

学校编码: 10384
学号: 32320141153433

分类号____密级____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

黄酮类化合物 LC431 对潜伏期 HIV 再
激活的机制研究

Mechanism of Latent HIV reactivation

by flavonoid compound LC431

作者姓名: 王慧茹

指导教师姓名: 薛玉花副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

目录.....	I
Catalogue	IV
英文缩略对照表	VII
摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言	5
1.1 HIV 及其治疗.....	5
1.1.1 HIV 与 AIDS	5
1.1.2 高效抗逆转录病毒疗法 HAART	5
1.1.3 艾滋病治疗新疗法——shock & kill.....	6
1.2 真核生物基因转录	8
1.2.1 RNA 聚合酶	8
1.2.2 正性转录延伸因子 P-TEFb 及其复合物.....	9
1.3 黄酮类母核化合物	14
1.4 组蛋白、组蛋白去乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶抑制剂	15
1.4.1 组蛋白 Histone	15
1.4.2 组蛋白乙酰化.....	16
1.4.3 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 HDACi	17
1.5 本课题研究目的与意义	19
第二章 实验材料和方法	20
2.1 实验试剂、药品、仪器	20
2.1.1 细胞株、质粒.....	20
2.1.2 主要试剂和材料.....	20

2.1.3 主要实验仪器和耗材.....	21
2.2 常用溶液配方	22
2.2.1 细胞培养相关溶液.....	22
2.2.2 核抽提缓冲液配制.....	23
2.2.3 全细胞裂解液.....	24
2.2.4 免疫共沉淀 IP 溶液配制	24
2.2.5 SDS-PAGE 蛋白胶配制.....	25
2.2.6 Western Blot 相关缓冲液.....	25
2.3 实验技术和方法	27
2.3.1 细胞培养	27
2.3.2 流式细胞术.....	27
2.3.3 Luciferase 荧光素酶活性测定.....	28
2.3.5 脂质体 PEI 转染.....	29
2.3.6 小量核抽提 NE	29
2.3.7 核分级抽提 Modified Nuclear Fractionation.....	30
2.3.8 盐浓度透析.....	30
2.3.9 免疫共沉淀 IP	31
2.3.10 Western Blot.....	31
2.3.11 MTT 实验	32
2.3.12 细胞周期.....	33
2.3.13 Annexin V-FITC 细胞凋亡实验.....	33
2.3.14 SILAC (stable isotopic labelling amino acid in cell)	34
2.3.15 酸提法提组蛋白.....	34
2.3.16 溶液中酶解 FASP	35
2.3.17 C18 除盐.....	36
2.3.18 试剂盒法提 RNA	36
2.3.19 反转录.....	37
2.3.20 qRT-PCR	37

第三章 结果与讨论	39
3.1 关于多种 HIV 潜伏激活剂化合物的筛选.....	39
3.1.1 黄酮类化合物的筛选.....	39
3.2 LC431 对潜伏期 HIV 转录激活呈时间和浓度依赖性	42
3.3 LC431 协同 Prostratin、JQ1 对潜伏期 HIV 有激活作用.....	44
3.4 LC431 引起的潜伏期 HIV 再激活可以被 iCDK9 所抑制	45
3.6 LC431 处理后 P-TEFb 复合物的动态变化	46
3.6.1 LC431 可以将 P-TEFb 从 7SK snRNP 中释放出来	46
3.6.2 从 7SK snRNP 释放出来的 P-TEFb 没有被 Tat 募集组装入 SEC 复合物	47
3.6.3 从 7SK snRNP 释放出来的 P-TEFb 也没有被 Brd4 募集	48
3.7 LC431 是组蛋白去乙酰化酶抑制剂.....	49
3.7.1 PI3K 抑制剂 LY294002 可以抑制 LC431 的潜伏期 HIV 再激活作用.....	49
3.7.2 LC431 可能是组蛋白去乙酰化酶抑制剂	51
3.8 LC431 具有抗肿瘤活性.....	52
3.8.1 Parp 切割	53
3.8.2 细胞凋亡的检测.....	55
3.9 结果与讨论	55
参考文献	58
致谢.....	68

Catalogue

Catalogue in Chinese	I
Catalogue	IV
Abbreviation.....	VII
Abstract in Chinese.....	1
Abstract.....	3
Charppter I Forewords.....	5
1.1 HIV 及其治疗	5
1.1.1 HIV and its treatment.....	5
1.1.2 HAART	5
1.1.3 The new strategy to cure HIV——shock & kill	6
1.2 Profiles of transcription in eukaryotes.....	8
1.2.1 RNA Polymerase.....	8
1.2.2 P-TEFb and related complexes	9
1.3 Flavonoids drugs	14
1.4 Histone ,HDAC and HDACi	15
1.4.1 Histone	15
1.4.2 Histone acetylation.....	15
1.4.3 Histone deacetylase inhibitor	17
1.5 Backgrounds, aims, contents and significances of this projects	19
Chapter II Materials and methods.....	20
2.1 Reagents, Drugs and Apparatus	20
2.1.1 cells and plasmids	20
2.1.2 Main reagents and materials	20
2.1.3 Main apparatus and materials	21

2.2 Solutions.....	22
2.2.1 Cell culture related solution	22
2.2.3 Cell lysis solution.....	23
2.2.4 IP related solution	24
2.2.5 SDS-PAGE Fibrin glue dispensing	25
2.2.6 Western Blot related Buffer	25
2.3 Protocols and Methods	26
2.3.1 Cell culture.....	26
2.3.2 FCM	27
2.3.3 Luciferase Assay	28
2.3.5 PEI transformation	28
2.3.6 Small-scale plasmid DNA extraction.....	29
2.3.7 Modified Nuclear Fractionation.....	29
2.3.8 Dialysis	30
2.3.9 Co-immunoprecipitation IP	31
2.3.10 Western Blot.....	31
2.3.11 MTT	32
2.3.12 Cell Cycle.....	33
2.3.13 Annexin V-FITC.....	33
2.3.14 SILAC (stable isotopic labelling amino acid in cell.....	34
2.3.15 Histone Extraction	34
2.3.16 FASP	35
2.3.17 C18 salt exclusion	35
2.3.18 RNA extraction	37
2.3.19 Reverse transcription	37
2.3.20 qRT-PCR	37
Chapter III Result and analysis	39
3.1 Screening compounds about LTRs.....	39
3.1.1 Drug Screening of Flavonoids	39

3.2 LC431 activates latency HIV in time and dose depended manner...	42
3.3 LC431 has synergy with Prostratin,JQ1.....	44
3.4 iCDK9 can inhibit the HIV latency activation effect by LC431	45
3.6 P-TEFb 's equilibrium after LC431 treatment	47
3.6.1 LC431 can release P-TEFb from7SK snRNP	47
3.6.2 Tat doesn't recruit the released P-TEFb into SEC complex.....	48
3.6.3 Brd4 doesn't recruit the released P-TEFb either	48
3.7 LC431 maybe a HDACi.....	50
3.7.1 PI3Ki can inhibit the HIV latency activation effect of LC431 ...	50
3.7.2 LC431 is a kind of HDACi	51
3.8 LC431 and anti-tumor activity	54
3.8.1 Parp Cleaved	55
3.8.2 Cell apoptosis.....	55
3.9 Results and Discussion.....	56
References	59
Acknowledgement.....	68

英文缩略对照表

Abbreviation	Full Name
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ActD	Actinomycin D
BD (I, II)	Bromodomain (I, II)
BET	Bromodomains and extraterminal
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
CDK9	Cyclin dependent kinase 9
CTD	C-terminal domain
DMEM	Dulbecco's modified of Eagle's medium
DRB	5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosyl-benzimidazole
HDAC	Histone deacetylase
HATs	Histone Acetyltransferases
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HAART	Highly active antiretroviral therapy
WHO	World Health Organization
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein
PKC	Protein kinase C
RNA Pol II	RNA Polymerase II
Tat	Trans-activating factor

SEC	Super elongation complex
TAR	Transacting-response
MCAP	Mitotic chromosomes associated protein
NELF	Negative elongation factor
NTEF	Negative transcription elongation factor

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

艾滋病是因感染 HIV 病毒而引起的一种死亡率高，传播范围广的免疫缺陷综合征。高效抗逆转录病毒疗法一度被认为是治疗 HIV 的良方，尽管高效抗逆转录病毒疗法可以将病毒载量降低至检测限以下，但却不能从根本上根除病毒，因为病毒颗粒会潜伏在“病毒库”中，一经停药，病毒又会“卷土重来”。因此，科学家们提出了一种新的疗法——shock & kill，就是先用激活剂将包藏在 CD4⁺ T 细胞中的病毒激发出来，再联用 HAART 以及自身免疫系统将其一举消灭。

RNA Pol II 是真核生物转录过程最重要的聚合酶，在转录延伸阶段，P-TEFb 作为一个转录延伸因子，可以磷酸化 RNAPol II 的 CTD 区域，以及负性转录因子 DSIF 和 NELF，从而解除其抑制作用，使得转录顺利进行下去，编码出全长的 mRNA。P-TEFb 不仅是细胞通用的一个转录因子，更参与了 HIV 特异性的转录活化过程。我们想从天然化合物中筛选出一类通过激活转录从而激活 HIV 的激活剂，从而实现 shock & kill 中的第一步。

本文通过筛选几类天然和合成的化合物，发现黄酮类母核的化合物对 HIV 前病毒的再激活作用较好。黄酮类药物是一类天然药物，兼具低毒，抗炎抑菌、降血糖、抗氧化、抗辐射、抗癌、抗肿瘤以及增强免疫能力等药理作用，我们希望可以筛选到高效低毒的前体药物。经筛选我们发现其中的一个叫做 LC431 的化合物效果尤其显著，在 5 μ M 时可以达到 44% 的激活率，且该化合物的激活作用是时间和浓度依赖性的。此外，LC431 还与 JQ1 及 Prostratin 药物具有协同激活作用。关于它激活 HIV 的机制，基于本实验室的关于 P-TEFb 转录的模型，我们进行了如下探索：发现它可以把 P-TEFb 从非活性复合物 7SK snRNP 中解离出来，但是这一部分 P-TEFb 却既没有被 Tat 组装入 SEC 复合物，也没有被 Brd4 募集。后来的结果证明 LC431 可能作为一个组蛋白去乙酰化酶抑制剂，可以使组蛋白 H4 的特异性位点 K2 和 K5 乙酰化程度加强；它还通过 PI3K-AKT 途径激活 HIV 并主要是在转录起始阶段激活发挥作用。不仅如此，LC431 还在抗肿瘤方面展现了良好的活性。总之，本文经研究表明 LC431 作为一个潜在的相对低毒的 HIV 潜伏激活剂，为清除艾滋病人体内的病毒库提供了帮助和可能。

关键字：HIV 转录激活；P-TEFb；黄酮类化合物 LC431；HDACi

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

AIDs is a kind of Immune deficiency syndrome that can cause a high rate of fatality and widely spreading, Which is caused by HIV infection. Highly active antiretroviral therapy was considered a good treatment for HIV, However, although the viral load can be reduced to lower than detection limit by HAART, It cannot fundamentally eradicate the virus. Because virus particles can hide themselves into the “reservoir”, Once stopped the HAART treatment, the virus will come back. So, the scientists come up with a new stragedy named “shock & kill”, It contains two steps: First, Activator is used to force out the virus of CD4⁺T cells, Then with the combination of HAART and immune system to prevent any de novo infections.

The transcription of protein-coding genes is performed by RNA Polymerase II, and P-TEFb can phosphorylate the C-terminal domain of RNA Pol II, together with the negative elongation factor DSIF and NELF, reversing their inhibition effect into positive effect, This phosphorylation is important for stimulating the Pol II elongation activity to ensure the synthesis of full-length pre-mRNA. As a general transcription elongation factor, P-TEFb is not only required for cellular genes, but also play an important part in HIV-1 dependent transcription. We want to screen out a class of activators that activate latency HIV by activating transcription from natural compounds to achieve the first step in shock & kill.

By screening a variety of natural and synthetic compounds, We found that flavonoid compound show a good activity. Flavonoids is a kind of natural drugs which have many pharmacological effects like low toxicity, antibacterial, anti-inflammatory, hpyerglycemic, oxidation resistance, radioresistance, anti-cancer, anti-tumor effects and it can also enhance the immunity ability, We hope to provide new drug for “shock & kill ”stragedy . One flavonoid compound named LC431 has a high rate of activation in HIV lantency , which can activate 44% cells in 5 μM treatment, and its activation effect is in time and dose-dependent manner. What’s more, LC431 synergizes with JQ1 or Prostratin to reactivate latent HIV. With the well established transcriptional

regulatory model in our lab, we have found that LC431 can release P-TEFb from its inactive complex 7SK snRNP, However, this part of P-TEFb can neither be recruited into the super elongation complex, nor be recruited by Brd4. In the end, we figure out that LC431 may act as a kind of histone deacetylation inhibitor. It can increase acetylation level of histone H4 K2 and K5, It mainly stimulate HIV in the transcription initiation step through PI3K-AKT pathway. What's more, LC431 also shows a potent anti-tumor activity. To sum up, This research offers the promise that LC431 may be a potent, relatively nontoxic drug that assist in the elimination of latent reservoir in HIV⁺ patients.

Keywords: HIV transcription activation ; P-TEFb; Flavonoids compound LC431 ; HDACi

第一章 前言

1.1 HIV 及其治疗

1.1.1 HIV 与 AIDS

艾滋病---AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) 是一种危害性极大的传染病,是由于感染人类免疫缺陷型病毒 HIV (Human Immunodeficiency Virus) 引起的。HIV 最早被发现,是源于 1981 年美国洛杉矶报告的 5 例 PJP 病例(一种极其罕见的只在重症免疫缺陷患者才会出现的真菌感染肺炎)。在这 5 例被报道后,美国 CDC 收到了越来越多的类似病例,引起了人们的注意^[1]。1981 年 6 月 6 日,美国疾控中心通报全球首宗爱滋病毒感染案例,自此人类便展开了与这头号传染病的漫长抗争^[2]。HIV 是一种能攻击人体免疫系统的病毒,它把人体免疫系统最重要的 T 淋巴细胞作为主要攻击目标,大量破坏,使人体丧失免疫功能,之后出现各种并发症最终导致患者死亡。目前感染人类的 HIV 可以大致分为 1/2 两型, HIV-1 最为普遍, HIV-2 主要集中在西非区域,我们主要关注的是 HIV-1 型。HIV 在人体内的潜伏期平均为 8~9 年;患者在艾滋病病发之前,可以没有任何症状地生活和工作多年。从 WHO 网站的数据显示,截止 2015 年底,全世界有约三千七百六十万 HIV 携带者,每年新增病例二百万。超过 95% 的新发感染发生在中低收入国家。仅在 2015 年,全球有 100 多万人死于艾滋。因此,艾滋病是一类短期内快速爆发并且传播迅速的疾病;艾滋病已被列入我国乙类法定传染病,并被列为卫生监测传染病之一。

1.1.2 高效抗逆转录病毒疗法 HAART

高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) 是目前治疗艾滋病行之有效的方法,它采用两种或三种及以上抗病毒药物联合起来共同针对 HIV 病毒,所以又被称为“鸡尾酒疗法”。该疗法可以将血浆中 HIV-RNA 浓度降低至检测不到的水平 (<

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库