

· 现场调查 ·

宁夏及其周边地区博尔纳病毒感染的分子流行病学研究

王振海 谢鹏 韩玉霞 詹军

【摘要】 目的 探讨博尔纳病毒(BDV)在宁夏及其周边地区的流行状况。方法 采用巢式逆转录酶聚合酶链反应结合荧光定量 PCR 检测了 52 例病毒性脑炎(VE)患者和 32 名健康人外周血液(PBMC)和脑脊液有核细胞(CSFMC)、53 例抑郁症(DD)患者和 360 只绵羊 PBMC 中 BDV p24 基因片段,对阳性产物进行基因序列测定、同源性和氨基酸顺序分析;并绘制系统发生树,分析 BDV 感染的分子流行病学特点。结果 BDV p24 基因片段阳性率在 VE 患者 CSFMC 为 11.54%、DD 患者 PBMC 11.32% 明显高于健康人 0% ($P < 0.05$);绵羊的 PBMC 为 7.78% 与健康人对比如差异无统计学意义 ($P > 0.05$);系统发生树图形表明,绵羊 PBMC 目的基因片段与人类 VE 和 DD 核苷酸序列亲缘关系最近,来源于一个分支,并与德国 H1766 病毒株核苷酸序列亲缘关系最近,其变异性较小。结论 宁夏及其周边地区部分 VE、DD 可能与 BDV 感染有关,健康绵羊存在 BDV 的自然感染,其流行可能具有一定的地域局限性;人类 VE、DD 的 BDV 感染可能存在潜在动物源性,有待于进一步研究。

【关键词】 病毒性脑炎;博尔纳病毒;巢式逆转录酶荧光定量 PCR

Study on molecular epidemiology of Borna disease virus in Ningxia and vicinal regions WANG Zhen-hai*, XIE Peng, HAN Yu-xia, ZHAN Jun. *Department of Multiple Disease, The Affiliated Hospital of Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China

Corresponding author: XIE Peng. Department of Neurology, 1st Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China Email: xiepeng58@21cn.com

【Abstract】 Objective In order to investigate the epidemics of borna disease virus (BDV) in Ningxia and its vicinal regions. **Methods** p24 fragment of BDV from: (1) peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cerebrospinal fluid mononuclear cells (CSFMC) from 52 patients with viral encephalitis (VE) and 32 healthy donors, (2) peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 53 patients with depressive disorder (DD) and from 360 sheep, were examined by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) with fluorescence quantitative PCR. Gene sequence and amino acid sequence were analysed for positive product and the molecular epidemiologic characteristics by drawing phylogenetic trees. **Results** The positive rate of BDV p24 in CSFMC from VE (11.54%) and in PBMC from DD 11.32% was significantly higher than that in healthy donors (0%) ($P < 0.05$). The phylogenetic trees indicating the genetic relationship of the p24 fragment of BDV in both sheep and VE, DD in China and was similar to the nucleotide sequence of H1766 strain in Germany. **Conclusion** Data indicated that the BDV infection was possibly existing in VE, DD patients and health sheep in Ningxia and its vicinal regions with confined locality which called for further study.

【Key words】 Viral encephalitis; Borna disease virus; Fluorescence quantitative nest RT-PCR

博尔纳病毒(Borna disease virus, BDV)是一种非细胞溶解性、负链、单股 RNA 嗜神经病毒,其感染范围从鸟类到灵长类,并造成博尔纳病(Borna disease, BD),即免疫介导的脑脊髓炎,其临床表现

为致死性中枢神经系统损害,以行为异常、脑实质和脑膜的炎性细胞浸润,以及疾病特异性抗原在边缘系统中积聚为特征。自然感染以马和羊为主,人类的 BDV 感染可能与部分神经精神疾病的发病有关^[1,2]。我国重庆和哈尔滨等地已有对血液 BDV 检测的散在报道^[3,4],但宁夏及其周边地区的 BDV 感染国内外尚未见有报道。为此我们采用巢式逆转录酶聚合酶链反应结合荧光定量 PCR (FQ-nRT-PCR)检测上述地区病毒性脑炎(viral encephalitis),

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470605);宁夏卫生厅基金重点资助项目(W2004021)

作者单位:750004 银川,宁夏医学院附属医院综合病房(王振海);重庆医科大学附属第一医院神经内科重庆市神经病学重点实验室(谢鹏);宁夏回族自治区疾病预防控制中心(韩玉霞、詹军)

通讯作者:谢鹏, Email: xiepeng58@21cn.com

VE) 患者、抑郁症 (depressive disorder, DD) 患者和健康人以及绵羊外周血液中 BDV p24 基因片段, 现将初步结果报道如下。

材料与方 法

1. 研究对象: 52 例 VE 患者均系宁夏及其周边地区医院神经科 2003 年 8 月到 2005 年 8 月住院及门诊患者, 通过临床表现、脑脊液 (CSF) 和血液常规生化检测及细胞学、脑电图及影像学等检查, 符合 VE 的临床诊断, 并行单纯疱疹病毒、EB 病毒等特异性抗体检测, 筛选全部病例经病原学诊断不明确者, 男 37 例, 女 15 例, 平均年龄 $42 \text{岁} \pm 10 \text{岁}$, 收集发病后 15 天内的血液和 CSF 各 52 例, 15-35 天的血液 38 例和 CSF 23 例。收集 32 例上述医院外科手术患者血液和 CSF, 男 18 例, 女 12 例, 平均年龄 $37 \text{岁} \pm 11 \text{岁}$ 。53 例 DD 患者均系上述地区医院神经科和精神科 2004 年 4 月到 2005 年 8 月住院及门诊患者, 诊断均符合中华医学会精神科分会 2001 年制定的中国精神障碍诊断与分类标准第三版 (CCMD-3) DD 的诊断标准, 采用 Hamilton 抑郁量表 (HAMD) 对患者进行评分: DD 患者 ≥ 17 分入组。男 22 例, 女 31 例, 平均年龄 $37 \text{岁} \pm 19 \text{岁}$; 并同时收集 32 名上述地区血库提供的健康自愿献血者为对照, 男 18 名, 女 14 名, 平均年龄 $34 \text{岁} \pm 15 \text{岁}$; 在上述地区的 12 个点, 每个点随机抽取绵羊外周血液 30 份, 共计 360 份。

2. 主要试剂及仪器: ① 外引物: P1: 5'-TGA CCCAACCGTAGACCA-3' (19 bp), P2: 5'-GTC CCATTCATCCGTTGTC-3' (19 bp); ② 内引物: P1: 5'-CCCTCCAAGTGGAACCAT-3' (19 bp), P2: 5'-CAGTATCTTGATGTTCTCGCCA-3' (22 bp)。均由上海博亚生物技术有限公司合成。荧光探针的序列: 5'-FAM-TCAGCGGTGCGACCACTCCGATAG C-TAMRA-3' (25 bp), 由中山大学达安基因诊断中心合成。ABI Prism[®] 7000 型荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司产品); GeneAmp PCR System 9700 (美国 Perkin Elmer 公司产品)。

3. 方法:

(1) 提取细胞总 RNA: 外周血液用 Ficoll-conray 液分离外周血有核细胞 (PBMC); CSF 5 ml, 离心分离 CSF 有核细胞 (CSFMC), 采用 Trizol RNA 提取试剂盒 (北京鼎国公司) 提取细胞总 RNA, 标本置 -70°C 保存。

(2) BDV 质粒标准曲线制作: 将重组质粒定量后作为阳性模板, 稀释成 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 拷贝/ μl 浓度梯度, 在 ABI Prism[®] 7700 型扩增检测仪上进行 PCR 扩增, 该扩增检测仪在 PCR 反应进行的同时, 每 8 秒钟检测 1 次 PCR 产物的量 (即反应管中荧光值 R_n 的变化), 做到实时检测。反应结束后, 由计算机自动分析出定量结果, 并给出 PCR 扩增的动力学曲线。

(3) FQ-nRT-PCR: 首先进行逆转录反应, 在含 RNA 的 65°C 烘干 Eppendorf 管中加入逆转录体系 $14.2 \mu\text{l}$, 外引物一对各 $0.4 \mu\text{l}$, 逆转录酶 MMLV $1 \mu\text{l}$ (20 U), 总反应体积为 $20 \mu\text{l}$, 37°C 持续 1 h, 95°C 3 min 灭活逆转录酶。然后取逆转录后反应产物 $5 \mu\text{l}$, 加外引物一对各 $0.5 \mu\text{l}$, dNTP (25 mmol/L) $0.3 \mu\text{l}$, $5 \times$ 定性 buffer $5 \mu\text{l}$, Taq DNA 聚合酶 $1.5 \mu\text{l}$ (2 U), 总反应体积 $20 \mu\text{l}$, 进行第一轮 PCR, 反应条件为: 93°C 预变性 2 min, 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共循环 20 周期; 再 72°C 延伸 7 min。第二轮 PCR 总反应体积亦为 $50 \mu\text{l}$, 含第一轮扩增产物 $5 \mu\text{l}$, dNTP $1 \mu\text{l}$, Taq 酶 $2 \mu\text{l}$, 25 mmol/L MgCl_2 $10 \mu\text{l}$, 内引物一对各 $1 \mu\text{l}$, 荧光标记探针 $1 \mu\text{l}$ 。反应条件为: 93°C 预变性 2 min; 93°C 45 s, 55°C 1 min, 循环 10 个周期; 93°C 30 s, 55°C 45 s, 循环 40 周期。每次实验设阴性对照。

(4) PCR 产物纯化、克隆、测序和系统发生树分析: 对阳性 PCR 产物采用纯化、克隆后由中山大学达安基因诊断中心进行测序。测序结果用 clustalx 1.83、DNAtools 6.0 软件与 GenBank 提供的不同时间、地点分离的国外标准病毒株进行同源性和氨基酸顺序分析, 绘制系统发生树和 BDV 阳性患者的地理分布简图, 揭示 BDV 分子水平的流行规律。

4. 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行皮尔逊 χ^2 和相关性检验。

结 果

1. FQ-nRT-PCR 扩增 PBMC 和 CSFMC 中 BDV p24 基因片段的检测: BDV p24 基因片段阳性率, VE 患者 CSFMC 为 11.54% (6/52)、DD 患者 PBMC 11.32% (6/53) 明显高于健康人 0% (0/32) ($P < 0.05$); 绵羊的 PBMC 为 7.78% (28/360) 与健康人对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); VE 患者中 PBMC 和 CSFMC BDV p24 基因片段拷贝数的对数值呈显著正相关 ($r = 0.653$, $P < 0.05$), 见表 1。

表1 PBMC 和 CSFMC 中 BDV p24 基因片段的检测结果

分组	标本	检测数	阳性数	阴性数	阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
VE 患者	PBMC	52	5	47	9.62	3.27	0.071
	CSFMC*	52	6	46	11.54	3.97	0.042
DD 患者	PBMC#	53	6	47	11.32	3.92	0.048
	PBMC	32	0	32	0	-	-
健康人	CSFMC	32	0	32	0	-	-
	PBMC	360	28	332	7.78	2.68	0.12

* 与健康人 CSFMC 比较, $P < 0.05$; # 与健康人 PBMC 比较, $P < 0.05$

2. BDV 基因序列同源性和氨基酸顺序分析: 国际上公认的 BDV 有代表性的可识别的开放读码框(open reading frame, ORF), 编码为磷蛋白(P, p24)作为研究对象, 用 FQ-nRT-PCR 扩增出宁夏及其周边地区 VE CSF、DD PBMC 和绵羊 PBMC 的目的基因片段, 并进行纯化、克隆和测序, 结果经 BLSAT 软件分析, 证明为 BDV p24 基因片段。与 GenBank 提供的标准病毒株 V 核苷酸序列比较同源性为 96.51%, 在 3 个位点出现突变(nt1649T→C, nt1670C→T, nt1673C→G), 突变率为 3.49%, 所编码的氨基酸大约为第 536~564 位氨基酸, 第 548 位的 A 由 V 代替, 第 555 位的 G 由 E 代替(图 1)。该目的基因变异程度小, 加上多数突变为无义突变, 所以氨基酸序列变异很小。

3. BDV 系统发生树分析: 应用 clustalx 1.83 软件, 将所测的 VE 患者 CSF、DD 患者 PBMC 和绵羊 PBMC 三者基因序列与 GenBank 提供的 25 个国外有代表性病毒株进行序列分析, 并绘制系统发生树

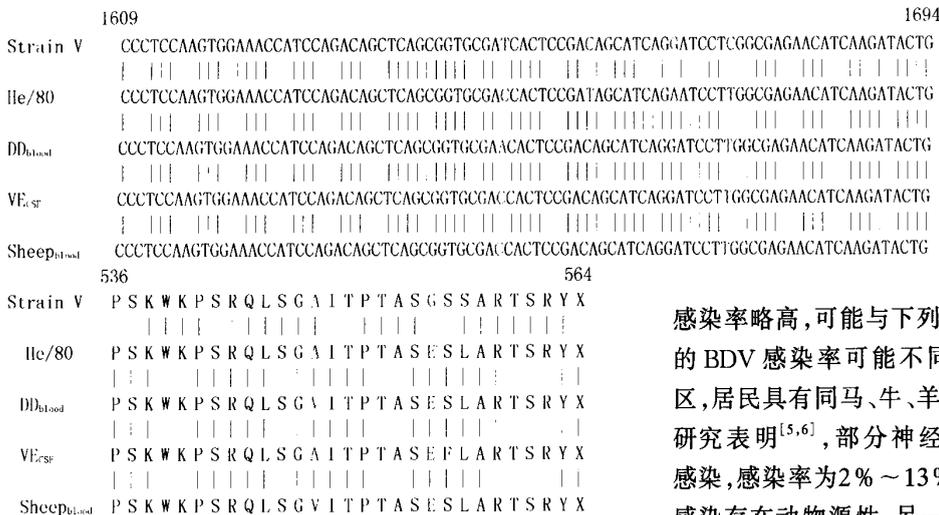


图1 PCR 扩增的目的基因片段与 GenBank 提供的标准病毒株 V 和 He/80 病毒株核苷酸和氨基酸序列对比

(图 2)。从发生树可以看出, 我们检测的 VE 患者的 CSF、DD 患者的 PBMC 和绵羊 PBMC 三者目的基因片段与德国 H1766、H544 和澳大利亚的 S88 病毒株核苷酸序列亲缘关系最近, 其同源性分别为 96.5%、96% 和 96%。

讨论

近年来病毒性感染疾病在世界许多国家呈爆发性流行, 如尼巴病毒(NiV)和西尼罗河病毒(WNV)脑炎, 导致感染区数千人短时间内迅速死亡; 2004 年以来发生的人感染禽流感病毒等都引起了人类恐慌和高度重视。BDV 可能也是新发感染性疾病中的一种病原体, 本研究采用 FQ-nRT-PCR 检测宁夏及其周边地区 VE 患者 PBMC 和 CSFMC、DD 患者、健康人和绵羊的 PBMC 中 BDV p24 基因片段。从地域分布上看(图 3): ①检测标本来源于 12 市区。52 例 VE 患者中血液 5 例(9.6%)和 CSFMC 6 例(11.5%)BDV p24 基因片段阳性; 32 名健康人均均为阴性。VE 患者 CSFMC 6 例阳性主要来自于宁夏固原市(2 例)、吴忠市和石嘴山市(各 1 例)及内蒙古乌海市和阿拉善左旗(各 1 例); DD 患者 PBMC 6 例阳性患者主要来自于宁夏固原市、中卫市、吴忠市和石嘴山市(各 1 例)、内蒙古乌海市(1 例)和陕西定边县(1 例); ②以宁夏吴忠市为界线, 进行南北区域划分, 结果 60% 阳性标本来自于北部地区, 75% 阳性标本分布于半农半牧区; ③经皮尔逊相关

性检验分析, 在 BDV 感染分布区中绵羊与人类 VE 和 DD 呈显著正相关 ($P < 0.05$)。

与国内外实验结果对比分析, 宁夏及其周边地区 BDV

感染率略高, 可能与下列因素有关: ①不同地域的 BDV 感染率可能不同, 宁夏处于半农半牧区, 居民具有同马、牛、羊等广泛的接触史; 国外研究表明^[5,6], 部分神经、精神疾病存在 BDV 感染, 感染率为 2%~13%, 一些学者认为 BDV 感染存在动物源性, 另一些认为接触马、牛、羊和猫等动物不能增加 BDV 血清抗体阳性率; 从该系统发生树分析, 检测的 VE 患者 CSF、DD 患者 PBMC 和绵羊 PBMC 三者目的基因片段

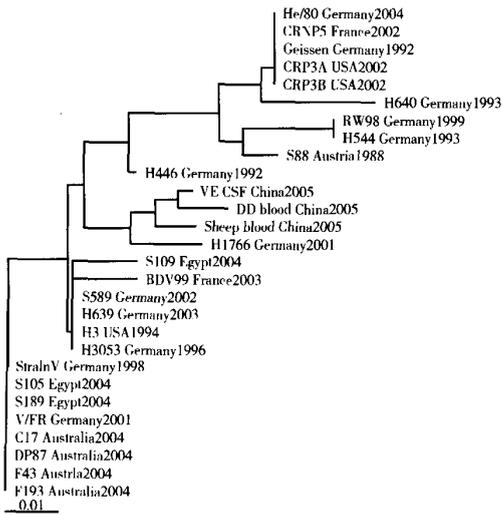


图2 BDV 系统发生树分析

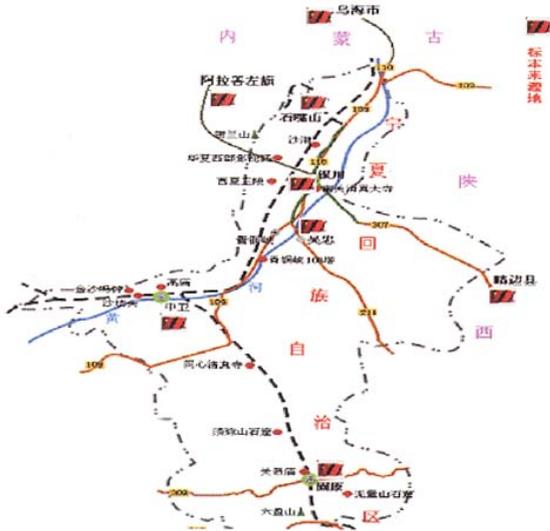


图3 宁夏及其周边地区 BDV 阳性患者和标本来源地的地理分布

与德国 H1766 病毒株核苷酸序列亲缘关系最近,来源于一个分支,其变异性较小,说明 BDV 流行有一定的地域局限性;绵羊 PBMC 目的基因片段与人类 VE 和 DD 患者核苷酸序列亲缘关系最近,来源于一个分支,提示可能存在人类感染的潜在动物源性,有待于进一步研究;②分离检测 PBMC 和 CSFMC 的方法不同可能影响检出率;③不同发病时期检测的阳性率可能也不同;本组检测 VE 患者是在出现症状后 15 天内行腰穿取 CSF, BDV 检测结果阳性率高于 15-35 天,其结论与 Davies 等^[7] 和 Davis, Tyler^[8] 报道相一致;④不同检测方法对检测结果也有很大的影响。FQ-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。但因血液中病毒 RNA 的水平低,若标本保存处理不当可出现假阴性或假阳性^[9]。这可能也是检测 BDV 人类感染阳性率差异较大的原因;FQ-nRT-PCR 在扩增反应中加入了特异性 2 个荧光标记的探针,增强了检测的特异性,避免了扩增产物后处理的可能污染所致的假阳性。本组资料统计提示,宁夏及其周边地区部分 VE、DD 可能与 BDV 或 BDV 相关病毒感染有关,健康绵羊存在 BDV 的自然感染,并可能具有一定的地域局限性;同时也可以看出,我们所检测的目的基因片段多数突变为无义突变,变异程度小,氨基酸序列高度保守,但由于缺乏 BDV 分离株,分子生物学性质研究相对较少,尚无法做出全面的解释。因此,需要对 BDV 感染的分子病毒学以及广泛的分子流行病学研究,进一步揭示 BDV 的流行规律,为预防和控制 BDV 打下基础。

(本课题部分实验在中山大学达安基因诊断中心完成,得到胡斌、王伟毅博士,王涛和乔颖枫技师的指导和帮助,谨此致谢)

参 考 文 献

- 1 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 Gen Virol*, 2005, 86:385-398.
- 2 Matsunaga H, Tanaka S, Sasao F, et al. Detection by radioligand assay of antibodies against Borna disease virus in patients with various psychiatric disorders. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12: 671-676.
- 3 邹德智, 谢鹏, 徐平, 等. 重庆地区精神病患者 Borna 病病毒感染的初步报道. *中华精神科杂志*, 2003, 36:228-230.
- 4 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病毒-p24 抗体的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17:85-87.
- 5 Chalmers RM, Thomas DR, Salmon RL. Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *QJM*, 2005, 98:255-274.
- 6 Thomas DR, Chalmers RM, Crook B, et al. Borna disease virus and mental health: a cross-sectional study. *QJM*, 2005, 98:247-254.
- 7 Davies NWS, Brown LJ, Gonde J, et al. Factors influencing PCR detection of viruses of in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 76:82-87.
- 8 Davis LE, Tyler KL. Molecular diagnosis of CNS viral infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 76:10.
- 9 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.

(收稿日期:2005-09-01)

(本文编辑:张林东)