

• 论著 •

双嗜性逆转录病毒感染日本血吸虫细胞的生物学理论与可行性探讨*

杨胜辉^{1,2}, 秦志强¹, 曾庆仁^{1*}, 曾铁兵^{1,3}, 刘彦^{1,3}, 刘碧源^{1,3}, 蔡力汀¹, 喻容¹, 张顺科¹, 兰玲梅¹

(1. 中南大学湘雅医学院寄生虫学系, 湖南长沙 410013; 2. 湖南中医药大学病原生物学与免疫学教研室, 湖南长沙 410208;

3. 南华大学病原生物学研究所, 湖南衡阳 421001)

【摘要】 目的 探讨用双嗜性逆转录病毒载体将外源基因导入日本血吸虫(Sj)细胞的生物学理论与实验依据。方法 用生物信息学方法对双嗜性逆转录病毒 rRam-1 受体同源性分布、结构与功能作系统的分析与比较; 利用携带外源 E77.43 基因的双嗜性逆转录病毒感染 Sj 童虫培养细胞, 经 PCR 和 RT-PCR 检测感染细胞目的基因(E77.43)的整合与表达。结果 根据生物信息学分析结果推断, Sj 细胞膜上存在的 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 两种蛋白为分泌性跨膜蛋白, 可能具有细胞膜离子转运通道或受体蛋白的功能及双嗜性逆转录病毒感染的膜受体样作用, 可能参与病毒对细胞的吸附和穿入过程; 利用携带外源 E77.43 基因的双嗜性逆转录病毒感染 Sj 童虫培养细胞后, 用 PCR 及 RT-PCR 检测到目的基因整合与表达, 扩增的目的片段大小为 330 bp, 与理论值相符。结论 用载有 E77.43 基因的双嗜性逆转录病毒感染 Sj 童虫细胞获得成功, 推测 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 两种与 rRam-1 受体同源的蛋白可能是 Sj 感染过程中起作用的分子。研究结果为下一步用双嗜性逆转录病毒载体转导永生生化基因到 Sj 细胞提供了生物学理论与实验依据。

【关键词】 双嗜性逆转录病毒; 受体同源蛋白; 血吸虫, 日本; 培养细胞; 基因整合与表达

【中图分类号】 R383.24

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2009)10-0744-10

[Journal of Pathogen Biology. 2009 Oct; 4(10): 744-753, 776.]

Biological theory and experimental foundation for transduction of cultured *Schistosoma japonicum* cells with amphotropic retrovirus

YANG Sheng-hui^{1,2}, QIN Zhi-qiang¹, ZENG Qing-ren¹, ZENG Tie-bing^{1,3}, LIU Yan^{1,3}, LIU Bi-yuan^{1,3}, CAI Li-ting¹, YU Rong¹, ZHANG Shun-ke¹, LAN Ling-mei¹ (1. Department of Parasitology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Pathogenic Biology and Immunology, Hunan Traditional Chinese Medical University, Changsha, 410208; 3. Institute of Pathogenic Biology, Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the biological theory and experimental foundation for transduction of exogenous genes into cultured *Schistosoma japonicum* (Sj) cells using an amphotropic retrovirus. **Methods** The homologous distribution, structure, and function of receptors for an amphotropic retrovirus, *Rattus norvegicus* (rRam-1), were systematically analyzed and compared using bioinformatics methods. Afterwards, the cultured cells of 12-day-old Sj schistosomula infected with the amphotropic retrovirus containing exogenous gene E77.43 were identified with PCR and RT-PCR in order to integrate and express the target gene in virus-treated cells. **Results** Results of bioinformatics analysis suggested two possible non-secreted transmembrane proteins, SjCHGC09605 and SjCHGC05362, on the cytomembrane of Sj, with their possible roles as ion transportation or receptor proteins and membrane receptors for amphotropic retroviruses involving in the virus adsorption and penetration into the cells. Consequently, the integration and expression of the exogenous gene, E77.43, was detected in schistosomulum cells exposed to the viruses using PCR or RT-PCR analysis. **Conclusion** Schistosomulum cells were transduced successfully with the amphotropic retrovirus. Notably, two proteins, SjCHGC09605 and SjCHGC05362, that are homologous to the rRam-1 receptor may play an important role in the infection stage. Taken together, these results provide biological theory and experimental foundation for transferring an immortalized gene into Sj cells with an amphotropic retrovirus in future investigations.

【Key words】 Amphotropic retrovirus; receptor homologous proteins; *Schistosoma japonicum*; cultured cells; gene integration and expression ***

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 30570952)。

** **【通讯作者】** E-mail: qingrenz@xysm.net

【作者简介】 杨胜辉(1969—),男,在读博士生,副教授,主要研究方向为病原生物学。

迄今为止,对血吸虫细胞培养仍未获得连续传代的细胞系。为解决这一问题,作者拟用合适的方法将永生生化基因导入血吸虫培养细胞,以期建立血吸虫细胞系提供新的思路。关于将外源基因导入靶细胞的方法很多,目前常用的有非病毒和病毒两大类。前者包括脂质体、磷酸钙及 DEAE-葡聚糖介导的转染^[1]、电穿孔^[2,3]、显微注射及基因枪注射等^[4,5];后者主要利用病毒作载体将外源性基因引入靶细胞。目前,用于外源基因转移工具的病毒载体主要有逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒以及 HIV-1 型病毒等。其中,由莫洛尼小鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, Mo MLV)改建而来的逆转录病毒载体系统是目前应用较广泛的基因转移工具^[6,7],具有广泛宿主细胞使用范围。根据其感染范围可将逆转录病毒分为 4 种,即亲嗜性逆转录病毒(Ecotropic retrovirus)、嗜异性逆转录病毒(Xenotropic retrovirus)、双嗜性逆转录病毒(Amphotropic retrovirus)和泛嗜性逆转录病毒(Pantropic retrovirus)。4 种逆转录病毒载体中,双嗜性逆转录病毒是应用最为广泛的基因转移载体,它可感染多种哺乳动物细胞^[8]。该病毒感染宿主细胞的首要条件是需与靶细胞上相应受体发生特异性结合。大量研究证明,双嗜性逆转录病毒的特异性受体或类似受体已广泛存在于脊椎动物细胞膜上^[9,10]。因此,使得双嗜性逆转录病毒载体在动物和人类的转基因研究中得到广泛应用^[9]。近年有学者利用双嗜性逆转录病毒载体将永生生化基因转入某些难以在体外连续传代培养的哺乳动物细胞,并成功建立了永生生化细胞系^[11,12]。然而却鲜有在低等无脊椎动物细胞中应用的研究报道。为寻求双嗜性逆转录病毒载体感染日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, Sj)细胞的理论依据并观察其可行性,本研究首先利用生物信息学研究方法对双嗜性逆转录病毒 rRam-1(receptor for amphotropic retrovirus of *Rattus norvegicus*, rRam-1)受体的同源性分布、结构与功能作系统分析与比较,进而利用携带外源基因的双嗜性逆转录病毒^[13]进行 Sj 童虫培养细胞感染的预实验,为在 Sj 培养细胞中利用双嗜性逆转录病毒载体导入外源永生生化基因的研究提供理论和实验依据。

材料和方法

1 双嗜性逆转录病毒 rRam-1 受体的生物信息学分析

1.1 rRam-1 受体氨基酸序列同源性分析 据文献报道^[14],从 GenBank 收集褐家鼠白血病双嗜性逆转录病毒受体(rRam-1)的氨基酸序列,其登陆号为 AAA16532.1,是一种含 656 个氨基酸的跨膜蛋白。利用 NCBI 站点 Blastp 程序,针对 NCBI 的蛋白质序

列数据库进行相似性搜索,了解其他物种中存在的与该受体蛋白相似的氨基酸序列以及在 Sj 中存在的与 rRam-1 同源蛋白分子。并用欧洲生物信息学研究所 Cluster W2 程序对 rRam-1 受体及其他物种中同源蛋白的氨基酸序列作多序列比对,确定各序列间同源性大小;并绘制系统发生树,了解彼此间的进化关系。

1.2 rRam-1 受体及其同源性蛋白质的结构与功能分析

1.2.1 rRam-1 受体及其同源性蛋白质的氨基酸序列保守区域分析 在 NCBI 的 CDD(conserved domain database)数据库中运用 RPS-blast 程序和 InterProScan 工具分析 rRam-1 受体蛋白及其同源性蛋白质的保守结构域,了解相互间是否存在共同保守结构域,推断其在生物学功能上的相似性。

1.2.2 与 rRam-1 受体同源的 Sj 蛋白的二级结构预测 运用 Predictprotein 程序分析与 rRam-1 受体同源性的 Sj 蛋白质可能的螺旋、片层、卷曲等二级结构,了解该蛋白氨基酸残基在二级结构上的特点,作为功能预测的基础。

1.2.3 与 rRam-1 受体同源的 Sj 蛋白的疏水性分析

应用 ExPASy 的 ProtScale 程序分析与 rRam-1 受体蛋白同源性的 Sj 蛋白质疏水性图谱和平均柔曲性图谱,预测该蛋白氨基酸残基的疏水区域与亲水区域的分布情况。

1.2.4 与 rRam-1 受体同源的 Sj 蛋白跨膜区分析

运用 ExPASy 站点提供的蛋白质组学分析工具 Tmpred 程序对上述分析所获的与 rRam-1 受体同源的 Sj 蛋白质进行跨膜性分析,推测其作为跨膜蛋白而发挥受体样作用的可能性。

1.2.5 与 rRam-1 受体同源的 Sj 蛋白信号肽、亚细胞定位信号及翻译后修饰点预测 运用 PSORT II 程序对与 rRam-1 受体同源的 Sj 蛋白进行信号肽预测和亚细胞定位信号分析,了解其在细胞内的分布。进而用 PROSITE motif search 程序寻找上述 2 种 Sj 蛋白内是否存在糖基化、磷酸化和脂酰化等翻译后的修饰位点,推测其与细胞膜信号传导的关系。

2 双嗜性逆转录病毒感染 Sj 细胞

2.1 实验动物、细胞株及 PCR 引物的来源 清洁级家兔由中南大学实验动物学部提供;阳性钉螺购自湖南省血吸虫病防治所。整合有东方田鼠 E77.43 基因和新霉素抗性基因的 pLXSN-E77.43/PA317 稳定产逆转录病毒细胞系以及小鼠 NIH3T3 细胞系由本院分子生物学研究中心秦自强博士惠赠。用 pLXSN-E77.43/PA317 细胞系包装出完整的 pLXSN-E77.43 双嗜性逆转录病毒颗粒^[13]。E77.43 基因和 Sj- β -actin 基因的 PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

2.2 pLXSN-E77.43 双嗜性逆转录病毒颗粒收集、浓

缩及滴度测定 参照文献^[13]的方法进行。制备好的病毒液分装保存于一80℃冰箱。

2.3 Sj 童虫细胞的制备、培养与鉴定 在无菌条件下收集 Sj 尾蚴感染家兔后第 12d 童虫,用含双抗(青霉素 1 000 U/ml,链霉素 1 000 μg/ml)和肝素(180 U/ml)的 RPMI-1640 培养基中反复洗涤 5 次。参照文献^[15]的方法剪切、消化、离心(280 g×8 min)洗涤 2 次收集细胞,加含 5% 胎牛血清的 1640-40 特定培养基^[16],悬浮细胞,计数后定容为 1×10^7 /ml,转入 6 孔培养板中(0.4 ml 细胞悬液/孔)置含 5% CO₂、37℃ 培养箱培养 8 h,加含 20% 胎牛血清的 1640-40 特定培养基(2.6 ml/孔)后继续培养。每 2 d 观察 1 次,隔 4 d 半量换液 1 次。细胞增殖情况用 BrdU-ELISA 检测,方法按 BrdU-ELISA Cell Proliferation Assay Kit(美国 Chemicon 公司)说明书进行。细胞活力检测用 AO-EB 染色法^[15]。

2.4 逆转录病毒感染 Sj 童虫原代培养细胞 当培养细胞经 BrdU-ELISA 检测证明有明显增殖时收集细胞,用无血清 RPMI-1640 培养基离心洗涤 2 次,按设计分管(每个因素平行设 2 管),分别加入经快速解冻的不同稀释度病毒液 1 ml(包括 1:1 和 1:100 两种不同浓度),再加终浓度为 8 μg/ml 的 Polybrene。轻轻重悬细胞,然后转种于 6 孔板中,2 孔/管,以不加病毒液孔为阴性对照。含细胞培养板置培养箱中培养 3 h,每 30 min 轻轻晃动培养板 1 次。培养 3 h 后补加含 20% 胎牛血清的 1640-40 特定培养基 1 ml,培养 24 h 后换液,隔 4 d 半量换液 1 次,持续培养 10 d 后取细胞鉴定。

2.5 PCR 检测外源基因在 Sj 童虫细胞中的整合 离心收集病毒感染后继续培养 10 d 的 Sj 童虫细胞,用 PBS 离心洗涤 3 次(280g×8 min),以弃除未结合病毒颗粒。采用 DNA 提取试剂盒(上海华舜生物工程有 限 公 司),按 说 明 书 抽 提 DNA。以 2×Taq PCR MasterMix(北京天根生物技术有限公司)和 E77.43 基因引物^[13](上游为 5'-AAATGGATCCTTGAGTAGT-TCCAGCAGGAA-3';下游为 5'-GCGGCTG-CAGTTTTTAAAAATAATTCCTTTTGT-3')进行 PCR 扩增,预期扩增的目标基因片段大小为 330 bp。以未加病毒感染组细胞 DNA 和感染组细胞培养上清作为阴性对照,以 pLXSN-E77.43/PA317 细胞基因组 DNA 作为阳性对照。PCR 反应条件:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,35 个循环后 72℃ 终延伸 10 min。预期 PCR 产物为 330 bp。用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。

2.6 RT-PCR 检测外源基因 E77.43 在 Sj 童虫细胞中转录表达 离心收集加病毒感染后继续培养 10 d

的 Sj 童虫细胞,按 Trizol 试剂(Invitrogen 产)说明书方法抽提 RNA。用 DNase I 酶(Fermentas 产)处理提取的总 RNA 以除去污染的基因组 DNA,以 MMLV 逆转录酶(Invitrogen 产)反转录合成 cDNA 第一链,取 cDNA 产物 3 μl 作 PCR 扩增,E77.43 基因特异引物及反应条件同上。以 Sj β-actin 基因为 RT-PCR 内参,根据 GenBank 中 Sj β-actin 基因序列[登录号:AF223400],用 Primer 5.0 软件设计引物(上游 5'-TGATGATGCACCAAGAGC-3';下游 5'-GT-CAAGAGGACGGGATGT-3'),取 3.0 μl cDNA 作 Sj β-actin 基因的扩增。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,33 个循环后 72℃ 终延伸 7 min。PCR 产物扩增片段为 249 bp,以 2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。实验以未加病毒感染组细胞的 cDNA 为阴性对照。

结 果

1 双嗜性逆转录病毒受体的生物学信息学分析结果

1.1 鼠白血病双嗜性逆转录病毒受体(rRam-1)氨基酸序列同源性分析 rRam-1 氨基酸序列同源性分析结果见图 1 和图 2,与多种脊椎动物如小鼠、猫、家犬、中国仓鼠、人类、牛及非洲爪蟾等的溶质运载体家族(solute carrier family)的氨基酸一致性均在 59%(401/679)以上,其中与中国仓鼠 Ram-1 受体^[17](receptor for amphotropic murine retroviruses of *Cricetus griseus*,cRam-1)及人类 Ram-1 受体^[18](receptor for amphotropic murine retroviruses of *Homo sapiens*,hRam-1)的氨基酸序列一致性均为 93%(604/647);与多种无脊椎动物如致倦库蚊、马来丝虫、秀丽隐杆线虫及新杆状线虫等的磷酸盐运载体(phosphate transporter)家族的氨基酸一致性分别为 42%(295/692)、48%(114/237)、45%(121/265)和 45%(120/263),相似性分别为 58%(402/692)、70%(168/237)、67%(180/265)和 66%(175/263)。SjCHGC09605(GenBank 登录号:AAW25459.1)和 SjCHGC05362(GenBank 登录号:AAP06275.2)与 rRam-1 受体的氨基酸序列一致性(Identities)分别为 54%(120/221)和 61%(112/183),相似性(Positives)分别为 74%(165/221)和 72%(132/183)。

选取 8 种脊椎动物和 5 种无脊椎动物的同源蛋白进行多序列比对并绘制系统发生树,结果显示 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 蛋白分别与褐家鼠、中国仓鼠和人类的 Ram-1 受体蛋白及小鼠、猫、家犬、牛、非洲爪蟾、致倦库蚊、马来丝虫、秀丽隐杆线虫、新杆状线虫等动物的同源蛋白存在大量保守氨基酸残基(图 1 和图 2),提示在进化上与致倦库蚊磷酸盐运载体蛋

体氨基酸序列进行保守区域分析,显示有相同结构域-PH04 superfamily(图5)。对 SWISS-PROT 蛋白质数据库检索,发现上述5种同源蛋白均为磷酸盐载体超家族成员(图6),该家族包括 Phos_transporter 和 PHO4 两个功能域,与 RPS-blast 程序的预测结果一致,故可初步确定 SjCHGC09605 蛋白和 SjCHGC05362 蛋白属于磷酸盐载体超家族成员。

GC05362 蛋白属于磷酸盐运载体超家族成员。

图 1 SiCHGC09605 蛋白、Ram-1 受体家族及其他物种同源蛋白氨基酸多序列比较

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of rRam-1, *S. japonicum* SJCHGC09605 protein and the related proteins to rRam-1 from divergent species

rRam-1_AAA16532	EE--GGVEMRLASELIDPDQPHFE-----DPAEDEKEEKDQSAEVHLL	487
M.musculus_AAHA46510.1	EE--GGVEMRLASELADPPDRPHE-----DPTFEEKEEKDQSAEVHLL	487
cRam-1_AAA57032	EE--GGVEMRLASELADPDQPHD-----DPTFEEKEEKDQTEVHLL	486
hRam-1_AAA18018	EE--GGVEMRLASELADPDQPER-----DPAFEEKEEKDQAEVHLL	486
F.catus_NF_001009839.1	EE--GGVEMRLASELIDPDQPERD-----DPAFEEKEEKDQAEVHLL	487
C.familiaris_XP_539953.2	EE--GGVEMRLASELADPDQPERD-----DPAFEEKEEKDQAEVHLL	487
B.taurus_NF_001073749.1	EE--GGVEVRLAPLAEPEPPERD-----DPADEEKEEKDQSEVHLL	479
X.laevis_NF_001083287.1	EA--EEQEGGEGIEDVVT--DRKSS-----SSSLEERHDQKQPEVSL	520
C.pipiens_XP_001844212.1	TEAAGLDHSLISTITLSPNISKVPLTIGKKDGSFEDGGAQVASESDVSAL	503
S.japonicum_SUCHGC05362	-----WLFPPDK-----IG-----KEPDPIDLVKDRPEAQV	95
C.elegans_AAB71321.2	-----WLFPPDK-----SRVSESDITLRL	342
C.briggsae_XP_001674477.1	-----WLPFDK-----KRISPTILRL	337
B.malayi_XP_001898489.1	-----MVRPTRSIE-----TFRSSKPEDEQASQL	355
	+	
rRam-1_AAA16532	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	537
M.musculus_AAHA46510.1	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	537
cRam-1_AAA57032	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	537
hRam-1_AAA18018	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	536
F.catus_NF_001009839.1	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	537
C.familiaris_XP_539953.2	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	537
B.taurus_NF_001073749.1	FHFLQVLITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLWLIYQGGVITQEAATFVWL	529
X.laevis_NF_001083287.1	FQFLQILITACFGSFGHGGNDVSNAGLPLVALNLVYVESGDVATKAATPIWL	570
C.pipiens_XP_001844212.1	FSLQVLITATFGSFGHGGNDVSNAGLPLALFMVIREGSLVQKSETPLAI	555
S.japonicum_SUCHGC05362	FSSLQILVITAVFGSFGHGGNDVSNAGLPLGLMLIATITQSVDSKKTIDWL	142
C.elegans_AAB71321.2	ITSVQVLITACFAGFAGHGGNDVSNAGLPLVALIAVYREDFVYQKRETPITV	393
C.briggsae_XP_001674477.1	ITSVQVLITACFAGFAGHGGNDVSNAGLPLVALIAVYREDFVYQKRETPITV	387
B.malayi_XP_001898489.1	FSLQVLITACFAGFAGHGGNDVSNAGLPLVALIAVYREDFVYQKRETPITV	405
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
rRam-1_AAA16532	LFYGGVGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	587
M.musculus_AAHA46510.1	LFYGGVGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	587
cRam-1_AAA57032	LFYGGVGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	586
hRam-1_AAA18018	LFYGGVGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	586
F.catus_NF_001009839.1	LFYGGVGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	587
C.familiaris_XP_539953.2	LFYGGVGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	587
B.taurus_NF_001073749.1	LLYGGIGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	629
X.laevis_NF_001083287.1	LLYGGIGICTGLVWNGRRVITQTMGKDLTIPITSSGFTIELASAFTVVIAS	570
C.pipiens_XP_001844212.1	LLYGGVGISVGLWNLGRRVITETIGNDLTKITPSTGFTIEIGAAFTVLLAS	193
S.japonicum_SUCHGC05362	LLYGGVGSISVGLWNLGRRVITQTLGDLTMTPSSGVCIEIGSALTVLIAS	605
C.elegans_AAB71321.2	LLYGVFAICVGLWNLGHKIVRTVGINMSEVNPASGFCIEFGAAVTALLAS	442
C.briggsae_XP_001674477.1	LLYGVLAICVGLWNLGHKIVRTVGINMSEVNPASGFCIEFGAAVTALLAS	437
B.malayi_XP_001898489.1	LLYGACGMCVGLWNLGHRVITYTGENLTKITPSCFAIEFGAAVTVLASS	455
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
rRam-1_AAA16532	NIGLEPVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	611
M.musculus_AAHA46510.1	NIGLEPVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	611
cRam-1_AAA57032	NIGLEPVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	610
hRam-1_AAA18018	NIGLEPVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	610
F.catus_NF_001009839.1	NVGLPEVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	611
C.familiaris_XP_539953.2	NVGLPEVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	611
B.taurus_NF_001073749.1	NIGLEPVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	603
X.laevis_NF_001083287.1	NVGLPEVSTTHCKVGSVVAVGWIRLS	644
C.pipiens_XP_001844212.1	KIGLEPSTTHCKVGSVVAVGASAPKLSADEEKALKRLSPHEHHHYATG	655
S.japonicum_SUCHGC05362	KIGLEPSTTHCKVGSVVAVGGRARS	217
C.elegans_AAB71321.2	KMGLEPSTTHCLVGAVVAVGSVKG	466
C.briggsae_XP_001674477.1	KMGLEPSTTHCLVGAVVAVGSVKA	461
B.malayi_XP_001898489.1	KFGSPVSTSTCKVGSVVAVGVIIQA	479
	: : * : * : * : * : * : *	
rRam-1_AAA16532	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMALLMY-ICGFVSSSR-	656
M.musculus_AAHA46510.1	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMALLMY-ICGLFVSSSR-	656
cRam-1_AAA57032	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAR--LFSAAIMAILMYGILPYV--	652
hRam-1_AAA18018	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMAILMYGILPYV--	652
F.catus_NF_001009839.1	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMALLMYGILPYV--	653
C.familiaris_XP_539953.2	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMAILMYGILPYV--	653
B.taurus_NF_001073749.1	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMAILMYGILPYV--	645
X.laevis_NF_001083287.1	-RKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAG--LFSAAIMAILMYGILPYV--	689
C.pipiens_XP_001844212.1	-QKAVDNLRLERNIFIAVNEFVIVFVAA--LFSAAIMAILMYGILPYV--	695
S.japonicum_SUCHGC05362	-RNNVNGVIFERNILLAKLVITLPAAG--AISALLMYITLTV--	255
C.elegans_AAB71321.2	-GKETDNLRLERNIAVSVVITLPAAG--LFAALYM-WLLHFTIP--	500
C.briggsae_XP_001674477.1	-GRSIDVGLERNIAVSVVITLPAAG--GFAALYM-WLLHFTIP--	500
B.malayi_XP_001898489.1	-SGSVKWSIERNISLSLWITLFTVGTSSIFLSIFISYIFNFSFKQKIAVN	528
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

rRam-1、cRam-1 和 hRam-1 是分别来源于褐鼠、中国仓鼠和人类的 Ram-1 受体; *M. musculus*_AAH46510.1、NP_001009839.1、XP_539953.2、NP_000737479.1、XP_001844212.1 是分别来自于小鼠、猫、家犬、牛和非洲爪蟾的溶质载体家族成员; *C. pipiens*_XP_001844212.1、*B. malayi*_XP_001898489.1、致倦库蚊和马来丝虫的磷酸盐载体; *SljCHG09605* 和 *SljCHG05362* 为日本血吸虫假定蛋白; *C. elegans*_AAH71321.2、秀丽隐杆线虫假定蛋白 F09G2.3、*C. briggsae*_XP_001674477.1、新杆状线虫假定蛋白 CBG19098。“*”表示完全相同的氨基酸残基,背景为灰色;“:”表示观察到氨基酸残基的保守替换;“-”表示观察到氨基酸残基的半保守替换;“-”为程序自动加入的间隙,以便于氨基酸残基间比对;右侧数字表示氨基酸残基位置。

The rRam-1, cRam-1 and hRam-1 is receptors for amphotropic retrovirus from *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus* and *Homo sapiens*, respectively. *M. musculus*_AAH46510.1, NP_001009839.1, XP_539953.2, NP_001073749.1 and XP_001844212.1 is a member of solute carrier family from *Mus musculus*, *Felis catus*, *Canis familiaris*, *Bos Taurus* and *Xenopus laevis*, respectively. *C. pipiens*_XP_001844212.1 and *B. malayi*_XP_001898489.1 is a member for phosphate transporter family from *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Brugia malayi*, respectively; S|CHGC09605 and S|CHGC05362 are predicted proteins of *Schistosoma japonicum*; *C. elegans*_AAB71321.2 is a hypothetical protein P09G2.3 of *Caenorhabditis elegans*; *C. briggsae*_XP_001674477.1 is a hypothetical protein CBG19098 from *Caenorhabditis briggsae*. " * " means that the residues in that column are identical in thirteen sequences in the alignment, shown as grey color. ":" means that conserved substitutions of amino acid residues have been observed. "." means that semi-conserved substitutions are observed. Gaps introduced to provide better sequence alignment are indicated by dashes. Numbers at right indicate the positions of amino acid residues.

图 2 SiCHGC05362 蛋白、Ram-1 受体家族及其他物种同源蛋白氨基酸多序列比较

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of rRam-1, *S. japonicum* SJCHGC05362 protein and the related proteins to rRam-1 from divergent species

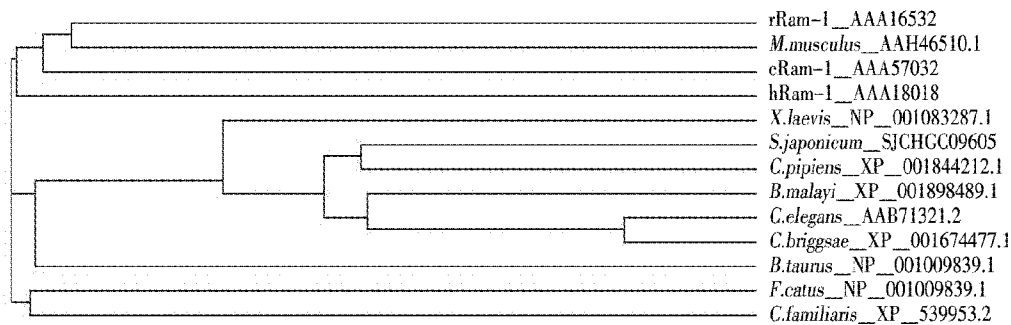


图 3 SjCHGC09605 蛋白、Ram-1 受体家族及其他几种同源蛋白的系统发生树
Fig. 3 Phylogenetic tree of SjCHGC09605 protein, Ram-1 family and homologous proteins from divergent species

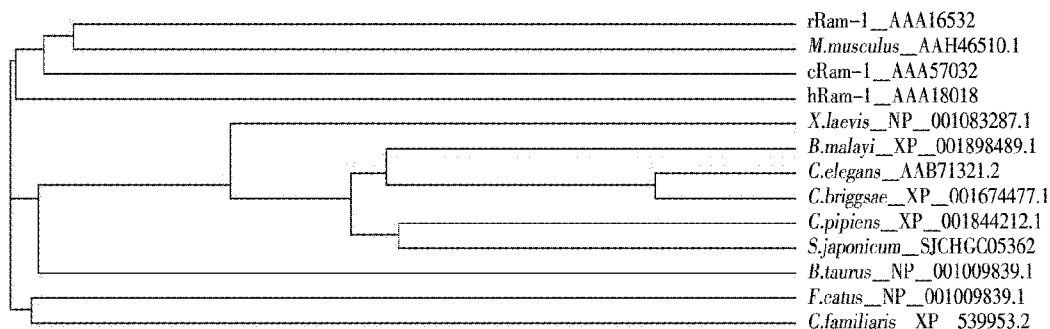
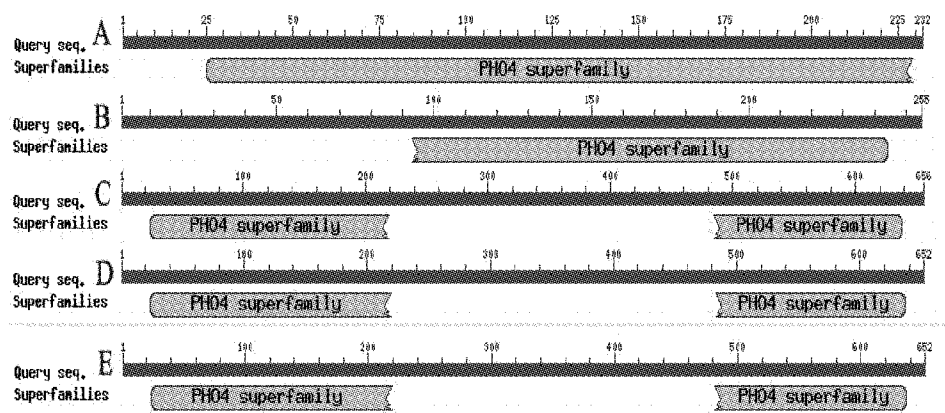


图 4 SjCHGC05362 蛋白、Ram-1 受体家族及其他几种同源蛋白的系统发生树
Fig. 4 Phylogenetic tree of SjCHGC05362 protein, Ram-1 family and the related proteins from divergent species



A Sj09605 protein B SjCHGC05362 protein C rRam-1 receptor D hRam-1 receptor E cRam-1 receptor

图 5 Ram-1 受体家族及 SjCHGC09605 蛋白和 SjCHGC05362 蛋白结构保守区域
Fig. 5 The Results of conserved domain searching by RPS-BLAST in NCBI

1.3 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 两种蛋白二级结构预测 SjCHGC09605 蛋白中 α -螺旋占 68.97%， β -折叠占 4.74%， β -转角占 26.29%，其中 α -螺旋主要分布于 7 个不同区域(图 7)；SjCHGC05362 蛋白中 α -螺旋占 39.22%， β -折叠占 16.08%， β -转角占 44.71%，其中 α -螺旋主要分布于 5 个不同区域(图 8)。

1.4 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 两种蛋白疏水性预测 对此 2 种 Sj 蛋白推导的氨基酸序列进行疏水性和平均柔曲性分析，显示分别含有 7 个和 5 个疏水区。

1.5 SjCHGC09605 和 SjCHGC0536 蛋白跨膜区分

析 对此 2 种 Sj 蛋白跨膜区进行预测结果显示：SjCHGC09605 蛋白有 7 个跨膜区，分别位于氨基酸残基的 8~27、48~65、93~111、122~141、151~169、186~204、215~232 等区域；SjCHGC05362 蛋白存在 5 个跨膜区，分别位于氨基酸残基的 93~111、114~133、141~158、178~200、229~255 等区域。与用 Predictprotein 程序预测的 α -螺旋区及 ProtScale 程序预测的疏水区分布基本一致。

1.6 SjCHGC09605 和 SjCHGC0536 蛋白定位及翻译后修饰位点分析 运用 PSORT II 程序分别对此 2 种 Sj 蛋白进行信号肽和亚细胞定位信号预测，显示 2

种 Sj 蛋白均不含有信号肽序列、线粒体靶向序列(mitochondrial targeting sequence)、核定位信号(nuclear localization signals)、线粒体膜滞留信号(ER membrane retention signals)、空泡靶向结构模块(vacuolar targeting motif)及从细胞表面到高尔基体的转运结构模块(transport motif from cell surface to Golgi); PROSITE motif search 结果显示,此 2 种蛋白序列中未发现糖基化、磷酸化和脂酰化等翻译后的修饰位点。

2 pLXSN-E77.43 病毒制备与感染 Sj 童虫细胞后的鉴定结果

2.1 培养的 pLXSN-E77.43/PA317 细胞和 NIH3T3 细胞形态 pLXSN-E77.43/PA317 细胞在 PA317 选择培养中接种 4 h 后开始贴壁生长,培养 3 d 达到 90% 汇合,形态呈长梭形(图 9A)。NIH3T3 细胞在接种 2 h 后开始贴壁生长,培养 3 d 达 90% 汇合,细胞呈长梭形(图 9B)(图 9 见封三)。

2.2 pLXSN-E77.43 双嗜性逆转录病毒滴度测定 NIH3T3 细胞经浓缩的重组逆转录病毒感染后,经 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 筛选培养 10 d,出现较多抗性细胞克隆。计数抗性细胞克隆,确定 pLXSN-77.43 重组逆转录病毒的滴度为 $3 \times 10^5 \text{ cfu}/\text{ml}$ 。

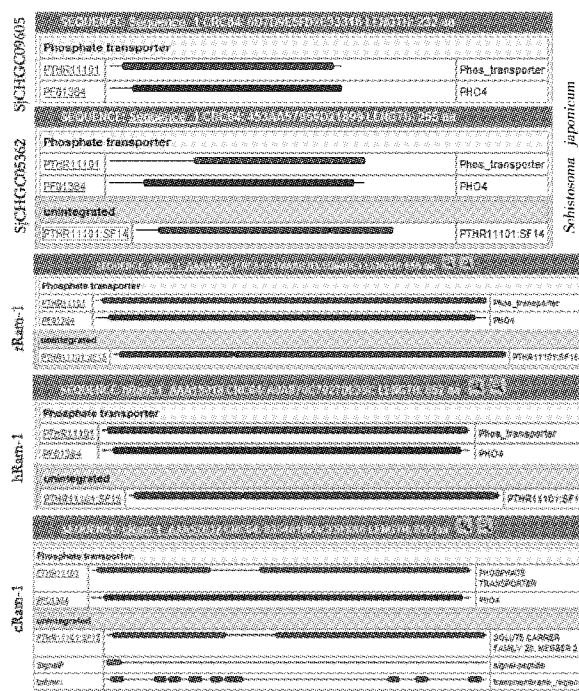


图 6 运用 InterProScan 程序对 5 种蛋白结构域的检索结果
Fig. 6 Domain search Results of five proteins by InterProScan program



注 AA:氨基酸;PROF_sec:神经网络二级结构预测,H: α -螺旋,E: β -折叠,L: β -转角;Rel_sec:神经网络二级结构预测可靠性指数,0:可靠性低,9:可靠性高;SUB_sec:神经网络子集二级结构预测,仅针对预期平均准确率在 82% 以上氨基酸残基。每栏图标最上方数字表示氨基酸残基位置。

图 7 用 Predictprotein 程序对 SjCHGC09605 蛋白二级结构的分析结果

Note AA:Amino;PROF_sec:Neural network secondary structure prediction,H: α -spiral,E: β -corner;Rel_sec:Neural network secondary structure prediction reliability index,0:Low reliability,9:High reliability;SUB_sec:A subset of neural network secondary structure prediction only for the expected average accuracy rate of 82% or more of the amino acid residues. Each column numbers indicate the position of amino acid residues on icon to the top.

图 7 The results of secondary structure of SjCHGC09605 protein from *S. japonicum* by predictprotein program

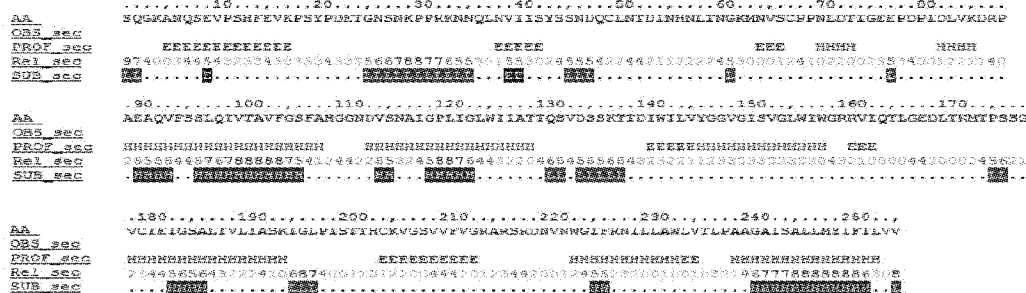


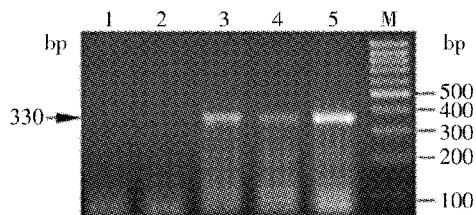
图 8 Predictprotein 程序对 SjCHGC05362 蛋白二级结构的分析结果

图 8 The results of secondary structure of SjCHGC05362 protein from *S. japonicum* by predictprotein program

2.3 Sj 童虫原型细胞的形态与活力 经剪切和消化制备的Sj童虫原型细胞形态见图10A,细胞活力经AO-EB染色见图10B,显示活细胞呈绿色,死细胞呈红色,计数后计算细胞活率为90%(图10见封三)。

2.4 Sj 童虫原代培养细胞的形态特点及增殖能力 用1640-40特定培养基培养Sj童虫细胞1d后可见少数细胞贴壁,多数呈半悬浮状生长。培养细胞形态多样,多呈圆形,表面光滑,饱满,轮廓清晰,立体感强。培养10d后,可见细胞有哑铃状分裂相(图11A)。BrdU-ELISA检测培养10d的细胞增殖水平与热处理致死细胞比较差异有统计学意义(t 值=-32.530, $P < 0.05$)(图11B)(图11见封三)。

2.5 逆转录病毒感染Sj童虫细胞后外源E77.43基因整合的PCR检测 取加病毒感染后继续培养10d的Sj童虫细胞,利用E77.43基因序列特异性引物作PCR,病毒原液感染细胞和 10^{-2} 浓度病毒感染细胞均扩增出预期大小(330 bp)的目的片段;未加病毒感染细胞和加病毒感染细胞的培养上清均无该扩增片段(图12)。提示外源性基因E77.43可通过逆转录病毒感染整合到血吸虫培养细胞基因组DNA中。



1 未加病毒感染Sj细胞DNA 2 病毒感染Sj细胞培养上清
3 病毒原液感染Sj细胞DNA 4 10^{-2} 浓度病毒感染Sj细胞DNA
5 pLXSN-E77.43/PA317细胞DNA(阳性对照) M 100 bp DNA marker

图12 pLXSN-E77.43逆转录病毒感染Sj童虫细胞后PCR结果

1 DNA from non-infected Sj cells 2 Supernatant from culture Sj cells infected with virus 3 DNA from Sj cells infected with undiluted virus 4 DNA from Sj cells infected with diluted virus at $1:100$ 5 DNA from pLXSN-E77.43/PA317 cells (positive control) M 100 bp DNA marker.

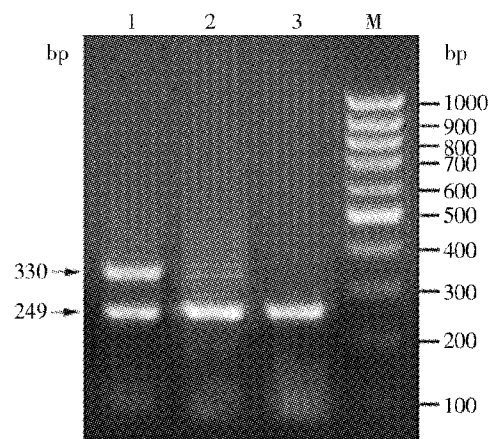
Fig. 12 Result of PCR detection *Schistosoma* cells infected with pLXSN-E77.43 retrovirus

2.6 逆转录病毒感染Sj童虫细胞后外源E77.43基因转录的RT-PCR检测 各组细胞RNA的RT-PCR产物经电泳分析,在病毒原液感染组细胞与 10^{-2} 浓度病毒感染细胞均出现E77.43基因的特异性扩增带(330 bp),但后者条带很弱;未加病毒液感染的细胞未出现该条带;各组细胞均扩增出内参Sj β -actin基因的特异性条带(249 bp)(图13)。表明E77.43基因经双嗜性逆转录病毒载体转入Sj童虫细胞,并在mRNA水平上有转录与表达。

讨论

逆转录病毒载体系统是目前广泛应用的外源基因

转移工具,该系统由两部分组成:首先构建含外源基因的逆转录病毒载体质粒,在载体中剔除病毒结构基因中的gag、pol及env三部分致病性反式功能序列,并以外源目的基因填替空白区,留下病毒基因组5'端和3'端的长末端序列(long terminal repeats, LTR)(内含病毒的启动子、增强子等)、包装信号 ψ 及相关序列,故为一种缺陷型病毒;其次构建逆转录病毒包装细胞,将逆转录病毒结构基因中的gag、pol及env三部分致病性基因(不包括病毒的包装信号)预先转染至包装细胞的基因组中,由后者提供病毒包装所需要的结构基因。由于包装细胞缺失病毒的包装信号(ψ),故可防止由于逆转录病毒基因之间的重组而产生完整的病毒基因组造成机体损害,同时又不对包装细胞的基因进行包装。该系统通过将携带外源基因的逆转录病毒载体质粒转染到特异性的包装细胞中,由后者产生具有一次性感染能力的重组复制缺陷型病毒颗粒,再通过后者感染靶细胞而将外源基因导入细胞内。它可将外源基因稳定插入和整合到宿主细胞基因组内,并随细胞分裂而传代。而且,逆转录病毒有很高的基因转染效率。体外实验证明,分裂期的靶细胞几乎可以100%地被感染^[8]。



1 病毒原液感染细胞RNA/cDNA 2 10^{-2} 稀释病毒液感染细胞RNA/cDNA 3 未加病毒感染细胞RNA/cDNA M 100 bp DNA marker 249 bp, Sj看家基因 β -actin的扩增产物

图13 pLXSN-E77.43逆转录病毒感染Sj童虫细胞后的RT-PCR结果

1 RNA/cDNA from the cells infected with virus stock solution 2 RNA/cDNA from the cells infected with diluted virus at $1:100$ 3 RNA/cDNA from cells infected without the virus M 100 bp DNA marker. A 249 bp amplicon is from Sj housekeeping gene, Sj β -actin

Fig. 13 RT-PCR detection for transcription of E77.43 gene in Sj cells

pLXSN逆转录病毒载体来源于Moloney鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, MMLV),系由Miller等(1989)^[19]在逆转录病毒载体N2基础上改建而成的新一代逆转录病毒载体。pLXSN不仅去除了病毒结构基因组gag、pol和env,而且将gag基因翻译起始密码由ATG突变成终止密码子TAG,将5'

端 MMLV 的 LTR 序列用相应的小鼠肉瘤病毒 (moloney murine sarcoma virus, MMSV) LTR 取代, 减少了同源重组的概率, 使其介导基因转移隐患大大降低, 具有较高安全性。该载体已经获得美国 FDA 的临床使用许可证, 是现阶段较好的载体系统^[8]。pLXSN 逆转录病毒感染宿主细胞的范围主要由其包装细胞所表达的包膜糖蛋白 (Env 蛋白) 决定。pLXSN-E77. 43 逆转录病毒载体和 pLXSN-E77. 43/PA317 稳定产逆转录病毒细胞系均由秦自强博士^[13]构建。在 pLXSN-E77. 43 逆转录病毒载体中, 外源基因 E77. 43 位于载体 5' 端 LTR 序列的下游, LTR 序列中包含有强启动子和增强子, 外源基因的转录与表达由其启动。pLXSN-E77. 43/PA317 细胞系是通过将 pLXSN-E77. 43 逆转录病毒载体转染至 PA317 细胞并经 G418 筛选而获得。PA317 细胞系为改建后的第 2 代包装细胞, 其 Env 蛋白的编码基因来自于双嗜性鼠白血病病毒 (amphotropic murine leukemia virus, AM-MLV), 故通过 PA317 细胞包装所得到的病毒为双嗜性逆转录病毒, 与第 1 代相比, 其产生的病毒滴度有较大提高, 并且更加安全^[20,21]。在本实验中, 将收集的 pLXSN-E77. 43 双嗜性逆转录病毒液感染 NIH3T3 细胞后, 检测到的病毒滴度为 3×10^5 CFU/ml, 与文献报道的 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml 滴度相近^[22], 可以满足后续实验要求。

尽管双嗜性逆转录病毒载体在动物和人类的转基因研究中得到广泛应用^[8], 然而, 迄今为止尚未见有关应用双嗜性逆转录病毒载体在无脊椎动物中转移外源基因的研究报道。为寻找双嗜性逆转录病毒载体在无脊椎动物中, 特别是在 Sj 中可应用的科学理论依据, 本研究应用生物信息学方法对褐家鼠的双嗜性逆转录病毒受体 (rRam-1) 的氨基酸序列进行相似性分析, 发现其与多种无脊椎动物蛋白的氨基酸序列有较高同源性, 特别是与 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 两种蛋白有较高同源性, 其氨基酸序列一致性分别为 54% 和 61%, 相似性分别为 74% 和 72%。序列比对和构建的系统发生树显示, Sj 此 2 种蛋白与褐家鼠、中国仓鼠、人类等的 Ram-1 受体蛋白及同源蛋白间存在大量高度保守的氨基酸残基, 并显示出在进化上要高于马来丝虫和秀丽隐杆线虫的同源蛋白, 与致倦库蚊磷酸盐运载体蛋白同源性最近, 与牛溶质运载体家族蛋白有共同进化祖先, 与人类、褐家鼠及中国仓鼠 Ram-1 受体蛋白处于平行进化分枝。对 Sj 此 2 种蛋白与褐家鼠、中国仓鼠和人类的 Ram-1 受体氨基酸序列进行保守区域分析, 发现 5 种蛋白序列中均存在磷酸盐运载体家族保守区域。磷酸盐运载体家族包括 2 个成员: 一个是来自粗糙链孢霉菌的钠离子依赖性磷酸盐运载体

体即 PHO-4^[23], 参与粗糙链孢霉菌对细胞外磷酸盐成分的摄取, 当加入钠离子后可使细胞摄取的磷酸盐增加 85 倍; 另一个则是来自人类和其他多种动物的白血病毒受体^[24,25], 正常情况下该受体在人类细胞膜上主要充作钠离子依赖性的磷酸盐运载体 (曾被称为溶质运载体家族), 通过参与磷酸盐物质的运输过程来维持细胞正常的新陈代谢、核苷酸及脂类合成^[26], 亦可作为逆转录病毒的受体而参与长臂猿白血病毒^[27,28]、猿猴肉瘤辅助病毒、猫白血病毒 B 亚群^[29]以及 10A1 鼠白血病毒^[24]对人类细胞的感染过程。

依据上述结果推测, SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 蛋白可能也有类似 rRam-1 受体蛋白的功能, 作为虫体细胞上的离子通道参与磷酸盐物质转运, 协助细胞完成正常的生理代谢过程, 并在双嗜性逆转录病毒感染过程中可能起到与病毒结合的受体样作用。Miller 等^[14]用 rRam-1 受体 cDNA 特异性探针与多种不同动物细胞 mRNA 进行杂交, 在鸡、蛙及酵母细胞 mRNA 中未检测到杂交信号, 但结果显示鸡细胞对双嗜性逆转录病毒载体高度易感, 认为这是鸡细胞膜上表达有 Ram-1 受体的同源蛋白所致。Burns 等^[30]也证实尽管非洲爪蟾细胞上不表达 Ram-1 受体, 但用双嗜性逆转录病毒载体作为基因转移工具仍可感染非洲爪蟾细胞, 并使外源性基因整合到细胞基因组上。

作为膜受体或膜离子通道的蛋白通常为细胞上的跨膜蛋白。为了解 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 是否为跨膜型蛋白而进行的二级结构预测显示, 2 种蛋白富含 α -螺旋区域。该区域一般为强疏水性的区域, 多位于膜上, 主要为蛋白跨膜性结构成分^[31]; 根据对疏水性和跨膜区的预测也发现, SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 分别有 7 个和 5 个疏水区及跨膜区, 与其 α -螺旋区域的分布基本一致, 表明上述蛋白为跨膜蛋白的可能性大。为进一步了解 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 蛋白在细胞中亚定位情况, 本研究用 PSORT II 程序对其作进一步分析结果显示, 上述 2 种蛋白均不含信号肽、线粒体靶向序列、核定位信号、线粒体膜滞留信号、空泡靶向结构模块及从细胞表面到高尔基体的转运结构模块 (transport motif from cell surface to Golgi), 提示它们可能是位于细胞膜上的跨细胞膜的蛋白成分。PROSITE motif search 程序分析未检索到此 2 种蛋白的任何翻译后修饰位点, 提示其参与信号转导的可能性小。

本研究为探索双嗜性逆转录病毒感染 Sj 细胞的可行性, 利用 E77. 43 基因作为分子标记, 在病毒感染细胞后通过检测该基因的整合与表达作为实验成功的标准。将 Sj 尾蚴感染动物后第 12 d 童虫制成细胞,

进行原代培养。在接种培养后 3 d 可见细胞分裂相, 培养后第 10 d 细胞分裂相增多, 用 BrdU-ELISA 检测证明其有较好增殖能力, 并选择此培养期细胞作双嗜性逆转录病毒感染的靶细胞。病毒感染后第 10 d, 提取细胞的 DNA 和 RNA 分别进行 PCR 和 RT-PCR 鉴定。E77. 43 基因的 PCR 结果显示, 在病毒感染细胞中扩增出预期大小的目的片段, 而在其培养上清中未检测到目的基因产物, 提示这种特异性条带的出现是由于病毒感染 Sj 童虫细胞后由外源 E77. 43 基因整合至细胞基因组内所致。E77. 43 基因的 RT-PCR 结果显示, 外源基因在病毒感染的 Sj 童虫细胞中出现了 mRNA 的转录。由此可见, 采用双嗜性逆转录病毒可将外源基因导入 Sj 童虫细胞中, 并在基因组中发生整合及 mRNA 的转录和表达。

本研究通过双嗜性逆转录病毒受体的生物信息学分析表明, 存在于 Sj 细胞膜上的 SjCHGC09605 和 SjCHGC05362 两种蛋白为非分泌性的跨膜蛋白, 其功能既可能有细胞膜离子转运通道或受体蛋白的作用, 也可能有双嗜性逆转录病毒感染的膜受体样作用, 参与病毒对细胞的吸附和穿入过程。本研究证实, 利用双嗜性逆转录病毒载体能够将外源 E77. 43 基因转导至 Sj 童虫培养细胞中, 为采用双嗜性逆转录病毒载体转导永生化基因到 Sj 细胞提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning, A laboratory manual[M]. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor, 1995. 345—347.
- [2] Hu QH, Liang WQ. A comparative study of electroporation and ion tophoresis for percutaneous penetration of naproxen [J]. Pharmazie, 2003, 58(3): 192—194.
- [3] Jaroszeski MJ, Heller LC, Gilbert R, et al. Electrically mediated plasmid DNA delivery to solid tumors *in vivo* [J]. Methods Mol Biol, 2004, 245: 237—244.
- [4] Gondo T, Tsuruta S, Akashi R, et al. Green, herbicide-resistant plants by particle inflow gun-mediated gene transfer to diploid bahiagrass (*Paspalum notatum*) [J]. J Plant Physio, 2005, 162(12): 1367—1375.
- [5] Dietrich A, Becherer L, Brinckmann U, et al. Particle-mediated cytokine gene therapy leads to anti-tumor and anti-metastatic effects in mouse carcinoma models[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2006, 21(4): 333—341.
- [6] Gordon EM, Anderson WF. Gene therapy using retroviral vectors[J]. Curr Opin Biotechnol, 1994, 5: 611—616.
- [7] Andreadis ST, Roth CM, Le Doux JM, et al. Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy[J]. Biotechnol Prog, 1999, 15: 1—11.
- [8] McTaggart S, Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery[J]. Biotechnology Advances, 2002, 20: 1—31.
- [9] Rasheed S, Gardner MB, Chan E. Amphotropic host range of naturally occurring wild mouse leukemia viruses [J]. J Virol, 1976, 19(1): 13—18.
- [10] Miller AD, Law MF, Verma IM. Generation of helper-free amphotropic retroviruses that transduce a dominant-acting, methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene [J]. Mol Cell Biol, 1985, 5(3): 431—437.
- [11] Gu Y, Li H, Miki, et al. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines [J]. Exp Cell Res, 2006, 312: 831—843.
- [12] Ouellette MM, McDaniel LD, Wright WE, et al. The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9: 403—411.
- [13] 秦自强. 东方田鼠抗日本血吸虫相关基因 E77. 43 的克隆和功能初步研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [14] Miller DG, Edwards RH, Miller AD. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 78—82.
- [15] 曾铁兵. 日本血吸虫童虫细胞体外培养与免疫保护性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [16] 刘伟, 曾铁兵, 曾庆仁, 等. 日本血吸虫成虫体外传代培养细胞的生物学鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(5): 395—397.
- [17] Wilson CA, Farrell KB, Eiden MV. Properties of a unique form of the murine amphotropic leukemia virus receptor expressed on hamster cells[J]. J Virol, 1994, 68(12): 7697—7703.
- [18] van Zeijl M, Johann SV, Closs E, et al. A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 1: 1168—1172.
- [19] Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression[J]. Biotechniques, 1989, 7(9): 980—986.
- [20] Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6(8): 2895—2902.
- [21] Miller AD. PA317 retrovirus packaging cells[J]. Mol Ther, 2002, 6(5): 572—575.
- [22] Jurgen S, Simon B, Gregory ML, et al. Retroviral preparations derived from PA317 packaging cells contain inhibitors that copurify with viral particles and are devoid of viral vector RNA[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11: 771—775.
- [23] Versaw WK, Metzenberg RL. Repressible cation-phosphate symporters in *Neurospora crassa* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(9): 3884—3887.
- [24] Miller DG, Miller AD. A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry[J]. J Virol, 1994, 68: 8270—8276.
- [25] Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7071—7075.

(下转 776 页)

两方面因素有关:一是随着当地居民生活水平的提高,卫生环境有了较大改善,多数居民家庭住房地面得到硬化,并进行了改水改厕,减少了寄生虫卵对环境的污染。对30户居民菜园、厕所周边、庭院、厨房的120份土样进行检查,仅有1份土样检出土源性线虫卵;二是通过积极开展寄生虫病防治知识教育,居民的健康保健意识显著提高,自我防护意识增强。但由于河南省地区之间经济发展不平衡,土源性线虫感染率差别较大,部分地区仍然需要下大力气做好土源性线虫病的调查、监测和防治,使当地的感染率达到国家规划的要求。

监测结果显示,调查点不同性别、年龄、职业和文化程度人群土源性线虫感染率差异无统计学意义。表明随着土源性线虫感染率的进一步下降,已无重点高危人群,防治重点应当转移到通过健康教育鼓励群众自愿检查,对感染者进行治疗等有效控制传染源方面。研究表明,开展健康教育能够有效提高居民自觉服药驱治率,取得较好的防治效果^[4]。陈艳等^[5]对大学新

生的调查显示,寄生虫病防治知识平均知晓率13项中有8项在50%以下,态度、信念、健康教育开设形成率14项有6项在50%以下,行为形成率13项有2项在50%以下。表明人们对寄生虫病防治的重视程度仍然不够,需要加强学校、家庭、社区、媒体等各层次的健康教育。

【参考文献】

- [1] 许汴利,赵旭东,苏云普,等.河南省人体重要寄生虫病流行现状调查与分析[J].中国病原生物学杂志,2005,18(6):454-457.
- [2] 张玉林,许汴利,黄倩.河南省人群肠道线虫感染情况[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1994,12:138-140.
- [3] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室.全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2005,23(5) suppl: 332-340.
- [4] 赵旭东,李莹,蔺西萌,等.健康教育全民防治肠道寄生虫病的研究[J].中国热带医学,2002,2(2):249-250.
- [5] 陈艳,牟荣,国果,等.健康教育对寄生虫病防治的影响[J].热带医学杂志,2007,7(1):83-85.

【收稿日期】 2009-05-10 【修回日期】 2009-07-28

(上接 753 页)

- [26] Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification[J]. Circ Res, 2000, 87: E10-E17.
- [27] O'Hara B, Johann SV, Klinger HP, et al. Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus[J]. Cell Growth Differ, 1990, 1: 119-127.
- [28] Olah Z, Lehel C, Anderson WB, et al. The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter[J]. J Biol Chem, 1994, 269:25426-25431.

- [29] Takeuchi Y, Vile RG, Simpson G, et al. Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus[J]. J Virol, 1992, 66:1219-1222.
- [30] Burns JC, McNeill L, Shimizu C, et al. Retroviral gene transfer in Xenopus cell lines and embryos[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1996, 32(2): 78-84.
- [31] Kuhlbrandt W, Gouaux E. Membrane proteins[J]. Curr Opin Struct Biol, 1999, 9(4): 445-447.

【收稿日期】 2009-06-08 【修回日期】 2009-09-27

(上接 757 页)

【参考文献】

- [1] MacDonald AS, Patton EA, La Flamme AC, et al. Impaired TH2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction[J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4643-4649.
- [2] McKee AS, Pearce EJ. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1224-1231.
- [3] Yang Y, Guo Zhong, Kiniwa Y, et al. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance[J]. Nat Immunol, 2004, 5(5):508-515.
- [4] Hogg KG, Kumkate S, Anderson S, et al. Interleukin-12 p40 se-

cretion by cutaneous CD11c⁺ and F4/80⁺ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni* [J]. Infect Immun, 2003, 71(6):3563-3571.

- [5] Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-Like receptor 8 mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function[J]. Science, 2005, 309(5739): 1380-1384.
- [6] LaRosa DF, Gelman AE, Rahman AH, et al. CpG DNA inhibits CD4⁺CD25⁺ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4⁺ T cells[J]. Immunol Lett, 2007, 108(2):183-188.

【收稿日期】 2009-04-30 【修回日期】 2009-09-25

欢迎订阅《中国病原生物学杂志》