[文章编号] 1003－4684(2026)01-0097-06

BACH1 过表达对 Ⅱ 型溶瘤单纯疱疹病毒(oHSV2)复制的抑制效应

钟 莉，陈明鑫，王润杨，汪 洋，胡 翰，刘滨磊

(湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为探究 BTB-CNC 同源体 1(BACH1)过表达对重组Ⅱ型溶瘤单纯疱疹病毒(oHSV2)复制的影响，以 PiggyBac 双启动子萤火虫荧光素酶-绿色荧光蛋白载体(PBDP-FLUC-GFP)为骨架，构建 BACH1 重组过表达质粒，采用 PEI-max 转染试剂将其转染至人胚胎肾细胞(293T)，经嘌呤霉素筛选获得稳定表达 BACH1 与 GFP 的单克隆细胞系(293T-BACH1-GFP)。通过流式细胞术检测 GFP 表达以验证细胞系纯度，通过实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)与蛋白质印迹法(Western Blot)验证 BACH1 的 mRNA 及蛋白表达水平，借助 CCK-8 实验比较 oHSV2 对 BACH1 过表达细胞与野生型 293T 细胞杀伤能力，采用半数细胞培养物感染剂量法(CCID50)检测 oHSV2 感染两类细胞后的病毒滴度。结果显示，流式细胞术检测得 293T-BACH1-GFP 细胞中 GFP 阳性率为 99.78%；RT-qPCR 检测到 293T-BACH1-GFP 细胞中 BACH1 mRNA 较对照组显著升高；Western Blot 可检测到 293T-BACH1-GFP 细胞中 BACH1-6xHis 融合蛋白的特异性条带；CCK-8 实验表明，BACH1 过表达细胞对 oHSV2 的杀伤敏感性显著降低；CCID50 检测发现 BACH1 过表达后，细胞内 oHSV2 病毒滴度呈显著下降趋势。BACH1 基因过表达可抑制 oHSV2 的复制，为后续溶瘤病毒治疗相关机制研究与方案优化提供实验依据。

[关键词] BACH1；Ⅱ型溶瘤单纯疱疹病毒；人胚胎肾细胞；复制抑制

[中图分类号] R37 [文献标识码] A

溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒(oncolytic herpes simplex virus type 2，oHSV2)是以野生型Ⅱ型单纯疱疹病毒为骨架[1]，通过敲除 ICP34.5[2]和 ICP47[3]以降低神经毒性和增强对肿瘤细胞的选择性改造而来[4]。单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)在既往实验和临床研究中被广泛使用[5]。研究表明，HSV-2 在某些方面可能比 HSV-1 具有更强的溶瘤潜力，其核心优势在于：1) HSV-2 的特定结构域可以激活 RAS/MEK/MAPK 信号通路，提高病毒自身繁殖效率；2)HSV-2 可以选择性感染肿瘤细胞并形成合胞体，诱导比 HSV-1 更显著的抗肿瘤免疫应答[2,6-7]。目前，已有多项基于 oHSV2 的临床试验在胶质母细胞瘤、黑色素瘤等实体瘤中开展，初步验证了其安全性和抗肿瘤潜力[8]。然而，如同其他癌症疗法，溶瘤病毒治疗同样面临肿瘤异质性及耐药性问题[9]。因此，系统鉴定调控 oHSV2 复制的关键宿主因子至关重要。这对于预测疗效、克服耐药性以及优化联合治疗策略具有重要的理论与临床价值。

BTB-CNC 同源体 1(BTB-CNC homolog 1，BACH1)是一种蛋白质编码基因，隶属于亮氨酸拉链转录因子家族，分子量大小为 82 kDa，在哺乳动物组织中广泛表达，早期对于 BACH1 的研究主要聚焦于其在氧化应激、机体衰老及血红素氧化生理调控等生理过程中的作用[10-12]。近年来，越来越多的研究表明 BACH1 与肿瘤的发生密切相关：在急性髓系白血病细胞中，暴露于抗癌药物后，较低水平的 BACH1 表达与血红素氧合酶-1(HO-1)表达量及细胞活力的升高存在关联性；BACH1 及其靶基因的高表达，与患者乳腺癌的复发以及前列腺的结肠癌细胞的侵袭和迁移能力增强呈正相关，而较低水平的 BACH1 与乳腺肿瘤转移能力的降低密切相关等[13-15]。另有研究表明，在肿瘤细胞中先下调 BACH1 的表达后再感染 HSV-1 检测病毒拷贝数，发现 BACH1 表达缺失后，HSV-1 在细胞中的复制能力显著增加，进而增加抗肿瘤能力[16]。这暗示 BACH1 可能作为一个关键的宿主限制性因子，负责调控疱疹病毒的复制过程。其潜在机制可能涉及多方面：一是可能直接结合并抑制病毒早期基因启

[收稿日期] 2024－01－18

[第一作者] 钟 莉(1997—)，女，四川宜宾人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为生物与医药－生物工程。

[通信作者] 刘滨磊(1962—)，男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

动子活性，从而阻碍病毒基因的转录启动；二是可能通过其经典的调控宿主抗氧化反应元件（ARE）的功能，以及近年研究揭示的负调控Ⅰ型干扰素信号通路的能力，共同改变细胞内的氧化还原状态与抗病毒免疫应答，间接影响病毒的复制进程[17-18]。

目前，关于BACH1对特异性改造的oHSV2复制的调控机制，仍缺乏系统性深入研究。鉴于BACH1在肿瘤发生进程中的关键调控作用及其已被证实的HSV-1复制的调控功能，本研究推测BACH1也可能通过相似通路或特异性机制影响oHSV2在肿瘤细胞中的复制效率。基于此，本研究旨在明确BACH1过表达是否抑制oHSV2的复制。

1 材料与方法

1.1 材料

293T细胞由北京协和医院细胞资源中心赠送，PBDP-FLUC-GFP重组质粒由本实验室（武汉滨会生物科技股份有限公司）提供。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 试剂 DMEM/F12培养基，TOP10感受态，DL15000 DNA Marker，PEI-max转染试剂，质粒提取试剂盒由本实验室提供；胎牛血清购自Biochannel公司；新生牛血清购自四季青公司；PLVX-CMV-BACH1质粒购于淼灵公司；Xba Ⅰ、Not Ⅰ购于NEB公司；连接酶，胶回收试剂盒，产物纯化试剂盒，RNA提取试剂盒，购于诺维赞公司；胰蛋白酶消化液、嘌呤霉素购于索莱宝公司；SYBR荧光染料购于TOYOBO公司；6x His-HRP抗体购于Proteintech公司；10～180 kDa蛋白Marker购于ABclonal公司；反转录试剂购于AG公司；ECL显影液购于Biosharp公司。

1.2.2 仪器 北京东联生物安全柜；细胞培养箱（Panasonic公司）；基因扩增PCR仪（东胜龙）；倒置荧光显微镜（Nikon）；多功能酶标仪（Thermo Fisher Scientific）；BD流式细胞检测仪；伯兰特化学发光仪；实时荧光定量PCR仪（ROGGENE）。

1.3 实验方法

1.3.1 重组过表达质粒的构建与鉴定 根据PBDP载体序列与BACH1基因（NM_001134385.1）设计并合成上、下游引物（F：ACCTCCATAGAAGATTCTAGAGAATTCATGTCTCTGAGTGAGAACTCGGTT；R：CGATCGCAGATCCTTGCGGCCGCGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCATCAGTAGTACATTTATCAGTCATCTGCTG），插入Xba Ⅰ、Not Ⅰ酶切位点。PCR扩增PLVX-CMV-BACH1质粒的BACH1基因片段，回收并纯化PCR产物；1 μg PBDP载体进行20 μL体系双酶切1 h，回收载体，于37 ℃，30 min的条件下采用连接酶进行重组连接，于37℃转化培养15 min，筛选单克隆菌落做菌落PCR，将阳性菌落摇菌并进行重组质粒提取。将提取后凝胶电泳验证条带正确的阳性菌落送至武汉擎科创新生物科技有限公司测序，同时保菌。

1.3.2 转染及单克隆细胞筛选 293T细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12基中，置于37℃、5% CO_2培养箱内孕育。质粒转染前24 h，以4×10^5 cells/mL的密度将细胞接种到6孔板中，更换新鲜的完全培养基，当细胞融合度达到80%时进行转染操作。取2支EP管，一支加入2 μg质粒DNA（PBDP-BACH1-GFP转座载体质粒与PBDP转座酶辅助质粒比例为1∶4[19]），用50 μL无血清稀释液稀释；另一支加入等量的无血清培养基，再加入7.5 μL PEI-max转染试剂，将稀释后的转染试剂与DNA稀释液混合。室温条件下孵育30 min后，将转染复合物加入到6孔板中，放入CO_2培养箱培养。实验细胞分为空白对照组（CTRL，未转染质粒）、过表达组（293T-BACH1-GFP）和未感染对照组（未接种oHSV2）。转染48 h后通过荧光显微镜观察细胞GFP荧光表达情况，并加入1 μg/mL嘌呤霉素连续筛选7 d，待空白对照组细胞全部死亡后，胰酶消化过表达组细胞扩培至T25培养瓶，然后按照5个/孔的浓度，每孔100 μL铺96孔板进行单克隆细胞筛选并扩培。

1.3.3 流式细胞术检测细胞纯度 处理293T和293T-BACH1-GFP细胞至密度为1×10^6 cells/mL，流式细胞仪检测293T-GFP-BACH1细胞中GFP阳性表达率。

1.3.4 RT-qPCR检测BACH1 mRNA表达量 使用RNA提取试剂盒提取293T和293T-BACH1-GFP细胞中总RNA，再将总RNA反转录为cDNA，将GAPDH做为内参，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法（$\Delta\Delta Ct=$（Ct样品-CtGAPDH）-（Ct对照-CtGAPDH））检测BACH1转录水平相对表达量。每个细胞设置两个组，分别用GAPDH引物（F：GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT；R：GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG）和BACH1引物（F：TTCCACTCAAGAATCGTAGG；R：AGGCAAACTGAATTAAAGGT）扩增，每组3个复孔，实验过程如下：

1）将提取的RNA进行反转录，体系见表1。

表 1　反转录体系

反应组分	体积/μL
5×EVOM-MLVRT Master Mix	2
Rnase free water	Up to 10
RNA	1

2)反转录反应条件：37℃，15 min；85℃，5 s；4℃，∞。

3)反转录后，进行 RT-qPCR 体系配制(表 2)。

表 2　RT-qPCR 体系

反应组分	体积/μL	反应组分	体积/μL
SYBR Green Mix	5	下游引物(R)	0.4
ddH2O	3.2	cDNA 样本	1
上游引物(F)	0.4		

4)RT-qPCR 反应条件：95℃，1 min；95℃，15 s；60℃，15 s；72℃，45 s；95℃，15 s；60℃，1 min；95℃，1 s。

1.3.5　WesternBlot 检测 BACH1 蛋白的表达　处理获得的单克隆 293T-BACH1-GFP 细胞和野生型 293T 细胞至 1×10^6 个 cells/mL，加 200 μL RIPA 蛋白裂解液(含 1×蛋白酶抑制剂)于 4℃冰箱裂解 30 min后，在 12000 r/min，4℃ 条件下低温离心 20 min收集蛋白上清。取适量上清与 6×蛋白 Loading Buffer 混合后金属浴 100℃，5 min 变性，进行 SDS-PAGE 电泳；150 V 恒定电压转膜 30 min；5%脱脂奶粉封闭 1 h，1×TBST 洗 3 次，一次 10 min；6xHis-HRP 抗体(按照 1∶5000 比例稀释)室温孵育 2 h，1×PBST 洗 3 次，每次 10 min；最后 ECL 显色液进行显影。实验中以 GAPDH 作为内参蛋白，因其在不同类型细胞及处理条件下表达稳定，广泛用于 Western Blot 实验中作为上样量与转膜率的参照。

1.3.6　检测 oHSV2 对 293T-BACH1 溶瘤效应　将 293T 细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板(每孔 100 μL)，每个细胞设置 3 个复孔，5% CO_2，37℃条件下培养细胞 24 h，然后按照 MOI 为 0.02、0.2、2 分别接种 oHSV2 病毒液。分别于 24 h、48 h、72 h 加入 CCK-8 试剂 10 μL，轻摇混匀后放培养箱孵育 2 h，酶标仪测定 450 nm 波长下 OD 值：

细胞存活率＝(实验组 OD_{450}－空白孔 OD_{450})/(未感染对照组 OD_{450}－空白孔 OD_{450})×100%。

1.3.7　oHSV2 病毒滴度测定　将 293T 和 293T-BACH1-GFP 细胞以 2 mL/孔铺于 6 孔板中，使待测细胞密度为 4×10^5 个细胞/孔，待细胞融合度达到 80%时，将 oHSV2 按照 MOI＝0.02、0.2 和 2 的剂量感染细胞。感染 24 h 后，取出孔板反复冻融 3 次，收集病毒上清。取 Vero 细胞按照 4×10^5 个 cells/mL，100 μL/孔铺于 96 孔板培养，待贴壁且细胞汇合度达 80%以上开始接毒：将病毒上清用含 2%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基从 10^{-1} 开始依次倍比稀释到 10^{-7}，100 μL/孔接种于 96 孔板，每个梯度 5 个复孔，于感染 72 h 后观察细胞病变效应(CPE)，以≥50%细胞出现病变作为阳性判定标准。采用 Reed-Muench 法计算病毒的半数感染剂量，并以 $CCID_{50}$/mL 表示病毒滴度。

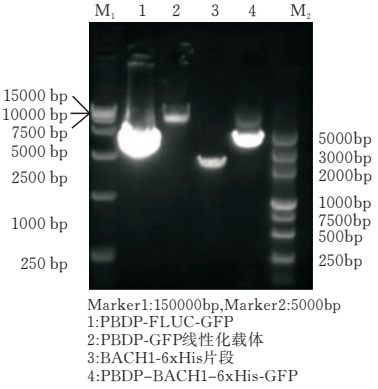
1.4　统计学分析

使用 GraphpadPrism 5.01 进行统计学分析，两组间比较采用两独立样本 t 检验，$P<0.05$ 表示差异具有显著统计学意义(* 代表 $P<0.05$；** 代表 $P<0.01$；*** 代表 $P<0.001$；**** 代表 $P<0.0001$)。

2　结果

2.1　重组过表达质粒的鉴定

如图 1 所示，使用 1.0%琼脂糖凝胶电泳验证重组过表达质粒。泳道 2 为双酶切获得的线性化载体，约 6968 bp；泳道 3 为 BACH1-6×His 片段 PCR 产物，约 2285 bp；泳道 4 为重组过表达质粒 PBDP-BACH1-6×His-GFP，约 9253 bp，均符合理论值。将经电泳验证后的质粒送至擎科(武汉)测序，测序结果中的基因序列与 GenBank 登录序列一致，表明重组过表达质粒构建成功。



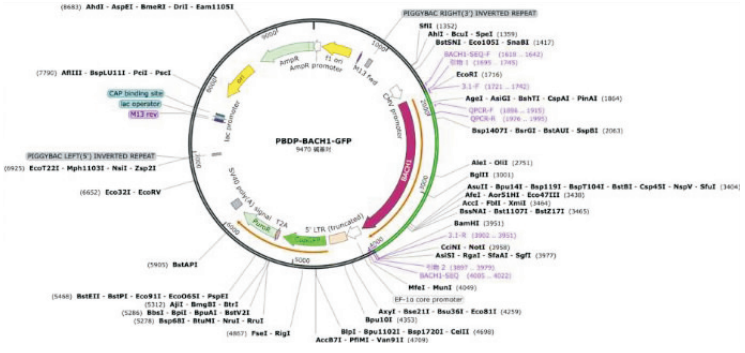


图 1　重组过表达质粒构建

2.2 转染及流式纯度检测

转染 293T 细胞 48 h 后，实验结果如图 2 所示。可观察到暗场下 GFP 表达；经单克隆筛选 293T-BACH1-GFP 细胞后进行流式检测，结果显示该单克隆细胞系中 GFP 阳性率为 99.78%。

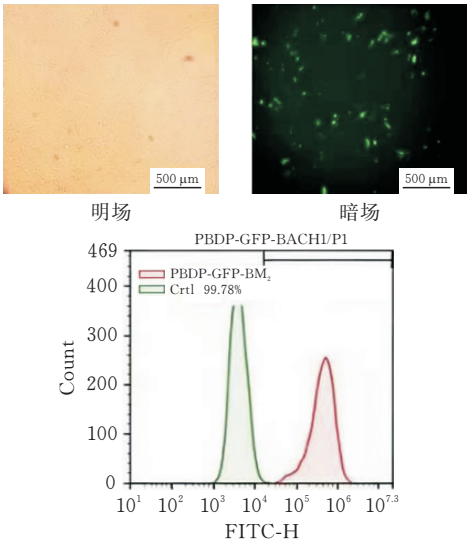


图 2 转染及流式 GFP 纯度检测

2.3 BACH1 mRNA 表达量

通过 RT-qPCR 检测 BACH1 基因的 mRNA 表达量，结果如图 3 所示。RT-qPCR 结果显示，293T-BACH1-GFP 细胞中 BACH1 的 mRNA 相对表达量显著高于野生型 293T 细胞（$P<0.05$），证实 BACH1 基因在细胞内成功过表达。

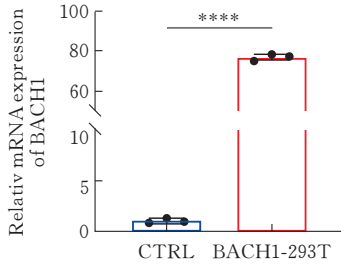


图 3 BACH1 mRNA 相对表达量

2.4 WesternBlot 验证蛋白表达

使用带 6×His 标签的抗体验证重组 BACH1-6xHis 蛋白的表达，实验结果如图 4 所示。对照组与实验组中内参基因 GAPDH 均表达且蛋白大小为 36 kDa；与对照组相比，实验组重组 BACH1-6xHis 蛋白有表达且蛋白大小为 100 kDa，而对照组蛋白无表达。

2.5 CCK-8 检测溶瘤效应

使用 3 个不同的 MOI 在 24 h、48 h 和 72 h 对过表达 BACH1 细胞和野生型 293T 细胞进行杀伤，实验结果如图 5 所示。在不同 MOI 感染条件下，过表达 BACH1 的细胞（293T-BACH1-GFP）在各时间点的存活率均显著高于野生型 293T 细胞

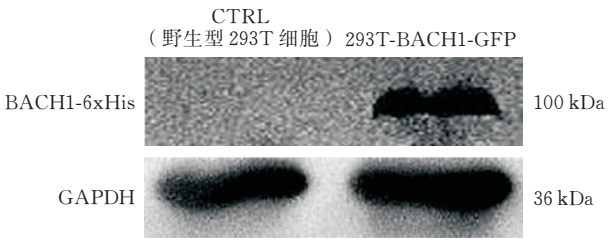


图 4 BACH1-6xHis 融合蛋白表达（Western Blot）

（图 5），且随着 MOI 值的增加，两组细胞存活率的差异更为显著。这提示 BACH1 过表达可增强细胞对 oHSV2 杀伤作用的抵抗力，进而抑制 oHSV2 的溶瘤效应。

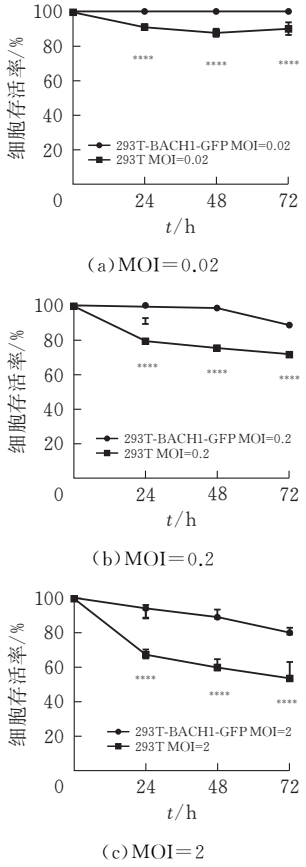


图 5 细胞存活率

2.6 oHSV2 病毒滴度测定

使用 3 个不同 MOI 的 oHSV2 感染 293T 细胞和 293T-BACH1-GFP 细胞，测定 72 h 滴度。如图 6 所示，oHSV2病毒在BACH1过表达细胞中的滴

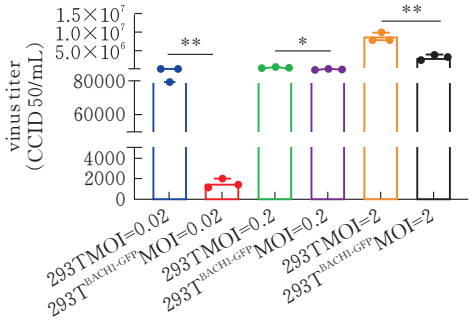


图 6 不同 MOI 感染细胞后病毒滴度

度显著低于野生型 293T 细胞，表明 BACH1 过表达与细胞内 oHSV2 病毒滴度的降低相关。

3　讨论

本研究揭示了转录因子 BACH1 是溶瘤病毒 oHSV2 高效复制的关键宿主限制因子。初步实验表明，BACH1 可能通过调控宿主细胞的转录程序，抑制 oHSV2 的复制周期，进而影响其溶瘤效力。然而，本研究仍存在一定局限性：首先，BACH1 抑制 oHSV2 的具体分子机制尚未阐明，其究竟是直接抑制病毒即刻早期基因的转录，还是通过调控 I 型干扰素(IFN-β)、NF-κB 等宿主抗病毒通路间接发挥作用，仍需进一步探索[20]。与经典的 HSV-1 研究相比，BACH1 在经基因改造的 oHSV2 背景下的作用可能呈现出独特的功能范式[21]，这值得深入对比研究。其次，目前的研究主要基于体外细胞模型，缺乏体内动物实验的验证，也未考虑复杂的肿瘤微环境(如缺氧、免疫细胞浸润)对 BACH1 与 oHSV2 相互作用的影响。

基于此，未来研究可从以下方向深入展开：1)机制层面，需采用染色质免疫共沉淀(ChIP)、双荧光素酶报告基因等技术[22]，验证 BACH1 是否直接结合病毒或特定宿主基因的启动子区域；利用免疫共沉淀、蛋白质组学技术筛选与 BACH1 相互作用的病毒或宿主蛋白，明确其作用靶点。2)模型层面，构建条件性 BACH1 基因敲除的荷瘤小鼠模型[23]，在体内验证靶向 BACH1 能否作为增强 oHSV2 溶瘤疗效的联合策略。3)转化层面，探究如何通过药物调控或基因编辑手段干预 BACH1 通路，从而安全、可控地提升 oHSV2 在肿瘤组织中的选择性复制能力，为开发新一代溶瘤病毒联合疗法提供理论依据和新靶点。

[参 考 文 献]

[1] 施桂兰. 半相合肿瘤特异性淋巴细胞过继免疫治疗肿瘤的小鼠模型研究 2、新型溶瘤病毒 oHSV2hGM-CSF 的构建及其抗肿瘤作用 [D].北京：北京协和医学院，2011.

[2] LIU B L, ROBINSON M, HAN Z Q, et al. ICP34.5-deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties [J]. Gene therapy, 2003, 10(04): 292-303.

[3] CHENG J T,WANG Y Y,ZHU L Z,et al.Novel transcription regulatory sequences and factors of the immune evasion protein ICP47 (US12) of herpes simplex viruses [J].Virology journal,2020,17 (01):101.

[4] 蔡奇应，张思琪，刘华鹃. 溶瘤Ⅱ型单纯疱疹病毒在肿瘤中的复制及表达 [J]. 生物工程学报，2024，40(02)：585-595.

[5] SMITH K D, MEZHIR J J, BICKENBACH K, et al. Activated MEK suppresses activation of PKR and enables efficient replication and in vivo oncolysis by Deltagamma(1)34.5 mutants of herpes simplex virus 1 [J]. Journal of virology, 2006, 80(03): 1110-1120.

[6] FU X, TAO L, CAI R, et al. A mutant type 2 herpes simplex virus deleted for the protein kinase domain of the ICP10 gene is a potent oncolytic virus [J]. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2006, 13(05): 882-890.

[7] 刘硕，钱云云，张荣波. 溶瘤单纯疱疹病毒抗肿瘤作用及其机理研究 [J]. 安徽理工大学学报(自然科学版)，2019，39(02)：81-86.

[8] ANDTBACKA R H, KAUFMAN H L, COLLICHIO F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma [J]. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2015, 33(25): 2780-2788.

[9] LAWLER S E, SPERANZA M C, CHO C F, et al. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review [J]. JAMA oncology, 2017, 3(06): 841-849.

[10] 何韫荃，郭阶雨，魏香香. 转录因子 BACH1 的研究进展 [J]. 自然杂志，2022，44(02)：79-86.

[11] ZHANG X Y, GUO J Y, WEI X X, et al. Bach1: Function, regulation, and involvement in diseas[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 1347969.

[12] ARUNACHALAM A, LAKSHMANAN D K, RAVICHANDRAN G, et al. Regulatory mechanisms of heme regulatory protein BACH1: a potential therapeutic target for cancer [J]. Medical oncology (Northwood, London, England), 2021, 38(10): 122.

[13] MIYAZAKI T, KIRINO Y, TAKENO M, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1 [J]. Cancer science, 2010, 101(06): 1409-1416.

[14] LIANG Y, WU H, LEI R, et al. Transcriptional network analysis identifies BACH1 as a master regulator of breast cancer bone metastasis [J]. The Journal of biological chemistry, 2012, 287(40): 33533-33544.

[15] ZHU G D, LIU F, OUYANG S, et al. BACH1 promotes the progression of human colorectal cancer through BACH1/CXCR4 pathway [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2018, 499(02): 120-127.

[16] 潘超虎. 干扰素诱导基因 BACH1 缺失促进溶瘤病毒 HSV-1 抗肿瘤免疫应答的机制研究 [D].北京：北京

协和医学院，2020.
[17]I GARASHI K，SUN J. The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation [J]. Antioxidants & redox signaling，2006，8(1-2)：107-118.
[18] OKABE Y，SANO T，NAGATA S. Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent [J]. Nature，2009，460(7254)：520-524.
[19] ZONGTAI Q，NATHANIEL W M，XUHUA C，et al. An optimized，broadly applicable piggyBac transposon induction system [J]. Nucleic acids research，2017，45(07)：e55.
[20] KRISTIE T M，ROIZMAN B. Host cell proteins bind to the cis-acting site required for virion-mediated induction of herpes simplex virus 1 alpha genes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，1987，84(01)：71-75.
[21] KAUFMAN H L，KOHLHAPP F J，ZLOZA A. Oncolytic viruses：a new class of immunotherapy drugs [J]. Nature reviews Drug discovery，2015，14(09)：642-662.
[22] ORLANDO V，STRUTT H，PARO R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking [J]. Methods (San Diego，Calif)，1997，11(02)：205-214.
[23] JONKERS J，BERNS A. Conditional mouse models of sporadic cancer [J]. Nature reviews Cancer，2002，2(04)：251-265.

The Inhibitory Effect of BACH1 Overexpression on the Replication of Type II Oncolytic Herpes Simplex Virus (oHSV2)

ZHONG Li，CHEN Mingxin，WANG Runyang，WANG Yang，HU Han，LIU Binlei
(*School of Bioengineering and Food Science，Hubei Univ. of Tech.，Wuhan* 430068，*China*)

Abstract：To investigate the effect of overexpression of BTB-CNC homolog 1 (BACH1) on the replication of recombinant type 2 oncolytic herpes simplex virus (oHSV2)，in this study，a BACH1 recombinant overexpression plasmid was constructed using the PiggyBac dualpromoter firefly luciferase green fluorescent protein vector (PiggyBac Dual Promoter Firefly Luciferase GFP，PBDP FLUC GFP) as the backbone. The plasmid was co-transfected into human embryonic kidney cells (293T) using PEI max transfection reagent，and stable 293T BACH1 GFP monoclonal cell lines were obtained after puromycin screening. The purity of the cell lines was verified by flow cytometry for GFP expression. The mRNA and protein expression levels of BACH1 were verified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blot. The cytotoxicity of oHSV2 against BACH1 overexpression cells and wild type 293T cells was compared by CCK 8 assay. The viral titers of oHSV2 in the two types of cells after infection were detected by the median cell culture infectious dose method (CCID50). The results showed that the GFP positive rate in 293T BACH1 GFP cells was 99.78% as detected by flow cytometry；RT qPCR detected that the BACH1 mRNA in 293T BACH1 GFP cells was significantly increased compared with the control group；Western Blot detected the specific band of BACH1 6xHis fusion protein in 293T BACH1 GFP cells；CCK 8 assay indicated that the sensitivity of BACH1 overexpression cells to oHSV2 cytotoxicity was significantly reduced；CCID50 detection found that the viral titer of oHSV2 in cells was significantly decreased after BACH1 overexpression. In conclusion，overexpression of the BACH1 gene can inhibit the replication of oHSV2，providing experimental evidence for subsequent research on the mechanism and optimization of oncolytic virus therapy.

Keywords：BACH1；oncolytic herpes simplex virus type Ⅱ；human kidney epithelial cells；restrai

[责任编校：张 众]