

利用假病毒技术研究抗 HIV-1 药物的作用机制

李艳丽¹ 郑永唐² 肖伟烈³ 孙汉董³ 王崑¹ 刘利新^{1*}

(1. 中国科学院研究生院生命科学学院 北京 100049)

(2. 中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室 云南 昆明 650223)

(3. 中科院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室 云南 昆明 650204)

摘要: 采用假病毒系统对 5 种具有抗 HIV-1 活性的天然化合物的作用机制进行研究, 建立了一种可在普通实验室进行抗 HIV-1 作用机理研究的实验平台。通过构建假病毒系统, 利用定量 PCR 实验分析感染细胞内病毒生命周期早期的特异性 DNA 产物, 发现 5 种化合物可通过不同的作用机制在早期抑制 HIV-1 复制。部分化合物表现出新的作用机制, 如 LC-1、LC-2 可抑制 HIV-1 的入核。通过分析药物对 2 种不同的逆转录病毒(HIV-1 和 MLV)的感染性, 发现 LC-1 可特异地阻断 HIV-1 的复制, 而对 MLV 无影响。同时为了检测药物是否也会在病毒的生命周期晚期有作用, 利用直接转染前病毒质粒的方式进行了验证。利用以上方法, 初步确定了这几种药物的作用靶点, 构建了一个有效的抗 HIV-1 药物作用机理的研究平台。

关键词: 假病毒系统, HIV-1, 入核, 病毒特异性

The action mechanisms of anti-HIV-1 compounds with pseudovirus system

LI Yan-Li¹ ZHENG Yong-Tang² XIAO Wei-Lie³ SUN Han-Dong³
WANG Wei¹ LIU Li-Xin^{1*}

(1. College of Life Sciences, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

(2. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanism of Academy of Sciences, Kunming & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China)

(3. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204, China)

Abstract: In this study, a pseudovirus system was constructed to investigate the anti-HIV mechanisms of five natural compounds. Three plasmids containing backbone, gag-pol of HIV-1 and VSVG were transfected to 293T cells to produce pseudotyped HIV-1 virus. Real-time PCR assay was used to explore

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2009CB522306); 国家科技重大专项“十一五”计划项目(No. 2009ZX09501-029); 中国科学院知识创新工程重要方向(No. KSCX2-YW-R-185)资助课题; 云南省地方科技攻关项目(No. 2007BC004); 生命科学领域“十二五”基础前沿专项(No. KSCX2-EW-J-29)

* 通讯作者: Tel: 86-10-88256454; 邮箱: lxliu@gucas.ac.cn

收稿日期: 2011-04-08; 接受日期: 2011-05-04

the targets of these compounds by testing the specific viral products in the early life cycle of HIV-1. With this system, the targets of four compounds have been initially identified. LC-1 and LC-2 could block the nuclear import of HIV-1 preintegration complex (PIC) into the nucleus. LC-3 could inhibit viral DNA integration to host genome. LC-4 could inhibit the activities of reverse transcriptase. Compounds LC1 and LC2 showed different action target from the existing drugs. Further study has been carried to explore the new potential action mechanism. This study showed that the pseudovirus system we constructed can be used as an assay platform to screen anti-HIV drugs.

Keywords: Pseudovirus system, HIV-1, Nuclear import, Viral speciality

HIV-1 属于逆转录病毒科,慢病毒属,基因组由两条相同的正链 RNA 组成。HIV-1 结构比较简单,但复制过程相对较复杂,包括病毒的吸附融合、侵入、逆转录、入核、整合、基因转录、蛋白表达、病毒粒子的组装释放等。目前 FDA 批准临床使用的抗 HIV 药物,主要针对病毒的不同复制阶段起作用。比较经典的药物包括核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)、非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)、蛋白酶抑制剂(PIs)^[1-2]。近几年又发现 2 类新型作用靶点的药物:整合酶抑制剂和融合进入抑制剂^[3-5]。这些药物在艾滋病的治疗上取得了很好的疗效,但仍然存在问题,如毒副作用大、费用昂贵、药物抗性、无法彻底清除病毒等^[6-7]。

天然化合物具有结构多样性、毒副作用小、价格低廉等特点,在艾滋病的防治方面有着独特的优势和巨大的潜力。并且目前已经从动物、植物以及微生物中分离得到许多具有抗 HIV-1 活性的化合物,其类型包括生物碱、香豆素、木脂素、醌类、多酚类、黄酮类、萜类、鞣质类、糖类、多肽和蛋白质类^[8-11]。我们通过与中国科学院昆明动物研究所合作,在植物和真菌的提取物中发现了一系列结构新颖、具有抗 HIV-1 活性的化合物,其中 Gomisin M2^[11]、(E)-3-(3-羟甲基-2-丁烯基)-7-(3-甲基-2-丁烯基)-1H-

吲哚^[12]、Flazin^[13]、Mangiferin^[14]、Concentricolide^[15] 是其中的 5 种具有抗 HIV-1 活性的天然化合物,在本文中分别以 LC-1、LC-2、LC-3、LC-4 和 LC-5 表示,5 种化合物的结构式如图 1 所示,它们的来源及属性见表 1。但是目前这 5 种化合物的作用机制尚不清楚,本文主要通过构建假病毒系统,对这 5 种化合物的作用机制进行了初步的探讨,为将来用于临床治疗提供理论指导。

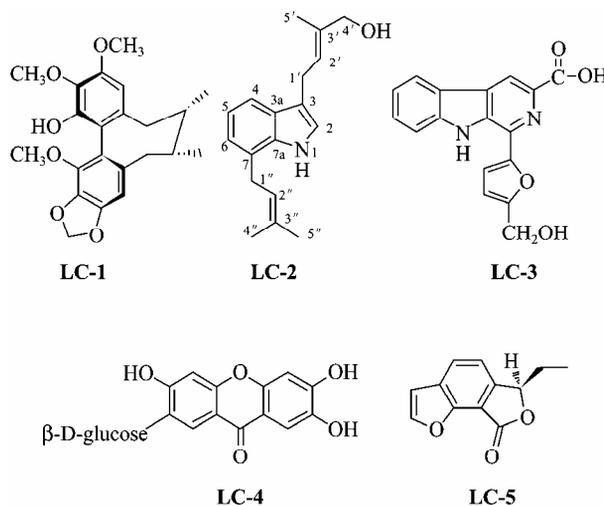


图 1 抗 HIV-1 化合物结构式

Fig. 1 Structure of anti-HIV-1 compounds

表 1 化合物来源及属性
Table 1 Source and property of compounds

编号 Number	名称 Name	性质 Property	来源 Source
LC-1	Gomisin M2	木脂素类	小花五味子
LC-2	(E)-3-(3-羟甲基-2-丁烯基)-7-(3-甲基-2-丁烯基)-1H-吲哚	生物碱类	海南山小桔
LC-3	Flazin	β 咪啉生物碱类	点柄乳牛杆菌
LC-4	Mangiferin	多酚类	知母
LC-5	Concentricolide	香豆素类	炭球菌

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、细胞和菌株: 人胚肾细胞株 293A 和 293T 均为本实验室保存。质粒 pMD.G、pCMV Δ R8.2、pTRIP-GFP 和 pNL4-3-Luc 均为中国科学院生物物理研究所高光侠研究员惠赠。其中质粒 pMD.G 表达水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)的包膜糖蛋白 VSV-G, 其构建方法在先前的报道中已有描述^[16], 用于形成 HIV-1 病毒核心外的包膜。包装质粒 pCMV Δ R8.2 中含有 HIV-1 的 *gag-pol* 基因以及一些辅助蛋白基因, 用于表达病毒的结构蛋白以及病毒复制所需的酶等^[17]。病毒载体 pTRIP-GFP 是在质粒 pHR'-CMV LacZ 的结构基础上使用 EGFP 取代了质粒中的 LacZ 报告基因构建而成, 并且加入了 HIV-1 的 cPPT 和 CTS 序列^[18], 含有病毒复制必需的所有元件。病毒载体 pNL4-3-Luc 中含有萤火虫荧光素酶报告基因, 可表达除 *env* 包膜基因和 *nef* 基因以外的所有 HIV-1 蛋白^[19]。Top10 大肠杆菌感受态细胞购自北京盖宁公司。

1.1.2 主要试剂: 化合物 LC-1、LC-2、LC-3、LC-4 和 LC-5 由中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室分子免疫药理学学科组提供。AZT 购自 Sigma 公司。胎牛血清、DMEM 高糖干粉培养基购自 Gibco 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司。SYBR Green Universal PCR Master Mix kit 购自 TOYOBO 公司。rTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。荧光素酶活性分析所用报告底物及海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 购自 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: 人胚肾 293T 和 293A 细胞株均用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。除细胞转染实验外, 细胞培养液中均加入了青霉素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L)溶液。

1.2.2 假病毒的包装: 本文中所用病毒均为包裹着 VSV 囊膜糖蛋白的假型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)

或者小鼠白血病病毒(MLV)。对于含有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的 HIV-1-GFP 病毒, 通过将前病毒质粒 pTRIP-GFP、衣壳蛋白表达质粒 pCMV Δ R8.2、以及 VSV 包膜表达质粒 pMD.G 共转染 293T 细胞株获得。含有萤火虫荧光素酶报告基因的 HIV-1-luc 病毒, 通过共转染 HIV-1 前病毒质粒 pNL4-3-Luc 和 VSV 包膜表达质粒 pMD.G 获得。HIV-1 假病毒载体转录出的 mRNA 中包含报告基因(GFP 或萤火虫荧光素酶)编码序列, 翻译后表达的 GFP 或萤火虫荧光素酶活性可视为 HIV-1 假病毒载体携带的基因表达量。

转染所用试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)。转染前一天, 将 293T 细胞接种于 60 mm 细胞培养皿中。16-20 h 后, 待细胞密度达到 90% 时进行转染。转染步骤按照说明书进行操作, 分别于转染后 36、48、60、72 h 收集含有病毒粒子的培养上清液。收集的病毒液经 DNase I (1 g/L, 10 mmol/L MgCl₂) 37 °C 处理 1 h, 去除游离的质粒后, 0.45 μ m 滤器过滤病毒液, 去除病毒液中残存的细胞, 于 -80 °C 保存。

1.2.3 病毒滴度的测定: 本文中所用病毒除特殊说明外, 使用的均为含有 GFP 报告基因的重组 HIV-1 病毒(HIV-1-GFP), 个别实验采用的为含有萤火虫荧光素酶报告基因的 HIV-1-luc 或者 MLV-luc。

感染前一天, 将约 5 \times 10⁴ 个 293A 细胞接种于 24 孔细胞培养板中。次日, 待细胞贴壁后, 将不同稀释浓度的 HIV-1-GFP 重组病毒加入培养液中, 37 °C 与细胞共孵育 3 h。感染 3 h 后, 将病毒液从培养板吸掉, PBS 洗 3 次, 加入新鲜的细胞培养液继续培养。感染后 48 h, 倒置荧光显微镜下观察报告基因绿色荧光蛋白的表达。

1.2.4 药物抗 HIV-1-GFP 活性分析: 选取 10 倍稀释的 HIV-1-GFP 重组病毒用于之后的实验。感染前, 细胞预先用药物 LC-1、LC-2、LC-3、LC-4、LC-5 处理 2 h, 然后进行感染实验。感染 3 h 后, 换取含有药物的培养液继续培养。感染后 48 h, 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。为减少药物溶剂 DMSO 对实验结果的影响, 所有药物终浓度中

DMSO 的含量低于 3%。

1.2.5 荧光素酶活性分析: 若所用感染病毒为含有荧光素酶的报告基因, 可采用 Promega 公司的荧光素酶活性分析系统对报告基因荧光素酶的活性进行分析。具体方法如下: 感染后 48 h, 细胞用冰浴的 PBS 洗 2 次, 尽量去除残余的 PBS, 然后用荧光素酶检测试剂盒按照说明书进行操作。每组设置 3 个平行孔。

若检测转染质粒 pNL4-3 中报告基因萤火虫荧光素酶的活性, 采用 Promega 公司的双荧光素酶活性分析系统进行分析。转染时我们同时转染 0.1 μg 前病毒质粒 pNL4-3 和 0.01 μg 的参照质粒 pRL-TK。质粒 pRL-TK 中可表达海肾荧光素酶, 可作为系统的内参用于校订各组数据, 校正后荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。转染后 8 h, 换取新鲜培养液, 48 h 后收集细胞, 按照说明书操作检测荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=实验组共转染比值/对照组共转染比值。每组设置 3 个平行孔。

1.2.6 Hirt DNA 提取: 为了检测感染细胞内病毒 DNA 的复制情况, 采用文献报道的 Hirt 提取法^[20-21], 提取细胞内的小分子量 DNA。具体步骤如下: 单层培养的细胞用冰浴的 PBS 洗 3 次后, 加入 0.8 mL 裂解缓冲液(0.6% SDS, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 室温下裂解 10 min。然后逐滴加入 0.2 mL 的 5 mol/L NaCl, 混合均匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。混合物经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30-60 min, 取上清转移到新的 EP 管。加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1, V/V/V)抽提, 然后加入 2.5 倍体积的乙醇进行沉淀 DNA。充分沉淀后, 用 70%乙醇洗涤 1 次, 晾干后, 将提取的 DNA 重悬在 TE 缓冲液(50 mg/L RNase A)中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.7 PCR 和 Real-time PCR: 根据所要检测的目的基因[负链强终止 DNA (-sssDNA)、正链强终止 DNA (+sssDNA)、环状 DNA (2-LTR)、线粒体内参基因]的序列设计引物, 引物序列如下:

-sssDNA-FP: 5'-GGCTAACTAGGGAACCCA CTG-3';

-sssDNA-RP: 5'-CTGCTAGAGATTTTCCACA CTGAC-3';

+sssDNA-FP: 5'-GGCTAACTAGGGAACCCA CTGC-3';

+sssDNA-RP: 5'-CCCTGTTCGGGCGCCACT G-3';

2-LTR-FP: 5'-GTA ACTAGAGATCCCTCAGA C-3';

2-LTR-RP: 5'-CAGATCTGGTCTAACCAGAG A-3';

Mito-FP: 5'-CCACTTTCCACACAGACATC-3';

Mito-RP: 5'-TCTGGTTAGGCTGGTGTAG-3'。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增完成后, 扩增产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 分析样品之间目的片段含量的差异。

Real-time PCR 采用 TOYOBO 公司的 Universal PCR Master Mix kit (SYBR Green), 反应体系均为 20 μL 。采用线粒体上的一段序列作为内参, 消除反应与样品之间的误差。每个样品设置 3 个平行反应。采用 ABI Prism3000 序列检测系统进行数据分析。

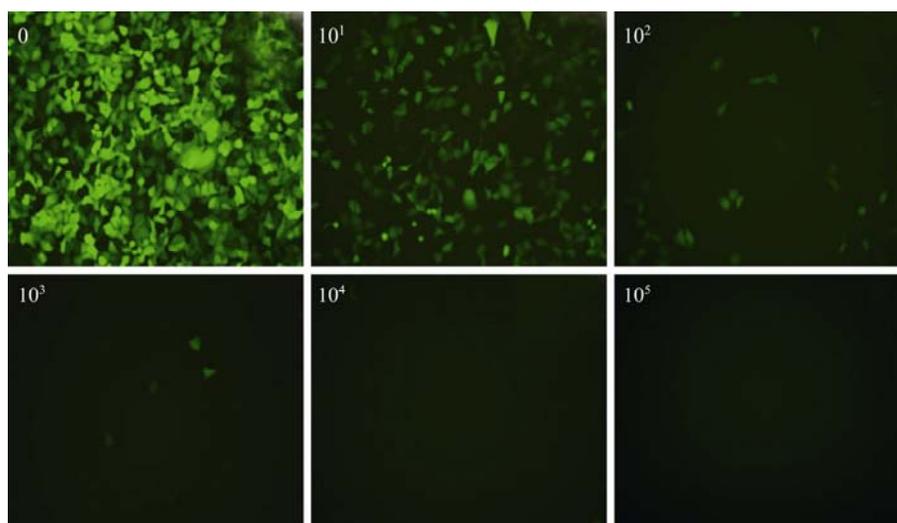
1.2.8 统计方法: 数据使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行处理, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 样品与对照之间的差异应用 t 检验进行分析, $P\leq 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 假病毒的包装

为了进行机理探索, 首先进行了 HIV-1-GFP 假病毒的包装。包装的假病毒中含有报告基因 GFP, 病毒外层用水泡性口炎病毒(VSV)的包膜代替了 HIV 的包膜。VSV-G 型重组病毒的优点是靶细胞比较多, 可感染很多类型的细胞, 例如本实验中所用的 293A 细胞。但也存在缺点, 由于采用了 VSV-G 的包膜, 病毒会按照 VSV 感染靶细胞的机制进入细胞内, 所以在对药物进行机理研究时, 就不能够检测药物是否会对 HIV-1 的入膜过程有影响。

如图 2 所示, 包装的假病毒 HIV-1-GFP 经过不同

图 2 HIV-1_{GFP} 重组病毒滴度测定Fig. 2 Determination of recombinant viral titer of HIV-1_{GFP}

注: 数字代表病毒稀释倍数.

Note: Figures represent the dilution of the recombinant virus.

倍数的稀释后感染 293A 细胞, 通过荧光显微镜检测报告基因 GFP 的表达, 证实得到了较高滴度的病毒粒子。未经稀释的病毒原液其感染效率几乎达到了 100%。为了减少由于病毒过量而导致药物作用效果不显著的现象, 采用 10 倍稀释的病毒液用于之后的感染实验。

2.2 药物作用靶点的初步分析

HIV-1 属于逆转录病毒, 在复制过程中会形成一些稳定的中间产物, 包括病毒 DNA、RNA、蛋白, 通过分析这些特征性中间产物的生成, 可以初步判断病毒在宿主细胞内的复制情况, 进而确定药物的作用靶点。负链强终止 DNA (-sss DNA) 和正链强终止 DNA (+sss DNA) 是 HIV-1 逆转录过程起始时和逆转录过程中形成的 2 个 DNA 产物, 利用 PCR 方法特异地扩增这 2 段序列, 可用于检测病毒逆转录的进程。环状 DNA (2-LTR) 是病毒的线性 DNA 分子进入宿主细胞核后形成的一个副产物, 尚未发现具有什么生理意义, 但是目前被广泛地用作检测 HIV-1 入核的一个指标^[22], 用来判断病毒的入核过程是否受影响。

在不同的药物作用下, HIV-1_{GFP} 感染 293A 细胞, 感染后 48 h 检测报告基因 GFP 的表达。如图 3

所示, 在假病毒体系中, LC-1、LC-2、LC-3 和 LC-4 均表现出了抗 HIV-1 的活性, LC-5 对病毒的感染几乎没有影响。但是在前期的合胞体形成抑制实验中, LC-5 表现了明显的抗 HIV-1 活性。我们分析这可能与前期实验中感染采用的是活体病毒有关系, 活体病毒含有 HIV-1 自身的全部元件, 可以用于检测 HIV-1 生命周期的任一环节。而我们实验中采用的 VSV-G 型假病毒体系, 对于入膜阶段以及病毒粒子的组装过程无法检测。但是这一现象也给了我们一些启示, 提示 LC-5 可能作用在 HIV 的入膜阶段或者是生命周期后期的组装阶段。

接着我们提取了感染细胞内的小分子量 DNA (Hirt DNA), 利用 PCR 技术检测病毒生命周期中 3 个特征性 DNA 产物(-sssDNA、+sssDNA、2-LTR) 的生成情况。如图 4 所示, 与对照相比, 药物 LC-2 处理后的细胞内, 环状 DNA (2-LTR) 的含量明显减少, -sssDNA 和 +sssDNA 含量变化不明显。环状 DNA 是病毒的线状 DNA 进入宿主细胞核后发生自身环化而形成的副产物, 被用作检测入核过程的一个指标^[22]。由此初步分析 LC-2 可能对病毒的入核过程有影响, 通过限制 HIV-1 的入核阻止了病毒的复制。

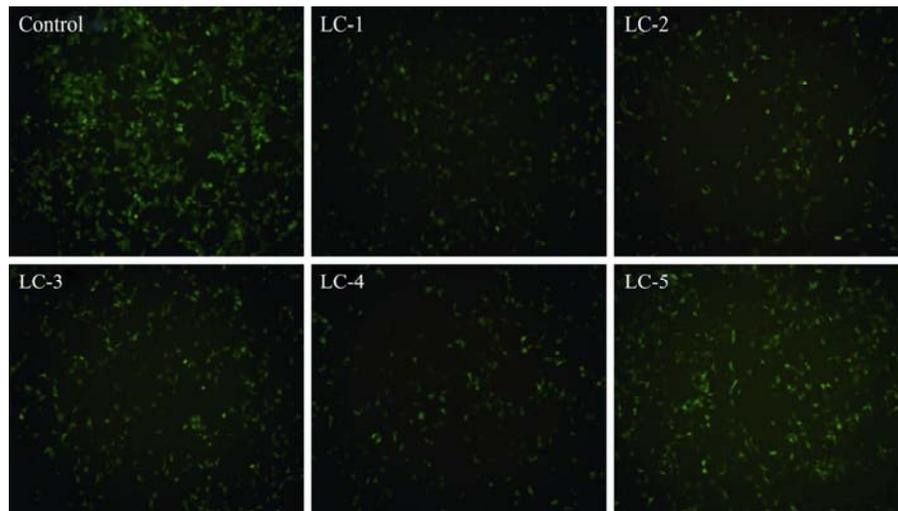


图3 天然化合物抗 HIV-1-GFP 活性分析

Fig. 3 Anti-HIV-1 activities of natural compounds

注: HIV-1-GFP 感染不同药物(LC-1 (4 mg/L)、LC-2 (6 mg/L)、LC-3 (124 mg/L)、LC-4 (60 mg/L)、LC-5 (40 mg/L))处理的 293A 细胞, 感染后 48 h, 荧光显微镜检测 GFP 的表达。

Note: 293A cells were infected by HIV-1-GFP in the presence of LC-1 (4 mg/L), LC-2 (6 mg/L), LC-3 (124 mg/L), LC-4 (60 mg/L), LC-5 (40 mg/L), or DMSO as a no drug control. Infectivity was analyzed by detecting GFP using a fluorescence microscope.

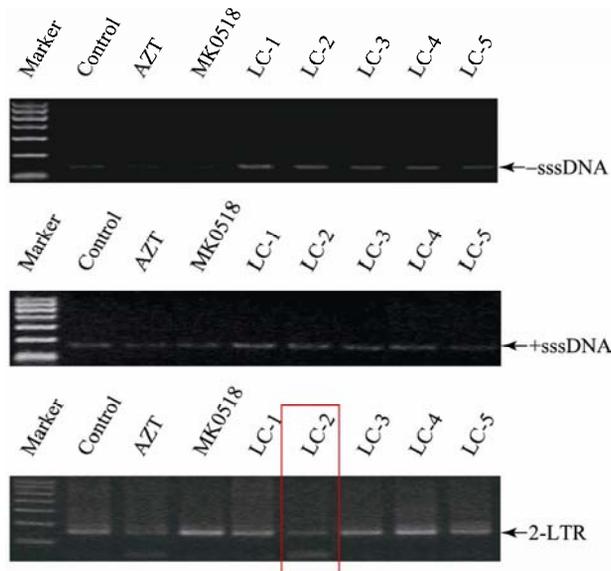


图4 PCR 分析感染 293A 细胞内的 HIV-1 DNA

Fig. 4 PCR analysis of HIV-1 DNA in 293A cell lines

注: HIV-1-GFP 感染不同药物[LC-1 (4 mg/L)、LC-2 (6 mg/L)、LC-3 (124 mg/L)、LC-4 (60 mg/L)、LC-5 (40 mg/L)]处理后的 293A 细胞。24 h 后, 提取小分子量 DNA 进行 PCR。AZT (10 μ mol/L) 和 MK0518 (10 μ mol/L) 作为阳性对照。

Note: 293A cells were infected by HIV-1-GFP in the presence of LC-1 (4 mg/L), LC-2 (6 mg/L), LC-3 (124 mg/L), LC-4 (60 mg/L), LC-5 (40 mg/L). 24 hours later, low molecular weight DNA was extracted to detect the specific viral DNA. DMSO was used as a no drug control. AZT (10 μ mol/L, a reverse transcriptase inhibitor) and MK0518 (10 μ mol/L, an integrase inhibitor) were used as positive control.

其它几种药物的作用效果不明显。常规 PCR 存在着一个缺点, 就是反应循环数的不合适可能导致反应达到平台期, 影响结果的可靠性。所以接下来采用灵敏度较高的 Real-time PCR 对 3 种病毒 DNA 产物进行检测, 检测结果如图 5A 所示。对结果进行了分析, 如表 2 所示。

表 2 Real-time PCR 结果总结				
Table 2 Summary of Real-time PCR results				
化合物 Compounds	负链强终止 DNA -sssDNA	正链强终止 DNA +sssDNA	环状 DNA 2-LTR	作用靶点 Target
LC-1	—	—	↓	Nuclear import
LC-2	—	—	↓	Nuclear import
LC-3	↑	↑	↑	Integration
LC-4	↓	↑	↓	RT, Nuclear import
LC-5	—	—	—	Entry/Assemble

LC-1 处理过的细胞内环状 DNA 明显减少, -sssDNA 和 +sssDNA 含量变化不明显, 与 LC-2 的结果很相似, 所以推测 LC-1 限制 HIV-1 复制的机制可能也是与阻断病毒粒子入核有关系。

LC-3 处理过的细胞, 3 种病毒 DNA 的含量均明显升高。分析这种现象可能与阻断病毒 DNA 整合到宿主基因组上有关系。如果病毒的整合过程受抑制, 势必会导致细胞内游离的病毒 DNA 分子增加, 从而影响 3 种病毒 DNA 比例的增加。以前文献中也有报道, 整合酶抑制剂可导致感染细胞内 3 种病毒 DNA 含量的增加^[23]。我们在实验中同时采用整合酶抑制剂 MK0518 作为阳性对照, 结果显示整合酶抑制剂确实会导致 3 种病毒 DNA 含量的增加。LC-3 处理过的细胞和整合酶抑制剂 MK0518 处理的细胞结果非常相似, 这也再次验证了我们的推测: LC-3 可能与阻断病毒的整合过程有关。

LC-4 处理过的细胞内, -sssDNA 和 2-LTR 含量明显减少, +sssDNA 含量略有升高。出现这种现象的原因可能和多靶点阻断病毒感染有关, 初步推测 LC-4 可能对病毒的逆转录过程和整合过程均有影响, 具体的作用机制还需要进一步研究。

在采用 Real-time PCR 检测 HIV-1 的 3 个特征性 DNA 分子时, 同时对这 3 个产物的溶解曲线进行了分析。单一峰的溶解曲线代表扩增产物的特异性。如图 5B 所示, 内参基因与 3 个待检测病毒 DNA 扩增产物的溶解曲线均为单峰, 证明了以上结果真实可靠。

2.3 筛选病毒特异性的药物

初步实验结果表明, 5 种化合物具有不同的作用机制。其中 3 种化合物均可通过阻断病毒入核的机制抑制 HIV-1 的复制, 展示了新的作用靶点。为了进一步研究这些药物的作用机制, 筛选出病毒特异性的药物, 我们分析了药物对两种不同逆转录病毒的感染性。

小鼠白血病病毒(Murine leukemia virus, MLV) 也属于逆转录病毒家族成员, 但与 HIV 不同的是, MLV 不属于慢病毒。为了对这几种药物的作用机制有更加深入的了解, 我们用同样是逆转录病毒的 MLV 感染 293A 细胞, 检测这些药物抗 MLV 的活性。结果如图 6 所示, 化合物 LC-1 可以特异地限制 HIV-1-luc 的感染, 而对同样是逆转录病毒的 MLV-luc 没有影响。其它 3 种药物对两种病毒的复制均有影响。

2.4 分析药物是否是多靶点作用的药物

Real-time PCR 实验结果显示, LC-1 阻断 HIV-1 复制的机制可能与限制病毒入核有关, 并且我们发现这种阻断病毒入核的方式呈现剂量依赖性(图 7), 随着加药浓度的增加, LC-1 阻止病毒入核的效应越明显。阻断病毒的入核是一个新的作用靶点, 目前临床上使用的抗 HIV 药物还没有这类药物。对新型作用靶点药物的需求使得 LC-1 在防治艾滋病方面有着独特的优势和巨大的潜力; 并且从药效来说, LC-1 的抗 HIV-1 活性明显优于其它几种药物。

为了确定药物是否会在 HIV 生命周期的多个位点阻断病毒的复制, 在 HIV-1 的生命周期晚期也会有作用。我们以 LC-1 为例, 采用直接转染前病毒质粒 pNL4-3 方式进行验证。该方法可避免药物对 HIV 生命周期早期阶段的影响, 直接检测药物对生命周期后期阶段(整合后阶段)的作用, 例如病毒蛋白的转录、翻译、RNA 的稳定性等阶段。

如图 8 所示, 5 mg/L LC-1 对转染质粒 pNL4-3 的荧光素酶的表达没有明显影响, 而感染组在 5 mg/L 的 LC-1 作用下, 病毒荧光素酶的表达明显下降。提示 LC-1 可能对 HIV-1 生命周期晚期没有影响, 主要作用在病毒生命周期早期阶段。所以, 通过该方法我们可以确定那些作用在 HIV-1 生命周期早期的药物是否也会对病毒的晚期阶段有影响。

3 讨论

在本研究中, 我们通过建立假病毒体系对具有抗 HIV-1 活性的天然化合物的作用靶点进行初步分析, 利用 PCR 实验检测 HIV-1 生命周期特征性 DNA 产物, 成功鉴定了 4 种化合物阻断 HIV-1 感染的作用机制。其中化合物 LC-1 和 LC-2, 可通过阻断 HIV-1 入核干扰病毒的复制, 在目前获准上市的抗 HIV 药物中, 尚没有药物可通过抑制入核这一过程阻断 HIV-1 的复制^[24-25]; LC3 能够抑制病毒的整合过程; LC4 可抑制病毒的逆转录酶活性。利用假病毒体系包装的不同假病毒 HIV-1 和 MLV, 进一步对化合物 LC-1 的作用机制进行了研究。尽管 HIV-1 和 MLV 都属于逆转录病毒, 但二者的感染靶细胞的方式还是存在一些差异。例如在入核方式上, HIV-1 可

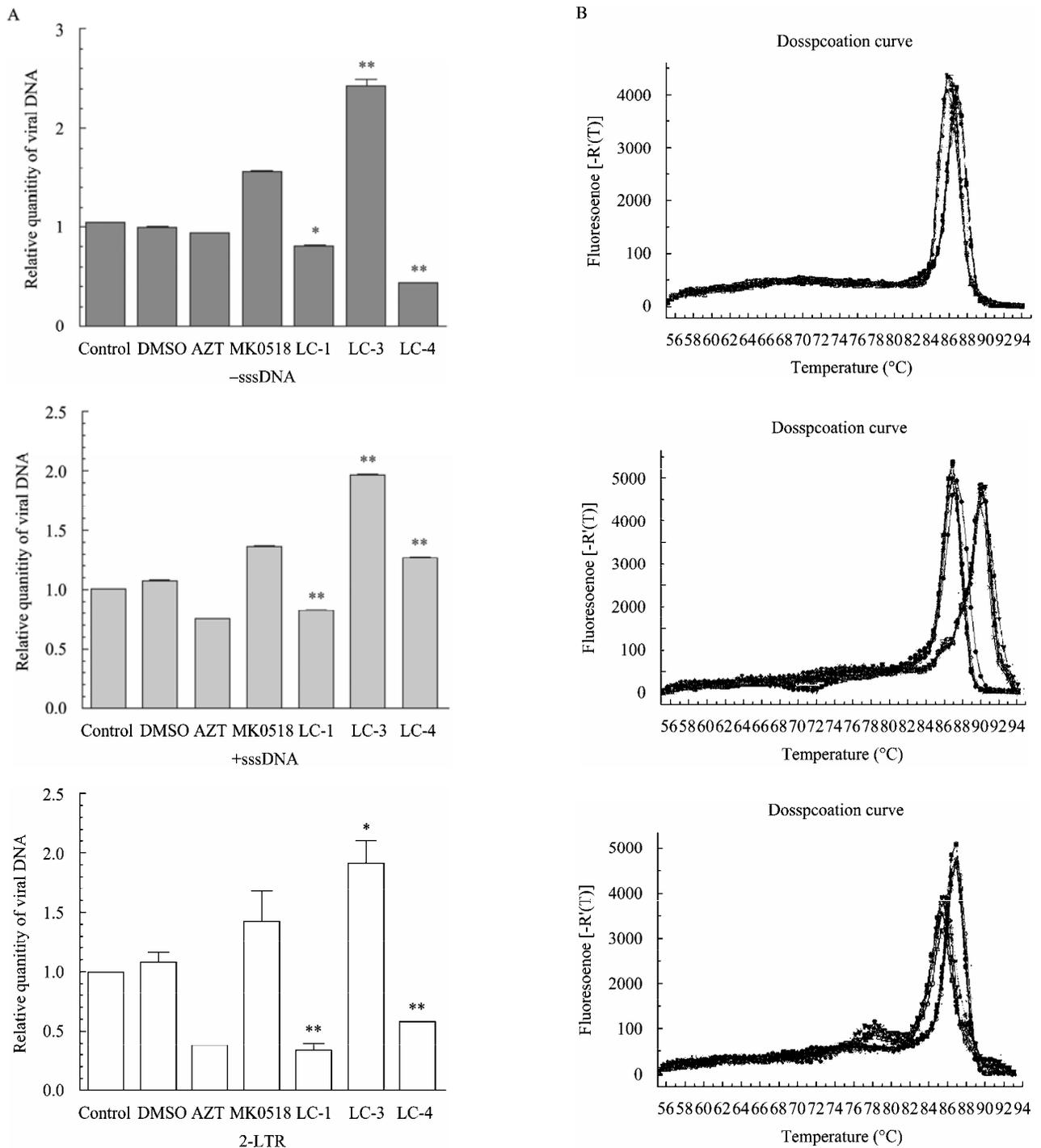


图5 Real-time PCR 分析感染 293A 细胞内的 HIV-1 DNA

Fig. 5 Real-time PCR analysis of HIV-1 DNA in 293A cell lines

注: A: HIV-1_{GFP} 感染不同药物(LC-1 (4 mg/L)、LC-3 (124 mg/L)、LC-4 (60 mg/L)) 处理后的 293A 细胞。24 小时后, 提取小分子量 DNA 进行定量 PCR。AZT (10 μmol/L) 和 MK0518 (10 μmol/L) 作为阳性对照; B: PCR 产物的溶解曲线。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Note: A: 293A cells were infected by HIV-1_{GFP} in the presence of LC-1 (4 mg/L), LC-3 (124 mg/L), LC-4 (60 mg/L). 24 hours later, low molecular weight DNA was extracted to detect the specific viral DNA. DMSO was used as a no drug control. AZT (10 μmol/L) and MK0518 (10 μmol/L) were used positive control; B: Dissociation curves of the PCR products. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

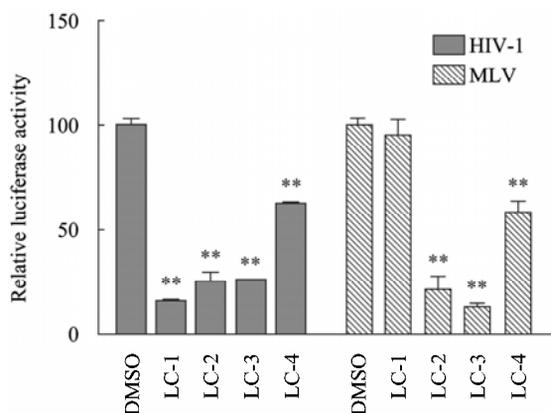


图 6 LC-1 可选择性抑制 HIV-1 复制

Fig. 6 LC-1 could selectively inhibit HIV-1 replication

注: 含有报告基因荧光素酶的重组病毒 HIV-1-luc 或 MLV-luc 分别感染药物(LC-1 (4 mg/L)、LC-2 (6 mg/L)、LC-3 (124 mg/L)、LC-4 (60 mg/L))处理后的 293A 细胞. 感染后 48 h, 检测荧光素酶活性. **: $P < 0.01$.

Note: 293A cells were infected with VSV-G pseudotyped HIV-1-luc or MLV-luc respectively, in the presence of compounds LC-1 (4 mg/L), LC-2 (6 mg/L), LC-3 (124 mg/L), LC-4 (60 mg/L), or DMSO as a no drug control. The anti-retrovirus activities were evaluated by testing the reporter gene luciferase activity, 48 hours postinfection. **: $P < 0.01$.

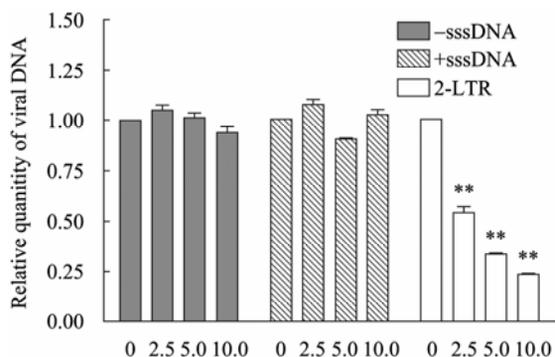


图 7 定量 PCR 分析 LC-1 对 HIV-1 DNA 合成的影响 (**: $P < 0.01$)

Fig. 7 Real-time PCR analysis of HIV-1 DNA in LC-1 treated cells (**: $P < 0.01$)

以感染非分裂的细胞, 在细胞分裂间期通过主动运输的方式进入宿主细胞核内^[26-27]; 而 MLV 只能在细胞分裂时通过不完整的细胞膜进入宿主细胞核内^[28-29]。本文发现化合物 LC-1 能够选择性地阻断 HIV-1 的感染, 对同样是逆转录病毒的 MLV 无影响; 提示我们可以从 HIV-1 与 MLV 入核方式的不同之处着手, 对该化合物进行更加深入的研究。

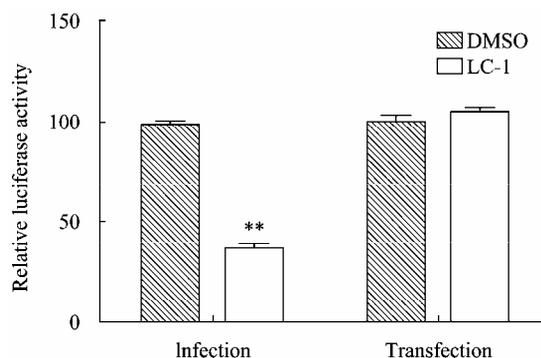


图 8 LC-1 主要在 HIV-1 的生命周期早期抑制病毒复制
Fig. 8 LC-1 inhibits HIV-1 lifecycle in the early stage

注: 0.1 μg 前病毒质粒 pNL4-3 转染 LC-1 (5 mg/L) 处理的 293A 细胞, 未处理的 293A 细胞作为转染对照组. 同时检测 LC-1 对含有荧光素酶报告基因的 HIV-1_{luc} 病毒的抗病毒活性. 48 h 后, 检测报告基因荧光素酶的活性. **: $P < 0.01$.

Note: 293A cells were infected by VSV-G pseudotyped HIV-1_{luc} or transfected by 0.1 μg of the proviral plasmid pNL4-3 respectively, in the presence of compounds LC-1 (5 mg/L) or DMSO as a no drug control. 48 hours later, cellular luciferase activity was determined. Error bars indicate standard deviation in triplicate values. **: $P < 0.01$.

在分析这 5 种天然化合物作用靶点时, 我们利用建立的假病毒体系进行确定。该方法相对于单功能的检测实验来说, 如体外逆转录酶活性测定、整合酶活性测定等, 利用假病毒体系通过一次检测多个复制环节, 包括逆转录、入核、整合过程等。能够更加方便快捷、高效地对病毒的多个作用靶点进行确定。在抗病毒机制研究中, 有通过分析不同的加药时间, 判断药物具体作用于病毒的哪一复制环节。这种方法相对于假病毒联合 Real time PCR 方法来说操作比较简单、方便, 能够快速确定药物的作用时段。但同时由于该方法受加药间隔的影响, 只能根据 HIV-1 本身复制的特点大致确定药物的作用时相, 如采用该方法, 药物 NV038 被确定作用于 HIV-1 的侵入后和逆转录完成前这一阶段^[30]。若想了解这些药物的具体作用靶点和作用机制还需通过进一步的实验进行验证。而利用假病毒感染细胞后, 设计合成不同的引物序列, 通过 Real time PCR 的方法可以直接特异地定量检测出病毒 DNA 在靶细胞内的合成情况, 具有高度的敏感性和特异性, 能够更精确地监测病毒的复制过程。此外, 利用假病毒系统进行抗 HIV-1 的筛选工作, 不需要在 BSL-3 级实验室进行操作, 具有较高的

生物安全性, 适用于普通实验室对于抗 HIV 药物作用机理的研究, 对于今后更快地研发出新型作用靶点的抗 HIV-1 药物具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Esnouf RM, Ren JS, Ross C, et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors[J]. *Nat Struct Biol*, 1995, 2(4): 303–309.
- [2] Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J. Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication[J]. *Retrovirology*, 2005, 2: 10.
- [3] Price DA, Gayton S, Selby MD. Initial synthesis of UK437857 (Maraviroc)[J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46(30): 5005–5007.
- [4] Walmsley S, Henry K, Katlama C, et al. Enfuvirtide (T-20) cross-reactive glycoprotein 41 antibody does not impair the efficacy or safety of enfuvirtide[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(12): 1827–1833.
- [5] Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells[J]. *Science*, 2000, 287(5453): 646–650.
- [6] Johnson MO, Charlebois E, Morin SF, et al. Perceived adverse effects of antiretroviral therapy[J]. *J Pain Symptom Manag*, 2005, 29(2): 193–205.
- [7] Cane PA. New developments in HIV drug resistance[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(S1): i37–i40.
- [8] Asres K, Seyoum A, Veeresham C, et al. Naturally derived anti-HIV agents[J]. *Phytother Res*, 2005, 19(7): 557–581.
- [9] Wang JH, Nie HL, Huang H, et al. Independency of anti-HIV-1 activity from ribosome-inactivating activity of trichosanthin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(1): 89–94.
- [10] 董泽军, 王飞, 王睿睿, 等. 点柄乳牛肝菌子实体中抗 HIV-1 活性成分[J]. *中草药*, 2007, 38(3): 337–339.
- [11] 李蓉涛, 孙汉董, 郑永唐, 等. 治疗艾滋病的药物及其应用: 中国, ZL 200410079515.1[P]. 2005-07-06.
- [12] Wang J, Zheng Y, Efferth T, et al. Indole and carbazole alkaloids from *Glycosmis montana* with weak anti-HIV and cytotoxic activities[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(6): 697–701.
- [13] Wang YH, Tang JG, Wang RR, et al. Flazinamide, a novel β -carboline compound with anti-HIV actions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4): 1091–1095.
- [14] Andreu GP, Delgado R, Velho JA, et al. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe^{2+} -citrate[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 513(1/2): 47–55.
- [15] Qin XD, Dong ZL, Liu JK, et al. Concentricolide, an anti-HIV agent from the ascomycete *Daldinia concentrica*[J]. *Helv Chim Acta*, 2006, 89(1): 127–133.
- [16] Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11400–11406.
- [17] Naldini L, Blömer U, Gage FH, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21): 11382–11388.
- [18] Zennou V, Petit C, Guetard D, et al. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap[J]. *Cell*, 2000, 101(2): 173–185.
- [19] Akkina RK, Walton RM, Chen ML, et al. High-efficiency gene transfer into CD34⁺ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G[J]. *J Virol*, 1996, 70(4): 2581–2585.
- [20] Ziegler K, Bui T, Frisque RJ, et al. A rapid *in vitro* polyomavirus DNA replication assay[J]. *J Virol Methods*, 2004, 122(1): 123–127.
- [21] Tang Y, Villinger F, Staprans SI, et al. Slowly declining levels of viral RNA and DNA in DNA/recombinant modified vaccinia virus Ankara-vaccinated macaques with controlled simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P challenges[J]. *J Virol*, 2002, 76(20): 10147–10154.
- [22] Goff SP. *Retroviridae: the retroviruses and their replication*[A]//Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*[M]. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 1871–1939.
- [23] Anderson JL, Hope TJ. APOBEC3G restricts early HIV-1 replication in the cytoplasm of target cells[J]. *Virology*, 2008, 375(1): 1–12.
- [24] Haffar OK, Smithgall MD, Popov S, et al. CNI-H0294, a nuclear importation inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 genome, abrogates virus replication in infected activated peripheral blood mononuclear cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(5): 1133–1138.
- [25] Al-Abed Y, Dubrovsky L, Ruzsicska B, et al. Inhibition of HIV-1 nuclear import via Schiff base formation with arylene bis(methylketone) compounds[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12(21): 3117–3119.
- [26] Hariton-Gazal E, Friedler D, Friedler A, et al. Inhibition of nuclear import by backbone cyclic peptidomimetics derived from the HIV-1 MA NLS sequence[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1594(2): 234–242.
- [27] Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via vpr-importin α interactions as a novel HIV-1 therapy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(4): 838–843.
- [28] Fouchier RA, Malim MH. Nuclear import of human im-

- munodeficiency virus type-1 preintegration complexes[J]. Adv Virus Res, 1999, 52: 275-299.
- [29] Roe T, Reynolds TC, Yu G, et al. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis[J]. EMBO J, 1993, 12(5): 2099-2108.
- [30] Pannecouque C, Szafarowicz B, Volkova N, et al. Inhibition of HIV-1 replication by a bis-thiadiazolbenzene-1, 2-diamine that chelates zinc ions from retroviral nucleocapsid zinc fingers[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(4): 1461-1468.



(上接 p.1498)

征 稿 简 则

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)
*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:
收稿日期: 2011-00-00; 接受日期: 2011-00-00

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)
Tel: 010-64807511
E-mail: tongbao@im.ac.cn
网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>