

柯萨奇病毒 B3 基因组及其变异与心肌损伤的关系*

李相军¹, 任立群^{1**}, 李广生¹, 万敏²

(1. 吉林大学白求恩医学部生物工程研究所, 吉林长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院分子生物学教研室, 吉林长春 130021)

The Relationship Between the Geonome and Its Variation of
Coxsackievirus B3 and Myocardium InjuryLI Xiang-jun¹, REN Li-qun^{1**}, LI Guang-sheng¹, WAN Min²

(1. Institute of Biological Engineering, Norman Bethune department of Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Biomolecular Laboratory, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

关键词: 柯萨奇病毒 B3; 基因组; 心肌损伤

中图分类号: R373.2 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)03-0286-03

肠道病毒感染是人类急性和慢性心肌炎的常见病因之一,而且也与人类扩张型心肌病(DCM)的发生发展有密切关系^[1]。病毒分离,血清学研究,免疫组化技术、原位核酸杂交技术以及聚合酶链反应技术(PCR)均提示肠道病毒与心肌炎关系密切。最近,LI 等^[2]用肠道病毒特异性单克隆抗体,采用改良的免疫组化技术对心肌炎或 DCM 病人心肌切片中肠道病毒抗原进行检测,此法直接证明了心肌炎或 DCM 病人体内确实有子代病毒产生。但是,肠道病毒究竟通过怎样的机制引起心肌损伤还未阐明,推测可能有多种机制参与。本文仅就肠道病毒(柯萨奇病毒 B3, CVB3)基因组结构及其基因变异与心肌损伤的关系方面加以综述。

1 CVB3 的结构

CVB3(Coxsackievirus B3)属小 RNA 病毒科,肠道病毒属,柯萨奇 B 组病毒中的一个血清型,其病毒颗粒的结构已经阐明^[3]。CVB3 的基因组属正链 RNA,含有 7400 个碱基,3' 及 5' 均为非翻译区(NTR),其中 3' 末端是一个多聚腺苷酸尾部,5' 末端的非翻译区(5' NTR)由 742 个核苷酸组成,是肠道病毒的相对保守序列。整个病毒基因组只含一个开放阅读框架(ORF),编码 2185 个氨基酸,可分为 P₁、P₂、P₃ 三个区,其中 P₁ 区编码病毒衣壳蛋白 VP₁₋₄。这里 VP₁ 由 281 个氨基酸构成,VP₂ 由 263

个氨基酸构成,VP₃ 由 238 个氨基酸构成,而 VP₄ 仅由 69 个氨基酸构成。P₂、P₃ 编码非结构蛋白如 RNA 酶、蛋白酶等,非结构蛋白对病毒多聚蛋白质的形成以及复制和翻译起重要作用。

Klump 等^[4]将 CVB3 的基因组与 CVB 其他血清型(CVB1、CVB4)的基因组做比较,发现他们的核苷酸序列和氨基酸组成上均有高度保守性,核苷酸序列有 80% 的同源性,而多聚蛋白的氨基酸序列有 90% 的同源性,而且同源性序列主要集中在基因组 5' 和 3' 末端,非结构蛋白编码区及 VP₄ 区,而结构蛋白 VP₁₋₃ 编码区的同源序列被一些长短不一、序列不同的核苷酸分开。这些序列保守区对维系病毒颗粒的桶状核心结构起重要作用。不同源的序列可能参与抗原决定簇的形成,从而显示出不同的特异的血清型抗原性质。

2 CVB3 的基因组改变与心肌毒性的关系

Chapman 等^[5]在对一种无心肌毒性的病毒株 CVB3/0 的 cDNA 拷贝进行序列分析时,将其序列与已知的有心肌毒性的病毒株的核苷酸序列做比较,发现共有 10 个核苷酸位点不同,其中两个位于非翻译区,8 个位于病毒蛋白质编码区。Beck 等^[6]在研究缺硒在 CVB3 感染小鼠体内的作用时,发现硒缺乏不仅使原来有心肌毒性作用的毒株 CVB3/

收稿日期:2001-11-29,修回日期:2002-01-21

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870668)

作者简介:李相军(1974-),男,吉林省吉林市籍,硕士研究生,病理学专业。

** 通讯作者。Correspondence author. Tel:0431-5645911-6287

20 的心肌毒性加重,而且可使本来无心肌毒性作用的毒株 CVB3/0 获得心肌毒性,把从缺硒小鼠心脏中分离到的 CVB3/0 接种至足硒小鼠,也能引起明显心肌损伤。随后,他们对从缺硒小鼠体内分离到的突变后的 CVB3/0 进行核苷酸序列测定,并与原来的 CVB3/0 做比较,发现共有 6 个核苷酸位点发生了改变,即发生了点突变。这些核苷酸的碱基改变,与已知柯萨奇病毒有心肌毒性毒株和无心肌毒性的毒株之间的碱基组成的 7 处差别中有 6 处相符,即 CVB3/0 的基因组在缺硒小鼠体内复制过程中发生的点突变除一处外均变得与已知毒株 CVB3/20、CVB3/M1 的核苷酸序列一致。这些研究说明 CVB3 基因组中个别核苷酸的改变可改变 CVB3 的心肌毒性表现。

到目前为止,文献报道过的 CVB3 毒株主要有 CVB3/0^[5]、CVB3/C0^[7]、CVB3/20^[8]、CVB3/Nancy^[4]、CVB3/H3^[9]、CVB3/M^[10]、CVB3/AS^[11]等,这些毒株均可在感染小鼠体内复制,但却不一定能引起心肌损伤。如 CVB3/0、CVB3/C0 两个毒株对心肌无毒性作用,尽管他们可以在感染小鼠体内复制却不引起明显心肌损伤,并且在感染 7—10d 后不能再检出病毒 RNA。但上述其他毒株却有明显心肌毒性,可引起感染小鼠明显心肌损伤,引起心肌类似炎症性改变,并且感染 7—10d 后仍能检出病毒 RNA,有的毒株甚至在感染两周后仍有检出^[8,18,19]。这些 CVB3 毒株结构及基因组的确定,为研究 CVB3 与心肌疾病的关系提供了方便。

2.1 CVB3 的 5'NRT 与心肌毒性的关系

5'NRT 这段肠道病毒属的相对保守序列对 CVB3 的心肌毒性表型起重要作用。Dunn 等^[12]将对心肌无毒性作用的 CVB3/0 毒株的 5'NRT 代替有心肌毒性的表现的 CVB3/20 的相应部位,并用新得到的重组病毒感染 C3H/HeJ 雄性小鼠,结果未发现小鼠心肌有损伤性改变,与原来 CVB3/0 个一样,在感染 7—10d 未能从感染小鼠心肌中检测到 CVB3。Tu 等^[13]将 CVB3/0 的不同部分代替 CVB3/20 的相应部位,通过一系列的在体和离体实验证明 5'NRT 在重组病毒体的心肌毒性表型上起主要作用,同时,他们还 对 5'NRT 作了核苷酸序列分析,结果发现在 5'NRT 序列中,重组毒株与原来的 CVB3/0 相比,只有第 234 位点不同。当 234 位点上的核苷酸碱基为 C 时,对心肌无毒性,但当该处核苷酸碱基为 U 时,有心肌毒性。这与 Beck

等^[6]发现的突变株发生突变的 7 个位点中的第一个位点相同,提示在第 234 位点在决定 CVB3 的致心肌毒性方面有起作用。Zhang 等^[14]也进行类似的研究以了解 5'NTR 的作用。他们用有心肌毒性的病毒 CVB3/Nancy 的多个片段从人的表皮成纤维细胞中分离到一个 CVB3 的减毒株(p14v1),该减毒株的 5'NTR 与 CVB3/Nancy 为 A,即第 690 位有 A→U 的改变,但此改变在决定病毒心肌毒力方面并不起主要作用,而可能是由其他原因如衣壳蛋白质质的改变决定的。综上所述,CVB3 对心肌的毒性表现与 5'NTR 有关,甚至 5'NTR 起主要作用,但这种作用看来不是由 5'NTR 上的某一个核苷酸位点发生突变就能决定的,而可能是一个复合因素在起作用。

2.2 CVB3 结构蛋白与心肌毒力的关系

Dunn 等^[12]的研究表明病毒蛋白编码区的改变与病毒心肌毒性表型无关(数据未显示),但从重组病毒对小鼠心肌损伤的评分及心肌中病毒滴度的数据看来,病毒衣壳蛋白对病毒的心肌毒性表型似乎有增强或减弱的作用。Kowlton 等^[9]用从有心肌毒力的 CVB3/H3 病毒株衍生来的病毒抗体脱逸突变来检测心肌毒力的决定因素,与已知病毒株相比,该减毒株衣壳蛋白 VP₂ 区第 165 个氨基酸残基是由天冬酰胺(Asn)变成了天冬氨酸(Asp),反之,当该位置的氨基酸残基由 Asp 变成 Asn 时,则病毒株心肌毒性得到恢复。因此,VP₂ 区的第 165 位氨基酸的改变与病毒心肌毒性表现有关。Zhang 等^[14]研究提示转化后的减毒株 p14V1 的心肌毒性减弱是由于 VP₁ 上的第 155 个氨基酸的改变起了重要作用。总之,CVB3 的衣壳蛋白含有与其毒性表型相关的决定子。而且,该决定子也不一定局限于单一的衣壳蛋白区域甚至单一的衣壳蛋白内。这种决定子在 4 种衣壳蛋白内均可找到,而且他们也不一定是位于病毒颗粒表面的暴露的残基上。

3 CVB3 编码的非结构蛋白质与心肌损伤的关系

柯萨奇病毒编码的非结构蛋白质中有 2 种蛋白酶,即蛋白酶 2A 和 3C,这两种蛋白酶均系病毒生命周期所必须的酶。最近,Badorff 等^[16]发现了蛋白酶的 2A 的一个新的底物——肌动蛋白收缩素(dystrophin)。肌动蛋白收缩素是一个大分子的细胞骨架蛋白,连接以细胞骨架为基础 F-actin 和结合于

dystroglycan 上的胞浆膜形成肌动蛋白收缩素—糖蛋白复合物。研究表明,肌动蛋白收缩素缺乏人群中 DCM 的发病率高^[20,21],动物实验也表明肌动蛋白收缩素的缺乏可引起严重的心肌病^[22],Badorff 通过一系列严格的实验表明肌动蛋白收缩素如果被蛋白酶 2A 分解,则其功能受损,并且在体外培养的心肌细胞和 CVB3 感染的小鼠心肌中均能看到心肌细胞的正常形态被破坏。进一步研究发现,柯萨奇病毒编码的这种蛋白酶 2A 对肌动蛋白收缩素的裂解作用是通过作用于肌动蛋白收缩素的铰链 3 区,此处无论在体内还是体外均可被蛋白酶 2A 切开^[15]。Badorff 的研究不仅对研究 DCM 的发病机制提供了新的思路,也对 DCM 的治疗提供了新思路。

结语 关于肠道病毒引起人类心肌疾病的机制,许多学者已从不同角度进行了大量的研究。随着分子生物学技术的产生和飞速发展,关于肠道病毒引起人类心肌疾病的分子机制日益受到重视。目前,关于病毒基因组及其基因变异与心肌疾病的关系的研究越来越多。许多学者认为病毒基因组中某个核苷酸或某些核苷酸的改变可引起及其所决定的结构蛋白及非结构蛋白(某些酶类)的改变,并可改变 CVB3 对心肌的毒性,从而改变病毒对心肌损伤的程度。但是,关于 CVB3 基因组结构与心肌损伤的关系还有待于进一步深入。

参考文献

- [1] Why H J F, Meany B T, Richardson P J, *et al.* Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 1994, 89:2582 - 2589.
- [2] Li Y W, Bourlet T, Andreoletti L, *et al.* Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissue from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2000, 101: 231 - 234.
- [3] Muckelbauer J K, Kremer M, Minor I, *et al.* The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution [J]. *Structure*, 1995, 3: 653 - 667.
- [4] Klumpp U M, Bergmann I, Muller B E, *et al.* Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B3 cDNA: Two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis [J]. *J virol*, 1990, 64:1573 - 1583.
- [5] Chapman N M, Tu I, Tracy S, *et al.* An infectious cDNA copy of the genome of a non-cardiovirulent coxsackievirus B3 strain: Virulent coxsackievirus [J]. *Arch Virol*, 1994, 135:115 - 130.
- [6] Back M A, Shi Q, Morris V C, *et al.* Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates [J]. *Nature Medicine*, 1995, 1:433 - 436.
- [7] Gaunff C L, Pallansch M A. Coxsackievirus B3 clinical isolates and murine myocarditis [J]. *Virus Res*, 1996, 41:89 - 99.
- [8] Tracy S, Chapman N M, Tu Z. Coxsackievirus B3 from an infectious cDNA is cardiovirulent in mice [J]. *Arch Virol*, 1992, 122: 398 - 409.
- [9] Knowlton K U, Jeon E, Berkley N, *et al.* A mutation in the region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of Coxsackievirus B3 [J]. *J Virol*, 1996, 70:7811 - 7818.
- [10] Lee C, Mull E, Chapman N M, *et al.* Generation of an infectious cDNA of a highly cardiovirulent Coxsackievirus B3 (CVB3m) and comparison to other infectious (CVB3 cDNAs) [J]. *Virus Res*, 1997, 50:225 - 235.
- [11] Chapman N M, Remero J R, Pallansch M A, *et al.* Sites other than nucleotide 235 determine cardiovirulence in natural isolates of Coxsackievirus B [J]. *J Med Virol*, 1997, 52:258 - 261.
- [12] Dunn J J, Chapman N M, Tracy S, *et al.* Genomic determinants of cardiovirulence in Coxsackievirus B3 clinical isolates: location to the 5' non-translated region [J]. *J Virol*, 2000, 74:4787 - 4794.
- [13] Tu Z, Chapman N M, Hufnagel G, *et al.* The cardiovirulent phenotype of Coxsackievirus B3 is determined at a single site in the 5' non-translated region [J]. *J Virol*, 1995, 69:4607 - 4618.
- [14] Zhang H Y, Yousef G E, Cunningham L, *et al.* Attenuation of a reactivated cardiovirulent Coxsackievirus B: The 5' non-translated region does not contain major attenuation determinants [J]. *J Med Virol*, 1993, 41:129 - 137.
- [15] Badorff C, Berkely N, Mehrotra S, *et al.* Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue [J]. *J Bio Chem*, 2000, 275:11191 - 11197.
- [16] Badorff C, Lee G H, Lamphear B J, *et al.* Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy [J]. *Nat Med*, 1999, 5:320 - 326.
- [17] Lee C, Maull E, Chapman N M, *et al.* Genomic regions of coxsackievirus B3 associated with cardiovirulence [J]. *J Med Virol*, 1997, 52:341 - 347.
- [18] Klingel K, Hohenadl C, Cauu A, *et al.* Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage and inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1992, 89: 314 - 318.
- [19] Lodge P A, Herzum M, Olszewski J, *et al.* Coxsackievirus B3 Myocarditis: acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms [J]. *Am J Pathol*, 1987, 128:455 - 463.
- [20] Beggs A H. Dystrophinopathy, the expanding phenotype. Dystrophin abnormalities in X-linked dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 1997, 95:2344 - 2347.
- [21] Melachini P, Fanin, Danieli G A, *et al.* Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy [J]. *Circulation*, 1996, 94:3168 - 3175.
- [22] Grady R M, Teng H, Nichol M C, *et al.* Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy [J]. *Cell*, 1997, 90:729 - 738.