

稳定表达人类疱疹病毒 6 型 U94 基因血管内皮细胞株的建立及 U94 对内皮细胞增殖和血管生成能力的影响

王金凤¹, 顾斌², 李猛², 周峰¹, 李凌云³, 冯东举¹, 姚堃^{1*}

(¹南京医科大学微生物与免疫学系, 江苏南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院神经外科, 江苏南京 210029; ³南京医科大学发育遗传学系, 江苏南京 210029)

[摘要] 目的: 构建人类疱疹病毒 6 型 U94 基因慢病毒载体, 研究 U94 基因对血管内皮细胞增殖及血管生成的影响。方法: 以质粒 pSR2PH-U94 为模板, PCR 扩增 U94-6×His 片段, 克隆至慢病毒载体 pLenti6.3-MCS-IRES2-EGFP, 经酶切和测序鉴定后, 将重组质粒与慢病毒辅助包装元件质粒共转染 293T 细胞, 获得含 U94-6×His 基因的重组慢病毒。重组慢病毒感染血管内皮细胞 EA.hy926, 经 Blasticidin 筛选, RT-PCR 和 Western blot 鉴定, 获得稳定表达细胞株。CCK-8 和小管形成实验研究 U94 基因对血管内皮细胞的增殖及血管生成能力的影响。结果: 成功构建含 U94 基因的慢病毒表达载体 pLenti-U94-IRES2-EGFP, 重组慢病毒经包装、纯化后测得滴度为 2.35×10^7 TU/ml。重组慢病毒感染血管内皮细胞 EA.hy926, 获得能稳定表达 U94 基因的细胞株 EA.hy926-U94。CCK-8 及小管形成实验结果显示 EA.hy926-U94 细胞与阴性对照细胞 EA.hy926-NC、正常 EA.hy926 细胞相比, 细胞增殖活性明显降低, 小管形成能力变差。结论: 成功建立了慢病毒介导的稳定表达 U94 基因的血管内皮细胞株, 研究表明 U94 可以抑制内皮细胞的增殖及血管生成。

[关键词] 人类疱疹病毒 6 型; 慢病毒; U94; 血管内皮细胞; 血管生成

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1027-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20130801

Construction of vascular endothelial cell line stably expressing HHV-6 U94 gene and the effect of U94 on endothelial cell proliferation and angiogenesis ability

Wang Jinfeng¹, Gu Bin², Li Meng², Zhou Feng¹, Li Lingyun³, Feng Dongju¹, Yao Kun^{1*}

(¹Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Developmental Genetics, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a lentiviral vector containing HHV-6 U94 gene and observe the effect of U94 on proliferation and angiogenesis of vascular endothelial cells. **Methods:** The U94-6×His fragment was amplified from plasmid pSR2PH-U94 by PCR and cloned into the lentiviral vector (pLenti6.3-MCS-IRES2-EGFP). The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme digestion and gene sequencing, and then cotransfected 293T cells with the auxiliary packaging components plasmids to obtain recombinant lentivirus containing U94-6×His gene. Endothelial cells EA.hy926 were infected with the recombinant lentivirus. After the Blasticidin screening and identification by RT-PCR and western blot, the resistant cell clones were selected. The proliferation and tube formation capacity of endothelial cells were examined by CCK-8 and tube formation assay respectively. **Results:** The U94 gene was successfully cloned to lentiviral vector pLenti-U94-IRES2-EGFP. The recombinant vector was packaged into 293T cells and the titer of the purified recombinant lentivirus was 2.35×10^7 TU/ml. The U94 stably expressing cell line EA.hy926-U94 was obtained after transfection with the recombinant lentivirus and Blasticidin screening. CCK-8 and tubule formation experimental results show that the proliferation and angiogenesis ability of EA.hy926-U94 were deteriorated significantly compared to the negative control cells EA.hy926-NC and normal cells EA.hy926. **Conclusion:** The pLenti-U94-IRES2-EGFP lentiviral expression vector was constructed

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30972784, 81273235, 81201520)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yaokun@njmu.edu.cn

and stably expressing human herpesvirus 6 U94 gene EA.hy926-U94 cell line was established successfully. U94 could inhibit endothelial cells proliferation and angiogenesis.

[Key words] HHV-6; lentivirus; U94; endothelial cell; angiogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1027-1033]

人类疱疹病毒6型 (human herpesvirus 6, HHV-6) 是一类嗜人淋巴细胞的双链 DNA 病毒, 于 1986 年由美国癌症中心的 Salahuddin 等^[1]首先从淋巴增生及人类免疫缺陷综合征(AIDS)患者外周血单个核细胞中分离到, 属于疱疹病毒 β 亚科。HHV-6 原发感染一般发生在 6 个月~2 岁的婴幼儿, 其后在体内建立潜伏感染^[2-3], 在机体免疫力低下时被激活或者发生再感染, 对免疫缺陷者或接受移植手术患者, HHV-6 易被激活引起脑炎、肺炎或移植失败等严重后果^[4]。较多报道 HHV-6 与多发性硬化症、AIDS、肿瘤等的发病有关^[5]。但 HHV-6 潜伏以及再激活的分子机制尚不清楚, 在潜伏感染期, 除了类似于人巨细胞病毒有即刻早期区域特异转录本 IE 转录外, 还检测到了 U94 基因^[6], 并认为 U94 是 HHV-6 潜伏感染的标志。

U94 是 HHV-6 区别于其他疱疹病毒编码的开放阅读框架, 在疱疹病毒家族成员中没有相似序列, 但与腺病毒相关病毒 2 型(AAV-2)rep68/78 基因具有一定的同源性^[7]。AAV-2 REP68/78 是一个多功能蛋白, 参与病毒的整合、复制及转录, HHV-6 U94 的功能目前并不明确, 但它在 HHV-6 不同病毒株间具有高度保守性, 提示它对病毒的生物学功能起到重要作用。有报道认为 U94 与病毒的复制与潜伏、基因转录调控及肿瘤的血管生成等有密切关系。有人称它为 HHV-6 编码的抑癌基因^[8]。本室前期工作曾在胶质瘤囊液中分离到 1 株 HHV-6, 并且发现胶质瘤患者脑组织中 HHV-6 阳性率与正常人群相比有显著性差异, 提示 HHV-6 感染在胶质瘤的发生发展中可能起到作用^[9]。并已构建了慢病毒介导的稳定表达 U94 的胶质瘤细胞系 U251, 发现其对该胶质瘤细胞系的增殖、迁移、侵袭等均有抑制作用。肿瘤的生长离不开血管, 目前尚无慢病毒介导 U94 转染血管内皮细胞株的报道。本研究旨在建立慢病毒介导的稳定表达 U94 的血管内皮细胞株, 并初步观察 U94 基因对血管内皮细胞生物学功能的影响, 为深入探索 U94 基因的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株

EA.hy926 细胞 (中科院上海细胞库), 质粒 pSR2PH-U94 由意大利法拉利大学 Di Luca 教授惠赠, 慢病毒载体 pLenti6.3-MCS-IRES2-EGFP、包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG (上海英潍捷基公司), 293T、HEK293 细胞、大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。

1.1.2 主要酶和试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Asc* I (美国 MBI 公司), T4 DNA Ligase (美国 NEB 公司), DNA 纯化试剂盒 (美国 Axygen 公司), TRIzol (美国 Sigma 公司), Cell Counting Kit-8 (南京凯基生物), DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), Matrigel Matix (美国 BD 公司), BU-Taq 2 \times Master PCR Mix (南京铂优生物)。

1.2 方法

1.2.1 重组慢病毒质粒 pLenti-U94-IRES2-EGFP 的构建和鉴定

根据 HHV-6A U94 (NC-001664.2) 和 6 \times His tag (catcatcatcatcatcac) 序列, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 在引物中引入 *Bam*H I 和 *Asc* I 酶切位点, 引物由上海赛百盛公司合成。上游引物 P1: 5'-CATCGGATCCGCCACCATGTTTTCCATAATAAATC-C-3'; 下游引物 P2: 5'-CATCGGCGCGCCTTAATG-GTGATGCTGATGGTGTAAATTTTCGGAACCGTGT-AGTC-3' (下划线部分为 *Bam*H I 和 *Asc* I 酶切位点), 以 pSR2PH-U94 质粒为模板, 扩增目的基因。PCR 反应体系为: DNA 0.3 μ l, 上下游引物各 1 μ l, BU-Taq 2 \times Master PCR Mix 12.5 μ l, ddH₂O 10.2 μ l, 总体积 25 μ l。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 扩增 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。产物经凝胶电泳检测, 纯化后回收 DNA 片段 U94-6 \times His。

上述 PCR 产物和 pLenti6.3-MCS-IRES2-EGFP 质粒, 分别以限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Asc* I 双酶切, T4 DNA Ligase 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, *Bam*H I 和 *Asc* I 双酶切验证, 交由上海英潍捷基公司测序验证。

1.2.2 慢病毒包装及慢病毒活性滴度的测定

将重组慢病毒质粒 pLenti-U94-IRES2-EGFP 和 3 种辅助包装质粒 pLP1、pLP2、pLP/VSVG(packaging mix), 以 Lipofectamine2000 共转染 293T 细胞, 转染后 6 h 更换含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基。48 h 后收集细胞培养上清, 3 000 r/min 离心 10 min, 去除细胞和碎片, 并用 0.45 μm 的滤器过滤。将病毒原液在 50 000 g 下超速离心 2 h, 去除上清, 重悬于 opti-MEM 培养液中, 得到慢病毒液 Lenti-HHV6-U94 滴度测定后分成小管保存于 -80°C 。同样方法制备空载体慢病毒液。

慢病毒滴度测定前 1 d 细胞铺板, HEK293 细胞胰酶消化后轻轻吹打成单细胞悬液, 细胞计数后铺 96 孔板, 8 000 个/孔。配置含 2% FBS 的 DMEM 培养基, 再添加 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Polybrene, 混合均匀后用慢病毒稀释培养基。然后 10 倍梯度连续稀释病毒液, 各取 100 μl 感染 HEK293 细胞, 每个稀释度 2 个复孔, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养。96 h 后, 在荧光显微镜下观察各孔中荧光细胞数量, 病毒滴度为各孔中表达荧光的细胞平均数除以每孔中含有的慢病毒液体积。

1.2.3 构建慢病毒介导稳定表达 U94 的血管内皮细胞 EA.hy926

EA.hy926 细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 37°C 、5% CO_2 培养箱条件下常规培养。慢病毒感染前 1 d, 胰酶消化细胞, 计数后按照 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板中。培养箱中培养过夜。按照 $\text{MOI}=20$, 用慢病毒稀释培养基分别稀释慢病毒 Lenti-HHV6-U94 和空载体慢病毒。PBS 轻洗贴壁细胞 1 遍后将稀释好的慢病毒液分别加入各细胞培养孔中, 同时设定空白 EA.hy926 细胞作为对照, 细胞放置培养箱中继续培养, 8 h 后换液, 96 h 后观察细胞阳性率。

6 孔板内病毒感染 3 d 后, 胰酶消化各孔, 并以 2×10^5 个/孔, 接种于 6 孔板内, 使得第 2 天细胞密度达 50%~60%; 细胞接种后第 2 天换液, 并加入 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blasticidin 进行筛选, 每 3~4 d 换液 1 次, 同时加入相应浓度的 Blasticidin 处理; 药物筛选时间为 8 d; 药物结束后细胞进行扩大培养, 同时加入维持药浓度 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Blasticidin。将转染 U94 慢病毒及空载体慢病毒的细胞药筛后得到的细胞株分别命名为 EA.hy926-U94 和 EA.hy926-NC。

1.2.4 RT-PCR 检测 U94 mRNA 在稳定表达细胞株的表达

收集 EA.hy926-U94、EA.hy926-NC、EA.hy926 细胞,

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 反转录生成 cDNA, 进行 RT-PCR。U94 基因引物序列同上(1.2.1), β -actin 作为内参, 上游引物序列 P3: 5' -TGGCAC-CCAGCACAATGAA-3'; 下游引物序列 P4: 5' -CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。PCR 反应体系为: cDNA 2 μl , 上下游引物各 1 μl , BU-Taq 2 \times Master PCR Mix 12.5 μl , ddH₂O 8.5 μl , 总体积 25 μl 。PCR 反应条件同上(1.2.1)。反应结束后, 取 5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 Western blot 检测目的蛋白的表达

收集 EA.hy926-U94、EA.hy926-NC、EA.hy926 细胞加入细胞裂解液抽提蛋白, 按 BCA 蛋白质定量试剂盒说明书操作测定蛋白质浓度, SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭, 加入抗 6 \times His tag 的鼠单克隆抗体和兔抗鼠的二抗进行杂交、洗膜等操作后, ECL 显色。

1.2.6 细胞增殖实验

胰酶消化 EA.hy926-U94、EA.hy926-NC、EA.hy926 细胞, 以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板内。分别在培养 24、48、72、96 h 时, 用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒检测细胞的增殖情况, 实验组及对照组均设 4 个复孔, 酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的吸光度值。

1.2.7 小管形成实验

将 Matrigel Matix (基质胶) 置 4°C 冰箱过夜融化, 96 孔板和移液枪头等置于 -20°C 冰箱预冷 20 min, 在 96 孔板中每孔加入 60 μl 融化的基质胶, 37°C 培养箱内静置 60 min, 待其凝固后收集上述 3 组细胞, 以 3×10^4 个/孔的密度铺于 96 孔板, 每组设 3 个复孔。 37°C 培养箱内孵育 4~16 h 后, 倒置显微镜下观察内皮细胞的小管形成情况, 100 倍视野下拍照。应用 Image Pro Plus 图像分析软件 (IPP), 利用长度测量法获得小管的量化指标。

1.3 统计学方法

实验均独立重复 3 次, 采用 SPSS15.0 统计分析软件分析实验数据。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

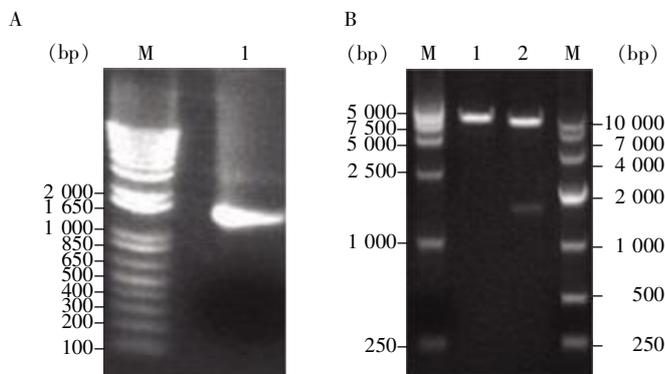
2 结果

2.1 重组慢病毒质粒的构建与鉴定

PCR 扩增 U94-6 \times His 基因片段, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 500 bp 左右可见目的条带 (图 1A)。回收并纯化 U94-6 \times His 片段与经 BamH I 和 Asc I 双酶切后线性化慢病毒载体质粒 pLenti6.3-

MCS-IRES2-EGFP 连接所得的重组质粒 (pLenti-U94-IRES2-EGFP), 经 *Bam*H I 和 *Asc* I 双酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定正确(图 1B)。上海英潍捷基公司

测序结果与 GenBank 中的 U94 序列比对, 完全一致。上述结果提示重组质粒 pLenti-U94-IRES2-EGFP 构建成功。



A: PCR 扩增目的基因片段 U94-6×His tag, M: DNA marker; 1: 约 1.5 kb 目的基因; B: 重组质粒双酶切, M: DNA marker; 1: 单酶切产物; 2: 双酶切得到约 1.5 kb 目的基因。

图 1 重组慢病毒质粒 pLenti-U94-IRES2-EGFP 的构建和鉴定

Figure 1 Construction and identification of recombinant lentiviral plasmid pLenti-U94-6his-IRE2-EGFP

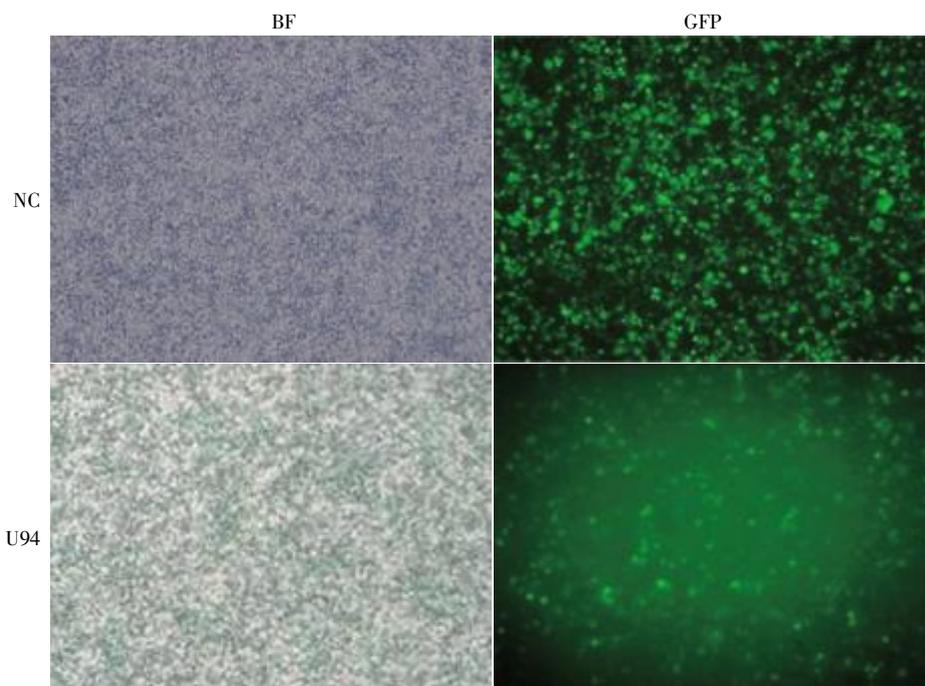
2.2 慢病毒的包装及滴度测定

慢病毒表达载体 pLenti-U94-IRES2-EGFP 和包装质粒(packaging mix)共转染 293T 细胞, 24 h 后, 在荧光显微镜下可见到绿色荧光(图 2), 表明质粒已成功转染到 293T 细胞中, 收集含慢病毒的细胞上清, 稀释, 测病毒滴度为 2.35×10^7 TU, 同样方法

制备的空载体慢病毒液病毒滴度是 1.0×10^8 TU。

2.3 稳定表达 U94 的 EA.hy926 细胞株的筛选

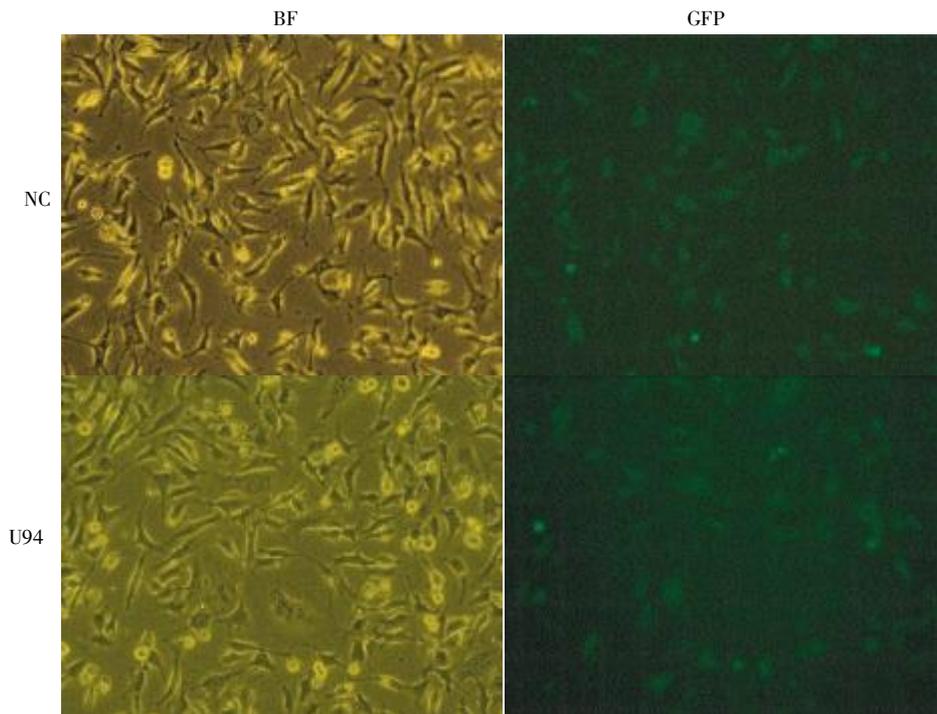
慢病毒感染后 3 d, 细胞融合率约 100%, 然后传代, 经 10 d $9 \mu\text{g/ml}$ Blasticidin 的药物筛选, 得到形态良好的稳定细胞株。荧光显微镜下可看到绿色荧光(图 3)。



BF: 可见光; GFP: 绿色荧光; NC: 阴性慢病毒质粒(pLenti6.3-MCS-IRES2-EGFP); U94: 重组慢病毒质粒(pLenti-U94-IRES2-EGFP)。

图 2 慢病毒质粒转染 293T 细胞 24 h 后在荧光显微镜下拍照($\times 100$)

Figure 2 293T transfected by lentiviral plasmid after 24 h($\times 100$)



BF:可见光;GFP:绿色荧光;NC:阴性对照细胞 EA.hy926-NC;U94:稳定表达目的基因的 EA.hy926-U94。

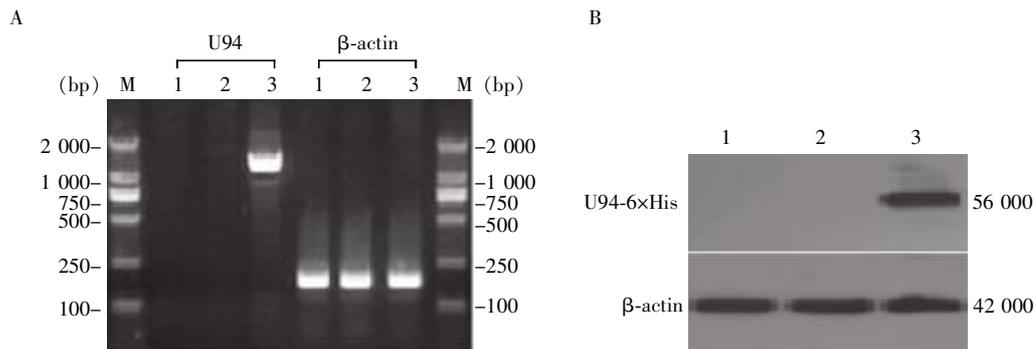
图 3 药筛后得到稳定细胞株在荧光显微镜下拍照($\times 100$)

Figure 3 The stable cell lines were obtained after the screening ($\times 100$)

2.4 EA.hy926-U94 稳定细胞株的鉴定

分别提取 EA.hy926-U94、EA.hy926-NC 及 EA.hy926 细胞的总 RNA 及细胞蛋白。总 RNA 的 RT-PCR 结果发现只有 EA.hy926-U94 组在约 1 500 bp 处有一特异性条带,表明 EA.hy926-U94 细胞株有

U94 mRNA 的转录(图 4A)。对收集的 3 组细胞蛋白进行 Western blot 鉴定,与 RT-PCR 结果一致,在 56 000 附近出现一特异性条带,与预期分子量大小一致(图 4B)。提示已成功建立了稳定表达 U94 的 EA.hy926-U94 细胞株。



A:RT-PCR 检测 U94 mRNA 的转录,M:DNA marker;1:EA.hy926 细胞;2:EA.hy926-NC 细胞;3:EA.hy926-U94 细胞;B:Western blot 鉴定 U94-6xHis 蛋白的表达,1:EA.hy926 细胞;2:EA.hy926-NC 细胞;3:EA.hy926-U94 细胞。

图 4 RT-PCR 及 Western blot 鉴定 EA.hy926-U94 稳定细胞株

Figure 4 Identification of the stable cell line EA.hy926-U94 by RT-PCR and Western blot analysis

2.5 U94 对 EA.hy926 细胞增殖和小管形成能力的影响

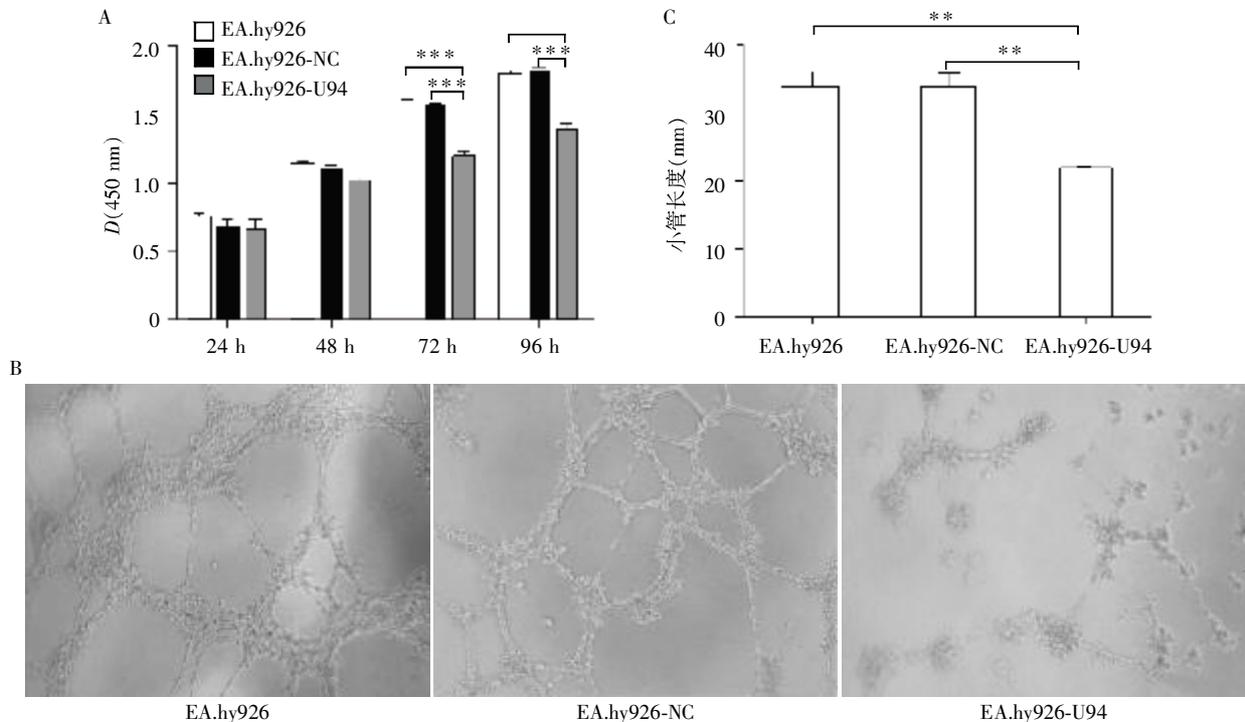
CCK-8 检测 3 组细胞增殖情况,在 48 h,EA.hy926-U94 与空白对照细胞 EA.hy926 相比增殖受到抑制,吸光度值分别为(1.017 \pm 0.026)和(1.136 \pm

0.030),EA.hy926-U94、EA.hy926-NC、EA.hy926 细胞在 72 h 时吸光度值分别为(1.203 \pm 0.042)、(1.554 \pm 0.021)、(1.567 \pm 0.064);96 h 时分别为(1.401 \pm 0.042)、(1.810 \pm 0.033)、(1.790 \pm 0.040),EA.hy926-U94 与其他两组相比增殖受到抑制,差异具有统计

学意义($P < 0.001$),而另外两组之间差异无统计学意义(图5A)。

内皮细胞小管形成实验分析:利用分析IPP图像分析软件对形成小管的长度参数进行分析。EA.

hy926-U94与EA.hy926-NC、EA.hy926相比,小管形成能力变差,显示了U94抑制小管形成能力(图5B、C)。其小管长度分别为 (21.83 ± 0.31) 、 (33.86 ± 2.04) 、 (33.83 ± 2.14) mm ($P < 0.01$)。



A: CCK-8 检测 3 组细胞在 24、48、72、96 h 的增殖能力; B: 倒置显微镜下观察 3 组细胞小管形成情况($\times 100$); C: 小管形成实验检测 3 组细胞的小管形成能力。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, $n = 3$ 。

图 5 CCK-8 及小管形成实验检测内皮细胞增殖能力及小管形成能力

Figure 5 Identification of the proliferation and tube formation capacity of endothelial cells by CCK-8 and tube formation assay, respectively

3 讨论

血管生成是肿瘤生长的必要条件,肿瘤细胞距离血管超过 $100 \mu\text{m}$ 就会缺氧,没有足够的血液供应时肿瘤生长不会超过 $1\sim 2$ mm。抑制血管生成是癌症治疗的一大进步,目前抗血管生成疗法使用抑制剂能特异性阻断单一的促血管生成活性分子,但肿瘤可以激活旁途径仍可促进血管生成进程;例如在小鼠体内抑制 VEGF 可以促进 bFGF 通路的增加^[10]。这就为肿瘤的抗血管治疗带来困难。

目前研究认为 U94 是 HHV-6 编码的一个抑癌基因。U94 可以调控基因的表达^[11],结合单链 DNA^[12],也可以结合人 TATA 结合蛋白^[13],下调基因的转录水平来参与病毒潜伏感染,抑制肿瘤基因转化和 HIV-1 LTR 的转录^[11],并发现原核表达重组蛋白 U94 定位在细胞核上^[8],这些证据提示 U94 可能通过诱导某种特殊细胞因子的表达来间接发挥调控作

用。然而这个被上调或下调的特殊的细胞因子目前尚未确定。Ifon 等^[8]利用基因芯片技术发现转染 U94 基因的前列腺癌细胞系(PC3)可以上调纤维连接蛋白(FN1),下调血管生成素样蛋白 4(ANGPTL4)的表达,具有抑制病灶形成的抗肿瘤潜能。FN 是一种细胞外糖蛋白,作为主要的细胞黏附分子之一,在许多重要的生理过程中起到关键性作用。大量聚合的 FN1 包裹在肿瘤细胞的表面,起到阻止肿瘤细胞间恶性信号传递的作用^[14]。有报道称 FN1 聚合体在体内具有抗肿瘤活性,实验小鼠被全身给予 FN1 聚合体后表现出对多种类型肿瘤的抗性^[15]。ANGPTL4 是一种与脂肪代谢相关的分泌蛋白,鸡胚尿囊膜实验提示 ANGPTL4 具有不依赖于 VEGF 基因的强大的促血管效应^[16]。新生血管是肿瘤进展的标志,抑制血管生成将对肿瘤治疗产生极大影响。虽然 U94 基因引起 FN1 表达上调和 ANGPTL4 表达下调的分子机制并不清楚,但推测 U94 通过对 FN1 和 ANGPTL4

的调控,来抑制血管生成,从而抑制肿瘤的生长。如果 U94 可以同步阻断血管生成的不同途径,将会为肿瘤的基因治疗提供一个很好的靶点。因此进一步阐明 U94 对血管生成的作用及机制是今后研究中急需解决的问题。

慢病毒载体是逆转录病毒家族成员,对分裂细胞和非分裂细胞均具有较强的感染能力^[17],且因其具有转染效率高,表达持久,免疫反应小等优点而得到广泛应用。本实验选用的慢病毒载体 pLenti6.3-MCS-IRES2-EGFP 含有 1 个 CMV 启动子,可以选择多个多克隆位点,且含有 EGFP 附加表位的四质粒包装系统。IRES 是内部核糖体进入位点序列,它可以翻译一条 mRNA 上的两个开放阅读框,其转录产物在翻译时核糖体能同时进入并起始翻译 IRES 上游及下游的两个转录本,使翻译出的标记蛋白与目的蛋白各具独立的空间结构和生物活性。由于没有商品化的 U94 蛋白的单克隆抗体,在 U94 基因片段中引入 6 × His 标签,成功构建了携带目的基因的 pLenti-U94-IRES2-EGFP 载体。在 293T 细胞内包装,获得 2 × 10⁷ TU/ml 的慢病毒液,并转染内皮细胞 EA.hy926,建立了稳定表达 U94 的细胞株。通过 CCK-8 细胞增殖实验及小管形成实验发现,U94 对血管内皮细胞增殖及血管生成均有抑制作用。

总之,本文成功构建了携带 U94 基因的慢病毒表达载体,并初步探索了 U94 基因对血管内皮细胞增殖和血管生成功能的影响,为以后进一步进行相关机制的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders[J]. *Science*, 1986, 234(4776): 596-601
- [2] Zerr DM, Meier AS, Selke SS, et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8): 768-776
- [3] Prober C. Sixth disease and the ubiquity of human herpesviruses[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8): 753-755
- [4] Caselli E, Di Luca D. Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 [J]. *New Microbiol*, 2007, 30(3): 173-187
- [5] Lacroix A, Jaccard A, Rouzioux C, et al. HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma [J]. *J Med Virol*, 2007, 79(9): 1349-1356
- [6] Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, et al. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13911-13916
- [7] Thomson BJ, Efstathiou S, Honess RW. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6[J]. *Nature*, 1991, 351(6321): 78-80
- [8] Ifon ET, Pang A, Johnson W, et al. U94 alters FN1 and ANGPTL4 gene expression and inhibits tumorigenesis of prostate cancer cell line PC3 [J]. *Cancer Cell Int*, 2005, 5: 19
- [9] Chi J, Gu B, Zhang C, et al. Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(9): 1394-1398
- [10] Dempke W, Heinemann V. Resistance to EGF-R (erbB-1) and VEGF-R modulating agents [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(7): 1117-1128
- [11] Araujo JC, Doniger J, Kashanchi F, et al. Human herpesvirus 6A ts suppresses both transformation by H-ras and transcription by the H-ras and human immunodeficiency virus type 1 promoters [J]. *J Virol*, 1995, 69(8): 4933-4940
- [12] Dhepakson P, Mori Y, Jiang YB, et al. Human herpesvirus-6 rep/U94 gene product has single-stranded DNA-binding activity[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(4): 847-854
- [13] Mori Y, Dhepakson P, Shimamoto T, et al. Expression of human herpesvirus 6B rep within infected cells and binding of its gene product to the TATA-binding protein in vitro and in vivo[J]. *J Virol*, 2000, 74(13): 6096-6104
- [14] Saad S, Gottlieb DJ, Bradstock KF, et al. Cancer cell-associated fibronectin induces release of matrix metalloproteinase-2 from normal fibroblasts[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 283-289
- [15] Yi M, Sakai T, Fässler R, et al. Antiangiogenic proteins require plasma fibronectin or vitronectin for in vivo activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11435-11438
- [16] Le Jan S, Amy C, Cazes A, et al. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(5): 1521-1528
- [17] Chu K, Cornetta KG, Econs MJ. Efficient and stable gene expression into human osteoclasts using an HIV-1-based lentiviral vector [J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27(6): 315-320