

乙型肝炎病毒受体研究进展

陈敏,张军,陈睦传,夏宁邵

(厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,厦门 361005)

中图分类号:R512.62 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2002)02-0185-09

乙型肝炎(乙肝)病毒(hepatitis B virus, HBV)是嗜肝DNA病毒科的原型病毒。目前,对HBV的基因组成、复制过程、抗原结构及生物学特性等已有相当程度的了解^[1]。但由于缺乏合适的感染系统,对HBV感染的早期过程,如病毒如何结合靶细胞上的受体最终进入细胞等,仍不很清楚。

病毒受体是宿主基因组编码、控制和表达的一组蛋白质,它参与病毒与靶细胞的相互作用,使病毒吸附在细胞表面。在病毒受体的介导下,病毒最终进入细胞进行复制。因此,细胞上的病毒受体与病毒的宿主范围和组织嗜性密切相关。过去认为病毒与细胞的相互作用是通过病毒的某个成份直接识别和/或通过病毒吸附蛋白(virus attachment protein, VAP)结合到细胞表面的单个分子上。近年来,由于各种新技术的发展和运用,相继分离出了多种病毒的受体,同时在病毒受体的本质及病毒和受体相互作用机制等研究方面也取得了很大的进展。看来,病毒与受体的结合是一个多步骤过程,涉及不同的病毒吸附蛋白及多个靶细胞受体^[2-4]。

HBV和其它病毒一样,也是通过病毒表面蛋白识别人肝脏细胞质膜上的受体^[3]。HBV的表面抗原(HBsAg)由3个相关蛋白组成:大蛋白(L-HBsAg, pre-S1+pre-S2+S)、中蛋白(M-HBsAg, pre-S2+S)和主蛋白(S-HBsAg, S)。目前已从人的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。

1 与 pre-S1 结合的蛋白

最早认为多聚人血清白蛋白(polymerized human serum albumin, pHSA)可以介导 pre-S2 与人肝脏细胞上的 pHSA 受体结合,使 HBV 进入细胞^[5]。但现在多数研究者认为, pre-S1 可能是病毒颗粒与人肝脏细胞结合的最重要区域^[3,6,7]。pre-S1 区 N 端中大约一半的分子指向病毒颗粒外部,另一半指向颗粒内部^[8]。该结构在禽乙肝病毒中保守^[9]。这种结构一方面可以介导病毒颗粒与靶细胞结合,另一方面可以介导病毒膜蛋白与核衣壳结合^[10]。

1.1 与 pre-S1(21~47)结合的蛋白 pre-S1 的 21~47 位氨基酸可能是 HBV 与肝细胞和 HepG2 细胞结合的最重要的部位^[11]。pre-S1(21~47)多肽可以阻断 HBV 和细胞结合,其它多肽则不能^[12,13]。相续分离出多种抗 pre-S1(21~47)单抗能阻断大蛋白或病毒颗粒与 HepG2 细胞和肝细胞的结合^[14-16]。有报道将 S-HBsAg 的 C 末端和 pre-

S1(21~47)融合而构建的质粒 DNA 在小鼠肌内注射一次后,即可以产生高滴度的 S-HBsAb 和抗 pre-S1 抗体及特异性 HBV-CTL 反应。在转基因鼠中该质粒能清除循环的 HBsAg,并出现抗 pre-S1 和抗 S 抗体。高滴度的抗 pre-S1 抗体可能可以有效清除慢性乙肝携带者血清中的病毒颗粒^[16]。

1.1.1 IgA pre-S1(21~47)与人 IgA 1 链的 C 区有相当的同源性^[17]。竞争实验和相关抗体的作用显示:在与正常人肝细胞结合时,HBV 和 IgA 有共同的或相近的受体^[18]。

但有研究认为虽然 pre-S(21~47)或 HBV 能以剂量相关方式阻断 IgA 和 HepG2 细胞结合,IgA 对 pre-S(21~47)或 HBV 与 HepG2 细胞的结合却没有影响,因此 IgA 受体在 HBV 的结合中无直接作用。可能 IgA 和 HBV 是结合在不同受体或同一受体的不同位点上,HBV 的结合一定程度上影响了受体结合 IgA 的能力^[12]。目前,两种可能性都不能排除。

1.1.2 hIL-6(human interleukin-6) hIL-6 具有多种生物学功能。在肝脏中 hIL-6 能调节急性反应基因的转录,并刺激肝脏再生。Galun 等利用 HBV-三嵌合体小鼠(详见后文)证实 hIL-6 在体内外均有利于 HBV 感染肝细胞系和淋巴细胞^[19,20]。

hIL-6 中含有 pre-S1(21~47)的识别位点,可以介导 HBV 和细胞间的相互作用^[21]。CHO 细胞转染 hIL-6 cDNA 及 hIL-6 cDNA 重组杆状病毒感染昆虫细胞后,即表达 pre-S1(21~47)的受体。并且,hIL-6 和抗 hIL-6 抗体都能阻断表达病毒受体的细胞与 pre-S1(21~47)结合。hIL-6 的 35~66 位氨基酸是 HBV 结合区^[22]。

虽然 hIL-6 在 HBV 感染中的准确作用还不清楚,但多数研究认为它是病毒内化的桥联分子^[23]。hIL-6 可能通过以下几种方式起作用: hIL-6 先与 HBV 形成复合体,复合体与膜定位的 hIL-6 受体(hIL-6R, gp80)或分泌性的 hIL-6 受体(shIL-6R)结合后再与 hIL-6 亚型受体(hIL-6R, gp130)作用; hIL-6 和 gp130 间也有直接相互作用; hIL-6 介导 Jak-Tyk 和 STAT 蛋白激酶激活或各种细胞蛋白表达,再进一步促进未知的相应膜受体或配体表达,有助于 HBV 感染;病毒从感染细胞出芽时,hIL-6 通过病毒与 hIL-6R 的结合,一面和病毒结合,另一面和肝细胞结合。

1.1.3 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPD) 利用抗 pre-S1 (21~47) 单抗的独特型抗体(Ab2),从 Hep G2 细胞和正常人肝脏质膜抽提物中分离出几个 pre-S1 结合蛋白。Hep G2 细胞的感染性和这几个结合蛋白的表达紧密相关^[16]。原代人肝细胞与病毒孵育后 4~8 日,细胞内的 rcDNA、cccDNA 和培养液中的 HBsAg 含量增加。这证实 35kD 蛋白可能作为病毒受体^[24]。经纯化和氨基酸序列分析后确认,该蛋白为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)^[25-27]。

推测在 HBV 生活周期中,GAPD 通过其蛋白激酶活性使病毒核衣壳磷酸化^[27]。已有证据表明 GAPD 能增加病毒核衣壳和包膜解离^[25],并可能结合转录后调节因子(post-transcriptional regulatory element,PRE),调节转录后 HBV 基因的表达^[26]。

1.1.4 HBV-BP(HBV binding protein)^[28] 为了增加亲和性,De Falco 等人制备了 pre-S1 (21~47) 的四聚体,从经表面活化剂处理的 Hep G2 细胞质膜中纯化出一个 44kD 的蛋白,并在体外培养的原代人肝细胞中研究了其 *E. coli* 表达重组蛋白抑制 HBV 结合和内化的作用。

直接结合实验确定,重组 HBV-BF 能和 HBV pre-S1 相互作用。Hep G2 细胞转染 HBV-BPcDNA 后,HBV-BP 表达在转染细胞表面和细胞质内。较未转染细胞,转染细胞结合病毒和四聚体能力约提高两个数量级。正常情况下不结合 HBV 的 CHO 细胞经转染后也能明显结合 HBV,并且重组 HBV-BP 及其抗体都以剂量相关方式阻断病毒结合和内化。

HBV-BP 和人扁平细胞癌抗原 1(SCCA1)的编码区仅有 4 个核苷酸不同。其中对应于 SCCA1 酶反应中心的位置有核苷酸变异。特别值得注意的是,有一个核苷酸的变异可能导致出现一个新的糖基化位点。HBV-BP 翻译后的修饰对其功能是很重要的。除了糖基化位点外,HBV-BP 序列中还有很多可能的磷酸化位点。在病毒感染早期,细胞受体通常需要磷酸化后才能发挥作用。这已经在其它病毒中得到证实。

虽然 HBV-BP 和 SCCA1 很类似,但完整的 HBV-BP 重组蛋白对 - 胰凝乳蛋白酶、胰酶等丝氨酸蛋白酶缺乏抑制作用,却能抑制高活性的半胱氨酸蛋白酶,如木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 L。包膜病毒侵入细胞经常需要在膜蛋白融合区域附近发生酶解,经切割后的膜蛋白才能和质膜或内吞小体膜融合。由此推测,与 HBV-BP 类似的 HBV 结合相关受体可能因为失去抑制蛋白酶活性的能力,导致在细胞表面出现蛋白酶作用位点,从而有利于细胞感染。

1.1.5 其它 用配体-受体原位交联法从 Hep G2 细胞裂解液中分离出能与 pre-S1 (21~47) 多肽结合的 31kD 糖蛋白^[12]。该蛋白的性质仍有待进一步研究。

1.2 其它的 pre-S1 结合蛋白

1.2.1 无涎糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor,ASGPR)

ASGPR 特异性表达在肝脏窦状隙和基底膜外侧的细胞膜

上,具有高度活跃的细胞吞饮功能,可介导多种配体吸收。其亲和力主要决定于配体糖基化状态^[29]。抗 pre-S1 单抗 MA18/7 能以剂量相关方式完全阻断血清来源 HBV 和 ASGPR 的特异性结合。二者的结合与临床高病毒血症相关^[2]。

通过 ASGPR 可以将外源 DNA 特异性导入肝细胞^[30]。在实验动物体内,载体-HBV DNA 复合物由 ASGPR 介导内吞后可以合成 HBsAg^[31]。组成性表达 ASGPR 的 Hep G2 细胞和 HuH7 细胞比不表达 ASGPR 的 COS 细胞更能结合内吞 HBV;阻断 ASGPR 的功能则明显抑制 HBV 的结合^[32]。进一步的研究表明,ASGPR 能特异性结合血清中的 HBV 颗粒,介导 Hep G2 细胞内吞,分泌 HBsAg。而特异性的 ASGPR 配体(无涎胎球蛋白,asialofetuin)有定量抑制作用。COS 细胞中则无此现象^[33]。因此至少在一定程度上,肝细胞特异性 ASGPR 介导的 HBV 吸附及侵入和病毒感染的组织嗜性相关。

根据 ASGPR 仅在肝细胞上大量地、高亲和性地表达的特点,建立了细胞指向的药物定位法^[34]。与常规的 IFN- α 或 IFN- β 相比,在 ASGPR 阳性人肝脏细胞中,含 ASGPR 结合区和 IFN- α 的重组蛋白(asialo-IFN- α)能更好地阻断 HBV 产生。在裸鼠体内,小鼠 asialo-IFN- α 能明显减轻病毒血症,而常规的 IFN- α 无明显作用^[35]。另外,将抗病毒核苷类似物与 ASGPR 结合,能使药物在肝细胞溶酶体内分离,因此可以降低抗病毒核苷类似物的肝外副作用^[36]。

1.2.2 p80^[37] 利用 *E. coli* 表达的重组蛋白 GST-pre-S1,从人肝细胞和 Hep G2 细胞膜中分离出一个约 80kD 的特异性结合蛋白。p80 能和各亚型的 HBV 结合。pre-S1 可以完全阻断重组蛋白和 p80 的结合。缺失突变分析表明,其结合位点在 pre-S1 的 12~20 和 82~90 位氨基酸,而不是通常所认为的 21~47 位氨基酸。两个抗 pre-S1 (21~47) 单抗的阻断结果也证实了该结论。

p80 的表达不限于人肝细胞。其作用很可能类似于鸭乙肝中的 gp180(详见后文),是病毒结合的早期位点。

1.2.3 其它^[38] Harvey 等利用酵母双杂交系统从人肝脏 cDNA 文库中得到几个与 HBV preS1 蛋白相作用的克隆,其体外表达产物能与杆状病毒来源的 GST-preS1 特异性结合。竞争实验分析发现:一个未知蛋白与 GST-preS1 的直接结合可被纯化的血清 HBV 阻断,但纯化的 HBsAg 则不起阻断作用。就目前所知,该未知蛋白是第一个确定的能结合 HBV 而不能结合 HBsAg 的蛋白质。

另外,序列分析显示克隆之一是脂蛋白 H(apolipoprotein H,apoH)(详见后文)。

2 与 pre-S2 结合的蛋白

2.1 多聚人血清白蛋白 PHSA 是研究最早的 HBV 结合蛋白。它可能作为中间受体介导 pre-S2 与肝细胞上的 pHSA 受体反应,使病毒侵入细胞。仅人和猩猩的 pHSA 可以和 pre-S2 结合,其他动物的则不能;但 pHSA 和肝细胞的结合无种属特异性^[5,39]。pHSA 的结合位点在 pre-S2 的 3~16 位氨基酸^[40]。

根据 HBV (adr)pre - S2 区合成引物,RT - PCR 和 RNA - PCR 的结果表明,pre - S2 和 pHSA 受体外显子有一定程度的同源性,而且 pHSA 受体基因在肝组织中表达,在 HBV 不敏感组织中不表达^[41]。

有的研究者认为,仅有戊二醛交联的 pHSA 才能和 HBsAg 有效结合,意义不大^[39]。后来发现未经化学处理的单体人血清白蛋白(HSA)也可以和 pre - S2 结合,但结合量较小。这提示戊二醛交联可能模拟了天然的修饰过程^[42]。

将阿糖腺苷(ara - AMP)与氨基乳糖人血清白蛋白(L - HSA)偶联用于治疗 HBV 感染者,28 天后它产生的抗病毒活性同 ara - AMP 一样,但没有神经毒性等临床副作用。这可能是由于人工改变的 HSA 易与病毒结合,然后又被肝细胞特异性摄取^[36]。

2.2 纤连蛋白(fibronectin) 纤连蛋白是人肝脏窦状隙的细胞外基质成分。纤连蛋白和病毒膜糖蛋白的亲和在多种病毒识别细胞的过程中起重要作用。利用抗 pre - S2 单抗的独型抗体发现,纤连蛋白和 HBV pre - S2 的结合有种属特异性。在体外纤连蛋白能与病毒及重组的中蛋白作用,重组的大蛋白由于表位未呈现而无结合活性^[43]。

病毒利用多种受体进入细胞时,多受体可能同时起作用,或者第一受体结合病毒后再与第二受体结合,而后病毒通过融合或内吞进入细胞。对在体液内循环的病毒,起始结合必须能有效引发病毒与宿主细胞快速结合。这样看来,在结合初期速率较亲和性更重要。因此病毒可能与一个含量丰富的受体弱结合后再与特异性的第二受体结合^[44]。肝细胞膜的窦状隙区与血流直接接触,有大量的生长因子及激素的受体,不能不令人推测窦状隙的纤连蛋白和 pHSA 受体等可能有助于循环蛋白的初始结合,随后的过程则由特异性肝细胞受体介导。

2.3 转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)^[45,46] 利用抗原呈递 T 细胞系统发现,在活化 T 细胞呈递 pre - S2 的一段序列时,CD71 转铁蛋白受体介导内吞作用。该过程中需要结合可溶性的转铁蛋白。HBV pre - S2 和 S 区中含与可溶性转铁蛋白作用的关键残基。摄取的膜抗原经内吞小体加工与 MHC 结合后,呈递给 CD4⁺ T 细胞。因为 TfR 也在肝细胞上表达,所以它可能在 HBV 侵入细胞时起作用。

3 与 S 结合的蛋白

pre - S1 上的结合位点可能是很重要的,但也有研究显示某些蛋白与 S - HBsAg 特异性结合。

3.1 膜联蛋白(annexin V, AV; 又名内联蛋白 —endonexin, E) 人膜联蛋白(human annexin V, hAV)是一种 Ca²⁺ 依赖磷脂结合通道蛋白,分子量为 34kD。天然 hAV 能与 HBsAg 特异性结合,并抑制 S - HBsAg 和人肝细胞间的作用。虽然鼠源膜联蛋白(mAV)和 hAV 有 90% 的氨基酸同源性,但 mAV 不与 S - HBsAg 结合,也不能明显阻断 S - HBsAg 与人肝细胞间的结合^[47]。S - HBsAg 上的 125 ~ 131、158 ~ 169 位氨基酸参与 hAV 结合构象型区域的形成^[48]。

AV 在多物种的多种组织中表达,与多种病毒的感染相

关。但就其与 HBV 的关系而言,HBV 感染和复制仅发生在含 hAV 的组织和细胞中^[49]。hAV 的种属特异性分布与 HBV 的种属倾向性有关,而且高度保守。在人、大猩猩、恒河猴的肝脏和人的所有肝外组织中都能检测到 hAV 的表达;在大小鼠牛、猪上则未检测到其表达。而且慢性肝炎病人各组织的 HBV - DNA、RNA 转录体、抗原检测结果与 hAV 在各组织的分布情况一致^[50]。在体外,hAV 可使鼠肝细胞特异性结合 S - HBsAg,并产生 HBV 复制性感染;缺乏 hAV 则不能检测到复制标记物^[49]。不表达 hAV 的大鼠肝癌细胞 FTO2B 转染 hAV 基因后,能感染 HBV。感染细胞可以复制并表达 HBsAg 和 HBcAg,并分泌 HBV - DNA 至培养细胞上清中。而且转染细胞上清有再感染能力^[51]。

从研究结果看,hAV 结合 HBV 膜蛋白时,至少有两个结构域是至关重要的,其中一个与 HBV 的磷脂酰丝氨酸结合,另一个与蛋白组分结合。脂质组成是蛋白发挥功能所需的^[51 - 53]。

抗 hAV 抗体或抗 HBsAg 抗体的独型抗体可以阻断 HBsAg 结合及侵入人肝细胞^[54]。这表明 hAV 可能与病毒内吞及内吞介导的膜融合和病毒内化直接相关。

3.2 脂蛋白 H(apoH) apoH(又称 2 - 糖蛋白)是一种肝细胞质膜糖蛋白,也可以在血浆中游离存在,分子量为 46kD^[54,55]。apoH 中含六氨基酸的“短同源重复序列(short consensus repeats, SCR)”。令人感兴趣的是,已确定的 3 个病毒受体也是 SCR 蛋白家族成员。肝细胞(包括培养的肝癌细胞)可以产生 apoH^[55]。在转染和表达 HBV 的 Hep G2 细胞中,apoH mRNA 的量是原细胞的 4.5 倍^[56]。重组的 apoH 和血清来源的 apoH 都可以与仅含 S - HBsAg 的重组蛋白结合^[57]。

apoH 中的一部分与脂蛋白相关,尤其是乳糜微粒和高密度脂蛋白。在正常的脂肪代谢中二者都在肝细胞中进行加工,所以推测 HBV 可能和 apoH 颗粒结合,被一起转运至肝细胞内^[57]。免疫电镜和 PCR 的结果研究表明:apoH 主要与 Dane's 颗粒结合。HBV - DNA 和 apoH - HBsAg 复合体间存在正相关关系,在病毒复制活跃期患者血清中,apoH - HBsAg 的结合活性高^[54]。

apoH 可能通过脂质诱导的构象改变与多种病毒成分作用。除去脂质的重组 HBsAg 则失去与 apoH 的结合活性^[52,55]。apoH 的作用与 HBV 包膜中的阴性磷脂成分有关,而且磷脂的氧化状态也影响 apoH - HBsAg 结合。用重组 HBsAg 分析发现十四烷基化的 pre - S1 与 apoH 作用紧密^[58]。HBV 大蛋白十四烷基化后的构象改变能提高受体的有效吸附能力^[59,60]。在所有的嗜肝 DNA 病毒中,pre - S N 末端的十四烷基化区都是保守的^[60]。apoH 与烷基化 pre - S1 结合后,隐藏的 S 区暴露,使得抗 HBsAg 抗体更容易接近 pre - S1 区。这提示 apoH - HBV 的复合体可使机体产生更好的免疫反应^[58]。而且 apoH 也与体内快速清除阴性脂质体及通过吞噬清除表达磷脂酰丝氨酸的细胞有关^[61]。HBV 作为异物颗粒,被 apoH 识别后,也可能通过这种方式被清

除。该过程可能与血浆中游离的 apoH 浓度有关^[58]。

有报道 apoH 和膜联蛋白 (annexin) 有亲和性。膜联蛋白可以调节内吞和外排等细胞膜上的物质运输过程。apoH - HBV 复合体与膜联蛋白的结合可能是一种细胞内病毒分选和/或病毒进入细胞的机制。从各项研究结果看, apoH 在 HBV 感染过程中可能参与 HBV 的膜运输过程及通过清除“氧化”HBV 起保护器官的作用^[58]。

目前 apoH 的受体还未确定^[55]。它可能与肝细胞上的脂蛋白受体 (LDL 受体和 LDL 受体相关蛋白) 相关^[33]。

4 具有蛋白酶活性的结合蛋白——HBV - BF (HBV binding factor)

从正常人血清中分离出一种 50kD 的糖蛋白, 可与 HBV pre - S1 和 pre - S2 作用, 称作 HBV - BF。HBV - BF 不与其他物种的肝细胞膜及 Hep G2 结合, 是正常人肝细胞膜成分的一个可溶性片段, 也可以位于膜上^[62, 63]。

HBV - BF 是中性金属蛋白酶之一。从蛋白的免疫化学性质、与病毒包膜位点结合等特点看, HBV - BF 可能与病毒进入细胞有关。金属蛋白酶在呼吸道和消化道上皮细胞的顶端表面尤其丰富。有报道在其它哺乳动物病毒中, 它与病毒进入细胞有关^[64]。

单抗作用结果揭示, HBV - BF 的作用位点在病毒表面蛋白 pre - S2 (136 - 141) (VRQL YF/L) 的精氨酸上。这是 HBV 上唯一的精氨酸切割位点。该单碱基切割位点与其它上皮细胞分泌酶在病毒糖蛋白上的活化位点一致。HBV - BF 仅切割 M - HBsAg 中的 pre - S2 羧基端序列, 由此可能改变 pre - S1 的构象, 影响 HBV 和抗 pre - S1 单抗的作用。在 L - HBsAg 中, HBV - BF 不能接近 pre - S2 的潜在切割位点, 所以无法作用。经 HBV - BF 处理过的病毒形态不变。病毒融合序列前的位点被酶水解后, 膜融合所必需的融合序列暴露。病毒膜蛋白的结构改变提高了病毒结合和进入 T - 淋巴细胞的能力, 使病毒吸附到包膜上, 进入细胞。从 T - 淋巴细胞的体外感染实验看, HBV - BF 的作用不仅有利于病毒结合, 也有利于病毒内化, 但不能使病毒进行复制。在体内的情况还不确定^[63]。

HBV 的大蛋白和中蛋白位于 Dane 颗粒和管状颗粒表面, 在肝细胞表面受体和 HBV 作用时, 它们可能作为病毒的吸附蛋白^[65], 而主蛋白则可能有融合蛋白活性。因为其 23 个 N 端氨基酸与其他病毒的融合肽有很高的同源性, 且在不同 HBV 亚型和嗜肝 DNA 病毒中保守^[66]。已经证明 HBV 能和多种不能复制感染病毒的人源细胞结合。一些证据表明这些细胞上的受体与 Hep G2 上的是同样的^[67]。HBV 自然感染需要与病毒结合, 进入并将病毒转运到合适细胞器的相关因子。结合在体外无法培养 HBV 等现象来看, 在非感染细胞上的受体可能可以使病毒集中在细胞表面, 靶细胞或靶细胞附近的特异性因子则是后续步骤所需的, 如病毒内化、病毒转运至细胞核。

有研究认为, 缺乏合适的融合 - 激活蛋白酶可能是 Hep G2 细胞不能感染 HBV 的原因。在体内, 病毒吸附后的

蛋白酶解可能是自发产生的, 在 Hep G2 细胞中则不能发生该过程。用葡萄球菌 V8 蛋白酶处理病毒颗粒, 其融合序列暴露后, HBV^[68] 和土拨鼠 HBV (WHV)^[69] 即能感染 Hep G2 细胞。许多 pH 依赖性病毒需要低 pH 条件使病毒构象改变后, 才能进入细胞。对那些非 pH 依赖性的病毒, 蛋白酶可能作为一种激发物。HBV - BF 在中性 pH 中活性最高, 很可能 HBV 就不依赖于 pH, 而是通过 HBV - BF 作用暴露融合序列, 使病毒包膜和质膜直接融合^[62]。

在靶细胞膜上或靶细胞附近, 存在的膜结合或分泌形式的活化蛋白可能决定了宿主范围和/或组织嗜性, 尤其是那些利用通用受体的病毒。与 HBV - BF 相同或相关的酶可能是一个很好的选择^[2]。

5 禽类嗜肝 DNA 病毒感染中的可能受体

从 HBV 感染早期过程的有关研究看, 虽然报道了很多可能起作用的病毒受体, 但由于缺乏有效的体外感染系统, 仍无法确定到底是哪一个受体起决定性作用。

目前的嗜肝 DNA 病毒受体研究中, 最详细的结果是关于 DHBV 的。这是因为鸭和鸭原代肝细胞 (primary duck hepatocytes, PDHs) 易获得, 而且可以有效感染 DHBV。其病毒 - 受体作用机制可能亦适用于哺乳动物嗜肝 DNA 病毒感染过程。

5.1 gp180/P170

5.1.1 gp180 的特点 灰鹭乙肝病毒 (HHBV) 不能感染北京鸭, 但用带有 DHBV/HHBV 嵌合膜蛋白基因的 HHBVenv 突变株研究发现, HHBV pre - S 的 69 个氨基酸被 DHBV 的相应区域替代后, 即可感染鸭肝细胞。这显示禽乙肝病毒的宿主特异性也是由 pre - S 区决定的^[70]。

从北京鸭中分离获得的 gp180/p70 可以和 DHBV pre - S 结合^[71, 72]。结合的核心区在 HHBV 膜蛋白的 85 ~ 109 位氨基酸, 30 ~ 85 位氨基酸则有稳定相关构象的作用^[73]。cDNA 克隆分析发现, gp180 是一种羧肽酶 D (duck carboxypeptidase D, DPCD)^[74]。gp180 有几个特点符合受体所需条件^[75, 76]: gp180 和 DHBV pre - S 的胞外区紧密结合, 其结合有属特异性; pre - S 受体结合区与 gp180 结合区一致; 可溶性 gp180 以剂量相关方式抑制 DHBV 感染; gp180 在异源肝细胞系表达后可以促进病毒吸附, 并进入细胞的泡状结构; DHBV 感染后, gp180 表达下调。gp180 不仅能结合病毒, 还能和结合的颗粒一起内源化^[76, 77]。

与已知的受体不同, gp180 位于高尔基体反面 (trans - Golgi network)。它通过在质膜和高尔基体间的不断循环起受体作用^[78]。

但是 gp180 的抗体不能阻断 DHBV 感染。其表达也无法使转染的异源细胞产生复制性感染。另外, gp180 不仅在鸭肝表达, 也在不感染 DHBV 的组织中表达。并且和不感染北京鸭的 HHBV pre - S 结合^[74, 76, 77]。

据此判断, gp180 是禽类嗜肝 DNA 病毒的共同受体, 而非唯一受体。可能与 gp180 结合是禽类摄取嗜肝 DNA 病毒的初始步骤。能否与 gp180 结合并不是宿主特异性的主要

决定因素。

5.1.2 gp180 与 DHBV 的相互作用^[79,80] 作为型跨膜蛋白, gp180 由胞外区、跨膜区和约 60 个氨基酸的 C 端胞质区组成。gp180 的胞内运输依赖于短的胞质区内的信号。其 C 末端含有一个推定的酪蛋白激酶识别位点。该区的突变(如苏氨酸 丙氨酸)可增加 gp180 转运至溶酶体的倾向,阻碍 DHBV 进入细胞。这说明由 gp180 介导的胞内 DHBV 的定向运输,对病毒复制性感染是重要的。

DHBV 和 gp180 以一种新机制相互作用。除了几个短的螺旋外, DHBV pre-S 受体结合区的多数氨基酸为随机结构,没有三级结构。其中一个短的螺旋有利于初始复合物的形成,在螺旋前有约 60 个随机程度很高的结构氨基酸。受体与短螺旋接触后,其外延非结构性的拉链状的序列即参与结合。该种结合可以暴露并改变受体结合部位的初级结构,同时保护还未确认的一些关键因子,以逃避宿主免疫反应。而且 pre-S 可以有更高的变异程度,与其重叠的多聚酶基因可根据进化压力而改变。因此就其本身而言,在结合时, DHBV 的结构适应性使病毒表面蛋白在保持受体亲和力的同时,也可调整一级序列逃避免疫监督及肝炎病毒基因组在进化中的压力。gp180 和 DHBV 形成复合体后,构象改变,最大吸收峰从 326nm 移至 344nm。

荧光标记的 DHBV 颗粒的内源化和 gp180 的胞内转运显示,内吞过程似乎是能量依赖的。共聚焦显微镜的结果表明,在生理 pH 范围内受体-配体结合物有高稳定性,内吞后, DHBV 仍结合着受体。DHBV 一旦进入溶酶体,则病毒的内化受阻,这可能是因为在溶酶体内没有融合受体,而且溶酶体的酸性环境使 DHBV 失活。研究排除了在细胞表面发生膜融合的可能性。

在其它病毒中已经指出了共受体在宿主和/或组织嗜性中的作用^[81]。未知的某种宿主特异性共受体可能在病毒内化后的某个步骤中起作用,也可能启动膜融合。

5.1.3 哺乳动物中的同源物 已经在人、牛、大鼠和小鼠中发现了 gp180 的同源物^[82-84]。编码人源全酶 85% 的 cDNA 与 gp180 有 79% 的同源性^[85]。但迄今仍无证据表明从人体中分离出的 gp180 的同源蛋白可以作为 HBV 的受体。

5.2 p120^[86,87] 从 gp180 的性质可见, gp180 不是 DHBV 中唯一的受体分子。以后的研究中又分离出可与 DHBV pre-S 区结合 p120 蛋白,即鸭肝氨基酸脱羧酶复合体(DGD)的 P 蛋白,其结合位点与 3 个 DHBV 中和表位的结合位点一致。在细胞表面和细胞内都可以检测到 p120,还不清楚在细胞表面 p120 的含量是否足够使病毒进入细胞。另外, p120 可在内源化 DHBV 颗粒的胞内转运中起作用,如果是这样,那么 p120 不需要主要定位于细胞表面。

由于以下几个原因, p120 可能可作为 DHBV 感染的共受体: gp180 的最佳结合需要完整的 pre-S 区,而 p120 与完整的或经切割的 pre-S 多肽都有高亲和力; p120 限制性表达在 DHBV 感染组织,如肝、肾和脾,而 gp180 表达广泛; p120 结合位点中的双位点突变可以明显抑制 DHBV

的感染。

p120 的结合区域可能位于 DHBV pre-S 的 98~102 位氨基酸。该区域通常被围绕的 pre-S 序列隐藏,类似胰酶的蛋白酶或双碱基特异性的内肽酶在 pre-S 的 102 位或 103 位氨基酸作用后,所产生的 pre-S 蛋白可以和 p120 结合。V8 蛋白酶的结果也表明,乙型肝炎病毒感染过程中可能有蛋白酶参与作用^[68,69]。

p120 和 gp180 可能是这样作用的:首先 DHBV 颗粒通过 gp180 结合到肝细胞表面;然后,由于 pre-S 蛋白的直接构象变化或蛋白酶在 102 位精氨酸的作用导致 p120 结合; p120 的结合使病毒进入或参与细胞内转运。

但在鸡和人的肝细胞中也检测到了 p120 相关蛋白,所以有人认为 p120 并不是 DHBV 的受体。

5.3 p55^[88] 用 PDHs 免疫小鼠制备出两个单抗。这两个单抗能抑制 DHBV 和 PDHs 结合,并阻断感染。单抗与 DHBV 外膜蛋白无交叉反应性,提示抑制作用是由于单抗和某个宿主细胞表面分子间的特异性作用。通过免疫沉淀获得表达在鸭肝细胞中的一个 55kD 的蛋白。p55 和 gp180 一样,广泛分布在鸭组织中。利用两个单抗在莫斯科鸭(Muscovy duck)、鸡和土拨鼠的肝脏裂解物中也鉴定出了 p55 的类似蛋白。p55 可能并不是受体复合物组分之一,只是它的一小部分表达在肝细胞表面,涉及传染途径中的早期步骤。

5.4 DHBV 感染模型 根据 gp180 等的研究结果,对 DHBV 的感染过程提出了如下模型^[80]:

DHBV 和低特异性的起始受体分子(如 gp180)结合后, DHBV-受体复合物一起被内吞转运到内吞小体区。由于未知的某种机制,复合物停留在内吞小体内,直至第二受体(宿主嗜性决定因素之一)激发细胞和病毒膜融合,将病毒核衣壳释放到胞质中。

在一些情况下,介导病毒融合分子也可以介导病毒内化,另一些病毒如 HIV 的感染则需要宿主细胞蛋白酶对病毒表面糖蛋白进行切割,使疏水氨基酸暴露,作为膜融合的介导。在低 pH 条件下处理 DHBV 颗粒,可以暴露其大蛋白中 S 区的胰酶位点,但不影响其主蛋白亚单位中的同一区域。这种疏水性构象可以使 DHBV 结合脂质体和完整细胞^[89]。然而 DHBV 似乎是第一个发现的依赖于内吞而非低 pH 进行膜融合的包膜病毒^[90]。因此在细胞中,可能是通过一种共受体因子起作用^[89]。还不清楚这种疏水构象的变化是否使潜在的膜融合区暴露。但至少 HBV 中发现该区域中有多种包膜病毒融合区的同源序列^[68]。

在哺乳动物的嗜肝 DNA 病毒中起作用的细胞受体可能不同,但其过程和机制可能类似。

6 目前乙肝病毒受体研究中的一些问题

6.1 建立适用的体外感染体系 HBV 有明显的组织嗜性和较严格的宿主特异性,它仅可感染人和黑猩猩等。长期以来 HBV 研究的主要障碍在于缺乏合适的体外感染模型。

除了仅见的一个报道外^[91], HBV 无法感染肝脏来源的连续培养细胞系。而人原代肝细胞不易获得,并且供者和制

备方法的不同对细胞感染力有很大的影响。虽然在大鼠^[92]、裸鼠^[93]、转基因小鼠^[94]及鸭等动物中建立了相关模型,但都不能完全阐明问题。黑猩猩是一种很好的感染模型,但其数量有限,而且价格昂贵。

最近有一些令人鼓舞的报道: Ilan 等用射线处理 CB6F1 小鼠后,立即静脉注入 SCID 小鼠骨髓细胞,然后将取自体内的 HBV 感染的人肝组织移植到小鼠肾囊下,建立了 HBV - 三嵌合体小鼠(HBV - Trimer)。在小鼠体内,HBV 可以感染肝脏细胞,复制并产生病毒血症^[19]。该模型可以模拟 HBV 的感染过程及用于筛选治疗性药物。纯化的 HBV 和狨猴 HBV (WMHBV) 能有效感染原代树 肝细胞^[95]。将原代人肝细胞注入 17 天胎龄的大鼠,使其对原人源细胞形成耐受。大鼠出生 1 天后,经脾脏注入人肝脏细胞悬液;1 周后,再注入 HBV。结果发现移植的原代人肝细胞可以在大鼠中存活、分化,产生人血清白蛋白并感染 HBV。在大鼠血清中可以检测到 HBsAg、HBV DNA 和 cccDNA^[96]。

6.2 实验系统的选择

(1) 受体研究时,通常是合成多肽、重组蛋白或 HBsAg/ HBV 作为配体,配体不同,其三级结构不同,与受体结合的特异性也可能不同^[37]。另外,S 区也可能通过构象影响 pre - S1 与肝细胞受体的结构^[97]。

(2) 不同的表达系统可以导致产物的肽、螺旋含量和翻译后修饰(磷酸化、糖基化、脂肪酸修饰等)不同。在体外用不同来源的重组蛋白分析与受体的结合活性时,可能导致不一致的结果。比如较纯化的 HBV 颗粒而言,重组 HBV 与人肝脏细胞质膜和 Hep G2 细胞的结合水平要低很多。这可能是由于重组颗粒的糖基化不足^[32]。而且从人质膜和人肝癌细胞系中分离的组分的组成也可能不同^[58]。

(3) 对配体的处理方法不同,可能影响配体 - 受体的结合。如以 pre - S1 (21 ~ 47) 多肽研究 pre - S1 介导的 HBV 和细胞间的相互作用时,由于所用多肽的结合方式不同,使配体的活动性不同,由此不同实验发现能与多肽特异性结合细胞种类不同^[12,67]。

(4) 样品纯度的影响。如血清中的亚病毒颗粒的竞争结合和胞内蛋白的非特异性结合都可能影响结果。

7 病毒感染嗜性的决定因素

长期以来认为 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。但对病毒受体本质的不断认识及对 HBV 感染周期的深入研究显示,其它因子的作用要远远超过人们的设想。从目前的研究结果看,HBV 感染的组织和宿主特异性至少由两个方面决定: HBV 外膜特定区域所识别的宿主细胞上的病毒受体; 病毒传代所需细胞特异性细胞质和/或细胞核因子。

7.1 病毒受体 目前认为作为病毒受体,应至少有如下几个特点: 限制性表达在宿主的感染组织中; 与病毒特异性结合; 能使非感染细胞产生复制性感染。

如上文所述,关于 HBV 病毒受体的报道很多,但结果不一。HBV 的 pre - S 区可能是人肝细胞最重要的附着部位,

受体可能与该区域结合的 IL - 6、GAPD、ASGPR 等相关。另外,与 S 区结合的 apoH、膜联蛋白 V 也可能直接涉及病毒结合的早期步骤。其中,HBV - BF 和 HBV - BP 的研究涉及蛋白酶的作用,很值得注意。

7.2 细胞特异性因子 HBV 在体外感染正常人原代肝细胞时^[24],发现对 HBV 生活周期的限制可能发生在病毒结合之后的某些步骤,如肝外宿主因子和/或病毒自身所调节的 RNA 反转录和核心区蛋白翻译等。Hep G2 细胞的感染实验也说明这一点^[11]: 由于 HBV 感染周期中的几个转录调节元件中都含有肝脏丰富的转录因子结合位点,这在不同程度上影响了病毒组织(也可能宿主)特异性^[97]。从 HBV 转基因小鼠的结果看,病毒的转录与复制中间体主要存在肝细胞和肾脏近曲小管^[94],揭示了控制病毒 RNA 合成的肝脏特异性转录因子对 HBV 肝脏特异性分布的影响。与病毒核心蛋白上的核定向信号有关的核定向,可能也是 HBV 宿主和细胞特异性的决定因素。虽然 HBV 转基因小鼠中有大量来自整合基因的完整感染性颗粒,但迄今仍未证实转基因小鼠存在 cccDNA,这表明小鼠的肝细胞可完成转录后的所有步骤,但至少缺乏一个使病毒基因组进入细胞核的因子^[94,98]。共转染核激素受体、肝细胞核因子 4 及类维生素 A 的 X 受体 - 过氧化物酶体活化增殖因子 可使非肝细胞复制 HBV^[99]。

综上所述,随着分子生物学及其相关技术和手段的发展,以及其病毒受体研究的进展,对 HBV 病毒受体及其进入机制的了解正不断深入。这不仅具有理论上的重要意义,而且对于乙肝的治疗、预防策略的制定及抗病毒药物的研制都将发挥重要的指导作用,最终带来乙肝预防和治疗上的重大突破。

参考文献:

- [1] Seeger C, Mason W S. Hepatitis B virus biology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(1): 51 - 68.
- [2] Schneider - Schaulies J. Cellular receptor for viruses: links to tropism and pathogenesis [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (pt 6): 1413 - 1429.
- [3] De Meyer S, Gong Z J, Suwandhi W, et al. Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes [J]. *J Viral Hepat*, 1997, 4(3): 145 - 153.
- [4] 金奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001, 29 - 45.
- [5] Pontisso P, Petit M - A, Bankowski M J, et al. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus preS1 region and, via polymerized human serum albumin, for the preS2 region [J]. *J Virol*, 1989, 63(5): 1981 - 1988.
- [6] Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, et al. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre - S1 domain [J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 2052 - 2057.
- [7] Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, et al. A short N - proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus [J]. *J Virol*, 2001, 75(23): 11565 - 11572.

- [8] Prange R, Streeck R E. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins[J]. *EMBO J*, 1995, 14(2): 247 - 256.
- [9] Swameye I, Schaller H. Dual topology of the large envelope protein of duck hepatitis B virus: determinants preventing preS translocation and glycosylation [J]. *J Virol*, 1997, 71(12): 9434 - 9441.
- [10] Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, et al. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis [J]. *Intervirology*, 1996, 39(1 - 2): 23 - 31.
- [11] Neurath A R, Kent S B H, Strick N, et al. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus [J]. *Cell*, 1986, 46(3): 429 - 436.
- [12] Qiao M, Macnaughton T B, Gowans E J. Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line [J]. *Virology*, 1994, 201(2): 356 - 363.
- [13] Dash S, Rao K V S, Panda S K. Receptor for pre - S1 (21 - 47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus-cell interaction [J]. *J Med Virol*, 1992, 37(2): 116 - 121.
- [14] Kutter G, Kramer A, Schmidtke G, et al. Characterization of neutralizing anti - pre - S1 and anti - pre - S2 (HBV) monoclonal antibodies and their fragments [J]. *Mol Immunol*, 1999, 36(10): 669 - 683.
- [15] Maeng C Y, Ryu C J, Gripon P, et al. Fine mapping of virus - neutralizing epitopes on hepatitis B virus preS1 [J]. *Virology*, 2000, 270(1): 9 - 16.
- [16] Hui J, Mancini M, Li G, et al. Immunization with a plasmid encoding a modified hepatitis B surface antigen carrying the receptor binding site for hepatocytes [J]. *Vaccine*, 1999, 17(13 - 14): 1711 - 1718.
- [17] Neurath A R, Strick N. Antigenic mimicry of an immunoglobulin A epitope by a hepatitis B virus cell attachment site [J]. *Virology*, 1990, 178(2): 631 - 634.
- [18] Pontisso P, Ruvoletto M G, Tiribelli C, et al. The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross - react in their binding to the hepatocyte surface [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(pt 8): 2041 - 2045.
- [19] Ilan E, Burakova T, Dagan S, et al. The hepatitis B virus - trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti - HBV therapeutic agent [J]. *Hepatology*, 1999, 29(2): 553 - 562.
- [20] Calun E, Nahor O, Eid A, et al. Human interleukin - 6 facilitates hepatitis B virus infection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Virology*, 2000, 270(2): 299 - 309.
- [21] Neurath A R, Strick N, Sproul P. Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin - 6 on the virus envelope protein [J]. *J Exp Med*, 1992, 175(2): 461 - 469.
- [22] Neurath A R, Strick N, Li Y Y. Cells transfected with human interleukin - 6 cDNA acquire binding sites for the hepatitis B virus envelope protein [J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6): 1561 - 1569.
- [23] Heinz D, Peters M, Prange R, et al. Possible role of human interleukin - 6 and soluble interleukin - 6 receptor in hepatitis B virus infection [J]. *J Viral Hepatitis*, 2001, 8(3): 186 - 193.
- [24] Mabit H, Vons C, Dubanchet S, et al. Primary cultured normal human hepatocytes for hepatitis B virus (HBV) receptor studies [J]. *J Hepatol*, 1996, 24(4): 403 - 412.
- [25] Mabit H, Capel F, Vons C, et al. Identification of the 35 - kDa preS1 - binding protein as glyceraldehydes - 3 - phosphate dehydrogenase: involvement in the infection process of human hepatocytes with hepatitis B virus [J]. *J Hepatol*, 1994, 21 (Suppl. 1): S37.
- [26] Zang W Q, Fieno A M, Grant R A, et al. Identification of glyceraldehydes - 3 - phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element [J]. *Virology*, 1998, 248(1): 46 - 52.
- [27] Duclos Vallee J C, Capel F, Mabit H, et al. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehydes - 3 - phosphate dehydrogenase protein kinase activity [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79 (pt 7): 1665 - 1670.
- [28] De Falco S, Ruvoletto M G, Verdoliva A, et al. Cloning and expressing of a novel hepatitis B virus binding protein from HepG2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36613 - 36623.
- [29] Eisenberg C, Seta N, Appel M, et al. Asialoglycoprotein receptor in human isolated hepatocytes from normal liver and its apparent increase in liver with histological alterations [J]. *J Hepatol*, 1991, 13(3): 305 - 309.
- [30] Wu G Y, Wu C H. Receptor - mediated gene delivery and expression *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(29): 14621 - 14624.
- [31] Wu G Y, Zhang P, Rowell R J, et al. Modification of inactivated adenovirus with a targetable DNA carrier enhances foreign gene expression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatology*, 1992, 16: 12.
- [32] Treichel U, Meyer zum Buschenfelde K H, Stochert R J, et al. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carrier [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75 (pt 11): 3021 - 3029.
- [33] Treichel U, Meyer zum Buschenfelde K H, Dienes H P, et al. Receptor - mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(3): 493 - 498.
- [34] Wu G Y, Wu C H. Receptor - mediated delivery of foreign genes to hepatocytes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29: 243 - 248.
- [35] Eto T, Takahashi H. Enhanced inhibition of hepatitis B virus production by asialoglycoprotein receptor - directed interferon [J]. *Nat Med*, 1999, 5(5): 577 - 581.
- [36] Fiume L, Di Stefano G, Busi C, et al. Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor [J]. *J Viral Hepatol*, 1997, 4(6): 363 - 370.
- [37] Ryu C J, Cho D Y, Gripon P, et al. An 80 - kilodalton protein that binds to the pre - S1 domain of hepatitis B virus [J]. *J Virol*, 2000, 74(1): 110 - 116.
- [38] Harvey T J, Macnaughton T B, Park D S, et al. A cellular protein which binds hepatitis B virus but not hepatitis B surface antigen [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(pt 3): 607 - 615.
- [39] Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, et al. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre - S region of hepatitis B virus deoxyribonucleotide acid bears the receptor of polymerized human as well as chimpanzee albumins [J]. *Gastroenterology*, 1984, 86: 910 - 918.
- [40] Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, et al. Mapping of immunodomi-

- nant B - cell epitopes and the human serum albumin - binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (pt 2) :369 - 378.
- [41] 余涛, 蔡美英, 张子康. 正常人肝细胞中 HBV - PHSA 受体基因表达的研究[J]. *华西医科大学学报*, 1997, 28(3) :263 - 267.
- [42] Krone B, Lenz A, Heermann K H, et al. Interaction between hepatitis B surface proteins and monomeric human serum albumin [J]. *Hepatology*, 1990, 11(6) :1050 - 1056.
- [43] Budkowska A, Bedossa P, Groh F, et al. 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]. *J Virol*, 1995, 69(2) :840 - 848.
- [44] Haywood A M. Virus receptors: binding, adhesion, strengthening, and changes in viral structure[J]. *J Virol*, 1994, 68(1) :1 - 5.
- [45] Franco A, Paroli M, Testa U, et al. Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1992, 175(5) :1195 - 1205.
- [46] Cagliardi M C, Nisini R, Benvenuto R, et al. Soluble transferrin mediates targeting of hepatitis B envelope antigen to transferrin receptor and its presentation by activated T cells [J]. *Eur J Immunol*, 1994, 24(6) :1372 - 1376.
- [47] Hertogs K, Leeders W P J, Depla E, et al. Endonexin, present on human liver plasma membranes is specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein [J]. *Virology*, 1993, 197(2) :546 - 557.
- [48] De Meyer S, Depla E, Maertens G, et al. Characterization of small hepatitis B surface antigen epitopes involved in binding to human annexin V [J]. *J Viral Hepatol*, 1999, 6(4) :277 - 285.
- [49] De Meyer S, Gong Z J, Hertogs K, et al. Influence of the administration of human annexin V on *in vitro* binding of small hepatitis B surface antigen to human and to rat hepatocytes and on *in vitro* hepatitis B virus infection [J]. *J Viral Hepatol*, 2000, 7(2) :104 - 114.
- [50] De Bruin W C, Leeders W P, Moshage H, et al. Species specificity for HBsAg binding protein endonexin [J]. *J Hepatol*, 1996, 24(3) :265 - 270.
- [51] Gong Z J, De Meyer S, Van Pelt J, et al. Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver Annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection [J]. *Hepatology*, 1999, 29(2) :576 - 584.
- [52] Neurath A R, Strick N. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, binding to lipid components of HBV [J]. *Virology*, 1994, 204(1) :475 - 477.
- [53] De Meyer S, Gong Z - J, Depla E, et al. Involvement of phosphatidylserine and non - phospholipid components of the hepatitis B virus envelope in human annexin V binding and in HBV infection *in vitro* [J]. *J Hepatol*, 1999, 31(5) :783 - 790.
- [54] De Bruin W C, Hertogs K, Leeders W P, et al. Hepatitis B virus: specific binding and internalization of small HBsAg by human hepatocytes [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt 4) :1047 - 1050.
- [55] Mehdi H, Yang X, Peebles M E. An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently [J]. *Virology*, 1996, 217(1) :58 - 66.
- [56] Mehdi H, Nunn M, Steele D M, et al. Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H (2 - glycoprotein) [J]. *Gene*, 1991, 108(2) :293 - 298.
- [57] Mehdi H, Kaplan M J, Anlar F Y, et al. Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H [J]. *J Virol*, 1994, 68(4) :2415 - 2424.
- [58] Stefanis I, Rucheton M D, Angead A D, et al. Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H [J]. *Hepatology*, 2001, 33(1) :207 - 217.
- [59] De Falco S, Ruvo M, Verdoliva A, et al. N - terminal myristylation of HBV preS1 domain enhances receptor recognition [J]. *J Peptide Res*, 2001, 57(3) :390 - 400.
- [60] Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, et al. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity [J]. *Virology*, 1995, 213(2) :292 - 299.
- [61] Balasubramanian K, Chandra J, Schroit A J. Immune clearance of phosphatidylserine - expressing cells by phagocytes. The role of beta2 - glycoprotein I in macrophage recognition [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(49) :31113 - 31117.
- [62] Budkowska A, Quan C, Groh F, et al. Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor [J]. *J Virol*, 1993, 67(7) :4316 - 4322.
- [63] Budkowska A, Maillard P, Theret N, et al. Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T - lymphocyte [J]. *Virology*, 1997, 237(1) :10 - 22.
- [64] Yeager C L, Ashmun R A, Williams R K, et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E [J]. *Nature*, 1992, 357(6377) :420 - 422.
- [65] Gerlich W, Lu X, Heermann K H. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus [J]. *J Hepatol*, 1993, 17(suppl. 3) :S10 - S14.
- [66] Rodriguez Crespo I, Gomez Gutierrez J, Nieto M, et al. Prediction of a putative fusion peptide in the S protein of hepatitis B virus [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(pt 3) :637 - 639.
- [67] Neurath A R, Strick N, Sproul P, et al. Detection of receptors for hepatitis B virus on cells of extrahepatic origin [J]. *Virology*, 1990, 176(2) :448 - 457.
- [68] Lu X Y, Block T M, Gerlich W H. Protease - induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line [J]. *J Virol*, 1996, 70(4) :2277 - 2285.
- [69] Lu X, Hazboun T, Block T. Limited proteolysis induces woodchuck hepatitis virus infectivity for human Hep G2 cells [J]. *Virus Res*, 2001, 73(1) :27 - 40.
- [70] Ishikawa T, Ganem D. The pre - S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(14) :6259 - 6263.
- [71] Kuroki K, Cheung R, Marion P L, et al. A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles [J]. *J Virol*, 1994, 68(4) :2091 - 2096.
- [72] Tong S, Li J, Wands J R. Interaction between duck hepatitis B virus

- and a 170 - kilodalton cellular protein is mediated through a neutralizing epitope of the pre - S region and occurs during viral infection [J]. *J Virol* ,1995 ,69(11) :7106 - 7112.
- [73] Urban S , Kruse C , Multhaup G. A soluble form of the avian hepatitis B virus receptor[J]. *J Biol Chem* ,1999 ,274(9) :5707 - 5715.
- [74] Kuroki K , Eng F , Ishikawa T , et al. gp180 , a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particle , is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family[J]. *J Biol Chem* ,1995 ,270(25) :15022 - 15028.
- [75] Breiner K M , Urban S , Glass B , et al. Envelope protein - mediated down - regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes[J]. *J Virol* ,2001 ,75(1) :143 - 150.
- [76] Breiner K M , Urban S , Schaller H. Carboxypeptidase D (gp180) , a Golgi - resident protein , functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses[J]. *J Virol* ,1998 ,72(10) :8098 - 8104.
- [77] Tong S , Li J , Wands J R. Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor[J]. *J Virol* ,1999 ,73(10) :8696 - 8702.
- [78] Urban S , Breiner K M , Fehler F , et al. Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre - S subdomain with the cellular receptor gp180[J]. *J Virol* ,1998 ,72(10) :8089 - 8097.
- [79] Urban S , Schwarz C , Marx U C , et al. Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus - receptor interaction[J]. *EMBO J* ,2000 ,19(6) :1217 - 1227.
- [80] Breiner K M , Schaller H. Cellular receptor traffic is essential for productive duck hepatitis B virus infection [J]. *J Virol* ,2000 ,74(5) :2203 - 2209.
- [81] Berger E A , Murphy P M , Farber J M. Chemokine receptor as HIV - 1 coreceptors : roles in viral entry , tropism , and disease[J]. *Annu Rev Immunol* ,1999 ,17(1) :657 - 700.
- [82] Ishikawa T , Murakami K , Kido Y , et al. Cloning functional expressing , and chromosomal localization of the human and mouse gp180 - carboxypeptidase D - like enzyme [J]. *Gene* ,1998 ,215(2) :361 - 370.
- [83] Tan F , Rehli M , Krause S W. Sequence of human carboxypeptidase D reveals it to be a member of the regulatory carboxypeptidase family with three tandem active site domains [J]. *Biochem J* ,1997 ,327(pt 1) :81 - 87.
- [84] Xin X , Varlamov O , Day R , et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding rat carboxypeptidase D[J]. *DNA Cell Biol* ,1997 ,16 :897 - 909.
- [85] McGwire G B , Tan F , Michel B , et al. Identification of a membrane - bound carboxypeptidase as the mammalian homolog of duck gp180 , a hepatitis B virus - binding protein[J]. *Life Sci* ,1997 ,60(10) :715 - 724.
- [86] Li J S , Tong S P , Wands J R. Characterization of a 120 - kilodalton pre - S - binding protein as a candidate duck hepatitis B virus receptor[J]. *J Virol* ,1996 ,70(9) :6029 - 6035.
- [87] Li J S , Tong S P , Wands J R. Identification and expression of glycine decarboxylase (p120) as a duck hepatitis B virus pre - S envelope - binding protein [J]. *J Biol Chem* ,1999 ,274(39) :27658 - 27665.
- [88] Guo J T , Pugh J C. Monoclonal antibodies to a 55 - kilodalton protein present in duck liver inhibit infection of primary duck hepatocytes with duck hepatitis B virus [J]. *J Virol* ,1997 ,71(6) :4820 - 4831.
- [89] Grgacic E V L , 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]. *J Virol* ,2000 ,74(11) :5116 - 5122.
- [90] Kock J , Borst E M , Schlicht H J. Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment[J]. *J Virol* ,1996 ,70(9) :5827 - 5831.
- [91] Bchini R , Capel F , Dauguet C , et al. *In vitro* infection of human hepatoma (hep G2) cells with hepatitis B virus [J]. *J Virol* ,1990 ,64(6) :3025 - 3032.
- [92] Takahashi H , Fujimoto J , Hanada S , et al. Acute hepatitis in rats expressing human hepatitis B virus transgenes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1995 ,92(5) :1470 - 1474.
- [93] Zhai W R , Vajta G , Acs G , et al. A nude mouse model for the *in vivo* production of hepatitis B virus[J]. *Gastroenterology* ,1990 ,98 :470 - 477.
- [94] Guidotti L G , Matzke B , Schaller H , et al. High level hepatitis B virus replication in transgenic mice [J]. *J Virol* ,1995 ,69(10) :6158 - 6169.
- [95] Kock J , Nasal M , MacNelly S , et al. Efficient infection of primary Tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus [J]. *J Virol* ,2001 ,75(11) :5084 - 5089.
- [96] Wu C H , Ouyang E C , Walton C M , et al. Human hepatocytes transplanted into genetically immunocompetent rats are susceptible to infection by hepatitis B virus *in situ* [J]. *J Viral Hepatol* ,2001 ,8(2) :111 - 119.
- [97] Di Q , Summers J , Burch J B , et al. Major differences between WHV and HBV in the regulation of transcription[J]. *Virology* ,1997 ,229(1) :25 - 35.
- [98] Guidotti L G , Matzke B , Chisari F V. Hepatitis B virus replication is cell cycle independent during liver regeneration in transgenic mice [J]. *J Virol* ,1997 ,71(6) :4804 - 4808.
- [99] Tang H , McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2001 ,98(4) :1841 - 1846.