

单纯疱疹病毒 2 型潜伏相关转录体 ORF1 的表达及其抗凋亡作用

吕芳彪^{1,2}, 杨慧兰¹, 钟菲菲^{1,2}, 樊建勇¹, 刘艳华¹, 高瑞迪¹

1 广州军区广州总医院皮肤科, 广东 广州 510010

2 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

吕芳彪, 杨慧兰, 钟菲菲, 等. 单纯疱疹病毒 2 型潜伏相关转录体 ORF1 的表达及其抗凋亡作用. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1776-1785.

Lv FB, Yang HL, Zhong FF, et al. Expression of herpes simplex virus type 2 latency associated transcript ORF1 and its anti-apoptotic function. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1776-1785.

摘要: 旨在研究单纯疱疹病毒 2 型潜伏相关转录体 (LAT) 开放读码框 1 (ORF1) 对放线菌素 D 诱导的凋亡作用的影响。以 HSV-2333 基因组为模板 PCR 扩增 ORF1 片段, 构建重组质粒 pEGFP-ORF1, 转染 Vero 细胞, RT-PCR 鉴定 ORF1 的表达。放线菌素 D 诱导 Vero 细胞凋亡, 通过荧光显微镜观察凋亡小体, Hoechst33258 荧光染色观察细胞形态变化, MTT 检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡率。双酶切和测序确认 pEGFP-ORF1 构建成功, RT-PCR 表明该真核表达载体能在 Vero 细胞中高效表达。转染了 pEGFP-ORF1 的 Vero 细胞经放线菌素 D 诱导后, Hoechst33258 染色显示细胞形态正常。MTT 结果表明转染了重组质粒 pEGFP-ORF1 的 Vero 细胞经放线菌素 D 诱导后 Vero 细胞活性与未经任何处理的正常对照组相比, 无显著差异 ($P > 0.05$), 但高于放线菌素 D 诱导凋亡的 Vero 细胞组及与转染空质粒 pEGFP-C2 且放线菌素 D 诱导凋亡的 Vero 细胞组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。流式结果表明, 转染重组质粒 pEGFP-ORF1 且经放线菌素 D 诱导凋亡组与正常对照组凋亡率差异不显著 ($P > 0.05$), 而显著低于放线菌素 D 诱导凋亡组和转染空质粒 pEGFP-C2 且经放线菌素 D 诱导凋亡组 ($P < 0.05$)。HSV-2 LAT ORF1 具有抗放线菌素 D 诱导的 Vero 细胞的凋亡作用。

关键词: 单纯疱疹病毒, LAT, ORF1, 放线菌素 D, 凋亡, Vero 细胞

Received: April 9, 2013; **Accepted:** June 24, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30972666, 81071401, 81171511).

Corresponding author: Huilan Yang. Tel/Fax: +86-20-86653508; E-mail: huilany88@hotmail.com

国家自然科学基金 (Nos. 30972666, 81071401, 81171511) 资助。

Expression of herpes simplex virus type 2 latency associated transcript ORF1 and its anti-apoptotic function

Fangbiao Lv^{1,2}, Huilan Yang¹, Feifei Zhong^{1,2}, Jianyong Fan¹, Yanhua Liu¹, and Ruidi Gao¹

¹ Department of Dermatology, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China

² School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

Abstract: To study the expression of herpes simplex virus type 2 latency-associated transcript (LAT) open reading frame 1 (ORF1) and its anti-apoptosis function induced by actinomycin D in Vero cells. The recombinant plasmid pEGFP-ORF1 was constructed and transfected into Vero cells, and the expression of ORF1 was identified by RT-PCR. The changes of Vero cells morphology induced by actinomycin D were observed by fluorescence microscopy, Hoechst33258 fluorescence staining. Cells viability was evaluated by MTT assay and cells apoptosis rate was detected by flow cytometry. Double digestion and sequencing confirmed the pEGFP-ORF1 was constructed successfully, RT-PCR showed that the target gene was highly expressed in Vero cells. Hoechst33258 staining reveals that Vero cells transfected with pEGFP-ORF1 and induced apoptosis by actinomycin D had no changes in morphology. MTT assay showed that the viabilities of Vero cells transfected with recombinant plasmid pEGFP-ORF1 and induced apoptosis by actinomycin D has no statistically significant difference compared with the untreated normal control group ($P>0.05$), but remarkable higher than Vero cells transfected with empty plasmid pEGFP-C2 and induced apoptosis by actinomycin D, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Flow cytometry assay shows that the cells apoptosis rate had no significant difference between pEGFP-ORF1 group and the normal group, but the cells apoptosis rate of pEGFP-ORF1 was lower than the pEGFP-C2 group. HSV-2 LAT ORF1 gene can be expressed in Vero cells and can protect Vero cells from apoptosis induced by actinomycin D.

Keywords: herpes simplex virus, LAT, ORF1, actinomycin D, apoptosis, Vero cells

单纯疱疹病毒是人类常见病毒性疾病的病原体，根据血清型的不同可分为 HSV-1 和 HSV-2，HSV-1 主要引起口唇疱疹、致死性脑膜炎^[1]，HSV-2 主要引起生殖器疱疹^[2]。初次感染后，疱疹病毒会潜伏在人体神经节中，当人体免疫力低下或者受到某些不良刺激时病毒会被再次激活，引起复发感染并出现相应的临床症状。目前对疱疹病毒潜伏感染和再激活的机制还不是十分清楚，临床上尚无有效的抗病毒药物可以彻底根治疱疹，也无有效的疫苗可以预防和治愈疱疹。潜伏相关转录体 (LAT) 是疱疹病毒潜伏感染期间唯一大量表达和可被检测到的病毒基因组转录产物，被认为在病毒潜伏感染的建立、

维持和再激活的过程中都起着重要的作用^[3-7]。

国外已有大量的研究表明 HSV-1 LAT ORFs 可通过其编码蛋白的抗凋亡作用使病毒处于潜伏感染状态^[8-9]，而与其同源性很高的 HSV-2 LAT ORFs 是否具有类似的作用却鲜有报道。HSV-2 主要 LAT 包含 3 个开放读码框分别为 ORF1、ORF2 和 ORF3^[10]。本课题组前期已经对 LAT ORF2 及 LAT ORF3 进行了一些研究，在研究 ORF2 的功能时，以 5-氟尿嘧啶诱导 Vero 细胞凋亡，通过 DNA ladder、caspase-3 活性检测等表明，ORF2 具有抗 5-氟尿嘧啶诱导的 Vero 细胞凋亡的作用。在研究 LAT ORF3 的功能时，以顺铂诱导 Vero 细胞凋亡，通过 Giemsa 染色、流式细胞术

等确定 LAT ORF3 具有抗顺铂诱导的 Vero 细胞的凋亡作用。但课题组还没有对 HSV-2 LAT ORF1 的研究。目前其编码的蛋白尚无商品化的抗体,为此,本实验以 EGFP 为标签,标记 HSV-2 LAT ORF1,示踪其在 Vero 细胞中表达蛋白,观察其表达的蛋白对放线菌素 D 诱导凋亡的抑制作用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大肠杆菌 Top10 菌株、Vero 细胞、质粒 pEGFP-C₂ 由广州军区总医院医学实验科保存; RPMI1640 细胞培养液,胎牛血清为美国 HyClone 公司生产;病毒 DNA 提取试剂盒、T4 DNA 连接酶由宝生物工程(大连)有限公司生产;MTT 粉剂、DMSO、放线菌素 D 为美国 Sigma 公司生产;胰酶、Giemsa、Hochest 33258 由广州威佳科技有限公司提供;高保真 DNA 聚合酶 PLATINUM[®] PFX DNA POLYMERASE、Trizol、无内毒素质粒大提试剂盒购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I 产自美国 NEB 公司;转染试剂盒 Xfect[™] 产自日本 Clontech 公司;逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司;凋亡检测试剂盒 Guava Nexin[®] Reagent 100 Tests 由美国 Millipore 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 Vero 细胞培养

Vero 细胞在含 10% (V/V) 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中贴壁生长,于 37 °C、5% CO₂ 及一定湿度的培养箱中培养,培养瓶铺满时用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代,培养细胞至对

数期。

1.2.2 HSV-2333 株基因组提取及重组质粒 pEGFP-ORF1 的构建和鉴定

HSV-2 病毒感染 Vero 细胞,待 Vero 细胞出现明显病变后,收集细胞上清液,用病毒基因组提取试剂盒提取其基因组,进行电泳鉴定;以提取的 HSV-2 病毒基因组为模板 PCR 扩增 ORF1 片段,*EcoR* I、*Kpn* I 对空质粒 pEGFP-C₂ 和 ORF1 扩增产物进行双酶切,T4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* TOP10,卡那抗性筛选阳性克隆;扩大培养阳性克隆,并提取重组质粒,用 *EcoR* I、*Kpn* I 限制性内切酶对重组质粒进行双酶切鉴定和测序鉴定。PCR 扩增 ORF1 的上游引物 P1: 5'-TAGCGAATTCATGCCTCGGGTCTCCTC TTCCTG-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点);下游引物 P2: 5'-TCATGGGTACCTTTGTTATTGACTTT CTTACCTTG-3' (下划线为 *Kpn* I 酶切位点)。PCR 反应条件为: 94 °C 7 min; 94 °C 30 s, 55 °C 20 s, 72 °C 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 5 min 后冷却至 4 °C。反应完毕后 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 重组质粒 pEGFP-ORF1 转染 Vero 细胞

消化 Vero 细胞,计数,分别以 1.0×10⁴ cells/孔和 4.0×10⁴ cells/孔密度接种于 96 孔与 6 孔细胞培养板,常规条件下培养,待细胞长至 80% 的融合度时进行转染实验,详细转染步骤见 Xfect[™] 转染试剂盒。转染 4 h 后更换成新鲜培养液继续培养。在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况及转染效率。

1.2.4 RT-PCR 检测 LAT ORF1 的表达

转染 48 h 后,于荧光显微镜下观察 Vero 细胞中绿色荧光蛋白的表达情况,并收获细胞提取

总 RNA。逆转录合成 cDNA, 以此为模板, PCR 扩增 ORF1 及 β -actin。扩增 ORF1/ β -actin 基因的条件为: 94 °C 预变性 7 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 5 min 后冷却至 4 °C。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳鉴定。扩增 ORF1 的引物同上, 内参 β -actin 的上游引物 P3: 5'-CGTACCACTGGCATC GTGAT-3', 下游引物 P4: 5'-GTGTTGGCTGACA GGTCTTTG-3'。

1.2.5 放线菌素 D 诱导 Vero 细胞凋亡

正常培养的 Vero 细胞孔板中, 分别加入终浓度为 0、0.25、0.5、1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的放线菌素 D, MTT 法检测凋亡诱导 36 h 的细胞存活率, 取 6 孔平均值, 按“细胞存活率= (实验组/对照组) \times 100%”计算。测得这 6 组的细胞存活率分别为: 100% \pm 0.12%、79.02% \pm 6.10%、68.84% \pm 4.42%、56.66% \pm 4.07%、46.83% \pm 3.76%、29.04% \pm 5.93% ($P < 0.01$)。Annexin-V-PE/7-AAD 双染流式细胞术检测各浓度组细胞的凋亡率分别是: 1.66% \pm 0.19%、16.65% \pm 1.26%、24.82% \pm 1.03%、36.22% \pm 1.04%、48.49% \pm 1.24%、43.34% \pm 1.17% ($P < 0.01$)。从细胞存活率和凋亡率两方面考虑, 转染质粒 24 h 后, 加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的放线菌素 D, 常规培养 36 h, 用于后续实验。

1.2.6 实验分组

实验分 3 组: 1) 未作任何处理的 Vero 细胞 (正常对照组); 2) 转染了空质粒 pEGFP-C2、经放线菌素 D 诱导凋亡的 Vero 细胞 (空白载体组); 3) 转染了重组质粒 pEGFP-ORF1、经放线菌素 D 诱导凋亡的 Vero 细胞 (重组质粒组)。

1.2.7 Vero 细胞凋亡情况的 Hoechst33258 荧光染色观察

将各组中 Vero 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于细胞爬片上, 贴壁后用 ActD (1 mg/L) 处理 36 h, PBS 洗 3 次, 加入 0.5 mL 固定液固定 10 min, PBS 洗 2 次, 每次 3 min; 加入 0.5 mL 的 Hoechst33258 染色液室温下染色 5 min, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.8 MTT 法测细胞增值

将各组细胞终止培养前 4 h 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 (终浓度为 0.5 mg/mL), 37 °C 培养至结束。吸净旧培养基和 MTT, 再加 150 μL DMSO 重悬细胞, 脱色摇床上振荡 10 min, 充分溶解 MTT 结晶物, 选择 570 nm 波长在酶标仪上测定 OD 值。每实验组设 6 个复孔, 重复 3 次。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡

弃去培养液, 胰酶消化收集各组细胞, 用 300 μL 10% NBS 的 PRMI1640 培养液重悬细胞, 各组中取 100 μL 细胞悬液, 加入 Annexin-V-PE/7-AAD 室温下避光孵育 20 min 后, 上流式细胞仪进行分析。

2 结果

2.1 ORF1 片段的 PCR 扩增及重组质粒 pEGFP-ORF1 的鉴定

PCR 扩增出的目的条带与预期大小相符合 (约 750 bp) (图 1), 重组质粒 pEGFP-ORF1 经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切后, 获得大小 4.7 kb 和 750 bp 左右的 2 个片段 (图 2)。送上海英骏公司测序, 测序结果与 NCBI 上提交的 HSV-II 333 标准株 (M69065.1) LAT ORF1 进行 Blast 比对,

序列完全一致,表明 HSV-2 LAT ORF1 真核表达载体构建成功。

2.2 重组质粒转染 Vero 细胞及荧光分布特点

转染 48 h 后在荧光倒置显微镜下观察绿色

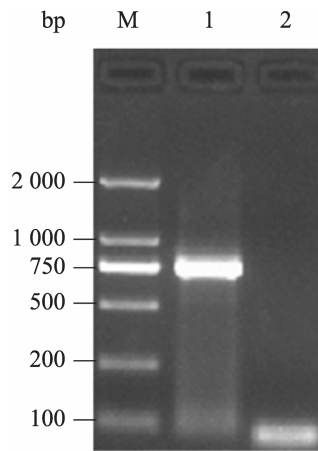


图 1 目的片段 LAT ORF1 的 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of the target gene-LAT ORF1. M: DL2000 marker; 1: PCR product of ORF1; 2: negative control.

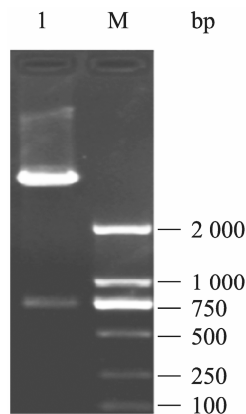


图 2 重组质粒 pEGFP-C2/LAT ORF1 的双酶切鉴定
Fig. 2 Identification of pEGFP-C2/LAT ORF1 by enzyme digestion. M: DL2000 marker; 1: plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1 digested with *Kpn* I and *Eco*R I.

荧光蛋白的分布情况,显微镜下可见空质粒 pEGFP-C2 表达的绿色荧光(图 3B)在细胞核和细胞质中都有分布,且不规则,与重组质粒组相比,荧光强度较弱。重组质粒 pEGFP-ORF1 表达的绿色荧光(图 3A)主要集中在细胞核,大多数为圆形,形态规则,分布均匀。由此可知,ORF1 基因的表达可能影响了绿色荧光蛋白在细胞中的定位。

2.3 RT-PCR 检测重组质粒在 Vero 细胞中的表达

空载体 pEGFP-C2 组和重组质粒 EGFP-ORF1 组的 Vero 细胞均可扩出 452 bp 的 β -肌动蛋白内参条带,仅转染重组质粒的 Vero 细胞可扩增出约 750 bp 左右的目的条带(图 4),说明 ORF1 在 Vero 细胞中成功转录,重组质粒转染 Vero 细胞后,可通过倒置荧光显微镜观察到融合蛋白表达,说明 ORF1 在 Vero 细胞中成功表达。

2.4 凋亡诱导后细胞形态学观察

转染 pEGFP-ORF1 的细胞凋亡诱导后,荧光

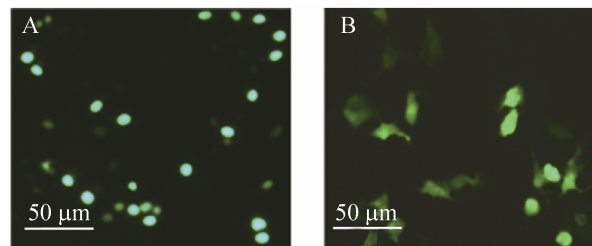


图 3 质粒表达的绿色荧光在 Vero 细胞中的分布特点
Fig. 3 Distribution characteristics of green fluorescence expressed by plasmid in Vero cells. (A) Fluorescence expression in Vero cells after transfected with the recombinant plasmid for 48 h. (B) Fluorescence expression in Vero cells after transfected with the empty plasmid for 48 h.

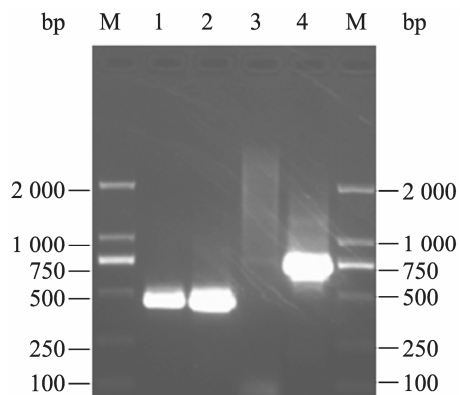


图 4 RT-PCR 鉴定 LAT ORF1 基因在 Vero 细胞中的表达

Fig. 4 Expression of recombinant plasmid pEGFP-C2/LAT-ORF1 in Vero cells identified by RT-PCR. M: DL2000 marker; 1: β -actin bands in negative control; 2: the β -actin band of Vero cells transfected with recombinant plasmid pEGFP-C2/LAT-ORF1; 3: without ORF1 fragment in Vero cells transfected with empty plasmid pEGFP-C2; 4: the ORF1 fragment of Vero cells transfected with recombinant plasmid pEGFP-C2/LAT-ORF1.

蛋白形态未发生明显变化 (图 5B), 而转染了空质粒的细胞凋亡诱导后, 细胞膜内外出现一些泡状的凋亡小体, 细胞皱缩变圆、染色质浓集成块 (图 5, A1-A6) 等明显的凋亡特征。

2.5 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡

在转染 pEGFP-C2 空载体组中可以明显看到凋亡小体和致密浓染的颗粒块状荧光 (图 6C); 正常对照组 (图 6A) 及转染 pEGFP-ORF1 重组载体组 (图 6B) 荧光较淡, 无凋亡小体和致密的浓染现象。

2.6 MTT 分析细胞增殖

重组质粒组 Vero 细胞经防线菌素 D 诱导处理 36 h 后, OD_{490} 值为 (2.1247 ± 0.0164) , 与正常对照组细胞 (2.235 ± 0.012) 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而与放线菌素 D 诱导凋亡的正

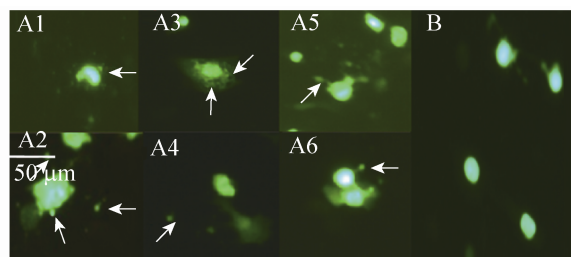


图 5 荧光蛋白的形态分析

Fig. 5 Morphology analysis of green fluorescent protein. (A) Vero cells transfected with pEGFP-C2. (B) Vero cells transfected with pEGFP-ORF1. Red arrowhead showed apoptotic body.

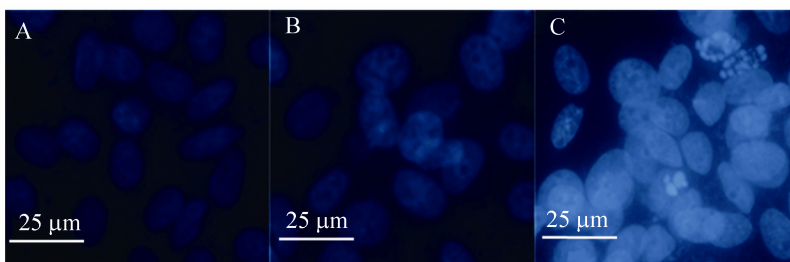


图 6 Hoechst 33258 荧光染色

Fig. 6 Hoechst 33258 fluorescence staining. (A) Control Vero cells. (B) Vero cells transfected with pEGFP-ORF1 and induced apoptosis by ActD. (C) Vero cells transfected with pEGFP-C2 and induced apoptosis by ActD.

常对照组 (1.6942 ± 0.0213) 和空载体组 (1.5753 ± 0.0124) 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而后两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 HSV-2 LAT ORF1 片段对放线菌素 D 诱导的 Vero 细胞的凋亡有保护作用 (图 7)。

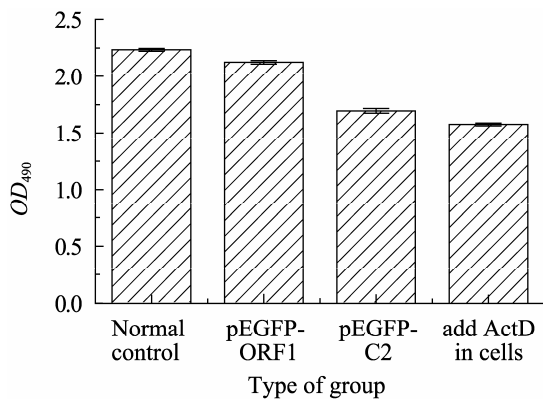


图 7 MTT 法分析细胞活性

Fig. 7 MTT analysis of cells viability. (A) Normal Vero cells. (B) Vero cells transfected with pEGFP-ORF1 induced apoptosis by ActD. (C) Vero cells transfected with pEGFP-C2 induced apoptosis by ActD. (D) Vero cells induced apoptosis by ActD.

2.7 流式细胞仪检测

检测凋亡细胞占细胞总数, 正常对照组为 $4.41\% \pm 0.09\%$, 重组质粒组为 $5.92\% \pm 1.07\%$, 空载体组为 $29.62\% \pm 2.19\%$ 。经分析, 重组质粒组细胞凋亡率与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 显著低于空载体组 ($P < 0.01$) (图 8)。HSV-2 LAT ORF1 在 Vero 细胞中具有抗放线菌素 D 诱导的凋亡作用。

3 讨论

单纯疱疹病毒普遍易感, 人是其唯一的自然宿主, 病毒具有嗜神经性, 并且有大量的研究表明 HSV-II 感染可显著增加人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染机率^[11-13]。HSV 造成宿主系统感染乃至损伤是一个病毒与宿主相互作用的过程, 这既与病毒特性有关, 亦与宿主对病毒的抵抗力和耐受力有关。凋亡是宿主细胞抵抗病毒感染、抑制病毒扩散的重要机制^[14]。HSV 含有多种抗凋亡基因, 如 US3、US5、ICP27、ICP22 等^[7], 但是

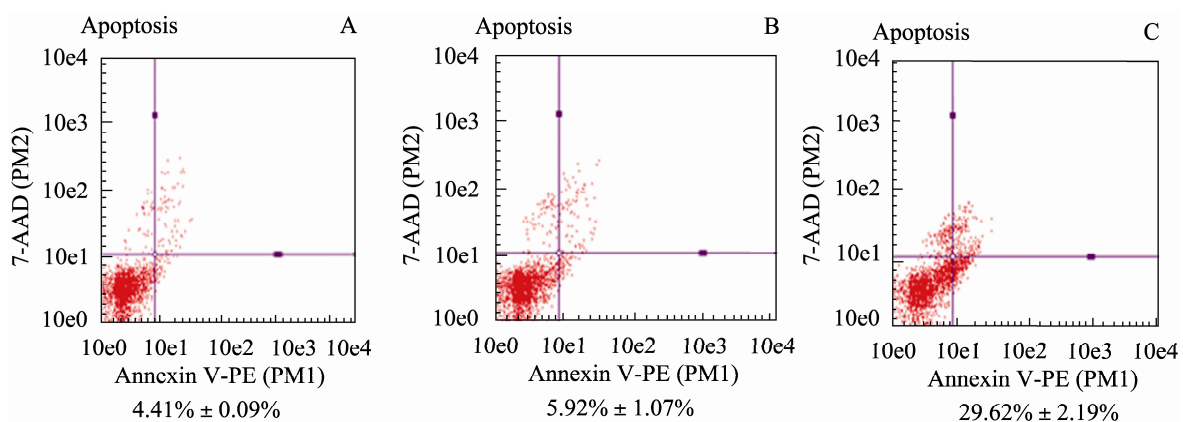


图 8 流式细胞术分析细胞凋亡情况

Fig. 8 Cell apoptosis was detected by flow cytometry. (A) Normal Vero cells ($4.41\% \pm 0.09\%$). (B) Vero cells transfected with pEGFP-ORF1 induced apoptosis by ActD ($5.92\% \pm 1.07\%$). (C) Vero cells transfected with pEGFP-C2 induced apoptosis by ActD ($29.62\% \pm 2.19\%$).

这些基因在病毒感染急性期表达,而在潜伏过程中不再表达, LAT 基因是 HSV 潜伏感染过程中唯一表达的基因。研究证明 HSV-1 及 HSV-2 LAT 均具有抗凋亡的作用^[15],通过阻止宿主细胞凋亡,抑制病毒释放,使得病毒能够在神经节中维持潜伏感染状态。

本研究将 HSV-2 LAT ORF1 重组到可以表达绿色荧光蛋白 EGFP 的真核表达载体 pEGFP-C2 上,并转染 Vero 细胞,通过 RT-PCR 鉴定了其能高效表达。EGFP 是一种新型的报告基因,检测方便,定位准确,荧光稳定,且对宿主细胞无任何毒害,具有共用性和通用性,不受受体范围的限制,可以在胚胎或转基因动物模型中表达^[16],为示踪 HSV-2 LAT ORF1 的定位和表达创造了条件。

HSV-2 起主要作用的 LAT 含有 3 个 ORF,国外已有研究表明 HSV-1 主要 LAT 可通过编码蛋白的抗凋亡作用使病毒处于潜伏状态^[17]。但与其同源性很高的 HSV-2 LAT 编码的蛋白是否有抗凋亡作用未见报道,可能是由于该蛋白的表达受到严格调控,瞬时表达后即发挥功能,存在时间较短而无法检测到^[18-20]。本课题选用 HSV-2 LAT ORF1 为研究对象,构建重组质粒 pEGPF-ORF1,转染 Vero 细胞,研究其对常见凋亡诱导剂放线菌素 D^[21-22]诱导细胞凋亡的影响,并通过定性和定量两方面的检测,初步证实 HSV-2 LAT ORF1 在 Vero 细胞中具有抗放线菌素 D 诱导的凋亡作用。本实验室前期已证实 HSV-2 LAT ORF2 在 Vero 细胞中具有抗 5-FU 诱导的凋亡作用^[23],HSV-2 LAT ORF3 在 Vero 细胞中具有抗顺铂诱导的凋亡作用^[24],由此可见 HSV-2 LAT ORFs 的这种抗凋亡作用是普遍的。

综上所述,本研究首次对 HSV-2 LAT ORF1 的蛋白表达及其抗凋亡功能作了初步探索,该结果可为进一步探讨 HSV LAT 蛋白的功能,研究该蛋白在调节细胞凋亡中的作用机制及病毒的潜伏复发机制创造条件。尽管目前对 LAT 抗凋亡作用机制尚不清楚且有争议,但以抗凋亡这个崭新的角度来审视 LAT 在 HSV 潜伏复发中的作用,将有可能成为揭示 HSV 的潜伏复发机制的一条新途径。LAT 抗凋亡作用的相关研究成果有可能为治疗 HSV-2 潜伏感染提供新的思路。

REFERENCES

- [1] Lafaille FG, Pessach IM, Zhang SY, et al. Impaired intrinsic immunity to HSV-1 in human iPSC-derived TLR3-deficient CNS cells. *Nature*, 2012, 491(7426): 769-773.
- [2] Johnston C, Saracino M, Kuntz S, et al. Standard-dose and high-dose daily antiviral therapy for short episodes of genital HSV-2 reactivation: three randomised, open-label, cross-over trials. 2012, 379(9816): 641-647.
- [3] Kather A, Raftery MJ, Devi-Rao G, et al. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol*, 2010, 84(2): 1034-1046.
- [4] Du T, Zhou GY, Roizman B, et al. HSV-1 gene expression from reactivated ganglia is disordered and concurrent with suppression of latency-associated transcript and miRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(26): 18 820-18824.
- [5] Kent JR, Kang W, Miller CG, et al. Herpes simplex

- virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol*, 2003, 9(3): 285–290.
- [6] Jin L, Carpenter D, Moerdyk-Schauwecker M, et al. Cellular FLIP can substitute for the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene to support a wild-type virus reactivation phenotype in mice. *J Neurovirol*, 2008, 14(5): 389–400.
- [7] Branco FJ, Fraser NW. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *J Virol*, 2005, 79(14): 9019–9025.
- [8] Li S, Carpenter D, Hsiang C, et al. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript inhibits apoptosis and promotes neurite sprouting in neuroblastoma cells following serum starvation by maintaining protein kinase B (AKT) levels. *General Virol*, 2010, 91(Pt 4): 858–66.
- [9] Jiang XZ, Chentoufi AA, Hsiang CH, et al. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can protect neuron-derived c1300 and neuro2A cells from granzyme b-induced apoptosis and CD8 T-cell killing. *J Virol*, 2011, 85(5): 2325–2332.
- [10] Krause PR, Ostrove JM, Straus SE. The nucleotide sequence, 5' end, promoter domain, and kinetics of expression of the gene encoding the herpes simplex virus type 2 latency-associated transcript. *J Virol*, 1991, 65(10): 5619–5623.
- [11] Stefanidou M, Ramos I, Mas CV, et al. Herpes simplex virus 2 (HSV-2) prevents dendritic cell maturation, induces apoptosis, and triggers release of proinflammatory cytokines: potential links to HSV-HIV synergy. *J Virol*, 2013, 87(3): 1443–1453.
- [12] Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, et al. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(1): 77–86.
- [13] Aziz AC, Xavier D, Pierre-Alain R, et al. Current trends in negative immuno-synergy between two sexually transmitted infectious viruses: HIV-1 and HSV-1/2. *Curr Trends Immunol*, 2012, 13: 51–68.
- [14] Everett H, McFadden. Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5: 395–402.
- [15] Kent JR, Kang W, Miller CG, et al. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol*, 2003, 9: 285–290.
- [16] Daly CJ, Mcgrath JC. Fluorescent ligands and protein for the study of receptors. *Pharmacol Ther*, 2003, 100(2): 101–118.
- [17] Carpenter D, Henderson G, Hsiang C, et al. Introducing point mutations into the ATGs of the putative open reading frames of the HSV-1 gene encoding the latency associated transcript (LAT) reduces its anti-apoptosis activity. *Microb Pathog*, 2008, 44(2): 98–102.
- [18] Thomas SK, Gough G, Latchman DS. A protein encoded by the herpes simplex virus (HSV) type 1 2-kilobase latency-associated transcript is phosphorylated, localized to the nucleus, and overcomes the repression of expression from exogenous promoters when inserted into the quiescent HSV genome. *J Virol*, 2002, 76(8): 4056–4067.
- [19] 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. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, (1164): 300–304.
- [20] Shen W, Sa E Silva M, Jaber T, et al. Two small

- RNAs encoded within the first 1.5 kb of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J Virol*, 2009, 83(18): 9131–9139.
- [21] Wang JB, Gong Z, Dong J, et al. Protective effect and mechanism of curcumin on ActD/TNF- α -induced synergistically apoptosis in PC12 cells. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2012, 28(5): 484–487 (in Chinese).
汪军兵, 龚正, 董军, 等. 姜黄素对放线菌素 D/TNF- α 协同诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用及机制研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(5): 484–487.
- [22] Alexander CM, Dabrowiak JC, Maye MM. Investigation of the drug binding properties and cytotoxicity of DNA-capped nanoparticles designed as delivery vehicles for the anticancer agents doxorubicin and actinomycin D. *J Bioconjug Chem*, 2012, 23(10): 2061–2070.
- [23] Yang HL, Bai LL. The expression and anti-apoptotic function of HSV-2 LAT ORF2. *Microbiol China*, 2010, 37(3): 389–393 (in Chinese).
杨慧兰, 白利利. 单纯疱疹病毒 2 型潜伏相关转录体 ORF2 的表达及其抗凋亡作用. *微生物学通报*, 2010, 37(3): 389–393.
- [24] Yang HL, Xue LZ, Fan JY, et al. Effects of herpes simplex virus 2 latency-associated transcript open reading frame 3 on the apoptosis in Vero cell. *Chin J Dermatol*, 2012, 45(3): 37–41 (in Chinese).
杨慧兰, 薛礼长, 樊建勇, 等. 单纯疱疹病毒 2 型潜伏相关转录体开放读码框 3 对 Vero 细胞凋亡的影响. *中华皮肤科杂志*, 2012, 45(3): 37–41.

(本文责编 郝丽芳)



《生物工程学报》专刊获《科技导报》期刊亮点推荐

《生物工程学报》2013 年分别于第 8 期和第 10 期出版了“合成生物学”专刊和“生物基化学品”专刊, 集中介绍了国内外在相应领域内获得的最新研究进展和科研成果。专刊发表后受到了研究者的关注, 被《科技导报》列为“科技期刊亮点”, 刊载在 2013 年(28/29)期和 32 期上, 相关信息请见《科技导报》网站 (<http://www.kjdb.org/cn/dqml.asp>)。