

病毒的细胞膜受体

郭爱珍 陆承平

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

Q939.402

Cell Membrane Receptor of Viruses

Guo Aizhen Lu Chengping

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

关键词 病毒, 受体, 细胞膜

Key words Virus, Receptor, Cell membrane

病毒受体是指能特异性地与病毒结合、介导病毒内化并促进病毒感染的细胞膜组份^[1]。受体决定病毒的宿主范围、组织及细胞嗜性。研究病毒受体对了解病毒感染机制、病毒病的预防与治疗、病毒分类等都具有十分重要的意义,因而近年来进展很快。本文拟对该领域研究成果作一综述,旨在为今后的研究提供参考。

1 病毒受体的特征

病毒受体与激素受体有类似之处,应具备特异性、高度亲合性、结合位点的有限性、靶细胞部位的局限性及生物学效应^[2],此外病毒受体还具有某些特殊性质。

1.1 特异性

受体存在于病毒敏感细胞的细胞膜上,与病毒的结合有一定的特异性。这种特异性有时非常精确,如鼠白血病病毒异生株(MuLV-E)的受体分子上第235位酪氨酸被脯氨酸取代后,受体将完全失活^[3]。但对某些受体而言,这种特异性并不十分严格,如柯萨奇B₃(Cox-B₃)与腺病毒2(Adeno-2)、柯萨奇A₂₁(Cox-A₂₁)与人鼻病毒4(HRV₄)分别共有相同的受体^[4],这可能与受体分子上有多个病毒结合位点有关。

1.2 亲合性

亲合性反映受体与病毒结合的稳定程度,一般采用放射分析法测定。根据Scatchard方程推算病毒受体结合的动力学参数如结合常数时,应考虑细胞膜上受体的分布及密度。而且病毒常常有1个以上的蛋白结合位点,能与受体多价结合。已测得Rauscher氏鼠白血病病毒(MuLV-R)的细胞结合常数为 $3.5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ ^[5],口蹄疫病毒(FMDV)为 10^{16}M^{-1} ^[4]。

1.3 受体位点的有限性与靶细胞部位的局限性

受体有限性是影响病毒受体分离纯化的因素之一。据估计Adeno-2的受体组份约占细胞膜总蛋白的0.015%^[6]。HeLa细胞上约有3000个脊髓灰质炎病毒(poliovirus)结合位

点^[7]。水泡性口炎病毒(VSV)与相应细胞 37℃作用 5 min 后,电镜观察发现病毒仅结合在细胞表面的被覆小凹(coated pit)上,并在这些特定部位被吞饮进入细胞^[4]。

1.4 受体的生物学效应

病毒与受体结合的结果是病毒内化进入细胞,感染靶细胞。虽然其间所发生的信号跨膜传导过程尚不清楚,但已经发现病毒入侵引起的一些生物学变化。病毒与受体结合初期,受体分子在细胞膜上重排,通过膜脂质双层的流动由受体单位(cell receptor unit, CRU)聚集成受体结合位点(cell receptor site, CRS),从而与病毒多价结合^[4]。

病毒与受体的初级吸附(initial binding)可逆,不稳定。次级吸附(secondary binding)是病毒感染限速步骤和必须步骤。此时,病毒受体的亲和力增加,因结合牢固,超速离心不能去除病毒。此外,病毒与靶细胞均发生一系列改变,如病毒沉淀系数变化,表现新的抗原特性,对蛋白酶敏感性增加等。受体细胞膜也发生相应改变,如水化、扭曲、紧张等。随后,融合发生,病毒被吞饮进入细胞^[1]。

上述受体的基本特征对鉴定受体而言仍不够全面,还需要分析受体的生化特征、克隆表达受体基因等。如果受体系统能在细胞外(如脂质体)和细胞内(受体基因在非敏感细胞上表达)重建,则可为受体鉴定提供最有说服力的证据。

2 病毒受体的本质

迄今为止,至少已研究了 30 种病毒的受体(表 1)。尽管受体可能是单个分子或多个分子的复合体,但从生化角度来说,不外乎蛋白聚糖、脂或糖脂、糖蛋白三种。

2.1 蛋白聚糖(proteoglycan)

动物细胞膜及结缔组织基底物质(ground substance)具有的蛋白聚糖是由一个蛋白质核心与一个或多个聚葡萄糖胺共价联系的大分子物质,聚糖为受体部分。已证明硫酸乙酰肝素蛋白聚糖为单纯疱疹病毒的细胞受体^[8]。

2.2 脂类(lipid)

细胞膜脂质双层的流动性在受体聚集时发挥重要作用。若将细胞固定,使细胞膜失去流动性,电镜观察时则看不到病毒的聚集吸附现象^[4]。有时细胞膜上裸露的脂类可能是某些病毒的受体,如仙台病毒受体为神经节苷脂^[9]。

2.3 糖蛋白(glycoprotein)

迄今发现的病毒受体大部分为糖蛋白,病毒的结合部分可能是蛋白部分或糖。糖蛋白可不同程度地糖基化,并被蛋白酶切割修饰,从而表现出多样性结构,具有作为受体的结构基础。事实正是如此,一定的动物细胞表达一定的糖蛋白,它们决定病毒的组织细胞嗜性。例如,CD₄ 为人免疫缺陷病毒(HIV)受体,在人淋巴细胞及脑细胞表达^[10];人鼻病毒(HRV)主要感染呼吸道,受体为 ICAM-1(细胞内粘连分子)^[11];EB 病毒结合补体 C_{3d} 的 II 型受体(CR₂)^[12],该受体在人淋巴细胞上表达;人麻疹病毒受体为 CD₄₆,在灵长类动物及人外分泌管与腺体的上皮细胞表达最多^[13,14]。

也有少数糖蛋白受体分子结构高度保守,广泛分布,如辛德毕斯病毒(sindbis virus)的受体高亲和力层粘连蛋白^[15],流感病毒的受体唾液酸糖蛋白^[16]等,决定病毒可以感染多种宿主动物。

前已提及,病毒受体可能是几个分子组成的复合体。这些分子的化学本质可能相同(如麻

疹病毒受体 CD₄₆与 Moesin 均为糖蛋白^[17],但也可能不同(如 HIV 受体除 CD₄ 外,还有半乳糖脑苷脂类^[18])。

需要特别指出的是,从生物学角度来说,受体并不是为病毒入侵而设计的,病毒不是受体的自然配体。动物或人类细胞的病毒受体为细胞膜正常成份,有其正常的生理功能。如 HIV 的受体 CD₄ 参与免疫识别,麻疹病毒受体 CD₄₆ 保护细胞免受补体介导的溶细胞作用,狂犬病病毒共用乙酰胆碱受体,辛德毕斯病毒与高亲和力层粘连蛋白受体相同, MuLV-E 受体为阳离子性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸)的运载体(CAT),猫白血病病毒受体为无机磷运载体等等。

3 研究受体的方法

鉴定受体概括地说至少应包括以下两方面的内容:①确定受体存在时病毒能结合和感染靶细胞;缺乏受体时,病毒则不能结合或感染靶细胞;②阐明自然状态下病毒与所鉴定的受体的相互作用^[8]。

一般说来,研究病毒受体可分为如下步骤:

3.1 选用对病毒敏感的细胞,并确定病毒与细胞结合的检测方法

传代细胞较稳定和均一,故常用于病毒受体的研究。但经长期传代,对某些病毒的受体可能丢失或改变。

病毒的某些特性可直接用于检测病毒受体的结合,而且操作简便。如血凝(正粘、副粘病毒^[4]),玫瑰花结形成(EB 病毒^[4]、麻疹病毒^[24])及病毒假型形成(反转录病毒与水泡性口炎病毒^[4])等。此外,电镜技术(透射电镜、扫描电镜、冰冻蚀刻等)可直接观察到病毒吸附与入侵时靶细胞的形态特征。标记技术结合显微技术可用于受体定位。放射受体标记法可用于动态

表 1 病毒受体举例

Table 1 Examples of virus receptors

病毒科	病毒	受体
腺病毒科	腺病毒-2	整合素 α ₅ β ₁ 与 α _v β ₃ ^[11]
冠状病毒科	鼠肝炎病毒	癌胚抗原家族成员,可能还有第二种受体 ^[11]
	猪传染性胃肠炎病毒	氨肽酶 N ^[11]
	人冠状病毒 229E 人冠状病毒 OC43 牛冠状病毒	N-乙酰-9-O-乙酰神经氨酸 ^[11]
疱疹病毒科	EB 病毒	2 型补体受体 CD ₂₁ (CR ₂) ^[12]
	单纯疱疹病毒	蛋白多糖中的硫酸乙酰肝素部分,可能还有第二种受体 ^[6]
	细胞巨化病毒	
	伪狂犬病毒 牛疱疹病毒	
正粘病毒科	A、B 型流感病毒	粘蛋白或神经节苷脂中的 N-乙酰神经氨酸 ^[1]
副粘病毒科	C 型流感病毒	N-乙酰-9-O-乙酰神经氨酸 ^[1]
	麻疹病毒	CD ₄₆ 、Moesin ^[17]
微 RNA 病毒科	脊髓灰质炎病毒	Ig 超家族成员 ^[7]
	人鼻病毒	细胞内粘附分子-1(ICAM-1) ^[11]
	人肠道孤儿病毒-1	整合素 VLA-2(α ₂ β ₁) ^[11]
	人免疫缺陷病毒	CD ₄ 与半乳糖脑苷脂类 ^[18]
	维士那病毒(Visna) 鼠白血病病毒	MHC-2 ^[19] 阳离子型 L-氨基酸运载体(CAT) ^[20]
反转录病毒科	长臂猿白血病病毒 猫白血病病毒 B	无机磷运载体 ^[20]
弹状病毒科	A 亚型禽白血病肉瘤病毒	一种膜相关蛋白,胞外区有一个 40 氨基酸残基的区域与低密度脂蛋白受体高度同源(80%以上) ^[21]
	狂犬病病毒	乙酰胆碱受体,为一种含 4 个亚单位的蛋白质 ^[22]
披膜病毒科	辛德毕斯病毒	高亲和力层粘连蛋白受体,为一种分子量为 67 kD 的粘分子 ^[15]
砂粒病毒科	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒	一种分子量为 120~140 kD,的糖蛋白 ^[23]

研究。

3.2 受体生化特性分析

生化特征分析可用完整细胞或细胞裂解液作材料,取决于受体的稳定性。分析方法包括生物化学方法及免疫学方法等。

3.2.1 蛋白酶酶解 蛋白酶酶解使受体失活,可揭示受体的蛋白质性质。受体对不同蛋白酶敏感性不一样。如 L₂ 鼠成纤维细胞经不同蛋白酶(胰蛋白酶、链霉蛋白酶、菠萝蛋白酶等)处理后与鼠肝炎病毒结合,其结合率分别为对照组的 62%、35%、28%^[4]。流感病毒受体为含唾液酸的糖蛋白,就是用此法确定的^[16]。

3.2.2 抑制蛋白糖基化 放线菌酮、衣霉素(tunicamycin)等可抑制 N-糖苷键的形成^[24]。利用这些抑制剂可证明受体活性与受体蛋白糖化有关。高碘酸盐可氧化受体中的单糖^[4]。

3.2.3 用抗受体抗体分离受体 将完整靶细胞或靶细胞膜免疫小鼠,筛选出能抑制病毒吸附与感染靶细胞的单克隆抗体即抗受体抗体。因为受体在细胞膜上含量很少,故能产生抗受体抗体的杂交瘤细胞比例很低,筛选工作量很大。麻疹病毒^[24]、脊髓灰质炎病毒^[25]等均先获得了抗受体抗体,而后用免疫亲和层析分离受体。

3.2.4 用抗独特型抗体鉴定受体 用病毒中和抗体制备的抗独特型抗体,其性质相当于模拟抗原或抗受体抗体,可用于鉴定、分离受体,如用狂犬病病毒抗独特型抗体鉴定其受体同乙酰胆碱受体^[22];用辛德比斯病毒抗独特型抗体证明其受体同高亲和力层粘连蛋白受体^[15]。

3.2.5 利用受体-病毒的特异性结合分离、鉴定受体 亲和层析是受体鉴定中最常用的方法。将病毒或病毒结合蛋白偶联到 Sepharose 4B 上,然后与完整细胞溶解液或细胞膜溶解液中的受体成份专一性结合,解脱组份即为病毒的细胞膜受体^[19]。

病毒结合胞膜蛋白印迹技术(virus overlay protein blot assay)系将细胞膜溶解物经 SDS-PAGE 分离,蛋白带转印至硝酸纤维素膜上;加病毒以便与受体特异性结合;然后通过病毒与标记抗体的结合鉴定病毒受体结合带^[26]。但受体分子为一种以上多肽组成的复合物时,此法不适用。

使用变性剂对细胞增溶时应考虑以下因素:受体系统的稳定性;纯化过程中去污剂可能带来的干扰;重建受体系统时是否容易去除去污剂,或者在有去污剂时能否检测受体系统^[27]。

如受体为碳水化合物,可使用薄层层析或脂质体技术。前者是用薄层层析法分离糖脂后,滴加病毒再检测它与病毒的结合情况。如怀疑某糖脂成分为病毒受体,则可将糖脂掺入脂质体中,然后检查脂质体与病毒结合的能力^[1]。

3.3 基因工程方法用于受体分析

基因工程方法常用于研究病毒受体,在受体易变性失活时尤为适用。如脊髓灰质炎病毒,生化研究表明其受体为一完整膜蛋白,但因受体不稳定,纯化未获成功,于是分离编码受体的基因,分析其核苷酸序列,推测到脊髓灰质炎病毒受体是免疫球蛋白超家族成员^[7]。

已知序列的受体分子可通过基因突变技术确定受体的病毒结合部位,如将 A 亚群禽白血病肉瘤病毒受体的第 35 与 50 位上的任一半胱氨酸替换为丙氨酸时,受体完全失活^[28]。说明受体的病毒结合区中少数氨基酸残基对保持受体活性必不可少。

3.4 受体系统的重建

重建受体系统是受体鉴定中的最后一步。将受体分子嵌入脂质体中,该脂质体应能获得

特异性吸附病毒的能力^[9];将受体基因转染非敏感细胞,该细胞应能表达受体,结合并感染相应病毒^[7]。

实际上,病毒受体的鉴定往往是多种方法相结合。如鉴定麻疹病毒受体为 CD₄₆时用了以下步骤^[29]:①证明受体为蛋白性质;②获得抗受体抗体;③用该抗体从细胞膜纯化出分子量为 57~67 kDa 的糖蛋白;④N-端氨基酸序列分析证明为 CD₄₆;⑤用含 CD₄₆ cDNA 的重组表达载体转染非敏感鼠细胞,使该细胞对麻疹病毒或其 H 与 F 蛋白重组病毒敏感。

此外受体鉴定还应考虑以下因素:

①病毒受体是细胞膜的跨膜成份,如跨膜蛋白,常与糖类、脂类等膜的其它成分紧密结合,不使用 Triton、NP-40、SDS 等变性剂很难将受体解离出来,而使用变性剂又易破坏受体的空间结构。且溶解后的细胞膜又易形成微球,重新将受体包裹在里面。

②病毒受体在细胞膜上的含量很少。有时虽然能用敏感的生物学方法检测出其活性,但却难以提纯到该组份。

③就病毒而言,其受体结合蛋白可能为囊膜糖蛋白(有囊膜病毒)或衣壳蛋白(无囊膜病毒)。囊膜蛋白在病毒提纯、保存过程中易遭破坏。

4 研究病毒受体的意义

目前的研究主要在致病机理的探讨方面。受体是病毒侵染细胞的门户,决定病毒的宿主范围及组织嗜性。越来越多受体分子的鉴定为病毒细胞嗜性奠定了分子基础。如 HIV-1 感染血细胞是因为血液中有大量 CD₄⁺T 细胞^[30]。CD₄ 与 HIV 的 gp120 结合介导 T 细胞凋亡 (apoptosis)^[31]。

既然动物或人类细胞的受体有其正常的生理功能,那么病毒与受体的结合是否会影响受体的正常功能?受体正常功能受影响后又如何影响病毒的致病作用?膜载体受体的研究成果可提供部分答案。膜载体受体作为载体,其氨基酸序列在真核生物中高度保守。但作为受体,与病毒结合的表位却变化很大。这种变化因只涉及到少数几个氨基酸残基,故一般不影响载体功能的发挥。如人细胞上的 CAT 与鼠 CAT 序列和结构都很相似,但人 CAT 无 MuLV-E 受体功能。不过 CAT 受体的氨基酸转运功能确因 MuLV-E 的结合而抑制^[3]。这种抑制对病毒致病的影响尚需进一步探讨。

病毒受体的研究对病毒的诊断、预防和治疗都有十分重要的意义,如已了解病毒的受体结合蛋白及细胞的病毒受体即可两面夹攻,一方面可封闭病毒的受体结合位点^[30],另一方面则可封闭受体,从而阻断受体与病毒的结合。另外还可将药物经受体导向到特定部位,发挥抗病毒作用^[32]。许多抗病毒病(包括艾滋病)的生物制剂将因此应运而生。

综上所述,病毒受体的研究尚处于初级阶段,但有可能给病毒致病、抗病毒治疗等方面的研究带来突破性进展,因而是当前病毒学的热门话题之一。

参 考 文 献

- 1 Haywood A M. Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *J Virol*, 1994;68(1):1~5
- 2 野尺义则, 香川靖雄著, 杨畔农译. 生物膜与疾病. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 38
- 3 Takayuki Yoshimoto, Eriko Yoshimoto, Daniel Meruelo. Identification of amino acid residues critical for infection, with ecotropic murine leukemia retrovirus. *J Virol*, 1993, 67(3):1310~1314
- 4 Lonberg-Holm K, Philipson L. Virus receptor, Part 2. Animal viruses. London: Chapman and Hall, 1981.
- 5 Kalyanaraman V S, Sarngadharan M G, Gallo R C. Characterization of Rauscher murine leukemia virus envelope glycoprotein receptor in membranes from murine fibroblasts. *J Virol*, 1978, 28(3):686~696
- 6 Hughes R C, Mautner V. Lancaster, In: Kent P ed, Membrane-mediated information. U. K: Medical and Technical Publishing Co, 1973. 104~125
- 7 Mendelsohn C L, Eckard Wimmer, Racaniello V R. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 1989, 56(10):855~865
- 8 Shieh M T, WuDunn D, Montgomery R I *et al.* Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol*, 1992, 116:1273~1281
- 9 Tsao Y S, Huang L. Kinetic studies of Sendai virus-target membrane interactions: independent analysis of binding and fusion. *Biochemistry*, 1986, 25:3971~3976
- 10 Sattentau Q J, Weiss R A. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell*, 1998, 52:631~633
- 11 Greve J M, Forte C P, Marlor C W *et al.* Mechanisms of receptor-mediated rhinovirus neutralization defined by two soluble forms of ICAM-1. *J Virol*, 1991, 65:6015~6138
- 12 McClure J E. Cellular receptor for Epstein-Barr virus. *Prog Med Virol*, 1992, 39:116~138
- 13 Wild T F, Naniche D, Raboudin-Combe C *et al.* Mode of entry of morbilliviruses. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44:267~270
- 14 Johnstone R W, Loveland B E, McKenzie I F C. Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology*, 1993, 79:341~347
- 15 Wang K S, Kuhn R J, Strauss E G *et al.* High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol*, 1992, 66:4992~5001
- 16 Herrler G, Rott R, Klenk H D *et al.* The Receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase. *EMBO J*, 1985, 4:1503~1506
- 17 Jurgen Schneider-Schaulies, Dunster Lee M, Reinhard Schwartz-Albiez *et al.* Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. *J Virol*, 1995;69(4):2248~2256
- 18 Fantini J, Cook D G, Nathanson N *et al.* Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:2700~2704
- 19 Dalziel R G, Hopkins J, Watt N J *et al.* Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J Gen Virol*, 1991, 72(8):1905~1991
- 20 Weiss R A, Taylor C S. Retrovirus receptors. *Cell*, 1995, 82:531~533
- 21 Lijun Rong, Paul Bates. Analysis of the subgroup A avian sarcoma and leukosis virus receptor: the 40-residue, cysteine-rich, low density lipoprotein receptor repeat motif of Tva is sufficient to mediate viral entry. *J Virol*, 1995, 69:4847~4853
- 22 Hanham C A, Zhao F, Tignor G H. Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *J Virol*, 1993, 67(1):530~542
- 23 Borrow P, Oldstone M B A. Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding proteins: a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol*, 1992, 66(12):7270~7281

- 24 Denise Nanche, Wild T F, Chantal Rabourdin - Combe *et al.* A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *J Gen Virol*, 1992, 73:2617-2624
- 25 Nobis P, Zibirre R, Meyer G *et al.* Production of a monoclonal antibody against an epitope on HeLa cells that is the functional poliovirus binding site. *J Gen Virol*, 1985, 8:2563-2569
- 26 Andrea Maisner, Jurgen Schneider - Schaulies, Liszewski M K. Binding of measles virus to membrane cofactor protein (CD₄₆): importance of disulfate bonds and N - glucans for the receptor function. *J Virol*, 1994, 68(10):6299-6304
- 27 王福安, 张学庸, 胡家露主编. 生物大分子的内化. 北京: 科学出版社, 1995. 59
- 28 Belanger C, Zingler K, Young J A T. Importance of cysteines in the LDLR-related domain of the subgroup - an avian leukosis and sarcoma virus receptor for viral entry. *J Virol*, 1995, 69(2):1019-1024
- 29 Denise Nanche, Gayathri Varior - Krishnan, Florence Cervoni *et al.* Human membrane cofactor protein (CD₄₆) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 1993, 67(10):6025-6032
- 30 项秉懿. HIV - 1 感染初始阶段的分子机制. *中国病毒学*, 1996, 11(1):9-16
- 31 Marina Radizzani, Paola Accornero, Annamaria Amidei *et al.* IL - 12 inhibits apoptosis induced in a human Th1 clone by gp120/CD₄ cross - linking and CD₃/TCR activation or by IL - 2 deprivation. *Cellular Immunology*, 1995, 161:14-21
- 32 张玲霞, 王慧芬, 李克等. 受体导向药物 L - HSA - AraAMP 的导向性及体外抗病毒效应的研究. *中国病毒学*, 1995, 10(4):280-288