

鳞片状细胞癌抗原I与乙型肝炎病毒的结合受反应位点环域疏水性的影响 Hydrophobicity of Reactive Site Loop of SCCA1 Affects its Binding to HBV

陈 敏, 程 通, 许辰煜, 吴 婷, 欧山海, 张 涛, 张 军, 夏宁邵*

CHEN Min, CHENG Tong, XU Chen-Yu, WU Ting, OU Shan-Hai, ZHANG Tao, ZHANG Jun and XIA Ning-Shao*

厦门大学 福建省医学分子病毒学研究中心, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005

Fujian Research Center of Medical Molecular Virology, The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 鳞片状细胞癌抗原 I (SCCA1) 是丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 超家族的成员, 具有多种变体。有报道其中的两种 (BP 和 AJ515706) 能通过乙型肝炎病毒 (HBV) 的前 S1 抗原促进表达 SCCA1 的细胞与 HBV 的结合。本研究从 HepG2 细胞中扩增出的一株 SCCA1 (A1) 却不具备 HBV 结合能力。将 A1 的 C 末端与 BP 的 C 末端互换, 获得的 A1-BP 能够结合 HBV, 而 BP-A1 却不能。A1 与 BP 的 C 末端仅有 3 个氨基酸的差异, 其中 2 个位于反应位点环域。一级结构分析发现在该区域内, A1 的疏水性较弱, 而 BP 和 AJ515706 的疏水性较强。将 A1 的 aa349 位的弱疏水性的谷氨酸突变为强疏水性的缬氨酸, 则可获得 HBV 结合能力。反之, 将 BP 同一位点的缬氨酸突变为谷氨酸, 则会丧失 HBV 结合能力。这些结果提示 SCCA1 与 HBV 的结合受反应位点环域的疏水性的影响。

关键词 乙型肝炎病毒, 鳞片状细胞癌抗原 I, 前 S1 抗原

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0052-06

Abstract Squamous cell carcinoma antigen 1 (SCCA1), a member of the ovalbumin family of serine protease inhibitors, includes several variants. It was reported that expression of two SCCA1 (BP and AJ515706) in cells results in increased binding of HBV to these cells by the interaction of the expressed BP and AJ515706 with HBV pre-S1 domain. In this study, a SCCA1 (A1) was isolated from HepG2, but it appears to lack this ability. A possible role of two mutants, A1-BP and BP-A1, constructed by interchanging the carboxyl terminal of A1 and BP, was investigated. Cells expressing A1-BP rather than BP-A1 showed an increased virus binding capacity. Comparison of A1 sequence with the sequence of BP indicated the presence of only three amino acid changes in the carboxyl terminal, two of them in the reactive site loop (RSL) of SCCA1. Primary structure analysis revealed that the hydrophobicity of BP and AJ515706 in this domain is higher than that of A1. Changing the aa349 of A1 from low hydrophobic glutamic acid to high hydrophobic valine enhanced HBV binding. In contrast, changing the aa349 of BP from valine to glutamic acid reduced HBV binding. Our finding suggests that the hydrophobicity of RSL of SCCA1 may play an important role in HBV binding to cells.

Key words HBV, SCCA1, pre-S1

Received: May 9, 2004; Accepted: July 12, 2004.

This work was supported by Grant from Excellent Scholar Incubation Plan of the Ministry of Education, China (2002).

* Corresponding author. Tel: 86-592-2184110; E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

教育部跨世纪优秀人才培养计划(2002).

乙型肝炎病毒(HBV)仅能够感染人类或高等灵长类动物,并且具有很强的肝细胞嗜性。这种高度的宿主和组织嗜性以及迄今可复制的 HBV 感染细胞模型的缺乏极大地阻碍了 HBV 受体的鉴定。虽然曾报道过众多可能的 HBV 受体,如 IgA 受体、白介素-6 受体、Annexin V 等等,但研究结果之间常不一致,迄今均没有有说服力的证据证实这些蛋白在 HBV 感染机制中所起的作用^[1]。目前比较公认的是,HBV 大蛋白(L)上的前 S1(preS1)区域对于 HBV 的细胞粘附以及随后的病毒感染起到重要的作用,因为 preS1 合成肽(aa21-47)和相应的抗体能够抑制病毒与 HepG2 细胞的结合^[2-4]。2001 年 De Falco 等^[5]用 preS1 合成肽(aa21-47)从 HepG2 细胞膜上分离到一个特异结合蛋白,命名为 HBV 结合蛋白(HBV-BP)。转染 BP 基因的 HepG2 细胞以及中国仓鼠卵巢细胞(CHO)与 HBV 的结合能力均有明显提高,提示 BP 可能是作用于 preS1 的 HBV 受体之一。BP 长 390aa,与 Suminami 等^[6]报道的丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)超家族的鳞片状细胞癌抗原 I(SCCA1)仅有 aa351、aa357 和 aa389 三个氨基酸的差异,也属于 SCCA1 成员之一。已报道的 Serpin 家族有 100 多种蛋白,结构保守,广泛分布在病毒、植物、脊椎动物和无脊椎动物中,具有多种生物学功能^[7]。De Falco 等^[5]在从 HepG2 细胞中分离 BP 基因时,得到的 12 个克隆中除了 4 个 BP 基因外,还有 4 个 SCCA1 基因以及 4 个 SCCA2 基因,后者是与 SCCA1 氨基酸同源性达 91% 的另一个 serpin 家族成员。Moore 等^[8]从 HepG2 细胞中分离出另一个 SCCA1 基因,与 BP 有 4 个氨基酸的差异,转染该基因同样可促进病毒与细胞的结合。但迄今一直没有 SCCA2 是否具有与 BP 类似的作用的研究报道。为了解哺乳动物细胞结合 HBV 过程中,SCCA2 分子是否也发挥作用,是否其他类型的 SCCA1 分子也可促进 HBV 的结合,并探讨 SCCA1 分子与 HBV 结合的可能结构基础,本研究构建了带有 SCCA1、SCCA2 和 BP 及其突变体的重组昆虫杆状病毒,利用其感染哺乳动物细胞系,观察感染后的细胞对 HBV 的结合能力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和质粒: *E. coli* DH5α 由本实验室保存, *E. coli* DH10Bac、Sf9 昆虫细胞株、pFastBac1、pFastBacDual 购自 Invitrogen 公司。pEGFP 购自 Clontech 公司, pcDNA3.1(+) 为 Invitrogen 公司产品。T

载体 pMD18-T 购自大连宝生物公司。细胞株购自 ATCC。

1.1.2 实验试剂:限制酶、连接酶均购自大连宝生物公司。引物合成、基因测序由上海博亚公司完成。Grace 培养基、乳白蛋白水解物、DMEM、MEM 培养基购自 Invitrogen 公司。IPTG、X-gal 购自 Sigma 公司。脂质体 Cellfectin 购自 Invitrogen 公司。细胞培养用胎牛血清购自 HyClone 公司。HBV 荧光 PCR 检测试剂盒购自厦门新创公司。HBV Dane's 颗粒购自北京生物制品研究所(10¹¹ copies/mL)。TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 SCCA1、SCCA2、BP 基因的克隆:根据 BP 基因序列合成引物(表 1)。用 TRIzol 提取 HepG2 细胞的总 RNA, BP2 为引物进行特异性反转录获得 cDNA,再通过巢式 PCR 扩增目标基因(外引物为 BP₁、BP2,内引物为 BP₃、BP4),发现在 PCR 复性温度为 50~58℃ 的范围内均可扩增出符合目的基因大小的片段(PCR 反应条件为:94℃ 50s, 50~58℃ 50s, 72℃ 1min, 25 个循环; 72℃ 延伸 10min)。分别回收不同复性温度下与目的基因长度相符的 PCR 扩增产物片段用华舜公司的胶回收试剂回收后进行克隆测序。测序结果在 GenBank 中进行序列比较分析。在复性温度为 56℃ 下所获得的 PCR 产物为 SCCA1 基因(A1, GenBank 号 AY245781);复性温度为 52℃ 下获得的 PCR 产物为 SCCA2 基因(A2, GenBank 号 AY245782)。经序列比对发现 A1 基因与 BP 基因仅有 5 个氨基酸的差异(aa185、aa202、aa349、aa351 和 aa389)。对 A1 基因进行 PCR 定点突变,进一步获得了与文献[5]完全一致的完整 BP 基因。

表 1 引物的名称及序列
Table 1 Sequences of the primers

Primer	Sequence
BP1	5'-CAC AGG AGT TCC AGA TCA CAT CGA G-3'
BP2	5'-CTG GAA GAA AAA GTA CAT TTA TAT GTG GGC-3'
BP3	5'-CCG CTA GCT CAC CAT GAA TTC ACT CAG-3'
BP4	5'-CCG TCG ACT CTA CGG GGA TGA GAA TCT-3'
BPf	5'-GGA TCC ATG AAT TCA CTC AGT G-3'
BPr	5'-CTC GAG CTA CGG GGG TGA GAA TC-3'
EGf1	5'-GAT ATC ATG GTG AGC AAG GGC G-3'
EGf2	5'-GTC GAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C-3'

1.2.2 pFB-A1、pFB-A2、pFB-BP、pFB-EGFP 的构建: 获得目的基因 A1、A2 和 BP 后,分别再用引物 BP_F、BP_R(序列见表 1)进行 PCR 扩增;获得的片段克隆至杆状病毒载体 pFastBac1,构建转移质粒 pFB-A1、pFB-A2、pFB-BP(图 1)。以 Egf1、Eg2 为引物(序列见表 1)从 pEGFP 中扩增 EGFP 基因;利用杆状病毒载体 pFastBacDual,构建转移质粒 pFBD-EGFP(图 1)。测序证实插入基因未发生突变。

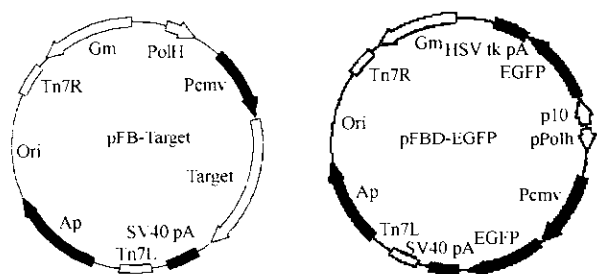


图 1 杆状病毒载体 pFB-Target(Target 分别为 A1、A2 或 BP)和 pFBD-EGFP

Fig.1 Map of pFB-Target (target is A1, A2 or BP gene respectively) and pFBD-EGFP

1.2.3 构建重组杆状病毒^[9]:获得嵌入了目的片段的转移质粒后,将转移质粒转化 CaCl₂ 致敏的 *E. coli* DH10Bac感受态细胞。该细胞含有穿梭质粒 bacmid 和辅助质粒。通过涂布含 X-gal、IPTG、庆大霉素、卡那霉素和四环素的 LB 平板筛选白色菌落,挑入含 3 种同样抗生素的液体 LB 培养基,碱法小量提取重组病毒 DNA (bacmid)。在 bacmid 的 LacZ 基因上下游有 M13 引物互补序列,以 M13 引物 PCR 扩增(94℃ 50s, 55℃ 50s, 72℃ 3min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min),所得的片段大小用于确证是否发生转座。

重组 bacmid 分别用 Cellfectin 转染对数生长前期的 Sf9 细胞获得重组杆状病毒 BacA1、BacA2、BacBP 和 BacEGFP。经过进一步培养扩增后收集含有重组杆状病毒的 Sf9 细胞培养上清,用空斑实验鉴定所收集上清中病毒滴度。

1.2.4 昆虫细胞的培养、转染及感染:提取好的 bacmid 用转染试剂 Cellfectin 转染对数生长前期的 Sf9 细胞,4 天后收集培养上清后再对新的 Sf9 细胞进行二次感染,以获得病毒滴度更高的培养上清。

1.2.5 病毒的收集及效价的检测:Sf9 细胞以 80% 覆盖率铺于 6 孔板中,置 28℃ 培养 1d,将收集的重组杆状病毒以 10 倍梯度稀释后接种 Sf9 细胞,感染 1h 后加入 2mL 用 Grace 配制的低熔点琼脂糖(0.8%),置 28℃ 培养 5d,用中性红染色后计算空斑

数量。本实验在感染后第 4 天收集含病毒培养上清,用空斑实验鉴定病毒的滴度(PFU,空斑形成单位)。

1.2.6 重组杆状病毒对哺乳动物细胞的基因转移:哺乳动物细胞培养于 24 孔培养板,每孔细胞数量约为 5×10^4 。37℃ 培养 12h 后弃去原培养基,加入 500μL 已收集的含重组杆状病毒的 Sf9 细胞培养上清的稀释液,置 37℃ 8h 后更换为原培养基。继续培养 48h 后进行观察和检测。

1.2.7 HBV 的细胞感染实验及 HBV 核酸提取:哺乳动物细胞培养于 24 孔培养板,每孔细胞数量约为 5×10^4 。37℃ 培养 16h 后吸去培养上清,用 D-hanks 液洗一次,在对应的孔中加入 200μL 用被感染哺乳动物细胞适用的完全培养基稀释的 Dane's 颗粒(2×10^7 copies/孔),在 37℃ CO₂ 培养箱中温育 4h。弃去上清,用 PBS 洗 2 次,将细胞收集到 Eppendorf 管中。经核质分离后用蛋白酶 K 法提取病毒核酸。

1.2.8 荧光 PCR 检测:待测样品使用 HBV 荧光 PCR 检测试剂盒(厦门新创)进行检测,在实时荧光 PCR 仪(Roton-Gene Real-Time 2000)中进行反应,PCR 条件为:94℃ 180s; 94℃ 1s, 53℃ 20s, 50 个循环。由荧光 PCR 分析软件分析实验数据并输出报告。

1.2.9 靶蛋白一级结构的疏水性分析:使用 DNASTAR 软件包中的 Protean 程序提供的 Kyte-Doolittle 算法进行分析。分析时平均氨基酸残基长度常数采用默认值:9 个残基。分析结果以横轴显示氨基酸残基的位置,纵轴为氨基酸的疏水指数,疏水指数为正值时,表示氨基酸呈疏水性,负值则表示氨基酸呈亲水性,疏水指数的绝对值越大表示疏水性或亲水性越强。

2 结果

2.1 HBV 对 HepG2 和 WI-38 细胞的感染实验

用 Dane's 颗粒分别感染 HepG2 细胞、WI-38 细胞、BNL 1ME A.7R.1 细胞和 CHO 细胞,洗涤后提取粘附或摄入细胞的 HBV DNA,利用实时荧光 PCR 技术进行定量检测,结果如表 2 所示。从检测结果可以看出,HepG2 细胞本身具有一定的结合 HBV 的能力;而其他细胞系作为 HBV 感染的非嗜性细胞,仅有未洗净的非特异吸附病毒。WI-38 细胞为人肺成纤维细胞,在过去的研究中我们发现使用携带 CMV 启动子的重组昆虫杆状病毒对哺乳动物细胞进行基因转移时,WI-38 细胞的报告基因转移和表达效率相对较高^[10]。因此我们选用 WI-38 细胞作为靶细胞进行后续研究。

表 2 HBV 对不同哺乳动物细胞的结合能力
Table 2 Comparison of the relative binding of HBV
in different mammalian cell lines

Cell line	Source	HBV DNA (copies/sample)
HepG2	human/hepatocellular carcinoma	263 382 ± 16 302
WI-38	human/lung fibroblast	186 215 ± 15 236
BNL 1ME A.7R.1	Mice/liver	169 221 ± 13 489
CHO	mice/ovary	105 400 ± 25 076

2.2 HBV 对表达不同靶蛋白的 WI-38 细胞的感染实验

将重组杆状病毒 (BacA1、BacA2、BacBP、BacEGFP) 分别感染 WI-38 细胞, 培养 48h 后, 用 Dane's 颗粒感染细胞。4h 后收集细胞提取 HBV DNA, 进行定量检测, 结果如图 2 所示。感染了 BacA1 和 BacA2 的细胞与感染了 BacEGFP (阴性对照)、未经任何处理的正常 WI-38 细胞 (空白对照) 相比, 其结合 HBV 的能力未见明显提高, 而感染了 BacBP 的 WI-38 细胞, 结合 HBV 的能力则明显提高 ($P < 0.05$)。表明 BP 的表达可使 WI-38 细胞吸附 HBV 病毒, 但 A1 及 A2 没有这种功能。

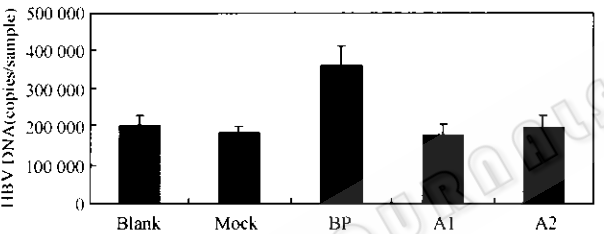


图 2 表达不同靶蛋白的 WI-38 细胞与 HBV 的结合能力
Fig.2 comparison of HBV binding to WI-38 cells infected
with different recombinant baculoviruses

Blank: uninfected cells; mock: BacEGFP infected cells; BP, A1 and A2: cells infected with recombinant baculovirus BacBP, BacA1 and BacA2 respectively.

2.3 五种 SCCA1 蛋白的氨基酸差异

A1 不能促进细胞与 HBV 的结合, 而同样经 PCR 由 Moore 等^[7]从 HepG2 细胞中分离的 SCCA1 基因 (GenBank 号 AJ515706) 却具有与 BP 类似的病毒吸附能力。Moore 等^[7]在 AJ515706 基因的反应位点环境 (RSL, 位于 aa340 ~ aa354) 上进行点突变, 构建了两种突变体蛋白 (P3、P14), 结果这两种突变体蛋白和 AJ515706 一样可促进靶细胞与 HBV 的结合。BP、AJ515706、P3、P14 以及 A1 这 5 种 SCCA1 蛋白中, 除 A1 外其余 4 种蛋白均具有吸附 HBV 能力。这 5 个蛋白的氨基酸序列差异见表 3, 可见与具有 HBV 吸附能力的 4 个蛋白相比, A1 在 aa185、aa202、aa349 和 aa351 上的变异是独有的。

表 3 五种 SCCA1 蛋白的氨基酸差异
Table 3 Amino acids sequence differences between
five SCCA1 proteins

Amino acid residue position	16	47	105	185	202	341	349	351	352	389
BP	F	D	N	Q	P	A	V	A	F	P
AJ515706	S	N	T	Q	P	A	V	A	F	S
P3	S	N	T	Q	P	A	V	A	A	S
P14	S	N	T	Q	P	R	V	A	F	S
A1	F	D	N	R	S	A	E	G	F	S

2.4 BP 和 A1 嵌合突变体的构建及对 HBV 的吸附

为初步了解哪些变异与 HBV 吸附能力相关, 我们以 aa342 为界, 将 BP 和 A1 的 N 端和 C 端互换, 构建了 BP-A1 和 A1-BP 两个嵌合突变体 (图 3)。

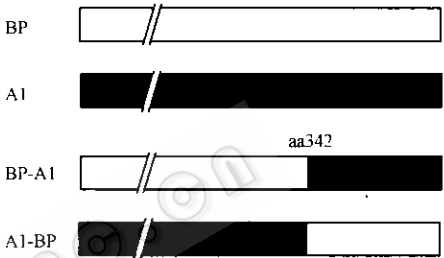


图 3 BP 和 A1 的嵌合突变体 BP-A1 和 A1-BP 的构建
Fig.3 Construction of chimeric mutants of BP and
A1: BP-A1 and A1-BP

The mutants were constructed by interchanging the part after aa342.

构建携带 BP-A1 基因和 A1-BP 基因的重组杆状病毒, 感染 WI-38 细胞, 检测感染细胞对 HBV 的吸附能力, 结果见图 4。可见 BP-A1 不能吸附 HBV, 而 A1-BP 可以吸附病毒, 表明 aa342 下游序列的变异 (V349E 和 A351G) 对 SCCA1 的 HBV 结合能力具有重要影响。

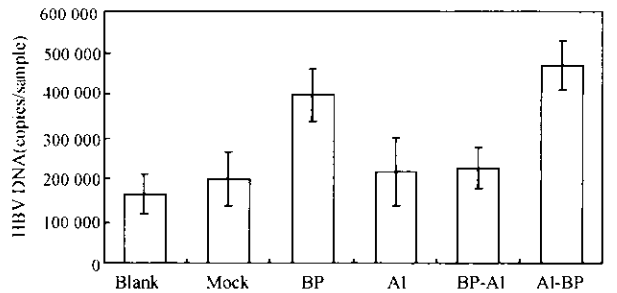


图 4 表达嵌合体 BP-A1 和 A1-BP 的
WI-38 细胞结合 HBV 的能力
Fig.4 Comparison of HBV binding to WI-38 cells
expressing BP-A1 and A1-BP

Blank: uninfected cells; mock: BacEGFP infected cells; BP, A1, BP-A1 and A1-BP: cells infected with recombinant baculovirus BacBP, BacA1, BacBP-A1 and BacA1-BP respectively.

2.5 几种 SCCA1 蛋白一级结构的亲疏水性分析

对 BP、AJ515706、P3、P14 以及 A1 这 5 种 SCCA1 蛋白的氨基酸序列的亲疏水性进行了比较。结果发现前 4 种具有 HBV 结合能力的蛋白在 aa344-354 区域上均有较高的疏水性,疏水指数峰值均大于 2.0,而不具 HBV 结合能力的 A1 蛋白在该区域的疏水性较弱,疏水指数峰值仅为 1.07(图 5)。

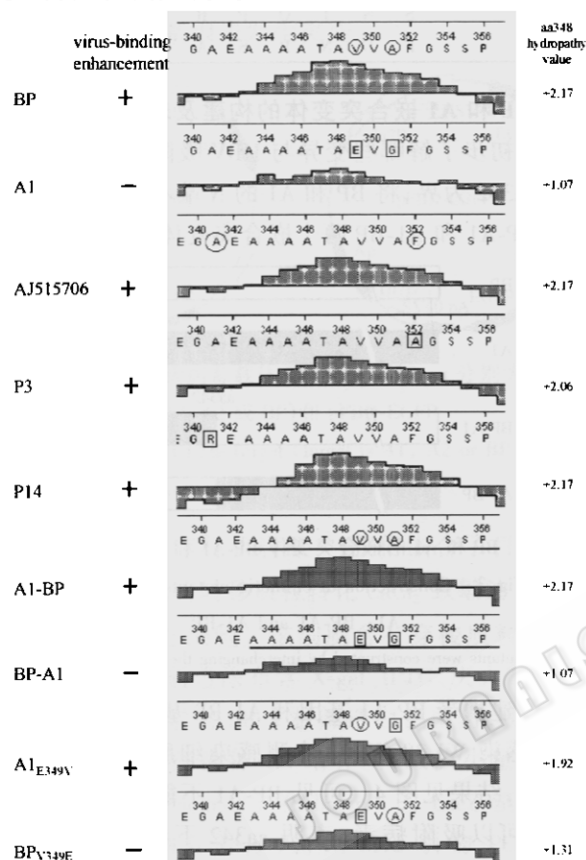


图 5 几种 SCCA1 蛋白 aa340-356 区域的疏水性分析

Fig.5 Hydrophobicity analysis of several SCCA1 proteins

2.6 BP、A1 的 aa349 点突变对蛋白的 HBV 结合能力的影响

与其他 4 个蛋白相比, A1 在 aa344-354 区域内发生了 V349E 和 A351G 两个突变,其中 349 位的强疏水性氨基酸 V(缬氨酸)突变为弱疏水性的 E(谷氨酸),推测该区域的疏水性可能与 SCCA1 的 HBV 结合能力有关。为了验证这一推测,将 BP 和 A1 的 aa349 进行了点突变,构建了 BP_{V349E} 和 A1_{E349V} 突变体,以及 BP 的 aa342 下游片段缺失的 BP_{N342} 突变体(图 6)。BP_{V349E} 在 aa344-354 区域内的疏水性明显减弱,而 A1_{E349V} 在该区域内的疏水性明显增强(图 5)。构建携带这些突变体的重组杆状病毒,感染 WI-38 细胞,检测感染细胞对 HBV 的吸附能力,结果

A1_{E349V} 能吸附 HBV, 而 BP_{V349E} 不能吸附病毒,表明 aa349 对 SCCA1 的 HBV 结合能力具有重要影响(图 7)。但 BP_{N342} 仍具有一定的病毒吸附能力,提示 BP 与 HBV 的结合可能是一个多位点的作用,或是 aa344~aa354 区域并不直接参与 BP 与 HBV 的结合,但该区域疏水性的改变可能间接导致了 HBV 结合位点处空间构象的改变。

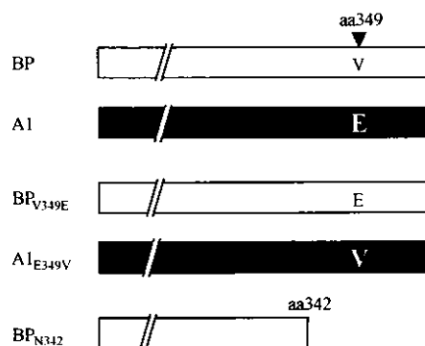


图 6 不同 SCCA1 突变体的构建

Fig.6 Construction of different SCCA1 mutants

BP_{V349E}: BP mutant contained a single coding change (Val349Glu);
A1_{E349V}: A1 mutant contained a single coding change (Glu349Val);
BP_{N342}: BP deletion mutant in which part after aa342 was deleted.

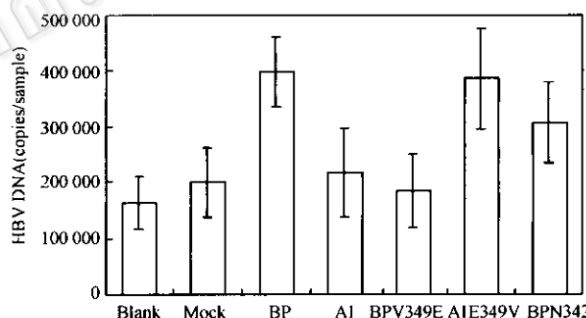


图 7 表达 BP 和 A1 突变体的 WI-38 细胞结合 HBV 的能力

Fig.7 HBV binding to WI-38 cells expressing site-mutants of BP and A1

Blank: uninfected cell; mock: BacEGFP infected cell. BP, A1, BP_{V349E}, A1_{E349V} and BP_{N342}: cells infected with recombinant baculovirus BacBP, BacA1, BacBP_{V349E}, BacA1_{E349V} and BacBP_{N342} respectively.

3 讨论

De Falco 等^[5]以及 Moore 等^[8]从 HepG2 中克隆出的 SCCA1 蛋白 BP 和 AJ515706 均能明显提高细胞结合 HBV 的能力,但本研究从同一细胞株中克隆出的 SCCA1 蛋白 A1 却不能促进细胞对 HBV 的结合,与 SCCA1 氨基酸同源性达 91% 的 SCCA2 蛋白 A2 也不起作用。

BP、AJ515706 和 A1 三种 SCCA1 的同源性很高,

相互间仅有 4~7 个氨基酸的差异。为初步了解哪些变异与 HBV 吸附能力相关,我们以 aa342 为界,将 BP 和 A1 的 N 端和 C 端互换,构建了 BP-A1 和 A1-BP 两个嵌合突变体,结果发现 BP-A1 不能促进细胞对 HBV 的吸附,而 A1-BP 可以,提示 A1 与 BP 间在 aa342 下游的 3 个氨基酸差异可能对于 SCCA1 与 HBV 的结合有重要作用,其中 2 个差异位点(aa349 和 aa351)位于 aa340~aa354 的反应位点环域内。一级结构分析显示,A1 在反应位点环域的疏水性较弱,但 BP 与 AJ515706 的疏水性都很强。将 A1 的 aa349 位的弱疏水性氨基酸 E(谷氨酸)突变为强疏水性氨基酸 V(缬氨酸),并将 BP 的 aa349 位的 V 突变为 E,分别获得突变体 A1_{E349V} 和 BP_{V349E},发现前者获得了结合 HBV 的能力,而后者丧失了结合能力。这些结果提示 SCCA1 反应位点环域的强疏水性对其与 HBV 的结合有重要影响,该区域疏水性的降低则伴随着 HBV 结合能力的丧失。

在病毒感染过程中,常常需要疏水结构域作为膜融合的介导^[11]。BP 和 AJ515706 在反应位点环域的强疏水性可能有助于它们和 HBV 或细胞的某种成分形成稳定的复合物,促使 HBV 与细胞的粘附和侵入。

serpin 作为一种结构依赖的功能蛋白,其内部的结构/功能的关系和活动机制非常独特,目前的研究还很不充分。serpin 的反应位点环域不仅在 serpin 的抑制活性中起重要作用,也影响 serpin 整体的构像。配体结合和蛋白-蛋白间的相互作用原则上可能发生在 serpin 的任一表面上。反应位点环域上的构像变化可能影响 serpin 上存在的其他结合位点的作用。BP 的反应位点环域及其疏水性在细胞和 HBV 的结合上起重要作用;但 BP 上可能存在病毒结合的其它位点。本研究中 BP 的 3' 端的反应位点环域缺失突变体 BP_{Δ342} 也能提高 WI-38 细胞与 HBV 的结合能力,显示了 serpin 结构对功能影响的复杂性。

HepG2 是一株人肝癌细胞系,其中的各个细胞的表面蛋白成分也并非完全一致,De Falco 等^[5]、Moore 等^[8] 以及本研究在用相似的方法从 HepG2 中分离 SCCA1 基因时,均获得了数种各不相同的分离

株。这些分离株均属于 SCCA1,高度同源,但结合 HBV 的能力却差异明显。在正常人肝细胞中是否同样也存在着多种 SCCA1 蛋白的同时表达,不同 SCCA1 蛋白的表达是否与细胞对 HBV 的易感性相关? 是否与 HBV 感染后的细胞病变相关? 对这些问题的进一步研究,可能会对深入了解 HBV 与人肝细胞的相互作用机制有所启迪。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Chen M (陈敏), Zhang J (张军), Chen MC (陈睦传) *et al.* Progress in HBV receptor research. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2002, **18**(2): 185-193
- [2] Neurath AR, Kent SB, Strick N *et al.* Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 1986, **46**(3): 429-436
- [3] Qiao M, Macnaughton TB, Gowans EJ. Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line. *Virology*, 1994, **201**(2): 356-363
- [4] Pontisso P, Ruvoletto MG, Tiribelli C *et al.* The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol*, 1992, **73** (Pt 8): 2041-2045
- [5] De Falco S, Ruvoletto MG, Verdoliva A *et al.* Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36613-36623
- [6] Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K *et al.* Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **181**(1): 51-58
- [7] Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*, 2002, **102**(12): 4751-4804
- [8] Moore PL, Ong S, Harrison TJ. SCCA1-mediated binding of hepatitis B virus to hepatocytes does not involve the hepatic serpin clearance system. *J Biol Chem*, 2003, **278**(47): 46709-46717
- [9] Duisit G, Saleun S, Douthe S *et al.* Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J Gene Med*, 1999, **1**(2): 93-102
- [10] Xu CY (许辰煜), Cheng T (程通), Lu WX (卢五迅) *et al.* Research on the gene-transfer and expression efficiencies in different mammalian cells by baculovirus. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2004, **20**(1): 73-77
- [11] Grgacic EVL, Schaller H. A metastable form of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: low-PH release results in a transition to a hydrophobic, potentially fusogenic conformation. *J Virol*, 2000, **74**(11): 5116-5122