

另一个信号从滤泡细胞反向传递到卵细胞,并通过改变卵细胞内微管骨架的极性,从而先建立起卵细胞的前后极性。在此基础上,相同的信号启动背方滤泡细胞的分化而建立背腹轴。腹方滤泡细胞产生的某种腹方信号再反向传递给受精卵,最后建立胚胎的背腹体轴。

### 参 考 文 献

- [1] St Johnston, R. D. and Nusslein-Volhard, C. 1992, *Cell*, **68**:1-20.
- [2] Debiao Zhao, 1991, *Chinese J of Cell Biology*, **13**(1):12-20, **13**(2):57-64.
- [3] Debiao Zhao, 1993, *Chinese J of Cell Biology*, **15**(1):15-22.
- [4] Gonzales-Reyes, A. et al., 1995, *Nature*, **375**:654-658.
- [5] Roth, S. et al., 1995, *Cell*, **81**:967-978.
- [6] Lasko, P. 1994, *Molecular Genetics of Drosophila Oogenesis*. R. G. Landes Company.
- [7] Rushlow, C. A. et al., 1989, *Cell*, **59**:1165-1177, Steward, R. *ibid*, p1179, and Roth, S. et al., *ibid*, p1189.
- [8] Cooley, L. and Theurkauf, W. E. 1994, *Sciences*, **266**:590-596.
- [9] Theurkauf, W. E., et al., 1992, *Development*, **115**:923-936.
- [10] Clark, I., et al., 1994, *Curr. Biology*, **4**:289-300.
- [11] Rongo, C. and Lehmann, R. 1996, *Trends in Genetics*.
- [12] Zhao, D. B. and Bownes, M. *Unpublished data*.
- [13] Gonzalez-reyes, A. and St Johnston, D. 1994, *Sciences*, **266**:639-642.
- [14] Lehmann, R. 1995, *Cell*, **83**:353-356.
- [15] Lane, M. E. and Kalderon, D. 1994, *Genes and Development*, **8**:2986-2995.
- [16] Ruohola, H. et al., 1991, *Cell*, **66**:433-449.
- [17] St Johnston, D. 1995, *Cell*, **81**:161-170.
- [18] Neuman-Silberberg, F. S. and Schubach, T. 1993, *Cell*, **75**:165-174.
- [19] Roth, S. and Schaubach, T. 1994, *Development*, **120**:2245-2257.
- [20] Brand, A. H. and Perrimon, N. 1994, *Genes and Development*, **8**:629-639.
- [21] Forlani, S. et al., 1993, *Mechanism of Development*, **14**:109-120.
- [22] Ruohola-Baker H. et al., 1993, *cell*, **73**:953-965.

## 猪瘟病毒与宿主细胞间的相互关系

王 镇 丁明孝

(北京大学生命科学学院细胞与遗传学系 北京 100871)

猪瘟病毒旧称猪霍乱(Hog cholera virus, HCV),现称经典猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)。感染猪可引起高热、皮肤变色、白细胞减少、大量内出血等及神经系统症状<sup>[1,2]</sup>,死亡率很高。猪瘟最早于19世纪30年代在美国的俄亥俄州发现。根据感染CSFV毒力的差异,可导致急性、亚急性及慢性猪瘟。强毒力CSFV导致的急性猪瘟可使猪在感染后10-20天内全部死亡。中低毒力CSFV感染也可使猪死亡,不死的猪可发展成持续感染、排毒的“CSFV携带者”。因此,猪瘟病毒是世界上危害养猪业的重要病毒之一。据统计,在我国每年死亡的猪中有三分之一是由CSFV感染造成的。每年造成的经济损失是巨大的。因此,猪瘟

病毒一直是家畜病害研究及兽病检测与防治的一个重点<sup>[3]</sup>。

猪瘟病毒是有囊膜的正链RNA病毒,在分类学上属黄病毒科(Flaviviridae),瘟病毒属(Pestivirus)<sup>[4]</sup>。病毒粒子直径40-60nm。囊膜上有病毒编码的糖蛋白:gp44/48、gp33、gp55<sup>[5]</sup>。核心由病毒蛋白衣壳蛋白p14与病毒基因组RNA组成,直径约30nm,超薄切片中呈六角形<sup>[6]</sup>,具有二十面体对称性<sup>[5]</sup>。猪瘟病毒在蔗糖中浮力密度为1.12g/ml,沉降系数 $S_{20} = 140-150$ 。猪瘟病毒能在多种动物细胞中增殖,且一般不使培养细胞产生病理变化(cytopathic effect, CPF)<sup>[7]</sup>。近年来,随着对猪瘟病毒分子生物学研究的深入,人们对CSFV及其

与宿主细胞关系的研究已取得了长足进展。

## 一、猪瘟病毒增殖过程

CSFV 是通过受体介导的胞饮作用进入宿主细胞的,该过程需要定位于宿主细胞膜上的某种因子的参与<sup>[8]</sup>。CSFV 脱衣壳释放核酸后,进行其蛋白质合成及基因组复制。CSFV 的基因组 RNA 约 12.3kb,5' 端无甲基化的“帽子”结构,3' 端亦无 poly(A)“尾”结构,只有一个可读框(open reading frame,ORF),可编码 3898 个氨基酸的多聚蛋白<sup>[9]</sup>。CSFV 的基因组 RNA 可作为 mRNA 指导其蛋白质的合成。ORF 编码的多聚蛋白在翻译的同时及翻译后,经宿主细胞及病毒编码酶的加工,形成 10—11 种病

毒蛋白。ORF 编码的 N<sup>pro</sup> 具有蛋白酶活性,以自催化的方式从正在翻译的多聚蛋白上断裂下来。CSFV 的结构蛋白:衣壳蛋白 C(p14)、囊膜糖蛋白 E<sup>m</sup>(gp44/48)、E1(gp33)、E2(gp55)是由定位在宿主细胞内质网及高尔基复合体上的信号肽酶、蛋白水解酶以及糖基化酶的作用下加工成熟的。E<sup>m</sup> 具有核酸酶活性<sup>[10,11]</sup>,由于分子内缺乏疏水的膜锚定区,与病毒囊膜结合力弱,易从囊膜上游离下来<sup>[11]</sup>。此外,E<sup>m</sup> 还具有一定的抗原性,可诱导产生猪瘟病毒的中和抗体<sup>[12]</sup>。E2 是 CSFV 的主要抗原蛋白<sup>[13]</sup>,可诱导产生病毒的中和抗体<sup>[11]</sup>,体内可诱导抗 CSFV 的保护性免疫,保护猪抵抗致死量 CSFV 的攻击<sup>[12]</sup>。

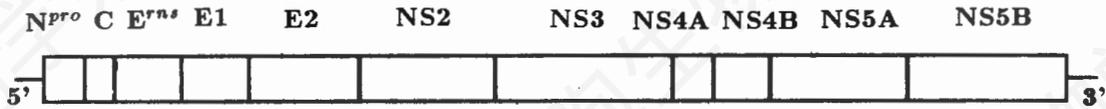


图1 猪瘟病毒的基因组结构示意图<sup>[1]</sup>

目前对 CSFV 非结构蛋白的数目及功能还不清楚<sup>[6]</sup>。已知在 CSFV 增殖过程及其与宿主细胞的相互作用过程中,非结构蛋白起重要作用。用高浓度的放线菌素 D 抑制宿主细胞 RNA 的合成,CSFV 的复制不受影响,表明 CSFV RNA 的复制不依赖于宿主的酶系统,而是靠其自身基因组编码的 RNA 聚合酶来完成的<sup>[14]</sup>。CSFV ORF 编码的多聚蛋白 C 端的一个蛋白中存在一段 Gly-Asp-Asp 序列,可能是充当病毒的复制酶,以 RNA 为模板进行 RNA 的合成<sup>[15]</sup>。病毒的基因组 RNA 由衣壳蛋白 p14 包装的过程十分迅速,但病毒核衣壳是在宿主细胞什么位置,以何种方式披膜并释放到胞外还不太清楚。Thiel 等认为 CSFV 的装配是发生在细胞内膜上的<sup>[6]</sup>。

## 二、猪瘟病毒在体外培养

### 细胞中的增殖特点

CSFV 可以在许多哺乳动物细胞中增殖,但与其它动物细胞相比,猪的细胞最易被 CS-

FV 感染,并且也最易于其增殖,滴度一般在  $10^5$ — $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml<sup>[3,16]</sup>。用免疫荧光检测,可在宿主细胞的胞质中检测到 CSFV 抗原<sup>[17]</sup>。大部分报道表明,即使是用猪原代细胞,CSFV 感染通常也不会使培养细胞产生 CPE<sup>[6]</sup>。由于接毒后 CSFV 可在细胞中不断增殖、释放,细胞可带毒传代,且在细胞分裂时病毒能传至子代细胞中,因此在疫苗生产中,接毒后可多次收获病毒。然而实验中我们发现在培养液中 CSFV 的半寿期却很短,37℃ 只有几小时<sup>[18]</sup>。

CSFV 在不同种类细胞中的增殖程度有差异,如:用猪淋巴细胞株 38A<sub>1</sub>D 系培养 CSFV 比用 PK-15 细胞系培养,滴度要高<sup>[19]</sup>,用微型猪肾细胞系(minipig kidney cell line, MPK)适应繁殖 CSFV C 株可比用兔脾增殖病毒提高一个滴度<sup>[20]</sup>。

此外,也有一些 CSFV 使体外培养细胞产生 CPE 的报道。Shimizu 用猪骨髓基质细胞(porcine bone marrow stroma cell, BMSC)体

外增殖 CSFV,发现 CSFV 感染不仅可以抑制骨髓基质细胞的分化,而且还可使 BMSC 产生 CPE。用 BMSC 增殖 CSFV ALD 毒株,一般接毒 4 天可观察到 CPE 的产生,培养液中病毒滴度可达  $10^{7.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml。继续培养, BMSC 的 CPE 更加明显,接毒 10 天几乎全部细胞均产生 CPE。用抗 CSFV 抗体可抑制 BMSC CPE 的产生,表明 BMSC CPE 的产生是由于 CSFV 的感染造成的<sup>[17]</sup>。此外,本实验室翟中和等将 CSFV 与不使培养细胞产生 CPE 的鸡新城疫(Newcastle disease virus) I 型弱毒株共培养,可使培养细胞产生 CPE。Kumagai 等也报道了这种现象,但造成细胞 CPE 的机制还不清楚。

随着在分子水平上对 CSFV 研究的深入,人们开始研究 CSFV 与宿主细胞之间相互作用的分子基础。Meyers 等人用 CSFV Alfort 株在猪淋巴细胞系 38A<sub>1</sub>D 上传了 239 代,得到了一株可使培养细胞产生 CPE 的突变株—CSFV Alfort/M。序列分析发现在 CSFV Alfort/M 株感染细胞中除有 12.3Kb 的 CSFV 全基因组 RNA 外,还有一段 8Kb 的病毒特异性 RNA 片段。该片段是由 CSFV 基因组 RNA 5' 端缺失形成的。也就是说,致细胞病变型(cp 型)的 CSFV Alfort/M 株是由一个含 8Kb 长的核酸片段的 DI 颗粒(defective interfering particles)及含 12.3Kb 全基因组 RNA 的帮助病毒(helper virus)构成。DI 颗粒的复制依赖于帮助病毒,而它的复制又会干扰帮助病毒的复制。对过去报道的可使培养细胞产生 CPE 的 CSFV ATCC 株、Steiermark 二毒株进行实验,发现在这两株 cp 型 CSFV 感染细胞中除含有 12.3Kb 的全基因组 RNA 外,也存在 8Kb 左右的病毒特异性核酸,即也是由 DI 颗粒及帮助病毒颗粒组成<sup>[21]</sup>。8Kb RNA 缺乏 CSFV 5' UCR 及编码 N<sup>pro</sup>、C、E<sup>pro</sup>、E1 和 E2 四种结构蛋白及 p125 N 端部分的序列。用 CSFV cDNA 体外缺失转录出同样长度的 RNA 转染细胞,也可促使 CSFV 感染的细胞产生 CPE<sup>[22]</sup>,表

明这几株 cp 型 CSFV 中的 DI 颗粒是造成 CSFV 感染细胞 CPE 的因子。在 cp 型 BVDV 中编码 p125 C 端序列转译出的 p80 被认为是 cp 型牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhoea virus, BVDV)在蛋白质水平上的标志分子,是 cp 型 BVDV 使培养细胞产生 CPE 的因素<sup>[23]</sup>。推测同 BVDV 类似,CSFV 使培养细胞产生 CPE 也需要表达一定量的 p80。CSFV Alfort/M 株、ATCC 株、Steiermark 株在宿主细胞中 8Kb 核酸表达的 p80 导致了培养细胞 CPE 的产生<sup>[21]</sup>。对 CSFV DI 颗粒与宿主细胞 CPE 产生间关系的研究有利于深入了解病毒复制过程及其与宿主细胞间的相互作用。

但是,实验也发现只能传有限代次的原代细胞,接种 CSFV 带毒传代后,可增加原代细胞的可传代次数。也就是说,CSFV 的存在延长了原代细胞的增殖存活时间。CSFV 是否携带有参与细胞调控并使细胞“无限增殖”的相关基因,CSFV 是如何作用于宿主细胞而改变宿主细胞生长特点的,还有待进一步研究。

### 三、猪瘟病毒对机体中细胞的破坏作用

CSFV 细胞培养滴度低,即使是强毒株通常也不使培养细胞产生 CPE。但 CSFV 感染猪死亡率很高,强毒株引起的急性猪瘟 10 天内死亡率几乎达 100%<sup>[2]</sup>。为什么 CSFV 在培养细胞中增殖力弱,而感染猪却可以迅速使猪死亡?尸体解剖发现 CSFV 感染猪可侵染猪的多种器官。据报道在瘟猪全身:如脑、肺、肝、脾、胰、肾、食管、胃、大小肠、皮肤、舌等器官及扁桃体、淋巴结、涎腺、甲状腺、胸腺、肾上腺等腺体中均可检测到 CSFV 的存在<sup>[2]</sup>;而且 CSFV 对猪扁桃体及其外周淋巴结及骨髓等器官的某些种类细胞的感染是杀伤性的<sup>[1,17]</sup>。CSFV 可感染并损伤猪的淋巴组织生发中心,障碍 B-淋巴细胞的成熟,造成循环系统及淋巴组织中的 B-淋巴细胞缺失,破坏猪的体液免疫<sup>[1]</sup>。CSFV 对

猪 B-淋巴细胞及骨髓基质细胞的损伤是导致急性致死性猪瘟的一个重要原因<sup>[1-17]</sup>。

有趣的是,另一种可引起的急性猪瘟的非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)同样对猪的淋巴细胞有嗜性。尽管 ASFV 与 CSFV 在病毒学上属于截然不同的两类病毒,且在病毒结构上也有很大的不同,但两者感染猪引起的症状相似。ASFV 感染猪,活化的猪单核巨噬细胞释放出的细胞因子诱导淋巴细胞的凋亡。猪淋巴细胞缺失是 ASFV 及 CSFV 感染引起的急性猪瘟死猪的共同原因之一<sup>[1-24]</sup>。

越来越多的研究证明病毒感染与细胞凋亡(apoptosis)之间存在着密切的关系。细胞凋亡也称细胞编程性死亡(programed cell death),是由基因控制的细胞主动性自杀过程。病毒感染细胞的结果是由病毒本身及宿主细胞的特性决定的。病毒感染可导致被感染细胞死亡、持续性感染或转化成永生的细胞系。ASFV 感染猪可引起猪淋巴细胞的凋亡;但研究发现 ASFV 还带有抑制细胞凋亡的基因。ASFV 的 A224L 基因编码的 ASFV 的结构蛋白是细胞凋亡抑制蛋白 IAP 家族的成员,该蛋白在感染早期可抑制被感染细胞进入程序性死亡。ASFV 的 A179L 基因编码的蛋白是属于 bcl-2 家族的凋亡抑制蛋白,这两种蛋白的表达,在体外可抑制 Vero 细胞的凋亡,延长细胞存活时间,使 ASFV 能够完成复制。在猪体内可通过抑制猪单核及巨噬细胞凋亡,使 ASFV 不断增殖造成慢性猪瘟的持续性感染<sup>[25-26]</sup>。虽然 CSFV 在猪肾细胞系 PK15 细胞中增殖时并不使细胞产生 CPE,但我们在 CSFV 感染的 PK15 细胞中发现少数细胞的核形成了类似细胞凋亡时“凋亡小体”样结构<sup>[18]</sup>。CSFV 是否可诱导细胞凋亡目前还没有定论,要搞清楚这一点还有待进一步的实验证明。

此外,瘟猪扁桃体切片显示:被 CSFV 感染的细胞形态完好,而其周围死亡细胞中又检测不到 CSFV 的存在。是否 CSFV 基因组中也

存在一种可使细胞死亡的基因,它以直接或间接的方式作用于周围的细胞,诱导细胞的死亡?人的免疫缺损病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染人巨噬细胞,可导致巨噬细胞 Fas 受体的高表达,并介导未感染 HIV 的 T 淋巴细胞凋亡<sup>[27]</sup>。CSFV 感染的细胞是否也可介导未感染细胞凋亡是一个令人感兴趣的课题。

对 CSFV 与宿主细胞相互关系的研究工作,有利于揭示病毒增殖过程中的调控及病毒致病机制,并将对 CSFV 疫苗生产及猪瘟防治具有指导意义。相信随着研究的深入,终将会揭示 CSFV 增殖及其与宿主细胞间关系的细节,并将为猪瘟的防治提供新的思路。

## 摘 要

猪瘟病毒(CSFV)是一种正链 RNA 病毒,在培养细胞中增殖力弱,滴度低,通常不使培养细胞产生病理变化;而感染猪导致的猪瘟发病迅速,死亡率高。本文综述了近年来在 CSFV 增殖过程、与宿主细胞间的相互作用方面的研究进展,并对 CSFV 与细胞凋亡间的关系进行了探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Susa, M. et al., 1992, *J. Virol.*, **66**:1171-1175.
- [2] Pan, I C, et al., 1993, *Arch. Virol.*, **131**: 475-481.
- [3] Moormann, R J M. et al., 1996, *J. Virol.*, **70**:763-770.
- [4] Wengler, G., 1991, In: Classification and nomenclature of viruses Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. by Franchi, R I B., et al., pp. 223-233, Springer-Verlag, Berlin.
- [5] Thiel, H-J. et al., 1991, *J. Virol.*, **65**: 4705-4712.
- [6] Moennig, V., 1990, *Vet. Microbiol.*, **23**:35-54.
- [7] 殷震等,1983, 动物病毒学, pp517-529, 科学出版社,北京.

- [8] Flores, E F. et al, 1996, *J. Gen. Virol.*, **77**:1295-1303.
- [9] Meyers, G. et al., 1989, *Virol.*, **171**:555-567.
- [10] Windisch, J M. et al., 1996, *J. Virol.*, **70**:352-358.
- [11] Hulst, M M. et al., 1994, *Virol.*, **200**:558-565.
- [12] Konig, M. et al., 1995, *J. Virol.*, **69**:6479-6486.
- [13] van Rijn, P A. et al., 1994, *J. Virol.*, **68**:3934-3942.
- [14] Rumenapf, T. et al., 1993, *J. Virol.*, **67**:3288-3294.
- [15] Moormann, R J M and Hulst, M M., 1988, *Virus Res.*, **11**:281-191.
- [16] Roehle, P M and Edwards, S., 1994, *Res. Vet. Sci.*, **57**:210-214.
- [17] Shimizu, M. et al., 1995, *Vet. Microbiol.*, **47**:395-400.
- [18] 王镇等, 1997, 见: 畜禽重大疫病免疫防制研究, 谢庆阁、翟中和主编, pp126-131, 中国农业科技出版社, 北京.
- [19] Strandstrom, H. et al., 1974, *Virol.*, **57**:175-178.
- [20] Ferrari, M., 1992, *Comp. Immun. Microbiol. Infect Dis.*, **15**:221-228.
- [21] Meyers, G. and Thiel, H-J., 1995, *J. Virol.*, **69**:3683-3689.
- [22] Meyers, G. et al., 1996, *J. Virol.*, **70**:1588-1595.
- [23] Meyers, G. et al., 1991, *Virol.*, **180**:602-616.
- [24] Gomez-Villamandos, J C. et al., 1995, *J. Gen. Virol.*, **76**:2399-2405.
- [25] Chacon, M R. et al., 1995, *Virol.*, **216**:670-674.
- [26] Neilan, J G. et al., 1993, *J. Virol.*, **67**:4391-4394.
- [27] Badley, A D. et al., 1996, *J. Virol.*, **70**:199-206.

## 细胞凋亡与细胞内信号

戴云

(第一军医大学细胞生物学实验室 广州 510515)

张兵

(第一军医大学南方医院消化内科 广州 510515)

细胞凋亡是生物界广泛存在的一种基本生命现象,具有重要的生理学和病理学意义,近年来颇受重视。同细胞的其它生物学现象(如增殖、分化、恶性转化)一样,诱导凋亡的细胞外刺激必须通过细胞内信号的传递,而激发自主死亡程序,最终导致细胞死亡<sup>[1]</sup>。本文就这方面的研究近况作一综述。

### 一、细胞内 $Ca^{2+}$

在对某些细胞外刺激的反应中,胞质内游离  $Ca^{2+}$  浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 迅速出现持续性升高(达 800nM),并随之出现核酸内切酶活化(DNA 断裂)和细胞死亡,如  $Ca^{2+}$  载体(可直接升高  $[Ca^{2+}]_i$ )和糖皮质激素、抗 TCR 抗体、 $\gamma$ -辐射(间接使  $[Ca^{2+}]_i$  升高)等可能均是通过细胞内  $Ca^{2+}$  的介导而诱发胸腺细胞凋亡的<sup>[2,3]</sup>。而细胞

外  $Ca^{2+}$  缺乏或细胞内  $Ca^{2+}$  螯合(BAPTA-AM 或 quin-2 处理)则可防止一些细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。因此,  $Ca^{2+}$  作为细胞内信使,可能在介导细胞凋亡中起重要的作用。

$[Ca^{2+}]_i$  升高触发细胞凋亡的机制尚不明确,可能与下列途径有关:(1) 介导或促进 DNA 损伤:  $[Ca^{2+}]_i$  可能在多个环节上参与细胞凋亡时 DNA 的损伤。首先,  $[Ca^{2+}]_i$  升高可通过激活  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  依赖性核酸内切酶,导致核小体间 DNA (180-200bp) 的断裂<sup>[3]</sup>。其次,尽管负责高分子量 DNA 大片段断裂(50-300kb, 出现于核小体间 DNA 断裂之前)的核酸酶似乎不依赖于  $Ca^{2+}$ ,但  $[Ca^{2+}]_i$  升高可能通过某些机制(如组蛋白 1 重新分布和拓扑异构酶 I 活化)而影响染色体的结构,使之出现解折叠、扭转张力减低和超螺旋构象改变,而使 DNA 易于被 DNase 降解,如细胞内、外  $Ca^{2+}$