

白细胞介素 32 通过 5'-LTR 抑制 HIV 复制

张蕊¹, 司晓棠¹, 白兰², 何辉², 覃瑞¹

(1 中南民族大学 生命科学学院, 武汉 430074; 2 武汉大学 生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 目的: 探讨白细胞介素 32(IL-32) 抑制 HIV 病毒复制的机制. 方法: 利用荧光色素酶活性测定筛选抑制 HIV 复制最显著的 IL-32 亚型, 通过构建 HIV 的 LTR 系列截断质粒和 TAR 茎环结构的系列点突变质粒, 确定 IL-32 抑制 HIV 复制作用的位点. 结果: 在 HeLa、Jurkat、293T 三个细胞系中, IL-32 γ 和 IL-32 ϵ 两种亚型对 HIV 的抑制作用最显著. 在 HeLa 细胞系中证实 IL-32 可通过抑制 HIV 5'-LTR 的活性抑制 HIV 复制, 确定 TAR 形成的茎环结构在此过程中起重要作用. IL-32 与 TAR 结构相互作用的位点定位在 TAR 的环状和半环状处. 结论: IL-32 能抑制 HIV 复制, 可作为 HIV 治疗的潜在手段.

关键词 白细胞介素 32; 人免疫缺陷病毒; 长末端重复序列

中图分类号 Q932 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)04-0040-05

Suppression of HIV Replication by Interleukin-32 via 5'-LTR

Zhang Rui¹, Si Xiaotang¹, Bai Lan², He Hui², Qin Rui¹

(1 College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2 College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of interleukin 32 (IL-32) inhibition of HIV replication. Methods: The most significant IL-32 subtype of HIV replication was screened by luciferase activity assays. By constructing a series of HIV plasmids containing LTR truncated mutations and point mutations of TAR hairpin, the site of IL-32 inhibition on HIV replication was determined. Results: In the three cell lines of HeLa, Jurkat and 293T, IL-32 γ and IL-32 ϵ subtypes had the most significant inhibitory effects on HIV. In HeLa cell line, it was confirmed that IL-32 could suppress HIV replication by inhibiting the activity of HIV 5'-LTR, with the hairpin structure formed by TAR playing an important role in this process. The action site of IL-32 interaction with TAR structure was located at the ring and the half ring of TAR. Conclusion: IL-32 can inhibit HIV replication as a potential means of HIV treatment.

Keywords interleukin-32(IL-32); human immunodeficiency virus(HIV); long terminal repeat(LTR)

白细胞介素 32(简称 IL-32) 因在自然杀伤细胞 (NK) 内大量表达而被命名为自然杀伤细胞转录本 4 (NK4)^[1]. 由美国科罗拉多大学健康科学中心医学部的 Kim 等^[2]于 2005 年在用基因芯片方法筛选 IL-18 可诱导基因时鉴定的一种白细胞介素. IL-32 为前炎症细胞因子, 可介导胞内炎症反应^[3]. 在多种病毒感染性疾病中 IL-32 表达水平都相应增高, 而 IL-32 可抑制流感病毒和乙肝病毒的复制^[4]. IL-32 基因含有 8 个小外显子, 由外显子的选择性拼接产生 7 类剪切亚型: IL-32 α 、IL-32 β 、IL-32 γ 、IL-32 δ 、IL-32 ϵ 、IL-32 ζ 和 IL-32 η ^[5](见图 1). 各种剪切异构体中只有 IL-32 γ 具有一个长度为 31 个氨基酸的信号肽序列, 为一种分泌型蛋白, 与 NK4 的特征一致. 多项研究均表明,

IL-32 γ 在诱导细胞因子表达和抗病毒方面具有比其他亚型更高的活性.

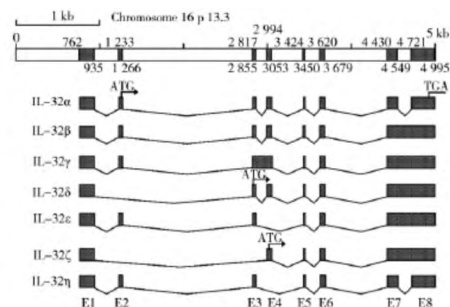


图 1 白细胞介素-32 各亚型的基因结构

Fig. 1 Gene structure of IL-32 subtypes
人免疫缺陷病毒(HIV) 是一种可以感染 CD4 细

收稿日期 2017-06-05

作者简介 张蕊(1982-), 女, 工程师, 博士, 研究方向: 微生物学、营养学, E-mail: Zhangrui@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81402668)

胞从而导致获得性免疫功能丧失综合症(AIDS) 的逆转录病毒. HIV 的 5'端和 3'端的长末端重复序列(LTRs) 帮助病毒整合至宿主基因组,对病毒基因的表达和病毒的复制具有调节作用,结构为 U3-R-U5 (见图 2) . 5'LTR 区域从 -454 到 +181 ,U3 和 R 区包括 4 个功能域: 远距离调节单位从 -454 到 -104 ,其中包含负调节区(NRE) 从 -340 到 -184; 增强子单位从 -105 到 -79; 核心启动子单位从 -78 到 -1; Tat 反应元件(TAR) 从 +1 到 +59. U5 之后为 gag 引导序列(GLS) . TAR 反应元件具有稳定的茎环二级结构,包括 4 段茎区,1 个半环和 1 个环状区. 这样的结构对与病毒反式因子 Tat 蛋白结合非常关键. 半环部被认为是与 Tat 蛋白的结合部位,而环状部结合其他细胞转录因子. 茎区也可结合少数细胞因子^[6].

感染 HIV 后会引引起感染人群的多种免疫缺陷,同时多种重要的免疫因子表达水平也发生了变化. 这些细胞因子会引发体内进行自身免疫调节,导致自身的分泌增多、减少甚至不分泌,如很多促炎症因子 TNF- α /IL-1、IL-6、IFN- α/β 、INF- γ 的表达均随之升高^[7-9].

1 实验部分

1.1 材料、试剂和仪器

人宫颈癌细胞系 HeLa、人肾上皮细胞系 293T 和人急性 T 细胞白血病细胞系 Jurkat 均来源于武汉大学典型培养物保藏中心. IL-32 各亚型质粒由武汉大学医学病毒学实验室构建并保存. HIV 突变型克隆 PNL-4-3-

R⁻E⁻ 和 HIV 长末端重复序列 pGL3-LTR-luc 为 Sahibzada T. Rasool 博士馈赠. Renilla luciferase 报告基因质粒(Promega) ,KOD-plus polymerase(TOYOBO) , Lipofectamine2000(Invitrogen) , 荧光素酶报告基因检测试剂盒(Roche) ,Mlu I 和 Hind III(TAKARA) ,DMEM 和 RPMI-1640 培养基(GIBCO) . 荧光测定仪(Chemi Doc MP System ,Bio-Rad) ,电转仪(4D/II Nucleofector 型, LONZA) .

1.2 细胞培养

HeLa 与 293T 细胞均采用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C ,5% CO₂ 培养箱中贴壁培养^[10]. Jurkat 细胞采用含有 10% FBS 的 1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C ,5% CO₂ 培养箱中悬浮培养.

1.3 质粒的构建

HIV-LTR 系列截断质粒均以 pGL3-LTR-luc 质粒为模板,依据长度递减通过以下引物进行扩增,转化和鉴定方法参考文献[11],再利用引入的 Mlu I 和 Hind III 构建而来,具体设计见图 2 和表 1.

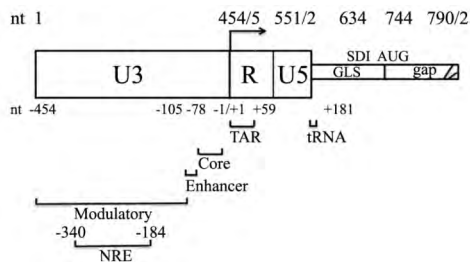


图 2 HIV 的 5'-LTR 结构图

Fig. 2 Structure of 5'-LTR of HIV

表 1 5'-LTR 系列截断质粒引物序列

Tab. 1 Primer sequences of truncated plasmid of 5'-LTR series

目的基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')
LTR-T1(-340 ~ +60)	5'-TCAACGCGTATCCACTGACCTTTG-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
LTR-T2(-184 ~ +60)	5'-CATACGCGTGCCTCCTAGCATTTTCG-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
LTR-T3(-105 ~ +60)	5'-TATACGCGTGGGACTTTCCGCTGGG-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
LTR-T4(-78 ~ +60)	5'-TATACGCGTGAGGTGTGGCCTGGGC-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
LTR-T5(-1 ~ +60)	5'-CATACGCGTGGTCTCTCTGTTAG-3'	5'-GGGAGCTGTGGCCTGGCCGGGACTG-3'
LTR-AC(-454 ~ -1)	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'	5'-ACCAGAGTCACACAACAGACGGGCA-3'

HIV-LTR 中 TAR 茎环状结构系列突变质粒均以 pGL3-LTR-luc 质粒为模板,利用保真度高的

KOD-plus polymerase 通过以下引物采用一步法进行扩增,具体设计见表 2 和图 3.

表 2 TAR 系列突变质粒引物序列

Tab. 2 Primer sequences of mutant plasmid of TAR series

TAR 突变位点	上游(5'-3')	下游(5'-3')
茎环 25 ~ 29 UGAGC→TACCG	5'-TTAGACCAGATCTACCGCTGGGAGCTCTCTG-3'	5'-CAGAGAGCTCCCAGGCTCAGATCTGGTCTAA-3'
环状 23 ~ 25: UCU(TCT) →AAG , 30 ~ 35: CUGGA→AUUGG	5'-CATACGCGTGCCTCCTAGCATTTTCG-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
半环状 23 ~ 25: UCU(TCT) →AAG	5'-TATACGCGTGGGACTTTCCGCTGGG-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
环状处 30 ~ 35: CUGGA→AUUGGA	5'-TATACGCGTGAGGTGTGGCCTGGGC-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'
茎状 6 ~ 10: TCTCT→CAATT , 25 ~ 29: UGAGC→TACCG	5'-CATACGCGTGGTCTCTCTGTTAG-3'	5'-GCCAAGCTTTTTATTGAGGCTTAAG-3'

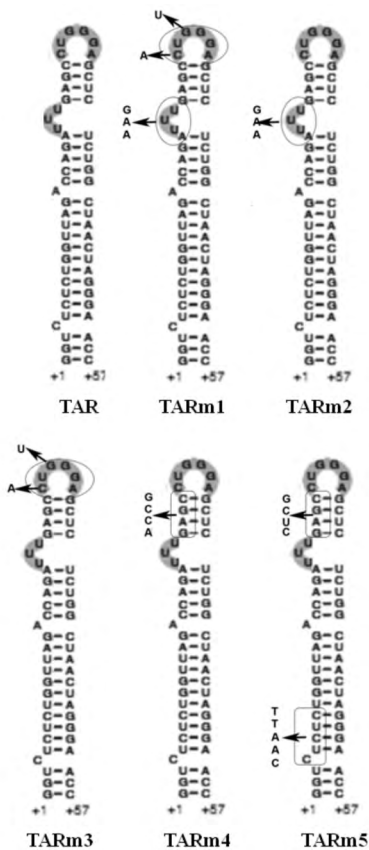


图3 HIV 5'-LTR 中 TAR 茎环结构的系列突变

Fig.3 A series of mutations in TAR hairpin structure in 5'-LTR of HIV

1.4 细胞转染及荧光素酶活性检测

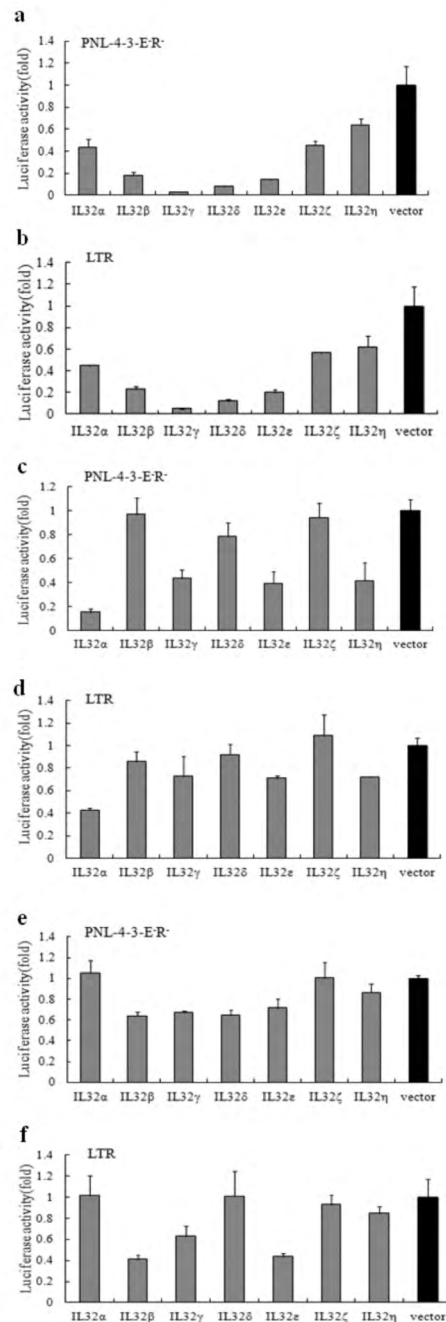
Hela 与 293T 采用转染试剂 Lipofectamine2000 进行转染. 转染前 1 d 按 40% ~ 60% 的密度接种到 24 孔板中, 37°C 培养, 使转染前细胞密度达到 80% ~ 95%. 每个 24 孔板的孔中转染 0.8 μg 质粒. 转染后将培养板放置于 37°C 培养箱中培养 4 ~ 6 h, 弃培养板中的液体, 加入含血清和抗生素的全培养基, 37°C 继续培养 48 ~ 72 h 后检测. Jurkat 采用电转仪进行电穿孔转染. 荧光素酶活性采用荧光素酶报告基因检测试剂盒通过荧光测定仪进行检测, 并以 Renilla luciferase 的报告基因质粒作为内参基因保证实验的可靠性.

2 结果

2.1 IL-32 各亚型对 HIV 复制的抑制作用

PNL-4-3-E⁻R⁻ 质粒是 HIV 突变型质粒, 不具有感染性但保持了 HIV 复制的特性. 本文利用 PNL-4-3-E⁻R⁻ 在 3 种人源细胞系内, 对 IL-32 与 HIV 复制的关系进行了观察. 结果见图 4. 由图 4a、4c、4e 可见, 大部分 IL-32 亚型能抑制 PNL-4-3-E⁻R⁻ 复制, 但在不同细胞系抑制作用有差异. 在 Hela 细胞系中

IL-32 γ 和 IL-32 ϵ 两种亚型对 HIV 复制的抑制作用最为突出. 在 293T 细胞系中抑制作用最显著的是 IL-32 γ 、IL-32 ϵ 和 IL32 α . 在 Jurkat 细胞中 IL-32 γ 、IL-32 ϵ 和 IL32 β 三种亚型的作用非常显著. 综上, IL-32 亚型中活性最显著的两个亚型: IL-32 γ 和 IL-32 ϵ 对 HIV 复制的抑制作用最为显著.



a, b) Hela 细胞; c, d) 293T 细胞; e, f) Jurkat 细胞

图4 IL-32 各亚型对 HIV PNL-4-3-E⁻R⁻ 和 5'-LTR 活性的抑制作用

Fig.4 Suppression effect of IL-32 subtypes on the activity of PNL-4-3-E⁻R⁻ and 5'-LTR in HIV

HIV 的 LTR 区在 HIV 复制过程中的作用与启

动子类似,主要是各种转录因子与之结合形成特殊结构的复合物. 推测 IL-32 可能通过抑制转录因子与 LTR 的相关作用来抑制 HIV 复制. 用 IL-32 各亚型与 pGL3-LTR-luc 共转染后,得到了与共转染 PNL4-3-E⁻R⁻相类似的结果(见图 4b、4d、4f),即 IL-32 各亚型均可抑制 HIV 的 LTR 活性,尤以 IL-32 γ 和 IL-32 ϵ 两种亚型作用明显. 而 IL-32 γ 是 IL-32 各亚型中活性最强的亚型^[5]. 综上,选取 IL-32 γ 为研究对象,由于 IL-32 γ 在 HeLa 细胞系中抑制作用最为明显,而 Jurkat 细胞的特性导致转染质粒的效率特别低,后续试验均在 HeLa 细胞系中进行.

2.2 IL-32 剂量对 HIV5'-LTR 活性的影响

选择抗病毒活性最强的 IL-32 γ 为研究对象的代表,在 HeLa 细胞系中,在共转染的 pGL3-LTR-luc 保持一定的情况下,依次增加 IL-32 的浓度,检测其对 HIV 5'-LTR 活性的影响,结果见图 5. 由图 5 可见,随着 IL-32 剂量的增加,HIV 5'-LTR 活性依次降低,说明 IL-32 对 HIV 5'-LTR 活性的抑制作用呈现剂量依赖性.

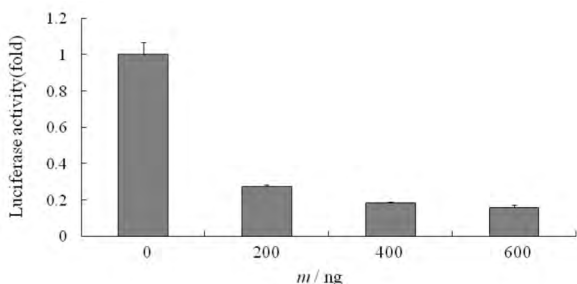


图 5 HeLa 细胞系中不同剂量 IL-32 对 HIV 5'-LTR 活性的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of HIV 5'-LTR activity by IL-32 with various doses in HeLa cell lines

2.3 IL-32 与 5'-LTR 的相互作用位点分析

HIV 的 5'-LTR 结构非常复杂,有多个功能区,如 Modulatory, Enhancer, Core 和 TAR 区(见图 2). 先确认 IL-32 对 LTR 作用的主要区域,再根据 LTR 的功能分区,依次对 LTR 进行了截断,构建了一系列的截断质粒. IL-32 对 HIV 系列截断 5'-LTR 片断活性的影响结果见图 6. 由图 6 可见,与 IL-32 γ 共转染之后,每个区域在这个过程中都可能起到了一定的作用,但当将 TAR 的茎环结构截断后,IL-32 对 LTR 的抑制作用获得了极大的回复,提示在 IL-32 与 LTR 相互作用的过程中,TAR 的茎环结构起到了极为关键的作用.

2.4 IL-32 与 TAR 作用位点为环状处和半环处

TAR 的序列及形成的相应的茎环结构,这个结

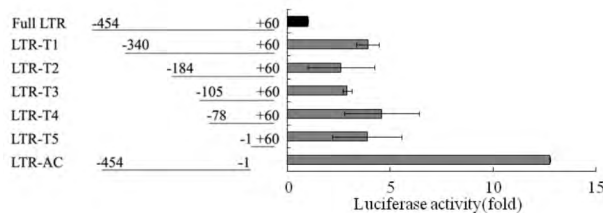


图 6 IL-32 对 HIV 系列截断 5'-LTR 片断活性的影响

Fig. 6 Effect of IL-32 on truncated mutants of HIV 5'-LTR

构的形成是由其中茎状处的几段互补序列的配对互补形成(见图 3). Vrolijk 等^[12]的研究确认环状处和半环处的几个点突变对 TAR 的活性影响不大. IL-32 对 HIV 的 TAR 结构的各突变体活性的影响结果见图 7. 由图 7 可见,在同等的活性情况下,在环状和半环状处同时进行点突变(TARm1),IL-32 对 LTR 的抑制作用得到了极大的回复,而仅仅在环状处(TARm2)或者半环状处(TARm3)进行点突变,并不能削弱 IL-32 的抑制作用. 同样,在茎状部位进行一处或多处点突变也不能削弱 IL-32 对 LTR 的抑制作用. 因此得出结论,IL-32 作用于 LTR 时,TAR 的环状处和半环状处在 IL-32 抑制 HIV 复制过程中不可缺少. 而 TAR 的半环部是与 Tat 蛋白的结合部位,而环状部结合其他细胞转录因子^[6],提示 IL-32 抑制 HIV 复制与抑制 Tat 蛋白与 TAR 的结合有关.

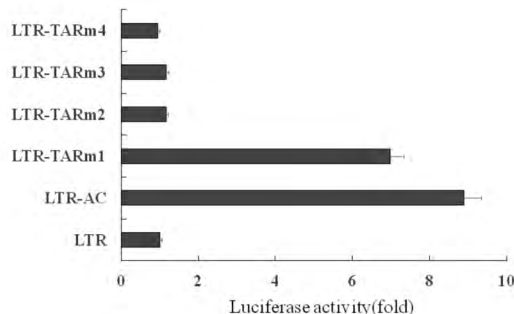


图 7 IL-32 对 HIV 的 TAR 结构的各突变体活性的影响

Fig. 7 Effect of IL-32 on mutants of TAR structure in HIV

3 讨论

Rasool 等^[13]发现 HIV 病人血清中 IL-32 表达水平明显高于健康人群,平均高出 78%,并且初步观察到在用 si-RNA 将内源性的 IL-32 表达水平降低后,HIV 的复制水平显著上升. 提示 IL-32 与 HIV 复制有着密切相关性. IL-32 具有抗流感病毒、乙肝病毒等多种病毒的作用,因此 IL-32 对 HIV 的抑制作用及其机理正是本文探讨的方向.

IL-32 具有多种亚型,本文先在三种人源细胞系中证实 IL-32 具有活性的亚型均能够降低 HIV 的复

制水平,而活性最强的 IL-32 γ 和 IL-32 ϵ 抑制作用最为显著.同时,IL-32 对 HIV 的 5'-LTR 活性的降低趋势与 IL-32 抑制 HIV 复制的趋势保持一致.推断 IL-32 抑制 HIV 复制的一条途径是通过抑制 LTR 活性.由于 LTR 结构复杂,功能多样,通过对每个功能区的截断实验,发现 LTR 中 TAR 形成的茎环结构在此过程中起重要作用,没有 TAR 结构的存在,IL-32 对 LTR 的活性增强了接近 10 倍.

进一步对 TAR 结构的不同部位进行点突变时,证实是 TAR 的环状和半环状在 IL-32 抑制 LTR 活性中起着不可或缺的作用,且当两个部位同时进行突变时才能将 IL-32 的抑制作用遏止,依然没有 TAR 整个缺失的影响大,故推断其他部位也参与了整个过程.所以 IL-32 通过与 LTR 的 TAR 的环状和半环状的相互作用抑制了 LTR 活性进而降低了 HIV 复制水平.最近 El-Far 等^[14]报道,在 HIV 慢性感染人群中 IL-32 可作为慢性感染控制失败的标志物,即 IL-32 的增多并不能抑制 HIV 复制,提示 IL-32 不直接抑制 HIV 复制,而是通过刺激合成更多的免疫细胞因子去抵抗 HIV.在 IL-32 与 HIV 的相互作用的过程中可能存在多种机制,在不同的情况下,两者之间的关系甚至还会逆转,这也是后续研究的方向.但 IL-32 在此进程的作用不容置疑,也将是不容忽视的一个标志物.

参 考 文 献

- [1] Dahl C A, Schall R P, He H L, et al. Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells [J]. *J Immunol*, 1992, 148(2): 597-603.
- [2] Kim S H, Han S Y, Azam T, et al. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α [J]. *Immunity* 2005 22(1): 131-142.
- [3] Joosten L A, Netea M G, Kim S H, et al. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103(9): 3298-3303.
- [4] 王 婧, 路慧丽, 韩 伟. 白细胞介素-32 免疫学特征及与 HIV 的相关性研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2008, 8(12): 2586-2588.
- [5] 孙 伟, 李 群, 冯金荣, 等. 1 个新的白介素-32 剪接异构体的克隆与表达 [J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(9): 792-795.
- [6] 沈 骏. HIV-1 LTR 区转录功能研究进展 [J]. *国外医学·病毒学分册*, 2003, 10(5): 158-160.
- [7] Graziosi C, Gant K R, Vaccarezza M, et al. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(9): 4386-4391.
- [8] Rinaldo C R Jr, Armstrong J A, Kingsley L A, et al. Relation of alpha and gamma interferon levels to development of AIDS in homosexual men [J]. *J Exp Pathol*, 1990, 5(3): 127-132.
- [9] Bix D L, Redfield R R, Tencer K, et al. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection [J]. *Blood*, 1990, 76(11): 2303-2310.
- [10] 王朝元, 刘亮亮. bHGA 对外培养成骨细胞活性的影响 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(2): 31-35.
- [11] 陈思礼, 吴汇兰, 陈 洁. 鱼腥藻 PCC7120 质粒上毒素-抗毒素基因对 *alr9029/asr9028* 的初步研究 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(2): 26-30.
- [12] Vrolijk M M, Ooms M, Harwig A, et al. Destabilization of the TAR hairpin affects the structure and function of the HIV-1 leader RNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(13): 4352-4363.
- [13] Rasool S T, Tang H, Wu J, et al. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication [J]. *Immunol Lett*, 2008, 117(2): 161-167.
- [14] El-Far M, Kouassi P, Sylla M, et al. Proinflammatory isoforms of IL-32 as novel and robust biomarkers for control failure in HIV-infected slow progressors [J]. *Sci Rep* 2016, 6: 22902.