

· 学术探讨 ·

HIV 假病毒模型优化及其在中医药防治
艾滋病研究中的应用探讨

刘 真 邓博文 李承乘 张清燕 桑 锋 王丹妮 段晨晨 李 强

摘要 中医药治疗艾滋病有一定疗效,但亟需研究其作用机制,因此建立稳定可靠模型尤为必要。HIV 假病毒安全性高、稳定性强,筛选优势毒株构建假病毒感染细胞模型研究中药作用机制可行可信。假病毒模型已应用于体外药物筛选、中和抗体检测、表型耐药检验系统、宿主与病毒相互作用等研究方面。笔者在分析中药作用特点及中药研究手段的基础上,提出筛选优势毒株、优化病毒制备和感染过程可构建稳定可靠的假病毒感染细胞模型,并且可应用于中药多靶点的机制探讨及网络药理学活性中药筛选等,以期为更好地开展中医药防治艾滋病临床基础研究提供借鉴。

关键词 人类免疫缺陷病毒假病毒;中医药;艾滋病;应用

Optimization of HIV Pseudovirus Model and Its Application in the Study of Chinese Medicine in the Prevention and Treatment of AIDS LIU Zhen, DENG Bo-wen, LI Cheng-cheng, ZHANG Qing-yan, SANG Feng, WANG Dan-ni, DUAN Chen-chen, and Li Qiang *Key Laboratory of Viral Disease Prevention and Treatment of TCM of Henan Province, Department of Acquired Immune Deficiency Syndrome Treatment and Research Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou (450000)*

ABSTRACT Chinese medicine (CM) has a definite effect on acquired immune deficiency syndrome (AIDS), and it is urgent to study its mechanism. Therefore, it is particularly necessary to establish a stable and reliable model. HIV pseudoviruses are characterized by high safety and stability, it is feasible and credible to screen dominant strains to construct pseudovirus infection cell model and study the mechanism of CM. Pseudoviruses have been applied in drug screening, neutralizing antibody detection, phenotypic resistance testing system, host-virus interaction and so on. Based on the analysis of the characteristics and the research methods of CM, the authors proposed that a stable and reliable pseudovirus infection cell model can be constructed by screening dominant strains and optimizing the process of virus preparation and infection. The pseudovirus infection cell model can be used to explore the mechanism of multi-target of CM and network pharmacological activity of CM screening, so as to provide a reference for better clinical basic research of CM in prevention and treatment of AIDS.

KEYWORDS human immunodeficiency virus Pseudovirus; Chinese medicine; acquired immune deficiency syndrome; application

艾滋病即获得性免疫缺陷综合征 (acquired

immune deficiency syndrome, AIDS), 是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染引起的以 T 淋巴细胞功能缺陷为主的一种免疫缺陷病^[1]。据估计,截至 2019 年 10 月底,全国报告存活感染者 95.8 万,传播途径以性传播为主,静脉吸毒和母婴传播得到有效控制,经输血传播基本阻断^[2]。目前, AIDS 治疗药物以高效联合抗反转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 为主,但药品种类有限,不良反应大,患者依从性差。中医药治疗 AIDS 疗效肯定且作用特点多靶点,在增强免疫、改善症状等方面均取得较好效果^[3],但具体作用机制不明。合适的研究模型是开展宿主与病毒相

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82004207); 河南省科技攻关计划 (No. 202102310178); 河南省青年科学基金资助项目 (No. 202300410255); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研专项 (No. 2019JDZX2047, No. 2021JDZY076, No. 2021JDZY080, No. 2018JDZX066); 河南省中医药治疗艾滋病研究专项课题 (No. 2019AZB003); 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室开放基金 (No. SBDSYY2021-001, SBDSYY2021-002)

作者单位: 河南中医药大学第一附属医院艾滋病临床研究中心, 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室 (郑州 450000)

通讯作者: 李 强, Tel: 0371-66251224, E-mail: strongmz@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20220831.241

互作用及药物机制研究的关键,大众化、易复制的 AIDS 模型的缺乏是 AIDS 基础研究的一大瓶颈^[4]。

HIV 假病毒构建基于骨架质粒(删除或修饰 HIV 中具有侵染能力的基因)与包膜蛋白质共转染包装细胞,包膜蛋白随着病毒颗粒出芽组装到新的病毒核心表面,形成具有侵染性的假病毒。假病毒侵染宿主细胞后由于基因组的不完整,无法形成新的病毒颗粒,只有一次感染能力,因此实验安全性较高,使用 HIV 假病毒代替活毒进行研究具有非常大的优势^[5]。基于系统进化树筛选优势毒株可以构建稳定可信的假病毒感染细胞模型并可在检测系统中得到验证,且能应用于中药调节 AIDS 机制研究中,进而开发抗 AIDS 中药新药。

1 假病毒感染细胞模型的构建与验证

HIV 假病毒主要分为 3 种类型:(1) HIV ENV/ HIV^{Δenv} 型假病毒,包膜质粒编码 HIV 包膜蛋白 envelope 基因(envelope gene),骨架质粒为缺失 ENV 蛋白(envelope protein)的骨架区序列。(2) 水泡性口膜炎病毒 G (vesicular stomatitis virus G, VSV-G)/HIV^{Δenv} 是将 VSV-G 的包膜糖蛋白质粒与 HIV 骨架质粒共转染获得假病毒。(3) HIV ENV/ 莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, MMLV)型假病毒利用 MMLV 包装细胞系构建 HIV 假病毒,其中以 ENV/HIV^{Δenv} 型假病毒应用最广^[6]。HIV 病毒感染细胞需要依赖于 CD4 受体以及辅助受体 CCR5/CXCR4 (CC-chemokine receptor 5 / C-X-C-motif chemokine receptor 4),可感染人原代 T 淋巴细胞、巨噬细胞,也可以感染改造细胞系^[7]。Hela 细胞系克隆株 TZM-bl 细胞为表达 CD4、CXCR4 和 CCR5 的 Hela 细胞系,细胞内含转录反式激活因子(trans-activator of transcription, Tat)调控荧光素酶和 β-半乳糖苷酶基因,细胞一旦被 HIV 感染,Tat 转录激活使得报告基因活化表达^[8]。人 T 细胞白血病细胞 MT-4 和 Hela 衍生细胞 MAGI-CCR5 细胞不含报告基因,常用于含绿色荧光蛋白或荧光素酶报告基因假病毒质粒的感染^[9, 10]。通过病毒基因组报告基因扩增、病毒 P24 抗原等检测系统来验证模型,报告基因系统相对 P24 检测灵敏度高,用荧光酶基因(luciferase gene, Luc)发光检测试剂盒或流式检测增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)表达等反映细胞中病毒活性^[11]。筛选优势毒株、优化病毒制备及感染过程可构建稳定可靠的假病毒感染细胞模型。

1.1 优势毒株 envelope 包膜质粒制备 分子流

行病学研究发现,HIV 病毒序列的差异与感染途径密切相关^[12]。HIV 病毒在机体内是一个准种,单基因组扩增(single-genome amplification, SGA)不同感染途径 HIV 感染者 envelope 基因,测序后 Gene Cutter 比对序列并用 MEGA 6.0 Neighbor-Joining Tree 构建进化树,结合 HIV Database 数据库中 envelope 基因序列,筛选优势毒株,与骨架质粒共转染包装细胞 293T 制备优势假病毒。SGA 最佳稀释度是将 cDNA 按照一定稀释倍数进行稀释,每个稀释度做 12 个平行巢式 PCR,当某个稀释度下的膜蛋白基因阳性孔为 30% 左右时,即为最佳稀释度,此稀释度下理论上每个 PCR 反应孔内仅有 1 条 cDNA 序列^[13]。筛选优势病毒株可以构建优势假病毒感染的细胞模型,进而探索药物作用机制。

1.2 HIV 假病毒感染细胞模型的构建 HIV 假病毒骨架质粒与 envelope 包膜质粒转染比例、质粒与转染试剂比例、假病毒收获时间均对假病毒包装滴度产生影响。HIV 包膜蛋白 envelope 质粒和 envelope 基因缺失的骨架质粒 pSG3^{Δenv} 在大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中扩增,两质粒提取后共转染 293T 细胞,转染用 Lipofectamine 2000 试剂盒采用脂质体法进行转染,其在细胞组装成病毒颗粒并分泌至上清中,收集假病毒并检测病毒活性,检测不同条件下制备假病毒的半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose, TCID₅₀),优化假病毒制备过程。假病毒感染细胞模型的构建是适宜滴度的假病毒感染宿主细胞的过程,感染过程影响因素有假病毒接种剂量、感染细胞数量及二乙氨基葡聚糖(DEAE-dextran)浓度等,优化感染条件构建优势假病毒感染的细胞模型。基于检测 HIV 保守蛋白 P24 表达水平、质粒或者宿主细胞上报告基因检测荧光素酶报告基因、绿色荧光蛋白及 β-半乳糖苷酶等多方面验证模型稳定性和可靠性^[14]。

本研究团队依托课题建立了重组质粒 PLAI(含有 HIV 骨架蛋白基因)和重组质粒 JRFL(含有 HIV 包膜基因)共转染 293T 细胞后合成 HIV ENV/ HIV^{Δenv} 类假病毒的技术平台,假病毒制备感染 MAGI-CCR5 细胞,通过 Luc 荧光素酶报告基因水平检测揭示复方法毒颗粒、单味药及组方体外抗病毒的作用。课题组拟利用假病毒平台探讨中药益艾康对 AIDS 患者中和抗体活性作用,并且优化假病毒感染人 T 淋巴细胞模拟体内病毒感染宿主细胞病理过程,进而研究中药益艾康调控 T 细胞免疫应答的作用机制。

2 假病毒模型在 HIV/AIDS 研究中的应用实践

假病毒研究起始于逆转录病毒载体的应用,是伴随重组病毒和哺乳动物细胞蛋白表达技术的提高而发展。由于 HIV 假病毒宿主嗜性广、稳定性强,并具有活病毒某些重要特性,已广泛应用于 AIDS 基础研究中^[15]。

2.1 假病毒在体外药物筛选中的应用 殷淑文^[16]利用单轮感染的假病毒实验证实三叶苷具有广谱抗 HIV-1 活性,且具有较低的细胞毒性,进一步研究其作用机制证明三叶苷可能是特异地靶向 gp41 的 N 末端重复序列区域从而抑制病毒进入。高丽娜^[17]构建假病毒感染模型并对 8 种藏药乙醇提取物的体外抗病毒活性进行筛选,结果显示,木藤蓼、野棉花、黑心虎耳草、柳兰与西北沼萎陵菜具有剂量依赖性的抗病毒作用。

2.2 假病毒在中和抗体研究中的应用 Liu LX 等^[18]筛选出具有广谱中和作用的 AID Shuanz 血浆,为探寻广谱中和作用抗原及设计免疫优势表位提供依据。陈敏等^[19]利用假病毒中和实验对云南省 142 例 AIDS 感染长期不进展者的病毒学和中和活性抗体进行分析,研究发现长期不进展者中 HIV-1 基因型复杂,存在不同活性的特异性中和抗体,血浆病毒载量水平与中和反应的宽度和强度密切相关

2.3 假病毒在病毒与宿主细胞相互作用研究中的应用 假病毒是利用基因工程技术整合的膜蛋白或衣壳蛋白,通过基因操作手段修饰某些基因或蛋白特性,以此研究宿主细胞与病毒间相互作用,为病毒感染宿主细胞寻找特定作用靶位提供方便可靠的研究方法。如以假病毒系统为基础,采用点突变技术对 HIV envelope 上的糖基化位点分别进行改造,分析糖基化位点对病毒的感染性、病毒颗粒的产生以及中和特性的影响^[20]。

2.4 表型耐药性检测系统中的应用 以重组假病毒为基础,将耐药性不同的 HIV-1 毒株约 1.5 kb 的耐药基因片段克隆到骨架载体相应位置,构建假病毒表型耐药检测系统。假病毒表型耐药检测系统结合传统表型和基因型耐药性检测方法的优点,可对 HIV 耐药性进行全面、具体的解释^[21]。

3 假病毒模型在中医药防治 AIDS 的研究应用前景探讨

中医药防治 AIDS 临床和基础研究不断深入,越来越多中药在临床上推广使用,假病毒模型在中医药防治 AIDS 机制探讨或筛选活性中药等方面有广阔应用前景,主要包括以下几个方面。

3.1 应用于中药多靶点机制探讨 中药复方作用机制复杂,在分子水平上,中药复方强调多组分多

靶点协同作用。益艾康胶囊为河南省中医药防治艾滋病 AIDS 项目试点药物,可提高患者的生活质量,增强患者免疫功能,预防和减少机会性感染的发生^[22]。艾可清胶囊是广州中医药大学热带医学研究所在长期临床实践和实验研究的基础上研制而成的胶囊制剂,临床研究显示其能够提高 HIV/AIDS 者的免疫功能,改善临床症状和提高生活质量^[23]。扶正抗毒胶囊和康爱保生胶囊经云南省食品药品监督管理局批准,是用于云南省中医药治疗艾滋病试点项目药物,具有解毒清热、活血祛湿、养阴益气之功效^[24]。由此可见,中医药治疗 AIDS 可改善患者临床症状并提高其生活质量,但其确切证据及作用机制有待进一步研究。HIV 假病毒感染细胞模型稳定性强、易复制,普通 2 级生物安全实验室即可开展,基于假病毒感染细胞模型可以从不同作用途径探讨中药作用机制,为中药临床推广使用提供现代医学证据。

3.2 结合网络药理学筛选活性中药 网络药理学可以对特定的疾病网络进行相应网络分析,寻找网络中所有可能受到药物干预的关键靶点,探索该类靶点对整体网络的影响。同时可对筛选所得靶点进行网络功能分析,阐明药物之间以及有效成分与疾病靶点间的相互作用机制^[25]。基于网络药理学筛选的中药有效成分或药物作用靶点需进行验证,体内验证耗时长、代价高,且易受其他因素干扰,利用 HIV 假病毒模型验证药物有效成分及作用靶点可行可信。

3.3 利用优势病毒株探讨药物作用机理 目前获得国家新药临床批件并进行临床应用的治疗 AIDS 的中成药仅唐草片一种,其他运用于 AIDS 中医药临床研究及治疗的药物多为院内制剂、区域性用药、配方颗粒、个人验方。因此筛选优势病毒株可以构建优势假病毒感染的细胞模型,探索某种亚型病毒或某地区优势病毒致病机制、宿主针对病毒的免疫反应,进而明确药物作用机制推广药物临床使用。

4 展望

随着中医药防治 AIDS 基础和临床研究的深入,越来越多中药在临床上推广使用,其可改善患者临床症状并提高其生活质量,但其作用机制亟需探讨。在病毒学研究中,假病毒作为一种安全有效的研究手段,尤其对于高致病性病毒研究发挥了极其重要作用,基于 HIV 假病毒模型的研究越来越受到研究者青睐。笔者认为,构建优势毒株假病毒感染细胞模型可为中药多靶点多途径的作用机制研究提供稳定可靠的技术平台,为 AIDS 中药的临床推广使用提供参考现

代医学证据。

参 考 文 献

- [1] Gómez-Mora E, Massanella M, García E, et al. Elevated humoral response to cytomegalovirus in HIV-infected individuals with poor CD4⁺ T-cell immune recovery[J]. PLoS ONE, 2017, 12 (9): e0184433.
- [2] 国家卫健委疾控局. 我国报告存活感染者 95.8 万 艾滋病疫情处于低流行水平[EB/OL]. [2019-12-01]. <https://news.china.com/domesticgd/10000159/20191201/37484807.html>.
- [3] 许前磊, 许二平, 谢世平, 等. 艾滋病中药治疗现状分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (20): 105-111.
- [4] 易智华, 周聪发, 何雪莹, 等. 人类免疫缺陷病毒动物模型在相关神经病变的研究应用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34 (4): 445-449.
- [5] Anke S, Anja G, Martina F, et al. Validation of an automated system for aliquoting of HIV-1 Env-pseudotyped virus stocks[J]. PLoS ONE, 2018, 13 (1): e0190669.
- [6] Nie J, Huang W, Liu Q, et al. HIV-1 pseudoviruses constructed in China regulatory laboratory[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 9 (1): 32-41.
- [7] 唐成润. HIV-1env/HIV-1^{Δenv} 假病毒筛选药物体系的建立及化合物 WYM-17 和 WYM-25 体外抗 HIV-1 活性研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- [8] Sarzotti-Kelsoe M, Bailer RT, Turk E, et al. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1[J]. J Immunol Methods, 2014, 409: 131-146.
- [9] Zhao H, Prosser AR, Liotta DC, et al. Discovery of novel N-aryl piperazine CXCR4 antagonists[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25 (21): 4950-4955.
- [10] Fernandez MV, Delviks-Frankenberry KA, Scheiblin DA, et al. Authentication analysis of MT-4 cells distributed by the National Institutes of Health AIDS Reagent Program[J]. J Virol, 2019, 93 (24): e01390-19.
- [11] 黄芳. 用于评价中和抗体广谱性的 HIV-1 假病毒系统的构建[D]. 福建: 厦门大学, 2019.
- [12] 金艳涛, 郭会军, 姜枫, 等. 中国 HIV-1 基因亚型分布文献分析[J]. 卫生研究, 2011, 40 (5): 645-648.
- [13] 张岱, 邹森, 郝金娟, 等. 具有广谱中和活性的 HIV 感染者血浆病毒膜蛋白基因及中和特征分析[J]. 中国热带医学, 2018, 18 (5): 418-422.
- [14] 陈丹璞, 李蕊, 张玥, 等. HIV-1 假病毒包装及感染条件优化[J]. 检验医学与临床, 2017, 14 (15): 2172-2174.
- [15] 庞灿. 假病毒的应用及其动物模型的研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2020, 43 (3): 136-143.
- [16] 殷淑文. 靶向 HIV-1gp41 跨膜糖蛋白的小分子进入抑制剂三叶苷的作用及机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [17] 高丽娜. 藏药提取物体外抗 HIV-1 活性研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2017.
- [18] Liu LX, Hao YL, Luo ZW, et al. Broad HIV-1 neutralizing antibody response induced by heterologous gp140/gp145 DNA prime-vaccinia boost immunization[J]. Vaccine, 2012, 30 (28): 4135-4143.
- [19] 陈敏, 戴洁, 傅莉莉, 等. 云南省 142 例 HIV-1 感染长期不进展者的病毒学和中和活性抗体分析[J]. 现代预防医学, 2019, 46 (12): 2217-2222, 2230.
- [20] Hargett AA, Wei Q, Knoppova B, et al. Defining HIV-1 envelope N-glycan microdomains through site-specific heterogeneity profiles[J]. J Virol, 2019, 93 (1): e01177-18.
- [21] 聂建辉, 许四宏, 宋爱京, 等. 基于假病毒的高通量人类免疫缺陷病毒表型耐药性检测方法的建立和优化[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34 (12): 941-949.
- [22] 张国平, 陈莉华, 王丹妮, 等. 益艾康胶囊对 HIV 感染者免疫功能的影响[J]. 中医学报, 2015, 30 (7): 925-927.
- [23] 李钱锋, 符林春, 谭行华, 等. 艾可清连续治疗 24 个月 HIV 感染者的疗效分析[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24 (10): 966-969.
- [24] 王莉, 赵竞, 刘彦丽, 等. 中医药治疗对 HIV/HCV 重叠感染者病毒载量的影响观察[J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (1): 143-144.
- [25] Zhao J, Yang J, Tian S, et al. A survey of web resources and tools for the study of TCM network pharmacology[J]. Quant Biol, 2019, 7 (1): 17-29.

(收稿: 2020-08-27 在线: 2022-11-16)

责任编辑: 汤 静