

整合的逆转病毒基因组表达的调节

R·A·Weinberg 和 D·L·Steffen

逆转病毒利用反转录作用合成其基因组的 DNA 拷贝, 并且在感染后不久便整合到细胞染色体的 DNA 中。这种整合的病毒 DNA, 作为病毒 mRNA 和子代病毒 RNA 的模板, 被称为前病毒。在这感染周期中, 一个重要的控制点在于前病毒转录调节的水平。前病毒的表达可能受到各种调节机制的控制, 这种控制是本文讨论的主题。因为对这一调节的分子机制了解得尚不够, 本文主要限于探讨调节现象。

内源性前病毒转录的调节

前病毒转录控制的最突出和最有力说服力的例子, 是来自许多脊椎动物种系细胞中的作为遗传因子所携带的逆转病毒基因组。尽管已提出一些理论来解释这些前病毒的来源, 但是已积累的证据提示, 它们是各种现代物种的祖先种系的组织受到感染的残留物。实验室中已重复了这样的种系感染。用 Moloney 小鼠白血病病毒(Mo-MuLV)感染 Balb/c 小鼠胚胎, 产生一株遗传上传递 Mo-MuLV 前病毒的小鼠细胞系。这种小鼠为种系感染是内源性前病毒来源的这一概念, 提供了实验依据, 也为内源性前病毒调节的研究提供了有力的实验材料。

内源性逆转病毒基因组表达的调节是非常复杂的。这些前病毒绝大多数处于转录静止状态, 少数在某些特定条件下可被激活, 而另一些则永久地失活, 再也不能产生转录物。这种活性的缺乏或许是可以预料到的, 因为这些前病毒象耐受性内源性寄生虫一样存在于宿主机体的种系中。偶尔前病毒得以有一定程度地转录, 只要不危及携带前病毒个体的繁殖适合度, 这种表达是可以耐受的。相反, 如果表达危及繁殖适合度, 这种携带特定致病病毒颗粒的高度表达的前病毒的个体, 就可能会从该种群的繁育群中消失。因此, 一种很强的进化压力限制着许多内源性前病毒基因组的表达。

这种压力可在迫使新近整合的前病毒被迅速地切除的机理中表现出来, 但目前尚缺乏说明这种机理的直接证据。其它的机理也可能使前病毒相对地无害化。例如: 鸡的一系列内源性前病毒的研究都说明了

不同遗传传递的病毒基因组广泛的部分缺失。这些缺失保证了内源性前病毒表达的部分或全部失活。在已知只表达内源性前病毒糖蛋白的鸡细胞中, 就有这种缺失性前病毒存在, 并且前病毒的这种物理改变可能用以解释存在于这种细胞系中的内源性病毒蛋白的有限组分。相同的情况也可能发生在某些小鼠组织中, 这些组织显示仅表达内源性嗜性前病毒的糖蛋白基因。

绝大多数内源性病毒即使有表达的话也是很少见的, 结构缺失之类的简单解释是否足以说明其缺乏表达的原因尚不清楚。估计小鼠基因组属于逆转病毒起源的部分在 0.04%~0.3% 的范围, 在这样大量的基因中总是少数基因在任何情况下都表达是极不可能的。

在非缺陷和能够表达的内源性前病毒中, 观察到表达类型上有很大的不同。在这方面为鼠类白血病病毒(AKV)编码的内源性前病毒被广泛地研究过。AKR、C₃H、Balb/c 和 C57BL 小鼠都携带 AKV 前病毒。AKR 小鼠的 AKV-1 和 AKV-2 前病毒在早期发育过程中表达, 并在条件允许的时候使动物产生终身的病毒血症。相反, Balb/c 和 C57BL 的前病毒仅在动物的生命晚期才表达。C₃H 的前病毒的表现介于两者之间, 虽在早期表达, 但明显地较 AKR 前病毒略晚, 或水平较低, 致使动物抗病毒免疫反应有效地增强, 不致发展成病毒血症。前病毒的拷贝数或遗传背景不能作为解释这些结果的依据, 因为在遗传交叉业已表明前病毒表达的水平是与一组前病毒相分离的, 并且不同遗传背景的其他部分相连锁。

内源性和外源性前病毒表达的差别

内源性病毒的转录通常受到严格的抑制。例如, 从 AKR 或 Balb/Mo 胚胎中制备的成纤维细胞携带有内源性前病毒拷贝, 但大多数在体外培养时并不释放病毒。Balb/Mo 小鼠其携带的遗传传递的 Mov-1 前病毒看来得以转录, 但也仅限于在这种病毒的靶组织, 即脾和胸腺内。这个结论是以胰 DNA 酶部分酶解染色质的技术为基础的, 这是一种检测有转录活

性的顺序的方法。脾和胸腺中 Mov-1 前病毒的敏感性, 和对比非靶器官中这种 DNA 顺序的不敏感性, 有力地提示这种前病毒只存在于脾和胸腺细胞的染色体中才得以转录。

靶组织一些细胞的转录阻遏的松弛, 能导致动物生命早期释放少许感染性病毒颗粒, 由此又可能导致小鼠的感染中心的迅速扩大, 因为释放的病毒能小鼠许多细胞里良好地生长。这样, 少数脾细胞可能起着迅速扩散系统性感染的播种作用。同样的过程大概也发生于 AKR 小鼠。

受到细胞间传播的病毒慢性感染的细胞, 释放出大量的病毒颗粒。这些细胞表现为有趣的实验模型, 因为在它们的 DNA 中含有两种 MLV 前病毒, 一种是内源性的、遗传获得的前病毒, 存在于小鼠的所有细胞内; 第二种是新近由水平播散导入小鼠细胞的、那些代表外源性基因组的前病毒。这两种类型的前病毒一定具有相同的结构顺序, 因为外源性前病毒来源于内源性病毒颗粒的感染。这些细胞外源性前病毒启动高度生产性感染的能力, 显示它们对前病毒表达的非允许性, 并不是固定不变的。由此又提出了阻遏内源性病毒表达的机制问题。

前病毒表达的顺式作用控制

两种类型前病毒的不同表达受到每个整合的基因相连锁的顺式作用遗传因子的控制, 可以从中引伸出一个模式, 它意味着内源性前病毒的不表达并非受限于缺乏一般的允许性细胞的内环境。

一些实验证据表明, 同样的细胞可能会含有表达水平差异很大的内源性和外源性前病毒。这些证据来自检查二核苷酸胞嘧啶-鸟嘌呤核苷(CpG)在胞嘧啶残基上甲基化的程度。已证明这种甲基化是 DNA 不转录区域的特征。仅含有 Rouse 肉瘤相关病毒(RAV)或小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)的内源性前病毒的细胞不存在未甲基化的病毒顺序。当这些细胞被感染, 并开始产生病毒和获得外源性前病毒时, 便具有了未甲基化的病毒顺序。我们最近的实验表明, 在含有内源性和外源性 AKV 前病毒的 AKR 小鼠胚胎成纤维细胞, 内源性前病毒以甲基化的形式存在, 而外源性前病毒则不被甲基化。

对既含有内源性 RAV-O 前病毒, 也存在外源性导入的、与内源性基因组高度同源的鸡肉瘤病毒基因组的鸡细胞, 也做了类似的实验。利用 DNA 酶敏感的染色质作为探针, 作者可以得到这样的结论, 即在一

个细胞中同时存在着有活性的外源性前病毒和感染前后都不活跃的内源性病毒基因组。

以上的实验可能意味着存在阻遏内源性前病毒表达的顺作用的调节物, 但这对同一细胞中存在的活跃的外源性前病毒则无作用。其它的实验也暗示顺作用阻遏物的存在。Graham 和 Van der Eb (1973)在转染实验中发现, 含内源性前病毒的 DNA 制备物已无感染性; 相反, 含相应的外源性前病毒 DNA 的制备物都容易感染。从这些转染实验中得出两个结论: (1) 表达或不表达的特性主要存在于裸露的 DNA, 而不需要其它染色体成份参与; (2) 在这些实验处理过程中, 编码表达水平的顺序仍连接于前病毒。这是与顺式用功能相符的论证。

这种顺式作用控制的另一个提示, 来自于 Jaenisch 和其同事们的其它工作。如上所述, 他们已研究的 Balb/Mo 小鼠携带 Mo-MuLV 前病毒, 它的 DNA 仅在靶组织的器官中呈对核酸酶敏感的构型。通过这种测定, 发现他们称为 Mov-1 的前病毒仅在脾和胸腺中转录。人们可能会作出这样的推断, 即这种有利状态可能是由于靶组织或非靶组织对 MuLV 转录一般的允许性或非允许性。

最近, 这些工作者培育出其它的 Balb/Mo 小鼠, 它们的内源性 Mo-MuLV 前病毒在多种靶组织或非靶组织中都以较高的水平表达。这一较新的结果指出, 实际上非靶组织对 Mo-MuLV 前病毒表达也是完全允许的。这个结果又产生了一个问题, 即为什么最初研究的 Mov-1 前病毒仅在一套组织中表达, 而最近得到的前病毒则在许多发育中的器官表达。看来本质上的差异似乎与 Mov-1 前病毒, 或它最近衍生出的相应物所整合的位点有关。Mov-1 前病毒象是整合到仅在脾和胸腺才许可表达而在其它器官都阻止表达的染色体区域。别的前病毒似乎是整合在不同发育环境都宜于表达的染色体区域。

这项工作除为顺式作用控制提供了一定的证据外, 还开辟了一个新的重要研究领域, 即前病毒能被用作探针, 以检测发育不同时期中特定染色体区域表达的调谐。

前病毒和相邻细胞成份间相互作用的机制

不同来源的资料提示, 前病毒的表达不是单一地受到扩散性反式作用因子的调节, 这种因子可能协调地激活或阻遏一系列分散在基因组的不同染色体位点上的前病毒。更确切地说, 这种证据提示了前病毒的

活性极其依赖于其染色体的环境。一个宜于表达的染色体环境可能是必要的条件。虽然或许并不足以成为一种先决条件,此外,在分化过程中,这种染色体环境的允许性可以受到调整。

染色体环境在扰乱前病毒的表达方面是怎样起作用的尚不清楚。一组实验提示,相邻的细胞顺序可能在前病毒表达中起了负作用。如上所述,Cooper及其同事们曾表明含内源性前病毒的DNA没有感染性。进一步观察,他们又发现带有内源性前病毒的DNA经机械性切割后就具有感染性。他们认为,切割致使内源性前病毒和负控制作用的细胞成份之间的连接断裂。

在与其无关的MMTV前病毒的工作中,已观察到宿主和病毒顺序相互关系之间的另一种模式。在这里已探查了两种外源性感染来源的MMTV前病毒对DNA酶的敏感性,发现在两株不同的细胞系中都存在着这两种前病毒,并整合于不同的染色体位点。病毒的DNA测定指出,当一种前病毒明显地失活时,另一种前病毒却具有转录活性。带有病毒顺序的染色质的DNA酶敏感性研究支持这一结论。

用分子克隆技术已分离出紧靠着这些前病毒的细胞顺序,并用作测定RNA和染色质对DNA酶敏感性水平的顺序探针。这些细胞探针表明,在整合过程之前,染色体区域中的这些细胞顺序都没有被转录,从而有力地提示,所观察到的整合前病毒转录后活性是依赖于随前病毒一起带入的转录启动子。用这些细胞顺序探针所进行的对核酸酶敏感性研究指出,有活性的前病毒所整合的染色体区域是在整合之前其DNA就对核酸酶敏感的。相反,转录上无活性的前病毒所整合的染色体区域,其DNA顺序在整合前或整合后都对核酸酶有抗性。

这项工作还是初步的,因为仅仅显示了两种前病毒的功能特征,然而却指出顺式作用控制机制引人注意的进展,即整合前染色质的构型是任何随后整合的病毒基因组的表达强有力的决定因素。

反式作用控制机制

有关表达的激活必定由于细胞内扩散性因子的介导是有几项突出例证的。其一是由卤化嘧啶对内源性病毒的诱导作用,另一是固醇类调节MMTV的表达。

在正常情况下不释放内源性病毒的几株小鼠细胞,通过与含溴或碘脱氧尿嘧啶培养液共同培养,能被诱导产生病毒。这些胸腺嘧啶类似物被有效地掺入到这些细胞的DNA中。这一现象或许可以证明,由

于类似化合物直接掺入前病毒DNA或有关的细胞顺序,从而打开了原先受到严格抑制的前病毒开关。其结果是DNA的结构可能被扰乱,成为一种能干扰正常DNA顺序和邻接的阻遏物样分子间的正常相互作用的型式。

Lowy曾从IdUrd处理过的细胞中取得DNA,并将它转染细胞,试图观察是否类似物的掺入可激活原来无感染性的前病毒。他没有观察到所期望的激活效应。然而,另一种办法却得出了突出的和意想不到的结果,在转染前用IdUrd预先处理接受转染的细胞,然后再将无类似物的DNA导入这种细胞,可以导致内源性病毒颗粒的释放。这个实验中细胞株的选择,保证了释放的病毒是由转染的供体DNA,而不是由受体细胞的基因组编码的。

这项实验表明,接受类似物的处理导致受体细胞处于一种使导入的通常为静止的前病毒,发生转录的生理状态。这种类似物并不必须掺入到前病毒本身的DNA中去。有关这些为IdUrd的诱导的扩散性控制因子的性质尚不明瞭。有趣的是环己亚胺的处理也能诱导一些内源性小鼠病毒的表达。这些作者推测这种药物抑制了一种不稳定的扩散性阻遏物,但尚未得到验证。

另一项自成系统的工作来自于固醇类诱导的MMTV的表达。用地塞米松处理具有相应固醇类受体的细胞,导致病毒的表达增加50~1,000倍。这一过程似乎是对已建立的转录模式的扩大,因而在无激素时以低构成水平转录的前病毒现在就以高水平表达了。不过以前完全失活的前病毒在有地塞米松时依然如故。

这些资料为前病毒转录的反式作用调节提供了有力的证据。与类固醇受体相关的细胞蛋白一定和控制MMTV转录强度的特异DNA顺序发生相互作用。这些顺序似乎是随病毒基因带入的而不象是整合前便存在于染色体区域之中。以上所提及的MMTV的工作说明,MMTV前病毒的转录虽然是高度固醇类应答的,而附近的细胞顺序的转录则不受其影响,无论受感染或未受感染的细胞都是如此。因此,似乎这些邻近的顺序并不为整合在附近的MMTV前病毒的调节表达提供固醇类应答位点。MMTV前病毒详细的结构分析将能鉴定有关固醇类应答的控制顺序。

控制的分子模式

如图1所示,在前病毒合成期间各顺序的复杂的

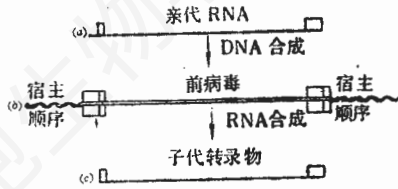


图1 逆转病毒基因组形式的相互转变

(a) 亲代病毒RNA反转录成DNA产生一系列未整合的DNA, 其中之一发生整合形成前病毒, 如(b)所描绘。前病毒反过来又作为合成子代RNA的模板, 如(c)所示。如图所示, 反转录和基因组的重排在最初存在于病毒RNA的左(5'端)和右(3'端)末端的顺序产生冗余拷贝。(b)中小箭头指示前病毒假定的转录启动子部位。

易位导致在病毒基因组末端基因顺序中的冗余顺序。重要的是当RNA和DNA基因组并列时(如图所示), 显然DNA前病毒在两端都超出RNA。这样, 子代病毒RNA(向前的)转录是开始于离最近细胞顺序几百个核苷酸的病毒顺序区域内。同样, 转录也在病毒顺序区域内终止。

从这个系统中得出的结论是启动病毒转录的启动子很可能是由病毒基因编码的, 这种启动子的功能很可能受到反式作用因子的影响, 正如在MMTV诱导过程中所涉及的那样。

除了邻近的细胞顺序外, 一个潜在的顺式作用控制的重要位点可能在病毒顺序组中(图1小箭头所示), 其中或许含有影响转录启动作用效率的顺序。一些内源性前病毒在这种顺序中也许存在缺陷, 而其

余的前病毒功能顺序都已表达。这样的缺陷可能产生于最初形成前病毒时逆转录的错误。如果细胞因子得以解除由于这一缺陷所造成转录上的阻断, 那么所产生的RNA转录物将不会受到这种缺陷的影响, 从而可能导致释放能诱导高度生产性感染的病毒颗粒。因此, 在病毒这一有限顺序部分的这些顺式作用的缺陷就不会通过遗传传递给子代病毒。

人们可能要问及有关把调节的信息传递给前病毒的信息性质。尽管用DNA酶I敏感性测定已经显示特异的染色质结构和转录活性有关, 但是这种染色质的构型似乎是控制转录活性基本分子机制的结果。正如转染实验所示, 这种机理和纯化的DNA有关。

纯化的DNA可能凭借病毒或细胞顺序中的核苷酸顺序的信息, 调节转染病毒的活力。然而, 这种DNA的一种附加的和重要的成份存在于和一些胞嘧啶残基连接的甲基基团中, 这些基团可能决定了体内或体外转染的前病毒的转录活性。这一假设是从Eisenman及其同事们最近的工作, 以及该实验室应用甲基化拮抗剂5-氮胞苷能诱导内源性前病毒的表达而提出来的。假定这种甲基基团调节是有潜在的重要性的, 改变这些DNA的甲基化酶的调节机制仍得不到解释。

采用现代分子克隆技术, 将有助于快速鉴定这些对于控制过程重要的细胞和病毒顺序, 而这种信息又将在控制所有细胞基因表达的性方面会有重要的启示。

中国科学院上海细胞生物学研究所

章海婴译 姚曾序 校审

[J. gen. Virol. 1981, 54:1-8]



乳鼠原代心肌细胞培养物的初步观察*

王鸿秀 龚建林
(浙江中医学院)

1960年Harary用胰蛋白酶分离出新生大鼠的单个心肌细胞, 作了单层培养, 维持自发性搏动达40天^[1]。此后, 其他学者培养成功了大鼠胎鼠及人胚的心肌细胞。我国于1978年首由北京中医研究院西苑医院开展了心肌细胞培养工作, 作了中医中药的实验性研究。我们于

1982年开展大鼠乳鼠心肌细胞的原代培养, 并作了初步观察。

* 扫描电镜部分由浙江省科委电镜室蔡继炯同志协助观察与拍摄, 特此致谢。