

树鼩 CD4 全长编码序列的克隆及分子特征分析

田巍威^{1,2,3}, 高跃东^{4,5}, 郭彦³, 黄京飞^{4,5}, 肖昌¹, 李作生^{2,*}, 张华堂^{3,*}

(1. 西南大学 生物技术学院, 重庆 北碚 400715; 2. 云南沃森生物技术股份有限公司, 云南 昆明 650106; 3. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室; 免疫生物学实验室, 云南 昆明 650223; 4. 中国科学院昆明生物多样性大型仪器区域中心, 云南 昆明 650223; 5. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223)

摘要: 树鼩作为多种人类疾病研究模型的可能性已受到广泛关注, 但尚缺乏研究其免疫功能的基本标志以及单克隆抗体。该实验首先以树鼩外周血总 RNA 为材料, 通过 RT-PCR 扩增得到长度为 1 365 bp 的树鼩 CD4 全长编码序列, 并确定了数据库中缺失的两个片段, 进而通过 Clustal W 等软件对其序列和分子特征进行分析, 发现树鼩 CD4 氨基酸序列胞外和胞内域保守性较好, 且与人类和猴的亲缘关系较近。虽然树鼩和人 CD4 分子表面大部分区域均带正电荷, 但与人 CD4 胞外域 D1 相比, 树鼩 CD4 D1 结构区域表面带负电荷较多, 且多出两个 N-糖基化位点。这些差异对抗体的结合可能存在影响。该研究为今后树鼩 CD4 单克隆抗体制备及功能研究奠定了基础。

关键词: 树鼩; CD4 分子; RT-PCR; 结构; 功能; 单克隆抗体

中图分类号: Q959.832; Q951.3; Q347 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2012)01-0060-07

Cloning of full-length coding sequence of tree shrew CD4 and prediction of its molecular characteristics

TIAN Wei-Wei^{1,2,3}, GAO Yue-Dong^{4,5}, GUO Yan³, HUANG Jing-Fei^{4,5},
XIAO Chang¹, LI Zuo-Sheng^{2,*}, ZHANG Hua-Tang^{3,*}

(1. College of Biotechnology, Southwestern University, Beibei 400715, China; 2. Yunnan Walvax Biotechnology Co., LTD Kunming 650106, China; 3. Immunobiology Laboratory, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China; 4. Kunming Biological Diversity Regional Center of Large Apparatus and Equipment, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 5. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: The tree shrews, as an ideal animal model receiving extensive attentions to human disease research, demands essential research tools, in particular cellular markers and monoclonal antibodies for immunological studies. In this paper, a 1365 bp of the full-length CD4 cDNA encoding sequence was cloned from total RNA in peripheral blood of tree shrews, the sequence completes two unknown fragment gaps of tree shrews predicted CD4 cDNA in the GenBank database, and its molecular characteristics were analyzed compared with other mammals by using biology software such as Clustal W2.0 and so forth. The results showed that the extracellular and intracellular domains of tree shrews CD4 amino acid sequence are conserved. The tree shrews CD4 amino acid sequence showed a close genetic relationship with *Homo sapiens* and *Macaca mulatta*. Most regions of the tree shrews CD4 molecule surface showed positive charges as humans. However, compared with CD4 extracellular domain D1 of human, CD4 D1 surface of tree shrews showed more negative charges, and more two N-glycosylation sites, which may affect antibody binding. This study provides a theoretical basis for the preparation and functional studies of CD4 monoclonal antibody.

Key words: Tree shrews; CD4; RT-PCR; Structure; Function; Monoclonal antibody

收稿日期: 2011-10-09; 接受日期: 2012-01-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)分课题(2007CB512807); 中科院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-R-12); 树鼩基础生物学及重要生物学特性研究(Y002732073); 中科院昆明动物研究所“动物模型与人类疾病机理重点实验室”开放课题

*通信作者(Corresponding authors), E-mail: zhanght@post.kiz.ac.cn; jxdxzs@yahoo.com.cn

第一作者简介: 田巍威, 硕士研究生, E-mail: vivit1986@126.com

CD4 是具有 4 个 Ig 样结构域的单链跨膜糖蛋白, 主要表达于 T 淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞, 参与 T 细胞的活化(Zeitlmann et al, 2001)。作为 T 辅助细胞(T-helper)活化的协同受体(co-receptor), 其胞外域可以与 MHC-II (major histocompatibility complex class II)结合, 稳定 TCR 与抗原肽-MHC-II 复合物之间的相互作用(Grakoui et al, 1999); 而其胞内域中的保守基序 KKTCQC 能与酪氨酸蛋白激酶 Src 家族成员 p56^{lck} 结合, 参与 T 细胞活化的信号转导过程(Glaichenhaus et al, 1991)。

树鼩(tree shrews, *Tupaia belangeri*)是一类外型酷似松鼠的小型哺乳动物, 主要分布于我国西南部、菲律宾、印度等地(Cao et al, 2003)。早在 1987 年, Su et al (1987)发现成年树鼩接种人 HBV 感染血清后, 其血清中能够检测到乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)。Walter et al (1996)报道新生树鼩经人 HBV 感染后, 表现出类似人类的急性自限性肝炎。此外, 已有报道树鼩对 HCV、HSV 亦具有易感性(Zhao et al, 2002; Darai et al, 1980)。由于树鼩对多种人类病毒易感且个体小、易于饲养, 其作为多种人类疾病研究模型的可能性

已受到广泛关注。

目前, 针对树鼩 CD4 的研究较少, 仅有根据树鼩 2 倍覆盖率基因组结合参考人类 CD4 (HGNC ID:1678)预测所得序列, 且存在两处未知片段, 影响了单克隆抗体制备中 CD4 抗原表位分析。为此, 本研究首先以获得树鼩 CD4 完整编码序列为目的, 同时比较分析其分子特征, 为树鼩 CD4 单克隆抗体的制备和功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物

本研究采用的滇缅树鼩购于云南省昆明医学院实验动物中心。

1.2 树鼩 CD4 全长编码序列克隆

根据已有预测树鼩 CD4 序列(<http://asia.ensembl.org/index.html>, ENSTBEG000000000662), 上游引物设计为: 5'-ATGGACCGCCAGTCCGG-3', 由于上述序列 3'端尚不完整, 因此参考人、狨毛猴等物种的 CD4 序列, 下游引物设计为: 5'-TCACATGAGACTACATGTCTTCTGAAACC-3'(图 1)。

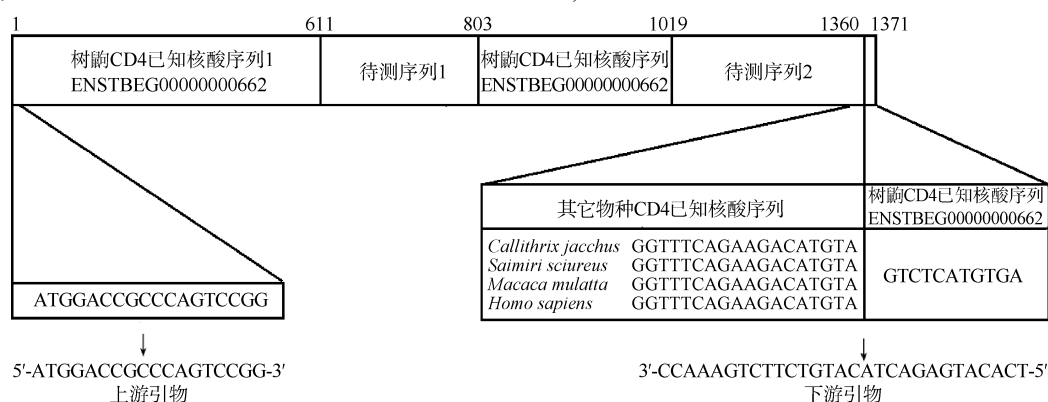


图 1 树鼩 CD4 已知序列和残缺序列以及引物设计

Fig.1 Primers for PCR amplification of tree shrews CD4 cDNA

所引用序列采自人(NM_000616)、恒河猴(NM_001042662)、松鼠猴(AF452617)、绒毛猴(AF452616)。

Sequences used for this study were extracted from *Homo sapiens* (M35160), *Macaca mulatta* (NM_001042662), *Saimiri sciureus* (AF452617), *Callithrix jacchus* (AF452616)。

采集树鼩外周血, 提取血液总 RNA (试剂盒购于 BioTeKe), 将其反转录为 cDNA。利用上述引物进行 PCR, 循环参数为: 94 °C, 3 min; 94 °C 30 s, 45 °C 30 s, 72 °C 3 min, 32 个循环; 72 °C, 10 min (RT-PCR 试剂盒购于 TIANGEN)。用树鼩管家基因 GAPDH(glyceraldehyde-3-phos-phate dehydrogenase)作为阳性对照。PCR 产物经 TA 克隆插入 pMD-19T 载体后, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 提取质

粒进行双酶切鉴定, 最终进行双向测序(北京三博志远基因技术有限公司)。

1.3 分子特征分析

本文用以参比的核酸序列均来源于 GenBank, 以 DNAMAN6.0、BlastP、Clustal W2.0、MEGA4、Discovery Studio 和 PyMOL 分别进行核酸序列、氨基酸序列、物种亲缘关系分析及蛋白质三维结构模建。而信号肽和跨膜域结构分析则采用在线预测

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

2 结果与讨论

2.1 树鼩 CD4 全长编码序列扩增与比较分析

利用树鼩外周血总 RNA, 通过 RT-PCR 获得长度约为 1 365 bp 的核酸片段(图 2)。通过双向测序, 我们确定了所得序列为树鼩 CD4 分子全长编码序列, 开放阅读框长度为 1 365 bp, 编码 454 个氨基酸 (GenBank 登陆号为 JN657224)。通过 DNAMAN 6.0 进行多序列比对, 所获得树鼩 CD4 编码序列确定了原预测序列 (ENSTBEG00000000662) 中第 611~797、1 019~1 357 的残缺片段, 共计 526 bp (图 3)。同时, 我们发现已测序列与原预测序列存在差异(表 1)。此外, 原预测序列中第 798~803、1

358~1 360 位 9 个碱基, 未在我们实测序列中未检出, 而我们实测序列第 901~903 位的 3 个碱基在原预测序列中未检出, 但上述差异并未导致移码突变。本实验采用高保真 Pfu 酶扩增基因并进行两次双向测序, 有效地排除了实验误差。因此, 我们所获得的树鼩 CD4 分子全长编码序列是较为准确的。

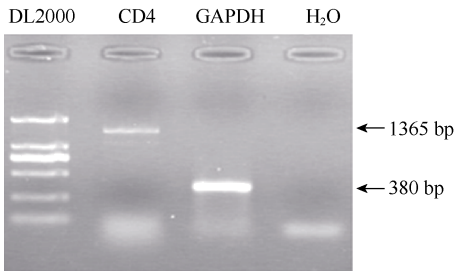


图 2 树鼩 CD4 cDNA 扩增

Fig.2 RT-PCR amplification of tree shrews CD4 cDNA

实测序列1 (611-797: 187bp) (不包含括号内碱基)
(G)GT TTC CAG AAG GCC TCG ATG ACA CTC TAT AAG AAA GAG GGA GAG CGG GTG
G F Q K A S M T L Y K K E G E R V
GAC CTC TCC TTC CCT CTC ACC TTC GAG GAC GAA CAC CTG CGT GGG GAG CTG
D L S F P L T F E D E H L R G E L
CGG TGG CAG GCA GAG CGG CCC CCC TCC TCC GAG TCC TGG GTC TCC TTC TCC
R W Q A E R P P S S E S W V S F S
GTA CAG GCC AAG GAG GTG ACT GTG CAG GGG TCC CT(C)
V Q A K E V T V Q G S L

实测序列2 (1016-1254: 238bp) (不包含括号内碱基)
(T)GG AAG CTG AAG AAT GAG TCA AAG GTC TCA AAG CAG GAG AAG GCG GTG TGG
W K L K N E S K V S K Q E K A V W
CTG CTG GAC CCC GAG GCA GGG ATG TGG GAG TGT CTG CTG AGT AAC GGG GAC
L L D P E A G M W E C L L S N G D
CAG GTC CTG TTG ACA TCC AAG TTT GAA GTC TCG GCC CGA CTG GTC ACC CAG
Q V L L T S K F E V S A R L V T Q
AGC TGG CAA ACC ACA CTG ATC GTG GCG GTG GGA GCC GCG GCG GGC CTG CTG
S W Q T T L I V A V G A A A G L L
TGT ATC GGT CTC TGC GCT TTC TGC TGC GTC AAG TGC CGG CAC CGA CGG CGC
C I G L C A F C C V K C R H R R R
CAG GCA GAG CGG ATG TCT CAG ATC AAG AGG CTC CTC AGT GAG AAG AAG ACC
Q A E R M S Q I K R L L S E K K T
TGC CAG TGC TCC CAC AGG TTT CAG AAG ACA TGT A(GT)
C Q C S H R F Q K T C S

图 3 树鼩 CD4 预测序列未知片段及对应氨基酸

Fig.3 The two unknown fragments of the predicted tree shrews CD4 cDNA and the corresponding amino acid

表 1 树鼩 CD4 cDNA 预测序列与实测序列差异性比较

Tab. 1 Comparison of the predicted tree shrews CD4 cDNA sequence and the obtained sequence

碱基位置 Base sits	碱基差异 Base differences	氨基酸位置 Amino acid sits	氨基酸差异 Amino acid differences
58	T→C	20	Ser→Pro
229	C→T	77	Arg→Trp
601	C→T	201	Ile→Val
826	A→G	276	Gly→Ser
839	G→C	280	Asn→Ser
844/846	G→A/A→G	282	Ser→Thr
856	T→A	286	Thr→Ala
866	A→C	289	Gln→Arg
875	A→G	292	Val→Gly
895	T→C	299	Ser→Thr
898/899/900	A→G/T→G/T→A	300	Thr→Leu
907	A→G	303	Arg→Gly

“→”左边为预测序列, “→”右边为实测序列。

The left of “→” is the predicted sequence of tree shrews CD4 cDNA, the right of “→” is the obtained sequence of tree shrews CD4 cDNA.

2.2 树鼩 CD4 氨基酸序列分析

2.2.1 树鼩 CD4 整体结构与亲缘关系分析

树鼩 CD4 分子由 454 个氨基酸组成, 属于 I 型跨膜蛋白。信号肽和跨膜域在线预测显示, 树鼩 CD4

整体结构与人 CD4 相似, 可分为信号肽(1~25)、胞外域(26~392)、跨膜域(393~416)、胞内域(416~454)四部分(图 4), 我们采用 Blast P 及 Clustal W2.0 对推导得到的树鼩 CD4(JN_657224)氨基酸序列与人

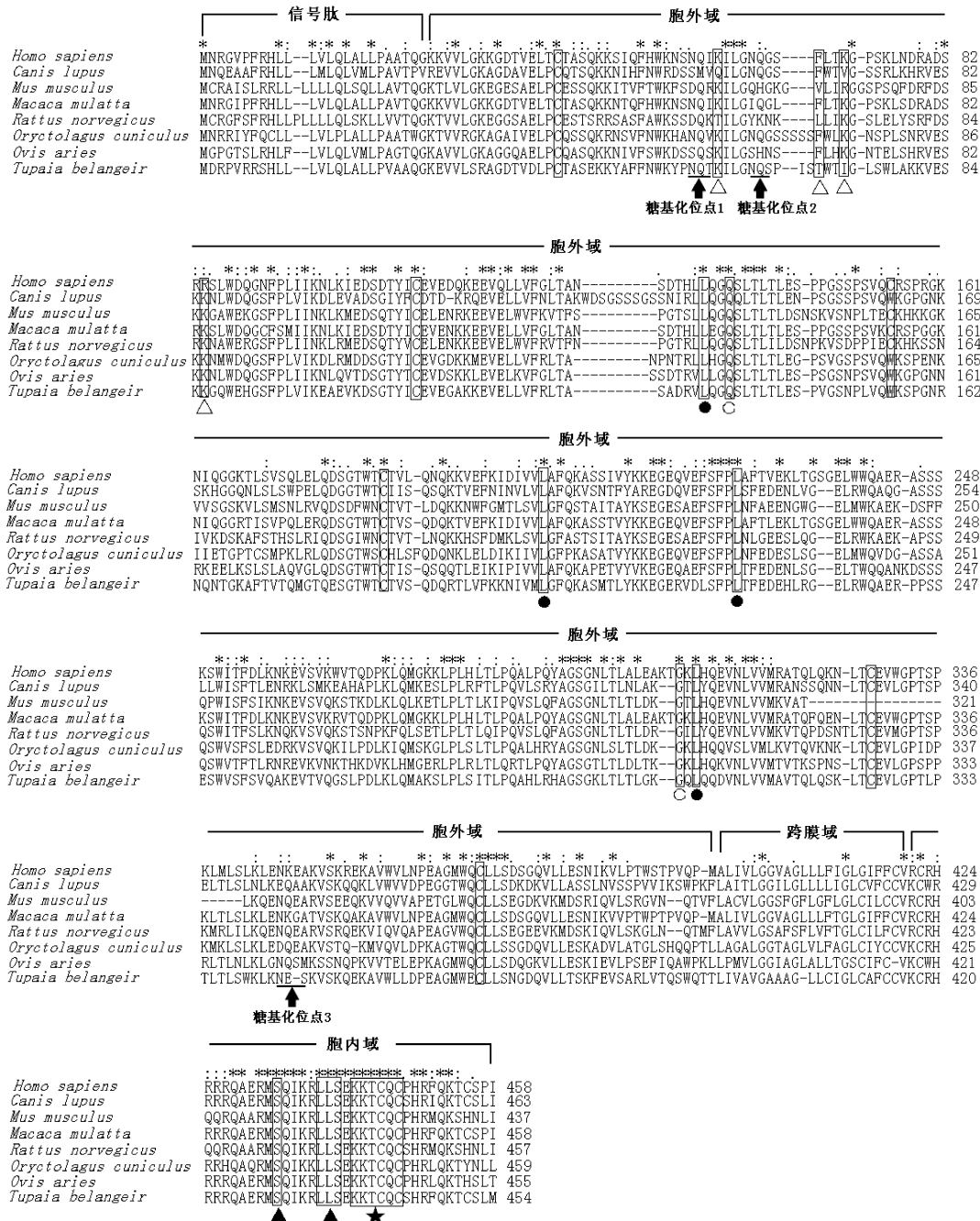


图 4 树鼩 CD4 推导氨基酸序列比对分析

Fig.4 Alignment of deduced amino acid sequences of tree shrews CD4 with those from other mammals

参与二硫键形成的半胱氨酸残基用方框标注; 与 MHC-II 结合的氨基酸残基用方框加△标注; 参与疏水域形成的亮氨酸残基用方框加●标注; 形成分子内氢键的谷氨酰胺和甘氨酸残基用方框加○标注; 与 CD4 分子内化相关的氨基酸残基用方框加▲标注; 参与结合 p56^{lck} 的基序用方框加★标注; * 显示的是序列上 100%保守区域; : 显示保守替换; . 显示的是非保守替换。

The cysteine residues involving in disulfide bond formation are marked with boxes; the amino acid residues combining with MHC-II are marked with boxes and △; the leucine residues forming hydrophobic region are marked with boxes and ●; the glutamine and glycine residues involving intramolecular hydrogen bonds are marked with boxes and ○; the amino acid residues associated with CD4 internalization are marked with boxes and ▲; the motif binding with p56^{lck} are marked with boxes and ★; *, :, . show the 100% conserved regions, conservative replacement and non-conservative replacement, respectively.

(NM_000616)、恒河猴(NM_001042662)、狼犬(NM_001003252)、穴兔(NM_001082313)、绵羊(NM_001129902)、大鼠(NM_013488)、小鼠(NM_012705)等哺乳动物进行比较(图 4),发现树鼩 CD4 氨基酸序列与人类、恒河猴的相似度较高,分

别为 61%、60%,而与大鼠、小鼠的相似度较低,分别为 48%、46%。同时,我们利用 MEGA4 对树鼩 CD4 亲缘关系进行分析,结果显示,树鼩与人类、恒河猴聚集,而与大鼠、小鼠距离较远,说明树鼩在进化关系上跟人类和恒河猴更接近(图 5)。

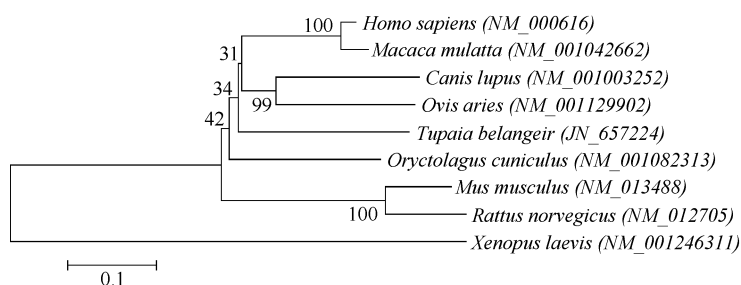


图 5 树鼩和其他哺乳动物 CD4 之间的亲缘关系

Fig.5 Phylogenetic relationships between CD4 chains from tree shrews and other mammals

Clustal W2.0 对上物种 CD4 氨基酸序列进行多序列比对,以非洲爪蟾作为外群,在 MEGA4 中采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)建树。

Multiple CD4 amino acid sequences of the above species were aligned by Clustal W2.0, and phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method through MEGA4, *Xenopus laevis* acting as an outgroup.

2.2.2 树鼩 CD4 胞外域特征

人 CD4 胞外域主要由 4 个免疫球蛋白样结构 D1、D2、D3、D4 组成,胞外域中存在 3 对二硫键。它们分别是形成于 D1 结构的 Cys41 和 Cys109; D2 结构的 Cys155 和 Cys184; D4 结构的 Cys328 和 Cys370(Matthias et al, 2002)。通过 Discovery Studio,我们对人和树鼩的 CD4 胞外域进行了三维空间结构分析。结果显示,树鼩 CD4 胞外域和人 CD4 胞外域整体相似,都可分为四个免疫球蛋白样结构,在树鼩的 D1 和 D4 结构域中找到相应的二硫键,但形成 D2 中二硫键的 Cys155 未能找到,相应位置被色氨酸占据(图 6B)。在 CD4 氨基酸多序列比对中,狼犬、穴兔、绵羊的 CD4 胞外域相应位置同样也为色氨酸(图 4)。由于这种差异并没有破坏树鼩 D2 结构的形成,我们认为色氨酸的存在可能在一定程度上弥补了二硫键缺失所带来的影响,但这需要进一步实验验证。

同时,人 CD4 分子中保守性氨基酸残基 Leu134、Leu202、Leu225、Leu308 能够形成疏水域,而 Gln137 和 Gly306 之间能够形成分子内氢键,它们能够保证 D1 和 D2 之间以及 D3 和 D4 之间的紧密连接(Wang et al, 1990)。在树鼩 CD4 胞外域的相应位置同样存在上述保守性氨基酸,这些氨基酸在维持树鼩 CD4 稳定性方面可能起到重要作用。进一步分析发现,人 D1 中的 α -螺旋在树鼩中同样存在,而 α -螺旋的存在一定程度可以确保肽链的正确折

叠和空间结构的形成。综合以上分析,我们所获得的树鼩 CD4 分子胞外域能够形成同人相似的三维空间结构。

人 CD4 胞外区与 MHC-II 的结合主要依靠 D1、D2 结构,特别是 D1 上的 4 个带正电的氨基酸残基(Lys60、Phe68、Lys71 和 Arg84)(Wang et al, 2001),但在我们的序列比对结果中发现,树鼩 CD4 分子 D1 中的后 3 个核心氨基酸残基都与人存在差异,而这种差异在氨基酸多序列比对的其它物种中同样存在(图 4)。这说明在各物种间 CD4 与 MHC-II 结合的氨基酸位点并不保守。CD4 的 D1 结构同时也是大多数单克隆抗体结合的区域,如 BD 公司针对人 CD4D1 区的鼠抗人 CD4 抗体(克隆号:RPA-T4)。通过人与树鼩 CD4 胞外域三维空间结构比较,我们发现树鼩在 D1 区存在两个 N-糖基化位点,而在人的 D1 区却不存在(图 6A, B),在人 CD4 D3 中存在一个 N-糖基化位点,在树鼩 CD4 分子的 D3 中未检测到,而在树鼩 CD4 分子的 D4 中包含一个人 D4 结构中不存在的 α -螺旋(图 6C, D)。以上差异并没有导致树鼩与人 CD4 胞外域产生较大不同,其机制有待进一步探讨。此外,我们对人与树鼩 CD4 胞外域的绝对电荷分布进行分析,发现人和树鼩 CD4 表面大部分区域均带正电荷,负电荷主要分布于 D1 和 D4 表面,且树鼩 D1 表面负电荷分布较人 D1 表面多(图 6E, F)。树鼩 CD4 的 D1 区在 N-糖基化位点数目和表面电荷上与人 CD4 的差异可能影响树

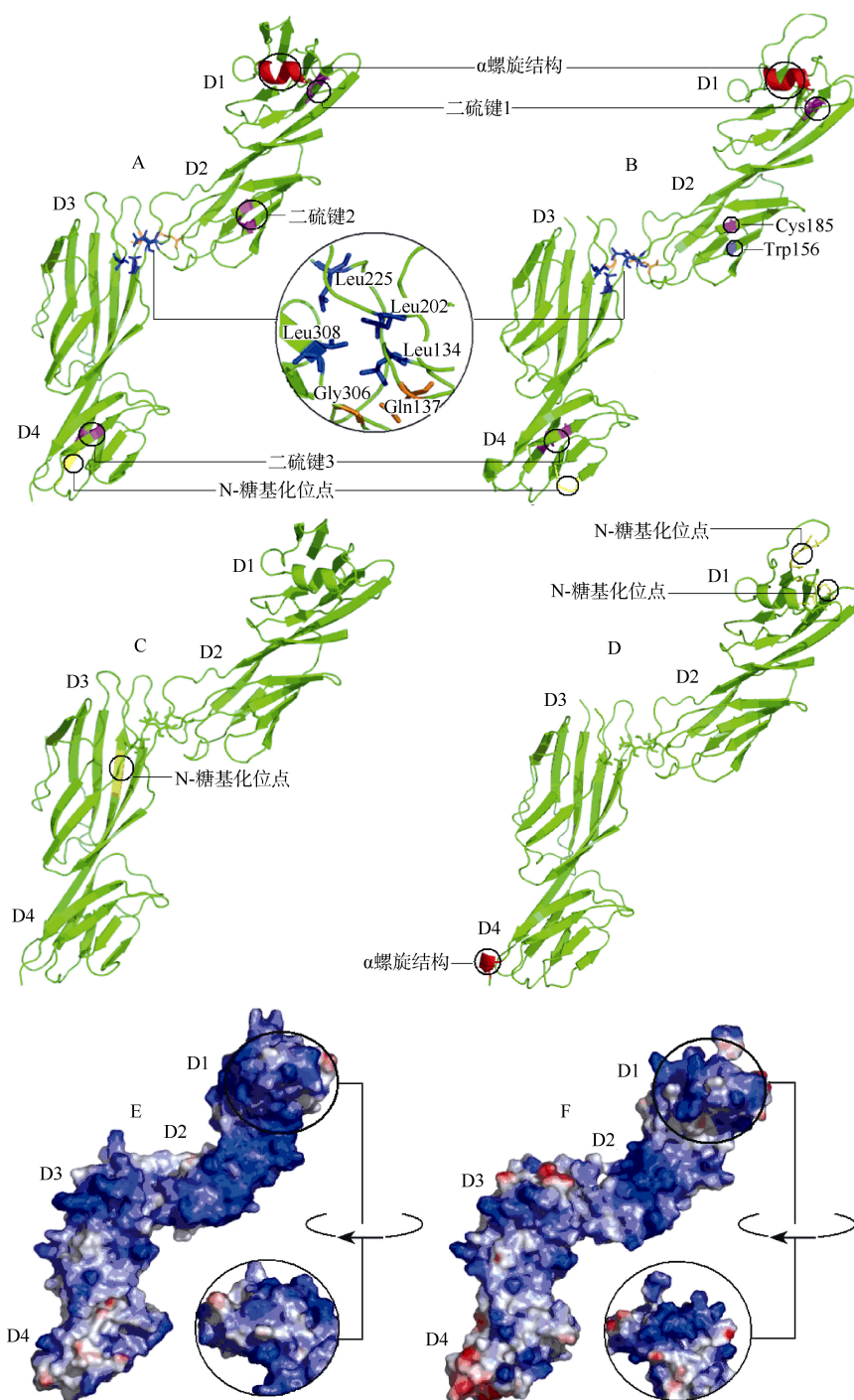


图 6 人和树鼯 CD4 胞外域蛋白三维结构建模和表面电荷比较

Fig.6 Modeling of three-dimensional structures and surface charges of the extracellular domain of human and tree shrews CD4 chains 左、右分别为人和树鼯 CD4 蛋白三维结构建模; A、B、C、D 和 E、F 分别为静电势图和表面绝对电荷分布图(负电荷显示为红色, 正电荷为蓝色)。Modeled structures and surface charges of human (left) and tree shrews (right) CD4 chains. Shown on A、B、C and D, E and F are surface views and surface charges, respectively. Show in red are negative charges and in blue positive charges.

鼯 CD4 分子与其它分子的结合, 例如我们在实验中发现鼠抗人 CD4 抗体不能与树鼯 CD4 发生交叉反应。

2.2.3 树鼯 CD4 胞内域特征

CD4 氨基酸多序列比对显示树鼯和其它物种的

CD4 胞内域高度保守(图 4), 提示该结构域参与了 CD4 分子重要功能。Glaichenhaus et al (1991)报道 CD4 分子胞内域中 *KKTCQC* 基序是 Src 家族酪氨酸蛋白激酶 p56^{lck} 的结合区域, 其中的两个半胱氨酸

是 CD4 与 p56^{lck} 结合所必需的(Learmont et al, 1999), 而 p56^{lck} 在去磷酸化激活状态下, 能够造成 CD3 胞内域 ITAM 的磷酸化, 进而引起 fyn 和 ZAP-70 等下游信号分子的激活, 最终完成 T 细胞活化(Leo & Schraven, 2001; Kane et al, 2000)。在树鼯 CD4 胞内域中, 我们同样检测到高度保守的 *KKTCQC* 基序的存在(图 4), 明确提示树鼯 CD4 具有与 p56^{lck} 结合的结构基础, 进而参与树鼯 T 淋巴细胞的活化。

我们在树鼯 *KKTCQC* 基序上游检测到两个保守的丝氨酸残基和两个保守的亮氨酸残基(图 4)。这 4 个保守氨基酸参与人 CD4 的内化(internalization), 其中两个保守的丝氨酸残基的磷酸化是 CD4 内化的信号, 而 CD4 分子内化可以下调细胞表面 CD4 的表达, 控制 T 淋巴细胞的过度活化, 保持免疫系统的平衡(Shin et al, 1990)。我们推测树鼯 CD4 胞内

域中的这 4 个保守性氨基酸亦参与了树鼯 CD4 的内化过程。此外, 我们发现以上基序在比对的其他哺乳动物中也同样存在(图 4), 提示大多数哺乳动物 CD4 胞内域重要基序在长期进化过程中具有高度的保守性。

综上, 本研究通过 RT-PCR 扩增得到树鼯 CD4 全长编码序列, 确定了原预测序列中未知的两处片段, 同时, 对其分子特征进行了比较分析。结果表明: 树鼯 CD4 氨基酸序列与人和恒河猴的亲缘关系较近, 其胞外域整体结构与人 CD4 胞外域相似的。而 CD4 与 MHC-II 结合相关的 4 个核心氨基酸在各物种中差异较大, 同时, 胞外域的潜在 N-糖基化位点、 α -螺旋以及表面电荷的分布也存在差异。这些差异的存在有利于对树鼯 CD4 结构与功能特点的进一步分析。

参考文献:

- Cao J, Yang EB, Su JJ, Li Y, Chow P. 2003. The tree shrews: Adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research[J]. *J Med Primatol*, **32**(3): 123-130.
- Darai G, Zöller L, Matz B, Schwaier A, Flügel RM, Munk K. 1980. Experimental infection and the state of viral latency of adult *tupaia* with herpes simplex virus type 1 and 2 and infection of juvenile *tupaia* with temperature-sensitive mutants of HSV Type 2 [J]. *Arch Virol*, **65**(3-4): 311-318.
- Glaichenhaus N, Shastri N, Littman DR, Turner JM. 1991. Requirement for association of p56^{lck} with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells[J]. *Cell*, **64**(3): 511-520.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation[J]. *Science*, **285**(5425): 221-227.
- Kane LP, Lin J, Weiss A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen[J]. *Curr Opin Immunol*, **12**(3): 242-249.
- Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort[J]. *N Engl J Med*, **340**(22): 1715-1722.
- Leo A and Schraven B. 2001. Adapters in lymphocyte signalling[J]. *Curr Opin Immunol*, **13**(3): 307-316.
- Matthias LJ, Yam PTW, Jiang XM, Vandegraaff N, Li P, Pombourios P, Donoghue N, Hogg PJ. 2002. Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1[J]. *Nat Immunol*, **3**(8): 727-732.
- Shin J, Doyle C, Yang Z, Kappes D, Strominger JL. 1990. Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization[J]. *EMBO J*, **9**(2): 425-434.
- Su JJ, Yan RQ, Gan YQ, Zhou DN, Huang DR, Huang GH. 1987. Adult tree shrews experimentally infected with hepatitis B virus[J]. *Chn J Pathol*, **16**(2): 103-105. [苏建家, 严瑞琪, 甘友全, 周德南, 黄定瑞, 黄国华. 1987. 成年树鼯实验感染乙型肝炎病毒的研究[J]. 中华病理学杂志, **16**(2): 103-105.]
- Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*[J]. *Hepatology*, **24**(1): 1-5.
- Wang JH, Meijers R, Xiong Y, Liu JH, Sakihama T, Zhang R, Joachimiak A, Reinherz EL. 2001. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(19): 10799-10804.
- Wang JH, Yan YW, Garrett TP, Liu JH, Rodgers DW, Garlick RL, Tarr GE, Husain Y, Reinherz EL, Harrison SC. 1990. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains[J]. *Nature*, **348**(6300): 411-418.
- Zhao X, Tang ZY, Klumpp B, Wolff-Vorbeck G, Barth H, Levy S, von Weizsäcker F, Blum HE, Baumert TF. 2002. Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection [J]. *J Clin Invest*, **109**(2): 221-232.
- Zeitlmann L, Sirim P, Kremmer E, Kolanus W. 2001. Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4[J]. *J Biol Chem*, **276**(12): 9123-9132.