

DOI:10.13350/j.cjpb.220805

· 论著 ·

HIV-1 临床株 SC42 无感染性细胞-细胞融合模型的构建*

石哲芳¹, 魏雪玲¹, 刘奇^{1**}

(大理大学基础医学院病原生物学综合实验室, 云南大理 671000)

【摘要】 **目的** 构建一种无感染性、可视化,用于检测 HIV-1 进入抑制剂在临床株 SC42 上的抑制活性的 HIV 细胞-细胞融合模型。 **方法** 将 HIV-1 SC42 *env* 基因插入质粒 pAAV-IRES-EGFP,获得可同时且分别表达 HIV-1 SC42 *env* 及 GFP 的真核表达质粒,经过转染 293T 细胞,使之同时表达这两种蛋白(293T/SC42/EGFP),作为模拟 HIV 病毒的效应细胞与靶细胞 TZM-b1 共同培养,观察细胞融合情况及合胞体的形成。使用经典 HIV-1 进入抑制剂 C34 和 T1144 检测该细胞融合模型的效果。 **结果** 效应细胞 293T/SC42/EGFP 和靶细胞 TZM-b1 细胞混合 2 h 后,在荧光显微镜下可见明显的细胞融合现象;24 h 后可形成合胞体。HIV-1 进入抑制剂 C34、T1144 能够抑制细胞融合,其 IC₅₀ 分别为 (600±6.22) nmol/L 和 (44±5.88) nmol/L。 **结论** 成功构建了 HIV-1 进入抑制剂药物检测筛选模型。该模型的构建无需在 P3 生物安全实验室完成,操作简单、方便且无感染性。

【关键词】 HIV-1;SC42;*env*;进入抑制剂;细胞-细胞融合

【中图分类号】 R373.9

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)08-0892-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Aug.;17(8):892-895, 900.]

Construction of a non-infectious cell-cell fusion model of HIV-1 clinical strain SC42

SHI Zhe-fang¹, WEI Xue-ling¹, LIU Qi¹ (*Integrated Lab of Pathogenic Biology, Pre-clinical College, Dali University, Dali 671000, Yunnan, China*)

【Abstract】 **Objective** To construct a non-infectious, visualized HIV cell-cell fusion model for testing the inhibitory activity of HIV-1 entry inhibitors on clinical strain SC42. **Methods** By inserting the HIV-1 SC42 *env* gene into the plasmid pAAV-IRES-EGFP, a eukaryotic expression plasmid that can simultaneously and separately express HIV-1 SC42 *env* and GFP was obtained, and 293T cells were transfected to express these two proteins simultaneously (293T/SC42/EGFP), as effector cells mimicking HIV virus, co-cultured with target cells TZM-b1, and observed cell fusion and the formation of syncytia. The effect of this cell fusion model was tested using the classical HIV-1 entry inhibitors C34 and T1144.

Results After mixing effector cells 293T/SC42/EGFP and target cells TZM-b1 cells for 2 hours, obvious cell fusion phenomenon can be seen under the fluorescence microscope; after 24 hours, syncytia can be formed. HIV-1 entry inhibitors C34 and T1144 can inhibit cell fusion with IC₅₀ of 600±6.22 nmol/L and 44±5.88 nmol/L, respectively. **Conclusion** A screening model for HIV-1 entry inhibitor drug detection was successfully constructed. The construction of this model does not need to be completed in the P3 biosafety laboratory, and the operation is simple, convenient and non-infectious.

【Key words】 HIV-1;SC42;*env*;emerging;entry inhibitor;cell-cell fusion

***人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus, HIV-1)的感染及其引起的艾滋病仍然是全球所面临的重大公共问题^[1]。在 HIV-1 侵染靶细胞的过程中,病毒包膜糖蛋白(Env)介导的膜融合是关键步骤。能阻断 HIV-1 侵染靶细胞过程的药物被称为 HIV 进入抑制剂。根据病毒进入靶细胞的过程,可将 HIV 进入抑制剂分为 3 类:1)吸附抑制剂,以 gp120 和 CD4 的结合为研究靶点;2)辅助受体抑制剂,以 CCR5 或 CXCR4 的共受体结合为研究靶点;3)融合抑制剂,以 gp41 的 NHR 和 CHR 以及近膜外侧区(membrane-proximal external region, MPER)为研究靶点。其中,检测 HIV 融合抑制剂最重要的模型是

HIV Env 介导的细胞-细胞融合模型^[2]。传统细胞融合试验需要使用感染 HIV 的细胞与靶细胞进行融合反应^[3],具有一定感染性,因此只能在 P3 生物安全实验室进行。

SC42 是 HIV B 亚型的代表株之一^[4],常用于抗 HIV-1 药物的活性测定。本研究拟构建一种能同时

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81703573, 81660337);大理大学创新团队项目(No. ZKXLX2019105)。

** **【通讯作者】** 刘奇, E-mail: Qiliu@aliyun.com

【作者简介】 石哲芳(1991-),女,河北石家庄人,在读研究生,主管检验师。主要研究方向:感染与免疫。
E-mail:550149827@qq.com

表达 SC42 的 Env 及绿色荧光蛋白 GFP 的真核表达质粒,瞬转 293T 细胞后作为效应细胞,用于检测 HIV-1 介导的细胞-细胞融合的非感染性检测模型。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株、质粒、细胞和多肽 DH-5 α 感受态细胞购于天根生物科技有限公司。载体质粒 pAAV-IRES-EGFP,含有 SC42 *env* 基因的 pCDNA-SC42,以及 293T 细胞和 TZM-b1 细胞由本实验室保存。HIV 进入抑制剂 C34 (WMEWDREINNYTSLIH-SLIEESQNQQEKNEQELL)和 T1144(TTWEAWD-RAIAEYAARIEALLRALQEQQEKNEAALREL)由浙江昂拓莱司公司合成。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 BamH I 和 Xho I,以及 T4 DNA Ligase 购于日本 Takara 公司;Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase PCR 扩增试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DNA 纯化试剂盒,小提质粒试剂盒和大提质粒试剂盒均购于天根生化科技有限公司;转染试剂 EZ Trans 购于 Life-iLab 李记生物公司;DMEM 培养基及细胞冻存液购自大连美仑生物科技有限公司;胎牛血清购自美国 ThermoFisher 公司;胰蛋白酶,青链霉素混合液,BSA,TMB,以及 4%甲醛缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司;CD4(含人 Fc 标签)蛋白购自北京义翘神州科技股份有限公司;羊抗人 IgG 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

2 方 法

2.1 引物设计与合成 根据 HIV-1 SC42 *env* 基因序列(GenBank 登录号:AY835441)设计 PCR 引物。上游引物(SC42-F):5'-GGAATTC-ATGAGAGT-GAGGGAGACCAG-3';下游引物(SC42-R):5'-CCTCGAGAATATTGTTTCGGGAAAGTT-3'(下划线处分别是 BamH I 和 Xho I 酶切位点)。引物由昆明擎科生物科技有限公司合成。

2.2 SC42 *env* 基因的扩增 以含有 SC42 *env* 基因的质粒 pCDNA-SC42 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系:2 \times Phanta Max Buffer 50 μ L,Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 2 μ L,dNTP Mix (10 mmol/L each) 2 μ L,SC42-F 4 μ L,SC42-R 4 μ L,DNA 模板 4 μ L,补水至 100 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.3 重组质粒 pAAV-IRES-EGFP-SC42 的构建 回收纯化 SC42 *env* 基因 PCR 产物,用 BamH I 和 Xho I

双酶切。酶切体系:限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 各 2 μ L,10 \times FastDigest Green Buffer 10 μ L,DNA 2 μ g,补水至 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 20 min 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并回收目的片段,与同样酶切的 pAAV-IRES-EGFP 载体片段连接。连接体系:SC42 *env* 基因片段与载体 pAAV-IRES-EGFP 的摩尔比为 7 : 1,10 \times T4 DNA Ligase Buffer 2 μ L,T4 DNA Ligase 1 μ L,补水至 20 μ L,混匀,4 $^{\circ}$ C 反应过夜。连接产物转化感受态细胞 DH-5 α ,涂板培养后挑取单个克隆,小提质粒进行酶切验证,含有 2.9 kb 片段的阳性克隆委托昆明擎科生物科技有限公司进行测序。

2.4 细胞培养及转染 293T 及 TZM-b1 细胞均使用含 10% 胎牛血清、1% 双抗(青、链霉素混合液)的高糖 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。转染前 24 h,293T 细胞提前铺于 6 孔板(6 \times 10⁵/孔),培养至密度达 80% 左右且细胞形态良好时采用 Life-iLab 李记生物公司的 EZ Trans 转染试剂进行转染:3 μ g 质粒 DNA 稀释于 125 μ L 无血清和抗生素的 DMEM 培养基。同时取 EZ Trans 9 μ L 加到 125 μ L 无血清和抗生素的 DMEM 培养液中,混匀后一次性加入到已稀释的质粒 DNA 溶液中,室温放置 15 min;将上述 250 μ L EZ Trans-DNA 转染复合物均匀滴入 293T 细胞的培养孔中转染 12~18 h,更换培养基,继续培养至 36~48 h。试验以转染 pAAV-IRES-EGFP-SC42 质粒的 293T 细胞作为效应细胞(293T/SC42/EGFP),转染 pAAV-IRES-EGFP 质粒的 293T 细胞作为阴性对照(293T/EGFP)细胞。

2.5 细胞 ELISA 检测培养细胞 SC42 *env* 表达水平 参照文献[5]的方法进行。去除 293T/SC42/EGFP 和 293T/EGFP 培养基,用 PBS 洗 2 次;每孔加入 10% 甲醛 125 μ L,室温固定 15 min,双蒸水洗 3 次,晾干;每孔加入含 2% BSA 的 PBS 250 μ L,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,双蒸水洗 3 次;加入用含 1% BSA 的 PBS 稀释的 CD4(1 : 5000) 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,双蒸水洗板 5 次;加入 50 μ L 用含 1% BSA 的 PBS 稀释的羊抗人 IgG(1 : 10000)50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,双蒸水洗板 5 次;加入 TMB 显色剂 50 μ L,室温显色 20 min;加入 25 μ L 10% H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪测 A₄₅₀ 值,此 A 值反映 293T/SC42/EGFP、293T/EGFP 细胞上 SC42 *env* 的表达水平。

2.6 HIV-1 SC42 介导的细胞-细胞融合试验 细胞融合前 1 d 将靶细胞 TZM-b1 铺于 96 孔板(5 \times 10⁴/孔)。效应细胞 293T/SC42/EGFP 和阴性对照细胞 293T/EGFP 经消化、重悬后加入到预先铺有靶细胞 TZM-b1 的 96 孔板上,在 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。使用荧光显微镜的绿色荧光通道观察细胞

融合情况。

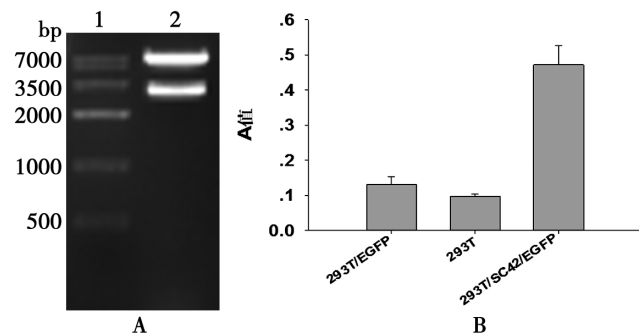
2.7 阳性药物的抑制活性测定 以 C34 和 T1144 为 HIV 进入抑制剂阳性药物^[6-7] 测定其在本模型的抑制活性。以 293T/SC42/EGFP 与 TZM-b1 共培养作为阳性孔,以 293T/EGFP 与 TZM-b1 共培养作为阴性孔,以 C34 或 T1144 与 293T/SC42/EGFP 及 TZM-b1 共培养作为检测孔。于 1 h 后记录各孔的细胞融合情况,同时计算检测孔中 C34、T1144 中对细胞融合的抑制率。抑制率(%) = $[1 - (E - N)/(P - N)] \times 100\%$ 。其中“E”为 验组的细胞融合率;“P”和“N”分别为融合对照和阴性组的细胞融合率。使用 Cal-susyn 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

结 果

1 293T/SC42/EGFP 的质粒构建、转染及鉴定

以 HIV-1 SC42 的 DNA 为模板 PCR 扩增 *env* 基因全长。扩增产物经 BamH I 和 Xho I 双酶切后连接入同样酶切的 pAAV-IRES-EGFP 载体片段,连接产物转化至 DH-5 α 感受态细胞并进行培养。抽提质进行 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定,得到 6.1 kb 的载体片段和 2.9 kb 的 *env* 基因片段(图 2A),重组 pAAV-IRES-EGFP-SC42 *env* 质粒构建成功。对重组质粒测序,结果与 HIV-1 SC42 *env* 基因序列完全吻合。

细胞 ELISA 检测 SC42 *env* 的表达情况,结果见图 1B。其中,293T 细胞 A 值为 0.098 \pm 0.066, pAAV-IRES-EGFP 转染后的 293T 细胞 A 值为 0.148 \pm 0.034,转染 pAAV-IRES-GFP-SC42 的 293T 细胞 A 值为 0.472 \pm 0.056。P/N 值(A_{293T/SC42/EGFP}/A_{293T/EGFP}) = 4.11 \pm 1.09 (≥ 2.1),表明转染后的 293T 细胞(293T/SC42/EGFP)成功表达 SC42 *env*。

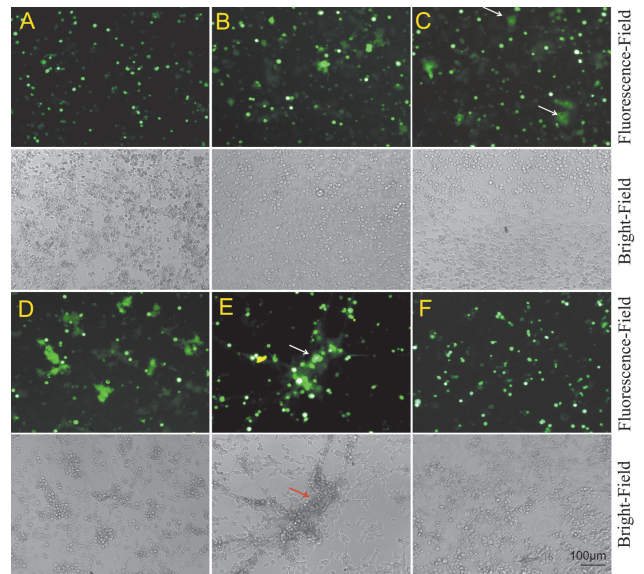


A pAAV-IRES-EGFP-SC42 双酶切鉴定 1 DNA 标志物 2 pAAV-IRES-EGFP-SC42 质粒双酶切 B ELISA 检测各组细胞表达的 *env* A 值

图 1 pAAV-IRES-EGFP-SC42 的质粒构建及 *env* 表达鉴定

A Double enzyme digestion identification of pAAV-IRES-EGFP-SC42 1 DNA marker 2 double digestion of pAAV-IRES-EGFP-SC42 plasmid B ELISA detected the *env* A value expressed by cells in each group

Fig. 1 Plasmid construction of pAAV-IRES-EGFP-SC42 and *env* expression identification



A、B、C、D、E 分别为 293T/SC42/EGFP 细胞与 TZM-b1 细胞混合 30 min 及 1、2、4、24 h 后的细胞融合形态 F 293T/EGFP 细胞与 TZM-b1 细胞混合 24 h 后的细胞形态(阴性对照)

图 2 HIV SC42 *env* 介导的细胞-细胞融合

A、B、C、D、E Cell fusion morphology after mixing 293T/SC42/EGFP cells and TZM-b1 cells for 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, and 24 h F The cell morphology of 293T/EGFP cells mixed with TZM-b1 cells for 24 hours as a negative control

Fig. 2 HIV SC42 *env* mediated cell-cell fusion

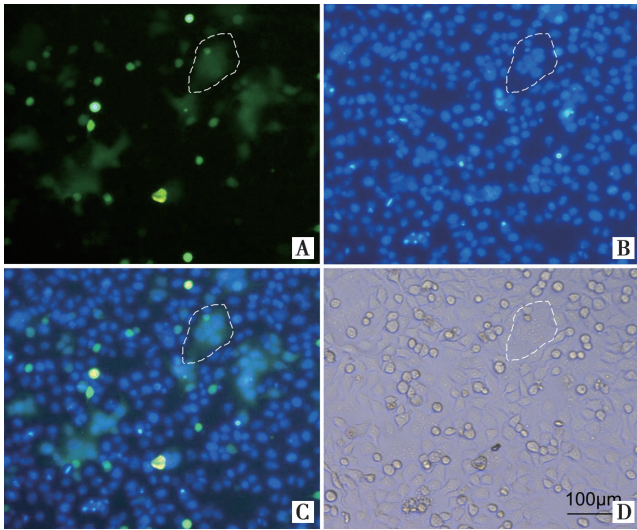
2 293T/SC42/EGFP 与 TZM-b1 细胞的融合

TZM-b1 细胞可感染各种嗜性的 HIV 病毒^[8]。因此使用 TZM-b1 作为细胞融合试验的靶细胞,效应细胞为上述步骤中得到的 293T/SC42/EGFP,293T/EGFP 作为阴性对照,与 TZM-b1 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中共同孵育,结果如图 2B。效应细胞 293T/SC42/EGFP 与 TZM-b1 靶细胞在 37 $^{\circ}$ C 共同培养 1 h 后,部分带有 GFP 的圆形细胞成为面积增大、荧光强度变弱的不规则型的细胞。这是 293T/SC42/EGFP 与 TZM-b1 发生融合时,GFP 从 293T/SC42/EGFP 扩散到靶细胞 TZM-b1,从而导致绿色荧光在形成的融合细胞中重新分布。对照组 293T/EGFP 未发生融合,进一步提示细胞融合是由 HIV-1 SC42 *env* 介导的。

共培养 24 h 后,细胞与细胞之间形成更大的合胞体,在光学视野和荧光视野下均可看到合胞体(图 2E 箭头所指)。对照组在培养过程中既未发生融合,也未形成大的合胞体。

进一步使用 4',6-二脒基-2-苯基吲(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对融合细胞进行细胞核染色。DAPI 为可与细胞核中的双链 DNA 结合的荧光染料,通过附着在 DNA 序列中形成荧光复合物。通过紫外光激发,发出 461 nm 的蓝色荧光。DAPI 染核后发生融合的细胞可见多个细胞核(图 3 框选区域),

未融合的细胞只有1个细胞核。进一步证实图中绿色荧光范围增大、荧光变暗的细胞为293T/SC42/EGFP与TZM-b1发生细胞融合的产物。



A 绿色荧光视野下的融合细胞 B 经 DAPI 染色的细胞核 C 绿色荧光和 DAPI 的重叠图片 D 融合细胞的白光视野

图3 融合细胞的细胞核染色

A Green fluorescence field of fused cells B Nucleus stained with DAPI C Overlapping pictures of green fluorescence and DAPI D Bright-field of fused cells.

Fig. 3 Nuclear staining of fused cells

3 HIV 进入抑制剂的活性检测

为判断建立的无感染性 HIV-1 SC42 *env* 介导的细胞-细胞融合模型能否被 HIV-1 进入抑制剂阻断, 选用了经典 HIV 进入抑制剂 C34 和 T1144 作为阳性药物进行测定, 同时用广谱冠状病毒融合抑制剂 EK1 作阴性对照^[9]。结果显示(图 4), HIV-1 进入抑制剂 C34 和 T1144 均可以剂量依赖性方式有效抑制 SC42 *env* 介导的细胞-细胞融合, 而 EK1 则对其融合无任何抑制作用。其中 C34 的 IC₅₀ 为(600±6.22)nmol/L, T1144 的 IC₅₀ 为(44±5.88)nmol/L, 与文献[6, 7, 10]报道的 IC₅₀ 值接近。

讨论

抗逆转录病毒疗法现已在延长患者寿命和降低患者死亡率方面显示出显著的效果, 但其毒性和耐药性等问题的日益严重, 迫切需要开发新型抗 HIV 药物^[11]。进入抑制剂因其在病毒进入靶细胞前就能发挥作用, 在感染最初阶段就可将病毒传播路径切断, 从而在预防和治疗 HIV 感染具有独特的优势。为了寻找新的 HIV 进入抑制剂, 需要建立特异的 HIV 包膜蛋白诱导的细胞-细胞融合方法。

传统细胞融合试验是将感染 HIV-1_{III B} 病毒株的 H9 细胞与 MT-2 细胞^[3], 或者 H9^[12] 共孵育, 两者可在悬浮状态下形成合胞体。此方法虽廉价、快速、方

便, 但需要使用感染 HIV-1 病毒的细胞与靶细胞进行融合反应, 具有一定感染性, 因此只能在 P3 实验室防护下进行, 从而限制了在普通实验室的广泛推行。因此需要尝试构建一种无感染性的方法, 从而可以在普通实验室进行。王小利等^[13] 建立了基于包膜蛋白和 Tat 蛋白筛选 HIV-1 细胞融合抑制剂的方法, 该方法利用编码 β-半乳糖苷酶和荧光素酶的报告基因来进行细胞-细胞融合分析。但由于当两种细胞融合时影响任一蛋白之间的相互作用过程, 均会导致报告基因的变化, 使得这些分析可能对细胞-细胞融合没有特异性。

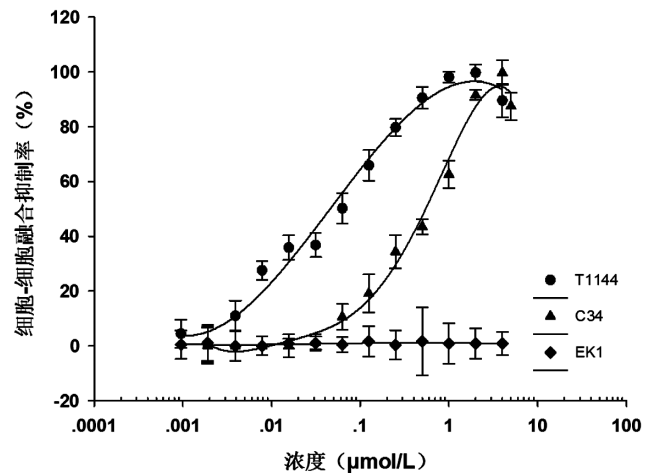


图4 SC42 *env* 介导的细胞-细胞融合模型 HIV 进入抑制剂抑制活性
Fig. 4 Inhibitory activity of HIV entry inhibitor on *env*-mediated cell-cell fusion model of SC42

SC42 属于 HIV-1 B 亚型临床毒株, 并作为 B 亚型的标准参考株最早用于疫苗诱导中和抗体的标准化评估^[4]。本研究构建了一种基于 SC42 *env* 的细胞-细胞融合模型, 采用的 293T 细胞可同时表达 SC42 *env* 和 GFP, 并模拟了 HIV-1 进入细胞的步骤。其中, SC42 *env* 介导细胞融合的发生, 而 GFP 可用于明确哪些细胞可以表达 *env* 并与 TZM-b1 发生特异性融合, 还可通过该细胞-细胞融合模型评估已知进入抑制剂的抑制浓度。由于 SC42 是临床分离株, 存在耐药性, 导致在该模型 C34 和 T1144 的 IC₅₀ 值均大于其在实验株 NL43 的 IC₅₀ 值^[14]。

本研究建立了细胞-细胞融合模型, 反应过程无感染性, 可在普通实验室进行, 可在荧光显微镜下肉眼观察。操作简单方便、特异性高、重复性好的 HIV-1 进入抑制剂检测模型可望用于 HIV-1 进入抑制剂的高通量筛选。

【参考文献】

[1] Xiao T, Cai Y, Chen B. HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors[J]. Viruses, 2021, 13(5):735.

(下转 900 页)

- 2005,175(5):3268-3272.
- [8] Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(11):a022616.
- [9] Gonzalez-Juarrero M, Kingry LC, Ordway DJ, et al. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* and identification of molecular markers of disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 40(4):398-409.
- [10] Bao X, Faris AE, Jang EK, et al. Molecular cloning, bacterial expression and properties of Rab31 and Rab32[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(1):259-271.
- [11] Cohen-Solal KA, Sood R, Marin Y, et al. Identification and characterization of mouse Rab32 by mRNA and protein expression analysis[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1651(1-2):68-75.
- [12] Spano S, Galan JE. A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella typhi* host restriction[J]. Science, 2012, 338(6109):960-963.
- [13] Lee HJ, Woo Y, Hahn TW, et al. Formation and maturation of the phagosome: a key mechanism in innate immunity against intracellular bacterial infection[J]. Microorganisms, 2020, 8(9):1298.
- [14] Hu Z, Rao C, Tang M, et al. Rab32 GTPase, as a direct target of miR-30b/c, controls the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* by regulating phagosome maturation[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(6):e1007879.
- [15] Solano-Collado V, Rofe A, Spano S. Rab32 restriction of intracellular bacterial pathogens[J]. Small GTPases, 2018, 9(3):216-223.
- [16] Cruz F, Colbert J, Rock KJTEJ. The GTPase Rab39a promotes phagosome maturation into MHC-I antigen-presenting compartments[J]. EMBO J, 2020, 39(2):e102020.
- [17] Tokuhisa M, Kadowaki T, Ogawa K, et al. Expression and localization of Rab44 in immune-related cells change during cell differentiation and stimulation[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):10728.
- [18] Vestre K, Persiconi I, Borg Distefano M, et al. Rab7b regulates dendritic cell migration by linking lysosomes to the actomyosin cytoskeleton[J]. J Cell Sci, 2021, 134(18):259221.
- [19] Li Y, Wang Y, Zou L, et al. Analysis of the rab GTPase interactome in dendritic cells reveals anti-microbial functions of the Rab32 complex in bacterial containment[J]. Immunity, 2016, 44(2):422-437.
- [20] Hoffmann C, Finsel I, Otto A, et al. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified Legionella-containing vacuoles from macrophages[J]. Cell Microbiol, 2014, 16(7):1034-1052.
- [21] Kohler A, Spano S, Galan J, et al. Structural and enzymatic characterization of a host-specificity determinant from *Salmonella* [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, 70(Pt 2):384-391.
- [22] Spano S, Gao X, Hannemann S, et al. A bacterial pathogen targets a host rab-family gtpase defense pathway with a GAP[J]. Cell Host Microbe, 2016, 19(2):216-226.
- [23] Savitskiy S, Wachtel R, Pourjafar-Dehkordi D, et al. Proteolysis of Rab32 by *Salmonella* GtgE induces an inactive GTPase conformation[J]. iScience, 2021, 24(1):101940.
- [24] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(9):a011189.
- [25] Datler H, Vogel A, Kerndl M, et al. PI3K activity in dendritic cells exerts paradoxical effects during autoimmune inflammation[J]. Mol Immunol, 2019(111):32-42.
- [26] Sha S, Shi X, Deng G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1987 induces Th2 immune responses and enhances *Mycobacterium smegmatis* survival in mice[J]. Microbiol Res, 2017(197):74-80.

【收稿日期】 2022-03-27 【修回日期】 2022-06-08

(上接 895 页)

- [2] 李珉珉, 李琳, 姜世勃, 等. 基于细胞-细胞融合的 HIV 进入抑制剂非感染性筛选方法的研究[J]. 暨南大学学报(医学版), 2007(6):576-580.
- [3] Lu H, Zhao Q, Xu Z, et al. Automatic quantitation of HIV-1 mediated cell-to-cell fusion with a digital image analysis system (DIAS): application for rapid screening of HIV-1 fusion inhibitors[J]. J Virol Methods, 2003, 107(2):155-161.
- [4] Li M, Gao F, Mascola J-R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies[J]. J Virol, 2005, 79(16):10108-10125.
- [5] 张绪清, 张瑞, 顾长海, 等. 定量细胞 ELISA 检测培养细胞 ICAM1 表达水平[J]. 第三军医大学学报, 2001(1):117-118.
- [6] W Li, Yu F, Wang Q, et al. Co-delivery of HIV-1 entry inhibitor and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor shuttled by nanoparticles: cocktail therapeutic strategy for antiviral therapy[J]. AIDS, 2016, 30(6):827-838.
- [7] Louis JM, Baber JL, Clore GM. The C34 peptide fusion inhibitor binds to the six-helix bundle core domain of HIV-1 gp41 by displacement of the C-terminal helical repeat region[J]. Biochemistry, 2015, 54(45):6796-6805.
- [8] 孙坚萍, 马丽英, 黄江虹, 等. TZM-b1 细胞系检测我国 HIV-1 病毒表型耐药性[J]. 中国艾滋病性病, 2008(5):439-441.
- [9] Xia S, Liu M, Wang C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion[J]. Cell Res, 2020, 30(4):343-355.
- [10] Lu L, Pan C, Li Y, et al. A bivalent recombinant protein inactivates HIV-1 by targeting the gp41 prehairpin fusion intermediate induced by CD4 D1D2 domains[J]. Retrovirology, 2012, 12(7):104.
- [11] 张红丽, 窦雨薇, 范晓文, 等. HIV-1 多肽类融合抑制剂活性及稳定性提高方法的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2020, 36(1):115-117.
- [12] 刘北一, 朱平, 姜世勃, 等. 合成环肽抑制 HIV-1 病毒介导的细胞融合的初步研究[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(8):871-872, 876.
- [13] 王小利, 杨怡姝, 沈思嗣, 等. 基于包膜蛋白和 Tat 蛋白筛选 HIV-1 细胞融合抑制剂的高效方法[J]. 生物工程学报, 2018, 34(3):429-439.
- [14] Hollmann A, Matos PM, Augusto MT, et al. Conjugation of cholesterol to HIV-1 fusion inhibitor C34 increases peptide-membrane interactions potentiating its action[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e60302.

【收稿日期】 2022-03-19 【修回日期】 2022-06-07