

人疱疹病毒 6B 感染对 Molt3 细胞增殖和细胞周期的影响

周 锋¹, 冯东举¹, 顾 斌², 姚 堃¹, 李 猛¹, 王金凤¹, 李凌云^{3*}

(¹南京医科大学微生物与免疫学系, 江苏 南京 210029; ²东南大学中大医院神经外科, 江苏 南京 210009; ³南京医科大学发育遗传学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究人疱疹病毒(human herpesvirus, HHV)6B 感染 T 淋巴细胞系 Molt3 后对其细胞增殖和周期的影响。方法: HHV-6B 感染 Molt3 细胞后, 倒置显微镜观察细胞形态变化, PCR 鉴定 Molt3 细胞中 HHV-6 U22 基因, 间接免疫荧光及 Western blot 检测 HHV-6 蛋白表达; MTT 检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期变化, 荧光定量 PCR 检测细胞周期相关蛋白 mRNA 水平变化。结果: HHV-6B 感染 48 h 后, Molt3 细胞出现典型细胞病变。PCR 检测到感染组细胞中含有 HHV-6 U22 基因, 间接免疫荧光及 Western blot 均检测到 HHV-6 蛋白表达。MTT 显示 HHV-6B 能明显抑制 Molt3 细胞的增殖。HHV-6B 感染后 Molt3 细胞周期发生改变, 与对照组相比, 感染组细胞 G1 期增多, S 期和 G2 期减少。实时荧光定量 PCR 表明 HHV-6B 感染后 cyclinE1 mRNA 水平降低, p53 mRNA 水平升高。结论: HHV-6B 能够有效感染 Molt3 细胞引起典型的细胞病变效应, HHV-6B 感染使细胞周期阻滞在 G1 期从而抑制细胞增殖。

[关键词] 人疱疹病毒 6B; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R371.1+1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1457-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20141101

Effects of human herpesvirus 6B infection on cell proliferation and cell cycle of Molt3 cells

Zhou Feng¹, Feng Dongju¹, Gu Bin², Yao Kun¹, Li Meng¹, Wang Jinfeng¹, Li Lingyun^{3*}

(¹Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Neurosurgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; ³Department of Developmental Genetics, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the significance of human herpesvirus type 6B(HHV-6B) infection on human T-lymphoblastoid cell line Molt3 and its effects on cell cycle and proliferation. **Methods:** HHV-6B-infected Molt3 cell morphology was assessed by a inverted microscope. The fragment of HHV-6 U22 gene in Molt3 cells was amplified by PCR. Expression of HHV-6B late protein was examined by the immunofluorescence assay and Western Blot. Cell proliferation was measured by MTT assay after HHV-6B infected Molt3. Cell cycle analysis was evaluated by flow cytometry. The mRNA levels of cell cycle related protein were examined by Real-time PCR. **Results:** Molt3 cells infected by HHV-6B showed typical cytopathic effect at 48 h post-infection. HHV-6 U22 gene was detected by PCR. HHV-6 late protein was positive in infected cells by indirect immunofluorescence and Western Blot assay. MTT assay detected that HHV-6B infection inhibited the proliferation of Molt3 cells significantly. Compared with the uninfected cells, percentages of Molt3 cells infected by HHV-6B were increased in phase G1 but decreased in phase S and G2. The mRNA levels of cyclinE1 were decreased after 48 h post-infection, however, the mRNA levels of p53 were significantly increased after infection. **Conclusion:** HHV-6B can infect the Molt3 cells, lead to typical cytopathic effect, and inhibit cell proliferation and make the cell cycle stay in phase G1.

[Key words] human herpesvirus 6B; cell proliferation; cell cycle

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1457-1462]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81273235; 81201520; 81301698)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: llyun2000@sina.com

人疱疹病毒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AIDS患者的外周血单个核细胞中分离得到,属于 β 疱疹病毒亚科。根据基因结构差异和抗原性可分为A、B两种亚型,代表株分别是GS、U1102和Z29^[2-5]。HHV-6在体内可感染多种细胞,但最敏感的是外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中的CD4⁺T细胞。HHV-6原发感染一般发生在6个月~2岁的婴幼儿,其后在体内建立长期潜伏感染。目前认为HHV-6是婴幼儿急疹的病因^[6]。近年研究表明HHV-6与多发性硬化症等中枢神经系统疾病相关;它是骨髓移植、器官移植等免疫抑制患者的主要致病性病原,也是引起严重移植物排斥的重要病因^[7-9];此外,HHV-6也是一种肿瘤相关病毒,其DR7基因具有转化能力,发现其与人类多种肿瘤如淋巴瘤、白血病、神经胶质瘤、口腔癌等有关^[10-12]。本研究在体外建立HHV-6感染Molt3细胞模型,探究HHV-6感染对Molt3细胞增殖和细胞周期的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞

HHV-6B亚型Z29标准株购自美国ATCC。人脐带血由南京市妇幼保健院提供。人T淋巴细胞系Molt3为本室保存。

1.1.2 主要试剂

胎牛血清和RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司。肝素购自徐州万邦医药公司,12500U/支。植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)购自广州市生化制品厂,10mg/支。IL-2购自美国Peprotech公司。人淋巴细胞分离液Ficoll购自天津灏洋公司。HHV-6晚期蛋白gp60/110单克隆抗体购加拿大Chemicon International公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒和细胞的培养

人淋巴细胞分离液Ficoll常规方法分离脐带血单个核细胞,用含20%新生牛血清、PHA 20 μ g/ml、IL-2 10 U/ml的RPMI-1640培养液调细胞数为 2×10^6 个/ml,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中预激活48h。将PHA预激活的脐带血单个核细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml,接种HHV-6B病毒。每天在倒置显微镜下观察细胞病变进程,当细胞病变效应最大时,收集感染细胞及上

清,反复冻融使病毒释放,离心收集上清,过0.45 μ m滤膜除去细胞残渣,超速离心后得浓缩纯化病毒。以MOI=10感染Molt3细胞后,在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养。

1.2.2 细胞形态学观察

Molt3细胞铺于6孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,HHV-6B病毒以MOI=10感染细胞。分别在病毒感染24、48h后在显微镜下观察细胞的细胞病变进程并拍照。

1.2.3 DNA的提取

酚、氯仿抽提法提取HHV-6B感染组和未感染组细胞总DNA。收集6孔板中的细胞,PBS洗2次,加300 μ l TE和15 μ l 10%SDS,混匀,37 $^{\circ}$ C水浴1h,加蛋白酶K,使工作浓度为100 μ g/ml,55 $^{\circ}$ C水浴3h。加等体积的酚、氯仿和异戊醇,颠倒混匀,12000 r/min离心10 min,将上清移入干净的离心管中。重复上述步骤1次。加入1/10体积的2.5 mmol/L NaAC和2倍体积无水乙醇,充分混匀,-20 $^{\circ}$ C沉淀过夜。第2天将其于4 $^{\circ}$ C 12000 r/min离心10 min后弃上清,每管加75%酒精1 ml,4 $^{\circ}$ C 12000 r/min离心5 min后弃上清,室温晾干,沉淀即为所提细胞的DNA,加入60 μ l TE溶解。

1.2.4 PCR鉴定细胞中HHV-6 DNA

以上述所获得DNA为模板扩增HHV-6 U22基因。U22引物序列:上游引物:5'-CGCTCGGAAAGGAAACATTA-3',下游引物:5'-AAGTGGAAGCTTGGTGGC-3'。 β -actin引物序列:上游引物:5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3',下游引物:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'(上海赛百胜公司合成)。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸8 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 间接免疫荧光检测HHV-6蛋白表达

HHV-6B感染48h后,收集感染组和未感染组细胞,PBS洗2次,涂片(载玻片经防脱试剂poly-L-lysine)处理。细胞用4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3次,滴加1%BSA封闭1h,加入1:50稀释的一抗100 μ l于载玻片上,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第2天PBS洗3次,加入1:50稀释的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1h(避光),PBS洗3次,滴加缓冲甘油封片,在倒置荧光显微镜下观察。

1.2.6 Western blot检测HHV-6蛋白的表达

收集感染组和未感染组的细胞,抽提蛋白后进

行 SDS-PAGE 电泳;电泳完毕的凝胶转移至 PVDF 膜;将 PVDF 膜浸入 5% 脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h;加入 HHV-6 晚期蛋白 gp60/110 单克隆抗体,4℃ 过夜;TBST 洗 3 次,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,ECL 显影,定影。

1.2.7 MTT 法检测细胞增殖

取 Molt3 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,6 个复孔。HHV-6B 病毒以 MOI=10 感染细胞,分别在感染后 24、48 h 行 MTT 检测。每孔加 MTT 20 μ l,继续培养 4 h,吸出上清液,每孔加 150 μ l DMSO,振荡 10~15 min,酶标仪在 550 nm 波长处检测各孔的吸光度。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期

分别于病毒感染后 24、48 h 收集对照细胞和感染细胞。2 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 次;缓慢加入 70%乙醇,-20℃ 固定 20 min 以上;2 000 r/min 离心 5 min 去除乙醇,PBS 水化 15 min;2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,加入 PI 染色,避光 30 min 后流式细胞仪检测分析。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 法检测 cyclinD1、cyclinE1 和 p53 的相对表达

提取感染组和未感染组的细胞 RNA,反转录 cDNA,实时荧光定量 PCR 扩增 cyclinD1、cyclinE1 和 p53 基因。cyclin D1: 上游引物:5'-ATGTTTCGTGGCCTC TAAGATGA-3',下游引物:5'-CAGGTTCCACTTGA-

GCTTGTTTC-3'。cyclin E1:上游引物:5'-ACCGGTA-TATGCGAC ACAAGAA-3',下游引物:5'-TCA CATA CGCAA ACTGGTGCAA-3'。p53:上游引物:5'-AGAGCTGAATGAGGCCTTGAA-3',下游引物:5'-GAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAAC-3'。 β -actin 引物同 1.2.4。

扩增条件:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 30 s,95℃ 15 s。以 β -actin 为内参,设 3 个复孔,读取 Ct 值,计算均值,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件,重复实验的数据结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HHV-6B 感染 Molt3 后出现典型的细胞病变

体外正常培养的 Molt3 细胞呈圆形。HHV-6B 感染 24 h 后细胞开始肿大,感染 48 h 后出现明显的细胞病变效应,细胞肿胀,变大变圆,呈气球样(图 1)。

2.2 HHV-6B DNA 在细胞中的鉴定

以 HHV-6B 感染的 Molt3 细胞总 DNA 为模板扩增 U22 基因,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可见 194 bp 处出现预期条带(图 2)。将 PCR 产物测序结

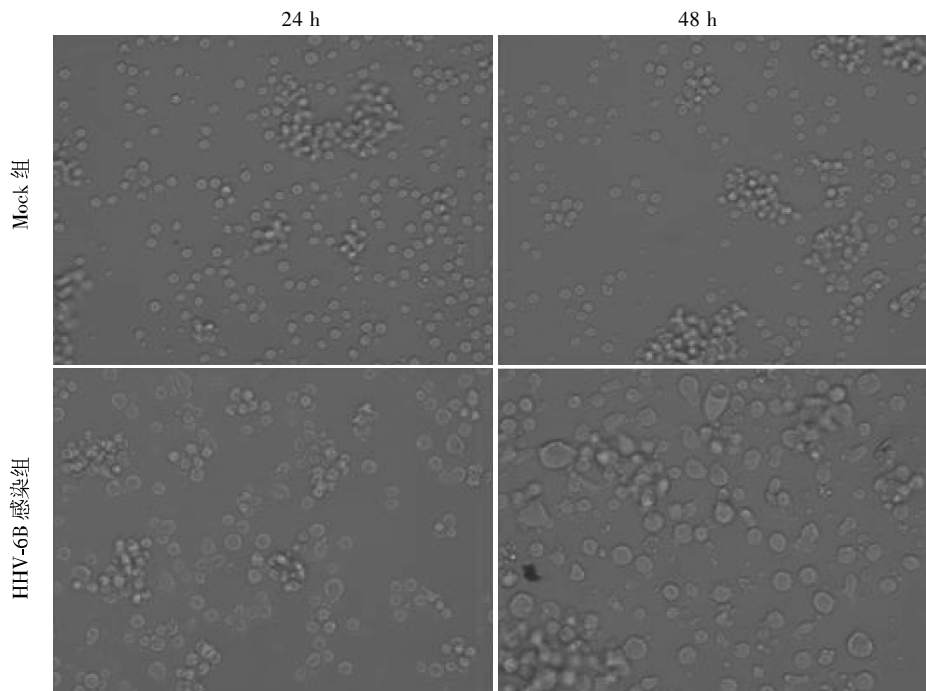
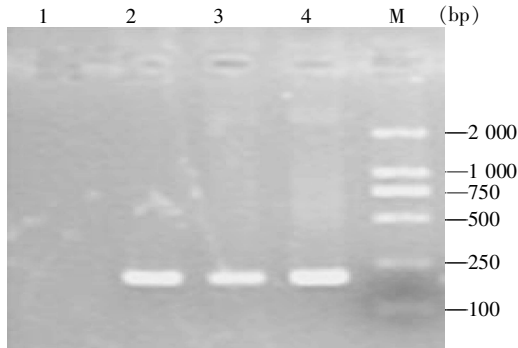


图 1 HHV-6B 感染后 Molt3 细胞形态变化($\times 200$)

Figure 1 The morphological change in Molt3 cells after infected by HHV-6B ($\times 200$)

果与 GenBank 序列比较同源性为 100%。证实细胞感染病毒后,细胞表达了 HHV-6 U22 基因。



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: 对照细胞扩增 U22; 2: HHV-6B 感染细胞扩增 U22; 3: 对照细胞扩增 β -actin; 4: HHV-6B 感染细胞扩增 β -actin。

图 2 HHV-6B 感染 Molt3 细胞后 U22 和 β -actin 扩增产物的电泳结果

Figure 2 PCR amplification of U22 and β -actin gene in Molt3 cells with HHV-6B infection

2.3 HHV-6B 蛋白在 Molt3 细胞内的表达

病毒感染后,收集正常细胞与感染细胞,分别用免疫荧光法和 Western blot 检测病毒晚期蛋白

gp60/110 在细胞中的表达。结果见图 3, HHV-6B 未感染细胞无 HHV-6B 蛋白表达, HHV-6B 感染 Molt3 细胞晚期蛋白 gp60/110 大量表达,表明 HHV-6B 能有效感染 Molt3 细胞,并在其中表达自身蛋白,以供病毒繁殖,装配病毒颗粒所用。

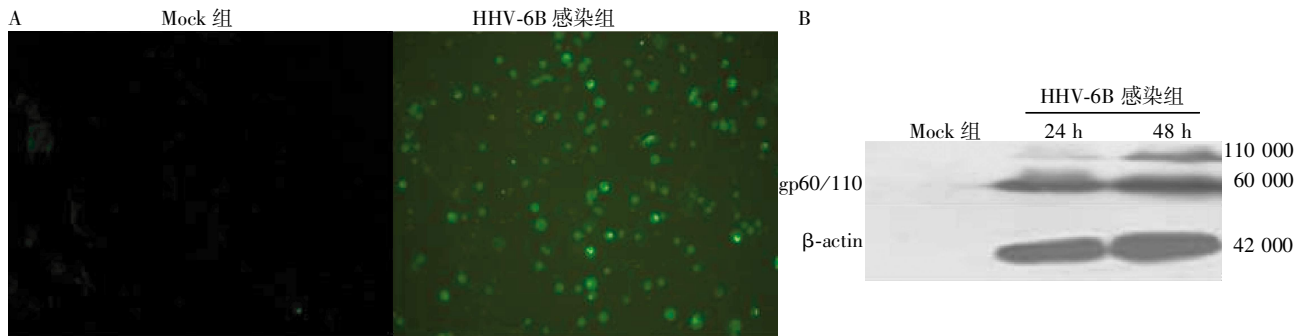
2.4 MTT 比色法测定 HHV-6B 对 Molt3 细胞增殖的影响

为了研究 HHV-6B 感染对细胞增殖的影响,对照组和 HHV-6B 感染组细胞分别进行 MTT 检测。结果表明 HHV-6B 感染明显抑制了 Molt3 细胞的增殖 ($P < 0.01, n=6$),且抑制作用具有时间依赖性(图 4)。

2.5 HHV-6B 感染对 Molt3 细胞周期进程的影响

病毒对细胞增殖的抑制作用与其对细胞周期的影响有关。为确定 HHV-6B 对细胞周期的影响,用流式细胞仪检测了细胞周期的分布情况。结果表明,病毒感染 Molt3 细胞后,细胞周期分布与对照组相比出现明显差异,G1 期细胞比率显著增多,S 期和 G2/M 期细胞减少,表明细胞周期在 G1 期阻滞,且这种阻滞具有时间依赖性(图 5A~D)。

为了进一步探究 HHV-6B 感染导致细胞 G1 期



A: 间接免疫荧光检测 Molt3 细胞内 HHV-6 晚期蛋白 gp60/110 的表达($\times 200$); B: Western blot 检测 Molt3 细胞内 HHV-6 晚期蛋白 gp60/110 的表达。

图 3 HHV-6B 蛋白在 Molt3 细胞内的表达

Figure 3 Expression of HHV-6B late protein in the infected Molt3 cells

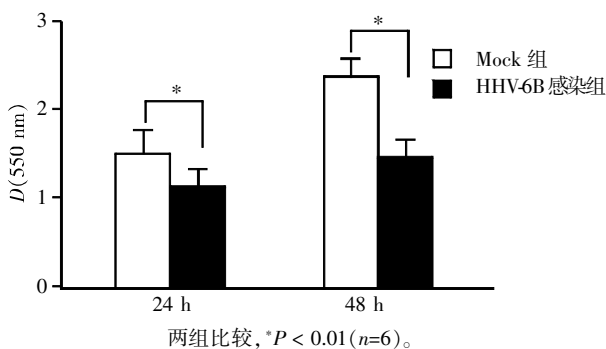
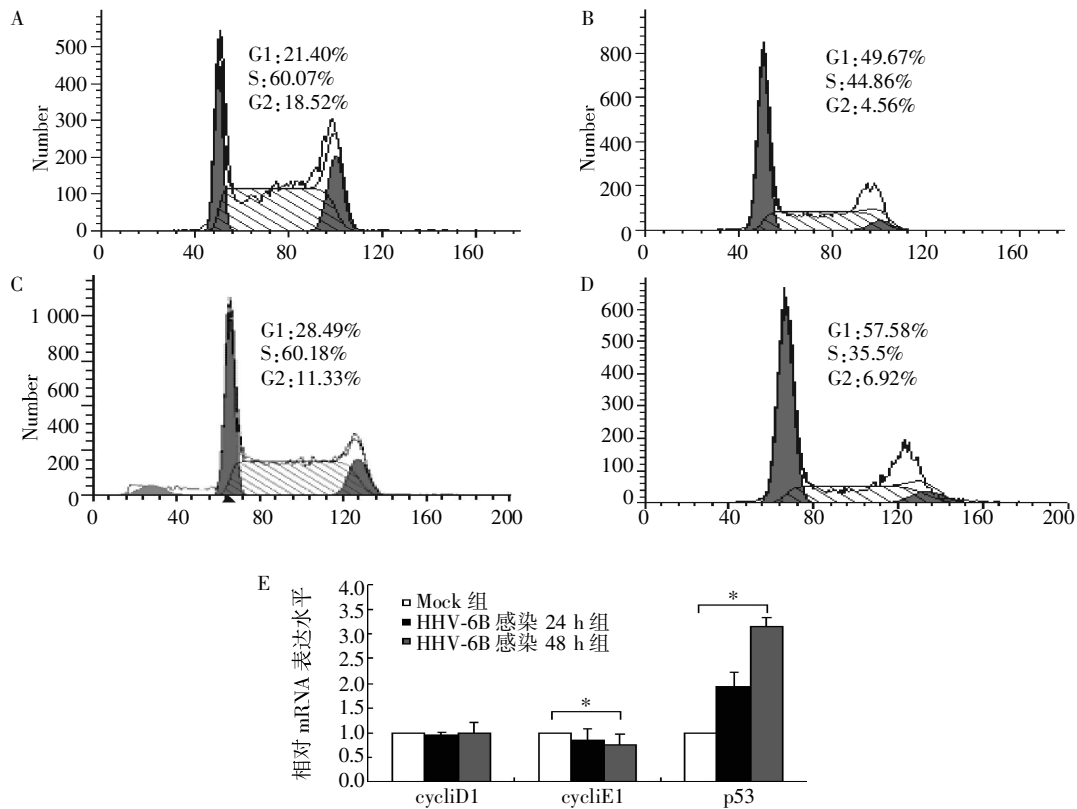


图 4 HHV-6B 感染 Molt3 对细胞增殖的影响

Figure 4 Effect of HHV-6B infection on Molt3 cells proliferation

阻滞的原因,我们提取细胞总 RNA 进行反转录,通过 real-time PCR 对 G1 期调控因子 cyclinD1、cyclinE1 和 p53 的 mRNA 进行检测(图 5E)。Cyclin D1 mRNA 水平各时间点差异不显著。CyclinE1 mRNA 在 HHV-6B 感染 24 h 开始下调,感染 48 h 后 mRNA 水平是未感染组的 0.85 倍,差异显著 ($P < 0.01, n=3$); p53 的 mRNA 水平,感染 24 h 是未感染组的 2 倍,感染 72 h 达 3 倍以上。表明 HHV-6B 感染抑制 Molt3 细胞增殖,诱导细胞周期 G1 阻滞,其作用机制可能与下调 cyclinE1 和上调 p53 表达有关。



A-D:流式细胞仪检测细胞周期。A:Mock 组 24 h;B:HHV-6 感染组 24 h;C:Mock 组 48 h;D:HHV-6 感染组 48 h;E:Real-time PCR 分析 HHV-6 感染后 cyclinD1、cyclinE1 和 p53 mRNA 的表达(两组比较, * $P < 0.01, n=3$)。

图 5 HHV-6B 感染影响细胞周期进程

Figure 5 Induction of aberrant cell cycle progression in HHV-6B infected Molt3 cells

3 讨论

HHV-6 是一种重要的免疫抑制和免疫调节病毒,可以通过抑制 IL-12 的产生^[13],影响树突状细胞的成熟^[14],改变单核细胞的表型^[15]等方式逃避免疫系统的识别,从而在体内建立长期感染。本研究发现 HHV-6B 感染可以抑制 T 淋巴细胞系 Molt3 增殖并导致细胞周期阻滞在 G1 期。HHV-6B 可能利用这种机制阻断了 HHV-6 特异性 T 细胞的克隆扩增从而损伤了宿主的抗病毒免疫反应。此外,有报道静止期细胞可以抵制效应 T 细胞的杀伤作用^[16],因此 HHV-6 也可利用细胞周期阻滞策略来逃避效应性 T 细胞的杀伤作用。

近年来的研究表明病毒入侵宿主细胞后,表达一些病毒蛋白,可以作为转录因子或通过和细胞周期相关蛋白相互作用来改变细胞周期进程^[17-19]。如人 T 细胞白血病病毒(human T-cell leukemia virus,HTLV-1) Tax 蛋白通过转录因子 NF- κ B 诱导 cyclin D2 和 Cdk6 的表达增加,使静止 T 细胞重新进入细胞周期^[20]。人

免疫缺陷病毒 Vif 蛋白通过阻碍 p53 的泛素化和核输出,提高了 p53 的稳定性和转录活性,诱导细胞 G2/M 期阻滞^[21]。本研究表明 HHV-6B 感染可导致细胞周期阻滞于 G1 期,在实验中发现紫外线灭活的病毒失去了这种阻滞效应,表明病毒蛋白的表达对于诱导细胞周期阻滞是必须的。

流感病毒通过诱导 G1 阻滞有利于病毒蛋白的表达和子代病毒的产生^[22]。传染性支气管炎病毒诱导细胞阻滞在 G2/M 也促进了病毒的复制^[23]。在本研究中 HHV-6B 感染使 Molt3 细胞周期阻滞于 G1 期,并且出现典型的细胞病变效应,病毒蛋白大量表达。表明 HHV-6B 一方面可以改变宿主细胞周期进程,创造适合病毒自身增殖的微环境;另一方面病毒增殖会使细胞结构和功能受损。寻找病毒改变细胞的关键作用环节就有可能发现阻遏病毒增殖的途径和方法,为临床有效预防和治疗 HHV-6 感染提供实验依据。

[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] Safronetz D, Humar A, Tipples GA. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2003, 112(1-2): 99-105
- [3] Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, et al. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A [J]. *J Virol*, 1999, 73 (10): 8040-8052
- [4] Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution [J]. *Virology*, 1995, 209 (1): 29-51
- [5] Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates [J]. *Virology*, 1991, 184 (2): 545-552
- [6] Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum [J]. *Lancet*, 1988, 1 (8594): 1065-1067
- [7] Clark DA. Human herpesvirus 6 [J]. *Rev Med Virol*, 2000, 10 (3): 155-173
- [8] De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18 (1): 217-245
- [9] Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features [J]. *J Med Microbiol*, 2003, 52 (Pt 1): 5-18
- [10] Yadav M, Arivananthan M, Chandrashekar A, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA and virus-encoded antigen in oral lesions [J]. *J Oral Pathol Med*, 1997, 26 (9): 393-401
- [11] Kashanchi F, Araujo J, Doniger J, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53 [J]. *Oncogene*, 1997, 14 (3): 359-367
- [12] 张春, 汪静, 顾文斌, 等. 人疱疹病毒6型感染与神经胶质瘤关系的初步研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(8): 1052-1056
- [13] Smith A, Santoro F, Di Lullo G, et al. Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6 [J]. *Blood*, 2003, 102 (8): 2877-2884
- [14] Smith AP, Paolucci C, Di Lullo G, et al. Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6 [J]. *J Virol*, 2005, 79 (5): 2807-2813
- [15] Janelle ME, Flamand L. Phenotypic alterations and survival of monocytes following infection by human herpesvirus-6 [J]. *Arch Virol*, 2006, 151 (8): 1603-1614
- [16] Nishioka WK, Welsh RM. Susceptibility to cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis is a function of the proliferative status of the target [J]. *J Exp Med*, 1994, 179 (2): 769-774
- [17] Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control [J]. *Gene*, 2002, 290 (1-2): 19-34
- [18] Nguyen DX, Westbrook TF, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest [J]. *J Virol*, 2002, 76 (2): 619-632
- [19] Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 1003-1017
- [20] Iwanaga R, Ozono E, Fujisawa J, et al. Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax [J]. *Oncogene*, 2008, 27(42): 5635-5642
- [21] Izumi T, Io K, Matsui M, et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (48): 20798-20803
- [22] He Y, Xu K, Keiner B, et al. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase [J]. *J Virol*, 2010, 84(24): 12832-12840
- [23] Dove B, Brooks G, Bicknell K, et al. Cell cycle perturbations induced by infection with the coronavirus infectious bronchitis virus and their effect on virus replication [J]. *J Virol*, 2006, 80 (8): 4147-4156

[收稿日期] 2014-06-27