

## HCMV 在基因转染细胞中复制的研究\*

严 华 申厚凤 张 跃 耿建平

(扬州大学医学院 扬州 225001)

**摘 要** 用人喉上皮细胞癌细胞系(HEP-2)的 DNA 转染人胚肺细胞(HEL),得到了 5 株基因转染细胞(GTC),命名为 A5、B3、G8、D3 和 H3。这些 GTC 的染色体数在 HEL 的染色体数与两个亲代细胞(HEP-2 和 HEL)染色体的和数之间。感染人巨细胞病毒 AD169 株后 4d, D3 比 A5、B3、G8 和 H3 有更多的荧光阳性细胞和更高的病毒滴度。在 D3 中 HCMV 复制随感染剂量的增大而增速。不同代数的 D3 对 HCMV 具有相似的敏感性, HCMV 感染传至 100 代的 D3,电镜证实仍可象原代 D3 复制大量的 HCMV。永生性的 D3 可以用作分析调控 HCMV 复制的宿主细胞因子、分离培养 HCMV 等的工具。

**关键词** 人巨细胞病毒, DNA 转染, 人胚肺细胞, 人喉上皮细胞癌细胞

**分类号** Q939[.93]

人巨细胞病毒(HCMV)是疱疹病毒科中的重要病毒。人对 HCMV 普遍易感,有两种人感染了 HCMV 具有较高危害性:一是孕妇的宫内感染可致胎儿畸形;二是免疫功能低下者,如免疫抑制剂治疗者、肿瘤患者和艾滋病患者常常发生致死性的 HCMV 感染<sup>[1,2]</sup>。目前医学界很重视 HCMV 的研究。表皮细胞和肿瘤细胞对 HCMV 是不敏感的,原因是这些细胞产生的抑制因子抑制了 HCMV 的复制。据报道:用 5 碘 2 脱氧尿嘧啶处理这些细胞可使其对 HCMV 敏感<sup>[3]</sup>。一般认为<sup>[2,4]</sup>:HEL 是对 HCMV 最敏感的细胞。然而,很少有人知道其机制。由于 HEL 不能无限传代,这给组织培养带来很大不便。本文报道从 HEP-2 抽提 DNA 转染 HEL 获得了 5 株 GTC,其中 D3 已传至 100 代,染色体数稳定在 90~100,表明已永生化,而且 HCMV 能在此细胞内良好复制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 GTC 的制备<sup>[5]</sup>

**1.1.1 DNA 的制备:**胰酶消化 HEP-2(本室液氮冻存)后用无钙镁 PBS 洗 3 次。取  $10^8$  细胞悬浮于 2ml pH7.9 TE 缓冲液(0.1mol/L Tris, 0.1mol/L NaCl, 0.05mol/L EDTA)中。另加终浓度为 0.02% Triton-X, 0.5% SDS。用前再加 100 $\mu$ g 蛋白酶 K(E. Merck) 37 $^{\circ}$ C 培养 2h。用 1/2 体积重蒸酚和 1/2 体积氯仿-异戊醇(体积比为 24:1)抽提,接着用等体积的氯仿-异戊醇再抽提 1 次。加 1/10 体积 5mol/L NaCl 和 2.5 倍体积冷乙醇,沉淀的 DNA 溶

\* 江苏省卫生厅、计划生育委员会资助课题。

收稿日期: 1997-09-01

于 1ml 1:10 稀释的 TE 中,并对该液透析过夜。加核糖核酸酶(华美生物工程公司),使终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$  45min。加蛋白酶 K 培养 60min。依上法再抽提 1 次,溶于 TE 中。紫外分光光度计测定 DNA 含量和蛋白质/核酸的比值。转染前乙醇沉淀 DNA,然后悬浮于溶液 A(19ml 无菌水; 5ml 盐溶液: 1.37mol/L NaCl, 0.05mol/L KCl, 0.007mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.06mol/L 葡萄糖; 1ml HEPES 缓冲液 pH7.0)中。

**1.1.2 DNA 沉淀物的制备:** 20 $\mu\text{g}$  DNA 加 75 $\mu\text{l}$  溶液 A, 混匀后加等体积的溶液 B(1ml 2mol/L  $\text{CaCl}_2$ , 3ml 双蒸馏水), 置室温 60min, 以形成沉淀。

**1.1.3 DNA 转染:** 将胰酶消化已传代 15 次的 HEL(本室常规方法制备), 用无钙镁 PBS 洗 3 次, 悬浮于无血清的 MEM 培养液中 ( $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ ), 加 20 $\mu\text{g}$  DNA 共沉淀物, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 2h, 离心去上清液, 沉淀悬浮于 0.5ml 35% PEG 中 2min, 加 5ml 含 10% 小牛血清的 MEM 培养液, 离心, 将沉淀细胞悬浮于 20ml 上述培养液中, 加至 2 块 96 孔培养板内。

**1.1.4 GTC 克隆:** GTC 出现后按有限稀释法作单克隆细胞培养。

## 1.2 GTC 的核型分析<sup>[4]</sup>

GTC 用含 10% 小牛血清的 MEM 培养基培养, 成单层后加秋水仙素, 使终浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 维持 1h, 倒去培养液, 胰酶消化细胞, 离心, 沉淀细胞用 0.075mol/L KCl 在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴箱内处理 12min, 丙酮固定, 姬母萨染液染色。

## 1.3 免疫荧光试验<sup>[1]</sup>

以 0.2ml (10PFU/ml) HCMV 悬液感染 24 孔板上的单层细胞, 33 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 4d, 倒去维持液, 用 PBS 洗 3 次, 丙酮固定 10min, 洗 3 次, 每孔加特异性单克隆抗体(自制) 0.5ml, 37 $^{\circ}\text{C}$  1h 后倒去, 洗 3 次, 每孔加入抗鼠 IgG 荧光抗体(Sigma 公司产品 1:20 稀释) 0.2ml, 洗 3 次, 取出 24 孔板内的盖玻片, 加甘油封片后镜检。

## 1.4 空斑试验<sup>[4]</sup>

将 0.2ml (10PFU/ml) HCMV 悬液接种 24 孔板上的单层细胞(37 $^{\circ}\text{C}$  吸附 2h), 弃去病毒悬液, 用维持液轻洗 2 次, 再加入 1.2% 甲基纤维素 MEM 覆盖液, 33 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养 4d, 显微镜下观察空斑形成的情况, 待空斑大小合适时弃覆盖液, 用 PBS 轻洗 3 次, 中性红染 5min, PBS 洗后低倍镜下计数蚀斑形成单位(PFU)。

## 1.5 HCMV 的浓缩、纯化和电镜检查<sup>[6]</sup>

HCMV 感染传至 100 代的 D3, 待出现 +++ ~++++ 的细胞病变时收获上清液, 加聚乙二醇(MW6 000), 使终浓度为 8%, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 10 000r/min 60min, 沉淀物以 STE 缓冲液混悬。将上述浓缩的 HCMV 液轻铺在预平衡的 20%~60% 蔗糖不连续密度梯度液上, 50 000g 离心 2h(Beckman LT-55 型超速离心机, SW28 转子), 在 50% 蔗糖梯度液中出现一狭窄乳白色带。收集该带, 用 1% 的磷钨酸负染, 透射电镜镜检。

# 2 结果

## 2.1 GTC 核型

HEL 为正常人体细胞, 染色体数为 46 条。HEP-2 染色体数为 72~74 条。GTC 染色体数为 90~100 条(图 1、图 2 和表 1)。

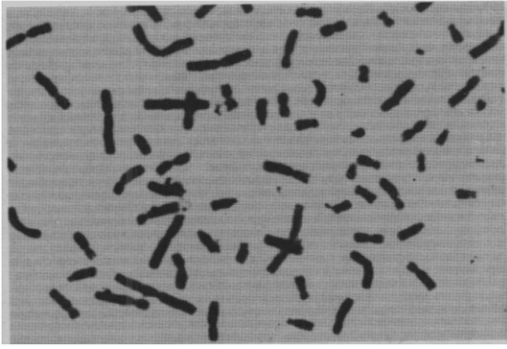


图1 HEP-2细胞染色体数(1000×)

Fig. 1 Chromosomes of HEP-2 cells

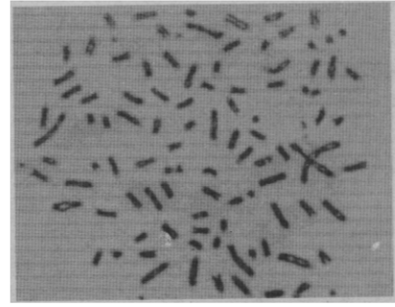


图2 D3细胞染色体数(640×)

Fig. 2 Chromosomes of D3 cells

表1 HEL、HEP-2和5GTC的特征

Table 1 Characteristics of HEL, HEP-2 and 5 GTC

细胞 Cell	染色体数目 Chromosome number		HCMV荧光阳性细胞 Positive cell to HCMV	病毒滴度 Virus titer
	变异 Variation	典型 Modle	(%)	(PFU/ml)×10 <sup>3</sup>
	HEL	44~46	46	78
HEP-2	72~74	73	0	0
A5	90~99	96	21	2.01±0.05
B3	94~99	97	42	3.80±0.11
D3	98~100	96	58	6.11±0.60
G8	92~100	97	51	5.02±0.51
H3	97~100	97	48	4.20±0.20

## 2.2 GTC的永生化

转染后第3周在倒置显微镜下可见成堆的GTC,细胞数量迅速增加。较HEL(未转化细胞)体积稍大,纤维丝稍短,且略显大小不一,仍保持纤维细胞形态(图3非病变部位)。HEL与GTC(D3)同时传代,HEL传至第35代分裂速度减慢,不能成单层,最终死亡。而D3传至第100代长势仍然良好,染色体数稳定在90~100条,表明已永生化。

## 2.3 GTC对HCMV的敏感性

HEP-2对HCMV不敏感。HEL和GTC感染了HCMV后均能引起明显的细胞病变:细胞肿胀圆缩,折光性强,核内包涵体突出,图3为D3感染了HCMV后第4天镜下所见到的细胞病变。免疫荧光试验、空斑试验的结果表明:对HCMV的敏感性HEL较D3高(表1)。传至第100代的D3与第1、10、50代的D3对HCMV的敏感性无显著差异,表明D3对HCMV敏感性与D3的传代次数无多大关系。HCMV在D3的增殖速度与感染剂量密切相关(表3)。

## 2.4 透射电镜下HCMV的形态

透射电镜照片(图4)显示出HCMV颗粒的外周是一层松散的脂蛋白包膜,中间部分为核衣壳,也可见到无包膜的裸露病毒。

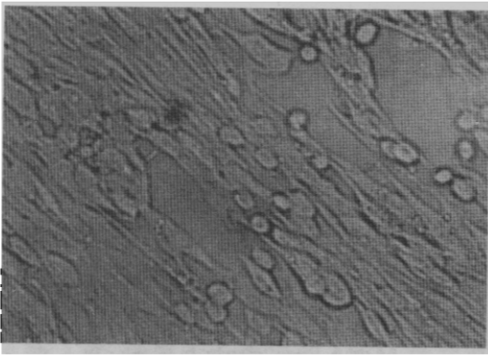


图3 HCMV 在 D3 上引起的细胞病变 (240 ×)

Fig. 3 CPE of HCMV on D3 cells

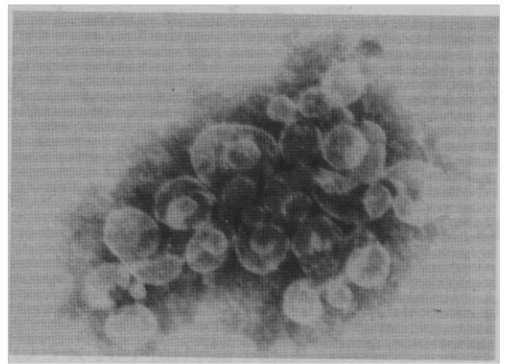


图4 HCMV 在电镜下的形态 (1 000 000 ×)

Fig. 4 Form of electron microscopic HCMV

表2 不同代数的D3对HCMV的易感性

Table 2 Susceptibility of different passage D3 to HCMV

D3代数		HCMV荧光阳性细胞 (%)	病毒滴度
D3 Passage		Positive cell to HCMV	Virus titer (PFU/ml) × 10 <sup>3</sup>
第1代	First	58	6.11 ± 0.60
第10代	10th	58	8.01 ± 1.02
第50代	50th	56	5.55 ± 0.42
第100代	100th	59	6.23 ± 0.58

表3 不同剂量的HCMV感染传代D3的结果\*

Table 3 Effect of infected passage D3 with different dose of HCMV

病毒量 Infection dose (PFU/ml)	病毒滴度		
	3d	4d	5d
0.1	0.02 ± 0.01	0.50 ± 0.88	1.05 ± 0.23
1	0.11 ± 0.02	1.88 ± 0.75	2.01 ± 0.30
10	2.90 ± 0.50	30.22 ± 3.87	28.03 ± 0.80
100	36.04 ± 2.21	360.21 ± 28.02	180.05 ± 1.08

\* 每个稀释度4孔, 每孔0.2ml病毒悬液。  
4well/ dilution, 0.2ml/ well.

### 3 讨论

核型分析的结果证实: GTC 具有两个亲代细胞 (HEP-2、HEL) 的绝大部分染色体。HEP-2 与 HEL 的染色体数分别为 73 条和 46 条, 总数为 119 条, GTC 的染色体数为 90~100 条, 不足 119 条, 这是因为在转染过程中有丧失染色体的倾向, 这正象杂交细胞也有丧失染色体的倾向一样, 但建系后再传几代就可稳定下来<sup>[4]</sup>。本试验建立的 GTC 传至 100 代染色体数仍然稳定在 90~100 条, 表明已永生代。

HEP-2对 HCMV 是非容纳性细胞,原因是该细胞的遗传物质编码的抑制因子抑制了 HCMV 的复制<sup>[1]</sup>。此遗传物质转移到 HEL 内当然也能编码这类抑制因子,但 HEL 对 HCMV 是容纳性细胞,能合成 HCMV 复制所必需的细胞因子,抑制因子被这些细胞因子稀释,对 HCMV 复制的抑制作用大为减弱。因此,GTC 既不象 HEP-2对 HCMV 不敏感,又不象 HEL 对 HCMV 高度敏感。但由于 GTC 能无限传代,具有 HEL 无法取代的优越性,可用作分析调控 HCMV 复制的宿主细胞因子、分离 HCMV、制备 HCMV 抗原的工具。

本试验制备的 5 株 GTC 之间对 HCMV 的敏感性有差异,其机理不很清楚,可能与这些 GTC 的核型数量、质量差异有关。哪一号染色体在抑制 HCMV 复制方面起关键作用?去抑制后能否提高 GTC 对 HCMV 的敏感性? GTC 对其他病毒,尤其是那些在通常的传代细胞、人二倍体细胞内难以增殖的病毒(如乙型肝炎病毒、EB 病毒、人类嗜 B 细胞病毒等)是否敏感? 这些问题有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 严 华, 戴 斌. 单克隆抗体通讯, 1994, 10(3): 27~30.  
 [2] Koopmans M, Sanches-martinez D, Patton T *et al.* *J Med Virol*, 1995, 46(4): 321~330.  
 [3] St Jeors, Rapp F. *J Virol*, 1973, 11: 986~990.  
 [4] Tsutsui Y, Sonta S, Kashiwat A *et al.* *Arch Virol*, 1987, 95: 29~40.  
 [5] 邬淑云, 温淦昇. 单克隆抗体通讯, 1994, 10(3): 22~26.  
 [6] 季明春, 周璐玺, 姚 堃. 中国病毒学, 1991, 6(3): 207~213.

## STUDY ON HCMV REPLICATION IN GENE TRANSTECFED CELLS

Yan Hua      Shen Houfeng      Zhang Yue      Geng Jianping

(School of Medicine, University of Yangzhou, Yangzhou 225001)

**Abstract** Five gene transfected cells (GTC: A5, B3, D3, G8 and H3) were generated by DNA (from HEP-2) transfer (into HEL). Chromosome number of the transfectants fell between that of HEL and the combined chromosome number of the two cell lines. D3 showed more positive fluorescence cells than A5, B3, G8 and H3 by 4d after infection of HCMV. As HCMV infection dose was increased from 0.1 to 100 PFU/ml, significant increase of viral production was observed. The similar susceptibility to HCMV was shown in different passages of D3. The immortal D3 may provide a tool to analyze host cell factors controlling the transcription and replication of HCMV.

**Key words** HCMV, DNA transfer, HEL, HEP-2