

乙脑病毒持续感染株 preM 区序列分析*

徐可树**, 李 琪, 王华枫, 周 霞

(华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 武汉 430022)

Significance and preM Sequence Analysis of Different Mutant Japanese Encephalitis Virus Strains in Persistently Infected KN73 Cells

XU Ke-shu**, LI Qi, WANG Hua-feng, ZHOU Xia

(Department of Digestive Disease, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: The significance and preM sequence analysis of two different mutant strains of *Japanese encephalitis virus* during persistent infection was studied. Two wild strains of *Japanese encephalitis viruses* (JaGAR-01 and Nakayama) were used to infect a human hepatoma cell line. Persistent infection was established after the cells were subcultured several times. Mutant viruses in persistently infected cells were collected by freezing and thawing of the cells. Viral titers were examined by plaque assays in BHK cells. The preM coding region of four Japanese encephalitis strains, two wild-type and two mutant viruses from infected cells were amplified by RT-PCR. The PCR products were sequenced and the preM sequences of the four strains were compared. The results showed that there was a single amino acid mutation (E9 Leu→Arg) in the JaGAR-01 persistently infecting mutant in comparison to wild-type JaGAR-01. Two amino acid replacements (E9 Leu→Arg and E13 Val→Ile) were noted in the persistently infecting Nakayama and its wild-type strains. The amino acid sequences of the mutant strains JaGAR-01 and Nakayama were completely the same. We inferred here that genotypic variation existed in preM region of all mutant viruses and that genotypic variation of protein encoded by preM region may play a role in persistent infections and may contribute to the maintenance of the characters of Japanese encephalitis virus and replication.

Key words: *Japanese encephalitis virus* (JEV); Persistent infection; preM sequence analysis; Genovariation

摘要: 为了研究乙型脑炎病毒持续感染株 preM 区域基因序列变异及其意义,我们将两种乙脑病毒野生株(JaGAR-01 株和 Nakayama 株)分别感染人肝癌 KN73 细胞,经过多次细胞传代后建立乙脑病毒持续感染模型,收集感染细胞经反复冻融获取变异病毒。利用 preM 区特异引物进行 RT-PCR 法得到两种病毒的 preM 区基因片段,应用基因测序反应进行序列分析,并对两种病毒株 preM 区序列进行比较。preM 区基因测序结果显示,与 JaGAR-01 野生株比较,JaGAR-01 持续感染变异株(JaG-per)有 1 个核苷酸上碱基发生变异(第 26 位 U→G)并导致相应氨基酸发生置换(第 9 位亮氨酸→精氨酸);Nakayama 持续感染变异株(Nak-per)与其野生株相比则有 11 个核苷酸上碱基存在差异(第 26 位 U→G,第 37 位 G→A,第 39 位 C→U,第 45 位 U→C,第 51 位 U→C,第 99 位 U→C,第 126 位 U→C,第 165 位 C→U,第 189 位 C→U,第 195 位 C→U,第 198 位 U→C),但仅有其中第 26 位、第 37 位、第 39 位的碱基变异引起相应编码的氨基酸发生置换(第 9 位亮氨酸→精氨酸及第 13 位缬氨酸→

收稿日期: 2005-12-02, 修回日期: 2006-01-12

* 基金项目: 教育部留学回国人员科研基金(教外司留[1999]363 号)

** 通讯作者: 徐可树(1961-), 男, 陕西省籍, 副教授, 博士, 研究方向为病毒与肝脏疾病。Corresponding author. Tel: 027-67119890, E-mail: xuzou@medmail.com.cn

异亮氨酸)。对比还发现变异后的 JaGAR-01 持续感染株与 Nakayama 持续感染株的基因序列相同。认为乙脑病毒持续感染变异株 preM 区存在基因变异, 这种变异可能与该区参与病毒持续感染及维持病毒生物学特性有关。

关键词: 流行性乙型脑炎病毒; 持续感染; preM 区序列分析; 基因变异

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0309-05

多数 RNA 病毒感染宿主后易导致持续感染的发生, 这可能与病毒含有的结构蛋白或非结构蛋白极易发生基因变异, 使病毒能够逃避宿主免疫防御系统的杀伤作用有关^[1]。流行性乙型脑炎病毒(乙脑病毒)属正链 RNA 病毒, 感染人体引起的流行性乙型脑炎(乙脑)是一种很凶险的中枢神经系统传染病, 其死亡率高达 30%, 另有 50% 的患者“治愈”后会留下神经系统方面的各种后遗症^[2]。目前临床上尚未能从根本上控制乙脑病毒感染, 特别是持续感染引起的乙脑病毒相关脑炎^[3], 对其感染的具体机理尚不十分清楚。为阐明乙脑病毒结构蛋白中 preM 区蛋白在持续感染过程中的作用, 本实验利用人肝癌 KN73 细胞株建立乙脑病毒持续感染模型, 应用基因测序反应对持续感染病毒的 preM 区序列进行分析并比较各变异株 preM 区序列的差异, 现将分析结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

细胞为人肝癌 KN73 细胞株, 细胞培养液为含 10% 胎牛血清(FCS)的 RPMI1640。病毒为乙脑病毒 JaGAR-01 株(1959 年分离)和中山予研株(Nakayama 株, 1935 年分离), 二者的变异株是在 KN73 细胞中经持续感染 2 年所得。

1.2 乙脑病毒持续感染模型的建立

JaGAR-01 株和 Nakayama 株分别感染 KN73 细胞, 以病毒量 m.o.i (multiplicity of infection)=10 吸附于 KN73 细胞, 37℃、60min 后, 加培养液在 50ml/L CO₂ 孵箱中培养, 待 90% 细胞出现变性时, 进行传代。继续培养残存细胞形成单层细胞后, 平均 5~6d 传代一次, 传代时采用标准胰蛋白酶消化技术进行。每次传代前采取培养液与感染细胞保存, 将感染细胞进行 3 次冷冻融解得到细胞内病毒。

1.3 病毒滴度测定

用空斑形成实验方法测定病毒含量^[4]。将含有病毒的培养上清液和细胞内病毒按比例稀释, 在 24 孔培养板内单层培养的仓鼠肾细胞株 BHK 上吸附, 添加 0.6% 的甲基纤维素液和含有 1% FCS 的 MEM 培养液, 3 d 后用甲醇固定, 再用 1% 结晶紫染色, 记录空斑数。

1.4 preM 区 RT-PCR 法

收集持续感染细胞, 用加酚法提取细胞内总 RNA。以该 RNA 作为模板, 取乙脑病毒 preM 区核苷酸作为引物, 扩增片段长度为 253bp, 上游引物为: 5'-TGTTATAGCCTGCGCAGGAGCC-3', 下游引物为 5'-ATTCCAAGCGAAGCAGGAGA-3'。RT 反应条件为: 下游引物 10μmol/L, dNTP2mmol/L, 逆转录酶 0.5U, 总体积 10μl, 42℃, 1h 合成 cDNA, PCR 反应条件: 各引物分别为 10μmol/L, dNTP2mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.5U, 总体积 50μl, 循环参数为 94℃ 1min 预变性, 94℃ 1min, 60℃ 2min, 72℃ 3min, DNA 增幅反应进行 40 个循环, 再 72℃ 延伸 7min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳证实。

1.5 preM 区基因序列分析

参照 Sambrook 法^[5], 从低熔点凝胶中回收 PCR 产物; 应用 preM 区特异引物, 运用基因测序反应进行序列分析, 具体方法参见试剂盒说明书。作为对照, JaGAR-01 野生株和 Nakayama 野生株的 preM 区序列分析方法同上。此外, JaGAR-01 野生株和 Nakayama 野生株 preM 区基因序列取自国际基因库 (GeneBank 号分别为 AF069076 和 U70413)。

2 结果

2.1 持续感染 KN73 细胞中乙脑病毒含量

JaGAR-01 株和 Nakayama 株感染 KN73 细胞, 感染后 24h JaGAR-01 株和 Nakayama 株的病毒量分别是 2.4×10^6 PFU/mL 与 8.2×10^4 PFU/mL, JaGAR-01 株的病毒量比 Nakayama 株约高 30 倍。感染后第 20d JaGAR-01 株和 Nakayama 株的病毒量分别是 17.2×10^3 PFU/mL 与 1.72×10^3 PFU/mL。感染后第 40d 和 90d, 即传代第 7 代和第 17 代时, 两株的病毒量均为 10^3 PFU/mL。目前已连续传代 2 年以上, 共传代 145 代, 细胞内病毒量多次检测一直维持在 10^3 PFU/mL 水平。被感染后的 KN73 细胞形态与非感染细胞极其近似, 未见明显细胞变性效应 (cytopathic effect, CPE), 但感染细胞的增殖性较非感染细胞为低, 非感染细胞的倍加时间 (doubling time) 为 18h, 而持续感染细胞为 23 h。

2.2 各病毒株 preM 区核苷酸序列及相应的氨基酸

序列测定

首先在感染后第 35d、40d 及 45d, 即传代第 6 代、第 7 代和第 8 代时, 进行 preM 区部分基因测序, 然后分别在一年、一年半及两年, 即传代第 70 代、第 110 代和第 145 代时, 用 RT-PCR 法分别对 4 株乙脑病毒的 preM 区全基因进行扩增, 克隆, 测序, 并进行序列比较, 两种野生株及两种持续感染变异株的 preM 区基因全长 253bp (图 1), 编码 80 个氨基酸。

```
JaGAR-01 KLSNFQ GKLLMTINNTDIADVIVIPTSKGENRCVWRAIDV 40
JaG-per ..... R.....
Nakayama ..... V.....
Nak-per ..... R.....
JaGAR-01 GYMCEDTITYECPKLTMGNDPEDVDCWCDNQEVYVQYGRC 80
JaG-per .....
Nakayama .....
Nak-per .....
```

图 1 四株乙型脑炎病毒 preM 蛋白区域的氨基酸序列对比结果

Fig.1 Alignment of amino acid sequences of the preM proteins of JEV wild strains and persistently infected strains

Note: All the amino acids of JaGAR-01 wild strain is written in abbreviated form while the differences are indicated for the others. A dot indicates the same amino acid as the JaGAR-01 wild strain. JaGAR-01: JaGAR-01 wild strain, JaG-per: JaGAR-01 persistently-infected mutant strain, Nakayama: Nakayama wild strain, Nak-per: Nakayama persistently-infected mutant strain

在病毒持续感染后第 40d, 即传代第 7 代时, 观察到持续感染 JaGAR-01 株与 Nakayama 株 preM 区域核苷酸的碱基序列及氨基酸的排列发生变异, 但以后稳定存在。至今持续感染系已建立 2 年, 变异后的氨基酸均未再发生变化。

测序后对比还显示: 持续感染 JaGAR-01 株和持续感染中山株病毒的 preM 区域在变异后核苷酸的碱基序列与氨基酸的排列完全相同(图 2)。与 JaGAR-01 野生株核苷酸序列比较, 两种持续感染株的同源性均为 99.6%, 与 JaGAR-01 野生株氨基酸序列比较, 另外三种病毒株的同源性均为 98.75% (表 1)。

表 1 乙型脑炎病毒野生株及持续感染变异株中 preM 区域核苷酸与氨基酸同源性的比较

Table 1 Comparison of the homology of nucleotide sequences and amino acid sequences of the preM proteins of Japanese encephalitis virus wild strains and their persistently-infected strains

JEV strains	Homology of nucleotides	Homology of amino acids
JaGAR-01	100	100
JaG-per	99.6	98.75
Nakayama	96.0	98.75
Nak-per	99.6	98.75

Note: regarding JaGAR-01 wild strain as control, compare other strains with it. JaGAR-01: JaGAR-01 wild strain JaG-per: JaGAR-01 persistently-infected mutant strain. Nakayama: Nakayama wild strain. Nak-per: Nakayama persistently-infected mutant strain.

```
JaGAR-01 AAGUUGUCAAAU UCCAGGGGAAGCUUUUGAUGACCAUUAACAACACGGACA UUGCAGAC 60
JaG-per ..... G.....
Nakayama ..... G C ..... U ..... U.....
Nak-per ..... G.....
JaGAR-01 GUUAUCGUGAUUCCACCUCAAAAGGAGAGAACAGAUGCUGGGUCCGGCAAUCGACGUC 120
JaG-per .....
Nakayama ..... U.....
Nak-per .....
JaGAR-01 GGCUACAUGUGUGAGGACACUAUCACCUACGAAUGUCCU AAGCUUACCAUGGGCAAUGAU 180
JaG-per .....
Nakayama ..... U ..... C.....
Nak-per .....
JaGAR-01 CCAGAGGAUGUGGAUUGCUGGUGUGACAACCAAGAAGUCUACGUCCAUAUGGACGGUGC 240
JaG-per .....
Nakayama ..... C ..... C ..... U.....
Nak-per .....
JaGAR-01 ACGCGGACCAGGC 254
JaG-per .....
Nakayama .....
Nak-per .....
```

(733)

图 2 四株乙型脑炎病毒 PreM 蛋白区域的核苷酸序列对比结果

Fig.2 Alignment of deduced nucleotide sequences of the preM proteins of four Japanese encephalitis virus strains

Note: One letter code is used for the base of a nucleotide. The base sequence of JaGAR-01 strain is written in full while the differences are indicated for the others. A dot indicates the same base as the JaGAR-01 strain. Bases are numbered from the first base of the PrM gene. Strain designations are listed first, followed by other strains. JaGAR-01: JaGAR-01 wild strain, JaG-per: JaGAR-01 persistently-infected mutant strain, Nakayama: Nakayama wild strain Nak-per: Nakayama persistently-infected mutant strain.

2.3 JaGAR-01 野生株和持续感染株 preM 区序列分析

和 JaGAR-01 野生株比较, 持续感染变异株的 preM 区域仅有 1 个核苷酸上碱基发生变异 (第 26

位 U→G) 并导致第 9 位亮氨酸 (Leu) → 精氨酸 (Arg)。JaGAR-01 持续感染株 preM 区域核苷酸上碱基的变异率为 0.35%，相应编码氨基酸的变异率为 1.25%。

2.4 Nakayama 野生株及持续感染变异株的 preM 区序列分析

与 Nakayama 野生株相比，持续感染株共有 11 个核苷酸的碱基发生变异，分别为位于碱基序列的第 26 位 U→G，第 37 位 G→A，第 39 位 C→U，第 45 位 U→C，第 51 位 U→C，第 99 位 U→C，第 126 位 U→C，第 165 位 C→U，第 189 位 C→U，第 195 位 C→U，第 198 位 U→C，其中第 26 位、第 37 位、第 39 位碱基的变异导致了 2 个氨基酸发生置换，第 9 位亮氨酸 (Leu) → 精氨酸 (Arg) 及第 13 位缬氨酸 (Val) → 异亮氨酸 (Ile)。另外虽有 8 个碱基发生改变，但其编码的氨基酸却无变化。统计显示核苷酸上碱基的变异率为 3.9%，相应编码氨基酸的变异率为 2.5%。

3 讨论

病毒持续感染模型的建立，对研究病毒的生物学特性及基因分析有其重要意义。在连续观察 3 个月以上，当细胞内病毒量趋向稳定，并可随细胞分裂繁殖而进入子代细胞，即可确定为持续感染细胞。本实验所选用的持续感染模型是 JaGAR-01 野生株和 Nakayama 野生株分别感染人肝癌 KN73 细胞后所建立。目前已连续传代 2 年以上，细胞内病毒量一直维持在 10^3 PFU/ml 水平，说明该持续感染模型的建立是适用和可行的。

乙脑病毒的基因组全长为 10976 个核苷酸，由 5' 与 3' 端非编码区及一个开放阅读框架 (ORF) 组成，ORF 编码一个含 3432 个氨基酸的多蛋白前体，后者经酶切后形成依次为 C、prM/M、E 的 3 个结构蛋白和依次为 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5 等 7 个非结构蛋白。研究认为，膜蛋白 M 是乙脑病毒毒粒包膜中含 75 个氨基酸的非糖基化蛋白。在感染细胞中，M 蛋白以糖基化的前体即 preM 的形式存在，preM 蛋白是未成熟病毒体的一部分，在病毒感染后期，它被定位在分泌途径中的细胞蛋白酶水解为 M 蛋白后发育为成熟的病毒体^[6]。preM/M 主要停顿在内质网，在病毒出芽过程中发挥关键作用，并与 E 蛋白及 C 蛋白共同组成感染性病毒核心^[7, 8]，因此 preM 蛋白在病毒感染方面有其重要作用。

从持续感染 JaGAR-01 株和 Nakayama 株基因分

析可见，两株 preM 区的氨基酸排列仅 1-2 个发生变化。与 JaGAR-01 野生株相比，其持续感染株只有 1 个氨基酸发生变异；此外，和 Nakayama 野生株比，持续感染 Nakayama 株虽有 10 个核苷酸上的碱基发生变异，但仅有其中 3 个碱基的变异导致了两个氨基酸置换。病毒持续感染过程中，缺陷干扰 (defective interfering, DI) 粒子等因素的存在阻碍野生株病毒的复制及增殖^[9]。本实验中两持续感染株 preM 区域均存在第 9 位亮氨酸→精氨酸，由中性氨基酸置换为碱性氨基酸，后者对 DI 粒子形成有抑制作用，从而可能减弱 DI 粒子阻碍病毒增殖的影响，有利于持续感染病毒的出芽与增殖。另外，在持续感染株中多数变异的核苷酸的差异在氨基酸编码子的第三位，属于沉默突变。也有研究显示，将乙脑病毒 SA-14 株和减毒株 SA-14-14-2 进行克隆和测序，发现 preM 蛋白无氨基酸的变化^[10]，但本实验对比发现两变异株的氨基酸均发生变异，推测乙脑病毒不同株的 preM 区域在持续感染过程中氨基酸有无变异存在差异。本实验中两种变异株虽有核苷酸的碱基序列和个别氨基酸的变化，但无核苷酸或氨基酸插入或丢失，因此认为 preM 区整体结构相对较稳定，这种 preM 区序列的高度保守，推测与病毒保持自身生物学特性和病毒复制有关。有趣的是，持续感染 JaGAR-01 株和 Nakayama 株 preM 区在变异后结构完全相同，可能与各变异株在持续感染过程中，通过改变自身结构，从而逃避宿主免疫杀伤有关。

病毒性状变异除与 preM 区域有关外，推测也与其他区域蛋白变异或病毒与宿主间蛋白相互作用有关。此外 preM 区在乙脑病毒持续感染过程中的其他作用以及与 E 蛋白和非结构区域 NS3 蛋白的关系则有待于进一步研究。

致谢：日本金泽医科大学竹上 勉教授对本实验的悉心指导和帮助，在此表示谢意！

References

- [1] Pavio N, Lai M M C. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system [J]. *Bioscience*, 2003, 28: 287-304.
- [2] Shyu W R, Wang Y C, Chin C. Assessment of neutralizing antibodies elicited by a vaccine (Nakayama) strain of Japanese encephalitis virus in Taiwan [J]. *Epidemiol Infect*, 1997, 119: 79-83.
- [3] Ravi V, Desai A S, Shenoy P K, *et al*. Persistence of Japanese encephalitis virus in the human nervous system [J]. *Med Virol*, 1993, 40: 326-329.

- [4] Takegami T, Sahara M, Hotta S. A sensitive method for detection of flavivirus envelope proteins and virus titration using a monospecific antiserum against Japanese encephalitis virus envelope protein [J]. Kanazawa Med Univ, 1990, 15: 73-79.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning [M]. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989, 345-348.
- [6] Chang G J, Hunt A R, Davis B, *et al.* A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice [J]. Virology, 2000, 74 (9): 4244-4252.
- [7] Yoshii K, Konno A, Goto A, *et al.* Single point mutation in a tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion [J]. J Gen Virol, 2004, 85 (10): 3049-3058.
- [8] Konishi E, Shope R E, Pincus S, *et al.* Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese Encephalitis virus PrM/M and E proteins are protected from Lethal/JEV infection [J]. Virology, 1992, 188: 714.
- [9] Poidinger M, Coelen RJ, Mackenzie JS. Persistent infection of Vero cells by the flavivirus Murry Valley encephalitis [J]. J General Virology, 1991,72:573-578.
- [10] Nitayaphan S, Grant J A, Chang G J, *et al.* Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis virus and its attenuated vaccine derivative, SA-14-14-2 [J]. Virology, 1990, 177 (2) : 541-552.