

网络出版时间: 2020-9-4 13:57 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1447.012.html>

卡波肉瘤相关疱疹病毒细胞抗原片的制备

文志¹, 周畅¹, 华玮², 董凯旋², 叶磊², 郑豪², 徐涵², 王林定¹

摘要 目的 成功制备了卡波肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)的细胞抗原片,并验证其有效性,为检测KSHV血清标本提供了一种可行的办法。方法 培养了能够稳定表达卡波肉瘤相关疱疹病毒核相关抗原(LANA)的BCBL-1细胞。BCBL-1细胞是感染过KSHV并且细胞基因组中包含KSHV

基因的细胞。待细胞生长活力旺盛且状态良好时,收集细胞并用4%的多聚甲醛固定到预先处理好的抗原片上,完成封闭、待测血清的孵育和荧光二抗的孵育后,通过免疫荧光显微镜观察检测结果。结果 通过免疫荧光技术发现,感染过KSHV的患者血清样本能观察到荧光标记的二抗激发的荧光,而未感染过KSHV的标本则没有观察到荧光标记的二抗激发的荧光。结论 成功制备了能用于检测血清的卡波肉瘤相关疱疹病毒的细胞抗原片,为进一步研究卡波肉瘤相关疱疹病毒的流行病学提供方法。

关键词 卡波肉瘤相关疱疹病毒; LANA; 细胞抗原片; 免疫荧光

中图分类号 R 373.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1541-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.012

2020-05-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271837); 安徽省自然科学基金(编号: 1708085MH193); 2019年度安徽医科大学科研基金(编号: 2019xkj020)

作者单位: 安徽医科大学¹基础医学院微生物教研室、²第二临床医学院, 合肥 230032

作者简介: 文志, 男, 硕士研究生;

王林定, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanglinding@ahmu.edu.cn

Expression and clinical significance of AP1S1 gene in breast cancer

Liu Yu^{1,2}, Shan Benjie¹, Shen Guodong^{2,3}, et al

(¹Dept of Oncology, ²Dept of Geriatrics, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

³Anhui Key Laboratory of Cancer Immunization and Nutrition Therapy, Hefei 230001)

Abstract **Objective** To investigate the expression and clinical significance of AP-1 complex subunit sigma-1A (AP1S1) gene in breast cancer. **Methods** The relationship between the expression level of AP1S1 and the clinical prognosis of breast cancer patients was analyzed using the data in surgical tissues and adjacent tissues of breast cancer patients published in the online databases of GEPIA and UALCAN. 110 cases of wax block specimens with complete clinical data and complete clinical data were collected. The expression of AP1S1 in breast cancer tissues was detected by immunohistochemistry. *In vitro* experiments were performed using plate clones, CCK-8 and cell scratch experiments to analyze the effect of AP1S1 expression on the proliferation and metastasis characteristics of breast cancer cells. **Results** Through the analysis of GEPIA and UALCAN data, it was found that the expression level of AP1S1 in breast cancer tissues was significantly higher than that in normal breast tissues ($P < 0.01$). The expression level of AP1S1 was significantly associated with overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) ($P < 0.05$), and it was closely related to the tumor stage of breast cancer patients ($P < 0.05$), and had no obvious correlation with age, tumor classification and lymph node metastasis. Clinical case analysis confirmed that AP1S1 expression was closely related to breast cancer tumor size and AJCC stage ($P < 0.05$), and had no significant correlation with age, lymph node metastasis, estrogen receptor (ER) status, progesterone receptor (PR) status, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status ($P > 0.05$). The results of cell function experiments showed that the expression of AP1S1 gene could promote the proliferation, colony formation and migration ability of breast cancer cells. **Conclusion** AP1S1 gene is highly expressed in breast cancer tissues, and its expression level is related to the prognosis of breast cancer patients. Moreover, AP1S1 gene expression can promote breast cancer cell proliferation, colony formation and migration ability.

Key words breast cancer; AP1S1; tumor staging; clinical prognosis

卡波肉瘤疱疹病毒(*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*, KSHV)又被称之为人类疱疹病毒 8 型(*human herpesvirus 8*, HHV-8),是在 1994 年由 Chang et al^[1]在卡波肉瘤(*Kaposi's sarcoma*, KS)组织中发现的,是引起 KS 的主要病原体^[2]。经研究证明 KSHV 同时还是原发性渗出性淋巴瘤^[3](*primary effusion lymphoma*, PEL)多中心性 Castleman 病(*multicentric Castleman's disease*, MCD)的病原体^[4],是危害人类健康的一大病原体。KSHV 的生命周期包涵两个阶段,潜伏期和裂解期。潜伏期和裂解期的转换是受到基因的严格控制^[5]。潜伏期占病毒整个生命周期的绝大多数时间,病毒的基因受到严格调控,只有少数潜伏相关基因在持续表达,所以临床很难对这一时间段病毒的存在做出精确的检出,但在裂解复制阶段,病毒绝大多数基因复制表达,并包装产生新的病毒,感染新的宿主细胞。目前用于检测 KSHV 的方法主要是酶联免疫吸附试验(ELISA),时间长,耗材大,不能长久保存。但是目前用只有 KSHV 感染而 EB 病毒未感染过的 PEL 细胞系来检测血清样本尚无人报道。这种细胞抗原片的制备能很好地解决上述问题,为 KSHV 的血清检测提供了一条新的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 卡波肉瘤相关疱疹病毒感染细胞系 BCBL-1 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和材料 12 孔免疫荧光原位杂交载玻片; Triton X-100(德国 Biofroxx 公司); DAPI 染液、牛血清白蛋白(BSA)(上海碧云天公司);山羊抗人 IgG(FITC)(武汉 Elabscience 公司);免疫荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司 TH4-200); KSHV 阴性和阳性标本为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 BCBL-1 细胞复苏后置于含 10% FBS 的且含有 1% 双抗的 RPMI 1640 培养基中,37℃、5% CO₂ 培养箱培养。每 48 h 观察细胞状态并收集细胞离心换一次液。

1.2.2 固定和预处理细胞 待细胞长到活力旺盛时期,收集细胞 2 000 r/min 离心 10 min, PBS 洗 3 遍。洗完后加入 200 μl PBS,彻底使细胞悬浮,使细胞单个均匀分布。载玻片每孔加入 5 μl 的细胞悬液,放置室温 20~30 min,待干透后每孔加入 50 μl 4% 多聚甲醛固定细胞,10~15 min, PBS 洗 3 遍,每

次 5 min。固定后每孔加 50 μl 3% BSA 和 0.1% Triton X-100 的混合液,封闭细胞,室温放置 1~2 h, PBS 洗 3 遍,每次 5 min。

1.2.3 检测样本 将待测样本用 PBS 按照 1:50 稀释,每孔加入 50 μl,置于 4℃ 过夜孵育。

1.2.4 免疫荧光二抗的孵育 将孵育完检测血清后的抗原片用 PBS 洗 3 遍,每次 5 min,每孔加入 50 μl 预先用 PBS 按照 1:100 稀释后的荧光二抗,室温避光孵育 1~2 h, PBS 洗 3 遍,每次 10 min。

1.2.5 细胞核染色 每个抗原孔内加入 50 μl DAPI 染液,室温避光 5 min, PBS 洗 3 遍,每次 10 min。

2 结果

2.1 显微镜下细胞培养结果 BCBL-1 细胞为悬浮细胞,生长时间相对较长,需在含有 10% FBS 和 1% 双抗的 1640 培养基、37℃、5% CO₂ 中培养 5~7 d,低倍镜下观察细胞生长状态(图 1A),待细胞长满整个视野时,此时细胞数量较多,活力旺盛,适合做免疫荧光。

2.2 细胞固定结果 待细胞固定在载玻片后肉眼可在载玻片上观察看到一层白色薄膜覆盖在孔底,显微镜下可见点状细胞分布在视野内。见图 1B。

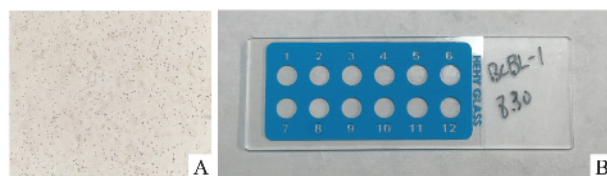


图 1 BCBL-1 细胞培养和 12 孔免疫荧光原位杂交载玻片
A: 低倍镜下细胞 5 d 后生长状态 ×40; B: 免疫荧光原位杂交载玻片

2.3 荧光显微镜观察结果 在荧光显微镜下,可以观察到孵育 KSHV 阳性血清的样本,有异硫氰酸(FITC)激发的绿色荧光。KSHV 阴性样本的血清则没有看见异硫氰酸激发的绿色荧光。细胞经过细胞核染色后,发现细胞核激发的蓝色荧光位点与 FITC 激发的绿色荧光位点相同。见图 2、3。

2.4 普通人群血清样本的检测结果 收集了合肥市 238 份普通血清标本,并用此方法检测,结果显示合肥市普通人群感染 KSHV 的感染率约为 7.6%。见表 1。

3 讨论

KSHV 又称为卡波肉瘤病相关疱疹病毒,是 DNA 双链病毒,属于 γ 疱疹病毒的亚科。现已发现

表1 合肥市238例普通人群 KSHV 的感染情况

性别	数量(例)	阳性数	感染率(%)
男	148	9	6.1
女	90	9	10.0
合计	238	18	7.6

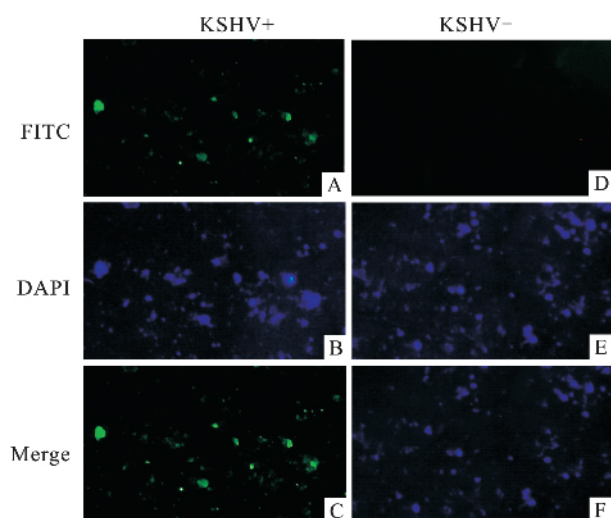


图2 荧光显微镜下观察 KSHV 阳性与阴性样本检测结果 ×100

A、B、C: 抗原片用于检测 KSHV 阳性标本的荧光显微镜下结果; D、E、F: 抗原片用于检测阴性标本的显微镜下结果; FITC: 显示含 FITC 标记的荧光二抗; DAPI: 显示细胞核染色; Merge: 叠加效果

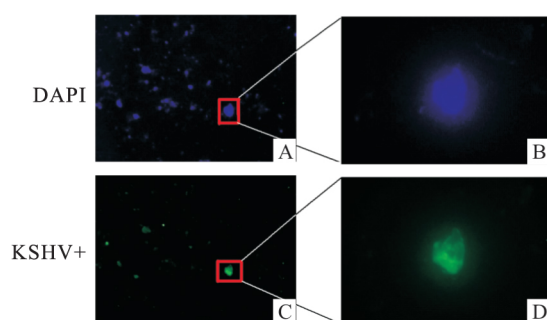


图3 KSHV 阳性标本结果局部放大与细胞核染色对比

A、B: 细胞核染色; C、D: KSHV 阳性标本检测孔; B、D 分别是 A、C 的局部放大图

的 KSHV 有 4 种类型,分别是经典型 KS、地域型 KS、移植型 KS 和 AIDS 相关性 KS。KSHV 在全世界的分布比较广泛,集中分布在非洲。部分欧美等地和地中海国家是高发区域。随着世界人口的流动,在中国及日韩和东南亚地区也发现了 KSHV 的活动迹象。我国对 KSHV 的研究起步相对较晚^[6],但是有研究^[7]表明我国西北地区 KSHV 的发病率明显较高,且各族之间差异较为显著。

目前常用于检测 KSHV 的血清学方法为 ELISA 间接法,用此方法检测血清有以下几个优点:①适用于大量样本的检测,一块反应板至少可以检测 90

余份血清标本,一次检测数块反应板可完成上百个样本的检测;②成本较低,ELISA 中各种试剂、耗材及仪器价格相对较低,储存方便。但是缺点也是十分明显的:①费时,包被抗原需 4℃ 过夜,第 2 天检测血清样本时,当中各种过程所需的时间至少要 6 h;②检测过程中温度求高,在检测样本时,除洗涤外,所有的过程均需要在 37℃ 的环境中进行,尤其是在酶和底物反应时,温度对最终的 OD 值影响较大;③洗涤不完全时,容易造成背景值的偏高,进而造成假阳性。采用细胞抗原片的方法检测血清样本也有优点:①检测时间短,抗原片还可以储存。制作抗原片只需要 1 h,检测样本需要 3 h,制作完成的抗原片可置于 -80℃ 保存,待有样本检测时可直接取出使用。②灵敏度较 ELISA 法高,只有与阳性标本中的抗体结合的荧光二抗能激发目的荧光,目的荧光的强弱只与激发光的强弱相关,不受温度等因素的影响。但是此种方法也存在不足:①细胞生长缓慢,BCBL-1 细胞为悬浮细胞,相对于普通的贴壁细胞生长周期更长。②要求避光。因为荧光二抗中的荧光物质在白光环境下容易淬灭,所以孵育二抗和在荧光显微镜下观察结果时不可过长时间暴露在白光下,进而造成假阴性。③费用相对较高,荧光显微镜的成本及维护和酶标仪表相比较,不适用于临床检测样本。

KSHV 生命周期中包涵两个阶段,即潜伏期及裂解期。当病毒侵入宿主细胞后,经过短暂的急性感染,病毒的自身基因激活,在表达的潜伏核抗原 (LANA) 的作用下,病毒自身的环状 DNA 分子直接耦联到宿主细胞核的基因组中,病毒进入到潜伏状态。此时,病毒的大多数基因处于沉默状态,只有少数的潜伏相关基因处于激活状态,如 ORF73、ORF72 和 K13 等。但是当宿主受到外界因素的直接或间接作用,处于免疫功能低下时,病毒潜伏状态的一些基因能被重新激活,并进入复制阶段,此时能检测到多种病毒裂解产物,如病毒复制与转录激活因子 (RTA)、病毒裂解复制立早期蛋白 (MTA) 等。

潜伏期相关核抗原 LANA 是一种多功能核蛋白,在病毒的整个生命周期中都持续稳定表达。LANA 有 220 ku,是由 KSHV 的 ORF73 基因编码。当病毒侵入宿主细胞并且处于潜伏状态时,它对病毒染色体的复制,维持正常结构和协助 KSHV 病毒基因组整合到宿主细胞中,并通过有丝分裂进入子代细胞中,都发挥着非常重要的作用。目前已知 KSHV 的基因组的末端重复序列 (terminal repeats,

TRs) 包含有一个负责 DNA 复制起始的顺式作用元件 (cis-element)。LANA 是一种反式作用蛋白, 它的氨基末端和羧基末端共同参与并调节了其与基因组的 TRs 的特异性结合, 最终形成一种 DNA 蛋白质复合物, 这种蛋白质复合物来调节病毒染色质的复制^[8]。LANA 是定位于细胞核中, 能够将病毒的基因组与宿主的基因组相互整合并随着宿主细胞的有丝分裂进入到子代细胞中^[9]。目前认为, 甲基化的 CPG 结合蛋白 MeCP2 和 DEK 蛋白共同作用于 LANA, 介导了这种作用^[10]。近几年发现在 KSHV 潜伏感染的 JSC 细胞株中, LANA 蛋白与着丝粒蛋白 F (CENP-F) 共同在着丝粒区域出现, 并且观察到 N 端与 C 端能直接与 CENP-F 结合。除此之外, 还发现 LANA 与另一种着丝粒蛋白 Bub1 有关, Bub1 与 CENP-F 共同形成复合物并且与 LANA 相互作用, 免疫荧光原位杂交显示, CENP-F、Bub1、LANA 三个蛋白共同介导 KSHV 基因组附着到宿主细胞的基因组中^[11-12], 实验通过携带有短发夹结构的 RNA (shRNA) 的慢病毒载体干扰蛋白 Bnb1 的表达能显著降低 KSHV 基因组的拷贝数量, 但是蛋白 CENP-F 的去除并未观察到这一现象^[13], 提示 LANA 可能与多种蛋白相互作用, 共同促进了病毒潜伏机制的建立。

参考文献

- [1] Chang Y, Cesarman E, Pessin M S, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma [J]. *Science* 1994 266(5192): 1865-9.
- [2] Ouyang X X, Fu B, Li B, et al. Establishment of an ELISA to detect Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus using recombinant ORF73 [J]. *Virologica Sinica*, 2010 25(3): 168-76.
- [3] Oster C, Stein T, Kitahara S, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8-associated extracavitary primary

- effusion lymphoma presenting as multiple lymphomatous polyposis [J]. *Hum Pathol*, 2018 79: 177-83.
- [4] Wang L, Pietrek M, Brinkmann M M, et al. Identification and functional characterization of a spliced rhesus rhadinovirus gene with homology to the K15 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Gen Virol* 2009 90(Pt 5): 1190-201.
- [5] Vogt C, Bohne J. The KSHV RNA regulator ORF57: target specificity and its role in the viral life cycle [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2016 7(2): 173-85.
- [6] 段强, 张莹, 曾宪聪, 等. 安徽省安庆地区卡波肉瘤相关疱疹病毒感染的危险因素分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014 49(1): 44-7.
- [7] 方圆, 许常青, 周畅, 等. 甘肃省敦煌地区普通人群卡波肉瘤相关疱疹病毒感染的血清学分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017 52(5): 697-700.
- [8] Kelley-Clarke B, De Leon-Vazquez E, Slain K, et al. Role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus C-terminal LANA chromosome binding in episome persistence [J]. *J Virol* 2009 83(9): 4326-37.
- [9] Kelley-Clarke B, Ballesteros M E, Komatsu T, et al. Kaposi's sarcoma herpesvirus C-terminal LANA concentrates at pericentromeric and peri-telomeric regions of a subset of mitotic chromosomes [J]. *Virology*, 2007 357(2): 149-57.
- [10] Matsumura S, Persson L M, Wong L, et al. The latency-associated nuclear antigen interacts with MeCP2 and nucleosomes through separate domains [J]. *J Virol* 2010 84(5): 2318-30.
- [11] Kaul R, Verma S C, Robertson E S. Protein complexes associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA [J]. *Virology*, 2007 364(2): 317-29.
- [12] Verma S C, Cai Q, Kreider E, et al. Comprehensive analysis of LANA interacting proteins essential for viral genome tethering and persistence [J]. *PLoS One*, 2013 8(9): e74662.
- [13] Xiao B, Verma S C, Cai Q, et al. Bub1 and CENP-F can contribute to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome persistence by targeting LANA to kinetochores [J]. *J Virol* 2010 84(19): 9718-32.

Preparation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cell antigen tablets

Wen Zhi¹, Zhou Chang¹, Hua Wei², et al

(¹Dept of Microbiology, ²The Second Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To prepare Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) cell antigen tablets and verify their effectiveness, providing a feasible method for the detection of KSHV serum samples. **Methods** BCBL-4 cells stably expressing KSHV nuclear-associated antigen (LANA) were cultured. BCBL-4 cells were cells infected with KSHV and contained the KSHV gene in their genome. LANA is a protein that is highly expressed on the nucleus of a host cell. When the cells were vigorously viable and in good condition, the cells were collected and fixed to the

网络出版时间: 2020-9-4 13:57 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1448.013.html>

牙髓干细胞与血管周细胞性能比较研究

吴文婧, 丁如愿, 张菁, 张红艳, 胡露露, 李頌

摘要 目的 比较人牙髓干细胞(DPSCs)与血管周细胞相关性能,研究是否可以用DPSCs取代血管周细胞用于血管再生。方法 比较DPSCs和血管周细胞2种细胞成骨、成神经多向分化潜能。Matrigel三维培养技术评价DPSCs和血管周细胞稳定血管样结构的能力。Transwell试验评价DPSCs和血管周细胞的迁移能力和对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)迁移行为的影响。结果 DPSCs和血管周细胞呈相似的形态,经诱导后均可向成骨和成神经分化。2种细胞在Matrigel基质胶上与HUVEC共培养均能建立稳定的管腔样结构。在Transwell试验中,DPSCs和血管周细胞均表现类似的趋化能力。结论 DPSCs具有与血管周细胞相似的形态和功能特征,可以尝试用于体外血管再生。

关键词 周细胞; 牙髓干细胞; 细胞迁移; 成血管; 分化

中图分类号 R 322.12; R 322.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)10-1545-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.013

血管新生是组织修复的基础,血管新生异常常常影响机体损伤的正常愈合。血管由内衬血管壁的内皮细胞层和血管周细胞组成。研究^[1]表明,在血管形成过程中,首先由增殖的血管内皮细胞形成管腔样结构,然后血管周细胞迁移聚集,2种细胞共同调节血管的稳定性。周细胞在全身毛细血管和微血

管周围广泛分布,能够稳定血管结构,对血管的发育以及重塑具有重要作用。然而,现阶段分离血管周细胞还有一定的困难,这限制了其在体外血管重建中的运用。有研究^[2-4]报道,来源于脑组织、脐带、脂肪等的间充质干细胞和血管周细胞有许多相似之处,这些间充质干细胞在细胞表型、基因表达和分化能力等方面与血管周细胞有着高度的相似性。但是,这些组织来源的间充质干细胞获取困难。相对来说,来源于牙髓的牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)具有无创伤、易于分离、增殖率高等优势,可以从第三恒磨牙、正畸牙或其他原因拔除的健康牙的牙髓组织中分离培养获得,而不受伦理问题的影响。在该研究中,选择血管稳定能力、迁移功能和干性分化潜能作为评价标准,比较DPSCs和血管周细胞之间的相似性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 原代血管周细胞和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)(美国ScienCell公司); Matrigel基质胶(美国BD公司); 周细胞培养基(美国ScienCell公司)和ECM培养基(Lonza公司); Transwell细胞小室(美国BD公司); DMEM培养基(美国HyClone公司); Dispase酶和I型胶原酶(美国Sigma公司); CO₂恒温孵箱(英国Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 DPSCs的分离培养与鉴定 取临床小于25岁健康患者因正畸或阻生拔除健康无龋的牙齿,拔出后立即放入含5%双抗PBS中,摇晃冲掉牙根表面血迹,立即冰盒保存,送至实验室。4 h内将牙齿

2020-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81400497)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 口腔疾病研究安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 吴文婧, 女, 硕士研究生;

李頌, 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 3197053337@qq.com;

胡露露, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: queenyhoo@yeah.net

pre-treated antigen tablets with 4% paraformaldehyde. After blocking, incubation of the serum to be tested and incubation of the fluorescent secondary antibody, the results were observed by immunofluorescence microscopy. **Results** The fluorescence of the fluorescent secondary antibody was observed in the serum samples of patients infected with KSHV by immunofluorescence technique, while the fluorescence of the secondary antibody was not observed by the specimens not infected with KSHV. **Conclusion** The cell antigenic tablets of KSHV which can detect serum have been successfully prepared, which provides a method for further studying the epidemiology of KSHV.

Key words Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; LANA; cell antigenic tablets; immunofluorescence