

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.002

病毒巨噬细胞炎症蛋白 -II 对载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化样蛋白 3G 和正常 T 细胞表达分泌的调节活化蛋白表达的影响 *

李 靖¹ 谭晓华² 何 森³ 刘如锦¹ 王小波² 杨 磊^{1,2Δ}

(1 杭州师范大学生命与环境科学学院 浙江 杭州 310036; 2 杭州师范大学医学院 浙江 杭州 310036;

3 石河子大学医学院 新疆 石河子 832002)

摘要 目的:明确病毒巨噬细胞炎症蛋白 -II (viral macrophage inflammatory protein-II, vMIP-II) 对 HIV-1 抑制因子: 载脂蛋白 BmRNA 编辑酶催化蛋白 3G(Apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-3G, APOBEC 3G)和正常 T 细胞表达分泌的调节活化蛋白 (regulated upon activation normal T expressed and secreted, RANTES) 表达的影响。**方法:**构建 vMIP-II 真核表达载体 pEGFP-N3-vMIP-II, 分别采用电穿孔和脂质体转染的方法将其转染至 Jurkat 和 293T 细胞。荧光定量 PCR 检测 vMIP-II 基因对 Jurkat 细胞和 293T 细胞内的抗艾滋病基因 APOBEC3G 和 RANTES 表达水平的影响。**结果:**测序结果显示成功构建了 vMIP-II 真核表达载体, 荧光显微镜观察估计转染效率达到 50%左右。与空载体组相比较, 转染 pEGFP-N3- vMIP-II 组的 Jurkat 细胞内的 APOBEC3G 和 RANTES 分别上调 4.97 倍和 7.31 倍, 293T 细胞内的 APOBEC3G 和 RANTES 分别上调为 5.73 倍和 8.14 倍。**结论:**vMIP-II 基因不同程度的上调了 Jurkat 细胞和 293T 细胞内的抗艾滋病基因 APOBEC3G 和 RANTES 的表达。

关键词:病毒巨噬细胞炎症蛋白 -II; HIV-1 抑制因子; 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化样蛋白 3G; 正常 T 细胞表达分泌的调节活化蛋白

中图分类号: Q75; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)21-4005-04

vMIP-II Induce Apolipoprotein B mRNA-editing Catalytic Polypeptide-3G and Regulated upon Activation Normal T Expressed and Secreted Expression*

LI Jing¹, TAN Xiao-hua², HE Miao³, LIU Ru-jin¹, WANG Xiao-bo², YANG Lei^{1,2Δ}

(1 College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang, 310036, China;

2 School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang, 310036, China;

3 School of Medicine, Shihezi, University, Shihezi, Xinjiang, 832002, China)

ABSTRACT Objective: To explore the impact of viral macrophage inflammatory protein-II (vMIP-II) on the expression levels of HIV restriction factors apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-3G (APOBEC3G) and regulated upon activation, normal T expressed and secreted (RANTES). **Methods:** The vMIP-II encoding gene was cloned into pEGFP-N3 vector to construct the recombinant plasmids pEGFP-N3-vMIP-II. The plasmids were transfected into Jurkat cells and 293T cells by electroporation and lipofectamine 2000™ reagent, respectively. The expression levels of APOBEC3G and RANTES were detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** The sequencing results verified the recombinant plasmids pEGFP-N3-vMIP-II was successfully constructed. The transfection efficiency reached about 50 % in both cell lines. Compared with the cells transfected pEGFP-N3 empty vector, the cells transfected pEGFP-N3-vMIP-II have increased APOBEC3G and RANTES expression levels in Jurkat cells (4.97 and 7.31 folds) and in 293T cells (5.73 and 8.14 folds). **Conclusions:** vMIP-II can induce the expression of host HIV -1 restriction factors of APOBEC3G and RANTES in Jurkat cells and 293T cells.

Key words: Viral macrophage inflammatory protein-II ; HIV-1 restriction factor; Apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-3G; Regulated upon activation; Normal T expressed and secreted

Chinese Library Classification (CLC): Q75; Q786 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4005-04

前言

由人获得性免疫缺陷病毒 -1 (human immunodeficiency

virus -1, HIV-1)引起的获得性免疫缺陷性综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 目前仍然是无有效的预防疫苗、无有效治愈办法的全球性疾病,其流行严重威胁着人类健

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071636);浙江省科技厅国际合作重点项目(2009C14014);

浙江省自然科学基金项目(Y12H160158);浙江省重点科技创新团队计划资助(2011R50021)

作者简介:李靖(1988-),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤分子生物学研究,电话:15268554737, E-mail: lotusjing419@163.com

Δ通讯作者:杨磊, E-mail: yanglei62@hznw.edu.cn

(收稿日期:2013-11-16 接受日期:2013-12-10)

康,是全球性的公共卫生问题。研究发现,人类体内本身存在一些 HIV 抑制因子(HIV restriction factors)^[1,2],这些因子能够对 HIV 感染和复制起到抑制作用。其中,载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化样蛋白 3G (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-3G,APOBEC 3G)和正常 T 细胞表达分泌的调节活化蛋白 (regulated upon activation normal T expressed and secreted, RANTES)是人体内重要的抗 HIV-1 基因。前者属于胞嘧啶脱氨酶家族,是非常重要的 HIV-1 抑制因子^[3-5],它通过诱导 HIV-1 前病毒基因组的 G→A 超突变抑制 HIV 的复制。RANTES 又称为 CC 类趋化性细胞因子配体 5 (CC chemokine ligand 5,CCL5),可与 CC 类趋化性细胞因子受体 5 (CC chemokine receptor 5, CCR5)、CXC 类趋化性细胞因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4)等 HIV-1 辅助受体结合,在抗 HIV-1 病毒感染中发挥了重要作用。

卡波氏肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 最早是有美国学者 Chang 等人在 1994 年从艾滋病相关的卡波氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma, KS) 组织中分离得到的^[6],它是 KS 的病因。同时,KS 也是艾滋病最常见的并发症之一。在本课题组前期的研究中,在基因芯片的结果中显示,KS 组织中 APOBEC3G 和 RANTES/CCL5 等 HIV-1 抑制因子基因表达上调。提示 KSHV 的某些基因产物能够激活宿主细胞的这些抗 HIV-1 基因上调表达。

目前已知 KSHV 至少有 84 个开放读码框 (open reading frame,ORF)。病毒巨噬细胞炎症蛋白-II (viral macrophage inflammatory protein-II,vMIP-II) 是一种由 K4 基因编码的 CC 类趋化因子,基因全长 285 bp,共编码 94 个氨基酸。vMIP-II 与 RANTES 蛋白序列有较高的氨基酸同源性。vMIP-II 可以广谱的结合 CCR5、CXCR4、CCR3、CCR2、CCR8、CCR10 等 10 余种趋化因子受体。已有研究明确 vMIP-II 具有抑制 HIV 感染和复制的功能,但对其抑制 HIV-1 的机制并不十分明确,目前认为其机制主要为 vMIP-II 可竞争抑制 CCR5 和 CXCR4 等 HIV 辅助受体。

本研究构建了 KSHV K4 基因真核表达载体 pEGFP-N3-vMIP-II,将其转染至 Jurkat 细胞和 293T 细胞后,通过荧光定量 PCR 检测 vMIP-II 对 APOBEC3G 和 RANTES 表达的影响,结果发现 vMIP-II 可以激活 APOBEC3G 和 RANTES 这两个重要的 HIV 抑制因子的表达,这为进一步阐明 vMIP-II 抗 HIV 感染机制提供了新的数据。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和细胞株

真核表达载体 pEGFP-N3、菌株 *E.coli* DH5 α 、Jurkat 细胞和 293T 细胞均为本实验室保存;含有 vMIP-II 基因的 Cosmid Z6 为美国匹茨堡大学的 Chang Y 教授惠赠。

1.2 工具酶及试剂

T4 DNA 连接酶,DNA 聚合酶为 Biolabs 公司产品;限制性内切酶 *Xho*I 和 *Bam*HI 为 Fermentas 公司产品;无内毒素质粒大提试剂盒,总 RNA 抽提试剂盒及 DNA Mark 购于北京天根生化科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于广州东盛生物有限公司;逆转录试剂盒和实时定量试剂盒购于 TaKaRa

公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司;RPMI-1640 培养基和 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基购于 Hyclone 公司;胎牛血清购于 Gibco 公司;引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,其余常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 真核表达质粒 pEGFP-N3-vMIP-II 的构建和鉴定

根据 KSHV K4 基因序列设计引物,于引物 5' 端分别引入 *Xho*I 和 *Bam*HI 限制性内切酶位点。

上游引物序列:5'-CATCTCGAGATGGACACCAAGGG-CAT-3'

下游引物序列:5'-CA TGGATCCTCAGCGAGCATGTACTG-3'

以 CosmidZ6 为模板,以上、下游引物进行扩增。PCR 反应总体体系为 10 $\times$ Taq DNA Buffer with MgSO₄ 2.5 μ L,2.5 mM dNTP Mixture 2 μ L,10 Mm 引物混合(上、下游)2 μ L,模板(的 Cosmid Z6)3 μ L,Taq DNA Polymerase 0.25 μ L,ddH₂O 13.25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 10min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。3% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,电泳条带为扩增目的片段长度,根据 DNA 凝胶回收试剂盒操作步骤切胶回收 PCR 产物。

将上述切胶回收产物与载体 pGEM-Teasy 在 T4 DNA 连接酶的作用下于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,将连接产物转化感受态细胞 *E.coli* DH5 α ,并在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基上进行蓝白斑筛选,挑取白色阳性菌落,摇菌并抽取质粒后用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定,将初步鉴定为阳性的质粒送上海生工测序。

1.4 细胞培养

复苏 Jurkat 细胞,用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养。复苏 293T 细胞,用含有 10% FBS 的 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基培养。培养条件均为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度,收集连续培养四代后的细胞用于转染实验。

取对数生长期中期或末期且状态良好的 Jurkat 细胞,1000 r/min 离心 5 min 收集细胞,用无血清无抗生素的 RPMI-1640 培养基,洗细胞一次,然后用无血清无抗生素 RPMI-1640 培养基重悬细胞至密度为 3.0 $\times$ 10⁶~4.0 $\times$ 10⁶ 个/mL。以 25 μ g 空载体质粒 pEGFP-N3 和带有目的片段质粒 pEGFP-N3-vMIP-II 分别作为实验组和对照组与 200 μ L 细胞悬液混合,各自转移至冰浴的电穿孔杯中,在 140 V、1000 μ F 的条件下,进行电穿孔。电穿孔结束后,冰浴 10 min,再加入 600~800 μ L 完全培养基,并将电穿孔后的细胞转移至六孔板中,补全培养基至 2 mL,继续培养,使细胞继续生长。转染 12 h 后换液,转染 24 h 后,在荧光显微镜下观察其转染效果。在转染 36 h 后,收集细胞,提取 RNA。

做脂质体转染前一天,用 6 孔板给细胞铺板,使细胞密度达到 70%-80%。转染前 2 h 更换无血清无抗生素 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基。首先准备复合物:(1)将 6 μ g 质粒稀释于 250 μ L Opti-EME 培养基中,轻轻混匀。(2)将 10 μ L Li2000 稀释于 250 μ L Opti-EME 培养基中,轻轻混匀,室温孵育 5 min。(3)5 min 后,将(1)液与(2)液混合,室温孵育 20 min。然后,去掉 6 孔板中的培养基,用 PBS 洗细胞 2 次,将复合物

加入培养孔,前后晃动培养板,使其分布均匀。最后,每孔补加 1.5 mL 无血清无抗生素培养基,37℃、5% CO₂ 培养 6 h 后,更换完全培养基。转染 24 h,在荧光显微镜下观察其转染效果。在转染 36 h 后,收集细胞,提取 RNA。

1.5 转染后细胞总 RNA 的提取与逆转录 PCR

按照细胞总 RNA 抽提试剂盒的说明进行操作,核酸蛋白仪测定提取的 RNA 纯度和浓度。按照反转录试剂盒的说明进行 RNA 的逆转录,反应条件为:(1)基因组 DNA 的去除:5× g DNA Eraser Buffer 2 μL, g DNA Eraser 1 μL, Total RNA 500 ng, RNase Free dH₂O up to 10 μL, 42℃ 2 min, 4℃ ∞。(2)cDNA 的反应:5× Prime Script Buffer 2 (for Real Time) 4 μL, Prime-Script RT Enzyme Mix I 1 μL, RT Prime Mix 1 μL, (1) 的反应液 10 μL, RNase Free dH₂O up to 20 μL。37℃ 15 min, 85℃ 5 sec, -20℃ 保存。

1.6 实时定量 PCR 检测 APOBEC3G 和 RANTES 的表达

以实验组和对照组总 cDNA 为模板,按照实时定量试剂盒的说明进行,反应体积总共为 20 μL: cDNA 2 μL, 2× SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, PCR Forward Primer (10 μM) 0.4 μL, PCR Reverse Primer (10 μM) 0.4 μL, dH₂O 6 μL。样本 cDNA 依次稀释 10 倍作为标准品,共 6 个梯度制作标准曲线。反应条件为:95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性

5 s, 60℃ 退火 31 s, 热循环 40 cycles, 最后 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。用 2^{-ΔΔt} 法, 计算基因的相对表达量。每个样本做 3 个重复, 求平均值。所用实时定量引物为 (1) APOBEC3G: 上游引物 5'-CACGTAGCCTGTGCATCTTC-3'; 下游引物 5'-TTGGC TGTGCTCATCATCTAGTCCATC-3'。(2) RANTES: 上游引物 5'-ACCAGTGGCAA GTGC TCCAAC -3'; 下游引物 5'-CTCCCAAGCTAGGACAAGAGCAAG -3'。(3) GAPDH: 上游引物 5'-GCACCGTC AAGGCTGAGAAC-3'; 下游引物 5'-ATGGTGGTGAAGACGC CAGT-3'。

2 结果

2.1 真核表达载体 pEGFP-N3-vMIP-II 的构建

3% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果在目的基因片段大小位置出现了特异性的扩增 (图 1A)。酶切结果 3% 琼脂糖凝胶电泳显示: 在目的基因片段大小位置出现清晰条带 (图 1B)。把目的基因的切胶回收产物与 pEGFP-N3 连接后, 双酶切结果 3% 琼脂糖凝胶电泳显示在目的基因片段大小位置出现清晰条带, 表明连接成功 (图 1C), 经测序所有克隆均按指定位置插入, 全部碱基准确无误, 没有任何点突变, 证明克隆是成功的, 测序图谱见图 1D。

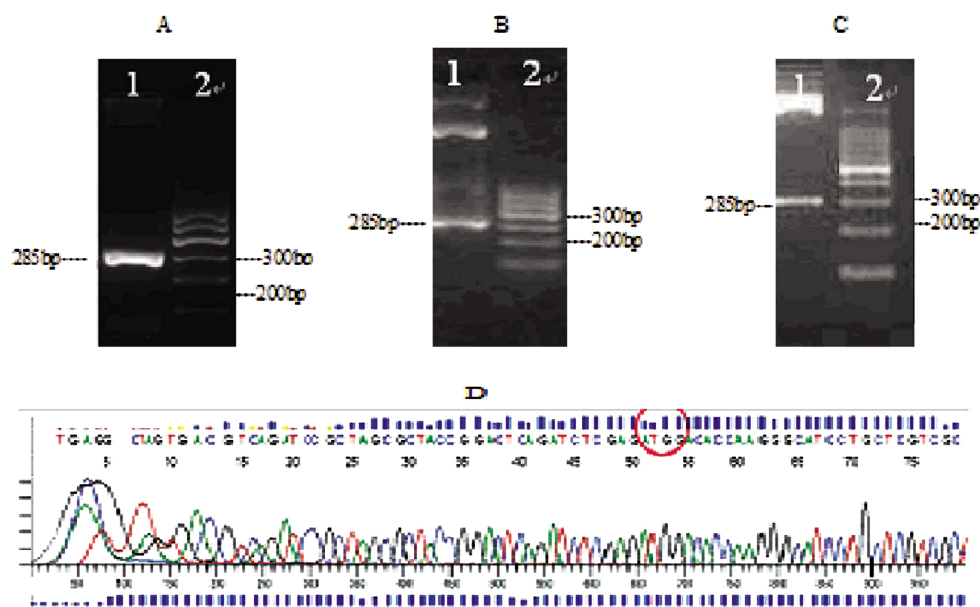


图 1 真核表达载体 pEGFP-N3-vMIP-II 的构建与鉴定

注: A vMIP-II 片段 PCR 产物凝胶电泳图, B 双酶切鉴定 pGEM-T easy-vMIP-II, C 双酶切鉴定 pEGFP-N3-vMIP-II, D 测序鉴定重组载体; A-B 中泳道 1 vMIP-II, 2 Marker

Fig.1 The construction and identification of recombinant plasmids pEGFP-N3-vMIP-II

Note: A The gel electrophoresis diagram of vMIP-II gene fragment by PCR, B The restriction mapping of pGEM-T easy-vMIP-II, C The restriction mapping of pEGFP-N3-vMIP-II, D The sequence diagram of recombinant plasmids pEGFP-N3-vMIP-II; Lane 1 in A-C vMIP-II, Lane 2 in A-C Marker

2.2 荧光显微镜下的观察 Jurkat 细胞和 293T 细胞的转染效率

重组质粒 pEGFP-N3-vMIP-II 和阴性对照质粒 pEGFP-N3 分别转染 Jurkat 细胞 (图 2-A、B、E、F) 和 293T 细胞 (图 2-C、D、G、H)。24 h 后, 在荧光显微镜下观察已有绿色荧光蛋白的表达。在 36 h 后, 在荧光显微镜下, 已有大量的绿色荧光蛋白的表达, 其转染效率均达到 50% 左右。

2.3 实时定量 PCR 检测抗 HIV 基因的表达

重组质粒 pEGFP-N3-vMIP-II 转染到 Jurkat 细胞 36 h 后, 细胞内 APOBEC3G 和 RANTES 基因表达分别上调 4.97 倍和 7.31 倍; 转染到 293T 细胞 36 h 后, 细胞内 APOBEC3G 和 RANTES 基因表达也均有上调, 分别为 5.73 倍和 8.14 倍 (图 3)。

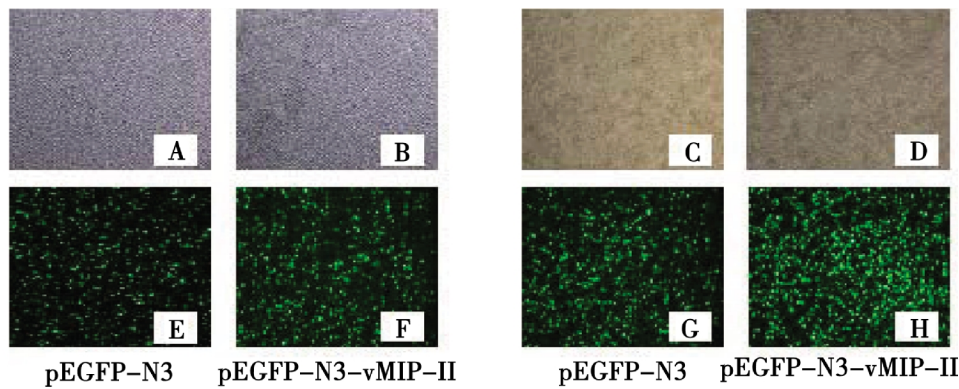


图2 重组质粒转染 Jurkat 细胞和 293T 细胞后的荧光显微镜检测图

注: A 和 E: Jurkat 细胞转染 pEGFP-N3 36 小时后同视野下的白光和荧光观测结果, B 和 F Jurkat 细胞转染 pEGFP-N3-vMIP-II 36 小时后同视野下的白光和荧光观测结果, C 和 G 293T 细胞转染 pEGFP-N3 36 小时后同视野下的白光和荧光观测结果, D 和 H 293T 细胞转染 pEGFP-N3-vMIP-II 36 小时后同视野下的白光和荧光观测结果

Fig.2 The fluorescent microscopy diagrams in Jurkat cells and 293T cells transfected with recombinant Plasmids

Note: A and E Jurkat cells transfection pEGFP - N3 after 36 h with the same vision of the bright lighting and fluorescent, B and F Jurkat cells transfection pEGFP N3-vMIP-II after 36 h with the same vision of the bright lighting and fluorescent, C and G 293T cells transfection pEGFP - N3 after 36 h with the same vision of the bright lighting and fluorescent, D and H 293T cells transfection pEGFP N3-vMIP-II after 36 h with the same vision of the bright lighting and fluorescent.

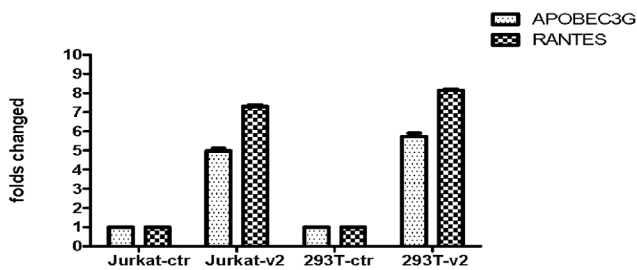


图3 转染 vMIP-II 的 Jurkat 细胞和 293T 细胞 APOBEC3G、RANTES 的表达水平

注: Jurkat-ctr 转染 pEGFP-N3 的 Jurkat 细胞, Jurkat-v2 转染 pEGFP-N3-vMIP-II 的细胞, 293T-ctr 转染 pEGFP-N3 的 Jurkat 细胞, 293T-v2 转染 pEGFP-N3-vMIP-II 的细胞

Fig.3 Expression levels of APOBEC3G and RANTES in Jurkat cells and 293T cells transfected by vMIP-II

Note: Jurkat-ctr Jurkat cells was transfected by pEGFP - N3, Jurkat-v2 Jurkat cells was transfected by pEGFP - N3-vMIP-II, 293T-ctr 293T cells was transfected by pEGFP - N3, 293T-v2 293T cells was transfected by pEGFP - N3-vMIP-II.

3 讨论

HIV 感染和 AIDS 的流行是当今世界人类面临最严重的公共卫生问题之一。研究发现, 机体内有一系列 HIV-1 抑制因子, 这些抑制因子多为先天免疫分子, 在抑制 HIV 感染和复制中发挥了重要作用^[7,8]。在这些 HIV-1 抑制因子中, 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化样蛋白 3G (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-3G, APOBEC3G) 发挥了重要作用。它是 APBEC 家族的成员, 是体内重要的抗 HIV 感染基因。其抗 HIV 的作用主要为: 在 HIV 负链的合成中, 催化 d C 脱氨基变为 d U, 使病毒基因组发生 G→A 超突变, 从而抑制 HIV 复制^[3-5]。Harris 研究发现 APOBEC3G 可以增强先天免疫来对抗 HIV-1

的感染^[9], 另有研究表明, APOBEC3G 能够参与体内抗病毒的固有性免疫应答^[10]。RANTES 作为 CC 家族的成员之一, 可以在一定程度上抑制 HIV 感染, 目前认为它与 HIV-1 有关。Cocchi 等研究发现, CD8⁺T 细胞释放的 RANTES 在体可抑制 HIV 的复制^[11]。Scarlati 等研究发现 RANTES 的趋化性细胞因子受体 CCR5 是 HIV-1 的初级病毒株感染细胞的主要协同受体^[12], 它一方面通过空间位阻效应去阻断病毒包装蛋白 (GP120) 与 CCR5 结合; 另一方面, 又通过下调细胞表面 CCR5 的表达, 即阻断 CCR5 内吞之后的再循环; 其中后者被认为发挥更为重要的作用。

vMIP-II 是 KSHV K4 基因编码的一种 CC 类趋化因子^[13,14], 其氨基酸序列与人 CC 类趋化因子有较高的同源性, 与 MIP-1 α 和 MIP-1 β 具有相似结构^[15]。研究显示除了抑制 HIV-1 复制外, vMIP-II 在调节 Th1/Th2 免疫平衡^[16], 血管增生^[14,17]等方面均具有重要的作用。Ganem 等发现 KSHV 裂解感染期使端粒酶永生化的微血管内皮细胞 (telomerase-immortalized microvascular endothelial, TIME) 中 ISG15 和 ISG20 等多条抗 HIV 基因表达上调^[18]; Cherqui 等发现 KSHV vMIP-II 基因使 HUVEC 细胞内 RANTES、APOBEC3G、ISG-15 和 OAS-1 等多条抗 HIV-1 基因表达明显上调^[19]。

vMIP-II 属于 CC 类趋化因子, 它通过与靶细胞膜上相应的受体结合而发挥其生理功能。CCR5 和 CXCR4 等趋化因子受体作为协同受体, 是大多数 HIV-1 病毒株进入细胞所必须利用的辅助受体, 一些共受体或其趋化因子的改变可明显地阻止和延缓 HIV 的感染或发病^[17]。Chang 等人的研究发现 KSHV 的病毒蛋白 vMIP-II 有较强的抑制 HIV-1 复制的功能, 并预言 vMIP-II 有可能发展成为一种广谱的抗 HIV-1 药物^[20]。但 vMIP-II 抑制 HIV-1 机制尚不完全清楚。本研究发现, vMIP-II 分别转染到 Jurkat 细胞和 293T 细胞后, 均不同程度地上调了 APOBEC3G 和 RANTES 的表达, 这将为 vMIP-II 的基因功能研究和其抗 HIV 感染的作用机制提供新的方向。 (下转第 4059 页)

- [11] Zhu H, Meloni BP, Bojarski C, et al. Post-ischemic modest hypothermia (35 degrees C) combined with intravenous magnesium is more effective at reducing CA1 neuronal death than either treatment used alone following global cerebral ischemia in rats[J]. *Exp Neurol*, 2005, 193(2): 361-368
- [12] Schmid-Elsaesser R, Hungerhuber E, Zausinger S, et al. Combination drug therapy and mild hypothermia: a promising treatment strategy for reversible, focal cerebral ischaemia [J]. *Stroke*, 1999, 30 (9): 1891-1899
- [13] Song W, Wu YM, Ji Z, et al. Intra- carotid cold magnesium sulfate infusion induces selective cerebral hypothermia and neuroprotection in rats with transient middle cerebral artery occlusion [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(4): 479-486
- [14] Zausinger S, Scholler K, Plesnila N, et al. Combination drug therapy and mild hypothermia after transient focal cerebral ischaemia in rats [J]. *Stroke*, 2003, 34(9): 2246-2251
- [15] Delhay C, Mahmoudi M, Waksman R. Hypothermia Therapy: Neurological and Cardiac Benefits [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(3): 197-210
- [16] Dehaes M, Aggarwal A, Lin PY, et al. Cerebral oxygen metabolism in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy during and after therapeutic hypothermia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(1): 87-94
- [17] Hennerici MG, Kern R, Szabo K. Non-pharmacological strategies for the treatment of acute ischaemic stroke [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12 (6): 572-584
- [18] Westermaier T, Stetter C, Kunze E, et al. Magnesium treatment for neuroprotection in ischemic diseases of the brain [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2013, 5(1): 6
- [19] Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, et al. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside [J]. *Int J Stroke*, 2012, 7(5): 407-418
- [20] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 92-99

(上接第 4008 页)

参 考 文 献(References)

- [1] Malim Mh, Bieniasz Pd. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5): a006940
- [2] Harris Rs, Hultquist Jf, Evans Dt. The restriction factors of human immunodeficiency virus[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(49): 40875-40883
- [3] Harris Rs, Bishop Kn, Sheehy Am, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection[J]. *Cell*, 2003, 113(6): 803-809
- [4] Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, et al. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22 [J]. *Genomics*, 2002, 79(3): 285-296
- [5] Zheng Yh, Irwin D, Kurosu T, et al. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication[J]. *J Virol*, 2004, 78(11): 6073-6076
- [6] Chang Y, Cesarman E, Pessin Ms, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma[J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1865-1869
- [7] Zheng Yh, Jeang Kt, Tokunaga K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction[J]. *Retrovirology*, 2012, 9(112): 45-73
- [8] Wolf D, Goff Sp. Host restriction factors blocking retroviral replication[J]. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 143-163
- [9] Harris Rs. Enhancing immunity to HIV through APOBEC[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10): 1089-1090
- [10] Koning Fa, Newman En, Kim Ey, et al. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets [J]. *J Virol*, 2009, 83(18): 9474-9485
- [11] Cocchi F, Devico Al, Garzino-Demo A, et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells[J]. *Science*, 1995, 270(5243): 1811-1815
- [12] Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression [J]. *Nat Med*, 1997, 3(11): 1259-1265
- [13] Kledal Tn, Rosenkilde Mm, Coulin F, et al. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1656-1659
- [14] Boshoff C, Endo Y, Collins Pd, et al. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines[J]. *Science*, 1997, 278(5336): 290-294
- [15] Moore Ps, Boshoff C, Weiss Ra, et al. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV[J]. *Science*, 1996, 274(5293): 1739-1744
- [16] Sozzani S, Luini W, Bianchi G, et al. The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant[J]. *Blood*, 1998, 92(11): 4036-4039
- [17] 罗燕, 谭晓华, 狄春红, 等. 细胞穿膜肽 pep-1 与 vMIP-II 的融合表达与纯化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(6): 1026-1032
- Luo Yan, Tan Xiao-hua, Di Chun-hong, et al. The fusion expression and purification on cell permeable peptide pep-1 and viral macrophage inflammatory protein-II[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29(6): 1026-1032
- [18] Chandriani S, Ganem D. Host transcript accumulation during lytic KSHV infection reveals several classes of host responses[J]. *PLoS One*, 2007, 2(8): e811
- [19] Cherqui S, Kingdon Km, Thorpe C, et al. Lentiviral gene delivery of vMIP-II to transplanted endothelial cells and endothelial progenitors is proangiogenic in vivo[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(7): 1264-1272
- [20] Chen S, Bacon Kb, Li L, et al. In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(1): 193-198