文章编号:1000-5404(2010)06-0533-04

论著

博尔纳病毒P24转染后不同时期核酸和蛋白的表达及细胞定位

徐鸣明[1],张英英[1],展群岭[1],何 丰[1],张 亮[1],金 戈[1],宋 哲[1],李亚军[3],李雷雷[2],谢 鹏[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经内科[1],神经科学中心[2];710077 西安,西安医学院附属医院神经内科[3])

[摘要] **目的** 通过观察博尔纳病毒(borna disease virus,BDV)磷蛋白(P24)及其编码核酸不同时期的表达和细胞定位,探索BDV潜伏感染的机制。**方法** 构建包含BDV GFP-P24质粒的OL细胞模型,检测并比较不同时期P24核酸和蛋白的表达;对构建的OL细胞模型和各种阴性对照进行逆转录原位PCR的检测,观察P24蛋白编码核酸的细胞定位;使用倒置荧光显微镜观察OL细胞中P24蛋白的细胞定位。**结果** 成功构建了含BDV GFP-P24质粒的OL细胞,发现转染后20代以内细胞P24核酸和蛋白的表达差异不显著($P>0.05$);BDV的P24重组蛋白基因始终定位于细胞核,其蛋白早期在细胞核出现,反复传代约15次后可同时在细胞核和细胞质内出现。**结论** BDV的重组蛋白P24在病毒感染过程中起关键作用,其编码基因始终存在于宿主细胞核内,但表达的蛋白可以在一定时期通过核膜进入细胞质。

[关键词] 博尔纳病;逆转录原位PCR;磷蛋白;感染
[中图法分类号] R373.9;R394-33;R394.2 **[文献标志码]** A

Expression and cellular localization of Borna disease virus P24 in different periods after transfection

Xu Mingming[1], Zhang Yingying[1], Zhan Qunling[1], He Feng[1], Zhang Liang[1], Jin Ge[1], Song Zhe[1], Li Yajun[3], Li Leilei[2], Xie Peng[1]([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, [2]Neuroscience Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Neurology, Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi Province, 710077, China)

[Abstract] **Objective** To identify the cellular localization of Borna disease virus (BDV) P24 by in situ RT-PCR in different periods after transfection and explore the mechanism of BDV latent infection. **Methods** Oligodendrocyte (OL cells) were transfected by plasmid BDV GFP-P24, and then tested by RT- PCR and ELISA in different periods after transfection in order to compare different expressions of nucleic acid and protein. In situ RT-PCR and fluorescence microscopy were used to identity cellular localization of BDV P24 nucleic acid and protein in different periods. **Results** BDV P24 transfected OL model was successfully constructed. The expression of BDV P24 nucleic acid and protein showed there was no statistics difference ($P>0.05$) in different periods in 20 passages. The BDV P24 gene was located in the cellular nucleus but BDV P24 protein in the cellular nucleus first and then in both nucleus and cytoplasm after 15 passages. **Conclusion** BDV P24 gene functions in the cellular nucleus and P24 protein can transport to the cytoplasm of OL cells at 15 passages or so after transfection.

[Key words] Borna disease virus; reverse transcription; *in situ* PCR; phosphoprotein; infection

Supported by the High-Tech Research and Development Program of China (2006AA02Z196). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail:xiepeng58@21.cn.com

博尔纳病毒(borna virus disease, BDV)是一种人畜共患的病毒,主要的动物宿主是马,普遍感染所有恒温动物。感染主要累及动物脑的边缘系统导致行为异常[1]。该病毒在人类多为潜伏感染,长期的潜伏感染可以引起精神疾病如情感障碍等[2]。BDV潜伏感染的机制有多种假说,但主要认为与BDV磷蛋白(P24)的调控有关。前期国内外的研究主要通过完整的病毒来研究它对宿主的作用,利用重组蛋白分析单一病毒蛋白对宿主作用的研究较少。本研究联合使用荧光显微镜和原位PCR技术从蛋白和核酸两个层面了解BDV磷蛋白基因和蛋白在感染宿主过程中的细胞定位,从而进一步探索该病毒的潜伏感染机制。

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2006AA02Z196)
[通信作者] 谢 鹏,电话:(023)68485490,E-mail:xiepeng58@21.cn.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与耗材 质粒小抽试剂盒,购自杭州博日科技

有限公司;转染试剂 Lipofectamine 2000,购自 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒,购自杭州博日科技有限公司;BDV 荧光定量 PCR 检测试剂盒,购自广州达安生物公司;无 RNA 活性的 DNA 酶,购自 PROMEGA 公司;RT-PCR 一步法反应试剂盒,购自 PROMEGA 公司。

1.1.2 仪器与设备 紫外分光光度计为 Thermo 公司的 NANODROP1000,荧光倒置显微镜和荧光显微照相系统为 Nikon SMZ-10A 和 FDX-35,原位 PCR 仪为 Bio-Rad 公司 DNA engine(加原位模件)。

1.1.3 质粒、细胞、抗体与样品 BDV GFP-P24 质粒和少突胶质细胞株(Oligodendrocyte, OL)由哈尔滨医科大学微生物学教研室张凤鸣教授惠赠,感受态细胞 DH5α 为本实验室常备,BVD-P24 抗体和阳性标准品血样由德国柏林自由大学路德维希教授惠赠。

1.1.4 引物与探针 逆转录原位 PCR 的引物为:5′-CCCTC-CAAGTGGAAACCAT-3′ 和 5′-CAGTATCTTGATGTTCTCGCCA-3′;探针为:5′-DIG-CCCTCCAAGTGGAAACCATC-3′;由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 BDV P24 转染细胞模型的建立与验证

1.2.1.1 BDV GFP-P24 质粒的扩增和检测 将 BDV GFP-P24 转化进入感受态细胞 DH5α,使用卡那霉素筛选,挑多个单克隆扩增。质粒小抽试剂盒提取质粒,测定样品的浓度并进行琼脂糖凝胶电泳后送测序。

1.2.1.2 BDV GFP-P24 质粒的转染 OL 细胞用 DMEM/高糖培养基(含 10% 胎牛血清)培养。等细胞长到 80% ~90% 时按脂质体试剂说明进行转染,24 h 后使用荧光倒置显微镜观察荧光。使用 G418(100 mg/ml)进行筛选,未转染细胞大量死亡后 G418 浓度减半维持。稳定转染后继续传代培养,并观察荧光在细胞中的位置。

1.2.1.3 BDV P24 转染细胞模型的 PCR 检验 对构建成功的不同时期的 BDV P24 转染细胞模型用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,并用 BDV 荧光定量 PCR 检测试剂盒检测。以拷贝数在 104 以上为阳性结果。

1.2.1.4 BDVP24 转染细胞模型的 ELISA 检测 按照 BDV 抗原检测试剂盒的说明操作,在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔的光密度值[$D(450)$],$D(450)$ 值 <0.3 为阴性病例;0.3 ~ 0.4 疑似病例; >0.4 为阳性病例。

1.2.2 BDV 细胞模型的逆转录原位 PCR 检测

1.2.2.1 细胞的准备 将不同时期的 BDV P24 转染细胞模型和阴性对照 OL 细胞在多聚赖氨酸硅化后的盖玻片上爬片。滴加 20 μl 固定液固定 20 min,用 PBS(DEPC 处理的,下同)冲洗,加入 50 μl 消化液,37 ℃消化 15 min,PBS 冲洗,加入 50 μl PBS 并且覆盖小盖玻片后,65 ℃灭活,10 min。加入 DNA 酶 20 μl,37 ℃消化 30 min。加入终止液终止,并且加入 50 μl PBS,覆盖盖玻片,65 ℃灭活 10 min。用 PBS 清洗,过梯度酒精。晾干备用。

1.2.2.2 PT-PCR 操作 使用 PT-PCR 一步法试剂盒按照说明配制 RT-PCR 反应试剂,加盖小的盖玻片,用矿物油封片。在原位 PCR 仪上进行反应。反应条件为:RT:45 ℃,45 min;94 ℃ 2 min。PCR:94 ℃ 60 s,65 ℃(每过 2 个循环降低 2 ℃,直至降到 57 ℃) 30 s,72 ℃ 30 s,循环 2 次;94 ℃ 60 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环 20 次;72 ℃ 5 min。

1.2.2.3 探针的杂交 过梯度酒精,室温待干,加入杂交液 A(含鲱鱼精子 DNA 和基本杂交液)25 μl,42 ℃恒温孵育 60 min,加入杂交液 B(含 10 ng/μl 的 BDV-P24 探针,使用前 95 ℃变性 10 min,冰浴 10 min)25 μl,用小盖玻片和矿物油封片,在原位 PCR 仪内 42 ℃杂交 18 h。

1.2.2.4 显色和封片 用梯度 TTBS 和 PBS 漂洗待干。加入地高辛抗体,37 ℃孵育 60 min。用 TBS 漂洗,加入 NBT-BCIP 显色试剂显色 4 h。去离子水漂洗,加入核固红染色 5 min,去离子水漂洗。显微镜下观察,封片。

1.2.2.5 阴性对照的设定 在检测 BDV 细胞模型的同时按要求设立各种阴性对照组。

1.3 统计学分析

使用统计学软件 SPSS 17,对测得的不同时期的 OL 细胞核酸、蛋白的表达量进行方差分析。

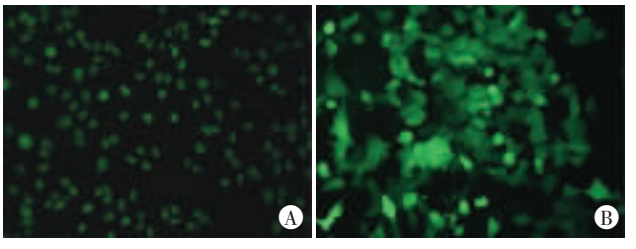
2 结果

2.1 BDV GFP-P24 质粒提取和验证的结果

提取的 BDV GFP-P24 质粒测定的浓度在 0.1 ~0.3 μg/μl 之间,可以满足转染的需要。该质粒大小为 5 398 bps,琼脂糖凝胶电泳结果,与 GeneBank 的序列结果相一致。

2.2 BDV P24 转染细胞模型的建立和检验

将 BDV GFP-P24 质粒转染进入 OL 细胞后,在荧光显微镜下观察可见细胞核有绿色荧光(图 1A);反复传代 15 ~20 次左右再观察其荧光发现可以同时在细胞核和细胞质中出现绿色荧光,且荧光的强度要大于转染初期,细胞密度和生长速度不如转染初期(图 1B);进行荧光定量 PCR 检测,见表 1。对细胞模型提取蛋白进行 ELISA 检测,发现各时期的细胞均有 BDV 磷蛋白表达,见表 1;但细胞不同代数之间核酸和蛋白表达的量差异没有统计学意义($P>0.05$)。



A:转染初期 BDV P24 转染细胞模型;B: 第 15 代起 BDV P24 转染细胞模型

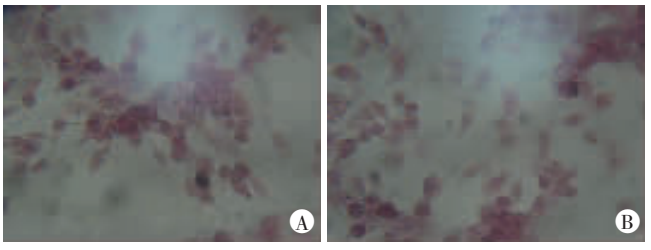
图 1 BDV P24 转染细胞模型的建立和检验结果 (荧光显微镜 ×200)

2.3 BDV 逆转录原位 PCR 检测结果

转染 BDV GFP-P24 质粒的细胞模型培养不同代数后逆转录原位 PCR 检测结果可以看见无论是 15 代之前的细胞还是 15 代之后的细胞其细胞核内均有紫黑色的深染(图 2);各组阴性对照组未见细胞核内深染。

表1 不同传代次数的OL细胞模型磷蛋白ELISA检测结果

传代次数	RT-PCR结果	ELISA测值	ELISA结果
1	阳性(10^5)	0.428	阳性
1	阳性(10^4)	0.436	阳性
1	阳性(10^4)	0.477	阳性
5	阳性(10^5)	0.460	阳性
5	阳性(10^5)	0.415	阳性
5	阳性(10^4)	0.489	阳性
10	阳性(10^4)	0.472	阳性
10	阳性(10^5)	0.437	阳性
10	阳性(10^4)	0.421	阳性
15	阳性(10^4)	0.418	阳性
15	阳性(10^5)	0.463	阳性
15	阳性(10^5)	0.485	阳性
20	阳性(10^4)	0.453	阳性
20	阳性(10^4)	0.456	阳性
20	阳性(10^5)	0.432	阳性
未转染	-	0.102	阴性
未转染	-	0.088	阴性
未转染	-	0.076	阴性



A:第15代以前的细胞;B:第15代以后的细胞

图2 BDV GFP-P24质粒的细胞模型逆转录原位PCR检测结果
(NBT-BCIP ×400)

3 讨论

BDV是一种嗜神经病毒,属于单股负链RNA病毒目、博尔纳病毒科、博尔纳病毒属,核酸全长8910,有6个开放读码区分别为核蛋白(N,P40),磷蛋白(P,P24),非糖基化蛋白(X,P10),基质蛋白(M,P16),糖蛋白(G,P56),L-聚合酶(L,P180)[3]。BDV感染宿主的过程中不发生细胞溶解和变性,病毒进入细胞核长期潜伏,引起各种神经精神症状。

使用ELISA的方法可以通过特异性的抗体检测相应抗原蛋白的表达,结合荧光质粒的荧光定位,确定细胞模型成功构建。原位PCR技术是一种以原位杂交为基础,结合PCR的方法,对组织、细胞进行检测的技术手段[4]。原位杂交可以在组织细胞内部定位目的核酸片段,多用于肿瘤的诊断。在对病毒感染的组织细胞进行应用的过程中发现有些时期由于病毒的滴度过低,检测往往会出现假阴性。PCR技术具有很强的敏感性,考虑一些干扰因素的作用后只需要体系中有2~3个分子便可以检测出阳性结果[5]。将PCR技术应用于原位杂交以后,大大地提高了敏感性,使其对低浓度靶核酸的检测变为可能。原位PCR技术可以了解各个时期病毒在组织细胞中的定位和含量,以及病毒对不同组织的亲和性。

OL细胞是BDV研究中的常用的细胞系。相应的BDV质粒在OL细胞中转染效率极高,稍加筛选即可得到稳定转染的细胞。成功构建稳定转染的BDV GFP-P24的OL细胞株,为进一步研究BDV感染宿主细胞的非免疫学机制提供了良好的实验模型。

在BDV的潜伏感染过程中其磷蛋白,核蛋白以及非糖基化蛋白的调控起到了重要的作用。当非糖基化蛋白表达增加并与磷蛋白结合时,病毒蛋白多见于细胞核,此时病毒处于潜伏感染状态,在潜伏期病毒的mRNA的检出远远高于病毒蛋白的检出,可见此时病毒的蛋白低表达[6]。但非糖基化蛋白表达降低时,磷蛋白出现在细胞质,则病毒进入活跃期[7]。

本研究通过原位PCR检测观察到磷蛋白的核酸不论在那个时期都只能在细胞核内存在,提示BDV P24的转录和翻译过程均在细胞核内完成,其P24基因具有核定位的功能。BDV全病毒严格的核内复制和翻译可能与P24的核定位功能有关。

研究还观察到P24的蛋白在转染早期只在细胞核内出现,经过反复传代可以同时在细胞核和细胞质内出现。该现象提示BDV的P24蛋白存在一个向核外转运的机制。目前的理论都认为这种BDV磷蛋白从细胞核内输出的机制与BDV非糖基化蛋白有关。Yanai等[8]的研究认为BDV非糖基化蛋白通过和磷蛋白的核输出信号区上一段富含蛋氨酸的位点结合调控蛋白出核,而这种结合又受到了CRM1通路介导。本研究中BDV P24转染后经多次传代,荧光强度反而增加。由于BDV非糖基化蛋白和磷蛋白核酸序列大部分重叠,推测转染初期非糖基化蛋白可能与磷蛋白同步表达,导致蛋白主要集中在细胞核,到后期由于磷蛋白表达增加,非糖基化蛋白表达下降导致磷蛋白转入细胞质并大量表达。

在研究中我们还观察到随着磷蛋白转入细胞,特别是反复传代的后期细胞生长变得缓慢。由于细胞没有发生任何溶解和变性反应,提示是磷蛋白本身对细胞的直接作用导致了细胞生长的缓慢。本课题组前期的研究也发现,BDV的磷蛋白有抑制神经元增殖的作用[9]。Kamitani等[10]的研究发现BDV的磷蛋白可以和轴突生长因子HMG-1结合,抑制细胞增殖。与其同一实验室Zhang等[11]的进一步研究发现BDV磷蛋白与HMG-1结合,同时还会抑制P53介导的G启动子活性,从而抑制细胞的增殖和功能。最新的研究还发现BDV磷蛋白可以与GABA受体相关的蛋白结合,阻滞GABA受体的信号传递,使细胞表现为过度兴奋,

影响细胞正常的生长和功能[12]。本研究的BDV P24重组蛋白虽然对细胞表现出同样的作用,但是其发生的机制是否与真病毒感染一致还需要进一步研究证实。

本研究使用原位PCR和荧光显微镜观察BDV P24转染的细胞。发现磷蛋白重组蛋白转染细胞的核酸蛋白细胞定位与真病毒感染相似,其表达在各个时期没有显著差异,提示磷蛋白在BDV感染宿主的过程中起了关键作用,但其机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] 朱丹, 谢鹏, 曾志磊. 博尔纳病病毒感染与精神行为异常[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(12): 1165-1167.

[2] Dietrich D E, Bode L. Human Borna disease virus-infection and its therapy in affective disorders[J]. APMIS Suppl, 2008, (124): 61-65.

[3] Ikuta K, Ibrahim M S, Kobayashi T, *et al*. Borna disease virus and infection in humans[J]. Front Biosci, 2002, 7: d470-d495.

[4] 苏慧慈,刘彦仿. 原位PCR[M]. 北京: 科学技术出版社, 1995. 3-5.

[5] 李金明. 实时荧光PCR技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007. 15-17.

[6] Ibrahim M S, Watanabe M, Palacios J A, *et al*. Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendroglioma cell line[J]. J Virol, 2002, 76(8): 3873-3880.

[7] Kobayashi T, Zhang G, Lee B J, *et al*. Modulation of Borna disease virus phosphoprotein nuclear localization by the viral protein X encoded in the overlapping open reading frame[J]. J Virol, 2003, 77(14): 8099-8107.

[8] Yanai H, Kobayashi T, Hayashi Y, *et al*. A methionine-rich domain mediates CRM1-dependent nuclear export activity of Borna disease virus phosphoprotein[J]. J Virol, 2006, 80(3): 1121-1129.

[9] 余建萍, 徐鸣明, 彭丹, 等. 博尔纳病病毒磷蛋白在PC-12细胞内的稳定表达及对其增殖的影响[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 123-127.

[10] Kamitani W, Shoya Y, Kobayashi T, *et al*. Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor, amphoterin/HMG-1[J]. J Virol, 2001, 75(18): 8742-8751.

[11] Zhang G, Kobayashi T, Kamitani W, *et al*. Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1[J]. J Virol, 2003, 77(22): 12243-12251.

[12] Peng G, Yan Y, Zhu C, *et al*. Borna disease virus P protein affects neural transmission through interactions with gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein[J]. J Virol, 2008, 82(24): 12487-12497.

(**收稿**:2009-09-02;**修回**:2009-10-11)

(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)06-0536-01

自体造血干细胞移植治疗鼻腔NK/T细胞淋巴瘤并皮肤浸润1例

孙志强,王季石,卢英豪,谢润兰,龙正美 (550004 贵阳,贵阳医学院附属医院血液科)

[关键词] 鼻腔NK/T细胞淋巴瘤;皮肤浸润;化疗;放疗;自体造血干细胞移植

[中图法分类号] R733.4 **[文献标志码]** B

1 临床资料

患者,男性,17岁,因右鼻腔阻塞不适7个月,高热3个月于2006年11月20日入院。7个月前无明显诱因鼻塞不适,以右侧为著, CT示右鼻腔软组织影,未做治疗。3个月前出现高热(40.0 ℃),1月前四川大学华西医院鼻腔新生物活检提示:符合NK/T细胞淋巴瘤,抗酸染色(-),CD3p(+),CD20(-),CD56(+),颗粒酶B(+), EBV(+)。体检:双侧颈部扪及数枚1 cm×1 cm×1 cm、质软、无压痛肿大淋巴结,右鼻腔前端息肉样新生物,表面不平,质较脆,触之易出血,鼻腔有黏性分泌物附着,恶臭,口咽部丰满。实验室检查:LDH 419.9 U/L;骨髓细胞学检查未见异常细胞浸润。CT示双侧鼻腔弥漫生长新生物,边界欠清楚,双侧额窦、上颌窦、筛窦密度增高,黏膜增厚,鼻咽及口咽气道狭窄,周围软组织浸润性肿胀、增厚,颈鞘多发淋巴结肿大。诊断为NK/TCLⅡB期。给予VLD方案化疗,由于出现寒战、皮疹、休克等症状而不能耐受,该方案用完第1天后即停药。经给予面颈联合野、筛窦、下颈野和上颈野后部放疗(50 Gy)后好转, CT示右鼻腔明显强化软组织影,双侧鼻咽腔增厚软组织壁较前明显好转,鼻咽及口咽气道较前增宽,双侧颈鞘多发淋巴结缩小。5个月后再次予VLD方案化疗,化疗后复查CT示鼻腔周围软组织影边界不清,与前比较好转。7个月后因左侧腋窝溃烂入院,体检:左侧腋窝后方见皮肤溃烂,面积约5 cm×6 cm,有恶臭分泌物,黑色痂块附着,触痛,双侧颈部扪及1 cm×1 cm×1 cm、质软肿大淋巴结,鼻腔未见新生物阻塞,扁桃体不大,肝脾肋下未及。腋窝溃烂坏死组织培养:金黄色葡萄球菌;腋窝溃烂组织活检为皮肤及基底组织NK/T淋巴瘤,侵袭性, CD56(+), GranzymeB(+), CD3(+), CD45R0(+),CD20(-),CD79a(-),Ki67阳性细胞数40%~50%。CT示:鼻烟腔壁增厚,双侧颈鞘多发淋巴结肿大。先后予2次CTOD方案和2次大剂量甲氨蝶呤。期间给予2次鞘注(甲氨蝶呤15 mg)。予CE方案(环磷酰胺3.0 g,依托泊苷1 400 mg),加重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员外周血干细胞,连续2 d共采集MNC 4.2×10^8/kg体质量,$CD34^+$ 6.3×10^6/kg体质量,-80 ℃冰箱保存。2007年11月21日予BEAM方案预处理行自体干细胞回输,第6天WBC 0.03×10^9/L,

(下转540页)

[通信作者] 王季石, E-mail: jswang_yg@yahoo.com