文章编号:1000-5404(2012)05-0401-05

论著

博尔纳病病毒对人少突胶质细胞增殖与凋亡的影响

邓 婧[1,2],李 丹[2],张 亮[1,2],黄荣忠[1,2],李文娟[2],马丽华[1,2],房 亮[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];神经科学研究中心,重庆市神经生物学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)感染对人少突胶质细胞(oligodendrocytes, OL)增殖与凋亡的影响。**方法** 用BDV感染OL细胞,免疫荧光检测OL细胞中博尔纳病病毒P40蛋白的表达,CCK8测定法观察细胞的生长增殖情况,用流式细胞技术检测细胞的凋亡情况和周期变化,Western blot检测凋亡指标Bax、Bcl-2的相对表达量。**结果** 与阴性对照组细胞比较,感染组在博尔纳病病毒感染少突胶质细胞第3天时,免疫荧光能够检测到P40蛋白的表达。随着感染时间的增加,BDV感染的OL细胞增殖能力下降($P<0.05$),且通过流式细胞仪检测到病毒感染3 d后,细胞出现凋亡增多。流式细胞仪检测结果显示,与对照组比较,感染细胞周期G_2期延迟($P<0.05$),细胞增殖指数降低($P<0.05$)。Western blot检测结果显示,与对照组比较,感染细胞促凋亡蛋白Bax表达量增加($P<0.05$),抑凋亡蛋白Bcl-2表达量下降($P<0.05$)。**结论** BDV感染可以抑制OL细胞增殖,并能通过上调Bax蛋白及下调Bcl-2蛋白表达量,诱导细胞凋亡的发生。

[关键词] 博尔纳病病毒;少突胶质细胞;细胞增殖;细胞凋亡
[中图法分类号] R329.28;R338.1;R373 [文献标志码] A

Borna disease virus inhibits proliferation and induces apoptosis in human oligodendrocyte *in vitro*

Deng Jing[1,2], Li Dan[1,2], Zhang Liang[1,2], Huang Rongzhong[1,2], Li Wenjuan[2], Ma Lihua[1,2], Fang Liang[2], Xie Peng[1,2] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital; [2] Center of Neuroscience, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of Borna disease virus (BDV) infection on the proliferation and apoptosis in human oligodendrocytes (OL cells). **Methods** BDV infection of OL cells was detected by P40 immunofluorescence, cell growth was observed by CCK8 assay, and the apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. Relative expression levels of Bax and Bcl-2 were also detected by Western blotting. **Results** Compare to negative control cells, the expression of P40 protein was positive in the experimental cells in 3 d after BDV infection. As the infection time increased, the proliferation of OL cells were decreased. Flow cytometry indicated that BDV infection resulted in an increase of apoptotic cells in 3 d after infection. BDV infected cells were arrested at G_2 phase, and cell proliferation was inhibited. Expression of pro-apoptotic protein Bax was increased, and that of antiapoptotic protein Bcl-2 was decreased. **Conclusion** BDV infection inhibits cell proliferation, and induces cell apoptosis through up-regulating Bax expression and down-regulating Bcl-2 expression in OL cells.

[**Key words**] Borna disease virus; oligodendrocyte cell; cell proliferation; cell apoptosis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2009CB18302), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5393), and the Medical Science and Technology Research Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-102). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail: xiepeng58@21cn.com

DNA病毒感染细胞后可以依靠病毒复制所需要的DNA合成酶参与到细胞周期机制,部分还可以引起细胞凋亡发生[1]。而RNA病毒影响细胞周期和凋亡机制的研究却很少,主要集中在人类免疫缺陷病毒HIV和呼吸道合胞病毒[2-4]。

博尔纳病病毒(Borna disease virus,BDV)是一种非细胞毒性单股负链RNA病毒,具有高度嗜神经细胞性,能引起中枢神经系统持续感染,临床上表现为致死

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB918302);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5393);重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2010-2-102)
[通信作者] 谢 鹏,电话:(023)68485490,E-mail: xiepeng58@21cn.com

性脑脊髓炎。BDV能广泛感染马、羊、啮齿类等温血动物,导致T细胞介导的病毒性脑炎,即Borna病[5]。同时,大量的流行病学研究显示BDV感染可能与人类精神疾病有关[6-8]。BDV能感染神经元和神经胶质细胞,引起神经细胞的功能改变,具体机制研究主要集中在神经可塑性学说、免疫学说和神经细胞凋亡学说。BDV感染神经胶质细胞的机制研究现仍少见,有研究显示BDV感染鼠神经胶质细胞株(C6)后检测发现抑癌因子P53的活性增强[9],说明BDV可能有抑制细胞增殖的作用。本研究用博尔纳病毒感染人少突胶质细胞(oligodendrocyte,OL),观察其对OL细胞的增殖生长和凋亡的影响,并探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与病毒 从精神分裂症病人大脑中分离得到的病毒株BDV Hu(德国柏林自由大学Hanns Ludwig教授惠赠)及人OL细胞株。细胞通过冻融裂解得到病毒液和OL细胞裂解液。

1.1.2 主要试剂 水浴锅(荣华HH-W420)、荧光倒置显微镜和荧光显微照相系统(Nikon SMZ-10A和FDX-35)、生物安全柜(海尔HR40-ⅡA2)、二氧化碳培养箱(Thermo FORMA 3111)、75cm^{2}培养皿、6孔板(corning)、胎牛血清(HyClone)、DMEM培养液(HyClone)、谷氨酰胺(HyClone)、青链霉素(HyClone)、0.25% 胰酶(Hyclone)、PBS(Hyclone)、BDV-P40单克隆抗体(与南京金斯瑞公司合作自主开发)、AnnexinV-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天)、CCK-8试剂盒(碧云天)、FITC标记羊抗兔IgG抗体(Santa Cruz)、总蛋白提取试剂盒(凯基)、Bcl-2抗体(sc-7382, Santa Cruz)、Bax抗体(sc-7480, Santa Cruz)、β-actin(sc-58669, Santa Cruz)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 OL细胞株用DMEM/High Glucose培养基,加入5%胎牛血清、1%谷氨酰胺、1%青链霉素,直径75 mm培养皿,37 ℃, 5% CO_2培养箱内单层细胞培养;当细胞长至70% ~80%融合时进行传代,传代浓度为5×10^5/ml,每次传代均以0.25%胰蛋白酶消化,更换新培养基。

1.2.2 病毒感染 根据所需培养基大小,接种适量数量的OL细胞,于5% DMEM培养基中培养8 h至细胞贴壁,吸取培养基,病毒感染组加入1/10体积、滴度为8×10^5 FFU的BDV病毒液,对照组加入同等方法提取的等量OL细胞裂解液,37 ℃ 5% CO_2培养箱内培养1 h,重新加入培养基继续培养。

1.2.3 BDV感染OL细胞P40蛋白鉴定 ①将盖玻片置于6孔板内,按4×10^5/ml接种细胞2 ml进行培养;次日待细胞贴壁后,用上述病毒感染方法加入200 μl病毒液进行感染。分为感染组和对照组,每组3个孔,分别代表感染1、3、5 d;②吸尽培养液,加入4% 多聚甲醛固定30 min;③3%双氧水作用30 min以灭活内源性过氧化物酶,5% BSA封闭20 min。;④甩掉血清后加兔抗人P40多抗(1∶200),4 ℃过夜;⑤加入FITC标记羊抗兔IgG抗体(1∶50),室温避光孵育1 h;⑥PBS洗涤,用蓝绿激发绿光在荧光显微镜下观察绿色荧光。

1.2.4 CCK8法测定BDV感染对OL细胞生长增殖的影响 取处于对数生长期的OL细胞,胰酶消化后,用5% DMEM制备成单细胞悬液,计数后按10^3/100 μl接种于96孔板。分组为:感染组、阴性对照组、空白调零组,每组设置4个附孔,感染组加入最佳感染剂量10 μl病毒液感染细胞,阴性对照组加入10 μl OL细胞裂解液,空白调零组只含5% DMEM培养液。培养1 ~7 d后,每天向各孔中加入10 μl CCK8试剂,37 ℃孵育1 h,选择450 nm波长,在酶标仪上测定各孔光密度值[D(450)]。重复3次实验,绘制生长曲线。

1.2.5 细胞周期分析 取对数生长期OL细胞按10^5/ml接种于6孔板在2% DMEM培养条件下培养24 h,吸去培养液,PBS洗2次。感染组加入200 μl病毒液,对照组加入200 μl OL细胞裂解液,同时各孔加入无血清的DMEM 2 ml,37 ℃培养,无血清饥饿24 h后使细胞同步于G_1期。向细胞中重新加入5% FCS进行血清释放,在0、6、15、24 h时收获细胞和培养液,70%乙醇固定,4℃过夜后加入0.05 g/L PI,室温暗处孵育30 min,用流式细胞仪检测细胞DNA含量,实验重复3次。

1.2.6 Annexin V-FITC双染流式细胞术(FCM)检测BDV对OL细胞凋亡的影响 取对数生长期OL细胞10^5/ml接种于6孔板,分为感染组和对照组,用加入200 μl病毒液感染细胞。37 ℃, 5% CO_2培养箱内培养至病毒感染后1、3、5 d后,胰酶消化细胞,收集细胞及培养液 ,1 000 r/min、10 min离心后,倒掉上清,加入PBS 1 ml重悬细胞,转移至EP管中。加10 μl AnnexinV-FITC冰上混匀,避光15 min,流式细胞仪进行检测细胞凋亡情况,重复3次实验。

1.2.7 Western blot检测细胞凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的表达变化 分为感染组和对照组,分别提取感染1、3、5 d的细胞总蛋白并检测其含量,行SDS-PAGE电泳检测,电泳结束后切胶、转膜、37 ℃胎牛血清封闭2 h,浸泡于含Bcl-2、Bax鼠单抗(1∶200)的5%脱脂牛奶中,4 ℃过夜孵育,加入羊抗鼠二抗(1∶2 000),室温孵育2 h,与化学发光剂结合2 min后进行化学发光。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,各组实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组均数比较采用重复测量方差分析和独立样本t检验。

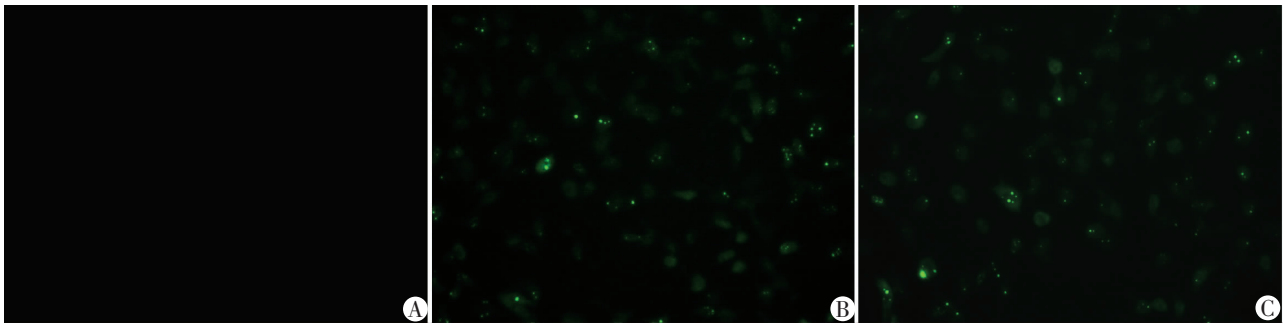
2 结果

2.1 BDV感染OL细胞后P40蛋白表达鉴定

BDV感染OL细胞1、3、5 d后进行BDV P40蛋白的免疫荧光验证,发现感染1 d的OL细胞并未发现有荧光表达,而感染3、5 d的细胞出现了绿色局灶性荧光点。BDV P40蛋白为核蛋白,主要在核内表达,所以可见绿色荧光蛋白主要在细胞核内表达(图1)。

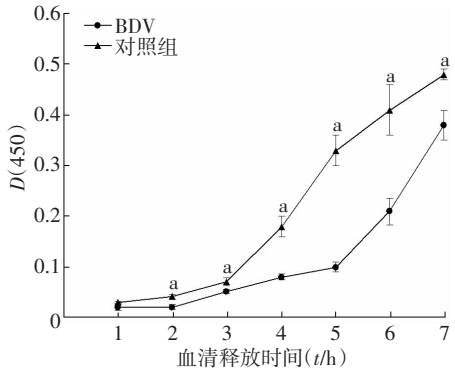
2.2 BDV感染对OL细胞增殖能力的影响

BDV感染OL细胞后1 ~7 d,通过CCK8法测定,实验组和对照组随着感染天数的增加,细胞数均逐渐增加,但感染第2天起感染组的细胞数少于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。感染第1天,两组细胞数无统计学差异($P>0.05$,图2)。



A:感染 1 d;B:A:感染 3 d;C:感染 5 d

图 1　BDV 感染 OLP40 蛋白表达　(荧光显微镜 ×100)



a:$P<0.05$,与 BDV 感染组比较

图 2　BDV 感染对 OL 细胞增殖能力的影响

2.3　BDV 对 OL 细胞细胞周期的影响

在细胞周期中,主要影响细胞增殖能力的时期为 S 期和 G_2 期,所以我们选用了细胞增殖指数(proliferation index,PI),即 S 期 + G_2/M 期细胞百分比来表示细胞增殖率。通过 PI 染色流式细胞仪测定 BDV 感染 OL 细胞后周期的变化,我们发现,感染组细胞 G_2 期延迟,增殖指数小于对照组,具有统计学意义($P<0.05$)。表 1。

2.4　BDV 对 OL 细胞凋亡的影响

通过 Annexin V-FITC 双染流式细胞仪检测 BDV 感染 OL 细胞 1、3、5 d 后对细胞凋亡的影响(表 2),结果显示,感染 1 d 时感染组和对照组细胞凋亡数目无明显统计学差异($P>0.05$),而感染 3 d 和 5 d 时,感染组细胞凋亡数目和对照组之间有明显统计学差异,感染组细胞凋亡数多于对照组($P<0.05$)。

表 1　血清释放后不同时间点 BDV 感染对 OL 细胞周期的影响(%,$n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1期	G_2/M 期	S 期	增殖指数
感染组				
0 h	67.20 ± 2.96	3.97 ± 0.32	28.01 ± 1.88	31.99 ± 1.86
6 h	60.15 ± 1.49	3.90 ± 0.47[a]	32.94 ± 1.11	36.84 ± 1.14[a]
15 h	61.42 ± 0.98	4.18 ± 1.35[a]	29.57 ± 0.69	33.75 ± 0.57[a]
24 h	64.22 ± 0.39	2.64 ± 0.23[a]	25.91 ± 0.15	28.56 ± 0.28[a]
对照组				
0 h	67.86 ± 2.68	4.00 ± 0.53	28.65 ± 2.70	32.65 ± 2.68
6 h	58.27 ± 1.82	5.08 ± 1.30	34.86 ± 0.34	39.94 ± 0.26
15 h	54.71 ± 0.66	7.69 ± 1.32	37.10 ± 1.10	44.80 ± 0.99
24 h	63.83 ± 0.24	5.48 ± 0.33	29.80 ± 1.19	35.28 ± 0.87

a:$P<0.05$,与对照组比较

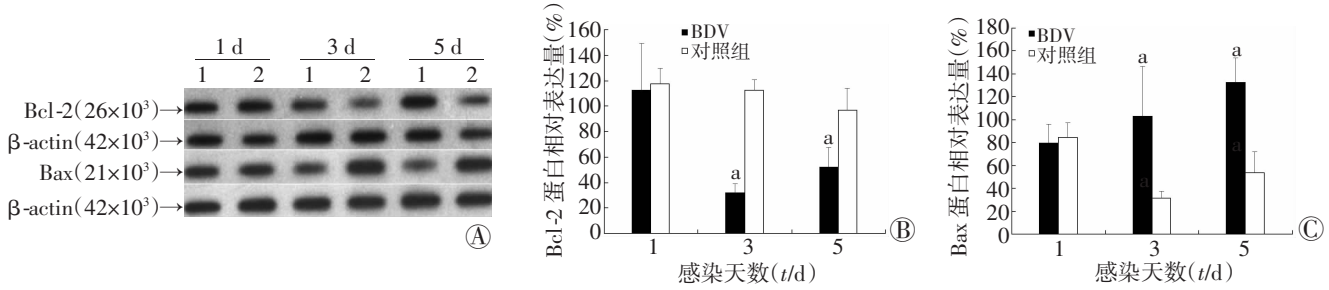
表 2　各组不同时间点细胞凋亡数检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	5 d
感染组	9.88 ± 1.20	9.69 ± 1.18[a]	9.51 ± 1.34[a]
对照组	12.22 ± 3.95	5.44 ± 0.84	7.40 ± 1.50

a:$P<0.05$,与对照组比较

2.5　BDV 感染 OL 细胞后凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达变化

通过对凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的 Western blot 检测结果显示,两种蛋白出现了与流式细胞仪凋亡测试结果一致的趋势。促凋亡蛋白 Bax 在感染第 3 天和第 5 天,感染组的表达量均大于对照组($P<0.05$)。而抑凋亡蛋白 Bcl-2 在感染第 3 天和第 5 天,感染组的表达量则小于对照组($P<0.05$)。感染第 1 天感染组和对照组之间两种蛋白表达量没有差异($P>0.05$,图 3)。



A:Western blot 检测结果　1:感染组;2:对照组;B、C:Bcl-2、Bax 蛋白定量分析($n=4$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　BDV 感染 OL 细胞凋亡相关蛋白 1、3、5 d 时 Bcl-2、Bax 蛋白的表达变化

3 讨论

BDV是一种嗜神经病毒,它能通过自身特有的糖蛋白结合细胞表面的受体介导内吞作用,从而感染神经细胞[10]。BDV在感染细胞的核内进行复制,并且造成持续感染,同时也造成一定程度的细胞生物学改变。关于BDV的致病机制目前尚不完全清楚,一般认为BDV感染的细胞发生病变,可能是通过诱导机体产生$CD8^+$T细胞介导的细胞免疫造成了神经系统的损伤,进而产生神经精神症状。但由于感染大剂量的病毒后,往往宿主出现类似于博尔纳病的严重疾病,却不形成显著的炎症性改变,因此推测炎性浸润可能不是BDV引起疾病发生的唯一途径[11]。BDV感染后引起的疾病表现根据宿主的种类和年龄不同而呈现不同的症状。在感染期内,BDV能影响中枢神经系统胞内信号通路,在形态学改变之前就导致分子细胞层面的改变[12]。现有研究显示,BDV主要影响了四大信号通路:与细胞可塑性有关的PKC、Raf/MEK/ERK通路[13],与凋亡有关的NF-κB通路[14],与抗病毒有关的IFN通路[15],以及caspase和bcl-2凋亡通路[16]。明确BDV感染神经细胞的机制,对于病毒感染宿主细胞和许多神经精神疾病的研究具有重要意义。

OL细胞是人体少突胶质细胞,它是中枢神经系统中白质的主要组成部分,对神经细胞功能的发挥具有重要作用,它能作为BDV持续感染细胞株用于研究病毒感染机制,国内外关于BDV感染该细胞的研究报道甚少[17]。

本实验中,我们使用了BDV病毒株感染OL细胞。通过CCK8法测定BDV感染OL细胞7d内细胞的增殖活性,发现BDV感染组的细胞其生长明显慢于对照组,在感染第2天开始具有差异性。细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞增殖最终发生在细胞周期水平上。所以我们进行了流式细胞术周期相DNA含量分析以明确BDV感染对细胞增殖的影响。细胞增殖的调控点有两个:一是由G_1期向S期转化;二是由S期向G_2期转化。当细胞进入S期,即其启动细胞的增殖过程,为了更好地说明细胞的增殖程度,可用PI即S期+G_2/M期细胞百分比来表示细胞增殖率[18]。我们发现血清释放6h后感染组细胞相对于对照组细胞发生了G_2期延迟,细胞增殖率明显低于对照组。这说明BDV感染OL细胞后确实发生了细胞增殖减慢。BDV感染细胞后可以通过与某些蛋白结合调节细胞周期的改变,同时也可以通过与某些细胞因子的结合而诱导神经细胞的功能改变。Oliver等[19]在BDV感染的大鼠成纤维细胞中检测到细胞周期G_2期的延迟可能是由P40蛋白结合了Cdc2-Cyclin B1诱导的。Kamitani等[20]指出BDV磷蛋白可以通过结合两性酸碱兼性蛋白(HMGB1)干扰细胞信号通路,影响神经细胞网络连接和大脑发育。HMGB1蛋白是一种轴突生长因子,与RAG1、p53、Hox等蛋白结合参与转录调节和DNA修复。后期研究也发现BDV感染PC12细胞后能激活ERK1/2通路,阻碍了NGF刺激的细胞分化进行[21]。因此BDV对神经细胞生长增殖的抑制作用可能与抑制神经营养因子的表达有关。

细胞凋亡是一种程序性的细胞死亡过程,也是清除异常增殖细胞的一种重要途径。研究显示,BDV感染的新生大鼠脑组织存在神经细胞的减少,TUNEL监测发现神经细胞凋亡增加,同时监测到促凋亡指标Fas、caspase-1表达水平的增加,抑凋亡指标Bcl-2表达水平的减少[16]。在本实验中,我们利用流式细胞术对BDV感染的OL细胞进行了凋亡细胞数的检测。我们发现,感染第1天时凋亡细胞数与对照组之间并无差异,而感染第3天和第5天感染组的凋亡细胞数是明显多于对照组的($P<0.05$)。同时我们观察到BDV感染OL细胞后P40蛋白免疫荧光实验中,感染第1天也未见荧光的表达,第3天和第5天可见到细胞核内少量荧光的表达。这说明,感染第1天细胞凋亡数未见明显差异的原因可能是由于感染时间较短,病毒还未能很好地感染大部分细胞,影响细胞的凋亡通路。Watanabe等[22]曾用BDV感染C6细胞株发现感染3~4 d时免疫荧光能发现阳性细胞,我们的实验结果与此相符。

Bcl-2蛋白质家族的抗凋亡和促凋亡成员,在线粒体水平上决定细胞的存活或死亡[23]。本实验中我们用Western blot法检测了促凋亡蛋白Bax和抑凋亡蛋白Bcl-2的表达水平,发现BDV感染OL细胞后,两个指标的表达水平均发生了变化。感染第3天和感染第5天均发现细胞Bax的表达量增加,而Bcl-2的表达量降低。实验结果表明,BDV对OL细胞具有明显的增殖抑制和促凋亡作用,这种作用的产生可能是短暂的,是细胞自身对BDV感染产生的调控机制,使病毒感染细胞维持在较低水平增殖,使得病毒持续感染。本研究不仅解释了病毒感染与宿主细胞增殖与凋亡的关系,我们还提供了一个新的思路,即运用病毒的特有蛋白(如BDV P40蛋白)是否可以对某些快速增殖细胞进行调控,如肿瘤细胞的细胞周期调控。

参考文献:

[1] Smith W. Virus-host cell interactions[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1958, 148(932): 370-384.

[2] Elder R T, Benko Z, Zhao Y. HIV-1 VPR modulates cell cycle G_2/M transition through an alternative cellular mechanism other than the clas-

sic mitotic checkpoints[J]. Front Biosci, 2002, 7: d349 – d357.
[3] Fluur C, De-Milito A, Fry T J, *et al*. Potential role for IL-7 in Fas-mediated T cell apoptosis during HIV infection[J]. J Immunol, 2007, 178(8): 5340 – 5350.
[4] Gibbs J D, Ornoff D M, Igo H A, *et al*. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells[J]. J Virol, 2009, 83(23): 12424 – 12431.
[5] Tomonaga K, Kobayashi T, Ikuta K. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection[J]. Microbes Infect, 2002, 4(4): 491 – 500.
[6] Ohlmeier M D, Zhang Y, Bode L, *et al*. Amantadine reduces mania in borna disease virus-infected non-psychotic bipolar patients[J]. Pharmacopsychiatry, 2008, 41(5): 202 – 203.
[7] Nunes S O, Itano E N, Amarante M K, *et al*. RNA from Borna disease virus in patients with schizophrenia, schizoaffective patients, and in their biological relatives[J]. J Clin Lab Anal, 2008, 22(4): 314 – 320.
[8] 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.
[9] 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.
[10] Clemente R, de-la-Torre J C. Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein[J]. J Virol, 2007, 81(11): 5968 – 5977.
[11] Baur K, Rauer M, Richter K, *et al*. Antiviral CD8 T cells recognize borna disease virus antigen transgenically expressed in either neurons or astrocytes[J]. J Virol, 2008, 82(6): 3099 – 3108.
[12] Lipkin W I, Briese T, Hornig M. Borna disease virus - Fact and fantasy[J]. Virus Res, 2011, 162(1/2): 162 – 172.
[13] Schmid S, Mayer D, Schneider U, *et al*. Functional characterization of the major and minor phosphorylation sites of the P protein of Borna disease virus[J]. J Virol, 2007, 81(11): 5497 – 5507.
[14] Bourteele S, Oesterle K, Pleschka S, *et al*. Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication[J]. J Virol, 2005, 79(10): 6043 – 6051.
[15] Peng G, Zhang F, Zhang Q, *et al*. Borna disease virus P protein inhibits nitric oxide synthase gene expression in astrocytes[J]. Virology, 2007, 366(2): 446 – 452.
[16] Hornig M, Weissenbock H, Horscroft N, *et al*. An infection-based model of neurodevelopmental damage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(21): 12102 – 12107.
[17] 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.
[18] 赵敬富, 张敬军, 刘璇玥. 银杏叶提取物对星形胶质细胞增殖周期的影响[J]. 中国临床神经科学, 2011, 19(1): 60 – 64.
[19] Planz O, Pleschka S, Oesterle K, *et al*. Borna disease virus nucleoprotein interacts with the CDC2-cyclin B1 complex[J]. J Virol, 2003, 77(20): 11186 – 11192.
[20] 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.
[21] Hans A, Syan S, Crosio C, *et al*. Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC12 cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(10): 7258 – 7265.
[22] Watanabe Y, Ibrahim M S, Hagiwara K, *et al*. Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility[J]. Microbes Infect, 2007, 9(4): 417 – 427.
[23] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy[J]. Autophagy, 2008, 4(5): 600 – 606.

(**收稿**:2011-09-22;**修回**:2011-11-17)
(编辑 王小寒)

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是:凡是可以使用阿拉伯数字,而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如:公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称,1995 年不能写成 95 年或'95 年;1953 – 1958 年不能写成 1953 – 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如:13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2 计数和计量(整数、小数、分数、百分数、均数)包括序数、编号 4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法,不用"千分撇",节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙(如 2,431 改为 2 431)。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节,也不加千分撇。尾数"0"多,5 位以上的数字,可以用"万""亿"表示,但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示,例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部