

体内 CD8⁺ T 细胞剔除对无症状期 SHIV 感染猴的影响

王卫¹, 丛喆¹, 刘浩¹, 陶真¹, 刘强¹, 魏强¹, 陈志伟², 秦川¹

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021; 2. 香港大学李嘉诚医学院艾滋病研究所, 香港 999077)

【摘要】 目的 CD8⁺ T 细胞在一些病毒感染疾病的免疫反应中起着重要的作用, 但 CD8⁺ T 细胞在 HIV 无症状期的作用尚不明确, 本研究通过体内 CD8⁺ T 细胞剔除, 研究 CD8⁺ T 细胞对 SHIV 感染猴的影响, 进一步了解艾滋病的发病机制。方法 选择 8 只 SHIV 病毒感染的恒河猴, 均处于无症状期, 随机分成两组, 实验组 4 只恒河猴在 0、3、7 d 注射抗 CD8⁺ T 抗体 cM-T807, 不同的时间取外周血、腹股沟淋巴结。流式细胞术测定恒河猴外周血和淋巴结中 CD8⁺ T 细胞数目, Real-time RT-PCR 法测定实验猴血浆病毒载量, 并使用 IFN- γ Elispot 方法测定其对猴细胞免疫的影响。结果 CD8⁺ T 细胞敲除后 4 只猴的病毒载量都转阳, 但反应性不一, HIV-1 的靶细胞 CD4⁺ T 细胞有轻微下降, 后反弹, 与病毒载量无相关性; CD8 敲除猴的感染情况 (血浆病毒载量和 CD4 细胞) 比 SHIV 病毒急性感染轻, 这与 ELISPOT 结果一致。结论 CD8⁺ T 细胞在 HIV 无症状期发挥重要的作用, 但其作用具有个体差别。

【关键词】 SHIV; 恒河猴; CD8⁺ T 细胞; 模型; 动物; 无症状期

【中图分类号】 R373; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.001

Effect of CD8⁺ T Cell Depletion in Vivo on Monkeys with Chronic SHIV-KB9 Infection

WANG Wei¹, CONG Zhe¹, LIU Hao¹, TAO Zhen¹, LIU Qiang¹, WEI Qiang¹, CHEN Zhi-wei², QIN Chuan¹

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China; 2. AIDS Institute, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

【Abstract】 Objective CD8⁺ T cells play an important role in some viral diseases, but the role of CD8⁺ T cells is not yet fully clear in the asymptomatic phase of HIV infection. The aim of this study was to elucidate the impact of CD8⁺ T cell in SHIV-infected monkeys with in vivo CD8⁺ T cells depletion, and to further understand the pathogenesis of AIDS. **Methods** Eight SHIV-infected rhesus monkeys in the asymptomatic phase were selected and randomly divided into two groups. Anti-CD8⁺ T antibody cM-T807 were injected intravenously into four monkeys on days 0, 3, and 7. Then the CD8⁺ T cell number in peripheral blood and lymph nodes in the monkeys were detected by flow cytometry, the plasma viral

【基金项目】 科技重大专项 - 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治 (2009ZX10004-402, 008ZX10001-002), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (DWS 201009)。

【作者简介】 王卫 (1981 -) 男, 助理研究员, 从事实验动物病毒免疫学研究工作。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病理学。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

load by real-time RT-PCR, and the cellular immunity by IFN- γ Elispot assay. **Results** The viral load of the four monkeys was elevated to above of detected after the CD8⁺ T cell depletion, but the reactions were not uniform. CD4⁺ T cells, the HIV-1 target cells, rebound and dropped slightly. The infection of monkeys with CD8⁺ T cell depletion was lighter than that after the SHIV virus first infection (plasma viral load and CD4 cells), which was consistent with the Elispot results. **Conclusions** CD8⁺ T cells play an important role in the asymptomatic phase of HIV-1 infection, but with some inter-individual variation.

【Key words】 SHIV, infection; Rhesus monkey; CD8⁺ T cell; Model, animal; Asymptomatic phase

CD8⁺ T 细胞在一些病毒性感染疾病的免疫反应中起着重要的作用,尤其在研究 HIV、SIV 等病毒发病机理中,发现与病毒复制水平有密切相关^[1,2]。近期的研究表明:HIV/SIV 特异的 CD8⁺ T 细胞在整个 HIV-1 感染期间扮演重要作用^[3,4]。测定 CD8⁺ T 细胞的作用,了解其功能有助于阐明体内 CD8⁺ T 细胞与感染病毒的复制、致病机制的相互作用^[5]。研究 CD8⁺ T 细胞在艾滋病无症状期的作用,确定 CD8⁺ T 细胞对病毒复制的压制作用,了解 CD8⁺ T 细胞敲除对 HIV-1 靶细胞数量的影响,研究该疾病过程与病毒急性感染的异同,分析细胞免疫、体液免疫的反应情况,将进一步了解艾滋病无症状期的致病机理,对艾滋病研究有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:恒河猴 4 只,由北京协尔鑫生物资源研究所提供 [SCXK (京) 2005-2005], 用商品化膨化饲料饲养。体重 3 ~ 5 kg。实验前经体检无异常,经血清学间接免疫荧光抗体检查法 (IFA) 检查排除猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猴逆转录 D 型病毒 (SRV-1, 2, 5) 和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒 (STLV-1) 的感染。所有动物实验在 ABSL-3 实验室中进行。

1.1.2 毒株:pSHIV-KB9 5'和 pSHIV-KB9 3'由 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program 提供,连接后转染 T293 细胞得到 SHIV-KB9 病毒,经 PCR 鉴定和细胞滴定。

1.1.3 抗体及试剂:抗 CD8⁺ T 抗体 cM-T807,由 NIH Nonhuman Primate Reagent Resource 提供。抗体 CD8-FITC (克隆号:DK25) 购自 Dako 公司,CD3-PE (克隆号:SP34)、CD4-PerCP (克隆号:L200) 购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组:恒河猴 8 只,随机分成 2 组,每组 4 只。实验组动物分别在 0 d 经皮下 (后颈背部) 和

3、7 d 静脉 (后肢静脉) 注射 cM-T807 抗体。第 1 次剂量 10 mg/kg,第 2、3 次剂量 5 mg/kg。分别在 0、7、14、21、28、42 d 采集外周血 5 mL (EDTA 抗凝),同时活检取腹股沟淋巴结 0.5 mg。另外 4 只注射 0.85% 生理盐水作为对照。

1.2.2 临床观察:抗体接种后,每天观察动物临床症状,如摄食量变化、活动情况、精神状态等。

1.2.3 CD8⁺ T 细胞绝对数的测定:

1.2.3.1 外周血淋巴细胞悬液的制备:取 50 μ L 的 EDTA 抗凝血加到 12 \times 75 mm Falcon 管中,标记抗 CD3、CD4、CD8 抗体,在室温避光作用 15 min 后,加入终浓度 10% 的溶血素,在 4 $^{\circ}$ C 下作用 10 min。后用 pH 7.2 PBS 洗 2 次,悬浮于 500 μ L 的 pH 7.2 PBS 中,48 h 内上机在 BD Calibur FACS 仪上分类计数。

1.2.3.2 淋巴结组织细胞悬液的制备:取体积约为 (1 \times 1 \times 1) mm 的新鲜淋巴结组织,将其置于盛有 0.5 mL 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基的小平皿的 200 目尼龙纱网上,去除包膜,剪碎。以网搓法轻搓组织块,再加入 0.5 mL 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基冲洗。收集细胞悬液,于 200 目尼龙纱网过滤。用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基洗 1 次,0.4% 台盼蓝染液染色计数细胞。调整细胞浓度至 10⁶/mL。标记抗 CD3、CD4、CD8 抗体,在室温避光作用 15 min。用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基洗 2 次,悬浮于 500 μ L 的 2% 多聚甲醛 PBS 中,48 h 内上机在 BD Calibur FACS 仪上分类计数。

1.2.4 病毒载量的检测:Trizol 法提取血浆中病毒 RNA,Quantitect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, 204243) Roche LightCycler 荧光定量仪测定血浆病毒 RNA 载量,该方法灵敏性为 10³ copies/mL^[6]。

1.2.5 CD4⁺ T 细胞绝对数检测:根据流式细胞仪测定的 CD4⁺/CD8⁺ 比值、血常规结果,计算出 CD4⁺ T 细胞绝对数^[7]。

1.2.6 细胞免疫反应:用 Monkey IFN- γ ELISPOT Kit (U-Cytech, CT126-PR20) 检测针对 SIV 肽库的

IFN- γ 分泌性 ELISPOT 反应,肽库为 NIH 提供的 SIVmac239 肽库, Gag (Item # 6204)、Env (Item # 6883)、Pol (Item # 6443), 反应终浓度为 1.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[8]。

2 结果

2.1 临床表现

cM-T807 抗体注射后,实验组动物出现不同程度的消瘦、腹泻等急性感染症状,其中 RH039 症状较轻微,RH029 症状较重,持续至实验开始后 35 d,濒死解剖。对照组动物未见明显异常。

2.2 外周血 CD8⁺ T 细胞数目变化

在注射抗体后,实验组动物的外周血 CD8⁺ T 细胞数目下降迅速,注射后第 4 天到第 21 天外周血一直维持在 0~2 个/ μL ,之后有轻微上升,到第 49 天实验结束未回升到初始水平;对照组动物则未见明显特异性变化(图 1)。

2.3 淋巴结 CD8⁺ T 细胞百分比

在明确外周血 CD8⁺ T 细胞后,还测定了淋巴结 CD8⁺ T 细胞百分比。结果表明,在抗体注射后 21 d,cM-T807 实验组 CD8⁺ T 细胞百分比的均值为 4.925%,对照组为 23.9%;到抗体效果回复的第 49 天,cM-T807 实验组 CD8⁺ T 细胞百分比上升到 21.225%,对照组为较接近的 24.4%(图 2)。

2.4 CD4⁺ T 细胞绝对数和血浆病毒载量

在抗体注射后,监测实验动物的血浆病毒载量和 CD4⁺ T 细胞绝对数,发现实验组的血浆病毒载量从开始在检测灵敏线以下上升到 $10^4 \sim 10^6 \text{copies}/$

mL,其中 RH002 和 RH029 的水平最高,都在 $10^6 \text{copies}/\text{mL}$ 以上,RH031 和 RH039 较低,尤其是 RH039,仅在第 10 天检出过一次载量。在整个实验过程中,对照组动物的血浆病毒载量位于检测灵敏线以下(图 3)。

在抗体注射后,实验组动物的 CD4⁺ T 细胞绝对数有轻微的下降,之后回升,而且回升幅度较大,比初始水平高;但 RH029 动物的 CD4⁺ T 细胞绝对数一直维持在一个较低的水平,对照组动物未见明显变化。

2.5 CD8⁺ T 细胞去除与 SHIV 首次感染对比

在 CD8⁺ T 细胞剔除后,免疫压力降低,病毒大量复制,与病毒首次感染类似。进行两者比较,能更好的分析 CD8⁺ T 细胞剔除的意义。结果表明,从平均值来看,CD8⁺ T 细胞剔除后的病毒复制比首次感染低,首次感染都位于 $10^6 \sim 10^8 \text{copies}/\text{mL}$ 之间,而且首次感染病毒复制维持时间较长,在感染后 49 d 仍能检测出病毒;同时,CD4⁺ T 细胞数量有较为严重的下降,尤其以 RH019 严重(图 4)。

2.6 IFN- γ ELISPOT 结果

之后,我们分析了实验猴的细胞免疫,第 3 周的 IFN- γ ELISPOT 结果显示,RH039 的细胞免疫最强,达到 2300 SFC/ 10^6 PBMC,RH029 的细胞免疫最低,RH002 和 RH031 在两者之间,其中与 GAG2 和 GAG1 刺激的斑点为主;与第 6 周的 IFN- γ ELISPOT 结果比较,发现 RH002 和 RH031 有一定程度的上升,而 RH029 更低了,其中 gag2 刺激的斑点显著增加(图 5)。

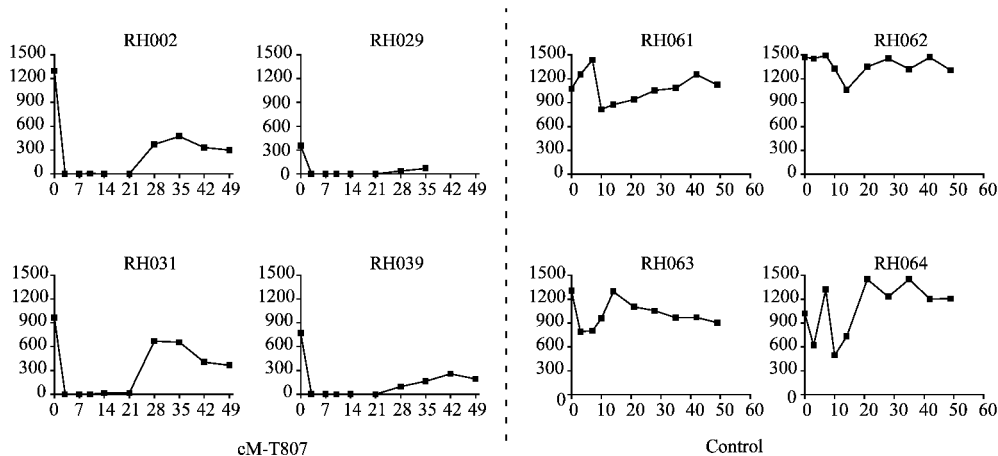


图 1 外周血 CD8⁺ T 细胞数目变化

Fig. 1 The number of CD8⁺ T cells in peripheral blood

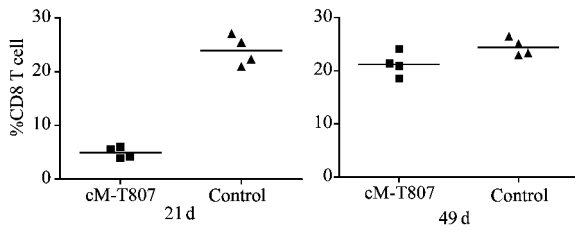


图 2 外周淋巴结 CD8⁺ T 细胞数目

Fig. 2 The number of CD8⁺ T cells in lymph nodes

3 讨论

艾滋病是严重威胁人类健康的传染性疾病之一^[9]。HIV-1 感染的自然史分为急性感染期、无症状期和艾滋病期^[10]。根据无症状期的长短,又可以把 HIV-1 感染者分为快速进展者、长期存活者和典型进展者。研究表明: HIV-1 感染者无症状期的状

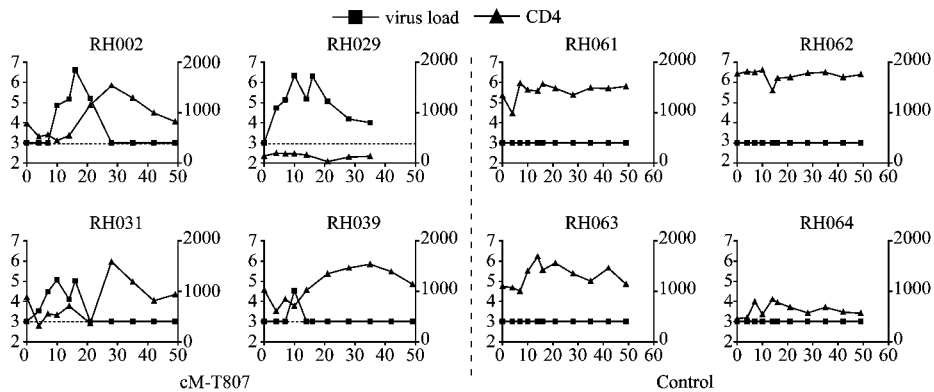


图 3 实验组和对照组动物 CD4⁺ T 细胞绝对数和血浆病毒载量结果

Fig. 3 The absolute number of CD4⁺ T cells and plasma viral load of the experimental and control groups

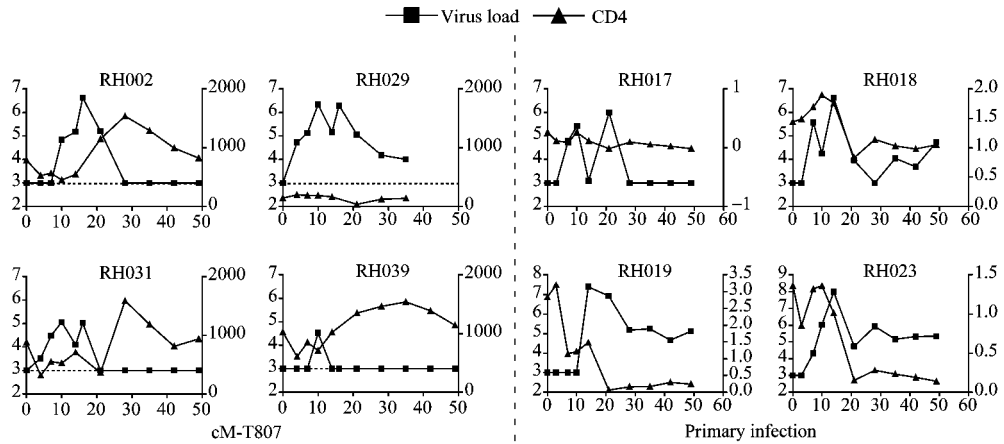


图 4 CD8⁺ T 细胞去除与 SHIV 首次感染动物 CD4⁺ T 细胞绝对数和血浆病毒载量结果

Fig. 4 The absolute number of CD4⁺ T cells and plasma viral load of experimental animals after CD8⁺ T

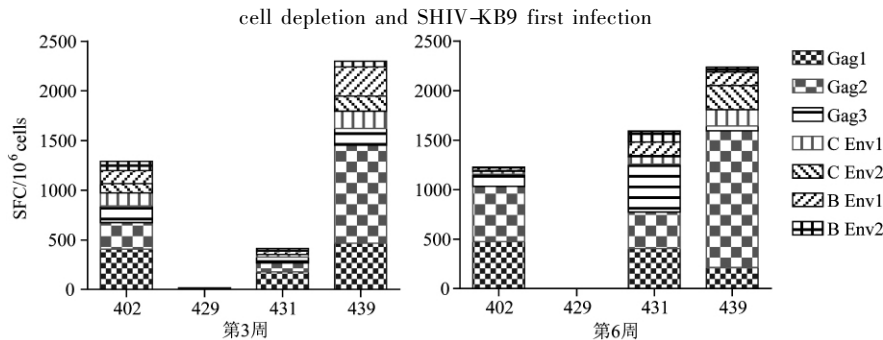


图 5 实验组动物注射抗体后第 3 周和第 6 周的 IFN- γ ELISPOT 结果

Fig. 5 The results of IFN- γ Elispot of experimental animals at 3 weeks and 6 weeks after CD8⁺ T cell depletion

况决定了病程的进展。CD8⁺ T 细胞在一些病毒性感染疾病的免疫反应中起着重要的作用,尤其在研究 HIV、SIV 等病毒发病机理中,发现与病毒复制水平有密切相关^[1,2]。测定 CD8⁺ T 细胞的作用,了解其功能有助于阐明体内 CD8⁺ T 细胞与感染病毒的复制、致病机制的相互作用^[5]。近期的研究表明:HIV/SIV 特异的 CD8⁺ T 细胞在整个 HIV-1 感染期间扮演重要作用^[3,4]。在本研究中,使用 SHIV 恒河猴动物模型,通过体内 CD8 细胞的剔除,研究 CD8 细胞对艾滋病的影响;这对了解艾滋病发病机制,进行艾滋病疫苗研发具有现实意义。

Schmitz JE 等^[11,12]人使用鼠 M-T807 杂交瘤分离出来的重链轻链可变区基因分别连接到人 γ 1 重链和 κ 轻链基因,连接表达质粒,并传染到 SP2/0-AG14 细胞,得到人鼠杂合单克隆抗体,命名为 cM-T807。并用于印度恒河猴,取得较好的 CD8 细胞剔除效果。乔红伟等^[13]通过 cM-T807 抗体注射中国恒河猴建立中国恒河猴 CD8⁺ T 细胞缺失模型。本实验中,通过类似方法注射剔除实验猴体内 CD8 细胞,结果成功敲除 4 只实验猴的 CD8 细胞,包括外周血和淋巴结,其效果好于印度恒河猴。

CD8⁺ T 细胞敲除后 4 只实验猴的病毒载量都阳转,说明在艾滋病无症状期细胞免疫具有一定保护作用,但反应性不一,有的峰值较高,如 402、429,有的复制水平较低,如 431 和 439,说明在艾滋病无症状期,CD8 细胞参与抑制病毒的复制,但不是唯一的抑制因素。这与 ELISPOT 结果一致,说明 SHIV 特异细胞免疫在艾滋病无症状期具有重要的保护作用。429 的细胞免疫缺乏,是其发病死亡的原因之一。

CD8⁺ T 细胞敲除后,HIV-1 的靶细胞-CD4⁺ T 细胞有轻微下降,后反弹,与病毒载量具有相关性,这与说明 CD4 细胞损失主要是因为自身免疫损伤,与病毒复制杀伤关系不大;另一方面,CD4 细胞损失后反弹说明猴体本身存在反馈机制,并能不断的补充新生的 CD4 细胞,证明其免疫再生系统还未衰减,而 CD4 细胞损失后不反弹或反弹较轻微,如 429,可能是由于其免疫再生系统已经衰竭,不能产生新的 CD4 T 细胞。

CD8⁺ T 细胞剔除后,病毒大量复制,刺激免疫系统产生压制作用,相当于进行了一次病毒感染。我们把这次的实验数据与之前相同病毒首次感染 4 只中国恒河猴的结果进行比较,结果表明,CD8 敲除猴的感染情况(血浆病毒载量和 CD4 细胞)比

SHIV 病毒急性感染轻,说明特异性体液免疫在免疫压制病毒复制中具有一定意义。经过 CD8 敲除,病毒大量复制,相当于进行了一次感染,其 GAG2 对应的细胞免疫增强,说明这段抗原能有效诱导细胞免疫,其在疫苗设计中具有一定意义。

参考文献:

- [1] Schaubert KL, Price DA, Salkowitz JR, et al. Generation of robust CD8(+) T cell responses against subdominant epitopes in conserved regions of HIV-1 by repertoire mining with mimotopes [J]. Eur J Immunol. 2010, 40(7): 1950-1962.
- [2] Meyer-Olson D, Simons BC, Conrad JA, et al. Clonal expansion and TCR-independent differentiation shape the HIV-specific CD8+ effector-memory T-cell repertoire in vivo [J]. Blood. 2010, 116(3): 396-405.
- [3] Walker BD, Burton DR. Toward an AIDS vaccine [J]. Science. 2008, 320(5877): 760-764.
- [4] Allen TM, Altfield M. Crippling HIV one mutation at a time [J]. J Exp Med. 2008, 205(5): 1003-1007.
- [5] Friberg H, Burns L, Woda M, et al. Memory CD8(+) T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive [J]. Immunol Cell Biol. 2010, Epub ahead of print.
- [6] 丛喆,李兆忠,魏强,等. SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒 RNA 拷贝数方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 271-275.
- [7] 王卫,刘强,许琰,等. SHIV-KB9 感染中国恒河猴的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(2): 67-71.
- [8] 王卫,冯育芳,许琰,等. ELISPOT 方法检测 SIVmac239 感染猴特异性细胞免疫水平 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 39-43.
- [9] Gupta RK, Towers GJ. A tail of Tetherin: how pandemic HIV-1 conquered the world [J]. Cell Host Microbe. 2009, 6(5): 393-395.
- [10] Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, et al. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys [J]. Nat Med. 2006, 12(3): 289-295.
- [11] Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes [J]. Science. 1999, 283(5403): 857-860.
- [12] Schmitz JE, Simon MA, Kuroda MJ, et al. A nonhuman primate model for the selective elimination of CD8+ lymphocytes using a mouse-human chimeric monoclonal antibody [J]. Am J Pathol. 1999, 154(6): 1923-1932.
- [13] 乔红伟,佟巍,朱华,等. 中国恒河猴 CD8⁺ T 细胞缺失模型制备 [J]. 中国比较医学杂志. 2007, 17(6): 321-324.

(修回日期)2010-10-11