

## HIV-1 感染者外周血 I 型干扰素产生细胞水平变化的研究

刘真 洪坤学 高占 贾明明 胡新韬 赵全璧 阮玉华 邵一鸣

**【摘要】 目的** 探讨我国 HIV 感染者外周血 I 型干扰素产生细胞(IPC)水平及其与疾病进展的关系。**方法** 应用流式细胞术以全血染色、全白细胞设门对 92 例 HIV-1 感染者和 59 例健康对照进行 IPC 水平的测定,并分析外周血 IPC 变化与 CD4<sup>+</sup> T 细胞计数和 HIV 血浆病毒载量的关系。**结果** HIV 感染者外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞及 IPC 绝对计数的均数分别为 342.000 个/ $\mu$ l 和 3.431 个/ $\mu$ l,显著低于正常对照(965.000 个/ $\mu$ l 和 5.995 个/ $\mu$ l,  $P$  均  $< 0.001$ ); HIV 感染者 IPC 细胞数量与 CD4<sup>+</sup> T 细胞计数成正比( $r = 0.430, P < 0.001$ ),与 HIV 血浆病毒载量成反比( $r = -0.483, P < 0.001$ ); CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数  $< 200$  个/ $\mu$ l 的感染者 IPC 水平明显低于 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数  $> 200$  个/ $\mu$ l 者( $P < 0.005$ )。HIV 慢性感染者的 IPC 水平显著高于艾滋病患者( $P < 0.001$ ),新发感染者的 IPC 水平(5.080 个/ $\mu$ l)明显低于正常对照( $P = 0.038$ ),但新发感染与慢性进展者的 IPC 水平间的差异无统计学意义。**结论** HIV 感染可显著降低机体的 IPC 水平,IPC 水平变化与 HIV 疾病进展密切相关。

**【关键词】** 人类免疫缺陷病毒;干扰素 I 型;病毒载量

**Changes on type I IFN-producing cell level in patients with human immunodeficiency virus-1 infection** LIU Zhen, HONG Kun-xue, GAO Zhan, JIA Ming-ming, HU Xin-tao, ZHAO Quan-bi, RUAN Yu-hua, SHAO Yi-ming. National Center for AIDS/STD Prevention and Control, China CDC (State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control), Beijing 102206, China

Corresponding author: HONG Kun-xue, Email: hongkx@chinaaids.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the profiles of the type I IFN-producing cell (IPC) level in patients with HIV-1 infection in different disease status. **Methods** Fifty-nine HIV-1 negative controls and ninety-two subjects infected with HIV-1 were enrolled in this study. The absolute numbers of IPCs were measured by flow cytometry through whole blood dyeing and whole white cells gating. Association

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.02.004

基金项目:“十一五”重大传染病防治研究项目(2008ZX10001-010);传染病预防控制国家重点实验室课题(2008SKLID101)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(传染病预防控制国家重点实验室)

通讯作者:洪坤学,Email:hongkx@chinaaids.cn

between IPCs and CD4<sup>+</sup> T cells and viral loads were analyzed. **Results** The median cell counts of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (342.000 cells/ $\mu$ l) and IPCs (3.431 cells/ $\mu$ l) in HIV infected subjects were both significantly lower than that of the controls ( $P < 0.001$ ). The absolute counts of IPCs in patients with HIV-1 infection correlated positively with CD4<sup>+</sup> T cells ( $r = 0.430$ ,  $P < 0.001$ ), while negatively with viral load ( $r = -0.483$ ,  $P < 0.001$ ). When stratifying the HIV-1 infected subjects with CD4<sup>+</sup> T cell counts, individuals with CD4<sup>+</sup> T cell counts below 200 cells/ $\mu$ l have significantly less IPCs than that of subjects with CD4<sup>+</sup> T cell counts above 200 cells/ $\mu$ l ( $P < 0.005$ ). The median count of IPCs in patients with AIDS was lower than that of HIV chronic progressors and primary infectors ( $P < 0.001$ ), while there was no statistical difference between HIV chronic progressors and primary infectors. **Conclusions** The absolute counts of IPCs in HIV-1 infected subjects were dramatically decreased and correlated with disease progression.

**【Key words】** Human immunodeficiency virus; Interferon, Type I; Viral load

I型干扰素产生细胞(type I IFN-producing cell, IPC)是机体内浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)的前体细胞,在抵御病原体入侵过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。IPC既可以通过分泌I型干扰素等细胞因子参与对固有免疫应答的调节,也可以通过抗原肽-MHC复合物与T淋巴细胞相互作用,提呈抗原,活化T细胞,进而介导获得性免疫应答<sup>[2,3]</sup>。近年来研究表明,在机体抗人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染免疫应答中,IPC既是免疫反应的重要调节细胞,又是免疫损伤的对象。IPC表达高水平的CD4和CCR5等分子,且对HIV高度易感。HIV感染可引起IPC数量和功能的改变,这些变化可能与疾病进程相关<sup>[4-6]</sup>。对HIV感染者外周血中IPC变化的研究,有助于评价感染者免疫功能状态和预后。本研究以BDCA2、BDCA4及CD4作为IPC特征性表面标志物组合<sup>[7]</sup>的全血染色法检测92例HIV感染者和59例正常对照的外周血IPC水平,并分析外周血IPC的变化与CD4<sup>+</sup>T细胞计数和血浆病毒载量的关系及不同疾病进展阶段患者IPC计数的改变特点。

## 资料与方法

### 一、研究对象

92例未经抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)的HIV-1感染者(其中包括新发感染者23例和慢性感染者69例),男性53例,女性39例;平均年龄52岁。健康对照59例,其中男性30例,女性29例;平均年龄48岁。本研究中的HIV感染者经既往单采浆或静脉吸毒途径感染,HIV感染者全部经酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)初筛和Western blot免疫印迹确诊。所有样品均为受试对象知情同意的情况下采集的肝素抗凝静脉血。

## 二、血细胞计数

入组者采血后肝素抗凝全血在 MEK-6108K 型血细胞计数仪上进行各成分计数。

## 三、CD4<sup>+</sup> T 细胞计数

取 20  $\mu\text{l}$  抗-FITC-CD3、抗-PE-CD4、抗-PerCP-CD45、抗-APC-CD8 混合抗体 (BD 公司) 加入 Trucount 管中, 加入 50  $\mu\text{l}$  充分混匀的全血, 振荡混匀, 室温避光 20 min; 然后加入 450  $\mu\text{l}$  1  $\times$  FACS 裂解液, 立即振荡混匀, 室温避光 10 min; 用 FACS Calibur 进行检测, 采用 MultiSET 软件进行分析。

## 四、病毒载量的测定

用 Roche 公司 COBAS AMPLICOR HIV-1 定量检测试剂盒 (RT-PCR 法) 在 COBAS AMPLICOR 全自动 PCR 检测仪上定量测定患者血浆中 HIV-1 RNA 含量, 检测下限为 50 拷贝/ml。

## 五、全血染色、全白细胞设门定量检测 IPC

取 100  $\mu\text{l}$  肝素抗凝新鲜外周血, 加入 10  $\mu\text{l}$  抗-FITC-BDCA2 (Miltenyi Biotec)、10  $\mu\text{l}$  抗-PE-BDCA4 (Miltenyi Biotec)、10  $\mu\text{l}$  抗-PE-Cy5-CD4 (Beckman Coulter)。混匀后室温避光标记 15 min, 加入 900  $\mu\text{l}$  溶血素, 立即振荡混匀, 室温避光 10 min 至溶液澄清, 加入 500  $\mu\text{l}$  PBS 溶液, 1500 rpm/min 离心 10 min, 除去未结合的荧光抗体, 将标记细胞重悬于 300  $\mu\text{l}$  的 PBS 中, 在流式细胞仪上用 FS-SS 全白细胞设门检测 CD4<sup>+</sup> BDCA2<sup>+</sup>/BDCA4<sup>+</sup> 细胞在全白细胞中所占比例, 以该比例乘以全白细胞总数, 即得 IPC 绝对计数。

## 六、统计学处理

使用 SigmaPlot 10.0 和 GraphPad Prim 5.0 进行统计学分析和作图。用双侧 *t* 检验 (两组数据呈正态分布且方差齐, 统计量为 *t*) 或 Mann-Whitney U 检验 (非正态或方差不齐, 统计量为 *T*) 比较组间差异, 相关性分析的统计学检验采用 Spearman 秩相关, 假设检验的水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 结 果

### 一、HIV 感染者 IPC 计数与对照组的比较

HIV 感染者 CD4<sup>+</sup> T 细胞平均值为 (342.000  $\pm$  260.263) 个/ $\mu\text{l}$ , 显著低于对照组 (965.000  $\pm$  457.249) 个/ $\mu\text{l}$  ( $T = 6714.500, P < 0.001$ ); HIV 感染者的 IPC 绝对计数的平均值为 3.431 个/ $\mu\text{l}$ , 显著低于对照组 IPC 水平 (5.995 个/ $\mu\text{l}$ ) ( $T = 5738.000, P < 0.001$ ); HIV 感染者血浆病毒载量的中位数为  $3.27 \times 10^4$  拷贝/ml, 四分位间距为 ( $1.65 \times 10^4$ ;  $1.78 \times 10^5$ ) 拷贝/ml (表 1)。

表 1 对照组与 HIV 感染组的病毒载量、CD4<sup>+</sup> T 细胞及 IPC 比较

组别	样本量(例)	病毒载量(拷贝/ml)	CD4(个/ $\mu\text{l}$ )	IPC(个/ $\mu\text{l}$ )
对照组	59	/	965	5.995
HIV 感染组	92	$3.27 \times 10^4$	342	3.431
<i>P</i>	/	/	< 0.001	< 0.001

注: “/” 表示无须检测某指标或未进行统计学分析

## 二、HIV 感染者 IPC 水平与 CD4<sup>+</sup> T 细胞绝对计数和病毒载量的相关性

为了研究 HIV 感染者外周血 IPC 的变化特征,探讨其是否与疾病进展和病毒复制具有相关性,本研究分析了感染者体内 IPC 水平与 CD4 和病毒载量的关系。结果显示 HIV 感染者的 IPC 绝对计数与 CD4<sup>+</sup> T 细胞数成正比( $r = 0.430$ ,  $P < 0.001$ ),而与血浆病毒载量成反比( $r = -0.483$ ,  $P < 0.001$ ) (图 1)。IPC 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞绝对计数和病毒载量相关性统计学检验采用 Spearman 秩相关分析。

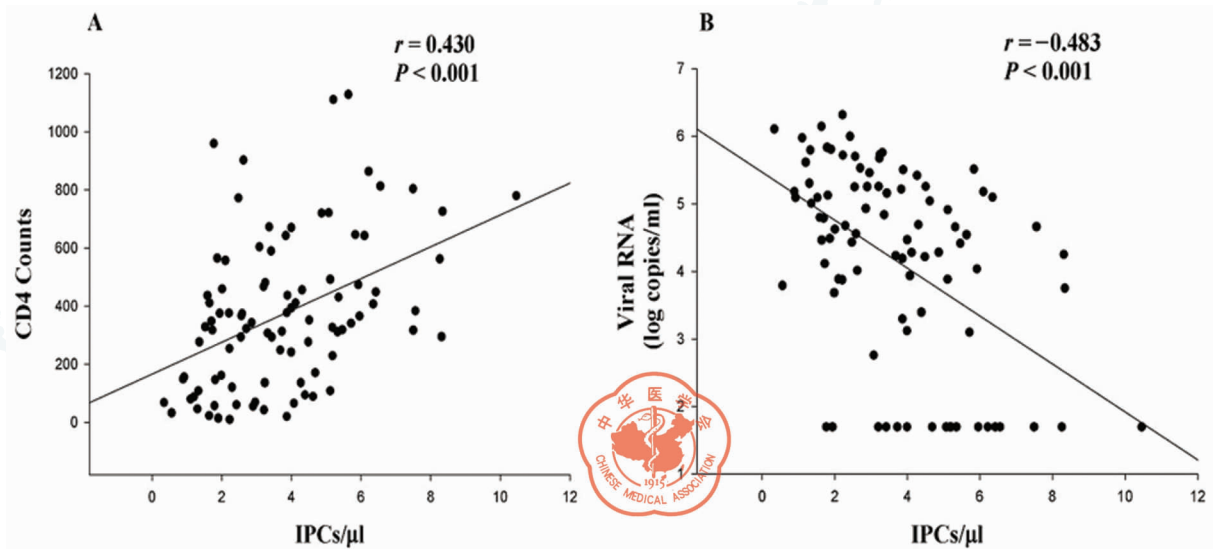


图 1 HIV-1 感染者外周血 IPC 计数与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数(A)和病毒载量(B)的相关性

## 三、HIV 感染者 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞与 IPC 绝对计数的关系

按照 CD4<sup>+</sup> T < 200 个/μl、200 ~ 350 个/μl、350 ~ 500 个/μl 和 ≥500 个/μl 的标准将患者分为 4 组,患者数分别为 27、21、22 和 22 例。各组 CD4<sup>+</sup> T 细胞绝对计数的均值分别为 80.340、312.000、411.000 和 720.682 个/μl; IPC 绝对计数的中位数分别为 2.230、3.680、3.940 和 4.975 个/μl。统计学分析显示 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数小于 200 个/μl 组的 IPC 水平明显低于其他 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数组(双侧  $t$  检验和 Mann-Whitney U 检验的统计量  $t$  或  $T$  分别为 2.969、3.428、739.000;  $P$  分别为 0.005、0.001、<0.001),其余各组间的 IPC 水平差异无统计学意义(图 2)。

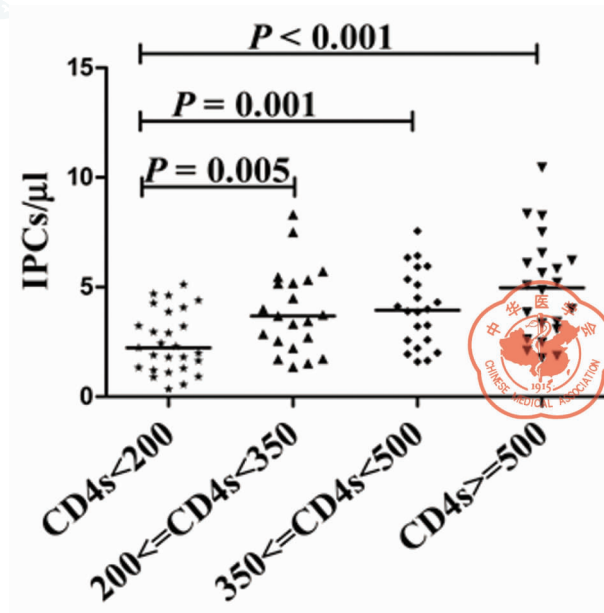


图2 不同 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数 HIV-1 感染者 IPC 水平的比较(中位数)

#### 四、HIV 新发感染组、慢性进展者组、艾滋病组与对照组 IPC 水平的比较

根据 HIV 感染者 CD4<sup>+</sup> T 细胞绝对计数和感染时间的不同进行分组,感染时间小于 6 个月的为新发感染组(primary infectors,  $n = 23$ ),慢性感染者中 CD4<sup>+</sup> T 细胞数小于 200 个/ $\mu\text{l}$  者为艾滋病组(AIDS 组,  $n = 27$ ),其余慢性感染者为 HIV 进展组( $n = 42$ )。AIDS 组、慢性 HIV 进展组、新发感染组和正常对照组的 IPC 绝对计数的均值分别为 2.230、3.855、5.080 和 5.995 个/ $\mu\text{l}$ 。不同组的 IPC 水平两两比较分析显示除新发感染和慢性进展组的 IPC 水平差异无统计学意义外,其余各组之间的 IPC 水平比较均具有统计学意义(图 3)。

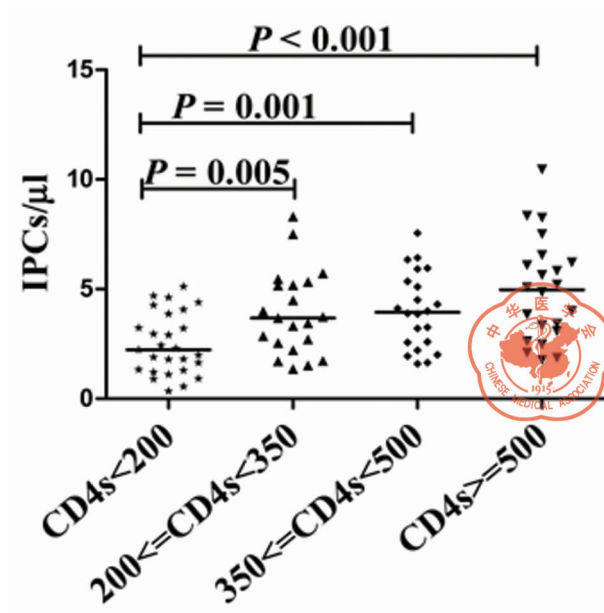


图3 正常对照组、新发感染组、HIV 慢性进展组和艾滋病组外周血 IPC 绝对计数的比较

## 讨 论

IPC 作为连接天然免疫和特异性免疫的桥梁细胞,在 HIV 感染发病机制中的作用日益受到重视。干扰素是发现最早的细胞因子之一,根据其来源和理化性质可将其分为 I 型干扰素(主要为 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ )和 II 型干扰素(IFN- $\gamma$ ), II 型干扰素主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,而 I 型干扰素 IFN- $\alpha$  主要由 IPC 产生。IPC 在体内数量虽然很少,但其产生 I 型干扰素的能力是其他细胞的 200 ~ 1000 倍<sup>[8]</sup>。DNA 和 RNA 包膜病毒感染机体后分别通过 Toll 样受体 7 (Toll-like receptor 7, TLR7) 和 TLR9 途径刺激 IPC 产生 IFN- $\alpha$  从而发挥抗病毒免疫效应<sup>[9,10]</sup>。

长期以来由于外周血 IPC 数量少,缺少特征性的表面标记,限制了对其在免疫学特性及在疾病中作用的研究。以往检测 IPC 的方法主要是基于组成性世系标记(CD3、CD14、CD16、CD19 和 CD56)阴性的细胞群中 CD11c-CD123<sup>+</sup> 细胞亚群,此种方法耗时长且结果不稳定<sup>[11]</sup>。本研究以 BDCA2、BDCA4 和 CD4 为 IPC 新的特征性表面标志组合,采用操作简便、结果可靠的全血染色和全白细胞设门分析计数方法,测定了 92 例处于不同感染进程阶段的 HIV-1 感染者和 59 例健康对照的 IPC 水平<sup>[7,12]</sup>。

本研究结果表明 HIV 感染人群的 IPC 绝对计数明显低于对照组,但在不同疾病进展阶段 IPC 水平存在两个明显的变化点,即感染初期人群与正常人群相比,AIDS 期人群与感染进展期人群相比,IPC 水平存在明显的下降,进展期人群虽然比新发感染者的 IPC 绝对计数低,但差别无统计学意义。上述结果提示 HIV 感染早期即能造成机体 IPC 细胞的显著降低,慢性期感染者 IPC 的丢失相对缓慢,但进展到艾滋病期的感染者 IPC 进一步急剧下降。近年来研究显示 HIV 感染后不仅 IPC 数量减少,其分泌 IFN- $\alpha$  的功能也减弱<sup>[13-15]</sup>。HIV 感染者外周血 IPC 水平与 CD4<sup>+</sup> T 细胞绝对计数呈正比,而与血浆病毒载量呈反比,提示 IPC 可作为评价 HIV 疾病进展的有价值的参考指标。根据 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数的高低进一步将病例分组后的结果比较表明,随着 CD4 细胞数量的减少,IPC 绝对计数显著下降,且不同 HIV 疾病进展阶段人群 IPC 水平也存在明显差异。结果提示 HIV 感染后机体外周血 IPC 数量明显下降,且其下降水平与 HIV 疾病进展状况密切相关。

HIV 感染导致 IPC 丢失的确切机制尚不明确,但近年来关于 IPC 和 HIV 相互作用的研究进展,为对这一现象的认识提供了越来越多的线索<sup>[16,17]</sup>。IPC 表达 CD4 及 HIV 感染的主要辅助受体 CCR5 和 CXCR4,对 T 细胞嗜性的 NL4-3 和巨噬细胞嗜性的 JR-CSF HIV 毒株均高度易感。从感染者体内分离的 IPC 及与病毒体外共培养后的 IPC 中检测到前病毒 DNA,提示由于 IPC 对 HIV 高度易感而导致的 HIV 病毒对 IPC 的直接损伤或由感染引发免疫损伤,可能是 IPC 在 HIV 感染期间丢失的部分原因,但也不排除在感染期间,IPC 大量从外周血向淋巴组织迁徙而导致外周血中 IPC 数量的下降。相关文献指出 IPC 水平的下降是由细胞

迁移和细胞死亡共同作用的结果,其确切机制还有待于进一步研究<sup>[18]</sup>。HIV 感染引起 IPC 细胞的损耗为 HIV 免疫致病机理的研究提供了新思路。

目前对 HIV 感染者免疫状态的评价主要基于 CD4<sup>+</sup> T 细胞数量的变化,检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞计数同时结合 IPC 数量的分析可能会更全面地反映 HIV 感染者免疫状态,为预防机会性感染及指导抗病毒治疗提供了依据。此外,传统的抗病毒治疗不良反应大,且易出现耐药,而 IPC 或者 IFN- $\alpha$  的免疫治疗则可能会为 HIV 的免疫治疗提供新的靶点。

#### 参 考 文 献

- 1 Fitzgerald-Bocarsly P, Feng D. The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie*,2007,89(6-7):843-855.
- 2 Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*,2008,29(3):352-361.
- 3 Zhang Z, Wang FS. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol*,2005,2(6):411-417.
- 4 Muller-Trutwin M, Hosmalin A. Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunol Cell Biol*,2005,83(5):578-583.
- 5 Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol*,2010,87(4):609-620.
- 6 Lichtner M, Rossi R, Rizza MC, et al. Plasmacytoid dendritic cells count in antiretroviral-treated patients is predictive of HIV load control independent of CD4<sup>+</sup> T-cell count. *Curr HIV Res*,2008,6(1):19-27.
- 7 Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4; three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*,2000,165(11):6037-6046.
- 8 Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science*,1999,284(5421):1835-1837.
- 9 Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev*,2008,19(1):3-19.
- 10 Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*,2005,115(11):3265-3275.
- 11 Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, et al. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol*,2006,177(11):7784-7793.
- 12 Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*,2002,63(12):1133-1148.
- 13 Feldman S, Stein D, Amrute S, et al. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol*,2001,101(2):201-210.
- 14 Killian MS, Fujimura SH, Hecht FM, et al. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS*,2006,20(9):1247-1252.
- 15 Nascimbeni M, Perie L, Chorro L, et al. Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-1 infected patients but rarely participate in interferon- $\alpha$  expression. *Blood*,2009,113(24):6112-6119.
- 16 Meyers JH, Justement JS, Hallahan CW, et al. Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One*,2007,2(5):e458.
- 17 Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology*,2009,6:51.
- 18 Brown KN, Wijewardana V, Liu X, et al. Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog*,2009,5(5):e1000413.

(收稿日期:2011-01-07)

(本文编辑:孙荣华)

刘真,洪坤学,高占,等. HIV-1 感染者外周血 I 型干扰素产生细胞水平变化的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(2):148-154.