

人类疱疹病毒 6A 亚型潜伏感染人神经胶质瘤细胞系 U251

顾斌^{1*}, 张国锋², 李凌云³, 周锋⁴, 冯东举⁴, 姚堃^{4*}

(¹东南大学附属中大医院神经外科, 江苏 南京 210009; ²九江市第一人民医院神经外科, 江西 九江 332000; ³南京医科大学发育遗传学系, ⁴免疫学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 采用人神经胶质瘤细胞系 U251 作为宿主建立 HHV-6A 亚型潜伏感染神经系统细胞的体外模型。方法: HHV-6A 急性感染 U251 细胞后随细胞传代, 通过观察细胞形态变化、病毒复制及检测病毒基因表达情况等确定其进入潜伏感染阶段。结果: HHV-6A 在急性感染 U251 细胞后随传代数增加, 病毒基因拷贝量逐渐降低至稳定的低水平, 而代表处于潜伏感染阶段的 HHV-6A 病毒 U94 基因的转录逐渐下降随后维持在稳定水平表达。结论: HHV-6A 在体外感染 U251 后通过传代使病毒从急性感染期逐渐转入潜伏感染期。

[关键词] 人类疱疹病毒 6A 亚型; 潜伏感染; U251

[中图分类号] R373

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)10-1339-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20151001

Human herpesvirus 6A subtype latent infection of human glioma cell line U251

Gu Bin^{1*}, Zhang Guofeng², Li Lingyun³, Zhou Feng⁴, Feng Dongju⁴, Yao Kun^{4*}

(¹Department of Neurosurgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Neurosurgery, the First People's Hospital of Jiujiang City, Jiujiang 332000; ³Department of Developmental Genetics, ⁴Department of Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the model of human herpesvirus (HHV)-6A subtype latent infection of human glioma cell line U251 *in vitro*. **Methods:** U251 cells infected by HHV-6A were cultured and passaged for model establishment. The cell morphology changing, virus replication and viral gene expression were detected to identify the latent infection stage. **Results:** With increase of HHV-6A infection of U251 cells algebra, the viral gene copy number was gradually decreased to a stable low level. The HHV-6A U94 gene, a representative of the latent stage of infection of the virus, was gradually decreased and then maintained at a stable level. **Conclusion:** HHV-6A was successfully transferred from the acute infection stage to the latent infection stage in U251 cells *in vitro*.

[Key words] human herpesvirus 6A subtype; latent infection; U251

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1339-1343]

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, 1986 年首次从淋巴细胞增生紊乱的获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)患者的外周血单核细胞中分离获得, 属于人类疱疹病毒 β 亚科, 可分为 A 和 B 两个亚型^[1]。HHV-6 原发感染婴幼儿后可在其体内建立长期的潜伏感染, 并且

可在人类整个生命周期中不断发生激活感染^[2]。其中 HHV-6A 亚型可以感染多种中枢神经系统的细胞, 所以该病毒被认为与多种神经系统疾病存在相关性, 如多发性硬化、癫痫、神经胶质瘤等^[3-5]。为了便于进一步研究 HHV-6A 亚型潜伏感染在上述神经系统疾病中的致病机制及作用, 我们采用人神经胶质瘤细胞系 U251 作为宿主建立了 HHV-6A 亚型潜伏感染神经系统细胞的体外模型。

[基金项目] 国家自然科学基金资助(813016898; 81273235; 81201520); 江苏省卫生厅科技项目(Z201409)

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: gubiiin@163.com; yaokun@njmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞

HHV-6A GS 标准株及人急性淋巴母细胞白血病细胞(HSB-2)由本实验室保存。U251 细胞购自中科院上海细胞库。

1.1.2 试剂

胎牛血清(fetal calf serum, FCS)和 DMEM、RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司。抗 HHV-6 gB 小鼠单抗、抗 GFAP 兔单抗、HRP 标记的羊抗小鼠二抗、FITC 标记的羊抗小鼠二抗、Rodanmin 标记的羊抗兔二抗均购自美国 Santa Cruz 公司, gDNA Miniprep Kit 购自美国 Biomiga 公司, 2×Taq PCR Master Mix 购自日本 TaKaRa 公司, Real-time PCR Master Mix 购自日本 Toyobo 公司, Hoechst 33258 购自上海碧云天生物技术公司。DL2000 Marker 购自北京天根生物公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒培养

调整对数生长期的 HSB-2 细胞浓度至 1×10^5 个/mL, 继而加入含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基的 6 孔板中, 在 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中培养 24 h。每个孔中接种 100 μL HHV-6A GS 病毒液。当 HSB-2 细胞病变效应(CPE)大于 80%时, 收集细胞悬液, 测定病毒滴度。

1.2.2 细胞形态学观察

根据所测定的病毒滴度, 用含 2% FCS 的 RPMI1640 培养基配置病毒悬液, 用于感染 U251 细胞, 每个细胞感染的病毒量为 10 病毒 DNA 拷贝量, 即 MOI=10, 每隔 5 d 传代, 培养至第 10 代。未经感染的 U251 细胞采用同样的方法培养, 作为对照组。细胞均在倒置显微镜下观察, 每隔 12 h 观察 1 次。

1.2.3 电镜观察

收集第 1、10 代被 HHV-6A GS 感染的 U251 细胞及对照组细胞。经过固定、脱水、包埋、切片、染色及自然干燥等程序后进行电镜观察。

1.2.4 间接免疫荧光

收集感染组第 1 代和对照组细胞各 5×10^4 个,

采用间接免疫荧光检测 HHV-6A gB 和 U251 细胞的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达情况。PBS 洗 2 遍, 细胞涂于多聚赖氨酸防脱处理的载玻片上, 4°C 下 4% 多聚甲醛固定细胞形态 30 min。PBS 洗 3 遍, 5% BSA 封闭。1:100 稀释的抗 HHV-6A gB 小鼠单抗在 37°C 孵育 1 h, PBS 洗 3 遍。1:50 稀释的抗 GFAP 兔单抗在 37°C 孵育 1 h, PBS 洗 3 遍, 加 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗小鼠二抗, 37°C 孵育 1 h, PBS 洗 3 遍。加 1:50 稀释 Rodanmin 标记的羊抗兔二抗, 37°C 孵育 1 h。PBS 洗 3 遍, 加 Hoechst33258 染料, 37°C 孵育 5 min。洗 3 遍, 加 1 滴 50% 缓冲甘油, 将盖玻片扣于载玻片上, 荧光显微镜观察、拍照。

1.2.5 Western blot

抽提蛋白, 用 BCA 法测蛋白浓度, 然后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后将凝胶转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 PVDF 膜 1 h。加入抗 HHV-6A gB 小鼠单抗, 4°C 孵育过夜。TBST 洗 3 遍, 加入 HRP 标记的羊抗小鼠二抗, 常温孵育 1 h。TBST 洗 3 遍后显影、定影、拍照。

1.2.6 PCR

搜索 GenBank 中的 HHV-6A GS 株 U27、U33、U39、U94 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件辅助设计 PCR 引物, 并结合文献相关引物的报道, 最终确定引物序列(表 1)。按照 TRIzol 法提取正常 U251 细胞及各代感染的 U251 细胞总 RNA, 逆转录 cDNA。以 cDNA 为模板, 通过 PCR 法扩增 U27、U33、U39、U94 等 HHV-6A 基因, 以 β-actin 为内参。取 5 μL PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳分析, 结果以凝胶成像系统观察电泳条带并拍照。

1.2.7 荧光定量 PCR 法检测 U251 细胞中及上清中 HHV-6 DNA 的拷贝量

收集实验组及对照组的细胞及培养上清, 用 gDNA Miniprep Kit 提取细胞及培养上清总 DNA。采用本实验室自制的 HHV-6 重组标准质粒 pMD19T-U22, 按 10 倍稀释成 10^{-7} ~ 10^{-1} , 使用 Realtime PCR Master Mix, 建立 Ct 值与质粒浓度相关的定量标准

表 1 HHV-6A GS 病毒基因引物序列

Table 1 Primer sequences of GS HHV-6A gene

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')	产物(bp)
U22	CGCTCGGAAAGGAAACATTA	AAGTGGAACTGCTTGGTGGC	194
U27	CGGGAACATAGAGAAACGAGAG	GACAAAAACAAAACATTCGCC	209
U33	GACAGCGCTGACACTGAAAA	CGGTGATCGGAACAAATTCT	174
U39	CCATACCCTCCTCCTTTTCC	CTTTCCTTATGCCACCAATCC	129
U94	GCATACGTGCACCAATCATC	ACGCTAAAGCGGAGAATAAA	167
β-actin	TGGCACCCAGCACAAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA	186

曲线。以 β -actin 为内参,设 4 个复孔,读取 Ct 值,计算 Ct 值均值。计算各样本 Ct 值,即 U22 基因 Ct 值与内参 Ct 值的差值。利用上述定量标准曲线计算出各组细胞及上清中 U22 基因拷贝量。

1.3 统计学方法

所有结果均采用 SPSS16.0 对数据进行分析,实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较均数差异的显著性检验用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U251 细胞感染 HHV-6A GS 后的形态变化

HHV-6A GS 感染 U251 细胞 5 d 后,U251 细胞形态融合,折光性降低,细胞发生明显病变。随着细胞的传代,细胞病变呈现逐渐恢复的形态,至第 5 代后,细胞形态基本恢复(图 1)。

2.2 验证 HHV-6A GS 成功感染 U251 细胞

用 Western blot 检测 HHV-6A GS 病毒株 gB 蛋白在细胞中的表达情况,结果显示感染病毒的 HSB-2 细胞(阳性对照)及感染组第 1 代 U251 细胞中 gB 蛋白表达阳性,而感染组第 10 代 U251 细胞中无 gB 蛋白表达(图 2A)。间接免疫荧光法检测发现感染组第 1 代 U251 细胞中 gB 蛋白表达阳性,而未感染组及感染组第 9 代 U251 细胞中无 gB 蛋白表达(图 2B)。电子显微镜检测到 HHV-6A GS 感染的 U251 细胞内外均有病毒颗粒(图 3)。

2.3 HHV-6A GS 感染 U251 细胞后病毒 DNA 拷贝量

为了进一步验证 HHV-6A GS 株感染 U251 细胞后是否从急性感染期进入潜伏感染期,我们检测每一代细胞及培养上清的病毒基因 U22 拷贝量。结果发现 U251 细胞感染 HHV-6A GS 后,随着细胞传代数的增加,病毒 DNA 在细胞中含量逐渐降低,直

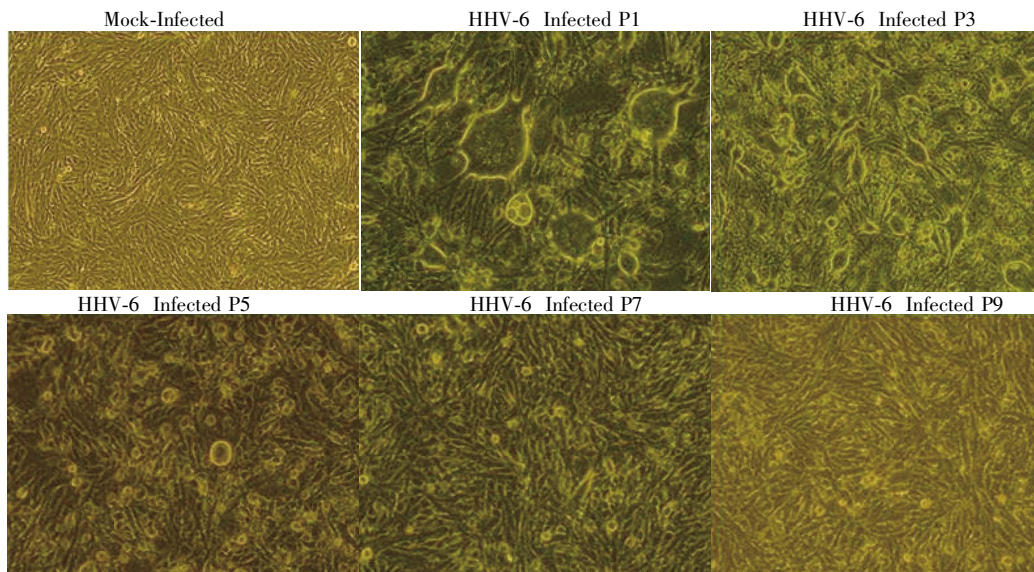
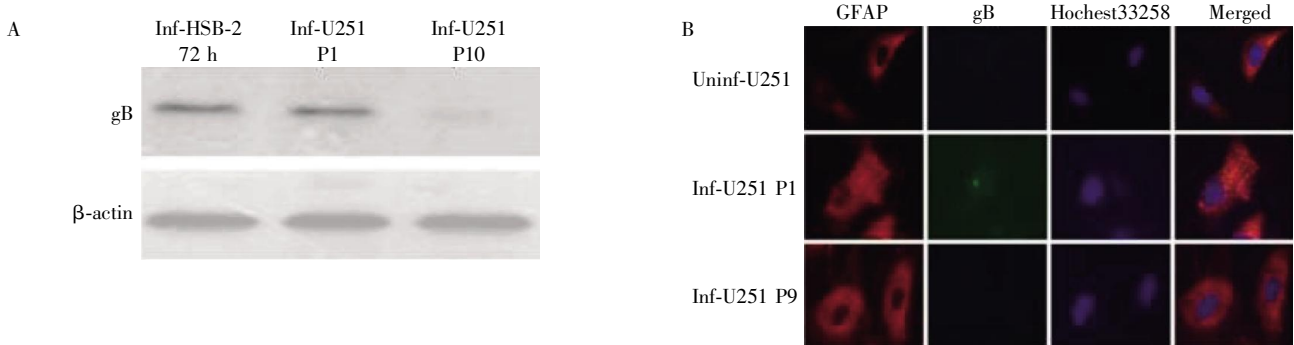


图 1 U251 细胞感染 HHV-6A GS 后的形态变化($\times 200$)

Figure 1 Morphological changes of U251 cells infected with HHV-6A GS ($\times 200$)



A: Western blot 检测; B: 间接免疫荧光法检测 HHV-6A GS 病毒株 gB 蛋白在细胞中表达定位情况($\times 400$)。

图 2 HHV-6A GS 病毒株 gB 蛋白在细胞中的表达

Figure 2 Expression of gB protein in HHV-6A GS infected U251 cells

至稳定。第 1 代感染的细胞内病毒总拷贝量约为 46/个细胞,病毒基因的拷贝数随着传代数的增加逐渐减少,到第 6 代感染的 U251 细胞时基本保持稳定水平,病毒的总拷贝量约为 0.64/个细胞(图 4),第 10 代被感染细胞中病毒的总拷贝量约为 0.54/个细胞。在上清中病毒 DNA 含量逐渐降低,第 1 代被感染细胞培养上清的病毒总拷贝量约为 9.6×10^6 /mL,第 3 代以后病毒拷贝基本检测不出。

2.4 HHV-6A GS 感染 U251 细胞后病毒 DNA 表达
为了验证从第 1 代到第 10 代被感染的 U251 细胞内是否含有 HHV-6A GS 株的全基因序列以及

表达量,我们采用 RT-PCR 法检测 4 个具有不同功能的病毒基因序列。结果发现病毒基因 U94 在第 1~10 代被感染 U251 细胞中都有不同水平表达。病毒基因 U22、U27、U33 及 U39 仅在第 1~5 代被感染的 U251 细胞中有不同水平的表达,且其表达量随代数增加而递减(图 5)。扩增后的病毒基因 U94 产物经测序及比对发现与 GenBank 中 HHV-6A U94 基因具有 99%的同源性。

3 讨论

长期以来,HHV-6 被认为与多种神经系统疾病

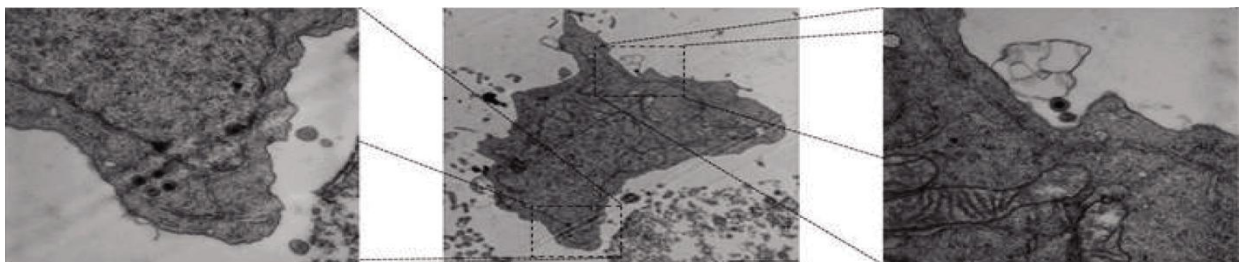


图 3 电子显微镜检测 HHV-6A GS 病毒在 U251 细胞内复制情况($\times 10\ 000, \times 50\ 000$)

Figure 3 detection of HHV-6A GS particles using electron microscope($\times 10\ 000, \times 50\ 000$)

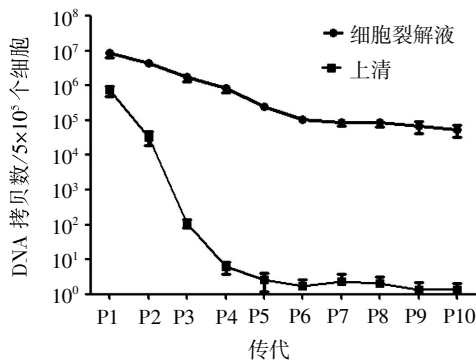


图 4 HHV-6A GS 株感染 U251 细胞后细胞及上清中的病毒基因 U22 的拷贝量

Figure 4 HHV-6A U22 gene copies in the cell lysate and cell supernatant of the infected U251 cells

的发生发展相关,如神经胶质瘤、多发性硬化、癫痫等^[3,6-8]。Crawford 等^[9-10]通过检测婴幼儿和成人神经胶质瘤组织中 HHV-6 的 DNA、早期蛋白和晚期蛋白,统计分析 HHV-6 和人神经胶质瘤有关。本课题组前期研究不仅发现 HHV-6 DNA 及蛋白在人神经胶质瘤标本中阳性率分别达 42.5% 及 32.5%,与正常脑组织相比具有统计学差异,而且在神经胶质瘤囊液中分离到了 HHV-6A 病毒^[11]。在二十多年以来,多项研究在多发性硬化患者的血清及斑块中分别检测到 HHV-6 病毒抗体及病毒 DNA^[7]。Niehusmann 等^[12]研究发现在颞叶癫痫患者中 HHV-6 DNA

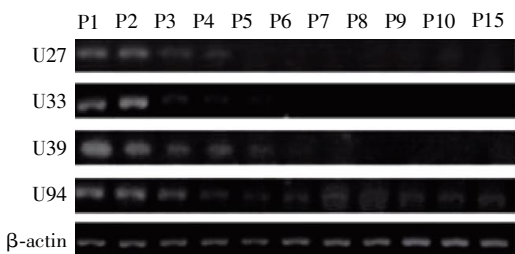


图 5 HHV-6A GS 病毒基因 U27、U33、U39 及 U94 转录水平随传代次数的变化

Figure 5 The transcriptional levels of HHV-6A gene (U27, U33, U39, U94) in different passage of HHV-6A infected U251 cells

阳性率高达 55.6%。为了进一步研究 HHV-6 在上述神经系统疾病中的具体作用机制,迫切需要体外建立 HHV-6 感染神经系统细胞的模型。一系列国内外研究已证实 HHV-6 可成功急性感染神经元、神经胶质细胞、神经干细胞及神经胶质瘤细胞等^[4]。HHV-6 进入潜伏感染阶段后其基因组整合于宿主细胞染色体被认为可能在上述这些疾病发病中发挥了重要作用^[13]。另外,HHV-6 在人体内大部分时间处于潜伏感染期,因此建立体外潜伏感染细胞模型意义重大。

本研究发现 HHV-6A GS 株在急性感染 U251 细胞后可有病毒抗原表达、病毒 DNA 复制和病毒

颗粒形成。但随急性感染后传代数的增加,病毒基因 U22 的拷贝量逐渐减低至稳定的低水平,通过 RT-PCR 检测发现 HHV-6A 病毒基因 U27、U33、U39 的转录水平逐渐下降至检测不出,而代表处于潜伏感染阶段的 HHV-6A 病毒基因 U94 的转录水平在逐渐下降后维持稳定。有研究发现 HHV-6 U94 基因编码蛋白具有结合单链 DNA 的活性,因此被认为可能参与调控病毒 DNA 复制进程^[14]。另有研究显示 HHV-6 U94 基因的 mRNA 是健康个体外周血单个核细胞中唯一被检测出的 HHV-6 基因转录本^[14]。病毒 DNA 复制进程首先是双链 DNA 解螺旋为单链,进而以单链 DNA 为模板进行复制。HHV-6 潜伏感染时期 HHV-6 U94 基因表达水平较高并结合单链 DNA,从而干扰 DNA 复制进程,起到抑制病毒复制的作用^[14]。HHV-6 U94 基因产物可以通过对病毒 DNA 复制的负性调控建立和维持 HHV-6 在宿主细胞中的潜伏感染,HHV-6 U94 基因的 mRNA 及蛋白亦可作为检测 HHV-6 是否发生潜伏感染的分子标志。

本研究结果显示 HHV-6 在体外感染 U251 后通过传代使病毒从急性感染期逐渐转入潜伏感染期。这将为研究 HHV-6A 在人神经胶质瘤等相关中枢神经系统疾病发病机制中的作用提供实验基础。

[参考文献]

[1] 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

[2] 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

[3] Caserta MT. Human herpesvirus 6 infection of the central nervous system [J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2004, 6(4): 316-321

[4] Donati D, Martinelli E, Cassiani-Ingoni R, et al. Variant-

specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes [J]. *J Virol*, 2005, 79(15): 9439-9448

[5] 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

[6] Cuomo L, Trivedi P, Cardillo MR, et al. Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue [J]. *J Med Virol*, 2001, 63(1): 45-51

[7] Leibovitch EC, Jacobson S. Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 9: 127-133

[8] Miller G. Brain cancer. A viral link to glioblastoma? [J]. *Science*, 2009, 323(5910): 30-31

[9] Crawford JR, Santi MR, Cornelison R, et al. Detection of human herpesvirus-6 in adult central nervous system tumors: predominance of early and late viral antigens in glial tumors [J]. *J Neurooncol*, 2009, 95(1): 49-60

[10] Crawford JR, Santi MR, Thorarinsdottir HK, et al. Detection of human herpesvirus-6 variants in pediatric brain tumors: association of viral antigen in low grade gliomas [J]. *J Clin Virol*, 2009, 46(1): 37-42

[11] 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

[12] Niehusmann P, Mittelstaedt T, Bien CG, et al. Presence of human herpes virus 6 DNA exclusively in temporal lobe epilepsy brain tissue of patients with history of encephalitis [J]. *Epilepsia*, 2010, 51(12): 2478-2783

[13] Hall CB, Caserta MT, Schnabel K, et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection [J]. *Pediatrics*, 2008, 122(3): 513-520

[14] Turner S, DiLuca D, Gompels U. Characterisation of a human herpesvirus 6 variant A 'amplicon' and replication modulation by U94-Rep 'latency gene' [J]. *J Virol Methods*, 2002, 105(2): 331-341

[收稿日期] 2015-07-21