

DOI:10.13350/j.cjpb.220806

· 论著 ·

Rab32 促进树突状细胞内 BCG 增殖的实验研究*

袁欣,孙巧玲,周艳萌,秦欢,王玉**

(遵义医科大学基础医学院,贵州遵义 563003)

【摘要】 **目的** 探讨 Rab32(Ras-related proteins in brain 32)在树突状细胞(dendritic cells, DCs)内卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG)感染中的作用。 **方法** 通过小鼠 DC2.4 细胞建立 BCG 感染模型,通过 RNA-Seq 技术检测 BCG 感染后 DCs 内 Rab 基因的表达变化;通过生信分析筛选 BCG 感染后差异表达的 Rab 蛋白;western blot 法检测 BCG 感染后 DC2.4 细胞内 Rab32 蛋白的表达情况;采用慢病毒转染技术制备 EYFP-Rab32 过表达 DC2.4 细胞(EYFP-Rab32 DC2.4 细胞),采用 western blot 法和流式细胞术进行转染效率验证;通过细胞载菌量实验检测 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞内 BCG 的增殖;采用 western blot 法检测磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路蛋白的变化。 **结果** DC2.4 细胞中存在 55 种 Rab 蛋白,BCG 感染后 10 种 Rab 蛋白的表达水平发生明显变化;Rab32 蛋白随着感染时间的增加而增加,感染 0 h 和 48 h 时 Rab32 表达显著增加($P < 0.05$)。BCG 感染 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞 48 h 时 BCG 载菌量为 $(60.16 \pm 4.69) \times 10^4$ CFU/孔,较 DC2.4 细胞明显增多 [$(21.09 \pm 1.56) \times 10^4$ CFU/孔] ($P < 0.01$);这可能与 Rab32 过表达导致 BCG 感染 DC2.4 细胞后 p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 增多($P < 0.05$),即 Rab32 激活 PI3K/AKT 通路相关。 **结论** Rab32 可能通过调控 PI3K/AKT 通路促进 DCs 内 BCG 增殖。

【关键词】 Rab32;卡介苗;树突状细胞;PI3K/AKT 通路

【中图分类号】 R378.911

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)08-0896-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Aug.;17(8):896-900.]

Effects of Rab32 on enhancing BCG proliferation in dendritic cells via PI3K/AKT pathway

YUAN Xin, SUN Qiao-ling, ZHOU Yan-meng, QIN Huan, WANG Yu (School of Basic Medical Science, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of Ras-related proteins in brain 32 (Rab32) on *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) infection in dendritic cells (DCs). **Methods** In murine DC2.4 cell model of BCG infection, The Changes of Rab genes expression in DCs after BCG infection were detected by RNA-Seq. Differentially expressed Rabs after BCG infection were characterized using bioinformatics tools. Then Rab32 expression in DC2.4 cells with BCG infection was measured by western blot assay. EYFP-Rab32 overexpressing DC2.4 cells (EYFP-Rab32 DC2.4 cells) were prepared by lentivirus transfection and the transfection efficiency was detected by western blot assay and flow cytometry. The proliferation of BCG in EYFP-Rab32 DC2.4 cells was counted by bacterial load assay. The expression of PI3K/AKT pathway was measured by western blot assay. **Results** Fifty-five Rab proteins were present in DC2.4 cells, and the expression levels of 10 Rab proteins changed significantly after BCG infection. Rab32 increased with increasing duration of infection, with significant differences at 0 h and 48 h ($P < 0.05$). BCG loading was $(60.16 \pm 4.69) \times 10^4$ CFU/well at 48 h in BCG-infected EYFP-Rab32 DC2.4 cells, which was significantly higher than DC2.4 cells [$(21.09 \pm 1.56) \times 10^4$ CFU/well] ($P < 0.01$). This may be associated with Rab32 overexpression leading to increased p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT in BCG-infected DC2.4 cells ($P < 0.05$), meaning that Rab32 activated the PI3K/AKT pathway. **Conclusion** Rab32 may promote BCG proliferation in DCs by regulating the PI3K/AKT pathway.

【Key words】 Rab32;BCG;dendritic cells;PI3K/AKT pathway

***卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG)是有毒牛型结核分枝杆菌经长期传代培养后获得的减毒活菌株。因其与人结核分枝杆菌具有相似的抗原组成,被广泛用于预防结核病,是全球唯一被广泛认可和使用的结核病疫苗^[1]。据估计,每年全球约有 1 亿名儿童接种 BCG^[2]。BCG 的应用减少了严重儿童结核病的发生,使得结核性脑膜炎和粟粒性结核病的发病率减

少了 85%,结核病的死亡率下降了 66%。研究发现

* **【基金项目】** 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2018]1191);遵义医科大学博士科研启动基金(No. F-810)。

** **【通讯作者】** 王玉, E-mail: anguwy@126.com

【作者简介】 袁欣(1996-),女,四川泸州人,硕士。主要从事病原微生物致病机制研究。E-mail:1019746685@qq.com

BCG能够减少麻风分枝杆菌^[3]、甲型流感病毒^[4]等病原体对机体的侵害,具有非特异性保护作用,甚至对于新型冠状病毒也有保护作用^[5]。DCs是抗感染免疫应答的中心环节。BCG接种产生的免疫保护作用与其诱导产生的T细胞亚群密切相关^[6]。动物实验证实DCs缺失时,结核分枝杆菌感染更加严重^[7]。说明DCs在结核分枝杆菌感染中具有重要作用。

Rab蛋白属于GTP酶蛋白家族,在真核细胞中广泛存在。哺乳动物细胞中存在约70种Rab蛋白,主要定位在细胞内不同亚细胞器膜,参与、调控了胞内吞噬的全部过程^[8],在结核分枝杆菌等多种病原体感染中具有重要作用^[9]。Rab32含有约1000个核苷酸,分子质量为28 ku^[10],在人体、小鼠及多种细胞系中广泛表达^[11]。研究发现Rab32在伤寒沙门菌^[12]、李斯特菌^[13]、类鼻疽伯克氏菌^[14]等胞内菌感染中具有重要作用^[15]。但其在BCG感染中的作用及其机制尚未阐明。因此,本研究拟通过RNA-seq技术、慢病毒转染技术和western blot法等探索Rab32在BCG感染DCs中的作用及其可能的分子机制。

材料与方法

1 材料

小鼠树突状细胞系DC2.4细胞,本室传代保存;BCG疫苗株。RPMI 1640培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司;Middlebrook 7H9培养基和OADC增菌液购自美国BD公司;RIPA裂解液购自中国bio-sharp公司;PMSF和Triton X-100购自中国索莱宝公司;兔抗鼠 β -actin、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、山羊抗兔二抗和蛋白磷酸酶抑制剂购自美国SAB公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5 \times)购自中国碧云天公司;预染彩虹蛋白Marker购自中国百赛生物公司;超敏ECL化学发光底物购自中国四正柏生物公司。

2 方法

2.1 细胞培养 将小鼠DC2.4细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂恒温细胞培养箱中培养。根据细胞生长状态间隔2~3d换液或传代培养。取生长状态良好的细胞进行后续实验。

2.2 稳定过表达Rab32蛋白的DC2.4细胞株建立 构建Rab32过表达质粒FUGW-CMV-EYFP-Rab32质粒,包被慢病毒。将2 \times 10⁴个/孔的DC2.4细胞置于24孔板中,次日更换含6 μ g/ml polybrene的RPMI 1640培养基,再加入50 μ l病毒液,混匀后37 $^{\circ}$ C孵育4h,更换RPMI 1640培养基。扩大培养后,采用含3 μ g/ml嘌呤霉素的RPMI 1640培养基进行持续7d

的筛选,最终得到EYFP-Rab32 DC2.4细胞。

2.3 BCG培养 BCG在含10%OADC增菌液、0.2%Tween-80的Middlebrook 7H9培养基中于37 $^{\circ}$ C细菌培养箱培养约3周,取对数期细菌离心后用无血清RPMI 1640培养基重悬,调整细菌悬液浓度为5 \times 10⁵CFU/ml,进行后续试验。

2.4 BCG感染 生长良好的DC2.4细胞和EYFP-Rab32 DC2.4细胞分别以5 \times 10⁴个/孔置于96孔板培养,细胞贴壁后,每孔加入BCG悬液(MOI=2)孵育3h,再用PBS清洗2次后加入完全RPMI 1640培养基,计为感染0h。BCG感染0h,24h,48h后,进行后续实验。

2.5 细胞载菌量实验 BCG感染至待测时间点,弃去上清,PBS清洗2次后加入100 μ l 1% Triton X-100裂解细胞10min,将细胞裂解液进行5倍稀释后,每个稀释度取10 μ l置于Middlebrook 7H9平板上,放入37 $^{\circ}$ C细菌培养箱培养约3周,测定菌落数量。

2.6 Western blot法检测细胞转染效率和细胞信号通路蛋白表达 BCG感染至待测时间点后收集细胞并裂解细胞,提取总蛋白、BCA法定量后,取15 μ g总蛋白进行10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜后采用5%脱脂牛奶封闭后,加入兔抗鼠PI3K(1:500)、p-PI3K(1:500)、p-AKT(1:500)、AKT(1:500)、Rab32(1:500)和 β -actin(1:5000)一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜。采用HRP标记的羊抗兔二抗(1:5000)室温孵育2h后用ECL显影法在凝胶成像分析系统内曝光成像。以 β -actin为内参,用Image J分析条带灰度值。

2.7 RNA测序和生物信息学分析 DC2.4细胞以5 \times 10⁵个/孔接种于6孔板中,次日加入BCG悬液(MOI=2)感染3h后,计为0h。BCG感染24h后收集细胞,采用Trizol法提取总RNA,采用Agilent 2100生物分析仪检测样本28S/18S、RIN/RQN值。筛选得到的合格样本采用DNBSEQ平台进行RNA测序,每个样本平均获得6.78G数据。将得到的原始数据去除低质量、接头污染以及未知碱基N含量过高的reads,得到clean reads(>94%)。通过HISAT和Bowtie2得到样品比对参考基因组的比对结果。通过华大基因公司Dr. Tom系统(<https://biosys.bgi.com/#/report/login>)进行样本差异表达分析。

2.8 统计学方法 数据采用SPSS 18.0统计软件进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组之间比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

1 BCG 感染 DCs 后 Rab 蛋白基因的变化

采用 RNA 测序技术分析 DCs 内差异表达的 Rab 蛋白,发现 DC2.4 细胞内共表达 55 种 Rab 蛋白基因,表明 Rab 蛋白参与 DCs 中 BCG 的感染过程(图 1)。筛选 BCG 感染组中差异表达的 Rab 蛋白(表 1)。

表 1 BCG 感染后 DCs 中差异表达的 Rab 蛋白基因
Table 1 Differentially expressed Rab genes in DCs after BCG infection

序号 NO.	基因识别符 Gene identifier	基因名称 Gene name	P 值 P value
1	19332	Rab20	0.007
2	224624	Rab40c	0.011
3	19345	Rab5c	0.011
4	19338	Rab33b	0.011
5	67844	Rab32	0.015
6	19328	Rab12	0.017
7	59021	Rab2a	0.018
8	19326	Rab11b	0.034
9	226421	Rab7b	0.035
10	76308	Rab1b	0.039

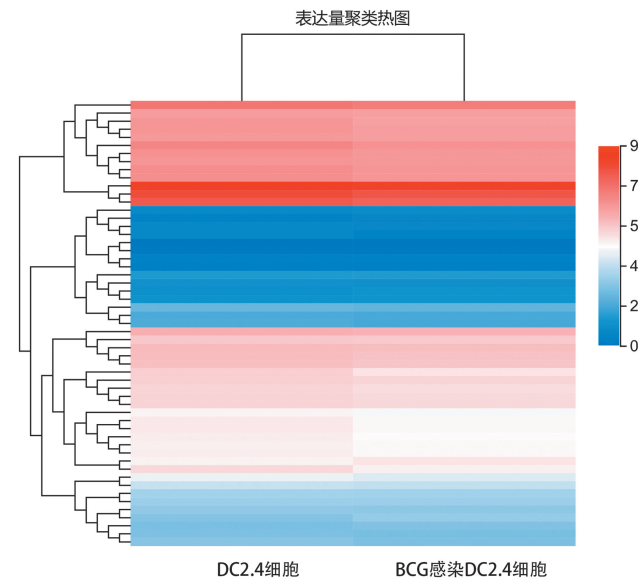


图 1 RNA 测序技术检测 BCG 感染 24 h DCs 中 Rab 基因表达的热图
Fig.1 The heatmap of the Rab gene expression in DCs at 24 h post BCG infection by RNA-Seq

2 BCG 感染后 DCs 内 Rab32 蛋白的表达

BCG(MOI=2)感染 DC2.4 细胞后,随着感染时间的延长,如图 2,细胞内 Rab32 蛋白表达量增加。且在感染 48 h 时,胞内 Rab32 蛋白较未感染组明显增加,差异有统计学意义($F=5.234, P=0.0221$)。

3 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞的建立

Rab32 蛋白表达增加约 1 倍($t=3.133, P=0.015$)。流式细胞术检测发现,EYFP 荧光表达达到 97.8%(图 3)。

4 Rab32 对于 DCs 内 BCG 载菌量的影响

细胞载菌量测定结果见图 4。BCG 感染 0 h 时,

Rab32 过表达组和对照组细胞载菌量没有差异($t=0.1478, p=0.8855$)。感染 24 h 时,Rab32 过表达组 BCG 载量较对照组减少($t=5.915, P=0.0002$),但感染 48 h 时,Rab32 过表达组 BCG 载量较对照组显著增加($t=11.70, P<0.0001$)。

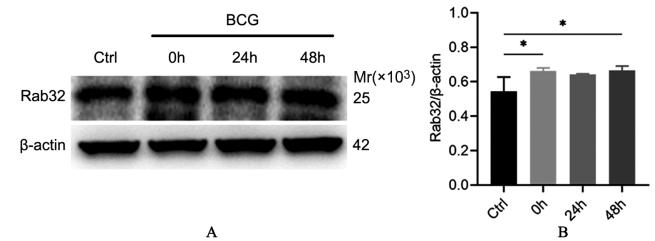
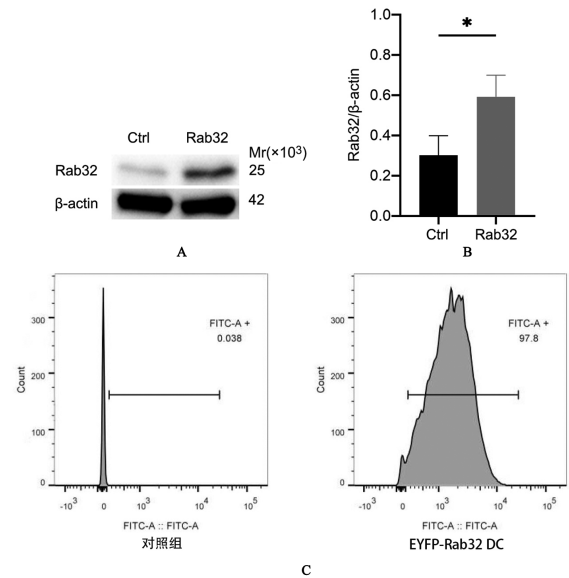


图 2 DC2.4 细胞感染 BCG 后 Rab32 的表达情况
Fig.2 The expression of Rab32 protein in DC2.4 cells with BCG infection



A western blot 法检测 Rab32 表达条带图 B Rab32 蛋白表达的统计图 C 流式细胞术检测 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞绿色荧光表达情况

图 3 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞的鉴定

A Western blot bands of Rab32 protein B Summarized bar graphs of Rab32 C The green fluorescent expression of EYFP-Rab32 DC2.4 cells is detected by flow cytometry

Fig.3 Identification of EYFP-Rab32 DC2.4 cells

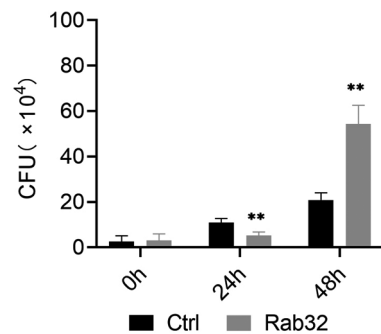
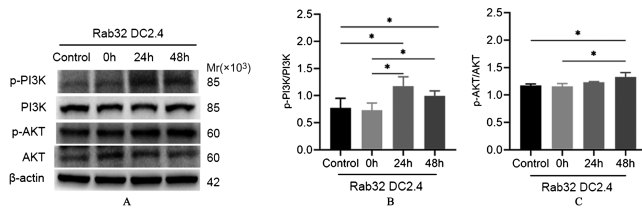


图 4 EYFP-Rab32 DC2.4 中 BCG 感染的载菌量实验
Fig.4 Bacterial load assay of BCG in EYFP-Rab32 DC2.4 cells

5 Rab32 对 BCG 感染 DCs 内 PI3K/AKT 通路变化的影响

采用 western blot 法测定 Rab32 过表达组中 PI3K/AKT 通路的变化,如图 5,BCG 感染前后 Rab32 过表达组中 PI3K 和 AKT 蛋白表达均未发生变化,但磷酸化 PI3K(p-PI3K)随着感染时间的增加表达量增加,在 24 h 达到峰值,随后表达量下降,而磷酸化 AKT(p-AKT)表达则随着 BCG 感染时间的增加而增加。



A Western blot 法检测 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达
B BCG 感染 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞内 p-PI3K/PI3K 比值 C
BCG 感染 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞内 p-AKT/AKT 比值

图 5 BCG 感染 EYFP-Rab32 DC2.4 细胞内 PI3K/AKT 通路蛋白表达分析

A Western blot analysis of PI3K, p-PI3K, AKT, and p-AKT proteins B The ratio of p-PI3K/PI3K in EYFP-Rab32 DC2.4 cells with BCG infection C The ratio of p-AKT/AKT in EYFP-Rab32 DC2.4 cells with BCG infection

Fig. 5 The expression of the proteins in PI3K/AKT pathway in EYFP-Rab32 DC2.4 cells infected with BCG

讨论

BCG 应用于人类已有 100 年,但其固有免疫机制仍不清楚。这导致 BCG 的免疫保护力有限,并不能很好地预防结核病的发生。本研究制备 BCG 感染 DCs 模型,发现 BCG 感染后 DCs 内 10 种 Rab 蛋白表达变化,其中 Rab32 表达明显升高。过表达 Rab32 激活 PI3K/AKT 通路,进而促进了 BCG 的胞内增殖。这些结果表明 BCG 能够通过上调 Rab32,进而激活 PI3K/AKT 通路,促进细菌的存活和生长。Rab32 是 DCs 内重要的免疫调控因子,参与了 BCG 的胞内感染过程。

Rab 蛋白属于 GTP 酶蛋白家族,在真核细胞中广泛存在。哺乳动物细胞中存在约 70 种 Rab 蛋白,主要定位于不同亚细胞器膜,参与、调控了细胞吞噬等生理活动^[8]。本研究通过 RNA-seq 技术发现 DCs 中存在 55 种 Rab 蛋白,BCG 感染后 10 种 Rab 蛋白表达改变,提示 Rab 蛋白参与 DCs 的生理功能与 DCs 抗 BCG 的胞内免疫应答。Rab 蛋白参与了 DCs 的抗原提呈^[16]、细胞分化^[17]和细胞迁移^[18]等功能。例如 Rab39 介导了 DCs 的抗原交叉提呈功能,可通过 MHC-I 分子将吞噬体内抗原提呈给 CD8⁺ T 细胞,激活 T 细胞免疫应答^[16]。有关 Rab 蛋白影响 DCs 免疫功能的研究鲜有报道。

Rab32 主要定位于内质网、线粒体等细胞器,参与了胞内脂质代谢、黑色素转运等生理功能。近年的研究发现 Rab32 在胞内菌吞噬中具有重要作用,能够抑制吞噬细胞内李斯特菌^[19]和类鼻疽伯克氏菌^[20]的增殖。本研究发现 BCG 感染后 DCs 内 Rab32 蛋白表达增加,表明 Rab32 参与了分枝杆菌的胞内感染过程。与李斯特菌和类鼻疽伯克氏菌感染中的作用不同,Rab32 过表达能够促进 DCs 内 BCG 的增殖。相似的结果在嗜肺军团菌研究中已有报道^[20]。可见,Rab32 在不同胞内菌感染中的作用不同,提示某些病原菌可能具有 Rab32 效应分子,能够调节 Rab32 功能来逃避胞内免疫机制。例如,鼠伤寒沙门菌的毒力因子 GtgE 和 SopD2,能够裂解 Rab32^[21],或将 Rab32 从含菌囊泡上解离^[22],进而促进鼠伤寒沙门菌能够在人巨噬细胞内存活^[23]。因此,BCG 可能具有 Rab32 效应分子,通过调控 Rab32 来影响 DCs 对 BCG 的吞噬功能。

PI3K/AKT 通路参与细胞代谢、凋亡等过程^[24],与 DCs 的活化、免疫激活功能相关^[25],是 DCs 内重要的信号转导通路。此外,PI3K/AKT 通路还参与了分枝杆菌的胞内感染过程。结核分枝杆菌及其蛋白可激活 PI3K/AKT 通路来诱导巨噬细胞极化^[26]。本研究发现 Rab32 过表达能够激活 PI3K/AKT 通路,影响下游信号分子来抑制 DCs 吞噬功能,促进 BCG 增殖。

综上所述,BCG 诱导 DCs 内 Rab32 表达,进而激活 PI3K/AKT 通路,促进 BCG 增殖。为深入探索分枝杆菌的固有免疫机制及新型结核疫苗研发提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Roy P, Vekemans J, Clark A, et al. Potential effect of age of BCG vaccination on global paediatric tuberculosis mortality: a modelling study[J]. Lancet Glob Health, 2019, 7(12): e1655-e63.
- [2] Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, et al. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis[J]. BMC, 2014(349): g4643.
- [3] World Health Organization. BCG vaccine: WHO position paper, February 2018-Recommendations[J]. Vaccine, 2018, 36(24): 3408-3410.
- [4] Moorlag SJCFM, Arts RJW, van Crevel R, et al. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(12): 1473-1478.
- [5] Li WX. Worldwide inverse correlation between Bacille Calmette-Guérin (BCG) immunization and COVID-19 mortality[J]. Infection, 2021, 49(3): 463-473.
- [6] Fletcher H, Snowden M, Landry B, et al. T-cell activation is an immune correlate of risk in BCG vaccinated infants[J]. Nat Commun, 2016(7): 11290.
- [7] Tian T, Woodworth J, Skld M, et al. In Vivo Depletion of CD11c⁺ Cells Delays the CD4⁺ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection[J]. J Immunol,

- 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