

绵羊进行性肺炎分子生物学研究进展

丁恩雨

(复旦大学生命科学院病毒学研究室, 上海 200433)

Advances of Research on Molecular Biology of Ovine Progressive Pneumonia

S858.265.3

Ding Enyu

(Virology Research Unit, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

关键词 绵羊进行性肺炎, 慢病毒, 分子生物学

病毒

Key words Ovine progressive pneumonia, Lentivirus, Molecular biology

绵羊进行性肺炎(Ovine Progressive Pneumonia, 简称 OPP)是一种慢性进行性传染病,以损害绵羊多种器官为特征,其病原为反转录病毒科慢病毒亚科中的成员^[1]。绵羊进行性肺炎在临床上表现两种症候群,一种以慢性进行性肺炎为特征的梅迪病(Maedi),另一种以侵害中枢神经系统引起脑膜脑炎为特征的维斯纳病(Visna)。目前,世界上的感染绵羊大多以发生肺炎为主。尽管梅迪病和维斯纳病在症状上有所不同,但一般认为它们的病原是同一种病毒^[2-4]。

1923年在加拿大蒙大纳绵羊中发现肺型 OPP,1933年在冰岛绵羊中大流行^[5]。1940年在法国曾描述 OPP 为淋巴瘤。1943年在荷兰又称为肺子病(Zwoegerziekte)。1947年才用 Maedi(意为呼吸困难)的名称描述了肺型 OPP。1951年有用 Visna(意为消瘦)的名称描述了麻痹型 OPP。绵羊进行性肺炎病毒(OPPV)首先由 Sigurdsson 于 1960年分离出来。现已知德、英、美、法、丹麦、荷兰、肯尼亚、印度、以色列、挪威、瑞典等国都有 OPP 存在。我国 OPP 应当追溯到 80年代从澳大利亚和新西兰进口边区莱斯特绵羊(Border Leicester Sheep)中发现“肺脓肿病”,当时认为与绵羊肺腺瘤(SPA)病羊接触有关。1984年用美国的 OPP 血清和抗原在进口边区莱斯特绵羊中检出 OPP 患病羊^[6],随后分离出 OPPV^[7],首次证明 OPP 已在我国出现。近年来,OPP 的研究进展相当迅速,文献报道亦甚多。本文就 OPP 分子生物学的研究进展进行综述。

1 OPPV 的核酸与蛋白

病毒基因序列分析表明^[8,9],Visna 病毒 1514 冰岛株基因组全长有 9202 个核苷酸,长末端重复序列(LTR)含 414bp。整个病毒基因结构包括 5'-gag-pol-Q-env-3',其中 gag 基因编码核心蛋白,pol 基因编码病毒蛋白酶、反转录酶和核酸内切酶或整合酶。Visna 病毒开读框架(Orf)pol 和 Orfenv 并不重叠,而由 OrfQ(230 个密码子)分开。Env 基因编码病毒囊膜糖蛋白。Orfenv 含 983 个密码子,并载有一个终止密码子(位置在第 8160bp 至 8162bp)。Visna 病毒的 LTRs 包括

• 本文于 1993 年 8 月 11 日收到,10 月 16 日修回

与细胞 tRNA 互补、且起始负链合成的引物结合部位(Primer binding sites, PBS)和起始正链合成的多聚嘌呤道(Polypurine tract, PPT)。Visna 病毒蛋白包括 gag 蛋白、pol 蛋白、env 蛋白。gag 基因中第一个 ATG 位于开读框架起始的第 51 个三联体(位置在 489bp 至 491bp),为典型的起始密码子^[10],限定含 442 个氨基酸的 gag 前体蛋白(估算分子量为 49808 道尔顿)。gag 前体蛋白的顺序为 NH₂-P₁₆-P₂₅-P₁₄-COOH, gag 前体可裂解成 P₂₅(主要核心蛋白)、P₁₆和 P₁₄。Orfpol 由 3315 个核苷酸构成,编码 1105 个氨基酸的多肽(分子量约 126kD),第一个甲硫氨基残基(密码子 4)不是典型的起始密码子,推测 gag-pol 前体也许是重叠的 gag-pol 转译过程中产生的裂解信息或框架移动而形成。gag-pol 前体大约 175kD,第 2177bp 至 2827bp 与反转录酶产生有关,第 4163bp 至 4681bp 与核酸内切酶产生有关。另外,5' 端的 polorf(位置在第 1870bp 至 1960bp)决定病毒蛋白酶的核心顺序。Orfenv 位于含 947 个核苷酸的中央区后面,env 前体有 983 个氨基酸,分子量为 115kD。OPPV 基因组与真核 mRNA 一样,具有 5' 甲基化帽子结构和 3' 端聚(A)尾^[11]。其基因组转录的特点是有 DNA 的中间型。病毒粒子内含有依赖 RNA 的 DNA 多聚酶,即反转录酶。它相对来说是一个单链 60kD—70kD 蛋白。这种反转录酶至少有四种不同活性。首先,它能以病毒 RNA 为模板合成 DNA 互补链;其次,它具有核酸酶活性(称为核酸酶 H),去除 DNA/RNA 杂交分子中的 RNA 链;第三,它又能以 DNA 为模板合成另一条 DNA 链而成双链;第四种是整合酶活性。这种病毒的双链 DNA 称为前病毒。前病毒 DNA 整合细胞基因组后,在宿主细胞依赖 DNA 的 RNA 多聚酶 I 的催化下,可转录成病毒正链 RNA,即由整合在细胞染色体中的前病毒产生新的病毒粒子。Haase 和 Baringer 等^[12]报道,OPPV 结构蛋白系由 15 种多肽组成,分别为 135、97、90、78、75、68、56、53、51、46、41、36、25、16 和 14kD 等,其中 135kD、51kD、46kD 蛋白成分为糖蛋白。FU HAI LIN 报道^[13],琼脂糖凝胶柱层析纯化的 Visna 病毒(K796 株)经 SDS-PAGE 分析,是由 25 种蛋白质组成的,最大的蛋白成分为 gP175 和 gP115,最小的蛋白成分为 P12。

2 OPP 致病机理^[14,15]

OPPV 是一种慢病毒,其 RNA 基因组通过 DNA 前病毒的形式在血液单核细胞中复制,这种限制性表达使病毒能隐蔽循环,不致引起机体的免疫反应,这种“特洛伊木马”式的机制,可以确保病毒的持续传播。当感染的单核细胞成熟为组织巨噬细胞后,前病毒基因的表达大为增加,以致用原位杂交即可检出病毒 RNA,但产生的完整病毒仍很少。病毒抗原在肺、乳房、关节和中枢神经系统组织巨噬细胞表面的表达导致局部单核细胞炎性灶的产生。血清学反应迟缓可能说明由于作用于免疫系统的抗原水平很低,因而所产生的抗体不足以预防巨噬细胞的感染。在感染过程中,可出现抗原性变异的病毒,但它们并不能取代原已存在的病毒株。

3 用于 OPP 诊断的先进技术

目前,国外已建立了 OPP 的琼脂免疫扩散(AGID)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、间接免疫荧光法(IFA)、补体结合反应(CF)以及中和试验(NT)诊断方法。

近年来,随着分子生物学新方法的不断涌现,聚合酶链式反应(PCR)、核酸探针技术、第二代 ELISA 技术^[16]以及单克隆抗体技术^[17]等已应用于 OPP 的特异诊断。据 R. Zanoni 等^[18]的实验表明,应用聚合酶链反应(PCR)检测 OPPV 的敏感性比常规法要高得多。绵羊感染 OPPV 后数月才能产生出可检出的病毒抗体,而在这期间虽可从感染动物中分离出病毒,但由于分离鉴定绵羊慢病毒的细胞培养技术需几周进行繁殖,而用 PCR 技术在短时间内很快检测出病毒

的存在。PCR 技术是目前早期快速诊断 OPP 等慢病毒病的较好方法之一。另外,重组体蛋白已被作为第二代试剂,用于检测慢病毒抗体。Zanoni R G 等将 PCR 扩增的 OPPV 片段克隆到 pGEX-2T 中,用谷胱甘肽亲和层析方法进一步纯化获得谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白,用其作酶联免疫吸附法(ELISA)的包被材料,检测绵羊慢病毒感染,证明既特异又敏感。

4 OPPV 受体的研究^[13]

OPPV 通过其囊膜糖蛋白吸附细胞表面受体而感染绵羊细胞,OPPV 受体的鉴定尚未见报道。为鉴定病毒对靶细胞结合的分子反应,采用病毒外表蛋白印迹法,检测能结合纯化病毒的细胞表面分子的分子量。山羊关节滑膜(GSM)细胞和绵羊脉络丛(SCP)细胞表面约 15、30 和 50kD 的分子与 OPPV 结合。病毒与中和抗体预孵育,能减弱 OPPV 与这些蛋白的结合。¹²⁵I 标记的 GSM 和 SCP 细胞膜被用于亲和纯化这些结合病毒的蛋白。这些蛋白通过 SDS-PAGE 分析,分子量有 15、30 和 50kD。其中,抗 50kD 蛋白抗体对活 SCP 和 GSM 细胞表面的结合可通过免疫荧光检测。另外,抗 50kD 蛋白抗体可阻断³⁵S-蛋氨酸标记 OPPV 与 SCP 细胞的结合。抗 15 和 30kD 蛋白抗体不能阻断病毒对细胞的结合。因此,通过抗 50kD 蛋白抗体的阻断活性,可表明 50kD 蛋白是 OPPV 识别和结合靶细胞表面的分子。

进一步的研究表明,OPPV 与 HIV 等慢病毒无论在病毒形态结构或基因水平上都有相关性,其发病机理亦相似。

参 考 文 献

- 1 范存军. 绵羊进行性肺炎与山羊关节炎脑炎. 中国畜禽传染病, 1990, 3: 59—61
- 2 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1985, 603—606
- 3 沈荣显, 魏仁山. 绵羊进行性肺炎的诊断. 中国畜禽传染病, 1988, 1: 18—21
- 4 Outlip R C, Laid G A. Isolation and characterization of a virus association with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. Am J Vet Res, 1976, 37(12): 1377—1382
- 5 Sigurdsson B. Rids, a chronic encephalitis of sheep. Brit Vet J 1954, 110: 341—354
- 6 龚成润. 新疆绵羊进行性肺炎的血清学诊断(初报). 中国兽医杂志, 1984, 12: 9—12
- 7 胡泽渊, 林杰, 胡尔玛西, 等. 新疆绵羊梅边(Maedi)病毒的分离和初步鉴定. 中国兽医杂志, 1985, 9: 2—3
- 8 Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, et al. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. Cell, 1985, 40: 9—17
- 9 Saltarelli M, Querat G, Konings D A M, et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. Virology, 1990, 179: 347—364
- 10 Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the transcriptional start site in eucaryotic mRNAs. Nucl Acids Res, 1984, 12: 857—872
- 11 侯云德. 分子病毒学. 第 1 版. 北京: 学苑出版社, 1990, 463—491
- 12 Haase A T, Baringer J R. The structural polypeptides of RNA slow viruses. Virology, 1974, 57: 238—250
- 13 FU HAI LIN. Polyacrylamide gel electrophoresis of visna virus polypeptides isolated by agarose gel chromatography. Journal of Virology, 1978, 25(1): 207—214
- 14 Zink M C, Narayan D, Kennedy P G E, et al. Pathogenesis of Visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis, New leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1987, 15(1—2): 167—180
- 15 Dawson M. Pathogenesis of maedi-visna. Vet. Rec, 1987, 120: 451—454

- 16 Zanoni R G, Nauta I M, Pauli U, *et al.* Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch maedi-visna virus strain ZZV1050; Application of recombinant protein in ELISA for the detection of caprine and ovine lentivirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991; 29(7): 1290—1294
- 17 Houwers D J, Schaake J. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentivirus, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *Journal of Immunological Methods*, 1987; 98(1): 151—154
- 18 Zanoni R. Detection of caprine arthritis encephalitis virus and maedi-visna virus using polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 1990; 23(1—4): 329
- 19 Crane S E, Buzy J, Clements J, *et al.* Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *Journal of Virology*, 1991; 65(11): 6137—6143