

HIV 感染者滤泡细胞毒性 T 细胞与疾病进展的关系及功能分析

赵海燕, 刘萍萍, 尹 飞

[摘要] 目的 探索 HIV 感染者滤泡细胞毒性 T 细胞 (follicular cytotoxic T cells, TFC) (即 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞) 与疾病进展的关系, 并将其与 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞对比分析。方法 入组 HIV 感染未治疗患者, 抗病毒治疗后免疫重建成功和免疫重建失败患者, 收集并分离其外周血单个核细胞, 经流式染色及体外培养后分析其数量、表型及功能。结果 HIV 感染者 TFC 的数量明显增加, TFC 与疾病进展呈负相关。与 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞相比, TFC 上 PD-1 的水平明显增加, TFC 的分泌功能较强而杀伤功能较弱。结论 在 HIV 感染中, TFC 与疾病进展呈负相关。TFC 与 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞在 PD-1 的表达和功能上均有一定的差异。

[关键词] TFC; HIV; PD-1; 杀伤功能; 分泌功能

[中国图书资料分类号] R512.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2020)06-0509-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2020.06.004

Correlation of TFC with disease progression and its function in HIV patients

ZHAO Hai-yan, LIU Ping-ping, YIN Fei*

Department of Laboratory Medicine, Qingdao No. 6 People's Hospital, 266033, China

*Corresponding author, E-mail: f35com0622@sina.com

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between follicular cytotoxic T cells (TFC) and disease progression in HIV patients and analyze the difference between TFC and CXCR5⁺CD8⁺ T cells. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were collected and isolated from untreated HIV patients, and the patients with successful and failed immune reconstitution after antiviral therapy. The quantity, phenotype and function of these cells were analyzed using flow cytometry staining and *in vitro* culture. **Results** The number of TFC increased significantly in HIV infected patients. TFC was negatively correlated with the progression of HIV. Compared with CXCR5⁺CD8⁺ T cells, the level of PD-1 on TFC was significantly increased, and the secretion function of TFC was stronger while the killing function was weaker than that of CXCR5⁺CD8⁺ T cells. **Conclusions** TFC is negatively correlated with disease progression during HIV infection. PD-1 expression and function of TFC are very different from those of CXCR5⁺CD8⁺ T cells.

[Key words] TFC; HIV; PD-1; killing function; secretory function

抗病毒治疗 (antiretroviral therapy, ART) 大大降低了 HIV 感染者的病死率, 但不能彻底清除病毒, 患者须要终身服药。潜伏 HIV 形成的储存库是艾滋病不能根治及终身服药的原因, 通过消除潜伏 HIV 实现功能性治愈成为国内外艾滋病领域研究的热点。有研究报道 HIV 特异性 CD8⁺ T 细胞在控制 HIV 复制及清除 HIV 储存库方面发挥着关键作用^[1-2]。研究表明如果有足够的 HIV 特异性 CD8⁺ T 细胞, HIV 有可能被消灭^[1-2]。而在 HIV 感染中, 随着疾病的进展, HIV 特异性 CD8⁺ T 细胞逐渐衰竭, 功能也逐渐降低。

近年发现一类新的 CD8⁺ T 细胞亚群, CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞阳性亚群, 即滤泡细胞毒性 T 细胞 (follicular cytotoxic T cells, TFC), 表达趋化因子受体 CXCR5 并具有 HIV 特异性 CD8⁺ T 细胞的某些特征, TFC 主要存在于淋巴结, 对控制慢性病毒感染、病毒复制起着关键作用^[3-5]。淋巴结是 HIV 储存库存在的主要解剖学场所, 其中存在

于淋巴结生发中心的滤泡辅助性 T 细胞 (follicular helper T cells, TFH) 即 CXCR5⁺CD4⁺ T 细胞是 HIV 潜伏最主要的靶标^[6]。TFC 和 TFH 在解剖学位置上距离比较近, 因此, 充分了解在 HIV 感染中 TFC 对潜伏 HIV 的作用具有重要的意义。

本研究入组 HIV 感染未治疗患者及 ART 后免疫重建成功和免疫重建失败患者, 通过其外周血标本分析 HIV 感染中 TFC 数量、表型及功能的特点, 为充分了解在 HIV 感染中 TFC 的特征提供数据。

1 对象与方法

1.1 对象 将 2015—2017 年于青岛市第六人民医院门诊就诊及随访的 105 例 HIV 感染者纳入本研究, 包括新就诊未治疗组患者 33 例, 免疫重建成功组患者^[7-9] (有效 ART 2 年以上, 病毒降低到检测不到的水平, CD4⁺ T 细胞恢复到 350 个/μl 以上并且 CD4⁺ T 细胞计数较基线增加 > 30%) 42 例, 免疫重建失败组患者^[7-9] (有效 ART 2 年以上, 病毒降低到检测不到的水平, CD4⁺ T 细胞持续在 250 个/μl 以下并且 CD4⁺ T 细胞计数较基线

[作者单位] 266033, 青岛市第六人民医院检验科 (赵海燕、刘萍萍、尹飞)

[通信作者] 尹飞, E-mail: f35com0622@sina.com

增加 < 20%) 30 例。HIV 诊断标准参照《中国艾滋病诊疗指南 (2018 版)》^[10]。纳入标准: 年龄为 15 ~ 65 岁。排除标准: 合并 HBV、HCV 感染者, 结核患者及孕妇。另选取我院

20 例与上述患者年龄及性别等相匹配的健康体检者纳入对照组。研究对象一般情况见表 1。本研究已获得医院伦理委员会批准, 研究对象及家属签署同意书。

表 1 研究对象一般情况
Table 1 General information of objects

指标	未治疗组 (n=33)	免疫重建成功组 (n=42)	免疫重建失败组 (n=30)	对照组 (n=20)
年龄 (岁)*	29(18, 62)	31(23, 52)	35(26, 56)	32(23, 50)
CD4 ⁺ T 细胞计数 (个/μl)	280(35, 813)	462(351, 796)	152(41, 232)	755(652, 986)
病毒载量 (拷贝/ml)	75 954(1780, 1 311 000)	检测不到	检测不到	检测不到

注: 数据用中位数 (最小值, 最大值) 表示; *. 4 组年龄比较, $U=8.376$, $P=0.069$

1.2 HIV 载量及 CD4⁺T 细胞计数检测 采用罗氏 cobas TaqMan 病毒载量检测系统检测 HIV 载量, 利用 BD 公司的流式细胞仪检测 CD4⁺T 细胞计数。

1.3 HIV DNA 检测 采用广州海力特公司生产的 HIV-1 DNA 定量检测试剂盒进行检测。

1.4 流式细胞检测 抽取患者外周血 20 ml, 用密度梯度离心法得到患者的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。PBMC 进行流式染色。Live and Dead-FVS700、抗 -CD3-PerCP、抗 -CD8-FITC、抗 -CD4-APC、抗 -CXCR5-eFlour450 及抗 -PD-1-BV500 抗体购自 eBioscience 公司。细胞先进行表面染色, 然后根据说明, 使用破膜 / 固定试剂盒对细胞进行破膜及固定后进行细胞内穿孔素 -PE-cy7 与颗粒酶 B-PE 染色。为了检测 TFC 的功能及 HIV 特异的 TFC 的功能, 对 PBMC 分别进行培养, 培养前先进行抗 -CD107a-PE 染色, 然后用 1 μg/ml 的抗 -CD3 和抗 -CD28 的抗体或者用 HIV-env、gag 和 pol 组成的重叠肽 (分别为 1 μg/ml, 德国 JPT 公司) 在含 10% 的胎牛血清的 1640 培养基中培养 6 h, 刺激 2 h 后加入高尔基体阻断剂。用表面抗体染色后再进行细胞内抗 -IFN-γ- PE-cy7 抗体进行细胞内染色。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 绘图采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行。一般资料采用描述性分析, 计量资料根据需求采用中位数或四分位数间距表示。2 组间计量资料比较采用 Mann-Whitney U 检验; 成对比较采用配对 t 检验或 Wilcoxon 配对符号秩检验; 相关性分析采用 Spearman 相关性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TFC 与疾病进展的相关性分析 未治疗组 TFC 数量与 CD4⁺T 细胞计数呈正相关 ($r=0.496$, $P=0.003$) (图 1 A), TFC 占 CD8⁺T 细胞的百分比与病毒载量呈负相关 ($r=-0.470$, $P=0.006$)

(图 1 B), TFC 数量与 HIV DNA 水平呈负相关 ($r=-0.526$, $P=0.002$) (图 1 C)。与对照组相比, HIV 感染者 TFC 的数量及百分比均明显增高, 且免疫重建失败组 TFC 数量和百分比明显高于未治疗组及免疫重建成功组 (图 1D ~ E)。

2.2 TFC 表面 PD-1 表达情况分析 无论是对照组还是未治疗组、免疫重建成功组及免疫重建失败组的患者, TFC 上 PD-1 的水平均高于 CXCR5⁺CD8⁺T 细胞, 见图 2。

2.3 TFC 的功能特点分析 未治疗组患者, 无论是经过非特异刺激还是 HIV 特异抗原肽的刺激, TFC 的分泌功能包括 IFN-γ (图 3A)、TNF-α (图 3B) CD107a (图 3C) 的水平均高于 CXCR5⁺CD8⁺T 细胞, 而 TFC 的杀伤功能包括内穿孔素 (图 3D) 与颗粒酶 B (图 3E) 水平均低于 CXCR5⁺CD8⁺T 细胞。图 3F 为在特异性刺激的情况下, CXCR5⁺CD8⁺T 细胞及 CXCR5⁺CD8⁺T 细胞分泌功能检测的典型流式图。

3 讨 论

TFC 是近年发现的一类新的细胞亚群, 主要存在于淋巴结, 目前药物不能清除的潜伏 HIV 也主要存在于淋巴结, 因此对 TFC 在 HIV 感染中作用的研究越来越多。由于入组患者的差异以及体内和体外实验的不同等, 目前 TFC 在 HIV 感染中的作用存在争议。有些研究认为 TFC 的杀伤能力强^[11], 而另外一些研究则认为 TFC 的杀伤作用弱^[12]。有些报道认为 TFC 上 PD-1 的表达水平较高^[12], 而另外一些研究则认为 PD-1 的表达水平低^[11]。

本研究对未治疗患者、治疗后免疫重建成功和免疫重建失败患者的外周血 TFC 数量、表型及功能进行了系统研究。结果表明, TFC 与疾病进展呈负相关, 这可能与 TFC 具有一定的抗病毒作用有关。与免疫重建成功组相比, 免疫重建失败组的 TFC 水平较高, 这可能与免疫重建失败组患者体内 HIV 载量较高有关^[13]。PD-1 是免疫耗竭分子,

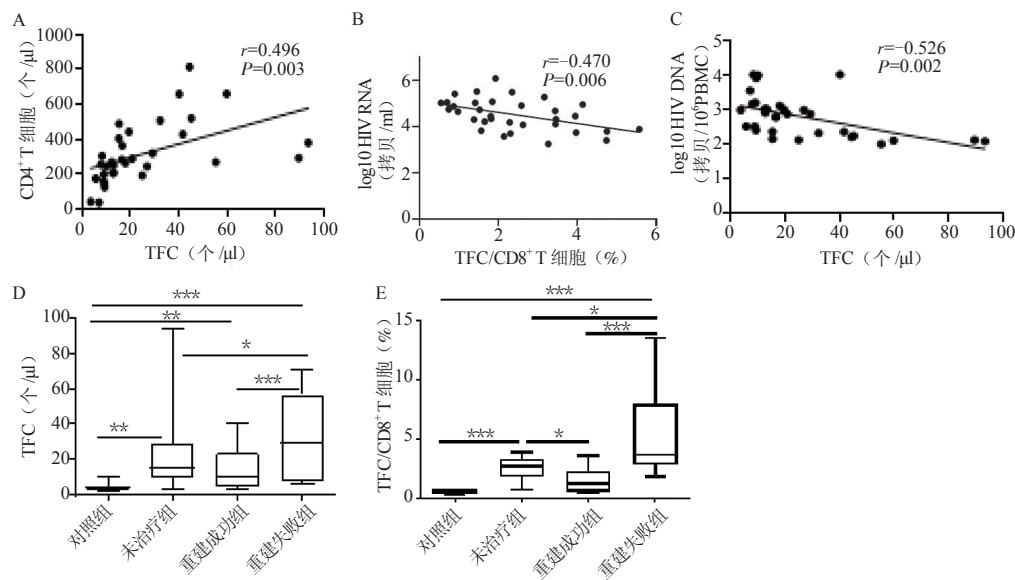


图 1 HIV 感染中 TFC 与疾病进程的相关性分析

A. TFC 与 CD4⁺T 细胞计数呈正相关; B. TFC 百分比与病毒载量呈负相关; C. TFC 与 HIV DNA 水平呈负相关; D. TFC 数量在不同患者之间的比较, 4 组总体比较的结果为 $H=32.517$, $P<0.0001$; E. TFC 百分比在不同患者之间的比较, 4 组总体比较的结果为 $H=25.321$, $P<0.0001$; *. $P<0.05$; **. $P<0.01$; ***. $P<0.001$

Figure 1 Analysis of the correlation between TFC and disease progression during HIV infection

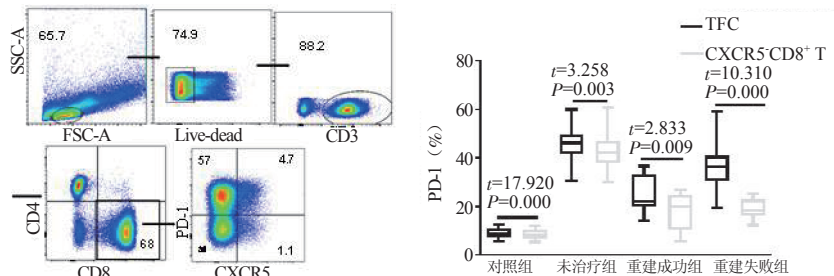


图 2 HIV 感染中 PD-1 在 TFC 上表达水平的分析

Figure 2 Analysis of PD-1 expression on TFC in HIV infection

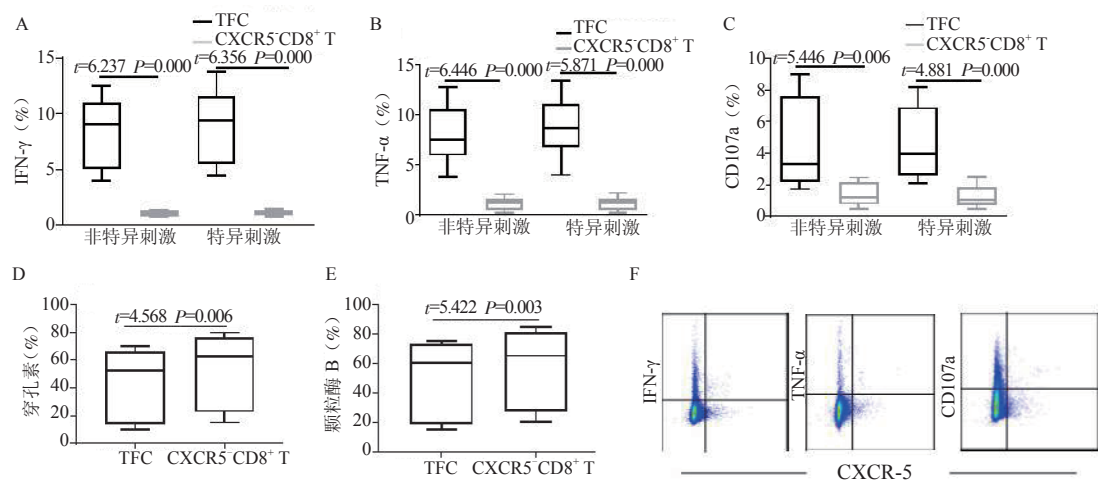


图 3 TFC 的功能分析

TFC 的分泌 IFN- γ (A), TNF- α (B) 及 CD107a (C) 的水平均高于 CXCR5⁺CD8⁺T 细胞, 而 TFC 的杀伤功能包括穿孔素 (D) 与颗粒酶 B (E) 水平均低于 CXCR5⁺CD8⁺T 细胞

Figure 3 Analysis of the functions of TFC

也是细胞归巢到淋巴结的重要分子。本研究发现, TFC 上 PD-1 水平明显高于 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞, 这可能与 TFC 特性有关。TFC 具有干细胞样特征, 能够缓慢地自我更新并能产生更多的终末分化效应 CD8⁺ T 细胞^[3-5]。前期通过对 HIV 感染者的研究表明, 高表达 PD-1 对 TFC 发挥功能是必须的^[14], PD-1 对 TFC 来说有可能不只是“耗竭”分子^[12-14]。另外一些在感染性疾病和肿瘤方面的研究也表明, PD-1 是 TFC 功能性的分子^[14-16]。最新在肿瘤方面的研究表明, PD-1⁺CD8⁺ T 细胞可分为不同的亚群, 部分处于“耗竭”状态, 而 PD-1⁺B7S1R⁺Tim-3⁺CD8⁺ T 细胞则是功能性亚群^[17]。通过单细胞测序技术的研究也表明, PD-1⁺CD8⁺ T 细胞亚群也分为两群, 一群处于“耗竭”阶段, 另外一群处于“耗竭前”阶段^[18], “耗竭前”阶段的 CD8⁺ T 细胞高表达转录因子 GZMK 及 ZNF683。与无功能的“耗竭”阶段细胞群不同, 处于“耗竭前”阶段 PD-1⁺CD8⁺ T 细胞群也具有干细胞特征, 能够自我更新并能产生更多的效应 CD8⁺ T 细胞, 并且具有很强的功能^[17-18]。因此, TFC 上 PD-1 的表达很大一部分有可能属于功能性亚群。

本研究也存在一些不足, TFC 主要存在淋巴结组织中, 而本文未对淋巴组织中的 TFC 进行分析。另外, 针对 TFC 的功能只进行了体外实验, 细胞在体外与体内功能不一定一致, 未进行动物实验进一步验证是本文的另外一个不足之处。

总之, 本研究通过检测 HIV 感染者的新鲜外周血标本发现, TFC 与疾病进展呈负相关。在 HIV 感染过程中, PD-1 在 TFC 上高表达。TFC 的杀伤功能较弱, 而分泌细胞因子的能力较强。本研究系统描述了 TFC 在 HIV 感染中的特点, 为进一步了解 TFC 在 HIV 感染中的作用提供了数据。

【参考文献】

- [1] Deng K, Perteaux M, Rongvaux A, *et al.* Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations [J]. *Nature*, 2015, 517(7534):381-385.
- [2] Shan L, Deng K, Shroff NS, *et al.* Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation [J]. *Immunity*, 2012, 36(3):491-501.
- [3] He R, Hou S, Liu C, *et al.* Follicular CXCR5-expressing CD8(+) T cells curtail chronic viral infection [J]. *Nature*, 2016, 537(7620):412-428.
- [4] Banga R, Procopio FA, Noto A, *et al.* PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals [J]. *Nat Med*, 2016, 22(7):754-761.
- [5] Leong YA, Chen Y, Ong HS, *et al.* CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(10):1187-1196.
- [6] Fukazawa Y, Lum R, Okoye AA, *et al.* B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers [J]. *Nat Med*, 2015, 21(2):132-139.
- [7] Collazos J, Valle-Garay E, Carton JA, *et al.* Factors associated with long-term CD4⁺ T cell recovery in HIV-infected patients on successful antiretroviral therapy [J]. *HIV Med*, 2016, 17(7):532-541.
- [8] 任圆圆. HIV 感染者抗病毒治疗免疫重建相关特异性 miRNA 标志物的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [9] Yang XD, Su B, Zhang X, *et al.* Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: challenges of immunological non-responders [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(4):597-612.
- [10] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组, 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南 (2018 版) [J]. *传染病信息*, 2018, 31(6):481-499, 504.
- [11] He R, Hou S, Liu C, *et al.* Follicular CXCR5-expressing CD8(+) T cells curtail chronic viral infection [J]. *Nature*, 2016, 537(7620):412-428.
- [12] Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, *et al.* Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy [J]. *Nature*, 2016, 537(7620):417-421.
- [13] Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Ghosn J, *et al.* Total HIV-1 DNA, a marker of viral reservoir dynamics with clinical implications [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(4):859-880.
- [14] Jiao YM, Yang HG, Huang HH, *et al.* Dichotomous roles of programmed cell death 1 on HIV-specific CXCR5⁺ and CXCR5⁻ CD8⁺ T cells during chronic HIV infection [J]. *Front Immunol*, 2017, 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01786.
- [15] Utschneider DT, Charmoy M, Chennupati V, *et al.* T cell factor 1-expressing memory-like CD8(+) T cells sustain the immune response to chronic viral infections [J]. *Immunity*, 2016, 45(2):415-427.
- [16] Siddiqui I, Schaeuble K, Chennupati V, *et al.* Intratumoral TCF1⁺PD-1⁺CD8⁺ T cells with stem-like properties promote tumor control in response to vaccination and checkpoint blockade immunotherapy [J]. *Immunity*, 2019, 50(1):195-211.
- [17] Li J, Lee Y, Li Y, *et al.* Co-inhibitory molecule B7 superfamily member 1 expressed by tumor-infiltrating myeloid cells induces dysfunction of anti-tumor CD8⁺ T cells [J]. *Immunity*, 2018, 48(4):773-786.
- [18] Guo X, Zhang Y, Zheng L, *et al.* Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7):978-985.

(2020-11-28 收稿 2020-12-05 修回)

(本文编辑 闫晶晶)