

HIV-1 辅受体配体的融合表达载体的构建及表达 *

张颖, 白雪帆 **, 黄长形, 孙永涛, 潘蕾, 李光玉, 王临旭

(第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, 陕西 西安 710038)

Construction and Expression of the Bicistronic Expression Vector pCMV-R-K-S-K

ZHANG Ying, BAI Xue-fan **, HUANG Chang-xing, SUN Yong-tao, PAN Lei,

LI Guang-yu, WANG Lin-xu

(The Center of Diagnosis and Treatment for Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, FMMU, Xi'an 710038, China)

Abstract: In order to construct bicistronic expression vector of RANTES and SDF-1, the ligands of HIV-1 principal coreceptors, RANTES-KDEL were amplified from pCMV-R-K by PCR and ligated with eukaryotic expression vector pCMV-S/K. The construction of pCMV-R-K-S-K was confirmed by enzymatic digestion and sequencing. Then pCMV-R-K-S-K transfection into HeLa cells was carried out by lipofectin. RANTES and SDF-1 were showed expressed in HeLa cells by indirect immunofluorescence. The results show that pCMV-R-K-S-K was constructed and expressed in cell line HeLa successfully, which will contribute to gene therapy of HIV-1.

Key words: HIV-1; Coreceptor; Chmokine; Bicistronic expression vector; Transfection

摘要: 应用 PCR 扩增 RANTES-KDEL 基因, 鉴定后与真核表达载体 pCMV-S/K 连接, 构建成 HIV-1 辅受体的配体、趋化因子 RANTES 和 SDF-1 的融合表达载体 pCMV-R-K-S-K, 酶切鉴定和测序证明成功构建了 pCMV-R-K-S-K 融合表达载体。脂质体介导 pCMV-R-K-S-K 转染 HeLa 细胞, 间接免疫荧光证实 RANTES 和 SDF-1 可高效表达于 HeLa 细胞。结果表明构建的 pCMV-R-K-S-K 融合表达载体能在 HeLa 细胞中高效表达, 可用于下一步的 HIV-1 感染实验。

关键词: HIV-1; 辅受体; 趋化因子; 融合表达载体; 转染

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2003)01-0023-04

获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrom, AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency vires, HIV) 引起的世界广泛流行、严重危害人类健康的传染病。虽然近年高效抗逆转录病毒疗法 (highly active anti-retroviral therapy, HAART) 明显提高了 HIV 感染和 AIDS 的临床疗效, 但是由于 HIV 的高度变异性, 化疗药物的毒副作用及价格昂贵等因素, AIDS 的治疗在发展中国家仍然存在很多难以解决的问题^[1]。已知 HIV-1 感染靶细胞首先需要与 CD4 分子及相应的

辅受体(coreceptors)结合^[2], 后者多数为趋化因子受体家族成员, 其中 CCR5 和 CXCR4 是其主要的辅受体。临床调查发现, CCR5 等位基因缺失个体, 即使频繁暴露但很少被 HIV-1 感染^[3], 表明辅受体在 HIV-1 感染具有重要的作用。HIV 辅受体的发现对理解 HIV 病毒嗜性的分子机理及病毒融合、进入靶细胞的病理过程有重要意义, 并为抗 HIV 基因治疗提供了新的思路。

为了研究 HIV-1 辅受体表型剔除对病毒感染的阻断作用, 本文构建了 HIV-1 辅受体的配

收稿日期: 2002-06-10, 修回日期: 2002-07-20

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(39970695)

作者简介: 张颖(1975-), 女, 陕西富平县籍, 博士, 主要从事 AIDS 基因治疗研究。

** 通讯作者: 白雪帆(1951-), 男, 博士研究生导师, 教授, 主要研究方向为肾综合征出血热、艾滋病和病毒性肝炎。Correspondence author.

体——趋化因子 RANTES 和 SDF-1 的融合表达载体 pCMV-R-K-S-K, 并观察其转染人宫颈癌细胞系 HeLa 的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

pCMV 真核表达载体购自 invitrogen 公司。pCMV-S/K 及 pCMV-R-K 质粒由本校杨安钢教授等构建并惠赠^[4], 本实验室保存。*E.coli* XL1-blue 宿主菌和人宫颈癌细胞系 HeLa 分别由第四军医大学生物化学和微生物学教研室惠赠。限制性内切酶、DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品。DMEM、胎牛血清及脂质体 lipofectAMINE™2000 均购自 Gibco 公司。羊抗人 RANTES、羊抗人 SDF-1 购自 Sigma 公司。荧光标记兔抗羊 IgG 为博士德产品。PCR 引物合成及基因测序由 TaKaRa 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应扩增 RANTES-KDEL 及产物鉴定: 根据 RANTES-KDEL 序列设计 PCR 扩增引物, 上游引物为: 5'-TTAAGCTTATGAAGGTCTCCGCGG-CAGCC-3', 其中引入 *Hind*III 酶切位点, 下游引物为 5'-TTTGC GGCCGCTCACAGCTCGTCCTT-3', 引入 *Not*I 酶切位点。PCR 反应以 pCMV-R-K 质粒为模板, 反应条件为 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 共 25 个循环, 最后一个循环延伸 7min。取 PCR 产物 5μL 进行琼脂糖凝胶电泳并初步鉴定。

1.2.2 pCMV-R-K-S-K 融合表达载体的构建及鉴定: 纯化后的 PCR 产物用 *Hind*III/*Not*I 双酶切, 同时将真核表达质粒 pCMV-S/K 用 *Hind*III/*Not*I 双酶切, 琼脂糖凝胶回收作为载体。将酶切后的 PCR 产物定向克隆入 pCMV-S/K, 使 RANTES-KDEL 片段位于 SDF-KDEL 的 5'端, 二者之间含有 IRES 片段。重组质粒转化 *E.coli* XL1-blue 感受态菌, 挑取

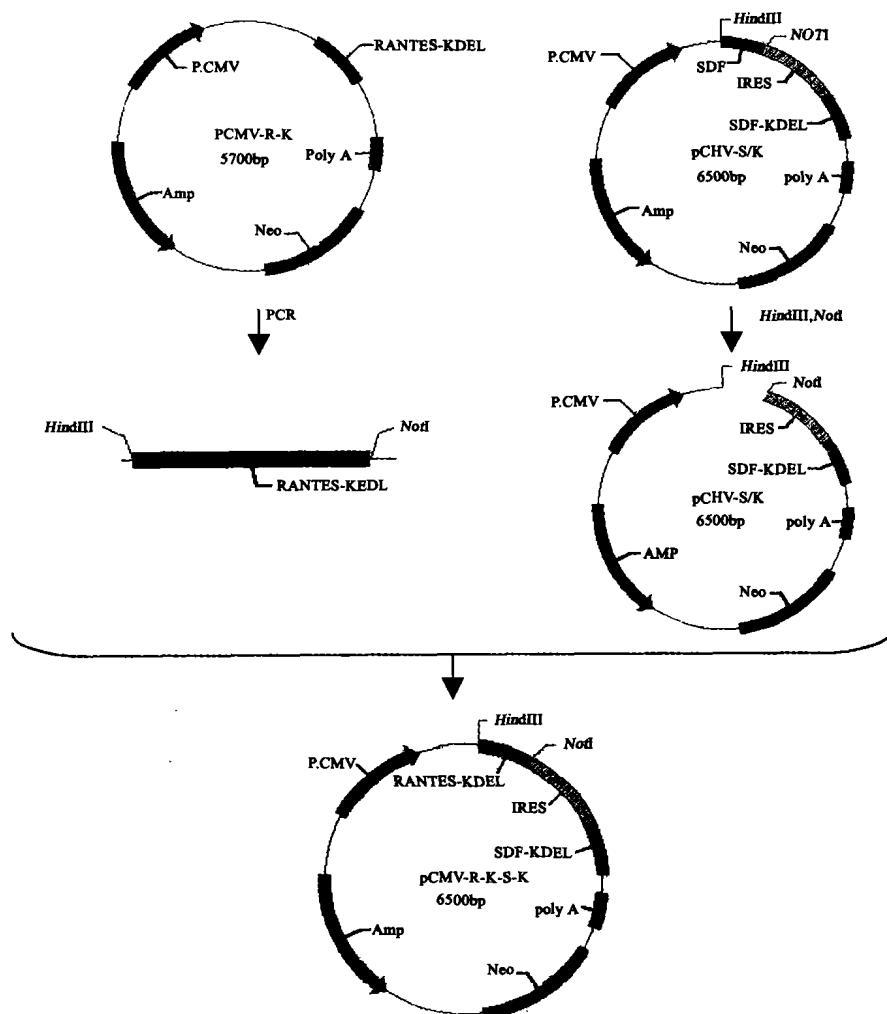


图 1 真核表达载体 pCMV-R-K-S-K 构建示意图

Fig. 1 Construction procedure of eukaryotic expression plasmid pCMV-R-K-S-K

阳性菌斑增菌培养后小提质粒进行酶切鉴定和测序。

1. 2. 3 pCMV-R-K-S-K 质粒的转染: HeLa 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养。转染前将对数生长的 HeLa 细胞接种于 24 孔板,待其长至 80%–90%单层时进行转染,取 3–5 μ g pCMV-R-K-S-K, 3 μ L lipofectAMINE™2000, 各加入 50 μ L 无血清 DMEM, 然后将二者轻轻混合, 室温孵育 20min, HeLa 细胞用无血清 DMEM 洗 2 次, 然后加入 800 μ L 无血清 DMEM, 将转染液滴加其中, 混匀。37 $^{\circ}$ C, 50 ml/L CO₂ 孵箱培养 9h 后弃转染液, 换成含 10%胎牛血清的 DMEM 继续培养, pCMV-R-K-S-K 转染 2 孔, 同时设 pCMV 空载体转染 2 孔为对照。

1. 2. 4 间接免疫荧光检测: 转染 48h 后, 取出细胞爬片, 冷丙酮固定, 风干; 在转染 pCMV-R-K-S-K 及 pCMV 空载体的细胞上分别滴加 1:500 稀释的 anti-RANTES 或 anti-SDF-1, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, PBS 洗 3 次, 风干; 加入 1:100 稀释的荧光标记二抗, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, PBS 洗, 风干; 缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 PCR 反应的产物鉴定

扩增出的 RANTES-KDEL 片段大小约为 288bp, 与预期片段相符。

2.2 pCMV-R-K-S-K 融合表达载体的构建和鉴定

按图 1 方法获得了 pCMV-R-K-S-K 重组阳性克隆, 酶切鉴定可见经 *Bam*H I 切出 377、2044、4500bp 3 个片段, 经 *Sac*II 切出 6544bp 一个片段, 表明 RANTES-KDEL 已正确克隆入真核表达质粒 pCMV-S/K 中 (图 2)。测序结果进一步确证所构建的 pCMV-R-K-S-K 融合表达载体基因序列与已知

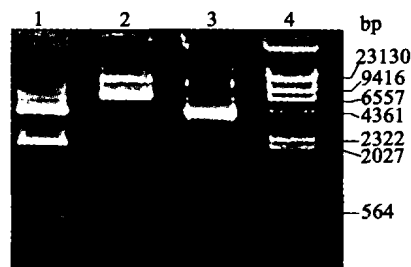


图 2 pCMV-R-K-S-K 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme identification of pCMV-R-K-S-K
1, Digestion of pCMV-R-K-S-K with *Bam*H I; 2, Digestion of pCMV-R-K-S-K with *Sac* II; 3, pCMV-R-K-S-K; 4, DNA Marker λ HindIII.

序列完全相符。

2.3 pCMV-R-K-S-K 转染 HeLa 细胞的荧光观察

转染融合表达载体 pCMV-R-K-S-K 的 2 组 HeLa 细胞分别滴加一抗羊抗人 RANTES 或羊抗人 SDF-1, 都可表达特异性黄绿色荧光, 荧光蛋白主要分布于胞质及核周; 转染空载体的细胞无论滴加何种一抗都未见特异性荧光表达 (见封 3 彩版图 3)。结果表明 HeLa 细胞成功表达了 HIV-1 辅受体的配体 RANTES 和 SDF-1。

3 讨论

HIV-1 病毒按所感染细胞的不同而分为嗜单核巨噬细胞 (嗜 M) 和嗜 T 淋巴细胞 (嗜 T) HIV-1 毒株。其中嗜 M HIV-1 毒株常见于血清转换后不久及处于 HIV 感染无症状期的患者; 嗜 T HIV-1 毒株多出现于感染晚期, 与进行性 CD4⁺细胞减少及疾病进展有关。近年研究表明, HIV 感染除需要病毒囊膜蛋白与靶细胞表面 CD4 分子结合之外, 还需要与相应的辅受体结合以最终导致病毒进入靶细胞^[2]。HIV-1 辅受体都是具有七次跨膜结构的 G 蛋白耦联受体, 合成于内质网, 然后被运送到细胞膜表面与其相应的配体结合或与 HIV 囊膜蛋白结合^[5]。嗜 M HIV-1 毒株主要利用 β 类趋化因子受体 CCR5 作为辅受体, CCR5 的配体是 RANTES; 嗜 T HIV-1 毒株主要使用 α 类趋化因子受体 CXCR4 作为辅受体, CXCR4 的配体是 SDF-1。

现已证实 CCR5 和 CXCR4 在 HIV-1 感染中至关重要, 经基因修饰的辅受体抗体能封闭新合成的 CCR5 或 CXCR4, 从而可以有效地抑制 HIV-1 感染靶细胞^[6,7]。近期研究发现转染 HIV-1 辅受体配基 SDF 或 RANTES/MIP 的淋巴细胞系能够抵抗或部分抵抗 T 细胞嗜性或巨噬细胞嗜性 HIV-1 感染^[4,8]。然而, 临床和实验研究表明, 单独抑制 CCR5 或 CXCR4 不足以完全阻止 HIV-1 感染和 AIDS 进展。分析原因可能是: 1). HIV-1 感染后进展为 AIDS 与病毒表型由 M 嗜性向 T 嗜性的转变有关, 而这种细胞嗜性变化的分子基础是病毒所利用的辅受体由 CCR5 发展为 CXCR4。HIV 对其辅受体有适应性, 对 CCR5 的抑制将会使病毒转而利用 T 嗜性辅受体 CXCR4, 从而促进病情进展^[9]。2). T 嗜性和 M 嗜性 HIV-1 病毒可能会共存于同一个感染者体内^[10]。3). 一些双嗜性的 HIV-1 病毒已发现, 能利用 CCR5 和 CXCR4 同时感染 T 淋巴细胞和单核-巨噬细胞^[11]。4). 有些病毒能绕过 CCR5 而直接以 CXCR4 为辅受

体而感染靶细胞,这也是为什么一些 CCR5 等位基因缺失的人仍然能够感染 HIV-1^[12]。

基于以上理论和实验基础,为了研究 HIV-1 辅受体的表型剔除对病毒感染的阻断作用,我们设计了 HIV-1 辅受体 CCR5 的配体 RANTES 和 CXCR4 的配体 SDF-1 的融合表达载体 pCMV-R-K-S-K,在 RANTES 和 SDF-1 基因片段后各加上一个 KDEL 序列,目的是使 pCMV-R-K-S-K 转染 HIV-1 易感细胞后 RANTES 和 SDF-1 能同时表达,并滞留于内质网,在内质网内结合、“扣押”新合成的 CCR5 和 CXCR4,阻止二者向细胞表面转运和表达,从而抑制 M 嗜性、T 嗜性及双嗜性 HIV-1 与靶细胞的融合和进入靶细胞。酶切和测序结果表明融合表达载体 pCMV-R-K-S-K 的构建是成功的。将融合表达载体 pCMV-R-K-S-K 转染 HeLa 细胞,间接免疫荧光检测发现, pCMV-R-K-S-K 被成功地转入 HeLa 细胞,并在胞浆、核周同时表达了 RANTES 和 SDF-1 蛋白。

上述研究表明我们已成功构建了 HIV-1 辅受体 CCR5、CXCR4 的配体 RANTES 和 SDF-1 的真核融合表达载体 pCMV-R-K-S-K,并证实 RANTES 和 SDF-1 可高效表达于 HeLa 细胞内,从而为进一步研究 HIV-1 辅受体表型剔除对病毒感染的阻断作用打下了坚实的基础。

参考文献

- [1] Richman D D. HIV Therapy [J]. Science, 1996, 272:1886-1887.
- [2] Feng Y, Broder C C, Kennedy P E, *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [J]. Science, 1996, 272 (5263): 872-877.
- [3] Liu R, Paxton W A, Choe S, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some mnuUply-exposed individuals to HIV-1 infection [J]. Cell, 1996, 9;86 (3): 267-377.
- [4] Yan A G, Bai X F, Huang X F, *et al.* Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR5 by intrakine as potential therapeutic approach for HIV-1 infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (21):11567-11572.
- [5] Baggiolini M, Dewald B, Moser B, Interleukin-8 and related Chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines [J]. Adv. Immunol, 1994, 55, 97-179.
- [6] McKnight A, Wilkinson D, Simmons G, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent [J]. J Virol, 1997, 71 (2):1692-1696.
- [7] Olson W C, Rabut G E, Nagashima K A, *et al.* Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5 [J]. J Virol, 1999, 73 (5):4145-4155.
- [8] Chen J D, Bei X F, Yang A G, *et al.* Inactivation of HIV-1 Chemokine receptor CXCR4 by a novel intrakine strategy [J]. Nature Medicine, 1997, 3 (10):1110-1116.
- [9] Mosier D E, Picchio G R, Gulizia R J, *et al.* Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection *in vivo* or rapidly select for CXCR4-using variants [J]. J virol, 1999, 73 (5):3544-3550.
- [10] Dittmar M T, McKnight A, Simmons G, *et al.* HIV-1 tropism and co-receptor use [J]. Nature, 1997, 6; 385 (6616): 495-6.
- [11] Biti R, French R, Young J, *et al.* HIV-1 infection in and individual homozygous for the CCR5 deletion allele [J]. Nat Med, 1997, 3 (3): 252-253.
- [12] Michael N L, Nelson J A, KewalRamani V N, *et al.* Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta 32 [J]. J Virol, 1998, 72 (7): 6040-6047.