

文章编号:1004-0374(2005)01-0055-05

HCMV 增殖机制研究进展

谭泽明, 李 艺, 罗敏华*

(中南大学湘雅医学院, 长沙, 410078)

摘要: 人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染在人群中广泛存在, 病毒在感染细胞内增殖会对宿主细胞进行多水平调节和干扰, 从而导致各种宏观疾病。本文对HCMV复制周期的基因表达时序、HCMV-DNA复制相关蛋白质及其编码基因、HCMV-DNA复制特点和HCMV必需基因、非必需基因及抑制基因等进行综述。

关键词: HCMV; 复制; 必需基因; 非必需基因

中图分类号: R373 **文献标识码:** A

The mechanism of HCMV replication

TAN Ze-Ming, LI Yi, LUO Min-Hua*

(Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Human Cytomegalovirus infection is ubiquitous. HCMV affects its host cell multilevelly while propagates in the infected cell, so that diseases can be developed macroscopically. This article elaborates the temporal sequence of viral gene expression in HCMV replication cycle HCMV-DNA replication related proteins and their genes together with their replicative features, the necessary genes, as well as the unnecessary genes and suppressive genes for the HCMV growth.

Key words: HCMV; replication; necessary genes; unnecessary genes

HCMV感染细胞后, HCMV增殖便在周期性基因表达、动态变化的细胞内外分子环境中进行。病毒和细胞的分子环境都处于相互作用的动态变化中, HCMV在某些情况下, 向病毒有利的方向发展; 在另一些情况下, 则向细胞有利的方向发展(潜伏感染或转化性感染)。自1990年起, 病毒学家便对这两种状态中, HCMV的增殖与细胞生化和生理变化之间的关系, 从基因水平以及HCMV与宿主细胞相互作用的分子水平进行研究^[1]。

1 HCMV复制周期的基因表达时序

HCMV基因转录需宿主细胞的RNA聚合酶参与, 该过程受由病毒激活的宿主细胞编码的转录因子调控。HCMV基因表达时序分为: 立即早期(IE或 α)、早期(E或 β)和晚期(L或 γ)三个阶段。

Chambers等^[2]已初步确定IE、E和L基因在HCMV基因组中的定位。

1.1 立即早期基因及其功能 IE基因是HCMV感染时最早被活化的基因和HCMV基因组复制的最重要启动子, 其编码产物可与细胞DNA结合或与细胞调控因子作用调节宿主细胞基因表达和增生^[3]。HCMV感染1h后, IE基因开始表达, HCMV的其他基因表达在IE蛋白的作用下启动。IE基因包括主要IE(Major IE, MIE)基因和辅助基因。MIE蛋白由ie1/ie2基因(UL122/123基因)编码, 其表达受一特异性的增强子-调节元件复合物(complex enhancer-modulator element)调控^[4]。该元件与宿主转录因子作用, 表现出MIE强大的转录活性。在ie1/ie2基因的TATA盒上游, 有-约500

收稿日期: 2004-05-10; 修回日期: 2004-08-16

基金项目: 国家自然科学基金(39700006, 30340002)和教育部回国人员启动基金资助

作者简介: 谭泽明(1982—), 男, 本硕连读学生; 李 艺(1982—), 女, 本硕连读学生; 罗敏华(1966—), 女, 副教授, 博士后, * 通讯作者。

bp的DNA片段,所含的重复元件能与NF- κ B、AP-1、Sp1和CREB/ATF等结合。HCMV感染可以迅速激活这些细胞因子与同源DNA的结合活性,所以,认为MIE增强子通过与相应细胞因子结合而发挥作用。IE基因中辅助基因包括:IRS1/TRS1和US3、UL36~UL38、UL115~UL119。研究表明辅助基因的功能为:TRS1和IRS1与IE1-72和IE2-86协同作用,反式激活(transactivation)HCMV早期基因启动子。US3基因编码的糖蛋白具有内质网定位作用,通过阻止MHC-I分子从内质网向高尔基体转运,下调MHC-I分子表达,使受感染细胞产生免疫逃避^[5]。UL36~38区域编码的蛋白质,如UL36和UL37作用于caspase级联反应,起抗细胞凋亡作用,有利于病毒增殖^[6]。

1.2 早期基因及其功能 E基因散在分布于HCMV的整个基因组中,其表达依赖于IE蛋白,不受病毒DNA复制抑制因子的影响^[2]。E基因转录由IE2-86单独或与IE1-72协同激活,首先IE2-86和IE1-72反式激活TATA盒依赖的启动子,再与宿主转录启动复合物和序列特异性转录因子(CREB/ATF和Sp1)协同作用,完成E基因激活^[3]。根据表达时序E基因分为 β_1 和 β_2 基因, β_1 于感染后4~8h内转录, β_2 于感染后8~24h内转录。E基因编码HCMV的大部分非结构蛋白,包括病毒DNA复制因子、修正酶和免疫逃避相关蛋白等^[7]。其中,UL112/113编码DNA结合蛋白在HCMV感染的细胞核中参与组建HCMV DNA复制中心,该中心包含UL54编码的病毒DNA聚合酶和UL44基因编码的病毒DNA聚合酶辅助因子等^[7]。US2与US11编码的蛋白与HCMV免疫逃避有关^[8];UL4编码非衣壳类早期结构蛋白^[9]。

1.3 晚期基因及其功能 晚期(L或 γ)基因表达始于感染24h后,并以病毒DNA转录为前提^[3]。L基因按表达时序和对病毒DNA复制抑制子的敏感性分为两个亚类,即 γ_1 和 γ_2 。 γ_1 转录发生在感染后24~36h,并由DNA复制抑制子诱导; γ_2 转录发生在感染后24~48h,并严格依赖于病毒DNA的复制。L蛋白是HCMV的主要结构蛋白,在病毒的装配和成熟中起主要作用^[7]。大部分HCMV基因都属于L基因^[2]。调节L基因转录和表达的病毒和/或细胞因素尚有待进一步研究。

2 与HCMV-DNA复制相关的蛋白质及其编码基因
HCMV通过包膜糖蛋白gB与宿主细胞内皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor EGFR)

结合进入细胞^[10],启动丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)^[11]、磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3kinase, PI-3K)^[10]、干扰素和G蛋白介导的宿主细胞内信息传导通路。我室近期研究表明HCMV感染影响宿主细胞的HOX基因表达^[12-14],改变细胞的生化和生理状态,有利于病毒的增殖。HCMV基因组的复制、裂解、倒置和装配发生在感染细胞核内。HCMV-DNA的合成始于感染16h以后,需要一些必需的病毒编码蛋白和一些由宿主细胞提供的蛋白共同作用完成^[7]。

基因组序列分析发现CMV不同于其他疱疹病毒,不编码脱氧核苷酸合成酶,如胸苷激酶、二氢叶酸还原酶和核苷酸还原酶,所以,CMV必需依赖宿主细胞代谢提供足够的dNTPs,以保证其DNA复制的进行^[15]。CMV有一套独特的宿主细胞dNTPs生物合成的调节机制^[16]。通过特定方式刺激细胞中相关酶的表达,使细胞滞留于G₁期,抵抗宿主细胞凋亡,促进病毒复制^[17]。HCMV感染一方面影响细胞周期相关基因,如Cdk2核易位,cyclin E、B的诱导表达,pRb过磷酸化,E2F依赖性转录的活化c-myc, c-jun,和c-fos原癌基因活化^[18]HOX基因表达异常等^[12-14];另一方面调节细胞中核苷酸代谢酶,如胸苷激酶、鸟氨酸脱羧酶和拓补异构酶^[19]、二氢叶酸还原酶^[20]、胸苷酸合成酶^[21]、脱氧腺苷脱氨酶和核苷酸还原酶^[22]等表达增加。由于HCMV增殖的需要,它与宿主细胞争夺dNTPs,导致细胞DNA合成受阻,不能进行正常的复制和分裂,使细胞滞留于G₁期。HCMV在静止期或非分裂的分化细胞中进行增殖,诱导宿主细胞dNTPs合成酶表达就更为重要^[23]。

HCMV基因组DNA复制所需的核心蛋白由6个ORFs编码,分别为:UL44、UL57、UL84、UL112/113和UL114,是疱疹病毒高度保守序列。UL57编码单链DNA结合蛋白ppUL57,它由UL70、UL102和UL105三个亚基组成。ppUL57在螺旋酶-引物酶复合物(helicase-primase complex)的解螺旋的过程中,阻止DNA链再退火(reannealing)。UL44编码DNA聚合酶辅助因子,防止UL54编码的病毒DNA聚合酶从模板上脱离^[7]。UL84编码一个75kD的磷蛋白,它与IE2-86结合形成Origin特异性启动因子,启动病毒起始点(Origin)依赖性DNA合成^[24]。UL112/113编码的磷蛋白参与构建HCMV DNA复制中心,是复制中心的前体,聚集

DNA 复制必需的蛋白和酶^[25]。HCMV-UL114 缺陷株未能在分裂后细胞中出现高水平 HCMV DNA 复制相,证明 UL114 编码产物对分裂后细胞中 HCMV-DNA 的复制是必需的^[26]。IE 蛋白,如 ie1/ie2 编码的反式激活蛋白、TRS1/IRS1 和 UL36~38 基因表达产物,是裂解性启动点(oriLyt)依赖的 DNA 合成所需要的阶段性互补物。

3 HCMV-DNA 复制特点

HCMV 的线性基因组在感染后 4 h 内环化,随后,在相应立即早期和早期基因产物与宿主细胞因子作用下,从裂解性启动点(oriLyt)以双向滚环方式进行 DNA 复制^[7]。在感染的后期,病毒 DNA 以双向滚环方式产生首-尾相连的大型串连复制体。这些串连体最后被裂解为可以装配的 HCMV-DNA。HCMV 的 oriLyt 在基因图谱上接近 UL57 区,大小约 2 000 bp,包含重复序列、转录因子结合位点及编码多种短转录产物(short transcripts)的区域^[27]。oriLyt 的重复序列的缺失导致 HCMV-DNA 合成明显受抑制,认为 oriLyt 的完整性影响复制的效率^[7]。

在 HCMV-DNA 复制晚期,新合成的基因组通过裂解成有游离末端的线性形式后,装配入衣壳,在衣壳内 HCMV-DNA 发生倒置^[28]。UL 和 US 倒置发生在基因组末端的直接重复序列和位于 UL-US 连接处的反向重复序列之间。这些重复序列包含了 DNA 裂解所必需的顺式作用元件 pac(packaging),位于 S 片断内,近重复序列端,约 220bp,包括 pac1 和 pac2,是疱疹病毒基因组中的高度保守序列,促进基因组倒置而产生异构化^[7]。L 和 / 或 S

倒置导致 HCMV 子代基因组形成四种异构体(isoform)。倒置可能是由基因组的末端和 UL/US 接合处需要某一基因序列的重复而引发。基因组在裂解/包装信号分子 pac1 和 pac2 作用下裂解,然后,装入预先合成的衣壳。

4 HCMV 生长必需基因、非必需基因及生长抑制基因

HCMV 的基因根据在 HCMV 增殖中的作用分为生长必需基因和非必需基因。生长必需基因指 HCMV 增殖中必不可少的一类基因,该类基因缺失 HCMV 就不能增殖;而非必需基因指仅影响 HCMV 增殖效率,即使缺失也不造成 HCMV 增殖缺陷的一类基因。非必需基因缺失可以重度、轻度影响 HCMV 增殖效率,也可以不影响,甚至促进 HCMV 增殖。HCMV 基因组中因缺失而促进 HCMV 增殖的基因称生长抑制基因。

通过对 HCMV Towne 株的 162 个 ORFs 研究,发现 45 个 ORFs(表 1)是 HCMV 在人包皮成纤维母细胞(human primary foreskin fibroblasts HFF)中生长所必需的,但其中 14 个 ORFs 的功能尚不明确。这 45 个 ORFs 中 78% 是所有疱疹病毒共有的高度保守 ORFs,推测它们可能是所有疱疹病毒的最原始核心基因组。此外,还发现 117 个 ORFs 是非必需的(表 2),其中 70 个 ORFs 的功能尚未明确^[29]。HCMV 的必需基因和非必需基因具有相对性,在不同的细胞系中基因的地位会改变。HCMV 在 HFF 的某些非必需 ORFs 在其他自然宿主细胞,如人微血管内皮细胞 human microvascular endothelial cells,

表1 HCMV Towne 株在HFF中增殖必需基因(45个ORFs)

功能	ORFs
碱性核酸酶	UL98
抗凋亡	UL37.1
衣壳	UL46, UL85, UL86
衣壳组装	UL80
衣壳蛋白	UL48.5
DNA 包装剪切	UL51, UL52, UL56, UL77, UL89.1, UL104
DNA 聚合酶	UL54
DNA 复制	UL44, UL84
出口	UL50, UL53
糖蛋白	UL55(B), UL75(H), UL115(L), UL100(M), UL73(N)
螺旋酶/引物酶	UL70, UL102, UL105
IE2 转录	UL122
SSDNA 结合蛋白	UL57
外被	UL32, UL48, UL99
未知	UL49, UL71, UL76, UL79, UL87, UL90, UL91, UL92, UL93, UL95, UL96, UL60, L94, UL34

表2 ORFs 缺失的HCMV 在 HFF 中的生长特性

生长情况	ORFs 缺失变
重度生长缺陷(12个突变株)	UL21, UL26, UL28, UL30, UL69, UL82, UL112, UL113, UL117, UL123, UL124, US26
中度生长缺陷(23个突变体)	UL2, UL11, UL12, UL14, UL20, UL29, UL31, UL35, UL38, UL47, UL65, UL72, UL74, UL88, UL97, UL103, UL108, UL114, UL129, UL132, US13, US23, TRS1
生长与野生型相似 (68个突变株, 78个ORFs)	UL3, UL4, UL5, UL6, UL7, UL8, UL10, UL13, UL15, UL16, UL17, UL18, UL19, UL24, UL25, UL27, UL33, UL36, UL37, UL39, UL42, UL43, UL45, UL59, UL62, UL64, UL67, UL78, UL83, UL89.2, UL109, UL110, UL111a, UL116, UL119, UL121, UL127, UL130, UL146, UL147, IRS, (US1), (US2), (US3), (US6), (US7), (US8), (US9), (US10), (US11), (US12), US14, US15, US16, US17, US18, US19, US20, US21, US22, US24, US25, US27, US28, US29, US31, US32, US33, US34, RL1, RL2, RL4, RL6, RL9, RL10, RL11, RL12, RL13
加速生长(4个突变体)	UL9, UL20a, UL23, US30

HMVEC) 和视网膜色素上皮细胞 (human retinal pigment epithelial cells RPE) 中是生长所必需的, 推测这些 ORFs 的编码产物与 HCMV 的组织嗜性 (tropism) 相关。与单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 的研究结果相似, Dunn 首次发现由病毒编码的抑制病毒自身增殖的 ORFs: UL9、UL20a、UL23 和 US30^[29]。这些增殖抑制因子可能与 HCMV 潜伏、HCMV 选择最适宜宿主细胞, 以及自我调节在宿主细胞中增殖速度、毒力和长期潜伏机制相关。

5 结语

HCMV 感染, 以 EGFR 为受体, EGFR 广泛分布于上皮组织、神经组织、血管组织, 甚至睾丸和卵巢组织, 调节组织细胞的增殖、分化、凋亡等。HCMV 的包膜糖蛋白 gB 与 EGFR 结合, 介导 HCMV 进入细胞, 病毒基因按时序表达, 病毒复制。HCMV 的包膜糖蛋白 gB 与 EGFR 结合, 同时启动 PI-3K 和 PLC- γ (phospholipase C- γ) 两条信号传导途径^[10], 激活 G 蛋白介导的信号传导通路和 MAPKs^[11], 还调节宿主细胞的 HOX 基因表达^[12-14]。通过这些机制改变细胞的生化和生理状态, 一方面促进病毒的增殖和病毒性疾病的发生和发展; 另一方面影响细胞命运, 除与病毒性疾病相关外, 还与畸形和肿瘤发生密切相关, 而相关机制尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Albrecht T, Boldogh I, Fons M, et al. Cell activation signals and the pathogenesis of human cytomegalovirus. *Intervirology*, 1990, 31: 68-75
- [2] Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, et al. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol*, 1999, 73: 5757-5766
- [3] Fortunato E A, Spector D H. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res*, 1999, 54: 61-128
- [4] Meier J L, Stinski M F. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology*, 1996, 39: 331-342
- [5] Jones T R, Wiertz E J H, Sun L, et al. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11327-11333
- [6] Skaletskaya A, Bartle L M, Chittenden T, et al. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 7829-7834
- [7] Mocarski E S, Courcelle C T. Cytomegalovirus and their replication [A]. *Fields virology*, Lippincott [C], Philadelphia: Williams and Wilkins, 2001, 2629-2673
- [8] Shamu C E, Story C M, Rapoport T A, et al. The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate. *J Cell Biol*, 1999, 147: 45-58
- [9] Hobom U, Brune W, Messerle M, et al. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoproteins genes. *J Virol*, 2000, 74: 7720-7729
- [10] Wang X, Huang S M, Chiu M L, et al. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*, 2003, 424 (6947): 456-461
- [11] Johnson R A, Huang S M, Huang E S. Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol*, 2000, 74: 1158-1167
- [12] 邬国军, 陈利玉, 戴 橄, 等. 人类巨细胞病毒感染对神经胶质瘤细胞 HOXB5, HOXB6, HOXB7 及 HOXB8 基因表达的影响. *湖南医科大学学报*, 2001, 26 (5): 409-411
- [13] 陈利玉, 邬国军, 戴 橄, 等. 人类巨细胞病毒对人胚肺细胞 HOX 基因表达的影响. *湖南医科大学学报*, 2000, 25 (5): 440-442
- [14] 谢 妮, 陈利玉, 戴 橄, 等. 人巨细胞病毒 AD₁₆₉ 株引起小鼠脑部畸形的初步探讨. *湖南医科大学学报*, 2003,

- 28 (3):243-246
- [15] Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol*, 1996; 70: 8833-8849
- [16] Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez V, et al. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol*, 2000, 8: 111-119
- [17] Dittmer D, Mocarski ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G₁/S transition. *J Virol*, 1997, 71: 1629-1634
- [18] Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol*, 1998, 72: 3729-3741
- [19] Benson JD, Huang ES. Human cytomegalovirus induces expression of cellular topoisomerase II. *J Virol*, 1990, 64: 9-15
- [20] Song YJ, Stinski MF. Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: a DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 2836-2841
- [21] Gribaudo G, Riera L, Rudge TL, et al. Human cytomegalovirus infection induces cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent fibroblasts. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2983-2993
- [22] Lembo D, Gribaudo G, Hofer A, et al. Expression of an altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of murine cytomegalovirus in quiescent fibroblasts. *J Virol*, 2000, 74: 11557-11565
- [23] Kalejta RF, Shenk T. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci*, 2002, 7: 295-306
- [24] Sarisky RT, Hayward GS. Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol*, 1996, 70: 7398-7413
- [25] Ahn JH, Jang WJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol*, 1999, 73: 10458-10471
- [26] Courcelle CT, Courcelle J, Prichard MN, et al. Requirement for uracil-DNA glycosylase during the transition to late-phase cytomegalovirus DNA replication. *J Virol*, 2001, 75: 7592-7601
- [27] Masse MJ, Karlin S, Schachtel GA, et al. Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5246-5250
- [28] McVoy MA, Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within concatemer. *J Virol*, 1994, 68: 1040-1051
- [29] Dunn W, Chou C, Li H, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100 (24): 14223-14228

· 书讯 ·

《基因芯片与功能基因组》

作为一门充满期待的新技术,基因芯片得到越来越多的关注,应用面也日益广泛。本书的编者都是在基因芯片技术第一线的科研工作者,结合作者实际工作经验,着重介绍基因芯片的几个主要方面:基因芯片及功能基因组相关的基本知识,基因芯片的制备和检测技术,基因芯片的检测原理和应用范围,基因芯片相关的生物信息学,其中有关应用方面重点介绍了在肿瘤基因组学、药物基因组学及临床医学方面的内容。考虑不同读者知识点的差异,本书尽可能地阐明基本概念、原理及如何应用于功能基因组研究中去,力求引用最新的文献和网络资料,反应当前的新进展,并结合作者们的工作体会,从实用的角度出发讨论问题。

本书适合作为基因芯片学习研究的入门教材和科研参考书,帮助读者深入了解基因芯片技术及应用。

2004年9月出版 ISBN 7-5025-5882-9/Q.108

定价:50.00元 作者:李瑶

