



小型模式生物在病毒作用机制研究中的应用

沈 琮 ,何琪杨

(中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所,北京 100050)

【摘要】 小型模式生物如酵母、线虫、果蝇、斑马鱼等在生命科学研究中应用广泛,将其应用于病毒的研究,使人们对病毒-宿主的相互作用以及生物体的抗病毒免疫机制有了新的认识。本文对这些小型模式生物的特点及其在病毒机制研究中的应用做简要介绍。

【关键词】 模式生物;病毒;酵母;线虫;果蝇;斑马鱼

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0069-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.16

Application of Small Model Organisms in Research on Viral Mechanisms

SHEN Cong ,HE Qi-yang

(Institute of Medical Biotechnology ,Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College ,Beijing 100050 ,China)

【Abstract】 Small model organisms such as yeast ,nematodes ,fruit fly and zebrafish have been widely used in biological research. They are used in research of viral mechanism and led to new understandings of virus-host interaction and antiviral immune mechanisms. The present review summarizes the versatility of these animal models and their main contributions in the elucidation of virus mechanisms.

【Key words】 Model organisms; Virus; Yeast; Nematode; Fruit fly; Zebrafish

病毒感染性疾病是严重威胁人类健康的一类重要疾病。尽管对病毒感染机体的分子机制已有很多认识,但病毒与宿主的相互作用及其细胞因素调节病毒基因表达的许多规律尚未得到彻底阐明,这是根治艾滋病、病毒性肝炎等难治性传染病的瓶颈所在。细胞培养和建立动物感染模型是病毒学研究的经典方法,细胞培养体系和动物模型的缺乏会严重阻碍对病毒机制的研究以及抗病毒药物的筛选^[1]。某些具有严格种属特异性的病毒(如巨细胞病毒 CMV),体外培养只能采用自然宿主来源的细胞系;某些病毒的自然宿主仅为人和灵长

类,需要建立可行的动物研究模型;此外,人类庞大的基因组、表观遗传学的修饰以及病毒变异株和新病毒的不断出现,在一定程度上增加了研究的难度。

模式生物是人们在长期研究生命科学的过程中建立起来的、可以模拟某个特定生理或病理过程的重要实验材料。目前,多种模式生物的基因组测序已经完成,蛋白质组学数据库和基因表达数据也陆续建立。除常用的大鼠、小鼠、兔子等大型的模式生物之外,应用小型模式生物如酵母、线虫、果蝇和斑马鱼等的研究,近年来发展迅速,取得了大量的研究成果。小型模式生物具有结构简单、操作方

[基金项目] 科技部“重大新药创制”综合性大平台项目(2009ZX09301-003)。

[作者简介] 沈琮(1985-),女,博士生,研究方向:微生物与生化药学。E-mail: shencyky@163.com。

[通讯作者] 何琪杨,男,教授,博士生导师,研究方向:微生物与生化药学。E-mail: qyh2000bj@yahoo.com.cn。

便、生长繁殖快、饲养成本低等特点,使其在病毒作用机制的研究中较其它大型模式生物更具优势。它们的应用有力地促进了病原学的发展,使许多难以解决的人类难题变得明朗。

1 酵母

酵母是简单的单细胞真核生物,约有 6000 个基因,1996 年酵母全基因组测序完成后发现:60% 以上为功能基因,其中 40% 含有与人类基因相似的保守序列。作为模式生物的酵母主要有酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 两种,二者在细胞周期调控的研究中具有重要地位。在病毒研究中使用酵母也取得了大量成果。

酵母基因文库可用于大规模筛选疾病关联基因以及与病毒复制相关的宿主蛋白。用酵母筛选到热休克蛋白 Hsp70 能够抑制由 HIV-1 的辅助蛋白 Vpr 引起的细胞周期阻断,这种抑制作用已在 HIV-1 感染的人体细胞中得到证实^[2]。

基于酵母系统已阐明了多种病毒(如人免疫缺陷病毒 HIV、丙型肝炎病毒 HCV、EB 病毒)中的某些特异蛋白的功能。Vpr 在 HIV 复制和核运送中起重要作用,把 Vpr 基因转化到酵母中,也观察到了与在 HIV-1 感染的人体细胞中相似的功能,具体表现为增加酵母细胞壁的几丁质合成、干扰细胞骨架并改变细胞极性^[3]。虽然 Vpr 使细胞阻断在 G₂ 期,但不影响紫外线引起的损伤效应。进一步研究发现,Vpr 影响细胞周期与 Wee1、PP2A 的组分 Ppa2 和 Rad24 的表达有关^[4,6]。

酵母在 RNA 病毒复制周期及相关宿主因子的研究中发挥了重要作用。首个利用酵母体系扩增的高等真核生物病毒是雀麦花叶病毒 (Brome mosaic virus BMV),一种基因组为单正链 RNA 的植物病毒。之后,一些 DNA 病毒如人乳头瘤病毒 HPV、牛乳头瘤病毒 BPV 等也在酵母中得到复制和扩增^[7]。为研究病毒宿主相互作用、寻找新的抗病毒药物靶点创造了条件。

在蛋白表达及药物筛选中的作用:酵母中表达的重组乙肝表面抗原已发展成为广泛应用的乙肝疫苗;某些病毒复制所必需的宿主蛋白只存在于人体细胞,而酵母细胞中没有相应组分,在酵母细胞中表达这种蛋白可以建立更为复杂的类似于“人源化酵母”的病毒感染体系;高通透性细胞膜酵母株

和细胞膜主要转运泵缺失酵母株的建立则使化合物更易进入细胞,提高了抗病毒药物在酵母体系中的筛选效率^[7]。

酵母的核糖体较哺乳动物的小,但二者结构非常相似,都含有 HCV (丙肝病毒内部核糖体进入位点) 序列结合位点,40S 亚基同源性达 60%^[8]。在不合翻译起始因子、只含 HeLa 细胞核糖体、酵母细胞延伸因子 1A、2 和大量氨酰 tRNA 的重组系统中,HCV IRES 介导的翻译仍可发生^[9]。利用双顺反子表达载体 pFGAL4,在酵母细胞中能够检测到 HCV IRES 的翻译活性^[10]。pFGAL4 载体由多重表达质粒改建而成,含有一个磷酸丙糖异构酶强启动子,以保证萤火虫荧光素酶基因和 GAL4 基因双顺反子 mRNA 的高水平表达。在含有 IRES 的顺反子区域,Gal4 转录因子是该区信号放大的保证。即使在只有少量的第二顺反子表达、即细胞中仅存在少量活性 Gal4 分子的情况下,Gal4 诱导型启动子也会启动大量的次生报告基因转录,使信号成比例放大。这种双顺反子表达系统利用了酵母在进化过程中自然形成的半乳糖代谢调节通路,严格准确、结果可靠。通过测定裂解产物中 -gal/luc 酶活性比值和活细胞在选择性 SD 培养基(缺乏腺嘌呤和组氨酸,富含组氨酸合成的竞争性抑制剂 3-AT)上的克隆形成率判断得知 HCV IRES 在酵母中仍有起始翻译的活性。为进一步明确 HCV IRES 功能,筛选新型抗病毒药物提供了新的模型。

此外,酵母双杂交系统是研究蛋白相互作用的有利工具,利用该系统已检测到了多种病毒蛋白与宿主蛋白的相互作用^[11],加深了人们对病毒致病机制的了解。

2 秀丽隐杆线虫

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 作为模式生物早在 40 多年前由 Sydney Brenner 博士提出,它是由单细胞生物进化而来的最简单的多细胞模式生物。成体线虫长约 1 mm,为雌雄同体。可在琼脂培养基上培养,以大肠杆菌为食。大约含有 1 000 个体细胞,细胞形态和遗传背景清楚。繁殖数 200 ~ 300 25℃ 两天可长为成体。低温液氮冷藏可保存数年。线虫基因组大约包含两万个基因,其中 60% 与其它物种的已知基因具有同源性。多种病毒可以感染线虫,并在线虫体细胞内复制和装配,RNA 病毒基因可被经典的 RNA 干扰途径沉默^[12]。尽管

线虫不产生获得性免疫且没有类似的巨噬细胞和嗜中性粒细胞,从整体水平研究宿主与病原体相互作用仍是良好的模型。

近年来广泛研究的 RNA 干扰现象,是否为哺乳类抗病毒的防御机制未见定论,使用没有免疫系统的线虫进行研究,解决了上述问题。用水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)感染 RNAi 机制缺陷的线虫突变体,可产生大量的病毒;而感染加强 RNAi 反应的突变体,病毒颗粒的产生被抑制^[13],表明 RNAi 的机制与抗病毒免疫密切相关。使用另一种具有广泛宿主,能在酵母、植物、昆虫和哺乳类细胞中复制的兽棚病毒(flock house virus)感染线虫,也得到了相似的结论^[14]。进一步研究表明,线虫除了表达 dicer 酶外还编码三种 dicer 相关的解旋酶(drh),此种酶与哺乳动物中能够广泛激活先天性免疫反应的 RIG-I 样 RNA 解旋酶受体关系密切。在 drh-2 突变的线虫中,外来双链 RNA 介导的 RNAi 和病毒复制子介导的 RNAi 均增强,但在 drh-1 突变的线虫中,外源性 RNAi 却无变化,提示外源性和病毒性 RNAi 途径在基因水平存在差异^[15]。

HSV VP16 蛋白的作用靶点是一类小而关键的基因家族,包括哺乳动物中的 HCF-1、HCF-2 和线虫中的 Ce HCF-1,它们在分子水平高度保守。HCF-1 是单纯疱疹病毒宿主细胞因子,在 HSV 感染的细胞中,HCF-1 与病毒蛋白 VP16 相互作用,共同促进 DNA-蛋白质转录激活复合物的形成。hcf-1 基因缺陷的线虫不能形成 VP16 介导的复合物,说明线虫中的 Ce HCF-1 是 HSV VP16 作用的唯一靶点^[16]。HCF 与 HSV VP16 的相互作用在多种动物中的保守性,一定程度上反映了自然选择和病毒感染对细胞进化的共同影响。

3 黑腹果蝇

果蝇(*Drosophila melanogaster*) 在分类学上属于昆虫纲双翅目,生活周期包括卵、幼虫、蛹和成虫四个完全变态的发育阶段,其中幼虫又分为一龄、二龄及三龄,从初生卵发育至新羽化的成虫大约为 10 d。清晰的遗传背景和便捷的遗传操作使其成为一种理想的模式生物,广泛应用于发育生物学、神经科学、生物化学和分子生物学等领域^[17]。

相对于酵母和线虫而言,果蝇已具有与人 NF- κ B 免疫信号通路相类似的抗病毒 Toll 通路。HIV

的辅助蛋白 Vpu,通过与 SCF 复合体的相互作用而干扰蛋白的降解,将 Vpu 基因转化到果蝇的脂肪细胞中,可抑制 Toll 信号通路的活化^[18]。在 HIV 感染早期起作用的 Nef 蛋白的功能,仍存在争议。把 Nef 基因转化到果蝇中,发现 Nef 不仅参与细胞增殖的调解,同时也诱导 Caspase 依赖的细胞凋亡;Nef 的功能与活化 JNK 信号通路,抑制 NF- κ B 免疫反应有关^[19]。把 HIV 的 Tat 蛋白注射到果蝇的胚胎中,观察到 Tat 与微管的结合,干扰细胞周期 M 期的运行,明显增加多倍体和异倍体的细胞^[20],此后在哺乳动物细胞中也检测到 Tat 的相似作用。表达 SARS 冠状病毒 3a 蛋白的果蝇可出现粗眼表型,利用这种转基因模型发现 3a 蛋白参与了细胞内依赖网格蛋白的内吞作用,并可能通过调节细胞色素 C 水平和 caspase 活性诱导细胞凋亡^[21]。而在 FHV 感染的果蝇细胞中发现凋亡抑制因子 DIAP 明显减少。通过 RNAi 方式抑制 diapl,细胞迅速凋亡,稳定转染 diapl 抑制 caspase 活性则可阻止 FHV 感染引起的凋亡。由此推断病毒诱导的凋亡也可能是通过改变细胞中凋亡抑制因子的水平和活性来实现的^[22]。总之,研究病毒蛋白对整体动物的影响,果蝇是一种比较适合的模式^[23]。

随着果蝇中大量人类致病基因同源序列的发现以及对转基因果蝇的研究,果蝇已被广泛用于阐释机体针对病毒的多种先天性免疫机制。研究发现,果蝇对 Nora 病毒的感染具有阈值依赖现象^[24]:高滴度病毒感染可产生稳定的持续感染,而低水平病毒感染后可被完全清除。而且这种阈值依赖现象在 RNAi 通路突变株、Toll 和 Jak-Stat 通路突变株中仍然存在。这种 RNA 病毒不受 RNAi 机制影响且对其他免疫通路也不敏感,尚需进一步探索。

4 斑马鱼

斑马鱼(*Danio rerio*) 作为模式生物用于研究脊椎动物的发育已有 20 多年的历史。其特点是体型小,生长快,幼体可在 24 h 孵化,可以生长在 96 孔板中,生命周期短且早期胚胎透明易于观察,饲养成本是小鼠的 1%~1%。尽管利用细胞培养及线虫、果蝇模型可以解决一些病原体与宿主反应的基本问题,但是由于缺乏脊椎动物复杂的免疫系统,这些模型对哺乳动物体内疾病进程的模拟程度有限^[25]。而利用斑马鱼研究病原体-宿主相互作用可以很好地补充无脊椎动物模型和小鼠模型的不足。

一方面,斑马鱼具有与哺乳动物类似的免疫因子和通路,不仅具备 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、抗原提呈细胞和能产生活性 NO 和活性氧自由基的吞噬细胞,还具有体液免疫的基本要素如补体等,以及类似于哺乳动物 Toll 样受体(TLR)和 Nod 样受体的同源蛋白,在微生物感染后可以激活特定细胞因子的表达^[26]。另一方面,斑马鱼具有操作简单、成本低廉、生长周期短、基因背景清楚等特点,随着对转基因和基因敲除研究的不断增加,利用斑马鱼建立细菌和病毒的感染模型备受关注。利用相差显微镜可以观察到斑马鱼的吞噬细胞将注入胚胎的细菌吞噬并摧毁的整个过程^[27];结核分枝杆菌感染的斑马鱼可以模拟人的结核病,产生肉芽肿样变^[28];葡萄球菌、链球菌和李斯特菌也有相应的斑马鱼模型^[29]。目前利用斑马鱼建立了传染性造血器官坏死病病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)、传染性胰脏坏死病病毒(infectious pancreatic necrosis virus in trout IPNV)、神经坏死病毒、病毒性出血性败血症病毒、鲤春病毒血症病毒等鱼类病毒感染模型,病毒感染方式有体表吸入,腹腔注射等^[30]。

利用斑马鱼研究免疫系统的功能有很多优点,例如可以检测淋巴组织的早期发育,可以有效进行定点突变并对表型突变株进行大规模筛选。胞浆中的 RIG-I 样受体(RLRs)和线粒体中的抗病毒信号蛋白(MAVS)在抗病毒干扰素的产生过程中有重要意义。鱼类细胞线粒体中也存在与 MAVS 同源的蛋白,其诱导产生干扰素的机制与哺乳动物细胞类似^[31]。研究 MAVS 缺失突变的鱼细胞发现 N-端的 CARD 样结构域和 C-端的跨膜结构域是维持 MAVS 信号转导功能所必需的,而中部富含脯氨酸的区域是非必需的。

5 结语

综上所述,目前利用小型模式生物对病毒的研究主要包括:通过阐明模式生物自然病原的感染机制了解病毒致病的通用途径;用于动物抗病毒机制的比较学研究和进化研究;以某种基因的插入或缺失突变体作为整体模型,系统地研究基因或蛋白在病毒侵染过程中的作用特点;通过表达转入的病毒基因筛选抗病毒药物等多个方面。不同的小型模式生物与人类的亲缘关系差别较大,需要在比较基因组学和功能学研究的基础上进行选择。例如,哺

乳动物 TLRs 和节肢动物的 Toll 家族有明显差别。前者可直接识别 PAMP,而果蝇的 Toll 受体则通过内源性蛋白间接地识别 PAMPs;而作为脊椎动物的硬骨鱼 TLR 则和与其同源的人类基因产物具有相同的功能^[32]。其中,TRL5 都是鞭毛蛋白的受体,TRL3 能识别相同的配体且都具有识别 RNA 的作用,在抵抗病毒感染的先天性免疫中发挥重要作用。

合理地选择小型模式生物,不仅可以在整体动物中观察病毒与宿主的相互作用、弥补细胞系研究的不足而且能够较早地进行抗病毒药物的体内筛选,降低药物研发的成本,有利于缩短研究周期、加快研究进度,减少实验室感染的风险。总之,小型模式生物在病毒学研究中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2009, 4(3): 179-184.
- [2] Iordanskiy S, Zhao Y, Dubrovsky L, et al. Heat shock protein 70 protects cells from cell cycle arrest and apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 viral protein [J]. *J Virol*, 2004, 78(18): 9697-9704.
- [3] Zhao Y, Yu M, Chen M, et al. Pleiotropic effects of HIV-1 protein R (Vpr) on morphogenesis and cell survival in fission yeast and antagonism by pentoxifylline [J]. *Virology*, 1998, 246(2): 266-276.
- [4] Chen M, Elder RT, Yu M, et al. Mutational analysis of Vpr-induced G₂ arrest, nuclear localization, and cell death in fission yeast [J]. *J Virol*, 1999, 73(4): 3236-3245.
- [5] Elder RT, Yu M, Chen M, et al. Cell cycle G₂ arrest induced by HIV-1 Vpr in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) is independent of cell death and early genes in the DNA damage checkpoint [J]. *Virus Res*, 2000, 68(2): 161-173.
- [6] Elder RT, Yu M, Chen M, et al. HIV-1 Vpr induces cell cycle G₂ arrest in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25 [J]. *Virology*, 2001, 287(2): 359-370.
- [7] Alves-Rodrigues I, Galao RP, Meyerhans A, et al. *Saccharomyces cerevisiae*: A useful model host to study fundamental biology of viral replication [J]. *Virus Res*, 2006, 120(1-2): 49-56.
- [8] Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, et al. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit [J]. *Science*, 2001, 291: 1959-1962.
- [9] Lancaster AM, Jan E, Sarnow P. Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site [J]. *RNA*, 2006, 12: 894-902.
- [10] Masek T, Vopalensky V, Horvath O, et al. Hepatitis C virus internal ribosome entry site initiates protein synthesis at the authentic initiation codon in yeast [J]. *J Gen Virol*, 2007, 88

- (7) :1992 – 2002.
- [11] Chassey B de ,Navratil V ,Tafforeau L ,et al. Hepatitis C virus infection protein network [J]. Mol Syst Biol. 2008 ,11 (4) :230.
- [12] Shohei M. Nematode ,an experimental animal in the national bio-resource project [J]. Exp Anim 2009 ,58 (4) :351 – 356.
- [13] Wilkins C ,Dishongh R ,Moore SC ,et al. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature 2005 ,436 (7053) :1044 – 1047.
- [14] Lu R ,Maduro M ,Li F ,et al. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature 2005 ,436 (7053) :1040 – 1043.
- [15] Lu R ,Yigit E ,Li WX ,et al. An RIG-I-like RNA helicase mediates antiviral RNAi downstream of viral siRNA biogenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. PLoS Pathogens ,2009 ,2 (5) :1 – 11.
- [16] Lee S ,Horn V ,Julien E ,et al. Epigenetic regulation of histone H3 serine 10 phosphorylation status by HCF-1 proteins in *C. elegans* and mammalian cells [J]. PLoS ONE ,2007 ,2 (11) :1213.
- [17] Jasny BR. The universe of *Drosophila* genes [J]. Science ,2000 ,287 (5461) :2181.
- [18] Leulier F ,Marchal C ,Miletich I ,et al. Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat-body cells inhibits Toll-dependent immune responses [J]. EMBO Rep ,2003 ,4 (10) :976 – 981.
- [19] Lee SB ,Park J ,Jung JU ,et al. Nef induces apoptosis by activating JNK signaling pathway and inhibits NF- κ B-dependent immune responses in *Drosophila* [J]. J Cell Sci ,2005 ,118 :1851 – 1859.
- [20] Battaglia PA ,Ponti D ,Naim V ,et al. The HIV-Tat protein induces chromosome number aberrations by affecting mitosis [J]. Cell Motil Cytoskel 2005 ,61 (3) :129 – 136.
- [21] Wong SLA ,Chen YW ,Chan CM ,et al. In vivo functional characterization of the SARS-coronavirus 3a protein in *Drosophila*. Biochemical and biophysical research communications [J]. 2005 ,337 :720 – 729.
- [22] Erik W ,Settles ,Friesen PD. Flock house virus induces apoptosis by depletion of *Drosophila* inhibitor-of-apoptosis protein DIAP1 [J]. J Virol 2008 ,2 :1378 – 1388.
- [23] Spresser CR ,Carlson KA. *Drosophila melanogaster* as a complementary system for studying HIV-1-related genes and proteins [J]. J Neurosci Res 2005 ,80 (4) :451 – 455.
- [24] Habayeb MS ,Ekström JO ,Hultmark D ,et al. Nora virus persistent infections are not affected by the RNAi machinery [J]. PLoS One 2009 ,4 (5) :5731.
- [25] Mahajan-Miklos S ,Rahme LG ,Ausubel FM. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts [J]. Mol Microbiol 2000 ,37 :981 – 988.
- [26] Meeker ND ,Tred NS. Immunology and zebrafish : spawning new models of human disease [J]. Dev Comp Immunol ,2008 ,32 :745 – 757.
- [27] Trede NS ,Langenau DM ,Traver D ,et al. The use of zebrafish to understand immunity [J]. Immunity 2004 ,20 :367 – 379.
- [28] Davis JM ,Clay H ,Lewis JL ,et al. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos [J]. Immunity 2002 ,17 :693 – 702.
- [29] Lin B ,Chen S ,Cao Z ,et al. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection : striking similarities and obvious differences with mammals [J]. Mol Immunol 2007 ,44 :295 – 301.
- [30] Sullivan C ,Kim CH. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function [J]. Fish Shellfish Immunol ,2008 ,25 (4) :341 – 350.
- [31] Biacchesi S ,LeBerre M ,Lamoureux A ,et al. Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses [J]. J Virol 2009 ,83 (16) :7815 – 7827.
- [32] Oshiumi H ,Matsuo A ,Matsumoto M ,et al. Pan-vertebrate Toll-like receptors during evolution [J]. Curr Genom 2008 ,9 :488 – 493.

修回日期)2010-10-18