

S

• 综 述 •

登革病毒受体的研究进展

肖 瑞*,江振友(暨南大学医学院微生物与免疫学教研室,广州 510632)

[摘要] 登革病毒(dengue virus, DEN virus)受体研究一直是登革病毒研究的热点之一,已提出的可能受体有蛋白质类、Fc受体类、乙酰硫酸肝素、与 CD14 相关的细胞表面结构(CD14-associated cell surface structure)等。近来,有关登革病毒在多种易感细胞上特异性受体成分的研究取得重大进展,已从多种登革病毒易感细胞株中分离出多个与登革病毒表面蛋白区域结合的受体组分;如热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)、GRP78(Bip)、LAMR1、DC-SIGN 等。本文就登革病毒相关细胞受体的最新研究进展作一综述。

[关键词] 登革热病毒;受体,病毒;综述文献

[中图分类号] R 373.33 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)01-0097-04

Recent advances in research of dengue virus receptors

XIAO Rui*, JIANG Zhen-you (Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] Dengue virus receptor is one of the hot issues in the investigation of dengue virus. The structures of many receptors, such as proteins, Fc-R, heparin sulphate and LPS/CD14-associated binding proteins, have been confirmed. Recently, great progress has been made in the research of some special receptors found in cells suseptible to dengue virus, and protein compositions binding to the virus membrane domain have been isolated from several susceptible cell lines. The candidates for the composition of the receptor can be catergorized into heat-shock protein, glucose regulated protein, laminin receptor, DC specific ICAM-3 grabbing non-integrin, etc. This article reviewed the recent advancements in the study of dengue virus receptors.

[KEY WORDS] dengue virus;receptors,virus;review literature

[Acad J Sec Mil Med Univ,2006,27(1):97-100]

登革病毒(dengue virus, DEN virus)属于黄病毒科,有 4 种血清型,经埃及伊蚊和白纹伊蚊传播。登革病毒感染可引起登革热(dengue fever, DF)、登革出血热(DHF)和登革休克综合征(DSS)。其中 DHF 和 DSS 已成为全球的主要问题,尤其是在热带和亚热带国家,威胁着全世界大约 40% 人口的健康。DF 是 1998 年后继疟疾后最重要的热带感染性疾病,WHO 估计登革病毒的感染每年导致 1 亿 DF、50 万 DHF 和 25 000 人死亡^[1]。登革病毒可以通过两种机制感染宿主细胞,即与病毒特异性抗体(IgG)形成病毒复合体与一些细胞上的 Fc 受体结合,或者病毒包膜表面糖蛋白直接与宿主细胞上特异性受体结合。对第一种机制的研究发现: DHF 或 DSS 时病毒滴度的增高与这种 IgG-Fc 介导的抗体增高有关^[2],而对于第二种机制的研究较少。此外,登革病毒可以感染不同组织来源的多种细胞,至今,可以从功能上把这些受体分为两种类型:第 1 种是氨基聚糖类,如硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS),它们是吸附病毒的始动因子,可以引起病毒颗粒的聚集和浓度的升高;第 2 种是一些相对分子质量大小不同的蛋白质^[3],对这些蛋白质空间结构的研究成为受体研究的重点。

1 登革病毒与靶细胞结合的自身结构:登革病毒包膜蛋白(E 蛋白)

病毒感染的早期现象是病毒的吸附及穿入。病毒吸附蛋白(virion attachment protein, VAP)与细胞膜表面特异性病毒受体的结合往往决定了病毒的组织、细胞亲嗜性及发病机制。登革病毒的 VAP 为包膜蛋白 E, X 射线晶体衍射技

术已明确了其三维结构^[4~6];E 蛋白是由两单聚体组成的同源二聚体,每个单聚体折叠成 3 个不同的区域:结构域 I 区是一个 β -桶状中心结构,由 8 个 β -折叠形成,两个二硫键起维持结构域稳定的作用;结构域 II 区是一个延伸的指状结构,可能与 E 蛋白二聚体的形成及膜融合过程相关;结构域 III 区为免疫球蛋白样折叠,由羧基末端区形成且延伸至病毒表面,含有大量天冬氨酸及碱性氨基酸,认为此结构域为细胞受体的结合位点;结构域 III 区在受体识别中起重要作用,研究显示此结构域的突变会引起病毒毒力的减弱,逃避机体的免疫捕获^[7]。结构域 III 的第 380~389 氨基酸合成的多肽,抑制了登革病毒与 C6/36 细胞的结合^[7]。但也有研究提出^[8]:E 蛋白 III 区对病毒与宿主细胞的结合作用并非具有独立性,相反,一个或者多个结构域 II 的氨基酸的改变可能在病毒最初的攻击中起主要作用。

2 登革病毒在 C6/36 细胞上的受体

登革病毒在自然界主要以埃及伊蚊和白纹伊蚊作为传播媒介。C6/36 细胞是从白纹伊蚊胚胎期分离出的一株细胞系,对登革病毒易感。Juan 等^[9]用放射标记的登革-4 型病毒在 C6/36 细胞上鉴定的受体的相对分子质量分别为 45 000 和 40 000;用高碘酸钠(sodium periodate, 能特异性去

[基金项目] 广东省科研课题(A2005340)。Supported by Science Research Foundation of Guangdong Province(A2005340)。
[作者简介] 肖 瑞,硕士生。E-mail: xiaorui-arrui@126.com

除蛋白分子上的糖链结构)处理 C6/36 细胞蛋白后做病毒覆盖蛋白结合分析(virus overlay protein bind assay,VOPBA)实验,发现 45 000 和 40 000 两蛋白条带都消失了,而在 35 000~37 000 处出现惟一的受体蛋白分子,推断 45 000 和 40 000 两分子是 35 000~37 000 处的蛋白分子不同糖基化水平生成的。Chee 等^[10]用 VOPBA 及质谱分析技术在 C6/36 细胞上鉴定出一个大小为 48 000 的微管蛋白样分子 D2BP,研究发现游离的 D2BP 可以抑制病毒与细胞的连接,提示此蛋白为登革病毒在 C6/36 细胞上的受体。因为登革病毒 E 蛋白上没有与微管相关蛋白(MAPs)及可以与微管蛋白结构相连接的驱动蛋白及动力蛋白相似的结构,现在还不清楚登革病毒是如何进入蚊细胞的。作者推测蚊细胞与登革病毒的最初作用是通过非蛋白-蛋白之间的连接(如通过 HS 或凝集素),这种连接造成了靶细胞空间构型的改变,从而有利于病毒 E 蛋白与 C6/36 上受体的连接及病毒的内化。在西尼罗病毒的研究中发现此蛋白在病毒入侵以后病毒颗粒的组装及转运中起作用,它通过与病毒的连接提供病毒颗粒组装的支架,由此推断此受体在登革病毒入侵后的复制过程中可能也有重要作用。

3 登革病毒在单核/巨噬细胞上的受体成分

已知单核/巨噬细胞(monocytes and macrophages)是登革病毒感染的主要靶细胞之一,且它的感染有利于病毒的扩散。Chen 等^[11]发现 LPS 可以阻断登革病毒感染单核/巨噬细胞,作者当时预测这种作用可能是因为 LPS 与细胞上连接结构相连,这些连接结构恰是登革病毒进入细胞的受体。对这种连接结构的预测最近得到证实。在登革病毒感染的单核/巨噬细胞细胞表面分离出 84 000 和 70 000~75 000 大小的两种蛋白,质谱分析表明分别为热休克蛋白 90(HSP90)和 HSP70^[3]。单核细胞上 HSP90 和 HSP70 的单克隆抗体的阳性结果表明上面有 HSP90 和 HSP70 的表达。感染抑制实验则提示两者只是登革病毒在单核/巨噬细胞上受体的一部分。HSP90 和 HSP70 有许多功能:如蛋白质折叠、多肽的免疫呈递、分子伴侣等。此外还可以表达于细胞膜表面作为细胞表面受体。作为细胞表面受体的 HSP90 和 HSP70 有两种作用:一是介导 LPS 样效应;二是在 LPS 作用于单核/巨噬细胞时作为一种 CD14 非依赖型细胞表面功能性受体。这可以解释为什么 LPS 可以阻断登革病毒对单核/巨噬细胞的感染;当 LPS 与单核/巨噬细胞作用时,封闭了细胞表面的 HSP90 和 HSP70 受体,这些受体同样也是登革病毒的受体,因此阻断了登革病毒的感染。

4 登革病毒在肝细胞上的受体

最近研究证实登革病毒可以感染肝细胞^[12]。Liu 等^[13]研究了登革病毒与 5 株肝细胞株(HuH-7、HA22、Hep3B、PLC、Chang liver)的相互作用,发现 HS 的类似物肝素,可以竞争性抑制登革病毒-2 在细胞中的复制。事实上,许多细胞表面均发现了高电荷的 HS,这是和肝素一样的氨基葡聚糖(glycosaminoglycans,GAGs),可以作为受体与所有 4 型登革病毒 E 蛋白结合。

除了以上 5 种肝细胞,经研究证实登革病毒感染 Vero、HL60、BMI3674 也是通过细胞表面的 GAGs^[14]。但有研究发现一些没有 GAG 的细胞仍然具有结合登革病毒的能力,且用肝素酶处理可以增加登革病毒的结合,表明 GAGs 并不是登革病毒感染细胞所必需的^[8]。事实上肝素为高度带电分子,它的抑制作用有可能是通过干扰靶细胞与病毒的相互作用而实现的^[13]。目前较为合理的解释是 HS 使病毒颗粒黏附于细胞,但这种黏附作用是可逆的,病毒需要特异性高亲和力受体才能最终进入靶细胞。

Jindadamrongwech 等^[15]通过 VOPBA 和质谱印迹等方法在登革病毒-2 感染的 HepG2 细胞膜上发现了葡萄糖调节蛋白 78[glucose regulated protein 78,GRP78(Bip)],可以和登革病毒 E 蛋白结构域 III 区上免疫球蛋白样结构连接。GRP78(Bip)是一种免疫球蛋白重链连接蛋白,与缺少轻链的免疫球蛋白的重链连接。多种细胞表面有 GRP78(Bip)的表达,它是细胞表面伴侣素的一种。在柯萨奇病毒(Coxsackie virus,CoxV)的研究中 GRP78(Bip)作为病毒共受体的一部分,参与病毒与细胞之间的相互作用。同样研究发现 GRP78 可能也只是登革病毒在肝细胞上受体的一部分。更深入的研究需要将 GRP78(Bip)的单克隆转染给一个对登革病毒非易感的细胞,观察此细胞系是否转化为对登革病毒的易感细胞系。

用同样的方法 Thepparit 等^[16]在登革病毒感染的 HepG2 上测出一个相对分子质量为大约 37 000 的分子,质谱测定仪分析表明此分子为 37 000/67 000 高亲和力的层粘连蛋白受体。37 000/67 000 是一种非整联蛋白性质的细胞表面受体分子,介导细胞与层粘连蛋白的相互作用,可以表达于正常人肝细胞的表面,在肝癌细胞此分子的表达会上调。37 000 是蛋白的前体,成熟以后为 67 000 大小分子的层粘连蛋白受体。已经证实 37 000/67 000 高亲和力的层粘连蛋白受体可以介导多种病原体的入侵,包括朊蛋白,节肢动物源性包膜 RNA 病毒。由 C6/36 细胞膜表面鉴定的大小为 32 000 的蛋白分子被推测为委内瑞拉马脑炎病毒在蚊细胞膜上的层粘连蛋白受体。通过体外感染抑制实验和直接的免疫抑制实验,发现此受体的单克隆抗体及可溶性层粘连蛋白均可抑制登革病毒 1 的感染,这种抑制作用呈剂量依赖性。但同样的抑制作用未出现在登革病毒 2、3、4,表明此受体有病毒的型的特异性。Tio 等^[17]的实验却表明可以与 37 000/67 000 laminin receptor (LAMR1)相互作用的是登革病毒 3、4 型。造成实验结果大相径庭的原因尚不清楚。

5 登革病毒在 DC 上的受体

已知树突状细胞(dendritic cell,DC)是登革病毒感染的靶细胞^[18]。表达于 DCs 表面的甘露糖特异的 C-型凝集素受体(DC specific ICAM-3 grabbing non-integrin,DC-SIGN),最近被证明是连接埃博拉病毒、巨细胞病毒及 HIV 与 DC 连接的受体成分^[19,20]。Navarro-Sanchez 等^[21]在研究了 DC 在登革病毒入侵过程中的作用后认为 DC-SIGN 起到了关键作用。作者用表达有 DC-SIGN 的未成熟 DCs 作研究细胞,结果显示这种细胞可以被登革病毒 1 感染。进一步的研究发

现 DC-SIGN 是通过本身的碳水化合物识别域(carbohydrate-recognition domain,CRD)与 DC 细胞膜表面富集甘露糖的低聚糖上的甘露糖残基相结合的。用 DC-SIGN CDR 特异性单克隆抗体 1B10 或 8A5 或其可溶性外功能区单克隆抗体可以减少 90%登革病毒感染,而登革病毒-E 蛋白的中和性单克隆抗体只减少了 70%的病毒的感染。用 THP-1 细胞及 THP-1/DC-SIGN 细胞(转染了 DC-SIGN 表面分子)研究发现:转染了 DC-SIGN 的 THP-1 细胞可以感染登革病毒且呈剂量依赖性。以上实验均表明:DC 是登革病毒的靶细胞,DC-SIGN 是登革病毒进入 DC 的分子基础。作为一种目前所知的机体内功能最强的抗原呈递细胞(antigen presenting cell,APC),同时又是激发初始 T 细胞反应的惟一细胞,DC 在包括病毒、细菌、寄生虫等病原体感染以及介导病毒的入侵,呈递病毒抗原,调节机体抗病毒免疫的过程中发挥极其重要的作用。但也有研究者提出,DC 的作用并不都是有利于机体清除病毒的。目前又发现一种与 DC-SIGN 密切相关的 C 型凝集素受体-DC-SIGN-related molecule, DC-SIGN/L-SIGN)^[22]。Tassaneetrithep 等^[23]的研究就证实 DC-SIGN 和 L-SIGN 可介导登革病毒的感染,不仅大量 DC 通过 DC-SIGN 和 L-SIGN 大量感染登革病毒,而且这些细胞还可以复制病毒,增强病毒感染。以至于非常微量病毒就能带来有效感染。

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^[24]。过去认为病毒与细胞的相互作用是通过病毒的某个成分直接识别和(或)通过病毒吸附蛋白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应用,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取得了很大的进展。事实上,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。病毒与受体的相互作用是一个非常复杂的过程,涉及到的受体往往不止一个。由于这种复杂性,不同的鉴别方法可能殊途同归,得到相同的结果,也可能得到不同的结果,这与其复杂性是相一致的。不同种病毒在同一细胞上的受体存在不一样的现象,有时甚至同一种病毒不同株系在同一细胞上的受体也有可能不一样。受体的研究一直是病毒研究领域中的热点问题之一,给予了人们更多的探索空间,在研究病毒致病机制、筛选药物、设计新型疫苗上都有不可忽视的作用。

[参 考 文 献]

[1] Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2: 33-42.

[2] McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections: pathogenesis and epidemiology[J]. Microbes Infect, 2000, 2: 1041-1050.

[3] Angel RM, Valle JR, Chavez-Salinas S, et al. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells[J]. J Virol, 2005, 79:

4557-4567.

[4] Modis Y, Ogata S, Harrison SC, et al. A ligand-binding pocket in the Dengue virus envelope glycoprotein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 6986-6991.

[5] Crill WD, Roehring JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of DEN E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells[J]. J Virol, 2001, 75: 4002-4007.

[6] Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, et al. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site[J]. J Virol, 2000, 74: 9601-9609.

[7] Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ. An external loop region of domain III of Dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells[J]. J Virol, 2004, 78: 378-388.

[8] Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, et al. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains[J]. Virus Res, 2001, 73: 81-89.

[9] Juan S, Salas-Benito JS, Rose M, et al. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus[J]. J Virol, 1997, 71: 7246-7252.

[10] Chee HE, AbuBakar S. Identification of a 48 kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 3: 11-17.

[11] Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry *via* a CD14-dependent mechanism[J]. J Virol, 1999, 73: 2650-2657.

[12] Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children[J]. Virchows Arch, 2001, 438: 107-115.

[13] Liu HS, Lin YL, Lei HY, et al. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines[J]. Antiviral Res, 2002, 56: 93-96.

[14] Marti'nez-Barraga'n JJ, Angel RM. Identification of a putative coeceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection[J]. J Virol, 2001, 75: 7818-7827.

[15] Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2[J]. Arch Virol, 2004, 149: 915-927.

[16] Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of Dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor[J]. J Virol, 2004, 78: 12647-12656.

[17] Tio PH, Jong WW, Cardoso MJ. Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3[J]. J Virol, 2005, 2: 25.

[18] Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2001, 6: 219-224.

[19] Delgado R, Alvarez CP, Lasala F, et al. C-type lectins DC-SIGN

and L-SIGN mediate cellular entry by Ebolavirus in cis and in trans[J]. J Virol,2002,76:6841-6844.

[20]

Geijtenbeek TB,Kwon DS,Torensma R,et al. DC-SIGN,a den-dritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T-cells[J]. Cell,2000,100:587-597.

[21]

Navarro-Sanchez E,Altmeyer R,Amara A,et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the pro-ductive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-de-rived dengue viruses[J]. EMBO Rep,2003,4:723-728.

[22]

Klimstra WB,Nangle EM,Smith MS. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distin-

guish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viru-ses[J]. J Virol,2003,77: 12022-12032.

[23]

Tassaneetrithep B,Burgess TH,Granelli-Piperno A. DC-SIGN (CD209) mediates Dengue virus infection of human dendritic cells[J]. J Exp Med,2003,197: 823- 829.

[24]

Schneider-Schaulies J. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 1413-1429.

[收稿日期]

2005-05-08

[修回日期]

2005-10-10

[本文编辑]

孙 岩

Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8⁺ CTL re-sponse by dendritic cell vaccine

Wu Y, Wan T, Zhou X, Wang B, Yang F, Li N, Chen G, Dai S, Liu S, Zhang M, Cao X (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Heat shock proteins (HSP) have been revealed to interact with antigen-presenting cells and have potent adju-vant capability to induce antigen-specific CD8⁺ CTL and Th1 responses. Our previous work shows how Hsp70-like protein 1 (Hsp70L1), as a new member of the Hsp70 subfamily, acts as potent Th1 adjuvant. Here, we report the efficient induction of tumor antigen-specific immune response by dendritic cells pulsed with recombinant fusion protein of Hsp70L1 and CEA₅₇₆₋₆₆₉ fragment of the carcinoembryonic antigen (CEA) containing CAP-1 (a HLA-A2-restricted CTL epitope). Fusion protein CEA₅₇₆₋₆₆₉-Hsp70L1 can promote dendritic cell maturation and activate dendritic cells to produce cytokines, such as interleukin-12, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha, and chemokines, such as macrophage inflammatory protein-1alpha, macrophage inflammatory protein-1beta, and regulated on activation, normal T expressed and secreted, indicating the adjuvant ability of Hsp70L1 in the fusion protein. CEA-specific HLA-A2. 1-restricted CD8⁺ CTLs either from patients with CEA⁺/HLA-A2. 1⁺ colon carcinoma or from splenocytes of immunized HLA-A2. 1/K^b transgenic mice can be generated more efficient-ly after stimulations or immunizations with dendritic cells pulsed by CEA₅₇₆₋₆₆₉-Hsp70L1 than with dendritic cells pulsed by CEA₅₇₆₋₆₆₉ alone, resulting in secreting more Th1 cytokine IFN-gamma and killing target cells more potently in an antigen-specif-ic and HLA-A2. 1-restricted manner. Adoptive transfer of splenocytes from transgenic mice immunized with CEA₅₇₆₋₆₆₉-Hsp70L1-pulsed dendritic cells can inhibit tumor growth and prolong survival in nude mice bearing CEA⁺/HLA-A2. 1⁺ human colon carcinoma more markedly. Therefore, Hsp70L1 has potent adjuvant effect in form of fusion protein, indicating that Hsp70L1 may be widely used as Th1 adjuvant to prepare antigenic fusion protein for the therapeutics of cancer or infectious dis-eases.

[Cancer Res,2005, 65: 4947-4954]