。

3 意义和展望

受体是病毒入侵宿主的决定性因子,受体在组织细胞中的分布决定了病毒的嗜性。长期以来,人们一直不知道CCHFV的受体。我们通过敲除、抗体阻断、可溶性LDLR蛋白封闭等实验在体外和小鼠体内证明LDLR是CCHFV的一个受体(图1)。LDLR在人体组织中广泛表达,主要在肝脏、肺、脾脏、肾脏等组织中较高表达,这与CCHFV在人体组织中嗜性相一致。此外,LDLR在人、猴、小鼠、牛、羊、野兔等动物中非常保守。CCHFV的自然宿主蜱虫也具有LDLR的同源类似物VgR^[27],说明LDLR可能在CCHFV的跨物种传播中起重要作用。然而,我们也在实验中发现,在某些类型的细胞中敲除*LDLR*并不能完全抑制CCHFV的感染,说明CCHFV还存在其他的(共)受体或感染方式^[26]。这些科学问题还需要进一步研究。尽管如此,本研究发现LDLR作为CCHFV的关键受体,对CCHFV的感染至关重要。本研究将推动对CCHFV感染和致病机制的了解,同时也为CCHFV的防治提供了关键靶标和策略。

参考文献 (References)

- [1] BENTE D A, FORRESTER N L, WATTS D M, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity [J]. *Antiviral Res*, 2013, 100(1): 159-89.
- [2] ERGÖNÜL Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever [J]. *Lancet infect Dis*, 2006, 6(4): 203-14.
- [3] SUN S, DAI X, AISHAN M, et al. Epidemiology and phylogenetic analysis of crimean-congo hemorrhagic fever viruses in Xinjiang, China [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(8): 2536-43.
- [4] AKINCI E, BODUR H, LEBLEBICIOGLU H. Pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2013, 13(7): 429-37.
- [5] ZIVCEC M, SCHOLTE F E M, SPIROPOULOU C F, et al. Molecular insights into Crimean-Congo hemorrhagic fever virus [J]. *Viruses*, 2016, 8(4): 106.
- [6] MEHAND M S, AL-SHORBAJI F, MILLETT P, et al. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts [J]. *Antiviral Res*, 2018, 159: 63-7.
- [7] HAWMAN D W, FELDMANN H. Crimean-Congo haemorrhagic fever virus [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(7): 463-77.
- [8] VINCENT M J, SANCHEZ A J, ERICKSON B R, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1 [J]. *J Virol*, 2003, 77(16): 8640-9.



CCHFV的包膜蛋白Gc可以与LDLR结合,介导病毒通过内吞进入细胞。靶向LDLR的抗体、LDL和可溶性的LDLR蛋白可以分别与LDLR和病毒结合,抑制CCHFV的感染。

Binding between LDLR and the glycoprotein Gc of CCHFV leads to CCHFV entry into the cell. The anti-LDLR antibodies, LDL and soluble LDLR, which bind to LDLR or the virions respectively, inhibit CCHFV infection.

图1 LDLR是CCHFV的入侵受体(根据参考文献[26]修改)

Fig.1 LDLR is the entry receptor for CCHFV (modified from reference [26])

- [9] SANCHEZ A J, VINCENT M J, ERICKSON B R, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein [J]. *J Virol*, 2006, 80(1): 514-25.
- [10] BERGERON E, VINCENT M J, NICHOL S T. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein processing by the endoprotease SKI-1/S1P is critical for virus infectivity [J]. *J Virol*, 2007, 81(23): 13271-6.
- [11] DAI S Y, WU Q L, WU X L, et al. Differential cell line susceptibility to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus [J]. *Front Cell Infect Mi*, 2021, 11: 648077.
- [12] SIMON M, JOHANSSON C, MIRAZIMI A. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry and replication is clathrin-, pH- and cholesterol-dependent [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90: 210-5.
- [13] GARRISON A R, RADOSHITZKY S R, KOTA K P, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus utilizes a clathrin- and early endosome-dependent entry pathway [J]. *Virology*, 2013, 444(1/2): 45-54.
- [14] SHTANKO O, NIKITINA R A, ALTUNTAS C Z, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry into host cells occurs through the multivesicular body and requires ESCRT regulators [J]. *PLoS Path*, 2014, 10(9): e1004390.
- [15] BERTOLOTI-CIARLET A, SMITH J, STRECKER K, et al. Cellular localization and antigenic characterization of crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoproteins [J]. *J Virol*, 2005, 79(10): 6152-61.
- [16] FELS J M, MAURER D P, HERBERT A S, et al. Protective neutralizing antibodies from human survivors of Crimean-Congo hemorrhagic fever [J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3486-501, e21.
- [17] MISHRA A K, HELLERT J, FREITAS N, et al. Structural basis of synergistic neutralization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by human antibodies [J]. *Science*, 2022, 375(6576): 104-9.
- [18] XIAO X D, FENG Y, ZHU Z Y, et al. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2): 253-8.
- [19] SUDA Y, FUKUSHI S, TANI H, et al. Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system [J]. *Arch Virol*, 2016, 161: 1447-54.
- [20] CONNOLLY-ANDERSEN A M, MAGNUSSON K E, MIRAZIMI A. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells [J]. *J Virol*, 2007, 81(5): 2158-64.
- [21] MONTEIL V, SALATA C, APPELBERG S, et al. Hazara virus and Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus show a different pattern of entry in fully-polarized Caco-2 cell line [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(11): e0008863.
- [22] GAN Y, MCGRAW T E, RODRIGUEZ-BOULAN E. The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(8): 605-9.
- [23] FULLER S, VON BONSDORFF C H, SIMONS K. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK [J]. *Cell*, 1984, 38(1): 65-77.
- [24] MOREIRA E A, LOCHER S, KOLESNIKOVA L, et al. Synthetic

- ically derived bat influenza A-like viruses reveal a cell type- but not species-specific tropism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(45): 12797-802.
- [25] FINKELSHTEIN D, WERMAN A, NOVICK D, et al. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(18): 7306-11.
- [26] XU Z S, DU W T, WANG S Y, et al. LDLR is an entry receptor for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus [J]. *Cell Res*, 2024, 34(2): 140-50.
- [27] MITCHELL R D, 3RD, SONENSHINE D E, PEREZ DE LEON A A. Vitellogenin receptor as a target for tick control: a mini-review [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 618.