

SIVmac251 感染增强恒河猴巨噬细胞 对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性

薛 婧 蒋 虹 傅春燕 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 SIVmac251 感染对 galectin-3 诱导恒河猴巨噬细胞凋亡的影响。方法 从健康猴和 SIVmac251 感染猴外周血分离单核细胞, 用 GM-CSF 与 IL-6 诱导单核细胞分化成巨噬细胞。巨噬细胞与 galectin-3 共孵育 5.5 h 后, 细胞经 PE-annexin V/PerCP-7AAD 染色, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果 无 galectin-3 诱导条件下健康猴与 SIVmac251 感染猴巨噬细胞中 annexin V 阳性细胞的百分率分别为 5.08% 与 4.87%。Galectin-3 诱导条件下健康猴巨噬细胞中 annexin V 阳性细胞的百分率升至 17.62%, SIVmac251 感染猴巨噬细胞中 annexin V 阳性细胞的百分率升至 45.56%, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 SIVmac251 感染增强恒河猴巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性。

【关键词】 巨噬细胞; 中国恒河猴; 半乳糖凝集素-3; 凋亡

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)10-0049-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.010.011

SIVmac251-infection enhances the sensitivity of rhesus macaque macrophages to galectin-3-induced apoptosis

XUE Jing, JIANG Hong, FU Chun-yan, 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 study the effect of SIVmac251-infection on galectin-3-induced apoptosis in macrophages of rhesus macaque. **Methods** Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of healthy or SIVmac251-infected rhesus macaques. The cells were induced to differentiate into macrophages by GM-CSF and IL-6. The macrophages were cultured for 5.5 hours at the presence of galectin-3. The cells were stained with PE-annexin-V/PerCP-7AAD and apoptosis was assayed by flow cytometry. **Results** The percentages of annexin-V⁺ cells without galectin-3 induction were 5.08% and 4.87% for macrophages from healthy or SIVmac251-infected rhesus macaques, respectively. The percentages of annexin-V⁺ cells with galectin-3 induction was increased to 17.62% and 45.56%, respectively. There were significant differences between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** SIVmac251-infection enhances the sensitivity to galectin-3-induced apoptosis in rhesus macaque macrophages.

【Key words】 Macrophage; Chinese-origin rhesus macaque; Galectin-3; Apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金(青年科学基金项目 81301437)。

[作者简介] 薛婧, 博士, 助理研究员, 从事实验动物病毒学和免疫学工作。E-mail: xuejing@cnilas.org。

[通讯作者] 魏强, 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。

艾滋病对人类健康与生命造成严重危害。尽管在艾滋病防治的研究与实践上已取得重大进展,但现有的药物都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,主要包括滤泡辅助性 CD4⁺ T 细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞以及造血干细胞等。因此,寻找清除艾滋病毒潜伏感染靶细胞的药物,以根治艾滋病成为当前艾滋病防治的研究热点^[1-2]。近年来,伴随糖组学的研究深入,人们越来越认识到半乳糖凝集素(galectin)在生命活动中的重要性^[3-6]。现已发现 galectin 家族有 15 个成员,它们经由与胞膜的相应受体结合,参与细胞间与细胞-基质间的粘附、细胞生长、细胞分化与凋亡、细胞因子分泌等多种生物学过程的调节^[7-8]。鉴于文献报道 HIV-1 感染致使人 T 细胞对 galectin-1 诱导凋亡的敏感性增强^[9],我们在恒河猴对 SIV 感染是否也能致使巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性增强做了初步探索。

1 材料和方法

1.1 试剂、动物及感染毒株

人重组 galectin-3 蛋白(R&D 公司)。PE-annexin V/PerCP-7AAD 凋亡检测试剂盒(BD Pharmingen 公司)。健康成年中国恒河猴(北京协尔鑫生物资源研究所)[SCXK(京)2005-2005],实验前经体检无异常,经过相关慢病毒(SIV、SRV-1, 2.5、STLV-1)间接免疫荧光法(IFA)检测为阴性。动物饲养及相关实验在动物生物安全三级实验室(ABSL-3)实验室中进行[SYXK(京)2009-0003]。SIVmac251 病毒为美国纽约 Aaron Diamond 艾滋病研究中心 Marx 博士惠赠。

1.2 SIVmac251 感染恒河猴

将麻醉好的实验猴放在操作台上,病毒原液用无血清 1640 培养基稀释后,10 000 TCID₅₀/mL 静脉感染中国恒河猴。

1.3 SIVmac251 感染猴血浆病毒载量的测定

定期采集 EDTA 抗凝全血,分离血浆提取病毒

RNA,使用 SYBR green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法测定血浆病毒载量^[10]。

1.4 外周血单核巨噬细胞制备

抗凝条件下抽取猴静脉血,用密度梯度离心法分离并获得猴外周血单个核细胞(PBMC),塑料培养皿贴壁法分离单核细胞,经 GM-CSF 与 IL-6 刺激 4~5 d 诱导单核细胞分化成巨噬细胞^[11]。

1.5 SIVmac251 感染细胞的确定

抗凝条件下抽取健康猴和感染猴静脉血,分别获得猴淋巴细胞和巨噬细胞,收集细胞培养上清提取病毒 RNA,使用 SYBR green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法测定细胞培养上清病毒载量。

1.6 细胞凋亡的诱导与检测

分别取健康猴和 SIVmac251 感染猴的巨噬细胞(5×10^5 细胞/60 μ L 培养基),置于 96 孔板培养,实验组每孔添加 3 μ mol/L galectin-3,对照组不添加 galectin-3。细胞在 5% CO₂ 37℃ 条件下孵育 5.5 h。收获细胞,细胞经 PE-annexin V/PerCP-7AAD 染色,流式细胞仪(FACS Aria; BD)检测细胞凋亡情况。

1.7 统计方法

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, $P < 0.01$ 具有差异显著性。

2 结果

2.1 SIVmac251 感染恒河猴外周血血浆病毒载量的动态变化

图 1 为 SIVmac251 静脉感染恒河猴外周血血浆病毒载量动态变化,感染后 11 d 血浆病毒载量呈阳性,14 d 达到 1.74×10^6 copies/mL。14、18、21、25 d 采集 EDTA 抗凝血分离 PBMC。18、21、25 d 的血浆病毒载量分别为 1.26×10^6 copies/mL、 1.95×10^5 copies/mL 和 1.78×10^5 copies/mL。

2.2 SIVmac251 感染恒河猴巨噬细胞的制备与鉴定

从健康猴和上述 SIVmac251 感染猴的外周血分离并制备巨噬细胞,以感染猴淋巴细胞培养上清病毒载量结果作为阳性对照,检测健康猴和感染猴巨噬细胞培养上清中的病毒载量情况。图 2 显示,健康猴巨噬细胞的病毒载量为阴性,SIVmac251 感染猴的巨噬细胞病毒载量(8.32×10^3 copies/mL)与淋巴细胞病毒载量(2.29×10^5 copies/mL)均为阳性。

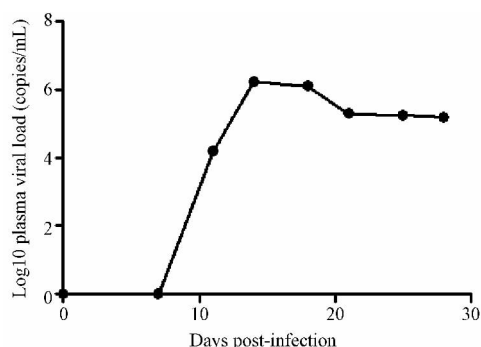


图 1 SIVmac251 感染恒河猴血浆病毒载量动态变化

Fig. 1 Dynamic changes of plasma viral loads in SIVmac251-infected rhesus macaque

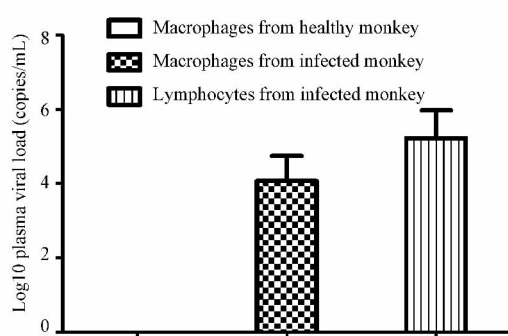


图 2 SIVmac251 感染猴外周血巨噬细胞培养上清的病毒载量

Fig. 2 Viral loads in the culture supernatants of macrophages from SIVmac251-infected rhesus macaque

2.3 SIVmac251 感染增强巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性

PE-annexin V⁺/PerCP-7AAD⁺ 代表晚期凋亡细胞, PE-annexin V⁺/PerCP-7AAD⁻ 代表早期凋亡细胞。图 3A 显示在 galectin-3 作用下, 健康猴巨噬细胞中 PE-annexin V⁺/PerCP-7AAD⁺ 的细胞占 12.16% (无 galectin-3 条件下为 2.44%), PE-annexin V⁺/PerCP-7AAD⁻ 的细胞占 5.46% (无 galectin-3 条件下为 2.64%), 而 SIVmac251 感染猴巨噬细胞中 PE-annexin V⁺/PerCP-7AAD⁺ 的细胞则占 21.55% (无 galectin-3 条件下为 2.40%), PE-annexin V⁺/PerCP-7AAD⁻ 的细胞则占 24.01% (无 galectin-3 条件下为 2.47%)。以 annexin V⁺ 计算细胞凋亡率, galectin-3 诱导健康猴巨噬细胞凋亡从 5.08% 到 17.62%, 而诱导 SIVmac251 感染猴巨噬细胞凋亡从 4.87% 增加到 45.56%。图 3B 显示健康猴和 SIVmac251 感染猴巨噬细胞经 galectin-3 诱导前后的细胞凋亡率, SIVmac251 感染猴巨噬细胞

经 galectin-3 诱导后的凋亡率明显高于健康猴巨噬细胞, 表明 SIVmac251 感染增强巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性 (**P* < 0.01)。

3 讨论

艾滋病毒的潜伏感染是艾滋病治疗的最大挑战之一。由于艾滋病毒潜伏感染靶细胞在机体内长期存活, 从而导致艾滋病患者抗病毒治疗停药后体内的艾滋病毒量快速反弹。寻找清除艾滋病毒潜伏感染靶细胞的药物, 从而实现艾滋病的功能性治愈是目前国际上的研究热点。巨噬细胞是一类重要的艾滋病毒潜伏感染靶细胞^[1, 2]。鉴于 galectin-3 的重要生物学作用, 国际上正把它作为肿瘤和炎症性疾病等多种疾病的治疗靶点进行研究^[12, 13]。本研究观察到 galectin-3 能诱导恒河猴巨噬细胞凋亡, 且 SIVmac251 感染致使巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性增强。这个现象提示了 galectin-3 可能作为清除艾滋病毒潜伏感染巨噬细胞的一个值得深入研究的候选者。

Galectin 经由与相应受体分子的 β-半乳糖残基的聚糖结合, 形成多价复合物, 参与细胞-细胞间与细胞-基质间的粘附, 细胞生长、分化与凋亡, 细胞因子的分泌等多种生物学过程的调节^[7, 8]。Galectin-1 和 galectin-3 都可以与细胞表面的 CD29、CD43 和 CD45 分子结合, 此外, galectin-3 还可以与 CD71 分子结合, galectin-1 则可以与 CD7、CD2 分子结合^[14]。这些受体分子在多种细胞表面表达, 如 CD45 既表达于 T 细胞, 也表达于巨噬细胞^[14, 15]。同类细胞也可能表达 galectin 家族的多个成员, 如 T 细胞既表达 galectin-1, 也表达 galectin-3^[14, 16], galectin-1 和 galectin-3 也表达于巨噬细胞^[17, 18]。因此, 有关 galectin 对细胞生物学行为的影响及机制研究可以相互参考。如 Lantéri 等报道, HIV-1 感染致使 T 细胞表面糖基化改变, 尤其表现为唾液酸化减弱、核心 2-O-聚糖增加和细胞表面 CD43、CD45 分子的 β-半乳糖残基增加, 这使得发生糖基化改变的细胞与 galectin-1 的结合增强, 从而对 galectin-1 诱导的凋亡敏感^[9]。鉴于 CD45 分子也是 galectin-3 的受体, 它也在巨噬细胞表面广泛表达, 因此上述 HIV-1 感染所致的 T 细胞表面糖基化改变也可能发生于 SIVmac251 感染的恒河猴巨噬细胞。这为研究 SIVmac251 感染增强恒河猴巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡敏感性的机制提供了参考。考虑到作为

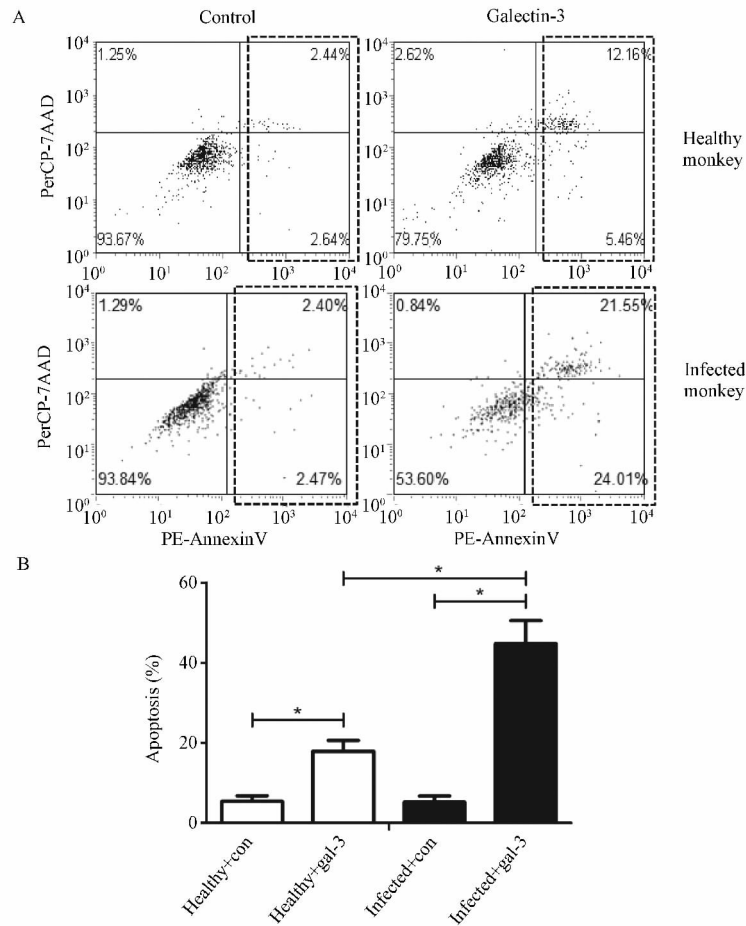


图3 SIVmac251 感染增强巨噬细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性

Fig. 3 SIVmac251 infection enhanced the sensitivity of macrophages to galectin-3-induced apoptosis

galectin-3 受体的 CD45 也在 T 细胞表面表达, 尽管尚未有报道, 可以设想 SIVmac251 感染也会影响 T 细胞对 galectin-3 诱导凋亡的敏感性。

参考文献:

- [1] Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication [J]. *Immunity*, 2012, 37: 377-388.
- [2] Vinuesa CG. HIV-1 and T follicular helper cells: a dangerous relationship [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 3059-3062.
- [3] Kaltner H, Gabius HJ. A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors [J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27: 397-416.
- [4] Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future [J]. *Clin Immunol*, 2012, 142: 107-116.
- [5] Sundblad V, Croci DO, Rabinovich GA. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues [J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26: 247-265.
- [6] St-Pierre C, Ouellet M, Tremblay MJ, et al. Galectin-1 and HIV-1 Infection [J]. *Methods Enzymol*, 2010, 480: 267-294.
- [7] Demetter P, Nagy N, Martin B, et al. The galectin family and digestive disease [J]. *J Pathol*, 2008, 215: 1-12.
- [8] Dhirapong A, Lleo A, Leung P, et al. The immunological potential of galectin-1 and -3 [J]. *Autoimmun Rev*, 2009, 8: 360-363.
- [9] Lantéri M, Giordanengo V, Hiraoka N, et al. Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death [J]. *Glycobiology*, 2003, 10(12): 909-918.
- [10] 丛喆, 李兆忠, 魏强, 等. SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒(SIV) RNA 拷贝数方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(4): 271-275.
- [11] Swingle S, Mann AM, Zhou J, et al. Apoptotic killing of HIV-1-infected macrophage is subverted by the viral envelop glycoprotein [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(9): e134.
- [12] Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, et al. The roles of galectin-3 in autoimmunity and tumor progression [J]. *Immunol Res*, 2012, 52: 100-110.
- [13] Nangia-Makker P, Nakahara S, Hogan V, et al. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39: 79-84.

(下转第 57 页)

参考文献:

- [1] Chung L, Ru L, Yi MS, et al. Propofol protects against hemorrhagic shock-induced organ damage in conscious spontaneously hypertensive rats [J]. *Biol Res Nurs*, 2009, 11: 152–162.
- [2] Tang Y, Xia XF, Zhang Y, et al. Establishment of an experimental mouse model of trauma-hemorrhagic shock [J]. *Exp Anim*, 2012, 61(4): 417–425.
- [3] 邱波, 王艳, 胡建廷, 等. SD 大鼠与巴马小型猪的皮肤组织学比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 6: 14–15.
- [4] 吴丰春, 魏鸿, 甘世祥, 等. 巴马小型猪与贵州小型香猪遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *实验生物学报*, 2001, 34(2): 115–119.
- [5] Silva GV, Fernandes MR, Madonna R, et al. Comparative healing response after sirolimus- and paclitaxel-eluting stent implantation in a pig model of restenosis [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2009, 73(6): 801–808.
- [6] 谢萍, 王喆, 陆承荣, 等. 氯胺酮与速眠新-硫喷妥钠对犬麻醉效果的观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 4: 64–65.
- [7] Jin G, Duggan M, Imam A, et al. Pharmacologic resuscitation for hemorrhagic shock combined with traumatic brain injury [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 73(6): 1461–1470.
- [8] 田明, 刘莺莺, 汪爱媛, 等. 四肢战伤高发生率、高伤残率特点及致残原因分析 [J]. *武警医学*, 2012, 23(9): 747–749.
- [9] 吴曙光, 王明镇, 詹新义, 等. 在动物福利和“3R”原则的指导下建立贵州小型猪的实验方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 10: 76–78.
- [10] 陈克研, 张贺, 陈振文, 等. 巴马小型猪大肠埃希菌的分离鉴定及耐药性试验 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 7: 40–43.
- [11] 王喆, 陆承荣, 王红. 氯胺酮与速眠新-硫喷妥钠对犬麻醉效果的观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 9: 564–565.
- [12] 王洋, 陈克研, 张贺, 等. 丙泊酚静脉麻醉与异氟醚吸入麻醉在巴马小型猪实验中的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 7: 25–28.

(修回日期)2013-08-24

(上接第 48 页)

- [12] Gupta S, Fransen S, Paxinos EE, et al. Combinations of mutations in the connection domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: assessing the impact on nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 1973–1980.
- [13] Alexander L, Denekamp L, Czajak S, et al. Suboptimal nucleotides in the infectious, pathogenic simian immunodeficiency virus clone SIVmac239 [J]. *J Virol*, 2001, 75(8): 4019–4022.
- [14] Newstein MC, Desrosiers RC. Effects of reverse-transcriptase mutations M184V and E89G on simian immunodeficiency virus in Rhesus monkeys [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(10): 1262–1267.

(修回日期)2013-08-26

(上接第 52 页)

- [14] Stillman BN, Hsu DK, Pang M, et al. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death [J]. *J Immunol*, 2006, 176: 778–789.
- [15] 陈慰峰, 主编. 医学免疫学(第 4 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2005: 272–273.
- [16] Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(13): 6737–6742.
- [17] Rabinovich GA, Riera CM, Sotomayor CE. Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(5): 557–567.
- [18] Dragomir AC, Sun R, Choi H, et al. Role of galectin-3 in classical and alternative macrophage activation in the liver following acetaminophen intoxication [J]. *J Immunol*, 2012, 189(12): 5934–5941.

(修回日期)2013-09-06