

讲 座

生物膜的动态结构和功能

——从二维到三维

三 被膜病毒感染细胞的机制

1. 被膜病毒

病毒分类中,具有被膜的病毒有 13 科,其中基因组是 RNA 的被膜病毒有 8 科,包括副粘病毒科的仙台病毒 (HVJ)、正粘病毒科的流感病毒 (IFV)、披膜病毒科的 Semliki 森林病毒 (SFV) 和弹状病毒科的水泡性口膜炎病毒 (VSV) 等。被膜病毒是从宿主细胞中装配出芽生成的。病毒被膜实际上是宿主细胞膜的一部分,其脂质成份与宿主细胞膜一样,只有被膜蛋白具有特异性。它们是一些糖蛋白其 C 末端有二十多个氨基酸残基的疏水片段插入脂双分子层。被膜蛋白的一级顺序及其功能研究的比较多。表 1 列出几种主要被膜蛋白及其功能^[1]。

仙台病毒的被膜糖蛋白有两种: HANA 及 $F_0 = F_1 + F_2$ 。HANA 可以结合靶细胞膜上受体(带唾液酸的糖蛋白或糖脂)。病毒感染细胞时,前体 F_0 酶解为 F_1 及 F_2 ,二者间仍以二硫键相连。 F_1 及 F_2 (可能 F_1) 使病毒被膜和靶细胞膜进行融合 (F_0 本身没有融合作用)。流感病毒的被膜蛋白 $HA_1 + HA_2$ 均来自一个前体 HA_0 ,它既有与靶细胞受体结合(亦是带唾液酸的糖蛋白或糖脂),又有使膜融合的功能。唾液酸苷酶 NA 的功能可能是水解受体糖蛋白的唾液酸残基,将病毒从靶细胞上游离出,不同亚型的 IFV, NA 的含量不一样。大西俊一等近年来一个主要的工作方面是研究被膜病毒和靶细胞的相互作用。其目的是除了探究病毒感染细胞的机制外,还试图以此作为模型研究各种生

表 1 几种病毒被膜蛋白及其功能

病 毒	糖 蛋 白	分 子 量	功 能
HVJ	HN (或 HANA) $F_1 + F_2$	67 52 + 11	与受体结合及唾液酸苷酶活性 膜融合,是 F_0 (64K) 的裂解产物
IFV	$HA_1 + HA_2$ NA	44 + 30 48 ~ 63	与受体结合和融合,是 HA_0 (74K) 的裂解产物 唾液酸苷酶活性
SFV	E_1 $E_2 + E_3$	51 52 + 11	膜融合? p62 的裂解产物
VSV	G	61	与受体结合和膜融合
MMTV	gp52 + gp36	52 + 36	gPr73 ^{env} 裂解产物

物膜融合的本质。

2. 被膜病毒的膜融合

1) 病毒被膜与细胞质膜的融合 (HVJ 的膜融合)

HVJ 与靶细胞融合的过程可以用铁蛋白抗体的电子显微镜术观察。随着融合,被膜蛋白逐渐扩散到靶细胞膜上。HVJ 与红细胞在低温下培育时,HVJ 即吸附在红细胞膜上。当温度升高到 37℃,1 分钟内即可发生病毒被膜和红细胞膜的融合,同时导致溶血。因此,有些人根据溶血指标测量 HVJ 的融合,但病毒和红细胞融合后为什么发生溶血,其机制还不清楚。有人认为病毒被膜上有缺陷,当和红细胞融合后膜亦存在缺陷,因而水进入细胞内引起膨胀,然后细胞破裂血红蛋白渗出^[2]。但用“早期收获病毒”(即鸡蛋尿囊腔中培养一天后收取的 HVJ,而不是一般三天培养样品),却发现病毒可与红细胞膜受体结合并在 37℃ 时产生融合,然而不发生溶血。负染电镜观察发现,三天后收获的病毒囊泡内有染料存在,而早期收获的则无。这似乎表明三天后收获的病毒被膜存在某种缺陷,染料才可进入。这是病毒被膜缺陷会引起溶血的一个证据。早期收获病毒因为不产生溶血,以前对它是否能引起融合不清楚,大西实验室采用电子自旋标记方法证明了它也有融合作用。当然,这只是例外,一般病毒同红细胞融合后均产生溶血,这也是以前人们常用溶血来鉴定融合的原因,这种方法既简单又方便。实际上,被膜融合有可能引起溶血,但溶血不能说是融合的原因。因此,以溶血来鉴定融合是很间接的。最直接,最合理的方法还是测定膜的融合。大西俊一等十多年来一直采用自旋标记法研究 HVJ 和细胞的融合。

根据 HVJ*-红细胞膜在 37℃ 温育时 ESR 峰高的时间变化(具体方法参见上篇),可以进行被膜融合的动力学分析^[3]。假设融合遵循一级动力学,即 $\frac{dn}{dt} = K(n_0 - n)$,式中 n 为融合的病毒数, n_0 为起始吸附在细胞上的病毒数, K 为融合速率常数;又假设存在两组具有不同

融合速率常数 K_1, K_2 的病毒,则 ESR 峰高的时间函数可表示为:

$$h/h_0 = f - (f - 1)\{\alpha e^{-K_1 t} + (1 - \alpha)e^{-K_2 t}\}$$

式中, h_0 是最初的峰高, h 是 t 时的峰高, f 为病毒与靶细胞融合前后 ESR 峰高增加因子(约 7~8 之间的常数), α 为融合速率为 K_1 的病毒比例。这样,实验的数据可以和计算结果很好地吻合。实验给出 $K_1 = 0.84\text{min}^{-1}, K_2 = 0.011\text{min}^{-1}$,与病毒的浓度无关。令人惊讶的是,表征快速组分比例的 α 值随细胞上结合的 HVJ 量增加而减小,即随病毒剂量增加而减小。将溶液中病毒浓度乘以 α 值,发现此数值基本不变,也就是说无论多少病毒结合在细胞上,快速融合的病毒数量是不变的。这种情况的机制还不清楚。Papahadjopoulos 等^[3]研究了 Ca^{2+} 存在下 PS 脂质体的融合,采用囊泡内容物相混的荧光方法同样计算了融合常数。他们发现较小的囊泡(直径 250Å)比较大囊泡(直径 1000Å)融合快。融合速率常数前者 5sec^{-1} ,后者 0.08sec^{-1} 。PS 脂质体融合基本发生在 1 秒内,与病毒和血影膜融合速率相比快得多。

除了病毒被膜和细胞膜融合外,HVJ 还能促使细胞间融合。病毒与红细胞培育时可以同几个红细胞膜上受体结合,引起细胞间融合。当温度升高到 37℃ 即发生细胞间融合及溶血,红细胞的融合数可多达 10 个。HVJ 尽管能引起血影膜的聚集,但不能产生血影膜之间的融合。有人认为,HVJ 引起红细胞间的融合是和细胞的膨胀相关联的。亦即 HVJ 和红细胞融合后水进入细胞内,引起细胞膨胀使膜间距离近得足以发生融合;而血影膜无膨胀性,因而不能创造此种条件。要搞清这个问题还有待进一步研究。

2) 酸性条件活化的膜融合 (IFV, SFV 等的膜融合)

HVJ 被膜蛋白结合靶细胞受体后引起融合,其基因组很容易进入细胞质。其它被膜病毒是否用相似方式感染靶细胞,电子显微镜下观察 IFV 和一种犬肾脏培养细胞 (MDCK) 的作用过程表明,病毒先和靶细胞受体结合,通过

被膜穴内吞,电镜照片中清楚地显示出病毒颗粒位于内含体中。自旋标记法测量也没有发现被膜的融合,此时也不产生溶血。1980年大西实验室的前田博士发现 pH5 条件下能很快引起膜融合和溶血^[4]。同时,美国的 Helenius 也发现 SFV 引起的膜融合同样具有 pH 依存性,其后发现 VSV 的情况亦如此。由图 1 可见除 HVJ 外,IFV、SFV、VSV 等和靶细胞的相互作用中,无论在被膜融合、溶血或引起细胞融合等都显示出效应和 pH 的依存性。即中性时无活性, pH6.0 或 6.5 以下时出现活性, pH5.0 时活性最大。电子显微镜下观察也清楚显示, pH 5.0, 37℃ 时 1 分钟以内 (SFV) 或 1—2 分钟 (IFV) 膜融合即告完成。HVJ 无论在中性或酸性中都表现出同样的膜融合活性,可能这是被膜病毒的一个例外。

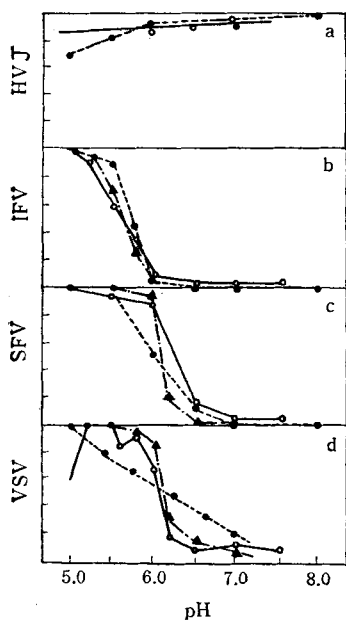


图 1 病毒膜融合活性(○)、溶血活性(●)及细胞融合活性(▲)的 pH 依存性

八十年代随着细胞生物学的迅速进步,我们已知道内吞作用后内在化囊泡很快酸化,其内部 pH ~ 5。由此出发即可解释 IFV、SFV 等被膜病毒感染宿主细胞的途径:虽然它们的被膜和宿主细胞的质膜不发生融合,但一旦内吞进细胞后,即能在酸性条件下发生

膜融合,从而向细胞溶质中释放出病毒的基因组。

3) 膜融合的分子机制

HVJ 被膜上具有融合活性的糖蛋白是 F 蛋白,现已知道 F₁除了自身嵌入被膜中的约 20 个疏水性氨基酸片断外,在 N 末端至少有 22 个连续的疏水性氨基酸残基。Gething 等人认为正是这一片断引起和靶细胞膜的融合^[5]。

IFV 被膜蛋白 HA 具有二种功能:与靶细胞表面受体结合、低 pH 条件下有融合活性。HA 的一级结构测定表明 HA₂的 N 末端也有一个约 20 个疏水性氨基酸组成的片段,和 F₁的不同之处是其中插入 2—3 个酸性氨基酸(Glu、Asp)。可以设想这一片段同样能引起膜融合。大西俊一等进一步用 HA 的重建膜作了各种研究。用 Triton X-100 等界面活性剂处理 IFV 后,分离出的 HA 相互聚合成玫瑰花结(Rosettes)状的微团。此种 HA 玫瑰花结在 37℃ 与红细胞温育时亦发生与病毒相似的 pH 依存性溶血。蛋卵磷脂(EPC)/胆固醇/HA 玫瑰花结一起透析后可以制备得到直径约 200 nm 的 HA 重建膜。它具有同完整病毒相同的

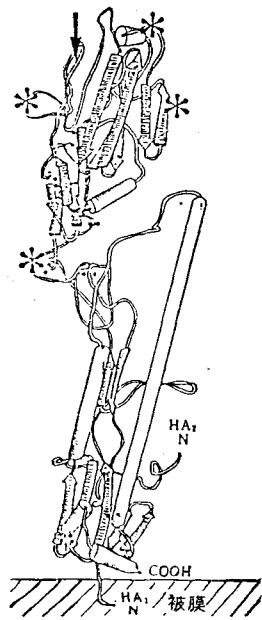


图 2 IFV 的 HA 立体结构

→: 受体的结合部位, *: 决定抗原性的部位

pH 依存性的融合活性^[6]。英国的 Wiley 用 X 射线衍射方法得出 HA 在 IFV 被膜上的三维结构图^[7] (图 2)。图中 HA 分子只表示其单体的结构,实际它在膜上是以三聚体形式存在的。HA 分子突出病毒被膜外约 135Å,最末端附近是和受体结合的部位。HA₂ 的 N 末端疏水片段较靠近被膜,约距 30Å。故当 IFV 识别受体并与之结合后,因 HA₂ 的 N 末端疏水部分离靶细胞膜约 100Å,因而不可能插入靶细胞膜中。这可以解释为什么 IFV 在中性环境没有融合活性。

不少证据表明在酸性环境中 HA 产生某种构象变化:(1) HA 的玫瑰花结出现凝聚现象,介质 pH 恢复到 7 后仍保持其凝聚态。(2) Wiley 曾将胰蛋白酶在 pH 7 时与 IFV 温育,HA 不发生水解;而将 IFV 先放在 pH 5 环境再恢复到 pH 7,然后加入胰蛋白酶温育,发现 HA 被水解成 2—3 个片段。这表明,由于酸性条件引起了 HA 的构象变化,致使 HA 对胰蛋白酶敏感。(3) 大西实验室还研究了 HA 的色氨酸残基 (Trp) 荧光。HA₁ 部分有 6 个 Trp 残基,HA₂ 有 4 个。如果在 HA 玫瑰花结溶液中加入 Trp 的荧光淬灭剂丙烯酸胺,结果发现 pH 7 时丙烯酸胺浓度从 10μmol 增加到 100μmol 荧光淬灭很小,而 pH 5 时荧光淬灭很大。因为丙烯酸胺是水溶性化合物,很难进入疏水区域,故不能淬灭疏水区域中的 Trp。而酸性条件下丙烯酸胺能淬灭 HA 的 Trp 荧光,这表明 HA 构象发生了变化,使 Trp 更多地暴露于水相。

荧光淬灭的实验同样能演示酸性条件下 HA 分子插入靶细胞膜。神经节苷脂 (Ganglioside) 含唾液酸,它是 HA 的受体。因此将含神经节苷脂的脂质体和 HA 玫瑰花结温育时,二者能互相结合。此后,降低 pH 至 5.2,再用半碱性蛋白酶,菠萝蛋白酶等处理,以便较完全地切除脂质体膜外的 HA 部分。如果膜内确有 HA₂ 的片段,用 Trp 荧光淬灭的方法可检测出,结果证明确实如此。亲水性的丙烯酸胺不能淬灭疏水相中的 Trp 荧光;而用在 5 位或 12 位上标记氮氧自由基的硬脂酸自旋标记分子作为淬灭

剂,因它很易进入膜层,实验结果发现有很强的荧光猝灭。至此,我们仅知道酸性条件下,HA₂ 的一部分直接进入靶细胞膜,但还不知道它是如何引起融合的。

前已提及,HA₂ 的 N 末端疏水性片段中总有 2—3 个酸性氨基酸 (Glu、Asp)。大西俊一等人认为,酸性条件能使 Glu、Asp 质子化,引起 HA 的结构变化,使得 HA₂ 的末端接近靶细胞膜,从而与之作用引起融合。计算表明,组成 α 螺旋的 20 个疏水性氨基酸残基从水相进入疏水区域的转移自由能变化约 -100 KJ/mol^[8]。然而,如果疏水片段中含有几个酸性氨基酸残基,由于电荷存在使转移自由能变化减少很多。用 Glu 或 Asp 替代 Ala 将减少自由能约 30 KJ/mol,因此,HA₂ 疏水片段中酸性氨基酸残基的质子化,将有利于其插入靶细胞脂层。对比之下,F₁ 的 N 末端疏水片段因没有酸性氨基酸残基,所以无论中性,还是酸性条件下它都很容易进入靶细胞脂层。

大西实验室最近用蜂毒素 (Mellitin) 引起 EPC 脂质体融合,以便研究质子化的作用。蜂毒素有一段由 26 个氨基酸组成的片段,和 HA₂ 中 N 末端疏水片段相似。因此,可以用蜂毒素模拟 HA₂ 的 N 末端疏水片段。但蜂毒素分子中有几个带正电荷的氨基酸残基 (Lys、Arg),所以实验中先用琥珀酸酐作用使其带上负电性,这称为琥珀酰蜂毒素。用自旋标记方法发现,琥珀酰蜂毒素引起脂质体的融合类似于 HA,其融合活性依赖于 pH 的变化,即 pH 中性时融合活性几乎没有,酸性时骤增;而一般蜂毒素没有这种依存性。用测定融合的荧光方法亦得出相同结果。酸性环境中,琥珀酰蜂毒素负电荷残基的质子化已用 C¹³-NMR 波谱化学位移的变化予以确认。结果推断,化学位移和 pH 变化曲线的 pK 值在 5.20 左右,这个数值恰恰接近融合活性最大时的 pH 值。

究竟这些疏水片段是怎样和靶细胞相互作用,又是如何引起膜融合,大西实验室近期用 FPR 测定及电镜观察发现^[9]: IFV 和 HA 玫瑰花结在酸性 pH 下都能促进红细胞内在性蛋白

(带 3 蛋白)的扩散运动并引起凝集,但中性 pH 时不发生。设想如果带 3 蛋白不动则会阻止病毒被膜接近靶细胞膜;带 3 蛋白扩散加快并产生区域凝集后,HA 的疏水片段才有可能进入靶细胞的脂双层。这种推断还没有确切证据。HA 和靶细胞膜作用后是否产生逆转微团(Inverted Miceller),六角形的 H_{II} 相,从而导致膜的融合,这也是人们感兴趣的研究课题。

3. 被膜病毒感染细胞的机制

HVJ 在中性或者酸性环境中可直接通过被膜和质膜的融合,将病毒基因组输送进细胞质。其他一些被膜病毒在中性条件下不与靶细胞融合,仅在酸性情况下和质膜融合。究竟病毒基因组如何进入细胞质,前文已讨论过,通过细胞质膜上的被膜穴,所结合的疾病很快被细胞内吞,在细胞内形成被膜囊泡。这样,病毒基因组同时被两层膜所包裹,要进入细胞质内似乎很困难。1978 年大熊等用荧光分析法测出小鼠巨噬细胞中溶酶体内 pH 为 4.7 — 4.8^[10]。1982 年 M axfield 实验室发现内含体囊泡内 pH 值为 5^[11]。如果把这些实验事实与被膜病毒在酸性条件下膜融合活性增高的结果一起考虑,可以假设:内含体内,由于其酸性的环境,病毒被膜将和内含体膜融合从而将基因组释放到细胞质中。另外,如果病毒通过内吞作用最后进入到溶酶体,那里的酸性环境也会通过膜的融合而释放出病毒基因组。怎样证明这个假设,理论上可以用电镜观察,但因为膜的融合发生很快,基因组的释放过程更快,因此实际上很难观察到这些阶段中的图象。大西实验室采用另一些方法。如果将内含体内 pH 值提高到 6 以上,病毒被膜将不能同内含体膜融合,因而不能释放出病毒基因组,病毒也就无法在宿主细胞中复制。究竟如何提高内含体内的 pH 值,我们知道,一些弱碱,如氯奎、氯化胺、甲胺等,其解离形式随 pH 而变化,原先能穿过膜的中性形式,当进入酸性环境时,质子化结果带上电荷,难以再跨膜输出,结果蓄积在酸性囊泡内,从而引起囊泡内 pH 的上升。实验发现,加入这些弱碱后提高了内含体、溶酶体内 pH 值,确能消除病毒

在细胞内的膜融合,感染也大大降低。如何测量细胞内囊泡的 pH 值,大熊和 Poole^[10] 发现不同 pH 中, FITC 有不同的荧光强度,比较 495 nm、450nm 波长激发, 520nm 发射的荧光强度时观察到, 495nm 荧光强度随 pH 变化很大,而 450nm 则不受影响。因而以 I_{495}/I_{450} 比值为参数可作出和 pH 的关系标准曲线。然后将 FITC-葡聚糖和巨噬细胞一起温育过夜,约 10 小时后洗去细胞外 FITC-葡聚糖,接着即可按上法测量荧光。实验中用葡聚糖的目的方面是它能被被膜内吞进细胞,同时它不会被溶酶体中酶所消化,这样可精确地测量溶酶体中 pH 值 (4.7 — 4.8)。

在测定内含体内 pH 之前必需知道病毒被靶细胞内吞后需多少时间到达溶酶体。为此,大西实验室先合成了二磷酸 FITC,这种化合物的荧光很弱,但进入溶酶体,被酸性磷酸酶脱去二个磷酸根后则荧光强度将增加 20 倍。因而可根据荧光强度判定它是否进入到溶酶体。实验结果表明, IFV 和 MDCK 细胞在 20℃ 培育 1 小时内, IFV 仍滞留在内含体中; 37℃ 温育 10 分钟内, IFV 亦仍在内含体内,未进入溶酶体。由此,将 FITC 标记的 IFV,在上述条件下与 MDCK 细胞培育,即可测出内含体内的 pK 值。结果得出 pH5.1 — 5.2; 而当加入氯化胺后, pH 可上升到 6.7, 此时被膜融合及病毒复制皆不会发生^[12]。

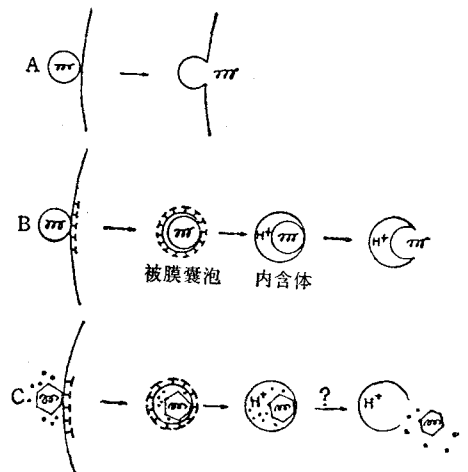


图 3 病毒基因组进入细胞的几种途径

根据以上所述可建立病毒感染细胞的如下模型(图3)。(A)病毒被膜直接和靶细胞膜融合将基因组释放到细胞质内。HIV感染细胞就是这种途径。(B)被膜病毒通过内吞进入被膜囊泡,被膜囊泡去被膜后成为内含体。由于质子泵作用,内含体内 pH 很快下降到6以下引起病毒被膜与内含体膜融合;释放出基因组。IFV、SFV 和 VSV 等通过此途径感染细胞。该途径也适用于 HIV,但 HIV 通过被膜与细胞质膜融合感染途径更为重要,因为此时,融合速率常数为 0.84 min^{-1} ,而内吞速率 $\sim 0.05 \text{ min}^{-1}$ 。(C)某些无被膜病毒也可通过内吞进入内含体,酸性环境中破膜后释放出基因组到细胞质。这方面已经积累了一些实验证据,但具体机制还未完全弄清。(A)途径和(B)途径从进化看哪个为先还不清楚,不过可以认为(B)途径较安全,因为这时质膜未遭损伤,利于病毒复制。

利用图3途径也可以将外源性物质(如药物)带入细胞内。如蓖麻蛋白 II 由 A、B 两条肽链以二硫键相连而成。B 链的功能是结合细胞表面的半乳糖;A 链功能是使核糖体 60S 失活。大西等将 A、B 链拆解后只将 A 链包入 HA 玫瑰花结的重建脂质体内,再使之与 MDCK 细胞

作用。实验表明随着 HA 量的增加细胞存活率亦下降,而加入氯化胺后即可减小蓖麻蛋白 A 链的细胞毒性。这表明药物是在内含体内通过膜融合释放出来的。利用这种模式即可使脂质体包裹药物等物质发挥工程上的作用

(刘宏志、张志鸿整理)

参 考 文 献

- [1] Ohnishi, S.: *Biomolecules* (C. Nagata et al., eds.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Elsevier, Amsterdam, P. 227, 1985.
- [2] Homma, M. et al.: *Virology*, **74**, 41, 1976.
- [3] Wilschut, J. et al.: *Biochemistry*, **19**, 6011, 1980.
- [4] Maeda, T. and Ohnishi, S.: *FEBS Lett.*, **122**, 283, 1980.
- [5] Gething, M. -J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2737, 1978.
- [6] Kawasaki, K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **733**, 286, 1983.
- [7] Wiley, D. C. et al.: *Nature*, **289**, 373, 1981.
- [8] Von Heijue, G.: *Eur. J. Biochem.*, **116**, 419, 1981.
- [9] Yoshimura, A. et al.: *Exper. Cell Research*, **160**, 126, 1985.
- [10] Ohkuma, S. and Poole, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3327, 1978.
- [11] Benjamin, T. and Maxfield, F. R.: *Cell*, **28**, 643, 1982.
- [12] Yoshimura, A. and Ohnishi, S.: *J. Virology*, **51**, 497, 1984.

[本文于1986年6月29日收到]

科技消息

学 术 期 刊 出 版 社 简 介

学术期刊出版社是中国科协直接领导的以出版自然科学书刊为主的综合性出版社。它的宗旨是宣传党和国家有关科学技术发展的方针、政策、介绍国内外自然科学理论和研究成果,传播国内外科技信息,促进学术交流,积累科技资料,为学会学术书刊出版发行服务,为我国科学技术现代化作贡献。

学术期刊出版社的主要任务是:一、出版学术会议论文集。学术会议论文集是交流、推广、汇集科技成果的有效方法之一,及时出版学术会议论文集,可扩大学术会议外全社会的交流,提高学术会议的社会实效。目前,中国科协所属各学会每年需出版学术会议论文集约 500 余种,这是十分重要、异常繁重的任务,限于力量,暂时还难以全部承担。随着我社的发展壮大,我们将有计划、有步骤地努力做好学术会议论文集的出版发行工作。二、出版科技学术期刊。学术期刊具有灵活和定期、快速的特点,它在促进学术交流,积累科技资料,培养和发现人才方面有特殊的作用。目前,中

国科协所属学会编辑的公开出版的刊物有 300 余种。我社拟逐步承担其中部分刊物的出版发行工作。三、出版学术专著。我社是自然科学学术性出版社,肩负着促进科学技术研究的开展和开拓新学科、新领域的重要任务。因此,出版具有学科权威性、奠基性和开拓性的学术专著是我社的光荣使命。

学术期刊出版社是在我国政治、经济改革深入发展的大好形势下于一九八四年十二月七日成立的。以改革促进发展是我们办社的指导思想,我们将在改革和探索中前进,在改革和探索中开创出版工作的新局面。坚决贯彻党的出版方针,才能保证出版工作的社会主义方向。为此,我们首先强调书刊出版物的社会效益,努力提高书刊质量;为适应科学技术日新月异发展的新特点,我们将努力加快出书节奏,力求缩短出书周期,降低印制成本;我社愿为全国各学术团体,科研、教学、生产各单位提供优质服务,为繁荣我国的科学技术事业尽职、尽责、尽力。