



泛靶点的抗艾滋病病毒药物高通量筛选系统

尹琪, 庄道明, 蒋亚琴, 赵传科, 曾新, 栗世铀*

中国科学院北京基因组研究所, 北京 100029;

中国科学院研究生院, 北京 100039;

军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物安全国家重点实验室, 北京 100071

* 联系人, E-mail: lishiyou@big.ac.cn

2009-04-29 收稿, 2009-08-28 接受

获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)即艾滋病,是由艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的一种人类免疫系统疾病。从1983年,法国科学家宣布第一次从艾滋病病人体内分离出艾滋病病毒^[1]至今,已经过去26年了,虽然生物学家和医学家们一直都在和艾滋病病毒进行着不懈地斗争,但是时值今日,艾滋病依然是人类无法战胜的疾病之一。

近年来,随着抗艾滋病病毒药物的广泛使用,艾滋病病毒的耐药性^[2-8]已经成为当今医学界治疗艾滋病的一大障碍。为了更好地治疗艾滋病,人们必须不断地寻找新的药物及药物靶点。为此,我们构建了一种具有广泛的作用靶点的抗艾滋病病毒药物高通量筛选系统,其优点在于应用该系统不仅能够筛选抗艾滋病病毒的药物,而且还有可能引导新的抗艾滋病病毒

药物作用靶点的发现。

该筛选系统的基本原理如下:首先,我们构建了HeLa-CD4-LTR报告细胞系。在报告细胞系中稳定表达了HIV感染细胞所必须的细胞表面受体CD4受体分子以及由HIV的长末端重复片段(long terminal repeat, LTR)起始的Luciferase报告基因。然后,我们将被病毒感染的MT2细胞、报告细胞和待筛选的化合物共孵育3d,通过检测Luciferase荧光信号的强弱来判断被筛选的化合物是否能够抑制HIV在细胞中的复制。

为了构建HeLa-CD4-LTR报告细胞系,我们构建了pGL3-Basic-LTR和pcDNA3.1-CD4两个质粒,并且分别通过Luciferase检测和Westernblot方法鉴定了这两个质粒的生物学功能。随后,将这两个质粒共转染了HeLa母细胞系,并且经过抗生素筛选得到了稳定的HeLa-CD4-LTR报告细胞系。

为了进一步验证该药物筛选系统

的可行性,我们选用了目前已经广泛应用于艾滋病临床治疗的HIV抑制剂对筛选系统进行了验证。实验结果如图1所示,表明,HIV抑制剂AZT,EFV和NVP都能够有效地抑制系统荧光信号,并表现出剂量效益依赖关系,其抑制半数有效浓度(IC₅₀)分别为:58,1.4和85 nmol/L,与文献^[9]报道的结果相近。

为了验证筛选系统的高通量稳定性,我们对系统进行了Z因子检测,实验数据应用Z因子公式计算: $Z = \frac{(\text{最大信号平均值} - 3SD_{\text{max}}) - (\text{最小信号平均值} - 3SD_{\text{min}})}{(\text{最大信号平均值} - \text{最小信号平均值})}$ 。

计算结果Z因子等于0.563,当Z因子大于0.5时表明筛选系统的重复稳定性可以应用于高通量筛选。

综上所述,我们成功地构建了一个可以应用于抗艾滋病病毒药物高通量筛选的系统,并将在现有的工作基础上进一步开展抗艾滋病病毒药物的筛选工作。

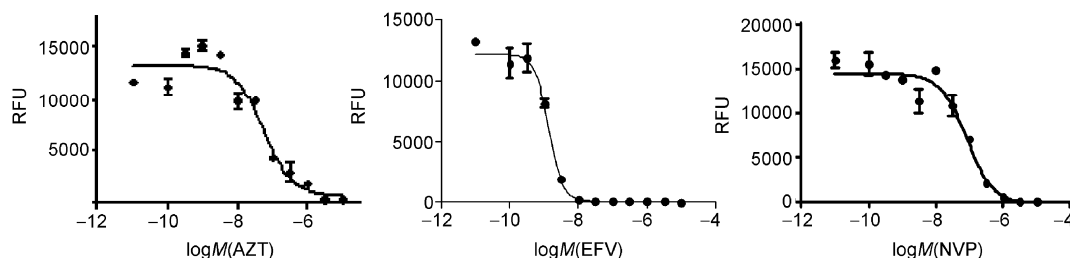


图1 HIV抑制剂的剂量效应依赖曲线

(a) 核苷类逆转录酶抑制剂 AZT 剂量效应依赖曲线, IC₅₀ 值为 58 nmol/L; (b) 非核苷类逆转录酶抑制剂 EFV 剂量效应依赖曲线, IC₅₀ 值为 1.4 nmol/L; (c) 非核苷类逆转录酶抑制剂 NVP 剂量效应依赖曲线, IC₅₀ 值为 85 nmol/L. 每个数据点均设 3 次重复

参考文献

- 1 Barre-Sinoussi F, Chermann J C, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983, 220: 868—871[[doi](#)]
- 2 Shafer R W, Schapiro J M. HIV-1 drug resistance mutations: An updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev*, 2008, 10: 67—84
- 3 Sung H, Jung Y S, Kang M W, et al. High frequency of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1-infected Korean patients treated with HAART. *AIDS Res Human Retrovir*, 2007, 23: 1223—1229[[doi](#)]
- 4 Wang Y M, Dyer W B, Workman C, et al. Drug resistance and viral evolution in plasma and peripheral blood cells during structured treatment interruption (STI) and non-interrupted HAART. *Curr HIV Res*, 2007, 5: 235—250[[doi](#)]
- 5 Hogg R S, Bangsberg D R, Lima V D, et al. Emergence of drug resistance is associated with an increased risk of death among patients first starting HAART. *PLoS Med*, 2006, 3: e356[[doi](#)]
- 6 Chew C B, Potter S J, Wang B, et al. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. *J Clin Virol*, 2005, 33: 206—216
- 7 Potter S J, Dwyer D E, Saksena N K. Differential cellular distribution of HIV-1 drug resistance *in vivo*: Evidence for infection of CD8⁺ T cells during HAART. *Virology*, 2003, 305: 339—352[[doi](#)]
- 8 Roge B T, Katzenstein T L, Nielsen H L, et al. Drug resistance mutations and outcome of second-line treatment in patients with first-line protease inhibitor failure on nelfinavir-containing HAART. *HIV Med*, 2003, 4: 38—47[[doi](#)]
- 9 Cao J, Isaacson J, Patick A K, et al. High-throughput human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) full replication assay that includes HIV-1 Vif as an antiviral target. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 3833—3841[[doi](#)]