

病原微生物与疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000761

博尔纳病病毒通过磷蛋白调节 miR-134 影响人少突胶质瘤细胞的增殖研究

白顺杰, 周婵娟, 王明菊, 谢 鹏
(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)在感染宿主细胞中, miR-134 对人少突胶质瘤细胞(oligodendrocyte, OL)增殖水平的影响。**方法:**应用 real-time PCR 方法检测正常的 OL 细胞和 BDV 感染的 OL 细胞(OL/BDV)中的 miR-134 表达水平, 同时分别将 BDV phosphoprotein(P24), nucleoprotein(P40)蛋白真核表达载体转染 OL 细胞, 检测对 miR-134 的作用; 通过 miR-134 过表达和 BDV 感染 OL 细胞, 采用流式细胞仪检测 miR-134 和 BDV 对 OL 细胞增殖的影响。**结果:**real-time PCR 表明 miR-134 在 OL、OL/BDV 细胞中的表达出现明显差异($P=0.000$), 并且 BDV 中的 P24 蛋白对 miR-134 有明显的上调作用($P=0.000$), 但 P40 对 miR-134 没有明显作用($P=0.139$); 流式细胞仪结果显示 miR-134 过表达($P=0.016$)和 BDV 感染($P=0.001$)均可以抑制 OL 细胞的增殖能力。**结论:**BDV 感染可通过 P24 蛋白上调 OL 细胞中 miR-134 的表达, 进而导致细胞增殖水平下降。

【关键词】博尔纳病病毒; 少突胶质瘤细胞; miR-134; P24; 增殖

【中图分类号】R741.02

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-02-02

Borna disease virus encoded phosphoprotein down-regulates the proliferation of human oligodendrocytes by regulating miR-134

Bai Shunjie, Zhou Chanjuan, Wang Mingju, Xie Peng
(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the proliferation of oligodendrocyte(OL) cells induced by miR-134 in Borna disease virus(BDV) infection. **Methods:** The expression levels of miR-134 in OL and OL/BDV were detected by real-time PCR. BDV phosphoprotein(P24) or nucleoprotein(P40) gene expression vector was used to transfect OL cells respectively; the effects of BDV P24 and P40 proteins on the expression of miR-134 were detected by real-time PCR. The OL cells proliferation ability was investigated by flow cytometry(FCM), along with miR-134 transfection and BDV infection. **Results:** There were significant differences in expression of miR-134 between OL and OL/BDV cells by real-time RT-PCR($P=0.000$). The expression of miR-134 was significantly increased by BDV P24 overexpression($P=0.000$), but not by BDV P40($P=0.139$). Both overexpression of miR-134($P=0.016$) and BDV infection($P=0.001$) down-regulated the proliferation of OL cells. **Conclusion:** BDV P24 protein down-regulates the proliferation of OL cells by up-regulating miR-134.

【Key words】Borna disease virus; oligodendrocyte; miR-134; P24; proliferation

博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)作为一种具代表性且研究最为集中的与精神疾病有关的病毒^[1], 是一种非分节段单股负链有包膜 RNA 病

毒, 具有高度嗜神经细胞性。BDV 基因组全长 8.9 kb, 有 6 个可识别的开放读码框(open reading frame, ORF), 其中以编码 BDV 核蛋白(P40)和磷蛋白(P24)的 ORF 最具有保守性, 并且对病毒感染人类起到主要作用, 同时可用于检测 BDV 感染^[2-3]。有研究显示 BDV P24 蛋白通过干扰 HMGB1 来抑制 P53 介导的转录活性, 而影响细胞的周期调控和凋亡^[4]。BDV 自然宿主十分广泛, 几乎能感染包括马、羊、鸟、恒河

作者介绍: 白顺杰, Email: jiasenbai@gmail.com,

研究方向: 神经精神疾病。

通信作者: 谢 鹏, Email: xiepeng@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家重大科学研究计划资助项目(编号: 2009CB918302)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150910.1649.008.html>

(2015-09-10)

猴,甚至人类在内的所有温血动物。感染后动物可以出现急性的致死性脑炎或慢性轻微的神与精神行为异常,也可以长期携带病毒而不表现出任何症状。根据我们实验室近年来的流行病学调查研究结果提示 BDV 与精神分裂症、多发性硬化、帕金森综合征等人类神经精神疾病相关^[5]。因此,明确其致病机制对人类神经精神疾病具有重要意义。

越来越多的证据显示 miRNAs 在病毒感染、调控宿主免疫应答,决定病毒感染方式、及其发生与发展的过程发挥重要作用。在先前的研究中,张凤民教授等人发现了 miR-122 通过对磷蛋白的靶向抑制作用,从而抑制了 BDV 的基因复制,并通过诱导内源性干扰素升高而参与抗病毒作用^[6];他们还发现 BDV 可以通过介导磷蛋白抑制 miR-155 表达,同时影响 BDV 增殖,从而在 BDV 的持续性感染中起到重要的免疫调节作用^[7]。

研究发现 miR-134 表达富集于成人脑和脊髓中,其在大脑组织中的表达丰度显著高于其他组织,在轴突形成、突触可塑性以及突触成熟等方面发挥重要作用,亦参与包括情感障碍等神经精神疾病的病理和生理过程^[8-9],但 miR-134 在病毒感染以及宿主天然免疫应答的作用尚不清楚。本研究选择 BDV 感染 OL 细胞系为模型,以分析 miR-134 在 BDV 病毒感染中对宿主细胞生物学活性的影响,为临床应用提供广阔的空间。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 空质粒载体(pEGFP-N1)、含有 BDV P24 基因的表达质粒(pEGFP-N1-p24)和含有 BDV P40 基因的表达质粒(pEGFP-N1-p40)为哈尔滨医科大学张凤民教授惠赠;人少突胶质瘤细胞系(OL)及从精神分裂症病人脑中分离得到的病毒株 BDV Hu-H1 由德国柏林自由大学 Hanns Ludwig 教授惠赠;miR-134 过表达质粒(pEZx-MR04-hsa-mir-134)及其对照质粒(pEZx-MR04)购自广州复能基因有限公司。

1.1.2 仪器与试剂 PCR 仪、凝胶成像系统(Bio-Rad),荧光定量 PCR 仪(Corbett Life Science),NanoDrop 分光光度仪、离心机、CO₂ 培养箱(Thermo),超净工作台(苏州净化),倒置生物显微镜和荧光显微照相系统(Nikon);DMEM/High glucose、胎牛血清(FBS)、青/链霉素浓缩液、Opti-MEM(Gibco),质粒转染试剂盒(Invitrogen 公司),All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit(Genecopoeia),BDV P24 和 P40 抗体为本实验室留存,Western blot 及蛋白质提取相关试剂购自上海碧云天

生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 miR-134 在感染 BDV 的 OL 细胞中的表达水平检测

1.2.1.1 细胞培养 OL 细胞株用含 10% FBS、1%青/链霉素的 DMEM/High Glucose 培养基培养于 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度孵箱中;当细胞长至 70%~80% 融合时进行传代,传代浓度为 2×10^5 cells/ml,0.25% 胰蛋白酶消化,血清终止,离心重悬,接种于新鲜培养基中继续培养。

1.2.1.2 病毒感染 参照本实验室病毒感染方法^[10]:将适量 OL 细胞接种于 6 孔板中,10% FBS 的 DMEM 培养基中培养 12 h 至细胞贴壁,实验分为 2 组,病毒感染组加入 400 μ l 滴度为 8×10^5 FFU 的 BDV 病毒液,对照组加入同病毒液提取方法相同的等量 OL 细胞裂解液,培养 1 h 后,换为新鲜培养基继续培养。

1.2.1.3 Western blot 鉴定 BDV P24 和 P40 蛋白表达 病毒感染细胞后,待细胞增殖至 80%左右,用细胞刮刮取细胞,按蛋白提取试剂盒操作步骤在冰上提取细胞总蛋白,用 BCA Protein Assay Kit 测蛋白浓度,加入 $5 \times$ loading buffer 上样缓冲液,100 ℃沸水浴 5 min 使蛋白变性。取 10 μ g 左右蛋白经 SDS-PAGE、转膜、封闭。分别加入鼠抗 BDV P24 多抗(1:10 000)、鼠抗 BDV P40 多抗(1:10 000)和鼠抗 GAPDH(1:10 000),4 ℃孵育过夜,洗膜,加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗(1:10 000),室温孵育 2 h,洗膜,化学发光显影并进行光密度分析,实验重复 3 次。

1.2.1.4 Real-time PCR 检测 BDV 感染组和正常组中 miR-134 的表达水平 病毒感染细胞后,采用 Trizol 法提取病毒感染组和正常组总 RNA,按照 All-in-one miRNA qRT-PCR detection kit 逆转录试剂盒操作说明采用 poly A 加尾法进行逆转录反应。qPCR 反应体系: $2 \times$ All-in-One qPCR Mix 10 μ l,上游目的基因引物(2 μ mol/L)2 μ l;下游通用引物(2 μ mol/L)2 μ l,cDNA 2 μ l,ddH₂O 4 μ l。反应条件:预变性 95 ℃ 10 min;变性 95 ℃ 10 s,退火 60 ℃ 20 s,延伸 72 ℃ 20 s,40 个循环,延伸阶段收集荧光信号。所涉及到的目的基因引物序列如下:hsa-miR-134 上游引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGTGT-GACTGGTTCCAGAGG-3',U6 上游引物为 5'-GCTTCGGC-AGCACATATACTAAAAT-3',下游引物均为通用引物。本研究实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对表达量统计计算。

1.2.2 BDV P24 和 P40 蛋白对 miR-134 的影响

1.2.2.1 BDV P24、P40 转染 OL 细胞 参照 Lipofectamine LTX 和 Plus Reagents 说明书(Invitrogen 公司)进行。将 OL 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长密度达到 70%~80%左右,用无血清培养液洗细胞后加入 DNA/脂质体混合物,转染 6 h 后改用完全培养基培养。转染时分为 pEGFP-N1-p24 组、pEGFP-N1-p40 组和 pEGFP-N1 空质粒组,每组 6 个平行孔。

1.2.2.2 Western blot 鉴定转染后 BDV P24、P40 蛋白的表达 收集转染后培养 48 h 的细胞,Western blot 鉴定转染后 pEGFP-N1-p24 细胞组和 pEGFP-N1 细胞组中 BDV P24 蛋白的表达,以及 pEGFP-N1-p40 细胞组和 pEGFP-N1 细胞组中 BDV

P40 蛋白的表达。具体步骤同“1.2.1.3”。

1.2.2.3 Real-time PCR 检测转染 BDV P24、P40 对 miR-134 的影响 收集转染后培养 48 h 的细胞,提取 RNA,real-time PCR 检测 miR-134 的表达变化水平。具体步骤同“1.2.1.4”。

1.2.3 BDV 病毒感染和 miR-134 过表达对 OL 细胞增殖的影响

1.2.3.1 miR-134 过表达质粒转染 OL 细胞并建立稳转细胞株 miR-134 过表达质粒(pEZ-X-MR04-hsa-mir-134)及其对照 miRNA 质粒(pEZ-X-MR04)按照上述步骤转染 OL 细胞,48 h 后开始更换为含嘌呤霉素(10 μ g/ml)的培养液,并持续筛选至 20 d。稳定表达 miR-134 和对照 miRNA 的 OL 均可全部表达增强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein,GFP)。将 2 组稳转 miRNA 的细胞株放置于倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况,并采集图像。

1.2.3.2 Real-time PCR 检测稳转细胞株 miR-134 的表达 收集稳转后的 OL 细胞,提取 RNA,real-time PCR 检测 miR-134 的变化水平。具体步骤同“1.2.1.4”。

1.2.3.3 流式细胞仪检测 BDV 病毒感染和 miR-134 过表达对 OL 细胞周期的影响 各组细胞以 2×10^5 cells/well 的密度接种于 6 孔板内,测定对细胞周期的影响。实验分为四组,OL 正常组;BDV 感染组;miR-134 过表达组;miRNA 对照组。用不含 EDTA-Na2 的胰酶消化各组 OL 细胞,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清;PBS 清洗 3 次;重悬于 1 ml 75%的乙醇中,4 $^{\circ}$ C 固定过夜后使用流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组独立样本均数比较,采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,采用 LSD-*t* 检验进行两两比较,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Western blot 鉴定 BDV 感染和 P24、P40 转染效果

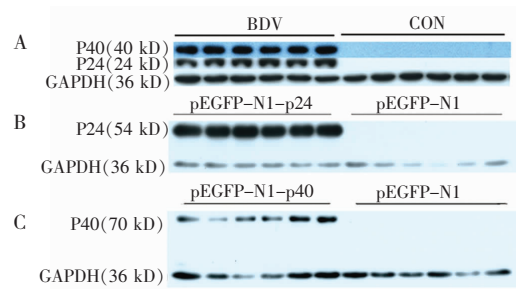
Western blot 检测显示(图 1A),OL/BDV 组分别在 24 kD 和 40 kD 看到特异性的 P24 和 P40 条带,而对照组不能见到特异性条带,说明 BDV 感染 OL 细胞成功。

Western blot 检测 BDV P24、P40 和空白对照质粒转染 OL 细胞融合蛋白的表达,BDV P24 转染组在 54 kD 左右看到 P24 的融合蛋白(图 1B),BDV P40 转染组在 70 kD 左右看到 P40 的融合蛋白(图 1C),同时对对照组没有检测到条带,说明 BDV 的 P24 和 P40 过表达质粒转染成功。

2.2 Real-time PCR 检测 BDV 感染和各转染组中成熟的 miR-134 的表达量

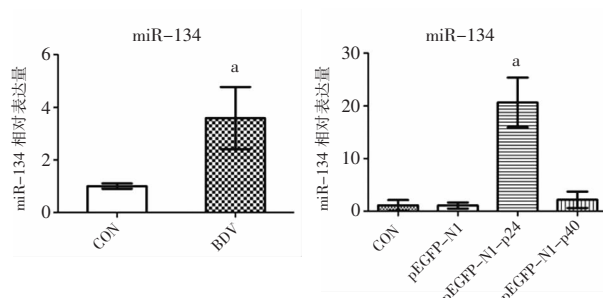
PCR 检测结果显示:OL/BDV 组和 OL 组对比,OL/BDV 组中 miR-134 的表达量(3.59 ± 1.18)明显高于 OL 组(1.00 ± 0.10),约为 3.58 倍($t=-5.331, P=0.000$,图 2A);鉴于对 OL 和 OL/BDV 细胞中 miR-134 的表达水平的分析中发现,OL/BDV 组细胞中 miR-134 的表达水平明显增高,即 BDV 感染可能影

响 miR-134 的水平,所以为进一步分析 BDV 相关基因或蛋白对 miR-134 表达的影响,检测了转染 BDV P24、P40 蛋白真核表达载体及其对照的 OL 细胞中 miR-134 的变化水平,比较发现组间差异有统计学意义($F=84.870, P=0.000$),与空质粒细胞组(1.09 ± 0.57)相比较,正常 OL 细胞组(1.11 ± 1.03)无统计学差异($P=0.964$,图 2B),BDV P40 过表达组(2.18 ± 1.56)亦无明显统计学差异($P=0.139$,图 2B),而 BDV P24 过表达组(20.65 ± 4.72)具有明显统计学差异($P=0.000$,图 2C),统计结果显示 BDV P24 过表达组明显上调 miR-134 的表达量至 20.65 倍。



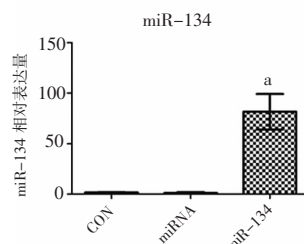
A. Western blot 检测 OL/BDV 组和正常 OL 组细胞的 P24、P40 蛋白的表达;B. Western blot 检测转染 BDV P24 质粒后的蛋白表达;C. Western blot 检测转染 BDV P40 质粒后的蛋白表达

图 1 Western blot 检测 OL 细胞中 P24 和 P40 蛋白的表达
Fig.1 BDV P24 and P40 protein expression in OL cells detected by Western blot



A. Real-time PCR 检测 OL/BDV 组和正常组细胞中的 miR-134 的表达量

B. BDV P24、P40 及其对照转染基因对 miR-134 表达量的影响



C. Real-time PCR 检测稳转过表达 miR-134 及 miRNA 对照质粒中 miR-134 的表达量

a: $P < 0.01$ ($n=6$)

图 2 Real-time PCR 检测 BDV 感染和各转染组中 miR-134 的表达量

Fig.2 Expression of miR-134 in BDV infection groups and transfection groups detected by real-time PCR

PCR 鉴定稳转细胞组中 miR-134 的结果显示,组间比较差异有统计学意义 ($F=186.454, P=0.000$),其中 miR-134 转染组 (81.65 ± 17.59) 明显比 miRNA 对照质粒组 (1.24 ± 0.88) 上调 miR-134 的表达量 ($P=0.000$, 图 2C),而正常的 OL 组 (1.63 ± 0.46) 和 miRNA 对照质粒组无统计学差异 ($P=0.935$),说明 miR-134 和对照 miRNA 的稳转细胞株建立成功。

2.3 倒置荧光显微镜观察 miR-134 和对照质粒稳转 OL 细胞后 EGFP 的表达

将 miR-134 过表达质粒和 miRNA 对照质粒分别建立稳转 OL 细胞株后,置于倒置显微镜下观察,均可在镜下看到较强的绿色荧光(图 3)。

2.4 流式细胞仪检测 BDV 感染和 miR-134 过表达对 OL 细胞周期的影响

为了进一步了解 BDV 感染和 miR-134 上调对细胞影响的联系,采用流式细胞仪分别测定 BDV 感染和 miR-134 过表达对细胞周期的改变,结果以 S 期和 G2/M 期之和的百分比来代表细胞的增殖指数。结果表明 OL/BDV 组在 S 期和 G2/M 期的细胞比例大约为 (44.78 ± 1.46)%,正常组的比例约为 (53.77 ± 1.21)%, ($t=-8.200, P=0.001$, 图 4);miR-134 过表达组的比例约为 (50.26 ± 2.52)%,miRNA 对照转染组的比例约为 (56.66 ± 1.18)%, ($t=-3.990, P=0.016$, 图 4)。结果显示 BDV 感染和 miR-134 过表达均对 OL 细胞周期产生负性调节作用,差异结果且有统计学意义。

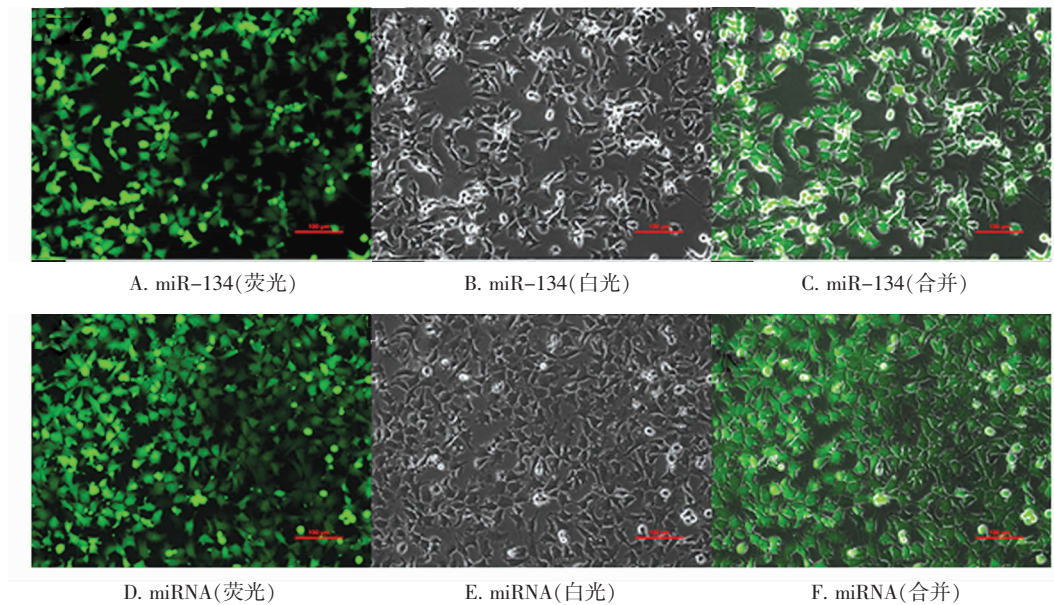
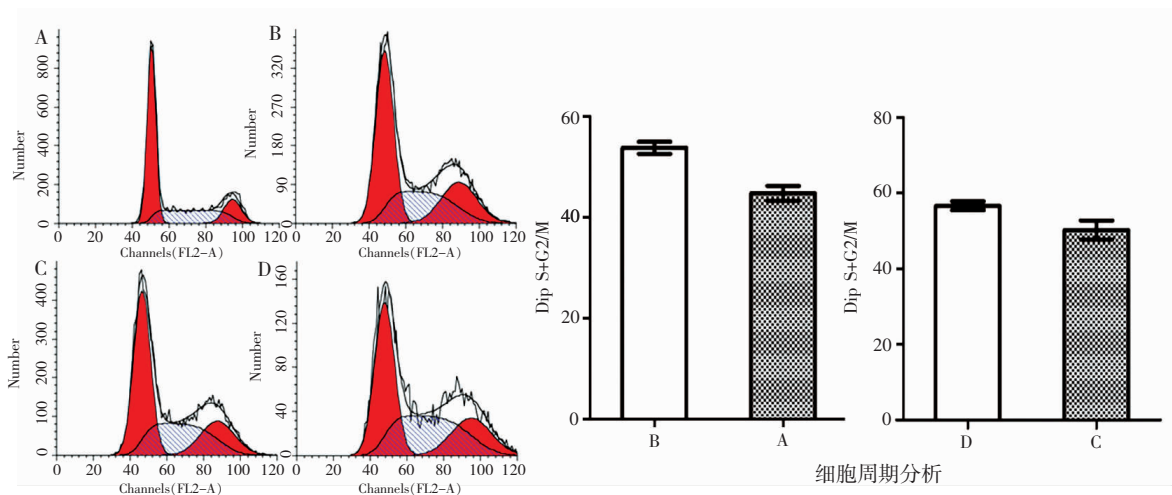


图 3 倒置显微镜检测稳转细胞株的转染效果 (100 ×)

Fig.3 Fluorescence expression of stable transfection cells detected by inverted fluorescence microscopy (100 ×)



A. OL/BDV 组; B. 正常 OL 组; C. miR-134 过表达稳转细胞组; D. miRNA 稳转细胞组

图 4 流式细胞仪测定各组 OL 细胞周期

Fig.4 Cell cycle of OL cells detected by FCM

3 讨论

BDV 在受感染的细胞中进行复制,引起细胞的持续性感感染,使细胞的生物分子在一定程度上发生改变,从而利用宿主细胞的代谢网络来完成病毒复制和增殖^[10]。课题组前期对 BDV 的研究显示^[10],从精神分裂症病人大脑中分离得到的 Hu-H1 病毒株可以引起细胞的增殖水平下降、凋亡增加,而感染大鼠后可以导致其行为缺陷和认知障碍等类精神神经疾病^[12]。而文献报道 miRNA-134 在学习记忆、突触发生和精神神经疾病中起重要调控作用^[8-9],并且在病毒感染的细胞中,经常伴有对细胞 miRNA 表达量的改变,那么与精神疾病有关的博尔纳病病毒的感染是否可以引起 miR-134 的改变,尚未见有报道。

本研究选择人源 BDV 病毒株感染的 OL 细胞系为模型, DV P24 基因有关。miR-134 对细胞增殖的影响已有报道,在星形胶质瘤细胞中 miR-134 可以使其增殖能力减弱^[13],也有提到对肝癌细胞的增殖抑制作用的研究^[14]。本研究中,前文提到 BDV 感染可引起 miR-134 明显增加,相当于间接增加细胞中的 miR-134,实验中转染 miR-134 到 OL 细胞中,可认为是直接增加细胞中的 miR-134,都引起了 OL 细胞增殖水平的下降。进一步在 BDV 稳定感染的 OL 细胞中抑制 miR-134 的表达,发现其抑制增殖的能力有所减少。因而,可以说明 BDV 能够通过上调 miR-134 的表达引起 OL 细胞增殖水平的下降。

综上, BDV 感染宿主细胞后,可通过磷蛋白 P24 引起细胞对 miR-134 的调控,显著上调 miR-134 的表达,从而导致细胞增殖能力的减弱。我们推测: miR-134 可作为 BDV 感染引起精神神经疾病的一个重要因素。进一步深入研究 miR-134 在博尔纳病病毒的持续感染形成以及对宿主固有免疫的调控过程中的作用机制,可能具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Rott R, Herzog S, Fleischer B, et al. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders[J]. Science, 1985, 228(4700): 755-756.
- [2] Perez M, Clemente R, Robison CS, et al. Generation and characterization of a recombinant vesicular stomatitis virus expressing the glycoprotein of Borna disease virus[J]. J Virol, 2007, 81(11): 5527-5536.
- [3] Briesse T, Schneemann A, Lewis AJ, et al. Genomic organization of Borna disease virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(10): 4362-4366.
- [4] 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.
- [5] Zhang L, Xu MM, Zeng L, et al. Evidence for Borna disease virus infection in neuropsychiatric patients in three western China provinces[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(4): 621-627.
- [6] Qian J, Zhai A, Kao W, et al. Modulation of miR-122 on persistently Borna disease virus infected human oligodendroglial cells[J]. Antiviral Res, 2010, 87(2): 249-256.
- [7] Zhai A, Qian J, Kao W, et al. Borna disease virus encoded phosphoprotein inhibits host innate immunity by regulating miR-155[J]. Antiviral Res, 2013, 98(1): 66-75.
- [8] Gao J, Wang WY, Mao YW, et al. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134[J]. Nature, 2010, 466(7310): 1105-1109.
- [9] Rong H, Liu TB, Yang KJ, et al. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania[J]. J Psychiatr Res, 2011, 45(1): 92-95.
- [10] Li D, Lei Y, Deng J, et al. Human but not laboratory Borna disease virus inhibits proliferation and induces apoptosis in human oligodendrocytes in vitro[J]. PloS One, 2013, 8(6): e66623.
- [11] Huang R, Gao H, Zhang L, et al. Borna disease virus infection perturbs energy metabolites and amino acids in cultured human oligodendroglia cells[J]. PloS one, 2012, 7(9): e44665.
- [12] Lei Y, Li D, Deng J, et al. Metabolomic profiling of three brain regions from a postnatal infected Borna disease virus Hu-H1 rat model[J]. Metabolomics, 2014, 10(3): 484-495.
- [13] Niu CS, Yang Y, Cheng CD. MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression[J]. Int J Oncol, 2013, 42(5): 1533-1540.
- [14] 汪培钦. miR-134 对肝细胞癌的作用及其分子机制[D]. 上海: 第二军医大学, 2013.

(责任编辑: 冉明会)