

• 实验室研究 •

# 新疆伊犁地区马群中博尔纳病病毒自然感染调查

朱丹 曾志磊 彭丹 陈晓 赵立波 张英英 徐明鸣 展群岭 余建平 谢鹏

**【摘要】** 目的 了解新疆伊犁地区马群中博尔纳病病毒(BDV)的流行状况,分析该病毒的种系来源。方法 采用改进的巢式反转录 PCR(nRT-PCR)方法对新疆伊犁地区 120 匹马的外周血单个核细胞(PBMC)及脑组织中的 BDV p24 基因片段进行检测,对阳性产物进行基因序列测定和同源性分析。结果 有 3 匹马外周血和脑组织中同时检测到 BDV,阳性率为 2.5% (3/120)。扩增产物序列与其他国外马源 BDV 分离株同源性 >93%,与标准株 He/80 同源性达到 98% 以上。结论 新疆伊犁地区马群中存在 BDV 的自然感染。该地区 BDV 流行株与标准株 He/80 存在高度的同源性。

**【关键词】** 博尔纳病病毒;巢式 RT-PCR; TaqMan 探针;马

**Epidemiological investigation on natural infection to Borna disease virus (BDV) among horses in Yili, Xinjiang** ZHU Dan\*, ZENG Zhi-lei, PENG Dan, CHEN Xiao, ZHAO Li-bo, ZHANG Ying-ying, XU Ming-ming, ZHAN Qun-ling, YU Jian-ping, XIE Peng. \*Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

Corresponding author: XIE Peng, Email: peng.xie58@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the epidemiological pattern of Borna disease virus (BDV) infection in horses and to analyze the phylogenetic tree of derived BDV in Yili, Xinjiang. **Methods** We established a modified nested RT-PCR (nRT-PCR) to detect BDV p24 segment in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and brain tissues of 120 horses in Yili, Xinjiang. Positive products were analyzed by sequencing and homology analysis. **Results** The positive rate of BDV infection was 2.5% in both PBMCs and brain tissues at the same time. The gene sequence revealed in positive PCR samples was more than 93%, identical to that of BDV derived from horses in other countries. We also noticed a high degree of identity (>98%) to standard strain He/80 in gene sequence of positive PCR samples. **Conclusion** Our study found the presence of BDV natural infection in horses in Yili. The endemic BDV had a high degree of identity to standard strain He/80.

**【Key words】** Borna disease virus; Nested RT-PCR; TaqMan probe; Horse

博尔纳病病毒(BDV)是一种负链单股 RNA 病毒,具有高度嗜神经性,是人畜共患病——博尔纳病的病原体。BDV 基因组长约 8.9 kb,包括 6 个开放读码框,分别编码核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)、RNA 聚合酶(L)、病毒蛋白(X)。近 20 年来,越来越多的动物种系被检测出 BDV 抗体及其核酸阳性,也在越来越多的国家与地区找到 BDV 感染的证据,引起了人们对 BDV 的重视<sup>[1]</sup>。目前国内外研究已证实,BDV 自然感染以马和羊为主,可引起从鸟类到灵长类的多种动物中枢神经系

统感染<sup>[2-4]</sup>。在我国重庆、哈尔滨和宁夏等地区已有对血液 BDV 检测的报道<sup>[5-7]</sup>,但新疆地区尚未见较大规模的调查报告。为此,我们采用改进的巢式反转录-聚合酶链反应(nRT-PCR)检测新疆伊犁及其周边地区马外周血单核细胞(PBMC)和脑组织中的 BDV p24 基因片段,并对阳性产物进行测序分析,以了解新疆伊犁地区马的 BDV 自然感染状况,并分析 BDV 种系来源及其与标准株 Strain V 和 He/80 的同源性。

## 材料与方 法

1. 研究对象:全部 120 匹马均为 2007 年 9-11 月采自新疆伊犁地区天然牧场上放养的马匹,雄雌各半。每匹马采外周血 10 ml 加 EDTA 抗凝,同时采取左侧额叶脑组织 100 mg。

2. 引物和探针:根据 GenBank 中 BDV 基因组

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2006AA022196)

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院神经内科(朱丹、曾志磊、彭丹、陈晓、张英英、徐明鸣、展群岭、余建平);重庆市第三人民医院(赵立波);重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆医科大学神经科学研究中心(谢鹏)

通信作者:谢鹏,Email: peng.xie58@gmail.com

中的最保守区 N 基因,即编码核蛋白(p24 蛋白)的核苷酸序列,设计 2 对引物和 1 条探针,其中外引物序列为 P1:5'-TGA CCC AAC CAG TAG ACC A-3',P2:5'-GTC CCA TTC ATC CGT TGT C-3';内引物序列为 P3:5'-CCC TCC AAG TGG AAA CCA T-3',P4:5'-CAG TAT CTT GAT GTT CTC GCC A-3',引物由上海英骏生物技术有限公司合成;荧光探针序列为:5'-FAM-TCA GCG GTG CGA CCA CTC CGA TAG C-TAMRA-3',由中山医科大学达晖基因诊断中心合成。

3. RNA 的提取:将 EDTA 抗凝的外周血用 Ficoll-conray 液密度梯度离心法分离 PBMC,随后用 Trizol 一步法提取 RNA;脑组织标本直接用 Trizol 一步法提取 RNA。提取的 RNA 样本用紫外分光光度计测 A 260 nm 和 A 280 nm 值,并计算二者比值以分析 RNA 样品的纯度。使用随机数字表法选择 8 例 PBMC 样本和 4 例脑组织样本提取的 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳分析所提取的 RNA 样品完整性。

4. BDV 检测:采用改进的 nRT-PCR 方法。即在常规 nRT-PCR 的基础上,在第二轮 PCR 过程中加入 TaqMan 荧光探针。在进行 BDV 检测的以下环节中,每次均设置非模板对照以排除假阳性结果,同时每次检测时使用 BDV 质粒(本课题组保存)作为阳性对照以排除假阴性结果。

(1) 反转录反应:反应体系为 10  $\mu$ l, RNA 样本 5  $\mu$ l, 5 $\times$  反转录缓冲液 2  $\mu$ l, 外上、下游引物各 0.2  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 0.1  $\mu$ l, 20 U/ $\mu$ l 反转录酶 0.5  $\mu$ l, DEPC 水 2  $\mu$ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min。

(2) 第一轮 PCR 采用 25  $\mu$ l 反应体系:5 $\times$  定性 PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, 外上、下游引物各 0.3  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 0.3  $\mu$ l, 3 U/ $\mu$ l Taq 聚合酶 1  $\mu$ l, 反转录产物 5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 13.1  $\mu$ l。反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 25 个循环。

(3) 荧光定量 PCR (FQ-PCR) 用 50  $\mu$ l 反应体系:5 $\times$  定量 PCR 缓冲液(含 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 10  $\mu$ l, 内上、下游引物各 0.5  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, Taq 聚合酶(3 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 荧光探针 0.5  $\mu$ l, PCR 产物 5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 32  $\mu$ l。反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 共 40 个循环。运用 Roter-gene 6000 荧光定量 PCR 仪自动进行实时定量分析。

5. nRT-PCR 扩增产物电泳和测序:将 nRT-PCR

阳性扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶扫描系统观察结果。同时将 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。

6. 序列分析:登录 GenBank,用 Blast 软件对 BDV p24 阳性扩增产物的核苷酸及其编码的氨基酸序列与国外人和动物来源 BDV 分离株和标准株 Strain V 与 He/80 等进行比较分析。

## 结 果

1. RNA 的提取质量:所选择 8 份外周血样本和 4 份脑组织样本的 RNA,用紫外分光光度计测 A 260 nm、A 280 nm 值,比值分别为 1.88、1.80、1.91、1.97、1.88、1.84、1.94、1.93、1.82、1.83、1.85、1.87。琼脂糖凝胶电泳可见明显的 28S、18S、5S 三条带,其中 28S 与 18S 的亮度约为 2:1,提示所提取的 RNA 样品纯度较高,完整性良好。

2. BDV 检测:使用改进的 nRT-PCR 方法对样本 RNA 进行 BDV 检测,结果发现,3 份马外周血样本及脑组织样本 RNA(马编号 HOR14、HOR20、HOR25)中的 BDV p24 基因片段检测阳性(图 1、2),其余样本均为阴性。

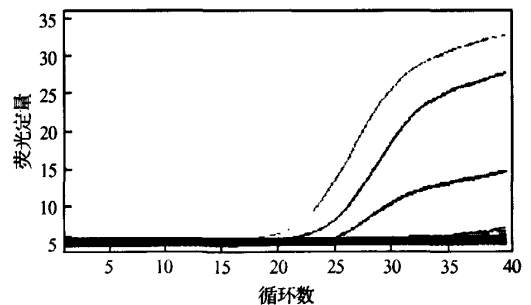


图1 马 PBMC 的 BDV 荧光扩增曲线

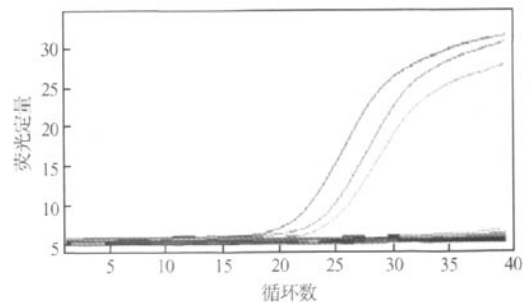


图2 马脑组织的 BDV 荧光扩增曲线

3. PCR 扩增产物的电泳和测序鉴定:琼脂糖凝胶电泳显示,阳性样本 PCR 扩增产物的大小为 86 bp,与

预期相符。其他阴性样品未见此扩增条带。

对 PCR 阳性样本的扩增产物进行测序,并登录美国国立卫生院网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)检索 Blast 和序列比对。结果发现,3 份样本中有 2 份的 PCR 扩增产物序列与 BDV 标准病毒株 He/80(Access Number:L27077)序列完全一致,同源率为 86/86(100.00%);另一份样本的 PCR 产物序列与 BDV He/80 株序列基本一致,仅有 1 个碱基不同(第 1656 位 C→T),同源率为 85/86(98.84%),编码氨基酸序列无变化。与其他标准病毒株 Strain V(Access Number:U04608.1)和 Strain H1766(AJ311523.1)相比,变异程度均小于 7%(表 1),所编码的氨基酸序列亦无变化。

### 讨 论

近年来,随着在越来越多的国家和地区找到 BDV 感染的证据,人们对 BDV 的研究更加重视,但对于 BDV 感染在全球范围的分布、与人类疾病的关系及其在自然界的宿主、传播途径等仍不十分清楚。已有的研究表明<sup>[4]</sup>,动物的 BDV 自然感染主要分布地区在欧洲、北美洲,主要感染动物是马和绵羊。最初的研究认为仅选择性在中枢神经系统的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞中持续复制,但近来发现周围神经、血液、胸腺及骨髓中的非神经细胞也是其复制部位<sup>[8]</sup>。因此,在外周血进行 BDV 检测发现阳性时提示可能同时存在中枢神经系统感染。

多数国外研究采用抗原和抗体等免疫学方法检测 BDV,近年来也开始使用分子生物学技术检测 BDV 核酸。对 BDV 的核酸检测中,普通 PCR 检测方法可能敏感性不够,导致出现假阴性结果的可能性较大。nRT-PCR 有很高的敏感性和特异性,可检出每份标本中 10~100 个 BDV 基因拷贝,但是存在反应结束后必须进行电泳才能明确检测结果的问题。本研究对常规的 nRT-PCR 方法做了改进,在第二轮 PCR 过程中加入荧光探针,改进后的方法具有以下优点:①进一步增加了反应的特异性;②可以

直观的观察 PCR 反应的结果;③避免常规 nRT-PCR 反应后电泳等操作,减少了工作量;④可对第二轮反应开始时的模板进行定量。

新疆地区是我国主要的马匹饲养基地,且与周边国家如俄罗斯等接壤。而在我国西北方向的邻国已经发现有 BDV 的自然感染,加之在“丝绸之路”沿线发达的传统商业交流,使国外疫病病原如 BDV 等有可能输入该地区。本研究关注新疆伊犁地区伊犁马的 BDV 自然感染情况,对 120 匹马 PBMC 及脑组织进行 BDV 检测。结果发现所采集的马外周血和脑组织中 BDV 阳性率均为 2.5%(3/120),提示在新疆伊犁地区的马中存在 BDV 的自然感染。与国内马培林等<sup>[9]</sup>采用 nRT-PCR 方法发现的黑龙江地区马 BDV 的阳性率 23.5% 相比,本文的结果则远远低于这一数值。这可能是因为 nRT-PCR 敏感性极高,且操作步骤较多容易引起污染导致假阳性,此外研究也提示若标本保存处理不当可出现假阳性<sup>[10]</sup>。我们在研究中尽可能严格试验分区,很好地避免了实验室污染引起的假阳性结果,另外探针的引入增强了检测的特异性,减少扩增后产物处理的污染导致假阳性的可能<sup>[11,12]</sup>。

BDV 是一种相对保守的病毒,从目前来源于马的分离株 H1766、Strain V 等来看,其基因序列存在高度同源性。国内马培林等<sup>[9]</sup>及王振海等<sup>[7]</sup>发现国内马等动物中存在 BDV 自然感染,且其基因序列与 BDV 标准株及分离株 H1766、Strain V 等序列同源性较高。本研究对 BDV 阳性标本的基因扩增产物进行克隆、测序,并与国外患病马的 BDV 分离株进行序列分析。结果发现,新疆伊犁地区马感染 BDV 的核苷酸序列与国外 BDV 株 He/80 的同源性最高,有 2 个样本为 100%,另一样本为 98.84%,与 BDV H1766 和 Strain V 的同源性也达 93% 以上,编码的氨基酸没有改变。由于这些马匹是从我国西北邻国引种的,提示伊犁地区马群中存在的 BDV 很可能源于这些国家,也提示 BDV 可能通过动物品种改良等途径传播。

表 1 扩增片段序列与 BDV 标准株 He/80、H1766 和 V 序列比对

	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690-5
He/80	CCCTCCAAGT	GGAAACCATC	CAGACAGCTC	AGCGGTGCGA	CCACTCOGAT	AGCATCAGAA	TCCTTGGOGA	GAACATCAAG	ATACTG
H1766	.....	.....	.....	.....	.....C	.....G	·T·C·T·	.....	.....
V	.....	.....	.....	.....	T.....C	.....G	···C···	.....	····A
HOR25	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HOR20	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HOR14	.....	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....

## 参 考 文 献

- [1] Flower R, Kamhieh S. Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect*, 2006, 8(3): 917-929.
- [2] Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, et al. Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol*, 2000, 81(9): 2123-2135.
- [3] Rott R, Becht H. Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, 190: 172-30.
- [4] Kolodziejek J, Drrwald 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 Gen Virol*, 2005, 86: 385-398.
- [5] 邹德智, 谢鹏, 徐平, 等. 重庆地区精神疾病患者 Borna 病病毒感染初步报道. *中华精神科杂志*, 2003, 36: 228-230.
- [6] 杨爱英, 张凤民, 李均辉, 等. 用蛋白印迹试验检测精神分裂症患者血清中博尔纳病毒 p24 抗体的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17: 85-87.
- [7] 王振海, 谢鹏, 韩玉霞, 等. 宁夏及其周边地区博尔纳病毒感染分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(6): 479-482.
- [8] Carbone KM. Borna disease virus and human disease. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(3): 513-527.
- [9] 马培林, 张凤民, 李桂梅, 等. 博尔纳病毒自然感染状况及其核苷酸序列. *中国公共卫生*, 2004, 20(4): 408-410.
- [10] Steine N, Budka A, Chaudhuri M, et al. Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol*, 2005, 12: 331-343.
- [11] Wensman JJ, Thorén P, Hakhverdyan M, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus. *J Virol Methods*, 2007, 143(1): 1-10.
- [12] Werner-Keiss N, Garten W, Richt JA, et al. Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008 (Epub ahead of print)

(收稿日期: 2008-06-26)

(本文编辑: 张林东)

(上承 1105 页)

在过去 10 年中, 遗传流行病学的关联研究运用较多。这些研究通常采用病例-对照设计, 从而比较病例和对照组中特殊基因变量的频率。和连锁相比, 关联研究有更强的统计效能以检测中、低度遗传效应。与单个候选基因关联研究相比, 以通径为基础的全基因关联研究可以对基因组进行更复杂的评估分析。存在的挑战是如何更好地设计这些研究, 如何去检测基因-基因和基因-环境的交互作用。

在流行病学研究资料的分析方法方面, 会议更多地关注了贝叶斯偏倚模型。认为传统模型是假设没有偏倚或偏倚可以忽视, 而贝叶斯偏倚模型是考虑到偏倚。传统的方法最多是对数据进行描述, 而且经常导致一些“垃圾”推论。贝叶斯偏倚模型可以免除传统方法中“滑稽”的假设, 是现代流行病学推论所必须的。

3. 流行病学研究中存在的问题: 调查中的应答率是研究中存在的主要问题。应答率低于 100% 时, 流行病学研究的有效性就会受到影响, 而在流行病学研究中普遍存在应答率低于 100%。国际上开展了多项有关提高应答率的随机实验。提高应答率的方法有: 保持调查表简短、使调查有趣、由一所大学发起、有小的激励、之前接触和事后发明信片、随访提醒等措施。英国爱丁堡大学的 Raj S. Bhopal 教授建议, 在研究过程中应做到准确地描述研究人群的特征; 准确地描述各种偏差; 仔细比较研究对象间的差异, 控制混杂; 结合理论知识与既往研究经验, 正确地评价研究的病因推断能力; 提供具体、客观的研究数据; 从公共卫生意义出发, 提出防治措施; 将研究结果积极应用于临床医疗实践、政策的制定及公共卫生领域, 只有这样才能改进流行病学研究, 使其不断进步。

一些最新的流行病学研究设计和分析方法也在大会上进行了交流。适用于病例-对照研究和病例-队列研究中补充抽样并能减少缺失资料影响的两阶段抽样设计 (two-phase sampling), 评价随时间而改变的暴露因素 (例如吸烟史、服药史) 与结局关系的 g 统计法 (g-methods), 以及以病例自身作为对照的病例交叉研究 (case-crossover study) 等。英国布里斯托尔大学的 Debbie Lawlor 教授和伦敦卫生与热带病医学

院的 Shah Ebrahim 教授介绍了孟德尔随机化法。这种分析方法类似于随机对照临床试验 (RCT), 通常将遗传变异变量 (genetic variant), 例如表型、基因型设置为工具变量 (instrumental variable), 从而达到控制混杂, 研究暴露因素 (non-genetic, modifiable risk factor) 与结局关系的目的。其优点在于遗传变异因素不受社会经济状况等混杂因素影响, 而且不会发生暴露与结局的时间关系颠倒 (reverse causation), 因此能比一般的线性回归方法 (例如多因素分析) 更准确地推断病因关联性, 解决了许多病因关系推断中流行病学观察性研究与 RCT 结果不相符合的问题。但通常适合的遗传变异变量难以寻找, 同时会受到基因多效性的影响; 而且需要大样本量时才能表现出较高的统计学效能。

4. 期刊杂志对流行病学研究发展的作用: 会议认为, 流行病学者应该更多关注经典流行病学中的病原、宿主和环境三方面, 这是所有初级预防策略制订的基础。国际主要流行病学期刊应该鼓励和优先发表有可能应用到公共卫生的流行病学研究成果, 如增加统计模型的应用、流行病学与卫生政策相结合、系统综述和 Meta 分析文章。会议也关注了医学界对 SCI 过度关心的现象, 而忽视了行业重要杂志的贡献及其研究的应用价值, 也有学者直指这种现象在中国的表现。

我国复旦大学公共卫生学院与江苏省、浙江省的流行病学合作研究团队的 9 名教师和工作骨干参加了此次会议, 并在会上作了“气候变暖与血吸虫病传播的关系”、“乙型肝炎母婴传播的流行病学研究”的学术报告, 同时以海报 (poster) 形式介绍了“肝癌流行病学研究”、“戊型肝炎人畜传播的研究”、“流感传播特征”、“血吸虫病监测”等最新研究成果。会议期间, 国际一些著名的学术机构介绍了在中国开展的合作研究成果, 但遗憾没有中方合作单位人员参加。

会议决定下届 (第 19 届) 大会于 2011 年在苏格兰爱丁堡召开。会议还选举新西兰 Massey 大学公共卫生研究中心主任 Neil Pearce 为新一届国际流行病学协会 (IEA) 主席。

(收稿日期: 2008-10-12)

(本文编辑: 张林东)