

L₆₅₆₅和 SRS 瘤株的白血病病毒分离提纯 及其生物学特性研究

程立

(上海医科大学病理生理学教研室, 上海)

郑葆芬

(上海医科大学生物物理学教研室, 上海)

ISOLATION PURIFICATION AND BIOLOGICAL PROPERTY OF LEUKEMIA VIRUS FROM L₆₅₆₅ AND SRS TUMOR STRAINS

Cheng Li Zeng Bao—feng

(Department of Pathophysiology and Biophysics,

Faculty of Basic Medical Sciences,

Shanghai Medical University, Shanghai)

自1951年 Gross 应用 AK 近交系白血病小鼠的无细胞提取液接种 C₃H 近交系新生乳鼠诱发白血病后, 病毒与白血病的关系引起了人们很大的关注, 相继的又建立了多株病毒性小鼠白血病模型, 并进行了广泛的研究, 目前已经肯定鸡、小鼠、猫、牛和猿猴等白血病的发生与病毒有病因学上的联系^[1]。近年来, 国外利用这些动物模型对白血病病毒的基因组结构和功能、肿瘤基因及其产物和诱瘤的机制等方面从分子生物学水平进行了深入的研究^[2], 得到不少资料对了解人类白血病病毒病因和发病学有重大的意义。我国的实验性白血病研究开始于六十年代初期, 先在天津、上海开展, 以后又在遵义等地陆续进行^[3-5], 并逐步形成具有我国特点的 T-S-Z 小鼠白血病系统^[6], 这是研究白血病病因一发病学的良好模型。在已建立的十株小鼠白血病模型中, 其中 8 株在病鼠的脾脏、胸腺和淋巴结等组织的超薄切片里观察到病毒颗粒 (A型或C型), 但是实验证明只有 T638和L6565 两株小鼠白血病, 是应用无细胞提取液注入新生乳鼠诱发产生白血病, 并能进行连续传代^[7-9]。但是我国对白血病病毒的研究与国外水平比较还有不少差距, 需要共同努力, 迎头赶上。

我校病理生理学教研室于1965年建成小鼠病毒性 L6565 白血病瘤株^[9], 并在1971年应用 L6565 白血病病鼠的胸腺悬液注入昆明种小鼠腹腔建立 SRS 淋巴细胞腹水瘤株^[10]。在 L6565 和 SRS 两瘤株的组织、细胞以及无细胞提取液和腹水液内, 电镜下观察到大量

的 C 型和 A 型病毒颗粒, 并证明具有致白血病活性^[9, 11]。小鼠 L6565 和 SRS 两瘤株的建立为白血病病毒的分离提纯和分子生物学的研究提供了良好的模型。

1. 白血病病毒的分离、提纯^[12] 曾用两种方法: ①蔗糖密度梯度离心法。L6565 病鼠组织的离心上层液经过不连续的 20~60% 蔗糖密度梯度离心后, 离心管内分成六条带, 病毒主要集中于 37~39% 的区带内, 相当于病毒的密度为 1.161~1.171 克/毫升; ②分子筛凝胶柱层析方法。L6565 病鼠的组织匀浆离心上层液, 用聚乙烯二醇 (PEG) 抽提, 再经 Sephadex G-200 凝胶层析得到三个组分。电镜观察在 G-1 组分内含有病毒颗粒, 并可测出逆转录酶活性, 注射给昆明种新生乳鼠有致白血病活性。关于 SRS 瘤株的超速离心分离的病毒的浮力密度, 在蔗糖里是 1.165 克/毫升, 而在氯化铯内是 1.176 克/毫升^[13]。

2. 电镜观察和病毒的分布^[9, 11] L6565 白血病小鼠的胸腺、脾脏、淋巴结和肝脏等器官的超薄切片里观察到典型的 C 型病毒颗粒。L6565 病鼠组织的无细胞提取液经铬真空喷涂后, 电镜下见到大小两种不同的病毒颗粒, 前者的直径为 130~150nm, 高度为 40~50nm; 后者直径为 70nm, 高度为 25nm^[3], 两者之间以及它们与超薄切片中 C 型颗粒的关系尚待进一步研究。在 SRS 腹水瘤细胞胞质中扩大的囊泡内, 电镜下观察到呈单个或 3~5 成群的池内 A 型病毒颗粒, 但腹水液超速离心后分离的病毒则呈 C 型颗粒形态。此外, 在 SRS 瘤细胞膜表面微绒毛间也可见到 C 型病毒的存在。这也提示池内 A 型可能是 C 型病毒的前体。

3. 白血病病毒的逆转录酶活性及其性质研究^[14-16] 从 L6565 和 SRS 两瘤株制备的提取液, 经蔗糖密度梯度离心法或分子筛凝胶法分离纯化的病毒, 应用 Schlom 和 Speigelman 的逆转录酶和高分子 RNA 同步测定法, 利用病毒的内源性反应, 均得到逆转录酶的阳性结果。酶反应需二价金属离子 Mn^{++} 、 Mg^{++} 的存在, Mn^{++} 的激活效率比 Mg^{++} 高, 这是哺乳类致癌性 RNA 病毒逆转录酶的特性。RNase 对反应有明显的抑制作用, 而 DNase 则无抑制作用。放线菌素 D 对反应也无明显的抑制作用, 表明了反应是由病毒本身具有的逆转录酶所催化, 以病毒 RNA 为模板而合成互补的 DNA。上述结果提示 L6565 和 SRS 瘤株中分离的白血病病毒是属于致癌性 RNA 病毒 (Oncornavirus)。此外, 应用 Poly (I:C)-Sephrose 4 B 柱亲和层析法对 L6565 白血病病毒逆转录酶进行纯化, 并对其性质进行了研究。实验结果显示二氮杂菲 (O-Phanthroline) 对纯化的逆转录酶有抑制作用, 表明该酶为含有 Zn^{++} 的酶; 对氯汞基苯(甲)酸 (P-chloromer benzoate) 对酶的活性也有抑制作用, 表明该酶活性中心具有 -SH 基; 磷酸盐对纯化 L6565 病毒逆转录酶的抑制作用, 表明是哺乳类逆转录酶的特性, 这可用于对禽类病毒逆转录酶的鉴别。应用 Poly G-DEAE 纤维素柱亲和层析法纯化了的小鼠 SRS 腹水瘤病毒的逆转录酶, 用 10% SDS 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定, 用扫描仪扫描, 结果在酶样品的凝胶带上只显示出一条蛋白吸收峰, 并测定出 SRS 病毒逆转录酶的分子量为 70,000。用不同模板引物比较酶的活性, 表明酶对 Poly A-Oligo dt 活性大于 Poly dA-Oligo dt, 进一步确定了该酶为依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶 (RDDP)。

4. 白血病病毒结构蛋白的研究^[13] 用含有 SDS 的不连续系统, 按 Laemmli 报道的方法, 将二次等密度平衡离心纯化的病毒样品, 经消化后与已知分子量的标准蛋白平

行电泳。根据蛋白质的迁移距离与六种标准蛋白进行比较, 实验结果表明, 小鼠 SRS 腹水瘤的白血病病毒的结构蛋白有 7 个分子量不同的组分: 10,000 (p10)、12,000 (p12)、17,000 (p17)、31,000 (p31)、45,000 (p45)、55,000 (p55) 和 71,000 (p71), 其中以 p17、p31 和 p71 的组分含量较高。这与国外报道的小鼠白血病病毒的蛋白质组分相一致的^[17]。

5. 白血病病毒的体外培养^[18] 应用新鲜制备的 SRS 腹水瘤无细胞提取液, 直接感染生长旺盛的 NIH/3T3 细胞后, 再加入 1640 液进行培养, 在不同的时间里取材进行研究, 或者将已感染的 NIH/3T3 细胞连续传代, 扩增细胞后取材进行各项检测。实验结果是: ①被感染的 NIH/3T3 细胞增殖时间加快, 且在 24 小时后逐渐出现数十个到成百个细胞的集呈灶性生长, 并有巨核细胞出现; ②感染的细胞制成的超薄切片, 在电镜下的细胞胞质中扩大的囊泡内观察到散在或成群的池内 A 型病毒颗粒; ③在 SRS 白血病病毒感染后 42、96 小时的细胞和上清液部分, 皆可测得逆转录酶的活性; ④感染细胞制备的无细胞提取液, 注射 SW-1 近交系新生乳鼠可以诱发产生淋巴细胞白血病和胸腺淋巴瘤。

6. 白血病病毒的前病毒研究 DNA^[19] 各种小鼠白血病病毒的基因组顺序中存在着相当的同源关系, 可利用其它已分子克隆化的病毒 DNA 探针来探测肿瘤病毒的前病毒。正常 NIH/3T3 细胞经新鲜制备的 SRS 腹水瘤无细胞提取液感染 18—48 小时后, 抽取染色体外 DNA 组分, 然后应用从 Moloney 小鼠白血病病毒制备的 DNA 探针, 进行 Southern 分子杂交, 结果表明, 新感染病毒的 NIH/3T3 细胞内有未整合的 SRS-RNA 前病毒, 分子量约为 5.9×10^6 道尔顿 (8.8Kb)。另用已感染 SRS 病毒的 NIH/3T3 细胞经 27 次传递后, 仍然可以检测到前病毒 DNA 的存在。

7. X-C 生物检测 (X-C assay) 根据大鼠 X-C 细胞在接触小鼠白血病病毒后会发发生合胞化的特性, 将生长旺盛的 X-C 细胞加入到分瓶培养 48 小时感染了 SRS 病毒的细胞内, 再混合培养 24—48 小时后, 用甲醇固定, 经 Giemsa 染色, 在光镜下可观察到细胞的融合和空斑的形成, 提示 NIH/3T3 感染细胞的 X-C 生物检测阳性。从 SRS 腹水瘤中克隆的 B₂、C₃ 细胞株, 其 X-C 检测也呈阳性反应。

8. 病毒的致白血病作用^[9, 11, 13] 小鼠 L6565 病毒性白血病, 20 年来一直是用其无细胞提取液注射昆明种乳鼠进行传代的, 目前已达 100 余代。这种无细胞提取液注射给 SW-1 近交系乳鼠也能诱发产生淋巴细胞白血病。经分子筛凝胶柱层析分离提纯的 L6565 白血病病毒也具有致白血病活性^[20]。应用 SRS 腹水瘤的无细胞提取液注射昆明种乳鼠共 24 只, 有 16 只发生白血病 (诱发率为 66.6%), 其中 13/16 只为淋巴细胞型 (占 81.2%), 3/16 只为粒细胞型 (18.7%)。应用蔗糖梯度平衡离心纯化的 SRS 病毒, 注射给昆明种乳鼠, 也观察到可诱发两种不同类型的白血病。这种病毒与白血病类型之间的关系需进一步研究。

从小鼠分离提纯的病毒和各方面研究结果表明, L6565 和 SRS 白血病病毒是致病性 RNA 病毒, 为肿瘤的病毒病因研究提供了良好的材料, 可利用这些模型进行白血病病毒基因结构和功能、基因的编码产物和白血病病毒的致癌机制以及病毒免疫性能等方面的分子水平的基础研究, 并可与国外公认的白血病病毒株进行比较, 确定我国分离的白血病病毒的特点, 为我国的白血病分子病毒学的研究开展作出贡献。

参 考 文 献

- [1] Gross L., 1983, *Oncogenic Viruses*, Third Edition, Pergamon Press, Oxford, pp178—239, pp303—556pp663-726, pp980—998.
- [2] Klein G (Ed), 1982, *Viral Oncology*, Raven press, New York, 1982, pp1—399.
- [3] 程立等, 1966, 上海第一医学院学报 4(1): 87.
- [4] 中国医学科学院分院实验白血病小组, 1975, 遗传学报 2(1):37.
- [5] 钱振超等, 1981, 中华血液学杂志 2(1):1.
- [6] 程立, 1979, 输血及血液学 3(4):20.
- [7] 程立等, 1983, 中华血液学杂志 4(1):52.
- [8] 宋玉华等, 1982, 血液学论文集(中国医学科学院血液学研究所)天津, 66页.
- [9] 上海第一医学院病理学教研室等, 1974, 新医学 5(3):103.
- [10] 季文琴等, 1979, 淋巴瘤学刊 (3):133.
- [11] 程立等, 1980, 肿瘤1(1):4.
- [12] 郑葆芬等, 1981, 上海第一医学院学报 8(1):1.
- [13] 曹式芳等, 1982, 肿瘤 2(3):7.
- [14] 郑葆芬等, 1981, 上海第一医学院学报 8(1):6.
- [15] 周金涛等, 1983, 上海第一医学院学报 10(5):345.
- [16] 周金涛等, 1984, 上海第一医学院学报 11(5):374.
- [17] Jancz E et al (Eds), 1982, *Oncogenic Viruses*, In "Reviews of Medical Microbiology" 15th Edition, Lange Medical publication, Los Altos, 1982, pp467-496.
- [18] 程立等, 未发表资料。
- [19] 李其翔等, 1985, 待发表资料。
- [20] 程立等, 1981, 上海第一医学院学报 8(1):11.