

# 卡波氏肉瘤病毒 K1 蛋白在血管内皮细胞中的表达及其功能初探

程晓东, 薛敏, 郝婷婷, 秦娣, 卢春\*

(南京医科大学微生物学与免疫学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**获得稳定表达卡波氏肉瘤病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)K1 蛋白的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),探究 K1 蛋白对 HUVECs 增殖和迁移能力的影响。**方法:**从本实验室已构建好的含 KSHV K1 基因的重组真核表达质粒 pCI-neo-K1 中扩增出 K1 基因, 克隆入慢病毒载体 pHAGE-CMV-MCS-IZs-Green 中构建重组质粒 pHAGE-K1。利用脂质体将 pHAGE-K1 与包装质粒 psPAX2 和包膜质粒 pMD2.G 共转染 293T 细胞,收集培养上清经 0.45 μm 滤膜过滤即获得慢病毒悬液。病毒感染 HUVECs, Western blot 检测 K1 蛋白的表达。通过绿色荧光蛋白进行流式分选、Western blot 验证获得稳定表达 K1 蛋白的 HUVECs。通过细胞增殖实验和细胞划痕实验检测 K1 蛋白对 HUVECs 增殖和迁移能力的影响。**结果:**核酸序列测定证实,克隆的 K1 基因全长 906 bp,与 GenBank 中登记的 K1 基因 100%同源。Western blot 结果显示,含 K1 基因的重组慢病毒感染的 HUVECs 在约 46 000 处可观察到一特异性条带,与预期的 K1 蛋白大小一致。流式分选获得稳定表达 K1 蛋白的 HUVECs,其增殖能力与对照组相比显著增强( $P < 0.01$ ),细胞迁移能力亦明显增加( $P < 0.05$ )。**结论:**成功包装了含 KSHV K1 基因的重组慢病毒。KSHV K1 蛋白能够促进 HUVECs 增殖和迁移。

**[关键词]** KSHV K1 蛋白;增殖;迁移

**[中图分类号]** R329.28

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)05-586-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130505

## Expression of KSHV K1 protein in vascular endothelial cells and preliminary study on its function

Cheng Xiaodong, Xue Min, Hao Tingting, Qin Di, Lu Chun\*

(Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To obtain human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) that stably expressing KSHV K1 protein and explore the effect of K1 protein on the proliferation and migration ability of HUVECs. **Methods:**The constructed fragment of K1 gene from expression plasmid pCI-neo-K1 was cloned into the lentiviral vector pHAGE-CMV-MCS-IZs-Green. We co-transfected the recombinant plasmid pHAGE-K1, the packaging plasmid psPAX2 and the envelope plasmid pMD2.G into 293T cells. Culture media were harvested and filtered through a 0.45 μm filter to remove the cells. The expression of K1 protein in recombinant lentivirus-infected HUVECs was detected by Western blot assay. Next, HUVECs stably expressing KSHV K1 protein were obtained by flow cytometry assay (FCM) screening and verified the expression of K1 protein by Western blot assay again. Finally, the effect of K1 protein on the proliferation and migration ability of HUVECs was detected by CCK-8 assay and wound-healing assay. **Results:**Nucleic acid sequencing confirmed that cloned K1 gene was 906 bp, which was 100% homologous with K1 gene registered in GenBank. The exact band of K1 protein in recombinant lentivirus-infected HUVECs was detectable by Western blot assay. The results of CCK-8 and wound-healing assay showed that the proliferation and migration ability of HUVEC stably expressing KSHV K1 protein was significantly increased than the corresponding control ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). **Conclusion:**The recombinant lentivirus carrying KSHV K1 gene was packaged successfully, and K1 protein could promote the proliferation and migration of HUVECs.

**[Key words]** KSHV K1 protein; proliferation; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 586-592]

**[基金项目]** 教育部高等学校博士点专项科研基金新教师基金课题 (20093234120004)

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

卡波氏肉瘤病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 又称人疱疹病毒 8 型 (human herpesvirus 8, HHV-8), 是一种  $\gamma 2$  型疱疹病毒, 最初由 Chang 等<sup>[1]</sup> 从艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 相关的卡波氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma, KS) 患者 (AIDS-KS) 病损组织中发现。研究发现, KSHV 感染与 KS、原发性渗出性淋巴瘤 (primary effusion lymphoma, PEL) 和多中心 Castleman 病发生相关, 其中与 KS 的关系最为密切<sup>[2]</sup>。KS 是一种以血管细胞异常增生为特征的恶性肿瘤, 好发于皮肤, 可累及黏膜和内脏器官。KS 病灶具有典型的组织学结构, 分布大量的梭形细胞、炎性细胞及异常增生的新生血管<sup>[3]</sup>。尽管对其梭形细胞的来源有争议, 但是根据细胞表面标志特征, 多数研究者认为梭形细胞主要来自于内皮细胞<sup>[4]</sup>。

KSHV 作为 KS 的相关病原体, 其编码的多种蛋白都与致瘤作用有关。如 KSHV ORF K1 编码的 K1 蛋白<sup>[5]</sup>, ORF K2 编码的病毒白细胞介素 6 (viral interleukin-6, vIL-6)<sup>[6-7]</sup>, ORF K9 编码的病毒干扰素调节因子 1 (viral interferon regulatory factor 1, vIRF-1)<sup>[8]</sup>, ORF74 编码的病毒 G 蛋白偶联受体 (viral G protein-coupled receptor, vGPCR)<sup>[9-10]</sup> 等。其中致瘤蛋白 K1 是 KSHV 编码的 I 型跨膜糖蛋白, 分子量约 46 000, 主要在病毒裂解期表达。K1 蛋白含有 289 个氨基酸, 结构分为 N-末端信号肽胞外区 (1~228 aa)、跨膜区 (229~261 aa) 和 C-末端胞浆区 (262~289 aa)。胞浆区含有免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)<sup>[11]</sup>。目前已证明, K1 可以通过 ITAM 的 C-末端 SH2 结合基序激活 PI3K/Akt 信号通路<sup>[11]</sup>, 活化的 PI3K 激活 Akt 激酶, Akt 再活化 mTOR, 抑制凋亡前体蛋白 (forkhead in rhabdomyosarcom, FKHR), 糖原合酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3, GSK-3 $\beta$ ) 和凋亡相关分子 Bad (Bcl-2 家族成员), 促进细胞存活<sup>[12-13]</sup>。再者, K1 能够诱导血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在内皮细胞和上皮细胞中表达和分泌, 从而促进血管生成、增加肿瘤血管数和肿瘤大小<sup>[13]</sup>。K1 还能够促进碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的表达, 有利于血管形成<sup>[5, 14]</sup>。此外, K1 也可以诱导基质金属蛋白酶-9 (matrix metallo proteinase-9, MMP-9) 在内皮细胞中表达, MMP-9 可促进胞外基质降解, 使细胞与细胞、细胞与基质之间的联系减少, 导致肿瘤细胞和内皮细胞迁移<sup>[15]</sup>。

本研究通过构建含 KSHV K1 基因重组慢病毒表达载体, 包装 K1 慢病毒感染人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 通过流式分选获得稳定表达 K1 蛋白的 HUVECs, 并初步探讨 K1 蛋白对血管内皮细胞增殖和迁移能力的影响, 为进一步研究 K1 蛋白的其他功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 慢病毒载体系统、质粒和细胞

慢病毒载体系统包括慢病毒克隆质粒 pHAGE-CMV-MCS-Izs-Green、包装质粒 psPAX2 以及包膜质粒 pMD2.G, 均由武汉大学黄赞教授惠赠。含 K1 基因的重组真核表达质粒 pCI-neo-K1-Flag 为本实验室先前构建<sup>[16]</sup>。人胚肾 293T 细胞为本实验室保存, HUVECs 按照常规方法培养<sup>[17]</sup>。293T 和 HUVECs 分别用含 10% 和 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养基中加入青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100  $\mu$ g/ml) 和庆大霉素 (50  $\mu$ g/ml), 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。研究中所用的胎牛血清和 DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品。DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂

实验中所用的各种工具酶、蛋白预染 Marker 及核酸标准分子量 Marker (Lambda DNA/EcoR I + Hind III) (美国 Fermentas MBI 公司), 质粒小量提取试剂盒、凝胶纯化试剂盒 (美国 Omega 公司), 去内毒素质粒大量提取试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 质粒转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (美国 Invitrogen 公司), 鼠抗人  $\alpha$ -Tubulin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxi-dase, HRP) 标记的羊抗鼠/羊抗兔 IgG (美国 Santa Cruz 公司), 兔抗 Flag 多克隆抗体 (DYKDDDDK Tag Antibody) 及用于免疫印迹 (Western blot) 检测的增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂 (美国 Cell Signaling Technology 公司), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂 (日本同仁化学研究所)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 K1 基因的扩增

根据真核表达载体 pCI-neo-K1-Flag 中的 DNA 序列, 利用 Oligo 6 软件设计上、下游引物。上游引物序列: 5'-CGTCTAGAGCCACCATGTTCTGTATGTTGTTG-3' (实线部分为 Xba I 酶切位点、虚线部分

为 Kozak 序列); 下游引物序列: 5'-CGCGGATCC TCACTTGTCATCGTCGT-3' (实线部分为 *Bam*H I 酶切位点)。

以 pCI-neo-K1-Flag 质粒为模板, PCR 扩增 K1 基因。具体反应条件如下: 94°C 变性 5 min; 然后 94°C 1 min, 62°C 1 min, 72°C 1 min, 扩增 30 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后回收备用。

### 1.2.2 重组慢病毒转移质粒 pHAGE-K1 的构建与鉴定

用限制性内切酶 *Xba* I、*Bam*H I 双酶切 PCR 产物回收片段, 同时双酶切转移质粒 pHAGE-CMV-MCS-IZs-Green。两个酶切产物纯化后用 T4 连接酶于 16°C 条件下连接过夜。取适量连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 随机挑选氨苄青霉素抗性菌落。先用质粒小量提取试剂盒得到少量重组质粒进行 PCR 鉴定, 进一步经基因测序正确后采用去内毒素质粒大量提取试剂盒获得大量重组质粒, 该质粒命名为 pHAGE-K1。

### 1.2.3 含 K1 基因重组慢病毒包装及病毒滴度测定

利用脂质体将 pHAGE-K1、pS-PAX2 和 pMD2.G 三种质粒按照 4:3:1 的比例共同转染 293T 细胞, 转染 12 h 后更换为新鲜完全培养基。收取病毒液之前可利用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达情况。转染 48 h 后收集细胞培养上清, 暂于 4°C 保存; 同时于 293T 细胞中补加新鲜完全培养基, 24 h 后再次收集细胞培养上清。二次收集的细胞培养上清充分混合经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤, 即得到 K1 慢病毒 (简称 K1) 悬液, 分装保存于 -70°C。同时以包装空载体作为阴性对照, 即 Mock。

接种 293T 细胞于 24 孔板, 第 2 天吸去原培养液, 分别取 100  $\mu$ l 不同稀释倍数的病毒液加入到相应孔的细胞中 (每一稀释倍数设置 3 个复孔)。37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 2~3 h 弃病毒液, 加入新鲜的 DMEM 完全培养基继续培养 72 h 后于荧光显微镜下计数绿色荧光细胞。1 个发光的细胞即为 1 个转导单位 (transducing unit, TU)。按下列公式计算病毒滴度: 病毒滴度 (TU/ml) = (绿色荧光细胞数/视野)  $\times$  (视野数/孔数)  $\times$  病毒稀释倍数/病毒体积。

### 1.2.4 K1 蛋白在 HUVECs 中的表达

将 HUVECs 接种于明胶包被的 6 孔板, 培养 18 h 后, 吸弃培养基。加入一定量含 polybrene (终浓度为 8  $\mu$ g/ml) 的病毒液 (K1 或 Mock) 进行感染。病

毒感染 2~3 h 后, 吸弃病毒液, 加入完全培养基继续培养。于感染后 72 h 收取细胞, 提取细胞总蛋白进行 Western blot, 以抗 Flag 抗体为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 检测 K1 蛋白在 HUVECs 中的表达。

### 1.2.5 获得稳定表达 K1 蛋白的内皮细胞

将 HUVECs 接种于明胶包被的 T25 细胞培养瓶, 培养 24 h 后弃去培养基, 用相同 MOI 的 Mock 和 K1 病毒感染细胞。感染 2~3 h 后, 更换 1 次病毒液, 进行二次感染 (目的是获得更多的阳性细胞), 2~3 h 后更换为新鲜培养基终止感染。培养 72 h 后, 以未感染的 HUVECs 为对照, 进行 GFP 流式分选。提取分选后的部分细胞总蛋白进行 Western blot。

### 1.2.6 K1 蛋白对血管内皮细胞增殖的影响

流式分选获得稳定表达 K1 蛋白的 HUVECs (简称 K1 细胞) 及对照 Mock 细胞。将细胞接种于 6 孔板, 待细胞达到约 90% 汇合度时, 撤去完全培养基, 换为含 1% 血清的培养基饥饿处理 6 h。然后消化细胞, 按 2 000 个/孔接种于 96 孔板。用 CCK-8 试剂盒按照其推荐使用说明书检测细胞增殖情况。

### 1.2.7 细胞划痕实验

将细胞接种于 6 孔板, 待细胞汇合, 用无菌的 200  $\mu$ l 移液器滴头沿培养板中间划痕。用培养基洗去脱落的细胞, 加入新鲜培养液继续培养。分别选取 5 个视野, 于 0 h 镜下记录划痕区相对距离, 24 h 镜下观察划痕愈合情况。

## 1.3 统计学方法

所得数据采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理, 实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 统计分析采用 *t* 检验,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

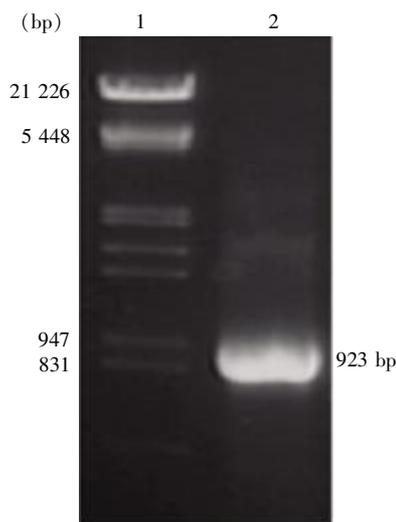
## 2 结果

### 2.1 K1 基因的 PCR 扩增

从重组真核表达质粒 pCI-neo-K1-Flag 中 PCR 扩增出目的片段 K1 基因, 全长约 923 bp (图 1), 与预期大小一致。

### 2.2 重组质粒 pHAGE-K1 的鉴定

质粒小提获得重组质粒, 经 PCR 检测扩增出目的条带。将此重组质粒进行基因测序, 结果显示插入的外源基因序列全长 906 bp。经 Blast 比对, 结果表明该序列与 GenBank 中已登记的 KSHV K1 基因序列一致, 引入的 Flag 序列正确无误。提示 K1 基因已被成功克隆到 pHAGE-CMV-MCS-IZsGreen 重组载体中。



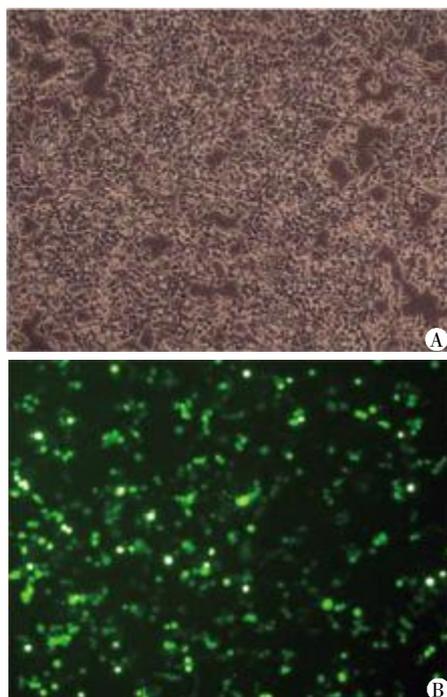
1:Marker;2:扩增的K1基因片段。

图 1 pCI-neo-K1-Flag 质粒中 K1 基因的扩增

Figure 1 PCR amplification of K1 gene from pCI-neo-K1-Flag plasmid

### 2.3 慢病毒的包装及滴度测定

pHAGE-K1、psPAX2 和 pMD2.G 三质粒共转染 293T 细胞,48 h 在荧光显微镜下可以观察到 GFP 的表达(图 2)。用梯度稀释法进行病毒滴度测定,经荧光计数法测得重组慢病毒 K1 的病毒滴度约  $3 \times 10^6$  TU/ml,对照 Mock 病毒滴度约  $4 \times 10^6$  TU/ml。



A:白光视野;B:荧光视野

图 2 三质粒共转染 293T 细胞后 48 h GFP 的表达

Figure 2 The expression of GFP in 293T cells at 48 h after three plasmids co-transfection

### 2.4 K1 蛋白在 HUVECs 中的表达

K1 慢病毒感染 HUVECs,72 h 后提取细胞总蛋白进行 Western blot,在约 46 000 处出现了 1 条特异性的条带,与预期 K1-Flag 蛋白大小一致(图 3)。提示含 KSHV K1 基因的重组慢病毒包装正确,且 K1 慢病毒可有效感染 HUVECs。

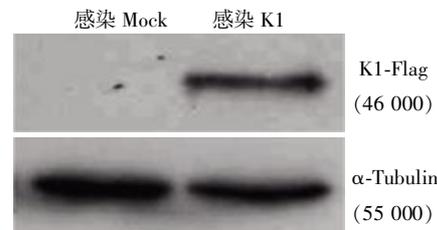


图 3 K1 蛋白在感染后的 HUVECs 中的表达

Figure 3 The expression of K1 protein in HUVECs after infected

### 2.5 稳定表达 K1 蛋白血管内皮细胞的获得

HUVECs 经 K1 慢病毒感染,再经过 GFP 流式分选,获得了 GFP 阳性率近 100% 的细胞(图 4A),即 K1 细胞。以经 Mock 感染、GFP 流式分选获得的 Mock 细胞(图 4A)作为对照,提取两细胞总蛋白进行 Western blot,结果显示,K1 细胞在约 46 000 处出现了 K1-Flag 对应的特征性条带(图 4B),提示 K1 蛋白在流式分选后所获得的 K1 细胞中稳定表达。

### 2.6 K1 蛋白促进血管内皮细胞增殖

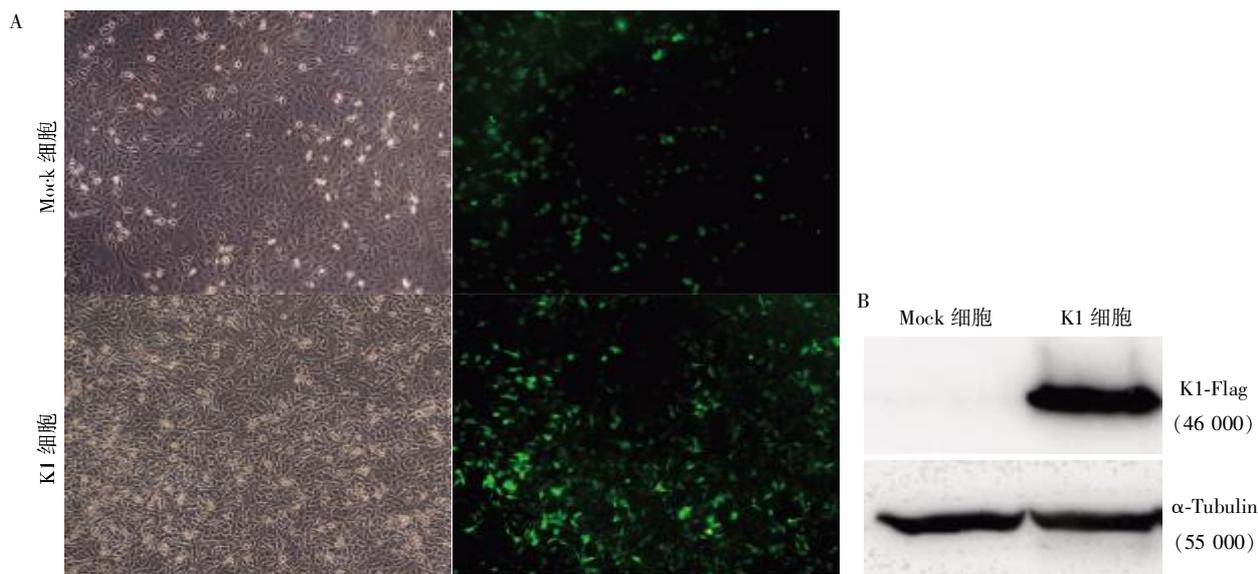
将 K1 细胞和 Mock 细胞按 2 000 个/孔接种于 96 孔板。分别于接种后 24、48、72、96 h,用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况。结果表明,从 48 h 起,K1 细胞增殖速度显著快于 Mock 细胞,初步提示 K1 蛋白具有促进血管内皮细胞增殖的能力(图 5)。

### 2.7 K1 蛋白促进血管内皮细胞迁移

细胞划痕实验中,取划痕后 24 h 的结果进行统计,以迁移到致伤区细胞所占的面积占原划痕面积的百分比为纵坐标进行作图(即以 0 h 的划痕结果对 24 h 的细胞迁移情况进行标准化)。结果表明,K1 细胞迁移能力强于 Mock 细胞(图 6)。提示 K1 蛋白具有促进血管内皮细胞迁移的能力。

## 3 讨论

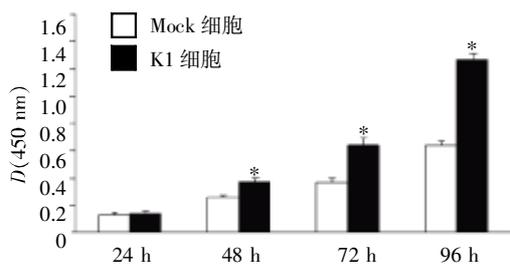
KSHV 作为一种致癌病毒,其基因组编码的多种蛋白都与肿瘤形成有关,如裂解期蛋白 K1、vIL-6、vGPCR、vIRF-1 等,潜伏期蛋白潜伏相关核抗原(latency associated nuclear antigen,LANA)、病毒 FLICE 抑制蛋白(viral FLICE inhibitory protein,vFLIP)等<sup>[4]</sup>。目前研究表明,K1 蛋白可以激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路,促使细胞存活<sup>[13]</sup>;能够诱导 VEGF 在内皮



A: 荧光显微镜观察 GFP 在流式分选获得的 Mock 细胞和 K1 细胞中的表达; B: Western blot 检测 K1 蛋白在流式分选后的 K1 细胞中的表达。

图 4 GFP 和 K1 蛋白在流式分选后的 K1 细胞中的表达

Figure 4 The expression of GFP and K1 protein in K1 cells screened by FCM

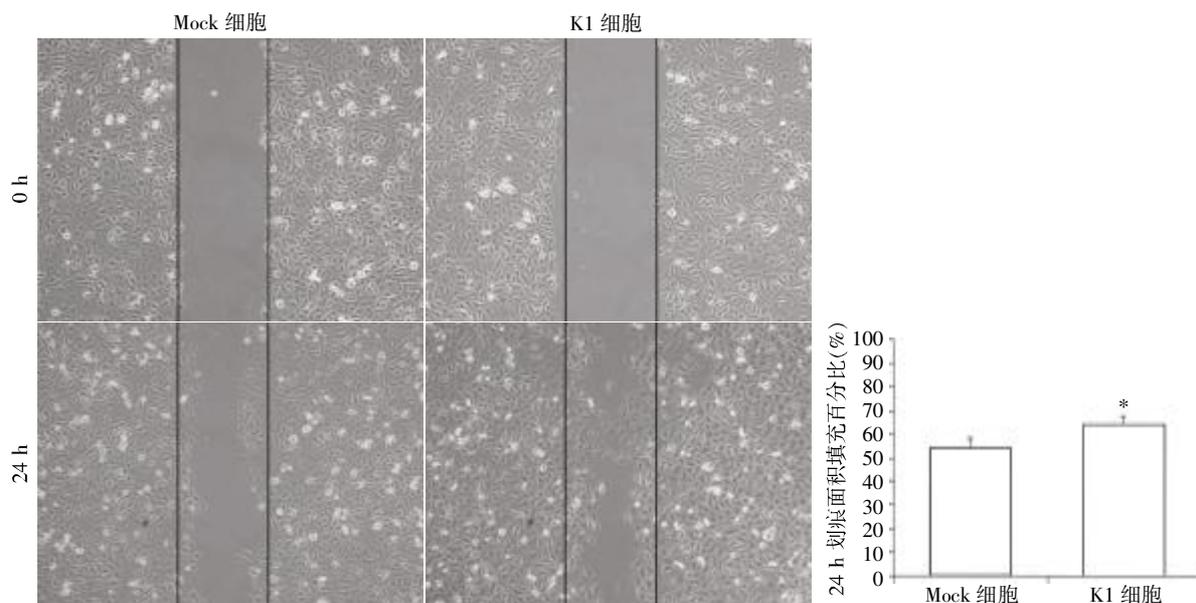


与 Mock 细胞组相比, \* $P < 0.01$ ,  $n = 5$ 。

图 5 K1 促进血管内皮细胞增殖

Figure 5 K1 promoted the proliferation of HUVECs

细胞及上皮细胞中表达和分泌, 促进血管生成和肿瘤形成。K1 虽为 KSHV 裂解期蛋白, 但同时在 KSHV 潜伏感染的细胞中也可以检测到表达<sup>[18]</sup>。有研究显示, 在 KSHV 潜伏感染的 HUVECs 中, Rac1 的活性明显上调, 导致内皮细胞连接异常, 血管通透性增加; 而 KSHV K1 蛋白可以活化 Rac1<sup>[19]</sup>。在 KS 肿瘤中, Rac1 也是上调的, 也存在肿瘤组织血管通透性增加的现象。以上实验结果表明, K1 可能在 KSHV 致癌过程中发挥着一定的作用。



与 Mock 细胞相比, \* $P = 0.034$ ,  $n = 5$ 。

图 6 K1 促进血管内皮细胞迁移

Figure 6 K1 promoted the migration of HUVECs

KS 是一种血管增生性的肿瘤,在 KS 组织中含有大量梭形细胞,目前研究认为梭形细胞的前体细胞主要为血管内皮细胞。而在 KS 的病损组织中也检测到 K1 蛋白的表达。有研究表明,K1 可诱导原代 HUVECs 永生化或延长其寿命,促进 VEGF 分泌,促进血管形成和肿瘤生长<sup>[13]</sup>。因此,获得稳定表达 K1 蛋白的血管内皮细胞,对进一步研究 K1 蛋白的生物学功能,探索 K1 在 KS 形成中的作用以及相关的分子机制具有重要意义。考虑到普通转染不能够获得持续稳定表达 K1 蛋白的血管内皮细胞,本试验采用慢病毒表达载体将 K1 基因引入血管内皮细胞并获得持续性的稳定表达。HUVECs 经 K1 慢病毒感染,GFP 流式分选,Western blot 验证获得了稳定表达 K1 蛋白的 HUVECs。

CCK-8 细胞增殖实验和细胞划痕实验表明,稳定表达 K1 蛋白的 HUVECs 相比其对照细胞具有更强的增殖和迁移能力,这表明 K1 具有促进血管内皮细胞增殖和迁移的能力。其中,在 CCK-8 细胞增殖实验中,K1 细胞在 48 h 即已表现出明显的增殖优势,并在 96 h 时表现得尤为突出。K1 蛋白有可能通过活化 PI3K-Akt-mTOR 信号通路,增加 HUVECs 中 VEGF 和 bFGF 的表达和分泌,并活化相关的信号通路来促进 HUVECs 的增殖。细胞划痕实验表明 K1 蛋白具有促进 HUVECs 迁移的能力。可能原因之一是 K1 蛋白通过诱导 MMP-9 的表达,促进胞外基质降解,使细胞与细胞以及细胞与基质之间的联系减少,来促进 HUVECs 的迁移。另外 K1 可增加 VEGF 的表达和分泌,并活化相关的信号通路,有可能对此进程产生影响。K1 蛋白的促血管内皮细胞增殖和迁移的功能,可能在 KSHV 感染机体后的致瘤过程中发挥着一定的作用。

尽管 KSHV 是 KS 的病原体,但 KSHV 导致 KS 发生往往还需要其他因子的参与,HIV-1 就是一个重要协同因子。在 AIDS 中,约 30% 的患者同时患 KS,即 AIDS-KS。又因 HIV-1 并不感染 KSHV 所感染的 HUVECs 和 B 淋巴细胞,所以 HIV-1 感染释放的细胞因子及 HIV-1 编码的可溶性蛋白如 Tat、Nef 和 Vpr 有可能影响 KSHV 的潜伏/复制和致瘤。本课题组前期的研究已显示,HIV-1 Tat 和 Vpr 蛋白可以调节 KSHV 的潜伏和复制进而促进 KS 的发生、发展<sup>[20-21]</sup>。本研究中发现,KSHV K1 蛋白能够诱导血管内皮细胞增殖和迁移,HIV-1 的相关蛋白对 K1 蛋白的这种作用是否具有影响值得进一步探索。

总之,本研究成功获得了稳定表达 KSHV K1

蛋白的 HUVECs,且初步证实了 K1 具有促进内皮细胞增殖和迁移的作用,这为今后进一步研究 KSHV K1 蛋白的其他功能及其与 HIV-1 诱生细胞因子和相关蛋白之间的关系奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma [J]. *Science*, 1994, 266 (5192): 1865 - 1869
- [2] Katano H, Sata T. Human herpesvirus 8 virology, epidemiology and related diseases [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2000, 53 (4): 137-155
- [3] Ganem D. KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma [J]. *Annu Rev Pathol*, 2006 (1), 1: 273 - 296
- [4] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10 (10): 707-719
- [5] Prakash O, Tang ZY, Peng X, et al. Tumorigenesis and aberrant signaling in transgenic mice expressing the human herpesvirus-8 K1 gene [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(12): 926-935
- [6] Sakakibara S, Tosato G. Viral interleukin-6: role in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; associated malignancies [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31 (11): 791-801
- [7] 朱小飞, 秦 娣, 卢 春. 含 KSHV vIL-6 基因重组分泌型表达载体的构建及其分泌蛋白对内皮细胞增殖和血管生成能力影响的初探 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(3): 283-288
- [8] Gao SJ, Boshoff C, Jayachandra S, et al. KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway [J]. *Oncogene*, 1997, 15(16): 1979-1985
- [9] Bais C, Santomasso B, Coso O, et al. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator [J]. *Nature*, 1998, 391(6662): 86-89
- [10] Guo HG, Sadowska M, Reid W, et al. Kaposi's sarcoma-like tumors in a human herpesvirus 8 ORF74 transgenic mouse [J]. *J Virol*, 2003, 77(4): 2631-2639
- [11] Tomlinson CC, Damania B. Critical role for endocytosis in the regulation of signaling by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 protein [J]. *J Virol*, 2008, 82(13): 6514-6523
- [12] Wang L, Wakisaka N, Tomlinson CC, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) K1 protein induces expression of angiogenic and invasion factors

[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8):2774-2781

[13] Wang L, Dittmer DP, Tomlinson CC, et al. Immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7):3658-3666

[14] Bala K, Bosco R, Gramolelli S, et al. Kaposi's Sarcoma herpesvirus K15 protein contributes to virus-induced angiogenesis by recruiting PLCgamma1 and activating NFAT1-dependent RCAN1 Expression [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(9):e1002927

[15] Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(1):103-120

[16] 闵治超, 王子盾, 糜远源, 等. 人类疱疹病毒 8 型 K1 基因的克隆及其在内皮细胞和前列腺癌细胞中的表达 [J]. *江苏医药*, 2011, 37(1):4-7

[17] 姜 华, 姜玉姬. 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(9):113-114

[18] Chandriani S, Ganem D. Array-based transcript profiling and limiting-dilution reverse transcription-PCR analysis identify additional latent genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Virol*, 2010, 84 (11):5565-5573

[19] Guilluy C, Zhang Z, Bhende PM, et al. Latent KSHV infection increases the vascular permeability of human endothelial cells [J]. *Blood*, 2011, 118(19):5344-5354

[20] Zeng Y, Zhang X, Huang Z, et al. Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus · role of JAK/STAT signaling [J]. *J Virol*, 2007, 81 (5):2401-2417

[21] 贾雪梅, 王 平, 秦 娣, 等. 重组慢病毒表达载体介导 HIV-1 Vpr 蛋白调控 KSHV 潜伏感染的初探 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 22(12):1097-1104

[收稿日期] 2012-10-30

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
 审理情况。