

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

杨慧兰^{1*} 白利利^{1,2}

(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)

摘要: 本文探讨了单纯疱疹病毒 2 型 (HSV-2) 潜伏相关转录体 (LAT) 的开放读码框 2 (ORF2) 在细胞中的表达, 及其对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 诱导的非洲绿猴肾细胞 (Vero) 凋亡的影响。通过将重组质粒 pEGFP-ORF2 转染 Vero 细胞, 绿色荧光蛋白检测转染效率, RT-PCR 验证目的基因的表达, 5-FU 诱导细胞凋亡, 通过荧光显微镜观察凋亡小体, Gimesa 染色检测细胞核形态, MTT 法检测细胞的存活率, DNA ladder 片段分析, 结果表明, 转染后绿色荧光蛋白表达效率很高, RT-PCR 验证有目的基因的转录。凋亡诱导后的细胞形态正常, MTT 法分析活性率与正常无差异, 而显著高于空质粒组, DNA ladder 未见凋亡条带。由此我们认为 HSV-2 LAT ORF2 基因在 Vero 细胞中得到了高效表达, 并且具有抗 5-FU 诱导的凋亡作用。

关键词: 单纯疱疹病毒, 潜伏相关转录体, 绿色荧光蛋白, Vero 细胞, 抗凋亡

The Expression and Anti-apoptotic Function of HSV-2 LAT ORF2

YANG Hui-Lan^{1*} BAI Li-Li^{1,2}

(1. Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Dermatology, Guangzhou, Guangdong 510010, China)
(2. South China University of Technology, Biological Science and Engineering School, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: To explore the expression and effects of transfection of the HSV-2 LAT ORF2 gene on Vero cells against apoptosis induced by 5-FU. Recombinant plasmid pEGFP-ORF2 was transiently transfected into vero cells, expression was determined by green fluorescent protein and RT-PCR, changes of cell apoptosis were determined by Giemsa stain, MTT assay and DNA ladder. We found that the green fluorescent protein has a high expressed efficiency in Vero cells, target gene was detected by RT-PCR. Vero cells transfected with pEGFP-ORF2 induced by 5-FU have no changes in cytomorphology. MTT assay showed that the cells activity transfected with HSV-2 LAT ORF2 remarkably higher than the negative control, While there were no such remarkable changes between them and normal cells. DNA ladder showed that there was no DNA fragment. Therefore we concluded that HSV-2 LAT ORF2 gene was expressed effectively in vero cells and can protect cells from apoptosis induced by 5-FU.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30972666); 全军医药卫生科研基金项目(No. 06J008)

*通讯作者: Tel: 86-20-36653508; 信箱: huilany88@hotmail.com

收稿日期: 2009-10-26; 接受日期: 2010-01-06

Keywords: HSV-2, LAT, Green fluorescent protein, Vero cells, Anti-apoptosis

单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)是人类疾病常见的病原体,在体内易引起持续潜伏感染,当免疫力低下时,可反复被激活。HSV-2 的潜伏感染是生殖器疱疹易复发、难根治的主要原因。潜伏相关转录体(LAT)是 HSV 在潜伏感染时唯一大量表达的基因,可通过所编码蛋白的抗凋亡作用使 HSV 持续处于潜伏复发状态^[1-4]。目前这一研究仅限于 HSV-1,与其同源性很高的 HSV-2 LAT 尚未见报道,对其编码蛋白也无法验证^[5-6];而增强型绿色荧光蛋白(EGFP)作为报告基因分子,结构稳定,不干扰细胞的生长与功能。为此,本实验以绿色荧光蛋白为标签示踪 HSV-2 LAT ORF2 编码蛋白,通过构建表达质粒转染 Vero 细胞后,观察 HSV-2 LAT 编码蛋白对 5-FU 所致的细胞凋亡的作用,为探讨 HSV-2 LAT ORF2 在 HSV-2 潜伏复发机制中的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1 材 料

1.1.1 细胞与菌种:非洲绿猴肾细胞(Vero), *E. coli* Top 10 为本实验室保存。

1.1.2 质粒:pEGFP-C2 为张宏斌博士赠予,重组质粒 ORF2-pcDNA6/myc-His B 为本实验室构建^[7]。

1.1.3 试剂:高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。无内毒素质粒大提试剂盒、细胞裂解液、RNase A 和蛋白酶 K 购自天根公司。脂质体 LipofectamineTM2000 和 TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品。RPMI1640 培养液与胎牛血清为 Hyclone 公司产品。MTT、Giemsa 和 DMSO 购自 Sigma 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方 法

1.2.1 Vero 细胞的培养:用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养液在 37°C、5% CO₂ 及一定湿度条件下对 Vero 细胞进行常规培养,2-3 d 传代 1 次。

1.2.2 质粒 pEGFP-ORF2 的制备及酶切鉴定:以 ORF2-pcDNA6/myc-His B 质粒为模板,PCR 扩增 ORF2 片段,双酶切 pEGFP-C2 质粒和 ORF 扩增产物, T4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* Top 10, 经卡纳抗性平板筛选阳性克隆。以限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 进行单双酶切电泳鉴定及测序鉴定。用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒 pEGFP-ORF2 (方

法见试剂盒说明书)。

1.2.3 质粒 pEGFP-ORF2 转染 Vero 细胞:胰蛋白酶消化 Vero 细胞,计数,分别以 1.0×10^4 cells/孔和 2.0×10^4 cells/孔密度接种于 96 孔与 6 孔细胞培养板,置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养,6 孔板中事先加入无菌玻片。48 h 后更换新鲜培养液,采用脂质体法转染细胞。用无血清 RPMI1640 培养液分别稀释质粒和 LipofectamineTM2000,室温静置 5 min。将两种稀释液轻轻混合,室温放置 20 min。将混合液加至对应的孔板中,置于 37°C、5% CO₂ 条件下培养。24 h 后更换成新鲜含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液继续培养,在荧光显微镜下检查绿色荧光蛋白的表达情况及转染效率。

1.2.4 RT-PCR 检测 LAT ORF2 的表达:将转染后的 Vero 细胞收集以后,用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA 进行逆转录,具体步骤参照各自的产品说明书。以所得 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,ORF2/hActin 扩增条件分别为:94°C 5 min;94°C 40 s,44°C/58°C 1 min,72°C 1 min,30 个循环;72°C 7 min,冷却到 4°C。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 5-FU 诱导 Vero 细胞凋亡:转染了质粒的细胞培养 24 h 后,加入终浓度为 10 mmol/L 的 5-FU,37°C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,用于后续的实验。

1.2.6 实验分组:实验分为 3 组:(1)未作任何处理的正常组 Vero 细胞;(2)转染了空质粒 pEGFP-C2、经 5-FU 诱导凋亡的 Vero 细胞;(3)转染了重组质粒 pEGFP-ORF2、经 5-FU 诱导凋亡的 Vero 的细胞。

1.2.7 Giemsa 染色:取出各实验组 6 孔板中的细胞玻片,PBS 漂洗 2 次,充分干燥;甲醇固定 5-10 min,空气干燥;Giemsa 工作液(10%)染色 10-20 min,流水冲洗;二甲苯透明 2 min,空气干燥,于普通光学显微镜和荧光显微镜下观察。

1.2.8 细胞增殖实验分析:将各实验组细胞及 5-FU 诱导的 Vero 细胞终止培养前 4 h 加入 MTT (终浓度为 0.5 mg/mL),4 h 后弃去液体,加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,溶解 MTT 结晶物,酶标仪测定 OD 值,检测波长为 570 nm,每实验组设 12 个复孔。取 12 孔的均值,按“细胞存活率 = (A_{实验组}/A_{对照组}) \times 100%”计算。

1.2.9 DNA ladder 片段分析:收集各实验组细胞,

PBS 洗 1 次, 加入细胞裂解液, 混匀细胞沉淀, 加入 RNase A (500 U/mL) 10 μ L, 轻弹管尖混匀, 37°C 孵育 30–120 min, 加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 10 μ L, 轻弹管尖混匀, 50°C 孵育至少 90 min, 也可过夜, 加入 DNA 上样缓冲液, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 恒流 50 V 电泳 2.5 h, 紫外灯下观察并照相。

1.2.10 统计学处理: 实验结果采用 SPSS16.0 软件进行分析, 各组数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间两两比较采用单因素的方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 质粒 pEGFP-ORF2 的酶切电泳结果

重组质粒 pEGFP-ORF2 总长度约为 4.9 kb, 经双酶切消化, 产生预期的 4.7 kb 与 240 bp 两个片段 (图 1)。

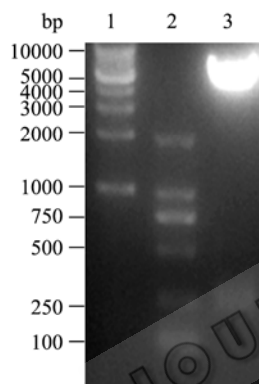


图 1 酶切鉴定 pEGFP-ORF2

Fig. 1 Identification of pEGFP-ORF2 by enzyme digestion
注: 1: DNA marker 1 kb; 2: DL2000 marker; 3: *Kpn* I 与 *Eco*R I 双酶切 pEGFP-ORF2。

Note: 1: DNA marker 1 kb; 2: DL2000 marker; 3: Plasmid pEGFP-ORF2 digested with *Kpn* I and *Eco*R I.

2.2 重组质粒转染 Vero 细胞的效率

脂质体介导的质粒转染 Vero 细胞, 24 h 后用荧光倒置显微镜观察转染效率, 重组质粒与空质粒都在 Vero 细胞中得到了高效表达, 且 EGFP-ORF2 融合蛋白在 Vero 细胞中的表达集中在整个胞质中如图 2 所示。

2.3 重组质粒在细胞中表达的 RT-PCR 验证

各组均可扩出 452 bp 的 β -actin 内参条带, 转染了 pEGFP-ORF2 质粒的 Vero 细胞可扩增出约 240 bp 的目的条带 (图 3)。

2.4 凋亡诱导后荧光显微镜形态分析

HSV-2 LAT ORF2 与 EGFP 融合蛋白在细胞整个胞质中表达, 转染了 pEGFP-ORF2 的细胞凋亡诱导后, 荧光蛋白形态未发生变化, 而转染了空质粒 pEGFP-C2 的细胞凋亡诱导后, 有明显的凋亡小体的产生 (图 4)。

2.5 Gimesa 染色

转染 pEGFP-ORF2 并经 5-FU 诱导凋亡的细胞与没有经过任何处理的细胞一样, 核被染成蓝紫色, 呈圆形, 较大, 细胞质淡染。而转染了空质粒 pEGFP-C2 并经 5-FU 诱导凋亡的细胞发生明显的凋亡现象, 染色质凝集在细胞中央 (图 5)。

2.6 细胞存活率 MTT 法分析结果

转染 HSV-2 LAT ORF2 基因的细胞, 经 5-FU 诱导处理 24 h 后, 细胞的存活率为 $93.98\% \pm 11.29\%$, 与正常组细胞没有明显差异, 而与 5-FU 诱导凋亡的正常细胞和转染了空质粒 pEGFP-C2 的细胞差异显著 ($P < 0.05$), 说明 HSV-2 LAT ORF2 基因对 5-FU 诱导的 Vero 细胞的凋亡有保护作用。凋亡诱导的含空质粒的细胞存活率为 $79.51\% \pm 11.07\%$, 略低于凋亡诱导的正常细胞的存活率 ($82.84\% \pm 11.84\%$), 两者无明显差异, 说明质粒的转染对细胞活性有一定影响, 还进一步说明转染 HSV-2 LAT ORF2 基因的细胞能够抗 5-FU 诱导的凋亡 (图 6)。

2.7 DNA 梯状凋亡条带

转染了空质粒 pEGFP-C2 的细胞经 5-FU 诱导凋亡后, 细胞染色体 DNA 断裂成 180–200 bp 整数倍的寡核苷酸片段, 在琼脂糖凝胶电泳上表现为特征性梯形电泳图谱; 而转染了 pEGFP-ORF2 的细胞经 5-FU 诱导凋亡后, 同正常的细胞一样, DNA 在胶顶部, 是一个高分子量条带细胞染色体未见有明显的 DNA 断裂表现, 说明 HSV-2 LAT ORF2 能抑制 5-FU 诱导的细胞凋亡 (图 7)。

3 讨论

凋亡是组织细胞防御病毒感染、抑制病毒扩散和持续存在的重要机制。HSV 在长期进化过程中演变出重要的调节蛋白来抑制细胞的凋亡, 从而为病毒感染和复发提供必要条件^[8]。LAT 作为 HSV 在潜伏期间唯一大量表达和可被检测的基因, 其所编码的蛋白在宿主细胞内发挥重要的调节作用, 国外对 HSV-1 的研究中已证实 LAT 编码的蛋白具有抑制

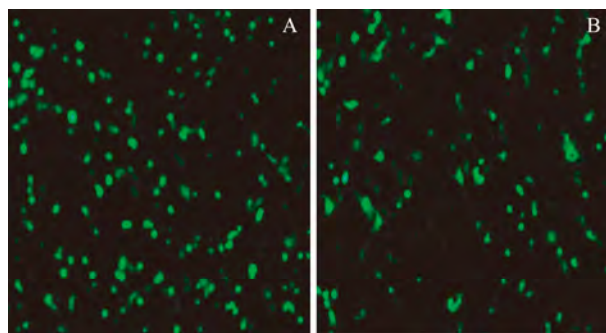


图2 质粒转染 Vero 细胞, 荧光蛋白表达 ($\times 100$)

Fig. 2 Post-transfected of plasmid, the expression of EGFP in Vero cells ($\times 100$)

注: a: 质粒 pEGFP-ORF2 转染 Vero 细胞; b: 质粒 pEGFP-C2 转染 Vero 细胞.

Note: a: Vero cells transfected with pEGFP-ORF2; b: Vero cells transfected with pEGFP-C2.

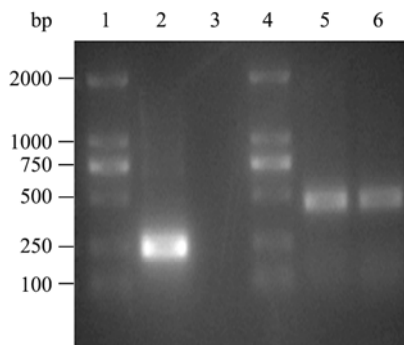


图3 RT-PCR 鉴定 pEGFP-ORF2 的表达

Fig. 3 Expression of pEGFP-ORF2 identified by RT-PCR

注: 1: DL2000 marker; 2: 转染 pEGFP-ORF2 的 Vero 细胞组的 ORF2 片段; 3: 转染 pEGFP-C2 的 Vero 细胞组无目的片段; 4: DL2000 marker; 5: 转染 pEGFP-ORF2 的 Vero 细胞组 β -actin 内参条带; 6: 转染 pEGFP-C2 的 Vero 细胞组的 β -actin 内参条带.

Note: 1: DL2000 marker; 2: ORF2 in vero cells transfected with pEGFP-ORF2; 3: Vero cells transfected with pEGFP-C2; 4: DL2000 marker; 5: β -actin in vero cells transfected with pEGFP-ORF2; 6: β -actin in vero cells transfected with pEGFP-C2.

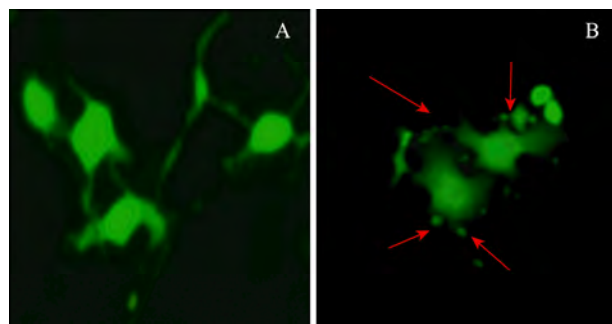


图4 荧光蛋白的形态分析 ($\times 400$)

Fig. 4 Morphology analysis of green fluorescent protein

注: a: 质粒 pEGFP-ORF2 转染 Vero 细胞; b: 质粒 pEGFP-C2 转染 Vero 细胞. 箭头所示为凋亡小体.

Note: a: Vero cells transfected with pEGFP-ORF2; b: Vero cells transfected with pEGFP-C2. Red arrowhead showed apoptotic body.

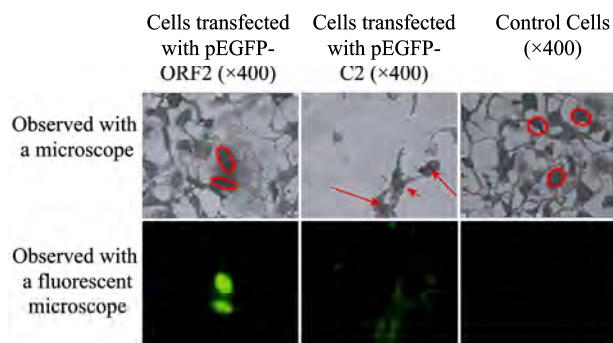


图5 细胞核染色

Fig. 5 Stain of cell nucleus

注: 红色圆圈标出的为细胞核被染成蓝紫色, 细胞质淡染; 红色箭头所示为染色质凝集在细胞中央.

Note: Red circle showed that nucleus stained amethyst, cytoplasm stained lightly. Red arrowhead showed that chromatin agglutinated in the middle of the cells.

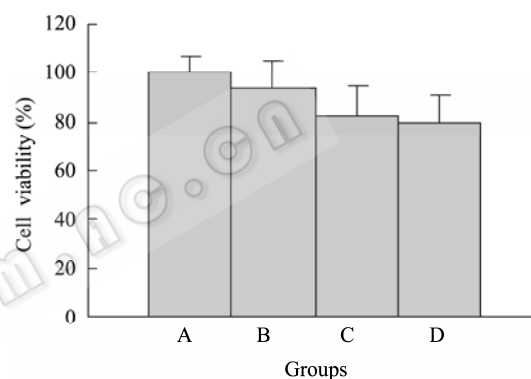


图6 细胞活性

Fig. 6 Cytoactive

注: A: 正常细胞; B: 转染了 pEGFP-ORF2, 诱导凋亡的细胞; C: 凋亡诱导的正常细胞; D: 转染了 pEGFP-C2, 诱导凋亡的细胞.

Note: A: Normal vero cells; B: Vero cells transfected with pEGFP-ORF2 induced by 5-FU; C: Vero cells induced by 5-FU; D: Vero cells transfected with pEGFP-C2 induced by 5-FU.

细胞凋亡的活性^[3]。目前对 HSV-2 LAT 的研究国内外较少^[9], 且所编码的蛋白可能是瞬时表达^[5-6], 所以很难检测到, 由此给 HSV-2 LAT ORF 的研究带来困难。

绿色荧光蛋白作为一种新型的报告基因, 被认为是研究基因表达调控、细胞分化及细胞探测的最好方法。它具有检测方便、定位准确、荧光稳定、对宿主细胞无任何毒害、不受受体范围限制的优点^[10], 因此以 EGFP 为标签, 构建 HSV-2 LAT ORF 的融合表达质粒对于检测 HSV-2 LAT ORF 的表达、示踪 HSV-2 LAT ORF 的表达定位创造了条件, 且我们的实验证实 HSV-2 LAT ORF2 与 EGFP 融合蛋白的表达集中于整个胞质中, 当凋亡诱导后, 荧光蛋白

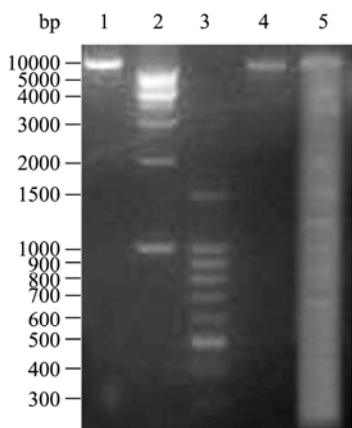


图 7 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 7 DNA agarose gel electrophoresis

注: 1: 正常 Vero 细胞; 2: 1 kb DNA marker; 3: 100 bp marker; 4: 转染重组质粒 pEGFP-ORF2 经 5-FU 诱导凋亡的细胞; 5: 转染空质粒 pEGFP-C2 经 5-FU 诱导凋亡的细胞。

Note: 1: Normal vero cells; 2: DNA marker 1 kb; 3: Marker 100 bp; 4: Vero cells transfected with pEGFP-ORF2 induced by 5-FU; 5: Vero cells transfected with pEGFP-C2 induced by 5-FU.

的形态改变可显示出细胞形态的变化, 这为直观检测提供了有力条件。

HSV 中起主要作用的 LAT 含有 3 个 ORF, 其中 ORF2 在 HSV-1 的研究中被认为有重要的作用^[11], 但对于 HSV-2 LAT ORF2 的蛋白表达水平与抗凋亡活性的研究未见报道。因此我们首次对 HSV-2 LAT ORF2 片段进行了研究, 将构建好的 HSV-2 的 LAT ORF2 基因的载体转染细胞, 通过形态学观察发现转染了 HSV-2 LAT ORF2 且经凋亡诱导后的细胞呈现出与正常细胞相同的形态, 而空质粒组出现了明显的凋亡小体, Gimesa 染色显示其细胞核与正常细胞一样, 核大, 呈圆形, 被染成蓝紫色, 细胞质淡染, 而对照细胞核内染色质凝集成深紫色, 集中于细胞中央; MTT 细胞活性分析, 转染重组质粒的细胞活性显著高于阴性对照, 而与正常细胞无差异; DNA ladder 分析未发现 DNA 梯形条带, 而对照呈现 180–200 bp 整数倍不等的断裂条带, 由此我们的实验结果初步证明, HSV-2 LAT ORF2 具有抗 5-FU 诱导的凋亡作用。

综上所述, 我们首次以绿色荧光蛋白为标签对 HSV-2 LAT ORF2 的蛋白表达及功能进行了初步探索, 发现其与 HSV-1 LAT 同样具有抗凋亡的特性, 该结果为进一步研究 HSV LAT 蛋白的功能, 探索

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了条件。

参 考 文 献

- [1] Jennifer R Kent, Wen Kang, Cathie G Miller, *et al.* Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *Journal of NeuroVirology*, 2003(9): 285–290.
- [2] 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 Neurovirology*, 2008, **14**(5): 389–400.
- [3] 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.
- [4] Francisco J Branco, Nigel W. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *J Virol*, 2005, **79**(14): 9019–9025.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 杨慧兰, 赵举峰, 樊建勇, 等. 单纯疱疹病毒 2 型潜伏相关转录子蛋白读码框 2 真核表达载体的构建及其在 Vero 细胞中的表达. *医学研究生学报*, 2008, **21**(9): 899–903.
- [8] Everett H, McFadden. Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr Opin Microbiol*, 2002(5): 395–402.
- [9] 仕瑶慧, 樊建勇, 杨慧兰. 潜伏相关转录体在单纯疱疹病毒中的作用. *国际皮肤性病杂志*, 2006, **32**(5): 324–326.
- [10] Daly CJ, Mcgrath JC. Fluorescent ligands and protein for the study of receptors. *Pharmacol Ther*, 2003, **100**(2): 101–118.
- [11] Mottk R, Osorio N, Jin L, *et al.* The bovine herpes virus-1 LR ORF2 is critical for this genes ability to restore the high wild-type reactivation phenotype to a herpes simplex virus-1 LAT null mutant. *J Gen Virol*, 2003(84): 2975–2985.