

基于包膜蛋白和 Tat 蛋白筛选 HIV-1 细胞融合抑制剂的高效方法

王小利¹, 杨怡姝¹, 沈思嗣¹, 王先良², 冯甜¹, 胡秦¹, 曾毅¹

1 北京工业大学 生命科学与生物工程学院, 北京 100124

2 中国疾病预防控制中心 环境与健康相关产品安全研究所, 北京 100123

王小利, 杨怡姝, 沈思嗣, 等. 基于包膜蛋白和 Tat 蛋白筛选 HIV-1 细胞融合抑制剂的高效方法. 生物工程学报, 2018, 34(3): 429-439.

Wang XL, Yang YS, Shen SS, et al. Tat-based cell-cell fusion method for screening HIV-1 fusion inhibitors. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 429-439.

摘要: 旨在建立一个细胞-细胞融合系统, 高效筛选对 HIV-1 病毒细胞-细胞间传播有抑制作用的药物。构建了 pEGFP-Tat 质粒, 将 pEGFP-Tat 质粒和 HIV-1 包膜质粒共转染 HEK-293T 细胞, 成为表达 Tat 蛋白和包膜蛋白的效应细胞, 然后与表达 CD4 及辅助受体和 β -半乳糖苷酶、荧光素酶双报告基因的靶细胞 TZM-bl 融合, 建立了细胞-细胞融合系统, 并进行条件优化, 确定了最佳的融合体系。用阳性融合抑制剂 maraviroc 以及没有融合抑制作用的 AZT 和 raltegravir 作用于该体系, 证明该系统可以特异性有效筛选具有细胞融合抑制作用的药物。用该系统测试了 8 个样本, 发现两种样品对融合有一定的抑制作用。该方法背景值低, 特异性强, 可用来高效筛选具有切断 HIV-1 病毒细胞-细胞间传播作用的抗病毒药物。

关键词: HIV-1, 细胞-细胞融合, 进入抑制剂, 药物筛选

Received: July 5, 2017; **Accepted:** August 25, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81202976), Scientific Research Project of Beijing Educational Committee (No. KM201510005029), National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2014ZX10005002-007).

Corresponding authors: Qin Hu. Tel: +86-10-67396212; E-mail: hq07616@bjut.edu.cn

Yi Zeng. Tel: +86-10-67392780; E-mail: zengyicdc@sina.com

国家自然科学基金 (No. 81202976), 北京市教委项目 (No. KM201510005029), 国家科技重大专项项目 (No. 2014ZX10005002-007) 资助。

网络出版时间: 2017-09-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170906.1559.008.html>

Tat-based cell-cell fusion method for screening HIV-1 fusion inhibitors

Xiaoli Wang¹, Yishu Yang¹, Sisi Shen¹, Xianliang Wang², Tian Feng¹, Qin Hu¹, and Yi Zeng¹

¹ College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

² National Institute of Environmental Health Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100123, China

Abstract: An HIV-1 cell-cell fusion system was developed to screen HIV-1 entry inhibitors that block cell-cell fusion. In this system, the pEGFP-Tat plasmid was constructed and cotransfected into effector cells (HEK-293T) with HIV-1 envelope plasmid. TZM-bl cell, a genetically engineered cell line that expresses CD4, CXCR4, CCR5 as well as Tat-inducible β -galactosidase and luciferase reporter gene, was used as target cell. Thus, the co-culture of target cells and effector cells allows the cell fusion via Env and the activity of the fusion inhibitor can be quantified by measuring the reporter protein expression. The experimental parameters were optimized and 11 anti-HIV-1 agents including CCR5 antagonist maraviroc, reverse transcription inhibitor zidovudine (AZT) and integrase inhibitor raltegravir were tested. The result showed that the system exhibited high specificity and sensitivity. Two of eight tested anti-HIV-1 agents were found to block the cell-cell fusion. The system is suitable for efficient screening of HIV-1 cell-cell fusion inhibitors.

Keywords: HIV-1, cell-cell fusion, entry inhibition, drug screening

艾滋病 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 是由人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 引起的一种逐步摧毁人体免疫系统、严重威胁人类健康和生存的重大传染性疾病。发现 30 多年来,至今仍无法彻底治愈^[1-3]。许多研究致力于发现新型的抗 HIV 病毒药物和治疗方案^[4-6]。

HIV-1 在体内的复制可通过病毒颗粒感染靶细胞或者通过已感染 HIV 的细胞感染靶细胞。后者称为细胞介导的病毒传播途径,许多研究认为该途径对 HIV 体内传播非常重要,其感染效率比病毒粒子感染高出多个数量级^[7-10]。因此,阻断该传播途径对 HIV 的治疗有重大意义。

细胞与细胞融合系统是筛选细胞介导的 HIV 传播阻断剂的有效手段。目前具有融合阻断作用的上市药物为 T-20 和 Maraviroc (Mar),这些药物已经存在耐药性等问题^[11-13]。许多研究建立了不同效应细胞-靶细胞的融合系统,采用不同的 HIV Env 质粒和不同的检测指标^[14-18],有的研究报道发现了一些具有融合抑制作用的化合物^[14,17,19],但没有深入研究的报道。曾祥凤等^[20]建立的将 H9

慢性感染细胞和 MT2 细胞进行细胞融合的筛选方法,需要加入钙荧光素,其可能对细胞生长有影响,而且融合和非融合细胞均有绿色荧光,靠人为区分,主观因素大,背景值高,终点检测用 p24 试剂盒,价格昂贵,成本高。李珉珉等建立了基于细胞-细胞融合的 HIV 进入抑制剂非感染性筛选方法,将两种细胞融合后,直接观察合胞体的形成^[21],该方法灵敏性不高,主观因素大。

HIV 的包膜蛋白 gp120 和 gp41,非共价结合成三聚体,在病毒表面或感染的细胞表面形成突起。在辅助受体 CCR5 或 CXCR4 等协助下 gp120 蛋白识别靶细胞的 CD4 分子并与其结合, gp120 与 gp41 分离, gp41 构象发生变化,暴露出融合功能区并插入到靶细胞膜中,导致病毒包膜或感染的细胞膜同靶细胞膜的融合^[22-24]。HIV 的 Tat 蛋白在细胞蛋白复合物的参与下,与 HIV 的长末端重复序列 (LTR) 中的 TAR RNA 相互作用,调节 HIV 基因的表达。TZM-bl 细胞株来自子宫颈癌细胞 HeLa,高表达 CXCR4 分子,稳定表达 CD4 分子和 CCR5 分子。该细胞导入了荧光素酶报告基因和大肠杆菌 β -gal 报告基因,由 LTR 控制。

Tat 蛋白与 LTR 结合可诱导报告基因表达。

本研究建立了一种高效筛选 HIV 细胞融合抑制剂的检测方法 (图 1)。首先构建了表达 GFP 蛋白和 Tat 蛋白的表达载体, 该质粒与 HIV 的 Env 质粒共转染 HEK-293T 细胞, 获得高表达 HIV-1 包膜蛋白和 Tat 蛋白的效应细胞。TZM-bl 细胞作为靶细胞。当两种细胞共培养时, 效应细胞表面的包膜蛋白识别结合靶细胞的 CD4、CCR5 和/或 CXCR4 受体, 两种细胞发生融合, Tat 蛋白扩散到靶细胞, 激活报告基因, 产生两种报告蛋白 β -半乳糖苷酶和荧光素酶。通过蓝斑计数或荧光素酶

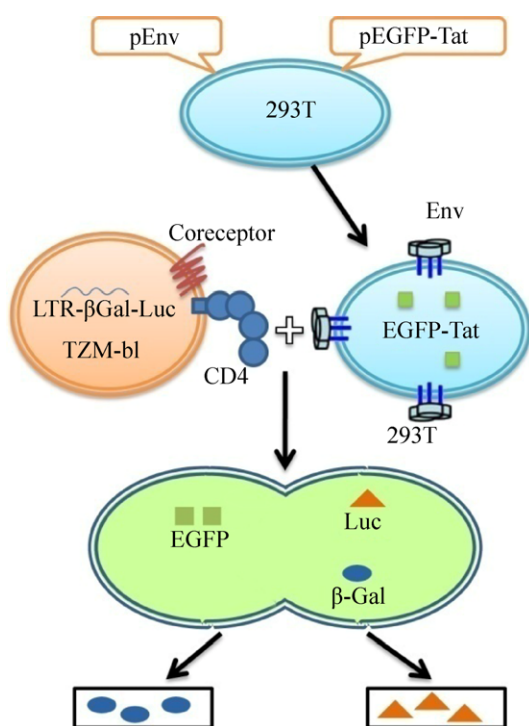


图 1 HIV-1 包膜介导的细胞-细胞融合系统原理

Fig. 1 Assay scheme for HIV-1 Env-mediated cell-cell fusion. The effector cells (HEK-293T) that express Env and Tat protein, were co-cultured with target cells (TZM-bl). The Cell-cell fusion enables the diffusion of Tat protein to target cells and thus activated the transcription of the Tat-inducible reporter gene. The efficiency of fusion was quantitated by reporter protein measurement.

检测反映融合情况。当两种细胞融合时, 加入待测样本, 如果报告基因表达减弱或缺失, 则说明该样本具有阻断细胞融合的作用。用已明确作用靶点的 HIV 上市药物评价了该筛选系统, 证明该方法可有效测定药物是否具有细胞融合抑制特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒

HEK-293T 细胞、TZM-bl 细胞由中国疾病预防控制中心病毒病研究所惠赠。质粒 HIV-NL4.3 和 HIV-1 B 亚型包膜质粒 pREJO4541.67 Env (编号为 11035, 本文以 11035-Env 表示) 由 NIH AIDS Reagent Repository 获得。质粒 HIV-NL4.3 携 HIV-1 B 亚型毒株全长基因组, 用以获取 *tat* 基因序列, 质粒 pREJO4541.67 Env 表达 HIV-1 包膜蛋白 *Env* 基因序列。

1.1.2 载体和试剂

pGEM-T 载体和 pEGFP-C3 载体、反转录试剂盒、转染试剂 FUGENE 6、Bright-glo 荧光素酶检测试剂盒等购自 Promega 公司; *Bam*H I、*Xho* I 限制性内切酶及 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司; 质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; CCK8 试剂盒购自日本同仁化学研究所。引物合成及基因测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。亚铁氰化钾、铁氰化钾等化学试剂购自国药集团化学试剂北京有限公司。

1.1.3 测定药物

Mar、AZT、Raltegravir (Ral) 购自 MCE 公司。Myr 购自国药集团化学试剂北京有限公司; HZ、BS、QQ 购自北京同仁堂药店; HPB、KH 为本实验室合成; ZL-1 为进行临床 II 期测试的药物。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-Tat 真核表达质粒的构建及鉴定

引物设计: 以 HIV-1 NL4.3 的 *tat* 基因序列为

模板,设计、合成引物,扩增含有两个外显子的 *tat* 基因序列。上游引物为:5'-CTCGAGAGCCACCATGGAGCCAGTAGATCCT-3',引入 *Xho* I 酶切位点;下游引物为:5'-GGATCCAATTCCTTCGGGCCTGT-3',引入 *Bam*H I 酶切位点。

pEGFP-Tat 质粒的构建:从转染了 HIV-1 NL4.3 质粒的 HEK-293T 细胞中提取总 RNA,以该 RNA 为模板,RT-PCR 扩增 *tat* 基因,纯化回收 PCR 产物,连接到 pGEMT 载体,构建 pGEMT-Tat 质粒。将 pGEMT-Tat 质粒进行 *Xho* I、*Bam*H I 双酶切,回收纯化 *tat* 酶切片段。*tat* 的回收产物和 pEGFP-C3 载体连接、转化、扩增提取,得到 pEGFP-Tat 质粒,该质粒进行酶切及测序鉴定。

1.2.2 细胞-细胞融合系统的建立

取对数生长期 HEK-293T 细胞接种六孔板。第 2 天将 pEGFP-Tat 质粒和 11035-Env 包膜质粒转染 HEK-293T 细胞,制备效应细胞。第 3 天取对数生长期的靶细胞 TZM-bl 接种到 96 孔板。第 4 天,收集转染了质粒的 HEK-293T 效应细胞,制成单细胞悬液,加入接种有 TZM-bl 细胞的 96 孔板中,两种细胞共培养 24 h 后,荧光显微镜摄像 (Observer A1, Zeiss, 德国)。报告蛋白 β -半乳糖苷酶用蓝斑染色试剂检测^[25],用 1% 甲醛、0.2% 戊二醛固定液固定样本,用 2 μ mol/L 亚铁氰化钾、0.2 μ mol/L 铁氰化钾、2 μ mol/L 氯化镁、40 μ g/mL X-gal 染色液染色,荧光显微镜 (IX71, Olympus, 日本) ImagPro 软件进行蓝斑计数。荧光素酶检测按照 Bright-glo 荧光素酶试剂盒步骤操作,多功能酶标 (Enspire, PE, 美国) 测定荧光素酶值。

1.2.3 细胞-细胞融合系统条件优化

优化 HEK-293T 效应细胞的制备条件:取对数生长期 HEK-293T 细胞按照 3×10^5 个细胞/孔接种六孔板。第 2 天,将 pEGFP-Tat 质粒和 11035-Env 质粒转染 HEK-293T 细胞。根据 *tat:env* 质粒不同

的量设不同实验组,24 h、48 h、72 h 荧光显微镜摄像及流式细胞术测定转染情况,确定最佳转染条件。

将对数生长期 TZM-bl 靶细胞制备成单细胞悬液,加入 96 孔培养板,每孔 10 000 个细胞,贴壁 0、2、6、24 h 时加入效应细胞,共孵育 24 h,荧光显微镜摄像及报告基因检测测定细胞融合情况,确定靶细胞最佳贴壁时间。

对数生长期的 TZM-bl 细胞按照 10 000 个/孔接种 96 孔板,贴壁 24 h。将 HEK-293T 效应细胞制成单细胞悬液,按照效应细胞和靶细胞数目比例为 0.5:1、1:1、2:1、4:1 的比例加入 96 孔板中,两种细胞共培养 24 h 后,荧光显微镜摄像及报告蛋白检测测定细胞融合情况,确定两种细胞最佳比例。

1.2.4 细胞融合系统筛选融合抑制剂的特异性

将 HIV-1 上市药物 Mar、AZT 和 Ral 10 倍比稀释成一系列的浓度梯度,与效应细胞同时加入靶细胞中孵育。同时设立融合阳性对照组 (FC, 只有效应细胞和靶细胞孵育) 和空白对照组 (Mock, 只转染了 pEGFP-Tat 质粒的 HEK-293T 细胞和靶细胞孵育)。24 h 后,用蓝斑染色法和荧光素酶法分别测定细胞融合情况。

1.2.5 细胞融合系统筛选具有融合抑制作用的样本

取对数生长期 TZM-bl 细胞接种 96 孔板,第 2 天加入不同浓度梯度的待测样本,培养 24 h, CCK8 检测药物对细胞的毒性作用。细胞死亡率在 10% 以下认为无细胞毒性。将待测样本无细胞毒剂量作为最高浓度稀释为系列浓度梯度,与效应细胞同时加入靶细胞共孵育 24 h, Mar 作为阳性对照药物, AZT 为阴性对照药物。检测报告基因,计算融合抑制率。

融合抑制率 (%) = (FC 组蓝斑数 - 加药组蓝斑数) / (FC 组蓝斑数 - Mock 组蓝斑数) \times 100。

1.2.6 数据统计分析

所有实验数据均为 3 次或以上重复实验结果,用 GraphPad PRISM6.0 绘图及进行统计学分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 真核表达质粒 pEGFP-Tat 的构建

HIV-1 NL4.3 质粒转染 HEK-293T 细胞,反转录 PCR 扩增 *tat* 片段,电泳图见图 2A。在 250 bp 附近有明显的扩增条带,*tat* 片段为 261 bp,与预期结果相符。构建真核表达克隆 pEGFP-Tat,酶切鉴定,所得片段长度与预期结果相符(图 2B)。将 pEGFP-Tat 酶切结果正确的阳性克隆送上海生工进行测序,测序结果序列比对后完全正确。

2.2 细胞-细胞融合系统

将 11035-Env 和 pEGFP-Tat 两种质粒共转染 HEK-293T 细胞,Env 质粒表达包膜蛋白,pEGFP-Tat 质粒表达 Tat 蛋白和 GFP 荧光蛋白,GFP 的亮度和表达率反映了蛋白表达量的多少,表达率越高,转染效率越高。将转染了质粒的

HEK-293T 效应细胞与 TZM-bl 细胞共培养以后,两种细胞两两融合或多个相互融合,形成大的合胞体或多核细胞,显微镜明场观察(图 3C),多为巨型细胞,细胞边缘不整齐,模糊不清,颗粒增多,形态多样,呈叠层生长,荧光观察,有些细胞中呈现多个绿色荧光体,蓝斑染色发现有的细胞含有一个蓝斑,有的含有多个蓝色斑点。只转染了 Tat 蛋白的 HEK-293T 细胞与 TZM-bl 细胞共孵育后(图 3B),显微镜明场下没有巨型细胞,只有单个的细胞,荧光观察,只能看到单个荧光的 HEK-293T 细胞,细胞蓝斑染色未见蓝色斑点。

2.3 细胞-细胞融合条件的优化

2.3.1 pEGFP-Tat 质粒与 11035-Env 包膜质粒转染量的影响

不同量的 Tat 质粒和 Env 质粒共转染 HEK-293T 细胞。从图 4A、4B 可知,当 Tat 质粒 1 μg 、Env 质粒 0.5 μg 时,荧光强度最强,转染效率最高。共转染 24、48、72 h 显微镜下观察荧光强度,发现 48 h 比 24 h 强,与 72 h 无显著差异(结果未显示),因此选取转染后 48 h 进行融合实验。

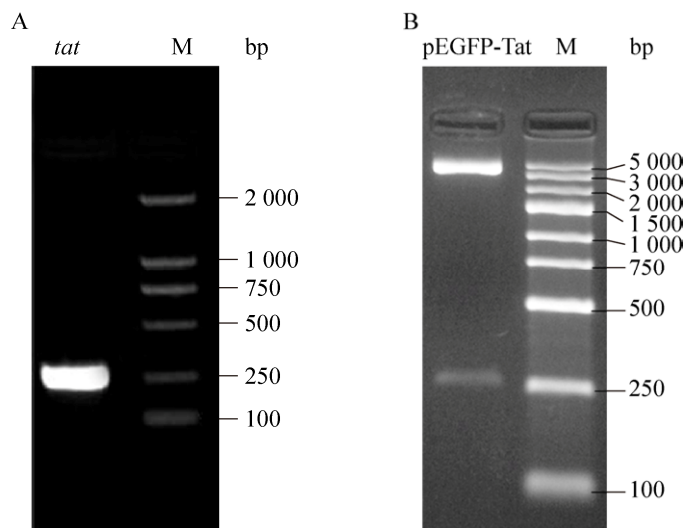


图 2 *tat* 基因 PCR 产物与各重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified *tat* gene and the restrictive endonuclease analysis of constructed plasmids. (A) PCR amplification of *tat* gene. (B) pEGFP-Tat digested with *Bam*H I and *Xho* I.

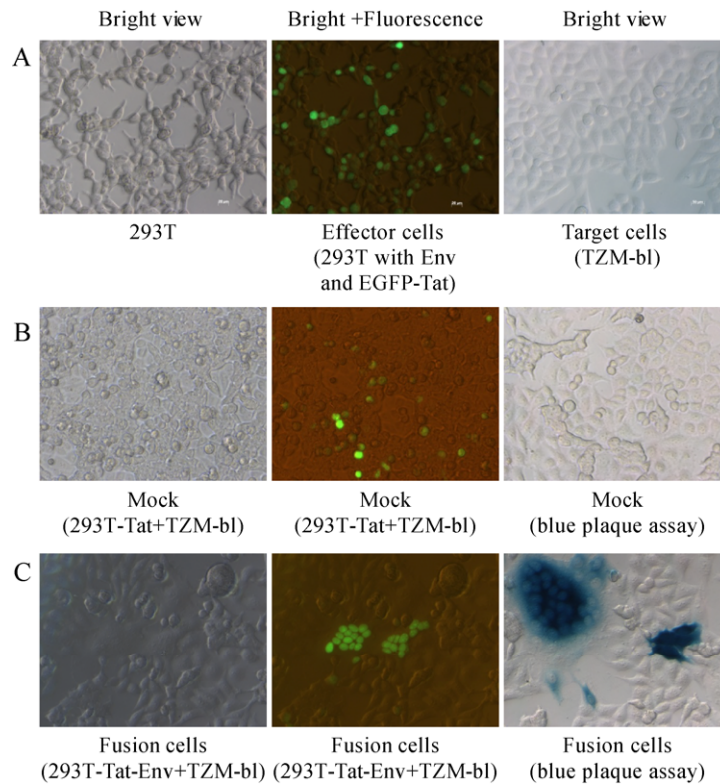


图3 细胞-细胞融合系统显微镜摄像分析 (200×)

Fig. 3 Direct visualization of cell-cell fusion system (200×). The effector cells (HEK-293T) were developed by co-transfection of pEGFP-Tat and p11035-Env plasmids. (A) The optical imaging of effector cells and target cells (TZM-bl) without fusion. Two cell types were co-cultured for 24 h and analysed for Tat expression as well as blue plaques under fluorescence microscope. (B) HEK-293T cells that transfected with only pEGFP-Tat were used as mock group. (C) HEK-293T and TZM-bl fusion group.

2.3.2 TZM-bl 细胞贴壁时间对融合效率的影响

在 TZM-bl 细胞贴壁 0、2、6、24 h 时加入效应细胞，共孵育 24 h 后，进行蓝斑染色，发现随着贴壁时间延长，蓝斑数增多，24 h 为最高 (图 4C)。结果提示靶细胞贴壁时间对两种细胞的融合效果有显著影响，本系统选取贴壁 24 h 后进行细胞融合。

2.3.3 效应细胞与靶细胞的数量对细胞融合的影响

TZM-bl 细胞 10 000 个/孔接种 96 孔板，24 h 后加入不同量的 HEK-293T 效应细胞共培养，24 h 后蓝斑计数 (图 4D)。随着效应细胞的增多，融合的蓝斑细胞数增多，当每孔加到 20 000 个效应

细胞，即 HEK-293T 与 TZM-bl 细胞为 2 : 1 时，蓝斑数最多，融合效率最高，随着效应细胞的增加，当二者比例为 4 : 1 时，融合效率下降，蓝斑数降低，因此选取效应细胞与靶细胞的数目分别为 20 000 和 10 000 作为最佳融合条件。

2.4 细胞-细胞融合系统药物筛选的特异性

将已知不同靶点的上市药物 Mar、AZT 和 Ral 作用于该细胞融合系统。Mar 为 CCR5 抑制剂，具有抑制细胞-细胞融合的作用，AZT 为逆转录酶抑制剂，Ral 为整合酶抑制剂，二者均没有融合抑制功能。由图 5 可知，无论是蓝斑计数法还是荧光素酶法，Mar 高剂量组测定值与融合

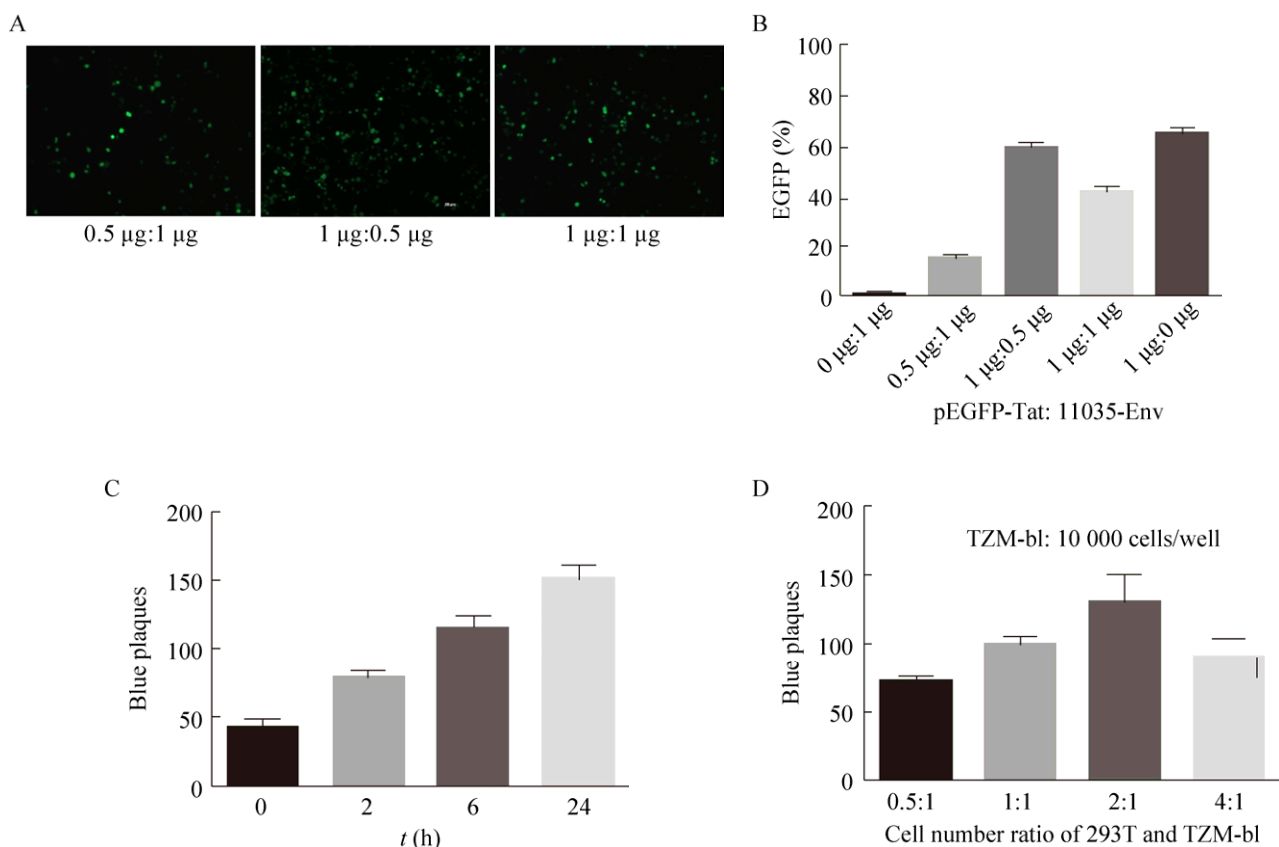


图 4 细胞-细胞融合条件优化

Fig. 4 Optimization of cell-cell fusion system. (A) Titration of the ratio of pEGFP-Tat: 11035-Env on transfection efficiency by fluorescence microscopy (100 \times). (B) Titration of the ratio of pEGFP-Tat: 11035-Env on transfection efficiency by flow cytometry. (C) The optimal seeding time of TZM-bl cells prior to co-culture with HEK-293T cells. (D) The ratios of 293T: TZM-bl cells on the fusion efficiency. All data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$).

对照组 (FC) 相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明其具有抑制融合的作用, 而且结果还显示 Mar 与融合存在剂量效应关系。AZT 和 Ral 组与 FC 组相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 没有融合抑制作用。实验结果与各药物抗病毒作用的靶点相符合, 表明该方法筛选细胞融合抑制剂有良好的特异性。

2.5 药物的筛选

用该系统测试了 6 种天然药物 (包括提取物) 及两种合成的化合物, 本实验室前期研究发现这些样本在细胞水平具有一定的 HIV-1 抑制作用。

细胞融合系统测定发现, 有两种药物 Myr 和 KH 对融合有一定的抑制作用, 高剂量组抑制率达到 50% 以上, 半数抑制浓度为 7.483 μ g/mL 和 5.646 μ g/mL, 提示这两种药物可能通过抑制融合作用发挥抗病毒作用, 其他几种药物的抗病毒作用与细胞融合无关 (图 6A 和 6B)。

3 讨论

本研究利用 Env 蛋白介导细胞-细胞融合, Tat 蛋白反式激活因子与 LTR 相互作用, 调控报告基因的表达, 建立了一个高效的细胞融合系统。我

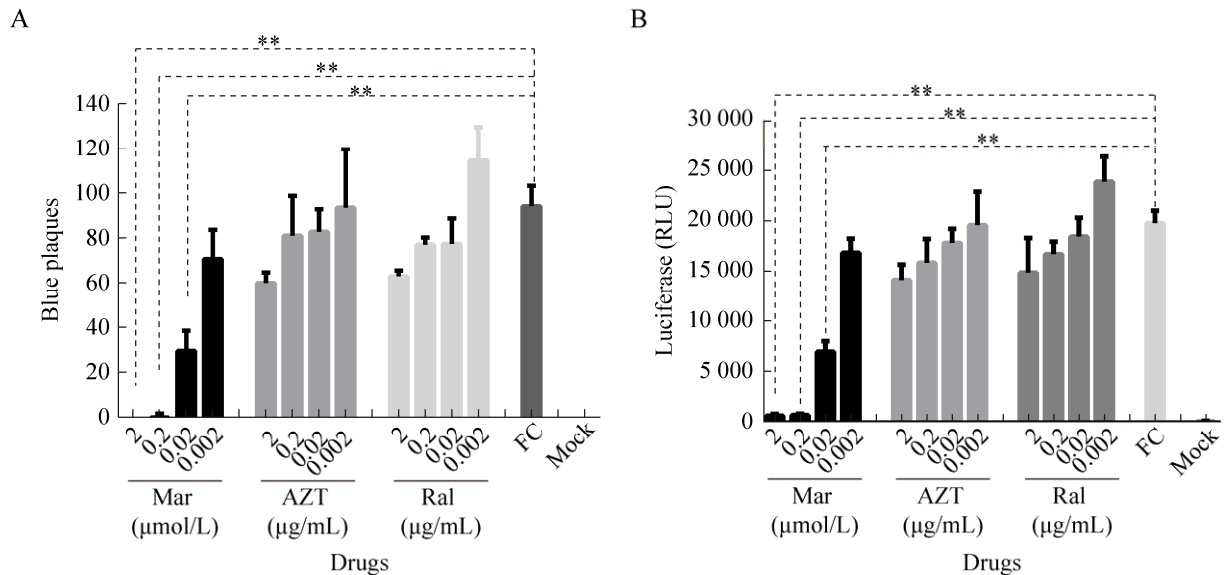


图5 细胞-细胞融合系统可行性及特异性检测

Fig. 5 The validation of the cell-cell fusion system. (A) The system was validated with 3 FDA-approved anti-HIV-1 drugs, including CCR5 antagonist maraviroc (positive control), reverse transcription inhibitor zidovudine (AZT) and integrase inhibitor raltegravir (negative controls). The fusion efficiency was detected using blue plaque assay (A) and luciferase assay (B). All data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$); ** $P < 0.05$ (Student's t tests). FC: fusion control, refers to 293T-Tat-Env and TZM-bl co-culture group; Mock refers to 293T-Tat and TZM-bl co-culture group.

们构建了 EGFP-Tat 蛋白表达质粒, EGFP 作为指示蛋白, 评价效应细胞产生的效率。当两种细胞共培养时, 效应细胞表面的 gp120、gp41 识别靶细胞的 CD4、CCR5 和/或 CXCR4 受体, 发生细胞融合, Tat 蛋白扩散到靶细胞, 激活报告基因。影响上述过程中任一或多个蛋白活性, 或者影响蛋白之间相互作用过程, 都会导致报告基因的变化。因此该方法筛选的有抑制作用的样品, 可能作用于某个融合靶点, 也可能作用多个靶点, 可广泛筛选具有切断细胞-细胞传播作用的药物。用 Mar 作为阳性药, AZT 和 Ral 为阴性药, 评价细胞融合系统筛选抑制剂的有效期。实验结果证实该系统可有效筛选融合抑制剂, 特异性强, 背景值低。蓝斑染色法和荧光素酶两种方法检测结果一致。

利用 HEK-293T 细胞作为效应细胞, 该细胞株可以高效表达外源蛋白, 表达率可达 60% 以上,

保证了效应细胞的高效性。EGFP 作为指示蛋白, 通过荧光显微镜, 可以实时快速反映转染蛋白表达情况和细胞融合情况, 流式细胞仪检测还可以确定表达了 Tat、Env 蛋白效应细胞的比例, 不同于 De-Chun Cheng 等^[14,21]建立的系统, 只有进行到细胞融合的终点才能评价此次实验融合情况。

Tat 调控蛋白只有通过融合作用才能进入靶细胞调控报告基因的表达, 非特异性低。该方法有荧光素酶和 β -半乳糖苷酶双报告基因系统, 均可反映样本对融合的抑制情况。用荧光素酶试剂盒测定, 灵敏度高, 时间短, 出结果快; 基于 β -半乳糖苷酶特性进行的细胞蓝斑染色, 背景值低, 特异性强, 检测成本低。两种指标同时检测, 可排除样本对某种报告蛋白直接影响带来的假阳性, 提高检测的特异性。但对报告蛋白直接影响的样本很少, 因此通常只采取一种检测方法即可。用不同的 HIV 包膜蛋

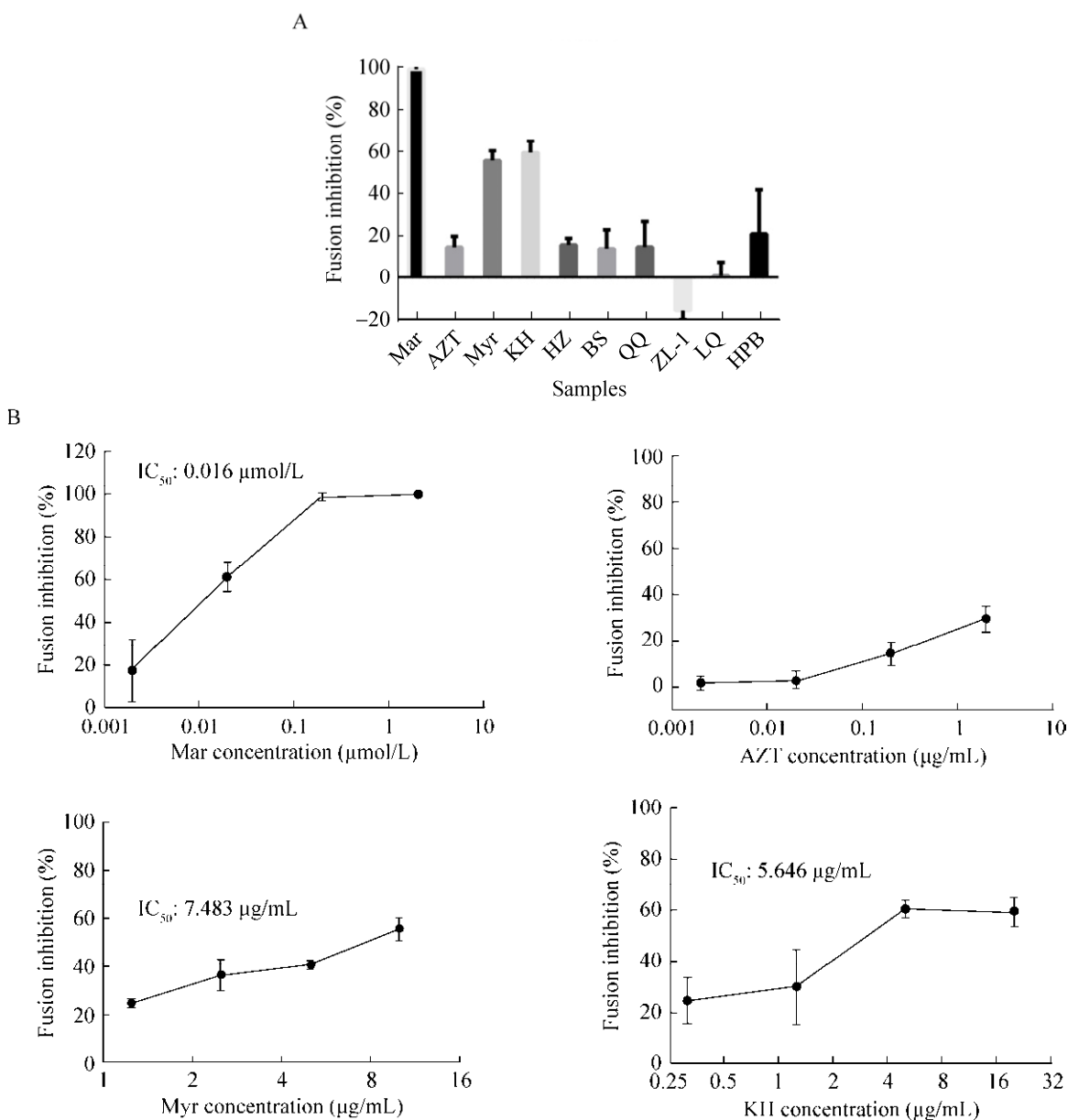


图 6 融合系统测定样本

Fig. 6 The screening for fusion inhibitor using cell-cell fusion system. (A) Ten anti-HIV-1 agents were tested in the cell-cell fusion system. Mar: 0.2 $\mu\text{mol/L}$; AZT: 0.2 $\mu\text{g/mL}$; Myr: 10 $\mu\text{g/mL}$; KH: 20 $\mu\text{g/mL}$; HZ: 150 $\mu\text{g/mL}$; BS: 150 $\mu\text{g/mL}$; QQ: 100 $\mu\text{g/mL}$; ZL-1: 100 $\mu\text{g/mL}$; LQ: 150 $\mu\text{g/mL}$. (B) The dose-effect curves of Mar, AZT, Myr and KH on HIV-1 cell-cell fusion. All data were expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$).

白质粒与 Tat 质粒进行转染，可以建立不同 HIV 包膜的细胞-细胞融合系统，筛选针对某一 HIV 亚型的细胞融合抑制剂，优于用表达 Env、Tat 的细胞系作为效应细胞的筛选方法^[26-27]。但同时这也成为该方

法不足之处，效应细胞蛋白瞬时表达，增加筛选的时间和系统的变异性。但由于 HEK-293T 细胞转染效率高，经多次重复实验，转染率差异在 3% 以内，对融合效果检测影响不显著。

用该系统筛选了 8 个样本, Mar 为融合阳性药物对照, AZT 为融合阴性药物对照。首先用 CCK8 方法检测药物的细胞毒性, 用药物的无毒剂量进行融合筛选实验, 排除药物的细胞毒性对融合的影响, 发现天然化合物 Myr 和化学合成物质 KH 具有显著抑制融合作用, 最高剂量的抑制率在 50% 以上, IC_{50} 分别为 7.483 $\mu\text{g/mL}$ 和 5.646 $\mu\text{g/mL}$, 为筛选具有融合作用的药物提供了有效的方法。

REFERENCES

- [1] Burki T. Claims of a cure for HIV come under fire. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(5): 484–485.
- [2] Liu C, Ma X, Liu B, et al. HIV-1 functional cure: will the dream come true? *BMC Med*, 2015, 13: 284.
- [3] Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet*, 2013, 382(9903): 1525–1533.
- [4] Carrillo MA, Zhen A, Zack JA, et al. New approaches for the enhancement of chimeric antigen receptors for the treatment of HIV. *Transl Res*, 2017, S1931-5244(17): 30233–30235.
- [5] Kwarteng A, Ahuno ST, Kwakye-Nuako G. The therapeutic landscape of HIV-1 via genome editing. *AIDS Res Ther*, 2017, 14(1): 32.
- [6] Malik T, Chauhan G, Rath G, et al. “Fusion and binding inhibition” key target for HIV-1 treatment and pre-exposure prophylaxis: targets, drug delivery and nanotechnology approaches. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 608–621.
- [7] Casartelli N. HIV-1 cell-to-cell transmission and antiviral strategies: an overview. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(1): 65–75.
- [8] Smith SA, Derdeyn CA. New connections: cell-to-cell HIV-1 transmission, resistance to broadly neutralizing antibodies, and an envelope sorting motif. *J Virol*, 2017, 91(9): e00149–17.
- [9] Sattentau Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(11): 815–826.
- [10] Sattentau QJ. Cell-to-cell spread of retroviruses. *Viruses*, 2010, 2(6): 1306–1321.
- [11] Wei XP, Decker JM, Liu HM, et al. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1896–1905.
- [12] Greenberg ML, Cammack N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54(2): 333–340.
- [13] Jiang XW, Feyertag F, Meehan CJ, et al. Characterizing the diverse mutational pathways associated with R5-tropic maraviroc resistance: HIV-1 That uses the drug-bound CCR5 coreceptor. *J Virol*, 2015, 89(22): 11457–11472.
- [14] Cheng DC, Zhong GC, Su JX, et al. A sensitive HIV-1 envelope induced fusion assay identifies fusion enhancement of thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(4): 1780–1784.
- [15] Kramer S, Buontempo P, Agrawal S, et al. Imaging-based assay for identification and characterization of inhibitors of CXCR4-tropic HIV-1 envelope-dependent cell-cell fusion. *J Biomol Screen*, 2011, 16(6): 668–675.
- [16] Herschhorn A, Finzi A, Jones DM, et al. An inducible cell-cell fusion system with integrated ability to measure the efficiency and specificity of HIV-1 entry inhibitors. *PLoS ONE*, 2011, 6(11): e26731.
- [17] Herschhorn A, Gu C, Espy N, et al. A broad HIV-1 inhibitor blocks envelope glycoprotein transitions critical for entry. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(10): 845–852.
- [18] Symeonides M, Lambel  M, Roy NH, et al. Evidence showing that tetraspanins inhibit HIV-1-induced cell-cell fusion at a post-hemifusion stage. *Viruses*, 2014, 6(3): 1078–1090.
- [19] Marin M, Du YH, Giroud C, et al. High-throughput HIV-cell fusion assay for discovery of virus entry inhibitors. *Assay Drug Dev Technol*, 2015, 13(3): 155–166.
- [20] Zeng XF, Zeng YY, Li HX. A novel method for rapid screening of anti-HIV drugs *in vitro*. *J Jinan Univ: Med Ed*, 2006, 27(2): 233–238 (in Chinese).
曾祥凤, 曾耀英, 李海仙. 体外快速筛选抗 HIV 药物的一种新方法. *暨南大学学报: 医学版*, 2006, 27(2): 233–238.
- [21] Li MM, Li L, Jiang SB, et al. A non-infectious assay for detecting HIV Env-induced cell-cell fusion. *J Jinan*

- Univ: Med Ed, 2007, 28(6): 576–580 (in Chinese).
- 李珉珉, 李琳, 姜世勃, 等. 基于细胞-细胞融合的 HIV 进入抑制剂非感染性筛选方法的研究. 暨南大学学报: 医学版, 2007, 28(6): 576–580.
- [22] Esté JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet*, 2007, 370(9581): 81–88.
- [23] Blumenthal R, Durell S, Viard M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J Biol Chem*, 2012, 287(49): 40841–40849.
- [24] Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 777–810.
- [25] Kimpton JI, Emerman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J Virol*, 1992, 66(4): 2232–2239.
- [26] Li MM, Xia CL, Mao QC, et al. A non-infectious and quantitative cell-based bioassay for screening HIV entry inhibitors targeting HIV envelope proteins. *J South Med Univ*, 2010, 30(5): 941–944 (in Chinese).
- 李珉珉, 夏承来, 毛芹超, 等. 靶向包膜蛋白的 HIV 进入抑制剂非感染性定量筛选方法的研究. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 941–944.
- [27] Chong HH, Yao X, Qiu ZL, et al. Discovery of critical residues for viral entry and inhibition through structural Insight of HIV-1 fusion inhibitor CP621–652. *J Biol Chem*, 2012, 287(24): 20281–20289.

(本文责编 郝丽芳)