

· 论 著 ·

HIV-1 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平的研究

洪坤学,刘真,贾明明,马鹏飞,赵全壁,邵一鸣

**摘要:**目的 探索我国 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平及其与疾病进展的关系。方法 运用流式细胞术测定 72 例 HIV-1 感染者和 29 例健康对照外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平,分析 PD-1 表达水平与 HIV 感染者 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数和血浆病毒载量的相关性。结果 HIV 感染者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平显著高于健康对照(30.395% vs 18.450%  $P=0.001$ ),且与 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数负相关( $r=-0.401$   $P<0.001$ ),与病毒载量正相关( $r=0.247$   $P=0.0368$ );CD4<sup>+</sup>T 细胞计数小于 200 细胞/ $\mu$ l 的感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平显著高于 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数大于 500 细胞/ $\mu$ l 的感染者( $P=0.002$ ),PD-1 的表达在新发感染期和艾滋病期出现两个高峰;长期不进展者 PD-1 的表达水平与正常对照组差别无统计学意义。结论 HIV 感染可显著上调 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平,PD-1 表达水平的变化与 HIV 疾病进展密切相关。

**关键词:**人类免疫缺陷病毒;程序性死亡受体 1;病毒载量;疾病进展

中图分类号:R392 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)8-909-04

Profiles of PD-1 expression on CD8<sup>+</sup>T cells in human immunodeficiency virus-1 infected individuals. HONG kun-xue, LIU Zhen, JIA Ming-ming et al. (National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, P. R. China)

**Abstract:** Objective To investigate the expression level and clinical significance of PD-1 on CD8<sup>+</sup>T cells in HIV-1 infected individuals with different disease status. Methods Seventy-two HIV-1 infected individuals and twenty-nine healthy controls were enrolled in this study. The expression level of PD-1 on CD8<sup>+</sup>T cells were measured by flow cytometry assay. Correlations between PD-1 expression level and CD4 counts and plasma viral loads were analyzed. Results The expression level of PD-1 on CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in HIV-1 infected individuals was significantly higher than that of healthy controls (30.395% vs 18.450%  $P=0.001$ ). The PD-1 expression level in HIV-1 infection correlated negatively with CD4<sup>+</sup>T cell counts ( $r=-0.401$   $P<0.001$ ) while positively with viral loads ( $r=0.247$   $P=0.0368$ ). Upregulation of PD-1 in individuals with CD4 count below 200 cells/ $\mu$ l was significantly higher than that of subjects with CD4 count above 500 cells/ $\mu$ l ( $P=0.002$ ). Two remarkable infection peaks of PD-1 expression in primary infections and AIDS patients were observed but no significant difference was observed between long-term nonprogressors and healthy controls. Conclusions The expression level of PD-1 on CD8<sup>+</sup>T cells in HIV-1 infected individuals is up-regulated and this expression level is correlated with disease progress.

**Key words:** Human immunodeficiency virus; Programmed Death-1; Viral load; Disease progress

人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA)分子介导的细胞毒性 T 淋巴细胞反应(Cytotoxic T-lymphocyte responses, CTL)对控制病毒感染具有重要作用<sup>[1]</sup>,但在人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)感染,尤其是慢性 HIV 感染过程中常出现 CTL 细胞功能的损伤<sup>[2,3]</sup>。近年的研究表明程序性死亡受体 1(Programmed Death-1, PD-1)的负性调节作用与病毒慢性感染细胞免疫损伤密切相关。慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)和慢性乙肝病毒(HBV)感染者外周血 T 细胞上均存在 PD-1 表达上调的现象<sup>[4,5]</sup>,HIV 感染者不同疾病进展阶段 PD-1 在

CD8<sup>+</sup>T 细胞上的表达及其与 HIV 疾病进展的关系尚需进一步探索<sup>[6,7]</sup>。本研究以 72 例不同疾病进展阶段的 HIV-1 感染者以及 29 例健康对照为研究对象,分析外周血 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞表面 PD-1 的表达与 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数和血浆病毒载量的关系,及不同疾病进程阶段感染者 PD-1 表达水平变化的特点。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 72 例未经抗逆转录病毒治疗(Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART)的 HIV 感染者(包括新发感染者 12 例、长期不进展者 12 例、典型慢性进展者 43 例和艾滋病人 5 例),其中男 34 例,女

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81172809)

作者单位: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 北京 102206

作者简介:洪坤学(1964~),男,研究员,主要从事感染免疫研究,Email: hongkx@chinaaids.cn

38 例,平均年龄 54 岁。阴性健康对照 29 例,其中男 18 例,女 11 例,平均年龄 46 岁。HIV 感染者全部经酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)初筛和蛋白免疫印迹试验(Western Blot, WB)确证。所有样品均在受试对象知情同意的情况下采集抗凝静脉血进行检测。

1.2 方法

1.2.1 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数 取 20 $\mu$ l 抗 -FITC-CD3、抗 -PE-CD4、抗 -PerCP-CD45、抗 -APC-CD8 混合抗体(BD 公司)加入已标记好的 Trucount 管中,加入 50 $\mu$ l 全血,振荡混匀,室温避光 20min。然后加入 450 $\mu$ l 1 $\times$ FACS 裂解液,立即振荡混匀,室温避光 10min 至溶液澄清。用 FACS Calibur 流式细胞仪进行检测,采用 MultiSET 软件收集细胞并进行分析,得到 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数结果。

1.2.2 血浆病毒载量的测定 用 COBAS AMPLICOR HIV-1 定量检测试剂盒(Roche 公司)在 COBAS AMPLICOR 全自动 PCR 检测仪上定量测定感染者血浆中 HIV-1 RNA 含量,病毒载量检测下限为 50 拷贝/ml。

1.2.3 外周血 PBMC 的分离 以 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从 EDTA 抗凝全血分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。用含 1%小牛血清的 PBS 重悬新鲜分离的 PBMC 并调整浓度至 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 细胞/ml。

1.2.4 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平的测定 取 100 $\mu$ l 已调整好浓度的 PBMC 悬液,加入 5 $\mu$ l ECD-CD3(Beckman Coulter)、10 $\mu$ l PerCP-Cy5.5-CD8 Ab(BD Biosciences)、10 $\mu$ l APC-PD-1 (eBioscience),以 10 $\mu$ l 鼠 APC- IgG1(eBioscience)为同型对照。试验管和同型对照管混匀后室温避光标记 20min,加入 20 倍 PBS 漂洗细胞,除去未结合的荧光抗体,将标记的细胞重悬于 2%多聚甲醛的 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 保存或直接上机检测。FACS Aria 流式细胞仪收集分析数据,采用 FS-SS 参数分析基础上对全 PBMC 设门,以 CD3-CD8 为分析参数,设定 CD8 阳性细胞门,检测 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平,试验管中 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平扣除同型对照的非特异性本底值即得实际的 PD-1 表达值。

1.3 统计学分析 统计分析及作图用 Excel 2007、SigmaPlot 10.0 和 GraphPad Prism 5.0 完成。用双侧 t 检验(数据正态分布且方差齐)或 Mann-Whitney U 检验(数据非正态分布或方差不齐)比较组间差异,PD-1 表达水平与 CD4 细胞计数和病毒载量相关性

分析采用 Spearman 秩相关,假设检验的水准  $\alpha$  等于 0.05。

2 结果

2.1 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平与正常对照的比较 72 例 HIV 感染者 CD4<sup>+</sup>T 细胞平均值为(446.023 $\pm$ 200.323) 细胞/ $\mu$ l,显著低于正常对照组(711.748 $\pm$ 203.209)细胞/ $\mu$ l,HIV 感染者血浆病毒载量的中位数为 15700.000 拷贝/ml,四分位间距为(2885.000,49600.000)拷贝/ml,HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平的中位数为 30.395%,显著高于健康对照组的 18.450%(表 1)。

表 1 研究对象的病毒载量、CD4<sup>+</sup>T 细胞计数及 PD-1 表达水平

Table1 Viral load, CD4<sup>+</sup>T cell count and PD-1 expression level in the study subjects

组别 Group	样本量(例数) Sample(No.)	VL (copies/ml)	CD4 (cells/ $\mu$ l)	%PD-1/CD8
正常对照组 Control	29	/	711.748	18.450
HIV 感染组 HIV case	72	15700.000	446.023	30.395
P 值 P value	/	/	<0.001	0.001

注:“/”表示无需检测某指标或未做统计学比较

2.2 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平与 HIV 感染者 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数和病毒载量的相关性 为了研究 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平变化特征,探讨其是否与病毒复制具有相关性,我们采用 Spearman 秩相关分析了 HIV 感染者体内 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达与 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数和病毒载量的相关性,结果显示 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平与 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数成负相关( $r=-0.401, P<0.001$ ),与血浆病毒载量成正相关( $r=0.247, P=0.0368$ )(图 1)。

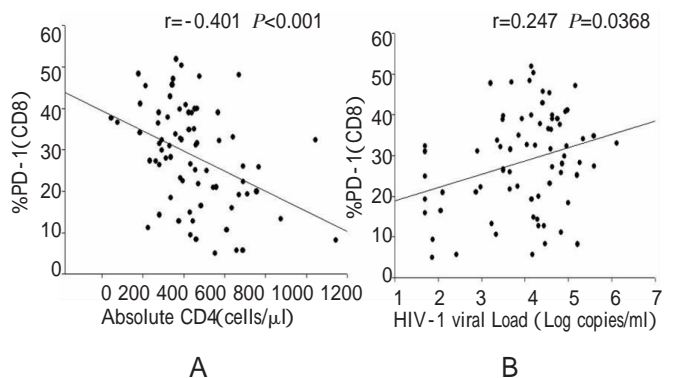


图 1 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平与 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数(A)和病毒载量的相关性(B)

Figure 1 Association between PD-1 expression level on CD8<sup>+</sup>T cells and CD4<sup>+</sup>T cell count and viral load of HIV-1 infected individuals

2.3 不同 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数组 HIV 感染者的 PD-1 表达水平 按 CD4<sup>+</sup>T 细胞小于 200 细胞 / $\mu$ l (5 例)、大于或等于 200 而小于 350 细胞 / $\mu$ l (19 例)、大于或等于 350 而小于 500 细胞 / $\mu$ l (27 例)及大于或等于 500 细胞 / $\mu$ l (21 例)将感染者分为四组 ;各组 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数均值分别为 178.96、292.00、432.00 和 670.00 细胞 / $\mu$ l ; 各组 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达的中位数分别为 37.60%、32.40%、30.96%和 20.92% 结果表明随着 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数的升高 ,CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达呈下降趋势。统计学分析显示 CD4<200 细胞 / $\mu$ l 组与 CD4 $\geq$ 500 细胞 / $\mu$ l 组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平有显著性差异( $P=0.002$ )(表 2)。

表 2 不同 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数组 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平

Table 2 PD-1 expression level on CD8<sup>+</sup>T cells in HIV-1 infectors with different CD4<sup>+</sup>T lymphocytes

组别 Group	CD4(cells/ $\mu$ l)	%PD-1/CD8
CD4<200	178.96	37.60%*
200 $\leq$ CD4<350	292.00	32.40%
350 $\leq$ CD4<500	432.00	30.96%
500 $\leq$ CD4	670.00	20.92%*

注 :“\*” 表示两组间 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平有统计学差异 ( $P=0.002$ )。

Note: \* indicating that there is significant differences in expression levels of PD-1 on CD8<sup>+</sup>T cell surface between the two groups( $P=0.002$ ).

2.4 不同疾病进展阶段 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平的比较 根据 HIV 感染者 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数、血浆病毒载量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  $n=12$ ) ,慢性感染者中 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数大于 500 细胞 / $\mu$ l 且血浆病毒载量小于 2000 拷贝 /ml 为 HIV 感染长期不进展组 (Long-term nonprogressors LTNP  $n=12$ ) ,慢性感染者中 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数小于 200 细胞 / $\mu$ l 者为艾滋病组 (AIDS  $n=5$ ) ,其余为 HIV 感染慢性进展组 (Chronic progressors  $n=43$ )。正常对照组、新发感染组、长期不进展组、HIV 感染慢性进展组和艾滋病组的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数的中位数分别为 694.00、387.50、556.00、410.10 和 179.00 细胞 / $\mu$ l ; CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞表面 PD-1 表达的百分比的中位数分别为 18.45%、39.34%、17.84%、28.19%和 37.60%。统计学分析显示 :与正常对照组相比 ,新发感染组和艾滋病组 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达水平最高( $P$  值均小于 0.001) ,慢性进展组的 PD-1 表达水平也较正常对照组显著升高( $P=0.003$ ) ,长期不进展组的 PD-1

的表达水平与正常对照组无统计学差异(图 2)。

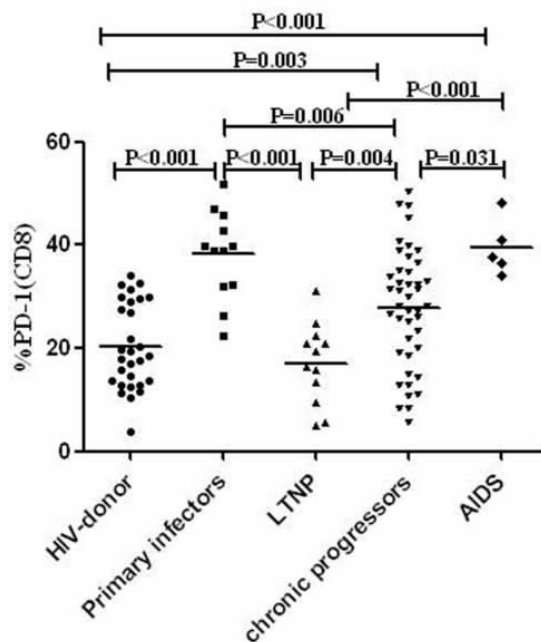


图 2 不同疾病进展人群 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平的比较

Figure 2 Comparison of PD-1 expression on CD8<sup>+</sup>T cells in HIV-1 infected individuals with different disease status

### 3 讨论

免疫应答中未致敏 T 细胞的激活依赖于双重信号 ,其中抗原特异性 T 细胞受体(TCR)识别 MHC 分子结合的抗原肽(pMHC) ,通过 TCR/CD3 复合体传递抗原识别信号 ,而以 CD28 为主的 T 细胞表面受体分子识别相应配体 B7 ,传递协同刺激信号<sup>[8]</sup>。目前已发现 T 细胞表面的多个共刺激分子 ,如 B7 分子家族 (CD80 ,CD86 ,PD-1 ,ICOS ,CTLA-4)及肿瘤坏死因子家族(OX40 ,CD30 ,4-1BB ,Fas ,CD27 ,CD40)等 ,这些协同刺激因子适时适量的激活对维持机体免疫应答调节的平衡至关重要<sup>[9 ,10]</sup>。PD-1 分子是近期发现的 T 细胞表面协同刺激分子 ,属于 CD28/CTLA-4 免疫球蛋白超家族的免疫抑制性受体 ,与配体 PD-L 结合并传递抑制性的协同刺激信号。PD-1/PD-L 信号通路的免疫调节作用最初是在自身免疫性疾病及过敏性疾病的研究中发现的 ,近几年来研究表明该通路的活化在慢性病毒感染过程中 T 细胞功能衰竭方面也有重要作用<sup>[11 ,12]</sup>。

PD-1 在 CD8<sup>+</sup>T 细胞上的表达是连续的 ,阴性、低表达、高表达的细胞亚群难以准确分开 ,本研究用同型对照抗体来界定阴阳性细胞群并扣除非特异性结合。研究结果表明 HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1

表达水平明显高于健康对照,在 HIV 不同疾病进展阶段 PD-1 的表达水平出现两个峰值。新发感染者和艾滋病患者 PD-1 表达水平显著升高,长期不进展者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达与健康对照差异无统计学意义。该结果提示 HIV 感染早期即刺激机体 T 细胞增强表达 PD-1,长期慢性的 HIV 抗原的刺激使机体免疫系统紊乱,艾滋期患者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的上调出现又一个高峰,这可能是机体免疫反馈系统和 HIV 抗原长期刺激相互作用的结果。HIV 感染者 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平与 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数负相关,与血浆病毒载量正相关,提示 PD-1 表达水平可作为评价 HIV 疾病进展的参考指标。根据 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数分组后的结果表明随着 CD4<sup>+</sup>T 细胞数量的升高,CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 的表达呈下降趋势。HIV 感染 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 PD-1 表达水平的变化特点对于认识疾病过程中关键转折点具有重要意义。

HIV 感染导致 PD-1 表达上调的确切机制尚不明确,Muthumani 等研究发现 HIV 附属蛋白 Nef 通过依赖 P38(Mitogen-Activated Protein Kinase MAPK) 机制引起 PD-1 的表达上调,这与 Nef 蛋白在 HIV 感染慢性化过程中发挥作用一致<sup>[13]</sup>。HIV 病毒的持续复制导致的 Nef 蛋白高水平表达可能是感染 HIV 后 T 细胞表面 PD-1 表达上调的机制之一,也是造成 HIV 病毒感染细胞免疫应答功能损伤的重要原因。HIV 感染中 PD-1 增强表达的细胞往往表现为分泌细胞因子能力以及细胞增殖能力的降低<sup>[14,15]</sup>。目前对 PD-1/PD-L 这一信号通路在 HIV 感染免疫应答中发挥作用的机制尚缺乏确切认识,进一步探讨 PD-1 在免疫调节中的作用机制可更深入了解这一免疫抑制性共刺激分子,并为 HIV 治疗提供新的靶点<sup>[16]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Benito JM, Lopez M, Soriano V. The role of CD8<sup>+</sup>T-cell response in HIV infection[J]. *AIDS Rev* 2004, 6(2): 79-88.
- [2] Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup>T cells [J]. *Blood*, 2006, 107(12): 4781-4789.
- [3] Gulzar N, Copeland KF. CD8<sup>+</sup>T-cells function and response to HIV infection[J]. *Curr HIV Res* 2004, 2(1): 23-37.
- [4] Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, et al. Molecular signature of CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion during chronic viral infection[J]. *Immunity* 2007, 27(4): 670-684.
- [5] Chen J, Wang XM, Wu XJ, et al. Intrahepatic levels of PD-1/PD-L correlate with liver inflammation in chronic hepatitis B[J]. *Inflamm Res* 2011, 60(1): 47-53.
- [6] Porichis F, Kaufmann DE. Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy[J]. *Curr HIV/AIDS Rep* 2012, 9(1): 81-90.
- [7] Zhang JY, Zhang Z, Wang X, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8<sup>+</sup>T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4671-4678.
- [8] Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, et al. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals [J]. *EMBO J*, 2006, 25(11): 2623-2633.
- [9] Lombardi V, Singh AK, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol* 2010, 151(3): 179-189.
- [10] Wang S, Bajorath J, Flies DB, et al. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction [J]. *J Exp Med* 2003, 197(9): 1083-1091.
- [11] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection[J]. *Nat Immunol* 2009, 10(1): 29-37.
- [12] Aubert RD, Kamphorst AO, Sarkar S, et al. Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(52): 21182-21187.
- [13] Muthumani K, Choo AY, Shedlock DJ, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces programmed death 1 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism[J]. *J Virol* 2008, 82(23): 11536-11544.
- [14] Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup>T cells leads to reversible immune dysfunction[J]. *Nat Med* 2006, 12(10): 1198-1202.
- [15] Youngblood B, Wherry EJ, Ahmed R. Acquired transcriptional programming in functional and exhausted virus-specific CD8<sup>+</sup>T cells[J]. *Curr Opin HIV AIDS* 2012, 7(1): 50-57.
- [16] Eichbaum Q. PD-1 signaling in HIV and chronic viral infection: potential for therapeutic intervention[J]. *Curr Med Chem* 2011, 18(26): 3971-3980.

收稿日期 2012-05-31 编辑 吴中菲