

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.08.027

卡波氏肉瘤相关疱疹病毒 ORF65 抗体的制备及其特异性检测*

陈源红¹, 赵丽娟¹, 梁有龙², 张卓华², 曾 怡^{1△}

(右江民族医学院:1. 微生物学与免疫学教研室;2. 临床本科 2011 级 8 班, 广西百色 533000)

[摘要] **目的** 制备高效价卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)病毒 ORF65 衣壳蛋白抗体并检测其特异性。**方法** 将人工合成的 ORF65 蛋白抗原经弗氏佐剂乳化,在家兔背部、颌下等皮下多点免疫注射,间隔 2 周免疫,共 4 次。末次免疫后 1 周取兔血清,ELISA 法检测兔血清抗体 IgG 抗体水平。进一步采用免疫荧光、Western blot 检测制备的抗血清中与 ORF65 结合的特异性。**结果** 家兔在全程免疫后产生了高效价的特异性抗体,最高滴度达 1:12 800。免疫荧光检测显示,与未经佛波酯(TPA)刺激的 BCBL-1 细胞相比,兔抗血清主要结合于 BCBL-1 细胞胞质,与 ORF65 蛋白在细胞内表达位置一致。Western blot 结果显示在 21 kD 处有特异性蛋白条带,其大小与预期的 ORF65 蛋白大小相符,同时经 TPA 刺激的 BCBL-1 细胞中 ORF65 蛋白表达量高于对照组,与 ORF65 蛋白裂解期蛋白的特性相符。**结论** 用 ORF65 衣壳蛋白抗原免疫家兔,可成功制备高效价的特异性抗血清,该抗体可与 KSHV 病毒 ORF65 蛋白特异性结合。

[关键词] 卡波氏肉瘤相关疱疹病毒;ORF65;抗体;免疫性

[中图分类号] R737

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)08-1091-03

Preparation and specificity of antibodies against ORF65 capsid protein of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus*

Chen Yuanhong¹, Zhao Lijuan¹, Liang Youlong², Zhang Zhuohua², Zeng Yi^{1△}

(1. Department of Microbiology and Immunology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Clinical Medicine Undergraduate Grade 2011 Class 8, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

[Abstract] **Objective** To prepare a high-titer rabbit specific serum antibody against Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) ORF65 capsid protein and identify the specificity of serum antibody. **Methods** Artificial synthetic peptide of ORF65 protein was emulsified with Freund adjuvant, 4 rabbits were immunized with the prepared antigen by subcutaneous injection at various sites of skin of back and jaw once every two weeks. Immunization was carried out in total 4 times. The serum of the immunized rabbits was collected at a week after the last immunization. The titer of rabbit anti-serum was assayed by ELISA. Specificity of the rabbit anti-serum was analyzed by immunofluorescence assay and Western blot. **Results** The immunized rabbits produced high-titer serum antibody after total immunization. The highest titer of anti-serum against ORF65 protein peptide was 1:12 800. The results of Immunofluorescence assay showed that antibody was binded in plasma of BCBL-1 cell mostly, which was consistent with the expression location of ORF65 in BCBL-1 cell. Subsequently, the data of Western blot revealed a specific band about 21 kD which accorded with the size of ORF65 protein. Meanwhile, the expression of ORF65 in TPA treated BCBL-1 cells was higher than the control cells, which was consistent with the expression characteristics of lytic protein. **Conclusion** High-titer specific rabbit serum antibody against KSHV capsid ORF65 antigen could be successfully prepared by rabbits immunization with ORF65 protein peptide. The prepared antibody could be revealed immune reaction specificity with KSHV ORF65 protein.

[Key words] Kaposi's sarcoma associated herpesvirus; ORF65 protein; antibody; specificity

卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV)由 Chang 等^[1]在 1994 年首先从 AIDS 相关型 Kaposi's 肉瘤(Kaposi's sarcoma, KS)患者的肉瘤组织发现,又称人类 8 型疱疹病毒(human herpesvirus-8, HHV-8)。KSHV 与原发弥漫性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)、多中心浆细胞增多症(multicenter castlemans disease, MCD)等恶性肿瘤发生密切相关^[2]。此外,研究发现 KSHV 是卡波氏肉瘤发生的必需因素^[3]。KS 是一种少见的软组织恶性多发性出血性血管肉瘤。临床上分为 4 型即经典型 KS、AIDS 相关型 KS、非洲型 KS 及免疫抑制型 KS^[4],因此,KS 为艾滋病患者好发肿瘤之一。来源于体腔 B 淋巴细胞瘤的

BCBL-1 细胞携带 KSHV。KSHV 在宿主细胞内的复制周期分潜伏和裂解复制感染 2 个阶段,其中,ORF65 蛋白是病毒衣壳蛋白,在病毒裂解期表达并可诱导机体产生特异免疫应答,并且在 KSHV 6 种衣壳蛋白中与其他疱疹病毒同源性最低^[5-6]。因此,ORF65 蛋白是 KSHV 病毒检测及其疫苗研究制备的靶抗原,是目前 KSHV 研究前沿热点之一。为获得高效价的 ORF65 蛋白抗体,本研究利用 ORF65 蛋白,通过免疫家兔制备特异性免疫血清,并对其效价及与 KSHV 结合的特异性进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 细胞 KSHV 潜伏感染的 BCBL-1 细胞(南京医科大学

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071345, 81160535);广西壮族自治区教育厅桂教科研基金资助项目(201204LX324, 2013YB183);广西自然科学基金资助项目(2014GXNSFAA118136)。 作者简介:陈源红(1979—),讲师,硕士,主要从事肿瘤相关病因研究。

△ 通讯作者, Tel:13607767453; E-mail: zengyirr@163.com。

卢春教授馈赠)。

1.2 动物 健康日本大耳白兔,雌性,体质量 2.0~2.5 kg,由右江民族医学院实验动物中心提供(批号:LX1304-A3)。

1.3 试剂与仪器 ORF65 蛋白抗原肽[由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成]序列:ASDILTTLSSTTETAAPAVADARK-PPSGKKK。细胞培养基 RPMI-1640 为 Bio Whittaker Cambrex Company 产品,胎牛血清为 Gibco 公司产品,山羊抗兔 IgG(H+L)-HRP、IgG(H+L)-Alexa fluor 488、发光蛋白购自 Cell Signaling Technology,完全弗氏佐剂及不完全弗氏佐剂、OPD 底物、HRP-DAB 底物显色试剂盒购于天根试剂公司,细胞免疫染色固定液、抗荧光淬灭封片液、Western 细胞裂解液、超敏 ECL 化学发光试剂盒为碧云天产品,预染蛋白分子量标准为 Ferments 公司产品,其他试剂均为国产分析纯产品。倒置相差显微镜(Leccia Microsystems CMS GmbH),酶联免疫检测仪(Berthold LB941),电热恒温水浴箱 WH. W21. CU600(上海医疗器械七厂),激光共聚焦显微镜(FV-500 奥林巴斯),ChemidocXRS 型凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 产品。

1.4 方法

1.4.1 家兔多克隆抗体的制备 选择 4 只纯种健康日本大耳白家兔,实验前采集家兔血清,作为阴性对照,分别用合成的 ORF65 蛋白抗原肽进行 0、2、4、6 周免疫程序皮内、皮下多点注射免疫。初次免疫抗原肽与完全弗氏佐剂等量混合,再次免疫抗原肽与不完全弗氏佐剂等量混合、充分乳化,免疫剂量为每只 2 mg。同时,于第 4 次免疫后 1 周,取心脏血。收集的血液于 4 ℃ 下静置过夜,4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 5 min,取血清分装,置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.4.2 家兔血清中抗 ORF65 抗体的 ELISA 检测 用方阵滴定法确定包被抗原和血清的最适工作浓度,将包被抗原(ORF65)用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释为 1.25、2.5、5.0、10.0 μg/mL 的溶液,取免疫血清及阴性血清各 1 份,作 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 稀释,ELISA 间接法检测血清抗体效价^[7]。测定 450 nm 处抗体稀释度均值(A 值),将 450 nm 处 A 值为 1.0 左右的抗原包被浓度和血清稀释度确定为抗原肽的最适包被浓度

和血清最佳稀释度^[8]。

1.4.3 家兔免疫血清中抗 ORF65 抗体的间接免疫荧光检测 调整 BCBL-1 细胞浓度至 1×10^6 个/mL,用无血清培养基同步化 24 h 后,加含 20 ng/mL 佛波酯(TPA)的完全培养基培养 48 h。收集细胞,调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,离心涂片,用免疫染色固定液固定。0.1% PBS-T 洗涤 3 次;用 5% 的 BSA 37 ℃ 封闭 30 min,洗涤 3 次;分别加家兔 ORF65 免疫血清、免疫前兔血清,37 ℃ 孵育 30 min,洗涤 3 次;加山羊抗兔 IgG(H+L)-Alexa fluor 488,洗涤 3 次;PI 染料染色 5 min,洗涤 3 次;用抗荧光淬灭封片液封片,镜检。

1.4.4 家兔免疫血清中抗 ORF65 抗体的 Western blot 检测 用 20 ng/mL TPA 诱导 BCBL-1 细胞 48 h,使细胞中 KSHV 活化,同时以未加 TPA 刺激的 BCBL-1 细胞为对照。收集各组 BCBL-1 细胞蛋白加入 RIPA(强级)裂解液,4 ℃ 下 16 000 r/min 离心 5 min。取上清液,电泳考马斯亮蓝染色确定上样量,分装, -80 ℃ 保存。进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白。转膜后,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, $1 \times$ TBST 缓冲液漂洗 3 次;分别加免疫血清及 β-Actin 一抗,4 ℃ 下孵育过夜,洗膜 3 次;加辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗孵育 1 h,洗膜 3 次;加化学发光试剂,于凝胶成像仪(chemidoc XRS, Bio-Rad, USA)中成像。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间采用 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗原和免疫血清的最适工作浓度 根据 ELISA 方阵滴定法检测的要求,选择 A 值在 1.0 左右时的抗原抗体浓度为最佳工作浓度,结果见表 1、2。在接近 $A_{450} = 1$ 的组合中,得出最佳的工作浓度:抗原包被浓度为 2.5 mg/L、抗体浓度为 1:6 400 的组合。从抗原抗体最佳工作浓度的间接 ELISA 法结果显示,在抗体浓度为 1:12 800,抗 ORF65 免疫血清抗血清 A 值为 (0.656 ± 0.024) ,阴性血清 A 值为 (0.075 ± 0.023) ,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明血效价达 1:12 800 以上,已成功制备 ORF65 的多克隆抗体。

表 1 抗 ORF65 免疫血清最适工作浓度方阵滴定($\bar{x} \pm s$)

ORF65 (μg/mL)	A 值				阴性对照 1:100
	1:100	1:200	1:400	1:800	
1.25	1.233 ± 0.036 *	0.960 ± 0.056 *	0.888 ± 0.025 *	0.885 ± 0.034 *	0.293 ± 0.031
2.5	1.376 ± 0.023 *	1.335 ± 0.045 *	1.282 ± 0.041 *	1.231 ± 0.021 *	0.282 ± 0.021
5.0	1.223 ± 0.033 *	1.138 ± 0.032 *	0.933 ± 0.047 *	0.823 ± 0.044 *	0.369 ± 0.038
10.0	0.908 ± 0.039 *	0.884 ± 0.027 *	0.812 ± 0.033 *	0.739 ± 0.025 *	0.291 ± 0.046

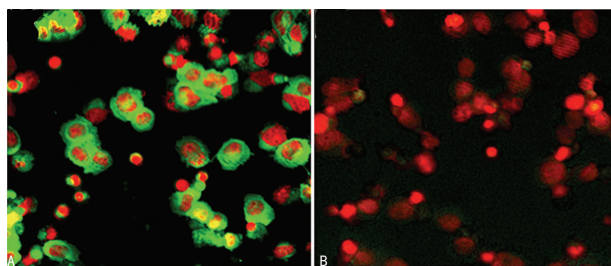
*: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

表 2 抗 ORF65 免疫血清最适工作浓度方阵滴定($\bar{x} \pm s$)

ORF65 (μg/mL)	A 值				阴性对照 1:100
	1:100	1:200	1:400	1:800	
1.25	0.804 ± 0.038 △	0.633 ± 0.023 △	0.445 ± 0.020 *	0.364 ± 0.019	0.293 ± 0.031
2.5	1.182 ± 0.042 △	1.085 ± 0.028 △	0.998 ± 0.033 △	0.656 ± 0.024 △	0.282 ± 0.021
5.0	0.761 ± 0.025 △	0.604 ± 0.027 △	0.318 ± 0.026	0.218 ± 0.029	0.369 ± 0.038
10.0	0.609 ± 0.024 △	0.325 ± 0.033	0.267 ± 0.035	0.184 ± 0.039	0.291 ± 0.046

*: $P < 0.05$, △: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

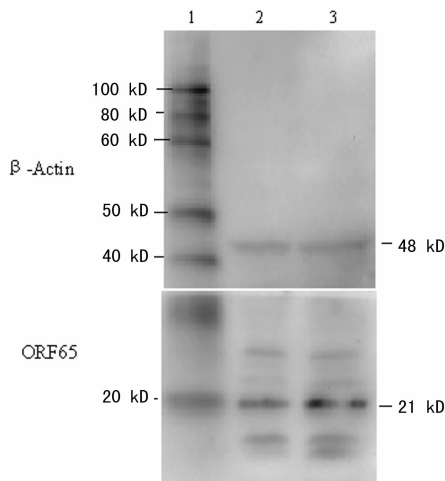
2.2 免疫荧光法检测 ORF65 蛋白表达及定位 阴性对照组显示微弱的绿色荧光,而实验组则显示较强的绿色荧光,且绿色荧光较多地集中在细胞质上,这说明 ORF65 蛋白表达于 BCBL-1 细胞,并且表达于细胞质上,见图 1。



A:以家兔 ORF65 免疫血清为一抗;B:以家兔免疫前血清为一抗。

图 1 间接免疫荧光检测免疫血清对 BCBL-1 细胞中 ORF65 蛋白的免疫反应性(×400)

2.3 蛋白质免疫印迹法检测 ORF65 蛋白表达 TPA 诱导 BCBL-1 细胞组及未加 TPA 刺激的 BCBL-1 细胞对照组在 21 kD 处均有特异性蛋白条带,其大小与 ORF65 蛋白大小相符,且 TPA 诱导 BCBL-1 细胞组蛋白表达量明显高于未加 TPA 刺激的 BCBL-1 细胞对照组,见图 2。



1: Biotinylated Protein Ladder; 2: TPA+BCBL-1 细胞组; 3: TPA-BCBL-1 细胞组。

图 2 抗 ORF65 抗体特异性的 Western blot 鉴定

3 讨论

KSHV 是卡波氏肉瘤发生的必需因素,跟未发生 KS 的 KSHV 感染者比较,KS 患者体内 KSHV 的病毒载量含量较高,体内含活化病毒的细胞数量与组织发生恶化及病毒感染的进程有相应关系;而且在疾病的发展进程中病毒载量也随之提高^[9-10]。KSHV 处于潜伏感染状态下的被重激活并裂解复制,此时可检测到多种病毒裂解复制产物,复制相关基因 ORF59、包装相关基因 ORF29、主要衣壳蛋白 ORF26、包膜糖蛋白 K8.1、小衣壳蛋白 ORF65 蛋白等,同时,KSHV 包装产生新的感染性病毒颗粒^[11-15]。其中,ORF65 蛋白是在子代病毒的装配中有重要作用,ORF65 蛋白在细胞内主要发挥转运其他衣壳蛋白的功能,一旦 ORF65 蛋白缺失,病毒会发生衣壳缺失。因此,ORF65 蛋白可作为检测 KSHV 感染的一个重要的免疫学指标,也可以作为一个新的抗病毒靶点。

抗原抗体反应具有比例性,如果抗原抗体的浓度和比例适合则形成的复合物体积大、数量多。如包被抗原浓度过高,由于蛋白质与酶标板的聚苯乙烯分子间的相互作用,蛋白质容

易吸附于酶标板表面,可能产生前带现象而降低敏感性。如果包被液中的抗原浓度过低,固相载体(酶标板)表面不能被完全覆盖,酶标板孔表面容易非特异性吸附相继加入的一抗血清标本和二抗中的蛋白质,产生非特异性显色而影响检测结果,因此,在 ELISA 方阵滴定法中接近 A₄₅₀=1 的组合中,得出最佳的抗原抗体工作浓度^[7]。另外,在抗 ORF65 免疫血清浓度为 1:12 800,抗血清 A 值为 0.656±0.024,阴性清 A 值为 0.075±0.023,差异有统计学意义(P<0.01)。在进一步的免疫荧光检测实验中,用免疫血清可以检测到 TPA 诱导活化的 KSHV 感染的 BCBL-1 细胞显示较强的绿色荧光;用 Western blot 则可以检测到 TPA 刺激与未刺激的 BCBL-1 细胞中,TPA 刺激的 BCBL-1 细胞中病毒衣壳蛋白 ORF65 的表达量较高,该抗血清具有特异性。因此,推断本研究获得了高效价的抗 ORF65 家兔免疫血清。

本研究成功制备 KSHV ORF65 多克隆抗体,该结果为为进一步制备 ORF65 单克隆抗体奠定了基础。基于 ORF65 蛋白在 KSHV 复制中的重要作用,成功制备该抗体也为进一步研究临床 KSHV 感染检测方法和探索抗病毒新靶点的研究奠定基础。

参考文献

[1] Chang Y, Cesarman E, Pessin M, et al. Identification of herpesvirus like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma[J]. Science, 1994, 266(5192): 1865-1869.

[2] Katano H, Sata T. Human herpesvirus 8 virology, epidemiology and related diseases[J]. Jpn J Infect Dis, 2000, 53(4): 137-155.

[3] Dilnur P, Katano H, Wang ZH, et al. Classic type of Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 infection in Xinjiang, China[J]. Pathol Int, 2001, 51(11): 845-852.

[4] 马春雷, 普雄明, 吴卫东. 新疆 Kaposi 肉瘤患者感染的人类疱疹病毒 8 型 ORF75 基因多态性研究[J]. 实用皮肤病学杂志, 2009, 26(2): 68-71.

[5] Fu B, Li BL, Wang LD. Immunogenicity analysis of prokaryotic expression products of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus ORF65[J]. Virologica Sinica, 2008, 23(3): 196-202.

[6] 王娜, 冷弘, 燕备战, 等. 人类疱疹病毒 8 抗原融合基因的构建及初步应用[J]. 重庆医学, 2013, 42(23): 2703-2705.

[7] 杨婷婷, 孙秀兰, 邵景东, 等. 百草枯人工抗原的合成及抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(9): 924-927.

[8] 杜瑞雪, 范仲学, 郭笃发. PCB77 人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(2): 149-151.

[9] Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen[J]. Science, 1999, 284(5414): 641-644.

[10] Decker LL, Shankar P, Khan G, et al. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus(KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients[J]. J Exp Med, 1996, 184(1): 283-288. (下转第 1096 页)

支的反折区,在功能上是下颌骨重要的应力部分^[11]。如果截骨线上端过高易向上延伸损伤颞下颌关节或引起髁突颈骨折,也易引起该区应力下降,影响咀嚼功能。故建议截骨线的后端 A 点不宜过高,尽可能不高于下颌孔平面。

3.3 弧形截骨线的设计 下颌角截骨术并不是要消灭下颌角,而是让下颌角的曲线变得更加流畅自然,更加符合美学要求。截骨时还应考虑求美者的个性化需求。基于上述结果,本文设计了 3 条弧形截骨线,即 A-X-C、A-X-D 和 A-X-E 弧线,基本能够满足各种类型求美者的需求(图 1)。3 条截骨线的后端均为 A 点,截骨线的前端 C 点、D 点、E 点可借活体标志来确定,C 点位于下颌支前缘的下方,D 点、E 点可分别位于在 M₂ 位和 P₄ 位下方。弧形截骨线的最凸点为 X 点,即截骨后新下颌角的位置,X 点可以在 B₁B 段移动,以调整新下颌角的弧度,因 X 点在 O 点与下颌角的连线上,保证了新下颌角在正常位置。3 条弧形截骨线分别适用于不同的求美者。A-X-C 截骨线最安全,但截骨量较少,适合下面部轮廓并不严重过宽者选用;对于下面部较宽、下颌角角度大、下颌骨升支较短者,可选取弧线 A-X-D,该截骨线适合多数求美者;下颌角肥大伴有颞部肥大并且要求进一步手术缩窄下面部宽度者可选用弧线 A-X-E。但需要注意 E 点不宜前移过多,否则截下的骨块将太长而不易完整取出^[12]。

3.4 临床意义 (1)实用:目前,临床上 X 线片是下颌角手术的首选参考,具体骨量的切除仍主要凭借术者的经验^[13]。该截骨线的设计可以凭借经验的模糊做法变得科学、量化。由于患者头颅骨与 X 线片的比例尺约为 1:1,所以,术前在下颌骨 X 线片上设计截骨线即相当于在下颌骨表面设计截骨线^[12]。术前把求美者的头部 X 线片输入电脑,可按此方法借助于画图工具设计出完美的弧形截骨线,然后直接与求美者交流,可以达到最佳满意度,也可最大限度减少医疗纠纷。截骨线的设计是借助于活体标志来确定的,这种根据下颌骨解剖学特点设计的截骨线具有标志明显、易于操作、便于推广的优点。(2)安全:下颌管的走行为一条弧线,3 条截骨线均走行在下颌管的下方,为基本平行于下颌管的弧线,距下颌管距离都大于 5 mm,不会损伤下颌管内的血管神经,也不会明显降低下颌骨的咬合力。下颌角肥大程度、下颌管距下颌角的距离、术后下面部拟缩小的程度等因素决定截骨宽度,截除下颌角达到明显改善脸型的目的即可,不宜过宽。(3)美观:截骨线两端留下的是弧线,与下颌骨的边缘衔接平滑自然;有效避免了直线截骨、三角块截骨后第 2 下颌角的出现。以保留下的骨量为衡量标准,可在安全范围内截除较宽的下颌角,以获得最大限度的对

称、美容效果。避免了两侧截骨过量或不足、不对称等情况,克服了用其他截骨方法截骨宽度不易掌握等缺点。

参考文献

[1] 吴一,李伟,邓颖,等. 下颌角肥大缩小术若干问题探讨[J]. 中国美容医学,2010,19(4):511-514.
 [2] 杨永胜,方皓,赵亮,等. 口内入路下颌角弧形截骨术 218 例回顾性分析[J]. 中国美容整形外科杂志,2011,22(4):202-204.
 [3] Ozdemir R,Baran CN,Karagoz MA,et al. Place of sagittal split osteotomy in mandibular surgery[J]. J Craniofac Surg,2009,20(2):349-355.
 [4] 郭军,常财旺,杨乐,等. 下颌角截除并下颌骨外板切除一次成形面下份缩小术[J]. 中国美容医学,2007,16(11):1507-1510.
 [5] Kim YH,Cho BC,Lo LJ. Facial contouring surgery for Asians[J]. Semin Plast Surg,2009,23(1):22-31.
 [6] Morris DE,Moaveni Z,Lo LJ. Aesthetic facial skeletal contouring in the Asian patient[J]. Clin Plast Surg,2007,34(3):547-556.
 [7] 艾玉峰. 下颌角截骨手术并发症的预防及处理[C]. 第二届全国医疗美容技术交流大会暨高新技术精品手术演示会,2010-10-22.
 [8] 郭军,常财旺,杨乐,等. 颞部楔形骨段切除矫治方颞[J]. 中国美容医学,2007,16(10):1397-1399.
 [9] 归来,侯全志,张智勇,等. 口内入路下颌角肥大弧形截骨术[J]. 中华整形烧伤外科杂志,1999,15(3):336-338.
 [10] 付升旗,范锡印,刘恒兴. 下颌管与下颌后牙的位置关系及临床意义[J]. 中国临床解剖学杂志,2009,27(6):651-653.
 [11] 罗奇,柳大烈,韩路军. 正常女性下颌角区多层螺旋 CT 解剖学研究[J]. 中国临床解剖学杂志,2010,28(2):162-165.
 [12] 李玉杰,高卿豪,李罡. 定点标示弧形延长法截骨矫正下颌角肥大[J]. 中国美容整形外科杂志,2012,23(6):345-348.
 [13] 谭鸞远,归来. 下颌角整形的研究进展[J]. 中国美容医学,2010,19(3):447-449.

(收稿日期:2014-10-25 修回日期:2014-12-22)

(上接第 1093 页)

[11] Sun R,Lin SF,Gradoville L,et al. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(18):10866-10871.
 [12] Sarid R,Flore O,Bohenzky RA,et al. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1) [J]. J Virol,1998,72(2):1005-1012.
 [13] 南玉龙,谭晓华,杨磊. KSHV 潜伏和裂解感染机制的研

究进展[J]. 中国医学创新,2012,9(3):151-153.
 [14] Lan K,Kuppers DA,Verma SC,et al. Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency[J]. J Virol,2005,79(12):7453-7465.
 [15] 程伟,郝婷婷,王子盾,等. HSV-1 作用于 KSHV ORF50 启动子区中特异性应答位点序列的初寻[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(5):595-600.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-12-15)