

· 实验研究 ·

人巨细胞病毒感染对 HEL 细胞周期及 Cdt1 表达的影响

陈平洋¹, 闫淑媛¹, 邱梅冰¹, 谢宗德¹, 刘水平²

(1. 中南大学湘雅二医院新生儿科; 2. 中南大学湘雅医学院微生物教研室, 湖南 长沙 410001)

[摘要] 目的 研究人巨细胞病毒(HCMV)感染对人胚肺成纤维(HEL)细胞周期及复制允许因子 Cdt1 表达的影响,探讨 HCMV 感染可能的发病机制。**方法** 用血清饥饿法同步化 HEL 细胞于 G₀/G₁ 期,用 HCMV 感染同步化的 HEL 细胞作为感染组($n = 10^6$),同时设模拟感染组为对照组($n = 10^6$)。于感染后 12, 24, 48, 72, 96 h 收获细胞。流式细胞术测细胞周期; RT-PCR 法检测 Cdt1 mRNA 的表达水平。**结果** ①模拟感染组在感染后 12 h, 24 h 时处于 G₁ 期细胞比感染组明显增多,两组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。②两组 Cdt1 mRNA 表达水平在 12 h, 24 h 和 48 h 时差异均有显著性($P < 0.05$)。模拟感染组 Cdt1 mRNA 表达水平的高峰出现在感染后 12 h,而感染组的高峰则出现在感染后 48 h。**结论** ①HCMV 感染影响了 HEL 细胞周期,使大部分细胞停滞在 G₁ 期。②HCMV 感染使 HEL 细胞复制允许因子 Cdt1 mRNA 的表达水平迟滞。③HCMV 感染可能通过影响复制允许因子 Cdt1 的生成而干扰宿主细胞周期,影响宿主细胞 DNA 合成,导致器官功能障碍。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(6): 580-582]

[关键词] 巨细胞病毒感染; HEL 细胞; 细胞周期; 复制允许因子 Cdt1

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0580-03

Influence of human cytomegalovirus infection on cell cycle and replication licensing factor Cdt1 in human embryonic lung fibroblastic cells

CHEN Ping-Yang, YAN Shu-Yuan, QIU Mei-Bing, XIE Zong-De, LIU Shui-Ping. Division of Neonatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Email: wycpyfu@163.com)

Abstract: Objective To study the influence of human cytomegalovirus (HCMV) infection on cell cycle and the expression of replication licensing factor Cdt1 in human embryonic lung fibroblastic (HEL) cells and to explore the pathogenesis of HCMV infection. **Methods** HEL cells were synchronized in the G₀/G₁ phase by the serum starvation method. The synchronized HEL cells were infected with HCMV, and those that were not subjected to HCMV infection were used as the control group. The HEL cells were harvested at 12, 24, 48, 72 and 96 hrs of HCMV infection. The cell cycle of HEL cells was detected by the flow cytometry. The expression of Cdt1 mRNA in HEL cells was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The cells in the G₁ phase in the control group was significantly more than in the HCMV-infected group 12 and 24 hrs after infection ($P < 0.01$). The expression of Cdt1 mRNA in the HCMV-infected group was significantly lower 12 and 24 hrs after infection but increased significantly 48 hrs after infection compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of Cdt1 mRNA reached a peak at 12 hrs of infection in the control group, but at 48 hrs of infection in the HCMV-infected group, which markedly lagged behind the control group. **Conclusions** HCMV infection arrests the cell cycle of HEL cells at the G₁ phase. HCMV infection makes Cdt1 expression delay. HCMV infection can interfere cell cycle of HEL cells possibly through affecting the expression of Cdt1. [Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6): 580-582]

Key words: Cytomegalovirus infection; Human embryonic lung fibroblastic cell; Cell cycle; Replication licensing factor Cdt1

人巨细胞病毒(HCMV)感染在人群中非常普遍,据统计,我国人群感染率已高达 80%~95%,世界人口中 60%~80% 有感染史^[1]。主要表现为隐性感染或潜伏感染。先天性宫内感染或围生期感染 HCMV,可累及身体的各个组织器官^[2,3],造成死胎、流产、胎儿畸形、脑钙化、耳聋、智力低下和发育迟缓等病理损害^[4,5]。近年来,有关 HCMV 感染的

发病机制的研究有了一定的进展,国外最近有研究认为 HCMV 感染后可能引起宿主细胞周期的改变,通过干扰宿主细胞周期,影响宿主细胞 DNA 合成,导致器官功能障碍^[6],国内尚未见相关报道。本课题旨在研究 HCMV 感染对人胚肺成纤维(HEL)细胞周期及对复制允许因子 Cdt1 的影响,从细胞周期及其调控因子水平探讨 HCMV 感染可能的发病机制。

[收稿日期] 2007-01-18; [修回日期] 2007-02-10

[作者简介] 陈平洋,女,教授,主任医师,硕士生导师。主攻方向:新生儿疾病的诊治。

1 材料与方法

1.1 用 HCMV 感染 G₀/G₁ 期同步的 HEL 细胞

取第 15~30 代 HEL 细胞按血清饥饿法^[7,8]予含 0.5% 新生小牛血清的 DMEM 培养基 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 再以 100 TCID₅₀^[9] 的 HCMVAD169 株等量吸附感染 1.5 h, 去上清, 加入细胞生长液, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养作为感染组 ($n = 10^6$), 分别取感染后 12, 24, 48, 72 h 和 96 h 细胞用于实验。同时设模拟感染组 ($n = 10^6$), 即吸附时以不含 HCMV 的病毒稀释液模拟感染。

1.2 PI 染色, 流式细胞术测定 HEL 细胞周期

将血清饥饿后细胞和两组感染后 12 h, 24 h 培养瓶中细胞按流式细胞术流程测定细胞周期。

1.3 RT-PCR 法检测 Cdt1 基因在两组 HEL 细胞中的表达水平

1.3.1 PCR 引物设计 从 Genbank 获得人 Cdt1 基因及人 β -actin 序列, 用软件 Primer 5.0 设计引物, 并在网上作 BLAST 分析选取特异性最强的一对引物。所设计引物序列如下:

基因	引物序列	退火温度	产物大小
Cdt1-U	5'GTG CTC TGA AGG TGT CC 3'	61.6℃	273
Cdt1-L	5'CGG AGA GGA GCA GCA GGT G 3'	61.6℃	
β -actin-U	5'CAT CCT GCG TCT GGA CCT 3'	62.7℃	480
β -actin-L	5'TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG 3'		

1.3.2 检测 Cdt1 基因在两组 HEL 细胞中的表达水平 将两组感染后各时间点细胞按 TRIzol 试剂盒 (BBI 公司) 操作程序提取总 RNA, DNase I (RNase-free) 处理总 RNA, 分装冻存于 -70℃ 冰箱, 将所提取的总 RNA 按逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 将总 RNA 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, β -actin 为内对照进行 PCR 扩增, 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30s, 35 个循环; 72℃ 再延伸 7 min。

1.4 统计学分析

1.4.1 细胞周期结果分析 对两组处于 G₁ 期的细胞数用统计学软件 SPSS 11.5 软件进行 χ^2 检验。

1.4.2 RT-PCR 产物分析 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后采用 Phar Bio 扫描、摄像, 并运用 Image Master VDS 软件通过光密度扫描计算各 OD 峰值及

OD 平均值, 按公式将同泳道 Cdt1 mRNA 与 β -actin mRNA OD 平均值相比后, 视为各泳道 Cdt1 mRNA 的相对表达水平, 将其以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 11.5 软件进行两样本 t 检验。目的片断的相对表达量 = 目的片断的平均 OD 值/ β -actin 的平均 OD 值 \times 100。

2 结果

2.1 两组 HEL 细胞感染后 12, 24 h 的细胞周期

模拟感染组 HEL 细胞在感染后 12 h 时有 65.7% 的细胞处于 G₁ 期, 26.4% 细胞处于 S 期; 24 h 时有 43.8% 的细胞处于 G₁ 期, 24.6% 细胞处于 S 期。感染组 HEL 细胞在感染后 12 h 时有 70.4% 的细胞处于 G₁ 期, 22.4% 细胞处于 S 期; 24 h 时有 69.9% 的细胞处于 G₁ 期, 12.4% 细胞处于 S 期。

2.2 两组感染后 12, 24 h 处于 G₁ 期的细胞数比较

感染后 12 h 和 24 h 时两组处于 G₁ 期的细胞数差异均有显著性, 感染组较模拟感染组明显增多 (见表 1)。

表 1 12 h, 24 h 时感染组和模拟感染组处于 G₁ 期的细胞数 (%)

组别	细胞总数	G ₁ 期细胞数	
		12 h	24 h
感染组	1000000	704000 (70.40)	699000 (69.9)
模拟感染组	1000000	657000 (65.7)	438000 (43.8)
合计	2000000	1361000 (68.1)	1137000 (56.9)

两组两个时段比较, 均 $P < 0.01$

2.3 两组 HEL 细胞各时间点 Cdt1 mRNA 表达水平比较

两组 Cdt1 mRNA 表达水平于 12 h, 24 h 和 48 h 差异均有显著性, 12 h 和 24 h 时感染组较模拟感染组明显降低, 48 h 时感染组较模拟感染组明显升高。模拟感染组在感染后 12 h 时 Cdt1 mRNA 表达水平最高, 后逐渐下降, 至 72 h 时达最低水平, 96 h 时又稍有回升, 但未达到 12 h 时表达水平, 仅与 48 h 时表达水平相当; 感染组在感染后 12 h 时 Cdt1 mRNA 表达水平较低, 24 h 时稍有升高, 48 h 达最高峰, 48 h 后至 72 h 急剧下降, 96 h 时大致维持 72 h 水平 (见表 2)。

表 2 感染组和模拟感染组各时间点 Cdt1 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
感染组	62.214 \pm 3.787	63.422 \pm 2.449	76.313 \pm 8.660	51.538 \pm 11.656	51.712 \pm 5.557
模拟感染组	71.915 \pm 4.302	66.833 \pm 2.214	54.555 \pm 7.177	48.994 \pm 7.602	55.677 \pm 3.940
t	4.146	2.531	-4.738	-0.448	1.426
P	<0.01	<0.05	<0.01	>0.05	>0.05

3 讨论

本课题采用血清饥饿法将 HEL 细胞同步在 G_0/G_1 期。将两组感染后 12 h 和 24 h 的细胞分别消化处理后送流式细胞仪检测细胞周期。结果显示,两组在感染后 12 h 和 24 h 时位于 G_1 期的细胞数差异有显著性,感染组在感染后 12 h 和 24 h 时位于 G_1 期的细胞数均较模拟感染组多。结果提示:感染组在感染后 12 h 和 24 h 时通过 G_1/S 限制点到达 S 期的细胞数量较模拟感染组少,故滞留在 G_1 期的细胞数量较模拟感染组增多。说明 HCMV 感染影响了 HEL 细胞周期,使 HEL 细胞周期滞后。

Cdt1 即 Cdc10 依赖性转录因子 1 (Cdc10 dependent transcript 1),其启动子具有特异性 DNA 序列结合因子的识别位点,是细胞复制前复合体 (Pre-RC) 的重要组成成分之一。Pre-RC 是一种高度保守多蛋白复合物,其形成过程被称为“复制许可”(Replication Licensing),是 S 期 DNA 复制的必要条件,缺乏其中的关键成分则 Pre-RC 不能形成、细胞将停滞于 G_1 期、DNA 合成障碍。

用 RT-PCR 半定量法检测两组感染后各时间点 Cdt1 mRNA 的表达水平。结果发现,模拟感染组 HEL 细胞 12 h 时 Cdt1 mRNA 表达水平最高,说明未感染 HCMV 的 HEL 细胞再次用含正常血清的培养基培养后,大多数细胞重新进入细胞周期,Cdt1 蛋白生成,Pre-RC 装配形成,利于细胞通过 G_1/S 限制点,进入 S 期。24 h,48 h 及 72 h 时模拟感染组 HEL 细胞 Cdt1 mRNA 表达水平逐渐降低,推测在这几个时期,大部分细胞已逐渐通过 G_1/S 限制点,到达 S 期完成细胞 DNA 复制、进入 G_2 期及 M 期,Cdt1 蛋白已通过磷酸化等途径降解,而滞留在 G_1 期的细胞逐渐减少。96 h 时 Cdt1 mRNA 表达水平又有回升,说明有一部分细胞已通过 M 期,重新进入下一个细胞生长周期。感染组在感染后 12 h 时 Cdt1 mRNA 表达水平较模拟感染组低,24 h 时稍有升高,但仍较模拟感染组低,48 h 时其 Cdt1 mRNA 表达水平达最高峰,明显高于模拟感染组。48 h 后感染组 Cdt1 mRNA 表达水平急剧下降至 72 h,96 h 时大致维持在 72 h 水平。模拟感染组 Cdt1 mRNA 表达水平的高峰出现在感染后 12 h,而感染组的高峰则出现在感染后 48 h,较模拟感染组明显滞后。提示 HCMV 感染 HEL 细胞后,影响了 Cdt1 基因转录,Cdt1 蛋白生成减少,从而影响了 Pre-RC 装配形成,

使细胞不能通过 G_1/S 限制点,细胞停滞在 G_1 期,同时激活 DNA 复制所必需的多种酶蛋白的细胞基因^[6,10],营造一个有利于 DNA 合成的细胞内环境,供 HCMV 自身利用,从而利于 HCMV DNA 复制、增殖。48 h 后,感染组 Cdt1 mRNA 表达水平降低,而模拟感染组自感染后 12 h 后即开始降低,这可能与感染 HCMV 后的 HEL 细胞通过 G_1/S 检测点,到达 S 期完成细胞 DNA 复制、进入 G_2 期及 M 期所需时间较模拟感染组延长有关。96 h 时感染组 Cdt1 mRNA 表达水平大致维持 72 h 水平,提示大部分细胞尚未进入下一个细胞周期,而模拟感染组此时已进入下一个细胞周期,证实 HCMV 感染能滞后 HEL 细胞周期。

本实验结果证实了 HCMV 感染 HEL 细胞后对其细胞周期及复制允许因子 Cdt1 的影响。提示 HCMV 感染的发病机制可能为:HCMV 通过影响复制允许因子 Cdt1 的生成及 Pre-RC 的装配而干扰宿主细胞周期,影响宿主细胞 DNA 合成,导致器官功能障碍。

[参 考 文 献]

- [1] 陈平洋,谢宗德,王涛.更昔洛韦治疗新生儿先天性巨细胞病毒感染临床研究[J].中国医师杂志,2003,5(4):502-504.
- [2] 陈平洋.小儿巨细胞病毒感染的诊断与治疗[J].湖南医学,2001,18(5):366-368.
- [3] Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause[J]. Gene, 2000, 247(1-2):1-15.
- [4] Fiano V, Ghimenti C, Schiffer D. Expression of cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors in oligodendrogliomas in humans[J]. Neurosci Lett, 2003, 347(2):111-115.
- [5] Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit[J]. J Clin Virol, 2006, 35(2):226-231.
- [6] 闫淑媛,陈平洋.人巨细胞病毒感染的实验室诊断研究进展[J].国外医学.儿科学分册,2005,32(5):284-287.
- [7] Biswas N, Sanchez V, Spector DH. Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication[J]. J Virol, 2003, 77(4):2369-2376.
- [8] Wiebusch L, Uecker R, Hagemeyer C. Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin[J]. EMBO Reports, 2003, 4(1):42-46.
- [9] Gibson W. Structural and nonstructural proteins of strain colbum cytomegalovirus[J]. Virology, 1981, 111(7):516-537.
- [10] Besbas N, Bayrakci US, Kale G, Cengiz AB, Akcoren Z, Akinci D, et al. Cytomegalovirus-related congenital nephrotic syndrome with diffuse mesangial sclerosis[J]. Pediatr Nephrol, 2006, 21(5):740-742.

(本文编辑:吉耕中)