

一种新的乙型肝炎病毒表面抗原结合蛋白的筛选、 表达及其生物学活性的初步研究

陈媛媛, 朱乃硕*

(复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要 为了研究乙肝病毒侵染肝细胞过程中的功能蛋白,通过印迹免疫分析技术从人肝 cDNA 噬菌体表达库中筛选出一株编码乙肝表面抗原结合蛋白(hepatitis B surface antigen binding protein, HBsAg-BP)的 cDNA 克隆. 基因测序结果表明,该 cDNA 具有独立的开放阅读框架,编码 1 个由 344 个氨基酸残基构成的可溶性蛋白分子,属于免疫球蛋白超家族成员. 将该基因克隆到原核表达载体 pTriplEx 后,在 *E. coli* XL1-Blue 菌株中获得 44 kD 的重组蛋白. 重组蛋白经 Western 印迹和 ELISA 实验证明具有与乙肝表面抗原特异性结合的能力. 进一步经流式细胞仪实验显示,在纯化的重组蛋白存在的情况下,天然的 HBsAg 与肝细胞株 Hep G2 的亲合力显著增高. 结果显示,该乙肝表面抗原结合蛋白可能是介导乙肝病毒对肝细胞亲和侵染的可溶性辅助受体.

关键词 肝 cDNA 噬菌体表达文库,乙肝表面抗原,乙肝表面抗原结合蛋白

中图分类号 R512.62,Q78

Screening, Expression and characterization of a Novel Protein Binding to Hepatitis B Surface Antigen

CHEN Yuan-Yuan, ZHU Nai-Shuo*

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract In order to study the functional proteins involved in the process of hepatitis B virus invasion to hepatocytes, a cDNA clone coding a protein binding to hepatitis B surface antigen(HBsAg) was screened out from a human liver cDNA expression phage library by immunoscreening. DNA sequencing analysis showed that the cDNA had an open reading frame encoding 344 amino acid residues without transmembrane domain and belonged to immunoglobulin superfamily. This gene was inserted into expression vector pTriplEx and the recombinant fusion protein of 44 kD was purified from *E. coli* XL1-blue. The specific binding ability of the recombinant protein to HBsAg was verified by Western blotting and ELISA. Flow cytometry (FCM) analysis showed that purified recombinant protein could enhance the affinity of HBsAg to human hepatoma cells Hep G2. This finding suggested that hepatitis B surface antigen binding protein(HBsAg-BP) might be a soluble co-receptor mediating hepatitis B virus invasion to hepatocytes.

Key words liver cDNA phage expression library, hepatitis B surface antigen(HBsAg), hepatitis B surface antigen binding protein(HBsAg-BP)

乙型病毒性肝炎(hepatitis B, HB)是世界范围内流行的一种严重危害人类健康的疾病,全世界约有 3.5 亿乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者^[1]. 我国也是乙肝高流行区,约有 1.2 亿携带者^[2]. HBV 是嗜肝 DNA 病毒科的一种,它仅可感染人和黑猩猩,具有明显的组织嗜性和较严格的宿主特异性^[3].

现在普遍认为,HBV 外膜蛋白是识别人肝细胞

收稿日期:2004-03-12,接受日期:2004-05-10

国家自然科学基金(No. 30131160733)和香港 RGC 资助项目及复旦大学 Med-X 基金资助项目

*联系人 Tel:(021)65641215, E-mail:nzhu@fudan.edu.cn

Received: March 12, 2004; Accepted: May 10, 2004

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30131160733), RGC Program of Hong Kong and Med-X Foundation of Fudan University

* Corresponding author Tel:(021)65641215, E-mail:nzhu@fudan.edu.cn

质膜可能受体的重要分子^[4],它决定了 HBV 对宿主细胞的靶向和最初的侵染过程. 乙肝表面抗原 (HBsAg) 包括 3 种相关蛋白: 小蛋白 (S 蛋白), 中蛋白 (M 蛋白, pre-S2 + S), 大蛋白 (L 蛋白, pre-S1 + pre-S2 + S). 目前, 已从人肝脏细胞及肝癌细胞系 (如 HepG2 细胞) 中分离出多个与各病毒表面蛋白区域结合的蛋白组分, 包括 IgA 受体^[5], 涎糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR)^[6], 纤连蛋白 (fibronectin)^[7], 甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[8], HBV-BP (HBV binding protein)^[9], 膜联蛋白 (annexin)^[10], 载脂蛋白 H (apolipoprotein H)^[11] 等, 它们都是从细胞质膜中分离出的蛋白. 另外, hIL-6 (human interleukin 6) 中含有 pre-S1 的识别位点, 可以介导 HBV 和细胞间的相互作用, 有可能是病毒侵染的桥联分子^[12]; Budkowska^[13,14] 从正常人血清中分离出一种可溶性 HBV 结合因子 (HBV-BF), 可与 HBV pre-S1 和 pre-S2 作用, 是一种 50 kD 的糖蛋白, 从蛋白的免疫化学性质和与病毒包膜位点结合等情况来看, 它可能与病毒进入细胞有关. HBV-BF 不与其他物种的肝细胞膜及 HepG2 结合, 可能是膜成分的一个可溶性片段, 并与 HBV 受体介导的 HBV 对人肝细胞的吸附有关. 由于缺乏合适的感染系统, 关于肝细胞受体的研究还没有统一的说法, 至今尚无学术界公认的受体. 然而, HBV 病毒受体及其相应的侵染机制对于乙肝的病理研究、治疗及抗病毒药物的研制均具有重要的意义.

本实验利用从人的血浆中纯化得到的完整乙肝表面抗原 (包括 pre-S1, pre-S2, 和 S 区), 以此作为探针, 采用印迹免疫筛选的方法, 从人肝 cDNA 噬菌体表达库中筛选出一株编码乙肝表面抗原结合蛋白的 cDNA 克隆. 基因测序结果表明, 该 cDNA 具有独立的开放阅读框架, 由 344 个氨基酸残基构成, 没有典型的跨膜区域, 属于免疫球蛋白超家族成员, 暂命名为乙肝表面抗原结合蛋白 (hepatitis B surface antigen binding protein, HBsAg-BP). 将该目的基因片段克隆到原核表达载体 pTriplEx 后, 在 *E. coli* XL1-Blue 菌株中诱导表达, 获得重组 HBsAg-BP. Western 印迹和 ELISA 实验证明, HBsAg-BP 具有与乙肝表面抗原特异性结合的能力; 进一步流式细胞仪实验结果显示, 基因工程表达的 HBsAg-BP 可以显著增强肝癌细胞株 HepG2 对乙肝表面抗原的亲合力. 这与至今没有发现学术界公认的直接 HBV 受体现象相吻合, 可能是 HBV 侵染肝细胞的辅助受体, 对介导乙肝病毒的侵染具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肝 cDNA 噬菌体表达库购自 Clontech 公司 (CA, USA); 乙肝表面抗原 Hepatitis B surface Antigen (ay) 和 FITC 标记的兔抗 HBsAg 多克隆抗体均购自 Biotest 公司 (ME, USA); 碱性磷酸酶标记的驴抗兔 IgG 多抗购自 Rockland 公司 (PA, USA); 碱性磷酸酶显色底物 FAST BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet 购自 Sigma 公司 (MO, USA); 硝酸纤维素膜购自 S&S 公司 (Dassel, Germany); 限制性内切酶 *EcoR* 和 *Xba* 购自 Takara 公司 (大连, 中国); *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs 均购自申能博彩生物技术有限公司 (上海, 中国); 质粒抽提试剂盒和 IPTG、抗生素均购自上海生工生物工程公司 (上海, 中国); 细胞培养基 MEM 购自 Gibco 公司 (N. Y, USA), 胎牛血清购自杭州四季青公司 (杭州, 中国).

1.2 菌种和细胞株

E. coli XL1-Blue, BM25.8 购自 Clontech 公司; HepG2 细胞株购自中科院上海生化细胞所.

1.3 HBV 表面抗原高亲和性人肝 cDNA 克隆的筛选

将感染有人肝 cDNA 噬菌体的大肠杆菌 XL1-Blue 铺于 LB 平板上, 40~42 °C 倒置培养 4 h. 再用 10 mmol/L IPTG 预先处理过的硝酸纤维素膜覆盖于平板上, 37 °C 培养 3~5 h. 做好标记, 取下硝酸纤维素膜, 用 1% 明胶室温封闭 45 min 后, TBST (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 漂洗 3 遍; 置于稀释好的 HBsAg (0.7 μg/ml) 中温育 1 h, TBST 漂洗 3 次; 再置于异硫氰荧光素 FITC 标记的兔抗 HBsAg 抗体 (1:6000 稀释) 中温育 1 h, TBST 漂洗 3 次; 置于驴抗兔二抗 (1:6000 稀释) 中 1.5 h, TBST 漂洗 3 次; 最后经 BCIP/NBT 显色. 挑出阳性噬菌斑点, 选取经过 2 轮复筛后仍为阳性的克隆.

1.4 插入 cDNA 片段的鉴定及转化

挑取阳性噬菌斑放到 25 μl H₂O 中, 振荡, 取 5 μl 作为模板, 以文库试剂盒中提供的引物, 作 PCR 扩增, 判断插入 cDNA 片段的长度. 按照 Clontech 公司此 cDNA 文库的说明, 将阳性噬菌体中的 cDNA 从 TriplEx 载体重组到 pTriplEx 质粒中, 操作如下: 挑取 BM25.8 单菌落接种于 10 ml LB 培养基, 31 °C, 150 r/min 过夜培养, 直到 A₆₀₀ 达 1.1~1.4. 同时取一分分离好的阳性噬菌斑放到 350 μl 1 × lambda 稀释缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgSO₄ · 7H₂O, 35

mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.01% 白明胶)中,4 过夜.10 ml BM25.8 过夜培养物中加入 100 μ l 1 mol/L MgCl₂.将 200 μ l 过夜培养物与 150 μ l 裂解液混合,31 静止温育 30 min,加入 400 μ l LB 培养基,31, 225 r/min 培养 1 h,取 1~10 μ l 细胞悬液在 LB/carcenicillin 平板上涂板,37 培养至单菌落出现.挑取单菌落培养抽提质粒,经 *EcoR* 和 *Xba* (cDNA 的插入位点)双酶切后,初步确定片段大小,选取正确的重组子,命名为 pTrip- HBsAg-BP.

1.5 重组质粒 pTrip- HBsAg-BP 的测序及分析

重组质粒测序工作由上海博亚生物技术有限公司帮助完成,并在 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中以网络分析软件对测序结果进行 BLAST 比较分析及其表达框(ORF)分析.

1.6 重组蛋白 HBsAg-BP 的诱导表达

将重组质粒 pTrip- HBsAg-BP 转入大肠杆菌 XL1-Blue 中,选取正确的重组子于 5 ml LB 培养基中(含 Amp 100 μ g/ml),37 培养过夜.次日以 1:50 的接种量转接于 LB 培养基中(含 Amp 100 μ g/ml),240 r/min 培养至 A₆₀₀ 为 0.4~0.6 之间,加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续诱导培养 4 h 或 5 h,收集菌液.1 ml 菌液离心物加入 25 μ l 水悬浮,立刻再加入 25 μ l 2 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液振荡,沸水浴 5 min,12 000 g 离心 10 min,取 10 μ l 上清以 15% SDS-PAGE 检测诱导蛋白表达.

1.7 重组蛋白 HBsAg-BP 的纯化

按照上述 1.6 中的方法发酵含有重组质粒的 XL1-Blue,并进行初步纯化和电洗脱纯化.取 40 ml 诱导培养物,4 离心收集菌体.用 4 ml 预冷的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 悬浮,加入 40 μ l 10 mg/ml 溶菌酶,室温振荡 30 min.加入 200 μ l 10% Triton-X100 和 20 μ l 0.1 mol/L PMSF,37 静置 15 min.得到的裂解液经液氮冻融 1 次,超声波处理 1 min.取 1.5 ml 裂解样品,4,10 000 g 离心 10 min,分离可溶和不可溶组分.将可溶上清转到一新管,不可溶组分(包涵体)用 750 μ l 20 mmol/L Tris-HCl 重新悬浮沉淀,10 000 g 离心 5 min,除去上清,重复洗涤过程.用 1.5 ml 1% SDS 悬浮沉淀,剧烈混匀直至溶解.将包涵体和可溶上清液经 12% SDS-PAGE 分析,确认蛋白表达的部位为包涵体.参照 Walker^[15]的方法,用割胶电洗脱的方法纯化蛋白,PBS 缓冲液 4 透析过夜,期间更换透析液数次,PEG20000 浓缩到合适的体积,12% SDS-PAGE 验证,得到的蛋白样品经紫外分光光度计测定其浓度.

1.8 重组蛋白 HBsAg-BP 的免疫印迹分析

参照文献[16]的方法,将表达及空白菌株的全蛋白样品(样品上样量均为 15 μ l,预染 Marker 为 10 μ l)经 SDS-PAGE(=15%)后,转印至硝酸纤维素膜上,先后加入乙肝表面抗原(0.7 μ g/ml),FITC 标记的兔抗 HBsAg 多抗(1:6 000),碱性磷酸酶标记的驴抗兔多抗(1:5 000),每一步之间都用 TBST 洗涤 3 次,最后置于含 BCIP/NBT 的显色液中显色.

1.9 酶联免疫实验

以纯化的蛋白溶液预包被板(用量分别为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60、2.40 μ g),5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入稀释好的 HBsAg (250 ng/孔),37 温育 1.5 h,TBST 洗涤 3 次;加入 FITC 标记的兔抗 HBsAg 抗体(1:6 000),37 温育 1.5 h,TBST 洗涤 3 次;加入驴抗兔多抗(1:4 000),37 温育 1 h,TBST 洗涤 3 次;最后经 PNPP 底物显色 30 min,3 mol/L NaOH 终止反应,酶标仪 405 nm 波长读数.

1.10 重组蛋白 HBsAg-BP 增强肝细胞对 HBsAg 的特异性吸附的 FCM 实验

每管收获约 1 \times 10⁶ HepG2 细胞,PBS 洗涤 3 次,悬浮于 0.5 ml PBS 中,(A)为对照组 HepG2 细胞+0.5 μ g HBsAg+FITC 标记的兔抗 HBsAg 抗体(1:500);(B) HepG2 细胞+0.5 μ g HBsAg 和 0.5 μ g 纯化的重组蛋白 HBsAg-BP+FITC 标记的兔抗 HBsAg 抗体(1:500);(C) HepG2 细胞+0.5 μ g HBsAg 和 1.0 μ g 纯化的重组蛋白 HBsAg-BP+FITC 标记的兔抗 HBsAg 抗体(1:500).

当加入 0.5 μ g HBsAg 或额外加入纯化的重组蛋白后,室温温育 30 min,PBS 洗涤 2 遍,加入 0.5 ml FITC 标记的兔抗 HBsAg 抗体(1:500),室温避光 30 min,PBS 洗涤 2 遍,悬浮在 0.5 ml PBS 中,流式细胞仪检测.

2 结果

2.1 HBV 表面抗原高亲和性人肝 cDNA 克隆筛选

本实验中所使用的人肝 cDNA 噬菌体表达库的独立克隆数(independent clones)是 3 \times 10⁶,滴度为 4 \times 10⁸.印迹免疫筛选所用的探针是从人血浆中纯化得到的完整乙肝表面抗原(包括 pre-S1,pre-S2,和 S 区),与合成多肽及重组蛋白相比,具有更好的天然构象.本次实验筛选了 5 \times 10⁵ 个克隆,得到一个阳性克隆.经过 2 轮复筛重复实验结果,仍为阳性.

2.2 插入 cDNA 片段的鉴定及转化

用文库试剂盒中的测序引物,以阳性噬菌体作

为模板,扩增噬菌体中插入的 cDNA,获得了 1.4 kb 左右的片段(含有载体上的部分序列,见 Fig. 1). 按照该 cDNA 文库的使用说明,在大肠杆菌 BM25.8 细胞里通过 Cre 重组酶介导的 *loxP* 位点特异性的转化,使噬菌体的重组 Trip1Ex 中的 cDNA 转化到 pTrip1Ex 质粒中(Fig. 2). 转化克隆用 *EcoR* 和 *Xba* 进行双酶切验证,得到两个大小分别为 3.5 kb (pTrip1Ex 载体)和 1.2 kb (目的 cDNA)的酶切片段(Fig. 1),说明 cDNA 已转化到 pTrip1Ex 载体中,将重组质粒命名为 pTrip⁻ HBsAg-BP.

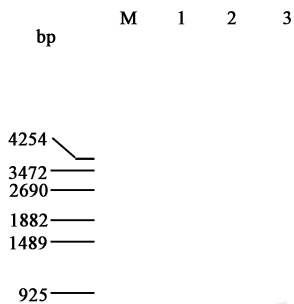


Fig. 1 PCR amplification of target cDNA and restriction analysis of recombinant pTrip1Ex

- M. DNA/*EcoT* 14I marker;
1. Recombinant plasmid;
2. Recombinant plasmid digested with *EcoR* and *Xba* ;
3. PCR product of positive phage

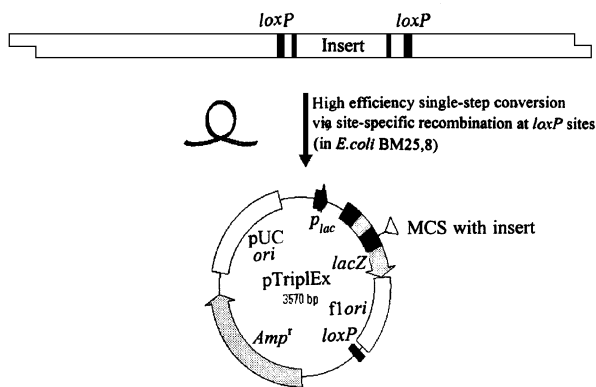


Fig. 2 Conversion of a recombinant Trip1Ex to pTrip1Ex

2.3 重组质粒(pTrip⁻ HBsAg-BP)的测序分析

测序结果显示,筛选到的 cDNA 大小为 1 226 bp,具有独立的开放阅读框架,表达产物含有 344 个氨基酸区域,理论推测分子量为 38 kD 左右,等电点 pI 为 8.0,没有典型的跨膜区域,认为是一可溶蛋白而不是膜蛋白(GenBank accession AY570731). 在

GenBank 中对氨基酸序列进行 BLAST 分析,发现属于免疫球蛋白超家族成员.

2.4 重组蛋白 HBsAg-BP 的诱导表达

理论上 pTrip1Ex 含有 3 个读码框,然而重组质粒 pTrip⁻ HBsAg-BP 只有第 3 种读框与该基因阅读框一致,能表达产生 44 kD 的融合蛋白. 将重组质粒 pTrip⁻ HBsAg-BP 质粒转入 XL1-Blue 菌株,经 1 mmol/L IPTG 诱导后提取全蛋白,经 15 % SDS-PAGE 检测,结果显示在 44 kD 处有特异条带(见 Fig. 3),与预测的蛋白分子量一致.



Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression product

- M. Protein molecular weight marker ;
1. XL1-blue control ;
2. XL1-Blue containing recombinant pTrip1Ex without IPTG induction ;
- 3, 4. XL1-blue containing recombinant pTrip1Ex induced by 1 mmol/L IPTG for 4 hours and 5 hours ,respectively

2.5 重组蛋白 HBsAg-BP 的纯化

初步纯化经 IPTG 诱导的重组菌株 XL1-Blue,裂解上清和包涵体进行 12 % SDS-PAGE,发现蛋白表达的部位为包涵体(Fig. 4). 通过割胶电洗脱的方法纯化 HBsAg-BP 蛋白,经 12 % SDS-PAGE 验证,得到 44kD 左右的单一条带(Fig. 5),蛋白样品经紫外分光光度计测定,浓度为 0.14 mg/ml.

2.6 目的蛋白的免疫印迹

将经 IPTG 诱导的重组菌株及空白菌株发酵,进行全蛋白 SDS-PAGE,转移膜以 HBsAg 与重组 HBsAg-BP 结合,进一步以 FITC 标记的抗 HBsAg 抗体和抗兔 IgG 二抗结合显色. 结果显示,有与预计分子量一致的特异性印迹条带出现(Fig. 6). 说明所表达的蛋白确实是目的基因产物,并具有高度的 HBsAg 亲和和特异性. 而且从 Western 印迹的结果来看,IPTG 的合适浓度为 1 mmol/L,诱导发酵的合适

时间为 4~5 h,超过 5 h 表达量会下降.

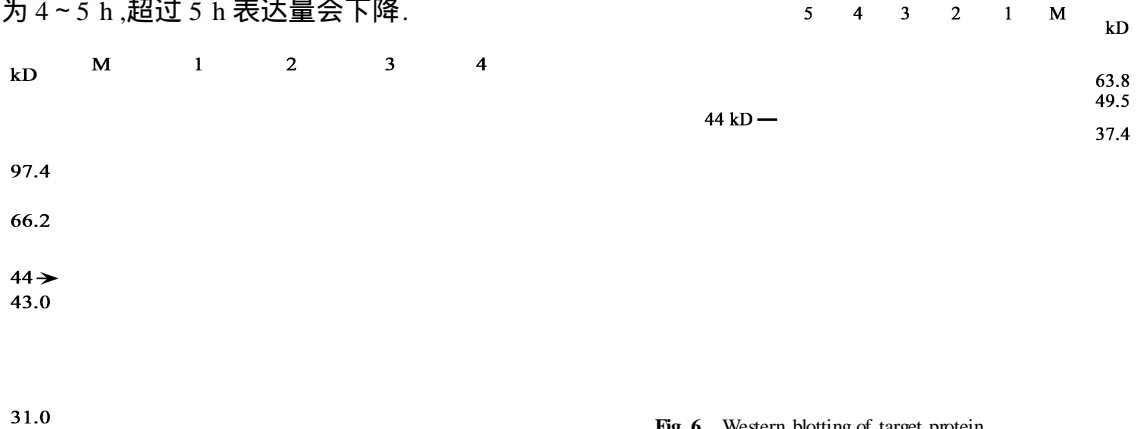


Fig. 4 Existence of target protein in inclusion body

M. Protein molecular weight marker;

- 1, 2. Inclusion body extracted from recombinant with IPTG induction;
- 3. Supernatant of recombinant with IPTG induction;
- 4. Inclusion body extracted from recombinant without IPTG induction

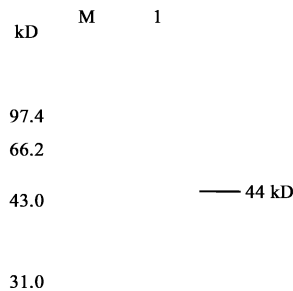


Fig. 5 Purified HBsAg-BP

M. Protein molecular weight marker;

- 1. Purified HBsAg-BP

2.7 酶联免疫实验

在酶标板上包被不同量的纯化重组 HBsAg-BP,用 HBsAg 来检测两者的结合能力,取 3 次酶联免疫实验的平均值,得到曲线如 Fig. 7 所示.结果显示,随着纯化蛋白包被量的增加, A_{405} 值也随之增大,说明重组 HBsAg-BP 与 HBsAg 具有亲和特异性.

2.8 重组 HBsAg-BP 影响肝细胞对 HBsAg 的特异性吸附的 FCM 实验

选用 Hep G2 肝癌细胞株作为实验对象,通过

Fig. 6 Western blotting of target protein

M. Prestained protein molecular weight ; 1. XL1-Blue ;

- 2,3. Recombinant induced for 6 hours by 10 and 1 mmol/L IPTG, respectively ;

- 4,5. Recombinant induced for 4.5 hours by 10 and 1 mmol/L IPTG, respectively

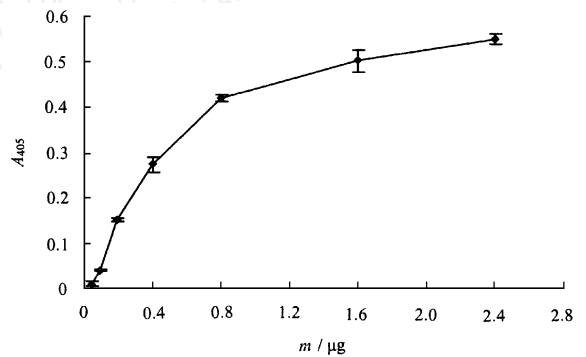


Fig. 7 ELISA analysis of purified recombinant HBsAg-BP and HBsAg

FCM 检测目的蛋白添加前后 HBsAg 对 Hep G2 的吸附能力,以只加入 HBsAg 的 A 管作为阴性对照.结果显示,加入纯化的重组 HBsAg-BP 0.5 和 1.0 μg 后的 B 管和 C 管, $M2$ 由 1.99 分别变为 4.28 和 8.04,说明吸附有 HBsAg 的 Hep G2 细胞所占比例显著增加(如 Fig. 8 所示).初步实验结果表明,重组 HBsAg-BP 可以促进 HBsAg 对肝细胞株 Hep G2 的吸附.

3 讨论

我们采用免疫筛选的方法,希望可以从人肝 cDNA 噬菌体表达库中筛选出与 HBsAg 相结合的蛋白.本研究中免疫筛选所用的探针为从人血清中纯化的乙肝表面蛋白(HBsAg),包括大蛋白,中蛋白和小蛋白,是抗原表位比较全面的分子.与多数受体研究所采用的合成多肽或重组蛋白相比,具有空间结

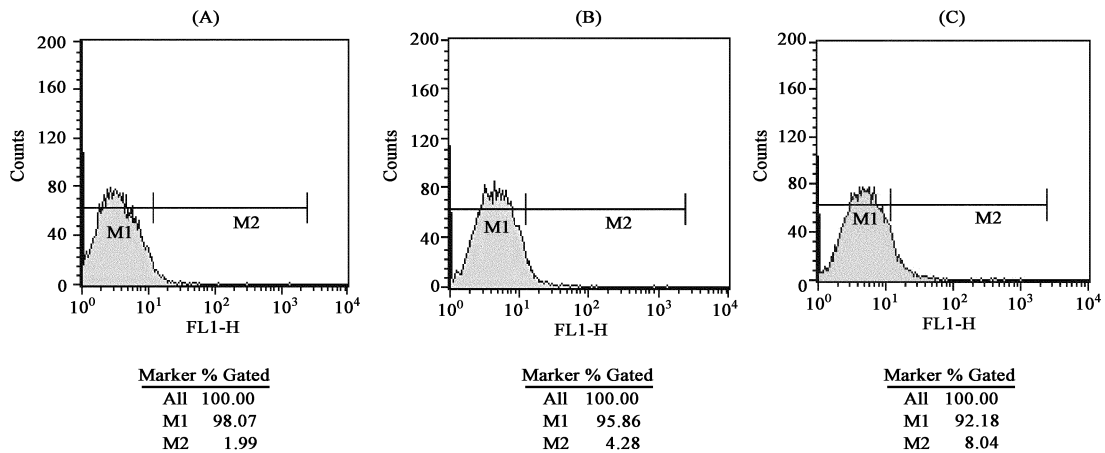


Fig. 8 FCM analysis of the effect of purified protein on the binding ability of HBsAg to HepG2 cells

(A) Control; (B) Purified protein 0.5 μg ; (C) Purified protein 1.0 μg .

M2: positive ratio; FL1-H: represents first channel's fluorescence intensity

构天然性,与受体的结合活性强等优点.另外,本实验中所使用的人肝 cDNA 表达库 Trip1Ex,可使每个重组子产生三种阅读框的多肽,保证了每个重组 Trip1Ex 的 cDNA 都可以表达具有正确读码框的蛋白或肽段.这样明显提高了筛选到含有目的 cDNA 的重组子的可能性.我们从 5×10^5 个噬菌斑中筛选到一株阳性克隆,测序结果表明,该 cDNA 大小为 1226 bp,具有独立的开放阅读框架,含有 344 个氨基酸残基,其表达产物属于免疫球蛋白超家族成员,没有典型的跨膜区,属可溶性蛋白.将该 cDNA 通过 Cre 重组酶介导的 loxP 位点的特异性转化构建到 pTrip1Ex 表达质粒上,并将该重组质粒转入 *E. coli* XL-Blue.经过 IPTG 诱导表达,得到了与预期大小一致的目的蛋白(44 kD).该蛋白在包涵体中大量表达,用电洗脱的方法纯化重组蛋白.经 Western 印迹和 ELISA 实验证明,重组 HBsAg-BP 与 HBsAg 具有特异性亲和作用.流式细胞仪实验结果显示,重组蛋白可以明显增强 HBsAg 对肝细胞的特异性吸附作用.因此,初步推测该蛋白可能在 HBV 对肝细胞的侵染过程中起作用,可能与 HBV 形成复合物,提高 HBV 与肝细胞受体的结合能力,促进 HBV 的膜运输过程,我们将此蛋白暂命名为乙肝表面抗原结合蛋白(HBsAg-BP).

病毒受体的研究对病理治疗非常重要,目前,许多病毒的受体都已研究清楚,如 HIV 的细胞表面受体 CD4 及细胞表面辅助受体(以细胞趋化因子受体 CCR5/CXCR4 为代表)^[17],脊髓灰质炎病毒的受体 hPVR (CD155)^[18],甲型肝炎病毒的受体 HAVcr-1^[19]

等.但对于 HBV 感染的早期过程一直没有定论,主要是因为缺乏合适的感染系统.长期以来,人们一直认为 HBV 的感染嗜性主要决定于宿主细胞上特异性表达的病毒受体,因此对 HBV 侵染肝细胞的研究大多集中在病毒受体的发现及其功能研究上,很少注意到可溶性的病毒亲和辅助受体.迄今为止,虽然关于 HBV 病毒受体的报道很多,但结果不一,至今未有公认而肯定的结论.而对 HBV 病毒受体的本质及对 HBV 感染周期的深入研究结果提示,可能存在其它因子在起作用,并可能涉及不同的病毒吸附蛋白或多个靶细胞受体^[20~22].其中有可能就是在肝细胞膜上或肝细胞附近存在某些分泌形式的蛋白,它们决定了宿主和组织特异性,然后利用某些通用受体而进入细胞,或者它们通过与 HBsAg 的作用使其改变构象,提高了病毒吸附到肝细胞膜上的能力,或为病毒与质膜融合,转运等后续步骤所必需.早期有人在研究中发现慢性 HBV 病人的肝脏存在膜联和(或)核定位免疫球蛋白 IgG^[23,24].近年来,有人在成年大鼠的肝脏质膜上分离出一新的 IgG 的 Fc 受体(FcRn),介导 IgG 从血浆到胆汁的胞吞转运用,并防止 IgG 的降解^[25,26].FcRn 是由 α_2 微球蛋白的轻链和类似 MHC-I 的重链组成的异源二聚体,在酸性 pH 下通过 Fc 与 IgG 结合^[27].此外,在人肝细胞株 HuH7 (HBV-negative),和 PLC/PRF/5 (HBV-positive,只产生 HBsAg)中,通过免疫电镜技术分析发现,外加的人 IgG 可以结合于肝细胞质膜上,并进入细胞,FcRn 与 IgG 的位置很相似,也存在于细胞膜和一些细胞内陷中^[28].我们在本研究中所筛选到的 HBsAg-

BP,属于免疫球蛋白超家族成员,与人的 IgG 同源性很高,它是否是作为病毒内化的桥梁分子,即一面与 HBV 结合,一面与肝细胞上的特定受体如 Fc 受体结合,使其经胞吞作用进入细胞,这有待于进一步的深入研究.由于我们发现的 HBsAg-BP 是从肝 cDNA 噬菌体表达库中筛选出的,与 HBsAg 具有特异性亲和作用,并且没有典型的跨膜区域,所以它极有可能是肝细胞分泌形式的活性蛋白.

关于 HBsAg-BP,有很多方面需要深入研究,如在人体的组织分布及特异性,与 HBV 结合后在人体特异细胞尤其是在肝细胞上的受体性质和定位研究.目前我们正在对 HBsAg-BP 的人群携带状态,包括正常人和慢性乙肝病人中的血清含量及基因多态性进行比较研究,这将有助于进一步了解 HBsAg-BP 的生理功能及在 HBV 感染中的意义.我们相信,该蛋白的发现,为研究 HBV 对肝细胞的侵染过程以及肝导向治疗提供了一个新的途径.

参考文献 (References)

- World Health Organization. *The World Health Report*. Geneva: WHO, 1998
- Parkin D M, Pisani P, Muñoz N, Ferlay J. The global health burden of infection associated cancers. *Cancer Surv*, 1999, **33**:5~33
- Ganem D, Varmus H E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**:651~693
- Seeger C, Mason W S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64**(1):51~68
- Pontisso P, Ruvoletto M G, Tiribelli C, Gerlich WH, Ruol A, Alberti A. The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol*, 1992, **73**:2041~2045
- Eisenberg C, Seta N, Appel M. Asialoglycoprotein receptor in human isolated hepatocytes from normal liver and its apparent increase in liver with histological alterations. *J Hepatol*, 1991, **13**(3):305~309
- Budkowska A, Bedossa P, Groh F, Louise A, Pillot J. Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J Virol*, 1995, **69**(2):840~848
- Zang W Q, Fieno A M, Grant R A. Identification of glycerol dehydro-3-phosphated hydrogen as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus post transcriptional regulatory element. *Virology*, 1998, **248**(1):46~52
- De Falco S, Ruvoletto MG, Verdoliva A, Ruvo M, Raucchi A, Marino M, Senatore S, Cassani G, Alberti A, Pontisso P, Fassina G. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from Hep C2 cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39):36613~36623
- Hertogs K, Leeders W P, Depla E. Endonexin II, present on human liver plasma membranes is specific binding protein of small hepatitis B virus envelope protein. *Virology*, 1993, **197**(2):546~557
- De Bruin W C, Hertogs K, Leeders W P, Depla E, Yap S H. Hepatitis B virus: specific binding and internalization of small HBsAg by human hepatocytes. *J Gen Virol*, 1995, **76**(4):1047~1050
- Heinz D, Peters M, Prange R, Gerken G, Rose-John S. Possible role of human interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*, 2001, **8**(3):186~193
- Budkowska A, Quan C, Groh F, Bedossa P, Dubreuil P, Bouvet J P, Pillot J. Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor. *J Virol*, 1993, **67**(7):4316~4322
- Budkowska A, Maillard P, Theret N, Groh F, Possehl C, Topilko A, Crainic R. Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte. *Virology*, 1997, **237**(1):10~22
- Walker J M. *The Protein Protocols Handbook* [M], New Jersey: Humana Press Inc Totowa, 1998:207~213
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989:18.64~18.75
- Zheng B J, Zhao X Y, Zhu N S, Chan C P, Wong K H, Chan K C, Yam W C, Yuen K Y, Lee S S. Polymorphisms of CCR5 gene in a southern Chinese population and their effects on disease progression in HIV infections. *AIDS*, 2002, **16**(18):2480~2482
- Bernhardt G, Bibb J A, Bradley J, Wimmer E. Molecular characterization of the cellular receptor for poliovirus. *Virology*, 1994, **199**:103~110
- Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone S M. Identification of a surface protein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J*, 1996, **15**:4282~4296
- DeMyer S, Gong Z J, Suwandhi W. Organ and species specificity of hepatitis B virus infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat*, 1997, **4**(3):145~153
- Schneider-Schallies J. Cellular receptor for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*, 2000, **81**(6):1413~1429
- 金奇等主编. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社 (Jin Qi ed. *Molecular Virology of Medicine*. Beijing: Science Press), 2001. 29~45
- Meliconi R, Stancari M V, Caragnani M, Baraldini M, Stefanini G F, Miglio F, Gasbarrini G. Hepatocyte membrane-bound IgG and circulating liver-specific autoantibodies in chronic liver disease: relation to hepatitis B virus serum markers and liver histology. *Hepatology*, 1983, **3**:155~161
- Naumov N V, Mondelli M, Alexander R, Tedder R S, Eddleston A L, Williams R. Relationship between expression of hepatitis B virus antigens in isolated hepatocytes and autologous lymphocyte toxicity in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 1984, **4**:63~68
- Blumberg R S, Koss T, Story C M, Barisani D, Polischuk J, Lipin A, Pablo L, Green R, Simister N E. A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes. *J Clin Invest*, 1995, **95**:2397~2402
- Junghans R P, Anderson C L. The protection receptor for IgG

catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 ,**93** :5512 ~ 5516

27 Chetie V, Ward E S. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol* ,2000 ,**18** : 739 ~ 766

28 Schilling R, Ijaz S, Davidoff M, Lee J Y, Locarnini S, Williams R, Naoumov N V. Endocytosis of hepatitis B immune globulin into hepatocytes inhibits the secretion of hepatitis B virus surface antigen and virions. *J Virol* ,2003 ,**77** :8882 ~ 8892

《中国生物化学与分子生物学报》第五届编辑委员会名单
The Fifth Editorial Board of Chinese Journal of Biochemistry
and Molecular Biology

顾问 (Advisors)

郑集 ZHENG Ji 张昌颖 ZHANG Chang Ying 邹承鲁 ZOU Cheng-Lu (Cherr-lu TSOU)

主编 (Editor-in-Chief)

贾弘禔 JIA Hong-Ti

副主编 (Associate Editors-in-Chief)

昌增益 CHANG Zeng-Yi 李林 LI Lin 尚永丰 SHANG Yong-Feng
 孙志贤 SUN Zhi-Xian 王琳芳 WANG Lin-Fang 王志珍 WANG Zhi-Zhen
 杨福愉 YANG Fu-Yu 查锡良 ZHA Xi-Liang

编委 (Members of the Board, alphabetically)

昌增益 CHANG Zeng-Yi	陈清西 CHEN Qing-Xi	耿运琪 GENG Yun-Qi
顾军 GU Jun	杭海英 HANG Hai-Ying	赫荣乔 HE Rong-Qiao
黄力 HUANG Li	贾弘禔 JIA Hong-Ti	蒋澄宇 JIANG Cheng-Yu
焦炳华 JIAO Bing-Hua	柯扬 KE Yang	金由辛 JIN You-Xin
李伯良 LI Bo-Liang	李刚 LI Gang	李根喜 LI Gen-Xi
李桂源 LI Gui-Yuan	李林 LI Lin	李宁 LI Ning
李载平 LI Zai-Ping	梁爱华 LIANG Ai-Hua	梁宋平 LIANG Song-Ping
林其谁 LIN Qi-Shui	刘德富 LIU De-Fu	刘德培 LIU De-Pei
刘国琴 LIU Guo-Qin	刘进元 LIU Jin-yuan	缪时英 MIAO Shi-Ying
彭景禔 PENG Jing-Pian	钱关祥 QIAN Guan-Xiang	强伯勤 QIANG Bo-Qin
屈良鹄 QU Liang-Hu	饶子和 RAO Zi-He	施蕴渝 SHI Yun-Yu
阮康成 RUAN Kang-Cheng	尚永丰 SHANG Yong-Feng	寿成超 SHOU Cheng-Chao
孙志贤 SUN Zhi-Xian	王嘉玺 WANG Jia-Xi	王琳芳 WANG Lin-Fang
王志珍 WANG Zhi-Zhen	魏群 WEI Qun	温进坤 WEN Jin-Kun
许根俊 XU Gen-Jun	杨福愉 YANG Fu-Yu	杨克恭 YANG Ke-Gong
杨晓明 YANG Xiao-Ming	药立波 YAO Li-Bo	姚仁杰 YAO Ren-Jie
叶棋浓 YE Qi-Nong	袁勤生 YUAN Qin-Sheng	查锡良 ZHA Xi-Liang
张今 ZHANG Jin	张葆衡 ZHANG Bao-Heng	张旭家 ZHANG Xu-Jia
张翼 ZHANG Yi	周春燕 ZHOU Chun-Yan	周海梦 ZHOU Hai-Meng
周筠梅 ZHOU Jun-Mei	朱大海 ZHU Da-Hai	朱卫国 ZHU Wei-Guo
朱玉贤 ZHU Yu-Xian		

特邀编委 (Specially Invited Members of the Board)

吴瑞 Ray WU (USA) 于宽仁 Robert K. YU (USA)