

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.001

4-苯乙烯磺酸马来酸酐共聚物抑制 HIV-1 的初步研究*

张龙锋¹, 邱敏², 蒋丽军³, 刘强¹, 焦志军¹, 吴稚伟^{2△}

(1. 江苏大学附属医院检验科, 江苏镇江 212001; 2. 南京大学医学院, 南京 210008;
3. 扬州市第一人民医院儿科, 江苏扬州 225001)

摘要:目的 研究 4-苯乙烯磺酸马来酸酐共聚物(PSM)对 HIV-1 的抑制作用。方法 通过 Luciferase 检测不同浓度的 PSM 对易感细胞 GHOST (3) X4/Hi5 中 HIV-1 的抑制作用, 观察 PSM 对北美 HIV-1 毒株 JR-FL、HXB2 和中国临床分离株 CNE6、CNE30、CNE50 和 CNE55 的抑制作用; 利用 CCK8 试剂盒测定 PSM 对 VK2/E6E7 生长的抑制率来观察 PSM 的体外细胞毒性。通过逆转录荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)检测生殖道上皮细胞 HEC-1-A 的紧密连接蛋白 ZO-1、E-cadherin 和 Occludin 的表达, 观察 PSM 对生殖道上皮细胞 HEC-1-A 表达的紧密连接蛋白的影响从而间接评价其对局部黏膜完整性的影响。结果 PSM 对北美 HIV-1 毒株 JR-FL、HXB2 以及中国常见临床分离株 CNE6、CNE30、CNE50 和 CNE55 的抑制 EC₅₀ 分别为 5.78、0.77、1.85、3.15、1.70 和 2.27 μg/mL, 具有抗 HIV-1 感染的活性; PSM 对 VK2/E6E7 细胞具有低毒性; PSM 不明显抑制 ZO-1 的表达且增加了 E-cadherin 和 Occludin 的转录水平。结论 PSM 可以抑制 HIV-1 感染, 具有作为杀微生物剂的潜能。

关键词: 4-苯乙烯磺酸马来酸酐共聚物; 抗病毒; HIV-1

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)01-0001-03

The preliminary research of PSM on the inhibition of HIV-1*

Zhang Longfeng¹, Qiu Min², Jiang Lijun³, Liu Qiang¹, Jiao Zhijun¹, Wu Zhiwei^{2△}

(1. Department of Clinical Test, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China;
2. Medical College of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 3. Department of Pediatric,
the First People's Hospital of Yangzhou City, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect of 4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid(PSM) in HIV-1. Methods The inhibition effect of different doses of PSM on HIV-1 in susceptible cells GHOST (3) X4/Hi5 was observed by Luciferase, and so did the inhibitory effect of PSM on JR-FL、HXB2、CNE6、CNE30、CNE50、CNE55. The cellular toxicity of PSM on the VK2/E6E7 was also evaluated by CCK8 kit. The transcript level of tight junction proteins (ZO-1, E-cadherin and Occludin) of HEC-1-A were analyzed by qRT-PCR. And then observed the effect of PSM on expression of genitourinary epithelial cells HEC-1-A, so we could evaluate the effect of integrity of local mucosal indirectly. Results The results showed that PSM exhibited potent antiviral activity against a broad spectrum of HIV-1 major isolates with different genotypes and biotypes (EC₅₀ value of JR-FL, HXB2, CNE6, CNE30, CNE50, CNE55 were 5.78, 0.77, 1.85, 3.15, 1.70, 2.27 μg/mL respectively). Meanwhile, it had less cytotoxicity on VK2/E6E7. qRT-PCR showed that no obvious restrain effect on expression of ZO-1 was observed and PSM increased the level of transcription of E-cadherin and Occludin. Conclusion PSM may be a potential agent for the prevention of HIV-1 infection.

Key words: 4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid; antiviral; HIV-1

自从 1981 年发现第一例艾滋病以来, 全世界每天有约 15 000 新增感染者^[1]。截止 2014 年 2 月, 我国官方报告现有 HIV 感染者 40 多万^[2]。传播途径中性传播占有非常重要的位置, 最近的研究显示, 超过 90% 的新近感染者是通过无防护的性交产生的。女性在无防护性交过程中较男性更容易感染 HIV 以及其他生殖道性病, 所以研究开发女性可控的局部杀微生物剂具有十分重要的意义^[3-7]。过去几年有较多的抗 HIV 的药物研究和报道^[1, 3-7], 但是目前仍没有理想的局部杀微生物剂的问世, 所以研究开发预防性药物-局部杀微生物剂具有十分重要的意义。目前发现苯乙烯磺酸钠及其共聚化合物 4-苯乙烯磺酸马来酸酐共聚物(4-styrenesulfonic acid-co-

maleic acid, PSM) 具有阻断性传播疾病的作用^[7-8]。本文初步研究了 PSM 抗人类免疫缺陷病毒-1 型(HIV-1) 的活性及其生物安全性。

1 材料与方法

1.1 材料 PSM 购于 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; qRT-PCR 试剂购自日本 TOYOBO 公司; 荧光素酶(Luciferase)检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 转染试剂 Lipofectamine-2000 购自美国 Invitrogen 公司; HEC-293T、VK2/E6E7 细胞购于美国 ATCC。GHOST (3) X4/Hi5 来源于美国 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program; HIV-1/VSV-G 假病毒, 质粒 pNL4-3 E-R-Luc 来自清华大学

* 基金项目: 国家卫计委“十二五”传染病重大专项项目(2012ZX10001007-009); 江苏大学医学临床科技发展项目基金资助项目(JLY20120169)。作者简介: 张龙锋(1980-), 主管检验师, 硕士, 主要从事免疫学方向研究。△ 通讯作者, Tel: (025) 83686092; E-mail: wzwh@nju.edu.cn。

张林琦教授。HIV-1 假病毒的构建参照 Connor 等^[9] 和 He 等^[10] 的方法进行。将 293T 细胞接种于 10 cm 的培养皿中,待细胞密度达到 90% 以上时,利用聚乙二醇 (PEG) 将 pNL4-3 E-R-Luc 和 Env 质粒按照 2:1 的比例转染细胞,转染后 16 h 换液。转染 48 h 后,收集上清液,分装冻存于 -80 °C 环境。将病毒液进行 10 倍梯度稀释,接种于生长在 96 孔板中的 GHOST (3) X4/Hi5 细胞中,48 h 后利用 Promega Luminometer 检测 Luciferase 活性来确定病毒滴度。病毒的滴度用半数组织培养感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 表示^[11-12]。

1.2 方法

1.2.1 PSM 抗 HIV-1 感染的活性检测 将 PSM 进行梯度稀释,加入到 96 孔板中。将病毒液稀释到 4 000 TCID₅₀/mL,每孔加入 50 μL,放置于 37 °C 孵育 1 h。孵育完毕后,在每孔中接种 104 个 GHOST (3) X4/Hi5 细胞,于 37 °C,5% CO₂ 培养。培养 48 h 后,弃去培养基,加入 100 μL Promega Glo-Lysis buffer 进行裂解。再取一空白 96 孔板,每个相应孔加入 50 μL 细胞裂解液随后加入 50 μL Luciferase 底物,然后迅速混匀,立即用 Promega Luminometer 测定 Luciferase 活性,计算病毒感染率。利用 HIV-1 假病毒感染系统来观察 PSM 对试验毒株(北美 HIV-1 毒株 R5 型 JR-FL 和 X4 型 HXB2 和中国临床分离株 CNE6、CNE30、CNE50 和 CNE55)的抗病毒活性。

1.2.2 PSM 的细胞毒性实验 将 VK2/E6E7 或 GHOST (3) X4/Hi5 细胞分别接种于 96 孔板中,每孔细胞数约为 10⁴ 个,于 37 °C,5% CO₂ 培养 24 h。将 PSM 进行梯度稀释,取每种浓度的 PSM 50 μL 加入到各孔中。继续培养 48 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK8 工作液,于 37 °C,5% CO₂ 孵育 2~4 h,于 450 nm 处测定每孔的吸光值,计算药物对细胞生长的抑制率。

1.2.3 HEC-1-A 紧密连接蛋白 ZO-1、E-cadherin 和 Occludin 的 RNA 抽提和 qRT-PCR 的检测 按照试剂说明书进行 RNA 的提取和逆转录并进行检测。使用 Life Technology 的 SYBR Green Mix 进行 qRT-PCR 检测,其中使用的 PCR 引物如下,ZO-1 上游引物为:5'-AAG TCA CAC TGG TGA AAT CC-3',下游引物为:5'-CTC TTG CTG CCA AAC TAT CT-3',产物大小 102 bp;E-cadherin 上游引物为:5'-AGG CCA AGC AGC AGT ACA TT-3',下游引物为:5'-ATT CAC ATC CAG CAC ATC CA-3',产物大小 110 bp;Occludin 上游引物为:5'-CAT TGC CAT CTT TGC CTG TG-3',下游引物为:5'-AGC CAT AAC CAT AGC CAT AGC-3',产物大小 149 bp;GAPDH 上游引物为:5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3',下游引物为:5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-5',产物大小 87 bp。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSM 具有抗 HIV-1 感染的活性 PSM 对试验毒株感染 GHOST (3) X4/Hi5 细胞的抑制作用的半最大效应浓度 (EC₅₀) 分别为 5.78、0.77 μg/mL,对中国临床分离毒感染 GHOST (3) X4/Hi5 细胞的抑制作用 EC₅₀ 从 1.70 μg/mL 到 3.15 μg/mL(表 1)。PSM 对北美 HIV-1 毒株 JR-FL 和 HXB2

均有很强的抑制作用,为了观察 PSM 抑制 HIV-1 假病毒感染是否依赖于病毒膜蛋白本研究还观察了 PSM 对 VSV-G 假病毒的抑制作用(图 1)。发现即使当 PSM 浓度达到 20 μg/mL 时,依然没有表现出明显的病毒抑制活性。这说明,PSM 抑制 HIV-1 对易感细胞的感染依赖于病毒膜蛋白 160。

2.2 PSM 对 VK2/E6E7 细胞具有低毒性 高浓度(10 000 μg/mL)PSM 与 VK2/E6E7 孵育 6、12 和 24 h 后,其对细胞的细胞毒作用很小,60% 以上 VK2/E6E7 细胞仍然能够存活(图 2)。在药物和细胞相互作用 48 h 后,凋亡细胞与全部细胞之比为 50% 时所对应的药物浓度 (IC₅₀) 也大于 6 000 μg/mL,远远大于药物抗病毒的 EC₅₀ 值(0.77~5.76 μg/mL)。

表 1 PSM 对 HIV-1 感染 GHOST (3) X4/Hi5 细胞的抑制作用

毒株	嗜性	亚型	EC ₅₀ (μg/mL)
JR-FL	CCR5	B	5.78
HXB2	CXCR4	B	0.77
CNE6	CCR5	B'	1.85
CNE30	CCR5	B'C	3.15
CNE50	CXCR4/CCR5	B'C	1.70
CNE55	CCR5	CRF01-AE	2.27
VSV-G 假病毒	—	—	39.70

—:无数据。

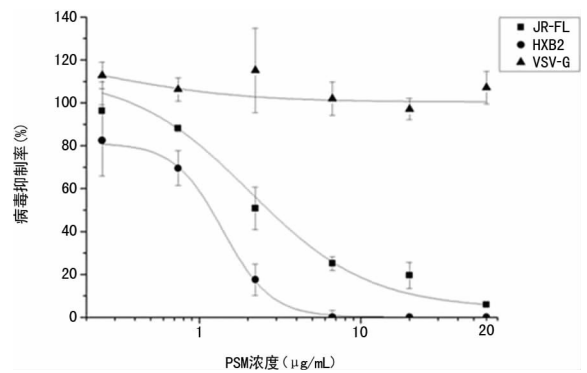


图 1 PSM 对 JR-FL、HXB2 和 VSV-G 假病毒感染 GHOST (3) X4/Hi5 细胞的抑制结果

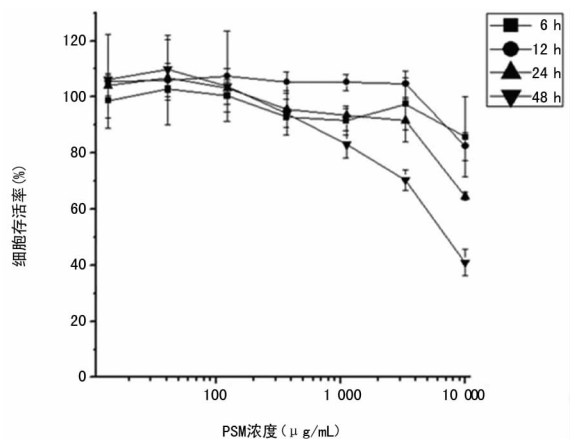


图 2 PSM 对 VK2/E6E7 细胞的低细胞毒作用

2.3 PSM 对阴道乳酸杆菌的生长的影响 本研究观察了

PSM 对于阴道乳酸杆菌阴道生长的影响情况(图 3)。结果发现 PSM 对阴道乳酸杆菌生长没有影响,即使在最高 PSM 浓度下(50 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),阴道乳酸杆菌的生长密度没有明显变化。

2.4 PSM 对上皮细胞紧密连接相关蛋白表达的影响 本研究利用 qRT-PCR 技术检测了 PSM 是否会降低生殖道上皮细胞 HEC-1-A 的紧密连接蛋白 ZO-1、E-cadherin 和 Occludin 的表达(图 4)。发现 PSM 并不明显抑制 ZO-1 的表达,相反增加了 E-cadherin 和 Occludin 的转录水平。而阳性对照 TNF- α 对 3 种细胞紧密连接蛋白均有下调作用。

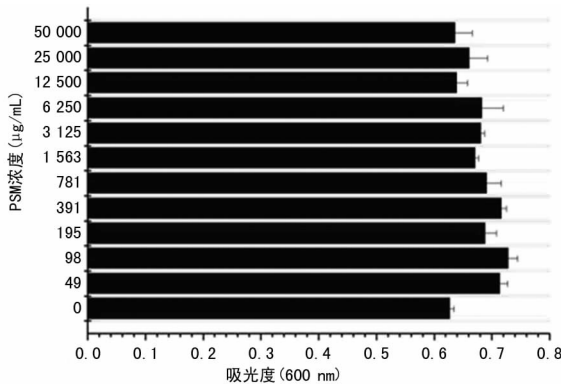


图 3 PSM 对阴道乳酸杆菌生长的影响

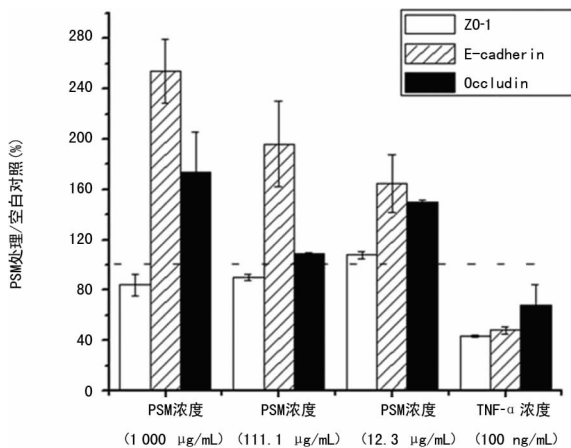


图 4 PSM 对 HEC-1-A 细胞紧密连接蛋白表达的影响

3 讨 论

易感细胞表面表达的 CD4 分子是 HIV 感染宿主细胞的受体,然而完成感染还需要辅助受体 CCR5 或者 CXCR4 分子^[13-15]。GHOST (3) X4/Hi5 细胞是人骨髓瘤细胞经过基因工程构建后能够稳定表达 HIV 病毒感染宿主细胞所需要的 CD4 受体分子及其所需要的辅助受体 CCR5 和 CXCR4 分子的细胞。GHOST (3) X4/Hi5 是 HIV 易感细胞,可用于病毒滴度检测和观察 PSM 对 HIV-1 的抑制活性。VK2/E6E7 细胞是人阴道上皮细胞株,可以在体外检测 PSM 的细胞毒性即安全性。本研究所用到的 6 株试验毒株(JR-FL、HXB2、CNE6、CNE30、CNE50 和 CNE55)代表了 B、B'、B'C 和 AE 亚型。JR-FL 是 CCR5 嗜性的,HXB2 是 CXCR4 嗜性的,其余的从中国患者外周循环血中分离得到^[9],也具有不同的嗜性和很好的代表性。本研究结果显示 PSM 对所选的实验毒株具有较好的抑制作用。理想的预防药物杀微生物剂所必须具备的首要条件就是安全,所以本研究随后观察了 PSM 对阴道上皮细

胞、阴道正常共生菌群(乳酸杆菌)和局部黏膜的完整性的影响。结果表明 PSM 对阴道上皮细胞株 VK2/E6E7 细胞具有低毒性;对阴道的正常菌群阴道乳酸杆菌的生长亦无明显的抑制作用;PSM 对上皮细胞间的紧密蛋白转录水平仅轻微影响 ZO-1 的表达,但是促进了 E-cadherin 和 Occludin 这两种紧密连接蛋白的转录水平,说明 PSM 没有破坏上皮细胞间的完整性。

综上所述,本实验中 PSM 能够有效抑制 HIV-1 感染其作用强度表现一定范围浓度内的剂量依赖性。同时 PSM 还具有低细胞毒性和维持黏膜的完整性的特点,符合安全性要求。但其相关机制方面的研究还需进一步探索。

参考文献:

- [1] Balzarini J, Van Damme L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection[J]. Lancet, 2007, 369(9563): 787-797.
- [2] 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心. 2014 年 2 月全国艾滋病性病疫情及主要防治工作进展[J]. 中国艾滋病性病杂志, 2014, 20(2): 75.
- [3] Stone A. Microbicides: a new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections [J]. Nat Rev Drug Discov, 2002, 1(12): 977-985.
- [4] Geuenich S, Goffinet C, Venzke S et al. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density [J]. Retrovirology, 2008, 5: 27.
- [5] Li L, He L, Tan, S et al. 3-Hydroxyphthalic anhydride-modified chicken ovalbumin exhibits potent and broad anti-HIV-1 activity: a potential microbicide for preventing sexual transmission of HIV-1 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 1700-1711.
- [6] Qiu M, Wang Q, Chu Y, et al. Lignosulfonic acid exhibits broadly anti-HIV-1 activity-potential as a microbicide candidate for the prevention of HIV-1 sexual transmission [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35906.
- [7] Anderso RA, Feathergill K, Diao X, et al. Evaluation of poly (styrene-4-sulfonate) as a preventive agent for conception and sexually transmitted diseases[J]. J Androl, 2000, 21(6): 862-875.
- [8] 陈钰, 宋思维, 邱敏, 等. 4-苯乙炔烯酸马来酸酐共聚物抑制 HSV-2 感染研究[J]. 东南大学学报: 医学版, 2012, 31(5): 563-566.
- [9] Connor RI, Chen BK, Choe S, et al. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes [J]. Virology, 1995, 206(2): 935-944.
- [10] He J, Choe S, Walker R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity [J]. J Virol, 1995, 69(11): 6705-6711.
- [11] Johnson V, Byington R. Infectivity assay (virus(下转第 6 页))

细胞的胞间联系及正常的调控,最终发展成为无序生长的恶性肿瘤^[10]。本研究发现 SHR 组肠系膜动脉上 Cx37 和 Cx40 的表达降低,而主动脉上只有 Cx37 的表达降低,Cx40 的表达没有明显变化。

大量有关 SHR 或诱导大鼠高血压病模型的研究报道发现,连接蛋白的表达会在疾病状态下发生改变。遗憾的是,研究的实验条件差异较大,导致结论不甚一致。例如,前期研究发现应用 NO 合酶抑制剂所致的高血压模型动物的主动脉上 Cx40 的表达没有变化,而 Cx37 的表达则相对于对照组减少^[11],与本实验的研究结果相一致。但是在两肾一夹所致的肾性高血压模型动物血管上 Cx40 的表达却是增加的。此外,在 SHR 上连接蛋白的变化相对于其他原因所致的高血压更加复杂,有研究发现 Cx40 和 Cx37 在血管平滑肌细胞和内皮细胞表达都减少^[12-13],与本实验的研究结果相一致。但也有报道称在 SHR 肾入球动脉和肠系膜动脉上 Cx37 的表达既有增多亦有减少,但 Cx40 的表达没有变化^[14-15]。上述连接蛋白在高血压中的表达差异可能与动物模型、检测方法及部位的不同相关。本实验选择了不同部位的动脉进行比较研究,也发现 Cx40 在肠系膜动脉和主动脉在高血压时的表达改变是不同的。

综上所述,本实验结果提示高血压通过降低血管细胞上 Cx37 和(或)Cx40 的表达造成细胞间缝隙连接通讯异常,引起血管功能紊乱,加重了高血压造成的损害。因此,血管细胞间的缝隙连接的异常改变可能在高血压的发生、发展中发挥了重要的作用。

参考文献:

- [1] Looft-Wilson RC, Billaud M, Johnstone SR, et al. Interaction between nitric oxide signaling and gap junctions: effects on vascular function[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(8): 1895-1902.
- [2] Socha MJ, Segal SS. Isolation of microvascular endothelial tubes from mouse resistance arteries[J]. *J Vis Exp*, 2013 (81): e50759.
- [3] Nishida S, Satoh H. Role of gap junction involved with endothelium-derived hyperpolarizing factor for the quercetin-induced vasodilatation in rat mesenteric artery[J]. *Life Sci*, 2013, 92(13): 752-756.
- [4] Koval M, Billaud M, Straub AC, et al. Spontaneous lung dysfunction and fibrosis in mice lacking connexin 40 and endothelial cell connexin 43[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (6): 2536-2546.
- [5] Firouzi M, Kok B, Spiering W, et al. Polymorphisms in human connexin40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men[J]. *J Hypertens*, 2006, 24(2): 325-330.
- [6] 李新芝, 司军强, 陈新燕, 等. 自发性高血压大鼠和 Wistar 大鼠脑动脉 Cx45 表达的差异[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(11): 39-42.
- [7] Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(11): 2516-2524.
- [8] Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. Diversity and properties of connexin gap junction channels[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2010, 46(1): 1-12.
- [9] Shimizu K, Stopfer M. Gap junctions[J]. *Curr Biol*, 2013, 23(23): R1026-1031.
- [10] Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function (Review) [J]. *Mol Membr Biol*, 2002, 19(2): 121-136.
- [11] Yeh HI, Lee PY, Su CH, et al. Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment[J]. *Am J Hypertens*, 2006, 19(2): 129-135.
- [12] Kansui Y, Fujii K, Nakamura K, et al. Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(1): H216-224.
- [13] Rummery NM, Grayson TH, Hill CE. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores endothelial but not medial connexin expression in hypertensive rats[J]. *J Hypertens*, 2005, 23(2): 317-328.
- [14] Goto K, Rummery NM, Grayson TH, et al. Attenuation of conducted vasodilatation in rat mesenteric arteries during hypertension: role of inwardly rectifying potassium channels[J]. *J Physiol*, 2004, 561(Pt 1): 215-231.
- [15] Braunstein TH, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH. Connexin abundance in resistance vessels from the renal microcirculation in normo- and hypertensive rats[J]. *APMIS*, 2009, 117(4): 268-276.

(收稿日期: 2014-08-11 修回日期: 2014-10-25)

(上接第 3 页)

- yield assay). *Techniques in HIV research [M]*. New York: Stockton Press, 1990: 71-76.
- [12] Montefiori DC. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2009 (485): 395-405.
- [13] Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens [J]. *Science*, 1998, 280(5371): 1884-1888.

- [14] Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition[J]. *Cell*, 1998, 93(5): 681-684.
- [15] Shang H, Han X, Shi X, et al. Genetic and neutralization sensitivity of diverse HIV-1 env clones from chronically infected patients in China [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (16): 14531-14541.

(收稿日期: 2014-08-18 修回日期: 2014-10-30)