

## 细胞间接触是 EB 病毒自发感染人类上皮细胞的有效途径\*

江培洲\*\*, 沈新明, 吕丽春, 黄 华, 姚开泰

(第一军医大学肿瘤研究所, 广东广州 510515)

Cell-to-Cell Contacting Is an Effective Pathway for Epstein-Barr Virus  
to Spontaneously Infect Human Epithelial Cells

JIANG Pei-zhou\*\*, SHEN Xin-ming, LU Li-chun, HUANG Hua, YAO Kai-tai

(Cancer research institute of the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Human immortal epithelial cell line-Hacat cells without expression of CR2(complement receptor 2, CR2) and polymeric immunoglobulin receptor(pIgR) were co-cultivated with marmoset lymphocyte line-B95-8 cells producing EBV for infection by cell-to-cell contacting. After a week, all the B95-8 cells were removed to keep only Hacat cells, and an ameliorated method was applied to determine whether the former was eradicated or not. When there were no contaminated B95-8 cells in those residual Hacat cells, EBV infection was detected and confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and *in situ* Hybridization(ISH), respectively. The results showed that the ameliorated method was sensitive, simple and convenient for detecting the contamination of B95-8 cells, and the Hacat cells can be effectively infected by EBV when co-cultivated with B95-8 cells, suggesting that there is a new pathway other than cell-to-cell fusing and CR2 or pIgR mediating for EBV to infect epithelial cells. This study simplified the method of infection *via* cell-to-cell contacting, and laid the foundation for establishing the model with EBV to spontaneously and effectively infect epithelial cells.

**Key words:** Epstein-Barr virus(EBV); Contact; Infect; Epithelial cell

**摘要:** 选用产 EB 病毒的绒猴淋巴细胞 B95-8 系和补体受体 2 型 (complement receptor 2, CR2)与多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)表达阴性的人永生上皮细胞 Hacat 系共培养, 进行细胞接触感染实验。一周后去除 B95-8 细胞, 仅留 Hacat 细胞, 并以自行改进的方法鉴定前者是否得以彻底去除。在证实没有 B95-8 残留后, PCR 和原位杂交分别检验剩余 Hacat 细胞中 EB 病毒的感染结果。实验结果表明: 改进的方法能够灵敏和简便地判断 B95-8 细胞的污染与否, 并且与 B95-8 细胞接触共培养的 Hacat 细胞能被 EB 病毒有效地感染, 后者暗示了 EB 病毒对上皮细胞可能存在细胞融合和 CR2 或 pIgR 介导之外新的感染途径。本研究在一定程度上简化了前人的细胞接触感染方法, 也为建立天然的 EB 病毒自发有效地感染上皮细胞的模型奠定了基础。

**关键词:** EB 病毒; 接触; 感染; 上皮细胞

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0001-05

众所周知, EB 病毒的感染与许多上皮性肿瘤如鼻咽癌、胃癌、肺癌的发生有密切关系<sup>[1]</sup>。因此研究 EB 病毒在上皮细胞的作用机制对阐明与之相关的上皮性肿瘤的发生发展机理有着重要意义。但是长期以来, EB 病毒对上皮细胞的生物学作用的

研究进展缓慢, 主要的原因就是没有有效的病毒感染模型, 因为大多数上皮细胞都缺乏 EB 病毒的受体 CR2 和 pIgR 的表达<sup>[2,3]</sup>, 很难感染上 EB 病毒。有人曾通过转染使某种上皮细胞表达 CR2 受体成功使该细胞感染 EB 病毒<sup>[3]</sup>, 但是这种人工的操作

收稿日期: 2003-06-09, 修回日期: 2003-07-23

\* 基金项目: 广东省十五攻关项目 (A1080201); 国家 863 项目 (2001AA216101)

\*\* 通讯作者: 江培洲 (1975-) 男, 江西九江籍, 讲师, 博士, 主要从事肿瘤的分子生物学研究。

Corresponding author. Tel: 020-61648204 E-mail: JPZGMDXX@hotmail.com

仍然不足以阐明细胞自然的感染机制及其诱发的病理变化。近年来有报道用携带重组 EB 病毒的产病毒细胞与未感染病毒的细胞相互接触培养的方法能使后者感染上 EB 病毒,提示了细胞间接触可能也是 EB 病毒感染上

皮细胞的途径之一<sup>[4, 5]</sup>。然而,这些接触感染实验使用的病毒株都经过了人工重组,与天然状态的 EB 病毒存在一定的差距,而后者才是与上皮性肿瘤真正相关的因素,因此建立天然状态的 EB 病毒自发而有效地感染上皮细胞的模型,将更利于研究 EB 病毒与上皮性肿瘤的关系。本所保存有绒猴淋巴细胞 B95-8 系和人永生上皮细胞 Hacat 系,前者是携带天然 EB 病毒的产病毒细胞<sup>[6]</sup>,后者是没有 CR2 和 pIgR 表达的正常上皮细胞。我们选用 B95-8 细胞作为病毒的供体,用 Hacat 细胞作为病毒的受体细胞,通过细胞接触培养来观察 B95-8 病毒株是否能有效地感染没有 EB 病毒受体的 Hacat 细胞,为建立天然的 EB 病毒自发高效地感染上皮细胞的模型奠定基础,也为经典的 CR2 受体等感染学说之外的 EB 病毒感染机制做有意义的探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂和细胞

培养基 RPMI-1640、TRIzol Reagent (Life& Technologies 公司)、MasterAmp<sup>TM</sup> RT-PCR Kit (Gene 公司)、3' 端标记试剂盒 (Roche 公司),实验细胞为 EB 病毒转化的绒猴淋巴细胞系 B95-8 细胞(中南大学湘雅医学院细胞中心提供),人永生上皮细胞系 Hacat 细胞(中国典型培养物保藏中心提供)。

### 1.2 细胞培养

B95-8 细胞和 Hacat 细胞均用完全培养基 RPMI-1640+10%小牛血清+1%双抗(100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素)培养,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的二氧化碳培养箱。其中, B95-8 细胞需大规模培养。

### 1.3 Hacat 细胞 CR2 及 pIgR 受体表达的检测

收集 10<sup>6</sup> Hacat 细胞,按照试剂 TRIzol Reagent 使用说明书进行 RNA 的抽提。随后以 RNA 为模板,按照 MasterAmp<sup>TM</sup> RT-PCR Kit 说明进行 RT 第一链合成。30min 后,将体系等分为 3 份分别加入 CR2 引物(上游: 5' -TGG AAC CAC GGT CAC TTA CA-3'; 下游: 5' -ACT GGT ACC CAT CTT GGC AG-3')、pIgR 引物(上游: 5' -TAG AGG TGG CTG CAT AAC CC-3'; 下游: 5' -ATC GCT GAG CCT GAG TTG TT-3')以及看家基因 GAPDH 引

物(上游: 5' -AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA-3'; 下游: 5' -CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3')各 12.5pmole 进行 PCR, 95℃ 5min、95℃ 30s、55℃ 60s、72℃ 60s, 循环 30 次, 最后 72℃ 10min 延伸。阳性对照分别选用本所引进的 CR2 以及 pIgR 的 cDNA 全长克隆作模板, 阴性对照以灭菌水为模板, 按常规 PCR 反应体系, 循环步骤同上。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

### 1.4 接触感染及感染后 B95-8 细胞的去除

待 Hacat 细胞生长至培养器皿的 50%时, 开始接触感染。将 B95-8 细胞离心沉淀, 然后用新鲜培养基重悬, 按 5 倍以上的数量往 Hacat 细胞培养瓶内加入, B95-8 细胞则由悬浮状逐渐沉积于贴壁的 Hacat 细胞层上, 使得两种细胞开始接触共培养。其间, 每次换液方案如下: 弃去变黄且含有悬浮 B95-8 细胞的培养基, 重新按上述方法加入新的 B95-8 细胞。当 Hacat 细胞满瓶, 消化分瓶后继续按上述方法共培养。1 周后, 开始去除 B95-8 细胞。方法如下: 弃去含有悬浮 B95-8 细胞的培养基, 加入 D-Hanks 液, 用吸管吸入液体用力吹打瓶底细胞层数十次, 弃去旧液(含脱落的 B95-8 细胞)换新液, 反复至少 3 遍。将该瓶细胞消化一分为二, 待完全贴壁后再按上述方法进行吹打, 然后继续培养至满瓶。准备检测。

### 1.5 感染后 Hacat 细胞 DNA 的抽提以及残留 B95-8 细胞检测

去除 B95-8 细胞后, 将剩余贴壁的 Hacat 细胞继续培养。满瓶后消化并混合, 取其三分之一数量的细胞按《分子生物学常用实验方法》<sup>[7]</sup>抽提基因组 DNA。为了确保感染后的 Hacat 细胞没有 B95-8 细胞的污染, 选择了高灵敏度的 PCR 方法, 以感染后的 Hacat 细胞基因组为模板, 用自行设计的引物扩增 B95-8 区别于人的特异性基因片段, 根据有无 PCR 产物来确定 B95-8 的去除效果。通过 GenBank 查询美洲绒猴的基因组序列, 寻找绒猴不同于人类的特异性基因序列。结果发现 Callithrix jacchus MHC class II antigen (CAJA-DRB1) gene 中的一个外显子符合要求。该外显子与人类 Homo sapiens MHC class II antigen (HLA-DRB1) gene 部分同源但是在起始端及末端有显著差异, 因此设计引物如下: 上游 5' -CGT TTC TTG GAG TAT AGC-3'; 下游 5' -CAC TAG GAA CCT CTC TGA-3', 扩增产物长度为 258bp。以上述 Hacat 基因组为模板, 按常规 PCR 体系进行扩增。扩增程序如下: 95℃ 5 min、94℃ 40s、58℃ 40s、72℃ 40s, 循环 33 次, 最后

72℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳观察。

### 1.6 PCR 检测感染后 HacaT 细胞中 EB 病毒基因组的整合

按文献<sup>[8]</sup>合成扩增 EB 病毒 *Bam*HI W 片段 (296bp) 引物。上游引物为: 5' -TCG CGT TGC TAG GCC ACC TT-3'; 下游引物为: 5' -CTT GGA TGG CGG AGT CAG CG-3'。以经过接触感染后且被验证没有 B95-8 细胞污染的 HacaT 细胞的基因组 DNA 为模板, 按常规 PCR 反应体系扩增。扩增程序如下: 95℃ 5 min、94℃ 40s、55℃ 40s、72℃ 40s, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳观察。

### 1.7 原位杂交验证及感染率的计算

根据文献<sup>[9]</sup>设计 EBER 寡核苷酸探针序列为: 5' -CTC CTC CCT AGC AAA ACC TCT AGG GCA GCG-3', 按 3' 端标记试剂盒操作说明对探针进行标记。接触感染后 HacaT 细胞的消化、滴片、原位杂交及显色步骤按《分子生物学常用实验方法》<sup>[7]</sup>进行。同时用 B95-8 细胞做阳性对照, 用未经过感染的 HacaT 细胞做阴性对照, 原位杂交步骤同上。原位杂交结束后, 取显色后的玻片 20 张, 分别在显微镜下取左上、右上、正中、左下、右下五个视野计算感染细胞及未感染细胞数, 计算感染率。

## 2 结果

### 2.1 HacaT 细胞的 CR2、pIgR 受体表达检测

对 CR2 及 pIgR 表达检测的 RT-PCR 结果经电泳观察, 阳性对照 428bp 和 462bp 准确无误, 阴性对照未见条带, HacaT 细胞 mRNA 的 RT-PCR 结果中仅见看家基因 GAPDH (580bp) 的表达, 未见 CR2 及 pIgR 的表达, 结果分别见图 1 和图 2。

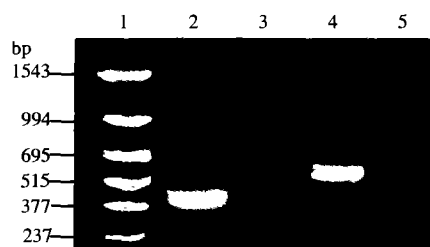


图 1 HacaT 细胞 CR2 受体表达检测结果

Fig. 1 Detection of expression of CR2 receptor in HacaT cells  
1, PCR marker; 2, The positive control(428bp) using CR2 plasmid as template; 3, Detection of CR2 by RT-PCR with mRNA of HacaT cells; 4, Detection of GAPDH(580bp) by RT-PCR with mRNA of HacaT cells; 5, The negative control using water as template.

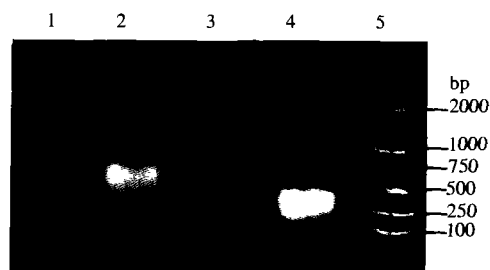


图 2 HacaT 细胞 pIgR 受体表达检测结果

Fig. 2 Detection of expression of pIgR in HacaT cells

1, The negative control using water as template; 2, Detection of GAPDH(580bp) by RT-PCR with mRNA of HacaT cells; 3, Detection of pIgR by RT-PCR with mRNA of HacaT cells; 4, The positive control(462bp) using pIgR plasmid as template; 5, Marker(DL2000).

### 2.2 残留 B95-8 细胞检测

用前述设计的绒猴特异性基因引物以感染并去除 B95-8 后的 HacaT 细胞基因组 DNA 为模板进行扩增, 如果 HacaT 细胞中有 B95-8 细胞的残留或者与 B95-8 细胞发生融合, 则能扩增出特异性片断 (258bp), 否则不会有该特异性产物。检测中阳性对照选用 B95-8 细胞基因组 DNA 为模板, 另取一组未彻底清除 B95-8 细胞的共培养 HacaT 细胞基因组 DNA 为模板作为污染对照, 实验组取经前述步骤反复清除 B95-8 细胞后的 HacaT 细胞基因组 DNA 为模板, 结果表明没有 B95-8 细胞的融合或残留 (见图 3)。

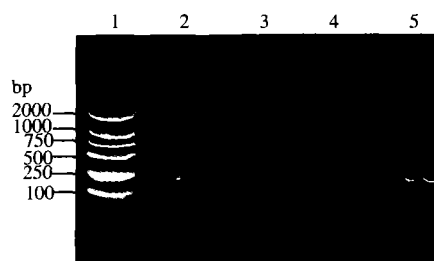


图 3 感染后 HacaT 细胞中污染的 B95-8 细胞检测

Fig.3 Detection of the pollution of B95-8 cells in infected HacaT cells by PCR

1, Marker(DL2000); 2, Positive control using the genomic DNA of B95-8 cells as template; 3/4, The result of PCR using the genomic DNA of HacaT cells without B95-8 cells remains after infection as template; 5, The result of PCR using the genomic DNA of HacaT cells with B95-8 cells remains after infection as template.

### 2.3 接触感染后 Haca<sub>t</sub> 细胞中是否有 EB 病毒基因的检测

以上述经过接触感染后且被验证没有 B95-8 细胞污染的 Haca<sub>t</sub> 细胞的基因组 DNA 为模板, 用 EB 病毒 *Bam*HI w 片段(296bp)的特异引物进行 PCR 扩增, 检测 Haca<sub>t</sub> 细胞中是否有 EB 病毒基因组的存在。阳性对照选用 B95-8 细胞基因组作模板, 阴性对照以水为模板, 结果显示 Haca<sub>t</sub> 细胞中存在 EB 病毒的基因(见图 4)。

### 2.4 原位杂交验证 EB 病毒感染 Haca<sub>t</sub> 细胞的结果

细胞感染 EB 病毒后在核内会因表达 EBER 而与地高辛标记的探针结合, 因而被显色于细胞核内。结果显示, 阴性对照即未经感染的 Haca<sub>t</sub> 细胞核中没有显色, 而阳性对照的 B95-8 细胞与经过共培养感染后的部分 Haca<sub>t</sub> 细胞在核内有显色, 表明这些细胞已经被 EB 病毒感染(彩版 I 图 5)。原位杂交结果统计显示感染率为 10.68% (228/2135)。

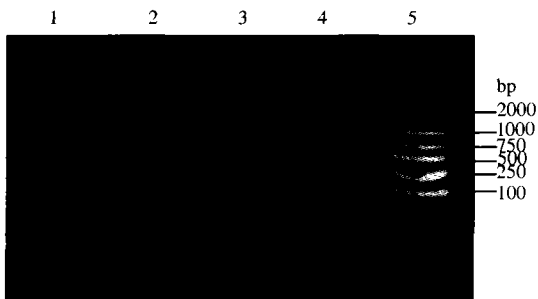


图 4 EB 病毒感染后的 Haca<sub>t</sub> 细胞基因组中 *Bam*HI w 片段检测  
Fig.4 Detection of *Bam*HI w fragments in the genomic DNA of infected Haca<sub>t</sub> cells by PCR

1/2, The result of PCR using the infected Haca<sub>t</sub> cells without B95-8 cells remains as template; 3, The negative control using water as template; 4, The positive control using the genomic DNA of B95-8 cells as template; 5, Marker(DL2000).

## 3 讨论

目前认为 EB 病毒进入细胞的途径主要有以下几种<sup>[10-13]</sup>: 1) 细胞间融合学说: 通过与感染 EB 病毒的 B 淋巴细胞的融合进入细胞; 2) 病毒粒子-细胞膜融合学说: 游离的病毒粒子粘附于细胞膜上并与之融合进入胞内。3) 受体学说: 经过受体 CR2 或 pIgR 介导进入细胞。其中受体学说被认为是 EB 病毒感染细胞的主要机制。但大多数上皮细胞都缺乏 CR2 和 pIgR 的表达<sup>[2,3]</sup>, 很难感染 EB 病毒, 这暗示 EB 病毒在上皮细胞的感染可能不同于目前已知的机制。因此, 寻找有效的感染途径, 建立合适

的感染模型, 对研究 EB 病毒在上皮细胞的作用机制及其与上皮性肿瘤的关系有重要意义。

近年的报道表明, 通过已感染 EB 病毒的细胞与未感染的细胞相互接触能够使后者以较高的效率感染 EB 病毒, 提示了细胞间接触可能也是上皮细胞的感染途径, 但报道中未对被感染的上皮细胞做受体检测, 因此尚不清楚这种感染机制是否有别于前述的三种学说。本实验中, 人永生上皮细胞 Haca<sub>t</sub> 系没有 CR2 以及 pIgR 的表达。因此, 首先能够排除受体介导机制。为了判断接触感染实验是否存在细胞融合方式, 我们在感染后, 去除病毒供体 B95-8 细胞, 取剩余 Haca<sub>t</sub> 细胞的三分之一量抽提基因组 DNA, 并以之为模板, 用 B95-8 细胞特异性基因引物进行 PCR 检测, 结果没有发现特异性扩增产物, 这一方面表明被感染的 Haca<sub>t</sub> 细胞中没有 B95-8 细胞的残留, 另一方面也排除了 B95-8 细胞与 Haca<sub>t</sub> 细胞融合的可能。并且, 我们在培养实验中没有发现细胞融合形成的多核细胞现象。因此细胞融合机制亦可被否定。此外, 文献<sup>[13]</sup>中曾报道, 游离的 EB 病毒粒子可以粘附细胞膜表面, 并与膜发生融合进入胞内。我们不能排除这种可能性。但值得注意的是, 以往 EB 病毒感染上皮细胞的实验大多是采用抽提的单纯病毒粒子与细胞相互作用而进行的, 而实验结果都显示感染率非常低<sup>[4,5]</sup>。有人<sup>[5]</sup>以纯病毒粒子感染和接触感染两种方式分别对多种上皮细胞进行实验, 发现后者感染率(0.1%~19.4%)明显高于前者(0.1%~2.1%)。本实验采用接触感染法得到的感染率是 10.68%。总之, 我们和前人通过细胞间接触进行的感染实验都能获得远远高于以往的感染率。这些结果暗示了接触感染中可能存在病毒粒子与细胞膜的融合机制, 但不是唯一机制, 即 EB 病毒应该主要是以另一种未知的机制通过细胞接触的方式进入上皮细胞内; 另一方面也为建立上皮细胞的 EB 病毒感染模型提供了新的思路和实验支持。结合前人的工作<sup>[1,14-16]</sup>, 我们认为 B95-8 细胞与 Haca<sub>t</sub> 细胞间接触引起 EB 病毒感染的机制有以下几种可能: 1) 紧密接触可能瞬时产生了一个 EB 病毒相互传递的桥梁; 2) 病毒颗粒与细胞表面直接接触融合进入上皮细胞; 3) 细胞间接触可能使病毒同靶细胞的一个新的未知低亲和受体结合, 引起感染。我们将在以后的工作中深入研究。

此外, 前人报道的细胞间接触感染实验采用的是人工重组的 Akata 病毒株, 考虑到不同的 EB 病毒株之间以及人工重组的 EB 病毒与天然状态的 EB

病毒之间都存在一定的差异, 并且只有天然状态的 EB 病毒才与上述上皮性肿瘤密切相关, 我们选用了 B95-8 病毒株作为研究对象。值得一提的是, 前人的文献报道<sup>[4,5]</sup>中, 为了判断病毒供体细胞是否完全被去除, 采用免疫荧光染色法, 通过观察剩余细胞中是否都有角蛋白显色来鉴定之。这种方法一次只能鉴定少量细胞, 且要求一定的操作技术和成本。而我们所用的方法(见前述 1.5)能鉴定更多数量的细胞, 且采用了灵敏度高达  $10^6 \sim 10^7$  的 PCR 技术, 因此是一种更简便、高灵敏度以及低成本的鉴定方法。

总之, 我们和前人对接触感染的实验结果为建立 EB 病毒有效感染上皮细胞的模型提供了新的思路 and 实验支持。此外, 鉴于前人在该领域研究的不足之处, 本实验选择了天然 EB 病毒株, 优化了接触感染实验的方法, 为阐明 EB 病毒通过细胞间接触而感染上皮细胞的机制提供了线索, 也为建立更简便科学的细胞间接触感染的实验方法奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Niedobitek G, Meru N, Delecluse H J. Epstein-Barr virus infection and human malignancies[J]. *Int J Exp Pathol*, 2001, 82(3): 149-170.
- [2] Sixbey J W, Yao Q Y. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism[J]. *Science*, 1992, 255(5051): 1578-1580.
- [3] Li Q X, Young L S, Niedobitek G, *et al*. Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system[J]. *Nature*, 1992, 356(6367): 347-350.
- [4] Chang Y, Tung C H, Huang Y T, *et al*. Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes[J]. *J Virol*, 1999, 73(10): 8857-8866.
- [5] Imai S, Nishikawa J, Takada K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells[J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 4371-4378.
- [6] Miller G, Lipman M. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973, 70(1): 190-194.
- [7] 姜泊, 张业历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996.
- [8] Wagner H J, Bein G, Bitsch A, *et al*. Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus-seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction[J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(11): 2826-2829.
- [9] Khan G, Coates P J, Kangro H O, *et al*. Epstein Barr virus (EB 病毒) encoded small RNAs: targets for detection by in situ hybridisation with oligonucleotide probes[J]. *J Clin Pathol*, 1992, 45(7): 616-620.
- [10] Imai S, Nishikawa J, Kuroda M, *et al*. Epstein-Barr virus infection of human epithelial cells[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 258: 161-184.
- [11] Speck P, Haan K M, Longnecker R, *et al*. Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology*, 2000, 277(1): 1-5.
- [12] Miller N, Hutt-Fletcher L M. Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes[J]. *J Virol*, 1992, 66(6): 3409-3414.
- [13] Lisi A, Pozzi D, Carloni G, *et al*. Fusion of EB 病毒 with the surface of receptor-negative human hepatoma cell line Li7A permits virus penetration and infection[J]. *Res Virol*, 1995, 146(4): 295-300.
- [14] Gazzolo L, De-The G, Vuillaume M, *et al*. Nasopharyngeal carcinoma. II. Ultrastructure of normal mucosa, tumor biopsies, and subsequent epithelial growth in vitro[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1972, 48(1): 73-86.
- [15] Tao Q, Srivastava G, Chan A C, *et al*. Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals[J]. *J Med Virol*, 1995, 45(1): 71-77.
- [16] Chen C L, Hsu M M, Hsu H C. Differential expression of EBER1 in nontumor nasopharyngeal biopsies and nontumor component of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Intervirology*, 1996, 39(4): 230-235