

整联蛋白与口蹄疫病毒感染*

独军政 常惠芸** 高闪电 才学鹏

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室
农业部畜禽病毒学重点开放实验室 国家口蹄疫参考实验室 兰州 730046)

摘要 整联蛋白是一类分布广泛的细胞表面受体家族,它不仅在细胞的生长、移行、增殖和分化等许多方面发挥重要生物学功能,而且在多种病理过程中发挥重要作用。许多病毒都能利用整联蛋白分子作为病毒受体或共受体进入宿主细胞。本文主要就整联蛋白的特征及其在口蹄疫病毒感染宿主细胞过程中的作用机制进行综述。

关键词 整联蛋白,口蹄疫病毒,细胞受体

中图分类号:Q71,Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0960-05

Integrin and Foot-and-mouth Disease Virus Infection*

DU Jun-Zheng CHANG Hui-Yun** GAO Shan-Dian CAI Xue-Peng

(National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

Abstract Integrins are a family of cell surface glycoproteins that contribute to a variety of biological functions, including cell growth, migration, proliferation and morphology. In addition, integrins also play the important roles in pathological process. Several viruses have been showed to use integrins as receptors or co-receptors to infect host cells. This article mainly reviews the progress on integrins and their roles in FMDV infection.

Key words Integrin, Foot-and-mouth disease virus, Cellular receptor

病毒受体是指位于细胞表面能够被病毒吸附蛋白识别并与之结合,参与病毒感染的分子复合物。病毒感染细胞的第一个步骤是病毒与被感染细胞表面病毒受体结合,在病毒受体的介导下,病毒粒子通过细胞的内吞等过程进入细胞内复制。病毒受体是决定病毒宿主特异性和组织嗜性的主要因素之一,其本质是糖蛋白、蛋白聚糖、脂类或糖脂,大多数属于蛋白质。病毒受体可以是单体也可以是多分子复合物,具有特异性、高亲和性、饱和性、结合位点的有限性等特性。在众多的病毒受体中,细胞表面的糖蛋白受体——整联蛋白(integrin)尤为引人注目。研究表明,许多病毒如口蹄疫病毒、腺病毒、轮状病毒、汉坦病毒、艾博拉病毒、柯萨奇病毒、人免疫缺陷病毒等均可利用整联蛋白分子作为受体或共受体(co-receptor)进入各自的宿主细胞^[1,2]。研究病毒受体的特性及其功能对于从分子

水平阐明病毒感染与免疫的机制、病毒与宿主细胞的相互关系具有重要意义。本文主要就整联蛋白的特征及其在口蹄疫病毒感染过程中的作用机制进行综述。

1 整联蛋白的特征

整联蛋白是一类分布广泛的细胞表面受体家族。该家族成员均是由 α 与 β 两个亚基以非共价键结合形成的异源二聚体穿膜糖蛋白。整联蛋白的亚基属于I型穿膜蛋白,含有一个大的胞外结构域和小的穿膜与胞浆结构域,每条链都包括胞外区、穿膜区和胞浆区3部分。 α 和 β 链的氨基末端形成的球形区域部分为细胞外配体结合域。 α 链的胞外区含有二价阳离子(Mg^{2+})结合部位,胞浆区与特异性底物结合。 β 链胞外区一般含有4个富含半胱氨酸的重复序列,其氨基末端的氨基酸残基则通过

* 国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2005CB523201)

** 通讯作者 Tel: 0931-8342052, E-mail: changhuiyun@126.com

收稿日期:2007-03-08,修回日期:2007-04-20

链内二硫键紧密折叠在一起,胞内结构域含有特殊的序列,参与细胞内外的信号转导、整联蛋白的激活和亚基构象的改变,可与细胞骨架相连发挥信号转导作用^[3](图 1)。目前已知该蛋白家族包括由 18 种不同的 α 亚基和 8 种 β 亚基形成的 24 种 $\alpha\beta$ 复合物,多数 α 亚基只能与一种 β 亚基结合组成异二聚体,而大部分 β 亚基则可以结合数种不同的 α 亚基,在这 24 种整联蛋白 $\alpha\beta$ 复合物中, $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 8$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha II\beta 3$ 8 种整联蛋白能够识别精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)序列而与其配体相互作用^[4]。整联蛋白的表达分布具有明显的细胞类型特异性。一种细胞可同时表达 2~10 种不同的整联蛋白,但不同类型的细胞表达整联蛋白的种类是不同的。

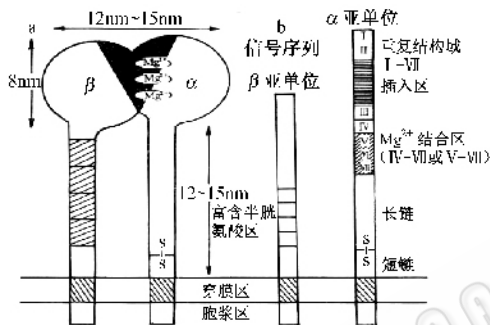


图 1 整联蛋白结构示意图

注: a 整联蛋白分子电镜下所见(模式图), 黑区部分显示整联蛋白分子 α 、 β 亚单位所组成的配体结合域; b 整联蛋白分子结构模式图

整联蛋白家族的配体主要是某些细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分, 参与介导细胞与 ECM 间的相互作用及转导细胞内外信号。整联蛋白的胞外区与 ECM 相连, 胞浆区由 β 链与细胞骨架相连形成焦点黏附物介导细胞内外双向信号的传递^[5]。整联蛋白介导的信号转导有 2 种方式: 1 是整联蛋白通过重组细胞骨架, 改变细胞的形状和结构来传递信号; 2 是整联蛋白与配体结合产生细胞内的生化信号, 其中第 2 种方式可能通过以下途径 (1) 对磷脂酶和脂类激酶的激活 (2) 对胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 离子浓度的调节 (3) 对多种蛋白激酶 (包括黏附斑蛋白激酶、有丝分裂原激活的蛋白激酶、整合素连接蛋白激酶等) 的激活, 其中对黏附斑蛋白激酶 (Focal adhesion kinase, FAK) 途径的研究是目前该领域的研究热点。整联蛋白聚集在黏附斑同 FAK、酪氨酸蛋白激酶 (Src family) 等形成黏附

斑化合物并激活传导分子及一系列传导通路,改变细胞骨架结构引起细胞内信息分子激活,如整联蛋白的胞浆区可与裸蛋白和 α -辅肌动蛋白相连,直接或间接与肌动蛋白微丝相连,将信号传递到细胞骨架引起细胞骨架变形,从而增强特定基因和转录因子的相互作用,导致 DNA 解链并激活蛋白翻译过程^[6]。整联蛋白作为 FMDV 的受体在病毒感染细胞过程中引发何种信号转导途径目前尚无证据。

整联蛋白广泛分布于生物体的组织细胞中,能与许多 ECM 成分如纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原蛋白结合,具有广泛的生物学活性,在细胞的生长、移行、增殖和分化等许多方面发挥重要作用,并在多种病理过程中发挥重要作用,如淋巴细胞向炎症部位的聚集及肿瘤细胞的浸润等^[7,8]。整联蛋白的机能缺陷可导致严重的疾病,如淋巴细胞粘附缺陷、血小板机能不全等症。值得注意的是,通过大量对整联蛋白与病毒感染关系的研究发现,许多病毒都能利用整联蛋白分子作为病毒受体或共受体(co-receptor)进入宿主细胞,在病毒与宿主细胞相互作用的过程中发挥了很大作用^[9,10]。

2 整联蛋白介导口蹄疫病毒感染

口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 属小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属。FMDV 呈球形, 无囊膜, 完整的病毒由衣壳包裹一个分子的 RNA 组成, 衣壳是二十面体, 由 4 种结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 组成的 60 个不对称原粒构成, 其中 VP1、VP2 和 VP3 位于衣壳表面, 而 VP4 则完全位于衣壳里面。病毒粒子表面明显的特征是由 VP1 140-160 位的 β G 和 β H 链形成的 G-H 环突出于表面, G-H 环含有高度保守的 RGD 基序, 这一基序既是病毒重要的中和位点, 又是细胞吸附位点的主要部分 (图 2)。整联蛋白分子可与含有 RGD 基序的蛋白配体结合, 而 RGD 基序在 FMDV 的 G-H 环中高度保守, 这是整联蛋白成为 FMDV 受体的分子基础^[11] (图 3)。已有的研究表明, 至少有 α v β 3、 α v β 6、 α v β 1、 α v β 8 4 种整联蛋白能与 G-H 环上的 RGD 基序作用介导口蹄疫病毒的感染^[12~15]。

1995 年, Berinstein 等^[12]发现人源玻连蛋白 (vitronectin) 受体 $\alpha\beta 3$ 的抗血清和 $\alpha\beta 3$ 的单克隆抗体均能阻断 FMDV 对易感细胞的感染, 由此人们认为 $\alpha\beta 3$ 是该病毒的细胞受体。这是第一个被发现

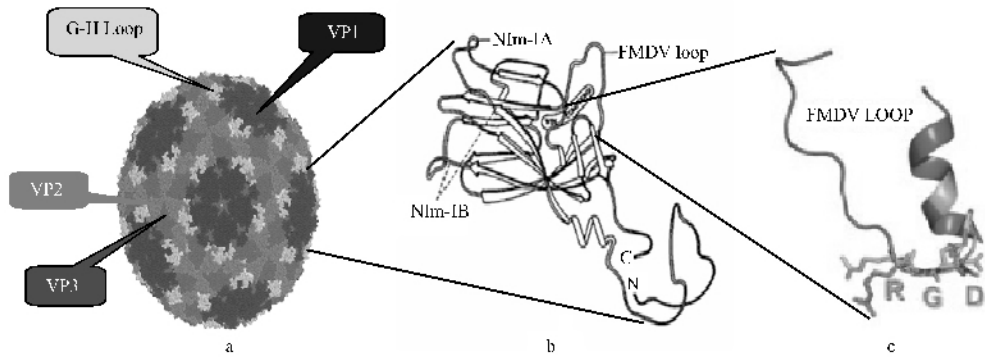


图2 口蹄疫病毒结构示意图

a 口蹄疫病毒 X 射线衍射图; b VP1 的结构; c G-H 环的结构



图3 口蹄疫病毒 G-H 环与受体相互作用模式图

a G-H 环与整联蛋白分子(α , β 亚基)的作用模式; b a 图局部放大

的 FMDV 受体。整联蛋白的 α_v 和 β_3 亚基均有自己特异的配体结合域,可与配体直接相互作用。虽然体外实验证明 FMDV 可以利用人源整联蛋白作为受体进入细胞,但这种病毒并不引起人类的疾病,为了阐明 FMDV 与自然宿主(牛)的相互作用关系, Neff 等^[16]对人和牛的 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白亚单位分子的序列进行了比较,发现人和牛的 α_v 亚基氨基酸序列同源性为 98.8%,而 β_3 亚基的同源性仅为 93%。他们将编码 α_v 和 β_3 亚基的 cDNA 转染 K562 和 CHO 细胞后,这两种 FMDV 非允许细胞对病毒的感染性大大提高,且牛 $\alpha_v\beta_3$ 介导病毒感染的效率高于人 $\alpha_v\beta_3$,说明 FMDV 的宿主范围在一定程度上与它结合自然宿主整联蛋白分子的能力有关。研究发现 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白可能是病毒的吸附受体,因为 α_v 或 β_3 亚基胞内结构域的缺失并未影响病毒的感染效率,推测可能还有其他的细胞表面分子作为共受体,在

病毒的内化过程中发挥作用^[17]。X 射线衍射研究表明,整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 胞外部分具有 12 个不同的结构域,其中 α 亚基上有 4 个, β 亚基上有 8 个,形成了具有卵形头部及两条尾巴的功能分子,尾部是其活性的关键,与细胞的调控机制有关,且在 β_A 结构域具有一个依赖金属离子的吸附位点(metal ion-dependent adhesion site, MIDAS),位于具有调节作用的钙离子结合位点附近^[18]。

$\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白仅在上皮细胞中表达,且在舌上皮细胞和唾液腺中表达量大,但在皮肤和肺上皮细胞表达水平较低。2000 年, Jackson 等^[13]发现正常情况下不感染 FMDV 的人结肠癌细胞 SW480 在转染了人源整联蛋白 β_6 cDNA 后,即变得对 FMDV 易感,且这种感染可被抗 $\alpha_v\beta_6$ 的单克隆抗体可抑制,由此证实 $\alpha_v\beta_6$ 是 FMDV 的又一功能受体。 β_6 亚基仅形成一种异二聚体即 $\alpha_v\beta_6$ 人的子宫、膀胱、呼吸

道和唾液腺等不同部位的上皮细胞都发现有 $\alpha\beta 36$ 表达。牛在感染 FMDV 后, $\alpha\beta 36$ 在病毒靶器官的上皮细胞表面可持续性表达, 此时却检测不到 $\alpha\beta 33$ 分子的表达, 这表明 $\alpha\beta 36$ 可能在 FMDV 感染的初始阶段起重要作用^[19]。最新研究表明, $\alpha\beta 36$ 整联蛋白不仅在 FMDV 吸附细胞的过程中起作用, 而且在病毒的脱壳、复制等过程中也发挥着重要功能^[20]。已经证实, 整联蛋白胞浆域的保守基序“NPLY”在细胞信号转导过程中扮演重要角色。Neff 等^[17]将人源 $\beta 6$ 胞浆域 C 末端大部分氨基酸残基或包含“NPLY”基序的核心区去掉后, $\alpha\beta 36$ 则不能正常介导 FMDV 感染。

$\alpha\beta 31$ 整联蛋白的表达仅局限于少数特定细胞。虽然某些细胞会大量表达 $\alpha\gamma$ 和 $\beta 1$ 亚基, 但不表达 $\alpha\beta 31$ 异二聚体, 这给 $\alpha\beta 31$ 的研究带来了困难, 因此有关 $\alpha\beta 31$ 的研究报道较少。2002 年, Jackson 等^[14]发现 $\alpha 5$ 亚基表达缺陷的 CHO2 细胞在正常情况下不能被 FMDV 感染, 当用人源 $\alpha\gamma$ cDNA 转染 CHO2 细胞后, 该细胞开始表达异源整联蛋白 $\alpha\beta 31$ (人 $\alpha\gamma$ /仓鼠 $\beta 1$), 并对 FMDV 变得易感, 这证明 $\alpha\beta 31$ 也是 FMDV 的功能受体。他们进一步研究发现由 $\alpha\beta 31$ 介导的病毒吸附可被抗 $\alpha\gamma$ 的单克隆抗体或含有 RGD 序列的短肽阻断, 从而证实了 $\alpha\gamma$ 亚基上具有病毒的主要结合部位。 $\alpha\beta 31$ 整联蛋白在生理状态的钙和镁离子浓度下是无效的, 但用锰离子或是有激活作用的抗 $\beta 1$ 抗体作用于表达 $\alpha\beta 31$ 的细胞后, FMDV 对细胞的感染性会显著提高。由此推测, FMDV 以 $\alpha\beta 31$ 作为病毒受体的能力可能会依赖于整联蛋白分子与配体结合的细胞调控机制。

2002 年, Mu 等研究发现 $\alpha\beta 38$ 整联蛋白是潜伏相关性蛋白 (latency-associated protein-1, LAP-1) 的受体, 而 LAP-1 的 RGD (RGDLATI) 基序与 FMDV 的 RGD (RGDLQVL) 基序比较相似, 由此人们推测 $\alpha\beta 38$ 整联蛋白可能是 FMDV 的另一受体^[21]。2004 年, Jackson 等^[15]将人源 $\beta 8$ cDNA 转染到 FMDV 非允许细胞 SW480, 当此细胞表面表达了 $\alpha\beta 38$ 整联蛋白后, FMDV 即可有效地感染该细胞, 但用针对 $\alpha\beta 38$ 异二聚体或 $\alpha\gamma$ 亚基的特异单克隆抗体处理该细胞后感染便被阻断, 从而证实, $\alpha\beta 38$ 是继 $\alpha\beta 33$ 、 $\alpha\beta 36$ 、 $\alpha\beta 31$ 后发现的第四种 FMDV 功能受体。同时, 他们构建了分别表达人源嵌合整联蛋白 $\alpha\beta 38/6$ 与 $\alpha\beta 36/8$ 的细胞模型, 通过比较二者介导 FMDV 感染的效率,

发现 $\beta 6$ 亚基胞浆域可有效代替 $\beta 8$ 的胞浆域, 而用 $\beta 8$ 亚基胞浆域代替 $\beta 6$ 的胞浆域时病毒对细胞的吸附能力大大减弱, 不能引起感染。在哺乳动物, 整联蛋白 $\alpha\beta 38$ 与 $\alpha\beta 36$ 均分布在组织器官的上皮细胞, 推测二者在 FMDV 感染过程中的角色相似。

3 小结

FMDV 除了可通过整联蛋白作为病毒受体进入细胞外, 还可利用硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 作为受体。近年来, 有人提出了 FMDV 存在第 3 类受体的假设。如 Baxt 等发现 FMDV 可利用 Fc 受体吸附巨噬细胞; Rieder 等利用基因重组将一种能与病毒结合的单链抗体 (single-chain antibody, scAb) 与细胞粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM 1) 融合, 产生了一种新的 FMDV 受体 (scAb/ICAM 1)^[22]。同样, 就病毒本身而言, 除 RGD 基序外人们又发现了几种新的细胞吸附位点, 如 Martinez 等发现当 FMDV 的细胞吸附位点由 RGD 变为 RGE 后, 病毒仍可在细胞中正常复制; Zhao 等用 FMDV A12 感染性克隆与 O/CHA/90 及其细胞适应株 vac-O/CHA/90 的 cDNA 构建嵌合病毒, 当将 RGD 人工突变为 KGE 后, 在排除利用 HS 的情况下嵌合病毒仍可在培养细胞中生长^[23]; 另外一些已发现的 FMDV 细胞吸附位点的自然突变体有 GGD、TGD、RDD、PGD、KGN、RSG、KGD、IGD 等^[24]。由此可见, 存在第 3 类 FMDV 受体是完全有可能的, 分离和鉴定该类受体将是很有意义的研究方向。不可否认的是, 整联蛋白在 FMDV 的感染过程中具有重要地位, 至于整联蛋白与其他 FMDV 受体分子如何协调发挥作用尚待更为深入的研究。截止目前, 虽然人们对整联蛋白在 FMDV 与宿主细胞相互作用中的角色做了一些研究, 但对于许多问题尚难做出解释, 如病毒感染细胞后的信号转导途径、不同整联蛋白介导病毒感染的能力、整联蛋白与病毒宿主嗜性的关系等。总之, 开展这一领域的研究, 将对病毒的感染免疫机制、病毒与细胞的作用关系、研制抗病毒疫苗以及抗病毒药物等诸多课题的研究铺平道路。

参考文献

- [1] Takada A, Watanabe S, Ito H, et al. Virology, 2000, 278: 20 ~ 26.
- [2] Gidycz, et al. J Virol, 1999, 73: 10000 ~ 10005.

- 73 3951 ~ 3959.
- [3] Hynes R O. Cell , 2002 , **110** :673 ~ 687.
- [4] Ruoslahti E. Annu Rev Cell Dev Biol , 1996 , **12** :697 ~ 715.
- [5] Kim M , Carman C , Springer T A. Science , 2003 , **301** :1720 ~ 1725.
- [6] Giancotti F G. Dev cell , 2003 , **4** :149 ~ 151.
- [7] Hehlhans S , Haase M , Cordes N. Biochim Biophys Acta , 2007 , **1775** (1) :163 ~ 180.
- [8] Moissoglou K , Schwartz M A. Biol Cell , 2006 , **98** (9) :547 ~ 555.
- [9] Sieczkarski S B , Whittaker G R. Curr Top Microbiol Immunol , 2004 , **285** :1 ~ 23.
- [10] Schneider-Schaulies J. J Gen Virol , 2000 , **81** :1413 ~ 1429.
- [11] Jackson T , King A M , Stuart D I , *et al.* Virus Res , 2003 , **91** :33 ~ 46.
- [12] Berinstein A , Roivainen M , Hovi T , *et al.* J Virol , 1995 , **69** :2664 ~ 2666.
- [13] Jackson T , Sheppard D , Denyer M , *et al.* J Virol , 2000 , **74** :4949 ~ 4956.
- [14] Jackson T , Mould A P , Sheppard D , *et al.* J Virol , 2002 , **76** :935 ~ 941.
- [15] Jackson T , Clark S , Berryman S , *et al.* J Virol , 2004 , **78** :4533 ~ 4540.
- [16] Neff S , Mason P W , and Baxt B. 2000 , J Virol , **74** :7298 ~ 7306.
- [17] Neff S , Baxt B. J Virol , 2001 , **75** :527 ~ 532.
- [18] Xiong J P , Stehle T , Diefenbach B , *et al.* Science , 2001 , **294** :399 ~ 345.
- [19] Monaghan P , Gold S , Simpson J , *et al.* J Gen Virol , 2005 , **86** :2769 ~ 2780.
- [20] Berryman S , Clark S , Monaghan P , *et al.* J Virol , 2005 , **79** :8519 ~ 8534.
- [21] Mu D , Cambier S , Fjellbirkeland L , *et al.* J Cell Biol , 2002 , **157** :493 ~ 507.
- [22] Rieder E , Berinstein A , Baxt B , *et al.* Proc Natl Acad Sci USA , 1996 , **93** :10428 ~ 10433.
- [23] Zhao Q Z , Pacheco J M , Mason P W. J Virol , 2003 , **77** :3269 ~ 3280.
- [24] Carrillo C , Tulman E R , Delhon G , *et al.* J virol , 2005 , **79** :6487 ~ 6504.