

DNA 肿瘤病毒 SV40 的细胞转化特性

柯 杨

(北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室, 北京 100034)

提 要

SV40 是被广泛应用于肿瘤研究的 DNA 肿瘤病毒。本文简述了它的一般生物学特性, 根据大量研究报道着重归纳了 SV40 在体外转化细胞的特性及其转化机制, 并展望了 SV40 转化蛋白在癌变机理、细胞分化等研究中的进一步应用。

关键词 SV40, 细胞转化, 癌变

肿瘤病毒为研究分析真核细胞分子生物学和细胞转化提供了一个简单而又非常有用的模式。由于病毒利用宿主细胞的酶和其它机制复制自身, 通过观察病毒的复制、转录及蛋白合成可以对复杂的细胞生物过程有所了解。更重要的, 病毒中少数转化蛋白功能的研究深化了人们对细胞转化、恶变机制的认识。

与肿瘤相关的 DNA 病毒分为五大类: 多瘤病毒, 乳头状瘤病毒、腺病毒、疱疹病毒及肝炎 B 病毒^[1]。SV40 属于其中的多瘤病毒组。60

年代初在美国因其造成腺病毒疫苗的污染而被发现, 并最终从猴肾中分离出来。因为 SV40 随着腺病毒疫苗接种了当时大批的美国学生和军人, 其生物活性及致癌性的研究受到了广泛的重视。目前它是 DNA 肿瘤病毒中被人们了解最透彻和应用最广的病毒之一。

一、SV40 的一般生物特性^[2]

SV40 是小双链环状 DNA 病毒, 颗粒直径 45nm, 含 88% 蛋白质及 12% DNA。基因组

参 考 文 献

- 1 许立成, 童坦君. 生理科学进展, 1988; 19: 36
- 2 Williams L T. *Science*, 1989; 243: 1564
- 3 吴平, 童坦君. 生理科学进展 1990; 21: 50
- 4 Goldfine I D et al. *Mol Cell Biochem*, 1982; 48: 3
- 5 Stoeckel K et al. *Brain Res*, 1976; 109: 271
- 6 Andres R Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 2785
- 7 Yanker B A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 1269
- 8 Savion N et al. *J Biol Chem*, 1981; 256: 1149
- 9 Wong K Y et al. *Biochemistry*, 1988; 27: 375
- 10 Burwen S J, Jones A L. *TIBS*, 1987; 12: 159
- 11 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 3728
- 12 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986; 140: 174
- 13 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Cancer Res*, 1988; 48: 7200
- 14 Marchisio P C et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980;

- 77: 1656
- 15 Yeh H J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 2317
- 16 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Mol Carcinogenesis*, 1989; 2: 47
- 17 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 653: 690
- 18 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Arch Biochem Biophys*, 1989; 208: 456
- 19 Scher C D et al. *Biochim Biophys Acta*, 1979; 560: 217
- 20 Ajiro K et al. *J Biol Chem*, 1983; 258: 4534
- 21 黄平, 童坦君. 生物化学杂志, 1989; 5(1): 503
- 22 Rakowicz-Szulczynska E M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 163: 649
- 23 Bouche G et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7660
- 24 Basu M et al. *Nature (London)*, 1985; 316: 640
- 25 Gill G N et al. *Mol Cell Endocrinol*, 1987; 51: 169
- 26 Jiang L W et al. *J Cell Biol*, 1988; 106: 13

[本文于1990年4月9日收到, 6月15日修回]

由 5227 个碱基对组成,具有单一复制起始点,除了编码三种主要的外壳蛋白外,编码的“早期蛋白”是病毒完成其生物活性的重要成分。早期蛋白又分为 90 kd 的大 T 抗原和 1.7 kd 的小 t 抗原。病毒对自然宿主的感染过程依次是吸附、穿入细胞、在核中脱壳、早期蛋白转录表达、细胞 DNA 合成酶含量增加。一般在 12—18 小时后病毒的结构蛋白合成, DNA 复制,组装成新病毒颗粒并释出细胞。在非自然宿主中,病毒可以进入细胞,但晚期基因无法表达,因而无法形成完整的病毒颗粒。SV40 的自然宿主很窄,主要为灵长类肾组织。感染也是低效的。人类不是其自然宿主,目前尚未发现 SV40 致人类疾病或致肿瘤的证据。动物实验表明,将大量病毒注入新生仓鼠方可在高度增殖性的器官造成肿瘤。因此 SV40 与肿瘤的相关研究主要集中在细胞转化上。

二、SV40 的细胞转化活性

SV40 的细胞转化活性由 Koprowski 1962 年首次报道^[9]。自此这一发现迅速被其它人的工作所证实。在此后的 20 多年间,SV40 的转化研究被扩展到不同种属的细胞,不同的细胞种类,从直接的野生型病毒发展为温度突变株及带有不同病毒片段的 DNA 质粒的转染。大量的工作不仅使 SV40 的转化特性日见清晰,也促进了人们对细胞离体转化过程的理解。SV40 转化细胞是一复杂的过程,根据众多报道的不同侧重面,现将已较明确的特性归纳综述如下:

(一) SV40 转化细胞之表型改变

1. 细胞的增殖和生命期 无论是动物细胞还是人类细胞, SV40 的转化首先造成细胞增生活跃。虽仅少部分细胞可最终成为不死性的细胞系^[4],多数细胞均可增加倍增次数,尤其正常二倍体细胞可以延长在体外培养时间^[5]。转化细胞对血清需求量常下降,一般对生长因子的需求量也相应下降,但也有报导显示,不同的转化克隆对生长因子的反应不同^[6]。值得一提的是,SV40 转化人类二倍体细胞往往在转化初期发生“危相”(crisis)^[7],其表现是在细胞生长

和寿命明显提高的情况下(约在 10 代左右)出现细胞进行性退化,大量细胞脱落死亡,少数存活细胞处于静止状态,这一危相可持续 1—3 个月不等,如能渡过污染关,少量存活细胞增殖扩大,有可能得到不死性的细胞系^[7,8]。

2. 形态改变 与其它因素所致转化事件类似,SV40 转化细胞的形态改变在光学显微镜下观察是成纤维细胞变成上皮样形态,而上皮细胞形态变化不大^[9]。电镜观察超微结构的变化主要为细胞核变大,核膜呈波浪状,核孔复合物多见,核仁失去网状结构,变为致密颗粒状结构,胞浆结构紊乱,另外,全病毒感染的细胞转化后可有病毒颗粒的存在^[6,9]。

3. 软琼脂克隆形成和致瘤能力 来源于动物细胞的转化多数获得了半悬浮生长能力,并可在裸鼠中致瘤^[10]。但这方面的研究结果是很不一致的。人的细胞或已分化的细胞,一般经 SV40 转化可在体外无限传代,却无法在软琼脂上生长,大多数不能在免疫缺陷的动物中致瘤,即使致瘤也多不转移^[11]。SV40 主要造成细胞不死性,这一性状被认为是其转化的特征之一。

4. 细胞的分化能力 SV40 转化细胞的另一特点是可以造成某些高度分化细胞的转化,并使这些细胞在转化后保留或部分保留其分化功能。如甲状旁腺细胞、下丘脑细胞转化后仍可分泌激素^[12];脾细胞仍可分泌抗体^[13];上皮细胞保留分泌细胞外基质的能力,及被其它因素诱导终未分化的能力^[14];肾上皮细胞仍具离子转运功能等^[15]。SV40 转化细胞的这一特点,对于研究细胞生长和分化的关系及其机制提供了难得的细胞模式。

5. 其它转化特性 另有不少报导涉及到 SV40 转化细胞的其它现象,如与病毒相关的细胞表面抗原的改变,细胞对低分子量营养成分摄入增加,细胞聚合性增强及细胞骨架紊乱等。

(二) SV40 转化细胞的染色体改变、病毒片段的整合及表达

大量证据表明 SV40 转化的细胞几乎全部都有染色体畸变,数目畸变表现在非整倍体上,而结构畸变为多样性的。可有易位、缺失、断

片、双着丝粒染色体,环状染色体等等^[16]。曾有人认为小端着丝粒染色体丢失是SV40转化细胞特有的,但以后的工作证实染色体的畸变是非特异性的。SV40并不能造成某特定的染色体或染色体组的畸变或丢失,畸变是非特异性的转化事件。与染色体改变类似,病毒片段整合掺入到细胞的基因组中也是非位点特异性的。采用限制性内切酶技术对转化细胞做Southern blot分析,发现SV40片段的整合是多位点的,许多染色体上都有活性部位,整合的片段大小也不一样^[17],整合后还可以进一步的扩增,因而造成重复。正是因为非特异的掺入位点和片段产生出了众多的不同表型的转化细胞系。掺入到细胞基因组中的病毒片段是线性的,很稳定,可以在体外传代200次不变,但凡是转化细胞,至少要有有一个完整的T基因的整合,而且维持细胞转化表型的关键在于T基因的稳定表达。间接免疫荧光染色显示转化细胞均有核中强T抗原阳性反应^[8],强调了T基因产物在细胞转化中的关键作用。

三、SV40 转化细胞的机制

目前虽对SV40转化细胞的确切机制仍不清楚,但如前所述,大量工作已证明,SV40是否造成转化取决于病毒早期蛋白大T基因的掺入和表达,而大T基因功能如下^[18]: 1. 作为早期蛋白除结合到病毒复制起始点,启动病毒DNA复制及晚期基因表达外还可激活某些细胞基因的表达并启动宿主DNA合成。2. 具有ATP酶和蛋白激酶活性,可与某些蛋白紧密结合,造成细胞内蛋白的磷酸化反应。3. 可与细胞内抑癌基因产物P₅₃蛋白及RB基因产物形成复合物,阻断后二者的生物活性^[19]。细胞转化与T抗原的如上功能密切相关。目前对抗癌基因研究的进展推动了SV40转化机制的研究。

四、SV40 转化细胞在肿瘤研究中的应用

利用SV40人们观察到了生物因素在体外

转化细胞的过程。由于SV40转化细胞的某些特性,近年来不少工作集中在利用SV40转化那些其它因素难以转化的人二倍体上皮细胞上,以便能够得到初步转化的具“不死性”、保持一定分化能力且不致瘤的细胞系,再用癌基因或其它物理化学致癌剂使细胞发生终末恶性转化^[19,20]。这一体系不仅可以作为人类细胞检测环境致癌剂的受体,缩短实验周期,减少正常细胞供体差异,甚至有人认为它可在某些癌基因研究中取代3T3细胞。除此之外,由于新近的研究展示了SV40T抗原与细胞内抗癌基因产物的结合,对于深入研究抗癌基因的特性也将成为有用的工具。在越来越多的人类上皮细胞培养成为可能的今天,相信SV40的应用仍将在癌变机制研究中发挥重要作用。

参 考 文 献

- 1 Green M. In: Fields B N *et al* eds. *Virology*, New York: Raven Press, New York Inc, 1985: 183—234
- 2 Howley P H *et al*. In: Klein G ed. *Viral Oncology*, New York: Raven Press, New York Inc; 1980: 489—550
- 3 Koprowski H *et al*. *J Cell Comp Physiol*, 1962; 59: 281
- 4 Eagle H *et al*. *J Exp Med*, 1970; 131: 863
- 5 Smith J R. *J Cell Biol*, 1974; 62: 48
- 6 Kaighn M E *et al*. *Carcinogenesis*, 1980; 1: 635
- 7 Girard A J *et al*. *Cell Comp Physiol*, 1965; 65: 69
- 8 Reddel R R *et al*. *Cancer Res*, 1988; 48: 1904
- 9 Sidney E *et al*. *Cancer Res*, 1982; 42: 2040
- 10 Pollack R *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974; 71: 4790
- 11 Choi K H *et al*. *Cytogenet Cell Genet*, 1983; 36: 633
- 12 Deffos L J *et al*. *Science*, 1968; 159: 435
- 13 Collins J J *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974; 71: 260
- 14 Ke Yang *et al*. *Differentiation*, 1988; 38: 60
- 15 Scoff D M *et al*. *Exp Cell Res*, 1986; 166: 391
- 16 Sack G. *Vitro*, 1980; 17: 1
- 17 Hara H *et al*. *Exp Cell Res*, 1987; 168: 531
- 18 DeCaprio J A *et al*. *Cell*, 1988; 54: 275
- 19 Ke Yang *et al*. *American J Pathol*, 1989; 135: 979
- 20 Reddel R R *et al*. *Oncogene Res*, 1988; 3: 101

【本文于1990年2月26日收到,5月20日修回】