



90K/Mac-2BP 基因沉默增强 HIV-1 感染的 单核巨噬细胞凋亡

傅春燕, 蒋虹, 薛婧, 丛喆, 陈霆, 魏强

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学
重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 研究人单核巨噬细胞株 U937 的 90K/Mac-2BP 基因沉默后其 mRNA 和蛋白水平的表达及其对 HIV-1 感染单核巨噬细胞凋亡的影响。方法 用人单核巨噬细胞株 U937 作为细胞模型, 用 R5 嗜性的 HIV-1 全长感染性质粒包装并获得 HIV-1 病毒, 待 HIV-1 感染 U937 细胞 5 d 后, 细胞经 PE-Annexin V, PerCP-7-AAD 染色, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。采用基因沉默技术, 将 U937 细胞中的 90K/Mac-2BP 基因沉默后, 再经 HIV-1 感染, 5 d 后检测细胞凋亡情况。结果 正常人单核巨噬细胞株 U937, 经 HIV-1 感染后细胞凋亡率为 $(16.27 \pm 0.30)\%$, 而 90K/Mac-2BP 基因沉默后的 U937 细胞, 经 HIV-1 感染后细胞凋亡率分别增加至 $(31.26 \pm 0.35)\%$ 、 $(25.76 \pm 0.30)\%$ 、 $(23.69 \pm 0.33)\%$, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。结论 90K/Mac-2BP 的表达水平能调节 HIV-1 感染的单核巨噬细胞凋亡。

【关键词】 人单核巨噬细胞株; 巨噬细胞-2 结合蛋白; HIV-1; 凋亡

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 05-0010-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.003

Gene silencing of 90K/Mac-2BP enhances the apoptosis of U937 cells by HIV-1 infection

FU Chun-yan, JIANG Hong, XUE Jing, CONG Zhe, CHEN Ting, WEI Qiang

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College & Institute of Medical Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State administration of Traditional Chinese medicine,
Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of cell death by HIV-1 infection on gene 90K/Mac-2BP by RNA interference (RNAi) in U937 cell line. **Methods** We used human monocyte-macrophage cell line U937 as the cell model. Cells were infected by HIV-1 (R5-tropic) 5 days, and then stained by PE-Annexin V and PerCP-7-AAD. 90K/Mac-2BP in U937 cell line was knocked down, and these cells were infected by HIV-1 for 5 days. Then, cells were stained by PE-Annexin V and PerCP-7-AAD. Apoptosis were examined upon flow cytometry. **Results** The percentages of Annexin V⁺ cells without 90K/Mac-2BP knock-down were $(16.27 \pm 0.30)\%$ by HIV-1 infection. The percentages of them with 90K/Mac-2BP knock-down were $(31.26 \pm 0.35)\%$, $(25.76 \pm 0.30)\%$, $(23.69 \pm 0.33)\%$ respectively. The increase

[基金项目] 国家自然科学基金(81301437)。

[作者简介] 傅春燕(1986-), 硕士生, 研究方向: 病毒感染与免疫, E-mail: april0705@163.com。

[通讯作者] 魏强(1964-), 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学, E-mail: weiqiang@cnilas.pumc.edu.cn。

of cell apoptosis rate for HIV-1-infected U937 cells by 90K/Mac-2BP siRNA transfection was significantly greater than that for HIV-1-infected untreated cells ($P < 0.01$). **Conclusion** The apoptosis of HIV-1-infected U937 cells was regulated by the expression of 90K/Mac-2BP.

【Key words】 U937; 90K/Mac-2BP; HIV-1; Apoptosis

艾滋病严重危害着人类的健康与生命。尽管在艾滋病防治的研究与实践上已取得重大进展,但现有的药物无法彻底治愈艾滋病,感染者仍需终身用药,一旦停药,体内的艾滋病毒载量将会快速反弹。造成停药后体内艾滋病毒量快速反弹的重要原因是抗病毒治疗不能完全清除艾滋病毒。一是由于抗病毒药物较难进入病毒感染的细胞,二是由于病毒在一些细胞中能持久潜伏或行低度隐性复制。人们将病毒感染后不发生凋亡、病毒能在其内潜伏并在合适条件下复制的细胞称为艾滋病毒潜伏感染靶细胞,而单核巨噬细胞是一类重要的潜伏感染靶细胞。因此,寻找清除艾滋病毒潜伏感染靶细胞的药物及措施,是艾滋病防治研究的一个重要领域^[1-2]。

巨细胞-2 结合蛋白(也称 Galectin-3 结合蛋白, 90K/Mac-2BP)在人单核巨噬细胞中高表达,其能与半乳糖凝集素相互作用,发挥多种生物学效应^[3-7]。其中最显著的作用是与受体结合介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质的相互作用^[5, 8]。有研究表明淋巴瘤与 90K/Mac-2BP 的粘附能够抵抗化疗诱导的细胞凋亡^[9]。鉴于文献报道 90K/Mac-2BP 能与 Galectin-3 相互作用^[5, 10],并具有一定的抗凋亡作用,我们对 90K/Mac-2BP 的表达水平是否能调节 HIV-1 感染单核巨噬细胞的凋亡进行了初步探索,这将为清除 HIV-1 潜伏感染靶细胞提供初步依据。

1 材料和方法

1.1 试剂及细胞

人单核巨噬细胞株 U937(北京协和医学院基础研究所细胞中心)。PE-Annexin V/ PerCP-7-AAD 凋亡检测试剂盒(BD Pharmingen 公司)。以 90K/Mac-2BP 为靶基因的 3 个 siRNA(Origene 公司),序列为: A-rArGrCrGrCrUrCrArGrCrUrUrCrArGrArArArUrUrArCTG; B-rArCrCrUrCrArCrCrGrArGrArUrArCrCrUrArCrArGCC; C-rArGrArCrGrUrCrArCrCrGrArUrUrUrCrGrArGrGrCrUGG。小鼠抗人 90K/Mac-2BP 单克隆抗体(Origene 公司)。HIV-1 全长质粒(Clone:11739, R5 tropic)(NIH 提供)。转染试剂 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)。细胞 RNA 提

取试剂盒(QIAGEN 公司)。cDNA 合成试剂盒、SYBR GREEN I 荧光实时定量试剂盒(TAKARA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

U937 细胞于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养。培养基为改良型 RPMI-1640 培养液(加入 10% 胎牛血清、200 U/mL 青霉素、200 μg/mL 链霉素)。处于对数生长期的细胞用于本实验。

1.2.2 HIV-1 病毒的制备

以 NIH 来源的 HIV-1 全长质粒(Clone:11739, R5 tropic)采用阳离子脂质体方法转染 293T 细胞,12 h 后更换新鲜培养基,72 h 后收获 HIV-1 病毒悬液。

1.2.3 HIV-1 病毒感染 U937 细胞

将含有 HIV-1 的病毒悬液加入到 U937 细胞的培养基内,培养 4~5 d 后收集细胞;将收集的细胞用 PE-Annexin V 和 PerCP-7-AAD 染色,流式细胞术检测细胞凋亡^[11-12]。

1.2.4 细胞凋亡的检测

细胞凋亡的检测利用 PE-Annexin V/ PerCP-7-AAD 凋亡检测试剂盒^[11-12](BD Pharmingen 公司),操作步骤参照试剂盒说明书。收集 5×10^5 个细胞于流式管中,冰预冷的 PBS 洗两次,1 × Annexin V Binding Buffer 洗一次,弃上清后,轻轻弹起细胞,分别加入 5 μL PE-Annexin V、5 μL PerCP-7-AAD,室温下避光孵育 15 min。加入 300 μL 1 × Annexin V Binding Buffer,在 1 h 内流式细胞仪(FACS Canto; BD)检测细胞凋亡情况。

1.2.5 90 K/Mac-2BP 基因沉默

将以 90K/Mac-2BP 为靶基因的 siRNA 利用阳离子脂质体方法转染 U937 细胞,6 h 后更换新鲜培养基,48 h 后检测基因沉默情况。

1.2.6 细胞 RNA 的提取和反转录

收获细胞并用细胞 RNA 提取试剂盒(QIAGEN)进行总 RNA 提取,提取过程参照试剂盒说明书。使用分光光度计(NanoDrop 2000c, Thermo Scientific)检测 RNA 的浓度和质量。提取 RNA 后立即对其进行反转录操作。反转录使用 Prime Scrip

试剂盒 (TAKARA) 进行, 操作过程参照试剂盒说明书。反转录获得的 cDNA 于 -20°C 储存备用。

1.2.7 利用荧光定量 PCR 检测 RNA 的表达水平

根据 GenBank 上人 90K/Mac-2BP 和 GAPDH 序列, 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 进行人基因 90K/Mac-2BP 和 GAPDH 的引物设计。引物由 Invitrogen 公司合成。引物序列为: 90K/Mac-2BP-F AACCCAAGCGTGAACGATG; 90K/Mac-2BP-RCTG GGTGGCGTCTCGAAGC; GAPDH-FCTCCTGTTCGA CAGTCAGCC; GAPDH-RACCAAATCCGTTGACTCC GAC。退火温度为 60°C 。所有样本的荧光定量 PCR 检测获得的 C_T 值数据后, 利用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算各样品基于内参基因的相对表达含量。

1.2.8 90 K/Mac-2BP 蛋白表达的检测

利用 western blotting 免疫印记法检测。收集 5×10^6 个细胞, PBS 洗一次, 加入 $100 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液, 冰浴 30 min, 13000 r/min 4°C 离心 30 min, 取上清液。在酶标仪上用 BCA 法参照标准蛋白浓度, 于 562 nm 处测定样品的吸光值。根据蛋白定量的标准曲线计算各样本的蛋白含量。

配制 10% 分离胶和 5% 积层胶, 取 $80 \mu\text{g}$ 蛋白样品溶于相应体积的上样缓冲液中, 98°C 煮沸 5 min, 蛋白变性后即可加样。室温下 80 V 电泳 30 min, 蛋白样品到达分离胶后将电压调为 120 V , 继续电泳约 1 h。配制电转液, 冰浴中 300 mA 电转约 1 h。将电转后的 NC 膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h。随后将膜放入一抗中 4°C 孵育过夜。第二天将膜置于 TBST 中清洗 3 次, 每次 10 min, 再置入二抗中室温孵育 1 h。抗体如下稀释: 抗 90K/Mac-2BP (1: 500)、抗 β -actin (1: 15000)、HRP 标记山羊抗小鼠 (1: 20000)。与二抗反应后, 将膜置于 ECL 发光液中 3 min, 放入化学发光分析仪进行检测。结果用 ImageJ 软件分析蛋白条带的相对密度。

1.2.9 统计分析

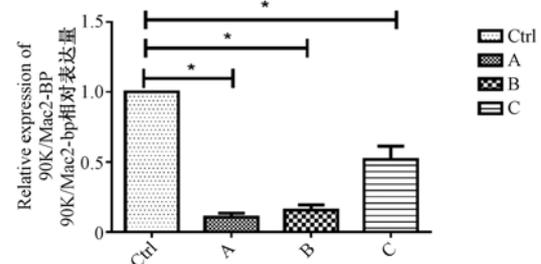
数据用 GraphPad 软件分析, 以均值 \pm 标准差表示。用 Student's t-test 对数据作统计处理, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果

2.1 利用荧光定量 PCR 检测 U937 细胞 90K/Mac-2BP mRNA 的表达

利用 siRNA 基因沉默技术, 将 U937 细胞中的 90K/Mac-2BP 基因沉默, 然后提取细胞 RNA 并进行

反转录, 利用荧光定量 PCR 技术, 在 RNA 水平检测基因沉默效果。图 1 为荧光定量 PCR 检测获得的 C_T 值, 利用 $\Delta\Delta C_T$ 法, 即 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算得到的各样本基于内参基因 GAPDH 的相对表达含量。结果显示 U937 细胞转染 siRNA A 后, 在 RNA 水平 90K/Mac-2BP 基因的表达含量相比对照组下降了 89.33%, 其次为 B 下降了 84.33%, C 下降了 48.00%。



注: 与对照相比, $* P < 0.05$ 。

图 1 荧光定量 PCR 检测 U937 细胞 siRNA 转染前后 90K/Mac-2BP mRNA 的表达水平

Note: Compared with the control, $* P < 0.05$.

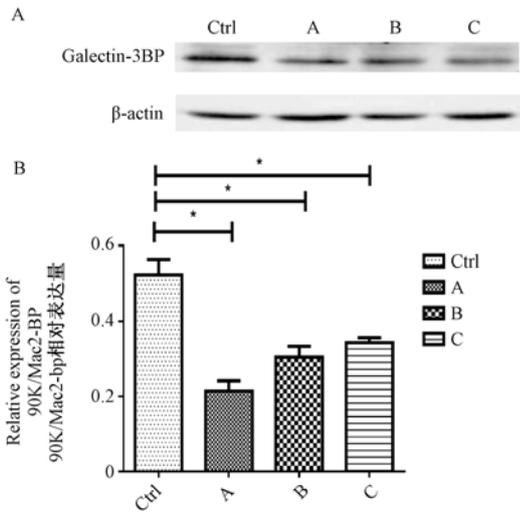
Fig. 1 Real time PCR analysis of 90K/Mac-2BP mRNA expression in U937 cells before and after siRNA transfection

2.2 western blotting 检测 U937 细胞 90K/Mac-2BP 蛋白的表达

利用 siRNA 基因沉默技术, 将 U937 细胞中的 90K/Mac-2BP 基因沉默。我们将针对 90K/Mac-2BP 基因的 siRNA 转染至 U937 细胞, 利用 western blotting 技术, 检测 90K/Mac-2BP 基因在 siRNA 转染前后蛋白水平的表达情况。图 2A 观察到在内参 β -actin 基本表达一致的情况下, 90K/Mac-2BP 基因 siRNA 转染后的 U937 细胞 (A、B、C) 的条带相比对照条带浅, 说明 90K/Mac-2BP 达到了一定的沉默效果, 其中 A 的沉默效果最为明显。图 2B 为 western blotting 的定量分析结果, 结果表明与 siRNA 转染前对照细胞相比, 转染 A 的 U937 细胞中 90K/Mac-2BP 的表达水平下降了 59.62%, 转染 B 的 U937 细胞中 90K/Mac-2BP 的表达水平下降了 40.38%, 转染 C 的 U937 细胞中 90K/Mac-2BP 的表达水平下降了 34.38%。

2.3 HIV-1 感染 90K/Mac-2BP 基因沉默的 U937 细胞凋亡增加

Annexin V 阳性代表发生凋亡的细胞。图 3A 显示 90K/Mac-2BP 基因沉默的 U937 细胞与对照 U937 细胞 (8.03 ± 0.25)% 相比, 凋亡率并没有增加, 分别为: (7.74 ± 0.22)%, (9.07 ± 0.47)%, (8.04 ± 0.34)%, 其与对照均无显著差异, 说明



注:与对照相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 Western blotting 检测 U937 细胞 siRNA 转染前后 90K/Mac-2BP 的表达水平

Note: Compared with the control, * $P < 0.05$.

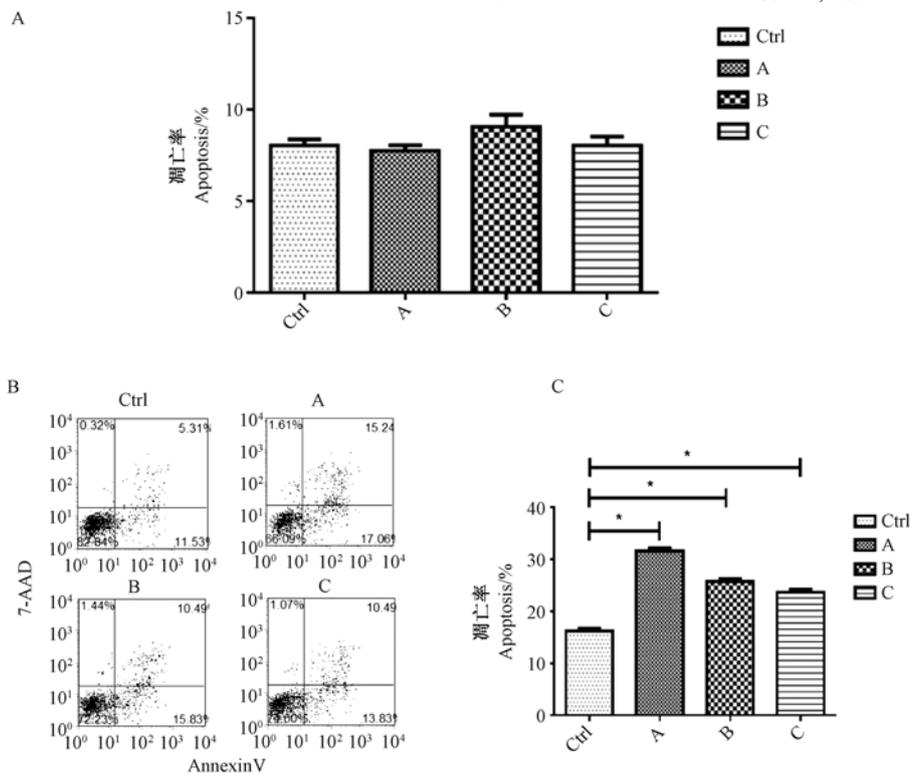
Fig. 2 Western blotting analysis of 90K/Mac-2BP expression in U937 cells before and after siRNA transfection

90K/Mac-2BP 基因沉默对 U937 细胞本身的凋亡无影响。图 3B 显示正常的人单核巨噬细胞株 U937,

经 HIV-1 感染后细胞凋亡率为 $(16.27 \pm 0.30)\%$, 而 90K/Mac-2BP 基因沉默的 U937, 经 HIV-1 感染后, 细胞凋亡率分别增加至 $(31.62 \pm 0.35)\%$, $(25.76 \pm 0.30)\%$, $(23.69 \pm 0.34)\%$ 。图 3C 结果显示 90K/Mac-2BP 基因沉默的 U937 细胞比正常的 U937 细胞经 HIV-1 感染后的凋亡率明显增加 ($p < 0.05$), 说明 90K/Mac-2BP 的表达水平能够调节 HIV-1 感染人单核巨噬细胞的凋亡, 即 90K/Mac-2BP 表达量降低, HIV-1 感染人单核巨噬细胞凋亡率升高。

3 讨论

90K/Mac-2BP 最初作为肿瘤相关抗原在人乳腺癌细胞培养上清中被检测出来^[13], 它由 90×10^3 的亚基组成, 故名 90K, 并且它是半乳糖凝集素 3 (Galectin-3) 的配体之一, 由多种细胞合成分泌, 其中包括造血细胞、上皮细胞等。90K 的作用目前还没有完全阐明, 研究表明它可以增加杀伤细胞的活性、促进细胞因子的产生、肿瘤增长的抑制等, 另外, 在黑色素瘤中的研究表明, 它可以通过与细胞表面 Galectin-3 的相互作用, 增加细胞间的粘附^[10]。



注:与对照相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 HIV-1 感染 90K/Mac-2BP siRNA 转染前后 U937 细胞的凋亡情况

Note: Compared with the control, * $P < 0.05$.

Fig. 3 Apoptosis of U937 cells by HIV-1 infection before and after 90K/Mac-2BP siRNA transfection

通常情况下,正常人血清中 90K/Mac-2BP 的含量在 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,研究表明,血清中 90K 的高水平表达与某些肿瘤细胞的发生、增殖、分化和转移有关^[14]。文献报道 90K/Mac-2BP 对于前列腺癌的诊断具有重要作用。另外,有研究报道,在 HIV 感染的病人中,血清中 90K/Mac-2BP 的表达增加^[6]。然而,对于 90K/Mac-2BP 在 HIV 感染的过程中起到何种作用,尚未见有研究报道。

研究报道,HIV 感染可使单核巨噬细胞抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-XL 的表达增强,基因沉默 Mcl-1、Bcl-XL 等抗凋亡基因可以增强 HIV 感染的单核巨噬细胞发生凋亡^[12]。本研究观察到利用 siRNA 基因沉默技术,使 90K/Mac-2BP 表达量降低后,HIV-1 诱导单核巨噬细胞凋亡率明显升高,提示了 90K/Mac-2BP 与 HIV-1 感染后单核巨噬细胞的抗凋亡能力有一定的关系。但其作用机制是否与调节促凋亡蛋白、抗凋亡蛋白的表达相关,仍需进一步研究证实。鉴于 Galectin-3 作为 90K/Mac-2BP 的受体且具有抑制细胞凋亡的作用^[15],尽管尚未有报道,可以设想 HIV-1 感染单核巨噬细胞中的 90K/Mac-2BP 有可能通过与 Galectin-3 相结合而发挥作用。这个现象提示 90K/Mac-2BP 可能作为清除艾滋病毒潜伏感染单核巨噬细胞的一个值得深入研究的候选者。

参考文献:

- [1] Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication [J]. *Immunity*, 2012, 37 (3): 77-388.
- [2] Vinuesa CG. HIV and T follicular helper cells; a dangerous relationship [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122 (9): 3059-3062.
- [3] Tinari N, Kuwabara I, Huflejt ME, *et al.* Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation [J]. *International journal of cancer*, 2001, 91 (2): 167-172.
- [4] Ozaki Y, Kontani K, Teramoto K, *et al.* Identification of antigenic epitopes recognized by Mac-2 binding protein-specific cytotoxic T lymphocytes for use in cancer immunotherapy [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 317 (4): 1089-1095.
- [5] Kim SJ, Lee SJ, Sung HJ, *et al.* Increased serum 90K and Galectin-3 expression are associated with advanced stage and a worse prognosis in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Acta haematologica*, 2008, 120 (4): 211-216.
- [6] Ullrich A, Sures I, D'Egidio M, *et al.* The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1994, 269 (28): 18401-18407.
- [7] Darcissac EC, Vidal V, De La Tribonniere X, *et al.* Variations in serum IL-7 and 90K/Mac-2 binding protein (Mac-2 BP) levels analysed in cohorts of HIV-1 patients and correlated with clinical changes following antiretroviral therapy [J]. *Clinical and experimental immunology*, 2001, 126 (2): 287-294.
- [8] Marchetti A, Tinari N, Buttitta F, *et al.* Expression of 90K (Mac-2 BP) correlates with distant metastasis and predicts survival in stage I non-small cell lung cancer patients [J]. *Cancer research*, 2002, 62 (9): 2535-2539.
- [9] Fornarini B, Ambrosio CD, Natoli C, *et al.* Adhesion to 90K (Mac-2 BP) as a mechanism for lymphoma drug resistance in vivo [J]. *Blood*, 2000, 96 (9): 3282-3285.
- [10] Inohara H, Akahani S, Kohts K, *et al.* Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion [J]. *Cancer research*, 1996, 56 (19): 4530-4534.
- [11] Laforge M, Campillo-Gimenez L, Monceaux V, *et al.* HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis [J]. *PLoS pathogens*, 2011, 7 (6): e1002087.
- [12] Busca A, Saxena M, Kumar A. Critical role for antiapoptotic Bcl-xL and Mcl-1 in human macrophage survival and cellular IAP1/2 (cIAP1/2) in resistance to HIV-Vpr-induced apoptosis [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287 (18): 15118-15133.
- [13] Iacobelli S, Arno E, D'Orazio A, *et al.* Detection of antigens recognized by a novel monoclonal antibody in tissue and serum from patients with breast cancer [J]. *Cancer research*, 1986, 46 (6): 3005-3010.
- [14] Hu J, He J, Kuang Y, *et al.* Expression and significance of 90K/Mac-2BP in prostate cancer [J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2013, 5 (1): 181-184.
- [15] Yang H, Lei C, Cheng C, *et al.* The antiapoptotic effect of galectin-3 in human endometrial cells under the regulation of estrogen and progesterone [J]. *Biology of reproduction*, 2012, 87 (2): 39.

[修回日期]2014-01-15