

## BIV 在人源细胞 MT-4 中的活性研究\*

王书晖<sup>1</sup>, 熊 鲲<sup>1</sup>, 杨怡姝<sup>2</sup>, 朱义鑫<sup>1</sup>, 夏秋雨<sup>1</sup>, 陈国敏<sup>2</sup>, 王金忠<sup>1</sup>,  
陈启民<sup>1</sup>, 耿运琪<sup>1\*\*</sup>, 曾 毅<sup>2</sup>

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 中国预防医学科学院病毒所, 北京 100052)

## The Study on BIV Activity in Human Cells MT-4

WANG Shu-hui<sup>1</sup>, XIONG Kun<sup>1</sup>, YANG Yi-shu<sup>2</sup>, ZHU Yi-xin<sup>1</sup>, XIA Qiu-yu<sup>1</sup>, CHEN Guo-min<sup>2</sup>,  
WANG Jin-zhong<sup>1</sup>, CHEN Qi-min<sup>1</sup>, GENG Yun-qi<sup>1\*\*</sup>, ZENG Yi<sup>2</sup>(1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Institute of Virology,  
Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

**Abstract:** Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a kind of *Lentivirus* belonging to *Retrovirus*, and up to now, there is no report about its infection to human. In order to check BIV's infection to human cells, we transfected BIV<sub>127</sub> cDNA into human cells MT-4. By RT-PCR, we checked the transcription of BIV's *gag* gene, and determined the expression of *gag* or *gag-pol* gene in MT-4 cell by IFA. Reverse Transcriptase (RT) assay showed the reverse transcriptase of BIV<sub>127</sub> had been expressed, while cell infection experiment indicated that BIV couldn't replicate in MT-4 cells.

**Key words:** Bovine immunodeficiency virus; MT-4 cells; Gene expression; Infection

**摘要:** 牛免疫缺陷病毒 (*Bovine immunodeficiency virus*, BIV) 在分类上属于反转录病毒科的慢病毒属, 目前尚未见 BIV 感染人的报道。为进一步确定 BIV 对人源细胞的感染性, 我们用 BIV<sub>127</sub>cDNA 转染人源细胞 MT-4, 通过 RT-PCR 检测到 BIV<sub>gag</sub> 基因的转录, IFA 则显示 BIV<sub>127</sub> 的 *gag* 或 *gag-pol* 基因在 MT-4 细胞中得到了翻译, 而 RT 值的测定也有力地说明 BIV<sub>127</sub>cDNA 已经在 MT-4 细胞内表达出有活性的反转录酶, 但细胞传代实验表明 BIV 不能在 MT-4 细胞内复制。

**关键词:** 牛免疫缺陷病毒; MT-4 细胞; 基因表达; 感染

中图分类号: R373 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0354-04

1972 年, 美国动物疾病中心的 van Der Maaten 博士及其同事从一头患有持续性淋巴细胞增多症的奶牛体内分离到了一株与羊维斯纳病毒十分类似的病毒 (R29)<sup>[1]</sup>。15 年后, Gonda MA 等人对该病毒进行了深入细致的研究, 发现其在形态、免疫学性质、基因组结构等方面与 HIV 和 SIV 极其相似, 因此, 在其病理学尚不清楚的情况下将其定名为牛免疫缺陷病毒 (*Bovine immunodeficiency-like virus*, BIV)<sup>[2,3]</sup>。目前各国研究者已经从世界上多个国家和地区分离到了 BIV<sup>[4,5]</sup>, 并在 BIV 的基因转录调

控<sup>[6]</sup>、致病机理<sup>[7]</sup>和基因组织结构与功能研究方面做了很多工作<sup>[8]</sup>, 但还没有人对 BIV 感染人源细胞后的生物学活性进行过深入研究, 也没有找到 BIV 感染细胞所需要的受体。

目前关于 HIV 嵌合病毒疫苗的研究主要集中在 HIV/SIV(SHIV) 上, 但由于 SIV 与 HIV 的同源性很高, 人们对 SHIV 的安全性有很大的质疑, 把 SHIV 作为 AIDS 疫苗的初步结果也不尽人意<sup>[9,10]</sup>。我们计划利用 HIV-1 和 BIV 构建一种能在人源细胞中复制但不致病的嵌合病毒, 探索这种嵌合病毒

收稿日期: 2002-03-25, 修回日期: 2002-05-27

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G1999054107) 及天津市科委重点科技攻关项目 (013105511)。

作者简介: 王书晖 (1974-), 女, 云南省籍, 博士研究生。

\*\* 通讯作者: 耿运琪 (1947-), 男, 河北省籍, 教授, 博士生导师。Correspondence author.

在作为 AIDS 疫苗方面的可行性,因此有必要对 BIV 是否能够感染人源细胞并在其中表达进行深入研究。本文用 BIV<sub>127</sub>cDNA 转染人源细胞 MT-4,并对其 cDNA 的转录、翻译、翻译后加工和可复制病毒的产生进行了初步的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和质粒

MT-4 细胞是经 HTLV 转化的人 T 淋巴细胞,由中国预防医学科学院病毒所肿瘤室保藏。pBIV<sub>127</sub> 携带有 BIV<sub>127</sub> 的 cDNA, pHIV-1 携带有 HIV-1 HXBc2 的 cDNA,由 cDNA 美国 pHIV Nebraska 大学的 C. Wood 教授惠赠。

### 1.2 主要酶和试剂

反转录酶、DEPC、RNase-Free DNase 购自 Promega;Lenti-PT<sup>TM</sup>Activity Assay 试剂盒购自 Cavid Tech UPPSALA(SWEDED)公司;TRLzolPNA 提取试剂购自 GIBCO/BRL;荧光标记抗体购自北京挚诚生物工程所;RPMI1640 细胞培养液、Hank's 液、青霉素和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液由中国预防医学科学院病毒所配液室配制;胎牛血清为北京军区兽医防治中心生产。

### 1.3 细胞培养和转染

MT-4 细胞为悬浮细胞,用 RPMI1640 培养基培养,添加 100U/mL 青霉素、100ug/mL 链霉素和 10%(V/V)的胎牛血清,调 pH 值至 7.0;37℃ 培养(不需要 5% CO<sub>2</sub> 的培养环境)。培养过程中维持细胞浓度在 2~3 × 10<sup>5</sup> 个细胞/mL 培养液,pH 值在 7.0 左右。用 Gene Puler(BIO-RAD)进行转染,1 500V,0.7s 将 15μgpBIV<sub>127</sub> 导入 10<sup>7</sup> 个 MT-4 细胞,37℃ 培养。

### 1.4 RNA 模板的制备

用 TRIzolRNA 试剂提取转染细胞的总 RNA,经 RNase-Free DNase 处理后再用 TRIzol 试剂抽提,乙醇沉淀,溶于 10μL 经 DEPC 处理过的双蒸水中,PCR 检测无 DNA 存在后,用作 RT-PCR 模板。

### 1.5 RT-PCR

按照 GIBCO/BRL SUPERSCRIP<sup>TM</sup> 一步 RT-PCR 说明书进行。上游引物:(21mer, BIV<sub>127</sub> 709~729nt) 5'-ATGAAGAGAAGGGAGTTAGAA-3';下游引物:(20mer, BIV<sub>127</sub> 1217~1236nt) 5'-TTCAGTGGCGTTCGTACCAGA-3'。扩增条件为:50℃30min,94℃ 2min(1 个循环);94℃ 30s,55℃

30s,72℃,30s(35 个循环);72℃ 5min(1 个循环)。

### 1.6 间接免疫荧光试验

离心收集转染细胞,经 Hank's 液洗细胞 2 次,均匀涂布于一洁净的载玻片,待其安全干燥后,用冷丙酮固定 10min,滴盖稀释倍数为 1:8 的 BIV Gag 单抗,在 37℃ 温盒内结合 1h,用磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)洗去单抗,再滴效价为 1:10 的荧光标记抗体,在 37℃ 温盒内反应 45min,PBS 洗涤后,0.1% 伊文氏蓝染色 15min,取出稍干,用 50% 甘油封片,在激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.7 反转录酶(RT)活性测定

参照 Cavid Tech UPPSALA(SWEDED)公司的 Lenti-RT<sup>TM</sup>Activity Assay 试剂盒说明书进行。

### 1.8 转染细胞传代观察病毒的感染性

为了检测病毒 cDNA 转染 MT-4 细胞后能否在 MT-4 细胞中复制,我们将转染细胞传代,收集每一代的细胞,提取细胞总 DNA,通过 PCR 检测病毒的 gag 基因来观察 BIV<sub>127</sub> 能否在 MT-4 细胞中复制。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 检测 BIV<sub>gag</sub> 基因的转录

BIV<sub>127</sub>cDNA 电转染 MT-4 细胞第 4 天后,提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR,获得预期长为 528bp 的增长片段(见图 1),表明 BIVcDNA 已在转染细胞中获得转录。

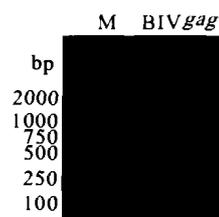


图 1 RT-PCR 检测 BIV<sub>gag</sub> 基因的转录电泳图

Fig.1 Electrophoresis of the transcription of BIV<sub>gag</sub> gene by RT-PCR

### 2.2 BIV Gag 单抗检测 BIV 外壳蛋白(CA)基因的表达

收集 BIV<sub>127</sub>cDNA 转染第 4 天后的 MT-4 细胞,丙酮固定后,分别与稀释倍数为 1:8 的 BIV<sub>gag</sub> 单抗和效价 1:10 的羊抗鼠荧光抗体反应,同时以 pUC18 的转染的 MT-4 细胞用为负对照,染色封片后在激光共聚焦显微镜下观察。从图 2 可以看到,pUC18 转染的 MT-4 细胞没有荧光反应,而 BIV<sub>127</sub>

cDNA 转染的 MT-4 部分细胞发绿色荧光, 这充分说明 BIV<sub>127</sub> 的 *gag* 或 *gag-pol* 基因已经得到翻译。

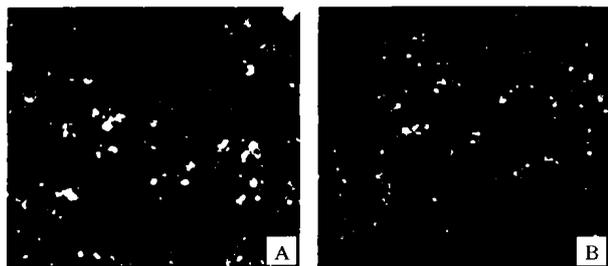


图2 IFA 检测 BIV 外壳蛋白基因的表达

A, pUC18 转染的 MT-4 细胞; B, BIV<sub>127</sub>cDNA 转染的 MT-4。

Fig. 2 Detecting the expression of BIV CA gene by IFA

A, MT-4 cells transfected by pUC18; B, MT-4 cells transfected by BIV<sub>127</sub> cDNA.

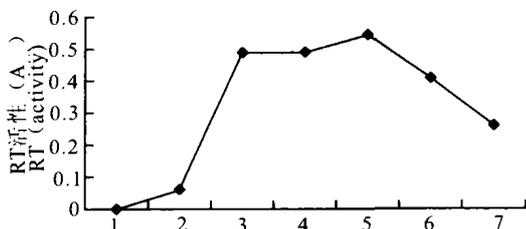


图3 pBIV<sub>127</sub>转染 MT-4 细胞 1~7 天的 RT 活性

Fig. 3 RT Activity of pBIV<sub>127</sub> in transfected cells from 1 to 7 day

### 2.3 反转录酶(RT)活性测定

分别收集转染后第 1 天到第 7 天的细胞培养上清进行 RT 活性测定, 结果以光吸收值 A<sub>405</sub> 表示, 光吸收值的大小直接反映反转录酶活性的强弱。以转染时间为横坐标, 扣除本底的样品光吸收值为纵坐标做图, 结果见图 3。结果显示, BIV<sub>127</sub>cDNA 转染后 1-2d 的 RT 值很低, 从第 3 天起 RT 活性开始上升, 在第 5 天时到达高峰, 之后从第 6 天开始下降。反转录酶是反转录病毒的特征性产物, BIV<sub>127</sub>cDNA 转染细胞的 RT 活性随着培养时间的不同而呈一有规律的动态变化, 有力地说明了 BIV<sub>127</sub>cDNA 已经表达出有活性的反转录酶。

### 2.4 BIV<sub>127</sub>cDNA 转染细胞传代观察其感染性

分别将 pHIV-1 和 pBIV<sub>127</sub> 电转染 MT-4 细胞, 37℃ 培养 7d 后, 取 10<sup>6</sup> 个转染细胞和 2ml 转染细胞培养液加入 9 × 10<sup>6</sup> 个 MT-4 细胞中, 补培养液至 20ml, 培养 3d 后再次按该法传代, 收集每一代的 10<sup>6</sup> 个细胞, 提取细胞总 DNA, 溶于 50μL 双蒸水,

取 1μL 进行 PCR。pBIV<sub>127</sub> 转染的细胞经传代后仅在 P1-P2 代细胞 DNA 中扩增到一条长 528bp 的带, 而 pHIV-1 转染细胞经传代后, 从 P1-P4 代细胞 DNA 都能扩增到一条长 370bp 的片段, 见图 4。这说明 pHIV-1 转染 MT-4 细胞后, 有感染性病毒产生, 病毒能够在 MT-4 细胞中传代, 而 pBIV<sub>127</sub> 转染细胞后不能在 MT-4 细胞中复制。同时, 从转染细胞的形态变化也说明了这一点, pHIV-1 转染细胞在第 7 天出现大量死亡, 每次传代至第 3 天都产生严重的细胞病变。而 pBIV<sub>127</sub> 转染细胞和传代细胞都没有任何细胞病变效应, 见图 5。

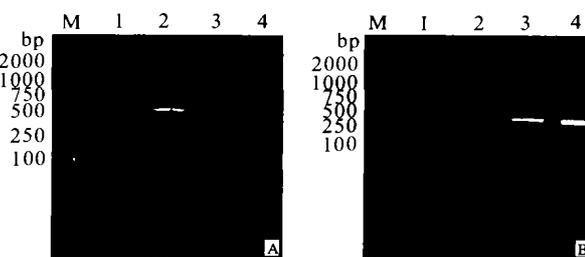


图4 PCR 检测传代细胞中的 *gag* 基因

A, BIV *gag* 基因; B, HIV *gag* 基因. (M, Markers; P1, 第一代传代细胞; P2, 第二代传代细胞; P3, 第三代传代细胞; P4, 第四代传代细胞.)

Fig. 4 Detection of *gag* gene in transfected cells by PCR

A, BIV *gag* gene; B, HIV *gag* gene. (M, Markers; p1, the First progeny of the transfected cells; p2, the Second progeny of the transfected cells; P3, the Third progeny of the transfected cells; P4, the Fourth progeny of the transfected cells.)

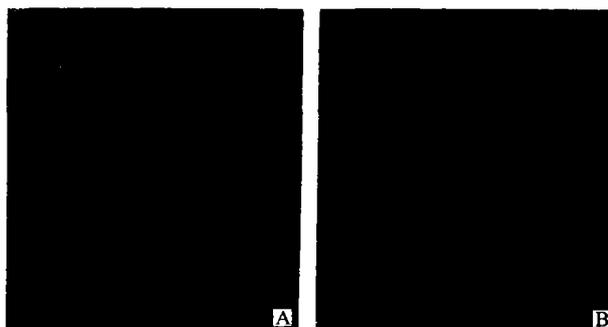


图5 pHIV-1 和 pBIV<sub>127</sub> 转染第 7 天后的细胞形态

A, pHIV-1 转染的 MT-4 细胞; B, pBIV<sub>127</sub> 转染的 MT-4 细胞

Fig. 5 The Morphogenesis of the MT-4 cells transfected by pHIV-1 and pBIV<sub>127</sub> on the seventh day

A, MT-4 cells transfected by pHIV-1; B, MT-1 cells transfected by pBIV<sub>127</sub>

## 3 讨论

慢病毒基因转录分为早期转录和晚期转录。在

感染早期,病毒利用宿主的转录系统,在 5'LTR 的启动下转录出低水平的全长 mRNA,随即被宿主的剪接系统多次剪接成包括 *tat* 和 *rev* 在内的小 mRNA 分子,分别翻译出 Tat 的 Rev 等调节蛋白, Tat 作用于 TAR 后显著激活 LTR 起始的转录,转录后调节蛋白 Rev 则结合到其应答元件 RRE 上,遮蔽 mRNA 中的剪接供位和受位,并抑制剪接体的组装,同时促进非剪接 RNA 转运到细胞质中,使病毒的基因表达由早期过渡到晚期。这时,细胞中才出现一定量的非剪接或单剪接的 mRNA。Gag 蛋白是病毒生活周期中的晚期基因产物,由非剪接的全长 mRNA 编码。因此, BIV<sub>127</sub> gag 转录本 528bp 片段的扩增成功,不仅说明 BIV cDNA 转染细胞中已有全长 mRNA 转录本的存在, *gag-pol* 基因已得到转录,而且表明 BIV<sub>127</sub> 的 *tat* 和 *rev* 基因已在 MT-4 细胞中的得到了正确转录、剪接和翻译,其产物能与 MT-4 细胞的各种细胞因子相互作用,在其应答元件上正确发挥功能,促进 BIV<sub>127</sub> cDNA 转录和转录加工后,使其各基因得到表达。反转录酶是病毒生活周期中最重要的晚期基因产物,因此反转录酶活性的检出,标志着 BIV<sub>127</sub> cDNA 电转染进入 MT-4 细胞后处于一种积极的生物活性状态,意味着 BIV<sub>127</sub> cDNA 各基因表达的成功和功能正确发挥。

在传代试验中,从被 BIV cDNA 转染的 P1-P2 代细胞 DNA 中代扩增到目的带是因为转染时我们使用的是病毒 cDNA, DNA 在一定时间内不可能被细胞核酸酶完全降解,但随着传代过程的进行,如果没有感染性病毒产生出新的病毒基因组,转染病毒 cDNA 最终消失,因此我们从第三代开始就无法检出病毒基因,这一结果表明 BIV 是不能在 MT-4 细胞中复制的。目前我们还不清楚 BIV cDNA 转染 MT-4 细胞后是否能够装配出可以感染下一代细胞的病毒颗粒,这需要采用免疫电镜等方法进行进一步的检测。

虽然各种元件均已具备,但为何 BIV 在 MT-4 细胞内不能在 MT-4 细胞中进行复制? 我们认为细胞受体在 BIV 的细胞嗜性方面起着至为关键的作用,灵长类动物和非灵长类动物细胞的病毒受体差异性大,故而 BIV 很难在人体细胞中建立感染。其次, BIV 转录翻译过程必须依赖于宿主细胞的蛋白合成系统, BIV 启动子和转录调节因子不能象 HIV

那样与宿主细胞因子高效协同作用,这也可能是 BIV 不能有效感染人源细胞的又一因素。另外,病毒蛋白加工和组装也必须有宿主细胞因子的参与,如病毒包膜前体的裂解就必须依赖于细胞蛋白酶的作用。人源细胞因子是否能有效作用于 BIV 病毒产物的加工过程? 还有, BIV 的核衣壳是否能够被运送到正确的位置? BIV 的表面糖蛋白和穿膜糖蛋白是否可以正确聚合并插入宿主细胞膜? 所有这些都可能为 BIV 不能在 MT-4 细胞中传代的因素。

### 参考文献

- [1] Maaten V D, Boothe M J, Seger C L. Isolation of virus from cattle with persistent lymphocytosis[J]. J Nat Cancer Inst, 1972, 49:1649 - 1657.
- [2] Fauquet C M, Mayo M A. The 7th ICTV report[J]. Arch Virol, 2001, 146:189 - 194.
- [3] Gonda M A, Braun M J, Carter S G, et al. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus[J]. Arch Virol, 1987, 330:388 - 391.
- [4] Polack B, Schwartz I, Berthelemy M, et al. Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France[J]. Vet Microbiol, 1996, 48:165 - 173.
- [5] 耿运琪, 纪永刚, 刘淑红, 等. 从我国进口奶牛及其后代中发现牛免疫缺陷病毒(BIV)的自发感染[J]. 病毒学报, 1994, 10: 322 - 326.
- [6] Whetstone C A, Maaten V D, Black J W. Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle[J]. J Virol, 1990, 64: 3557 - 3561.
- [7] Oberste M S, Greenwood J D, Gonda M A. Analysis of the transcription pattern and mapping of the putative rev and env splice junctions of bovine immunodeficiency-like virus[J]. J Virol, 1991, 65:3932 - 3937.
- [8] Tobin G J, Sowder R C, Fabris D, et al. Amino acid sequence analysis of the proteolytic cleavage products of the bovine immunodeficiency virus Gag precursor polypeptide[J]. J Virol, 1994, 68:7620 - 7627.
- [9] Ui M, Kuwata T, Igarashi T, et al. Protection of macaques against a SHIV with a homologous HIV-1 Env and a pathogenic SHIV-89.6P with a heterologous Env by vaccination with multiple gene-deleted SHIVs[J]. Virology, 1999, 265:252 - 263.
- [10] Kumar A, Lifson J D, Li Z, et al. Sequential immunization of macaques with two differentially attenuated vaccines induced long-term virus-specific immune responses and conferred protection against AIDS caused by heterologous simian human immunodeficiency Virus (SHIV(89.6)P)[J]. Virology, 2001, 279:241 - 256.