

宁夏地区人畜 BDV p24 基因系统发生树构建和序列分析

刘建 柳英 王振海 谢鹏

【摘要】 目的 了解宁夏及其周边地区博尔纳病毒(BDV)的感染状况和基因特征及其种系发生来源。方法 采用巢式反转录实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-nRT-PCR),检测 119 例病毒性脑炎(VE)患者和其密切接触的患病或健康牛 205 头、绵羊 978 只及脑血管病患者 46 例、多发硬化患者 13 例的外周血单核细胞 BDV p24 片段,检出的阳性序列连同前期检出的宁夏绵羊、VE 患者和抑郁症患者阳性 BDV p24 基因序列与 GenBank 中 5 个国家 7 个动物种属 29 例 BDV p24 基因序列进行比对,分析其核苷酸和氨基酸序列的同源性,重新构建基因系统发生树。结果 23 例阳性检测标本连同 3 例前期检测序列基因聚合分析显示核苷酸之间的同源相似度为 96.5% ~ 100.0%,氨基酸的同源相似度为 95.3% ~ 100.0%。与德国马源性标准株 HE80 同源相似度较高。构建基因的系统发生树发现宁夏绵羊、VE 患者和抑郁症患者同德国马和绵羊、奥地利马都各自形成了独立的支系,其余样本形成混合支系,其中宁夏的 VE 患者、牛、绵羊同德国马、日本绵羊形成德国-中国宁夏-日本混合支系。结论 宁夏及其周边地区人和动物 BDV 的感染,存在区域性 BDV 独立株和国外传入基因保守株的多源状态。

【关键词】 博尔纳病毒; 病毒性脑炎; 种系发生学; 牛; 绵羊

Construction of phylogenetic tree and sequence analysis on BDV p24 gene in both livestock and host in Ningxia LIU Jian¹, LIU Ying¹, WANG Zhen-hai¹, XIE Peng². 1 Department of Neurology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2 Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University
Corresponding author: WANG Zhen-hai, Email: wangzhenhai1968@163.com
This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA02Z196); National Natural Science Foundation of China (No. 30760067); Natural Science Foundation of Ningxia (No. NZ0790); The 42nd China Postdoctoral Science Foundation (No. 20070420721)

【Abstract】 Objective To gain detailed insights into the Borna disease virus infection and its genetic characteristics and phylogeny in Ningxia, China. **Methods** BDV p24 segment were detected by fluorescence quantitative nested RT-PCR from peripheral blood mononuclear cells of 119 patients with viral encephalitis, 205 cattle, 978 sheep, 46 patients with cerebrovascular diseases and 13 patients with multiple sclerosis. Data from phylogenetic analysis on BDV p24 positive samples together with those from the positive gene sequences of animals and patients in the previous studies in Ningxia, were compared to the 29 sequences provided by the GenBank from 7 animals in 5 countries. Both the sequence homologous similarity of the nucleotide and amino acid sequences were analyzed and gene phylogenetic tree was reconstructed. **Results** Data from 23 collections of positive test samples, together with the ones from early detection of gene sequence analysis, showed that the homologous similarity sequences of both nucleotide and amino acid was between 95.3% and 100.0% and highly homophylic with HE80 that detected from ill horses in Germany. One part of nucleotide sequences formed the 'Ningxia independent branch' while the other one belonged to the 'Germany - Ningxia - Japan mixed branch'. There was a high identity within the branch. **Conclusion** A Ningxia independent BDV strain from geographical origin might exist while the epidemic strains were imported with multiple sources.

【Key words】 Borna disease virus; Viral encephalitis; Phylogeny; Cattle; Sheep

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.02.018

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA02Z196); 国家自然科学基金(30760067); 宁夏自然科学基金(NZ0790); 中国博士后科学基金(20070420721)

作者单位: 750004 银川, 宁夏医科大学附属医院神经内科(刘建、柳英、王振海); 重庆医科大学第一附属医院神经内科(谢鹏)

通信作者: 王振海, Email: wangzhenhai1968@163.com

博尔纳纳病毒(BDV)是人畜共患病博尔纳病的病原体,可引起多种动物和人中枢神经系统感染。病毒在人群中感染主要影响中枢神经系统,出现各种神经精神症状或病毒性脑炎(VE)的非特异性临床症状,动物感染可引起致死性的脑炎。BDV 基因全长约 8.9 kb,非分节段,分别编码相对分子质量(M_r)为 40×10^3 核蛋白(N)、 24×10^3 磷蛋白(P)、 10×10^3 基质蛋白(M)、 16×10^3 糖蛋白(G)、 56×10^3 L-多聚酶以及 180×10^3 的 X 蛋白。Bode 等^[1]研究发现磷蛋白 P24 和核蛋白 P40 在种系中具高度保守性。因此国内外通常研究 P40 和 P24 作为检测 BDV 的生物学指标^[2]。近年来,在我国多个省市检测到 BDV 的感染,在宁夏地区也有报道^[3],但尚未做 BDV 大样本检测和系统研究其自然感染来源、系统发生等。为此本研究应用巢式反转录实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-nRT-PCR)对宁夏地区 VE 患者、脑血管病患者及动物牛羊的检测,对阳性基因序列进行系统发生学分析,探讨宁夏地区人和动物 BDV 自然感染的种系形成及其可能原因。

材料与方法

1. 研究对象:收集 2007 年 9 月至 2009 年 5 月期间在宁夏医科大学附属医院神经内科收治的 VE 患者 119 例、脑血管病患者 46 例、多发硬化病患者 13 例;患者年龄 18~87 岁;其中男性 101 例,女性 77 例。所有研究对象均采集外周血 5 ml。对宁夏吴忠、永宁、固原、中卫地区有发病症状和无症状动物牛 205 头、绵羊 978 只采血 10 ml。血样 EDTA 抗凝。

2. 主要试剂及仪器:检测设计两套引物。外引物:p1 5'-TCA GAC CCA GAC CAG CGA A-3', p2 5'-ATC TGG GGA TAA ATG CGC G-3';内引物:p1 5'-CCC TCC AAG TGG AAA CCA T-3', p2 5'-CAG TAT CTT GAT GTT CTC GCC A-3';探针序列为:5'-(FAM) TCA GCG GTG CGA CCA CTC CGA TAG C(TAMRA)-3',均由美国 Invitrogen 公司合成;荧光定量 PCR 仪:ROTOR GENE 6000(澳大利亚 Corbett 公司)。所用吸头、试管、EP 管等均购自美国 Axygen 公司的去酶、硅化材料。

3. 研究方法:

(1)提取总 RNA:将采集的 EDTA 抗凝血 5 ml,用人淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞(PBMCs),再按照 RNAiso™ Plus RNA 提取试剂提取总 RNA。提取的 RNA 保存在 -80°C 冰箱。SPSS 随机数字选取 10 例 RNA 样本用紫外分光光度计测

吸光度(A)值,计算 A_{260}/A_{280} 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。

(2)PCR 检测:①BDV P24 序列的荧光定量 PCR 检测:反转录反应体系包括反应液 7 μl , 反转录酶 1 μl , DEPC 水 7 μl , RNA 模板 5 μl , 总反应体系 20 μl ; 反应条件: 37°C , 1 h。反转录产物进行第一次 PCR 扩增。反应体系包括反应液 8 μl , Taq 酶 1 μl , 去离子水 11 μl , 模板 5 μl , 总反应体系 25 μl ; 反应条件: 93°C 4 min 预变性,然后按 94°C 30 s, 72°C 60 s, 重复 20 个循环。第二次 PCR 扩增,同时检测荧光值,获得标准曲线和样本测定的 C_t 值。反应体系包括反应液 14 μl , Taq 酶 1 μl , 去离子水 30 μl , 模板 5 μl , 总反应体系 50 μl ; 反应条件: 93°C 3 min 预变性,然后按 93°C 45 s, 55°C 60 s, 重复 40 个循环。每一步反应均设阴性对照,对照标准曲线拷贝数在 10^4 以上为阳性。②BDV P40 序列的荧光定量 PCR 检测:反转录反应之后对产物进行 PCR 反应,上游引物为: 5'-AGT CAC CGC GCG ATA GTT T-3', 下游引物为: 5'-CGA CAG GTA GGA TTC ACG AGG C-3'。PCR 反应条件:采用降落 PCR 扩增, 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, ($66\sim 58^\circ\text{C}$, 每两个循环降 2°C) 30 s, 72°C 1 min, 共 10 个循环, 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。反应产物 3% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物为 154 bp。

(3)测序和建立病毒基因系统发生树:将两个保守区 P24 和 P40 检测均为阳性标本的 P24 序列产物做纯化、连接测序(上海英骏生物技术有限公司),并对测序结果应用 MEGA4.0、DnaSP4.0 和 EMBL 软件同国外标准病毒株进行基因序列比对分析,建立 BDV 基因系统发生树,推断病毒株种系发生关系。再将阳性产物 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、犬、牛、驹、羊驼)的 33 份 BDV p24 基因序列和前期宁夏地区 BDV p24 片段阳性的 44 份动物(牛、绵羊)和 18 例患者(VE、抑郁症) p24 基因序列进行序列对比和进化分析^[3]。EMBL 分析核苷酸序列同源相似性、DnaSP4.0 和 MEGA4.0 软件分析差异度; MEGA4.0 软件构建 Neighbor-Joining 基因系统发生树。

4. 统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料 $\bar{x} \pm s$; 计数资料 Fisher 精确 χ^2 检验。

结 果

1. RNA 提取:外周血 RNA 提取后经电泳可见

3 个明显的亮条带,分别为 28S、18S 和 5S;随机取检测标本 20 份测定 A 值分别为 1.84、1.88、1.91、1.87、1.86、1.97、1.89、1.76、1.96、1.87、1.95、1.94、1.83、1.77、1.89、1.93、1.82、2.01、2.11、1.86,平均 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.2 之间。说明 RNA 提取完整性好,纯度较高,可进一步检测。

2. BDV P24 序列荧光定量 PCR 和 BDV P40 序列的 PCR 检测:荧光定量 PCR 标准曲线的 M 值为 -0.341(理想状态为 -0.33),相关系数(r^2)为 0.9978(理想状态为 1),满足构建标准曲线的要求。P24 [VE 患者阳性率为 10.08% (12/119),脑血管病患者(0/46)和多发硬化病患者(0/13)无阳性;牛阳性率为 12.68%(26/205),绵羊阳性率为 11.15%(109/978)],检测结果显示,荧光定量 PCR 曲线拷贝数在 10^4 以上,电泳后可见片段大小在 86 bp 左右的阳性条带与标准对照相同,说明其 P24 的检测为阳性。P40 [VE 患者阳性率为 5.88% (7/119),脑血管病患者(0/46)和多发硬化病患者(0/13)无阳性;牛阳性率为 1.46% (3/205),绵羊阳性率为 1.33% (13/978)]检测结果显示,PCR 电泳后与 P40 标准品相同,片段大小在 154 bp 左右。以上阳性标本中 2 个片段检测均为阳

性标本者确定为 BDV 感染的最终阳性标本,共计 23 份,其中 VE 患者 7 份、牛 3 份和绵羊 13 份。在前期试验检测中有 3 份阳性标本序列,其中 VE 患者 1 份、抑郁症患者 1 份和宁夏绵羊 1 份。

3. BDV P24 核苷酸和氨基酸序列分析:阳性测序样本核苷酸之间的同源相似度为 96.5%~100.0%,氨基酸同源相似度为 95.3%~100.0%。所有对比序列核苷酸总体差异度 $\pi=0.02$,平均核苷酸差异数 $k=1.32$,嘌呤碱基转换/颠换偏倚率 $k_1=6.108$,嘧啶碱基转换/颠换偏倚率 $k_2=40.909$,总体碱基的基转换/颠换偏倚 R (临界值为 2.0)为 12.39, Tajima's 中性检验 $D=-1.72(P<0.01)$ 。见表 1、2。

4. BDVp24 基因的聚合分析:BDV 检测阳性的 44 份动物、12 份 VE 患者和 6 份抑郁症患者核苷酸和氨基酸同源相似性分别与标准病毒株 HE80、Strain V 和 H1766 等比对分析,结果见表 3。

5. 系统发生学分析:重新构建系统的发生树,可见形成 12 个支系,其中有些支系是来自一些国家和地区的混合支系,如宁夏绵羊、VE 患者和抑郁症患者同德国马、绵羊及奥地利马都各自形成独立分支,其余样本则形成混合支系,其中宁夏 VE 患者、牛、绵

表 1 阳性 BDV 检测样本与标准株核苷酸序列对比

Table with 10 columns (病毒株, 1510, 1520, 1530, 1540, 1550, 1560, 1570, 1580, 1595) and 30 rows of nucleotide sequence alignments for various samples including HE80, Strain V, H1766, and various NX and NXshoop samples.

表 2 阳性 BDV 检测样本与标准株氨基酸

病毒株	536	546	556
HE80	PSKMKPSRQL	SGATTPIASE	SLARTSRY
StrainVI..T..G	..S.....
H1766T..G	F.SV.....
NX05050
NX05046
NX05103
NX05096
NX05291
NX05299
NX05315
NX02131
NX02141
NX02144
NX030075
NX030209
NX030215
NX030240
NX030352
NX030412T..
NX030413Y..
NX030588
NX030601
NX030607
NX030611
NX030622
NX030641
NXDDN..T..G
NXVET..G
NXsheepT..G

表 3 宁夏地区 BDV 阳性标本与标准株的同源相似度比较

序列	同源相似度(%)		
	HE80	Strain V	H1766
核苷酸	97.7 ~ 100(CS)	93.0 ~ 96.5(CS)	93.0 ~ 96.5(CS)
	97.7 ~ 100(VE)	93.0 ~ 96.5(VE)	93.0 ~ 96.5(VE)
	96.5(DD)	94.2(DD)	93.0(DD)
氨基酸	92.9 ~ 100(CS)	94.2 ~ 97.7(CS)	93.0 ~ 96.5(CS)
	92.9 ~ 100(VE)	95.3 ~ 97.7(VE)	94.2 ~ 96.5(VE)
	89.3(DD)	94.2(DD)	93.0(DD)

注:VE为病毒性脑炎患者;DD为抑郁症患者;CS为动物(牛、羊)

羊同德国马、日本绵羊形成了德国-中国宁夏-日本混合支系,且在混合支系中基因和氨基酸的同源相似度都很高,有 73.1% (19/26) 序列与 HE80 达到 100%,说明种系发生及其相近(图 1)。

讨 论

BDV 自 1894 年在德国博尔纳镇马群中暴发致死性脑炎而得名至今,已在世界许多地区有感染的报道,且不断在感染动物和患者中分离出该病毒株,所有分离病毒的基因序列都表现出明显的遗传稳定性,但也不乏独立种系株的出现。因此,有学者认为 BDV 的种系在世界范围内已形成地源性聚集分布

和种系交叉分布的共同特点^[4,5]。

BDV 基因中编码包绕病毒核酸的核衣壳 N 蛋白可与 P 和 L-多聚酶连接参与病毒早期入侵感染。P 蛋白主要介导病毒入侵机体以及调节 L-多聚酶的活性,BDV 的 P40 和 P24 核酸序列编码的 N 蛋白和 P 蛋白共同参与病毒核糖核酸蛋白复合物的的重要组成部分,并在病毒的感染中起关键作用。因此,p24 和 p40 基因片段的检测以及其编码蛋白的研究一直是关注的焦点^[6-8]。

本研究通过对宁夏地区人和动物中两种保守蛋白基因的检测发现:该地区患者和其接触的牛、羊动物不论在核酸序列,还是转录后的氨基酸序列上都有极高的同源相似度,提示存在动物和人之间的相互交叉传播感染。而 BDV 是一种罕见的 RNA 病毒,不同地源 BDV 株其核苷酸序列极少发生改变^[9]。Okamoto 等^[10]研究发现,在动物唾液、鼻黏膜中检出 BDV 核酸,因此推断人和动物之间的感染可通过动物的分泌物和雌性动物的垂直传播而传染。本研究与国外标准株的序列分析也显示出极高的相似度和一致性,并且在所有检测标本中均与 HE80 株达到极高的同源性。HE80 株是在德国南部的马脑组织中分离而来,在世界各地发现的感染病毒株中分布和传播最为广泛^[11]。因此,推断可能存在国外动物源性的传入感染。在重构的种系发生树分析结果中,宁夏绵羊、VE 患者和抑郁症患者同德国马、绵羊及奥地利马都各自形成独立的支系,其余样本形成混合支系,其中宁夏 VE 患者、牛、绵羊同德国马、日本绵羊形成德国-中国宁夏-日本混合支系,在混合支系中基因序列和来源有极高的同源性,因此推断宁夏地区 BDV 存在独立和传入的多源性。出现该现象的原因:①BDV 在世界分布具有明显的地源聚集性,也可在较大范围内出现稀疏分布^[12]。宁夏也是感染地区之一。②病毒株进化中自然选择和不同种属动物对基因序列变异压力不同,使地域中的 BDV 基因突变形成新的独株系^[5]。③宁夏自古以来就是各民族南来北往频繁的地区,自然环境干旱,昼夜温差变化大等多种独特地理位置和自然环境,也为病毒变异提供了条件。④宁夏地区牛、羊饲养种群数量大,而这些动物种群经由国内外繁殖培养,增加了境内外病毒相互交叉感染的概率。这些结论尚有待进一步完整病毒基因组的测序加以证实。

(感谢重庆医科大学徐鸣明、张英英、展群岭等博士的悉心指导)

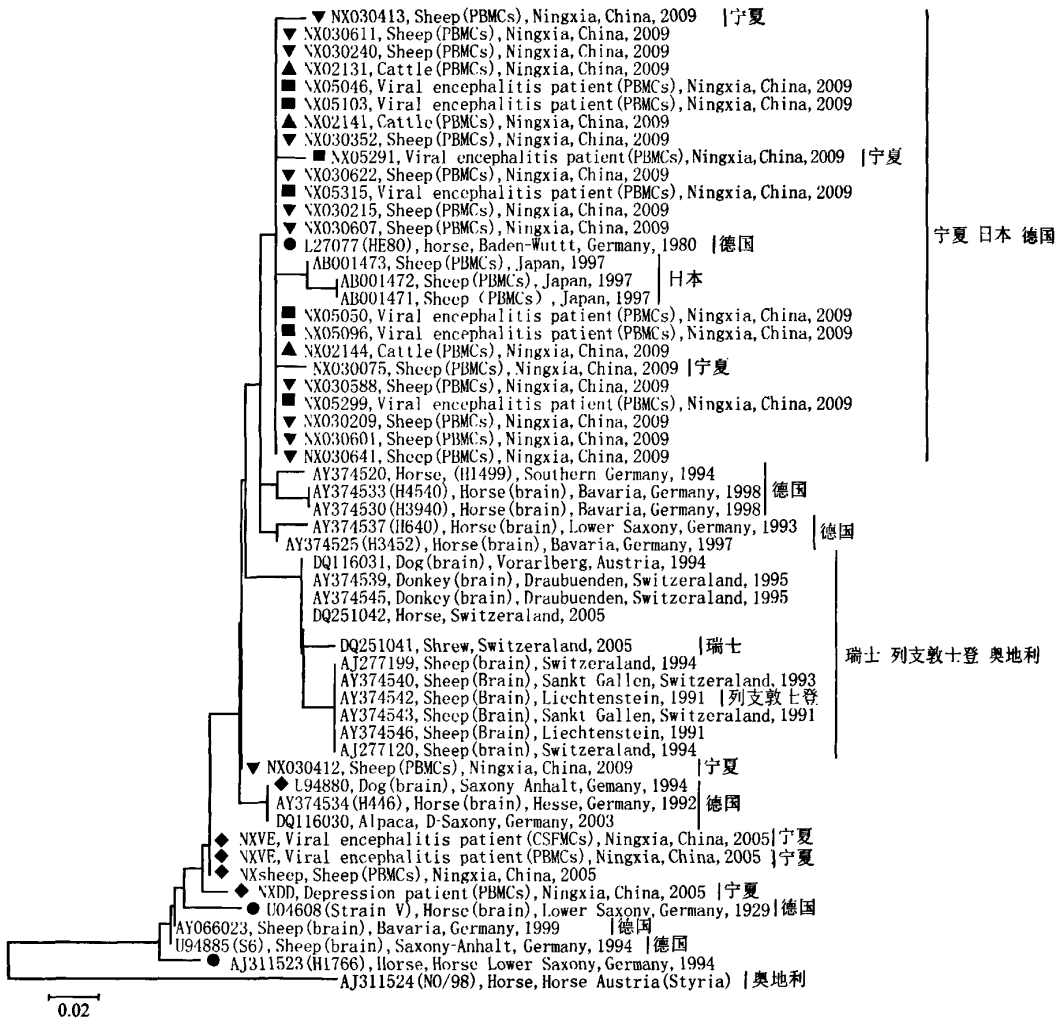


图1 宁夏VE患者和动物的重构BDV p24基因序列系统发生树

参考文献

[1] Bode L, Detlef E, Dietrich, et al. Biology of depression. Published Online. New York, Wiley, 2008:583-615.
 [2] Kamhieh S, Flower RL. Borna disease virus (BDV) infection in cats. A concise review based on current knowledge. Vet Q, 2006, 28(2):66-73.
 [3] Wang ZH, Xie P, Han YX, et al. Study on molecular epidemiology of Borna disease virus in Ningxia and vicinal regions. Chin J Epidemiol, 2006, 27(6):479-482. (in Chinese)
 王振海, 谢鹏, 韩玉霞, 等. 宁夏及其周边地区博尔纳病毒感染的分子流行病学研究. 中华流行病学杂志, 2006, 27(6):479-482.
 [4] 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(Pt 2):385-398.
 [5] Nowotny N, Kolodziejek J, Jehle CO, et al. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. J Virol, 2000, 74(12):5655-5658.
 [6] Rott R, Becht H. Natural and experimental Borna disease in animals. Curr Top Microbiol Immunol, 1995, 190:17-30.

[7] Kohno T, Goto T, Takasaki T, et al. Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. J Virol, 1999, 73(1):760-766.
 [8] Lou M, Green TJ, Zhang X, et al. Structural comparisons of the nucleoprotein from three negative strand RNA virus families. Virol J, 2007, 10(4):72.
 [9] Formella S, Jehle C, Sauder C, et al. Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may contribute to high genome stability in persistently infected cells. J Virol, 2000, 74(17):7878-7883.
 [10] Okamoto M, Hagiwara K, Kamitani W, et al. Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. Arch Virol, 2003, 148(8):1557-1568.
 [11] Durrwald R, Kolodziejek J, Herzog S, et al. Meta-analysis of putative human bornavirus. Rev Med Virol, 2007, 17(3):181-203.
 [12] Durrwald R, Kolodziejek J, Mulunch A, et al. 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.

(收稿日期:2009-09-15)
(本文编辑:张林东)