

一种拮抗 HIV-1 并靶向 DC 的融合基因的设计及表达鉴定

赵萌^{1*}, 徐青^{1*}, 于继云², 余云舟³

1 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044
2 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850
3 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 艾滋病病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 通过与靶细胞膜的融合感染宿主细胞, 研究表明阻断 HIV 与受体靶分子的结合可以阻止 HIV 进入宿主细胞, 抑制 HIV 病毒的感染。设计合成了一个包含 CD4 和 CCR5 与 HIV-1 结合的主要功能结构区, 及 Flt3-L 和 Mip-3 α 分子的融合基因, 构建了 2 个融合基因的真核表达载体 pABK-CKR5-CD4/Flt3L-Mip3 α (pABK-HIV-MF) 和 pABK-CKR5-CD4 (pABK-HIV-MT), 在人胚肾 293 细胞中进行了表达。RT-PCR、细胞免疫荧光技术、ELISA 和 Western blotting 检测结果表明融合基因在真核细胞中获得了正确的表达, 这为进一步研究其对于 HIV-1 的拮抗并靶向树突状细胞 (DC) 清除研究奠定了基础。

关键词: 融合基因, HIV, 真核表达, 树突状细胞, 靶向

Design and expression of an inhibitor for HIV-1 targeting dendritic cell

Meng Zhao^{1*}, Qing Xu^{1*}, Jiyun Yu², and Yunzhou Yu³

1 *Institute of Life Science and Biotechnology, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China*
2 *Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*
3 *Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China*

Abstract: Human immunodeficiency virus (HIV) infects the host cells by the fusion of viral and cell membranes. Blocking the combining between HIV and the receptors can prevent HIV from entering the host cells. We designed an invasion-inhibitor for HIV-1 targeting dendritic cell (DC), including 2 important HIV-1 receptors CD4 and CCR5, and 2 molecules Flt3-L and Mip-3 α . With the synthetic gene of the inhibitor, 2 eukaryotic expression vectors pABK-CKR5-CD4/Flt3L-Mip3 α (pABK-HIV-MF) and pABK-CKR5-CD4 (pABK-HIV-MT) were constructed and transfected into HEK 293 cells for expression. Results from RT-PCR,

Received: December 30, 2010; **Accepted:** March 25, 2011

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2009JBM107), Beijing Municipal Natural Science Foundation of China (No. 6112018).

Corresponding author: Qing Xu. Tel: +86-10-51684351; Fax: +86-10-51683887; E-mail: qingxu@bjtu.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 209JBM107), 北京市自然科学基金 (No. 6112018) 资助。

immunofluorescent assay, ELISA and Western blot approved that the invasion-inhibitor for HIV-1 was successfully and exactly expressed in the eukaryotic cells. Current study formed a solid base for the further research on the function of inhibitors for HIV-1 and elimination targeting DC.

Keywords: fusion gene, HIV, eukaryotic expression, dendritic cell (DC), target

HIV (Human immunodeficiency virus) 属于慢病毒属, 是一种潜伏期极长的逆转录病毒, 它可以通过感染 CD4⁺T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞 (DC) 等使机体免疫系统受损, 最终导致患者艾滋病 (AIDS) 的发生。艾滋病的蔓延对全世界人类健康和社会经济的发展构成了巨大的威胁, 而目前尚无能够彻底治疗艾滋病的药物和预防的疫苗。HIV 通过一系列连续的过程进入宿主细胞, HIV 病毒主要表面蛋白 gp120 首先与细胞表面的分子 CD4 结合, 使 HIV 外膜复合物发生结构改变, 然后与细胞表面的趋化因子辅助受体 CCR5 或 CXCR4 结合, 使病毒与宿主细胞膜接近和融合^[1-2]。近些年在对于艾滋病人的治疗中发现 HIV-1 抗原刺激 DC 所诱导的免疫可以控制血浆病毒载量并有效杀伤 HIV-1 感染的细胞, 并且研究发现成熟的 DC 可以增强机体 T 细胞对于 HIV-1 的免疫应答^[3]。Flt3-L 可以极大刺激 DC 增殖、分化和成熟, 在 DC 靶向疫苗的研究中可以增强 DC 对 HIV 抗原递呈作用^[4-5]。趋化因子 Mip-3 α 直接参与了 DC 细胞和 T 细胞的定向迁移, 近期的研究发现 Mip-3 α 还具有抗 HIV-1 活性^[6-7]。本研究中, 首先设计了一个包含 CD4 和 CCR5 与 gp120 结合的主要功能结构区及 Flt3-L 和 Mip-3 α 分子的融合基因, 目的是通过融合基因表达的 CD4 和 CCR5 与 HIV 表面蛋白 gp120 的双重结合, 捕获病毒分子, 从而阻断病毒进入靶细胞内, 然后通过 Mip-3 α 对 DC 的趋化作用, 将捕获的病毒分子靶向 DC, 从而抑制和清除病毒。其次我们体外合成了全长的基因分子, 并分别构建了包含 pABK-CKR5-CD4/Flt3-L-Mip-3 α (pABK-HIV-MF) 和 pABK-CKR5-CD4 (pABK-HIV-MT) 的真核表达载体。pABK-HIV-MF 表达的是全长的融合基因, 而构建 pABK-HIV-MT 的目的是辅助性检测 CKR5 和 CD4 的融合蛋白与

gp120 在体外是否能够有效结合。最后, 我们在真核细胞中成功地表达了所构建的载体, 为下一步研究融合蛋白对 HIV-1 的拮抗及靶向 DC 清除作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾 293 细胞、真核表达载体 pABK 和 pVAX-1-s-CD4 为本实验室保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根公司。

1.2 方法

1.2.1 pABK-HIV-MT 和 pABK-HIV-MF 真核表达载体的构建

全长融合基因序列由北京擎科生物技术公司合成, 合成的基因 DNA 连接在 T-EASY 载体上。扩增 HIV-MT 和 HIV-MF 融合基因的上游引物均包含 BamH I 酶切位点, 下游引物均包含 Xba I 的酶切位点, 引物均由生工生物工程上海有限公司合成, 引物序列参照表 1。PCR、质粒提取、DNA 酶切、连接和转化等操作参照相关试剂说明书和《分子克隆实验指南》^[8]。实验中的连接酶, DNA 限制性内切酶 BamH I 和 Xba I 购自 New England Biolabs 公司; 2 \times Pfu PCR MasterMix, 转染用小量及中量质粒提取试剂盒购自天根公司。

1.2.2 细胞培养和转染

人胚肾 293 细胞的培养使用 FreestyleTM293 Expression Medium (Gibico), 待细胞密度生长至 1 \times 10⁹ 个/L 时, 转染质粒。转染试剂使用 293fectinTM (Invitrogen), 按试剂盒说明进行操作。

1.2.3 RT-PCR 检测 HIV-MF 在细胞内转录

转染 48 h 后收获转染 HIV-MF 质粒的人胚肾

293 细胞, 每孔加入 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。取细胞总 RNA 5 μ L, 按照 Invitrogen SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) 的产品说明进行反转录实验。引物序列参照表 1, 其中 GAPDH 特异性上下游引物和 Oligo(dT)₂₀ 购自东洋纺公司。

1.2.4 间接免疫荧光

转染后 24 h, 取转染质粒的人胚肾 293 细胞悬液 1 mL 移入 6 孔板, 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞, 在 -20 $^{\circ}$ C 用 5% 醋酸 (溶于甲醇) 固定细胞; 1% BSA (含 0.5% Triton-100) 孵育 10 min, PBS 洗 3 次; 1% BSA 封闭 1 h 后, 加入 1:250 稀释的兔抗人 CD4 一抗 (Santa Cruz), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBS 洗 3 次后, 加溶于 1% 伊文氏蓝及 1% BSA 中 1:200 稀释的 FITC-山羊抗兔二抗 (中杉金桥), 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h, PBST 洗 3 次; 在荧光镜下观察并照相。

1.2.5 ELISA

转染后 72 h, 取细胞悬液, 离心, 分别分离上清与细胞沉淀。上清使用 0.45 μ m 滤膜过滤后可直接作样品, 细胞总蛋白的提取参照细胞裂解液 (Promega) 说明书。将蛋白样品分别与 PBS 等体积混合后, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每组样品设 2 个平行, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜后, 2% BSA 封闭 2 h; PBS 洗 2 次后, 每孔加入 100 μ L 的 1:100 稀释兔抗人 CD4 一抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗 4 次后, 每孔加入 50 μ L 的 1:2 000 稀释 HRP-山羊抗兔二抗 (中杉金桥), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗 4 次, PBS 洗 1 次后 OPD 室温显色 10 min, 用 BioRad 酶联仪检测 492 nm 和 630 nm 的 A 值。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Sequences (5'-3')
HIV-MT-Forward	CTAGTCTAGAGGCGATTATCAAGTGTC AAGTCCAATCTATGAC
HIV-MT-Reverse	CGCGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGGCTGCCCTGGAGCTCC
HIV-MF-Forward	CTAGTCTAGAGGCGATTATCAAGTGTC AAGTCCAATCTATGAC
HIV-MF-Reverse	CGCGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTGGTGGTGGC
RT-PCR primers-Forward	TCTAGAGGCGATTATCAAGTGTC AAGTCCAATC
RT-PCR primers- Reverse	GGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGTG-ATGGTGGC

1.2.6 Western blotting

转染后 72 h, 收集细胞, 采用细胞裂解液 (Promega) 提取胞内总蛋白。将蛋白样品与电泳上样缓冲液混合后沸水煮 5 min, 立即置于冰上 5 min, 短暂离心。细胞总蛋白的上样量为每泳道 20 μ g, 10% SDS-PAGE 胶分离样品, 200 mA 湿转 2 h 至 PVDF 膜上; 室温封闭 2 h 后, 将膜与 5% 脱脂奶粉 1:5 000 稀释的鼠抗 His 标签一抗 (中杉金桥) 和 1:10 000 稀释的鼠抗 β -Tubulin 一抗 (Abmart) 4 $^{\circ}$ C 共同孵育过夜; PBST 洗膜 3 次, 将膜与 1:10 000 稀释的 HRP-山羊抗鼠二抗 (Santa Cruz) 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次后; 加入 ECL 试剂, 室温反应 5 min, 暗室曝光, 显影, 定影。

2 结果

2.1 HIV-1 拮抗并靶向 DC 的融合基因的设计和合成

本实验中我们设计了一个能够捕获 HIV-1 并靶向 DC 的融合基因, 包含 CD4 等 4 个分子, 其中 CD4 和 CCR5 能够与 HIV-1 特异性结合, 可以阻断 HIV 的膜蛋白 gp120 与靶细胞表面受体结合, 而 Mip-3 α 分子可以募集 DC, Flt3-L 分子则能够刺激 DC 的增殖。在 4 个不同的分子间, 加入了连接序列, 避免所表达分子间的相互作用。另外, 为了方便融合蛋白的检测和纯化, 我们在融合基因 3 末端加入了 6 个组氨酸构成的标签。在 GenBank 中获取了对应基因的核酸序列, 各序列详细信息见表 2。融合基因全长 2 232 bp, 序列的一级结构分析 (www.expasy.org) 表明融合基因对应蛋白的分子量约 84 kDa。

表 2 HIV-MF 融合基因中各组分信息

Table 2 Information of each component in HIV-MF

Gene	GenBank ID	Position in sequence	Size (bp)	Function
<i>CCR5</i>	NM_001100168	126-722	597	Coreceptor
<i>CD4</i>	NM_000616	249-776	528	Attach with HIV-1
<i>Flt3-L</i>	NM_001459	169-633	465	Expansion of DCs
<i>Mip-3α</i>	NM_004591	74-358	285	Migration of DCs



图 1 HIV-MF 融合基因结构

Fig. 1 Component included in HIV-MF.

2.2 真核表达载体的鉴定

电泳结果显示, 重组质粒 pABK-HIV-MT 和 pABK-HIV-MF 用 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切后, 条带分别与载体和目的片段大小一致 (图 2)。测序分析表明重组质粒序列正确, 表明重组质粒构建成功。

2.3 HIV-MF 的转录结果

用重组质粒 pABK-HIV-MF 转染人胚肾 293 细胞, RT-PCR 检测重组质粒在细胞中的转录。

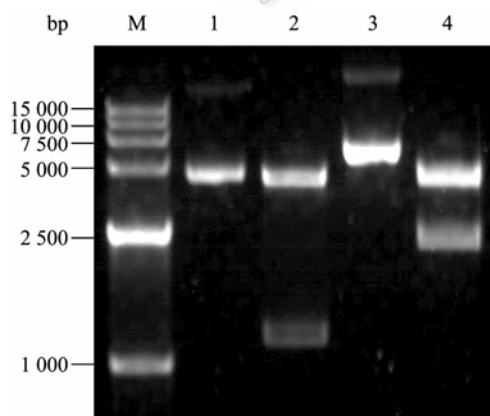


图 2 重组质粒 pABK-HIV-MT 和 pABK-HIV-MF 的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion of pABK-HIV-MT and pABK-HIV-MF. M: DNA marker; 1: pABK-HIV-MT plasmid; 2: pABK-HIV-MT digested with *Bam*H I/*Xba* I; 3: pABK-HIV-MF plasmid; 4: pABK-HIV-MF digested with *Bam*H I/*Xba* I.

pABK-HIV-MF 重组质粒在 2 244 bp 左右有扩增条带, 转染 pABK-HIV-MF 组和 pABK 空载体组有 GAPDH 的扩增条带, 以水为模板的空白对照组和未添加反转录酶处理的所有样品 (图略) 均无对应扩增条带, 表明 pABK-HIV-MF 在细胞中得到了特异的转录。

2.4 融合基因表达的间接免疫荧光检测结果

间接免疫荧光检测结果显示阳性对照 (转染 pVAX-1-s-CD4 真核表达载体) 及转染 pABK-HIV-MT 和 pABK-HIV-MF 的人胚肾 293 细胞在镜下观察有染色 (图 4), 而未转染重组质粒组没有染色, 表明融合基因 HIV-MT 和 HIV-MF 在细胞中得到了特异表达。

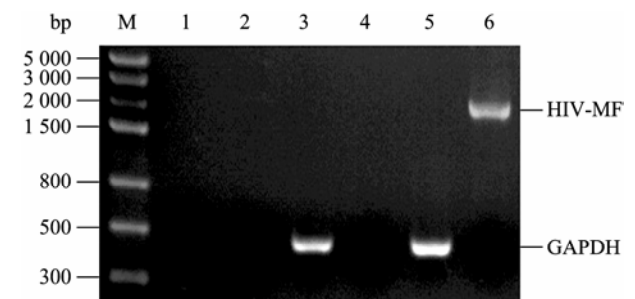


图 3 HIV-MF 融合基因的 RT-PCR 产物

Fig. 3 RT-PCR product of HIV-MF. M: DNA marker; 1: amplification of water by GAPDH primer; 2: amplification of water by specific primer; 3: amplification of pABK group by GAPDH primer; 4: amplification of pABK group by specific primer; 5: amplification of pABK-HIV-MF group by GAPDH primer; 6: amplification of pABK-HIV-MF group by specific primer.

2.5 融合基因表达的 ELISA 检测结果

因为真核表达载体 pABK 中带有一段信号肽, 可以使得表达的蛋白分泌到细胞外, 所以细胞上清中会有表达的蛋白。我们采用间接 ELISA 法进一步验证融合基因 HIV-MT 和 HIV-MF 在细胞内和培养上清中的表达情况。通过包被细胞总蛋白和培养上清, 用 CD4 作为一抗孵育, 每个样品组设 2 个平行孔。同时设置多组对照组: 一抗对照 (不加二抗只加一抗), 二抗对照 (不加一抗只加二抗), 阴性对照 (未转染组)。如图 5 所示, 转染 pABK-HIV-MT 和 pABK-HIV-MF 的培养上清和细胞内总蛋白 CD4 抗体检测结果呈阳性, 未处理组和所有对照组呈阴性, 表明融合蛋白在人胚肾 293 细胞中得到了特异表达, 并且分泌到了细胞外。

2.6 HIV-MF 的 Western blotting 结果

为了进一步检测 HIV-MF 在人胚肾 293 细胞中的表达及估计其蛋白分子量的大小, 我们用抗 His 标签和抗 β -Tubulin 内参抗体对转染 HIV-MF 真核表达载体后人胚肾 293 细胞的胞内总蛋白进行了 Western blotting 分析, 结果显示转染 HIV-MF 真核表达载体组存在特异性条带和内参条带, 而对照组

只见内参条带 (图 6), 其结果确定了 HIV-MF 融合基因在人胚肾 293 细胞中获得了正确的表达。

3 讨论

目前美国 FDA 批准用于治疗 HIV-1 的药物主要是逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂, 这两种药物在使用中均有不良反应, 很难抑制病毒的复制, 且极易导致病毒变异, 出现耐药。而 HIV 进入/融合抑制类药物由于不受耐药性影响, 成为非常有吸引力的药物研制方向。HIV 通过外膜蛋白 gp120 与靶细胞表面的 CD4 受体及趋化因子受体 CCR5 和 CXCR4 结合进入细胞, 因此与 gp120 结合的高度保守区域为 HIV 进入/融合抑制类药物作用提供了靶点。其中, PRO542 是由 CD4 的 D1 ~ D2 区和天然抗体 IgG2 的保守区融合而成的重组蛋白, 正处于 II 期临床研究阶段。另一种抗 CD4 的单克隆抗体 Ibalizumab 可阻断 HIV-1 与细胞表面受体 CD4 结合, 在一期临床实验中也获得了较好的抗病毒效应。而 Maraviroc 作为第一个 CCR5 拮抗剂已于 2007 年 8 月被美国 FDA 批准上市^[9-10], 随访结果显示 Maraviroc 具有良好的安全性和抗病毒效应^[11]。

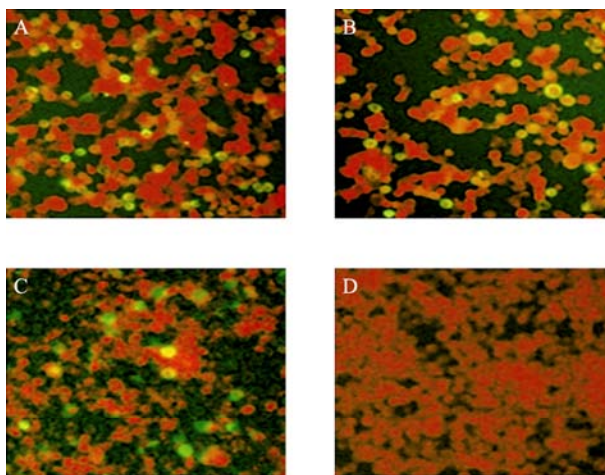


图 4 融合基因的间接免疫荧光检测结果

Fig. 4 Immunofluorescent assay of the fusion gene expressing in cells. (A) Transfected with plasmid pABK-HIV-MT. (B) Transfected with plasmid HIV-MF. (C) Transfected with plasmid pVAX-1-s-CD4 (positive control). (D) Untreated group (negative control).

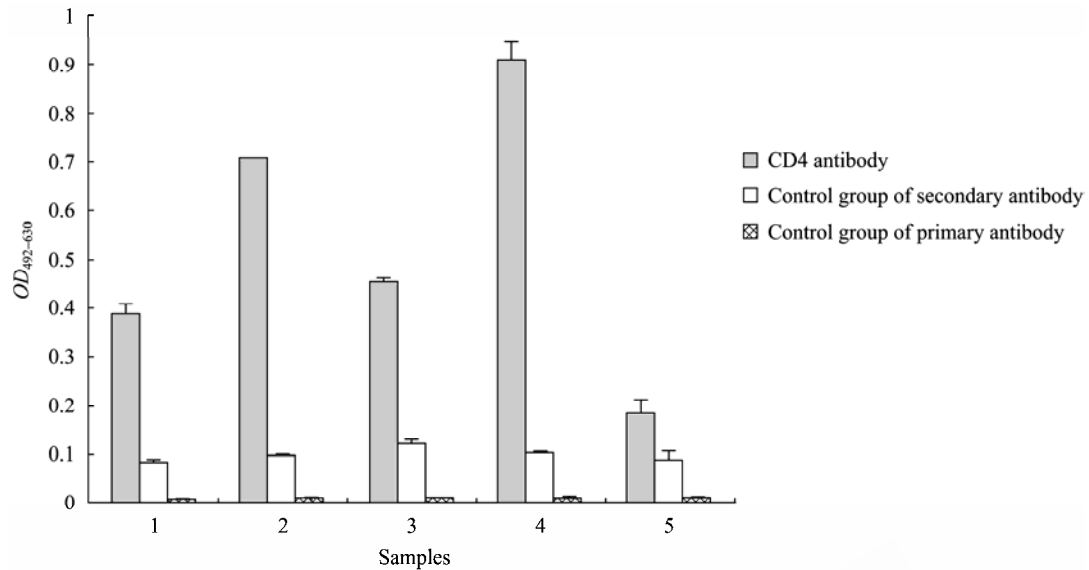


图 5 融合蛋白表达的 ELISA 检测结果

Fig. 5 ELISA analysis of the fusion gene in cells. 1: culture medium of HEK293 transfected with plasmid pABK-HIV-MT; 2: culture medium of HEK293 transfected with plasmid pABK-HIV-MF; 3: intracellular protein of HEK293 transfected with plasmid pABK-HIV-MT; 4: intracellular protein of HEK293 transfected with plasmid pABK-HIV-MF; 5: untransfected group.

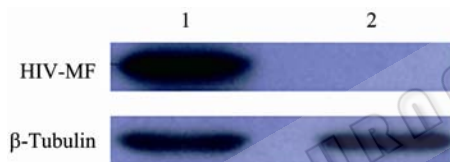


图 6 融合蛋白 HIV-MF 表达的 Western blotting 鉴定

Fig. 6 Western blotting of fusion protein HIV-MF in cells. 1: intracellular protein of HEK293 transfected with plasmid pABK-HIV-MF; 2: untreated group.

根据上述的研究结果，本研究中我们设计的融合基因 HIV-MF 理论上可以通过 CD4 和 CCR5 与 HIV 表面蛋白 gp120 的双重结合，捕获病毒分子，然后通过 Mip-3 α 对 DC 的趋化作用，将捕获的病毒分子靶向 DC，从而抑制和清除病毒，而 Flt3-L 分子则可以刺激 DC 的增殖、分化和成熟，增强 DC 对 HIV 抗原递呈作用。本研究采用多种不同的方法来检测 HIV-MF 在细胞中的表达情况，不同的检测方法得到了一致的结果，说明含融合基因的真核表达载体已被成功构建并在细胞中获得了正确的表达，为研究融合蛋白对 HIV-1 的拮抗及靶向 DC 的作

用奠定了基础。下一步我们将纯化融合蛋白 HIV-MT 和 HIV-MF，首先在体外检测它们是否可与 gp120 结合，然后验证其对 HIV 的捕获以及 HIV-MF 分子是否可以募集，并刺激 DC 的增殖和分化。

REFERENCES

- [1] Yu Y, Xiao GF, Li M, et al. Molecular mechanism of the entry of HIV-1 into cells and the related drug research. *Prog Biochem Biophys*, 2003, 30(1): 13-18.
余勇, 肖庚富, 李敏, 等. 人类免疫缺陷病毒-1 进入细胞的分子机制及相关药物的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(1): 13-18.
- [2] Weber J. The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull*, 2001, 58(1): 61-72.
- [3] Huang XL, Fan Z, Borowski LA, et al. Dendritic cells reveal a broad range of MHC class I epitopes for HIV-1 in persons with suppressed viral load on antiretroviral therapy. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12936.
- [4] Bozzacco L, Trumpfheller C, Huang Y, et al. HIV gag protein is efficiently cross-presented when targeted with an antibody towards the DEC-205 receptor in Flt3

ligand-mobilized murine DC. *Eur J Immunol*, 2010, 40(1): 36-46.

[5] Gamvrellis A, Leong D, Hanley JC, et al. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5): 506-516.

[6] Yue HL, Peng DZ. Structure and function of CCL20. *Immunol J*, 2004, 20(3): 100-102.
岳海岭, 彭代智. CCL20 的结构与功能. *免疫学杂志*, 2004, 20(3): 100-102.

[7] Ghosh M, Shen Z, Schaefer TM. CCL20/MIP3 α is a novel anti-HIV-1 molecule of the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol*, 2009, 62(1): 60-71.

[8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[9] Kuritzkes DR. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009, 4(2): 82-87.

[10] Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009, 4(2): 96-103.

[11] Hardy WD, Gulick RM, Mayer H, et al. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2010, 55(5): 558-564.



本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	生物谷网站	内 页
宝生物工程 (大连) 有限公司	封 二	镇江东方生物工程公司	内 页
北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司	内 页	安琪酵母股份有限公司	内 页