

SIVmac239 感染恒河猴急性期回肠派氏 淋巴结中淋巴细胞亚群的变化

刘克剑, 丛 喆, 吴芳新, 王 卫, 熊 竞, 魏 强, 秦 川

(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)

【摘要】 目的 分析 SIVmac239 感染早期中国恒河猴回肠派氏淋巴结淋巴细胞数量及亚群的变化, 探讨这些变化与疾病进展的可能关系。**方法** 以静脉注射 SIVmac239 制备恒河猴 AIDS 模型, 对回肠派氏淋巴结进行 CD4 和 CD8 免疫组化标记, 分离 Peyer's 集合淋巴结淋巴细胞, 分别标记 CD3、CD4、CD8、CD28、CD95 单克隆抗体, 以流式细胞仪检测 T 细胞及其亚群的表达情况。**结果** SIVmac239 感染急性期中国恒河猴 Peyer 淋巴结中 CD4 + /CD8 + 比值持续下降, 记忆性细胞比例升高, 但 Peyer 淋巴结形态及 CD4 + T 细胞数量未见明显变化, CD8 + T 细胞从第 5 天开始持续升高。**结论** SIVmac239 感染急性期, 中国恒河猴回肠派氏淋巴结形态及 CD4 + T 细胞数量基本维持, 向记忆性细胞的转化增加, 但是 CD4 + /CD8 + 比值下降。

【关键词】 AIDS; 派氏淋巴结; T 淋巴细胞; 恒河猴

【中图分类号】 R373.33 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0025-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.007

The Changes of Lymphocytes from Ileum Payers Pacht from Rhesus Monkeys at the Earliest Period with SIVmac239 Infection

LIU Ke-jian, CONG Zhe, WU Fang-xin, WANG Wei, XIONG Jing, WEI Qiang, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical

Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human

Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To analyze the changes of lymphocytes from ileum Payers pacht from Chinese rhesus monkeys at acute period with SIVmac239 infection. **Methods** 9 rhesus monkeys were used and 5 were infected with SIVmac239 via intravenous injection. The tissues or lymphocytes from ileum Payers pacht lymph nodes from rhesus monkeys at acute period were collected and analyzed with CD4 +, CD8 immunohistochemistry and flow cytometry T-cell subsets labeling with CD3, CD4, CD8, CD28, CD95 monoclonal antibodies respectively. **Results** Obviously declined CD4 + /CD8 + ratio and increased memory cells (CD4 + & CD8 +) ratio and CD8 + T cells were detected in Payers lymph nodes, but CD4 counts had no significant change in Payers lymph nodes. **Conclusion** Declined CD4 + /CD8 + ratio and increased memory cells (CD4 + & CD8 +) ratio were found in Payers lymph nodes from rhesus macaques at acute period with SIVmac239 infection, however, the meaning and possible affection to disease need further study.

【基金项目】“十二五”国家科技重大专项课题(2012ZX10004-501); 协和青年基金(SIV 感染早期粘膜屏障结构的改变)。

【作者简介】刘克剑, 男, 博士生, 从事实验动物病毒学研究工作。

【通讯作者】秦川, 教授, 博士生导师, 研究方向: 重大传染病发病机制。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

魏强, 教授, 博士生导师, 研究方向: 艾滋病模型及应用。E-mail: weiqiang@nilas.pumc.edu.cn。

【Key words】 AIDS; Peyer's Patch; T cell; Rhesus monkeys

在我们长期进行的灵长类艾滋病动物模型研究中发现,不同动物疾病进程表现不十分一致,除了个体遗传差异等因素影响,也可能与病毒早期和机体相互作用相关,因此,了解肠道粘膜组织在 AIDS 发病过程中的重要作用对疾病的发生、发展至关重要。

肠道粘膜组织的免疫系统主要由两部分构成,分别是免疫诱导部位,主要是有结构的淋巴组织,如派氏淋巴结(Peyer's patch, PP)和免疫效应部位,主要是分布在粘膜固有层中弥散的淋巴组织。目前 AIDS 研究中关于粘膜部分主要集中在固有层,而派氏淋巴结的资料相对较少,缺乏系统性研究。据文献推测艾滋病病毒的宿主侵入、早期控制、疾病转归等与 PP 直接相关。基于此,本文对 SIVmac239 感染早期的中国恒河猴回肠肠道 PP 中免疫细胞数量及分群的变化做初步研究,分析可能的对疾病进程的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物与模型制备

健康恒河猴 9 只,购自北京协尔鑫生物资源研究所(合格证编号:SCXK(京)2005-2005),实验前体重为 3~5 kg,动物实验在本所 P3 实验室进行[SYXK(京)2009-0003];实验动物经 IFA 法检查排除猴免疫缺陷病毒(SIV)、猴逆转录 D 型病毒(SRV-1)和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒(STLV-1)的感染。其中猴 489、3-2、3-3、3-4、3-5 静脉感染 1000 TCID₅₀ 1 mL SIVmac239,其余 4 只作为正常对照,定期采样,测定血浆病毒载量及细胞变化。

1.2 样品采集

1.2.1 外周血 分别于感染前及感染后第 0, 7, 14, 28 天采集实验猴 EDTA 抗凝血,测定血浆病毒载量、血常规及流式检测^[1]。

1.2.2 肠道组织采集及病理制片 分别于第 0, 1, 3, 5, 7, 14 天剖腹手术截取 10 cm 回肠肠段(0 d 取 4 只动物,其余时间点一只),分离 PP 淋巴细胞,其余经 4% 中性甲醛固定 24 h,修块,4% 福尔马林再固定 24 h,包埋、切片。

1.2.3 PP 淋巴细胞分离 肠段纵向剖开,解剖镜下用眼科剪剪下派氏淋巴结^[2],置于预冷的含 5% 胎牛血清的 PRMI-1640(R-5)培养基中。剪碎,用冷

的 PBS(不含钙镁离子)冲洗两次。研磨,70 μm 孔径细胞筛过滤(BD, Cat#352350)。4℃ 2000 rpm 离心 10 min,重悬,调整细胞浓度为 1×10^6 cell/mL。

1.3 免疫组化

组织切片用抗 CD4、CD8 抗体进行标记。具体步骤如下:PBS 冲洗,2 min × 3 次。滴加一抗,37℃ 孵育 2 h, PBS 冲洗,2 min × 3 次。滴加试剂 1(中杉金桥, PV-9000), 37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗,2 min × 3 次。滴加试剂 2(中杉金桥, PV-9000), 37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗,2 min × 3 次。DAB 溶液显色。自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片,镜下观察,计数(每个样本取 3 个高倍视野,计算平均值)。

1.4 流式检测

取细胞悬液 100 μL,置于流式管中,标记抗 CD3、CD4、CD8、CD28、CD95 抗体,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 μL 的 pH7.2 PBS 中, BD FACS-CANTO FACS 仪上分类计数。

2 结果

2.1 SIVmac239 感染猴血浆病毒载量结果

血浆病毒载量结果显示,全部攻毒的动物在攻毒后第 7 天可检测出血浆病毒载量,载量峰值位于 1×10^5 到 1×10^7 copies/mL 之间,表明这些动物在实验进行中的 28 d 内被病毒感染并且病毒能进行有效复制。

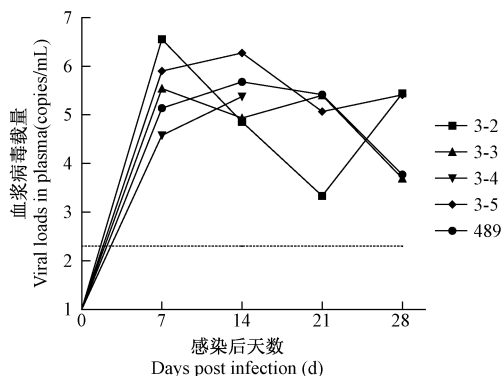


图 1 SIVmac239 感染猴血浆病毒载量结果

Fig. 1 The changes of viral loads in plasma of SIVmac239-inoculated rhesus monkeys

2.2 SIVmac239 感染猴肠道 PP 淋巴结 CD4 + T 淋巴细胞免疫组化结果

0 d 结果显示,健康中国恒河猴派氏淋巴结滤泡

中心发育完好,CD4 + 细胞主要分布于淋巴鞘,在滤泡中心也有零星分布,大小正常,形态完整;感染猴在 SIVmac239 感染后 1, 3, 5 d 派氏淋巴结与正常恒河猴派氏淋巴结一样 T 细胞分布于淋巴鞘,形态完整,CD4 + T 淋巴细胞在局部细胞密度与正常对照组未见明显区别(彩插 5 图 2 A, C)。7, 14 d 派氏淋巴结中心区域淋巴细胞有所增加,CD4 + T 淋巴细胞在局部细胞密度有所增大(彩插 5 图 2 A, C)。CD8 + 细胞主要分布于淋巴鞘,在滤泡中心也有零星分布,大小正常,形态完整;数目随时间增加而增多(彩插 5 图 2 D)。

2.3 SIVmac239 感染猴肠道 PP 淋巴结 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值的变化

在 SIVmac239 感染后,免疫组化计数结果:动物

的 PP CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值减少。由感染前的 0.90 左右降到感染后 5 d 的 0.55, 第 7 天为的 0.39,第 14 天为 0.37 (彩插 5 图 2 A)。流式细胞检测结果:动物的 PP CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值减少。由感染前的 1.00 左右降到感染后 5 d 的 0.25,仅为正常值的 25%, 第 7 天为正常值的 40%,第 14 天仅为正常值的 3% (彩插 5 图 2 B)。

2.4 SIVmac239 感染猴回肠派氏淋巴结中记忆性 T 细胞的变化

恒河猴感染 SIVmac239 早期 PP 淋巴结中 Naive CD4 + T 细胞所占的比例随着时间有所增加,从正常的 27% 升至第 14 天的 85.5%。同时伴随着 T_{CM} 的持续下降,从正常恒河猴的 71.5% 下降至第 5 天的 53.1%,第 14 天时更是降至 9.5%。

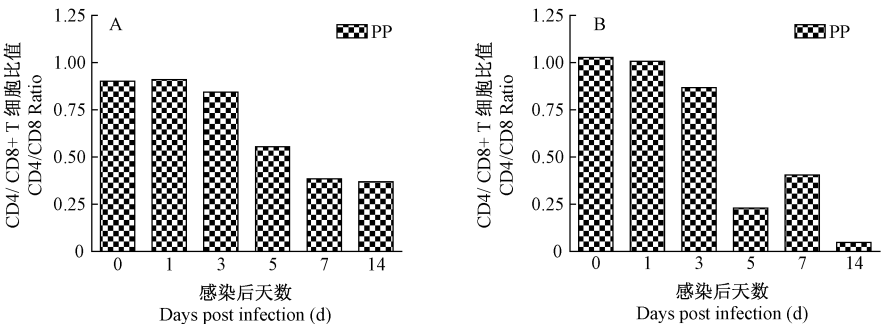


图 3 SIVmac239 感染后急性期不同天数回肠内 PP CD4⁺/CD8⁺ 比值

注:A:CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞免疫组化平均数比值;B:流式细胞检测 CD4/CD8⁺ T 细胞比值

Fig. 3 CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio in PP from SIV infected rhesus monkeys obtained from GI tract

Note: A: CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio with Immunohistochemistry assay; B: CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio with Flow Cytometry Analysis

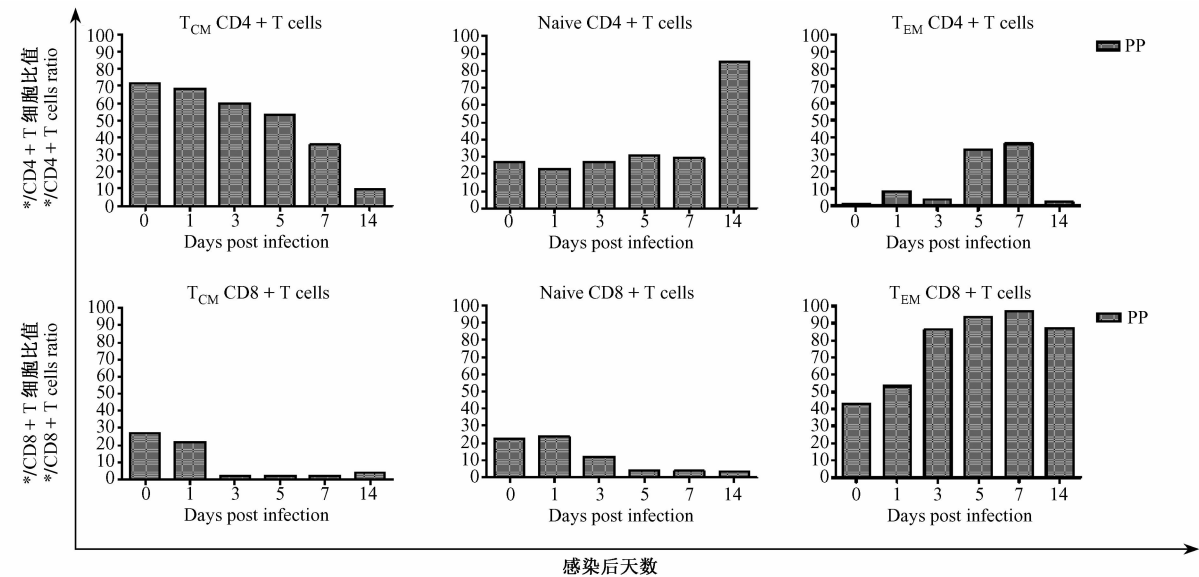


图 4 SIVmac239 感染急性期恒河猴回肠 PP,CD4⁺/CD8⁺ T Naïve 与记忆性 CD4⁺/CD8⁺ T 比例的变化

Fig. 4 The changes of Naïve, Tcm, Tem, CD4⁺/CD8⁺ T cells in PP of Chinese-origin rhesus monkeys infected intravenously with SIVmac239

与此相反,正常猴回肠 PP 淋巴结中 T_{EM} 仅占 1% 左右,感染后略有增加,在 5 d、7 d 达到峰值,约为 30% 到 40%,到第 14 天时则重新下降至 2.3%。

Naive CD8 + T 比例第 3 天下降至正常值 (22.2%) 的一半左右,之后持续下降,一致维持至 14 d 均无明显变化; T_{EM} 与 Naive 情况相似,感染后 3 d 即从正常的 27.3% 降到 2.0%,持续到 14 d; T_{EM} CD8 + T 细胞在 7 d 内比例逐渐升高 (43% - 97%),到 14 d 一直维持在较高水平。

3 讨论

消化道是 HIV 及其相关病毒的侵犯目标,HIV 在消化道粘膜中攻击目标主要是 CD4 + T 淋巴细胞,在整个感染过程中起着重要作用,与外周血液相比,一般认为在感染过程中,粘膜 CD4 + T 淋巴细胞的损耗出现得更早、更剧烈,肠道中最丰富的 CD4 + T 淋巴细胞存在于肠道固有层并且多处于激活状态,所以感染及消耗的细胞也主要在固有层。固有层之外,肠道内的效应部位,PP 由于其结构与功能均与固有层有所不同,所以派氏淋巴结内的 CD4 + T 细胞在感染初期的表型与形态与固有层也是否有所区别,为本文关注内容之一。

PP 是沿小肠纵向分布,位于粘膜下层,肉眼可见的微小的集合淋巴组织^[3]。在一般情况下,PP 集中于小肠末端部分(特别是回肠),PP 由上皮下圆顶区、滤泡区和滤泡旁区组成。T 细胞位于滤泡旁区,主要为 CD4 + T 和 CD8 + T 细胞,表达 T 细胞受体,其中有中心记忆性和初始 T 淋巴细胞^[4,5]。

在免疫反应中,首先,初始 T 细胞进入 PP,成为记忆/效应性 T 细胞后,从 PP 粘膜通过传出淋巴结和外周血移植向效应部位^[6]。HIV 优先感染激活的 CD4 + T 细胞,根据效应部位与诱导部位的差异,在感染早期,粘膜 CD4 + T 细胞的严重损耗,但本文对感染早期 PP 的免疫组化及流式检测表明,PP 中 CD4 + T 细胞的减少及破坏在 SIVmac239 感染的 14 d 内程度是很轻微的,如图 2 所示。虽然流式结果显示在感染早期 PP CD4 + /CD8 + T 淋巴细胞比值有所下降,这提示了在 CD4 + 数目没有明显降低的情况下,CD8 + T 细胞的数目增多,针对 PP CD8 + 细胞的免疫组化结果支持这一推断,如图 3。所以 CD4 + T 细胞的稳定与 CD4 + /CD8 + T 淋巴细胞比值的下降不矛盾。某些研究发现,HIV 感染晚期在派氏淋巴结中有与其他淋巴组织类似的 T

细胞变化,主要是 CD4 + T 细胞数目的减少。结合感染初期 PP 中 CD4 + T 淋巴细胞相对完好的状况,如果能有效减缓 PP 中 CD4 + T 细胞的损耗将有助于延缓 AIDS 的进程。

HIV-1 感染后的 T 细胞免疫应答在感染早期,至少在感染之后的 10 d 内,机体外周血中检测不到明显的 T 细胞应答,病毒在这段时间内大量扩增,在不同的靶细胞中潜伏,为病毒的长期持续性感染奠定了基础。感染 10 d 后(2~3 周),随着病毒的进一步扩增,产生大量的 T 细胞免疫反应,病毒载量随着 CD8 + T 细胞免疫反应的出现与升高开始下降,并逐步到达一个稳定点(set point)。与此相似,来自恒河猴外周血的数据也表明,针对 SIV 的外周血特异性 T 细胞应答主要发生于感染 14 天以后^[7]。但在 SIVmac239 感染早期的恒河猴回肠 PP 中,7 d 之内既能检测到活跃的细胞免疫应答,表现为效应记忆性 CD4 + T 和 CD8 + T 淋巴细胞比例的逐步升高,说明在感染很早期病毒复制活跃的部分(比如肠道粘膜)已经有活跃的免疫应答,血液检测结果的延迟说明血液可能并不是了解病毒感染早期机体生物事件的有效窗口。目前有关于粘膜的研究,比如对粘膜固有层的研究表明,固有层含有各种表型的 T 细胞,包括大量的 CD4 + T 细胞,在正常的人类及非人灵长类当中,固有层 CD4 + T 细胞与 CD8 + T 细胞的比率与外周血及淋巴结相似,但粘膜中表达 CCR5 的 CD4 + T 细胞比例更大,拥有记忆表型并表达细胞激活的标志物,并且大部分 CD4 + T 细胞也在原位产生细胞因子,提示这些细胞是激活的并最终分化的细胞,也是 HIV/SIV 感染的极好靶标。所以在固有层,感染 3~4 d 后即可检出大量的受感染细胞,并且 SIV 感染猴的粘膜效应位点 CD4 + T 细胞剧烈而迅速的损耗^[3]。作为目前研究 AIDS 最实用的模型,SIV 感染恒河猴肠道组织中早期 T 细胞免疫反应的变化为研究 HIV 感染者疾病的发生发展规律提供了线索。

而同样作为粘膜免疫系统的构成部分,免疫诱导部位的 PP,其 CD4 + T 细胞数目变化与固有层相比却在急性期未见明显变化。而在免疫表型方面,由于 HIV-1 可优先感染 HIV-1 特异性 CD4 + T 细胞,随着病情的进展,HIV-1 特异性 CD4 + T 细胞会逐渐减少乃至完全耗竭。HIV-1 特异性 CD4 + T 细胞的主要功能在于维护 HIV-1 特异性 CD8 + T 细胞的功能上,而不是在直接抗击 HIV-1 中。既往

的研究也表明, CD4 + T 细胞在 CD8 + T 细胞免疫反应的激活, 记忆性 CD8 + T 细胞的维持以及 CD8 + T 细胞的功能成熟等过程中起重要的作用。相应地, HIV-1 感染所导致 CD4 + T 细胞的耗竭, 可导致 HIV 特异性的记忆 CD8 + T 细胞的成熟障碍以及 HIV-1 特异性 CD8 + T 细胞的功能受损^[8-9]。如图 3 所示, 效应记忆性 CD8 + T 细胞在感染 14d 后在 PP 中比例的下降与效应记忆性 CD4 + T 细胞的下降趋势相同, 且效应记忆性 CD4 + T 细胞下降比例更为明显, 从侧面证明, 在感染早期的 PP 效应记忆性 CD4 + T 细胞的丢失可能是导致效应记忆性 CD8 + T 细胞比例下降的原因。

综上所述, 关于 SIV 感染急性期不同时间 PP 淋巴细胞的变化, 目前尚未见相关报道。本研究中正常对照组中国恒河猴 PP 中 CD4/CD8 细胞约等于 1。与正常对照组相比, SIVmac239 感染的中国恒河猴 PP 中 CD4/CD8 + T 细胞比值显著降低, 但同时 PP 中 CD4 + T 细胞的数量及形态几乎没有变化, 而同时期其它研究表明固有层中的 CD4 + 数量急剧下降且大量凋亡及坏死, 说明在感染急性期 PP 中的 CD4 + 可能得到循环血中 T 细胞的补充, 从而维持其形态及功能。因此 PP 中 CD4 + T 细胞数量和功能在感染早期对维持粘膜局部的免疫功能发挥影响。SIVmac239 感染急性期 PP 中 CD4 + T 细胞数量及形态的维持, 以及向记忆性表型的转化提示, PP 在感染早期对补充因感染损失的淋巴细胞起重要作用, 同时, 对病毒及机体相互作用后最终造成不同感染程度可能产生一定影响。

参考文献:

[1] 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(SIV) RNA 拷贝数方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 271 - 275.

- [2] Michael Vajdy, Ronald S. Veazey, Heather K. Knight et al. Differential effects of Simian Immunodeficiency Virus infection on immune inductive and effector sites in the rectal mucosa of rhesus macaques [J]. Am J Pathol, 2000, 2(157): 485 - 495.
- [3] Makala LH, Suzuki N, Nagasawa H. Peyer's patches; organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine [J]. Pathobiology, 2003, 70(2): 55 - 68.
- [4] Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest [J]. Nat Immunol, 2005, 6(5): 430 - 432.
- [5] Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, et al. The gastrointestinal tract as a major site of CD4 + T cell depletion and viral replication in SIV infection [J]. Science, 1998, 280(17): 427 - 431.
- [6] Horton H, Vogel T, O'Connor D, et al. Analysis of the immune response and viral evolution during the acute phase of SIV infection [J]. Vaccine, 2002, 20(15): 1927 - 1932.
- [7] Shacklett BL, Ling B, Veazey RS, et al. Boosting of SIV-specific T cell responses in rhesus macaques that resist repeated intravaginal challenge with SIVmac251 [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002, 18(14): 1081 - 1088.
- [8] Maziana SK, Liu CH, Tzianabos AO, et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system [J]. Cell, 2005, 122(1): 107 - 118.
- [9] Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg SR. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis [J]. Cell, 2004, 118(2): 229 - 41.

[修回日期]2010-08-20