

[文章编号] 1000-4718(2008)11-2179-07

灭活 HIV-1 颗粒对人 CD4⁺ T 细胞活化和全血 Th1/Th2 细胞因子分泌的影响*

黄秀艳, 曾耀英[△], 赵令斋, 林长乐
(暨南大学组织移植与免疫中心, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 体外研究 AT-2 灭活的 HIV-1 颗粒对人 CD4⁺ T 细胞活化和全血 (whole blood, WB) Th1/Th2 细胞因子分泌的影响。方法: AT-2 灭活 HIV-1_{III_B} 型病毒颗粒, 运用 ELISA 法测定所制备的灭活病毒中 p24 抗原的含量, 按照 1/500、1/50 和 1/5 (V/V) 的浓度加入到 WB 中, 以植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 组为阳性对照; 24 h 后, 收集 WB 培养上清, 运用流式微球分析法 (cytometric bead array, CBA) 检测 WB 分泌 Th1 (IL-2、IFN- γ 和 TNF- α) 和 Th2 (IL-4、IL-6 和 IL-10) 细胞因子水平; 同时运用免疫荧光抗体染色技术结合流式细胞术检测 WB 中 CD4⁺ T 细胞早期活化标记分子 CD69 的表达百分率。结果: 我们所制备的灭活病毒中 p24 抗原的含量为 85.5 $\mu\text{g/L}$; 24 h 后, 空白对照组中, CD4⁺ T 细胞 CD69 的表达百分率为 (1.62 \pm 0.63)%, PHA 组为 (38.82 \pm 6.00)%, HIV-1 (1/500) 组为 (3.83 \pm 1.07)%, HIV-1 (1/50) 组为 (5.94 \pm 0.85)%, HIV-1 (1/5) 组为 (9.30 \pm 1.22)%; 空白对照组 WB 培养上清中细胞因子主要为 IL-6 和 TNF- α , PHA 组中 Th1 和 Th2 细胞因子全部升高, 3 个浓度的 HIV-1 组中 Th1 和 Th2 细胞因子也全部升高。结论: AT-2 灭活的 HIV-1_{III_B} 颗粒能够明显引起 WB 中 CD4⁺ T 细胞活化, 并上调 WB 培养上清中 Th1 和 Th2 细胞因子的水平, 其机制可能是除了 HIV-1 病毒蛋白的作用外, HIV-1 出胞时, 许多宿主细胞来源的免疫分子整合到病毒颗粒包膜中, 而模拟抗原提呈细胞, 从而产生免疫调节作用。

[关键词] HIV 颗粒; 细胞因子类; CD4⁺ T 细胞

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

Effects of inactivated HIV-1 particles on human CD4⁺ T cell activation and Th1/Th2 cytokine secretion in whole blood

HUANG Xiu-yan, ZENG Yao-ying, ZHAO Ling-zhai, LIN Chang-le

(Institute for Tissue Transplantation & Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of AT-2-inactivated HIV-1 particles on human CD4⁺ T cell activation and cytokine secretion in whole blood (WB) *in vitro*. **METHODS:** HIV-1_{III_B} particles were inactivated by AT-2 chemical and the concentration of p24 antigen was determined by p24 ELISA. AT-2-inactivated HIV-1_{III_B} particles were added to human WB culture system in serial concentrations to stimulate the cells. PHA was used as positive control. After 24 h, all the cultural supernatants were harvested and the concentrations of Th1 (IL-2, IFN- γ and TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-6 and IL-10) cytokines released to the supernatants were detected by cytometric bead array (CBA). The percentage of CD69 expression on CD4⁺ T cells from WB was detected by immuno-fluorescence staining plus flow cytometry. **RESULTS:** The concentration of p24 antigen in the AT-2-inactivated specimen was 85.5 $\mu\text{g/L}$. 24 h later, the percentage of CD69 expression on CD4⁺ T cells from control group was (1.62 \pm 0.63)%, whereas it was (38.82 \pm 6.00)%, (3.83 \pm 1.07)%, (5.94 \pm 0.85)% and (9.30 \pm 1.22)% in PHA group, HIV-1 (1/500) group, HIV-1 (1/50) group and HIV-1 (1/5) group, respectively. Cytokines secreted by WB in control group were mainly TNF- α and IL-6. However, all the six cytokines tested were strikingly increased in PHA group, as well as in HIV-1_{III_B} groups. **CONCLUSION:** AT-2-inactivated HIV-1_{III_B} particles activate CD4⁺ T cells from WB, and up-regulate both Th1 and Th2 cytokine secretion in WB. Besides the effects of viral proteins, other mechanisms may be proposed that HIV-1 parti-

[收稿日期] 2008-01-08

[修回日期] 2008-05-20

* [基金项目] “973”国家重点基础研究项目资助 (No. 2004CB720100; No. 2006CB504201); 广州市科技计划项目资助 (No. 2006Z1-E0091)

Δ 通讯作者 Tel: 020-85226219; E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn

cles act as antigen presenting cell (APC) because many host - derived immune molecules are incorporated into HIV - 1 envelop when it is released from infected cells by budding, and exert immune modulation.

[KEY WORDS] HIV particles; Cytokines; CD4⁺T cells

普遍性免疫过度活化、HIV - 1 复制、CD4⁺T 细胞损耗和免疫缺陷是 HIV 病的共同病理特征,它们关系密切,互为因果。HIV - 1 感染时免疫活化的特点是:免疫过度活化与 CD4⁺T 细胞群和 CD8⁺T 细胞群无能同时存在;表达活化标记分子的 T 细胞频率增加,出现记忆性细胞的表型;产生大量的促炎细胞因子;活化的 T 细胞不仅限于 HIV 抗原特异性的 T 细胞,而是表现为普遍性的 T 细胞活化^[1-4]。尽管人们已经做了大量的研究,其细胞和分子机制还不是很清楚。我们认为,HIV - 1 颗粒在免疫活化中起到中心作用。有包膜病毒成熟释放时从其感染的细胞中获得包膜,成熟的病毒包膜除了病毒基因组编码的蛋白外,还从宿主获得两类成分形成完整的包膜,它们是宿主细胞质膜和宿主来源的蛋白。宿主来源的病毒包膜成分不仅能够影响病毒的生活周期,还影响病毒和宿主细胞之间的相互作用,尤其是影响宿主对整合到病毒包膜内的宿主蛋白成分的应答,这些影响最终体现在病毒的致病性上。HIV - 1 是有包膜的逆转录病毒,成熟的 HIV - 1 通过两条途径出胞:一条是从感染的 T 淋巴细胞中突破细胞膜获得宿主细胞浆膜和蛋白,释放到细胞外;另外一条途径是感染巨噬细胞的病毒倾向于突破内体(endosome)的质膜,获得内体膜上的蛋白释放到内体系统中,再通过出胞作用释放到细胞外,当然,感染巨噬细胞的 HIV - 1 也可以通过细胞膜途径出胞。因此,病毒颗粒所携带的宿主蛋白成分因所感染的细胞不同和出胞途径不同而有明显的差别^[5-8]。现已证明,HIV - 1 劫持的宿主蛋白中,既包括主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC; 在人类中,通常称为 HLA)等抗原提呈分子,也包括共刺激分子,还包括与细胞表面受体及信息传递相关的分子以及热休克蛋白(heat shock protein, HSP)和分子伴侣^[5-8]。很显然,HIV - 1 出胞过程中带出的抗原提呈分子和共刺激分子,可以使得 HIV - 1 颗粒模拟抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),而带出的热休克蛋白又是危险信号(danger signal),加上 gp120 本身是超抗原,从而能够对宿主的免疫应答产生调节作用。因此,本研究目的是探讨 HIV - 1 病毒颗粒引起免疫活化的作用,在此基础上阐明 HIV - 1 感染时出现的普遍性免疫过度活化的可能机制。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 成年人外周血的来源和采集 成年人肝素抗凝静脉血取自健康志愿者(年龄 25 - 35 岁, $n = 5$)。

1.2 细胞系 H9/HIV - 1_{ⅢB} 细胞系由南方医科大学免疫教研室惠赠; C8166 细胞系由中国科学院昆明动物研究所分子免疫室惠赠。

1.3 主要试剂和仪器 Mouse anti - human CD3 - PE、CD4 - PE - Cy5、CD69 - FITC, human Th1/Th2 CBA kit 为 BD PharMingen 产品; 植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)、L - glutamine、二巯基乙醇(β - 2mercaptoethanol, β - 2ME)、二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)和 2, 2' - dithiodipyridine (aldri-thiol - 2, AT - 2) 为 Sigma - aldrich 产品; RPMI - 1640 细胞培养液和胎牛血清(fetal calf serum, FCS) 为 Gibco 产品; 青霉素(penicillin)和链霉素(streptomycin)为华北制药公司产品。FACSCalibur 型流式细胞仪购自 BD; Megafuge 1.0R 型低速冷冻离心机购自 Hercules; 3K30 型高速冷冻离心机购自 Sigma; II 级生物安全柜购自 Forma。

2 方法

2.1 溶液的配制

① AT - 2 溶液的配制 将适量 AT - 2 用 DMSO 溶解配制成 1 mol/L 的储存液, -20 °C 长期保存。

② 红细胞裂解液的配制 称取 NH₄Cl 8.29 g、KH₂CO₃ 1.00 g 和 Na₂EDTA 37.2 mg, 溶解于 800 mL 三蒸水中, 调整 pH 值 7.2 - 7.4, 最后定容到 1 000 mL, 4 °C 避光保存。

2.2 AT - 2 灭活 HIV - 1_{ⅢB} 颗粒的制备

① H9/HIV - 1_{ⅢB} 细胞系和 C8166 细胞系的培养 HIV - 1_{ⅢB} 属于 X4 型 HIV 病毒株, 感染 HIV - 1_{ⅢB} 的 H9 细胞系即 H9/HIV - 1_{ⅢB} 细胞系用 RPMI - 1640 完全培养基(含 15% FCS, 2 mmol/L L - glutamine, 1×10^5 U/L penicillin, 100 mg/L streptomycin 和 50 μ mol/L β - 2ME) 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 2 - 3 d 换液传代 1 次, 显微镜下观察: 细胞大小同人正常淋巴细胞, 形态呈现圆形或不规则形, 呈玫瑰花样小团或分散生长, 细胞之间无融合现象, 见图 1A。

C8166 细胞系培养条件同上, 显微镜下观察: 细胞大小比人正常淋巴细胞稍大, 形态呈现圆形或不规则形, 周围有少量毛刺, 呈大团生长, 细胞之间无

融合现象,见图 1B。

② HIV-1_{ⅢB}病毒液的制备 通常状态下,HIV-1_{ⅢB}在 H9 细胞系中呈慢性整合感染状态,病毒较少释放出来,细胞表面可表达病毒蛋白 gp120。H9/HIV-1_{ⅢB}细胞与 C8166 细胞混合培养后,发生细胞融合,出现巨细胞病变(virus-inducing cytopathic effect, CPE),见图 1C:细胞间界线不清、融合成多核巨细胞,病毒通

过出芽形式或细胞裂解而释放到上清中。制作病毒液时,第 1 d,取 2.2①中处于对数生长期的 H9/HIV-1_{ⅢB}细胞与 C8166 细胞按 1:3 的比例混合培养,第 3 d,再向培养系统中补加 C8166 细胞,使 H9/HIV-1_{ⅢB}细胞与 C8166 细胞的比例为 1:9,第 6 d,小心吹打细胞,使病毒充分释放,4 ℃ 8 000 ×g 离心 10 min,去除细胞和细胞碎片,收集上清。

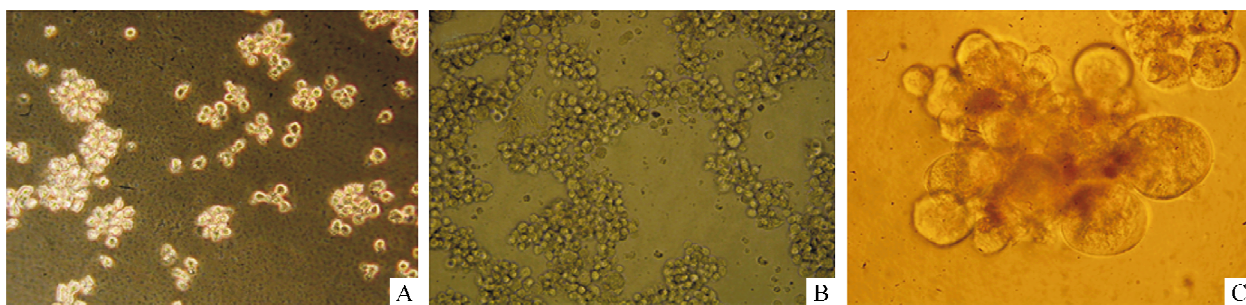


Fig 1 A: H9/HIV-1_{ⅢB} cell line cultured in RPMI-1640 complete medium for 48 h and in the form of small clusters or scatter; B: C8166 cell line cultured in RPMI-1640 complete medium for 48 h and in the form of big clusters; C: C8166 cell line and H9/HIV-1_{ⅢB} cell line co-cultured in RPMI-1640 complete medium for 72 h, cells fused and showed virus-inducing cytopathic effect (×250).

图 1 A: RPMI-1640 完全培养液中培养 48 h 的 H9/HIV-1_{ⅢB} 细胞系,呈玫瑰花样小团生长或分散生长; B: RPMI-1640 完全培养液中培养 48 h 的 C8166 细胞系,呈大团生长; C: RPMI-1640 完全培养液中混合培养 72 h 的 H9/HIV-1_{ⅢB} 细胞系和 C8166 细胞系(比例为 1:3),发生细胞融合,出现巨细胞病变现象

③ AT-2 灭活 HIV-1_{ⅢB} 操作流程参考 Rossio 等^[9]所述的制备方法,优化后简述如下:取 2.2②中制备的病毒液,直接加入适量的 AT-2 储备液,混匀,使 AT-2 终浓度为 1 mmol/L,37 ℃ 水浴轻柔振荡处理 1 h,然后放置冰上处理 2 h,加入冷 RPMI-1640 完全培养基,4 ℃ 17 000 ×g 离心 1 h,弃上清,不要碰到病毒沉淀。加入适量 RPMI-1640 完全培养基,轻柔地吹打病毒沉淀,混匀,分装,-70 ℃ 冰箱保存。将制备的 AT-2 灭活的 HIV-1_{ⅢB} 病毒液稀释 500 倍后,用 p24 抗原检测试剂盒检测其 p24 抗原量。

2.3 AT-2 灭活 HIV-1_{ⅢB} 颗粒诱导全血(whole blood, WB)培养系统 Th1/Th2 细胞因子分泌和 CD4⁺T 细胞活化

① WB 的培养 无菌取抗凝全血 5 mL,加入 10 mL RPMI-1640 完全培养基,混匀,使两者比例为 1:2 (V/V)。

② 实验分组 将 2.3①中稀释好的 WB 接种于 96 孔培养板,分别设置空白对照组、PHA 组(终浓度 5 mg/L)、HIV-1 (终浓度 1/500)组、HIV-1 (终浓度 1/50)组和 HIV-1 (终浓度 1/5)组,每组各 3 个复孔,定容 200 μL/well。置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。

③ 样品收集与检测 24 h 后,分别收集 80 μL WB 培养上清于 EP 管中,留待测定 Th1/Th2 细胞因子(见 2.4);分别吸取 50 μL WB 于流式管中,进行三色免疫荧光抗体标记,加入 anti-human CD3-PE、CD4-PE-Cy5、CD69-FITC 单克隆抗体各 1 μg,混匀,4 ℃ 避光染色 25 min;然后加入 3 mL 预热的红细胞裂解液,37 ℃ 水浴作用 5 min,离心 5 min(25 ℃ 425 ×g),弃上清,加入 3 mL PBS 重悬,离心(25 ℃ 425 ×g 5 min)洗涤 1 次,弃上清,重悬于 300 μL 的 PBS 中,立即上机检测。全部数据经 FACSCalibur 型流式细胞仪和 CELLQuest 软件获取;FITC 为 FL1 通道,PE 为 FL2 通道,PE-Cy5 为 FL3 通道。每管样品检测 20 000 个细胞,获得的数据用 CELLQuest 软件分析。

2.4 WB 培养上清中 Th1/Th2 细胞因子的检测

① 流式微球分析法(cytometric bead array, CBA)原理简介 CBA 的基本原理近似于 ELISA。不同荧光强度的捕获微球表面包被有不同的捕获抗体,每一个微球都能够提供一个和特定蛋白结合的表面,因此,每个微球就相当于一个单独的、包被好的 ELISA 板孔。以本论文中所使用的 human Th1/Th2 CBA kit 为例,分别包被了 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α 和 IFN-γ 特异性捕获抗体的 6 个微球群(图 3、4,分别记作 A1 到 A6)本身在 BD FACS™ 的流

式细胞仪的 FL3 通道上具有不同的荧光强度,其荧光强度由高到低依次排列,经混合,成为 CBA。捕获微球与待测样品混合后,微球上的特异性抗体就与样品(血清、血浆或细胞培养液)中的待测物(如细胞因子和磷酸化蛋白)结合。由于捕获微球混合物是悬浮态,能更有效地捕获待测物,最后,加入 PE 标记的检测抗体,便形成了“捕获抗体-待测物(重组标准品)-检测抗体”三明治夹心复合物,通过流式细胞术检测 PE (FL2 通道)荧光强度。运用 BD CBA 分析软件生成标准曲线(见图 3),便可对样品中待测物的含量进行分析。并以图、表的形式产生分析结果。

② 细胞因子检测 取 2.3 中收集的 WB 培养上清,根据预实验结果对 PHA 组和 HIV-1 组的培养上清进行 1:4 (v/v) 和 1:2 (v/v) 稀释,使所检测的 6 种细胞因子的浓度进入标准曲线浓度范围;将重组标准品进行连续的倍比稀释(从 1:2 到 1:256,并以单纯 RPMI-1640 完全培养基为阴性对照);取稀释好的标准品和待测样品各 50 μL,按照试剂盒说明书完成样品孵育步骤并对流式细胞仪进行参数设置,然后运用流式细胞仪结合 BD CBA 软件获取数据并分析。

3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, n 为样本量。

统计作图软件用 Microsoft Excel。统计方法用 One-way t test。

结 果

1 制备的 AT-2 灭活的 HIV-1_{MB} 病毒液中 p24 抗原含量

制备的 AT-2 灭活的 HIV-1_{MB} 病毒液稀释 500 倍后,ELISA 法检测其 p24 抗原量为 171 ng/L,那么,病毒原液中 p24 抗原量为 85.5 μg/L。HIV-1 (1/500) 组含 p24 抗原量为 171 ng/L, HIV-1 (1/50) 组含 p24 抗原量为 1 710 ng/L, HIV-1 (1/5) 组含 p24 抗原量为 17 100 ng/L。

2 AT-2 灭活 HIV-1_{MB} 颗粒可以促进 CD4⁺T 细胞表达早期活化标记分子 CD69

CD69 为淋巴细胞早期活化的标记分子,淋巴细胞激活后,在短时间内就开始合成表达。如图 2 所示,24 h 后,空白对照组中,CD4⁺T 细胞 CD69 的表达百分率为 (1.62 ± 0.63)%, PHA 组为 (38.82 ± 6.00)%, HIV-1 (1/500) 组为 (3.83 ± 1.07)%, HIV-1 (1/50) 组为 (5.94 ± 0.85)%, HIV-1 (1/5) 组为 (9.30 ± 1.22)%,由此可见,AT-2 灭活 HIV-1_{MB} 颗粒可以明显地诱导 WB 来源的 CD4⁺T 细胞活化,

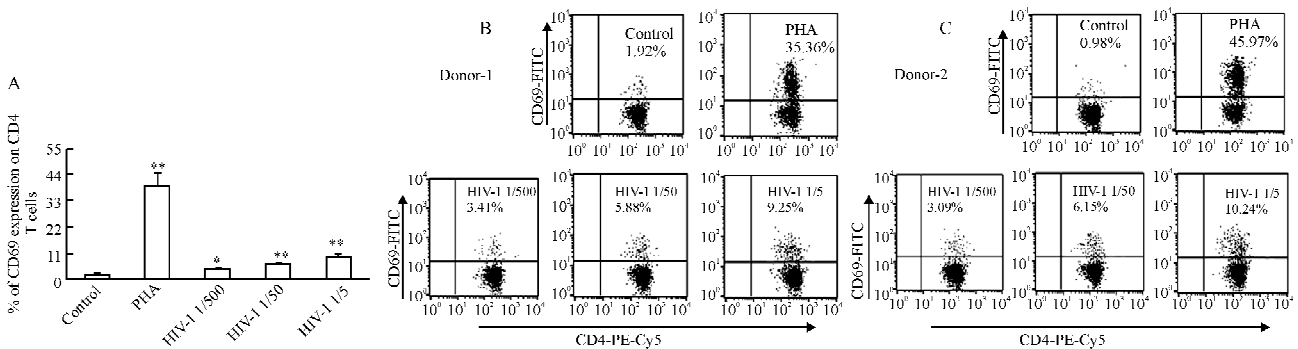


Fig 2 The percentage of CD69 expression on CD4⁺T cells from human WB stimulated by AT-2-inactivated HIV-1_{MB} particles. A: activated human CD4 T-cells induced by AT-2-inactivated HIV-1 particles in WB culture system. $\bar{x} \pm s$. $n=5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; B, C: flow cytometric analyses of level of CD69 expressed on CD4⁺T cells from two donors stimulated by AT-2-inactivated HIV-1_{MB} particles.

图 2 AT-2 灭活 HIV-1_{MB} 颗粒诱导人 WB 来源的 CD4⁺T 细胞表达 CD69

表 1 AT-2 灭活 HIV-1_{MB} 颗粒诱导 WB 分泌 Th1 细胞因子谱的影响

Tab 1 Effects of AT-2-inactivated HIV-1_{MB} particles on Th1 cytokine profiles secreted by WB ($\bar{x} \pm s$. $n=5$)

| Group | IFN- γ | | TNF- α | | IL-2 | |
|-------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | MFI | ng/L | MFI | ng/L | MFI | ng/L |
| Control | 3.4 ± 1.1 | 10.1 ± 8.6 | 25.3 ± 5.1 | 74.6 ± 15.3 | 3.3 ± 1.2 | 3.2 ± 1.6 |
| PHA | 1 121.5 ± 30.2 ^{##} | 16 103.9 ± 576.5 ^{##} | 133.0 ± 9.4 ^{##} | 506.2 ± 30.1 ^{##} | 478.5 ± 20.3 ^{##} | 680.0 ± 40.8 ^{##} |
| HIV-1 1/500 | 4.7 ± 1.9 | 22.9 ± 10.3 [*] | 27.2 ± 5.5 | 80.3 ± 17.6 | 5.9 ± 1.6 [*] | 9.9 ± 3.6 [*] |
| HIV-1 1/50 | 14.0 ± 2.6 [*] | 124.3 ± 30.2 ^{##} | 48.5 ± 13.2 [*] | 148.5 ± 46.7 [*] | 7.6 ± 2.9 [*] | 12.5 ± 6.3 [*] |
| HIV-1 1/5 | 15.9 ± 2.1 [#] | 145.1 ± 19.6 ^{##} | 124.4 ± 18.9 ^{##} | 403.5 ± 63.9 ^{##} | 11.3 ± 2.5 ^{##} | 21.9 ± 5.1 ^{##} |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs control. MFI: mean fluorescence intensity.

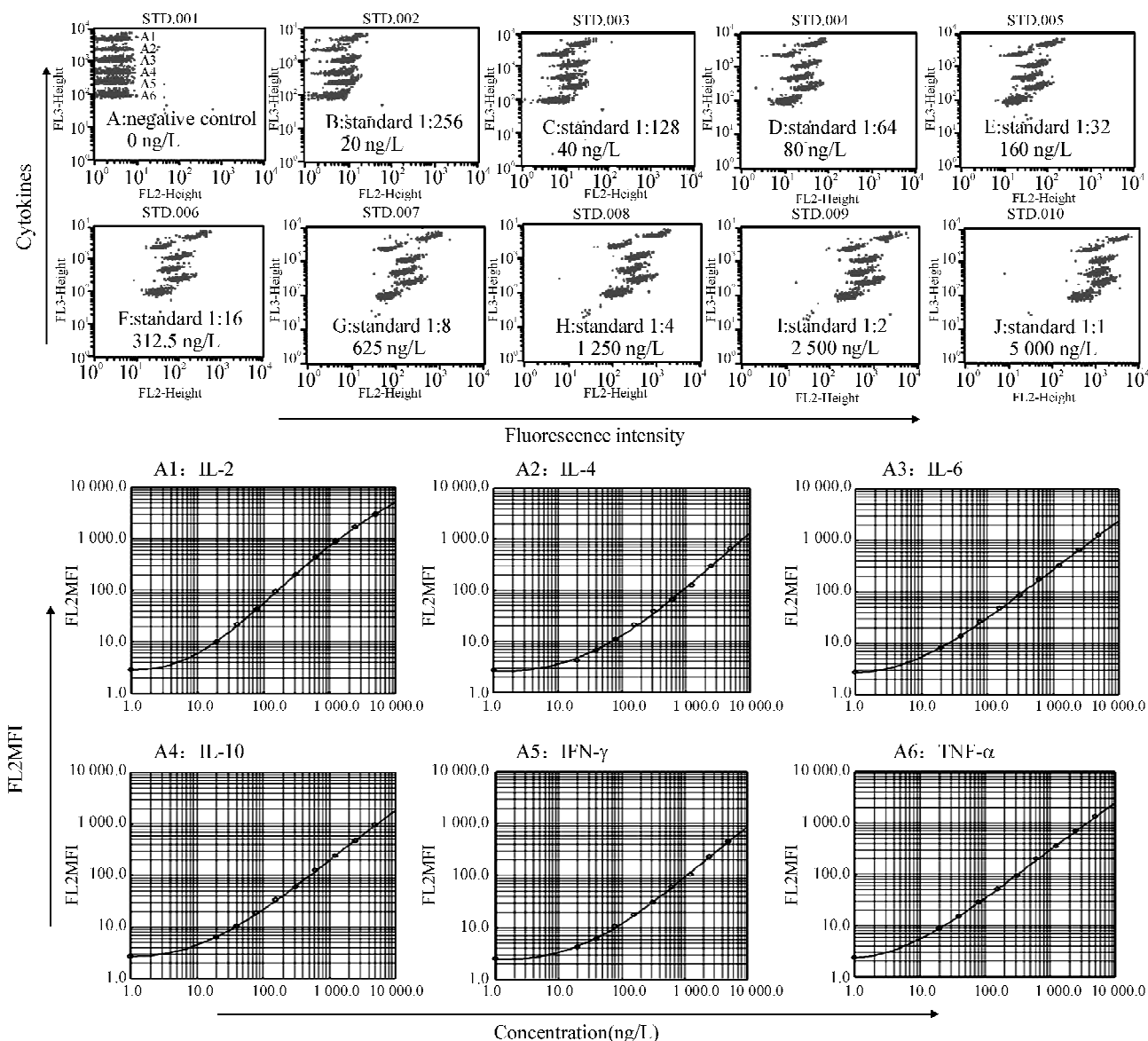


Fig 3 CBA dot plots and standard curves of six recombinant cytokine standards by serial dilution. MFI; mean fluorescence intensity.
 图3 6种重组细胞因子标准品倍比稀释后的CBA散点图及标准曲线

表2 AT-2灭活HIV-1_{WB}颗粒诱导WB分泌Th2细胞因子谱的影响

Tab 2 Effects of AT-2-inactivated HIV-1_{WB} particles on Th2 cytokine profiles secreted by WB ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| Group | IL-4 | | IL-6 | | IL-10 | |
|-------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | MFI | ng/L | MFI | ng/L | MFI | ng/L |
| Control | 2.7 ± 0.7 | 3.0 ± 1.6 | 254.9 ± 16.3 | 938.8 ± 63.9 | 3.3 ± 1.6 | 4.5 ± 2.3 |
| PHA | 29.2 ± 2.9 ^{##} | 257.1 ± 32.3 ^{##} | 2 375.7 ± 100.2 ^{##} | 17 490.7 ± 638.5 ^{##} | 217.6 ± 18.3 ^{##} | 1 113.7 ± 95.6 ^{##} |
| HIV-1 1/500 | 2.8 ± 0.6 | 3.3 ± 1.6 | 2 196.2 ± 48.3 ^{##} | 15 359.5 ± 362.9 ^{##} | 33.1 ± 5.3 ^{##} | 159.6 ± 25.7 ^{##} |
| HIV-1 1/50 | 3.2 ± 0.9 | 7.0 ± 2.0 [#] | 2 711.5 ± 89.9 ^{##} | 22 531.0 ± 541.3 ^{##} | 69.0 ± 8.0 ^{##} | 347.9 ± 40.1 ^{##} |
| HIV-1 1/5 | 3.4 ± 0.9 | 7.7 ± 2.1 [#] | 27 51.6 ± 65.4 ^{##} | 23 687.2 ± 427.9 ^{##} | 82.8 ± 10.3 ^{##} | 417.7 ± 50.2 ^{##} |

[#]P < 0.05, ^{##}P < 0.001 vs control. MFI; mean fluorescence intensity.

且呈现浓度梯度依赖性。

3 AT-2灭活HIV-1_{WB}颗粒对WB Th1/Th2细胞因子分泌的影响

如表1、2和图4所示,24 h后空白对照组的WB培养上清中细胞因子主要为IL-6和TNF-α,PHA

组中Th1和Th2细胞因子全部升高,3个浓度的HIV-1组中Th1和Th2细胞因子也全部升高,其中Th1细胞因子中,以IFN-γ和TNF-α最为显著,而Th2细胞因子中,以IL-6和IL-10最为显著。

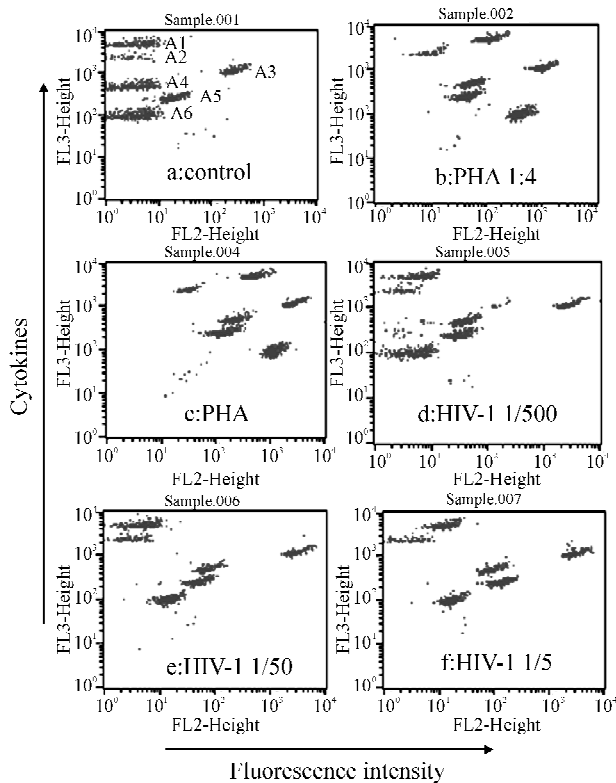


Fig 4 Concentrations of Th1/Th2 cytokines in the supernatant of each groups analyzed by CBA.

图4 CBA 法分析各组 WB 培养上清中的 Th1/Th2 细胞因子的含量

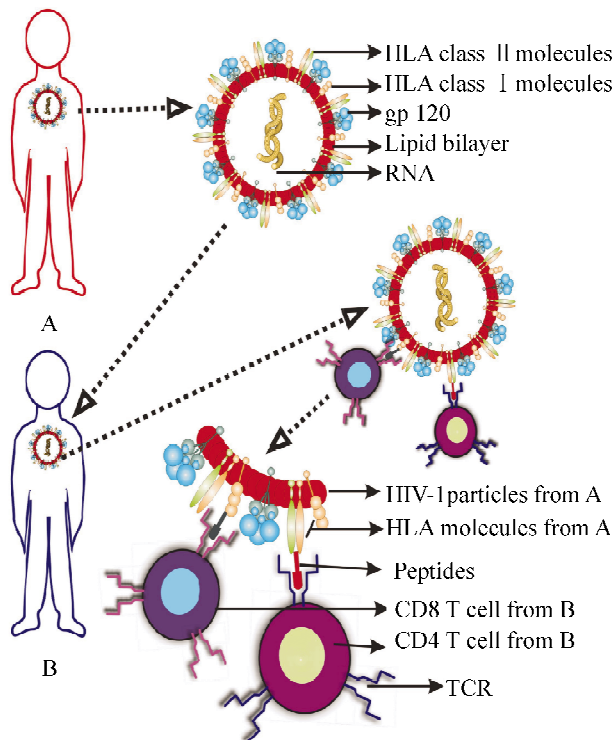


Fig 5 “Direct recognition” happens in HIV - 1 primary infection.

图5 HIV - 1 原发感染中发生的“直接识别”

讨 论

HIV - 1 出胞时,大量宿主细胞表面的分子插入病毒壳。虽然还没有确切的证据表明 HIV - 1 的复制绝对需要镶嵌在病毒壳的宿主来源的蛋白分子,但是有研究表明这些蛋白是有功能的,它们不但影响着病毒生活周期的多个环节,而且还影响着宿主免疫细胞的多种行为^[5-8]。

本文中,我们之所以利用 AT - 2 灭活的 HIV - 1 颗粒,首先,可以脱离在生物安全实验室中进行操作,大大地降低了实验操作人员的危险性;另外,AT - 2 是通过共价修饰 NCp7 中的锌指结构而破坏 HIV - 1 的感染性,但仍保留了 HIV - 1 颗粒构象和功能的完整性以及病毒颗粒出胞时携带的宿主细胞来源蛋白的构象和功能的完整性^[9,10],而热灭活等其它灭活方式却会导致蛋白变性。

我们认为: HIV - 1 原发性感染(primary infection)中,普遍性的免疫过度活化主要是由同种异基因识别(allo - recognition)而触发的。如图 5 所示,因为在 HIV - 1 原发感染中,A 把 HIV - 1 传染给 B 的过程可以看作是同种异基因移植的过程:其中,A 为供者(donor),携带 A 的 HLA 分子的 HIV - 1 为移植体(graft),而 B 为受者(recipient)。B 的 T 细胞通过同种异基因识别中的“直接识别”和“间接识别”引发细胞免疫清除 HIV - 1 的过程,可以看作是宿主抗移植体(host - versus - graft, HVG)的过程,其中,“直接识别”是指 B 的 T 细胞识别 HIV - 1 颗粒表面完整的 A 来源的 HLA 分子,HIV - 1 颗粒由此模拟了 A 的 APC 角色;而“间接识别”是指 B 的 T 细胞识别经过 B 自身 APC 加工处理的、来源于 A 的 HLA 分子的肽。在同种异基因移植中^[11],由于 T 细胞识别的“简并性”,通过“直接识别”可以使受者反应性 T 细胞的频率高达 3% - 10%;而针对一般抗原,特异性应答的 T 细胞前体的频率仅为 $10^{-5} - 10^{-4}$ 。我们的实验结果显示:AT - 2 灭活的 HIV - 1_{III_B}颗粒可以使活化的 CD4⁺T 细胞频率高达 10%,这一数字恰恰与同种异基因移植中受者 T 细胞通过“直接识别”而活化的频率相吻合。根据我们以往的测定结果显示:我们制备 HIV - 1_{III_B}颗粒时所运用的 C8166 细胞系膜表面表达 HLA I/II 类分子和 B7.1 和 B7.2 等共刺激分子,所以当 HIV - 1_{III_B}出胞时,这些分子便会整合到包膜中,使得 HIV - 1_{III_B}颗粒模拟 APC 成为了可能。虽然,我们没有对我们所制备的 AT - 2 灭活 HIV - 1_{III_B}颗粒所携带的宿主蛋白分子的类型和数量进行测定,但是很显然,这一结果很难用 HIV - 1 颗

粒携带蛋白(病毒基因组编码蛋白和宿主来源的蛋白)仅仅是通过“间接识别”来解释,因为通过“间接识别”而活化的 T 细胞频率非常低。静止的 CD4⁺T 细胞的活化需要两类信号:主要信号来自于 TCR 结合 MHC II 类分子-抗原肽复合物,次要信号来自于 T 细胞上的共刺激分子受体(如 CD28 等)结合 APC 上的相应配体(如 B7.1、B7.2 等)。已有文献表明, HIV-1 出胞时,从宿主细胞获得了 HLA I/II 类分子^[5],如果这些 HLA I/II 类分子结合有抗原肽,那么,就可以为抗原特异性的 CD8⁺/CD4⁺T 细胞活化提供主要信号;另有文献报道, HIV-1 出胞时,还会整合 B7.1 和 B7.2 等共刺激分子^[6],这样就可以为抗原特异性 CD8⁺/CD4⁺T 细胞活化提供次要信号。正是因为能够提供上述两类信号,而且只在原发性感染中, HIV-1 颗粒才携带有“异己”的 HLA 分子,扮演了 APC 的角色,并通过同种异基因识别机制引发普遍性的免疫过度活化;普遍性免疫过度活化和 HIV-1 复制是时空的联合体,也就是说,免疫活化可以为 HIV-1 感染提供更多的“燃料”细胞,而 HIV-1 的复制又进一步引起免疫活化,从而推动着免疫缺陷的形成。这一假说对于 HIV-1 原发感染发病机制的阐明和治疗策略的制定有着重要的指导意义。

另外,在 HIV-1 感染者中,普遍性免疫过度活化和细胞因子风暴(cytokine storm)并存^[12,13],说明两者休戚相关。细胞因子是由机体的多种细胞分泌的小分子蛋白质,通过结合细胞表面的特异性受体发挥生物学作用。细胞因子通过旁分泌(paracrine)、自分泌(autocrine)和/或内分泌(endocrine)的方式来发挥免疫调节和刺激造血等多种生物学作用。多效性(pleiotropy)、重叠性(redundancy)、拮抗性(antagonism)和协同性(synergy)是细胞因子发挥生物学功能时所表现出的特征,从而形成十分复杂的细胞因子调节网络。我们的体外实验结果显示, AT-2 灭活的 HIV-1_{ⅢB}颗粒可以明显上调 WB 分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 和 IL-10,其中 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-6 是典型的促炎细胞因子(pro-inflammatory cytokine),可以诱导单核-巨噬细胞、NK 细胞和树突状细胞等多种免疫细胞活化;而 IL-10 可以诱导 B 细胞活化,但却抑制 T 细胞免疫功能。由此推理, HIV-1 颗粒引发 Th1/Th2 细胞因子风暴,而细胞因子谱的“漂移”产生的“旁观者效应”(bystander effect),使得更多的免疫细胞活化,也会使得很多的免疫细胞无能,最终导致普遍性免疫过度活化与 CD4⁺T 细胞群和 CD8⁺T 细胞群无能并存的矛盾局面。

[参 考 文 献]

- [1] Stevenson M. HIV-1 pathogenesis [J]. *Nat Med*, 2003, 9(7):853-860.
- [2] 曾耀英,肇静娴. HIV 病发病学新概念:肠淋巴组织主要病灶论[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(3):607-613.
- [3] 曾耀英,钱中清. 固有性抗人类免疫缺陷病毒-1 因子的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(3):614-618.
- [4] Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺T-cell changes independent of viral load [J]. *Blood*, 2004, 104(4):942-947.
- [5] Cantin R, Fortin JF, Lamontagne G, et al. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells [J]. *Blood*, 1997, 90(3):1091-1100.
- [6] Giguère JF, Bounou S, Paquette JS, et al. Insertion of host-derived costimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) into human immunodeficiency virus type 1 affects the virus life cycle [J]. *J Virol*, 2004, 78(12):6222-6232.
- [7] Cantin R, Méthot S, Tremblay MJ. Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses [J]. *J Virol*, 2005, 79(11):6577-6587.
- [8] Saphire AC, Bobardt MD, Galloway PA. Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells [J]. *Immunol Res*, 2000, 21(2-3):211-217.
- [9] Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins [J]. *J Virol*, 1998, 72(10):7992-8001.
- [10] Morellet N, Meudal H, Bouaziz S, et al. Structure of the zinc finger domain encompassing residues 13-51 of the nucleocapsid protein from simian immunodeficiency virus [J]. *Biochem J*, 2006, 393(Pt 3):725-732.
- [11] 曾耀英. T 细胞识别同种异型移植抗原的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(3):149-152.
- [12] Kinter A, Arthos J, Cicala C, et al. Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis [J]. *Immunol Rev*, 2000, 177(期):88-98.
- [13] Klenerman P, Ludewig B. Virus scores a perfect 10 [J]. *Nat Med*, 2006, 12(11):1246-1248.