

人单核细胞系中 HIV-1 前病毒转录调节新型研究模型的建立

李阳^{1,2} 谷丽君^{2,3} 张宇² 刘文军⁴ 严景华⁴ 高福⁴ 岩本愛吉^{2,5}
合田仁^{2,3} 石田尚臣^{2,3*}

(1. 安徽大学 生命科学院 安徽 合肥 230601)

(2. 中国科学院微生物研究所 中日联合实验室 北京 100101)

(3. Research Center for Asian Infectious Diseases, The Institute of Medical Science,
The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan)

(4. 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室 北京 100101)

(5. Division of Infectious Diseases, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science,
The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan)

摘要:【目的】抗反转录病毒疗法(ART)能够有效控制人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus-1, HIV-1)的复制,但是不能将其完全清除。至 2012 年底,全球仍有 3 500 万 HIV-1 感染者,同年约 160 万人死于艾滋病(Acquired immune deficiency syndrome, AIDS)及其相关疾病。HIV-1 感染难以根治的主要原因之一是机体内 HIV-1 潜伏储存库(Reservoir)的存在。HIV-1 潜伏储存库主要由 CD4⁺ T 细胞和单核巨噬细胞构成,与 CD4⁺ T 细胞相比,目前研究者对单核巨噬系细胞中 HIV-1 病毒复制机制尚不明瞭,且缺乏适宜的研究体系。因此,为探讨单核细胞活化或分化信号对 HIV-1 复制的影响,我们建立了旨在研究 HIV-1 前病毒转录调控机制的人单核巨噬细胞系模型。【方法】构建 *env* 区域移码突变和 *nef* 区域携带 EGFP 或 NanoLuc 报告基因的 HIV-1 NLnGFP-Kp 或 NLnNanoLuc-Kp 重组病毒,分别感染 2 种人单核细胞系 THP-1 或 U937 细胞。通过有限稀释法制备单克隆细胞系,利用流式细胞术或 NanoLuc 荧光素酶活性分析检测报告基因的表达。筛选 EGFP 或 NanoLuc 阴性表达的细胞克隆,经激活剂佛波酯(Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)刺激后鉴定潜伏感染的细胞克隆。【结果】研究中鉴定了 4 个 HIV-1 潜伏感染的细胞克隆。其中 2 个是表达 EGFP 的 THP-1 克隆,2 个是以 NanoLuc 为报告基因的 U937 克隆。这些克隆在 PMA 刺激处理后皆有报告基因的表达,而在恒态条件下未检测到报告基因的表达。【结论】成功建立了 4 个 HIV-1 潜伏感染的人单核细胞系克隆,该模型有助于理解单核巨噬系细胞的 HIV-1 病毒复制机制,可能成为进一步研究 HIV-1 前病毒转录调控机制的有力工具。

关键词: 人免疫缺陷病毒, 前病毒, 转录调控, 单核巨噬细胞, 细胞模型, 再活化

基金项目: 日本文部科学省“新生与再生传染性疾病研究基地项目”(No. 10005010)

*通讯作者: Tel: 81-3-6409-2206; Fax: 81-3-6409-2008; ✉: imoakat@ims.u-tokyo.ac.jp

收稿日期: 2014-05-23; 接受日期: 2014-06-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-29

Establishment of a model system for studying the transcriptional regulation mechanism of HIV-1 in latently infected human monocyte cell lines

LI Yang^{1,2} GU Li-Jun^{2,3} ZHANG Yu² LIU Wen-Jun⁴ YAN Jing-Hua⁴
GAO George Fu⁴ IWAMOTO Aikichi^{2,5} GOHDA Jin^{2,3} ISHIDA Takaomi^{2,3*}

(1. School of Life Sciences, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China)

(2. China-Japan Joint Laboratory of Molecular Immunology & Microbiology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(3. Research Center for Asian Infectious Diseases, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan)

(4. CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(5. Division of Infectious Diseases, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan)

Abstract: [Objective] With the use of anti-retroviral therapy (ART) for HIV-infected individuals, a greater control of viral replication is now possible. In 2012, however, more than 35 million people were living with HIV-1 and more than 1.6 million people died of AIDS or HIV-1 related diseases worldwide. One of the main reasons for difficulties in completely eradicating HIV-1 *in vivo* is the reservoir problem. Although the CD4⁺ T-cells and monocytes or macrophages are thought to be the reservoir of HIV-1 *in vivo*, the viral replication mechanism in monocytes or macrophages is yet to be studied, as compared with that of CD4⁺ T-cells, because of the lack of an appropriate system. Thus, to evaluate the effects of the activating or differentiating signals in monocytes on the replication of HIV-1, we attempted to establish the HIV-1 latently infected human monocyte cell lines. **[Methods]** We used two recombinant HIV-1 viruses, NLnGFP-Kp and NLnNanoLuc-Kp, which have a frame-shift mutation in the *env* region and have EGFP or NanoLuc gene, respectively, as a marker in the *nef* region. Two human monocyte lineage cell lines, THP-1 and U937 cells, were each infected with one of the two viruses. For cloning of the infected cells, the limiting dilution method was used and the expression levels of these marker genes were determined by flow cytometry or luciferase assay. From the cell clones not expressing either marker gene, we selected latently infected cell clones after stimulating them with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). **[Results]** We obtained four cell clones that were considered to be latently infected with HIV-1. Two of them from THP-1 had EGFP as a marker and two of them from U937 had NanoLuc as a marker. All these cell clones expressed their marker genes when stimulated with PMA but in the steady state condition of their cultures at an undetectable level. **[Conclusion]** We established four cell clones latently infected HIV-1 from human monocyte lineage cell lines. These cells can be a useful tool for a better understanding of the transcriptional regulation mechanisms in the HIV-1 replication.

Keywords: Human immunodeficiency virus (HIV), Provirus, Transcriptional regulation, Monocyte-macrophage, Cell model system, Reactivation

虽然高效联合抗反转录病毒治疗 (Anti-retroviral therapy, ART) 的应用和推广, 使得抗艾滋病毒治疗取得了良好的临床效果^[1], 但是根据世界卫生组织(WHO)和联合国艾滋病规划署的估计, 截止 2012 年底, 全球大约有 3 500 万 HIV

感染者, 同年约 160 万人死于 AIDS 及其相关疾病。HIV-1 感染难以根治的主要原因是 HIV-1 属于反转录病毒的一种, 具有特异性的生活周期, 常常发生病毒基因组整合进入宿主细胞基因组中, 整合后的病毒只要感染细胞不被彻底清除, 则持续存在于宿

主体内^[2]。

HIV-1 主要的靶细胞是 CD4⁺ T 细胞和单核巨噬细胞。细胞表面 CD4 分子是 HIV 的主要细胞受体, HIV-1 感染细胞同时需要宿主细胞表面的趋化因子受体 CCR5 或 CXCR4 作为协同受体^[3-5]。目前研究普遍认为 HIV-1 病毒感染活化的 CD4⁺ T 细胞和巨噬细胞后, 立即引起病毒的转录与翻译, 从而使病毒大量复制导致感染。但是少量细胞被感染后, 能够转化为静息(Resting)的 T 细胞和单核巨噬系细胞, 其细胞内前病毒转录受抑, 复制受阻^[6-8]。其中最主要的是静息记忆性 CD4⁺ T 细胞(Resting memory CD4⁺ T cells), 因其寿命长构成了机体最主要的 HIV-1 潜伏病毒储存库, 仅靠 ART 治疗不可能将其彻底清除。HIV-1 储存库是根除 HIV 感染的巨大障碍。因此, 研究 HIV-1 储存库的分子形成机制, 成为寻找高效、安全的激活前病毒的技术, 以及开发根除病毒的药物等的关键环节^[9-10]。若能重新安全地激活储存库中的未活化细胞, 诱导前病毒恢复复制能力及其基因表达, 使其再次成为抗病毒治疗的靶标, 以及通过细胞免疫系统识别表达抗原的靶细胞, 则可能将其完全清除。另外, 单核细胞是一种限制 HIV-1 感染的宿主细胞, 只有当单核细胞诱导分化为巨噬细胞后, HIV-1 才能表现出一定程度的复制性感染^[11]。但是目前对病毒基因表达抑制分化、和再活化的分子调控机制, 以及病毒复制的调节等不明点尚多。本研究依据单核细胞分化为巨噬细胞过程中各种细胞因子在细胞间的相互作用, 利用人单核细胞系建立前病毒转录受抑后再活化的模型细胞, 进行其分子机制的解析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂: CO₂ 培养箱, 日本 SANYO 公司; 离心机, 日本 TOMY 公司; PCR 仪(2720 Thermal Cycler), 美国 ABI 公司; BD FACSCalibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司; GLOMAX 96 微孔板发光检测仪(GLOMAX 96 microplate luminometer), 双荧光素酶报告基因检测系统(Dual-luciferase

Reporter Assay System), 美国 Promega 公司; 6 孔、12 孔、24 孔、96 孔细胞培养板及 6 cm 细胞培养皿, 美国 CORNING 公司; T25 细胞培养瓶, 美国 BD 公司; In-Fusion 基因克隆试剂盒(In-Fusion HD cloning kit), 日本 TaKaRa 公司; PMA 试剂(Phorbol-12-myristate-13-acetate), 美国 Sigma 公司; FBS 胎牛血清(Fetal bovine serum), 美国 Serum Source International 公司; RPMI1640、DMEM 培养基、PBS 缓冲液(Phosphate buffered saline), 美国 Gibco 公司; Lipofectamine2000 转染试剂, 美国 Invitrogen 公司; Herculase II fusion DNA polymerase, 日本 Agilent 公司。

1.1.2 实验材料: 本实验所用的 THP-1、U937 人单核细胞株及 HEK293FT 人胚肾细胞株由日本东京大学医科学研究所亚洲传染病研究基地提供。质粒 pNLnGFP-Kp 由日本德岛大学大学院足立昭夫教授惠赠^[12]。质粒 pVSVG-Rev 由日本东京大学大学院新领域创成科学研究科渡邊俊樹教授惠赠。质粒 pNanoluc 由东京大学医科学研究所亚洲传染病研究基地松田善衛教授惠赠。构建 pNLnNanoLuc 质粒所用 PCR 引物 pNL4-3 GFP Fw: 5'-GACCAATGACTTACAAGGCAGC-3'; pNL4-3 GFP Rv: 5'-ATGGATCCCTCGAGATACTGCT-3'; Luc-infusion Fw: 5'-TCTCGAGGGATCCATATGGTCTTCACACTCGAAGATTTCG-3', Luc-infusion Rv: 5'-TGTAAGTCATTGGTCTTACGCCAGAATGCGTTCGCACAG-3', 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2 细胞培养

THP-1 和 U937 细胞使用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, HEK293FT 细胞使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育。当培养的 THP-1 和 U937 细胞增殖至 7×10⁵ cells/mL 时, 以 1/10 的比率进行传代培养。

1.3 病毒载体构建

本研究采用 PCR 方法以 pNanoLuc 为模板扩增 NanoLuc cDNA, 其 50 μL 的 PCR 反应体系内包含

10 μL 的 5 \times Herculase II reaction buffer, 0.5 μL 的 25 mmol/L dNTPs, 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 Luc-infusion Fw 和 Luc-infusion Rv 引物, 1 μL (20 ng) 的 DNA 模板, 以及 0.5 μL 的 Herculase II fusion DNA polymerase。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。再以 pNLnGFP-Kp 为模板扩增报告基因载体, 其 50 μL 的 PCR 反应体系内包含 10 μL 的 5 \times Herculase II reaction buffer, 0.5 μL 的 25 mmol/L dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 pNL4-3 GFP Fw 和 pNL4-3 GFP Rv 引物, 1 μL (50 ng) 的 DNA 模板, 以及 0.5 μL 的 Herculase II fusion DNA polymerase。PCR 扩增条件为: 92 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 92 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 10 个循环; 92 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸不同时间, 20 个循环, 延伸时间从 7 min 开始每个循环增加 20 s; 68 $^{\circ}\text{C}$ 加强延伸 8 min。然后利用 In-Fusion HD cloning kit 将扩增的报告基因载体与扩增的 NanoLuc cDNA 连接, 成功构建 pNLnNanoLuc-Kp 病毒载体。

1.4 HIV-1 假病毒 Recombinant VSV-G 重组体的制备

将 1×10^6 cells 的 HEK293FT 细胞 5 mL 接种于 6 cm 培养皿, 孵育 24 h 后, 通过 Lipofectamine2000 试剂分别进行 pNLnGFP-Kp (5 μg) 和 pVSVG-Rev (1 μg)、pNLnNanoLuc (5 μg) 和 pVSVG-Rev (1 μg) 的共转染。24 h 更换培养液, 48 h 收集上清。180 \times g 离心 3 min 去除细胞碎片, 其收获的病毒上清液分装冻存于 -80°C 以备后续分析。

1.5 HIV-1 潜伏感染的单克隆细胞系的制备

将 5×10^5 cells 的 THP-1 细胞和 U937 细胞 2 mL 分别接种于 6 孔培养板, 分别添加 1 mL 收获的 EGFP 和 NanoLuc 假病毒悬液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h。通过 FACS 分析 EGFP 表达或 NanoLuc 荧光素酶活性检测证实细胞感染成功后, 调制 2.5 cells/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔加入 200 μL 。约 2–3 周后将出现的单克隆细胞系移至 24 孔板继续培养。再经 12 孔板、6 孔板扩增培养, 最终将增殖的克隆移至 T25 培养瓶中, 其中

一部分用于分析, 剩余细胞冻存于液氮中。

1.6 FACS 分析

用已建立的 THP-1 细胞克隆(5×10^5 cells)铺于 12 孔板, 添加 10 $\mu\text{g/L}$ PMA, 持续刺激 24 h。然后用细胞刮直接刮起贴壁细胞, 转移至流式管, 180 \times g 离心 3 min 收集细胞。然后用 1 mL 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 再用 0.5 mL 的 PBS 缓冲液重悬细胞, 通过 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测 EGFP 表达。

1.7 NanoLuc 荧光素酶活性检测

用已建立的 U937 细胞克隆(2.5×10^5 cells)接种于 24 孔板, 添加 10 $\mu\text{g/L}$ PMA, 培养 48 h。用 1 mL 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 向每一孔中加入 100 μL 的被动裂解液(Passive lysis buffer, Promega), 振摇 15 min 充分裂解细胞。应用双荧光素酶报告基因检测系统(Dual-luciferase Reporter Assay System), 以腔肠素(Coelenterazine)(Promega KK, Tokyo, Japan)为发光底物, 通过 GLOMAX 仪测定 5 μL 细胞裂解液中的 NanoLuc 荧光素酶活性。

1.8 数据分析

实验数据统计分析使用 Prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA), 采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的方式作图。FACS 分析采用 CellQuestTM Pro Software (BD)。

2 结果与分析

2.1 携带报告基因的 HIV-1 假病毒的构建

为简便、定量检测 HIV-1 感染单核细胞系中的前病毒转录活性, 本研究利用携带 EGFP 或 NanoLuc (Promega KK, Tokyo, Japan)为报告基因的 HIV-1 假病毒。源自 HIV-1 实验室株 NL432 的病毒载体 pNLnGFP-Kp 是 env 基因的编码区域内 Kpn I 限制酶切后, 经平端化处理产生移码突变, 使 ENV 蛋白质不能表达(图 1A)^[12]。而且, 以 EGFP 编码基因替换部分 nef 基因编码区, 通过测定 EGFP 表达确证感染后转录活性。然后, 再用 NanoLuc 基因(由源自 Oplophorus gracillrostris 的 Luciferase 改良所得)^[13]完全代替 pNLnGFP-Kp 携带的 EGFP 基因, 成功构建 pNLnNanoLuc-Kp (图 1B)。

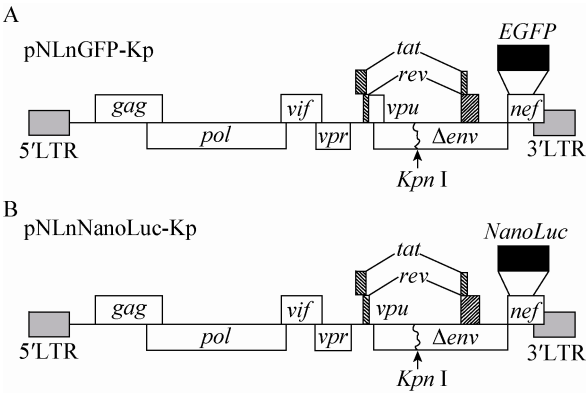


图1 pNLnGFP-Kp (A)和 pNLnNanoLuc-Kp (B) HIV-1 载体结构示意图

Figure 1 Schematic structure of HIV-1 vectors designated pNLnGFP-Kp (A) and pNLnNanoLuc (B)

注：2 种 HIV-1 载体均在 *env* 基因内部 *Kpn* I 位点存在移码突变^[12]。pNLnGFP-Kp 中 HIV-1 部分 *nef* 基因被替换为 *EGFP* 基因。pNLnNanoLuc-Kp 中则以 *NanoLuc* 基因替代了 *EGFP* 基因。

Note: Both of the clones have a frame-shift mutation at the *Kpn* I site in the *env* gene^[12]. In the pNLnGFP-Kp, the partial region of HIV-1 *nef* gene was replaced with an *EGFP* gene as indicated. The pNLnNanoLuc has a *NanoLuc* gene, instead of an *EGFP* gene.

2.2 假病毒的制备及感染鉴定

pNLnGFP-Kp 与疱疹性口腔炎病毒糖蛋白 (Vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G)表达载体共转染,经 HEK293FT 细胞包装成具备高感染活性的 VSV-G 重组假病毒,感染人单核细胞系 THP-1 细胞,24 h 后通过 FACS 检测 EGFP 表达,计算感染细胞的比例。发现 20.1%的 THP-1 细胞呈 EGFP 阳性,提示制备的该病毒有感染效率,足够用于以后的潜伏感染细胞克隆化。另外,利用 pNLnNanoLuc-Kp 相同方法制备 VSV-G 重组假病

毒,感染人单核细胞系 U937 细胞,48 h 后测定 NanoLuc 荧光素酶活性,证实感染细胞的 NanoLuc 荧光素酶活性是非感染细胞的 9.79×10^4 倍。

2.3 细胞克隆的建立及报告基因表达的解析

通过有限稀释法建立感染细胞克隆,THP-1 细胞收获 40 个克隆,U937 细胞收获 81 个克隆(表 1)。然后检测每个克隆的报告基因的表达水平,FACS 分析显示在 THP-1 细胞中 EGFP 阳性表达的克隆 31 个,几乎无 EGFP 表达的阴性克隆 9 个。而 U937 细胞证实有 NanoLuc 荧光素酶活性的阳性克隆 37 个,没有 NanoLuc 荧光素酶活性的阴性克隆 44 个。

2.4 PMA 刺激诱导报告基因表达

研究认为报告基因阴性表达的克隆可能是:(1)未感染细胞;(2)某种原因致病毒基因组整合进入宿主基因组中而不能活化;(3)正常状态下病毒基因未活化,一旦适当刺激下病毒即发生再活化。采用 PKC 激活剂 PMA 刺激 THP-1 和 U937 细胞,诱导分化为巨噬细胞的同时^[14-15],潜伏的 HIV-1 前病毒被高效诱导重新激活^[16]。因此,对报告基因阴性表达的克隆实施了 PMA 刺激,鉴定其能否诱导出报告基因表达。FACS 分析发现 2 个 EGFP 阴性 THP-1 细胞克隆在 PMA 持续刺激 24 h 后,显示出显著的 EGFP 表达激活(表 1、图 2)。

另外还发现 2 个 NanoLuc 荧光素酶阴性 U937 细胞克隆经 PMA 持续刺激 48 h 后,NanoLuc 荧光素酶活性上升,其中 1 克隆显著增强(表 1、图 3)。因此,收获的 4 个克隆在没有激活剂存在的情况下,

表 1 细胞克隆中报告基因的表达					
Table 1 Marker gene expression in clonal cells					
细胞系	克隆数	报告基因表达		PMA 活化	
Cell line	Total clone number	Expression of a marker gene		Reactivation by PMA	
THP-1	40	EGFP (+)	31		
		EGFP (–)	9	EGFP (+)	2
				EGFP (–)	7
U937	81	NanoLuc (+)	37		
		NanoLuc (–)	44	NanoLuc (+)	2
				NanoLuc (–)	24
				Not tested	18

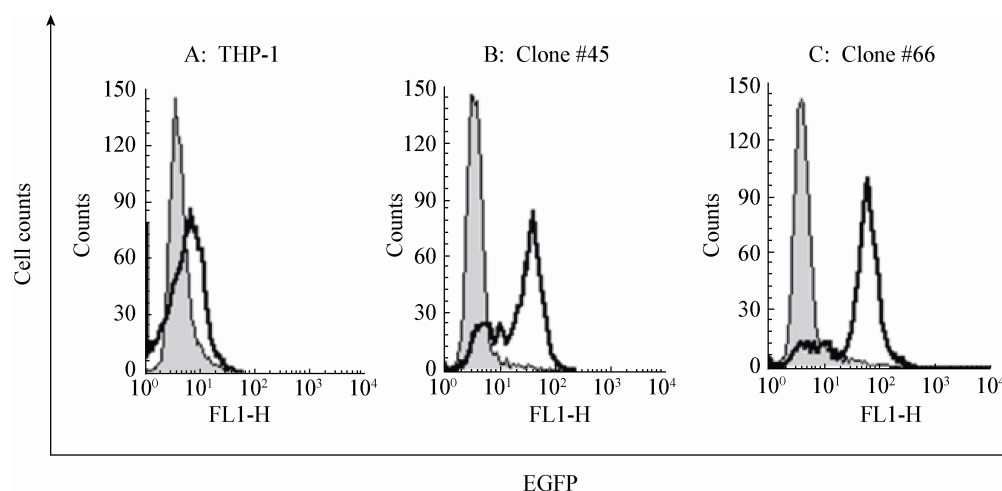


图2 感染 NLnGFP-Kp 的 THP-1 细胞克隆通过 PMA 刺激诱导 EGFP 表达

Figure 2 Induction of EGFP by PMA stimulation in THP-1 cells and NLnGFP-Kp infected clones

注：经 10 μ g/L PMA 刺激 24 h 或未刺激的 THP-1 细胞(A)、2 个候选潜伏感染克隆#45 (B)和#66 (C)，通过流式细胞术测定其 EGFP 表达水平。灰色区与空白区图分别表示未予 PMA 刺激和予以 PMA 刺激的细胞。

Note: Parental THP-1 cells (A) and two candidate clones for latent infection, clone #45 (B) and #66 (C), were stimulated for 24 h with or without 10 μ g/L of PMA. EGFP expression levels in the cells were analyzed by flow cytometry. Grey and blank histograms represent the cells stimulated cultured in the absence and presence of PMA, respectively.

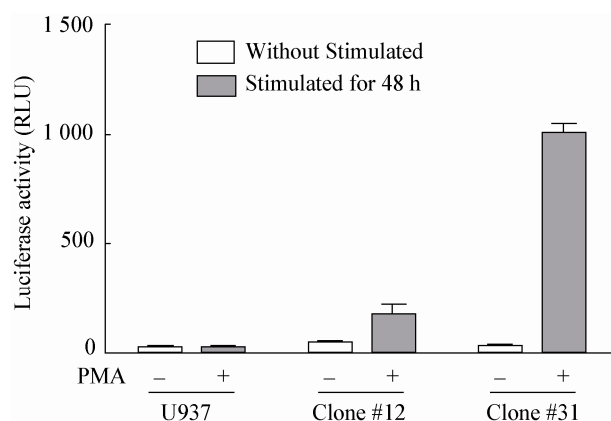


图3 感染 NLnNanoLuc-Kp 的 U937 细胞克隆通过 PMA 刺激诱导 NanoLuc 表达

Figure 3 Induction of NanoLuc by PMA stimulation in U937 cells and NLnNanoLuc-Kp infected clones

注：经 10 μ g/L PMA 刺激 48 h (灰色)或未刺激(空白)的 U937 细胞、2 个候选潜伏感染克隆#12 和#31 的荧光素酶活性。NanoLuc 活性以腔肠素为底物通过荧光素酶活性分析测定。

Note: Parental U937 cells and two candidate latent infected clones, clone #12 and #31, were stimulated for 48 h with (grey) or without (blank) 10 μ g/L of PMA. The activity of NanoLuc was measured by a luciferase assay with coelenterazine as substrate.

病毒基因的转录活性是受抑沉默的。PMA 刺激激活了潜伏的 HIV-1 前病毒基因组中的报告基因表达。表明已成功地建立了用于解析人单核细胞系中 HIV-1 前病毒再活化机制的细胞模型。

3 讨论

造血干细胞在骨髓中分化为髓系前体细胞后，发育成为单核细胞释放至外周血中，在外周血中可分化成树突状细胞或者巨噬细胞。树突状细胞或者巨噬细胞是机体首先识别病原体入侵的细胞，以吞噬作用消化病原体后，释放出多种细胞因子产生炎症反应，继而分泌趋化因子。并通过 MHCII 分子将相应抗原呈递给 CD4⁺ T 细胞，激活启动免疫反应。

目前 HIV-1 感染机体后淋巴细胞如何变化进展尚不完全明了，多数研究认为外周血中公认靶细胞的前病毒量，即使血中病毒量超过 10 000 copies/mL，CD4⁺ T 细胞数只有 0.01%–0.001% (1 细胞/10⁴ 细胞–1 细胞/10⁵ 细胞)，单核细胞数为 0.1%–1%

(1 细胞/ 10^2 细胞–1 细胞/ 10^4 细胞)^[7-8]。HIV-1 感染 CD4⁺ T 细胞后, 某些细胞能转化为静息细胞, 病毒的转录与翻译受抑、复制受阻, 保持潜伏感染状态^[11]。研究还发现 HIV-1 感染单核细胞后, 在外周血中向巨噬细胞或树突状细胞分化, 成为病毒复制细胞, 导致感染^[17], 但某些单核细胞也与 CD4⁺ T 细胞类似, 成为潜伏储存库细胞, 抑制病毒复制^[11]。CD4⁺ T 细胞从静息到再活化时, 潜伏病毒大量复制, 病毒量迅速反弹^[11]。迄今诸多研究报道了 T 细胞中潜伏感染的转录调控机制、病毒基因表达调节机制及潜伏感染清除策略^[9-10], 而有关单核细胞或者分化后的巨噬细胞或树突状细胞中 HIV-1 前病毒的复制转录调控机制、基因表达调节则知之甚少。

本研究建立了 2 个 THP-1 细胞克隆、2 个 U937 细胞克隆的人单核细胞系模型, 为揭示单核巨噬细胞分化诱导相关的细胞因子在 HIV-1 病毒复制和转录调控分子机制中的作用, 提供了有力的研究工具。来源于 U937 细胞的 HIV-1 慢性感染 U1 细胞和来源于 HL-60 细胞的 HIV-1 慢性感染 OM10.1 细胞被认为是 HIV-1 感染单核细胞模型^[18-19], 但是诱导前病毒使之重新激活, 产生子代病毒的研究必须在 BSL3 级实验室进行; 而且检测 p24 等病毒抗原, 还需要高成本的 ELISA 等试剂。此外, 转录调控机制的分析要求利用 Real-time PCR 等方法进行 mRNA 定量, 实验操作复杂且花费时间。而本研究建立的模型细胞不产生病毒, 不必在 BSL3 级实验室操作。由于采用的是监控转录水平常用的 NanoLuc 报告基因系统, 可以简单地进行 NanoLuc 荧光素酶活性定量分析, EGFP 报告基因也能够通过荧光显微镜和 FACS 流式细胞仪实施定性和定量分析。本研究所用细胞除 *env* 和 *nef* 外的所有 HIV-1 基因均为野生型, 可以用于分析病毒基因产物对细胞功能的影响, 特别是对寻找活化所必需的病毒因子, 阐明其分子机制具有重要意义。而且, 通过宿主基因库等鉴定与病毒基因表达抑制相关的因素及再活化必需的基因等成为可能。

外周血中的单核巨噬细胞是机体感知与识别

外源病原体入侵的第一道免疫防线, HIV-1 感染也会导致单核巨噬细胞功能损害。模型研究希望 HIV-1 的各种基因能正常表达, 但是迄今许多研究报道的利用 LTR-GFP-LTR 的 HIV-1 模型, 它虽然可以分析 T 淋巴细胞潜伏感染再活化机制^[20], 但是在阐明再活化分子机制时, 未能考虑病毒基因的功能。而本研究建立的细胞模型在进行各种实验时, 与上述模型相比虽然存在 *env* 和 *nef* 病毒基因缺失的问题, 但是所拥有的其他病毒基因群依然能发挥各自功能, 因此可以认为是一种病毒基因功能研究可行性较高的细胞模型, 其应用价值值得期待。

本研究采用 EGFP 或者 NanoLuc 报告基因的重组病毒, 建立了研究 HIV-1 前病毒转录调节的人单核细胞系模型, 并且在多个克隆均可诱导报告基因的 stable 表达(表 1)。各克隆表达报告基因的细胞比例存在差异, 表达水平也各有不同, 表明该细胞模型能够充分评估、解析巨噬细胞分化、功能调控相关的细胞因子对 HIV-1 转录的影响。

今后, 利用该细胞模型阐明与单核细胞系的分化调节相关的各种细胞因子对 HIV-1 转录调控机制中的功能同时, 将更加深入地研究 HIV-1 感染中的单核细胞系激活机制, 了解其信号通路, 发现与之相关的宿主因子。

4 结论

为探讨单核细胞向巨噬细胞分化过程中各种细胞因子在细胞之间的相互作用, 揭示转录受抑的前病毒再活化的分子机制, 本研究成功建立了 HIV-1 潜伏感染人单核细胞系的模型系统。该模型在维持大部分的病毒基因表达的同时, 不需要 BSL3 级实验室就能够定量检测与监控前病毒的转录调节过程; 另一方面, 它们不仅可通过分化调节相关的细胞因子和细胞间相互作用, 分析 HIV-1 前病毒的转录调控机制, 也为深入了解 HIV-1 感染中未活化的单核细胞系再活化的分子机制, 寻找与转录调控相关的宿主因子, 提供了良好的解析工具, 其应用价值值得期待。

参考文献

- [1] Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy[J]. The New England Journal of Medicine, 1997, 337(11): 734-739
- [2] Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(24): 13193-13197
- [3] Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV[J]. Nature, 1984, 312(5996): 767-768
- [4] Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus[J]. Nature, 1984, 312(5996): 763-767
- [5] Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1[J]. Science, 1996, 272(5270): 1955-1958
- [6] Chun T, Davey RT, Ostrowski M, et al. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy[J]. Nature Medicine, 2000, 6(7): 757-761
- [7] Zhu T, Muthui D, Holte S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication *in vivo* in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy[J]. Journal of Virology, 2002, 76(2): 707-716
- [8] Lambotte O, Taoufik Y, De Goer MG, et al. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy[J]. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2000, 23(2): 114-119
- [9] Sgarbanti M, Battistini A. Therapeutics for HIV-1 reactivation from latency[J]. Current Opinion in Virology, 2013, 3(4): 394-401
- [10] Siliciano JD, Siliciano RF. HIV-1 eradication strategies: design and assessment[J]. Current Opinion in HIV and AIDS, 2013, 8(4): 318-325
- [11] Sharova N, Swingler C, Sharkey M, et al. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans[J]. The EMBO Journal, 2005, 24(13): 2481-2489
- [12] Fukumori T, Akari H, Yoshida A, et al. Regulation of cell cycle and apoptosis by human immunodeficiency virus type 1 Vpr[J]. Microbes and Infection, 2000, 2(9): 1011-1017
- [13] Inoue S, Watanabe K, Nakamura H, et al. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase[J]. FEBS Letters, 2000, 481(1): 19-25
- [14] Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester[J]. Cancer Research, 1982, 42(4): 1530-1536
- [15] Minta JO, Pambrun L. *In vitro* induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbolmyristateacetate[J]. American Journal of Pathology, 1985, 119(1): 111-126
- [16] Kaufman JD, Valandra G, Roderiquez G, et al. Phorbol ester enhances human immunodeficiency virus-promoted gene expression and acts on a repeated 10-base-pair functional enhancer element[J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(10): 3759-3766
- [17] Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update[J]. Retrovirology, 2013, 10(1): 67
- [18] Folks TM, Justement J, Kinter A, et al. Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line[J]. Science, 1987, 238(4828): 800-802
- [19] Butera ST, Perez VL, Wu BY, et al. Oscillation of the human immunodeficiency virus surface receptor is regulated by the state of activation in a CD41 cell model of chronic infection[J]. Journal of Virology, 1991, 65(9): 4645-4653
- [20] Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells *in vitro*[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(8): 1868-1877