

◇ 基础医学研究 ◇

水痘 - 带状疱疹病毒糖蛋白 E 胞外域基因的真核细胞稳定表达及其免疫反应性的初步研究

伊兴旭¹, 陈敬贤^{1,2}, 甘霖¹, 王明丽¹

摘要 目的 真核细胞稳定表达水痘 - 带状疱疹病毒 (VZV) 糖蛋白 E (gE) 的胞外域基因, 应用 gE 抗原建立 VZV 感染的血清学试验来评价 VZV 疫苗的免疫效果。方法 构建含有 VZV gE 胞外域基因的真核表达质粒 pCDNA3.1-gE, 测序后脂质体转染 COS-7 细胞, 经 G418 筛选出稳定表达 VZV gE 的细胞株。采用 RT-PCR 法检测 VZV gE 的 mRNA, Western blot 和间接免疫荧光法检测 gE 的免疫反应性, 表达产物经 Ni²⁺-NTA 柱纯化后包被 ELISA 板, 对 127 份 0~10 岁正常儿童血清中 VZV-IgG 抗体水平进行检测。结果 成功筛选出能够稳定表达 VZV gE 胞外域基因的 COS-7 细胞株, RT-PCR 检测到 gE 的 mRNA, 经 Western blot 和间接免疫荧光鉴定, gE 具有明显的免疫反应性, COS-7 细胞株和其培养上清液中均有 gE 融合蛋白, 表达量约为 0.632 mg/ml, 纯度约为 90%。ELISA 实验检测了 127 份 0~10 岁儿童血清中 VZV-IgG 抗体, 总阳性率为 81.89%, 特异度和灵敏度分别为 93.75% 和 88.24%。结论 本实验获得稳定高效表达 VZV gE 胞外域基因的 COS-7 细胞株, 建立的 ELISA 血清学检测方法有助于 VZV 感染的流行病学研究和对易感人群 VZV 感染的诊断和预防。

关键词 水痘 - 带状疱疹病毒; 糖蛋白 E; 转染; 真核稳定表达; 血清学试验

中图分类号 R 373.1; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0259-06

水痘 - 带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 属疱疹病毒 α 亚科, 为双链 DNA 病毒, 原发感染引起水痘, 患儿的全身症状和皮疹消退以后有少量残存的病毒会终身潜伏于宿主的脊髓后根神经节、颅神经节和肠道神经节的神经细胞中^[1-2]。日后当机体免疫力降低时, 潜伏在神经细胞中的病毒

会被再激活, 导致疼痛性的皮肤疾病—带状疱疹^[3-4]。VZV 糖蛋白 E (glycoprotein E, gE) 由病毒的 ORF68 基因编码, 由 872 个碱基组成的该基因位于 VZV 基因组短片段区, 编码的 gE 含 623 个氨基酸 (amino acid, AA)。其 C 端是 17AA 的跨膜疏水区, N 端为 544AA 含有信号肽的亲水胞外区^[5]。gE 存在于病毒颗粒的表面和受感染细胞的表面和胞质内, 是生成感染性病毒颗粒的必需糖蛋白, 是病毒囊膜和宿主细胞膜上含量最丰富的包膜糖蛋白^[6-7], 也是细胞免疫和体液免疫应答的重要靶点^[8-9]。该实验在 COS-7 细胞中稳定表达 VZV gE 胞外域蛋白, 为其在临床上的应用研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和菌株 逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; 脂质体转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 鼠抗人 VZV gE 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (H+L)、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司; DH-5 α 感受态细胞由本室制备并保存。

1.1.2 细胞、病毒和血清标本 人胚胎成纤维细胞 (human embryo fibroblast, HF) 为本室制备并保存, COS-7 细胞购自美国 ATCC 公司。VZV 标本采自安徽医科大学第一附属医院皮肤科门诊的带状疱疹患者的皮肤水疱液。127 份 0~10 岁正常儿童血清标本和 30 份带状疱疹患者的阳性血清标本均采自安徽医科大学第一附属医院检验科。30 份 VZV 抗体已知阴性血清由本室从自然人群中筛选与保存。交叉反应对照抗体为本实验室用 1-型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus-1, HSV-1)、2-型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus-2, HSV-2) 和人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 的全病毒免疫小鼠制备的抗血清。

2014-11-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30872253); 安徽省科技厅科技攻关项目 (编号: 08010302179); 校企合作实践教育基地 (编号: 2012sjjd014)

作者单位: ¹安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

²哥伦比亚大学病理与细胞生物系, 纽约 10032

作者简介: 伊兴旭, 男, 硕士研究生;

王明丽, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1952987441@qq.com

1.2 方法

1.2.1 病毒分离与鉴定 参照文献^[10]进行。即取 10 μl 从水痘-带状疱疹患者皮肤采集的水疱液,接种单层 HF 细胞后置 37 °C、5% CO₂ 温箱培养,待出现特征性细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)后,取少量细胞涂片,应用 VZV gE 单克隆抗体,通过间接免疫荧光染色鉴定。

1.2.2 病毒 DNA 的提取 将分离的 VZV 株接种至 HF 细胞,待 CPE 达 80% 以上时,用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)提取总 DNA,并经微量定量仪测定浓度后置 -20 °C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 VZV gE 胞外域基因 参照文献^[11]设计引物,上游引物(含 XhoI 酶切位点): 5'-AATAATCTCGAGACCATGGGACAGTTAATAAACCTGT-3'; 下游引物(含 Hind III 酶切位点): 5'-AG-GCAGAAGCTTGGCATATCGTAGAAGTGGTGACG-3'。以病毒 DNA 为模板,PCR 扩增出 VZV gE 胞外域基因片段(1 617 bp)。反应条件为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 50 s; 60 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 2 min; 共 39 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4 重组质粒 pCDNA3.1-gE 的构建及鉴定 将 PCR 产物与 pCDNA3.1 真核表达载体(5 400 bp), 分别用 XhoI、Hind III 进行酶切,凝胶回收,T4 连接酶连接 gE 基因片段与 pCDNA3.1 载体。转化 DH-5α 大肠杆菌感受态细胞中,涂 LB/AMP 板,挑取单个菌落,扩增后提取质粒,经酶切鉴定后,送公司测序。

1.2.5 质粒的转染 取重组质粒 pCDNA3.1-gE 和 pCDNA3.1 空载体用脂质体介导的方法分别转染 COS-7 细胞,按照 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Inc.) 说明书进行操作。转染 48 h 后加入 G418 进行筛选,约 14 d 后,可见有单克隆细胞形成,然后对其扩增培养。

1.2.6 RT-PCR 检测 gE 的 mRNA 表达 设置转染 gE 基因的 COS-7 细胞,VZV 感染的 HF 细胞(阳性对照),转染 pCDNA3.1 空载体的 COS-7 细胞(阴性对照)。以 β-actin 作为内参。分别提取各组细胞的总 RNA,按照 Thermo Fisher 逆转录试剂盒说明书,采用随机引物将总 RNA 逆转录成 cDNA,再进行 PCR 扩增。引物和扩增条件与构建重组质粒时相同。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,选择高表达 gE 基因的单克隆细胞扩增培养。

1.2.7 Western blot 鉴定 gE 收集正常 COS-7 细胞

和稳定转染 gE 基因的 COS-7 细胞及其培养上清液,以 VZV 感染的 HF 细胞为阳性对照,加蛋白上样缓冲液煮沸 5 min,经 SDS-PAGE 电泳分离后,转移至 PVDF 膜上。用鼠抗人 VZV gE 单克隆抗体(1:6 000)作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:5 000)作为二抗,检测 gE 蛋白。

1.2.8 间接免疫荧光鉴定 gE 取稳定转染 gE 基因的 COS-7 细胞铺 6 孔板做细胞爬片处理,待细胞汇合度约 70% 进行染色。用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min,1% Triton X-100 处理细胞 10 min,20% 小牛血清封闭 1 h。加入 1:400 稀释的鼠抗人 VZV gE 单克隆抗体,室温孵育 1 h。继用 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG-FITC,室温孵育 30 min。最后用 0.5 μg/ml DAPI 染色,经 PBS 洗涤以后用 50% 甘油封片,荧光显微镜下观察结果。

1.2.9 融合蛋白的纯化及鉴定 收集表达 gE 融合蛋白的细胞悬液,超声破碎,12 000 r/min 离心 15 min。弃细胞碎片,取上清液透析,Ni²⁺-NTA 柱纯化,继后与纯化前蛋白作纯度比较,以 VZV 感染的 HF 细胞做阳性对照,用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。

1.2.10 ELISA 检测最佳包被浓度和最佳血清稀释度的确定 用包被液稀释纯化后的 gE,稀释度分别为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600,设两列复孔。按 1:50、1:100、1:200、1:400 稀释血清,设 2 行复孔。用 PBS 稀释二抗(1:10 000)。经棋盘滴定后,用酶标仪测定双波长 450 nm 和 630 nm 校准后的光密度(optical density, OD),计算 P/N 值。

1.2.11 酶标二抗最佳浓度的优化 用 gE 抗原最佳包被浓度包板后,按最佳一抗浓度稀释血清,每两行设置空白对照组,阴性血清对照组和阳性血清对照组。每列按 1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:15 000、1:20 000、1:30 000 对二抗 IgG-HRP 进行稀释,测定各组的 OD 值,计算 P/N 值,P/N 值最大时对应的二抗稀释度即为最佳二抗稀释度。

1.2.12 gE ELISA 阴性和阳性临界值的确定 将本室从自然人群中筛选出的 30 份 VZV 抗体阴性的血清进行间接 ELISA 检测,计算其 OD 的平均值(\bar{x})和标准差(s)。OD 值 $> \bar{x} + 3s$ 判断为阳性;OD 值 $< \bar{x} - 3s$ 判断为阴性。

1.2.13 gE ELISA 特异性和敏感性的鉴定 以本室制备的 HSV-1、HSV-2 和 HCMV 全病毒免疫小鼠的抗血清作为待检血清,对 gE ELISA 方法的特异性进行

鉴定。以已知阳性血清和已知阴性血清作为待检血清,对 gE ELISA 方法的特异度和敏感度进行测定。

1.2.14 血清标本的检测 按照优化的反应条件行间接 ELISA 法检测 127 份 0~10 岁儿童血清标本,同时设置阳性血清对照组和阴性血清对照组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,定性数据以 % 表示。采用秩和检验、Kappa 一致性检验进行分析。

2 结果

2.1 VZV 株的分离培养与鉴定 接种带状疱疹患者的皮肤水疱液的 HF 细胞,培养 3~5 d 后,细胞表面出现特征性 CPE。见图 1。继后通过间接免疫荧光染色鉴定。见图 2。

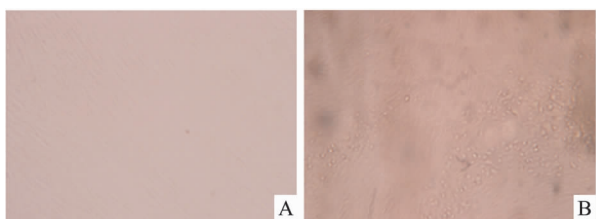


图 1 HZ 患者皮肤水疱液接种至 HF 细胞后出现细胞病变结果 $\times 200$
A: 正常 HF 细胞; B: 3~5 d 后细胞病变

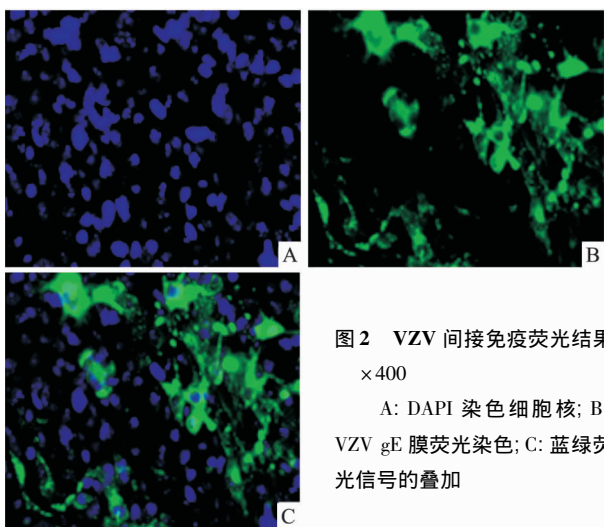


图 2 VZV 间接免疫荧光结果 $\times 400$
A: DAPI 染色细胞核; B: VZV gE 膜荧光染色; C: 蓝绿荧光信号的叠加

2.2 目的基因与重组质粒的鉴定 PCR 扩增 gE 胞外域基因的产物和重组质粒 pCDNA3.1-gE 经双酶切后的产物经琼脂糖凝胶电泳,均可见 1 617 bp 的特异性目的条带。见图 3。目的基因片段经测序后,用 BLAST 法与 GenBank 数据库比对,序列一致。

2.3 RT-PCR 检测 gE 的 mRNA 表达 提取稳定转染 gE 胞外域基因的 COS-7 细胞,和 pCDNA3.1

空载体转染的 COS-7 细胞(阴性对照)、正常 COS-7 细胞(阴性对照)和 VZV 感染的 HF 细胞(阳性对照)的总 RNA 进行 RT-PCR 鉴定。结果显示,稳定转染 gE 胞外域基因的 COS-7 细胞组扩增出大小为 1 617 bp 的特异性条带。见图 4A。

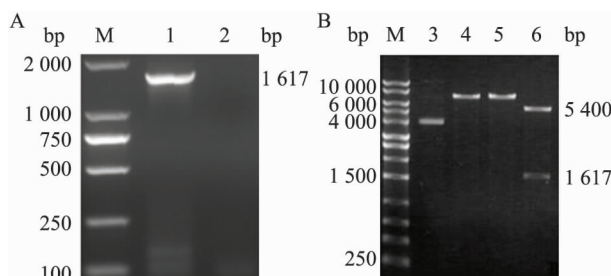


图 3 gE 胞外域基因 PCR 扩增和重组质粒单、双酶切鉴定

A: gE 胞外域基因 PCR 扩增图; B: 重组质粒单、双酶切鉴定图; M: Marker; 1: 目的基因片段; 2: 以 ddH₂O 作为模板的阴性对照; 3: 重组质粒; 4: 重组质粒经 XhoI 酶切; 5: 重组质粒经 HindIII 酶切; 6: 重组质粒经双酶切

2.4 Western blot 鉴定 gE 分别收集正常细胞、稳定转染 gE 胞外域基因的 COS-7 细胞及其培养上清液,进行 Western blot 鉴定。结果可见约 59 ku 的特异性目的条带。见图 4B。

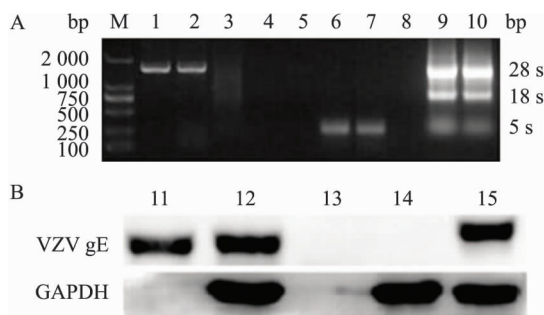


图 4 RT-PCR 检测 gE 的 mRNA 和 Western blot 鉴定 gE 胞外域蛋白

A: 阳性 COS-7 细胞 gE 的 mRNA 表达; B: gE 蛋白表达情况; M: Marker; 1: 转染 pCDNA3.1-gE 的 COS-7 细胞; 2: VZV 感染的 HF 细胞; 3: 转染 pCDNA3.1 空载体的 COS-7 细胞; 4: 正常 COS-7 细胞; 5: 未加模板 PCR 阴性对照; 6、7: β -actin 内参阳性对照; 8: β -actin 内参阴性对照; 9、10: 阳性 COS-7 细胞提取的总 RNA; 11: 转染 gE 基因的 COS-7 细胞培养上清液; 12: 转染 gE 基因的 COS-7 细胞沉淀; 13: 正常 COS-7 细胞培养上清液; 14: 正常 COS-7 细胞沉淀; 15: VZV 感染的 HF 细胞沉淀

2.5 间接免疫荧光鉴定 gE 经间接免疫荧光检测,稳定转染 gE 基因的 COS-7 细胞的细胞膜呈现典型的胞膜糖蛋白着色,表明目的蛋白确实为 VZV gE 蛋白,并具有免疫反应性。见图 5。

2.6 目的蛋白的纯化鉴定 纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 鉴定,纯度约 90%。见图 6A。Western blot 鉴定可见约 59 ku 的特异性目的条带。见图 6B。

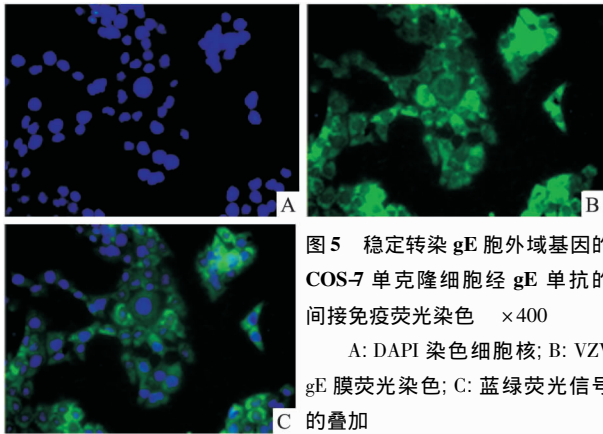


图5 稳定转染 gE 胞外域基因的 COS-7 单克隆细胞经 gE 单抗的间接免疫荧光染色 ×400
A: DAPI 染色细胞核; B: VZV gE 膜荧光染色; C: 蓝绿荧光信号的叠加

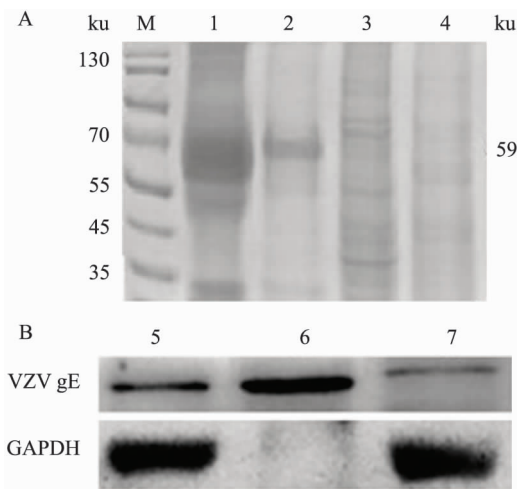


图6 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定纯化后的 gE 胞外域蛋白

A: gE 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定图; B: gE 融合蛋白纯化后 Western blot 鉴定图; M: Marker; 1: 纯化前总蛋白; 2: 纯化后 gE 胞外域蛋白; 3: VZV 感染的 HF 细胞; 4: 转染 pCDNA3.1 空载体; 5: 纯化前 gE 蛋白; 6: 纯化后 gE 蛋白; 7: VZV 感染的 HF 细胞

2.7 ELISA 检测结果

2.7.1 包被抗原浓度、血清和二抗稀释度的确定 经棋盘滴定后,用酶标仪测定各组 OD 值,计算抗原和一抗的最佳稀释度均为 1 : 100。见表 1。二抗的最佳稀释度为 1 : 5 000。

2.7.2 ELISA 阴性和阳性临界值确定 采用上述方法对 30 份阴性血清进行检测,其 OD 值为 0.102 ± 0.086,因此,阴性和阳性临界值为 0.360。

2.7.3 间接 ELISA 法的特异性和敏感性 首先对 HSV-1、HSV-2 和 HCMV 的抗血清进行 VZV-IgG 抗

表 1 棋盘滴定法测阳性血清和阴性血清的 OD 值比值(P/N)

血清稀释度	gE 蛋白稀释度					
	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600
1 : 50	74.1	106.0	88.2	80.7	104.1	51.2
1 : 100	117.2	275.6	52.6	85.3	117.7	45.1
1 : 200	34.6	98.3	103.9	16.9	25.6	53.2
1 : 400	2.34	5.76	1.73	3.52	6.45	5.38

体检测,结果均为阴性,说明该 ELISA 法的特异性良好。检测 30 份已知阳性血清,结果显示,阳性数为 26;阴性数为 4。检测 30 份已知阴性血清,结果显示,阳性数为 2;阴性数为 28。因此,特异度为 93.75% (30/32),敏感度为 88.24% (30/34)。采用 Kappa 一致性检验分析,Kappa 值为 0.8,显示该方法特异度和灵敏度较好。

2.8 儿童血清 VZV-IgG 抗体的阳性率 采用上述方法检测 127 份儿童血清中 VZV-IgG 抗体。结果显示,总体阳性率为 81.89%。按照年龄分组统计 0 ~ 1 岁、1 ~ 5 岁、5 ~ 10 岁儿童血清中 VZV 抗体阳性率分别为 77.36%、83.33%、86.84%,可见随着儿童年龄的增长,VZV 抗体阳性率呈上升趋势。采用秩和检验分析,各年龄组之间阳性率差异无统计学意义($Z = 1.402, P = 0.496$)。

3 讨论

基因工程中许多在细菌中合成的蛋白,由于折叠方式不正确或折叠效率不高,以及缺乏必要的加工和修饰,如二硫键的形成、糖基化和磷酸化等,使得表达出的蛋白有时缺乏生物学活性或活性较低。而真核表达调控最明显的特征是能在特定时间和特定的细胞中激活特定的基因,从而实现目的蛋白预定、有序的转录和翻译^[12]。因此,如果需要表达具有生物学功能的分泌蛋白,往往需要真核表达系统,才有可能表达出具有高生物活性的蛋白质,从而有利于对一个完整的成熟蛋白的功能进行研究。

本研究经 Western blot 检测显示,转染 VZV gE 胞外域基因的细胞培养上清液和破碎后的细胞上清液中均分泌有 gE 融合蛋白。然而,细胞培养上清液中蛋白含量相对较低,需要培养大量细胞,提示真核细胞表达蛋白在翻译后进行必要的加工和修饰后,成熟的蛋白在分泌信号肽的作用下会自行分泌到胞外,但是其分泌的量多少与细胞的生存环境和生长状态有关,因此需要保证细胞生长状态的良好。本实验利用 COS-7 细胞作为目的基因的容纳细胞,筛选出稳定表达 gE 胞外域基因的 COS-7 细胞株,

表达产物纯化后获得纯度较高的 gE 蛋白,将该蛋白用于 ELISA 检测显示,抗原与其他疱疹病毒之间不存在交叉反应,说明重组抗原特异性良好。由于新生儿血清中通常带有来自母体的抗体,这些抗体大约 6 个月后逐渐消失,因此该实验对 1 岁以下儿童 VZV 抗体的检测结果中,一部分反映了母源 VZV 感染的情况。总体上看,随着儿童年龄的增长,VZV 抗体阳性率呈上升趋势,这与我国其他地区人群中 VZV 感染情况大体相一致^[13]。然而,目前水痘疫苗并没有纳入计划免疫接种的范围,水痘的自然感染率和流行病学特征并没有发生明显的改变^[14]。如果能将水痘疫苗列入计划免疫范围,将大大增加水痘疫苗的免疫接种覆盖率。在此基础上,适当的时候再加强免疫 1 次来保持疫苗接受者抵抗野生型 VZV 感染的能力,将会获得更好的预防效果。由于膜抗原荧光抗体试验检测法是目前被公认为能够反映 VZV 免疫状态的最为可靠的试验方法,是检测人群 VZV 免疫状态的“金标准”^[15]。目前,正在以膜抗原荧光抗体试验为对照系统,增加检测血清样本的数量,来进一步验证检测的方法,并期望为 VZV 感染的流行病学研究奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] Gershon A A, Gershon M D, Breuer J, et al. Advances in the understanding of the pathogenesis and epidemiology of herpes zoster [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(Suppl 1): S2-7.
- [2] Fusco D, Krawitz P, LaRussa P, et al. VZV meningitis following varicella vaccine [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(4): 275-7.
- [3] Oliver S L, Sommer M H, Reichelt M, et al. Mutagenesis of varicella-zoster virus glycoprotein I (gI) identifies a cysteine residue critical for gE/gI heterodimer formation, gI structure, and virulence in skin cells [J]. *J Clin Virol*, 2011, 85(9): 4095-110.
- [4] Leroux-Roels I, Leroux-Roels G, Clement F, et al. A Phase 1/2 clinical trial evaluating safety and immunogenicity of a varicella zoster glycoprotein E subunit vaccine candidate in young and older adults [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(8): 1280-90.
- [5] Arvin A M, Oliver S, Reichelt M, et al. Analysis of the functions of glycoproteins E and I and their promoters during VZV replication *In vitro* and in skin and T-cell xenografts in the SCID mouse model of VZV pathogenesis [J]. *Varicella-zoster Virus*, 2010, 342, 129-46.
- [6] Mo C, Lee J, Sommer M, et al. The requirement of varicella zoster virus glycoprotein E (gE) for viral replication and effects of Glycoprotein I on gE in melanoma cells [J]. *Virology*, 2002, 304(2): 176-86.
- [7] Grahn A, Studahl M, Nilsson S, et al. Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E is a serological antigen for detection of intrathecal antibodies to VZV in central nervous system infections, without cross-reaction to herpes simplex virus [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(8): 1336-42.
- [8] Dendouga N, Fochesato M, Lockman L, et al. Cell-mediated immune responses to a varicella-zoster virus glycoprotein E vaccine using both a TLR agonist and QS21 in mice [J]. *Vaccine*, 2012, 30(20): 3126-35.
- [9] Wang Z H, Gershon M D, Lungu O, et al. Essential role played by the C-terminal domain of glycoprotein I in envelopment of varicella-zoster virus in the trans-Golgi network: interactions of glycoproteins with tegument [J]. *J Virol*, 2001, 75(1): 323-40.
- [10] 陈敬贤. 诊断病毒学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 244-51.
- [11] Thomsson E, Persson L, Grahn A, et al. Recombinant glycoprotein E produced in mammalian cells in large-scale as an antigen for varicella-zoster-virus serology [J]. *J Virol Methods*, 2011, 175(1): 53-9.
- [12] Kenyon T K, Grose C. VZV ORF47 serine protein kinase and its viral substrates [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 342, 99-111.
- [13] 刘静静, 王明丽, 甘霖, 等. 应用膜抗原荧光抗体试验检测人群水痘-带状疱疹病毒血清抗体阳性率 [J]. *中华流行病学杂志* 2009, 30(4): 371-5.
- [14] 甘霖, 王明丽, 陈敬贤. 水痘减毒活疫苗的研究进展 [J]. *微生物与感染* 2009, 8(1): 40-4.
- [15] Breuer J, Schmid D S, Gershon A A. Use and limitations of varicella-zoster virus-specific serological testing to evaluate breakthrough disease in vaccinees and to screen for susceptibility to varicella [J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(Suppl 2): 147-51.

The immunoreactivity and the eukaryotic expression of extracellular domain gene against varicella-zoster virus

Yi Xingxu¹, Chen Jingxian^{1,2}, Gan Lin¹, et al

(¹Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pathology & Cell Biology, Columbia University, New York 10032)

Abstract Objective To express varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E (gE) extracellular domain in eukaryotic cells, and then use it to develop a serological test for diagnosis of VZV infection as well as for evaluation of

重组人内抑素对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

张晓明¹, 余建^{1,2}, 黄学应¹, 邓雪飞¹, 李小静³

摘要 目的 观察重组人内抑素(rhEndostatin)对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞(HSFs)增殖的影响,探讨rhEndostatin抑制HSFs增殖的相关机制。方法 制备兔耳增生性瘢痕(HS)模型,分离、培养并鉴定兔耳HSFs;应用四甲基偶氮唑盐(MTT)法和流式细胞仪分别检测rhEndostatin对HSFs增殖和周期的影响。结果 分离培养的兔耳细胞经波形蛋白免疫细胞化学染色检测呈阳性。rhEndostatin对HSFs增殖的抑制效应与浓度和作用时间呈依赖关系,测得IC₅₀值为100 mg/L。与正常对照组细胞相比,HSFs G₁期细胞比例减少($P < 0.01$) S期和G₂/M期细胞比例增加($P < 0.01$);与模型组细胞相比,rhEndostatin组细胞G₁期比例增加($P < 0.01$) S期和G₂/M期细胞比例减少($P < 0.01$)。结论 rhEndostatin可抑制兔耳HSFs增殖,该作用可能与其引起HSFs细胞周期G₁期阻滞相关。

关键词 重组人内抑素;增生性瘢痕;增殖;细胞周期;流式细胞术

中图分类号 R 587.1; R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)03-0264-05

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤创伤后组织过度修复引起的纤维增生性疾病,术后发病率可达40%~70%,烧伤后则高达91%;临床表现为凸于周围正常皮肤的异常增生,色红或粉红,多伴有瘙痒、疼痛等症状,不仅影响美观,还可发生瘢痕性挛缩,特别是造成关节严重功能障碍,给患者身心健康带来极大危害^[1-3]。其组织学特点是成纤维细胞过度增殖,胶原等细胞外基质大量合成、分泌和过度沉积,血管增生^[4]。内抑素是从小鼠血管内皮瘤细胞培养上清液中分离出来的一种蛋白质,可特异性抑制新生血管内皮细胞增殖,并诱导其凋亡而发挥抗肿瘤效应^[5-7]。前期研究^[8]显示,重组人内抑素(recombinant human endostatin, rhEndostatin)可抑制兔耳创面瘢痕增生,减少其血管生成和胶原沉积等。该研究拟在此基础上进一步观察rhEndostatin对增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblasts, HSFs)增殖的影响,探讨其抗瘢痕增生的作

2014-11-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171819、81272107);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012Z166)

作者单位:¹安徽医科大学人体解剖学教研室,合肥 230032

²湖北省宜昌市第一人民医院,宜昌 443000

³安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:张晓明,男,硕士,讲师;

黄学应,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hxy8676@126.com

VZV vaccination efficiency. **Methods** Constructing eukaryotic expression plasmid pCDNA3.1-gE, which contained coding gene for the extracellular domain of VZV gE. The authenticity of the insert was confirmed by DNA sequencing before it was transfected into COS-7 cells. G418 was used to select the cell line that stably expressed VZV gE fusion protein. VZV gE gene expression in those cells was recognized by RT-PCR, and corresponding protein expression was demonstrated by Western blot and immunofluorescence. An ELISA assay was developed with the use of Ni²⁺-NTA column purified gE as the coating antigen, and the assay was then used to detect IgG antibodies against VZV in 127 serum specimens of normal children. **Results** COS-7 cell lines that stably expressed VZV gE extracellular domain protein was cloned successfully. mRNA encoding gE was determined by RT-PCR. The gE has obvious immunoreactivity detected by Western blot and indirect immunofluorescence. Western blot proved the expression of recombinant gE fusion protein in both cells and culture supernatant of the COS-7 cells. The total gE protein was 0.632 mg/ml and the purity was nearly 90%. The serological test detected VZV-IgG antibody in 81.89% of the 127 serum specimens from normal children. The specificity and the sensitivity of this ELISA test were 93.75% and 88.24% respectively. **Conclusion** COS-7 cell lines that efficiently express gE extracellular domain protein was obtained, and an ELISA based serology test was developed and validated. The test is not only beneficial to the epidemiological studies of VZV infection, but also to the screen individuals that are at risk of VZV infection.

Key words varicella-zoster virus; glycoprotein E; stable eukaryotic expression; serology test