

CEMx174 细胞中 SAMHD1 蛋白表达与 SIVmac239 病毒水平的相关性研究

彭灵娟, 丛喆, 薛婧, 宋铭晶, 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 SIV 在感染 CEMx174 细胞过程中, SAMHD1 在基因和蛋白水平的变化与病毒水平之间的相关性。方法 SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞后, 每天收集上清和细胞, 应用 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 方法, 检测细胞内 SAMHD1 mRNA 的相对表达量的变化; 用 Western blot 检测 SAMHD1 蛋白与 SIVmac239 P27 蛋白表达量的变化, 并分析其相关性。结果 CEMx174 细胞感染 SIVmac239 后, 细胞中的 SAMHD1 mRNA 基于内参基因 GAPDH 的相对表达量逐渐增加, 前 3 d 分别增加了 14%, 16%, 42%, 随后开始迅速增加, 第 4 天达到了 200%, 第 6 天更是达到了 890%; 细胞中 SAMHD1 蛋白的表达量在感染后第 1、2 天时变化不大, 随后逐渐降低, 到第 5、6 天时, 几乎检测不到, 呈现逐渐下降的趋势。结论 CEMx174 细胞感染 SIVmac239 后, SAMHD1 基因表达上调, 与上清中病毒载量水平正相关, 细胞内 SAMHD1 蛋白水平与 SIVmac239 P27 蛋白水平呈负相关。

【关键词】 SAMHD1; HIV-1; SIV; 实时荧光定量 RT-PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 04-0041-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.04.007

Relationship between the SAMHD1 protein expression and the SIVmac239 viral level in CEMx174 cells

PENG Ling-juan, CONG Zhe, XUE Jing, SONG Ming-jing, WEI Qiang

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

【Abstract】 Objective To explore the relationship between protein levels of SAMHD1 expression with viral load of SIV in the SIVmac239-infected CEMx174 cells. **Methods** CEMx174 cells were infected with SIVmac239, and the cells and supernatant were collected daily for analysis. The viral loads and the SAMHD1 mRNA level were detected by real-time RT-PCR and the level of P27 and SAMHD1 proteins were detected by Western blotting. **Results** The mRNA level of intracellular SAMHD1 gene was increased and SAMHD1 protein decreased gradually when CEMx174 cells were infected with SIVmac239. **Conclusions** There is a positive correlation between viral load in the supernatant and the mRNA level of SAMHD1, and a negative correlation between the increase of P27 protein and the decrease of SAMHD1 protein in the SIVmac239-infected CEMx174 cells.

[基金项目] 国家十二五科技重大专项课题 (2013ZX10004608-003 和 2012ZX10004501-001)。

[作者简介] 彭灵娟 (1991-), 女, 硕士研究生, 专业: 动物学, 从事实验动物病毒学研究工作。

[通讯作者] 魏强 (1964-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@cnilas.org。

【Key words】 SAMHD1; HIV-1; SIV; Real-time RT-PCR

SAMHD1 是近年来新发现的抗艾滋病病毒(HIV)的天然蛋白质分子,早期研究表明,SAMHD1 蛋白作为限制因子,在髓系树突细胞、巨噬细胞和静息 CD4⁺ T 细胞中,发挥 dNTPase 功能,通过降低胞内 dNTP 水平,阻止 HIV-1 病毒早期复制^[1],但在感染的活化 CD4⁺ T 细胞中,却不能发挥抗病毒作用^[2]。本研究使用 SIV 病毒感染 CEMx174 细胞,研究在活化的 T 细胞感染过程中,SAMHD1 在基因和蛋白水平的变化与病毒水平之间的相关性,以期 SAMHD1 在活化细胞中的抗病毒作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒:CEMx174 细胞:由 T 淋巴细胞干细胞系 CEMR.3 和 B 淋巴细胞干细胞系 721.174 杂交而成的细胞系,病毒感染该种细胞后能表现出明显的细胞病变的融合现象。毒株:SIVmac239,由本实验室保存。CEMx174 细胞滴定病毒滴度为 4×10^5 TCID₅₀/mL。

1.1.2 主要试剂盒:QIAamp RNA Blood Mini Kit 购自 Qiagen 公司(Cat No. 52304),TaqMan RNA-to-CT-1-Step Kit 购自 Applied Biosystems 公司(Cat No. 4392938)。

1.2 引物和探针

利用 Primer Express 3.0 软件设计 SAMHD1 mRNA (NCBI: NM_001271642) 和内参 GAPDH 的实时荧光定量 RT-PCR 引物和 MGB 探针,Invitrogen 公司合成(表 1)。反应体系总体积 20 μ L,内含:引物 F 和 R 各 0.5 μ L、TaqMan[®] RT-PCR Mix (2 \times) 缓冲液 10 μ L、TaqMan[®] RT Enzyme Mix (40 \times) 0.3 μ L、probe 0.3 μ L、DEPC-H₂O 3.4 μ L、5 μ L 的模板 RNA。反应条件为 48 $^{\circ}$ C 30 min、95 $^{\circ}$ C 10 min、94 $^{\circ}$ C 15 s (\times 40)、60 $^{\circ}$ C 60 s (\times 40)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞感染:在 3 mL 状态良好的 3×10^7 个 CEMx174 细胞悬液中,加入 SIVmac239 病毒原液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,补足 RPMI1640 生长液至 30 mL。

1.3.2 样本收集和处理:在 CEMx174 细胞感染 SIVmac239 病毒后的第 0、1、2、3、4、5、6 天,分别取 4 mL 的细胞悬液,离心。提取上清液中病毒 RNA,real-time RT-PCR 检测病毒载量水平变化^[3]。

离心后的细胞沉淀,一半用来提取细胞 RNA,在 mRNA 水平检测 SAMHD1 的表达量的变化,即采用荧光定量 RT-PCR 检测获得的 CT 值,利用 $\Delta\Delta$ CT 法,即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各个时间点的样本基于内参基因 GAPDH 的相对表达量^[4]。另一半细胞裂解,提取蛋白,利用 Western blot 检测 SAMHD1 蛋白的表达量和病毒的 p27 蛋白的表达量的变化^[5]。

1.4 统计学方法

应用统计学软件 GraphPad Prism 5.0 数据统计软件处理数据。

2 结果

2.1 细胞病变

在 CEMx174 细胞感染 SIVmac239 病毒后细胞状态发生改变,会出现明显细胞融合。在感染后第 3 天就可看到早期融合细胞的产生(图 1B),在第 6 天,镜下观察有大量的融合细胞产生(图 1C)。

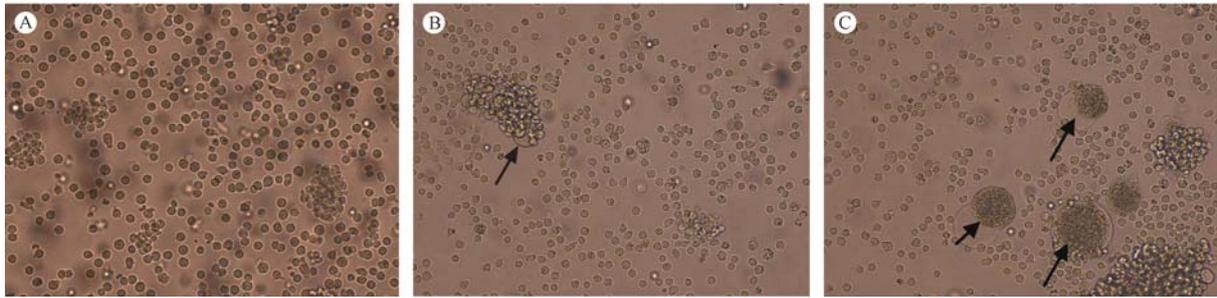
2.2 SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 mRNA 相对表达量与病毒载量之间的相关性分析

SIVmac239 感染 CEMx174 细胞后,感染上清液中的病毒 RNA 水平逐渐升高,从第 1 天的 1×10^4 copies/mL 左右,到第 6 天增长到 1×10^8 copies/mL (图 2A)。CEMx174 细胞中的 SAMHD1 mRNA 基于

表 1 Real-time RT-PCR 测定的 PCR 扩增引物和探针

Tab.1 Primers and probes used for the real-time RT-PCR detection

目的基因 Genes	引物和探针名称 Primers and probes	序列(5' \rightarrow 3') Sequences	长度 Length
SAMHD1	SAMHD1 F	CCTCTCCTCGTCCGAATCATT	21bp
	SAMHD1 R	CCCAGCTGTTTGATGTATCGAA	22bp
	S- Probe	CACACCTCAATTTCAACG	18bp
GAPDH	GAPDH F	GACCACAGTCCATGCCATCA	20bp
	GAPDH R	CATCACGCCACAGTTTCCC	19bp
	G- Probe	ACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCC	24bp

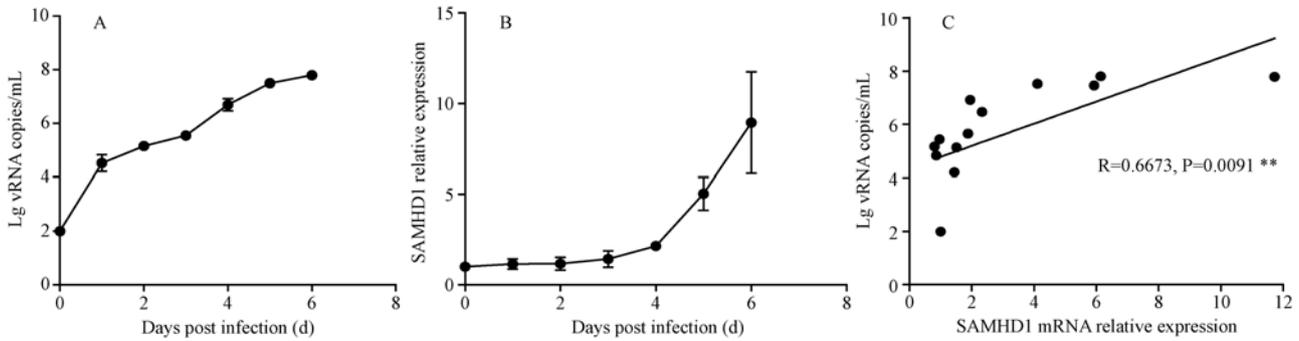


注:指细胞融合泡的位置; A:正常 CEMx174 细胞形态;B:SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞第 3 天时细胞形态;C:SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞第 6 天时细胞形态

图 1 SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞后产生细胞病变

Note.: The site of cell fusion bulbs; A: Normal CEMx174 cells; B: The CPE of CEMx174 cells 3 days post infection with SIVmac239; C: The CPE of CEMx174 cells 6 days post infection with SIVmac239

Fig. 1 The cytopathic effect (CPE) of CEMx174 cells infected with SIVmac239



注:A:培养上清中病毒载量的变化;B:SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 mRNA 相对表达量变化; C: SAMHD1 mRNA 的相对表达量和病毒载量相关性分析

图 2 SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中 SAMHD1 mRNA 相对表达量和上清中病毒载量的变化及两者之间相关性分析

Note. A: The changes of viral loads; B: The change of SAMHD1 mRNA relative expression; C: The correlation between viral loads and SAMHD1 mRNA relative expression

Fig. 2 The relationship between the relative expression of SAMHD1 mRNA and the viral RNA level in SIVmac239-infected CEMx174 cells

参内基因 GAPDH 的相对表达量,在前 3 d 分别比第 0 天增加了 14%, 16%, 42%, 呈现缓慢增加趋势。随后开始迅速增加,第 4 天达到了 200%,第 6 天更是达到了 890% (图 2B)。

SAMHD1 mRNA 相对表达量与培养上清中病毒 RNA 载量呈正相关, $R = 0.6673, P < 0.01$; (图 2C)。

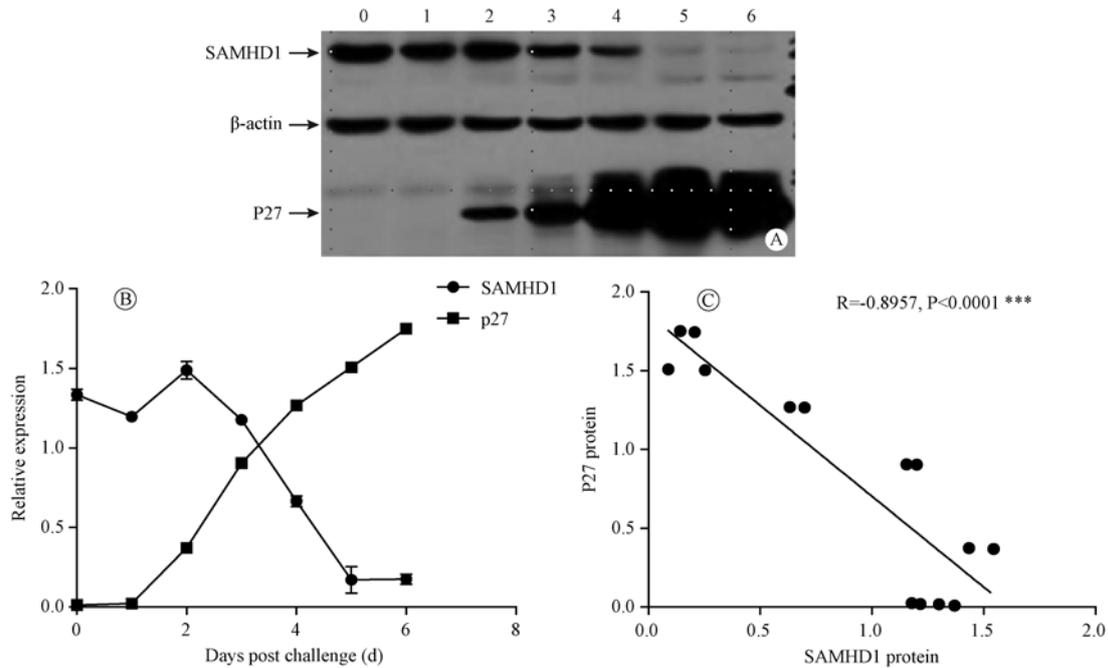
2.3 SIVmac239 感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 和 P27 蛋白表达水平变化

CEMx174 细胞感染 SIVmac239 后,细胞中 SAMHD1 蛋白的表达量在第 1、2 天时变化不大,随后逐渐降低,到第 5、6 天时,几乎检测不到(图 3A)。在整个感染过程中,SAMHD1 蛋白的表达量总体呈现逐渐下降的趋势。而细胞中 SIV 病毒 P27 蛋白的含量却呈现逐渐递增的趋势。在感染后的第 2 天已经可以检测到 P27 蛋白,之后 4 d 表达量持续增加。

SIVmac239 病毒的 P27 蛋白与 SAMHD1 蛋白的表达量呈显著负相关, $R = -0.8957, P < 0.0001$ 。

3 讨论

早期研究表明,SAMHD1 做为天然抗艾滋病毒的蛋白质分子,在髓系树突细胞、巨噬细胞和 $CD4^+$ 静息 T 细胞中,通过降低胞内 dNTP 水平,阻止 HIV-1 病毒早期复制^[6],低的 dNTP 水平被认为是 SAMHD1 蛋白抑制病毒复制的重要指标。然而,WY Gao 等人^[7,8]发现活化的 $CD4^+$ T 细胞感染后,dNTP 含量没有明显下降,且显著高于静息细胞中 dNTP 水平,因此认为在活化的 T 细胞中,SAMHD1 蛋白不具有抗病毒作用。然而最新研究表明,SAMHD1 蛋白除了通过降解 dNTP 来发挥抑制病毒复制的作用,还能发挥 RNase 的功能来抗病毒



注:A: Western Blotting 电泳结果; B: SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞蛋白检测;
C: SAMHD1 与病毒 P27 蛋白相关性分析

图 3 SIVmac239 病毒感染 CEMx174 细胞中的 SAMHD1、P27 蛋白表达量检测及相关性分析

Note. A: Western blot showing expression of SIV P27 and SAMHD1 in SIV-infected CEMx174 cells; B: The relative expression of SIV P27 and SAMHD1 in SIV-infected CEMx174 cells; C: The correlation between SAMHD1 protein and P27 protein

Fig. 3 The correlation between the expression of SAMHD1 protein and the P27 protein in SIVmac239-infected CEMx174 cells

[7,9,10]。因此,在活化的 $CD4^+$ T 细胞中,dNTP 的含量比较高,并不能说明 SAMHD1 蛋白就没有发挥抗病毒功能。

CEMx174 细胞是由 T 淋巴细胞干细胞系 CEMR. 3 和 B 淋巴细胞干细胞系 721. 174 杂交而成的细胞系,被 SIV 病毒感染后能产生明显的细胞病变。本研究中,CEMx174 细胞感染 SIVmac239 病毒后,随着培养上清液中的病毒载量快速升高,细胞中病毒 P27 蛋白的表达水平也增加迅速。而 SAMHD1 的 mRNA 相对表达量在 4 d 后显著增加,与病毒载量呈正相关,可见细胞在感染过程中,上调了 SAMHD1 基因的表达;与之相反的是细胞中 SAMHD1 蛋白表达量从 4 d 后逐渐下降,第 5~6 天时基本检测不到,与 SIV 病毒 P27 蛋白量呈显著负相关。

前期研究表明,一些慢病毒如 HIV-2 和 SIV,可以编码 Vpx 蛋白来抑制细胞内抗病毒复制的蛋白。HIV-2 和一些 SIV 编码的 Vpx 蛋白,通过加载 SAMHD1 蛋白到 CRL4DCAF1E3 泛素连接酶上诱导 SAMHD1 蛋白酶体降解,通过降解 SAMHD1 蛋白可

以促进 HIV-1 病毒的反转录产物 cDNA 的积累,同时也明显促进人的单核细胞、及其来源的树突细胞和巨噬细胞的 HIV-1 的感染^[11]。在其他 SAMHD1 限制感染的细胞,如星形胶质细胞中,Vpx 也能发挥降解 SAMHD1 功能,促进这些细胞的感染^[12]。本研究使用的 CEMx174 细胞中的 SAMHD1 蛋白表达量的降低,可能与 SIVmac239 病毒产生的 Vpx 蛋白降解 SAMHD1 蛋白有关。SAMHD1 蛋白在活化的细胞中是否发挥抗病毒的功能有待进一步证实,但本研究中发现感染 SIV 的 CEMx174 细胞 SAMHD1 基因上调,蛋白含量下降,说明 SAMHD1 在感染过程中是起作用的。广谱表达的 SAMHD1 蛋白可能具有广谱的抗病毒作用,不只是在静息 $CD4^+$ T 细胞或髓系细胞中发挥作用。

参考文献:

- [1] Shingai M, Welbourn S, Brenchley JM, et al. The expression of functional Vpx during atogenous SIVmac infections of rhesus macaques suppresses SAMHD1 in $CD4^+$ memory T cells [J]. PLoS Pathog, 2015, 11(5): 1-23.
- [2] Ryoo J, Oh C, Choi J, et al. The ribonuclease activity of

- SAMHD1 is required for HIV - 1 restriction [J]. Nat Med, 2014, 20(8): 936 - 941.
- [3] Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, et al. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one-versus two-enzyme systems [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000, 16(13): 1247 - 1257.
- [4] Zhang R, Bloch N, Nguyen LA, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 replication and regulates inter-feron production in mouse myeloid cells [J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): 1 - 10.
- [5] Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic and myeloid - cell - specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx [J]. Nature, 2011, 474 (7353): 654 - 657.
- [6] Ballana I E, Esté JA. SAMHD1: at the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction [J]. Trends Microbiol, 2015, 23(11): 680 - 692.
- [7] Gao WY, Cara A, Gallo RC, et al. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(19): 8925 - 8928.
- [8] Wu L. SAMHD1: a new contributor to HIV-1 restriction in resting CD4⁺ T-cells [J]. Retrovirology, 2012, 23(9): 88.
- [9] Goncalves A, Kavayel E, Rice GI, et al. SAMHD1 is a nucleic-acid binding protein that is mislocalized due to Aicardi-Goutieres syndrome-associated mutations [J]. Hum Mutat, 2012, 33(7): 1116 - 1122.
- [10] Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates [J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 223 - 228.
- [11] Baldauf HM, Pan X, Erikson E, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells [J]. Nat Med, 2012, 18(11): 1682 - 1687.
- [12] Ayinde D, Casartelli N, Schwartz O. Restricting HIV the SAMHD1 way: through nucleotide starvation [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(10): 675 - 680.

[修回日期] 2016-02-01

(上接第 17 页)

- [8] Cooper D S, Claes D, Goldstein S L, et al. Follow-Up renal assessment of injury long-term after acute kidney injury (FRAIL-AKI) [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(1): 21 - 29.
- [9] Clement J. Considerations about a Chinese vaccine preventing a national form of epidemic acute kidney injury (AKI) [J]. Infect Dis (Lond), 2015, 135(12): 1 - 3.
- [10] Sun Y, Gao Q, Wu N, et al. Protective effects of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(2): 647 - 652.
- [11] Dahmani S, Rouelle D, Gressens P, et al. Characterization of the postconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation [J]. Anesthesiology, 2010, 112(2): 373 - 383.
- [12] Stoetzer C, Reuter S, Doll T, et al. Inhibition of the cardiac Na channel alpha-subunit Nav1.5 by propofol and dexmedetomidine [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2016, 389(3): 315 - 325.
- [13] Yao H, Chi X, Jin Y, et al. Dexmedetomidine Inhibits TLR4/NF-kappaB Activation and reduces acute kidney injury after orthotopic autologous liver transplantation in rats [J]. Sci Rep, 2015, 5: 16849.
- [14] 陈克研, 张毅男, 刁玉刚, 周锦, 张铁铮. 右美托咪定抑制肾缺血/再灌注炎症性反应 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(53): 9189 - 9195.
- [15] 李新灵, 雷钟, 杜靖, 等. 不同剂量右美托咪定对大鼠肾缺血再灌注后心肌组织损伤的影响 [J]. 医学研究生学报, 2015, (8): 809 - 814.
- [16] Miao Y S, Zhao Y Y, Zhao L N, et al. MiR-18a increased the permeability of BTB via RUNX1 mediated down-regulation of ZO-1, occludin and claudin-5 [J]. Cell Signal, 2015, 27(1): 156 - 167.
- [17] Cai H, Liu W, Xue Y, et al. Roundabout 4 regulates blood-tumor barrier permeability through the modulation of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 expression [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2015, 74(1): 25 - 37.

[修回日期] 2016-02-22

更 正

《中国比较医学杂志》2016 年 (26) 卷第 2 期首篇 (1 - 3 页) 文章: "浅谈实验动物微生物国家标准", 原作者为 "魏强, 秦川", 现作者更正为 "魏强"。特此更正。