

单纯疱疹病毒 II 型潜伏、激活细胞模型建立

孙朝晖¹, 杨慧兰^{1*}, 石玉玲¹, 危敏², 冼江¹, 胡文魁¹

(¹广州军区广州总医院, 广州 510010)

(²广州南方医科大学基因工程研究所, 广州 510515)

摘要:【目的】建立单纯疱疹病毒 II 型(HSV-2)潜伏感染人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 及激活的细胞模型。【方法】分别加入 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 $\mu\text{mol/L}$ 的阿昔洛韦(ACV), 观察对 SH-SY5Y 细胞生物性状的影响; 在 ACV 存在的情况下, 分别将含有 0.1、1、10、100 MOI 的病毒液接种 SH-SY5Y 细胞, 运用相差显微镜观察病毒对细胞的影响, 确定潜伏的建立; 分别用 41 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 、43 $^{\circ}\text{C}$ 、44 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 加热 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h, 观察加热时间及温度诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中激发的最适条件; 加入 25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 福斯高林(Forskolin)诱导病毒在细胞中激活, 探讨诱导的最佳浓度; 对 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的潜伏及激发进行验证并测序; 运用相差显微镜观察病毒激活后细胞形态的变化。【结果】60 $\mu\text{mol/L}$ ACV 的存在最适合 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中建立潜伏状态; 1-10 MOI 的感染量均能取得较好的病毒潜伏及激发效果; 通过观察, 病毒在 SH-SY5Y 细胞中最长可潜伏 14 d; 43 $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 h 及 75 $\mu\text{mol/L}$ Forskolin 均为诱导病毒潜伏激发的最佳条件; 相差显微镜观察病毒激发后细胞病变, 从 24 h 到 72 h, 细胞变性、坏死的程度、数量随感染时间延长而增加; HSV-2 LAT、gG 基因 PCR 扩增及电泳结果, 证实病毒在细胞中的潜伏及激活。【结论】初步在人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 上建立了 HSV-2 潜伏感染及激活的细胞模型, 为下一步研究 HSV-2 的潜伏与激发机理, 了解 HSV-2 的致病机制打下基础。

关键词: 疱疹病毒 II 型; SH-SY5Y 细胞; 潜伏; 激发

中图分类号: R373 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0098-09

疱疹病毒 II 型(Herpes simplex virus type 2, HSV-2)为双链 DNA 病毒, 是人类病毒性疾病的常见病原体之一。基因组为一线性双链 DNA 分子, 大小约为 152 kb, 由共价连接的长片段(L)和短片段(S)组成, 两者分别占病毒 DNA 的 82% 和 18%, 每一片段由中间的独特序列(U)和两端的倒置重复序列组成, GC 含量约为 69%。目前发现 HSV-2 共有 80 个基因 94 个蛋白读码框(ORF), 至少编码 84 种蛋白^[1-2]。我们在人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y

上建立了 HSV-2 潜伏感染与激发的细胞模型, 为了解 HSV-2 的致病机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器: 1640 培养基(美国 Gibico 公司); 胎牛血清(FCS, 美国 Hyclone 公司); 胰酶(trypsin, 美国 Gibico 公司); 5% CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司); 电动倒置荧光显微镜 TE2000-E(日

基金项目: 广东省自然科学基金(9151001002000001); 全军医学科学技术研究“十一五”计划(06J008)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-36653508; E-mail: huilany@hotmail.com

作者简介: 孙朝晖(1970-), 男, 上海市人, 副主任医师, 博士后, 硕士生导师。研究方向为病毒功能基因组学研究。E-mail: zhaohui3

@126.com

收稿日期: 2009-06-07; 修回日期: 2009-09-01

本 Nikon 公司);ACV、Forskolin(美国 Sigma 公司)

1.1.2 病毒:HSV-2 333 标准株由中国预防医学科学院病毒研究所提供,病毒复苏后,接种 Vero 细胞单层增殖,测定病毒毒力,详见文献^[3]。

1.1.3 人神经母细胞瘤细胞株:SH-SY5Y 购自中国医学科学院基础医学研究所,细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养瓶中,每隔两天换液一次,当细胞长到 80% 汇合时,进行传代培养。

1.2 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染的建立

1.2.1 阿昔洛韦 (ACV) 对 SH-SY5Y 细胞的影响:从细胞培养瓶中弃掉旧培养液,加入 0.25% 胰酶消化液 1-3 mL,37℃ 消化细胞 2-5 min 后,显微镜观察贴壁细胞形状变圆至脱离瓶壁,加等体积 10% FCS RPMI1640 终止消化,500-1000 rpm/min 离心 1-2 min,弃去上清,加入含 10% FCS RPMI1640 培养液,用吸管吹打使细胞悬浮,调整细胞数大致为 1.0×10^5 细胞/cm²,各加入 1 mL 至 24 孔板中(2 cm²/孔),24h 待细胞贴壁生长后,弃去上清,加入含 10% FCS RPMI1640 培养液,分别加入 20,40,60,80,100,120,140 μmol/L 的 ACV 100 μL,过夜,吸去上清,将含有 5 MOI 的病毒液 100 μL 接种于孔板中,并于 37℃ 吸附 1 h,加入含 2.0% FCS RPMI1640 维持培养液,CO₂ 培养箱中 5% CO₂ 37℃ 培养,观察药物对细胞的影响,在各个实验观察时间点,经反复细胞冻融,使病毒粒子释放到细胞培养液中。将培养液于 4℃、10000 r/min 离心 10 min,收集上清,按 Reed-Munch 公式计算上清中病毒的组织培养半数感染量 TCID₅₀。

1.2.2 不同感染复数 (MOI, multiplicity of infection) 的 HSV-2 接种 SH-SY5Y 细胞对病毒潜伏及激发的影响:调整细胞数大致为 1.0×10^5 细胞/cm²,各加入 1 mL 至 24 孔板中(2 cm²/孔),24 h 待细胞贴壁生长后,弃去上清,加入含 10% FCS RPMI1640 培养液在 24 孔板中,然后加入 60 μmol/L ACV 100 μL 过夜,吸去上清,分别将含有 0.1、1、10、100 MOI 的病毒液 100 μL 接种于孔板中,并于 37℃ 吸附 1 h,加入含 2.0% FCS RPMI1640 维持培养液,CO₂ 培养箱中 5% CO₂ 37℃ 培养,至第 10 d 43℃ 1.5 h 后,在各个实验观察时间点,收集上清,按 Reed-Munch 公式计算上清中病毒的组织培养半数感染量 TCID₅₀。

1.2.3 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染时细胞形态观察:调整细胞数大致为 1.0×10^5 细胞/cm²,各加入 1 mL 至 24 孔板中(2 cm²/孔),24 h 待

细胞贴壁生长后,弃去上清,加入含 10% FCS RPMI1640 培养液,加入 60 μmol/L 的 ACV 100 μL,过夜,吸去上清,将含有 5 MOI 的病毒液 100 μL 接种于孔板中,并于 37℃ 吸附 1 h,加入含 2.0% FCS RPMI1640 维持培养液,CO₂ 培养箱中 5% CO₂ 37℃ 培养,在各个实验观察时间点,相差显微镜下观察细胞形态。

1.3 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染激发的诱导

1.3.1 加热诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的激活:在 24 孔板中,将潜伏感染 8 d 的细胞放入温度分别为 41℃、42℃、43℃、44℃、45℃ 的水浴箱,分别水浴 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,然后在各个实验观察时间点,收集上清,按 Reed-Munch 公式计算上清中病毒的组织培养半数感染量 TCID₅₀,观察不同温度及时间对细胞激发的影响。

1.3.2 福斯高林 (Forskolin) 诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的激活:在 24 孔板中,将潜伏感染 8 d 的细胞分别加入 25、50、75、100、125 μmol/L 的 Forskolin 100 μL,然后在各个实验观察时间点,收集上清,按 Reed-Munch 公式计算上清中病毒的组织培养半数感染量 TCID₅₀,在 24 孔板上加入不同浓度的 Forskolin,观察药物诱导对细胞激发的影响。

1.4 对 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的潜伏、激发进行验证

在 24 孔板中,分别在 HSV-2 感染 SH-SY5Y 细胞的第 4、6、8 d 取细胞进行 PCR 验证;第 8 d,43℃ 加热 1.5 h 后,取 12 h、24 h、36 h 后细胞进行 PCR 验证。PCR 引物设计:HSV-2 LAT 基因为 5'-GCCAGACGTGCGT GCTCTGCACGAT(上游引物);5'-TGTGTC TTTATCATAGAACAGAG(下游引物)位置为基因组 121,343121,492,扩增条带大小为 150 bp;HSV-2 gG 基因为 5'-GACCCAAAGACGC ACCCACA(上游引物);5'-CCAAGCGACCAGACA AACG(下游引物),位置为基因组 139,478¹41,988,扩增条带大小为 412 bp。扩增反应体系总体积 50 μL,含 2 μL 样品上清、10 μL 5 × PCR Buffer(含 Mg⁺)冲液、4 μL dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L),DNA Polymerase 0.5 μL,20 μmol/L 的上下游引物各 1 μL 和 dd H₂O 31.5 μL。循环条件为:94℃ 预变性 10 min,主循环(94℃ 50 s、65℃ 15 s、72℃ 90 s)共 30 个循环,72℃ 延伸 7 min。2.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定产物。扩增产物进行纯化回收,用测序仪测序,并将所得的测序结果与 GenBank 数据库进行

BLAST 同源性比较。

1.5 对病毒在细胞中的潜伏、激发进行 Real-time PCR 验证

在 24 孔板中,分别在 8 d 及 43℃ 加热 1.5 h 后,12 h 后取细胞进行 PCR 验证,同时设立 GAPDH 基因为内标。逆转录合成 cDNA 第一链,Real Time RT-PCR,反应条件如下:95℃,10 s;95℃,5 s,60℃,20 s,45 个循环。反应结束后,根据内标 GAPDH 和目的基因的各扩增曲线得到的 Ct 值制作标准曲线,对检测指样品目的基因 mRNA 进行相对定量。

2 结果

2.1 不同浓度 ACV 对 SH-SY5Y 细胞的影响

把 ACV 配制成 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 $\mu\text{mol/L}$ 加入至细胞培养物中,结果显示,

60 $\mu\text{mol/L}$ ACV 以下细胞基本上没有改变(图 1-A、B),80 $\mu\text{mol/L}$ 以上细胞形态出现明显改变,细胞膜发生溶解现象,细胞变圆,脱壁,死亡(图 1-C、D、E)。加入不同浓度 ACV 于 24 孔板细胞中过夜后,用 5 MOI 的病毒液接种,病毒滴度变化见图 2-A,从图可见,20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ ACV 在分别接种后约 4、5、6 d 病毒滴度显著上升,说明出现了急性溶细胞反应;50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以上能使病毒不出现激发现象,TCID₅₀ 处于 2.0 以下的较低水平,说明病毒可以处于潜伏状态;通过细胞形态学观察,70 $\mu\text{mol/L}$ ACV 至第 8 天后细胞形态稍差,因此 50–60 $\mu\text{mol/L}$ 的 ACV 最适合 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中建立潜伏状态。实验中,选用 60 $\mu\text{mol/L}$ ACV 进行以下各种实验。

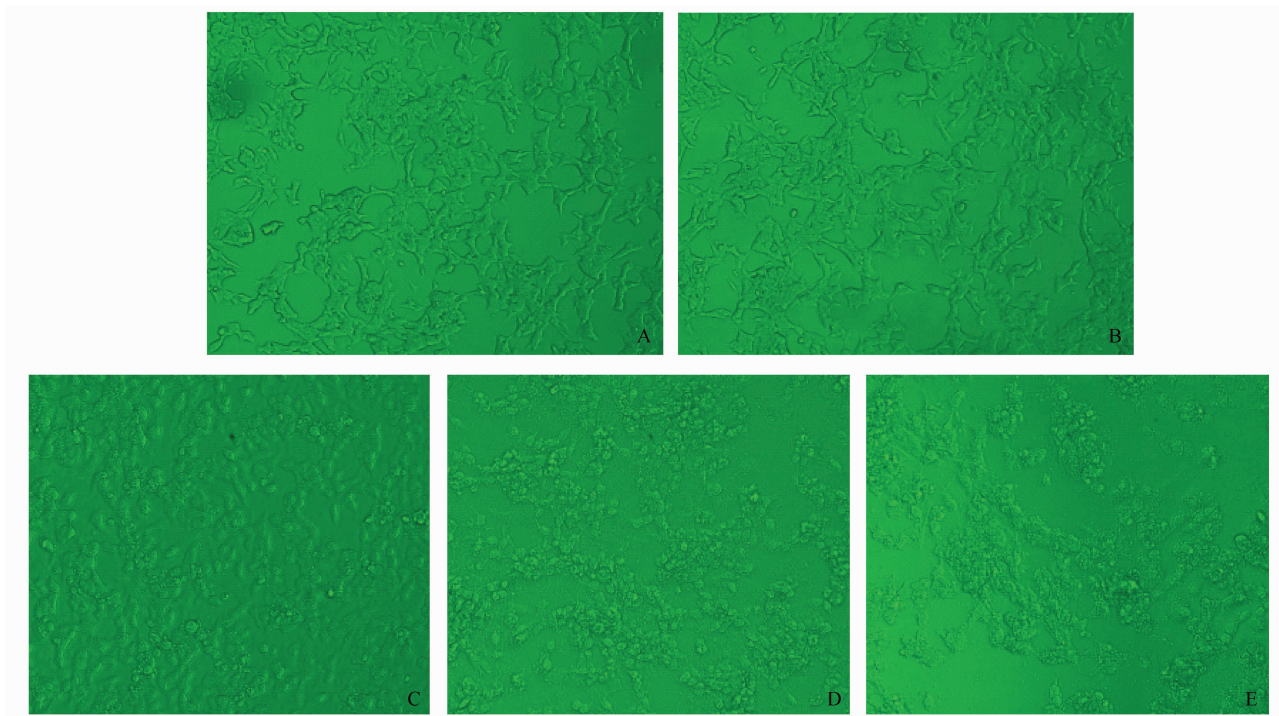


图 1 不同浓度 ACV 对 SH-SY5Y 细胞形态的影响结果(相差显微镜 $\times 200$)

Fig. 1 Morphological changes of SH-SY5Y cells added with ACV. (Phase contrast Microscope $\times 200$). A: Control; B: 60 $\mu\text{mol/L}$; C: 80 $\mu\text{mol/L}$; D: 100 $\mu\text{mol/L}$; E: 120 $\mu\text{mol/L}$.

2.2 不同 MOI 的 HSV-2 接种 SH-SY5Y 细胞对病毒潜伏及激发的影响

加入 60 $\mu\text{mol/L}$ ACV 于 24 孔板 SH-SY5Y 细胞中过夜后,分别用 0.1、1、10、100 MOI 的病毒液接种于孔板中,病毒滴度变化见图 2B,从图可见,100 MOI 从第 2 d 病毒滴度 TCID₅₀ 已逐渐上升,至第 6 d 已经出于明显急性溶细胞反应;0.1 MOI 由于病毒

滴度较低,至第 10 d,43℃ 1.5 h 诱导激发时病毒滴度未出现显著变化;1、10 MOI 至第 10 d,加热诱导后病毒滴度显著上升,说明病毒潜伏后激发,出现急性溶细胞反应。因此可见,1–10 MOI 均能取得较好的病毒潜伏激发效果,实验中采用 5 MOI 做为 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中建立潜伏感染激发模型的感染量。

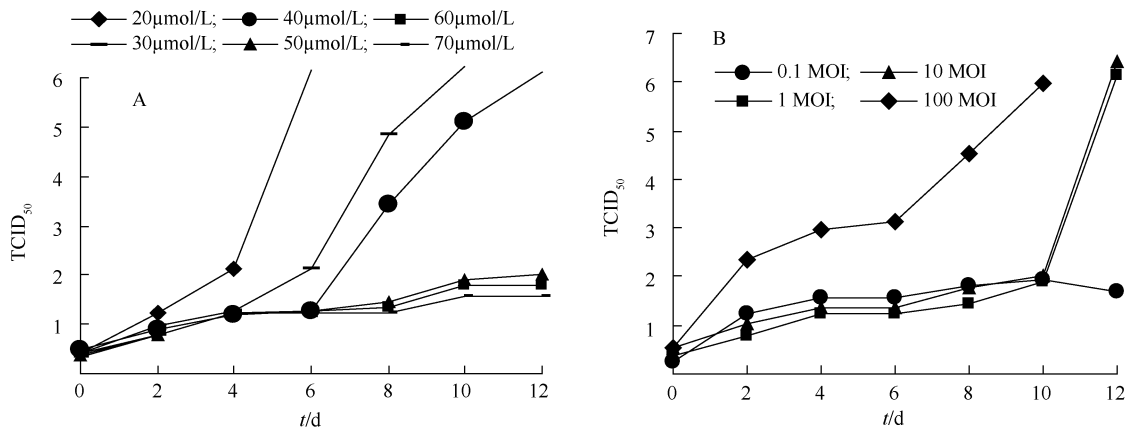


图2 ACV 浓度及 MOI 接种对 SH-SY5Y 细胞中的 HSV-2 滴度影响

Fig.2 The effect of ACV and MOI on titers of HSV-2 in SH-SY5Y cell cultivation. A: The effect of ACV; B: The effect of MOI.

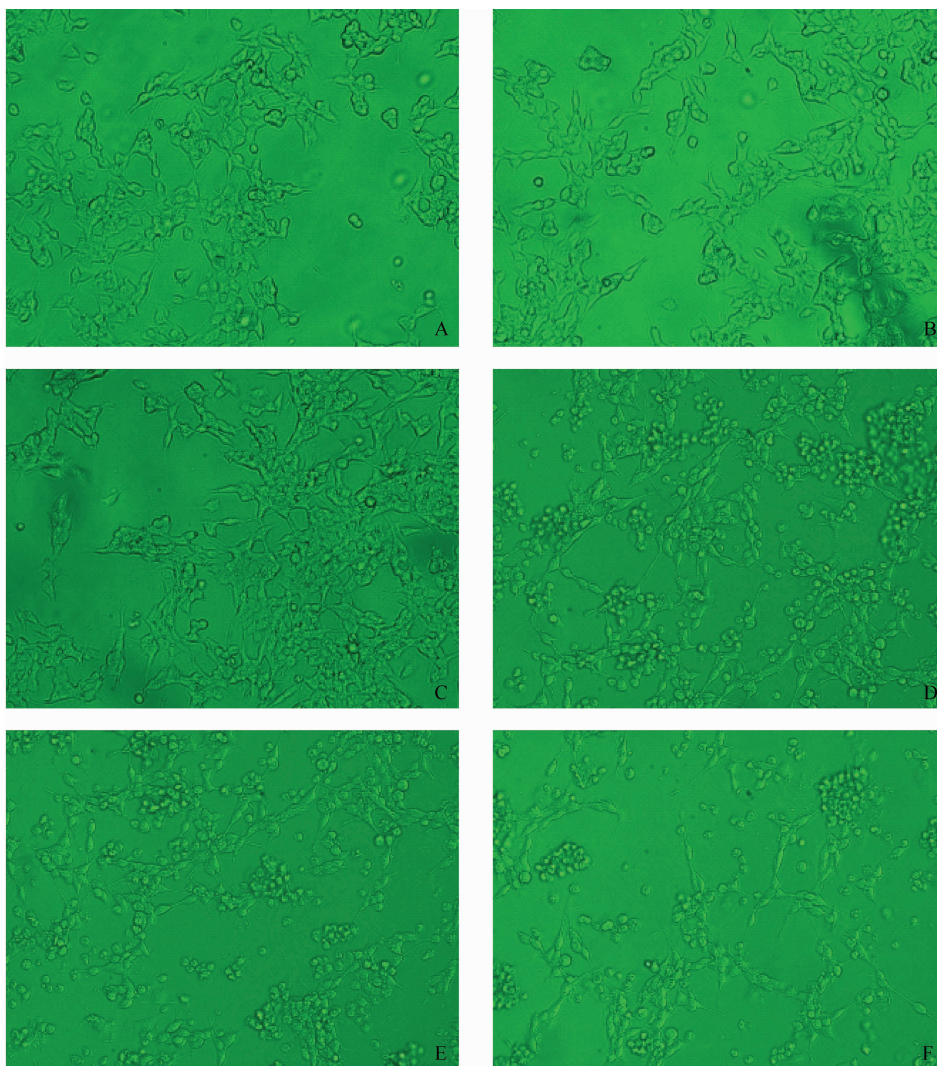


图3 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染时细胞形态观察 (相差显微镜 ×200)

Fig.3 Morphological observation of SH-SY5Y cells latent infected with HSV-2. (Phase contrast Microscope ×200). A: 0 d; B: 6 d; C: 8 d; D: 10 d; E: 12 d; F: 14 d.

2.3 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染时细胞形态观察

从病毒接种第 0 d 开始观察细胞形态,至 14 d HSV-2 在 SY5Y 细胞中均能保持潜伏状态,图 3 为接种 5 MOI 病毒后,第 0、6、8、10、12、14 d 细胞形态图。第 14 d 后,细胞出现较大量的变圆,死亡现象,在实验中得出,HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中最长可潜伏 14 d。

2.4 加热诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中激活

2.4.1 加热时间对 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的激活的影响:加热时间的长短诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的激活十分关键,潜伏感染 8 d 时,将细胞在 43℃ 中水浴不同时间,结果见图 4A,加热 0.5 及 2.5 h 未见病毒滴度出现明显上升,未能使病毒激发(2.5 h 时细胞出现大量死亡现象);1.0、1.5、2.0 h 均能使病毒产生激活现象,1.5 h 诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中激发效果最好,我们在实验中采用 1.5 h 作为加热时间。

2.4.2 加热温度对 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中激活的影响:潜伏感染 8 d 时,将细胞在不同温度下水浴 1.5 h,结果见图 4B,41℃、45℃ 未见病毒滴度出现明显上升,未能使病毒激发(45℃ 时细胞出现大量死亡现象);42、43、44℃ 均能使病毒产生激发现象,42、43℃ 诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中激发效果较好,我们在实验中采用 43℃ 作为加热温度。

2.5 Forskolin (Forskolin) 诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的激活

将潜伏感染 8 d 的细胞分别加入不同浓度的 Forskolin,结果见图 4-C,50 - 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Forskolin 能显著的诱导 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中的激活,而 25、125 $\mu\text{mol/L}$ 诱导效果不明显,实验中我们采用 75 $\mu\text{mol/L}$ 作为诱导最适浓度。从图 4-C 也可看出用 Forskolin,较之加热诱导病毒激发速度要慢 12-24 h 左右。

2.6 HSV-2 潜伏感染 SH-SY5Y 细胞激活后形态观察

培养的 SH-SY5Y 对照细胞在荧光倒置显微镜下观察呈单层生长,细胞呈多角形或梭形,细胞突起长而多,形成树枝状网络(图 5-A)。胞核圆形或椭圆形,有 1-2 个清晰的核仁,可见双核细胞,胞浆较丰富,易见分裂像的细胞。接种后 24 h 出现灶性细胞病变,主要为细胞逐渐变圆、变大,核变大、核膜移位,折光性变差(图 5-B)。接种后 48 h 病变范围呈片状扩大,可见多数细胞融合成多核巨细胞,

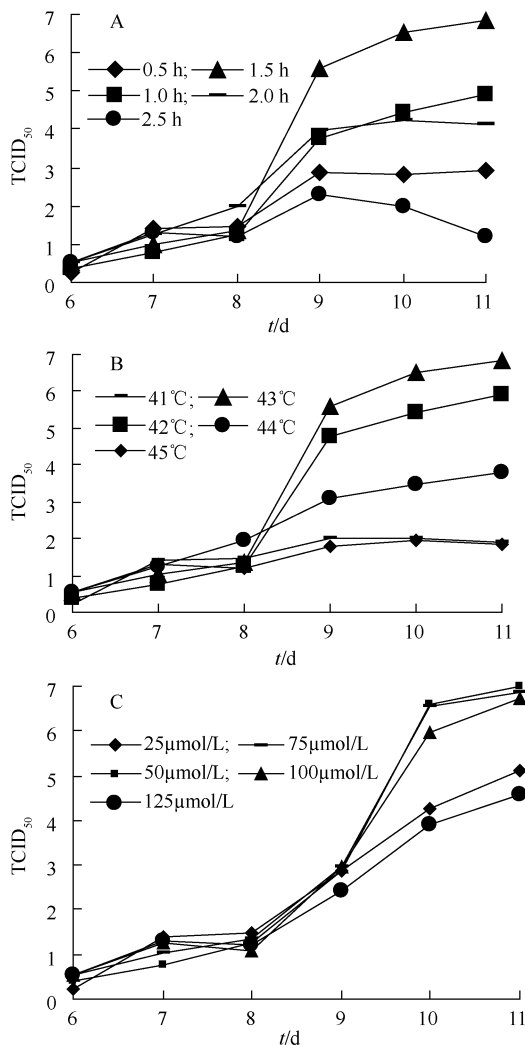


图 4 加热时间、温度、Forskolin 对 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中滴度的影响

Fig. 4 The effect of heating time, temperature and Forskolin on titers of HSV-2 in SH-SY5Y cell cultivation. A: The effect of heating time; B: The effect of temperature; C: The effect of Forskolin.

染色体着边、核破碎(图 5-C)。72 h 大部分细胞脱落、多核巨细胞裂解(图 5-D)。

2.7 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏、激活进行验证

在 HSV-2 潜伏感染 SY5Y 细胞的 4、6、8 d 分别取上清进行 PCR, LAT 基因均有表达, 而编码 gG 蛋白基因未有表达, 说明处于病毒的潜伏期(图 6-A); 激活后 12、24、36 h, LAT 基因及 gG 基因均有表达(图 6-B), 说明病毒在细胞中已被激活, 病毒基因组大量复制。分别将扩增出的 PCR 产物测序进行验证, 可见测序结果清晰, 信噪比高。经 BLAST 比对测序结果分别与 HSV-2 LAT 及 gG 基因序列相符。

2.8 Real-time PCR 验证结果

本实验中 GAPDH (内标) 和 gG 基因的 Real-

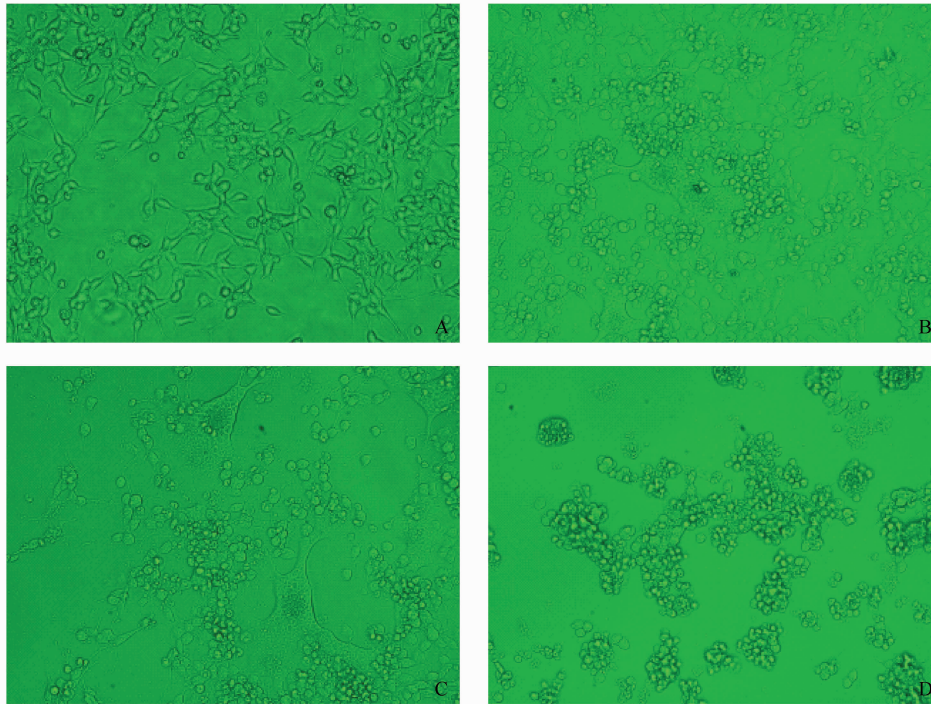


图 5 HSV-2 潜伏感染 SH-SY5Y 细胞激活后形态学改变 (相差显微镜 ×200)

Fig. 5 Morphological changes of SH-SY5Y cells latent infected and reactivated with HSV-2 (Phase contrast Microscope ×200). A: Control; B: 24 h post-reactivation; C: 48 h post-reactivation; D: 72 h post-reactivation.

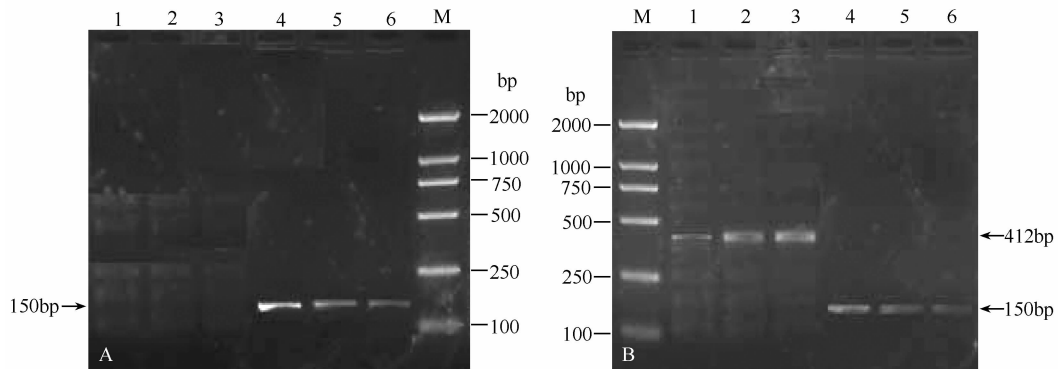


图 6 HSV-2 gG、LAT 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of PCR products of HSV-2 LAT and gG gene. M: MDL2000 standard DNA ladder; A (latency): 1, 2, 3 gG gene on 4, 6, 8 d post latent infection; 4, 5, 6 LAT gene on 8, 6, 4 d post latent infection; B (reactivation): 1, 2, 3 gG gene on 12, 24, 36 h post reactivation; 4, 5, 6 LAT gene on 12, 24, 36 h post reactivation.

time PCR 数据结果分别见表 1、表 2, 可见作为内标的 GAPDH 相对定量后的校正系数为 1.09 (表 1), 而 gG 基因在激活后较潜伏期增加了 10.55 倍 (表 2), 校正后为 9.68 倍。

3 讨论

在人群中约 90% 以上的人曾感染过 HSV, 其中很大一部分导致潜伏感染, 病毒在体内可维持数年以致终生。临床上使用抗毒药物治疗 HSV 感染时, 常出现耐药现象, 均难以清除病毒潜伏。潜伏感

表 1 GAPDH real time RT-PCR 数据结果表

Table 1 Date result of real time RT-PCR on GAPDH

Well	Sample Type	Repl	Ct	SQ
A01	Standard	1	19.39	1000.00
B01	Standard	2	22.18	100.00
C01	Standard	3	27.01	10.00
D01	Standard	4	31.83	1.00
E01	SAMPLE	A (latency)	20.45	402.02
F01	SAMPLE	B (reactivation)	20.30	436.54 (+1.09)

表 2 gG real time RT-PCR 数据结果表

Table 2 Date result of real time RT-PCR on gG

Well	Sample Type	Repl	Ct	SQ
A02	Standard	1	22.07	1000.00
B02	Standard	2	25.25	100.00
C02	Standard	3	28.69	10.00
D02	Standard	4	32.37	1.00
E02	SAMPLE	A (latency)	30.47	3.30
F02	SAMPLE	B (reactivation)	26.95	34.80(+10.55)

染的 HSV-2 病毒可因各种非特异性刺激如发热、寒冷、日晒、月经、情绪紧张、某些细菌(如肺炎球菌)及某些病毒感染(如流感)等而复发,导致相关的临床症状。潜伏感染 HSV-2 的复发不仅会发生并且广泛存在,这给相关疾病的治疗及研究均带来了巨大障碍,临床上对 HSV-2 感染复发的防治显得尤为重要,因此病毒潜伏感染及复发的相关机制已成为现在研究的热点。

由于缺乏一个广泛可接受的 HSV-2 感染神经细胞建立潜伏感染并激发的细胞模型,为我们研究 HSV-2 潜伏感染及复发机制带来了一些束缚,目前用于研究 HSV-2 潜伏感染与激发机制的主要为动物模型^[4-9],但是有许多限制:(1)动物可能带有其他病毒或细菌的隐性感染,往往有干扰作用和假阳性出现,另外动物经隐性感染获得免疫力,对接种疫苗会发生抵抗,但由于后天免疫一般不表现在细胞抵抗力的增加,因此离体细胞无免疫力,利于病毒生长;(2)由病毒引起的潜伏感染及激活,在不同的动物表型并不完全相同,而且不易观察;(3)接种动物时,潜伏感染的神经元数受到限制^[7-9],而采用细胞模型有许多好处:细胞来源方便,能定量,便于研究,可以从中选择最敏感的细胞以满足实验要求,同时还利于从单一细胞水平上研究病毒的繁殖过程和病毒与细胞的相互关系;另外,动物接种均受数量、年龄、途径的限制,细胞不仅可以大量生产,而且还可较久地持续培养,便于病毒生长。SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 中的一个克隆,具有交感神经节的许多特性,能诱导分化成为神经元样细胞,由于 SH-SY5Y 细胞基因组与正常人十分相似,已广泛应用于基因功能组学、基因表达等研究^[10-13],是用来研究 HSV-2 潜伏感染、激活较好的人神经细胞模型。

潜伏相关转录子 LAT (latency-associated transcript) 是 HSV 在潜伏感染时唯一大量表达的基因, LATs 被认为在 HSV 潜伏建立、维持和再激活过程中起着重要的作用,而与 LATs 相关的研究也正

是目前国内外研究 HSV 病毒的热点。LATs 位于病毒基因组的长重复序列中,包括主要 LATs(由 2.2、2.0、1.5、1.45 kb 组成)和非主要 LATs(由 9.0、8.3 kb 组成),潜伏感染时聚集在感染的细胞核及细胞质中,增殖性感染及潜伏再激活时聚集在细胞质中^[14-15]。实验证实,HSV-2 的 LAT 只有两类,即非主要的 9.0 kb LAT 和主要的 2.2 kb LAT,且不进行进一步剪切成更小的片段。因此,2.2 kb LAT 是细胞处于潜伏状态的标志^[16-18]。Kesari^[19]等概括了 HSV 病毒潜伏的相关性状,即:(1)能够在宿主内持续存在而缺乏相应的临床表现;(2)能由潜伏状态再活化并产生感染性颗粒;(3)缺乏病毒抗原但有病毒基因组的存在;(4)缺乏溶细胞病毒基因的表达但可检测到 LAT。在我们研究中,细胞模型建立也可以总结以下几点:(1)在适当的药物作用下,病毒在细胞中能潜伏感染至少稳定 7d 以上,细胞形态,性状无明显改变;(2)在一定诱发因素下,病毒能够再激活,出现快速的溶细胞反应;(3)潜伏感染时,细胞培养上清液检测不到病毒结构功能基因的复制,而能检测到 LAT 基因;激活后,病毒基因组、LAT 均能检测到。

实验中,我们用不同 MOI 的病毒量去感染细胞,MOI 是 multiplicity of infection 的缩写,MOI 中文译为感染复数。传统的 MOI 概念起源于噬菌体感染细菌的研究。MOI 其含义是感染时噬菌体与细菌的数量比值,也就是平均每个细菌感染噬菌体的数量。噬菌体的数量单位为 pfu。一般认为 MOI 是一个比值,没有单位,其实 MOI 隐含的单位是 pfu number/cell。病毒 moi 是因为后来 MOI 被普遍用于病毒感染细胞的研究中,病毒 moi 含义是感染时病毒与细胞数量的比值。由于测定 pfu 往往重复性较差,因此近些年许多研究又开始采用 TCID₅₀ (组织半数感染量)方法来计算病毒的感染单位,隐含单位为 TCID₅₀/cell。计算公式为:病毒液体积(mL) × 病毒滴度(TCID₅₀/Ml)

本实验使用 TCID₅₀ 法来确定病毒滴度,是检验病毒“毒力强度”的灵敏方法之一。测定 TCID₅₀ 时,高稀释度下细胞能抗少量病毒而不出现感染,或出现 CPE 效应晚,故应尽量在维持正常细胞生长的前提下,将观察时间延长。就 HSV-2 这种属烈性感染病毒,病毒感染细胞后,会引起细胞迅速死亡,脱壁,变圆。最多观察 10 d 即可。多种情况下都能够诱发潜伏状态 HSV 的再激

活,这些诱发因素主要包括物理(加热^[20,21],紫外线^[6])、化学(Forskolin)^[20,22]及生物(垂体腺苷酸环化酶激活肽)^[23]等方面。在我们研究中,采用了加热及 Forskolin 两种诱导方式,成功使 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染激发进入到快速的溶细胞反应,实验中,我们也观察到 Forskolin 的激发效果要较加热晚大概 12-24 h。

总之,我们成功的构建了 HSV-2 在 SH-SY5Y 细胞中潜伏感染及复发的细胞模型,为下一步进行 HSV-2 潜伏感染及复发机制的研究,了解病毒的致病机理研究打下坚实的基础。

参考文献

- [1] Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, et al. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *Journal of Virol*, 1998, 72(3) :2010-2021.
- [2] Rajcani J, Andrea V, Ingeborg R. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes*. 2004, 28(3) :293-310.
- [3] 孙朝晖, 石玉玲, 冼江, 等. HSV-2 333 株在 Vero 细胞中持续感染及增殖特性研究. 医学临床研究 (*Journal of clinical research*). 2009, 26(5) :753-756.
- [4] Shiro Higaki, Tatsunori Deai, Masahiko Fukuda, et al. Microarray Analysis in the HSV-1 Latently Infected Mouse Trigeminal Ganglion. 2004, *Cornea*, 23 (s1) : 42-47.
- [5] Wen Kang, Ruma Mukerjee, Nigel W. , Fraser. Establishment and maintenance of HSV latent infection is mediated through correct splicing of the LAT primary transcript. 2003, *Virology*, 312(1) :233-244.
- [6] Carr DJ, Austin BA, Halford WP, et al. Delivery of Interferon-gamma by an adenovirus vector blocks herpes simplex virus Type 1 reactivation in vitro and in vivo independent of RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase pathways. *Journal of Neuroimmunology*, 2009, 206(1) :39-43.
- [7] Sawtell NM, Poon DK, Tansky CS, et al. The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlated with reactivation. *Journal of Virology*, 1998, 72 (7) : 5343-5350.
- [8] Sawtell NM. Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *Journal of Virology*, 1997, 71(7) :5423-5431.
- [9] Thompson RL, Sawtell NM. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *Journal of Virology*, 1997, 71(7) :5432-5440.
- [10] Rebhan M, Vacun G, Bayreuther K, et al. Altered ganglioside ex-pression by SH-SY5Y cells upon retinoic acid-induced neuronal differentiation. *Neuroreport*, 1994, 5(3) :941-949.
- [11] Perez-Juste G, Aranda A. Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor 1 is associated with induction of retinoic acid receptor beta gene expression. *Oncogene*, 1999, 18(39) :5393-5402.
- [12] Alfredo GC, Filip L, Javier DN. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *Journal of Neuroscience Research*, 2006, 84(2) :755-767.
- [13] Encinas M, Iglesias M, Liu Y, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, 2000, 75(2) :991-1003.
- [14] Nicosia M, JM Zabolotny, RP Lirette, et al. The HSV-1 2-kb latency-associated transcript is found in the cytoplasm comigrating with ribosomal subunits during productive infection. *Virology*, 1994, 204(2) :717-728.
- [15] Zabolotny, JC Krummenacher, NW Fraser. The herpes simplex virus type 1 2. 0-kilobase latency-associated transcript is a stable intron which branches at a guanosine. *Journal of Virology*, 1997, 71 (6) : 4199-4208.
- [16] Croen KD, L Dragovic, JM Ostrove, et al. Characterization of herpes simplex virus type 2 latency associated transcription in human sacral ganglia and in cell culture. *Journal of Infectious Diseases*, 1991, 163 (1) :23-28.
- [17] Krause PR, JM Ostrove, SE Straus. The nucleotide sequence, 5' end, promoter domain, and kinetics of expression of the gene encoding the herpes simplex virus type 2 latency-associated transcript. *Journal of Virology*, 1991, 65(8) :5619-5623.
- [18] Mitchell WJ, SL Deshmane, A Dolan, et al. Characterization of herpes simplex virus type 2 transcription during latent infection of mouse trigeminal ganglia. *Journal of Virology*, 1990, 64(7) :5342-5348.
- [19] Kesari S, Lee VMY, Brown SM, et al. Selective vulnerability of mouse CNS neurons to latent infection with a neuroattenuated herpes simplex virus type 1. *Journal of Neuroscience*. 1996, 16(8) :5644-5653.
- [20] CS Miller, RJ Danaher, RJ Jacob. ICP0 Is Not Required for Efficient Stress - Induced Reactivation of Herpes Simplex Virus Type 1 from Cultured Quiescently Infected Neuron Cells. *Journal of Virology*, 2006, 80(7) : 3360-3368.

- [21] RJ Danaher, RJ Jacob, CS Miller. Reactivation from quiescence does not coincide with a global induction of herpes simplex virus type 1 transactivators. *Virus. Genes*, 2006,33(1): 163-167.
- [22] RJ Damaher, RJ Jacob, CS Miller. Herpesvirus quiescence in neuronal cells. V: Forskolin-responsiveness of the herpes simplex virus type 1 α 0 promoter and contribution of the putative cAMP response element. *Journal of Neurovirology*,2003,9(2):489-497.
- [23] RJ Danaher, AD Savells-Arb, SA Black, et al. Herpesvirus quiescence in neuronal cells IV: Virus activation induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) involves the protein kinase A pathway. *Journal of Neurovirology*, 2001, 7(1): 163-168.

Establishment of a cell model system of herpes simplex virus type II latent infection and reactivation in SH-SY5Y cells

Zhaohui Sun¹, Huilan Yang^{1*}, Yuling Shi¹, Min Wei², Jiang Xian¹, Wenkui Hu¹

(¹General Hospital of Guangzhou command, Guangzhou 510010, China)

(²Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: [**Objective**] To establish an experimental culture system of herpes simplex virus type II (HSV-2) latent infection and reactivation in SH-SY5Y cells. [**Methods**] Changes of biological character were observed after 20, 40, 60, 80,100, 120 and 140 μ mol/L ACV were added into cell cultures, and also the morphological observation was detected with phase-contrast microscopy after HSV-2 was inoculated into SH-SY5Y cells using MOI of 0.1, 1, 10 and 100. The optimum condition of time and temperature was approached using temperature of 41 $^{\circ}$ C, 42 $^{\circ}$ C, 43 $^{\circ}$ C, 44 $^{\circ}$ C and 45 $^{\circ}$ C, and time of 0.5 h, 1.0 h, 1.5 h, 2.0 h and 2.5 h to induce HSV-2 reactivation. The optimum concentration of Forskolin was also decided using 25, 50, 75, 100 and 125 μ mol/L to activate the virus from latency. PCR was used to authenticate HSV-2 latent infection and reactivation. The morphological changes were observed when the virus was reactivated from latency. [**Results**] The optimum concentration of ACV was 60 μ mol/L to establish latency in SH-SY5Y cells. Suitable infective dose of HSV-2 was 1-10 MOI to construct latency and reactivation in SH-SY5Y cells. The time of virus latency in SH-SY5Y cells could reach up to 14 d. Heat stress of 43 $^{\circ}$ C, 1.5 h and 75 μ mol/L Forskolin were the optimum condition to induce virus reactivation. The morphologic changes in SH-SY5Y cells recurred by HSV-2: Cytopathic effects were more and more obvious with time lasting from 24 h to 72 h after reactivation from latency. PCR and results of electrophoresis proved the cell model of latent infection and reactivation was set up successfully. [**Conclusions**] The cell model system of HSV-2 latent infection and reactivation in SH-SY5Y cells was established. The research provided usefulness for study on HSV-2 of latency, reactivation and pathogenic mechanism.

Keywords: HSV-2; SH-SY5Y cell; latency; reactivation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong province (9151001002000001) and the Programs for Medical High Technology Research during the eleventh Five-Year Plan of PLA (06J008)

Corresponding author: Tel/Fax: +86 20 36653508; E-mail: huilany@hotmail.com

Received: 7 June 2009 / Revised: 1 September 2009