

- their distribution in serum and their role in the uptake of lipoproteins by reticuloendothelial cells. *Acta Universitatis Upsaliensis*, 1986; **57**: 1
- 5 张林华, 刘秉文. 大鼠肝非实质细胞载脂蛋白CⅢ结合位点(受体)的研究. 华西医科大学学报, 1992; **23** (3): 23
- 6 刘秉文, 傅明德, 刘婉珍等. 人血浆载脂蛋白CⅠ, CⅡ及CⅢ的分离与鉴定. 华西医科大学学报, 1986; **17**: 81
- 7 刘秉文, 张林华, 刘婉珍等. 人血清载脂蛋白CⅢ放射免疫测定法的研究. 华西医科大学学报, 1987; **18**: 1
- 8 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. 生物化学与生物物理学报, 1989; **21** (3): 257
- 9 Ray T K. A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1970; **196**: 1
- 10 张林华, 刘秉文, 蓝天鹤. 大鼠肝细胞膜高密度脂蛋白受体的研究. 生物化学与生物物理进展, 1991; **18**: 42
- 11 Weinberg R, Patton C. Binding of human apolipoprotein AⅣ to human hepatocellular plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1990; **1044**: 255

## Study of apoCⅢ-Binding Sites of Human and Mouse Hepatic Plasma Membranes

Fang Dingzhi     Liu Bingwen

(Department of Biochemistry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

### ABSTRACT

A specific, sensitive and simple radioligand binding assay for apoCⅢ-binding sites of hepatic plasma membranes has been established by separation of B/F with PEG. Addition of increasing concentration of  $^{125}\text{I}$ -labeled apoCⅢ to human hepatic plasma membranes revealed saturation binding to membranes with a  $K_d$  of  $0.31 \mu\text{mol/L}$  ( $3.1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ ) and binding maximum of  $1.74 \mu\text{g/mg}$  of membrane protein. In displacement studies using unlabeled apoCⅢ and isolated lipoproteins HDL, LDL and VLDL, only apoCⅢ and VLDL effectively competed with  $^{125}\text{I}$ -apoCⅢ for membrane binding sites. The binding of  $^{125}\text{I}$ -apoCⅢ to human liver plasma membranes was  $\text{Ca}^{2+}$ -independent and was abolished when plasma membranes were treated with trypsin. The characteristics of apoCⅢ-binding sites of mouse liver plasma membranes was similar to that of human liver plasma membranes with an exception of binding maximum of  $1.52 \mu\text{g/mg}$  of membrane protein.

**Key words** apoCⅢ binding sites (receptors), hepatic plasma membranes, radioligand assay

## 嗜肝病毒家族成员间进化关系的初步研究\*

吴玉章 朱锡华

(第三军医大学免疫学教研室, 重庆 630038)

### 提 要

比较分析了嗜肝病毒家族四成员间的全基因核苷酸序列, 得出了它们之间的相对进化距离, DHBV 分野最早, GSHV, WHV 次之, HBV 最晚; 其进化方式属趋

\* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1992-02-29 修回日期: 1992-06-13

异性进化. 进一步比较各 ORF 的保守性, 发现各 ORF 间及同一 ORF 内的不同区域核苷酸发生替换的频率有明显差别; 讨论了各 ORF 的特点及意义.

**关键词** 嗜肝病毒家族, 分子进化, 核苷酸序列比较

嗜肝病毒家族(hepadana virus family)包括人乙型肝炎病毒(HBV)、土拨鼠肝炎病毒(WHV)、地松鼠肝炎病毒(GSHV)和鸭乙型肝炎病毒(DHBV). 虽然这些病毒具有一些共同特征如超微结构、抗原组成、DNA 大小等, 但侵犯宿主截然不同, 致病性有很大差异. WHV 是最强的致癌病毒, 一半以上感染动物发生肝细胞癌; 相比之下 GSHV 所致病变较轻且很少致癌; HBV 致病有明显的肝炎—肝硬化—肝癌三部曲, 而在其它病毒则见不到这种情况. 因此, 在分子水平上分析它们的进化关系有助于了解 HBV 的致病原理, 为深入研究其分子免疫学提供线索.

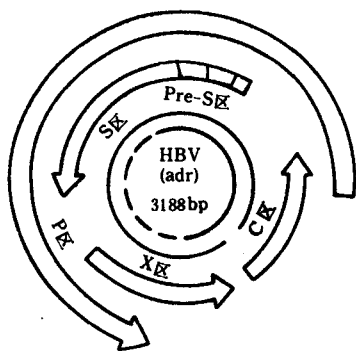


图 1 HBV 的基因结构

Fig. 1 The genome structure of hepatitis B virus

图内圈的双线环表示病毒部分双链的 DNA 分子; 虚线表示 S 链的缺损部分. 各 ORF 用带箭头的实线框表示

The incomplete double-stranded DNA molecule in virion with the cohesive region is drawn as the inner double circle; the dashed line is the deleted region with the S strand, making an overall partially double

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HBV, WHV, GSHV 和 DHBV 基因组的核苷酸序列分别引自文献 [1—4].

## 1.2 方法

1.2.1 基因组结构的比较 采用 Staden 程序, 在 IBM-PC/AT 机上进行<sup>[5]</sup>.

1.2.2 相对进化距离的计算 用 Jukes 方案<sup>[6]</sup>, 以单个开放阅读框架(ORF)分别进行.

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因结构和核苷酸序列的比较

嗜肝病毒家族成员的基因结构相似: 都是部分双链的 DNA 分子; 都含 4 个开放阅读框架(ORF): S, C, X, P; 且 S ORF 均可分为 S 区和 Pre-S 区. 但 DNA 分子大小略有不同: HBV<sub>adr</sub> 为 3188bp, WHV 3320bp, GSHV 3311bp, DHBV 3021bp; 在 DHBVX 和 C ORF 成为 X/C ORF. 图 1 所示的是 HBV<sub>adr</sub> 的基因结构图.

使用 Staden 计算程序比较四种病毒的核苷酸序列, 结果如图 2 所示. 除少数区域外 HBV 与 WHV, GSHV 的同源性达 62—70%, 与 DHBV 的同源性在绝大多数区域在 40% 以下, 但在四个区段即 DHBV 的 100—200, 300—500, 600—800, 1300—2100 则相对保守, 同源性达 50%. 说明上述序列在保持嗜肝病毒家族的基本特性方面可能有重要性.

四种病毒 L 链都有四个 ORF 且位置相同. 通过比较各 ORF 间的核苷酸替换率发现: 不同 ORF 间的核苷酸替换率有明显不同; S ORF 和 X—C 间的非编码区核苷酸替换率很低; C ORF 中心区的核苷酸替换引起氨基酸残基改变的频率高, C ORF 其它区域则多为沉默突变, 推测这可能与该 ORF 的结构有关; X ORF 的保守力最差, 其核苷酸替换往往引起氨基酸残基的改变; 各 ORF 间的交叠区有一定特性. 如假设每个 ORF 有各自的进化动力, 那么该类地区受双重选择力的作用. 本文的计算结果表明: 在 Pre-S 和 Pol 交叠区替换常发生

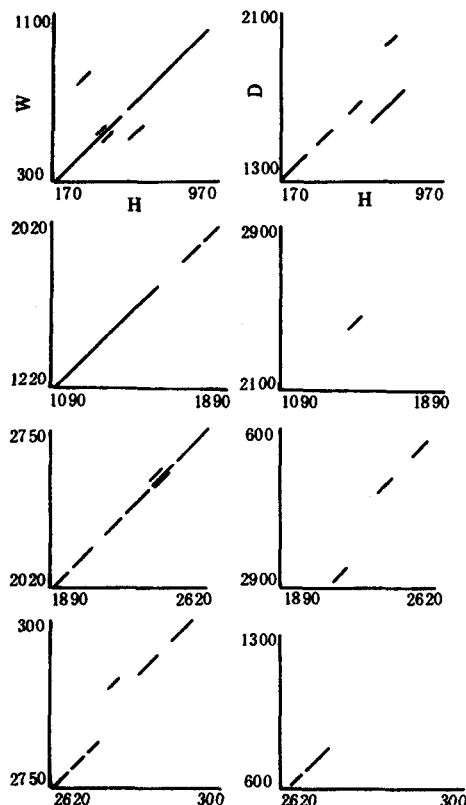


图 2 核苷酸序列比较

Fig. 2 Comparison of nucleotide sequence

左侧为 WHV (W) 和 HBV (H), 右侧为 DHBV (D) 与 HBV (H). 图中直线表示二种基因组对应位置上每 40 个核苷酸序列具有 50% 或 50% 以上同源性的部分

Sequences of 40 nucleotides long with a homology equal or superior to 50% were scored, and they are indicated by lines whose coordinates correspond to the position of that sequence within the two compared genomes. Left hand row is a comparison of WHV (W) and HBV (H) genomes; right-hand one of DHBV (D) and HBV (H) genomes

在 Pre-S 编码区的第三位置上; 在 X—Pol 交叠区 Pol 比 X 保守。

将核苷酸序列推导出的氨基酸序列比较, 结果表明: HBS 蛋白与 WHS 蛋白和 GSHS 蛋白同源性很好, 达 60% 左右; 而与 DHBS 蛋白同源性较差, 仅达 40%, 尤其在 C 末端差异更大; HBS 蛋白有一 50 个氨基酸片段 (105—

155) 在 DHBS 蛋白上缺失, 既往多方面的材料证明这一片段含有 HBS 蛋白的重要抗原表位, 目前我国临床使用的乙肝疫苗就是基于这一表位的保护性。通过序列比较还发现 HBS 蛋白的一个强疏水序列 (79—97)、99 位的糖基化部位和 Pre-S 区 Asn-X-Thr/Ser 上的潜在糖基化部位在四种病毒都被很好地保留下来了; C 抗原有所不同: 在 HBV, WHV, GSHV 由 C 区编码, 在 DHBV 则由 X/C 区编码; 由于 DHBV 与 HBV, WHV, GSHV 间同源性太差, 难以确定丢失或获得了哪些序列。图 3 列出了以 HBV 与 DHBV, HBV 与 WHV 间 C 抗原序列同源性的比较结果。

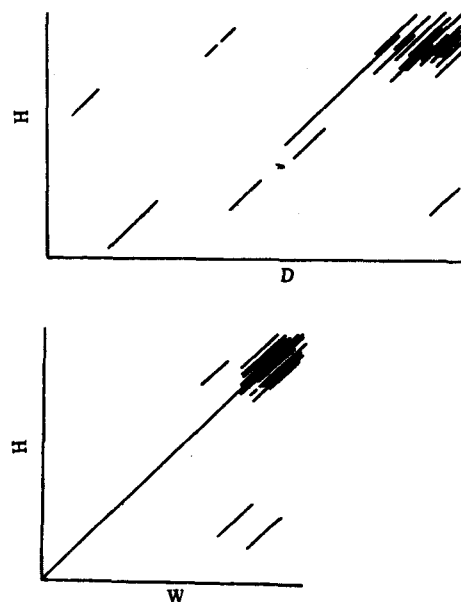


图 3 C 抗原氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Comparison of homology of the amino acid sequences of C antigens of HBV (H), DHBV (D), WHV (W)

图上部为 HBV (H) 和 DHBV (D), 图下部为 HBV (H) 与 WHV (W). 图中直线表示每 30 个氨基酸残基同源性大于或等于 20% 的部分

Stretches of 30 amino acids long with homology equal or superior to 20% are indicated by a line

## 2.2 各 ORF 的保守能力

按照中性突变-随机漂变学说, 分子水平上突变绝大多数是中性突变或是近中性突变。为

反映单一的突变事件, 计算了单个核苷酸替换引起氨基酸改变的密码子在所有发生单个核苷酸替换的密码子中的比重. 计算结果列于表 1. 在此基础上, 通过某一 ORF 氨基酸变化率的

比较可得出各病毒相对进化距离. 图 4 表示 S ORF 和 Pol ORF 为例的计算结果.

从图 4 和表 1 可得出 WHV 与 GSHV 间的相对进化距离约是 HBV 亚型间的 2/5. 由此

表 1 各 ORF 的比较  
Table 1 Comparison of different ORFs

| ORF 及病毒<br>ORF and virus | 碱 基         |                    | 氨基酸残基               |                    | 保守指数 * / %<br><br>Intrinsic<br>constrain factor |
|--------------------------|-------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------------------|
|                          | Base        |                    | Amino acid residues |                    |                                                 |
|                          | 总数<br>Total | 变化数/%<br>Variation | 总数<br>Total         | 变化数/%<br>Variation |                                                 |
| C 区                      |             |                    |                     |                    |                                                 |
| HBVadr 与 WHV             | 495         | 145 (29.9)         | 165                 | 41 (24.8)          | 85.3                                            |
| WHV 与 GSHV               | 558         | 65 (11.6)          | 186                 | 17 (9.1)           | 78.8                                            |
| HBVadr 与 HBVayw          | 549         | 51 (9.3)           | 183                 | 8 (4.4)            | 87.2                                            |
| S 区                      |             |                    |                     |                    |                                                 |
| HBVadr 与 WHV             | 678         | 182 (26.8)         | 226                 | 90 (39.8)          | 44.0                                            |
| WHV 与 GSHV               | 666         | 58 (8.7)           | 222                 | 23 (10.4)          | 64.1                                            |
| HBVadr 与 HBVayw          | 678         | 36 (5.3)           | 226                 | 17 (7.5)           | 53.5                                            |
| Pre-S 区                  |             |                    |                     |                    |                                                 |
| WHV 与 GSHV               | 615         | 143 (23.3)         | 205                 | 55 (26.8)          | 62.8                                            |
| HBVadr 与 HBVayw          | 489         | 68 (13.9)          | 163                 | 22 (13.5)          | 70.0                                            |
| Pol 区                    |             |                    |                     |                    |                                                 |
| WHV 与 GSHV               | 2637        | 436 (16.5)         | 879                 | 198 (22.5)         | 52.3                                            |
| HBVadr 与 HBVayw          | 2496        | 239 (10.0)         | 832                 | 97 (11.7)          | 58.8                                            |
| X 区                      |             |                    |                     |                    |                                                 |
| HBVadr 与 WHV             | 408         | 140 (34.3)         | 136                 | 71 (52.2)          | 27.3                                            |
| WHV 与 GSHV               | 414         | 65 (15.7)          | 138                 | 39 (28.3)          | 28.6                                            |
| HBVadr 与 HBVayw          | 435         | 15 (3.4)           | 145                 | 11 (7.6)           | 23.1                                            |
| 非编码区 (X 区内)              |             |                    |                     |                    |                                                 |
| HBVadr 与 WHV             | 411         | 154 (37.5)         | 137                 | 85 (62.0)          | 7.0                                             |
| WHV 与 GSHV               | 426         | 67 (15.7)          | 142                 | 53 (37.3)          | 4.4                                             |

\* 只发生单个碱基替换的密码子中不发生氨基酸替换的百分比.

\* Intrinsic constrain factor was caculated as the ratio (percent) fo triplets without substituting the amino acid code to total triplets having a one-letter change.

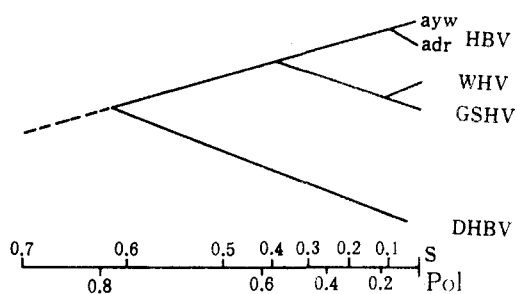


图 4 四种病毒的相对进化距离

Fig 4 Relative evolutionary distances  
between hepadnaviruses

看来 WHV 和 GSHV 似可归入同一亚类 (sub-group) 下的不同亚型 (subtype). 令人不解的是 GSHV, WHV 虽然在进化距离上非常接近, 但致病性特别是致癌性有很大差别. 既往认为, 直接重复序列在病毒 DNA 整合到宿主染色体有很大重要性, 但我们的比较结果提示: WHV 与 GSHV 的直接重复序列完全相同, 说明直接重复序列在 WHV 致癌机理上并不重要; 另一方面, 通过比较分析我们发现 X ORF 保守力较弱, 且只有在 X ORF WHV 与 GSHV 的核

苷酸替换率比 HBV 亚型间高; 加之 WHV 并不编码额外的蛋白, 由此我们推测 X ORF 可能与致癌有关, WHV 的 X 蛋白可能与 GSHV 有很大不同, 有必要深入研究 X 蛋白的特性。

### 3. 结 语

既往通过上述四种病毒的生物学行为特征比较, 曾推测它们是来自同一祖先的同一家族的成员, 我们用核苷酸序列比较的方法进一步证实了这一推断。我们发现 HBV 与 WHV, GSHV 的同源性高达 60%, 而与 DHBV 大多数区域仅为 40%。表明这些病毒在进化过程中并不是在同一时间分野的, DHBV 分野最早。这与 DHBV 感染鸟类而其它病毒感染哺乳动物相一致<sup>[7]</sup>; 反过来也说明, 至少在嗜肝病毒家族分野很早并侵占了当时并行分野的靶宿主。不幸的是, 这一假说难以取得更多的佐证, 因为到目前为止嗜肝病毒家族的 DNA 序列已全部搞清、但各侵犯截然不同的宿主而又属于同一科的唯一例子。这种进化方式属趋异性进化,

深入研究其分子的进化特征对生物学及医学均具有重要意义。

### 参 考 文 献

- 1 Tiollais P, Buendisa M A. Hepatitis B virus. *Sci. Am*, 1991; **264**: 116
- 2 Cohen J I, Miller R H, Rosenblum B *et al*. Sequence comparison of Woodchuck hepatitis virus replicative forms shows conservation of the genome. *Virology*, 1988; **162**: 12
- 3 Seeger C, Ganem D, Varmus H E. Nucleotide sequence of an infectious molecularly cloned genome of ground squirrel hepatitis virus. *J Virol*, 1984; **51**: 369
- 4 Tong S, Mattes F, Teubner K *et al*. Complete nucleotide sequence of a Chinese duck hepatitis B virus. *Nucl. Acids Res*, 1990; **18**: 6139
- 5 Staden R. An interactive graphics program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequences. *Nucl. Acids Res*, 1982; **10**: 2951
- 6 Osawa S, Muto A, Jukes T H *et al*. Evolutionary changes in the genetic code. *Proc R Soc Lond*, 1990; **241**: 19
- 7 Mehrotra R. Animal models in hepadna viruses. *Indian J Pathol Microbio*, 1990; **33**: 288

## Evolutional Relationship Between Hepadnaviruses

Wu Yuzhang      Zhu Xihua

(Department of Molecular Immunology, The Third Military Medical University, Chongqing 630038)

### ABSTRACT

Comparisons of the nucleotide sequences and amino acid sequences were made among various hepadnaviruses, and the relative evolutionary distances were calculated. From the comparison, it was shown that DHBV, HBV, GSHV and WHV are derived from a common ancestor, and the three mammalian hepatitis B viruses are more homologous to each other than they are to DHBV, indicating that DHBV starts to evolve on its own earlier than the three other viruses, as do birds compared with mammals. Based on these findings it was proposed that viruses evolved in a fashion parallel to the species they infect. From the calculated relative evolutionary distances, it was suggested that WHV and GSHV can be categorized in a way similar to the subgroups of HBV.

**Key words** hepadnaviruse, molecular evolution, nucleotide sequence comparison