

本文引用:刘琼华,刘志生,郑煜煌,陈霞,贺波,郑力文.HIV/AIDS患者外周血中4种细胞因子IL-2、IL-4、IL-15和IL-21表达水平及其临床意义研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):1011-1014.

HIV/AIDS患者外周血中4种细胞因子IL-2、IL-4、IL-15和IL-21表达水平及其临床意义研究

刘琼华¹,刘志生¹,郑煜煌²,陈霞³,贺波²,郑力文⁴

(1.湖南娄底职业技术学院医学部,湖南娄底417000;2.中南大学湘雅二医院感染科,湖南长沙410011;

3.中南大学湘雅医院检验科,湖南长沙410008;4.中南大学湘雅二医院骨科,湖南长沙410011)

[摘要] 目的 观察外周血4种细胞因子(IL-2、IL-4、IL-15及IL-21)在HIV感染者/AIDS患者(HIV/AIDS)和正常人表达水平的区别及其与HIV RNA病毒载量和CD3⁺、CD4⁺细胞数量的相关性,分析其与HIV感染的关系和临床意义。方法 40例未经抗病毒治疗的HIV/AIDS和31名正常人,采用ELISA法检测外周血4种细胞因子(IL-2、IL-4、IL-15及IL-21),使用流式细胞计数法检测外周血CD3⁺、CD4⁺T淋巴细胞数量,实时聚合酶链反应测定血清中HIV RNA水平。结果 未经抗病毒治疗的HIV/AIDS外周血IL-2、IL-15及IL-21水平低于正常人,而IL-4水平高于正常人($P<0.05$)。CD3⁺、CD4⁺细胞数量和各细胞因子水平显示出一定的相关关系,IL-2和IL-15水平均与HIV-1 RNA载量呈负相关。结论 提示外周血4种细胞因子都可能参与了HIV感染的致病机制,并与HIV RNA病毒载量及CD3⁺、CD4⁺细胞数量相关。

[关键词] 人免疫缺陷病毒;艾滋病;IL-2;IL-4;IL-15;IL-21

[中图分类号]R512.91 **[文献标志码]**B **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.08.018

Four Cytokine Expression Levels of IL-2, IL-4, IL-15 and IL-21 in Peripheral Blood of HIV/AIDS Patients and Their Clinical Significance

LIU Qionghua¹, LIU Zhisheng¹, ZHENG Yuhuang², CHEN Xia³, HE Bo², ZHENG Liwen⁴

(1. Department of Medicine, Loudi Medical School, Loudi, Hunan 420000, China; 2. Department of Infectious Diseases, Second Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha, Hunan 410011, China; 3. Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha, Hunan 410018, China; 4. Department of Orthopedics, Second Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[Abstract] **Objective** To observe the differences of 4 cytokine levels between HIV/AIDS patients and normal persons, and their relevance with HIV RNA level and CD3⁺, CD4⁺ cell count, and to analyze the relationship with HIV infection and clinical significance. **Methods** A total of 40 HIV/AIDS patients without antiviral therapy and 31 normal persons were enrolled. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to detect 4 cytokine levels (IL-2, IL-4, IL-15 and IL-21). At the same time, the number of CD3⁺ and CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood was detected by flow cytometry, and the level of HIV RNA in serum was determined by real-time polymerase chain reaction. **Results** IL-2, IL-15 and IL-21 in peripheral blood of HIV/AIDS patients without antiviral therapy were significantly lower than that of the normal people, and IL-4 level was higher than the normal people ($P<0.05$). The number of CD3⁺, CD4⁺ cells and the level of each cytokine showed a certain correlation, and IL-2 and IL-15 levels were negatively correlated with HIV-1 RNA load. **Conclusion** It is suggested that all 4 cytokines in peripheral blood may be involved in the pathogenesis of HIV infection and are related to HIV RNA viral load and the number of CD3⁺ and CD4⁺ cells.

[Keywords] human immunodeficiency virus; AIDS; IL-2; IL-4; IL-15; IL-21

[收稿日期]2018-03-15

[作者简介]刘琼华,女,讲师,研究方向:传染性疾病的防治,E-mail:578941158@qq.com。

人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所致的艾滋病(AIDS)已成为危害人类健康和生命的严峻问题。至2016年底全世界现存的HIV/AIDS达到3 670万人。截止2016年6月底中国大陆活着的HIV/AIDS有65.3万人,另有约20.1万人死亡^[1]。加强对HIV传播和AIDS发病的预防与控制已成为急待解决的燃眉之急。高效抗逆转录病毒治疗(HAART)能快速地抑制血液中的病毒,但无法根除细胞中的病毒储存库。近年来,科学家们已发现多种免疫细胞及其释放的细胞因子参与了HIV/AIDS的发病机制,并和血浆HIV病毒载量及外周血CD3⁺、CD4⁺细胞数量相关。研究这些细胞因子在HIV感染者中的变化及其在AIDS发病过程中的作用,有可能为加强抗HIV病毒效果提供新的辅助治疗途径^[2],为最终根除AIDS提供可能性。本研究对比观察了外周血4种细胞因子在HIV/AIDS和正常人表达水平的区别,及其与血浆HIV RNA病毒载量和外周血CD3⁺、CD4⁺细胞数量的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

40例HIV/AIDS患者均选自中南大学湘雅二医院感染科门诊,并经过湘雅二医院艾滋病研究室HIV抗体初筛实验阳性和湖南省疾病预防控制中心HIV抗体确认实验阳性确证为HIV-1感染。其中,男性26人,女性14人,年龄(37.8±10.1)岁,均符合我国2001年制定的《HIV/AIDS诊断标准及处理原则》中华人民共和国标准(试行)和中国疾病预防控制中心2016年颁发的《国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册》(第四版)的诊断标准;并从未使用过抗HIV药物、无明显艾滋病表现、无肿瘤发生,女性无妊娠,心肝肺肾功能基本正常。31名对照正常人均来自湖南省娄底职业技术学院医学部。其中,男19人,女性12人,年龄(34.5±13.6)岁,身体健康,均检测HIV抗体初筛实验阴性,其余同HIV/AIDS组。本研究启动前经湘雅二医院医学伦理委员会批准,并向研究对象说明实验的意义、可能的副作用及其他注意事项,均签署知情同意书。

1.2 外周血淋巴细胞亚群检测和血浆HIV RNA定量检测

40例HIV/AIDS患者以EDTA真空采血管采集静脉血2 mL,每支试管各取100 μL全血分别加入CD3-PreCP、CD4-PE、CD8-PE荧光单克隆抗体(美国BD公司),混合后置室温避光孵育,加入溶血素

再避光孵育,离心弃上清PBS洗涤2次,送FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司)检测,以Cell Quest软件收集分析处理好的标本,分析CD3⁺总T淋巴细胞数、CD3⁺、CD4⁺淋巴细胞数和CD3⁺、CD4⁺淋巴细胞数。离心分离的血浆置-80℃保存待测,HIV核酸扩增荧光定量检测(FQPCR HIV RNA)试剂盒(深圳市PG生物工程公司提供,国药准字SZ20020041),Gene Amp 7300序列检测系统(美国PE公司)。操作程序严格按照试剂盒说明书进行,定量线性范围50拷贝/mL~1 000 000拷贝/mL。

1.3 外周血细胞因子的血清浓度检测

使用酶联免疫吸附法(ELISA)测定40例HIV/AIDS和31名正常对照者血清中细胞因子的浓度。IL-2和IL-21试剂盒购自北京四正柏生物科技公司,IL-4试剂盒购自深圳晶美生物工程公司,IL-15试剂盒购自美国R&D Systems公司。

1.4 统计学方法

采用Graphpad Prism 5统计软件和Excel软件进行分析。资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。计量资料符合条件(正态分布/方差齐性)者采用 t 检验,不符合条件者,采用Wilcoxon秩和检验。运用SPSS 19.0统计软件分析各变量的相关性,计算其相关系数及其 P 值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血CD3⁺、CD4⁺细胞数量和血浆HIV RNA定量检测

40例未经抗病毒治疗的HIV/AIDS患者外周血CD3⁺、CD4⁺细胞数量平均值为(194.98±95.25)个/μL,其中20例行血浆HIV RNA定量检测,其log值的水平为(4.35±1.15)。做相关性回归分析,二者呈负相关($r = -0.56, P = 0.000$)。见图1。

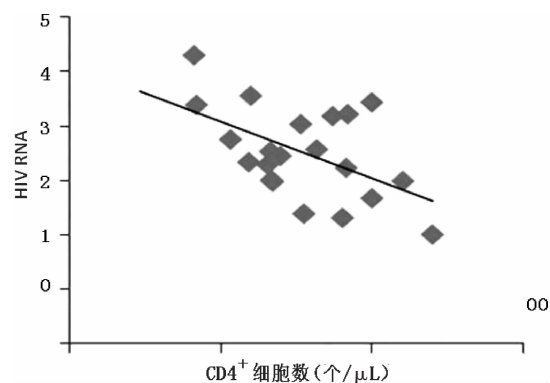


图1 外周血CD3⁺CD4⁺数量和HIV RNA病毒载量的关系

2.2 HIV/AIDS 血浆 4 种细胞因子水平与正常人的区别

40 例 HIV/AIDS 的血浆 IL-2、IL-15 及 IL-21 水平低于正常人($t=2.690, 2.550, 2.780, P=0.001, 0.022, 0.000$); IL-4 水平高于正常人($t=2.870, P=0.000$)。见表 1。

表 1 HIV-AIDS 和正常人外周血 4 种细胞因子水平检测结果($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	<i>n</i>	IL-2	IL-4	IL-15	IL-21
HIV/AIDS 组	40	8.90±2.29*	19.41±6.50*	1.53±0.49*	78.22±29.01*
正常对照组	31	27.24±7.81	8.35±2.98	5.12±0.91	256.01±40.90

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$

2.3 HIV/AIDS 血浆 4 种细胞因子水平与 CD3⁺、CD4⁺细胞数的关系

对 40 例 HIV-AIDS 患者血浆 IL-2、IL-4、IL-15 及 IL-21 的水平与外周血 CD3⁺、CD4⁺细胞计数的相关性进行分析发现:IL-4 水平与 CD3⁺、CD4⁺细胞数量呈负相关($r=-0.48, P<0.01$); IL-2、IL-15 与 CD3⁺、CD4⁺细胞数量则呈正相关($r=0.36, P=0.002; r=0.52, P<0.001, r=0.68, P=0.017$)。

2.4 HIV-AIDS 血浆 4 种细胞因子水平与 HIV RNA 病毒载量的关系

20 例 HIV-AIDS 做了血浆 HIV RNA 水平检测,其 log 值的水平为(4.35±1.15)。血浆 IL-2、IL-4、IL-15 及 IL-21 的水平与血浆 HIV-1 RNA 载量相关性分析显示,IL-4 和 IL-21 水平与血浆 HIV-1 RNA 载量的相关性差异无统计学意义($r=0.213$ 和 $-0.190, P=0.076$ 和 0.173); 而 IL-2 及 IL-15 水平均与 HIV-1 RNA 载量呈负相关($r=-0.33$ 和 $-0.34, P=0.040$ 和 0.031)。

3 讨论

研究表明,多种免疫细胞及其释放的细胞因子在 HIV 感染机体后发生了显著改变,而在接受 HAART 治疗的进程中这些变化得以不同程度矫正,反映这些细胞和细胞因子可能参与抗 HIV 的免疫应答过程,AIDS 发病机制也与其有一定关系。挖掘这些细胞因子和 HIV 发病的内在联系,揭露其对抗病毒治疗的影响,极大可能为强化抗 HIV 病毒效果开辟崭新的治疗方向^[1-2]。细胞因子广泛作用于启动、维持与调节免疫自身稳定和炎症性过程中^[3],许多细胞因子因为结构上有共同的 γ 受体链,如 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 和 IL-21 等,具有不少近似的功能,同

时它们也有各自的特点^[4-5]。目前已有临床试验表明, γ 链细胞因子中的 IL-2、IL-7 及 IL-21 在增强抗病毒作用和促进免疫重建方面有积极效果^[6-8]。然而,目前针对 γ 链细胞因子与 HIV 感染关联性的报告尚不多见。

IL-2 是分子级别第 1 个被发现,且最早被用于 AIDS 患者辅助治疗的常见 γ 链细胞因子,在抗各种感染包括 HIV 感染的免疫反应中都起到了重要的调节作用^[4-5]。研究发现^[9-10]IL-2 和抗 HIV 免疫应答存在某些必然关联。但是,由于 IL-2 对先天免疫和获得免疫反应均有刺激效应,高剂量使用时可引发突出的毒性反应^[11-12]。某些患者单一使用 HAART 无法获得明显免疫反应,联用 IL-2 后出现辅助的临床作用^[13],但也存在部分临床观察未发现 IL-2 对 HAART 的强化效果^[14-15]。

IL-21 是新近发现的细胞因子,主要由 CD3⁺、CD4⁺细胞产生,在 T 细胞抗病毒感染应答过程中起重大的作用,对慢性病毒感染控制发挥免疫增强效应。数据表明,未经临床干预的 HIV/AIDS 血浆 IL-21 水平低于正常人,并且与 CD3⁺、CD4⁺细胞计数呈正相关。当前研究发现,IL-21 通过对 CD4⁺、CD8⁺细胞和自然杀伤细胞的调节,发挥控制病毒感染的功能^[16];急慢性 HIV 感染者在未经干预前均可被检测到因 HIV 特异而释放 IL-21 的 CD4⁺细胞,而这些细胞频率的高低影响相关的病毒控制程度,且可以干预 CD8⁺细胞的维持来促进对病毒的控制^[17-18]。因此,在促进 HIV 感染者的 NK 细胞反应和控制病毒复制层面,IL-21 可能有积极的辅助治疗意义^[19]。

IL-4 大多由 CD4⁺Th2 细胞释放,常见生物学作用是:刺激 T 细胞的增殖、分化,抑制 Th1 细胞的增殖与应答,通过自分泌途径激发 Th2 细胞亚群的扩增,以及抑制巨噬细胞的功能。本研究发现 HIV/AIDS 患者的 IL-4 水平高于正常人,反映其与 HIV 感染机制存在可能关系。

IL-15 由多种细胞产生,生物学效能与 IL-2 相仿。在此次研究中观察到 HIV/AIDS 患者的 IL-15 水平明显低于正常人,提示 HIV 感染的免疫受损过程中可能有其参与。目前研究发现,对 IL-15 含量下降的 HIV/AIDS 补充外源性 IL-15 可以明显增强其免疫细胞的功能。国外报告表明,IL-15 及其受体可作为 DNA 疫苗中产生和保持记忆 CD8⁺细胞的有效方式,进而对 CD8⁺细胞亲和性成熟机制加以解释,有望帮助新型疫苗的研制^[20-21]。

综上所述,现有研究充分说明 C 细胞因子的重

要意义:促进外周血 T 细胞的自身稳定、存活增殖和功能调节,参与各种抗感染免疫的反应过程,其中某些因子已用于临床疾病的辅助免疫治疗和疫苗佐剂研发。由于存在种族遗传差异,不同国家人群的细胞免疫特征也不尽相同,HIV-1 流行病毒株在各个地区也有一定区别,因此在中国范围内研究血细胞因子在 HIV/AIDS 感染的发病机制和抗病毒免疫应答中所扮演的角色具有巨大的科学意义和临床价值。本研究对未经抗病毒治疗的 HIV/AIDS 患者外周血常见的 4 个细胞因子浓度进行了初步观察,分析发现它们与主要的免疫重建指标 CD3⁺、CD4⁺ 细胞数量及主要的病毒学指标血浆 HIV RNA 水平存在不同程度的相关性。随着进一步的深入研究和临床观察有可能更清楚地了解 HIV/AIDS 的免疫发病机制,为艾滋病抗病毒治疗的辅助手段拓展新思路,为探索新更精准的免疫干预途径打下基础。

参考文献

- [1] 中国疾病预防控制中心,性病艾滋病预防控制中心,性病控制中心.2016年第2季度全国艾滋病性病疫情及主要防治工作进展[J].中国艾滋病性病,2016,22(8):585.
- [2] SWAMINATHAN S, QIU J, RUPERT A W, et al. Interleukin-15 (IL-15) strongly correlates with increasing HIV-1 viremia and markers of inflammation [J]. PLoS One, 2016, 11 (11): e0167091.
- [3] 周国强,郑煜煌,刘 猛,等.T 淋巴因子变化对免疫重建炎症综合征发生的影响[J].中国医师杂志,2010,12(9):44-47.
- [4] VÉRONIQUE, AVETTAND-FENOEL, VINCENT BOUTELOUP, ADELINÉ MÉLARD, et al. Higher HIV-1 DNA associated with lower gains in CD4 cell count among patients with advanced therapeutic failure receiving optimized treatment (ANRS123-ETOILE) [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(10): 2212-2214.
- [5] PERSAUD D. Effect of therapeutic HIV recombinant poxvirus vaccines on the size of the resting CD4⁺T-cell latent HIV reservoir[J]. AIDS, 2011, 25(18): 2227-2234.
- [6] MOLINA J M, LENY Y, FOURNIER I, et al. Interleukin-2 before antiretroviral therapy in patients with HIV infection: a randomized trial (ANRS119)[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2009,200(2):206-215.
- [7] LEVY Y. Cytokine therapies in HIV infection[J]. Medicine Science (Paris), 2006, 22(8-9): 751-754.
- [8] ZHENG LIWEN, DIALLO MAMADUO, ZHENG YUHUANG, et al. IL-21 level in Chinese HIV infected individuals and its dynamics undergoing HAART[J]. Journal of Central South University Medical Sciences, 2011, 36(11): 1059-1064.
- [9] 任莉莉,李富荣,齐 晖,等.论外周血 CD4⁺ 淋巴细胞及 Th1/Th2 细胞因子变化与 HIV/AIDS 疾病发展的相关性[J].中国现代医学杂志,2005,15(20):91-93.
- [10] HE M, ZHENG Y H, ZHOU H Y, et al. Prospective observation for seven-year's highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV-1 infected patients[J]. Current HIV Research, 2011, 9(3): 160-165.
- [11] 郑煜煌,刘 猛,周华英,等.艾滋病 HAART 治疗免疫重建炎症综合征的免疫机制初步研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2011,31(1):62-68.
- [12] PISCITELLI S C, BHAT N, PAU A. A risk-benefit assessment of interleukin-2 as an adjunct to antiviral therapy in HIV infection[J]. Drug Safety, 2000, 22(1): 19-31.
- [13] WEISSMAN D, DYBUL M, DAUCHER M B, et al. Interleukin-2 up-regulates expression of the human immunodeficiency virus fusion coreceptor CCR5 by CD4⁺ lymphocytes in vivo[J]. Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(3): 933-938.
- [14] ZHOU H Y, ZHENG Y H, HE Y, et al. Evaluation of a 6-year highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV-1 infected patients[J]. Intervirology, 2010, 53(4): 240-246.
- [15] DURIER C, CAPITANT C, LASCAUX A S, et al. Long-term effects of intermittent interleukin-2 therapy in chronic HIV-infected patients (ANRS 048-079 Trials)[J]. AIDS, 2007, 21(14): 1887-1897.
- [16] MUELLER Y M, KATSIKIS P D. IL-15 in HIV infection: pathogenic or therapeutic potential?[J]. European Cytokine Network, 2010, 21(3): 219-221.
- [17] DAVEY R T, MURPHY R L, GRAZIANO F M, et al. Immunologic and virologic effects of subcutaneous Interleukin2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial[J]. JAMA, 2000, 284(2): 183-189.
- [18] KATLAMA C, CARCELAIN G, DUVIVIER C, et al. Interleukin-2 accelerates cd4 cell reconstitution in hiv-infected patients with severe immunosuppression despite highly active antiretroviral therapy: the ilstim study Anrs 082 [J]. Infectious Diseases in Clinical Practice, 2002, 16(15): 2027-2034.
- [19] OH S, PERERA L P, BURKE D S, et al. IL-15/IL-15R α -mediated avidity maturation of memory CD8⁺ T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(42): 15154-15159.
- [20] AHMAD A, AHMAD R, IANNELLO A, et al. IL-15 and HIV infection: lessons for immunotherapy and vaccination[J]. Current HIV Research, 2005, 3(3): 261-270.
- [21] LAFEUILLADE A, POGGI C, CHADAPAUD S et al. Pilot study of a combination of highly active antiretroviral therapy and cytokines to induce HIV-1 remission[J]. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2001, 26(1): 44-55.