

病毒分子生物学研究

柯丽华 胡志红 张先恩

(武汉病毒研究所 430071)

提要 病毒分子生物学研究与人类的健康和经济生活有着极为密切的关系,因而越来越引起人们的关注。本文就病毒性质及其与宿主之间的关系;病毒防治的新策略;从分子水平上研究病毒的开发和利用三方面进行了评述。文章最后还提出了需要进一步研究解决的几个基础性问题。

病毒是一类具有生物大分子之称的最微小的生物,它们因种类不同分别寄生于包括人类在内的动物、植物和微生物机体内,引起各种病毒病。据统计,约 3/4 的传染病由病毒引起,有的病毒遗传物质能整合于宿主细胞染色体并随之遗传。由于病毒与人类的健康、经济生活有着极为密切的关系,因而愈来愈引起人们的关注。

近十年来,病毒分子生物学研究进展可概括为以下三个方面:

一、病毒性质及其与宿主的关系

(一) 病毒分子结构与功能

病毒由核酸(DNA 或 RNA)和蛋白质组成。最简单的一类为无蛋白质外壳,只有 300—400 核苷酸构成的 RNA 小分子,如类病毒。它们必须依赖宿主细胞才能表现出生命活性。在理化性质、形态结构及生物学特性等研究基础上,目前绝大多数病毒已进入基因组结构的研究。应用核酸序列分析技术不仅测出了一些较小分子量的基因组如乙肝病毒(HBV, 3200bp)、猿猴空泡形成病毒(SV40, 5243bp)等,还测出一些大分子量的 DNA 及 RNA 病毒基因组,如蓝舌病毒(BTV, 19kb, RNA)、腺病毒(Ad2, 36kb)、苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV, 130kb)等。随着越来越多的病毒核酸序列被确定、国际联网序列数据库的建立和用于序列分析的计算机软件不断完善,通过病毒核酸序列分析和氨基酸一级结构及多肽的高级结构等分析,已经能够推测病毒基因组中相当一部分核酸的功能。通过基因克隆与表达的方法已绘制出许多病毒基因组的遗传图谱。

近年来的研究表明,与结构相关的蛋白,不仅包括病毒的结构蛋白,还包括一些与结构的形成相关的非结构蛋白,例如,在许多病毒感染的细胞中常出现由病毒编码的蛋白组成的纤维状或管状结构,这类结构往往与病毒的装配过程有关。在病毒感染过程中,许多病毒编码的蛋白质需要在细胞核内行使功能,这些蛋白质,特别是那些分子量较大的蛋白,如何进入核内的问题引起了人们的关注。在对 AcMNPV 的研究中,发现位于多角体蛋白 32—35 位的氨基酸序列 KRKK 对该蛋白的核定位起决定作用,只要通过点突变法将 KRKK 转变为 NGNN,多角体蛋白就无法进入核内。同样,在 SV40 的大 T 抗原中,也存在着核定位信号。预计这种核定

位现象也将成为抗病毒制剂研究的新靶点。此外,还发现具有锌指结构的蛋白以及具有亮氨酸拉链结构的蛋白在许多病毒的转录调节中起重要作用。

(二) 病毒与宿主之间的关系

在研究病毒感染细胞过程中,发现敏感细胞与非敏感细胞的界限越来越模糊。敏感与不敏感只是相对而言,病毒感染非敏感细胞后仍可能有早期基因的表达,有时仅仅因为缺乏一个与复制相关的基因而受阻。例如 AcMNPV 通常不能在家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的敏感细胞系 BmN 上增殖,但只要将 BmNPV 螺旋酶基因编码区中的一段 527bp 的核酸序列与 AcMNPV 的相应序列互换,AcMNPV 就可以在 BmN 上增殖。新近研究还发现,有些细胞具有一种自杀性的防御功能,即细胞程序化死亡(apoptosis)。在病毒感染细胞后,这种防御功能系统被启动,通过个别细胞的自杀,抵制病毒的感染,从而使细胞群体对该病毒不敏感。而某些病毒则具有抗 apoptosis 的基因,能抑制细胞的 apoptosis,从而达到繁殖的目的,如 AcMNPV 的 p35 基因就具有抗 apoptosis 的功能。肿瘤病毒的致癌机理是探讨多年的病毒与细胞相互作用的一个重要问题,抗癌基因研究的突破,提高了对 DNA 肿瘤病毒致癌机理的认识。抗癌基因是一类能抑制肿瘤形成的基因。其中研究得较多的为 Rb(视网膜母细胞瘤敏感基因)和 p53 基因。许多肿瘤病毒的基因产物可以和 Rb 基因产物及 p53 结合,从而干扰了抗癌基因的活性,导致细胞转化。例如,SV40 大 T 抗原、腺病毒 E1A 和 E1B55k 蛋白、HPV E6 和 E7 蛋白,都能与 p53 结合并抑制 p53 的抗癌活性,有些基因产物如 SV40 大 T 抗原还能与 Rb 基因产物结合。研究这种结合将为揭示病毒致癌和抗癌策略起重要作用。

二、病毒病防治的新策略

(一) 抗病毒制剂

随着病毒分子生物学研究的发展,人们对致病性病毒的认识日渐深入。近年来,研究者依据病毒与宿主间关系研究的新成果,设计出新的抗病毒制剂,其主要方向是抑制病毒复制酶系。如无环鸟苷(Acyclovir)能抑制病毒 DNA 多聚酶的合成,它的衍生物用于治疗疱疹性炎症已收到良好的效果。人工合成肽可封闭疱疹病毒核酸还原酶的活性,研制能穿过细胞膜的人工合成小肽,具有抗疱疹性炎症的作用,此类合成肽已经面市。叠氮胸苷(AZT)和磷甲酸盐是逆转录酶的抑制剂,在逆转录病毒复制过程中,它们直接与逆转录酶结合,而抑制病毒相应酶的活性,用以治疗艾滋病有一定效果。其次是作用于病毒感染过程的吸附或脱壳靶点的抑制剂。目前已弄清 Epstein Barr(EB)病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、鼻病毒(RV)等宿主细胞表面受体成分,这些受体成分及与之结合的病毒蛋白,已成为研究抗病毒制剂的重要靶点,如 HIV 感染时是以病毒囊膜蛋白(gp120)附着到细胞膜上的 CD₄ 受体分子,设计能阻止 HIV 对 CD₄ 结合的制剂,就有可能阻止 HIV 的感染。目前认为几种可溶性制备物(rsCD₄)临床试验效果良好。据报道,人工构建用于抗 RV 感染的可溶性分子 sICAM-1 可明显抑制人 RV₅₄ 引起的细胞病变;“Win”类抗病毒药物 51711 和 53084 能阻止 RV RNA 溢出,使病毒基因组不能进入宿主细胞发生感染和复制。这类依据病毒感染与复制过程作用靶点而设计的抗病毒制剂还在不断地研制或试用中,可能将有一种像抗生素对付细菌感染一样特效的药物问世。

(二) 抗病毒基因工程研究

随着分子病毒研究及基因工程的发展,有些抗病毒基因已经被引入抗病毒动、植物基因工

程研究,并显示了不同的抗病效果。下面介绍几种目前常用的策略。

1. 病毒外壳蛋白基因

1987 年,美国学者 R. Beachy 等将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白基因导入烟草,培育出了能抵抗病毒感染的工程烟草植株,开创了抗病毒植物基因工程的先例。随后,用其它植物病毒外壳蛋白基因培育的转基因植物,如马铃薯 X 病毒(PXV)及 Y 病毒(PYV),黄瓜花叶病毒(CMV),蕃茄斑萎病毒(TSMV),水稻条纹病毒(TSV)等表现了不同程度的抗病效果。外壳蛋白基因抗病机制尚不十分清楚,不少报道认为,由于外壳蛋白大量表达,干扰了病毒脱壳及在宿主细胞内复制。这一途径用于抗植物病毒是一种较成熟、危险性较小的方法,许多试验已进入大田。据 Mogen 国际遗传公司报道,他们把 PXV 的外壳蛋白基因导入马铃薯中,获得对 PXV 有抗性的转基因品种,在荷兰试种 1400 多株,田间抗病效果良好。又据中科院微生物所报道,将 CMV 和 TMV 的外壳蛋白基因拼接在一起,导入烟草中,得到对 CMV 及 TMV 均具抗性的转基因烟草,田间测得对 TMV 抵抗率为 100%,对 CMV 为 70%。最近还有试验指出,转移温和 TMV 株系完整基因组的烟草,具有更高的保护作用,比只表达外壳蛋白基因植株的抗性要强 10—25 倍。但这种工程株将有比外壳蛋白基因更大的危险性。

2. 病毒卫星 RNA

卫星 RNA 是一类借助辅助病毒进行复制的小分子 RNA,约 300—400 核苷酸,属病毒的寄生物。它与辅助病毒基因组不同源,但能干扰病毒 RNA 的合成,从而抑制病毒复制,减轻病毒引起的症状。1983 年,田波等用卫星 RNA 作为生防制剂控制 CMV 引起的病害获得成功。1986 年,Baulcombe 报道,将 CMV 卫星 RNA-1-17N 的 cDNA 双体引入烟草,产生了对 CMV 的抗性。目前用 CMV 卫星 RNA 的双体基因和单体基因转化蕃茄等植物均表现出较高的抗性。应用卫星 RNA 抗病毒的主要优点是转基因植物不需要生产异源蛋白质,只需要低水平的卫星 RNA 表达就能获得高效抗性。但此方法仍存在着潜在的危险,辅助病毒毒力控制有待进一步解决。

3. 反意 RNA(Antisense RNA)

反意 RNA 序列是通过与病毒 mRNA 互补序列的结合,关闭 mRNA 的翻译功能,实现阻遏病毒复制。将人工构建的 Rous 肉瘤病毒、反转录病毒和 5 型腺病毒等反意核酸表达质粒导入各病毒的敏感细胞,建立了持续表达反意 RNA 的细胞体系,转化后的细胞对相应病毒感染具有明显的抑制作用。不同部位的抑制效率有所不同,如能针对不同病毒的基因结构和调控序列,设计反意表达质粒,将可进一步提高抑制效果。这些成功试验多见于细胞培养水平,未见动物整体的报道。用此策略对付植物病毒效果不太理想,其原因可能是反意 RNA 的表达量有限,又限于细胞质内作用。后来,有人用反意 RNA 对付 DNA 病毒感染得到满意的抑制效果。预计反意 RNA 如在细胞质及细胞核都能发挥作用将获满意效果。总之,反意 RNA 抗性有待提高。

4. 核酶(Ribozyme)

Ribozyme 是具催化 RNA 切割反应的 RNA 小分子,可在特异位点上切割 RNA,故又称基因剪。只要已知病毒 RNA 序列中含有 Ribozyme 切割位点(GUC, GUA),就能设计并合成相应的 Ribozyme。体外试验表明,人工合成的 Ribozyme 能够切断动物病毒 RNA。Sarver 等设计的 4 种针对 HIV gag 基因和 5'LTR 的 Ribozyme,均能有效地切割 HIV-1RNA。我国金哲

元等报道,按锤头结构原理设计,合成一个 38 核苷酸的 Ribozyme,能在体外定点切割甲肝病毒 RNA 片段。核酶策略有可能产生广谱抗性,是一个具有广阔应用前景的途径。

5. 其它抗病毒物质基因

(1) 中和性单克隆抗体 基因抗体的可变区是与抗原特异结合的位点。将此可变区基因导入动物受精卵培育含该基因的转基因动物,为抵抗相应病毒(抗原)感染提供新途径。如果此基因经过反转录后构建该区的重组基因在植物体内进行表达,将具有重要的实用意义。

(2) 干扰素(IFN)基因 干扰素是动物体内一种重要的生物活性物质,具有广谱抗病毒作用和细胞免疫调节等功能。近十余年,许多国家克隆了 IFN 基因,相继在大肠杆菌、酵母和动物细胞系统进行表达。这种基因工程干扰素早已投放市场用于治疗,但应用于转基因动物的研究仍在进行中。

此外,针对病毒感染过程的抗病毒物质基因,如抑制病毒复制酶的基因、抑制病毒吸附、脱壳物质基因等均可作为抗病毒基因进行研究。据目前国内外抗病毒基因工程研究进展情况看,抗动物病毒研究较抗植物病毒研究慢,多处于细胞培养的抗病毒效果。尽管这条路线困难很多,离应用还有相当距离,但人们还是在努力探索。

(三) 基因工程疫苗

用疫苗预防病毒病对人类及具有免疫系统的动物是最有效的方法,所以疫苗的应用经久不衰。除常规疫苗外,80 年代发展了基因工程疫苗。乙肝病毒表面抗原基因,分别在大肠杆菌、酵母及动物细胞系统进行表达获得成功。酵母生产的乙肝基因工程疫苗已面市多年,收到了良好的社会及经济效益。狂犬病毒糖蛋白基因以痘苗病毒为载体也获成功表达,表达产物为融合性糖蛋白,具良好免疫原性,对细胞培养的狂犬病毒具显著抑制作用。用此疫苗免疫家犬,显示 100% 的保护效果。只是用活痘苗病毒做载体,其安全性曾在美国引起争议。虽然基因工程疫苗的研制和生产较常规疫苗耗资费力,但对于那些像乙肝病毒材料来源困难的对象则显示出特殊的优越性。目前基因工程疫苗正朝着多价方向发展。在乙肝疫苗基础上,进一步研制甲、乙、丙的多价疫苗和其它来源困难而又重要的疫苗是十分必要但又有待解决的问题。

(四) 病毒检测新技术

病毒病防治的另一重要措施是早期诊断。建立敏感、快速、准确的检测方法,无论对人或动、植物均有重要意义。传统的病毒检测方法曾主要依赖于病毒的分离培养和免疫学检测。随着分子生物学技术的发展,核酸分子杂交技术和 PCR(聚合酶链式反应)技术,在病毒检测中得到了迅速广泛的应用。特别是 PCR 技术,被认为是病毒检测系统的一次革命。它对病毒性疾病的早期诊断,尤其是对难以进行病毒培养和血清学检测的病毒种类有巨大作用。如对爱滋病的诊断,有报告指出,用 PCR 检测 HIV 核酸可比血清学检测提前 35 个月。PCR 技术的实质是寡核苷酸扩增,可由一个拷贝扩增 10^n 。可见,用此法检测样品对提高检测率是十分可观的,如与其它技术结合使用将更是如虎添翼。分子杂交与免疫学结合的检测方法除具有快速、敏感、特异外,还显示了安全、简便的特点,尤其适合于临床应用。分子杂交技术的突出优点是特异、灵敏,而免疫学方法则安全和简便。两者结合,可使病毒检测趋向更完善。近年来,病毒检测方法层出不穷,大都在灵敏、快速上下功夫。预计一种特异、灵敏、快速、安全与简便的检测方法即将产生。

三、从分子水平上研究病毒的开发和利用

病毒大分子作为先导在分子生物学发展中起了重要作用,许多病毒编码的酶早已成为分子生物学的工具酶,如 T4 连接酶、T7DNA 多聚酶;M13、 λ 噬菌体等在 DNA 重组技术中已广泛应用;近年来噬菌体展示技术(phage display)在抗体基因工程研究中为突变抗体亲和力的富集筛选提供了有效手段。下面着重评述病毒载体及病毒在生防中的作用。

(一) 以病毒为载体表达外源基因

鉴于病毒在宿主细胞中繁殖的特性及 DNA 重组技术的建立,从 80 年代起发展了多种真核病毒载体。目前已发展起来的病毒载体有痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒、禽类痘病毒、水痘带状疱疹病毒、腺病毒、SV40、牛乳头瘤病毒等,根据不同的目的可选用不同的载体。

痘苗病毒的基因组约 187kb,可以容纳大量的外源 DNA。由于痘苗病毒在 WHO 消灭天花的过程中早已广泛采用,因而痘苗病毒表达载体系统被用来制作单价和多价疫苗,并产生了良好的免疫效果;禽类痘病毒对人无感染性,已被用作载体表达兽用疫苗;水痘带状疱疹病毒在儿童中使用安全,以该毒株作载体研究基因工程活疫苗正在进行中;以腺病毒做载体开发口服基因工程活疫苗也是一个诱人的发展方向。杆状病毒载体具有众多优点,是目前广泛应用的真核表达系统之一。它最突出的优点是高表达量,最高时可达细胞总蛋白量的 25—50%。此外,杆状病毒只感染无脊椎动物,十分安全。它复制的最适宜温度为 27℃,因而为研究一些温度敏感型突变蛋白提供了良好的表达系统。携带外源基因的重组杆状病毒可在培养细胞中增殖,也可以感染昆虫幼虫。据估计,一条虫所生产的外源蛋白如用于临床诊断分析,可供约 100 万人次使用,是一个成本低廉、具有大规模工业化生产前景的载体表达系统。

与上述提到的 DNA 病毒载体系统不同,逆转录病毒是正链 RNA 病毒。在其复制过程中会形成双链病毒 DNA,并与细胞染色体 DNA 整合,是真核系统基因转移的有力工具。同时,由于它可以感染骨髓干细胞及胚胎细胞,从而提供了将基因导入整体动物体细胞的途径,也可用于基因治疗。

(二) 分子病毒学在生物防治中的应用

在病毒所造成的流行性传染中,昆虫病毒是目前发现的唯一可被用于杀虫的病毒类群。昆虫病毒,特别是杆状病毒,具有宿主特异性、杀虫后效良好、不污染环境等优良特性,是生物防治的好材料。目前世界上通过国家注册登记的昆虫病毒杀虫剂有 15 种。与化学农药相比,它的最大的缺点是不能快速地杀死害虫,通常从感染到死亡需 5—7 天时间,而在这段时间内,幼虫往往已对作物造成了不可挽回的损失。因而,如何提高杆状病毒的杀虫毒力,缩短杀虫时间,成了杆状病毒分子生物学的一个重要议题。目前已设计出多种利用基因工程技术改良杆状病毒杀虫性能的方案,有的已在实验室显示出良好的效果。

方案之一是在杆状病毒的基因组中加入其它快速作用的毒素基因,如苏云金杆菌的毒素基因、蝎毒基因等。蝎毒能特异性地作用于昆虫的神经系统,最近的研究证明,将蝎毒基因插入到 AcMNPV 的 P10 基因启动子后所构成的重组病毒,经口服感染,对二龄幼虫的半致死时间缩短约 20 小时,而且比感染野生型病毒的昆虫提早两天以上停止进食,从而极大地降低了害虫对植物的损害,是一种极有前途的基因工程杀虫剂。

方案之二是删除或破坏杆状病毒基因组中的 egt(ecdysteroid UDP - glucosyltransferase, 脱皮激素尿嘧啶葡萄糖基转移酶)基因。egt 基因是近年来在杆状病毒中发现能阻止昆虫变态

的基因。该基因的产物能将葡萄糖基转移至脱皮激素上,使脱皮激素失活,从而阻止幼虫的脱皮及从幼虫到蛹的变态过程。利用基因工程技术构建的缺失 *egt* 基因的重组杆状病毒,比野生型病毒能更快地减少害虫的进食,较快地杀死害虫。

除此之外,科学家们也正在研究其它一些能引起昆虫代谢紊乱的方案,如利用杆状病毒高效表达一些昆虫激素或激素调节物,其中有些已显示出良好的应用前景。

总之,由于病毒分子生物学研究的不断深入,阐明并解决了许多病毒学中的基本问题,有的已付之应用,在医学和农业生产上发挥了重要作用。但是,在它的发展长河中仍然留下一些重要的基础问题至今仍未解决。第一,病毒基因的自然突变,给疫苗应用带来实际困难。第二,病毒致癌作用研究虽有进展,但仍像基因突变一样难测。第三,由于病毒绝对细胞内寄生的特性,给药物治疗带来困扰等。诸如此类难题将有待病毒学及其相关学科和技术的发展予以研究解决。

* 简讯 *

中国只能走资源节约型发展道路

本刊讯 1995年3月13日,中国科学院院长周光召在答《中国科学报》记者问时指出:

1、根据我国人口众多、人均资源少、耕地不足的基本国情,我们既不能走西方高消耗资源之路,更不能浪费现有资源,我们只能走资源节约型的发展道路。

2、中国的吃饭问题只能靠自己解决,“一靠政策,二靠科技,三靠投入”,依靠科技解决农业问题才有出路。

3、在加快经济发展的同时,要采取强有力的措施,搞好环境保护,防止环境污染,而绝不允许牺牲环境来换取发展,宁可把发展速度放慢一点,也要搞好环境保护工作。

4、我国的工业抉择,必须从国情出发,找到一条促进中国社会持续、快速、健康发展的道路。

5、我们必须对青年人进行艰苦奋斗的教育,要崇尚勤俭,艰苦朴素。爱国主义和艰苦奋斗永远是中华民族自立于世界民族之林的强大精神力量。

(益鸣)