

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00349

· 论 著 ·

HIV-1 Tat 通过抑制启动子活性调控 MCAK 基因表达

黄越承^{1,2}, 孙 蕊², 张士猛², 徐勤枝², 周平坤², 蔡建明^{1*}

1. 第二军医大学海军医学系放射医学教研室, 上海 200433

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所四室, 北京 100850

[摘要] **目的** 验证 HIV-1 Tat 对有丝分裂着丝点关联驱动蛋白 MCAK 基因表达的调节作用并探讨其分子机制。**方法** 利用表达 Tat 的人横纹肌肉瘤细胞(TE671)模型及原核表达纯化的 Tat 蛋白,通过 Northern 印迹法和蛋白印迹技术验证 HIV-1 Tat 对 MCAK 基因表达的抑制作用。PCR 扩增 MCAK 基因各启动区片段,与荧光素酶报告质粒相连接,并转染到 TE671 细胞,通过荧光素活性分析法检测 DNA 片段启动活性,确定 MCAK 基因的活性启动区域。进一步通过 HIV-1 Tat 与 MCAK 启动区作用,分析 Tat 对启动子活性的调控作用。**结果** Northern 印迹和蛋白印迹结果证实 Tat 蛋白对 MCAK 转录、翻译水平的表达都有强烈的抑制作用;荧光报告质粒检测系统分析表明 MCAK 的核心启动区存在于-399+1 bp 区域,且其启动子活性在 Tat 存在的情况下受到明显的抑制。**结论** HIV-1 Tat 能作用于 MCAK 基因启动区-399+1 bp 区域,导致 MCAK 启动子活性降低,从而抑制 MCAK 基因的表达。

[关键词] Tat;MCAK;TE671 细胞;启动子活性

[中图分类号] R 512.91 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0349-05

HIV-1 Tat down-regulates expression of mitotic centromere-associated kinesin through inhibiting promoter activity

HUANG Yue-cheng^{1,2}, SUN Yi², ZHANG Shi-meng², XU Qin-zhi², ZHOU Ping-kun², CAI Jian-ming^{1*}

1. Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effect of HIV-1 Tat on mitotic centromere-associated kinesin (MCAK) expression and the related mechanism. **Methods** Tat-expression TE671 cell model and purified prokaryotically expressed Tat protein were used to verify the down-regulated expression of MCAK using Northern blotting and Western blotting analysis. Various DNA fragments in the promoter region of the MCAK gene were amplified with PCR, linked to the luciferase reporter plasmid, and then transferred into TE671 cells. Luciferase activity analysis was performed to measure the promoter activity of various DNA fragments, so as to determine the active promoter region of MCAK gene. Moreover, HIV-1 Tat protein was co-incubated with TE671 cells, and the promoter activity was detected to analyze the modulating effect of Tat on promoter activity *in vitro*. **Results** The results of Northern blotting and Western blotting analysis indicated that the mRNA and protein levels of MCAK were strongly decreased by Tat protein. The core region of MCAK promoter was located in -399+1 bp region, and the promoter activity was strikingly inhibited by Tat protein. **Conclusion** HIV-1 Tat has a marked inhibitory effect on MCAK expression, which might be related to the decreased promoter activity caused by Tat protein.

[Key words] Tat;MCAK;TE671 cell;promoter activity

[Acad J Sec Mil Med Univ,2010,31(4):349-353]

Tat 蛋白是 HIV-1 Tat 基因编码的一种转录激活因子, Tat 蛋白可特异性结合在病毒 RNA 5'端反式激活反应区(transactivation response, TAR),造成 HIV-1 mRNA 转录显著增强,促进 HIV-1 病毒

大量复制,增强 HIV 在宿主体内的传播速度,执行免疫抑制的功能^[1-2]。Tat 蛋白还能够与多种类型的细胞宿主蛋白相互作用进而影响细胞增殖和凋亡过程^[3-5]。由于 Tat 蛋白的致病机制相当复杂,目前对

[收稿日期] 2009-09-07

[接受日期] 2010-02-09

[基金项目] 国家自然科学基金(30400120), IAEA 协作项目(12510/R1)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30400120) and Cooperation Project of International Atomic Energy Agency(12510/R1)。

[作者简介] 黄越承,博士,讲师。E-mail: huangyuecheng369@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871149, E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn

其确切的作用机制还不清楚。

许多研究表明细胞周期的进程特别是 DNA 的复制和姐妹染色体的分离需要精确的调控,轻度的偏差将会使细胞经历基因组不稳定,促使肿瘤发生甚至死亡^[6-7]。有丝分裂着丝点关联驱动蛋白(mitotic centromere-associated kinesin, MCAK)属于 KIN I 亚家族动点马达蛋白成员,能与其他驱动蛋白、驱动蛋白结合蛋白和检查点蛋白等形成活性驱动蛋白复合物成分,发挥微管解聚酶和 ATP 酶的作用,参与调节微管的解聚、二极纺锤体的形成和染色体的分离,从而调节有丝分裂和细胞周期^[8]。抑制 MCAK 还可以导致多种动点-微管附着缺陷,提示 MCAK 在预防和纠正错误的动点-微管附着方面有重要的作用^[9-10]。

我们的前期研究从一河南 HIV-1 感染患者的病毒株中克隆了 Tat 基因,通过 Tat 转染 TE671 细胞,进行基因芯片分析发现:转染 Tat 后,Tat 高表达导致 MCAK 显著下调(与未转染细胞相比,MCAK 表达降低了 25 倍)^[11]。但关于 HIV-1 Tat 对 MCAK 表达抑制作用的相关分子机制目前还不清楚。本研究利用建立的表达 Tat 的细胞模型(pCI-Tat)和原核表达纯化的 Tat 蛋白,通过分子生物学手段检测 Tat 对 MCAK 转录、翻译水平的调节,验证了 Tat 对 MCAK 表达强烈的抑制作用;然后,利用荧光报告质粒检测系统分析 MCAK 的核心启动区以及在 Tat 存在的情况下启动子活性改变,探讨 Tat 对 MCAK 的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞和质粒 人横纹肌肉瘤细胞(TE671)和表达 Tat 的 TT2 细胞由佛罗里达大学 Chang L 博士馈赠。细胞在 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液(内含青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)中,置于 37℃ 恒温二氧化碳培养箱中培养。表达 Tat 的 pCI-Tat 和对照 pCI-NC 细胞模型由 TE671 细胞分别转染 Tat 基因或对照质粒 DNA,由本教研室建立^[11]。pET22b、pGL3-basic、pGL3-control、pTK 质粒及双荧光报告基因分析系统均为 Promega 公司产品。

1.2 Tat 融合蛋白的原核诱导表达及纯化 利用前期构建的 pET22b-Tat 质粒,转化 Rosetta 感受态细菌,挑取阳性克隆;在含氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素四抗的 LB 培养液,27℃ 振荡培养至对数中期;加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.6 mmol/L 诱导,27℃ 继续通气培养不同时间(0、1、3 h);4℃,低温离心,收集菌体;取 40 μg 样品沉淀行 10% SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,观察特

异表达产物条带,选择优化条件。另外将 PBS 溶液悬浮的 pET22b-Tat Rosetta 菌体放在冰上 30 min,用 6 mm 的探头超声破碎 20 min 至菌液澄清,离心收集制备细菌裂解上清;利用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱纯化 pET22b-Tat 蛋白。

1.3 RT-PCR 检测 MCAK mRNA 的表达 首先,用 TRIzol(Gibco 公司)试剂按其说明提取 TE671、pCI-NC、pCI-Tat 和 TT2 细胞总 RNA。以 5 μg 总 RNA 为模板,Oligo(dT)₁₅ 为引物进行反转录,用 MMLV 反转录酶进行转录反应。外源人 18S RNA 作为内参。MCAK 的引物序列:正义链:5'-GAG ATA GGC ATT GTC AGA CTA-3',反义链:5'-CGC GTT TCT ATC ATT GGT ATC AT-3',反应条件:94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,32 个循环。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳条带并纯化 PCR 产物。

1.4 Northern 印迹法验证 MCAK mRNA 的表达 纯化的 MCAK PCR 产物,利用 Klenow 酶粘端补平法标记[α-³²P]-dCTP 合成核素探针,对照内参采用 GAPDH。通过 TRIzol 法提取细胞总 RNA,抽提的 RNA 经过变性、分光光度计下测定其浓度,总 RNA 样品用 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离;电泳后转移到尼龙膜上,置于紫外交联仪内,1 200 J/cm² 交联;加入预杂交液(50% 甲酰胺,10% 硫酸葡聚糖,1 mol/L NaCl,100 μg/ml 变性鲑鱼蛋白 DNA),杂交炉中 42℃ 预杂交 3 h;加入含有相应放射性标记探针的杂交液(成分与预杂交液相同)代替预杂交液,42℃,杂交过夜;放射自显影后分光光度计进行定量分析。

1.5 蛋白印迹法检测 MCAK 蛋白的表达 参照分子克隆实验指南的实验方案。用 1% NP-40 裂解缓冲液提取 pCI-Tat、pCI-NC、TT2、TE671 细胞总蛋白或者经 Tat 处理的相应 pCI-NC 细胞总蛋白;考马斯亮蓝法进行蛋白定量后,取 60 μg 样品经 10% SDS-PAGE 分离,湿式电转移法(100 V,80 min)转移到硝酸纤维素膜;15% 脱脂奶粉封闭后,用抗 MCAK 抗体(Sigma 公司)或内参照 β-actin 抗体(Santa Cruz 公司)于 25℃ 温育 90 min;用辣根过氧化物酶标记的二抗(吉泰公司)室温孵育 90 min;TBST 漂洗后 ECL(普飞生物科技公司)显像,并扫描输入 SmartView2001 图像分析系统(上海复日科技公司)进行图像分析。

1.6 启动子荧光素酶活性分析

1.6.1 引物设计 用 Primer5.0 软件,设计 MCAK 基因启动子片段引物,在上游、下游引物前各加 Xho I 和 Hind III 酶切位点,见表 1。

表 1 用于 PCR 扩增启动区 DNA 片段的上下游引物序列

Tab 1 Upstream and downstream primers for PCR amplification of promoter region DNA fragments

Primer	Site	Length (bp)	Sequence (with enzymic restriction site)
A(u)	-1 064--1 043	21	5'-GACTCGAG TCT GCC CGG CTG CCC CAT TTG-3'
B(u)	-601--581	20	5'-GACTCGAG TGA GGC AAC ATG CTT CTC AC-3'
C(u)	-472--451	21	5'-GACTCGAG CGA GCG ATC ACT CCC ACC TCT-3'
D(u)	-399--379	20	5'-GACTCGAG CCA ACT TGC TCG AGG TCA CT-3'
E(u)	-337--316	21	5'-GACTCGAG AGG ATC CCA GAG CCC TCA TTG-3'
F(d)	-580--599	20	5'-CTAAGCTT TGC AGA AGC ATG TTG CCT CA-3'
G(d)	-447--466	20	5'-CTAAGCTT GAA GGG AGA GGT GGG AGT GA-3'
H(d)	-232--252	21	5'-CTAAGCTT TCT GGG GCT CCC ATT TCT GGT-3'
I(d)	+1--18	20	5'-CTAAGCTT TCA ATT TCG CTA ACC CTA CT-3'
J(d)	+81--+62	20	5'-CTAAGCTT GCG GGC CTG AAG CGA CGA GT-3'

u: Upstream; d: Downstream. CTCGAG: Restriction site for *Xho* I; AAGCTT: Restriction site for *Hind* III

1.6.2 荧光素酶活性分析 提取 pCI-NC、pCI-Tat 细胞基因组 DNA 作为模板,利用上述引物进行配对,PCR 扩增相应 DNA 片段;扩增片段通过 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切消化,然后插入到同样酶切后的 pGL3-basic 空载体(载体含氨苄青霉素抗性基因和荧光素酶报告基因);融合质粒转染 TE671 细胞,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.7 统计学处理 实验采用成组设计,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件对组间差异进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tat 融合蛋白的诱导表达和纯化 诱导表达试验结果表明,终浓度 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导 13 h 为最佳收获条件,原核表达的 Tat 蛋白相对分子质量约为 12 000。纯化产物经质谱鉴定确认为 Tat 蛋白,纯度达 95%,并经过蛋白印迹分析验证正确(图 1)。

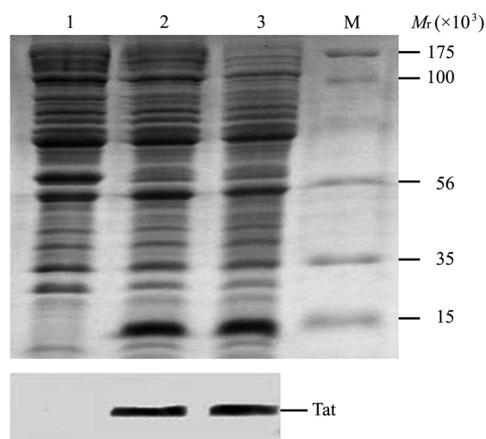


图 1 IPTG 诱导 Rosetta 细菌中 Tat 蛋白的表达

Fig 1 Expression of Tat protein in Rosetta induced by IPTG

M: Protein marker; 1-3: 0, 1, 3 h induced by IPTG

2.2 RT-PCR 和 Northern 印迹分析证实 MCAK mRNA 表达抑制 微阵列检测 TE671 及 TT2 细胞基因表达谱的差异,结果显示 MCAK 的表达在 TT2 细胞中显著下调。为了证实其表达抑制,我们使用半定量 RT-PCR 和 Northern 印迹分析了 2 个转染了 Tat 基因的细胞系(TT2 和 pCI-Tat)在 mRNA 水平 MCAK 的表达,结果如图 2。

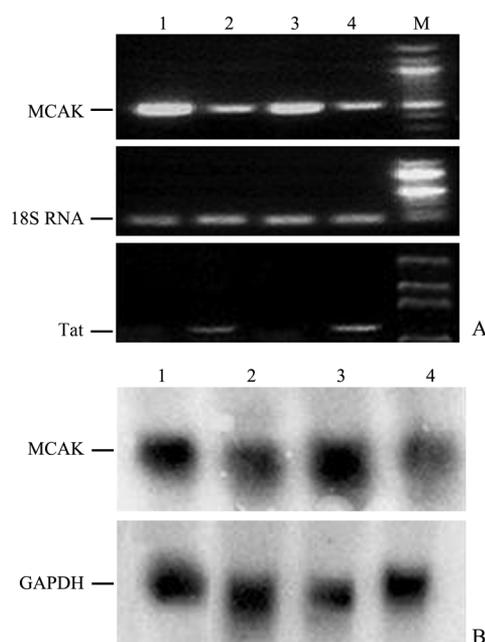


图 2 RT-PCR(A)和 Northern 印迹(B)检测 MCAK mRNA 的表达

Fig 2 MCAK mRNA level by RT-PCR(A) and Northern blotting(B) analysis

1: TE671; 2: TT2; 3: pCI-NC; 4: pCI-Tat; M: DNA marker

2.3 蛋白印迹法验证 Tat 对 MCAK 蛋白表达水平抑制 在 pCI-Tat 细胞中, MCAK 的表达水平也明显低于 pCI-NC(图 3), 与基因检测结果相符; 通过 Tat 蛋白和 Tat 培养上清进行刺激实验, 结果发现, Tat 蛋白刺激后, MCAK 的表达水平也明显降低,

具有明显的剂量效应(图4)。pCI-Tat 细胞的培养上清作用于 pCI-NC 细胞,在作用 4 h 后 MCAK 的表达也受到抑制(图5),说明 Tat 蛋白能从 pCI-Tat 细胞中分泌出来,并能进入 pCI-NC 细胞中发挥抑制 MCAK 表达的功能。

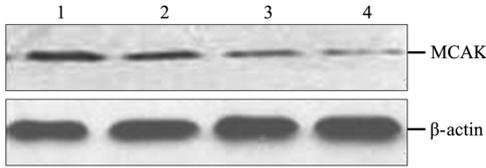


图3 蛋白印迹法检测 MCAK 蛋白的表达

Fig 3 MCAK protein expression by Western blotting analysis

1:TE671;2: pCI-NC;3: TT2;4: pCI-Tat

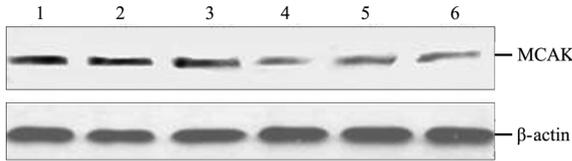


图4 不同剂量 Tat 蛋白处理 24 h 后 MCAK 蛋白的表达

Fig 4 MCAK protein level in TE671 cell after treatment with various concentrations of Tat protein

1-5: Cells treated with 0, 2, 4, 8, and 16 μg/ml Tat protein, respectively; 6: pCI-Tat cell

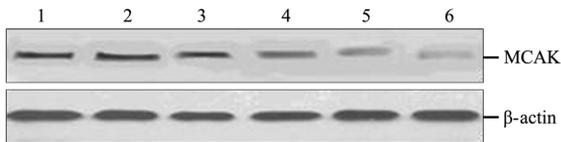


图5 pCI-Tat 细胞培养上清处理后不同时间点 MCAK 的表达

Fig 5 MCAK protein levels after treatment with pCI-Tat culture supernatant for different periods

1-6: Treatment with pCI-Tat culture supernatants for 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h, respectively

2.4 启动子片段构建和报告基因活性检测 针对 MCAK 启动区-1 220+81 bp 区段,进行启动子区域生物信息功能分析(<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan>)。结果发现人 MCAK 基因启动区-37 bp 位点有典型的 TATA box 结构,启动区序列富含 GC,有多个 Sp1 结合位点及其他转录因子结合位点如: CREB、SIF、GCF、E4TF1、AP-2、NF-κB 等。推测核心启动区位于-73-323 bp 区域。

2.4.1 PCR 扩增 MCAK 启动区片段 如图 6 所示,利用不同组合配对引物扩增的 MCAK 启动子片

段的电泳图,得到相应的 MCAK 启动区 DNA 片段,并通过测序分析比对确定扩增产物序列正确性。

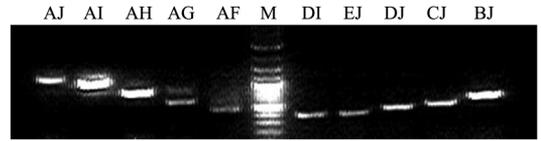


图6 MCAK 启动区片段 PCR 扩增结果

Fig 6 DNA fragments of MCAK promoter region amplified by PCR

AJ-BJ: The primer pairs used for PCR amplification;M: DNA marker

2.4.2 启动子活性分析 本研究分析的 MCAK 启动区全长片段是-1 064+81 bp 的 AJ 片段。启动子活性分析结果如图 7 所示,含 DI(相当于-399+1 bp 片段)区域的 DNA 片段的活性与 AJ 活性相当,或稍微减弱。具有较高启动子活性的片段包括 AJ、AI、BI、CI、DI,最小的片段为 DI。而不包含 DI 的片段,启动子活性显著低于 AJ 片段,其活性接近于阴性对照质粒的启动子活性水平。提示 DI 区域可能存在 MCAK 核心启动子,与生物信息学分析结果相符。而在加入 Tat 蛋白后,启动子活性明显被抑制(图 7B),说明 Tat 蛋白对 MCAK 的启动子活性有抑制作用。

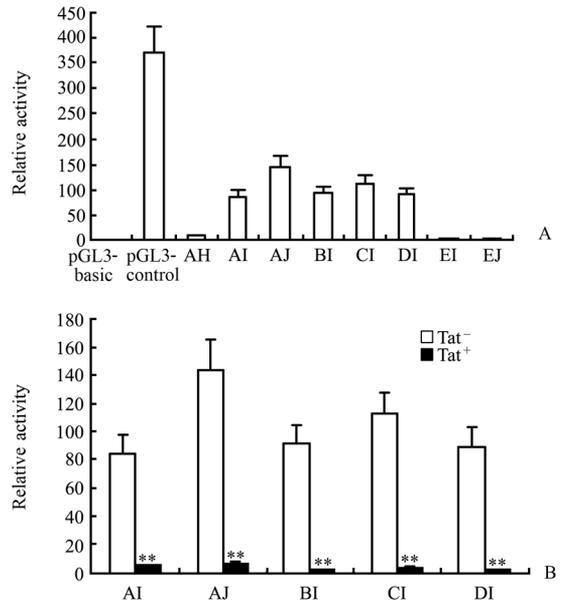


图7 荧光素酶报告基因系统检测 MCAK 启动区片段的相对启动子活性

Fig 7 Relative activity of MCAK promoter region as detected by luciferase report gene system

A: Promoter activity of various DNA fragments; B: Promoter activity of DNA fragments with/without Tat(Tat⁺/Tat⁻) protein treatment. AH-EJ: Various DNA fragments of MCAK promoter region.

** P<0.01 vs Tat⁻

3 讨论

人类细胞含 46 个染色体,进行分裂时,复制后的染色质经由微管将 2 套染色体牵引、分离至 2 个子细胞。非倍数染色体异常即可能因微管体两端牵引到同一条染色分体,而造成数目异常的问题。MCAK 在着丝粒富集,作为动力蛋白或者促微管解聚因子,对于染色体的移动发挥着重要的作用。当微管与染色体异常结合时,MCAK 即活化并移除结合错误的微管体。因此,MCAK 对纠正错误的微管与染色体结合,维持细胞基因组的稳定性和细胞分裂的正常运行具有重要意义。而其与相关调控因子相互作用的研究也具有重要应用价值。如细胞分裂时,Aurora A 能通过磷酸化 MCAK 调节二极纺锤体的形成,Aurora B 调控 MCAK 以破坏结合异常的微管^[12-13],目前已知许多肿瘤内 Aurora 激酶家族会异常表达。

Tat 蛋白能够通过多种途径与各种类型的细胞宿主蛋白相互作用进而促进增殖^[14-15]。而细胞恶性增殖是恶性肿瘤的特征之一,临床资料证实,在 HIV-1 感染后期机体会出现各种并发症,如各系统的肿瘤。我们的研究结果表明,TE671 转染了来源于 HIV-1 感染的不同病毒株的 Tat 基因后,MCAK 表达显著抑制。

在前期的研究中,我们证实了 Tat 可以抑制 MCAK 的表达^[11]。Tat 刺激可以导致 MCAK mRNA 和蛋白表达水平明显降低。但其表达抑制的机制尚不清楚。本研究证实了不论是稳定转染细胞的外源性表达 Tat 还是原核表达纯化的 Tat 蛋白,对 MCAK 的表达都具有明显的抑制作用,导致其转录和翻译水平显著降低,并且具有明显的剂量和时间效应。通过启动子活性分析,发现 MCAK 的核心启动子区位于-399+1 bp 区域,Tat 与启动区相应 DNA 片段作用后,MCAK 启动子活性受到显著抑制。这提示 Tat 可能与 MCAK 基因上游启动区作用,导致启动子活性降低,从而促使 MCAK 的表达抑制。MCAK 启动子活性降低至少是 Tat 诱发的 MCAK 表达抑制的原因之一。由于 MCAK 的表达异常经常导致细胞分裂和纺锤体结构和功能的异常,与细胞的增殖异常和恶性转化显著相关,因此有必要针对 Tat、MCAK 的变异与癌症的相关性进行进一步研究。

[参考文献]

[1] Mingaleeva R N, Chernov I P, Kopantsev E P, Stukacheva E A, Skaptsova N V, Sverdlov E D. [Study of transactivation

effect on transcription by Tat-TAR-system of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in non-lymphoid cells HEK293 and Calu-1][J]. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 2009 (2):11-15.

- [2] Molle D, Maiuri P, Boireau S, Bertrand E, Knezevich A, Marcello A, et al. A real-time view of the TAR: Tat; P-TEFb complex at HIV-1 transcription sites[J]. Retrovirology, 2007, 4: 36.
- [3] Peruzzi F. The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis[J]. Front Biosci, 2006, 11:708-717.
- [4] Gibellini D, Vitone F, Schiavone P, Re M C. HIV-1 tat protein and cell proliferation and survival: a brief review[J]. New Microbiol, 2005, 28:95-109.
- [5] Misumi S, Takamune N, Ohtsubo Y, Waniguchi K, Shoji S. Zn²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2004, 20:297-304.
- [6] Kaye J A, Melo J A, Cheung S K, Vaze M B, Haber J E, Toczycki D P. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation[J]. Curr Biol, 2004, 14: 2096-2106.
- [7] Sawyer J R, Tricot G, Lukacs J L, Binz R L, Tian E, Barlogie B, et al. Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 42:95-106.
- [8] Manning A L, Ganem N J, Bakhom S F, Wagenbach M, Wordeman L, Compton D A. The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells[J]. Mol Biol Cell, 2007, 18:2970-2979.
- [9] Huang H, Feng J, Famulski J, Rattner J B, Liu S T, Kao G D, et al. Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments[J]. J Cell Biol, 2007, 177:413-424.
- [10] Kline-Smith S L, Khodjakov A, Hergert P, Walczak C E. Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15:1146-1159.
- [11] Sun Y, Huang Y C, Xu Q Z, Wang H P, Bai B, Sui J L, et al. HIV-1 Tat depresses DNA-PK(CS) expression and DNA repair, and sensitizes cells to ionizing radiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 65:842-850.
- [12] Zhang X, Ems-McClung S C, Walczak C E. Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19:2752-2765.
- [13] Knowlton A L, Lan W, Stukenberg P T. Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK[J]. Curr Biol, 2006, 16:1705-1710.
- [14] Seve M, Favier A, Osman M, Hernandez D, Vaitaitis G, Flores N C, et al. The human immunodeficiency virus-1 Tat protein increases cell proliferation, alters sensitivity to zinc chelator-induced apoptosis, and changes Sp1 DNA binding in HeLa cells[J]. Arch Biochem Biophys, 1999, 361:165-172.
- [15] Cantaluppi V, Biancone L, Boccellino M, Doublier S, Benelli R, Carlone S, et al. HIV type 1 Tat protein is a survival factor for Kaposi's sarcoma and endothelial cells[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001, 17:965-976.