

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(7):921-926; 4 July 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

利用报告基因比较悬浮细胞与贴壁细胞对 HIV-1 假病毒感染效率的差异

苏艳¹, 苏玲玲², 殷涛³, 张宝江¹

¹新疆农业大学动医学院基础医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000

²新疆畜牧科学院, 乌鲁木齐 830000

³新疆兵团兽医总站, 乌鲁木齐 830000

摘要:【目的】研究人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)-1 假病毒感染带有 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal) 报告基因和 HIV 受体 CD4⁺CCR5⁺的 Tzmb1 细胞, 分析悬浮状态与贴壁状态对 HIV-1 假病毒感染 Tzmb1 细胞的影响, 为进一步进行 HIV 生物学研究与中和抗体实验室评价提供实验基础。【方法】通过将 pNL43 R-E-与编码 HIV 膜蛋白的质粒共转染 293T 细胞, 收集上清, 获得 HIV 假病毒。该假病毒感染悬浮的和贴壁的 Tzmb1 细胞后可表达 β -gal 报告蛋白, 通过 X-gal 染色和仪器分析可测定表达 β -gal 报告基因的细胞数与细胞感染率。【结果】HIV 假病毒感染悬浮细胞的效率高于其对贴壁的 Tzmb1 细胞感染的效率, 且细胞的感染率的改变与病毒的型相关。【结论】该研究结果可为进一步利用具有单轮感染活性的 HIV 假病毒进行生物研究和中和抗体实验提供研究方法。

关键词: HIV-1 假病毒, 悬浮细胞, 贴壁细胞, 报告基因, 细胞感染

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0921-06

目前对人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)的防治迫在眉睫, 人们正在努力致力于抗 HIV 药物的开发及疫苗的研究, 为了更好的评价和比较 HIV-1 疫苗抗原是否能够诱导较强的中和抗体, 需要建立一种具有良好重复性、准确、高通量的检测中和抗体的方法。最近几年, 以假病毒为基础的单周期感染实验技术被广泛应用于中和抗体的检测^[1], 该技术较活病毒培养法具有更好的安全性和稳定性, 而且操作相对比较简单。此外许多学者的研究成果证明利用假病毒技术可在细胞水平进行药物筛选和耐药性分析^[2], 且具有准

确、安全和高效的特点, 因而逐渐受到重视。

HIV-1 假病毒感染细胞系统是指通过使用 HIV-1 假病毒感染易感细胞来模拟真病毒的感染及复制过程, 并以此进行 HIV 相关研究的系统。这种系统通常通过选择合适的易感细胞系和引入灵敏度高且易于检测的报告基因等方法来对系统进行优化。HIV-1 通常只能感染能够表达 CD4 分子及辅助受体 CCR5/CXCR4 的细胞。TZMbl 细胞系含 HIV 感染必需的 CD4 受体及 CCR5 和 CXCR4 辅助受体, 而且还是一种能够表达 β -半乳糖苷酶(β -gal) 报告基因的报告细胞系, 它能在 HIV Tat 蛋白的诱导

基金项目: 国家自然科学基金(31160191)

作者简介: 苏艳(1973 -), 女, 陕西人, 博士, 副教授, 研究方向为分子微生物学及免疫。Tel: +86-991-8762701; E-mail: 2006au@163.com

收稿日期: 2012-01-04; 修回日期: 2012-03-06

下表达 β -半乳糖苷酶,并通过这种途径来反映假病毒在宿主细胞中的复制情况。本研究比较了悬浮状态和贴壁状态的细胞对 HIV-1 假病毒感染报告细胞系效率的影响,发现胰酶消化后的悬浮 TZMbl 细胞对 AD8 亚型假病毒感染的效率远远高于贴壁生长的同种细胞,同时发现对于 LAI 亚型假病毒感染的效率虽然有所提高,但是感染效率的增加明显低于 AD8 亚型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞: pNL43 Luc R-E 从美国国立卫生院 (NIH) AIDS Research and Reference Reagent program 获得,因为在其 env 和 vpr 基因的 5'端引入移码突变,该质粒不能表达 HIV 的 Env 蛋白和 Vpr 蛋白。AD8 和 LAI 是由本研究室构建 pcDNA 3.1-gp140。细胞系:293T 和 Tzmb1 细胞,由本实验室保存,在含 10% FBS (Hyclone)、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺 (GIBCO) 的高糖 DMEM (GIBCO) 培养基中培养。Tzmb1 细胞是转染了 CD4 和 CCR5 及 β -gal 的人宫颈癌细胞,由美国国立卫生院 (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program 提供,在含 10% FBS、2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺、1 μ g/mL 嘌呤霉素 (Sigma) 的高糖 DMEM 培养基中培养。所有细胞均在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下培养。

1.1.2 主要试剂和仪器: 0.25% 胰酶为 GIBCO 公司产品, X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-乳糖苷), 5 mmol/L 铁氰化钾, 5 mmol/L 亚铁氰化钾、2 mmol/L 氯化镁, 倒置显微镜, Forma Series II CO₂ 培养箱为美国 Thermo 公司产品, Beta-Glo 检测系统为 Promega 公司产品, 微孔板发光检测仪为 Bio-tek 公司产品。

1.2 假病毒的获得及电子显微镜观察

用磷酸钙 (Promega) 方法转染 293T 细胞。48 h 后, 4 $^{\circ}$ C, 800 \times g 离心 5 min 去除细胞碎片, 用 0.45 μ m 的滤器过滤, 分装后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。制成的假病毒经负染色后用透射电子显微镜观察。

1.3 假病毒感染实验

Tzmb1 细胞作为感染靶细胞, 0.25% 胰酶消化 5 min 后的 Tzmb1 细胞以每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔板, 分别做不同的处理, 一种处理是直接接种假病毒, 每孔加入 10 μ L 的假病毒 (AD8 的滴度为 8×10^3 /mL LAI 的滴度为 2.2×10^4 /mL), 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的条件下培养 48 h。另一种处理在 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后再接种同等剂量的假病毒。继续培养 48 h。

1.4 X-gal 染色实验

感染假病毒的 Tzmb1 细胞 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 细胞用 PBS 洗涤 3 遍, 加入 2 mL PBS 配制的固定液 (2% 甲醛和 0.2% 戊二醛, 用 PBS 配制), 于 4 $^{\circ}$ C 固定 5 min。再以 PBS 洗涤细胞 2 次后, 加入 2 mL 染色液 (5 mmol/L 铁氰化钾, 5 mmol/L 亚铁氰化钾、2 mmol/L 氯化镁及 1g/L X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-乳糖苷), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 在倒置显微镜下观察, 细胞呈蓝色者为阳性, 计数蓝色染色细胞的数目。

1.5 Beta-Glo 检测实验

将感染假病毒的 Tzmb1 细胞 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 去除培养基将细胞用 PBS 洗涤 3 遍, 用 Beta-Glo 检测系统及微孔板发光检测仪定量检测感染细胞表达的 β -半乳糖苷酶。

2 结果

2.1 重组假病毒的形态观察及滴度测定

将收获的重组假病毒用透射电子显微镜观察 (图 1), 可见到约 80 nm - 100 nm 的假病毒颗粒。收获的假病毒进行系列稀释后, 感染 Tzmb1 细胞并用 X-gal 染色, 倒置显微镜观察并统计每孔的染色细胞数目, 结果显示, 所获得的重组假病毒滴度分别为 AD8 4×10^4 个 /mL, LAI 8×10^4 个 /mL。

2.2 不同处理的细胞对假病毒感染能力影响

将 HIV-1 假病毒直接感染经胰酶消化后的悬浮 Tzmb1 细胞与经 16h 后 Tzmb1 细胞贴壁后用同等剂量的假病毒感染相比较, 感染 48h 后 X-gal 染色的比较结果 (图 2) 显示, 悬浮细胞表现出比贴壁生长

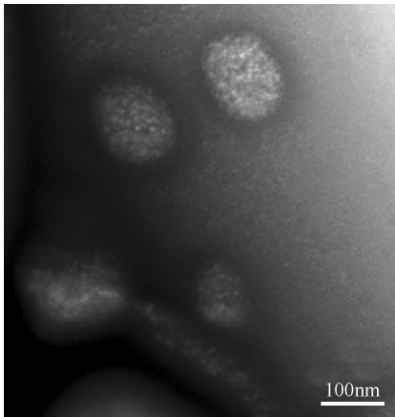


图1 电子显微镜下的假病毒颗粒

Fig.1 Pseudovirus particles observed by electromicroscope.

细胞对假病毒感染的敏感性明显提高,对 AD8 假病毒的 X-gal 染色的结果来看可以达到 8.8 倍,对 LAI 的染色结果为 1.7 倍(图 3,每个处理重复 3 次),据此结果可以看出,悬浮细胞和贴壁细胞对不同型的假病毒感染时的敏感性是不同的。

为进一步验证和比较检测的结果,我们用 Beta-Glo 检测系统定量检测 β -半乳糖苷酶的表达量(图 4,每个处理重复 3 次)。Beta-Glo 检测系统中检测的光信号的光强与样品中的 β -半乳糖苷酶的量成正比,其敏感度和信号强度比蓝色细胞计数高。将同样处理的细胞在感染 48h 后用 Beta-Glo 检测系统

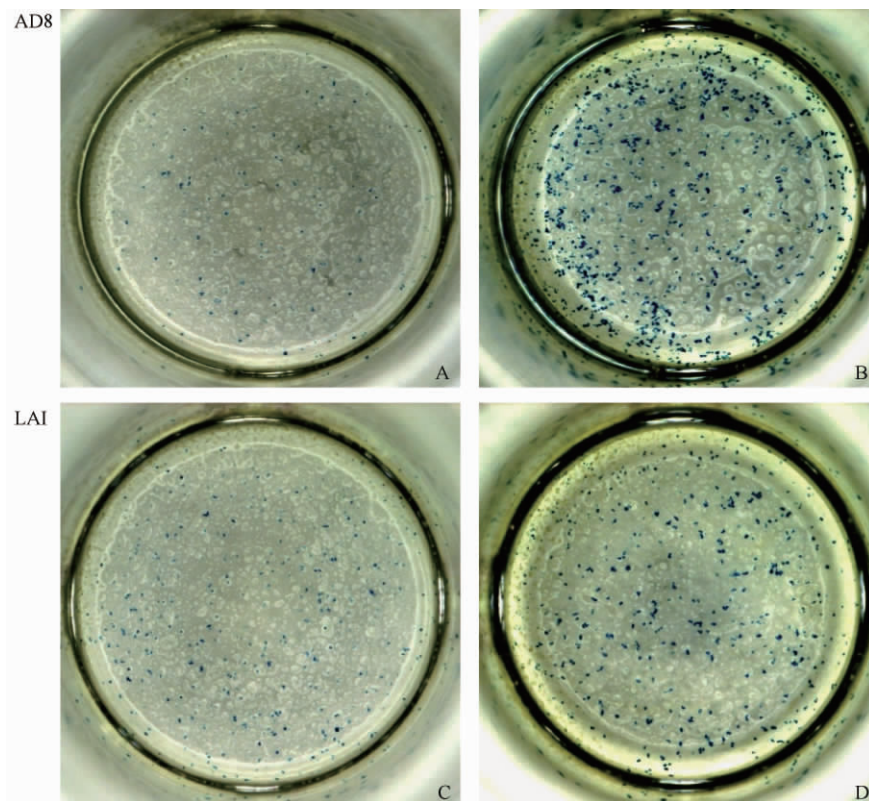


图2 光学显微镜下观察不同处理对假病毒感染 Tzmb1 细胞的影响

Fig.2 effect of different treatment on pseudovirus infection of Tzmb1 cell observed with optical microscope. A: AD8 pseudovirus infect adherent Tzmb1 cells; B: AD8 pseudovirus infect suspended Tzmb1 cells; C: LAI pseudovirus infect adherent Tzmb1 cells; D: LAI pseudovirus infect suspended Tzmb1 cells.

对感染细胞表达的 β -半乳糖苷酶进行定量检测,检测后的结果与 X-gal 染色的结果基本一致,对 AD8 假病毒的检测结果可以达到 17 倍,对 LAI 的染色结果为 3.3 倍。

3 讨论

近年来,假病毒技术在抗 HIV 药物的研究和

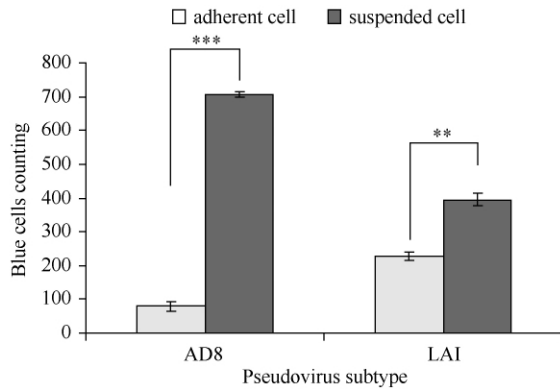


图3 对蓝色细胞计数比较假病毒感染悬浮和贴壁的 Tzmb1 细胞的效率

Fig. 3 Comparison of pseudovirus infection efficiency on suspended and adherent cells by counting blue stained cell (each treatment repeat three times). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.05$.

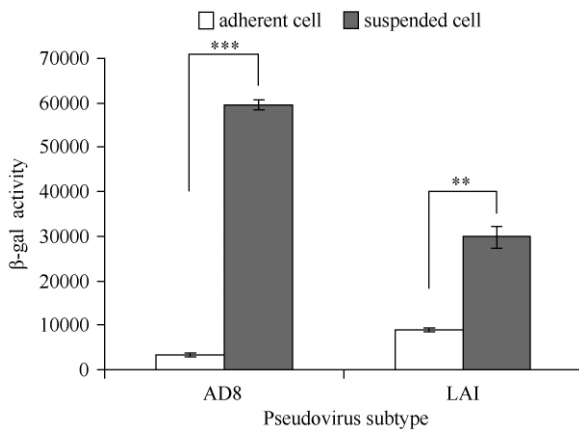


图4 Beta-Glo 检测比较假病毒感染悬浮和贴壁的 Tzmb1 细胞的效率

Fig. 4 Comparison of pseudovirus infection efficiency on suspended and adherent cells using Beta-Glo assay system (each treatment repeat three times). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.05$.

HIV 疾病的治疗方面的应用有了很大发展, 构建 HIV 假病毒进行研究由于具有常规方法无法替代的优点而逐渐受到重视。用于 HIV 假病毒载体包装的病毒可分为复制型和非复制型两类。非复制型病毒则可限制病毒生活周期, 不仅降低了生物危险性, 而且增加了实验的可重复性。本研究所使用的非复制型 pNL43R-E-HIV 假病毒载体, 其基因组中的膜蛋白基因失活, 不具有编码蛋白的能力, 因而需要外源膜蛋白基因共转染才能包装出子代假病毒颗粒。

假病毒颗粒一旦感染细胞后, 因所感染的靶细胞内不存在外源膜蛋白基因而不能进一步复制产生新一轮的病毒, 包装的假病毒颗粒仅具有单轮感染能力, 非常安全。另外, 由于膜蛋白基因由外源质粒提供, 由同一质粒提供的膜蛋白可包装得到均一的假病毒颗粒, 增加了实验的可重复性^[3], 并且可以通过改变膜蛋白基因得到不同特征的假病毒颗粒。此外假病毒培养过程相对简便快速, 降低了病毒变异, 减少了检测时间^[4], 因此应用假病毒技术构建 HIV-1 研究系统, 具有广泛的研究前景。

用于检测 HIV 感染细胞的报告基因有许多, 包括氯霉素乙酰基转移酶^[5]、荧光素酶、碱性磷酸酶^[6]、 β -半乳糖苷酶^[7]、绿色荧光蛋白^[8]等检测都可以对病毒感染细胞进行定量。其中 β -半乳糖苷酶, 绿色荧光蛋白还可以用显微镜观察和计数。本研究中以 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 为报告基因, 可以在显微镜下观察感染细胞的数量。根据报告基因引入方式的不同, 假病毒感染系统可以分为报告病毒型和报告细胞型^[9]。本研究所用的系统属于报告细胞型系统, 报告基因被引入到靶细胞 TZMbl 细胞系中。HIV-1 通常只能感染能够表达 CD4 分子及辅助受体 CCR5/CXCR4 的细胞。对于具有 HIV-1 包膜糖蛋白的假病毒来说, 其感染细胞的机制与 HIV 相似^[10]。本实验中我们使用了经过改造后表达 CD4 和 CCR5/CXCR4 TZMbl 细胞系。该细胞系容易在实验室传代培养, 被广泛应用于 HIV 的研究。该细胞被假病毒感染后, 在 HIVTat 蛋白的诱导下表达 β -半乳糖苷酶, 并可以通过这种途径来反映假病毒在宿主细胞中的感染情况。

关于 HIV 假病毒对悬浮细胞的感染能力高于贴壁细胞鲜有报道。本研究的结果还发现不同类型的假病毒对悬浮细胞及贴壁细胞的感染能力是有差别的, 分析认为将细胞制备成悬浮状态可增加病毒与细胞作用的表面积, 在将细胞制备成悬浮状态的过程中可能会对病毒与不同受体的结合产生影响。此外悬浮状态和贴壁状态的细胞分别处于不同的生长期, 细胞生长期的不同也可能造成对病毒敏感性的不同。具体的机制有待于进一步的研究。

在将细胞处理成悬浮状态的过程中, 胰酶也是一个不容忽视的因素。以往的研究表明, 用胰酶处理猪轮状、犊牛冠状病毒等病毒或培养液中加适量胰酶可以促进病毒感染细胞及病毒在细胞内的增殖^[11]。一些试验结果证明, 应用一定量的胰酶, 可以使一些用常规方法难以分离的病毒得到分离, 这样的做法还可以增强病毒在细胞中的繁殖, 提高毒价^[12]。这一现象究竟是通过胰酶作用于病毒还是胰酶作用于细胞起作用, 目前普遍认为这是由于胰酶将抑制吸附的表面蛋白物分解, 也有人认为它破坏干扰素, 使细胞对病毒失去抵抗力, 因此用胰酶处理细胞培养物可以增殖病毒。本研究的结果验证了胰酶可以通过作用于细胞发挥这种作用。关于这种处理究竟是通过何种机制促进了病毒对细胞的感染还有待于进一步的研究。本文的研究结果为进一步更好的利用 HIV 假病毒研究 HIV 的感染与增殖功能及评价 HIV 中和抗体的功能提供了有用的实验依据。

参考文献

- [1] Dong M, Zhang PF, Grieder F, Lee J, Krishnamurthy G, VanCott T, Broder C, Polonis VR, Yu XF, Shao Y, Faix D, Valente P, Quinnan GV Jr. Induction of primary virus cross reactive human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies in small animals by using an alphavirus derived in vivo expression system. *Journal of Virology*, 2003, 77 (5) :3119-30
- [2] Zhang H, Zhou Y, Alcock C, Kiefer T, Monie D, Siliciano J, Li Q, Pham P, Cofrancesco J, Persaud D, Siliciano RF. Novel single cell level phenotypic assay for residual drug susceptibility and reduced replication capacity of drug resistant human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, 2004, 78 (4) :1718-1729.
- [3] He J, Landau NR. Use of a novel human immunodeficiency virus type 1 reporter virus expressing human placental alkaline phosphatase to detect an alternative viral receptor. *Journal of Virology*, 1995, 69 (7) :4587-4592.
- [4] Garcia-Perez J, Sanchez-Palomino S, Perez-Olmeda M, Fernandez B, Alcami J. A new strategy based on recombinant viroes as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of medical virology*, 2007, 79 (2) :127-137.
- [5] Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, et al. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4 + T lymphocytes. *Journal of Virology*, 1992, 66 (11) :6489-6495.
- [6] He J, Landau NR. Use of a novel human immunodeficiency virus type 1 reporter virus expressing human placental alkaline phosphatase to detect an alternative viral receptor. *Journal of Virology*, 1995, 69 (7) :4587-4592.
- [7] Chang LJ, Urlacher V, Iwakuma T, Cui Y, Zucali J. Efficacy and safety analyses of a recombinant human immunodeficiency virus type 1 derived vector system. *Gene Therapy*, 1999, 6 (5) :715-728.
- [8] 仇超, 彭虹, 黄相刚, 任莉, 潘翔, 邵一鸣, 徐建青. 携带绿色荧光蛋白基因的单轮感染活性 HIV 假病毒的建立及其活性检测, *中华微生物学和免疫学杂志 (Chinese Journal of Microbiology and Immunology)*, 2006, 5 (26) ,394-397.
- [9] Westby M, Nakayama GR, Butler SL, Blair WS. Cell-based and biochemical screening approaches for the discovery of novel HIV-1 inhibitors. *Antiviral Research*, 2005, 67 (3) :121-140.
- [10] 苗文泉, 李敬云. 抗 HIV 药物的筛选评价方法. *国外医学药学分册 (Foreign Medical Sciences Section of Pharmacy)*, 2007, 34 (3) :170-173.
- [11] 李根, 彭克高. 胰酶酶促进蓝舌病病毒在细胞中增殖的报告. *云南畜牧兽医 (Yunnan Journal of Animal science and Veterinary Medicine)*, 1991, (3) :32-33.
- [12] Yiu-Wing K, Yuushi O, Hiroshi K, Lisa FP Ng, Roberto B, Ralf A. Cleavage of the SARS Coronavirus Spike Glycoprotein by Airway Proteases Enhances Virus Entry into Human Bronchial Epithelial Cells In Vitro, *Plos One*, 2009; 4 (11) :e7870.

Using reporter gene to compare infection efficiency of HIV-1 pseudovirus to suspended and adherent cells

Yan Su^{1*}, Lingling Su², Tao Yin³, Baojiang Zhang¹

¹Key Laboratory of Basic Medical Science, College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China

²Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China

³the Corps of Xinjiang Veterinary Station, Urumqi 830000, China

Abstract: [Objective] In order to compare the infection of HIV-1 pseudovirus to suspended and adherent cells, Tzmb1 cells containing β -gal (β -galactosidase) reporter gene were used here to do the analysis. [Methods] HIV-1 pseudoviruses were generated by co-transfection of 293T cells with the plasmid pNL43R-E- and HIV envelope expressing plasmid. Supernatant of co-transfected 293T cells was collected and used to infect Tzmb1 cells with or without trypsin treatment. Forty-eight hours after infection, β -gal positive Tzmb1 cells and virus infection were determined using X-gal staining and β -glo (β -galactosidase) assay. [Results] The efficiency of HIV pseudoviruses infection of suspended Tzmb1 cell was higher than that of adherent cells and the increase of infection correlated with the pseudoviral subtype. [Conclusion] This study may provide a useful method for HIV biological study and neutralization assays using a single-round replicative pseudovirus in the future.

Keywords: HIV-1 Pseudovirus, suspended cell, adherent cell, reporter gene, cell infection

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science foundation of China (31160191)

* Corresponding author. Tel: +86-991-8762701; E-mail:2006au@163.com

Received:4 January 2012/ Revised:6 March 2012

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。