

## 博尔纳病病毒磷蛋白在 PC-12 细胞内的稳定表达及其增殖的影响

余建萍, 徐鸣明, 彭丹, 曾志磊, 张英英, 谢鹏\*

(重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016)

**摘要** 【目的】建立博尔纳病病毒磷蛋白在神经源性 PC-12 细胞内的稳定表达体系, 初步探讨博尔纳病病毒磷蛋白对 PC-12 细胞的生长是否有影响。【方法】培养 PC-12 细胞, 用阳离子脂质体的方法将带有博尔纳病病毒磷蛋白基因的表达质粒转染到细胞内进行稳定表达, 用荧光显微镜和 RT-PCR 的方法检测细胞内磷蛋白的表达, 用 MTT 方法检测磷蛋白对细胞生长的影响。【结果】转染细胞经培养 10 代后仍然表达目的蛋白, 成功建立稳定表达体系。MTT 检测显示博尔纳病病毒磷蛋白对 PC-12 细胞的生长具有明显的抑制作用, 其生长明显滞后, 但粘附能力增加。【结论】通过本文建立的体系能在 PC-12 细胞内稳定表达博尔纳病病毒磷蛋白, 该体系可用于进一步深入研究博尔纳病病毒磷蛋白的作用机制, 进而为研究博尔纳病病毒持续感染中枢神经系统的机制提供基础。此外本文通过检测细胞的增殖活性发现博尔纳病病毒磷蛋白对 PC-12 细胞的生长具有明显的抑制作用, 可能是博尔纳病病毒持续感染中枢神经系统的重要机制之一。

**关键词:** 博尔纳病病毒; 磷蛋白; PC-12 细胞; 增殖

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0123-05

博尔纳病病毒(Borna Disease Virus, BDV)是一种嗜神经性、单股负链 RNA 病毒, 主要感染马和羊, 但实验发现其宿主范围比我们认识的更为广泛, 可能包括人在内的所有温血动物, 有研究显示 BDV 通过调节病毒的多聚酶活性来适应新的宿主<sup>[1]</sup>。目前对 BDV 的研究主要集中在两个方面, 一方面是 BDV 是否感染人的问题, 流行病学研究在部分精神病人的血液和脑脊液中检测到 BDV 的主要抗原和核酸, 提示其感染可能与人类精神疾病相关<sup>[2-5]</sup>, 但由于病毒分离困难, 缺乏特异性和敏感性均很高的可靠的诊断方法, BDV 与人类疾病的关系至今仍未有结论; 另一方面是 BDV 的发病机制, BDV 主要侵犯神经元, 有时也累及神经胶质细胞、施旺细胞和室管膜细胞<sup>[6-7]</sup>。博尔纳病病毒致病主要由抗 BDV 的 CD8

+ T 细胞介导的免疫反应引起<sup>[8-9]</sup>, 但是 BDV 也可以感染免疫系统尚未发育完善的新生大鼠, 并导致行为障碍、学习和记忆能力降低等中枢神经系统表现, 说明非免疫学致病机制在博尔纳病中也发挥重要作用, 包括抑制神经递质及其受体的表达、影响神经营养因子及信号传导、分子模拟机制及影响神经可塑性等<sup>[10-16]</sup>。本研究拟通过建立持续表达 BDV 磷蛋白的细胞模型, 为进一步研究 BDV 的非免疫学发病机制提供条件, 同时初步探讨 BDV 磷蛋白对 PC-12 细胞增殖的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒: PC-12 细胞购自上海中国科

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA02Z196)

\* 通信作者。Tel: +86-23-68485490; Fax: +86-23-68485111; E-mail: Peng.Xie58@gmail.com

作者简介: 余建萍(1983-), 女, 四川乐山人, 硕士研究生, 研究方向为中枢神经系统感染。E-mail: 507208@163.com

收稿日期: 2008-08-28; 修回日期: 2008-10-14

学院细胞库,含 BDV 磷蛋白的荧光表达质粒(pEGFP-BDV P24)及其空质粒(pEGFP N1)由张凤民教授惠赠, DH5 $\alpha$  感受态细胞由重庆医科大学基础研究所冻存。

**1.1.2 主要仪器和试剂:**水浴锅(荣华 HH-W420)、摇床(orbital shaker TS-1)、普通离心机(湘仪 TDZ5-WS)、凝胶成像分析系统(BIO-RAD GelDoc 2000)、分光光度计(GE Healthcare Gene Quant pro)、荧光显微镜照相系统(Nikon SMZ-10A 和 FDX-35)、低温离心机(HERMLE Z 233 MK-2)、普通 PCR 仪(ependorf)、酶标仪(TECAN SUNRISE 91-TY4414)、LB 培养基(实验室自配)、质粒小抽试剂盒(Bioflux)、卡那霉素(GIBCO 公司)、新生胎牛血清(天津 TBD-science)、DMEM/F12 培养基、PBS 和胰酶由实验室自配、Opti-MEM 培养基(invitrogen)、transfectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagen(invitrogen)、G418 抗生素(GIBCO 公司)、Trizol(TaKaRa)、RT 试剂盒(TaKaRa)、PCR 试剂盒(Qiagen)。

**1.1.3 引物:**针对 BDV 磷蛋白的基因设计引物为: 5'-AAGCTTCCCTCCAAGTGGAAACCATC-3' 和 5'-GTCGACCAGTATCTTGATGTTCTCGC-3', 反应产物的长度为 96bp。选大鼠的 GAPDH 作为内参, 上游引物为: 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3', 下游引物为: 5'-GTGGAAGAATGGGAGTTGCTGT-3', 反应产物的长度为 610bp。

### 1.2 pEGFP-BDV P24 质粒的构建

将质粒 pEGFP-BDV P24 和 pEGFP N1 分别转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在含有卡那霉素的 LB 培养基上铺板, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。挑取单克隆菌落进行质粒抽提, 将抽提出的质粒进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并用分光光度计测定浓度。在确定大小正确后, 将质粒送测序, 将测序结果在 NCBI GenBank 中进行 Blast。

### 1.3 细胞培养和转染

PC-12 细胞用 DMEM/F12 培养基, 加入 10% 胎牛血清, 4cm $\times$ 7.5cm 培养瓶, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。按照转染试剂说明进行转染, 转染后 6h 换液, 24h 后观察荧光。荧光表达量达到 10% 时加 G418(终浓度 1000  $\mu$ g/mL)进行筛选, 3~5 d 后, 未转染成功的细胞大量死亡, G418 浓度减半维持剂量培养, 筛选过程中用 20% 胎牛血清培养。

### 1.4 RT-PCR 鉴定 BDV P24 的表达

为了检测各组细胞内 BDV 磷蛋白的表达情况, 针对 BDV 磷蛋白的 mRNA 进行 RT-PCR。采用异硫

氰酸胍-酚-氯仿法提取各组细胞的总 RNA, 按照 RT 试剂使用说明进行逆转录反应。PCR 反应体系共 20  $\mu$ L, 包括 PCR Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L 及逆转录产物 1  $\mu$ L。反应条件是: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 细胞活性检测

分转染 pEGFP-BDV P24 的细胞组(P)、转染 pEGFP N1 空质粒的细胞组(N)、未转染的细胞组(W)和培养基作为空白对照组(Nc)。收获细胞后进行细胞计数, 于 96 孔板内每孔接种细胞 5000 个, 每组细胞接种 3 个孔, 24h 重复种板一次, 第 4 天将所有细胞用 MTT 检测其生长速度, 并描绘生长曲线, 组间差异的统计方法采用方差分析(SPSS16.0),  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 质粒的扩增和鉴定

将扩增的质粒进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1), 结果证实 pEGFP-BDV P24 质粒为 5.4 kb 大小条带, 为 pEGFP N1 质粒(4.7 kb)和 BDV(700 bp)磷蛋白基因大小的和。为排除质粒扩增过程中可能出现点突变的可能性, 将质粒送测序, 测序结果与 NCBI GenBank 中序列号 AJ246873.1 的序列完全吻合, 证实质粒中插入片段为 BDV 磷蛋白的全基因序列, 可用于 BDV 磷蛋白的表达实验。

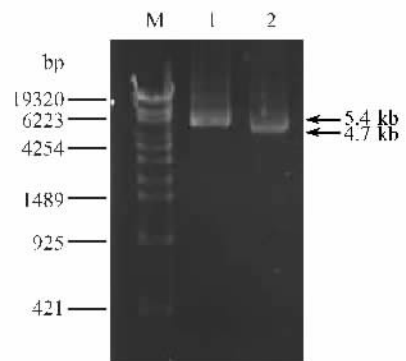


图 1 质粒鉴定电泳图

Fig. 1 Definition of the plasmid as 5.4 kb. M:  $\lambda$  DNA/EcoR III marker; 1: pEGFP-BDV P24 plasmid; 2: pEGFP N1 plasmid. The size of pEGFP N1 plasmid is 4.7 kb. The size of pEGFP-BDV P24 plasmid is 5.4 kb.

### 2.2 荧光显微镜观察转染细胞

将 pEGFP-BDV P24 和 pEGFP N1 空质粒分别转染到 PC-12 细胞中, 由于该质粒在插入的 BDV 磷蛋白基因前有一个绿色荧光蛋白的基因, 在细胞内表达的目的蛋白末端会带上绿色荧光蛋白, 这样在荧

光显微镜下就可以观察到目的蛋白在细胞内的表达情况。转染后 24 h 观察荧光,可见 BDV 磷蛋白具有明显的核定向,仅在细胞核内能看见绿色荧光,而 pEGFP N1 空质粒的绿色荧光蛋白主要在细胞浆中表达(图 2)。由于 PC-12 细胞贴壁较差,在阳离子脂质体转染的过程中容易脱落死亡或者细胞状态不好,所以转染效率比较低,24 h 观察荧光时荧光表达量不足 10%。48h 后加用 G418 进行筛选,由于 pEGFP N1 质粒能够使细胞具有抗 G418 的抗性,转

染了质粒的细胞能够生存下来,而部分未转入质粒的细胞将被杀死,筛选后的细胞荧光表达量明显增加。经传 10 代后仍然表达荧光认为是稳定转染的细胞,可用于下游试验。在传代和换液的过程中,可以观察到 P 组细胞的贴壁能力明显比 N 和 W 组强,在各组细胞中加入 3 ml 温浴的 PBS 清洗 2 遍后,W、N、P 组细胞分别有 50%、40%、10% 的细胞脱落。传代时在各组细胞内加入 15 滴胰酶后,W、N、P 组细胞全部消化所需要的时间分别是 60 s、80 s、90 s。

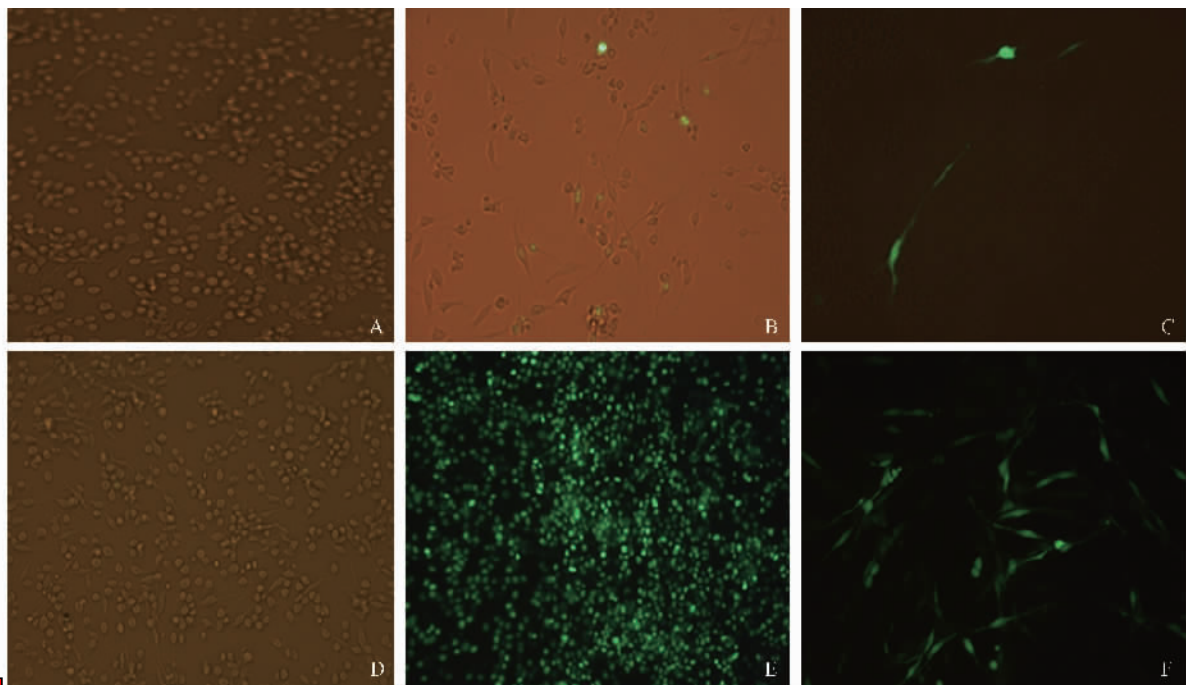


图 2 细胞转染前后的荧光表达情况(200×)

Fig.2 Expression of fluorescent protein in pro- and post-transfected PC-12 cells (200×). (A, D): non-transfected cells; (B, E): pEGFP-BDV P24 transfected cells; (C, F): pEGFP N1 transfected cells; (B, C): 24h after transfection; (E, F): the 10<sup>th</sup> generation of transfected cells. Green fluorescent protein(GFP) alone appears in cytoplasm(C), but with BDV phosphoprotein GFP stays in nucleus only(B). Treated with G418, GFP was increased significantly(E, F).

### 2.3 RT-PCR 鉴定 BDV 磷蛋白的表达

为了进一步证实 BDV 磷蛋白的稳定表达体系建立成功,使用 RT-PCR 的方法检测各组细胞中磷蛋白的表达情况,以 GAPDH 作为内参(图 3-B),结果显示有且只有 P 组细胞内有磷蛋白基因的表达(图 3-A),说明转染及筛选成功。

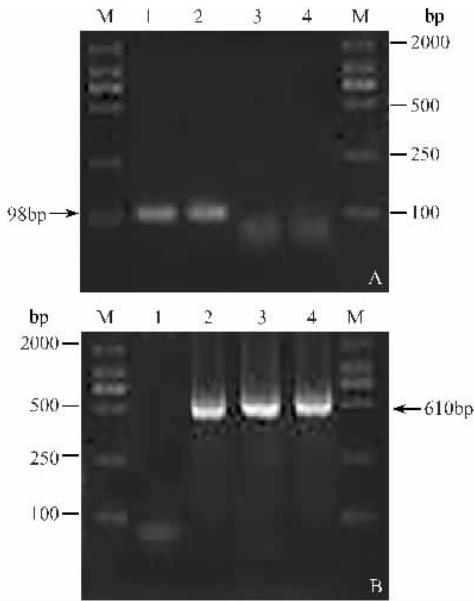
### 2.4 细胞活性鉴定

为了明确磷蛋白对细胞的生长是否有影响,使用 MTT 检测各组细胞活性。由于空质粒中绿色荧光蛋白的表达对细胞的生长也有一定的干扰,N 组细胞较 W 组细胞生长稍慢,但 P 组细胞的生长明显慢于 N 组和 W 组细胞,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 P 组细胞生长缓慢是表达磷蛋白的作用,而非单纯是质粒的作用(图 4)。

## 3 结论

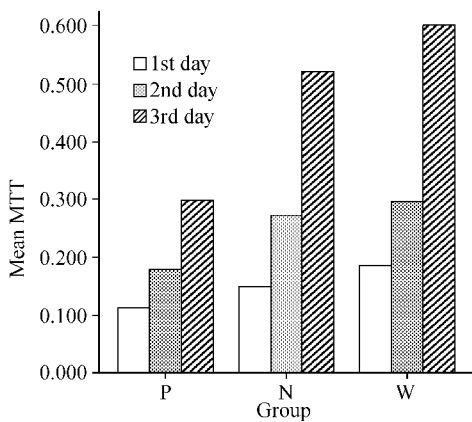
BDV 具有强嗜神经性,首先通过特异性的糖蛋白识别、结合并感染神经元,再通过细胞与细胞间的传播扩散到神经胶质细胞<sup>[17]</sup>,并可长期寄居在神经系统内而不被机体免疫系统清除,明确其致病机制对许多神经系统的疾病及病毒持续感染的研究具有重要的意义。

本实验将 pEGFP-BDV P24 转染到 PC-12 细胞中,经培养 10 代后仍然表达目的蛋白,建立了 BDV 磷蛋白的稳定表达体系,以绿色荧光蛋白作为标记直接用荧光显微镜观察磷蛋白的表达情况。该体系可用于进一步深入研究 BDV 磷蛋白的作用,及博尔纳病的非免疫学发病机制。用神经元细胞模型研究



### 3 各组细胞表达 BDV 磷蛋白的情况

Fig.3 Expression of BDV phosphoprotein in three groups of cells. A shows the PCR products of BDV phosphoprotein(98bp), B shows the PCR products of GAPDH(610bp). M: DL 2000 DNA marker; 1: the PCR product of pEGFP-BDV P24 plasmid; 2: the PCR product of PC-12 cells treated with pEGFP-BDV P24 plasmid; 3: the PCR product of PC-12 cells treated with pEGFP N1 plasmid; 4: the PCR product of non-treated PC-12 cells. In the three groups of cells, only cells treated with pEGFP-BDV P24 plasmid express BDV phosphoprotein.



### 4 BDV 磷蛋白对 PC-12 细胞生长的影响

Fig.4 BDV phosphoprotein depress the proliferation of PC-12 cell. P: cells treated with pEGFP-BDV P24 plasmid; N: cells treated with pEGFP N1 plasmid; W: cells untreated. 5000 cells of three groups were seeded in a pore. Every group had three copies in every 24h. The MTT values were detected by the OD of 570nm. Compared with N and W, the proliferation of P was significantly depressed ( $P < 0.05$ ).

BDV 的发病机制,排除了机体内免疫系统的干扰,单纯研究单个蛋白对神经细胞的直接作用。但由于原代神经细胞仅能存活 2 周左右,且无法将质粒转染到原代神经细胞内,所以我们选择 PC-12 细胞代替原代神经细胞。PC-12 细胞是大鼠的嗜铬细胞瘤

细胞,来源于神经外胚层,具有神经元的特性,分泌儿茶酚胺类神经递质,是研究神经生物学的主要细胞之一。由于 PC-12 细胞贴壁能力差且具有神经元特性,所以转染效率很低,本实验中转染后 24 h 观察荧光表达量不足 10%,经筛选足够时间后细胞内的荧光表达量也增多,本实验稳定表达的细胞体系中荧光表达量达到 80% 左右。

我们用 MTT 的方法检测各组细胞的增殖活性,发现表达 BDV 磷蛋白的细胞其生长明显慢于对照组细胞,说明 BDV 磷蛋白对 PC-12 细胞的增殖有抑制作用。在 BDV 感染的动物和细胞中其磷蛋白的含量非常丰富,因此磷蛋白很可能通过与某些细胞因子结合而诱导被感染细胞或脑组织的功能改变。Wataru 等以重组的 BDV 磷蛋白作为探针,用 Western blot、层析、微序列分析等方法研究显示 BDV 磷蛋白能与各种细胞提取物中的两性酸碱兼性蛋白结合,该蛋白是一种轴突生长因子,富含于发育阶段的大脑组织中<sup>[18]</sup>。因此 BDV 磷蛋白对神经细胞生长的抑制作用可能与抑制神经营养因子的表达有关。本实验中我们还观察到表达 BDV 磷蛋白的细胞贴壁能力较对照组强,可能与 BDV 磷蛋白改变神经细胞的突出生长从而影响了细胞骨架有关,但在本实验中未观察到明显的细胞形态的改变,可能是因为改变比较轻微或者放大倍数不够等,尚需要进一步实验验证。

### 参考文献

- [1] Ackermann A, Staeheli P, Schneider U. Adaptation of Borna disease virus to new host species attributed to altered regulation of viral polymerase activity. *Journal of Virology*, 2007, 81(15):7933-7940.
- [2] 张爱英,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 (Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology)* 2003, 17(1):85-87.
- [3] 王振海,谢鹏,杨平,等.病毒性脑炎患者血液和脑脊液博尔纳病毒 p24 的检测. *中华神经科杂志 (Chinese Journal of Neurology)* 2006, 39(2):105-108.
- [4] Miranda HC, Nunes SOV, Calvo ES, et al. Detection of Borna disease virus p24 RNA in peripheral blood cells from Brazilian mood and psychotic disorder patients. *Journal of Affective Disorders*, 2006, 90(1):43-47.
- [5] Chalmers RM, Thomas DR, Salmon RL. Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *Quarterly Journal of Medicine*, 2005, 98(4):255-274.

- [ 6 ] Carbone KM , Moench TR , Lipkin WI. Borna disease virus replicates in astrocytes , Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats : location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* , 1991 , 50( 3 ) : 205 - 214.
- [ 7 ] Rauere M , Gotz J , Schuppli D , et al. Transgenic mice expressing the nucleoprotein of Borna disease virus in either neurons or astrocytes : decreased susceptibility to homotypic infection and disease. *Journal of Virology* , 2004 , 78( 7 ) : 3621 - 3632.
- [ 8 ] Hausmann J , Baur K , Engelhardt KR , et al. Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice. *Journal of General Neurology* , 2005 , 86( Pt 2 ) 399 - 403.
- [ 9 ] Hausmann J , Pagenstecher A , Baur K , et al. CD8 T cells require gamma interferon to clear Borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *Journal of Virology* , 2005 , 79( 21 ) : 13509 - 13518.
- [ 10 ] 董云霞 , 李小光 , 宋武琦 , 等. 博尔纳病病毒感染对新生大鼠脑内单胺类受体基因转录的影响. 中华实验和临床病毒学杂志( *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology* ) 2006 , 20( 4 ) 321 - 323.
- [ 11 ] Hans A , Syan S , Crosio c , et al. Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC-12 cells. *Journal of Biological Chemistry* , 2001 , 276( 10 ) : 7258 - 7265.
- [ 12 ] Volmer R , Prat CMA , Masson GL , et al. Borna disease virus infection impairs synaptic plasticity. *Journal of Virology* , 2007 , 81( 16 ) 8833 - 8837.
- [ 13 ] Zhang G , Kobayashi T , Kamitani W , et al. Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *Journal of Virology* , 2003 , 77( 22 ) : 12243 - 12251.
- [ 14 ] Volmer R , Prat CM , Le Masson G , et al. Borna disease virus infection impairs synaptic plasticity. *Journal of Virology* , 2007 , 81( 16 ) 8833 - 8837.
- [ 15 ] Kamitani W , Ono Etsuro , Yoshino S , et al. Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral and neurological abnormalities in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2003 , 100( 15 ) 8969 - 8974.
- [ 16 ] 赵立波 , 李亚军 , 张小东 , 等. 博尔纳病病毒感染对神经元可塑性影响的研究进展. 微生物学报( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2006 46( 4 ) 676 - 679.
- [ 17 ] Clemente R , de la Torre JC. 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. *Journal of Virology* , 2007 , 81( 11 ) : 5968 - 5977.
- [ 18 ] Wataru K , Yuko S , Takeshi K , et al. Borna disease virus phosphoprotein binds a neurite outgrowth factor , amphoterin/ HMG-1. *Journal of Virology* , 2001 , 75( 18 ) 8742 - 8751.

## Expressing Borna disease virus phosphoprotein in PC-12 cell and its influence on the cell proliferation

Jianping Yu , Mingming Xu , Dan Peng , Zhilei Zeng , Yingying Zhang , Peng Xie \*

( Department of Neurology , the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University , Chongqing 400016 , China )

**Abstract [ Objective ]** To establish stable expressing system of Borna disease virus( BDV ) phosphoprotein in PC-12 cells , and then study its influence on cell proliferation of PC-12 cells. **[ Method ]** An expression plasmid with green fluorescence protein was cloned and identified to express BDV phosphoprotein. Cultured PC-12 cell was transfected with the recombinant plasmid by positive ion lipidsome method. Fluorescence microscopy was used to detect the expression of phosphoprotein in PC-12 cells , then G418 was added into cell culture medium to kill cells without recombinant plasmid. We performed reverse transcriptase polymerase chain reaction( RT-PCR ) in the 10th generation of treated cells to examine the expression of BDV phosphoprotein. The proliferation of treated cells and control cells was examined by methyl thiazolyl tetrazolium assay ( MTT ). **[ Result ]** The recombinant plasmid was confirmed to be able to express BDV phosphoprotein and green fluorescence protein by both fluorescence microscopy and RT-PCR. BDV phosphoprotein expressed in PC-12 cell inhibited cell proliferation. **[ Conclusion ]** We established a stable expressing system of BDV phosphoprotein in PC-12 cell. This cell model can be used to study the effect of BDV phosphoprotein on the centre nervous system without exposure to live virus.

**Keywords :** Borna disease virus ( BDV ) ; phosphoprotein p24 ; PC-12 cell ; proliferation

( 本文责编 : 王晋芳 )