论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0454-04

重庆地区博尔纳病病毒种系发生分析

张英英[1],展群岭[1],徐鸣明[1],余建萍[1],翟 红[1],刘妍汐[1],陈 晓[1],彭 丹[1],朱 丹[1],谢 鹏[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经内科[1],神经科学研究中心[2])

[摘要] **目的** 了解重庆地区博尔纳病病毒(Borna disease virus,BDV)基因特征及其种系发生。**方法** 采用荧光定量巢式实时逆转录聚合酶链反应(fluorescence quantitative nested RT-PCR,FQ-nRT-PCR)检测健康牛、山羊、猪各50例以及病毒性脑炎(viral encephalitis,VE)患者20例外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)BDV p24片段,检出阳性序列和前期检出的5例重庆地区山羊和神经精神患者阳性BDV p24基因序列,与GenBank中5个国家7个动物种属33例BDV p24基因序列进行比对,分析其核苷酸和氨基酸序列同源性,重建基因系统发生树。**结果** 10例BDV p24核苷酸序列一部分(1例VE患者)形成重庆独立支系,另一部分(7例动物和2例VE患者)汇聚至德国-瑞士-奥地利-日本-重庆混合支系。与BDV标准病毒株Strain V、H1766及He/80比对,9例核苷酸和氨基酸序列同源相似性分别为94%~100%和82%~100%,1例为95%~98%和89%~93%。**结论** 重庆地区动物和人宿主可能存在地源性BDV独立株和源于外来疫病病原传入的流行株。

[关键词] 博尔纳病病毒;p24;种系发生;牛;山羊;猪;病毒性脑炎;人类
[中图法分类号] R373.3;R394.5;R446.5 **[文献标志码]** A

Phylogenetic analysis of Borna disease virus in Chongqing region

Zhang Yingying[1], Zhan Qunling[1], Xu Mingming[1], Yu Jianping[1], Zhai Hong[1], Liu Yanxi[1], Chen Xiao[1], Peng Dan[1], Zhu Dan[1], Xie Peng[1,2] ([1]Department of Neurology, [2]Neuroscience Research Center, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the genetic characteristics and phylogeny of Borna disease virus (BDV) in Chongqing, China. **Methods** BDV p24 segment was detected by fluorescence quantitative nested RT-PCR (FQ-nRT-PCR) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 50 healthy cattle, 50 healthy goats, 50 healthy pigs and 20 patients with viral encephalitis (VE). Phylogenetic analysis of BDV p24 positive samples were performed by alignment with 5 positive gene sequences of healthy goats and patients with neuropsychiatry diseases in preliminary studies in Chongqing and 33 sequences of 7 kinds of animal species in 5 countries from GenBank. The sequence homologous similarity of the nucleotide and the amino acid sequences was analyzed and gene phylogenetic tree was reconstructed. **Results** Among the 10 nucleotide sequences from Chongqing (including 3 strains from cattle, 2 from goat, 2 from pig and 3 from VE patients), the sequence of 1 VE patient and those of our preliminary studies formed a Chongqing independent branch, and the other 9 sequences clustered within Germany-Switzerland-Austria-Japan-Chongqing mixed branch. Aligned with standard BDV strain V, H1766 and He/80, the homologous similarity in 9 sequences was 94% to 100% in nucleotide and 82% to 100% in amino acid, and the 1 sequence had a similarity of 95% to 98% in nucleotide and 89% to 93% in amino acid. **Conclusion** There may exist a Chongqing independent BDV strain from geographical origin, and the epidemic strain due to spread of foreign pathogen.

[Key words] Borna disease virus; p24; phylogeny; cattle; goat; pig; viral encephalitis; human

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z196). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail: peng.xie58@gmail.com

博尔纳病病毒(Borna disease virus,BDV)是人畜共患病——博尔纳病(Borna disease,BD)病原体,感染后主要表现为动物的脑炎和人类的神经精神疾病[1],

[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:peng.xie58@gmail.com

具有严格的嗜神经性[2],在感染细胞内呈低量、非溶细胞性复制[3]。其基因组为8.9 kb,具有6个开放读码框(open reading frame,ORF),编码核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)、L-多聚酶以及X蛋白[4]。在BDV感染的细胞中,p24和p40基因序列高度保守,编码的磷蛋白和核蛋白常被作为检测BDV的生物学指标[5]。近年来已相继从重庆地区山羊、猪和部分神经精神疾病患者中检测出BDV基因片段[6-11],但对该地区BDV自然感染来源、系统发生等尚未进行系统分析。为此,我们采用Borna病病毒荧光定量PCR诊断试剂盒(FQ-nRT-PCR诊断试剂盒)[12]检测重庆地区健康动物(牛、山羊、猪)和病毒性脑炎(viral encephalitis,VE)患者BDV p24片段,对其阳性基因序列进行系统发生学分析,了解重庆地区BDV动物和人自然感染的种系形成及其可能的原因。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 动物样本 2007年9月至2008年5月来自重庆地区(合川、荣昌、涪陵、云阳、巴南等)圈养的健康牛、山羊和猪各50例,雌雄比1:1。采集动物外周血10 ml加EDTA抗凝。

1.1.2 人样本 样本分为VE患者组和对照组。20例VE患者为重庆医科大学附属第一医院神经内科和第三军医大学大坪医院野战外科研究所2007年11月至2008年10月住院及门诊收治。通过临床表现、CSF和血液常规生化及细胞学、脑电图及影像学等检查,全部病例符合VE的临床诊断标准:①急性或亚急性起病,多有发热、头痛等神经系统症状;②神经系统受损的定位体征;③CSF白细胞计数多在(50~500)×10^6/L,其中70%为淋巴细胞,蛋白正常或轻度增高,糖和氯化物正常;④脑电图背景活动明显异常;⑤影像学检查(CT或磁共振成像)发现低密度灶,也可正常。除外以下疾病:颅脑外伤、脑肿瘤、颅内出血、其他致病微生物所致颅内感染、脑白质病变、中毒性脑病、代谢性脑病等。全部患者经单纯带状疱疹病毒、乙脑病毒和EB病毒等特异性抗体检测,病原学诊断尚不明确。其中,男性7例,女性13例,年龄(29.35±12.05)岁。收集18例上述医院健康献血者作为对照,其中,男性7例,女性11例,年龄(29.44±8.38)岁。2组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。2组均采集外周血10 ml加EDTA抗凝待测。

1.2 RNA的提取

EDTA抗凝外周血用Ficoll-conray液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs),Trizol一步法提取RNA。使用随机数字表法选取10例RNA样本用紫外分光光度计测定$D(260)$和$D(280)$值,计算二者比值以分析RNA样品的纯度;琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。

1.3 引物和探针的设计与合成

1.3.1 BDV p24片段引物和探针 针对BDV p24蛋白的核苷酸序列,设计2对引物和1条探针序列[7]。外引物序列P1:5′-TGACCCAACCAGTAGACCA-3′,P2:5′-GTCCCATTCATCCGTTGTC-3′;内引物序列P3:5′-CCCTCCAAGTGGAAACCAT-3′,P4:5′-CAGTATCTTGATGTTCTCGCCA-3′。引物由上海英骏生物有限公司合成。荧光探针序列为:5′-FAM-TCAGCGGTGCGACCACTCCGATAGC-TAMRA-3′,由中山医科大学达晖基因诊断中心合成。

1.3.2 BDV p40片段和质粒PMD19标准品引物 为增加检测结果的可靠性,针对BDV p40核苷酸序列设计1对引物,上游:5′-CGACAGGTAGGATTCACGAGGC-3′,下游:5′-AGACATCAGGCAGAACGCAGTG-3′;设计PMD19标准品引物1对,引物位置分别位于PMD19质粒骨架和连接BDV p24基因片段,上游:5′-CTGATGCTGTCGGAGTGG-3′,下游:5′-CGGTGATGACGGTGAAAA-3′。二者均由赛百胜公司合成。

1.4 BDV p24基因片段FQ-nRT-PCR检测

采用BDV荧光定量PCR诊断试剂盒(FQ-nRT-PCR诊断试剂盒)检测BDV p24片段,Rotor-Gene 6000荧光定量PCR仪自动进行实时定量分析[12]。PCR产物长度为86 bp。

1.5 BDV p40基因片段RT-PCR检测

PCR反应条件:采用降落PCR扩增,94 ℃预变性5 min;94 ℃ 30 s、(66 ℃~58 ℃,每2个循环降2 ℃)30 s、72 ℃ 1 min,共10个循环;94 ℃ 30 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,共30个循环;72 ℃延伸5 min。反应产物3%琼脂糖凝胶电泳,PCR产物为154 bp。

1.6 质粒PMD19标准品RT-PCR检测

PCR反应条件:采用降落PCR扩增,94 ℃预变性5 min;94 ℃ 30 s、(64 ℃~56 ℃,每2个循环降2 ℃)30 s、72 ℃ 1 min,共10个循环;94 ℃ 30 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,共30个循环;72 ℃延伸5 min。反应产物3%琼脂糖凝胶电泳,PCR产物为480 bp。

1.7 PCR产物测序

BDV p24阳性样本PCR产物经纯化和克隆后由上海英骏生物技术有限公司测序。

1.8 BDV p24片段核苷酸和氨基酸序列分析及种系发生分析

将阳性产物BDV p24基因序列与GenBank中5个国家(德国、瑞士、列支敦士登、日本、奥地利)7个动物种属(马、绵羊、驴、狗、牛、鼬鼱、羊驼)的33例BDV p24基因序列和前期重庆地区BDV p24片段阳性的山羊和患者(帕金森病、格林巴利综合征、精神分裂症、病毒性脑炎)5例p24基因序列[6-10]进行序列和进化分析。核苷酸序列同源相似性由EMBL完成;差异度由DnaSP 4.0和MEGA 4.0软件完成;MEGA 4.0软件构建Neighbor-Joining基因系统发生树。

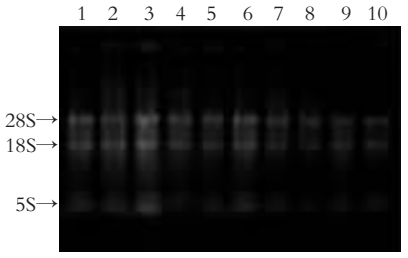
1.9 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,计数资料采用Fisher精确χ^2检验。

2 结果

2.1 样本RNA的提取

随机选择10例外周血样本,用紫外分光光度计测定$D(260)/D(280)$值,比值分别为1.87、1.90、1.91、1.85、1.88、1.94、1.92、1.83、1.86、1.90。琼脂糖凝胶电泳可见明显的28S、18S、5S 3个条带,提示所提取的RNA样品纯度较高,完整性良好,见图1。



1~3:牛;4~6:山羊;7~9:猪;10:VE患者

图1 10例牛、山羊、猪和VE患者PBMCs样本的RNA提取后电泳验证结果

2.2 样本的BDV p24检测

10例样本BDV p24检测阳性(牛:3/50,6%;羊:2/50,4%;猪:2/50,4%;VE患者:3/20,15%);健康对照组均为阴性。

2.3 检测BDV p40和质粒PMD19标准品验证

在188例动物和人样本中检出BDV p40片段阳性10例,与BDV p24阳性结果一致,在3%琼脂糖凝胶电泳154 bp出现1条清晰的带,其余样本均为阴性,见图2;在BDV p24和p40检测结果均为阳性的样本中未检出质粒标准品,在3%琼脂糖凝胶电泳480 bp位置未见其条带,见图3。



M:标准(DL 2 000);1~10:动物和VE患者阳性样本;11~20:随机阴性样本;21~23:阴性对照;24:阳性对照

图2 BDV p40片段琼脂糖凝胶电泳结果



M:标准(DL 2 000);1~10:BDV p24和p40均为阳性的样本;11~20:随机阴性样本;21~23:阴性对照;24:阳性对照

图3 质粒PMD19标准品检测琼脂糖凝胶电泳结果

2.4 BDV p24核苷酸和氨基酸序列分析

与BDV标准病毒株Strain V、H1766和He/80等比对,7例动物和2例VE患者样本核苷酸和氨基酸同源相似性分别为94%~100%和82%~100%,1例VE患者为95%~98%和89%~93%;与前期研究[6-10]重庆地区山羊和患者BDV p24片段阳性序列比对,7例动物和2例VE患者核苷酸和氨基酸同源相似性分别为94%~97%和82%~89%,1例VE患者为95%~100%和93%~100%。

所有序列核苷酸总体差异度 $\pi = 0.07$,平均核苷酸差异数 $k = 5.75$,碱基转换/颠换偏倚 R(临界值为2.0)为8.48,Tajima's中性检验 $D = -2.30$($P < 0.01$),见表1、2。

表1 重庆山羊、牛、猪和VE患者阳性扩增序列与He/80、H1766和Strain V氨基酸序列比对

检测样本	536	546	556
He/80	PSKWKPSRQL	SGATTPIASE	SLARTSRY
H1766	----------	------T--G	FSV-----
StrainV	----------	---I--T--G	-S------
CQY08	----------	----------	--------
CQY44	----------	----------	--------
CQN12	----------	----------	--------
CQN49	----------	----------	--------
CQN50	----------	----------	--------
CQZ30	----------	----------	--------
CQZ39	----------	----------	--------
CQR06	----------	------T--G	F-------
CQR13	----------	----------	--------
CQR15	----------	----------	--------

2.5 系统发生学分析

重构10个支系的系统发生树发现,在核苷酸和氨基酸水平,本次检测7例动物和2例VE患者BDV p24片段序列汇聚德国-瑞士-奥地利-日本-重庆混合支系;1例VE患者和前期山羊和神经精神患者序列形成重庆独立支系,见图4。

表2 重庆山羊、牛、猪和VE患者阳性扩增序列与He/80、H1766和Strain V核苷酸序列比对

检测样本	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
He/80	CCCTCCAAGT	GGAAACCATC	CAGACAGCTC	AGCGGTGCGA	CCACTCCGAT	AGCATCAGAA	TCCTTGGCGA	GAACATCAAG	ATACTG
H1766	----------	----------	----------	----------	---------C	--------G-	-T--C--T--	----------	------
StrainV	----------	----------	----------	----------	T--------C	--------G-	----C-----	----------	-----A
CQY08	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQY44	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQN12	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQN49	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQN50	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQZ30	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQZ39	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQR06	----------	----------	----------	----------	---------C	--------G-	-T--------	----------	------
CQR13	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------
CQR15	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	------

CQY08、CQY44、CQN12、CQN49、CQN50、CQZ30、CQZ39、CQR06、CQR13、CQR15:BDV检测阳性的山羊、牛、猪和VE患者血液样本;CQ:重庆地区;Y:山羊;N:牛;Z:猪;R:VE患者

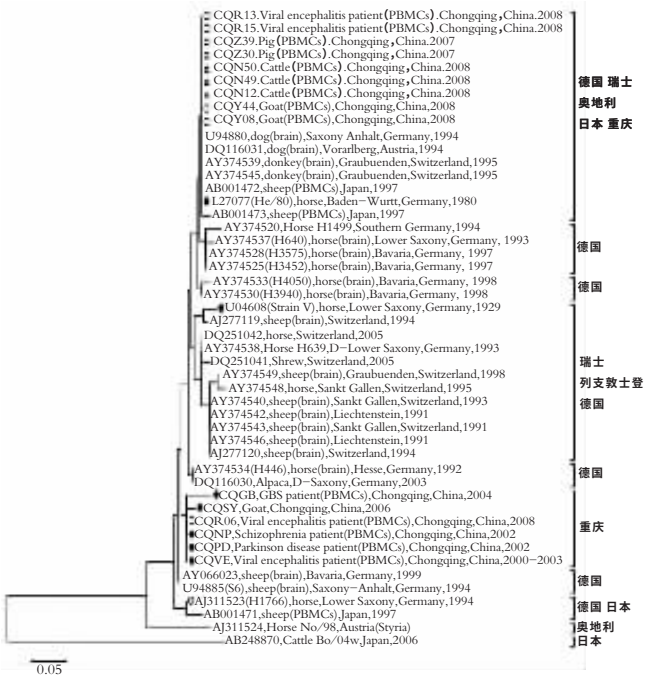


图 4　重构重庆动物和患者 BDV p24 片段序列基因系统发生树

3　讨论

自 1885 年首次在德国发现 BDV 至今，由于其感染地域和储存宿主（包括人类）广泛，越来越多的研究关注 BDV 在全球的分子流行病学特征[13]。虽然 BDV 基因组具有明显的遗传稳定性，表现出不同地源相同的 BDV 种系，但仍存在不同程度的变异，表现出不同地源的相对独立种系，形成 BDV 地源聚集分布和种系交叉分布的特点[14,15]。

本次研究结果结合前期重庆地区山羊和神经精神疾病患者 BDV 调查[6-10]，对该地区 BDV 种系类型和系统进化等进行系统分析，了解 BDV 在中国重庆地区动物和 VE 患者中的遗传进化、变异和可能的自然感染来源。

本研究表明：在重构的基因系统发生树中可见 10 例阳性样本 BDV 核苷酸序列隶属于 2 个支系，7 例动物和 2 例 VE 患者样本聚合形成德国-瑞士-奥地利-日本-重庆混合支系，1 例 VE 患者与前期重庆山羊和神经、精神病患者聚合形成重庆独立支系。混合支系形成的可能原因：①德国、瑞士、奥地利、日本、重庆分别存在固有的相同 BDV 种系；②随着与国外贸易合作、交流的加强，同一 BDV 株在德国、瑞士、奥地利、日本、重庆等的相互传播[14]，感染动物和人类，形成重庆不同动物种属相同的 BDV 株。重庆独立支系形成的可能原因：①不同地源相对的独立性形成了重庆地区固有的独立种系；②自然选择对序列变异压力的不同，由该地域 BDV 株基因突变形成[14]。

在两个分支内部，BDV 在动物和人类存在高度的同源性，不同宿主之间可能存在动物和动物、动物和人类、人类和人类之间的循环传播[14]。本次研究除 1 例外，均隶属于混合支系，而前期隶属于重庆独立支系，表明在不同物种和时期，BDV 种系可能不同，可表现为某一种系为主，说明 BDV 及其储存宿主物种可能存在进化和变异的稳定平衡[15]。由于 BDV p24 扩增序列长度的有限性和样本量的相对不足，上述结论尚有待于进一步研究证实。

参考文献：

[1] Thakur R, Sarma S, Sharma B. Role of Borna disease virus in neuropsychiatric illnesses: are we inching closer? [J]. Indian J Med Microbiol, 2009, 27(3):191-201.

[2] Heimrich B, Hesse D A, Wu Y J, *et al*. Borna disease virus infection alters synaptic input of neurons in rat dentate gyrus[J]. Cell Tissue Res, 2009, 338(2): 179-190.

[3] Planz O, Pleschka S, Wolff T. Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways[J]. Cell Microbiol, 2009, 11(6):872-879.

[4] Watanabe Y, Ohtaki N, Hayashi Y, *et al*. Autogenous translational regulation of the Borna disease virus negative control factor X from polycistronic mRNA using host RNA helicases[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(11):e1000654.

[5] Kamhieh S, Flower R L. Borna disease virus (BDV) infection in cats. A concise review based on current knowledge[J]. Vet Q, 2006, 28(2):66-73.

[6] 赵立波，谢鹏，牟君，等. 重庆市山羊博尔纳病病毒 P24 基因的检测[J]. 中国兽医科学，2006，36(6)：460-463.

[7] 徐平，谢鹏，邹德智，等. 博尔纳病病毒感染和帕金森病[J]. 中华老年医学杂志，2003，22(11)：696-697.

[8] 徐平，谢鹏，邹德智. 博尔纳病病毒与慢性格林-巴利综合征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2004，24(6)：425.

[9] 徐平，谢鹏，邹德智，等. 中国精神病人外周血博尔纳病病毒 P24 基因片段检测[J]. 中国人兽共患病杂志，2004，20(6)：471-473，476.

[10] 徐平，谢鹏，邹德智. 病毒性脑炎患者博尔纳病病毒 P24 基因片段的检测[J]. 中华神经科杂志，2005，38(5)：309-312.

[11] 朱丹，张英英，展群岭，等. 重庆三峡库区部分地域猪博尔纳病病毒自然感染状况调查[J]. 第三军医大学学报，2009，31(21)：2093，2105.

[12] 徐平，谢鹏，邹德智，等. 博尔纳病病毒荧光定量套式 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 重庆医科大学学报，2003，28(6)：688-691，696.

[13] Kinnunen PM, Billich C, Ek-Kommonen C, *et al*. Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland[J]. J Clin Virol, 2007, 38(1):64-69.

[14] Kolodziejek J, Durrwald R, Herzog S, *et al*. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 2):385-398.

[15] Ludwig H, Bode L. Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology[J]. Rev Sci Tech, 2000, 19(1): 259-288.

（**收稿**：2009-07-24；**修回**：2009-08-29）
（编辑　王　红）