

# GATA-1/2对感染HCMV人单核细胞中 病毒LUNA基因转录的影响

郭彬瀚<sup>1,2,3</sup> 张梦伊<sup>1,2,3</sup> 刘艳清<sup>1,2,3</sup> 赖媚媚<sup>1,2,3</sup> 卢雨田<sup>1,2,3</sup> 王慧燕<sup>1,2</sup> 郑晓群<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>温州医科大学附属第二医院, 温州 325027; <sup>2</sup>温州医科大学检验医学院, 温州 325035;

<sup>3</sup>检验医学教育部重点实验室, 温州 325035)

**摘要** 该文通过建立人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染人单核白血病细胞(THP-1)的潜伏和激活细胞模型, 研究转录因子GATA-1/2与HCMV *LUNA*(latency unique nuclear antigen)基因转录的关系。采用免疫印迹(Western blot)技术检测HCMV潜伏和激活感染组GATA-1/2蛋白质水平; 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术检测GATA-1/2与*LUNA*基因5'上游序列结合情况; 采用shRNA干扰技术敲低THP-1细胞中GATA-1/2的表达后, 检测潜伏和激活感染组HCMV *LUNA*基因mRNA水平。结果表明, HCMV潜伏感染组*LUNA*基因mRNA及GATA-1/2蛋白质水平均高于激活感染组, 差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ); HCMV潜伏感染组转录因子GATA-1/2与*LUNA*基因5'启动子区域结合率低于激活感染组, 差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ); shRNA干扰技术敲低THP-1细胞GATA-1/2后, HCMV *LUNA*基因mRNA水平出现下调。研究结果表明, 转录因子GATA-1/2在HCMV潜伏和激活感染THP-1细胞时与*LUNA*基因5'上游启动子区域存在结合, 并与*LUNA*基因的表达有关。

**关键词** HCMV; *LUNA*; GATA-1/2; 转录因子; 感染

## Effects of GATA-1/2 on the Transcription of *LUNA* Gene in Human Monocytes Infected with HCMV

Guo Binhan<sup>1,2,3</sup>, Zhang Mengyi<sup>1,2,3</sup>, Liu Yanqing<sup>1,2,3</sup>, Lai Meimei<sup>1,2,3</sup>, Lu Yutian<sup>1,2,3</sup>,

Wang Huiyan<sup>1,2</sup>, Zheng Xiaqun<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China;

<sup>2</sup>School of Laboratory Medical Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

<sup>3</sup>The Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education of China, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** This study investigated the relationship between transcription factor GATA-1/2 and human cytomegalovirus (HCMV) latency unique nuclear antigen (*LUNA*) gene using established HCMV latent and activated infection models. The protein level of GATA-1/2 was determined by Western blot. The binding of GATA-1/2 with 5' upstream sequence of *LUNA* gene was assessed by chromatin immunoprecipitation (ChIP). Moreover, the level of *LUNA* mRNA was detected by RT-PCR after GATA-1/2 was interfered. The results showed that the expression of *LUNA* gene and GATA-1/2 in latent infection group were both higher than activated infection group,

收稿日期: 2017-09-21 接受日期: 2017-11-09

浙江省自然科学基金(批准号: LY13H190006)和浙江省医药卫生项目(批准号: 2017KY474)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-86699196, E-mail: jszhengxq@163.com

Received: September 21, 2017 Accepted: November 9, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY13H190006) and the Medical and Health Issues Project of Zhejiang Province (Grant No. 2017KY474)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-86699196, E-mail: jszhengxq@163.com

网络出版时间: 2018-01-31 18:12:47

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180131.1812.004.html>

and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). The binding rate of transcription factor GATA-1/2 with 5' terminal of promoter of *LUNA* gene in latent infection group was lower than that of activated infection group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The expression of *LUNA* gene were both downregulated in HCMV latent and activated infection group after GATA-1/2 was interfered. Our results indicated that the transcription factor GATA-1/2 is involved in the presence of *LUNA* 5' upstream promoter region in HCMV latent and activated infection, and participates in the process of HCMV latent and activated infection.

**Keywords** HCMV; *LUNA*; GATA-1/2; transcription factor; infection

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是一类人群普遍感染的疱疹病毒。HCMV感染宿主后,常通过多种途径逃避宿主的免疫监视及防御功能,并在宿主体内建立长期潜伏感染。当宿主免疫功能不全或低下时,潜伏感染的病毒被激活,易引起播散性疾病或器官损害,甚至威胁生命<sup>[1-2]</sup>。因此,及早发现HCMV感染对其预防及治疗至关重要。尽管目前关于HCMV感染的研究已取得了较大进展,但迄今为止,HCMV潜伏和激活感染的分子机制仍不明确。

既往研究证实,HCMV潜伏感染时,病毒基因虽以低水平复制的形式持续存在,但是一些病毒基因(如病毒*LUNA*基因、*UL111A*和*UL138*等<sup>[3-4]</sup>)仍然是转录的,与病毒的复制、感染有着密不可分的关系。其中,病毒*LUNA*基因通过影响病毒基因*UL82* mRNA的稳定性与翻译,进而介导病毒被膜蛋白pp71的合成来调控HCMV的潜伏和激活感染<sup>[5-6]</sup>。转录因子GATA-1/2是造血细胞分化的重要调节因子,含2个锌指结构,即C-锌指和N-锌指,可通过与基因启动子中(A/T)GATA(A/G)模块结合影响基因的转录<sup>[7]</sup>。经生物信息学分析表明,在HCMV *LUNA*基因的启动子区交错分布着转录因子GATA-1/2的结合位点。本文通过建立HCMV潜伏和激活感染的THP-1细胞模型,明确GATA-1/2与*LUNA*基因启动子区的结合情况,探讨HCMV潜伏与激活感染时GATA-1/2对*LUNA*基因转录的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与病毒株

HCMV Towne株来自中国典型培养物保藏中心,THP-1细胞(人单核白血病细胞)以及293T细胞(人胚肾T细胞)购自中国科学院上海细胞库,HEL细胞(人胚肺成纤维细胞)购自中国科学院昆明动物研究所。

### 1.2 主要试剂

佛波酯(PMA)以及细胞总蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术研究。Trizol提取试剂购自Invitrogen公司。miRNeasy Mini Kit购自QIAGEN公司。SYBR Premix Ex Taq购自TaKaRa公司。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒购自Thermo Fisher Scientific公司。GATA-1/2兔抗人抗体购自Abcam公司。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。ChIP试剂盒购自Millipore公司。Trans10感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。VSVG质粒购自上海吉然生物科技有限公司。RNAi-Ready pSIREN-RetroQ质粒购自Clontech公司。Gagpol质粒购自Biovector公司。Polybrene购自上海吉玛制药技术有限公司。质粒DNA小量试剂盒购自AxyPrep公司。无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

### 1.3 主要方法

**1.3.1 HCMV潜伏和激活感染细胞模型建立** THP-1细胞的培养以及HCMV病毒制备参照我们先前的研究<sup>[8]</sup>。HCMV Towne株(MOI=3)感染THP-1细胞,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养3 d后建立潜伏感染模型。100 ng/mL佛波酯(PMA)刺激HCMV潜伏感染的THP-1细胞分化为巨噬细胞,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱培养3 d后建立激活感染模型。对照组加入与病毒液等量的RPMI-1640培养液,同条件培养。

**1.3.2 HCMV潜伏和激活感染组** *IE1*(immediate early 1)以及*LUNA*基因表达的检测使用QIAGEN公司的miRNeasy Mini Kit试剂盒,分别提取HCMV潜伏和激活感染组的细胞总RNA并测定浓度及纯度。取1 μg总RNA,按照Thermo Fisher Scientific公司RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书进行操作,逆转录为cDNA。应用Primer Premier 5.0软件设计*IE1*、*LUNA*基因以及内参基因*GAPDH*的PCR引物,上述得到cDNA进行PCR扩增

所得产物用2%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。使用ImageJ软件对电泳条带进行灰度分析,目的基因灰度值与内参基因灰度值之比表示IE1以及LUNA基因的相对表达量。所用PCR引物序列见表1。

**1.3.3 Western blot检测转录因子GATA-1/2蛋白质水平** 利用细胞总蛋白提取试剂盒提取对照组、HCMV潜伏和激活感染组细胞总蛋白。将提取的蛋白质样品与5×蛋白质上样缓冲液按4:1的比例混匀,100 °C加热变性10 min,调节蛋白质浓度一致,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。用事先活化的硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane)在恒流300 mA条件下转膜60 min,5%脱脂奶粉封闭2 h,分别用相应的GATA-1(1:1 000)、GATA-2(1:1 000)、GAPDH(1:5 000)一抗于4 °C条件下孵育过夜。TBST洗膜后,于HRP标记的羊抗兔IgG二抗室温孵育1 h,ECL发光试剂盒显影。使用ImageJ软件对蛋白条带进行灰度分析,目的条带灰度值与内参蛋白质灰度值之比表示转录因子GATA-1/2的相对表达量。

**1.3.4 ChIP检测HCMV潜伏和激活感染组GATA-1/2与LUNA基因的结合** 对HCMV LUNA基因5'端上游约1 Kb的核酸序列进行生物信息学分析,应用TRANSFAC数据库中MATCH工具对分析序列的转录因子结合位点进行预测。该数据库通过每个位点的所得分数(0~1)来确定转录因子结合位点。经过

筛选,我们确定HCMV LUNA基因5'上游序列831位点和172位点分别与GATA-1、GATA-2存在结合,并进行后续ChIP-PCR引物设计。使用Millipore公司的EZ-ChIP Kit处理对照组、HCMV潜伏和激活感染组细胞。根据试剂盒说明书进行染色质免疫共沉淀,操作步骤如下:加入37%甲醛体外交联和裂解细胞DNA,超声处理(功率500 W,超声7 s,停10 s,重复3次)DNA,使交联的DNA/蛋白质共沉淀,洗脱DNA/蛋白质复合物,解交联,纯化DNA。将各组得到的DNA产物分别加入对应的引物进行PCR扩增,扩增产物用2%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。电泳结果使用ImageJ软件进行灰度分析,并以抗体处理组与Input自身对照组的电泳结果灰度值之比表示GATA-1/2与LUNA基因的结合率。

**1.3.5 shRNA干扰对HCMV LUNA基因转录的影响** 根据文献[9]设计了针对GATA-1/2基因分别有干扰作用的shRNA序列(表2);将退火双链小片段与RNAi-Ready pSIREN-RetroQ载体连接后导入感受态细胞,筛选阳性菌落并抽提质粒DNA送至杭州擎科生物公司测序。待插入序列鉴定正确后,在293T细胞[(4~6)×10<sup>6</sup>/10 cm<sup>2</sup>培养皿]中构建慢病毒并收集用于转染THP-1, polybrene(10 mg/mL)转染操作按照说明书进行,补齐培养液后于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养2 d后,先后使用1.0 μg/mL、1.5 μg/mL

表1 HCMV IE1、LUNA以及GAPDH引物

Table 1 The primers of HCMV IE1, LUNA and GAPDH

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') The sequence of primer (5'→3')	产物大小 The length of product
IE1 F	CAA GAG AAA GAT GGA CCC TG	242 bp
IE1 R	CGA GTT CTG CCA GGA CAT C	
GAPDH F	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	185 bp
GAPDH R	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	
LUNA F	GAG CCT TGA CGA CTT GGT AC	241 bp
LUNA R	GAG CCT TGA CGA CTT GGT AC	

表2 合成的shRNA对应的DNA序列

Table 2 Synthesized DNA sequence correlated to shRNA

shRNA名称 shRNA name	shRNA序列(5'→3') The sequence of shRNA (5'→3')
sh-GATA1 F	GAT CCA GCG CCT GAT TGT CAG TAA ACT TCA AGA GAG TTT ACT GAC AAT CAG GCG CTT TTT TG
sh-GATA1 R	AAT CCA AAA AAA GCG CCT GAT TGT CAG TAA ACT CTC TTG AAG TTT ACT GAC AAT CAG GCG CTG
sh-GATA2 F	GAT CCG AAC CGG AAG ATG TCC AAC AAT TCA AGA GAT TGT TGG ACA TCT TCC GGT TCT TTT TTG
sh-GATA2 R	AAT CCA AAA AAG AAC CGG AAG ATG TCC AAC AAT CTC TTG AAT TGT TGG ACA TCT TCC GGT TCG



puromycin筛选阳性转染的细胞。经过两次筛选存活下来的细胞进行扩大培养,待其状态良好后使用HCMV感染建立潜伏和激活模型,提取细胞总RNA后,RT-PCR检测HCMV *LUNA*基因的表达情况。

#### 1.4 统计学分析

数据采用SPSS 18.0统计学软件进行分析,数据用均数±标准差(mean±S.D.)表示,两组间比较采用*t*检验,多组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCMV潜伏和激活感染组*IE1*、*LUNA*基因的表达水平

为证明成功建立HCMV潜伏和激活感染细胞模型,我们使用RT-PCR实验分别检测了HCMV *IE1*和*LUNA*基因的表达。HCMV潜伏感染组在1 d时*IE1*基因有表达,随后逐渐降低或不表达;HCMV激活感染组在1 d时*IE1*基因有表达,随后表达逐渐增加。HCMV潜伏感染组在1~3 d时*LUNA*基因持续表达;HCMV激活感染组在1 d后*LUNA* mRNA水平

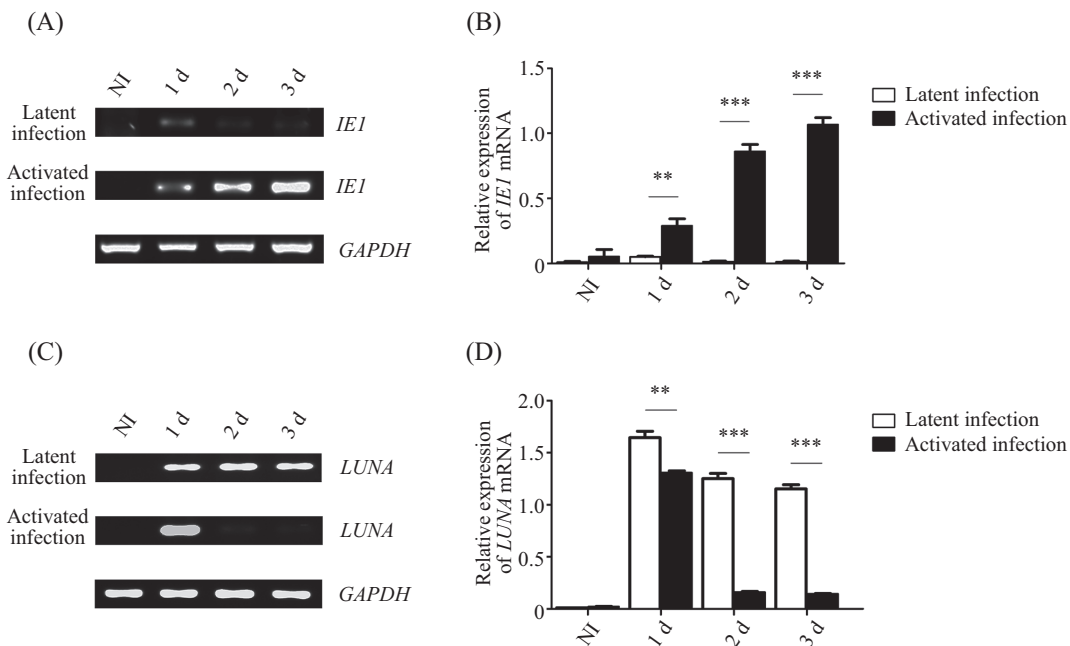
下降。上述实验结果表明,HCMV潜伏感染组*IE1*、*LUNA* mRNA水平与激活感染组存在显著的统计学差异( $P<0.01$ ,图1)。

### 2.2 HCMV潜伏和激活感染组转录因子GATA-1/2蛋白质水平的变化

为了解HCMV潜伏和激活感染组GATA-1/2蛋白质水平的差异,我们通过Western blot实验发现,HCMV潜伏感染组GATA-1在1~3 d持续表达;HCMV激活感染组GATA-1在1 d后表达明显下降。结果还显示,HCMV潜伏感染组GATA-1的表达明显高于激活感染组,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ,图2)。同等实验条件下,HCMV潜伏感染组在1 d后GATA-2水平下降,低于对照组;HCMV激活感染组在1~3 d GATA-2水平与对照组差异不大。结果表明,HCMV潜伏感染组GATA-2的水平高于激活感染组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,图3)。

### 2.3 HCMV潜伏和激活感染组GATA-1/2与*LUNA*基因5'上游序列结合情况

基于ChIP实验我们发现,GATA-1与HCMV *LUNA*基因5'上游序列831位点存在结合,HCMV潜伏感染



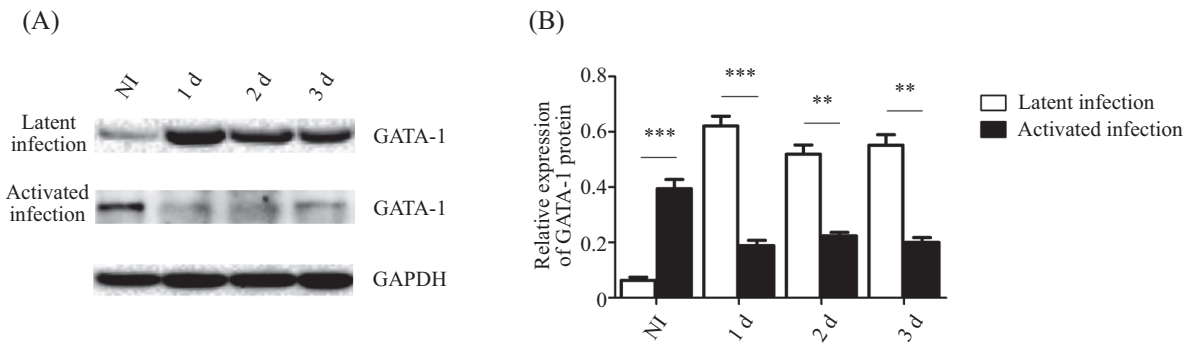
A: *IE1* mRNA水平; B: *IE1* mRNA相对水平的统计分析; C: *LUNA* mRNA水平; D: *LUNA* mRNA相对水平的统计分析。NI: 对照组; Latent infection: HCMV潜伏感染组; Activated infection: HCMV激活感染组。Mean±S.D.,  $n=3$ 。\*\*\* $P<0.001$ , HCMV潜伏感染组与HCMV激活感染组相比较。

A: the level of *IE1* mRNA; B: the statistical analysis of relative level of *IE1* mRNA; C: the level of *LUNA* mRNA; D: the statistical analysis of relative level of *LUNA* mRNA. NI: control group; Latent infection: HCMV latent infection group; Activated infection: HCMV activated infection group. Mean±S.D.,  $n=3$ . \*\*\* $P<0.001$ , latent infection group vs activated infection group.

图1 HCMV潜伏和激活感染THP-1细胞时*IE1*、*LUNA*基因的表达

Fig.1 The expression of HCMV *IE1* and *LUNA* genes in HCMV latent and activated infection



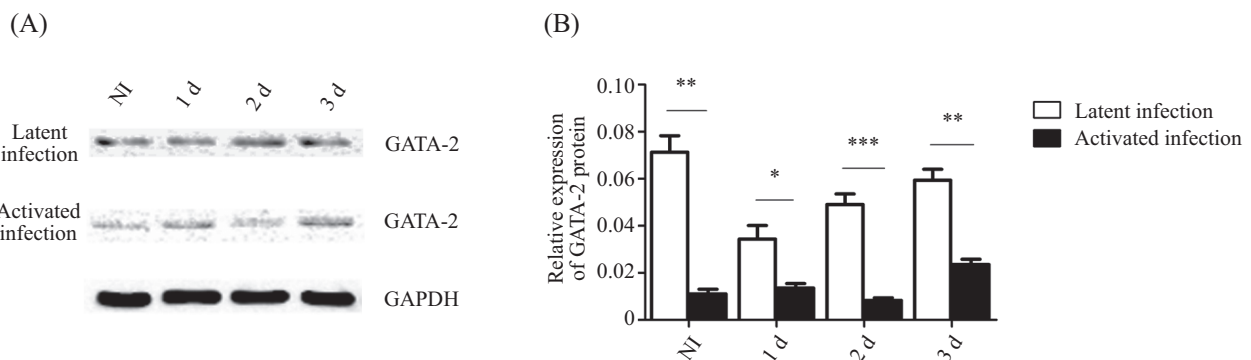


A: GATA-1蛋白质水平; B: GATA-1蛋白质相对水平的统计分析。NI: 对照组; Latent infection: HCMV潜伏感染组; Activated infection: HCMV激活感染组。Mean±S.D.,  $n=3$ 。\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , HCMV潜伏感染组与HCMV激活感染组相比较。

A: the level of GATA-1 protein; B: the statistical analysis of relative level of GATA-1 protein. NI: control group; Latent infection: HCMV latent infection group; Activated infection: HCMV activated infection group. Mean±S.D.,  $n=3$ . \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , latent infection group vs activated infection group.

图2 HCMV潜伏和激活感染THP-1细胞时转录因子GATA-1蛋白质水平

Fig.2 The protein level of transcription factor GATA-1 in HCMV latent and activated infection



A: GATA-2蛋白质水平; B: GATA-2蛋白质相对水平的统计分析。NI: 对照组; Latent infection: HCMV潜伏感染组; Activated infection: HCMV激活感染组。Mean±S.D.,  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , HCMV潜伏感染组与HCMV激活感染组相比较。

A: the level of GATA-2 protein; B: the statistical analysis of relative level of GATA-2 protein. NI: control group; Latent infection: HCMV latent infection group; Activated infection: HCMV activated infection group. Mean±S.D.,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , latent infection group vs activated infection group.

图3 HCMV潜伏和激活感染THP-1细胞时转录因子GATA-2蛋白质水平

Fig.3 The protein level of transcription factor GATA-2 in HCMV latent and activated infection

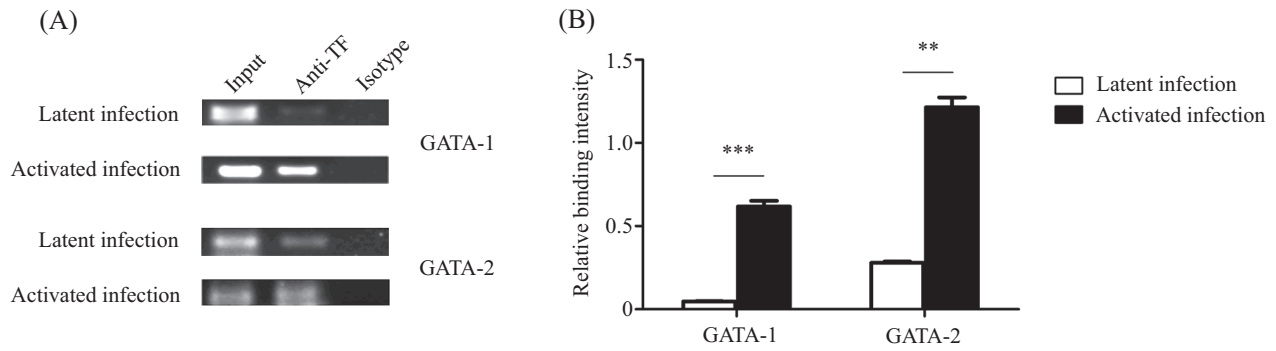
组GATA-1与HCMV *LUNA*基因启动子区的结合率较激活感染组低, 差异具有显著统计学意义( $P<0.001$ , 图4); GATA-2与HCMV *LUNA*基因5'上游序列172位点存在结合, HCMV潜伏感染组GATA-2与HCMV *LUNA*基因启动子区的结合率较激活感染组低, 差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ , 图4)。

#### 2.4 shRNA干扰GATA-1/2后HCMV *LUNA*基因的表达

采用shRNA分别靶向干扰GATA-1和GATA-2后, 实验组GATA-1/2的表达明显低于阴性对照组, 差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ , 图5)。HCMV潜伏和激活感染GATA-1/2干扰后THP-1细胞时, *LUNA* mRNA水平在感染3 d内明显降低(图6)。

### 3 讨论

HCMV感染具有潜伏-激活的特性, 单核细胞和髓系祖细胞是HCMV潜伏感染的主要宿主细胞<sup>[10]</sup>。HCMV潜伏感染时, 可编码一些称为巨细胞病毒潜伏相关转录组(cytomegalovirus latent association transcripts, CLTs)的基因<sup>[11-12]</sup>。这些CLTs可能是维持病毒潜伏感染所必需的, 其中, *LUNA*是*UL81*基因编码的由133个氨基酸组成的富含丝氨酸的蛋白质, 与HCMV潜伏感染密切相关, 但其在HCMV潜伏感染中的具体作用机制尚未明确<sup>[6]</sup>。研究发现, 在HCMV血清学阳性的单核细胞中可检测到*LUNA*基因的表达, 表明HCMV在潜伏感染单核细胞过程中, 存在病毒*LUNA*基因的表达<sup>[6,13]</sup>。本研究结果同样表明了

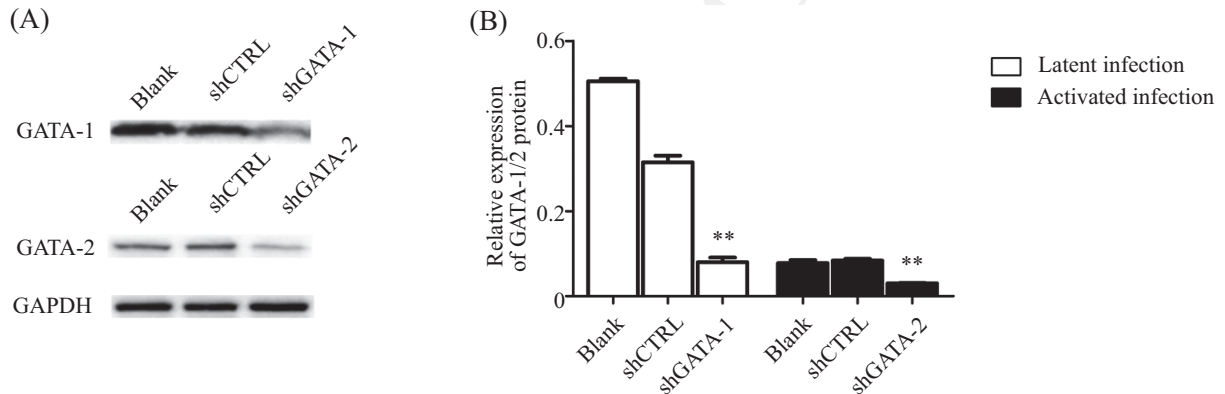


A: HCMV潜伏和激活感染组ChIP实验后PCR产物电泳结果; B: HCMV潜伏和激活感染组GATA-1/2相对结合程度的统计分析。Input: 阴性对照组; Anti-TF: 抗体处理组; Isotype: 同型对照组。Mean±S.D.,  $n=3$ 。\*\*\* $P<0.001$ , HCMV潜伏感染组与HCMV激活感染组相比较。

A: PCR product electrophoresis of HCMV latent and activated infection after ChIP; B: the statistical analysis of relative binding intensity of GATA-1/2 in latent and activated infection. Input: negative control group; Anti-TF: antibody treatment group; Isotype: isotype control group. mean±S.D.,  $n=3$ . \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , latent infection group vs activated infection group.

图4 HCMV潜伏和激活感染时转录因子GATA-1/2与LUNA基因结合的ChIP结果

Fig.4 HCMV LUNA binding with transcription factor GATA-1/2 in latent and activated infection detected by ChIP

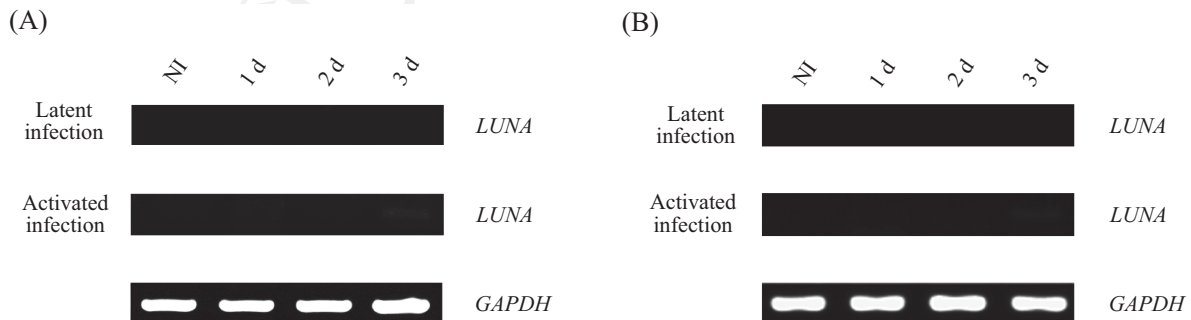


A: GATA-1/2蛋白质水平; B: GATA-1/2蛋白质相对水平的统计分析。Blank: 空白对照组; shCTRL: 阴性对照组; shGATA-1: GATA-1 shRNA干扰组; shGATA-2: GATA-2 shRNA干扰组。Mean±S.D.,  $n=3$ 。\*\*\* $P<0.001$ , 与阴性对照组相比较。

A: the level of GATA-1/2 protein; B: the statistical analysis of relative level of GATA-1/2 protein. Blank: blank control group; shCTRL: negative control group; shGATA-1: GATA-1 shRNA group; shGATA-2: GATA-2 shRNA group. Mean±S.D.,  $n=3$ . \*\* $P<0.01$  vs negative control shRNA group.

图5 GATA-1/2敲低THP-1细胞株构建

Fig.5 The construction of GATA-1/2 knockdown THP-1 cell line



A: GATA-1 shRNA干扰THP-1细胞后LUNA mRNA水平; B: GATA-2 shRNA干扰THP-1细胞后LUNA mRNA水平。NI: 对照组; Latent infection: HCMV潜伏感染组; Activated infection: HCMV激活感染组。

A: the level of LUNA mRNA in THP-1 treated with GATA-1 shRNA; B: the level of LUNA mRNA in THP-1 treated with GATA-2 shRNA. NI: control group; Latent infection: HCMV latent infection group; Activated infection: HCMV activated infection group.

图6 HCMV潜伏和激活感染GATA-1/2干扰后THP-1细胞时LUNA基因的表达

Fig.6 The expression of HCMV LUNA gene in GATA-1/2 knockdown THP-1 cells in latent and activated infection

HCMV *LUNA*基因在两种感染状态下的表达差异,即HCMV潜伏感染时*LUNA*基因表达,而在激活感染时基本不表达。

HCMV感染髓系祖细胞后,随着其分化为巨噬细胞或树突状细胞,病毒的早期基因表达就会被激活,HCMV可由潜伏感染向激活感染转化,同时产生具有感染性的子代病毒<sup>[14-15]</sup>。HCMV潜伏感染细胞时,病毒CLTs的表达直接受到细胞一些转录调控因子的影响,例如核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、CAMP反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)和GATA-1/2等<sup>[16]</sup>。Reeves等<sup>[17]</sup>研究发现,HCMV感染髓系CD34<sup>+</sup>细胞时,病毒*LUNA*基因的表达会受到细胞分化的影响。这主要是由于细胞分化过程中,病毒*LUNA*基因启动子区受到乙酰化组蛋白以及甲基化酶的调控,随后转录因子GATA-2与病毒*LUNA*基因启动子结合,通过改变染色质结构影响*LUNA*基因的表达<sup>[17]</sup>。我们先前的研究亦证实,转录因子GATA-1可以与*UL111A*基因结合进而调控其表达,参与HCMV潜伏和激活感染过程<sup>[8]</sup>。*LUNA*基因已被证实是HCMV潜伏相关基因,本研究结果表明,HCMV潜伏和激活感染组转录因子GATA-1/2的表达与*LUNA*基因表达相关,GATA-1/2可影响病毒基因*LUNA*的转录。Emma等<sup>[18]</sup>研究证实,在HCMV TB40E/Merlin病毒株潜伏感染髓系CD34<sup>+</sup>细胞时,转录因子GATA-2可与*LUNA*基因启动子区域发生结合,在乙酰化组蛋白作用下对*LUNA*基因的表达进行调控。本研究在HCMV感染的细胞模型中,进一步证实转录因子GATA-1/2通过与*LUNA*基因5'上游序列结合影响*LUNA*基因的转录,参与HCMV潜伏与激活过程。

shRNA干扰技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,我们利用该技术干扰转录因子GATA-1/2后,分析病毒*LUNA*基因的表达。以慢病毒为载体的shRNA干扰技术,通过扩增的方式使转染成功的细胞基因组中永久包含shRNA表达框并能稳定表达shRNA,产生较久的基因沉默效应。本文研究结果显示,干扰THP-1细胞GATA-1/2后,病毒*LUNA*基因的表达受到影响,这进一步证明转录因子GATA-1/2的表达与病毒*LUNA*基因的表达相关。综合上述结果,我们认为,GATA-1/2对HCMV潜伏和激活感染组*LUNA*基因的表达发挥着调控作用,且潜伏感染组调控作用更为明显,这可能是由于潜伏感染时

GATA-1/2蛋白表达量较高。在病毒潜伏感染过程中,HCMV基因的表达增加,可能有其他病毒产物影响了细胞转录因子的产生。Poole等<sup>[19-20]</sup>的研究也认为,在HCMV潜伏感染髓系CD34<sup>+</sup>细胞时,病毒产生的miRNA可以引发胞内转录因子GATA-2表达上调,从而维持病毒在细胞内的潜伏感染,而在HCMV激活感染中并无此现象。

本研究结果证实,GATA-1/2与*LUNA*基因启动子区结合,初步阐明GATA-1/2通过影响病毒*LUNA*基因的转录参与HCMV潜伏和激活感染,为明确HCMV感染的分子机制提供实验依据。但由于HCMV潜伏与激活感染是一个复杂的过程,还需进一步深入研究并进行验证,例如GATA-1/2是如何与*LUNA*基因启动子区结合位点作用的,结合位点的缺失是否影响GATA-1/2的调控功能,是否存在其他转录因子作用这些区域等。相信随着这些问题的逐一阐明,将有助于全面理解HCMV潜伏和激活感染的分子机制。

## 参考文献 (References)

- 1 MocarSKI ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses//Lippincott W, Wilkins. Fields Virology, 5th ed. Philadelphia, PA, USA, 2007, 2701-72.
- 2 Ross DS, Dollard SC, Victor M, Sumartojo E, Cannon MJ. The epidemiology and prevention of congenital cytomegalovirus infection and disease: activities of the Centers for Disease Control and Prevention Workgroup. J Womens Health (Larchmt) 2006; 15(3): 224-9.
- 3 Ma Y, Wang N, Li M, Gao S, Wang L, Zheng B, et al. Human CMV transcripts: an overview. Future Microbiol 2012; 7(5): 577-93.
- 4 Slobodman B, Cao JZ, Avdic S, Webster B, McAllery S, Cheung AK, et al. Human cytomegalovirus latent infection and associated viral gene expression. Future Microbiol 2010; 5(6): 883-900.
- 5 Bresnahan WA, Shenk TE. UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(26): 14506-11.
- 6 Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 325: 297-313.
- 7 Gao J, Chen YH, Peterson LC. GATA family transcriptional factors: emerging suspects in hematologic disorders. Exp Hematol Oncol 2015; 4: 28.
- 8 田可港, 浮苗, 高艳, 彭颖, 李祥, 郑晓群, 等. 转录因子GATA-1与人巨细胞病毒*UL111A*基因5'上游序列结合的研究. 中国病理生理杂志(Tian Kegang, Fu Miao, Gao Yan, Peng Ying, Li Xiang, Zheng Xiaoqun, et al. Binding of transcription factor GATA-1 to 5' upstream sequence of human cytomegalovirus *UL111A* gene. Chinese Journal of Pathophysiology) 2012; 28(12): 2244-9.



- 9 Kong SK, Kim BS, Uhm TG, Lee W, Lee GR, Park CS, *et al.* Different GATA factors dictate CCR3 transcription in allergic inflammatory cells in a cell type-specific manner. *J Immunol* 2013; 190(11): 5747-56.
- 10 Rice GP, Schrier RD, Oldstone MB. Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(19): 6134-8.
- 11 Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(25): 11879-83.
- 12 Kondo K, Xu J, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(20): 11137-42.
- 13 Bego M, Maciejewski J, Khaiboullina S, Pari G, St Jeor S. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J Virol* 2005; 79(17): 11022-34.
- 14 Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(25): 16255-60.
- 15 Hargett D, Shenk TE. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14<sup>+</sup> monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(46): 20039-44.
- 16 李琦涵, 姜莉. 人类疱疹病毒的病原生物学. 北京: 化学工业出版社(Li Qihan, Jiang Li. Pathogenesis of Human Herpesvirus. Beijing: Chemical Industry Press), 2009, 226-41.
- 17 Reeves MB, Sinclair JH. Analysis of latent viral gene expression in natural and experimental latency models of human cytomegalovirus and its correlation with histone modifications at a latent promoter. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 3): 599-604.
- 18 Poole E, Walther A, Raven K, Benedict CA, Mason GM, Sinclair J. The myeloid transcription factor GATA-2 regulates the viral *UL144* gene during human cytomegalovirus latency in an isolate-specific manner. *J Virol* 2013; 87(8): 4261-71.
- 19 Poole E, McGregor Dallas SR, Colston J, Joseph RS, Sinclair J. Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34 progenitors. *J Gen Virol* 2010; 92(Pt 7): 1539-49.
- 20 Poole E, Sinclair J. Sleepless latency of human cytomegalovirus. *Med Microbiol Immunol* 2015; 204(3): 421-9.