

网络出版时间:2022-1-20 15:44 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220119.1137.031.html>

◇综述◇

KSHV 信号膜蛋白 K15 的致病机制

王心琛¹, 桂思语², 华 珮³, 董凯旋³ 综述 王林定³ 审校

摘要 人类疱疹病毒-8(HHV-8)是卡波西肉瘤(KS)的致病因子,又被称为卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)。KSHV编码的信号膜蛋白K15通过与宿主细胞蛋白的相互作用激活多种细胞内信号通路,诱导血管生成和炎症反应。对K15蛋白的基本作用机制,包括其直接和间接介导的细胞信号通路的研究有助于深入了解K15蛋白在KS发病机制中的潜在作用,也对该病的靶向治疗有重要的参考价值。

关键词 卡波西肉瘤相关疱疹病毒;K15;发病机制;细胞信号通路

中图分类号 R 373.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)02-0333-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.033

卡波西肉瘤(Kaposis' sarcoma, KS)是一种罕见的内皮细胞系肿瘤,也是世界上最常见的艾滋病相关恶性肿瘤之一^[1]。KS是由卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposis' s sarcoma-associated herpesvirus, KSHV),又名人类疱疹病毒-8(human herpesvirus-8, HHV-8)引起的^[2]。HHV-8首次于KS组织中通过代表性差异分析法发现,也是艾滋病感染的判定依据之一^[3-4]。非洲和中东是KSHV流行率较高的地区,而美国和北欧的流行率相对较低,但传播途径尚未确定^[5]。KSHV基因组中的K15基因编码K15蛋白,该蛋白可显著诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和促炎性细胞因子

2021-08-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271837);安徽高校自然科学研究项目(编号:KJ2012A161);安徽省自然科学基金项目(编号:1708085MH193);安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划(编号:2019XKJT024);安徽省大学生创新创业训练计划项目(编号:S202010366109)

作者单位:安徽医科大学¹第二临床医学院,³微生物学教研室,合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

作者简介:王心琛,女,本科生;

王林定,男,博士,教授,责任作者,E-mail:wanglinding@ahmu.edu.cn

以及环氧酶(cyclooxygenase, COX)-2、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8等趋化因子的表达^[6]。目前KS的临床治疗仍面临巨大的挑战,而信号膜蛋白K15可能成为未来研究的重点。该文就K15蛋白的作用机制和研究进展做一综述。

1 概述

1.1 KS 异常的血管生成、炎症反应和细胞迁移是KS的重要病理特征。KS病变早期(斑块期)会出现血管壁裂缝,引起红细胞外渗进入周围组织产生水肿,伴随含铁血黄素沉积形成紫红色外观,同时含有中性粒细胞和B细胞的炎性浸润。疾病发展至后期(结节期),内皮细胞变异成梭形获得侵袭性并在血管缝处聚集^[6-7]。

1.2 KSHV 目前研究^[8]表明,不仅KS由KSHV感染引起,体腔性淋巴瘤(body cavity-based lymphoma, BCBL)、原发性渗出性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)和多中心性牧牛人病(multicentric castleman's disease, MCD)也与其有关。KSHV存在于已有KS病变的内皮细胞、PEL细胞、MCD的滤泡周围B细胞中,并常以潜伏期形式存在,病毒基因表达受限。KSHV拥有两种生命周期模式,即潜伏期和裂解性复制,其中KSHV裂解性复制有利于KS的发展。在KS和其他相关恶性肿瘤内皮细胞中,KSHV基因表达的病毒蛋白是强有力的信号分子,对于肿瘤的血管生成和炎症反应有重要意义^[9]。

1.3 K15 基因与蛋白 K15基因位于病毒基因组的末端,其初始转录物由8个交替拼接的外显子组成,表达KSHV基因组长独特编码区最右端的一个假定跨膜蛋白,即K15蛋白^[10]。

K15蛋白是一个包含最多12个跨膜结构域和1个羧基末端的信号受体,有若干高度保守的信号模体,包括2个SH2结合位点、1个富含脯氨酸的SH3结合位点和1个TRAF结合位点^[2]。既往的研究^[4,11-12]表明,K15蛋白通过其羧基末端结构域和其他胞内蛋白相互作用,激活转录因子激活蛋白-1

(AP-1) 和活化 T 细胞核因子 (NFAT), 从而进一步激活促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径、核因子 κB (nuclear factor kappa B, NF-κB) 以及 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路。

2 K15 蛋白作用机制

2.1 诱导血管新生 KS 早期病变的特征之一是有显著的血管生成。HHV-8 初始感染和潜伏感染内皮细胞过程中, K15 蛋白会靶向激活 VEGF 信号通路, 靶点有唐氏综合征关键区域 (down syndrome critical region, DSCR)-1 和 COX-2, 从而招募多种炎症和血管生成因子^[6, 13]。基质凝胶毛细管形成试验^[14]提示 KSHV 编码的 K15 蛋白通过招募 PLCγ1 以及酪氨酸磷酸化, 连续激活 VEGF 信号通路下游, 触发 NFAT 通路和上调 DSCR-1 的下游分子, 增强 KSHV 感染的原代内皮细胞的血管生成特性。

另外一方面, K15 介导的信号通路调节分泌细胞因子和炎性趋化因子, 如 IL-6、CCL2、CXCL3 和 CXCL8, 这些细胞因子都已被证实与 KS 发病机制有关, 具有促进血管生成活性^[13]。

2.2 慢性炎症微环境 与晚期触发炎症反应的经典癌症不同, 巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞和浆细胞的炎性浸润在 KS 早期 (斑块期) 已经非常丰富。细胞经 HIV 感染后生成的炎性细胞因子 (如干扰素 (interferon, IFN)-γ) 已被证实能够体外诱导 KSHV 溶解再活化和内皮细胞活化, 因此艾滋病患者的慢性炎症微环境可能有利于 KS 的发展^[6]。

2.2.1 NF-κB 信号通路的激活 NF-κB 是一种多效性功能诱导型转录因子, 通过调节细胞因子、生长因子和效应酶的表达参与细胞增殖分化、免疫反应、炎症以及肿瘤转化等生物过程。哺乳动物的 NF-κB 家族由 5 个成员组成, p50 和 p52 (I 类)、p65/RelA、c-Rel 和 RelB (II 类)。p50 和 p52 分别由 p105 和 p100 经蛋白酶水解加工后产生。而大多数细胞中的 NF-κB 因子通常是 p50/p65 异源二聚体^[15]。静息态细胞中核因子 κB 抑制蛋白 (inhibitor of NF-κB, IκB) 能够阻止 NF-κB 进入胞核, 而 NF-κB 激活后可诱导 IκB 蛋白的磷酸化, 并通过泛素 - 蛋白酶体途径将其快速降解。经典途径通常诱导 p50-p65 二聚体从 IκB 介导的储存库中释放, 替代途径则促进 p52-RelB 二聚体在细胞核中的积累^[16]。NF-κB 诱导激酶 (NF-κB inducing kinase, NIK) 可调节 p100

的磷酸化和水解, 使其形成 p52 后再转位入胞核。因此, NIK 的含量是激活该通路的关键步骤^[17], 正常情况下, NF-κB 诱导 NIK 保持较低水平。以前的研究^[11]表明 K15 蛋白可能是一个受泛素化调控且具有持续活性的 NF-κB 活化因子, 其与负性 NIK 的共表达会导致 NF-κB 反应启动子的激活减少, 可能有助于调节 KSHV 感染细胞中 NF-κB 介导的细胞炎症基因的表达。NF-κB 途径也已被证明在其他病毒诱导慢性炎症的过程中存在, 例如 HHV-4 潜伏膜蛋白 (latent membrane protein, LMP)1 以 NIK 依赖的方式激活 NF-κB 通路。

2.2.2 诱导炎症基因表达 K15 蛋白在 KSHV 潜伏感染的 B 细胞中能够激活炎症基因的表达, 如基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP-3 和 COX-2。其中 COX-2 是 KSHV 感染原代内皮细胞时诱导的强有力的炎症介质之一。K15 通过上调 COX-2 的表达可促进炎性细胞因子、趋化因子和生长因子的分泌, 介导炎性细胞的招募^[6, 10, 18]。

2.3 延长感染细胞寿命

2.3.1 下调 B 细胞受体信号 KSHV 与 EB 病毒同属 γ 疱疹病毒亚科, 二者 DNA 序列有高度同源性^[19]。与其他疱疹病毒一样, KSHV 主要在 B 细胞中建立潜伏感染^[13]。有研究^[12]显示 CD8 分子与 K15 胞质结构域融合的结合体在 Y⁴⁸¹EEV 模体的 Y⁴⁸¹位点产生磷酸化, 从而下调 B 细胞受体 (BCR) 信号转导, 抑制胞内钙动员和受感染 B 细胞凋亡, 延长病毒潜伏期。也有学者发现 EB 病毒基因组编码的蛋白 LMP2A 能够维持记忆 B 细胞的潜伏期, BCR 的下游效应子 (如 Lyn) 能够通过 SH2 结构域识别磷酸化的 LMP2A YEEA 模体^[20]。而 LMP2A 可以调节 Lyn 活性, 因此 LMP2A 是将抗原受体活化信号转化为钙动员和激活 MAPK 途径的关键因素^[21]。此外, 有研究^[4]显示在重组疱疹病毒的转基因小鼠中, K15 胞质区抑制 BCR 近端酪氨酸磷酸化, 进而阻断 Ca²⁺ 内流。K15 蛋白的拓扑结构与 LMP2A 类似, 因此可能激活某些相同的信号通路^[10]。

2.3.2 抗细胞凋亡 HS1 相关蛋白 X-1 (HS1-associated protein X-1, HAX-1) 是一种新型的细胞凋亡调节蛋白, 具有与凋亡调控基因 B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma, Bcl)-2 编码蛋白同源的结构域, 二者

可以在体内形成同源二聚体,二者可以在体内形成同源二聚体,阻断促凋亡蛋白 Bax 诱导的细胞凋亡,还拥有调节肌动蛋白细胞骨架运动的功能^[14-15]。K15 蛋白不仅与 HAX-1 相互作用,还可以诱导多种抗凋亡基因的表达,如 A20、Bcl-2A1,大大提高了细胞增殖,转移及生存能力,有助于延长 KSHV 感染细胞的存活时间^[13]。

Bcl-2 同源基因 *BHRF1* 和 *BALF1* 均于 EB 病毒感染潜伏期内高表达,且表达产物与 LMP2A 协同发挥抗凋亡作用^[4]。因此猜测 K15 蛋白可能也通过与类似抗凋亡蛋白的相互作用,对抗不同的促凋亡信号抑制细胞凋亡。

2.3.3 维持病毒潜伏期 转录因子 NF-κB 参与维持病毒潜伏期,也有抑制病毒裂解的作用。K15 蛋白最有可能通过其胞质结构域的 SH2 结合位点 YEEV 模体中的 Y⁴⁸¹ 以及 NIK 和 IκB 激酶复合体的膜近端氨基酸磷酸化,激活 IκB 激酶复合物,从而活化 NF-κB。因此 SH2 结合模体 YEEV 在延长病毒潜伏期中占据重要地位^[18]。

K15 基因属于典型的早期裂解基因,主要在病毒裂解周期中表达。但在潜伏期的 KSHV 阳性 PEL 细胞中也发现了该基因,诱导病毒进入裂解周期后其表达增加。因此可以猜测 K15 基因可能根据病毒处于潜伏期或裂解期适当调节表达量,通过转导促生存信号提高细胞活性^[13]。

2.4 促进细胞迁移和侵袭 肿瘤细胞的异常迁移会导致病灶转移,这是大多数癌症患者死亡的主要原因^[10]。在晚期 KS 病变中,KSHV 感染的内皮细胞失去正常形态变成纺锤形并获得侵袭特性^[14]。与其他疱疹病毒一样,大多数 KSHV 感染的细胞处于潜伏期,只有少部分潜伏感染的细胞自发性溶解再激活,将病毒传播至易感细胞,如 B 细胞和 T 细胞^[21]。此外,裂解感染的细胞合成的细胞因子一般以旁分泌方式促进病理性血管生成和潜伏感染细胞的侵袭^[14]。K15 蛋白会上调与细胞迁移有关的基因表达,诱导几种已知参与细胞运动的蛋白质的生成^[4]。实验研究^[10] 证明 K15 可以通过激活 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和 AP-1 提高原代人脐静脉内皮细胞的侵袭性。

2.4.1 K15 蛋白与 PLC γ1 的相互作用 K15 蛋白通过招募和激活细胞蛋白 PLCγ1 及其下游效应分子 βPIX、GIT1 和 cdc42,显著提高病毒潜伏期内皮

细胞的侵袭性。研究^[14] 已经证明 GIT1 与 βPIX 能够形成稳定的复合体并充当 PLCγ1 诱导的蛋白复合体,即 PLCγ1-GIT1-βPIX-cdc42 复合体的支架。PLCγ2 cSH2 结构域作为显性抑制物,能够以剂量依赖的方式抑制 K15 蛋白对于 PLCγ1 的招募和激活。K15 蛋白与 PLCγ1 相互作用是受感染内皮细胞获得侵袭性所必需的条件,发挥负调节作用的 PLCγ2 cSH2 结构域可能作为一个重要的治疗靶点。

2.4.2 K15P 与 K15M 的重要作用 K15 基因可分为 P、M 和 N 三种基因型,其中 K15P 与 K15M 有 33% 的氨基酸同源性,在功能上基本等效^[10]。已有研究^[4] 表明,K15P 通过诱导钙库操作性钙离子通道(store-operated calcium entry, SOCE) 的重要膜蛋白 Orail1 的形成参与 Ca²⁺ 信号转导,并促进细胞迁移。研究^[10] 表明 K15M 在 KSHV 阳性的 PEL 细胞中潜伏表达,通过其 SH2 结构域定位于细胞溶酶体膜,诱导细胞迁移和侵袭,同时提高 NF-κB 的活性。K15M 可能通过负调节 miR-21 和 miR-31 的胞内含量参与 KSHV 介导的肿瘤转移。K15M 是否通过调节溶酶体膜的通透性从而影响组织蛋白酶的释放还未得到实验证实,但这仍可能是一种治疗 KSHV 相关癌症的新方法。

3 展望

K15 可激活细胞的 Ras/MAPK 和 NF-κB 通路,并弱激活 JNK/SAPK 通路,上调细胞因子和趋化因子的表达,引起免疫和炎症效应。K15 蛋白招募并激活 PLCγ1,提高原代内皮细胞的血管生成活性,同时以 PLCγ1-GIT1-βPIX-cdc42 复合物的方式促进 KSHV 感染的内皮细胞迁移和侵袭,因此可以成为治疗 KS 的有效靶点。K15 蛋白与抗凋亡蛋白 HAX-1 之间的相互作用可以有效延长细胞寿命,也可成为治疗 KS 的突破点。大部分情况下 K15 蛋白通过羧基末端结合的模体与特定的宿主蛋白相互作用,促进病毒感染和扩散。对其致病机制的深入研究依据,可能为开发新型抗病毒和抗感染药物提供依据。

参考文献

- [1] Guihot A, Dupin N, Marcellin A G, et al. Low T cell responses to human herpesvirus 8 in patients with AIDS-related and classic Kaposi sarcoma[J]. Infect Dis, 2006, 194(8):1078-88.
- [2] 周畅,许常青,许方玮,等. KSHV K15P 及其突变体的慢病

- 毒包装与稳定细胞株的筛选及其对内皮细胞增殖迁移的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(11):1765–70.
- [3] Hosseinpour M C, Sweet K M, Xiong J, et al. Viral profiling identifies multiple subtypes of Kaposi's sarcoma[J]. *mBio*, 2014, 5(5):e01633–14.
- [4] Chen W, Xu C, Wang L, et al. K15 protein of Kaposi's sarcoma herpesviruses increases endothelial cell proliferation and migration through store-operated calcium entry[J]. *Viruses*, 2018, 10(6): 282.
- [5] Demba R N, Shaviya N, Aradi S M, et al. Selected genes of human herpesvirus-8 associated Kaposi's sarcoma among patients with human immunodeficiency virus-1 and acquired immunodeficiency disease syndrome[J]. *Pan Afr Med*, 2019, 32:215.
- [6] Abere B, Schulz T F. KSHV non-structural membrane proteins involved in the activation of intracellular signaling pathways and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 20:11–9.
- [7] Bala K, Bosco R, Gramolelli S, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus K15 protein contributes to virus-induced angiogenesis by recruiting PLCgamma1 and activating NFAT1-dependent RCAN1 expression[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(9):e1002927.
- [8] 方圆, 许常青, 周畅, 等. 甘肃省敦煌地区普通人群卡波肉瘤相关疱疹病毒感染的血清学分析[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(5):697–700.
- [9] Wang L, Brinkmann M M, Pietrek M, et al. Functional characterization of the M-type K15-encoded membrane protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Gen Virol*, 2007, 88(6): 1698–707.
- [10] Tsai Y H, Wu M F, Wu Y H, et al. The M type K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulates microRNA expression via its SH2-binding motif to induce cell migration and invasion[J]. *J Virol*, 2009, 83(2):622–32.
- [11] Hävemeier A, Gramolelli S, Pietrek M, et al. Activation of NF-κB by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 protein involves recruitment of the NF-κB-inducing kinase, IκB kinases, and phosphorylation of p65[J]. *J Virol*, 2014, 88(22):13161–72.
- [12] Brinkmann M M, Pietrek M, Dittrich-Breiholz O, et al. Modulation of host gene expression by the K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *J Virol*, 2007, 81(1):42–58.
- [13] Cousins E, Nicholas J. Molecular biology of human herpesvirus-8: novel functions and virus-host interactions implicated in viral pathogenesis and replication[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2014, 193:227–68.
- [14] Gramolelli S, Weidner-Glunde M, Abere B, et al. Inhibiting the recruitment of PLCgamma1 to Kaposi's sarcoma herpesvirus K15 protein reduces the invasiveness and angiogenesis of infected endothelial cells[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(8):e1005105.
- [15] Reale C, Zotti T, Scudiero I, et al. The NF-kappaB family of transcription factors and its role in thyroid physiology[J]. *Vitam Horm*, 2018, 106:195–210.
- [16] Brinkmann M M, Glenn M, Rainbow L, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein[J]. *J Virol*, 2003, 77(17):9346–58.
- [17] Cildir G, Low K C, Tergaonkar V. Noncanonical NF-kappaB signaling in health and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(5): 414–29.
- [18] Bonsignore L, Passelli K, Pelzer C, et al. A role for MALT1 activity in Kaposi's sarcoma-associated herpes virus latency and growth of primary effusion lymphoma[J]. *Leukemia*, 2017, 31(3):614–24.
- [19] Wong E L, Damania B. Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 gene[J]. *J Virol*, 2006, 80(3):1385–92.
- [20] Lim C S, Seet B T, Ingham R J, et al. The K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus recruits the endocytic regulator intersectin 2 through a selective SH3 domain interaction[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(35):9874–85.
- [21] Cho N H, Choi Y K, Choi J K. Multi-transmembrane protein K15 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus targets Lyn kinase in the membrane raft and induces NFAT/API activities[J]. *Exp Mol Med*, 2008, 40(5):565–73.