

# 细胞内表达 CCR5Delta32 蛋白对 HIV-1 感染抑制作用的研究\*

安群星<sup>1)\*\*</sup> 雷迎峰<sup>2)\*\*</sup> 杨静<sup>2)</sup> 张献清<sup>1)</sup> 易静<sup>1)</sup> 陈蕤<sup>1)</sup> 穆士杰<sup>1)\*\*\*</sup>

<sup>1)</sup>第四军医大学西京医院输血科, 西安 710032; <sup>2)</sup>第四军医大学微生物学教研室, 西安 710033)

**摘要** 人 CCR5Delta32 突变个体能有效抵制 HIV-1 感染, 主要是由于该个体淋巴细胞内表达的 CCR5Delta32 突变蛋白能通过反式显性失活效应(TDN)抑制细胞表面 HIV-1 辅受体 CCR5 和 CXCR4 的产生. 通过构建 CCR5Delta32 慢病毒载体, 体外转染人外周血单个核细胞(PBMCs), 研究细胞内表达 CCR5Delta32 蛋白对 HIV-1 感染的抑制作用. 结果表明, 表达 CCR5Delta32 蛋白的人 PBMCs 对 HIV-1 R5、X4 及 R5X4 毒株感染均具有显著的抑制作用. 这些工作为后续的 AIDS 基因治疗研究奠定了基础.

**关键词** CCR5Delta32, 外周血单个核细胞, 人类免疫缺陷病毒, 辅受体

**学科分类号** R37

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00083

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)是一种由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的严重传染病, 迄今仍缺乏特别有效的治疗方法. HIV-1 辅受体及其基因多态性的发现给 AIDS 的治疗研究带来新的契机. CCR5 和 CXCR4 是 HIV-1 最为主要的辅受体, CCR5 辅受体在人群中存在有多种突变, 其中 CCR5Delta32 是一种最常见、也是最重要的辅受体突变形式. 据调查, CCR5Delta32 纯合子突变个体能有效抵制 HIV-1 感染, 其杂合子个体也不易被 HIV-1 感染或感染后病程进展缓慢. 我们从 CCR5Delta32 突变个体获得目的基因并将其克隆至 pLenti6/V5-D-TOPO 载体, 经慢病毒包装后转染人外周血单个核细胞(PBMCs), 研究细胞内表达 CCR5Delta32 蛋白对 HIV-1 感染的抑制作用. 这些工作为今后 AIDS 的基因治疗研究奠定了基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株和 293T 细胞为第四军医大学西京医院输血科保存. 载体 pUCm-T、pLP1、pLP2、pLP/VSVG 和 pLenti6/V5-D-TOPO 均购自 Invitrogen 公司. 基因组 DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, 胶回收试剂盒购自宝信公司, 质粒

快速提取试剂盒购自 Promega 公司. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶, 以及限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 均购自 TaKaRa 公司. 转染试剂 GeneCompanion II 购自 GeneTrans 公司, 培养基 DMEM + 10% 胎牛血清购自 Hyclone 公司. Anti-CD4-FITC、Anti-CCR5-PE 和 Anti-CXCR4-PE-Cy5 购自 eBioscience 公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 重组慢病毒载体的构建及包装.** 从 CCR5Delta32 突变个体外周血提取基因组 DNA, 以其为模板利用设计的一对引物进行 PCR 扩增. 将扩增产物克隆至 pLenti6/V5-D-TOPO 载体, 随后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  宿主菌. 碱裂解法小量提取质粒进行酶切鉴定及测序. 用 pLP1、pLP2、pLP/VSVG 及 pLenti-CCR5Delta32 4 种质粒共转染 293T 细胞, 获得重组慢病毒液并测定其滴度.

**1.2.2 重组慢病毒转染 PBMCs.** 用淋巴细胞分

\* 国家自然科学基金资助项目(30571675).

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 029-84775465, E-mail: bestar01@163.com

收稿日期: 2009-01-31, 接受日期: 2009-05-11

离液从新鲜外周血中提取 PBMCs, 用 10% FCS RPMI1640 培养液(含 10 mg/L PHA, 100 U/ml rIL-2) 培养 48 h. 加入包装好的重组慢病毒液 1 ml ( $5 \times 10^5$  TU/ml), 加入 polybrene(6 mg/L), 感染 2~3 h. 移除感染上清, 加入新培养液(含 PHA 和 rIL-2)培养 24 h, 观察转染情况.

**1.2.3 Western blot 鉴定.** 裂解转染有目的基因的 PBMCs, 之后行 12% SDS-PAGE, 结束后将蛋白质转移至 NC 膜上. 以抗 CCR5Delta32 兔血清(第四军医大学西京医院输血科自制)为一抗, 以鼠抗兔 IgG-HRP 为二抗, 用 ECL 显色后观察结果.

**1.2.4 免疫共沉淀检测.** 用重组慢病毒液感染人 PBMCs, 培养 48 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 然后加入 0.5 ml 细胞裂解液作用 2 h. 结束后于 4℃ 12 000  $g$  离心 10 min, 收集上清, 加入 protein A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology) 20  $\mu$ l, 于 4℃ 预吸附 2 h. 离心后收集上清, 加入 anti-CCR5Delta32 抗体 2  $\mu$ g, 4℃ 震荡 1 h, 再加入 40  $\mu$ l protein A/G agarose 震荡 3 h. 离心收集沉淀, 用约 0.5 ml 细胞裂解液洗涤 3 次, 再加入同体积的 2 $\times$  SDS 样品缓冲液煮沸 5 min. 之后行 10% SDS-PAGE, 将蛋白质转移至 PVDF 膜, 加入相应一抗(McAb anti-CCR5 或 McAb anti-CXCR4)及二抗(羊抗鼠 IgG-HRP), 用 ECL 显色后观察结果.

**1.2.5 流式细胞术(FACS)分析.** 用 PBS 调整经转化的 PBMCs 为  $1 \times 10^6$  个每 100  $\mu$ l 每管, 分别加入 20  $\mu$ l 荧光抗体(anti-CD4-FITC、anti-CCR5-PE 和 anti-CXCR4-PE-Cy5), 4℃ 避光孵育 30 min. 结束后加入 1.5 ml PBS 洗涤 2 次, 用 400  $\mu$ l 2%多聚甲醛固定后进行 FACS 分析.

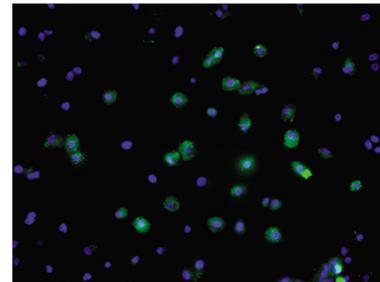
**1.2.6 HIV-1 感染试验.** 培养转染有 Lenti-CCR5Delta32 重组慢病毒的人 PBMCs 48 h, 用  $10^3$  TCID<sub>50</sub>(半数组织培养感染剂量)的 HIV-1 R5 毒株 ADA、X4 毒株 III B 及 R5X4 毒株 89.6 进行分组攻击, 分别于 3 天、6 天、9 天、12 天及 15 天测定培养上清中 p24 抗原水平. p24 抗原测定依照试剂盒说明书进行.

## 2 结 果

### 2.1 重组慢病毒载体的构建、包装及转染

以 CCR5Delta32 突变个体基因组 DNA 为模板 PCR 得到约 650 bp 的扩增片段. 测序正确后构建 pLenti-CCR5Delta32 质粒, 用包括 pLenti-CCR5Delta32 在内的 4 种质粒共转染 293T 细胞,

产生重组慢病毒, 测定其滴度为  $5 \times 10^5$  TU/ml. 将其转染人 PBMCs, 36 h 后可见约半数靶细胞内有绿色荧光蛋白表达(图 1).



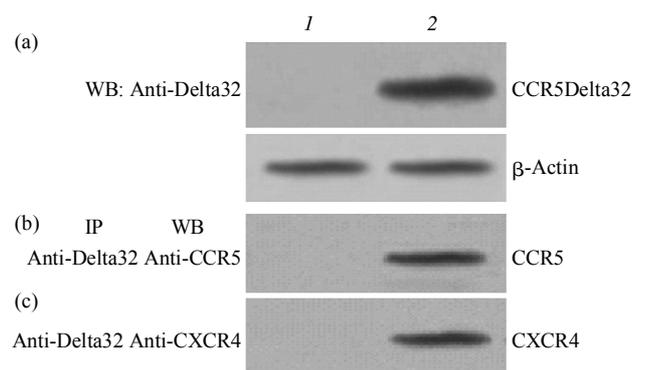
**Fig. 1** Micrograph of human peripheral blood mononuclear cells transfected with Lenti-CCR5Delta32-EGFP incubated for 36 h

### 2.2 Western blot 鉴定

以抗 CCR5Delta32 兔血清为一抗, 鼠抗兔 IgG-HRP 为二抗, 用 ECL 显色后观察到目的蛋白的表达(图 2a).

### 2.3 免疫共沉淀检测

以 anti-CCR5Delta32 为沉淀抗体, 以 anti-CCR5 及 anti-CXCR4 为检测抗体, 验证目的蛋白与 CCR5/CXCR4 间是否存在相互作用. 结果表明, CCR5Delta32 与 CCR5、CCR5Delta32 与 CXCR4 以异源二聚体形式结合, 之间确实存在着相互作用(图 2 b, c).



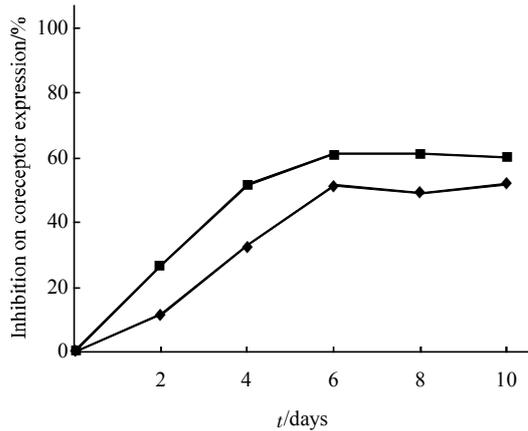
**Fig. 2** Western blot analysis of whole cell lysates from transfected human PBMCs

(a) Western blot analysis of CCR5Delta32 expression. (b) Co-immunoprecipitation analysis of CCR5Delta32-CCR5 interaction. (c) Co-immunoprecipitation analysis of CCR5Delta32-CXCR4 interaction. 1: Untransfected group; 2: Transfected group.

### 2.4 FACS 分析

培养转染有 Lenti-CCR5Delta32 的人 PBMCs,

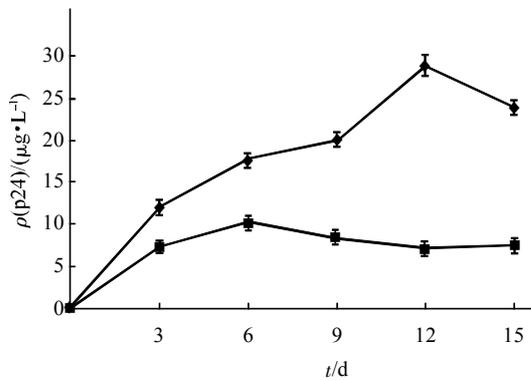
每隔 2 天对其表面 CCR5 和 CXCR4 辅受体进行 FACS 分析. 结果表明, 靶细胞内目的蛋白的表达对靶细胞表面辅受体 CCR5 和 CXCR4 的产生起抑制作用, 抑制率在转染后第 6 天达到高峰(CCR5 的抑制率为 51.69%, CXCR4 的抑制率为 61.05%), 以后维持在此水平(图 3).



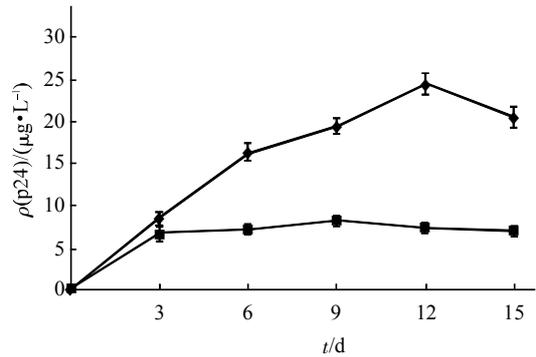
**Fig. 3** Inhibition of CCR5Delta32 protein on human PBMCs surface expression of coreceptor (CCR5/CXCR4)  
◆—◆: CCR5; ■—■: CXCR4.

### 2.5 HIV-1 感染试验

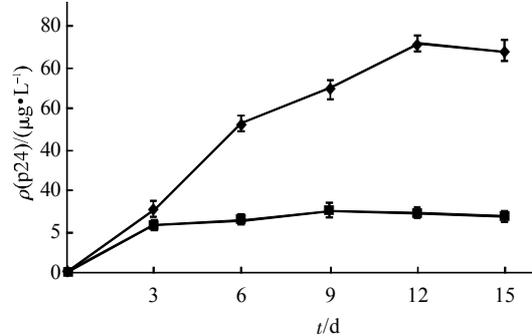
分别用 HIV-1 R5、X4 及 R5X4 毒株攻击转染有 Lenti-CCR5Delta32 的人 PBMCs, 数天后测定培养上清中 p24 抗原水平. 结果表明, 转染有重组慢病毒的人 PBMCs 对 HIV-1 R5、X4 及 R5X4 毒株感染均具有显著抑制作用(图 4, 5, 6).



**Fig. 4** Inhibition of human PBMCs expressed with CCR5Delta32 protein on R5 HIV-1 infection  
◆—◆: None; ■—■: Lenti-CCR5Delta32.



**Fig. 5** Inhibition of human PBMCs expressed with CCR5Delta32 protein on X4 HIV-1 infection  
◆—◆: None; ■—■: Lenti-CCR5Delta32.



**Fig. 6** Inhibition of human PBMCs expressed with CCR5Delta32 protein on R5X4 HIV-1 infection  
◆—◆: None; ■—■: Lenti-CCR5Delta32.

### 3 讨 论

HIV-1 所感染的靶细胞, 其表面除了 CD4 受体外, 还存在一些辅受体. 现已发现的辅受体有 CCR5、CXCR4、CCR3 和 CCR2 等, 其中 CCR5 和 CXCR4 是 HIV-1 的主要辅受体. CCR5 是 HIV-1 嗜 M 毒株的辅受体, 趋化因子 RANTES、MIP-1 $\alpha$  和 MIP-1 $\beta$  是其配体. CXCR4 是嗜 T 毒株的辅受体, SDF1 是其天然配体. 由于 CCR5 和 CXCR4 在 HIV-1 致病过程中的特殊作用, 它自然成为人们寻找最佳预防及治疗 AIDS 的突破口. 现已发现, CCR5 基因具有多态性(即存在有多种自然突变, 如 CCR5Delta32、CCR5m303 及 CCR5-59353-T/C 等), 并已证明某些 CCR5 自然突变在抵抗 HIV-1 感染及延缓疾病进展中起到了积极的作用.

CCR5Delta32 是一种最常见, 也是最重要的辅受体突变形式. 它是由于 CCR5 辅受体基因在自然进化过程中发生了 32 个碱基缺失的突变, 即在 CCR5 基因编码区域第 185 位氨基酸密码子以后发生了 32 个碱基的缺失, 导致开放读码框错位, 造成蛋白质翻译的提前终止, 在细胞内产生出一种截短的、无功能的 CCR5Delta32 突变蛋白. 正常 CCR5 分子质量约为 46 ku, 而这种截短的突变蛋白分子质量只有 30 ku. 据调查研究, CCR5Delta32 纯合子突变个体能有效抵制 HIV-1 感染, 其杂合子个体也不易被 HIV-1 感染或感染后病程进展缓慢<sup>[1-5]</sup>. 通过哈迪 - 温伯格(Hardy-Weinberg)测试及其他研究, 这类突变个体其生理及生殖发育等方面均未受到任何影响. 据流行病学调查发现, 在美国白人和欧洲后裔中, CCR5Delta32 等位基因突变率约为 10%左右<sup>[6,7]</sup>. 在我国, 各民族 CCR5Delta32 平均突变率还不到 0.2%, 而且主要为杂合子突变<sup>[8]</sup>. 从遗传学角度认为, 我国人群普遍对 HIV-1 易感.

目前, CCR5Delta32 突变个体抗 HIV-1 感染的机理已基本清楚, 可归纳如下: 由于这种突变个体淋巴细胞内产生的 CCR5Delta32 蛋白, 通过反式显性失活(transdominant negative, TDN)效应抑制细胞表面 CCR5 和 CXCR4 两类辅受体的表达, 从而阻止了嗜 T、嗜 M 及双嗜性 HIV-1 毒株的感染<sup>[1,3,9,10]</sup>. 具体地说, 是细胞内产生的 CCR5Delta32 突变蛋白, 与胞内新合成的两类辅受体通过异源二聚体形式结合并将之扣押, 使其无法到达细胞表面. 经过数天的新陈代谢, 细胞表面两类辅受体就会减少乃至消失, 从而达到抑制各类 HIV-1 毒株感染的作用.

这个发现给 AIDS 的治疗带来新的契机. 我们拟通过构建含 CCR5Delta32 基因的真核表达载体, 体外转染人 PBMCs 或造血干细胞, 通过表达产物与细胞内新合成的两类辅受体(CCR5 和 CXCR4)结合并将之扣押在胞内, 从而达到同时阻断嗜 T、嗜 M 及双嗜性 HIV-1 毒株感染的目的.

本研究成功地构建了重组慢病毒载体 pLenti-CCR5Delta32, 包装后产生重组慢病毒, 转

染人 PBMCs 后检测到目的蛋白的表达. 免疫共沉淀结果表明, 目的蛋白与两类 HIV-1 辅受体在细胞内以异源二聚体形式结合, 之间确实存在着相互作用. FACS 分析表明, 靶细胞内目的蛋白的表达对靶细胞表面辅受体(CCR5 和 CXCR4)的产生起抑制作用. HIV-1 感染试验表明, 细胞内表达 CCR5Delta32 蛋白对 HIV-1 R5、X4 及 R5X4 毒株感染均具有显著抑制作用. 这些工作为后续 AIDS 基因治疗研究奠定了基础.

### 参 考 文 献

- 1 Agrawal L, Jin Q, Altenburg J, *et al.* CCR5Delta32 protein expression and stability are critical for resistance to HIV-1 *in vivo*. *J Virol*, 2007, **81**(13): 7111~7123
- 2 Huang Y, Paxton W A, Wolinsky S M, *et al.* The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*, 1996, **2**(11): 1240~1243
- 3 Agrawal L, Lu X, Qingwen J, *et al.* Role for CCR5Delta32 protein in resistance to R5, R5X4, and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells. *J Virol*, 2004, **78**(5): 2277~2287
- 4 Liu R, Paxton W A, Choe S, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996, **86**(3): 367~377
- 5 Dean M, Carrington M, Winkler C, *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science*, 1996, **273**(5283): 1856~1862
- 6 Zimmerman P A, Buckler-White A, Alkhatib G, *et al.* Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med*, 1997, **3**(1): 23~36
- 7 Samson M, Libert F, Doranz B J, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996, **382**(6593): 722~725
- 8 Wang F S, Jin L, Hong W G, *et al.* Low frequencies of CCR5-Δ32 and CCR5-m303, but high frequencies of CCR2-641 and SDF1-3'A alleles in indigenous ethnic groups in mainland China. *Chin J Sex Transm Inf*, 2002, **2**(1): 7~12
- 9 Marmor M, Sheppard H W, Donnell D, *et al.* Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2001, **27**(5): 472~481
- 10 Chelli M, Alizon M. Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor. *J Biol Chem*, 2001, **276**(50): 46975~46982

## Inhibition of HIV-1 Infection by CCR5Delta32 Protein Expressed in Human PBMCs\*

AN Qun-Xing<sup>1)\*\*</sup>, LEI Ying-Feng<sup>2)\*\*</sup>, YANG Jing<sup>2)</sup>, ZHANG Xian-Qing<sup>1)</sup>, YI Jing<sup>1)</sup>, CHEN Rui<sup>1)</sup>, MU Shi-Jie<sup>1)\*\*\*</sup>

(1) *Department of Blood Transfusion, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China;*

2) *Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China )*

**Abstract** Individuals with CCR5Delta32 mutant genotype can naturally resist human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) infection. The mechanism is mainly due to CCR5Delta32 mutant protein expressed in the individual peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), through trans-dominant negative (TDN) effect, which can inhibit two types of HIV-1 coreceptor (CCR5 and CXCR4) on the cell surface from producing. The recombinant lentiviruses, namely Lenti-CCR5Delta32, were generated and used to infect human PBMCs. HIV-1 infection of the PBMCs transduced with Lenti-CCR5Delta32 showed that CCR5Delta32 protein expressed in human PBMCs was able to inhibit R5, X4, and R5X4 HIV-1 infection. The result is expected to be used for the gene therapy on AIDS, which deserves further study.

**Key words** CCR5Delta32, peripheral blood mononuclear cells, human immunodeficiency virus type 1, coreceptor

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00083

---

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30571675).

\*\*These authors contributed to this paper equally.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-29-84775465, E-mail: bestar01@163.com

Received: January 31, 2009 Accepted: May 11, 2009