

# 缺陷干扰病毒及其分子生物学研究

王 懋 梁

(湖北省医学科学院, 武汉)

缺陷干扰病毒 (defective interfering virus, 简称 DI 病毒) 是一类基因缺失突变株, 它们存在于多种动物病毒制剂中, 可干扰产生 DI 病毒的正常病毒的复制及生长。

## 缺陷干扰病毒的发现

1951 年 von Magnus 在进行未稀释的流感病毒连续传代时发现, 所产生的病毒感染性与血凝集作用的比率减少。这被称为 von Magnus 现象。进一步试验发现, 连续传代后感染性减弱的流感病毒与高效价流感病毒混合后, 能抑制后者的生长。经过抗原分析发现, 这种干扰制剂是几种毒粒的混合物。它的核蛋白与表面抗原的平均比例低于正常病毒, 说明每一毒粒中核蛋白含量低于正常病毒。这种病毒颗粒称 von Magnus 颗粒, 或缺陷干扰病毒。几乎各种动物病毒中都有 DI 病毒, 目前只有痘病毒群、微小病毒群和冠状病毒群尚未发现 DI 病毒。

## 缺陷干扰病毒的结构和性质<sup>[1,2]</sup>

目前认为, 缺陷干扰病毒应具备以下特征: 1) 仅含病毒的一部分基因组; 2) 含有正常的病毒结构蛋白; 3) 本身不能在宿主细胞内复制, 只有存在同种完整的正常病毒 (又称辅助病毒) 时才能繁殖; 4) 能特异地干扰同种正常病毒在细胞内的生长和复制。因此, 缺陷干扰病毒与正常病毒颗粒具有相同的抗原性。DI 病毒对正常病毒的干扰并不产生干扰素, 而且专一性很强。

抗原性分析和多肽分析证明, DI 颗粒与正常毒粒的多肽类型相同, 均能诱发中和抗体, 并能与补体结合。电镜观察表明它们的超微结构几乎完全相同。例如疱疹性口炎病毒 (VSV) 的 DI 颗粒, 只是较正常病毒稍短小些, 其它性状相似。

DI 颗粒核酸基因组片段的缺失是相对特异的, 而不是随机的, 某种病毒总是缺失同一基因组片段。例如 SV40 的 DI 颗粒, 尽管基因的缺失可发生在整个基因组中, 复制起始点决不会丢失; 脊髓灰质炎病毒的 RNA 缺失总发生在与衣壳蛋白有关的密码区域。

有些 DI 颗粒比正常毒粒体积小, 故可用蔗糖密度梯度离心分离。有些病毒二者物理性质相差不显著, 则需用氯化铯密度梯度离心或除去外壳蛋白后再分

离。

DI 病毒除了具有干扰作用外, 还具有病毒的多种功能。这些功能取决于结构蛋白的功能和病毒特异的遗传信息量。例如仙台病毒的 DI 颗粒具有结构蛋白所行使的功能; 脊髓灰质炎 DI 颗粒除不能合成外膜蛋白外, 可进行病毒复制的其它全部过程。

## 缺陷干扰病毒的干扰作用<sup>[2,3]</sup>

DI 颗粒的干扰作用有以下特点: 1) 在宿主细胞内部, 而不是在细胞表面发生, 即它不能阻止正常毒粒附着或穿入细胞表面; 2) 对同一种正常病毒的干扰作用最强, 对该病毒关系密切的病毒干扰作用稍弱, 对无关的病毒则全无干扰作用; 3) 受紫外线照射后即丧失干扰作用, 这暗示干扰作用与核酸有关; 4) 与干扰素参与的干扰作用无关, 这可由其特异性及对紫外线的敏感性说明。

影响 DI 干扰作用的因素, 已发现的主要是宿主细胞及宿主的年龄, 以及正常毒粒的遗传结构。DI 颗粒的干扰作用在对宿主的要求上有特异性, 例如流感病毒在鸡绒毛尿囊膜细胞中生长时, 经一次传代时就易积蓄 DI 颗粒, 而在 Madin-Darby 小牛肾细胞中传代时, 它的积蓄要慢得多。同种动物的不同组织中情况也不同, 例如仙台病毒在鸡胚中经 7 次传代均能检出 DI 颗粒, 而在鸡胚肺组织中只有 1/3 的毒株可检出 DI 颗粒。甚至同种宿主的同种组织, 由于遗传结构不同, 对干扰作用的敏感性也不同。Darnell 用对乙型脑炎敏感性不同的近亲繁殖的小鼠试验, 发现敏感小鼠正常毒粒产量很高, 而不敏感小鼠中, 正常毒粒明显减少, 复制受到干扰。另外, Sabin 发现, 2 月龄以上的小鼠对 VSV 的抵抗力较强, 而几周龄小鼠迅速因 VSV 感染麻痹而死亡。由于未发现抵抗力较强的小鼠的中和病毒或抑制病毒复制的全身性反应, 故认为可能是 DI 颗粒起了阻挡病毒扩散的屏障作用。据 RNA 合成量测定表明, 在成年小鼠中 DI 颗粒的干扰作用较幼年小鼠更明显。

一种病毒不只形成一种类型的 DI 颗粒。例如 VSV 的印第安型主要形成 DI-T 颗粒, 仅含正常毒粒基因组的 1/3, 而它的耐热株却产生大量含 2/3 病毒基因组的颗粒。Schnitzlein 发现<sup>[1]</sup>, 用新泽西血清型和印第安血清型的 VSV 复合感染 BHK 细胞, 产生的

DI 颗粒所含 RNA 的大小相同,而且“退火”(anneal)成为原印第安血清型 DI 颗粒,但其核壳仍是新泽西型的蛋白质。比较这种假印第安型 DI 与原有的血清型的干扰作用发现,其干扰新泽西型的能力增强。但将印第安型毒粒一次传代后再进行同样试验,此种干扰能力消失,故认为病毒的蛋白质对 VSV 的干扰能力有特异性影响。

DI 颗粒的感染次数及在接种物中的比例、温度、激素等因素也影响 DI 颗粒的干扰作用。由于以上多种因素影响,因此在有些病毒系统中不易发现 DI 颗粒及其干扰作用。

## 缺陷干扰病毒及其干扰作用的分子生物学

在 VSV 和脊髓灰质炎病毒系统中详细地研究了 DI 颗粒干扰作用的分子生物学机制。虽然这些研究结果还很不完备,但可以看出,在不同病毒系统中 DI 颗粒的干扰作用,其分子基础可能不同,这取决于病毒核酸的复制及子代毒粒形态发生的特异方式。

### 一、在疱疹性口炎病毒系统中的干扰作用<sup>[1]</sup>

一般认为 VSV 在细胞内的复制经过以下阶段:转录酶将亲本的 RNA 全部信息转录到多条互补 RNA 链中,原发性转录后开始合成病毒蛋白,再以互补的 RNA 为模板合成子代 RNA。新合成的 RNA 被蛋白质包绕而形成核壳,后者作为继发性转录的模板并形成子代毒粒的前身,最后核壳突出于质膜外, VSV 即成熟。

现已发现, VSV 正常毒粒核酸的 3' 末端与 5' 末端是互补的,因此估计它的 DI 颗粒中全部 RNA 可能存在于某些互补的核苷酸序列。有人用电镜观察到 DI 颗粒的 RNA 呈环形和二聚体线状结构,也说明它的末端存在互补结构或逆互补结构。Rao 等比较了 DI 颗粒与正常毒粒的 RNA 肽图谱,发现 DI-RNA 中除正常基因组的某些部分外,还有额外的核苷酸序列。由于发现 DI 颗粒的 RNA 分子能迅速“自身退火”(self-anneal),说明这些额外的核苷酸序列可能来自互补的 RNA 结构。

VSV 的 RNA 合成从毒粒进入细胞开始,毒粒中含有一个负链的 40S RNA 基因组,并从无核壳到有核壳。转录过程中,转录出的 mRNA 即为正链。当合成了该病毒所特有的蛋白质时,即开始复制基因组,正链的 40S RNA 作为模板,合成与其完全互补的基因组。

图 1 是从 VSV 病毒 RNA 的 3' 末端产生 DI RNA 的模型<sup>[2]</sup>。图中(1)表示正常病毒的互补结构。正常复制完成时产生同样的结构;(2)表示复制失败时,新生的 RNA 链 3' 末端形成横 U 形;(3)表示由于新合成的 RNA 的复制、模板移位,并沿着正链的 5' 末端合成,形成两个柄状结构;(4)所形成的正股增加了一些互补结构,如 B 和 B', C 和 C'; (5)如以有缺陷的正股为模板复制负链,则产生有缺陷的负链基因组,具有 AA' 外,还有 BB' 和 CC' 的互补序列。(6)在负链基因组合成过程中,如引入 U 形环,则易合成其它互补结构,于是正常基因组中出现正链的互补结构。此种广泛的互补性可引起 RNA 分子内的自身退火。不过大多数 DI 颗粒的有 5' 末端正常结构的大部分。

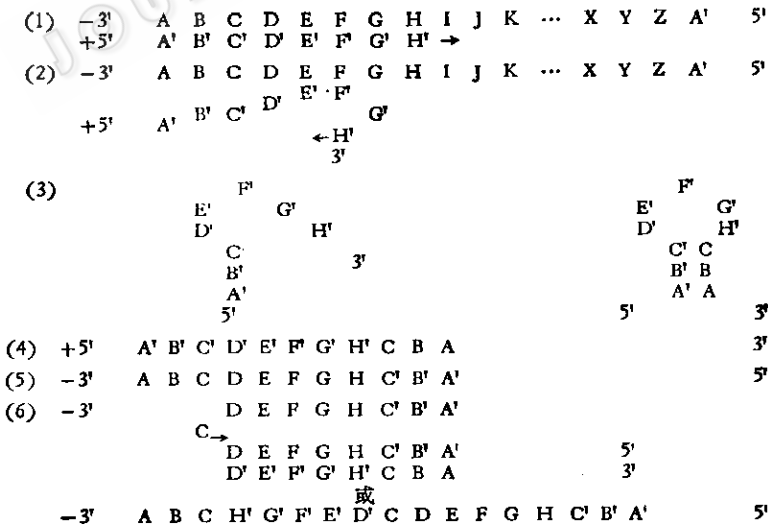


图 1 从 3' 末端产生 VSV DI RNA 的模型

这种产生 VSV DI 基因组的模型可用来说明多种 DI 病毒基因组的复制,例如腺病毒、亚急性硬化性全脑炎病毒、Sindbis 病毒的 DI 颗粒均以类似方式产

生。

由这种模型推测,如果 U 形结构在复制了一半核酸以后出现,或新生链大部分被复制到与缺陷基因共

价相连的互补结构中,还可产生比正常病毒基因组大的 DI 颗粒。总之,由于线性分子上有逆互补末端,这种模型可排除 RNA 分子间随机结合产生 DI 基因组的可能性,并确定 DI 基因组是从原基因组的末端开始产生的。目前尚不完全了解 U 形结构是如何形成的,一般认为在试管内有逆转录酶时即可出现此种过程。

实验表明,当 DI 颗粒中 RNA 的转录被抑制时,DI 的合成及复制不受影响,相反,复制受抑制时,DI-T 的 RNA 合成即停止。因此认为它的 RNA 合成,仅取决于复制过程,不依赖于转录过程,即 DI-T 颗粒对正常毒粒的干扰作用仅见于 RNA 复制阶段。由于实验表明,在 VSV 病毒复制周期的前期加入 DI 颗粒的干扰作用与同时加入正常毒粒和 DI 颗粒时的作用程度相同,而后期加入则无干扰作用,因此人们认为干扰作用必定发生在 RNA 复制的早期。即很可能不直接抑制病毒蛋白质的合成,也不抑制 RNA 的原发性转录,而是在很大程度上取决于 DI 颗粒与正常毒粒的 RNA 对复制酶的竞争作用。Khan<sup>[4]</sup>的实验进一步证实了这一点。

仙台病毒等副粘病毒 DI 颗粒的合成方式亦与此类似,故它的 DI 颗粒的干扰作用机制也与 VSV 病毒的 DI 颗粒十分相似。

## 二、在脊髓灰质炎病毒系统中的干扰作用<sup>[4]</sup>

脊髓灰质炎病毒在细胞内复制,首先是转译进入细胞内的毒粒 RNA,病毒基因组完全转译到一条长链多肽上,后者经多次降解而成为较小的有功能的多肽,利用这些多肽,毒粒 RNA 便迅速复制。病毒蛋白的合成出现于整个生长周期,最后形成称为原壳的蛋白质外壳。

脊髓灰质炎病毒的 DI 颗粒除没有合成原壳的能力外,其它全部病毒功能均具备。DI 颗粒抑制正常毒粒的复制,使正常毒粒减少,原壳合成也随之减少。而且 DI 颗粒还与正常毒粒在原壳的需求上发生竞争,从而进一步发挥其干扰作用。但尚不了解 DI 颗粒如何限制 RNA 的全部合成过程。

### 研究 DI 颗粒及其干扰作用的意义<sup>[1,4]</sup>

1. 促进动物病毒生物学的研究进展: DI 颗粒在多种病毒系统中的广泛存在及其干扰作用的特异性,提示它在动物病毒的生长调节中有着重要的作用。此项研究的逐步深入将会继续阐明病毒复制的细胞内过程及其调节机制。DI 颗粒的核酸将用于发现多聚酶

的识别部位及结构核蛋白的附着部位,也可用于绘出病毒基因组图。

2. 有助于阐明病毒性疾病的发病机制: 动物病毒在细胞培养中连续传代时,观察到 DI 颗粒引起病毒效价的周期性改变。这提示,存在大量正常毒粒的感染初期相当于临床上急性病毒感染早期,继而随着 DI 颗粒的出现,正常毒粒迅速减少,加上宿主的免疫机能,感染被控制。如宿主免疫机能未能控制病毒的繁殖,则感染扩散,出现正常毒粒合成的另一次高峰,以此可解释某些病毒感染的双相型。此种周期性改变如持续下去,宿主免疫反应不能完全制止感染,则正常毒粒及 DI 颗粒均减少或仅是正常毒粒减少,表现为亚急性或持续性病毒感染,由病毒或抗原抗体复合物的蓄积而引起临床症状。如正常毒粒与 DI 颗粒的平衡失调,正常毒粒的合成迅速增加,则表现为慢性感染的急性加剧。此学说为病毒发病机制的研究提供了重要线索,是否完全符合病毒的感染过程尚待进一步实验研究确定。

3. DI 颗粒在病毒疫苗中的可能作用: 现已发现脊髓灰质炎口服疫苗中 DI 颗粒的含量很高,而且脊髓灰质炎疫苗参照株产生 DI 颗粒所需传代次数比有毒株要少,故推测 DI 颗粒的存在有一定的减毒作用,使该疫苗可引起免疫,但不产生严重的病变。

4. DI 颗粒作为抗病毒因子的可能性: DI 颗粒是对应的正常病毒的特异性抑制剂,但其抑制能力受病毒株的不同及宿主遗传型等因素的影响。因此,完全阐明这些因素后才能确定 DI 颗粒是否可作为有效的抗病毒制剂。

### 参 考 文 献

- [1] Huang, A. S.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 27: 101—105, 1973.
- [2] Huang, A. S.: *Bacteriol. Rev.*, 41(4): 811—821, 1977.
- [3] Huang, A. S. and E. L. Palma: Defective Interfering Particles as Antiviral Agents, Antiviral Mechanisms, *Perspectives in Virology IX* (ed. by Pollard, M.), Academic Press, New York, 1975, pp. 77—90.
- [4] Cole, C. N.: Defective Interfering Particles of Poliovirus, *Progress in Medical Virology* (ed. by Melnick, S. E.), Vol. 20, S. Karger, 1975, pp. 181—202.
- [5] Schnittlein, W. M. and M. E. Reichmann: *Virology*, 80(2): 275—288, 1977.
- [6] Khan, S. R. and R. A. Lazzarini: *Virology*, 77(1): 189—201, 1977.