

## 利托那韦抗 HTLV-1 病毒侵染及抑制成人 T 细胞白血病细胞增殖机制研究

任欣欣<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 朱圣宇<sup>2</sup>, 张馨逸<sup>2</sup>, 王旻然<sup>2</sup>, 徐玲玲<sup>1\*</sup>, 赵铁军<sup>2\*</sup> (1. 浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华 321004; 2. 浙大城市学院医学院, 杭州 310015)

**摘要:**目的 研究利托那韦(ritonavir)对人类 T 细胞白血病病毒 1 型(human T-cell leukemia virus type-1, HTLV-1)病毒侵染及成人 T 细胞白血病(adult T-cell leukemia, ATL)细胞恶性增殖抑制作用,并探讨其分子机制。方法 采用 CCK-8 和克隆形成实验检测 ritonavir 对多种 ATL 细胞增殖的影响;流式细胞术、双荧光素酶报告基因技术、实时定量聚合酶链反应(qPCR)和 Western blot 检测 ritonavir 对 HTLV-1 病毒侵染的影响;流式细胞术检测 ritonavir 对 ATL 细胞周期和凋亡的影响。结果 Ritonavir 能够抑制 4 种 ATL 细胞株的增殖及 HTLV-1 阳性细胞株的克隆性增殖,前者具有明显的量效关系,且对 HTLV-1 阳性细胞株的抑制作用更明显( $P < 0.05$ )。阳性细胞株与 JETWT35 细胞共培养后立即加入 ritonavir,药物可明显下调后者红色荧光蛋白的表达,抑制 HTLV-1 病毒侵染到受体细胞( $P < 0.01$ )。阳性细胞株和 Jurkat 细胞共培养体系中立即加入 ritonavir 后,受体细胞中 HTLV-1 相关病毒基因 *Tax* 等 mRNA 水平均有抑制作用( $P < 0.01$ ),而 12 h 病毒侵染完成后再加入 ritonavir,则无这些明显影响。Ritonavir 剂量依赖性地抑制阳性细胞株 ATL-T 细胞表面 HTLV-1 包膜蛋白亚基 gp46 的表达,从而抑制 HTLV-1 病毒的产生和侵染( $P < 0.01$ )。Ritonavir 将细胞阻滞于 G<sub>1</sub>期,并促进细胞凋亡,且 HTLV-1 阳性细胞株的凋亡率显著高于阴性细胞株( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 Ritonavir 通过降低 WT-Luc 病毒启动子活力,下调 HTLV-1 相关病毒基因(*Tax*、*HBZ*、*Gag*、*Pol* 和 *Env*)表达,以及减少阳性细胞表面 HTLV-1 包膜蛋白亚基 gp46 表达从而抑制 HTLV-1 病毒的产生及侵染,并将细胞阻滞于 G<sub>1</sub>期,诱导其凋亡,从多环节有效抑制 ATL 细胞增殖。

**关键词:**利托那韦;人类 T 细胞白血病病毒 1 型;病毒侵染;增殖;成人 T 细胞白血病

doi:10.11669/cpj.2024.08.003 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)08-0676-11

### Anti-HTLV-1 Virus Transmission and Inhibition of Cell Proliferation of Adult T-Cell Leukemia by Ritonavir and the Mechanism Study

REN Xinxin<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, ZHU Shengyu<sup>2</sup>, ZHANG Xinyi<sup>2</sup>, WANG Minran<sup>2</sup>, XU Lingling<sup>1\*</sup>, ZHAO Tiejun<sup>2\*</sup> (1. College of Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; 2. School of Medicine, Hangzhou City University, Hangzhou 310015, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the inhibitory effect of ritonavir on human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) transmission and malignant proliferation of adult T-cell leukemia (ATL) cells, and explore its molecular mechanism. **METHODS** The proliferation and vitality of ritonavir on various leukemic cells were evaluated by CCK-8 and colony formation assay. The effects of ritonavir on HTLV-1 virus transmission were detected by flow cytometry, dual luciferase reporter gene technique, qPCR and Western blot. The effects of ritonavir on the cell cycle and apoptosis of ATL cells were examined through flow cytometry. **RESULTS** Ritonavir could inhibit the proliferation of four ATL cell lines and the clonal proliferation of HTLV-1 positive cell lines. The former exhibited a significant dose-effect relationship and had a more pronounced inhibitory effect on HTLV-1 positive cell lines ( $P < 0.05$ ). Additionally, the administration of ritonavir immediately after co-culture of HTLV-1 positive cell lines with JETWT35 cells resulted in a significant down-regulation of red fluorescent protein expression in JETWT35 and inhibited the transmission of HTLV-1 virus into recipient cells ( $P < 0.01$ ). Upon immediate addition of ritonavir to the co-culture system of HTLV-1 positive cell lines and Jurkat cells, there was a notable inhibition of HTLV-1-related gene *Tax* and other genes mRNA in recipient cells ( $P < 0.01$ ); however, no significant effect was observed when ritonavir was added 12 h after virus transmission. Moreover, ritonavir demonstrated a dose-dependent inhibition of gp46

**基金项目:**国家自然科学基金项目资助(32370147,31970173);浙江省自然科学基金探索项目资助(LY21C010001)

**作者简介:**任欣欣,女,硕士研究生 研究方向:分子细胞生物学;王莹,女,硕士研究生 研究方向:分子细胞生物学。任欣欣与王莹为共同第一作者 \* **通讯作者:**徐玲玲,女,硕士,实验师 研究方向:细胞生物学 Tel:(0579)82282067;赵铁军,男,博士,教授,博士生导师 研究方向:分子细胞生物学 Tel:(0571)88285793

expression on the cell membrane of the HTLV-1 positive cell line ATL-T, thereby suppressing the production of HTLV-1 virus ( $P < 0.01$ ). Ritonavir impeded cell progression into  $G_1$  phase and facilitated apoptosis, with the apoptosis rate of HTLV-1 positive cell lines being significantly greater than that of HTLV-1 negative cell lines ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Ritonavir exerts inhibitory effects on the production and transmission of HTLV-1 virus by diminishing the activity of WT-Luc virus promoter, suppressing the expression of HTLV-1-related virus genes (*Tax*, *HBZ*, *Gag*, *Pol*, and *Env*). Additionally, it inhibits the expression of the HTLV-1-positive membrane surface envelope protein subunit gp46. Furthermore, ritonavir induces apoptosis in ATL cells by arresting cell cycle in the  $G_1$  phase, thereby effectively suppressing cell proliferation.

**KEY WORDS:** ritonavir; human T-cell leukemia virus type-1; viral transmission; proliferation; adult T-cell leukemia

成人 T 细胞白血病 (adult T-cell leukemia, ATL) 是由人类 T 细胞白血病病毒 1 型 (human T-cell leukemia virus type-1, HTLV-1) 感染引起的侵袭型 T 细胞恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。该病毒是首个被发现的人类逆转录病毒,感染后可引起严重的神经系统性疾病及癌症等<sup>[2-3]</sup>。ATL 潜伏期长,发病机制复杂,目前并无公认的治愈 ATL 的方法或药物<sup>[4]</sup>。现阶段临床上主要的治疗方法有常规化疗、一线抗病毒疗法及异基因造血干细胞移植等,其中一线抗病毒疗法备受关注。目前现行常规抗病毒治疗多采用齐多夫定 (zidovudine, AZT) 与干扰素  $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , INF- $\alpha$ ) 联用的方法,且该方法现已纳入欧洲和美国的护理标准。该疗法虽能明显改善患者的临床症状、延长生存期,但仍存在对某些亚型 (如淋巴瘤型治疗生存率接近 0) 无效、耐药性强、对病毒的靶向性不强等缺陷<sup>[5]</sup>,因此,寻求新的疗效好、靶向性强的抗病毒药物势在必行。

HTLV-1 主要通过病毒学突触或细胞导管和受体细胞接触来实现有效的病毒传播<sup>[6]</sup>,因此,抑制成熟病毒粒子的产生和侵染成为现阶段抗病毒药物开发的研究重点。利托那韦 (ritonavir) 是 1996 年被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市的一种人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 天冬氨酸蛋白酶抑制剂,通过抑制 HIV 蛋白酶对 HIV Gag、Gag-Pol 蛋白前体进行切割,从而使 HIV 颗粒保持在未成熟的状态,抑制成熟具有传染性 HIV 病毒颗粒的产生,减缓 HIV 在细胞中的蔓延,延迟感染和疾病发展<sup>[7]</sup>。近年来不少研究表明,ritonavir 能诱导多种肿瘤细胞 (乳腺癌<sup>[8]</sup>、胰腺癌<sup>[9]</sup>等) 凋亡及周期阻滞,从而发挥抗肿瘤作用。此外,2021 年 11 月美国 FDA 紧急授权辉瑞公司研发的新型抗病毒药物帕克洛维 (paxlovid) 用于治疗新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19),2022 年 2 月中国国家药监局应急特别批准 Paxlovid 进口注册,用于 COVID-19 的临床治疗<sup>[10]</sup>。Paxlovid 即为

ritonavir 和奈玛特韦 (nirmatrelvir) 两种抗病毒药物组合包装而成的小分子新冠病毒治疗药物,可以有效抑制新冠病毒在体内的复制,并对多种变异株表现出抗病毒活性<sup>[11]</sup>,作为首个口服新冠病毒治疗新药,目前正在全球临床研究和疫情防控中发挥着极其重要的作用。

HTLV-1 与 HIV 都作为与人类疾病相关的逆转录病毒,其蛋白酶的结构和功能具有相似性,已有研究推测未来 ritonavir 应用于 HTLV-1 治疗具有一定的可行性<sup>[12]</sup>,但相关研究鲜有报道。本研究选用多种 ATL 细胞为研究对象,采用 CCK-8、克隆形成实验检测了 ritonavir 对 HTLV-1 细胞增殖的影响,并通过流式细胞术、Western blot、实时定量聚合酶链反应 (qPCR) 和双荧光素酶报告基因技术深入探究了 ritonavir 抑制 HTLV-1 病毒粒子产生和侵染的分子机制,采用流式细胞术检测了 ritonavir 对 HTLV-1 细胞周期及凋亡的影响。该研究成果探讨了 ritonavir 杀伤 ATL 细胞的具体机制,以期能为抗 HTLV-1 特异性靶向药物的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

药品: ritonavir (美国 Apex bio 公司, CAS: 155213-67-5,批号: A820311337769,有效期至 2025 年 5 月,分子式为  $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$ ,相对分子质量为 720.9,纯度为 99%)。

细胞:未感染 HTLV-1 病毒的 T 细胞株,文中简称为 HTLV-1 阴性细胞株,如 Jurkat 和 Molt-4,感染 HTLV-1 病毒简称为 HTLV-1 阳性细胞株,如 ATL-T、ATL-2 细胞株。其中,JETWT35、Jurkat、Molt-4、ATL-T 细胞株为本实验室保存,ATL-2 细胞株为日本京都大学馈赠。

试剂: LTX/Plus 转染试剂、Mitomycin C (美国 Sigma 公司,批号分别为 CN2481212、0000121182); GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司,批号: 00083126); Anti-HTLV-1 gp46 抗体 (美国 Santa Cruz

公司,批号 F0420);双荧光素酶报告基因试剂盒(美国 Promega 公司,批号:0000449801);CCK-8 试剂盒(美国 Apex bio 公司,批号:K1D1B11133EF5E);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,批号:033022220428)。

仪器:实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo fisher 公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);CytoFLEX S 流式细胞仪(美国 Beckman 公司);iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);管式发光检测仪(德国 Berthold 公司)。

## 1.2 细胞培养

细胞复苏后,用含有体积分数 10% FBS、体积分数 1% 双抗的 RPMI-1640 完全培养基在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行消化传代。

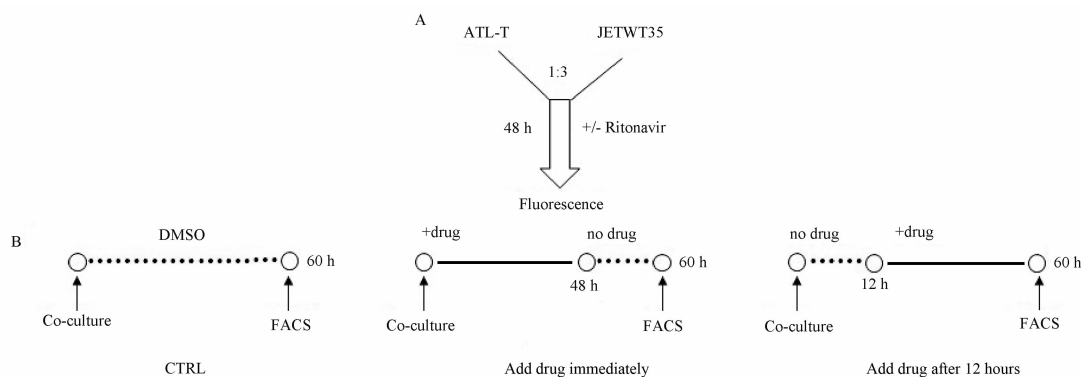
## 1.3 CCK-8 和克隆形成率实验检测 ritonavir 对细胞增殖能力的影响

以每孔 3 000 个细胞接种于 96 孔板中,不含细胞的培养基组为空白对照组,Jurkat 细胞和 Molt-4

细胞分别加入终浓度为 0、10、15、30、40、50 μmol · L<sup>-1</sup> 的 ritonavir,ATL-T 细胞和 ATL-2 细胞分别加入 0、10、15、20、30、40 μmol · L<sup>-1</sup> 的 ritonavir,每组 3 复孔。常规培养 0、24、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,培养 4 h 后,酶标仪 450 nm 波长下测量光密度(OD)值,计算 IC<sub>50</sub> 值。ATL-T 接种后培养过夜待细胞贴壁,加入 ritonavir (20 μmol · L<sup>-1</sup>),孵育 12 ~ 14 d,出现细胞克隆后,弃去培养基,甲醇固定并用结晶紫染色后拍照。

## 1.4 细胞共培养及流式细胞术检测 ritonavir 对 HTLV-1 阳性细胞株侵染能力的影响

将 ATL-T 和 JETWT35 细胞按体积比 1:3 进行混合,每孔 1.6 × 10<sup>5</sup> 个接种于 48 孔板中培养 2 h,待细胞基本贴壁后,对照组加入相应浓度的二甲基亚砜(DMSO)继续培养 60 h,立即加入药物组加入 10 μmol · L<sup>-1</sup> ritonavir;12 h 后加入药物组待细胞培养 12 h 后,再加入同等浓度药物(图 1)。药物统一处理 48 h 后收集细胞,2 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 2 min,弃上清,用 PBS 重悬,流式细胞仪检测荧光强度。



A - 细胞共培养处理流程图;B - 药物处理流程图;CTRL - 对照组;FACS - 荧光激活细胞分选术。

A - flow chart of cell co-culture processing; B - flow chart of drug treatment; CTRL - control; FACS - fluorescence - activated cell sorting.

图 1 细胞共培养及药物处理流程图

Fig. 1 Cell co-culture and drug treatment flowchart

## 1.5 双荧光素酶报告基因实验

将 ATL-T、ATL-2 细胞接种于 6 孔板中,并用 100 μg · mL<sup>-1</sup> Mitomycin C (MMC) 处理 ATL-T 细胞 1 h,从而排除 HTLV-1 供体细胞对报告基因结果的影响。将 Jurkat 细胞接种于 24 孔板中,并用 LTX/Plus 转染试剂转染 HTLV-1 启动子报告基因质粒 WT-Luc, LTX-Plus-质粒浓度按照 1:2:1 的比例进行转染。将经过 MMC 处理的 ATL-T 与转染了 WT-Luc 的 Jurkat 以 1:1 共培养,然后按“1.4”项下分组加药处理后收集细胞,双荧光素酶报告基因检测各组细胞中荧光素酶的活性。

## 1.6 qPCR 法检测 ritonavir 对 HTLV-1 病毒相关基因表达的影响

加药处理后收集细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA(全程冰上操作),将 RNA 逆转录为 cDNA,PCR 仪定量检测,引物由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成,引物序列见表 1。

## 1.7 Western blot 检测 ritonavir 对 HTLV-1 阳性细胞内 gp46 表达的影响

细胞经药物处理后加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 15 min 后提取总蛋白。12 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 收集上清液,BCA 定量后经电泳分离蛋白,半

干电转法将蛋白转移至 PVDF 膜,再用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗、二抗孵育后取出 PVDF 膜并用 PBST 清洗,ECL 化学发光检测条带。

表 1 HTLV-1 相关基因引物序列

Tab.1 HTLV-1 related gene primer sequence

| Gene | Primer forward        | Primer reverse        |
|------|-----------------------|-----------------------|
| Tax  | TCTCACACGGCCTCATAACAG | ATAATTTGGGGCTCATGGTCA |
| HBZ  | TGTTTCGATGCCTGCCTGTG  | GGATAATAGCCCGTCCACCA  |
| Gag  | CTTTGCTCCTCCCTCGTG    | TTGCTGGTATTCGCGCTTA   |
| Pol  | CCTCCTGCCCGCTTACT     | GTTGTGGTTGCCCTTGC     |
| Env  | TGGCGGAGGCTATTATTCAG  | TTGAGGCGTGACACTTCTTG  |
| 18S  | AACCCGTTGAACCCCATF    | CCATCCAATCGGTAGTAGCG  |

### 1.8 流式细胞术检测 ritonavir 对阳性细胞株表面 HTLV-1 包膜蛋白亚基 gp46 表达的影响

将 ATL-T、ATL-2 细胞密度调整为  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  接种于 12 孔板中,加入终浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ritonavir 处理细胞 48 h。收集细胞并计数,每组取  $1 \times 10^5$  个细胞加入 Anti-HTLV-1 gp46 抗体,室温孵育 15 min。用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,再加入山羊抗鼠 IgG(594 荧光标记二抗),室温孵育 15 min。流式细胞仪检测细胞表面红色荧光的染色情况,并统计分析。

### 1.9 流式细胞术检测 ritonavir 对细胞周期与凋亡的影响

收集细胞后加入体积分数 70% 乙醇固定细胞。次日  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min 弃乙醇,PBS 洗涤后收集细胞。每管加入  $10 \mu\text{L}$  RNase A 和  $25 \mu\text{L}$  PI 染色液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光水浴 30 min 后上机,Flow Jo 软件检测 DNA 含量。

以  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的密度将细胞接种于 12 孔细胞培养板中,分别加入  $10, 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ritonavir 处理,每组 3 复孔,孵育 48 h 后收集细胞。避光条件下加入  $5 \mu\text{L}$  的 FITC 和 PI,室温下避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。

### 1.10 统计学分析

所有实验至少进行 3 次重复,采用 Graphpad Prism 8.0 软件对结果进行统计分析和作图,结果报告为  $\bar{x} \pm s$ ,组间统计比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  表示在统计学上具有显著性差异,以  $P < 0.01$  表示在统计学上具有极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 ritonavir 显著抑制多种 ATL 细胞的恶性增殖

采用 CCK-8 法检测不同浓度的 ritonavir 在 48 h

内对 HTLV-1 阴性细胞株 (Jurkat、Molt-4) 和 HTLV-1 阳性细胞株 (ATL-T、ATL-2) 增殖活性的影响。结果见图 2A,  $10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ritonavir 对多种 ATL 细胞株增殖都存在抑制作用,且该抑制作用呈现一定的时间和剂量依赖性。统计分析可知,ritonavir 对 Jurkat、Molt-4、ATL-2、ATL-T 的半数抑制浓度  $\text{IC}_{50}$  分别为:  $40.23, 51.70, 29.93, 36.84 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与 Jurkat、Molt-4 相比,ritonavir 对 ATL-T、ATL-2 具有更为明显的抑制作用,且存在统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (图 2B)。表明 ritonavir 对多种不同来源的 ATL 细胞增殖均存在显著抑制,但其对 HTLV-1 阳性细胞的抑制作用更为明显。因此,后续选择将 ATL-T、ATL-2 作为主要的研究对象,进一步探索 ritonavir 抗 HTLV-1 病毒粒子产生和侵染的分子机制。

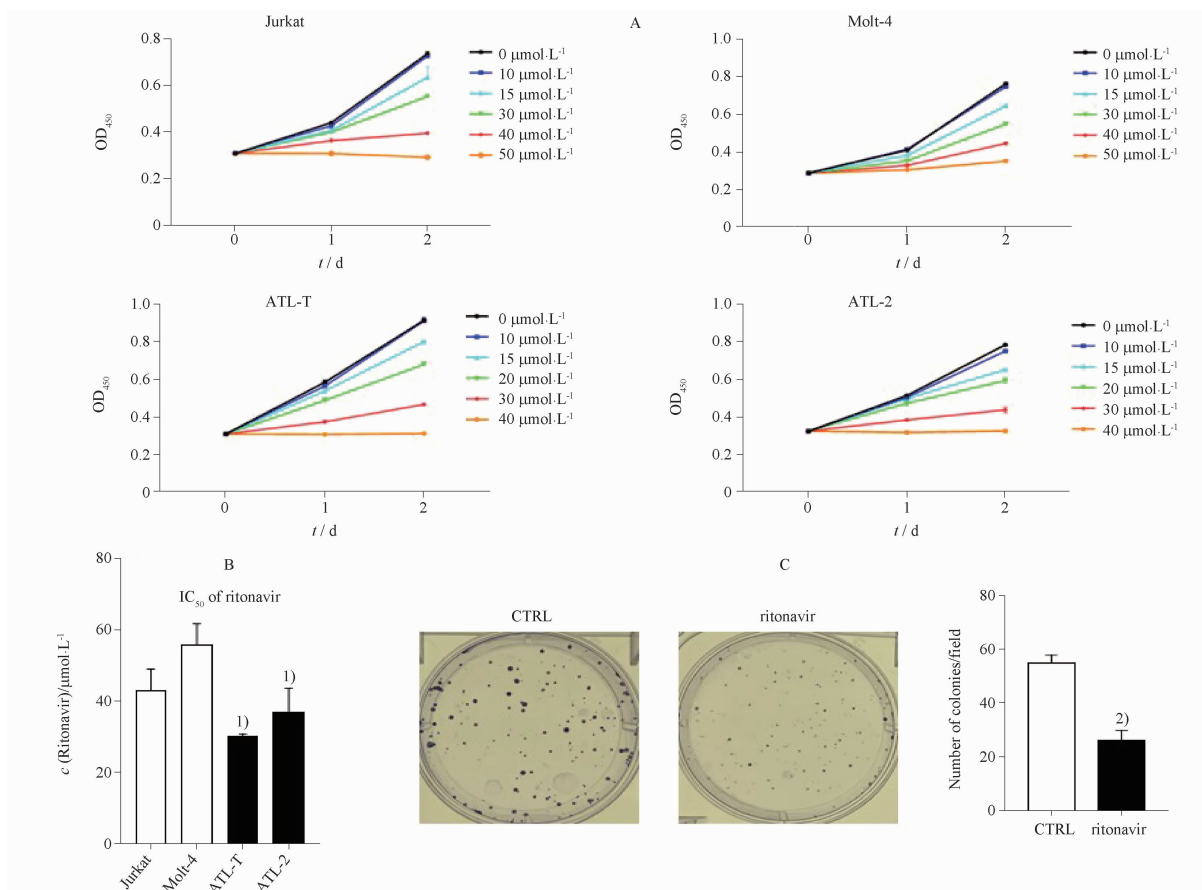
为了再次确认 ritonavir 对 HTLV-1 阳性细胞株生长的抑制作用,本研究采用了克隆形成实验。结果见图 2C,与 DMSO 处理的对照组相比,ritonavir 处理组的 ATL-T 细胞克隆数显著减少 ( $P < 0.01$ ),表明 ritonavir 能明显抑制 HTLV-1 阳性细胞株的克隆性增殖。

### 2.2 ritonavir 抑制 JETWT35 细胞中红色荧光蛋白 tdTomato 的表达

JETWT35 是经过改造的 Jurkat 报告细胞系,该细胞转染了一个含有 HTLV-1 病毒蛋白 Tax 反应元件的报告基因质粒。在 HTLV-1 感染及 Tax 表达情况下,Tax 反应元件被活化,从而诱导其下游红色荧光蛋白 tdTomato 的表达<sup>[13]</sup>。采用 ATL-T 和 JETWT35 细胞共培养实验检测 ritonavir 对 HTLV-1 病毒粒子侵染的影响,结果见图 3,“立即加入药物组”能抑制 JETWT35 中红色荧光蛋白的表达 ( $P < 0.01$ )。而“12 h 后加入药物组”对红色荧光蛋白的表达无明显影响 ( $P > 0.05$ ),这表明 ritonavir 可抑制细胞与细胞接触介导的 HTLV-1 侵染,而病毒侵染完成后药物则对 Tax 反应元件活化无影响。

### 2.3 ritonavir 抑制 HTLV-1 侵染 JETWT35 受体细胞

为进一步验证 ritonavir 对 JETWT35 细胞中荧光蛋白表达的影响,本研究运用流式细胞术检测 JETWT35 细胞中的荧光强度。ATL-T、ATL-2 与 JETWT35 细胞共培养实验组中,“立即加入药物组”皆能显著抑制 JETWT35 细胞中红色荧光的表达 ( $P < 0.01$ ),12 h 后加入药物则无影响 ( $P > 0.05$ ),这一结果表明 ritonavir 仅能抑制 HTLV-1 侵染受体细胞这一过程,而在病毒侵染完成后再加入药物则无影响,见图 4。

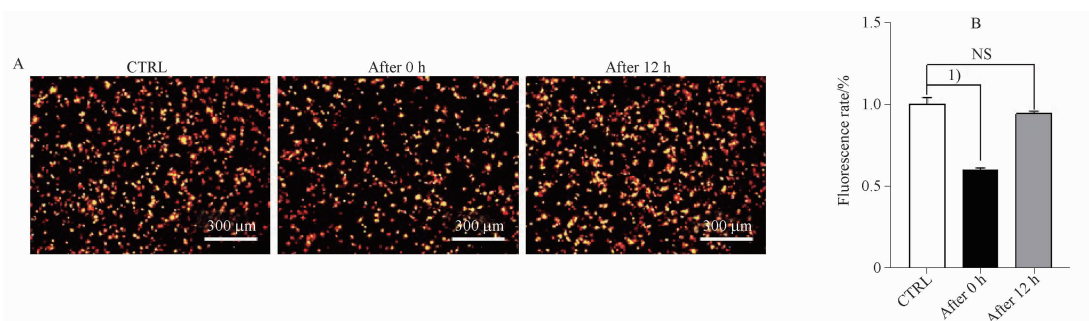


A - CCK-8 法检测 ritonavir 对成人 T 细胞白血病细胞 Jurkat, Molt-4、ATL-T、ATL-2 增殖的影响; B - ritonavir 作用于 HTLV-1 阴性和阳性细胞株的  $IC_{50}$ ; C - 克隆形成率实验检测 ritonavir 对 ATL-T 细胞增殖的影响; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

A - effects of ritonavir on proliferation in Jurkat, Molt-4, ATL-T and ATL-2 cells measured by CCK-8 assay; B - the  $IC_{50}$  of ritonavir in HTLV-1 uninfected and infected cell lines; C - effects of ritonavir on the proliferation of ATL-T cells by clonal formation rate experiment; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , vs control group.

图 2 利托那韦 (ritonavir) 对人类 T 细胞白血病病毒 1 型 (HTLV-1) 细胞株增殖的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Effects of ritonavir on proliferation of HTLV-1 cell lines.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



A - ATL-T 与 JETWT35 共培养, 立即加入药物组或 12 h 后加入药物组对 JETWT35 细胞中红色荧光蛋白表达的影响; B - JETWT35 细胞中的红色荧光率; After 0 h - 立即加入药物组; After 12 h - 12 h 后加入药物组 (下同); 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; NS - 无统计学差异。

A - effects of "adding drug immediately" or "adding drug after 12 h" on the expression of red fluorescent protein in JETWT35 cells; B - red fluorescence rate of JETWT35 cells; After 0 h - adding drugs after co-culture for 0 h; After 12 h - adding drugs after co-culture for 12 h, the same as below; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; NS - no significance.

图 3 Ritonavir 对 JETWT35 细胞中红色荧光蛋白表达的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of ritonavir on the expression of red fluorescent protein in JETWT35 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

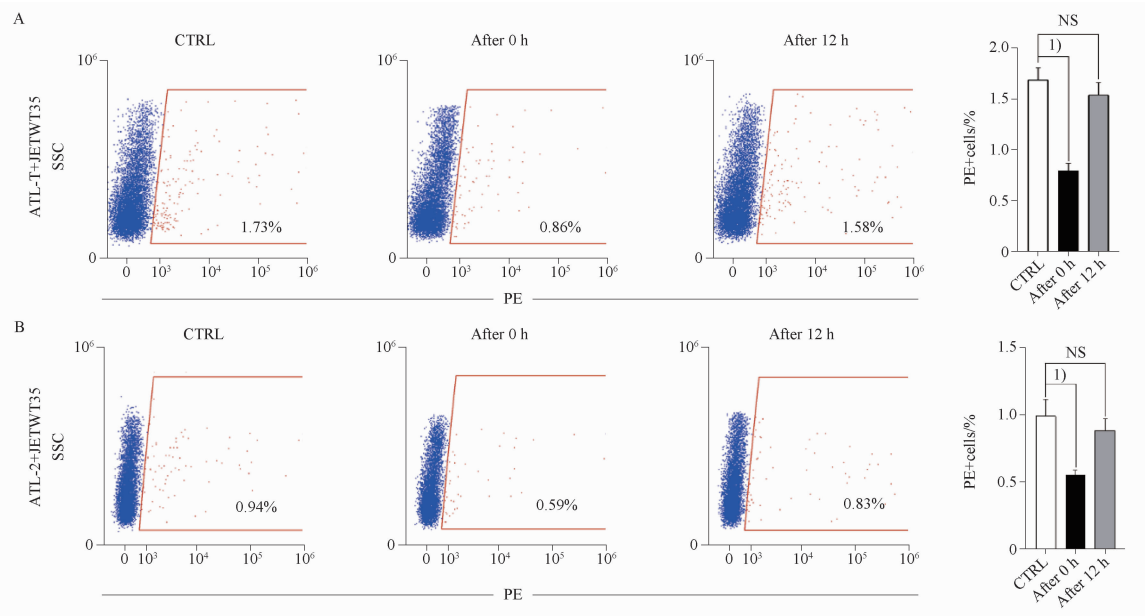
## 2.4 双荧光素酶报告基因检测 ritonavir 抑制 HTLV-1 病毒侵袭

本研究使用双荧光素酶报告基因实验进一步

验证 ritonavir 是否具有抑制 HTLV-1 侵袭的功能。结果见图 5, 经过 MCC 处理的 HTLV-1 阳性细胞株 ATL-T、ATL-2 与转染了 HTLV-1 启动子报告基因质

粒 WT-Luc 的 Jurkat 细胞共培养后发现,在单独 Jurkat 组中,ritonavir 对 WT-Luc 的活力无影响;而在实验组,共培养后立即加入 ritonavir 能显著下调 HTLV-1 侵染 Jurkat 后激活的 WT-Luc 活力

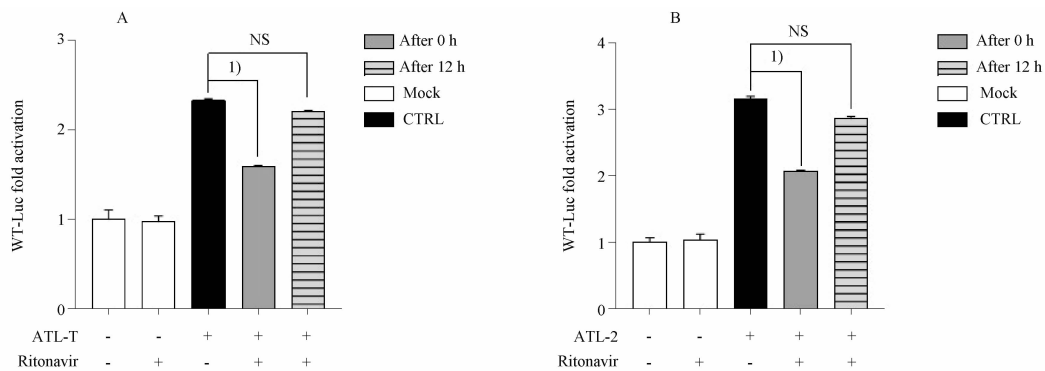
( $P < 0.01$ ),而共培养 12 h 后再加入药物则无明显影响( $P > 0.05$ )。该结果进一步表明,ritonavir 能显著抑制 HTLV-1 病毒粒子的侵染,而侵染完成后则无影响。



A - ATL-T 与 JETWT35 细胞共培养体系;B - ATL-2 与 JETWT35 细胞共培养体系;与对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; NS - 无统计学差异;PE - 橙色偏红的荧光。  
A - Co-culture system of ATL-T and JETWT35 cells;B - Co-culture system of ATL-2 and JETWT35 cells;<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , *vs* control group; NS - no significance; PE - phycoerythrin.

图 4 Ritonavir 下调被 HTLV-1 侵染的 JETWT35 细胞比例。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Ritonavir down-regulates the proportion of JETWT35 cells infected with HTLV-1.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



A - ATL-T 与 JETWT35 细胞共培养体系;B - ATL-2 与 JETWT35 细胞共培养体系;与对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; NS - 无统计学差异。  
A - Co-culture system of ATL-T and JETWT35 cells; B - Co-culture system of ATL-2 and JETWT35 cells;<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , *vs* control group; NS - no significance.

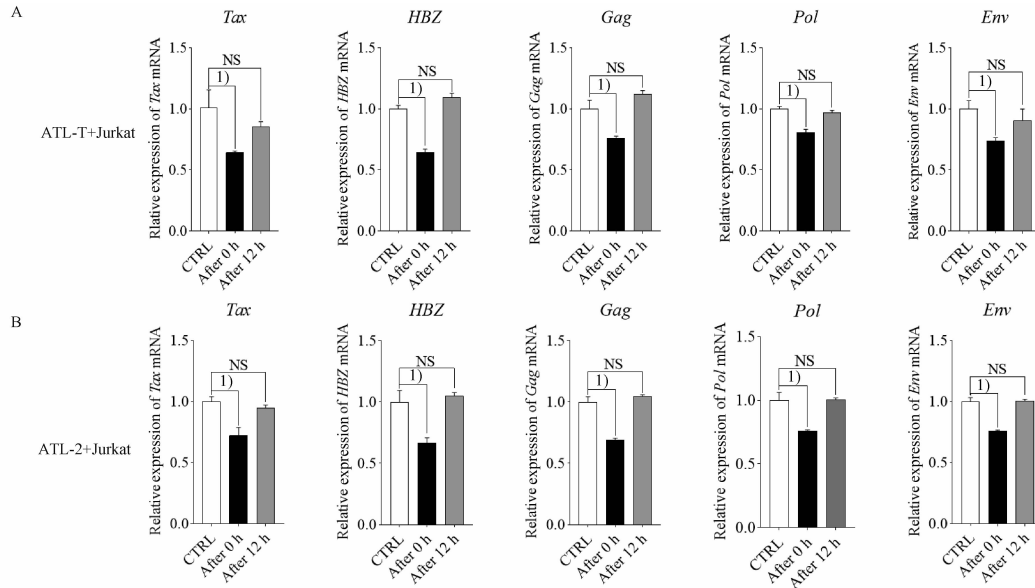
图 5 Ritonavir 抑制 HTLV-1 侵染 Jurkat 细胞。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Ritonavir blocks the process of HTLV-1 infecting Jurkat cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 2.5 ritonavir 抑制受体细胞中 HTLV-1 病毒基因表达

将 MMC 处理后的 HTLV-1 阳性细胞株 ATL-T、ATL-2 和 HTLV-1 阴性细胞株 Jurkat 细胞共培养,分别以“立即加入药物”“12 h 后加入药物”处理共培养体系,进一步通过 qPCR 检测 ritonavir 对受体细胞

Jurkat 中 HTLV-1 相关病毒基因的表达情况。“立即加入药物组”对 Jurkat 细胞中的 *Tax*、*HBZ*、*Gag*、*Pol* 和 *Env* 的表达均有抑制作用( $P < 0.01$ ),而“12 h 后加入药物”对上述基因的表达则无明显影响( $P > 0.05$ )。该结果表明 ritonavir 通过降低病毒基因的表达以抑制 HTLV-1 病毒粒子的产生和侵染,见图 6。



A - ATL-T 与 JETWT35 细胞共培养体系; B - ATL-2 与 JETWT35 细胞共培养体系; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; NS - 无统计学差异。  
A - Co-culture system of ATL-T and JETWT35 cells; B - Co-culture system of ATL-2 and JETWT35 cells; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; NS - no significance.

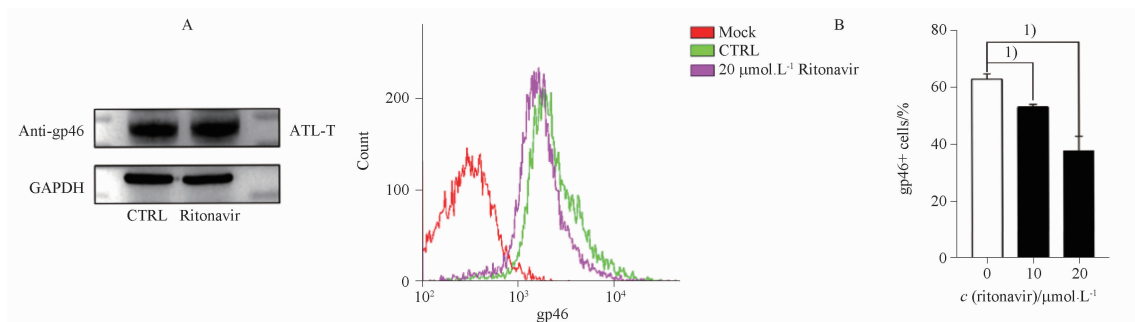
图 6 Ritonavir 下调与 HTLV-1 阳性细胞共培养的 Jurkat 中病毒基因的转录水平。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Ritonavir down-regulates the transcription levels of the viral genes in the Jurkat co-cultured with the HTLV-1 infected cell lines.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 2.6 ritonavir 抑制阳性细胞表面 HTLV-1 病毒包膜蛋白亚基 gp46 的表达

HTLV-1 病毒的侵染是由病毒包膜糖蛋白(envelope glycoprotein)的表面亚基 gp46 与宿主细胞表面受体相互作用后启动的<sup>[14]</sup>, 为了进一步揭示 ritonavir 对 HTLV-1 病毒侵染的分子机制, 本研究采用 Western blot 实验检测 ritonavir 对细胞内总 gp46 表达的影响。结果见图 7A, ritonavir 对细胞内总 gp46 的含量无影响。阳性细胞株表面 HTLV-1 病毒包膜蛋白亚基 gp46 与靶细胞表面受体相互作用介

导的膜融合是 HTLV-1 病毒复制的重要环节。为了进一步探究 ritonavir 是否通过作用于 HTLV-1 阳性细胞株表面的 gp46 蛋白, 从而抑制 HTLV-1 病毒的侵染, 本研究分别用 10、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ritonavir 处理 ATL-T 细胞 48 h, 通过流式细胞仪检测细胞表面 gp46 的表达。结果见图 7B, ritonavir 抑制 ATL-T 细胞表面 gp46 的表达, 且具有剂量依赖性 ( $P < 0.01$ )。结果表明 ritonavir 可能是通过影响细胞表面 HTLV-1 包膜蛋白亚基 gp46 的表达以抑制 HTLV-1 病毒的侵染。



A - ritonavir 对细胞内总 gp46 表达的影响; B - ritonavir 对细胞表面 gp46 表达的影响; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

A - effects of ritonavir on the expression of total gp46 in cells; B - effects of ritonavir on the expression of gp46 on cell surface; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group.

图 7 Ritonavir 对 ATL-T 细胞表面 gp46 表达的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

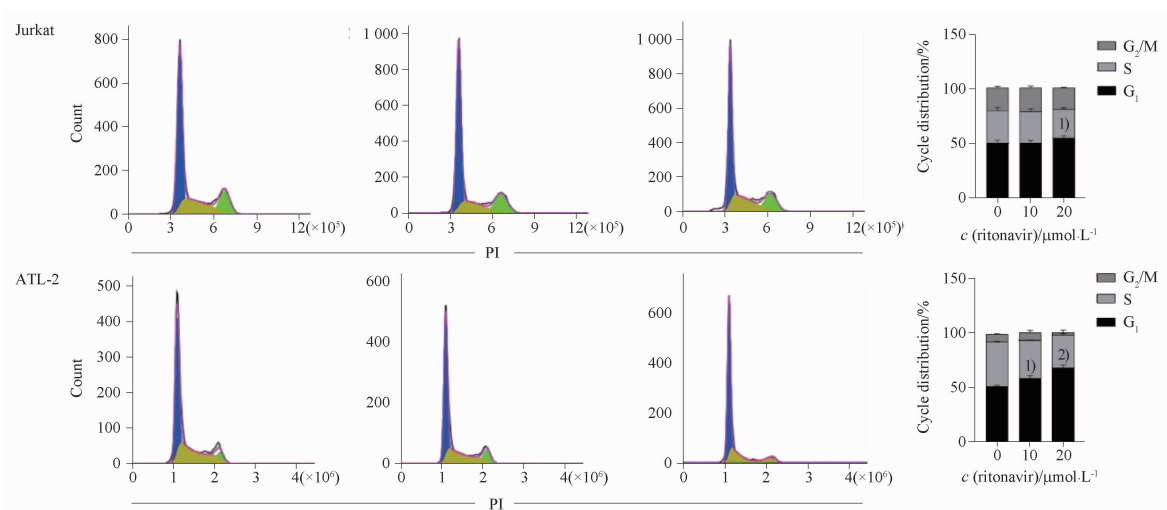
Fig. 7 Effect of ritonavir on the expression of gp46 in ATL-T cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 2.7 ritonavir 将 ATL 细胞株周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期 Jurkat、ATL-2 细胞经不同浓度 ritonavir 处理的

细胞周期分布结果见图 8。结果显示, Jurkat 细胞经 0、10、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ritonavir 处理后的 G<sub>1</sub> 分别为

50.0%、50.2% 和 54.5%，ATL-2 细胞经 0、10、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ritonavir 处理后的  $G_1$  分别为 50.8%、58.5% 和 67.9%，和 Jurkat 细胞相比，ATL-2 的  $G_1$  期细胞显著增加 ( $P < 0.05$ )，且该作用

呈现一定的药物剂量依赖性。结果表明 ritonavir 将 ATL 细胞株周期阻滞在  $G_1$  期，通过影响细胞的周期进程从而抑制细胞增殖，且对 HTLV-1 阳性细胞株周期阻滞效果更显著。



与对照组相比，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ，<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ，<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ，vs control group.

图8 Ritonavir 对 Jurkat、ATL-2 细胞周期分布的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Effect of ritonavir on the cell cycle distribution of Jurkat and ATL-2 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

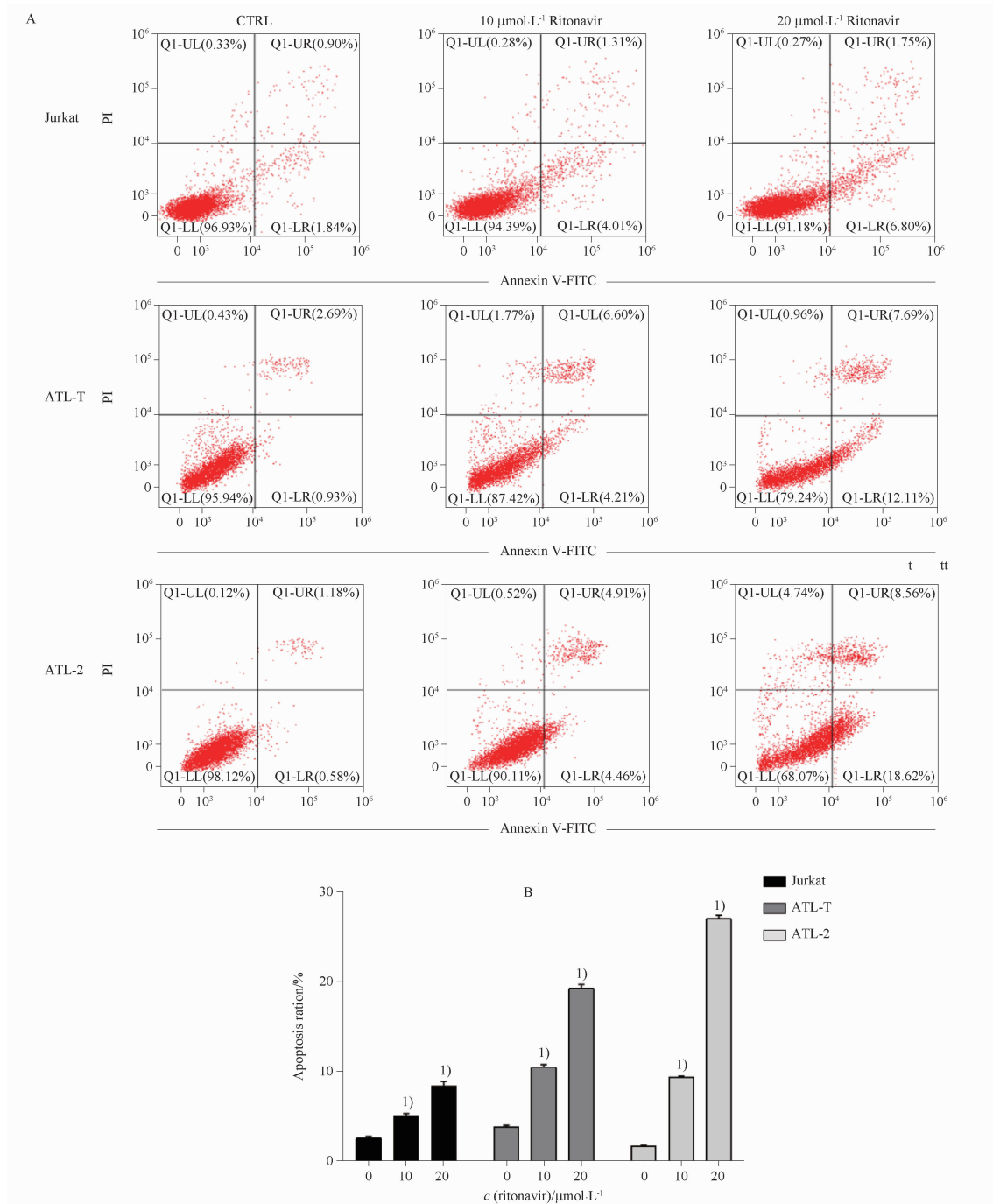
## 2.8 ritonavir 诱导 ATL 细胞凋亡

为了探究 ritonavir 抑制 ATL 细胞生长是否与诱导细胞凋亡相关，本研究对 ritonavir 处理后的细胞进行 AnnexinV/PI 染色，流式细胞术分析细胞凋亡分布比例。结果见图 9，10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ritonavir 对 Jurkat、ATL-T 和 ATL-2 的凋亡诱导率分别为 5.03%、10.49% 和 9.34%，20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ritonavir 对 Jurkat、ATL-T 和 ATL-2 的凋亡诱导率分别为 8.36%、19.32% 和 27.08%。和 Jurkat 细胞相比，ritonavir 对 ATL-T 和 ATL-2 细胞的凋亡诱导率明显提高，呈时间-剂量依赖性 ( $P < 0.01$ )，该结果表明 ritonavir 能诱导 ATL 细胞株凋亡，且对阳性细胞株效果更显著。提示 ritonavir 可通过诱导 ATL 细胞凋亡从而抑制细胞的增殖，阻碍 ATL 的发生发展。

## 3 讨论

ATL 是一种极难治愈的 T 细胞恶性增殖性血液疾病，人类 T 细胞白血病病毒 1 型 HTLV-1 为其病原体。据统计，目前全球有两千多万 HTLV-1 病毒携带者，该病毒潜伏期长，发病机制复杂，且近年来发病率逐年上升<sup>[15]</sup>。ATL 临床亚型多种多样，发

病机制复杂，极难治愈，目前针对 ATL 的抗病毒疗法仍存在很大的局限性，如常规化疗的耐药性强、副作用大等缺陷直接影响了治疗效果<sup>[16]</sup>。因此，寻求新的更为安全有效的抗病毒药物势在必行。ritonavir 作为抗 HIV 病毒的蛋白酶抑制剂，具有优异的药代动力学特征。临床上低剂量 ritonavir 还常被作为其他蛋白酶抑制剂的增强剂，如添加到针对丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染的联合疗法中破坏细胞色素 P450 3A4 酶 (cytochrome P-450 3A4, CYP3A4) 的氧化能力，阻止 CYP3A4 对其他抗病毒蛋白酶抑制剂药物的氧化代谢，还可通过 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 和多药耐药相关蛋白 (multi-drug resistance-associated protein, MRP) 外排通道限制细胞转运和其他蛋白酶抑制剂的外排，从而达到良好的抗病毒效果<sup>[17-18]</sup>。由美国辉瑞公司研发的新型抗病毒药物 Paxlovid (由 Nirmatrelvir 和 ritonavir 组成)，通过抑制新冠病毒自身编码中剪切和加工 RNA 的主要蛋白酶 3CLpro 阻止病毒复制，目前正在全球疫情防控中发挥巨大作用<sup>[19]</sup>。近年也有报道 ritonavir 可通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化诱导原代 ATL 细胞凋亡<sup>[20]</sup>，但关于 ritonavir 是否直接靶向 HTLV-1 病毒尚未研究。为进一步证实 ritonavir



A - 不同浓度的 ritonavir 对 Jurkat、ATL-T、ATL-2 凋亡的影响; B - Jurkat、ATL-T、ATL-2 凋亡率统计图; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

A - effects of different concentrations of ritonavir on apoptosis of Jurkat, ATL-T, and ATL-2 cells; B - statistical chart of Jurkat, ATL-T, and ATL-2 apoptosis rates; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group.

图9 Ritonavir 对 Jurkat、ATL-T、ATL-2 细胞凋亡的影响.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 9 Effect of ritonavir on apoptosis of Jurkat, ATL-T, and ATL-2 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

的抗病毒作用,本研究选用 ATL 细胞株作为研究对象,通过双荧光素酶报告基因技术、qPCR 和 Western blot 等检测其对 HTLV-1 病毒侵染的影响。结果显示 ritonavir 能明显抑制 HTLV-1 病毒的产生及侵染,与此同时,流式细胞术还提示 ritonavir 阻滞细胞于 G<sub>1</sub> 期,并促进其凋亡,且对阳性细胞株的效果显著

高于阴性细胞株,结合本研究实验结果,推测 ritonavir 可能直接靶向 HTLV-1 病毒,具有成为潜在抗 ATL 药物的可能。

HTLV-1 是最早发现的与人类恶性肿瘤相关的逆转录病毒,该病毒与 HIV 等其他逆转录病毒类似,是一种包膜病毒,病毒表面含有源自宿主细胞膜

的包膜。HTLV-1 病毒 5'LTR 启动子起始编码核心蛋白 (*Gag*)、逆转录酶 (*Pol*) 和包膜蛋白 (*Env*) 等外源逆转录病毒中常见的结构基因以及 HTLV-1 病毒特有的 pX 区域<sup>[21-22]</sup>。pX 区位于 3'LTR 与 *Env* 之间,编码 *Tax*、*Rex*、*HBZ* 等一系列重要的调节基因及 *p12* 等辅助基因。多年来研究表明,*Tax* 在病毒致癌早期通过转录激活 HTLV-1 LTR 启动子活力来增强病毒 mRNA 合成,从而促进病毒的转录与复制。*Tax* 还是多条重要细胞信号通路如 PI3K/AKT 等激活剂,促进 ATL 细胞增殖与 HTLV-1 的致癌转化<sup>[23]</sup>,但约有 60% 的 ATL 细胞丧失了 *Tax* 表达。而 *HBZ* 却是唯一一个在所有 ATL 病人样品中持续表达的病毒编码基因,它可抑制经典 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[24-25]</sup>,激活 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路<sup>[26]</sup>,其 AD 结构域通过与多种转录因子结合的方式参与调控细胞内信号通路,与 *Tax* 一起协同促进 HTLV-1 的感染。病毒结构蛋白 *Gag* 作为多蛋白前体,能在 HTLV-1 蛋白酶的作用下裂解成多个功能结构域(基质:p19、衣壳:p24、核衣壳:p15),这些结构域能加速 HTLV-1 病毒的组装与出芽<sup>[27]</sup>。*Pol* 蛋白编码 3 种酶:逆转录酶、RNase H 和整合酶,催化逆转录病毒感染的全过程<sup>[28]</sup>。*Env* 蛋白在 HTLV-1 病毒侵染过程中起核心作用,它与宿主细胞表面受体结合,触发病毒和宿主细胞膜融合,从而介导病毒侵染<sup>[14]</sup>。因此,HTLV-1 病毒蛋白对病毒侵染至关重要,本研究通过实验证实,ritonavir 可降低 WT-Luc 病毒启动子活力,并且下调 HTLV-1 相关病毒基因 (*Tax*、*HBZ*、*Gag*、*Pol* 和 *Env*) 的表达,能够有效阻断 HTLV-1 在 T 细胞中的传播,而共培养 12 小时病毒侵染完成后则效果不佳,表明 ritonavir 在病毒生成及早期传播进入受体细胞阶段发挥关键作用,上述研究将为今后运用 ritonavir 实现抗病毒治疗提供线索。

病毒包膜糖蛋白 (*Env*) 在由高尔基体运送至细胞膜的过程中,被宿主细胞蛋白酶切割成表面糖蛋白 gp46 和跨膜糖蛋白 gp21<sup>[29]</sup>,gp46 与宿主细胞表面受体葡萄糖转运蛋白-1 (glucose transporter-1, GLUT-1)、神经纤毛蛋白-1 (neuropilin-1, NRP-1) 及硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) 结合后,由 gp21 启动其与宿主细胞膜和融合,从而实现病毒的传播。过表达 GLUT-1 后,*Env* 前体蛋白的剪切水平会受到一定程度的抑制,从而使得 gp46 在细胞表面的分布减少,最终导致病毒侵染受到抑制<sup>[30]</sup>。治疗急性早幼粒细胞白血病的药物三氧化二砷 ( $As_2O_3$ ),通过抑制 HTLV-1 gp46

的表达,从而对 gp46 诱导的 HTLV-1 感染细胞和靶细胞之间合胞体的形成产生抑制作用,证实 gp46 可成为病毒传播的重要靶标<sup>[31]</sup>。戊聚糖多磷酸盐 (pentosan polysulfate, PPS) 通过抑制 HTLV-1 阳性细胞 MT-2 和 MT-4 细胞表面 HTLV-1 gp46 表达和合胞体生成,从而抑制 HTLV-1 病毒粒子的产生<sup>[32]</sup>。HIV 病毒结构功能和 HTLV-1 相似,2007 年经美国 FDA 批准用于 HIV 感染患者的小分子药物马拉韦罗 (maraviroc),是辅助受体细胞表面趋化因子受体 5 (C-C chemokine receptor type 5, CCR5) 拮抗剂,通过结合 CCR5 的疏水跨膜域,非竞争性地阻止了 gp120 (与 HTLV-1 gp46 功能类似) 与 CCR5 的相互作用,进而抑制病毒附着和进入受体细胞<sup>[33]</sup>。本研究同样发现,ritonavir 能显著抑制 ATL-T 细胞表面 gp46 的表达,且呈现剂量依赖,推测 ritonavir 可能通过影响阳性细胞表面 HTLV-1 包膜糖蛋白亚基 gp46 的表达进而抑制病毒粒子的侵染,gp46 未来将成为临床治疗 ATL 的有效靶点。

据报道,ritonavir 能够抑制周期蛋白 CyclinD1 和周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 2、4、6 的表达,从而使得乳腺癌细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期<sup>[8]</sup>。Batchu 等<sup>[9]</sup> 发现,在胰腺癌细胞中 ritonavir 不仅通过下调 CDK4 的表达并上调其对应的 CDK 抑制因子 p21<sup>Cip/WAF1</sup> 的表达使细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞,还通过抑制视网膜细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, RB) 的磷酸化下调转录因子 E2F-1 (细胞周期从 G<sub>1</sub> 期向 S 期转化所必需的转录因子) 的活性,从而阻断周期进程。另外,ritonavir 通过上调凋亡相关蛋白 Caspase-7、Caspase-9 的表达和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达促进胰腺癌细胞凋亡<sup>[34]</sup>。本研究同样发现,ritonavir 将细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期,并促进细胞凋亡,且 HTLV-1 阳性细胞株的生长抑制、周期阻滞及凋亡率皆显著高于阴性细胞株,推测该药物可直接靶向病毒,通过降低病毒基因表达抑制 ATL 细胞的生长。但 ritonavir 作为具有抗 HTLV-1 潜质的抗肿瘤药物,其阻滞细胞周期及诱导 ATL 细胞株凋亡的分子机制还有待进一步探究。

综上,ritonavir 能显著抑制 ATL 细胞增殖,抑制 HTLV-1 病毒粒子的产生和侵染,并阻滞其周期,诱导其凋亡,其机制可能通过降低病毒基因表达、抑制 gp46 膜泡运输过程、周期及凋亡调控等多环节发挥作用。结果提示,ritonavir 具有成为潜在抗肿瘤药物的可能,具有继续深入研究的价值。

## REFERENCES

- [ 1 ] EUSEBIO-PONCE E, ANGUITA E, PAULINO-RAMIREZ R, *et al.* HTLV-1 infection; an emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases [J]. *Rev Esp Quimioter*, 2019, 32(6): 485-496.
- [ 2 ] LOCKBAUM G J, HENES M, TALLEGE N, *et al.* Inhibiting HTLV-1 protease; a viable antiviral target [J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(3): 529-538.
- [ 3 ] COFFIN J M. The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(51): 15525-15529.
- [ 4 ] BANGHAM C R M. HTLV-1 persistence and the oncogenesis of adult T cell leukemia/lymphoma [J]. *Blood*, 2023, 141: 2299-2306. DOI: 2210.1182/blood.2022019332.
- [ 5 ] HACHIMAN M, YOSHIMITSU M, EZINNE C, *et al.* *In vitro* effects of arsenic trioxide, interferon  $\alpha$  and zidovudine in adult T cell leukemia/lymphoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 1305-1311.
- [ 6 ] GROSS C, THOMA-KRESS A K. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission [J]. *Viruses*, 2016, 8(3): 74-96.
- [ 7 ] ALI A, BANDARANAYAKE R M, CAI Y, *et al.* Molecular basis for drug resistance in HIV-1 protease [J]. *Viruses*, 2010, 2(11): 2509-2535.
- [ 8 ] SRIRANGAM A, MITRA R, WANG M, *et al.* Effects of HIV protease inhibitor ritonavir on Akt-regulated cell proliferation in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(6): 1883-1896.
- [ 9 ] BATCHU R B, GRUZDYN O V, BRYANT C S, *et al.* Ritonavir-mediated induction of apoptosis in pancreatic cancer occurs via the RB/E2F-1 and AKT pathways [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014, 7(1): 46-57.
- [ 10 ] LAMB Y N. Nirmatrelvir plus ritonavir: first approval [J]. *Drugs*, 2022, 82(5): 585-591.
- [ 11 ] MARZI M, VAKIL M K, BAHMANYAR M, *et al.* Paxlovid; mechanism of action, synthesis, and in silico study [J]. *Biomed Res Int*, 2022. DOI: 10.1155/2022/7341493.
- [ 12 ] ZEPHYR J, KURT YILMAZ N, SCHIFFER C A. Viral proteases; structure, mechanism and inhibition [J]. *Enzymes*, 2021, 50: 301-333. DOI: 310.1016/bs.enz.2021.1009.1004.
- [ 13 ] FURUTA R, YASUNAGA J I, MIURA M, *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells *in vivo* [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(11): e1006722. DOI: 1006710.1001371/journal.ppat.1006722.
- [ 14 ] WALLIN M, EKSTR M M, GAROFF H. Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion [J]. *EMBO J*, 2004, 23(1): 54-65.
- [ 15 ] KAMOI K, WATANABE T, UCHIMARU K, *et al.* Updates on HTLV-1 uveitis [J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 794. DOI: 710.3390/v14040794.
- [ 16 ] EL HAJJ H, TSUKASAKI K, CHEMINANT M, *et al.* Novel treatments of adult T cell leukemia lymphoma [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1062-1074.
- [ 17 ] LOOS N H C, BEIJNEN J H, SCHINKEL A H. The inhibitory and inducing effects of ritonavir on hepatic and intestinal CYP3A and other drug-handling proteins [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162:114636. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114636.
- [ 18 ] KEATING G M. Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir; a review in chronic HCV genotype 4 infection [J]. *Drugs*, 2016, 76(12): 1203-1211.
- [ 19 ] YANG K S, LEEUWON S Z, XU S, *et al.* Evolutionary and structural insights about potential SARS-CoV-2 evasion of nirmatrelvir [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(13): 8686-8698.
- [ 20 ] DEWAN M Z, UCHIHARA J-N, TERASHIMA K, *et al.* Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir [J]. *Blood*, 2006, 107(2): 716-724.
- [ 21 ] WOLF S, VERCRUYSEN M, COOK L. HTLV-1-related adult T-cell leukemia/lymphoma: insights in early detection and management [J]. *Curr Opin Oncol*, 2022, 34(5): 446-453.
- [ 22 ] MATSUOKA M, JEANG K-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(4): 270-280.
- [ 23 ] GRASSMANN R, ABOUD M, JEANG K-T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax [J]. *Oncogene*, 2005, 24(39): 5976-5985.
- [ 24 ] ZHAO T, YASUNAGA J-I, SATOU Y, *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- $\kappa$ B [J]. *Blood*, 2009, 113(12): 2755-2764.
- [ 25 ] ZHAO T, MATSUOKA M. HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis [J]. *Front Microbiol*, 2012, 3: 247. DOI: 210.3389/fmicb.2012.00247.
- [ 26 ] ZHAO T, SATOU Y, SUGATA K, *et al.* HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator [J]. *Blood*, 2011, 118(7): 1865-1876.
- [ 27 ] FOGARTY K H, ZHANG W, GRIGSBY I F, *et al.* New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells [J]. *Viruses*, 2011, 3(6): 770-793.
- [ 28 ] MAHIEUX R. Virological aspects of HTLV-1 infection and new therapeutical concepts [J]. *Bull Soc Pathol Exot*, 2011, 104(3): 181-187.
- [ 29 ] JONES K S, LAMBERT S, BOUTTIER M, *et al.* Molecular aspects of HTLV-1 entry; functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors [J]. *Viruses*, 2011, 3(6): 794-810.
- [ 30 ] MAEDA Y, TERASAWA H, TANAKA Y, *et al.* Separate cellular localizations of human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) Env and glucose transporter type 1 (GLUT1) are required for HTLV-1 Env-mediated fusion and infection [J]. *J Virol*, 2015, 89(1): 502-511.
- [ 31 ] NABESHI H, YOSHIKAWA T, KAMADA H, *et al.* Arsenic trioxide induces down-regulation of gp46 via protein oxidation; proteomics analysis of oxidative modified proteins in As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-treated HTLV-1-infected cells [J]. *Pharmazie*, 2010, 65(9): 702-707.
- [ 32 ] MA G, YASUNAGA J I, OHSHIMA K, *et al.* Pentosan polysulfate demonstrates anti-human T-Cell leukemia virus type 1 activities *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Virol*, 2019, 93(16): e00413-00419.
- [ 33 ] RATCLIFF A N, SHI W, ARTS E J. HIV-1 resistance to maraviroc conferred by a CD4 binding site mutation in the envelope glycoprotein gp120 [J]. *J Virol*, 2013, 87(2): 923-934.
- [ 34 ] GAEDICKE S, FIRAT-GEIER E, CONSTANTINIU O, *et al.* Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir; induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 6901-6908.

(收稿日期:2023-07-20)