



体外培养的红白血病细胞中 Friend 病毒合成的研究

报告人: C. Friend 教授

(美国 Mount Sinai 医学院实验细胞

生物学中心主任)

报告日期: 79.6.7.

Friend 白血病毒 (FLV) 是有双层套膜的 C 型 RNA 肿瘤病毒, 由受感染的细胞芽生。成熟的病毒颗粒呈圆形, 直径约 100 毫微米, 电子密度深的拟核含 RNA 和蛋白质, RNA 单链, 约占病毒的 1%。成熟的小鼠白血病毒有类似鸟类髓细胞白血病毒基因组的结构, 两个 35S 亚单位约为 3×10^6 道尔顿, RNA 分子量为 $10-12 \times 10^6$ 道尔顿。这类 RNA 肿瘤病毒 (Oncorna 病毒) 都含有反转录酶, 它的合成受病毒基因组中 pol 基因的控制。基因组的 gag 基因控制病毒的拟核抗原, 位于核酸链的 5' 端, 控制套膜糖蛋白的 env 基因位于 3' 端。

FLV 诱发白血病的有关机理, 还不清楚, 主要是因为一些病毒株含有复合病毒的缘故。通常并没有注意到, 这种小鼠白血病至少发生两种可以相区别的红细胞生成性反应。原型病毒象最初所分离到的病毒一样, 诱发红白血病和严重贫血, 称为 FLV-A。随后出现的其他病毒株称为 FLV-P, 由于它们诱发红白血病并伴随红细胞增多症 (polycythemia)。红细胞增多症病毒除含有第二种病毒, 即缺陷性脾病灶形成病毒 (spleen focus-forming virus, 简称 SFFV) 之外, 还含有 FLV-A。这两种病毒在感染成年的敏感小鼠品系, 经 1-2 周短暂潜伏期后, 很快地引起暴发性红白血病。因为两种病毒株的潜伏期和 LD_{50} 都相类似, 所以对 SFFV 诱发白血病的作用仍未能作出令人满意的判断。

不过这两株病毒也在几个方面存在彼此不同之处。SFFV 象是 FLV 的基因组同嗜异种病毒, 或一些正常细胞成分之间的重组体。它

是一种缺陷性病毒, 只有存在着种种病毒性或非病毒性因子所提供的“辅助者”的时候才能够表达。SFFV 的表达就使得在感染 9 天之后可以检查到红细胞增多症以及形成脾病灶。我们能够把 SFFV 的活性从 FLV-P 制品中去掉而不改变其诱发白血病的活性, 因为在 FLV-P 中从来不完全没有 FLV-A 的存在。在 FLV-P 病毒株中, SFFV 刺激过度输血小鼠的红细胞生成, 可是 FLV-A 却不能。切除脾脏并接种 FLV-P 的小鼠只发生白血病而不产生红细胞增多症。这个事实提示, 靶细胞可能是不同的。SFFV 可能作用于类红细胞的前身物, 或许已接近分化过程的血红素生成——敏感性水平。在另一方面, FLV-A 可能通过转化比较早期的类红细胞的前身物而诱发白血病。对于白血病毒和 SFFV 的遗传控制也有所不同, 因为控制对这些病毒敏感性的基因组是独立的分离的。SFFV 宜于在对 FLV 诱发白血病较有抗性的小鼠中检测到。FV-1 位点施加其影响于白血病毒病的“辅助者”, 而 FV-2 位点象是作用在缺陷性 SFFV。最后, 在与 Lerner 的共同工作中所取得的初步结果表明, FLV-A 和 FLV-P 的 GP71 抗原不一样, 而 P30 抗原是相同的。

为了希望略为弄清 SFFV 在整体中诱发白血病所起的作用, 比较了 FLV-A 和 FLV-P 对体外培养细胞的转化能力。恶性转化的指标是形态改变, 在软琼脂上生长和在同品系宿主主体内形成肿瘤。实验之一是取自 DBA/2 成年小鼠骨髓细胞感染以含有 SFFV 的 FLV-P。另一实验是取 12-13 天胎龄小鼠的胚肝细胞

感染以 FLV-A, 并在最初 5 天的培养液里含红细胞生成素(erythropoietin, 简称 EPO)。两项实验都产生了已连续传代几年的转化细胞系。其中三系细胞是受诱导物处理之后, 能够接受刺激, 进行分化的恶性未分化类红血细胞。另外两系是非恶性的, 不属于红血细胞的粘着细胞。象从 FLV 感染的小鼠所发生的白血病中建株的细胞一样, 体外转化的细胞系所合成的病毒也是减毒病毒。

这一系列的实验结果表明, FLV 所包含的这两株病毒都能够转化高度敏感的 DBA/2 小鼠细胞。既然只有接受 EPO 处理两次的细胞才能建立持久的细胞株, 所以 EPO 似乎是受 FLV-A 感染的细胞发生转化所必需的条件。以下两点说明 SFFV 或许也有象 EPO 样的效应的可能性: 1. 在超输小鼠中 SFFV 所具有的性能; 2. FLV-P 感染的培养细胞不需要 EPO 也能发生转化这一事实。这些病毒引起细胞转化的效率都不高, 但看来是特异性的。对于 FLV 诱发白血病有遗传抗性的 C57BL 小鼠的细胞, 在感染这种病毒以后不表现什么变化。

看来似乎取决于细胞的类型, 微环境所施加的选择性压力, 以及还不了解的因素等, 病毒的感染可能触发了从细胞分化直到细胞转化的一系列的生物学改变过程。当知道了哪些因素在体外培养的细胞转化中是关系重要的, 我们就有可能获得与整体发生白血病有关机制的较为完善的认识。

关于红白血病细胞系中病毒合成的研究, 主要是 Tsuei 所从事的工作。用二甲亚砜(dimethylsulfoxide, 简称 DMSO) 处理培养的细胞, 不只刺激细胞分化, 也刺激合成了病毒。这样就有可能研究控制血球蛋白和病毒合成的机理。从电镜观察的事实, 在含有刺激分化的化合物或抑制诱导分化的化合物中生长的细胞, 膜上芽生病毒的数目和释放到培养液中病毒颗粒的数目都显著增加, 表明调节这两种功能的机理是并无关联的。当发现不论能否合成病

毒的变种细胞株在受到诱导物处理以后都能进行分化, 就为不同的调节因子控制这两种功能提供了进一步的证据。

把培养中的病毒作特性鉴定。培养 3 天的对照细胞用 ^3H -尿嘧啶脉冲标记, DMSO 处理的细胞在新鲜培养液中用 ^{32}P 脉冲标记 18 小时。去除细胞后将上清液铺层在 25% 蔗糖溶液, 然后经 25,000 转/分 90 分钟离心。两个样品的病毒沉淀块混合后再铺层在 15—55% 线性蔗糖梯度, 并经 45,000 转/分, 90 分钟离心, 收集的部分再用三氯醋酸沉淀, 并计数。其结果是取自对照细胞和 DMSO-处理组细胞的病毒子粒, 都在密度为 1.16 克/毫升处沉淀。再用同样方法标记的细胞测定病毒 RNA 的大小。取自实验和对照两组的病毒使相混合, 在室温经 1% 十二烷基硫酸钠(SDS) 致溶 10 分钟后, 把混合物加于 2—20% 线性蔗糖梯度中, 经 45,000 转/分 90 分钟离心, 用 3 毫米滤片分别收集沉淀物, 并以三氯醋酸和乙醇洗涤。外标志是鸟类髓细胞白血病毒。与这种病毒的 70S 基因组相比较, 上述两组细胞中病毒的 RNA 都在 60S 左右(约 6×10^6 道尔顿)。再用凝胶电泳测定病毒 RNA 的分子量。用酚-SDS 方法从 ^3H -尿嘧啶标记的病毒粒子中提取 RNA, 并在 70°C 温度下经 8M 尿素处理 3 分钟使变性, 然后在 2% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳。结果推算出 RNA 亚单位的分子量为 3×10^6 道尔顿, 证实了前述整个基因组大小的数据。

为了确定在调节血红蛋白和病毒合成的机制之间是否存在着关联性, 以 DMSO 处理后血红蛋白和病毒合成的反应作为比较的基础, 对与其亲代不同的三株变种克隆(clone)进行了研究。5—86 克隆是原型细胞株, 其血红蛋白和病毒的合成都对 DMSO 处理有高度敏感性。未处理的细胞克隆的生长模式, 在最初 3 天为对数生长期, 平均倍增期为 12—15 小时, 都是可相比较的。在培养液内含有 DMSO 时, 抗 DMSO 变种株 119 显示出与亲代

5—86株所特有的早期生长迟滞的反应,并在4天后达到生长稳定期。不过抗DMSO株707M和可诱导株F4—2细胞的生长模式却不受培液中DMSO的影响,也未看到细胞生长的延滞。逐日用联苯胺染色检测血红蛋白的合成时,在培液不含DMSO的情况下所有四株细胞中的联苯胺阳性(B+)细胞水平均低,范围在0—3%之间;可是当生长在含有DMSO的培液里,可诱导株5—86和F4—1的B+细胞显著增加,从处理以后2—3天开始到第6天B+细胞达到80—90%的水平。相比之下,H—29株和707M株对于DMSO的刺激作用反应很弱,到第6天只有不到5%的B+细胞。用测定培液里病毒反转录酶的每日累积活力作为从FL细胞中释放病毒的指标。5—86株和从其衍生的对DMSO有抗性的H—19株都是以同样模式释放病毒。这两株细胞的对照组,在细胞生长的早期对数期时,病毒的释放是以指数增长。在用DMSO处理时,从两株细胞释放病毒都受到刺激。与细胞增殖平行,病毒的释放也存在最初的延滞,到第4天时达到高峰,在培养细胞至静止期以后则下降。不接受诱导的707株和可诱导的F4—1株产生病毒的量都很低。DMSO处理虽使707M

株释放病毒稍有增加,但对F4—1株并无效果。用单向特异血清,以竞争放射免疫方法来测定四株细胞的培液中病毒套膜抗原FLV—GP71和拟核抗原P30的含量。按照每200微升培液对¹²⁵I—标记的病毒抗原置换百分率来标绘测定。四株细胞不论是否释放病毒,其培液中都存在可以测得出的GP72抗原。从几乎不产生病毒的707M和F4—2两株细胞,同产生病毒的5—86和H—19两株细胞的培液中所测定的GP71抗原水平,是可相类比的。对照和DMSO处理的培养细胞所释出的抗原量之间也没有什么差别。在病毒P30抗原的检测方面,产生病毒的5—86和H—19株,以及产量低的707M株,释放到培液中的抗原量大致相似,但在F4—1细胞株的培液中却测不到这种抗原。除去F4—2株以外,其他对照和DMSO处理组的P30水平都相类似,而在F4—2株只有用DMSO处理之后才测得出这种抗原。

这些实验结果表明,血红蛋白的合成和病毒的合成之间不存在相互关系,同时也指出,两种功能中每一种的调节是同另一功能的调节无关的。

(姚曾序译)

膜的感传效应(membrane impression)和基因表达

G. Brunner

分化的分子生物学的中心问题是:为什么有新的基因组片段被转录?对于细胞分化过程的控制已提出各种不同的假设。很多假设主张由“时间程序”、也有主张由“变化程序”导致细胞转化为新的表型。这里讨论的模型是赞助后一假说的,提出细胞微环境的连续依次的变化引导了分化过程。这些变化的规律性的认识作为“进化的经历”即作为或多或少已固定下来的程序被整合到基因组中去。细胞膜的特殊

结构(受体、受体区)能够感受和转换环境信号,这种信号能够在细胞的不同水平上被转换和被调节。对于信息流从细胞膜到基因组的这个过程,叫做膜的感传效应。这与信息流从基因组到细胞膜的所谓“基因表达”正相反。应提及的是,分化过程相当于在细胞膜和基因组之间两者的相互作用,这种典型的像打乒乓球那样一来一往的作用形成了细胞谱系,并假设对后面预期信号的膜受体是与细胞的特殊表型一