

HSV-2 型 2.2 kb 潜伏相关转录子对 Hela 细胞生长特性的影响

毕建军 杨慧兰* 樊建勇 王颖 李翠华 梁洁

(广州军区广州总医院 皮肤科 广东 广州 510010)

摘要: 【目的】研究人单纯疱疹病毒 2 型(Herpes simple virus type 2, HSV-2) 2.2 kb 潜伏相关转录体(Latency associated transcript, LAT) 对体外培养 Hela 细胞生长特性的影响。

【方法】将真核表达质粒 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 或 pcDNA3.1 转染 Hela 细胞后, 观察细胞的生长情况。在 4 °C 和 43.5 °C 应激下, MTT 法检测细胞活性, Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡。【结果】pcDNA3.1-2.2 kb LAT 质粒转导入 Hela 细胞后, 检测到 2.2 kb LAT 转录; 细胞培养 2 d 转染 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 细胞明显多于转染 pcDNA3.1 细胞数, 两者细胞数分别为 $1.7\pm 0.09\times 10^5/\text{mL}$ 和 $1.45\pm 0.14\times 10^5/\text{mL}$, $P<0.05$ 。4 °C 下 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 组和 pcDNA3.1 组细胞凋亡率分别为 $27.6\%\pm 5.7\%$ 和 $7.8\%\pm 1.5\%$, $P<0.01$; 43.5 °C 下 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 组和 pcDNA3.1 组细胞凋亡率分别为 $30.5\%\pm 4.6\%$ 和 $5.3\%\pm 2.0\%$, $P<0.01$ 。【结论】2.2 kb LAT 具有促进细胞增殖, 提高细胞活力和抗凋亡作用, 提示它可能在 HSV-2 感染中发挥重要作用。

关键词: 单纯疱疹病毒 2 型, 生殖器疱疹, 潜伏相关转录子, 生长特性, 凋亡

Effect of HSV-2 2.2 kb latency associated transcript on the growth characteristics of HeLa cells

BI Jian-Jun YANG Hui-Lan* FAN Jian-Yong WANG Ying
LI Cui-Hua LIANG Jie

(Department of Dermatology, General Hospital of Guangzhou Military Command,
Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: [Objective] In this study, we investigated the influence of HSV-2 2.2 kb latency associated transcript on the growth characteristics of HeLa cells in vitro. **[Methods]** We observed the growth of HeLa cells transfected with recombinant expression plasmids pcDNA3.1-2.2 kb LAT along with pcDNA3.1 control. In 4 °C or 43.5 °C, vitality of cells and apoptosis rate of cells was detected by MTT and Hoechst33258 staining. **[Results]** The transcription of 2.2 kb LAT was detected in HeLa cells transfected with pcDNA3.1-2.2 kb LAT. The number of cells transfected with pcDNA3.1-2.2 kb LAT was higher than that transfected with pcDNA3.1 ($1.7\pm 0.09\times 10^5/\text{mL}$ and $1.45\pm 0.14\times 10^5/\text{mL}$, respectively, $P<0.05$) at 2 days. The apoptosis rate of cells transfected with pcDNA3.1-2.2 kb LAT was lower than that transfected with pcDNA3.1 ($27.6\%\pm 5.7\%$ and $7.8\%\pm 1.5\%$, respectively, $P<0.01$) at 4 °C. The apoptosis rate of cells transfected with pcDNA3.1-2.2 kb LAT was lower than that transfected with pcDNA3.1 ($30.5\%\pm 4.6\%$ and $5.3\%\pm 2.0\%$, respectively, $P<0.01$) at 43.5 °C. **[Conclusion]** The HeLa cells transfected with pcDNA3.1-2.2 kb LAT showed promoted proliferation, heightened vitality and reduced apoptosis. These experiments demonstrated that 2.2 kb LAT could play an important role in HSV-2 infection.

Keywords: Herpes simple virus type 2, Genital herpes, Latency associated transcript, Growth characteristics, Apoptosis

HSV-2 是生殖器疱疹的主要病原体, 感染后可建立终生潜伏, 可因各种非特异性刺激反复激活而发病。目前 HSV-2 的潜伏及激活机制未完全明确, 使得相关药物或治疗手段的研发非常困难^[1]。LAT 是 HSV 在潜伏感染时唯一大量转录和可被检测到的基因, 被认为在 HSV 潜伏的建立、维持和激活过程中起重要作用^[2-3]。HSV-2 基因通过转录生成约 9.0 kb 的初级 LAT, 进一步剪切生成稳定的 2.2 kb 次级 LAT, 有研究显示后者可能在 HSV-2 的潜伏和激活中扮演重要角色^[4]。为研

究 2.2 kb LAT 在病毒潜伏和激活中的作用, 本实验拟将构建好的 HSV-2 2.2 kb LAT 重组质粒转染 HeLa 细胞, 观察其在细胞中的转录情况和对细胞的作用, 为探讨 HSV-2 潜伏和激活的机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞: 重组质粒 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 由本实验室构建并保存, HeLa 细胞为本实验

室液氮冻存。

1.1.2 主要试剂: 脂质体 LipofectamineTM2000、TRIzol、pcDNA3.1 (Invitrogen 公司), pEGFP-N1 (Clontech 公司), 逆转录试剂盒(Promega 公司), RPMI1640 培养液、胎牛血清(Hyclone 公司), MTT (Sigma 公司), Hoechst 33258 染料(杭州碧云天公司)。

1.2 质粒转染 HeLa 细胞

选择生长状态良好、处于对数生长期的 HeLa 细胞, 胰酶消化后以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 24 孔板中, 待细胞融合度达 80%, 采用脂质体共转染 pEGFP-N1 和 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 或 pcDNA3.1 观察转染效率。无血清 RPMI1640 培养液分别稀释质粒和 LipofectamineTM2000, 混合后加至 24 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。24 h 后更换成含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养, 转染 24 h 后检测转染情况。

1.3 检测质粒转染效率

荧光显微镜下观察转染后细胞形态的变化, 计数表达绿色荧光蛋白的细胞反映细胞转染效率。

1.4 RT-PCR 鉴定

按上面 1.2 方法分别转染质粒 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 或 pcDNA3.1 于 HeLa 细胞, TRIzol 试剂提取转染 HeLa 细胞总 RNA, 逆转录得到 cDNA, 以其为模板进行 PCR。2.2 kb LAT 基因上游引物: 5'-GTAGGTTTAGGGTCGTACAGG-3'; 下游引物: 5'-GCTGGGAGAGACGAGAAACC-3'。PCR 扩增程序: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min, 最后冷却到 4 °C。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 绘制细胞生长曲线

HeLa 细胞转染质粒 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 或 pcDNA3.1 24 h 后, 胰酶消化后吹打均匀计数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 按 100 μL /孔接种于 96 孔板中, CO₂ 孵箱中 37 °C 培养。每隔 24 h 计

数一次, 每次取 3 孔细胞, 取其均值, 连续计数 4 d, 正常细胞为对照。根据细胞计数结果, 以单位细胞数(细胞数/mL)为纵坐标, 以时间为横坐标绘制生长曲线。

1.6 MTT 法检测细胞活性

HeLa 细胞转染质粒 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 或 pcDNA3.1 48 h 后, 与未转染 HeLa 细胞进行冷热应激处理。冷应激组: 4 °C 处理 10 h, 37 °C 复温 1 h; 热应激组: 43.5 °C 90 min, 37 °C 复温 1 h; 37 °C 培养细胞为对照组。冷热应激后, 每孔中加入 10 μL MTT 溶液(5 g/L), 继续培养 4 h, 加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 酶标仪测定 OD₅₇₀。

1.7 Hoechst 33258 染色

冷热应激后的细胞用甲醇/冰乙酸(3:1, V/V)固定 15 min, PBS 漂洗 5 min, Hoechst 33258 工作液室温染色 15 min, 550 nm 波长的荧光显微镜下观察。镜下随机选择 3 个观察视野, 计数至少 100 个细胞, 计算凋亡率=(凋亡细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.8 统计学处理

实验结果采用 SPSS13.0 软件进行分析, 各组数据均以均数 \pm 标准差($x \pm s$)表示, 各组间两两比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时认为有显著差异。

2 结果

2.1 重组质粒的转染和转录情况

转染 24 h 后各组可以观察到 GFP 表达, 48 h 荧光表达最强烈(图 1), 约 70%–80% 的 HeLa 细胞表达 GFP, 提示转染率可达到 70%–80%。72 h 后绿色荧光有所衰弱, 96 h 后仍有荧光表达。RT-PCR 验证重组质粒的转录: 各组均可扩出 β -actin 内参条带, 重组质粒组扩增出约 2.2 kb 的目的条带, 空质粒组无 2.2 kb 的条带出现(图 2)。

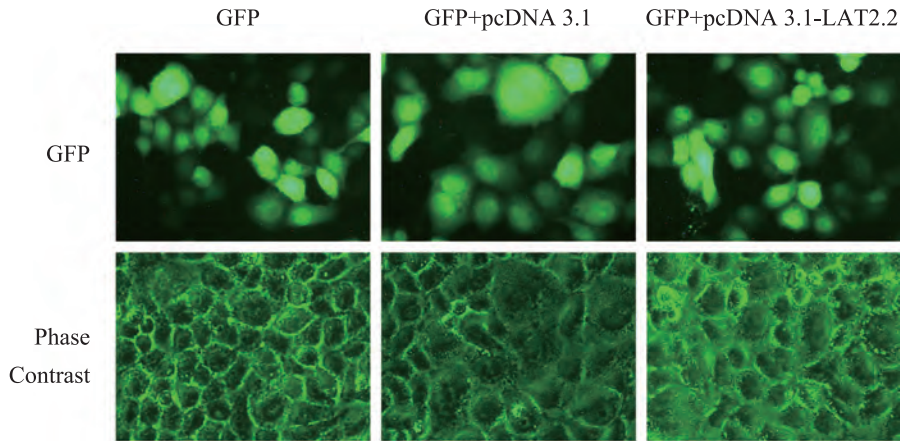


图1 质粒转染 48 h 后 GFP 表达的情况(200×)

Fig. 1 Expression of GFP in HeLa cells transfected with plasmids at 48 hours (200×)

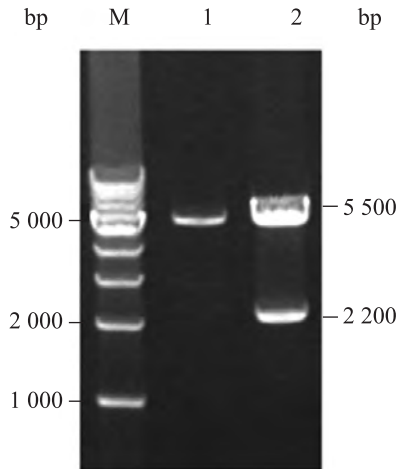


图2 质粒 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 的双酶切鉴定

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-2.2 kb LAT

注: 1: DNA 分子量 Marker; 2: 转染 pcDNA3.1 的空质粒; 3: 转染 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 质粒。

Note: M: DNA marker; 1: pcDNA3.1; 2: pcDNA3.1-2.2 kb LAT.

2.2 重组质粒对细胞生长的影响

转染细胞接种后 3 组细胞生长曲线见图 3。2 d 后重组质粒组、空质粒组和对照组细胞数分别为 $(1.70\pm 0.09)\times 10^5/\text{mL}$ 、 $(1.45\pm 0.14)\times 10^5/\text{mL}$ 和 $(1.53\pm 0.13)\times 10^5/\text{mL}$ ，重组质粒组明显多于空质粒组($P<0.05$)，与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。3 d 后 3 组细胞数分别为 $(3.08\pm 0.19)\times 10^5/\text{mL}$ 、

$(2.52\pm 0.12)\times 10^5/\text{mL}$ 和 $(2.72\pm 0.14)\times 10^5/\text{mL}$ ，重组质粒组明显多于其它两组($P<0.01$)。4 d 后 3 组细胞数分别为 $(3.94\pm 0.16)\times 10^5/\text{mL}$ 、 $(2.98\pm 0.25)\times 10^5/\text{mL}$ 和 $(3.21\pm 0.28)\times 10^5/\text{mL}$ ，重组质粒组明显多于其它两组($P<0.01$)。

2.3 重组质粒对细胞活力的影响

各组冷热应激后 OD_{570} 值均有所降低，其中未转染组和空质粒组冷热应激后较 37°C 对照组 OD_{570} 值下降非常显著($P<0.01$)，而重组质粒组与 37°C 对照组差异不显著($P>0.05$)，具体见图 4。

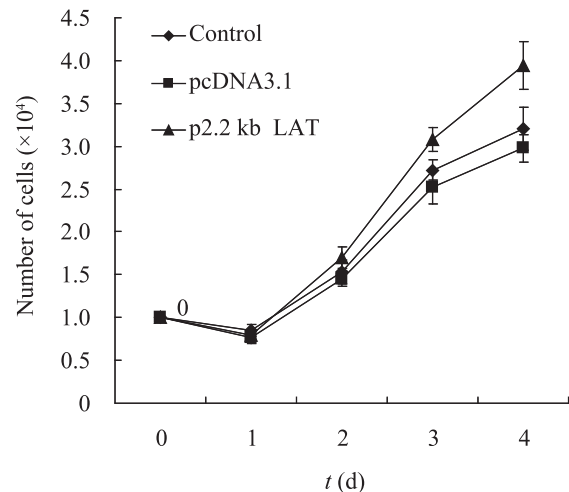


图3 生长曲线图

Fig. 3 Growth curve of HeLa cells

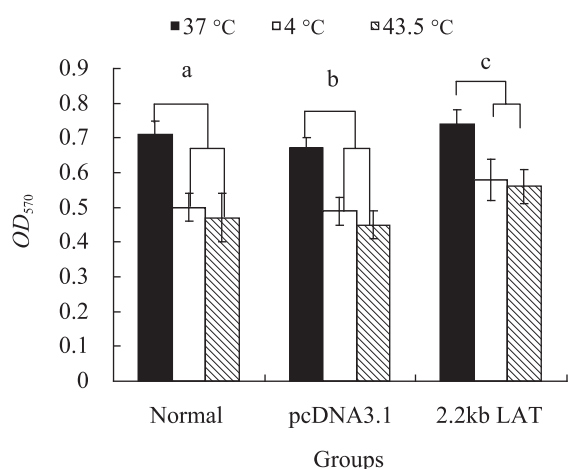


图 4 细胞活力的测定

Fig. 4 Measurement of cells vitality

注: 37 °C、4 °C 和 43.5 °C 下, 测定正常细胞、转染空质粒细胞和转染 2.2 kb LAT 细胞的活力。a: $P < 0.05$; b: $P < 0.05$; c: $P > 0.05$ 。

Note: Measurement of cells (normal cell, cells transfected with vector or pcDNA3.1-2.2 kb LAT) vitality in 37 °C, 4 °C and 43.5 °C. a: $P < 0.05$; b: $P < 0.05$; c: $P > 0.05$ 。

2.4 重组质粒对细胞凋亡的影响

凋亡细胞 Hoechst33258 染色可见浓染致密的颗粒块状荧光(见图 5 红色箭头所示)。4 °C、37 °C 和 43.5 °C 下均能观察到凋亡细胞, 37 °C 空质粒组和重组质粒组细胞凋亡率分别为 $3.2\% \pm 1.5\%$ 和 $2.2\% \pm 1.2\%$, 比较无显著差异($P > 0.05$)。4 °C 空质粒组和重组质粒组细胞凋亡率分别为

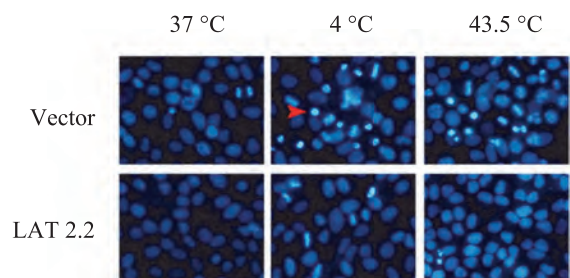


图 5 Hoechst33258 染色(100×)

Fig. 5 Hoechst33258 staining (100×)

注: Vector、LAT 2.2 分别代表转染的空质粒组和 2.2 kb LAT 质粒组; 箭头标示凋亡的细胞。

Note: Vector: Transfected with vector; LAT 2.2: Transfected with pcDNA3.1-2.2 kb LAT. The red arrow in the map mark the apoptosis cells.

$27.6\% \pm 5.7\%$ 和 $7.8\% \pm 1.5\%$, 差异非常显著(P 均 < 0.01)。43.5 °C 空质粒组和重组质粒组细胞凋亡率分别为 $30.5\% \pm 4.6\%$ 和 $5.3\% \pm 2.0\%$, 差异非常显著(P 均 < 0.01)。

3 讨论

HSV-2 在人骶尾神经节内建立终生潜伏, 因多种非特异性刺激活化后反复发作^[5-6], 临床治疗困难。LAT 是 HSV-2 潜伏感染后唯一大量转录的基因产物, LAT 进一步剪切为稳定的 2.2 kb LAT。2.2 kb LAT 在病毒潜伏和激活时均可检测到, 提示它可能在病毒的潜伏和激活中发挥作用, 但其确切的细胞生物学效应尚不清楚。

本实验在前期已构建重组质粒的基础上, 将质粒转染入 HeLa 细胞, 体外进一步研究 2.2 kb LAT 的细胞生物学效应。我们采用脂质体法共转染表达 GFP 的质粒 pEGFP-N1 和重组质粒来反映转染效率。瞬时转染 24 h 后即可见 GFP 表达, 48 h 达到高峰, 转染率约 70%–80%, 96 h 后仍可见 GFP 表达, 能够满足实验需要。重组质粒组 RT-PCR 检测可见约 2.2 kb 的特异条带, 但空质粒组和未处理组无特异条带出现, 进一步证明重组质粒能够转入 HeLa 细胞并转录。

转染细胞接种 2 d 后重组质粒组细胞增殖速度明显高于空质粒组($P < 0.05$), 3 d 和 4 d 后重组质粒组细胞增殖速度明显高于未处理组和空质粒组($P < 0.01$), 提示 2.2 kb LAT 有促进细胞增殖的作用。冷热应激下, 各组细胞活力均受到影响, 以未处理组和空质粒组细胞活力下降尤为明显(与 37 °C 下细胞比较, P 均 < 0.01), 重组质粒组细胞活力下降不明显(与 37 °C 下细胞比较, $P > 0.05$), 提示 2.2 kb LAT 有减弱冷热应激对细胞的损伤作用。凋亡是细胞自行死亡以防止病毒蔓延和持续性感染的机制之一, 病毒在演化过程中建立相应机制阻止宿主细胞凋亡^[7]。HSV 含有多

种抗凋亡基因,如 US3、US11、ICP27^[8-10]等,但上述基因在病毒潜伏过程中不表达。37 °C 下细胞发生低水平(约 2%–3%)凋亡,冷热应激后细胞凋亡率明显增高,但重组质粒组细胞凋亡率较转染空质粒组明显减少,说明 2.2 kb LAT 有抵抗冷热应激的凋亡作用。

2.2 kb LAT 发挥上述作用的机制可能与其表达蛋白有关,2.2 kb LAT 含有 3 个 ORF,前期工作中我们将表达 2.2 kb LAT-ORF 基因的真核载体转入 Vero 细胞中,发现它能影响细胞的增殖和活性^[11],但更多的研究认为 HSV LAT-ORF 在正常情况下不表达蛋白,推测 2.2 kb LAT 可能通过其他途径发挥作用^[12-13]。另有研究者认为 LAT 可能与核糖体结合,发挥对蛋白合成的调控作用^[14],从而影响细胞的增殖。国外对与 HSV-2 型基因相似的 HSV-1 型研究中发现,HSV-1 型 2.0 kb LAT 在应激下能调控 Hsp70 的表达,后者是一种已知的抗凋亡蛋白。HSV-2 型 2.2 kb 是否存在上述机制尚无研究证实。

综上所述,我们将 pcDNA3.1-2.2 kb LAT 重组质粒转入 Hela 细胞中,检测到 2.2 kb LAT 转录,发现 2.2 kb LAT 具有促进细胞增殖,减弱冷热应激对细胞的损伤和抗凋亡等多种作用,提示 2.2 kb LAT 可能在 HSV-2 潜伏和激活机制中发挥作用,具体作用靶位和机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Watson Jones D, Baisley K, Rusizoka M, et al. Measurement and predictors of adherence in a trial of HSV suppressive therapy in Tanzania[J]. Contemporary Clinical Trials, 2009, 30(6): 504–512.

[2] Hill JM, Patel A, Bhattacharjee P, et al. An HSV-1 chimeric containing HSV-2 latency associated transcript (LAT) sequences has significantly reduced adrenergic reactivation in the rabbit eye model[J]. Current Eye Research, 2003, 26(3/4):

219–224.

- [3] Margolis TP, Imai Y, Yang L, et al. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) establishes latent infection in a different population of ganglionic neurons than HSV-1: role of latency-associated transcripts[J]. Journal of Virology, 2007, 81(4): 1872–1878.
- [4] Alvarez AL, Habtemariam S, Juan-Badaturuge M, et al. *In vitro* anti HSV-1 and HSV-2 activity of Tanacetum vulgare extracts and isolated compounds: an approach to their mechanisms of action[J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(2): 296–301.
- [5] Goldmeier D, Garvey L, Barton S. Does chronic stress lead to increased rates of recurrences of genital herpes--a review of the psychoneuroimmunological evidence? [J]. International Journal of STD and AIDS, 2008, 19(6): 359–362.
- [6] Ozawa S, Eda H, Ishii Y, et al. The herpes simplex virus type 1 BgK_L variant, unlike the BgO_L variant, shows a higher association with orolabial infection than with infections at other sites, supporting the variant-dispersion-replacement hypothesis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(7): 2183–90.
- [7] Esaki S, Goshima F, Katsumi S, et al. Apoptosis induction after herpes simplex virus infection differs according to cell type *in vivo*[J]. Archives of Virology, 2010, 155(8): 1235–1245.
- [8] Deruelle MJ, De Corte N, Englebienne J, et al. Pseudorabies virus US3-mediated inhibition of apoptosis does not affect infectious virus production[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(5): 1127–1132.
- [9] Gillis PA, Okagaki LH, Rice SA. Herpes simplex virus type 1 ICP27 induces p38 mitogen-activated protein kinase signaling and apoptosis in HeLa cells[J]. Journal of Virology, 2009, 83(4): 1767–1777.
- [10] Javouhey E, Gibert B, Arrigo AP, et al. Protection against heat and staurosporine mediated apoptosis by the HSV-1 US11 protein[J]. Virology, 2008, 376(1): 31–41.
- [11] 白利利, 杨慧兰. HSV-2 LAT ORF2在 Vero 细胞中的表达及对细胞的作用[J]. 生物技术通报, 2010,

- 3: 160–163.
- [12] Derfuss T, Arbusow V, Strupp M, et al. The presence of lytic HSV-1 transcripts and clonally expanded T cells with a memory effector phenotype in human sensory ganglia[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1164: 300–3004.
- [13] Shen WW, Sa e Silva M, Jaber T, et al. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(18): 9131–9139.
- [14] Atanasiu D, Kent JR, Gartner JJ, et al. The stable 2-kb LAT intron of herpes simplex stimulates the expression of heat shock proteins and protects cells from stress[J]. *Virology*, 2006, 350(1): 26–33.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. *微生物实验教程*[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. *核农学进展*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2012-00-00; 接受日期: 2012-00-00

(下转 p. 1362)