

# 合并丙型肝炎病毒感染对 HIV-1 感染者特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫的影响

曹孟丽<sup>1</sup> 唐漾波<sup>2</sup> 赵稳<sup>3</sup> 陈凤<sup>1</sup> 王福祥<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 深圳市第三人民医院感染科, 广东深圳 518000; <sup>2</sup> 广州市第八人民医院传染病研究所 510060;

<sup>3</sup> 深圳大学总医院呼吸科, 广东深圳 518000

通信作者: 王福祥, Email: 13927486077@163.com

**【摘要】** 目的 探讨合并 HCV 感染对 HIV-1 感染者特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫应答的影响。方法 选取 2015 年 9 月至 2016 年 5 月在广州市第八人民医院就诊的 49 例 HIV-1 感染者, 根据是否合并 HCV 感染, 分为 HIV-1 单纯感染组 (26 例) 和 HIV-1 合并 HCV 感染组 (23 例)。以 HIV-1 P24 蛋白上的氨基酸序列人工合成的 12 个重叠肽段组成肽段库, 体外刺激已接受 HAART 的外周 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 采用酶联免疫斑点试验方法检测特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  分泌细胞个数, 根据斑点形成细胞 (SFC) 数计算抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答频率。以  $1 \times 10^6$  个细胞产生的 SFC > 50, 且大于各自非特异性刺激对照孔 SFC 的 3 倍作为 HIV-1 抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞阳性反应。结果 HIV-1 单纯感染组的特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞阳性应答率为 80.8%, 应答频率为 250 (100, 700) SFC/10<sup>6</sup> 个细胞, 均高于 HIV-1 合并 HCV 感染组的 52.2% 和 50 (0, 250) SFC/10<sup>6</sup> 个细胞, 组间比较差异具有统计学意义 ( $\chi^2=4.538$ ,  $Z=-2.432$ ,  $P$  均 < 0.05)。结论 HIV-1 感染者合并 HCV 感染可能抑制特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应。

**【关键词】** HIV 感染; 肝炎病毒, 丙型; 杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞; 抑制

基金项目: 国家自然科学基金 (81971915)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200310-00058

## The impact of hepatitis C virus co-infection on immune responses of specific cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells among HIV-1 infected individuals

Cao Mengli<sup>1</sup>, Tang Yangbo<sup>2</sup>, Zhao Wen<sup>3</sup>, Chen Feng<sup>1</sup>, Wang Fuxiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, China; <sup>2</sup>Institute of Infectious Diseases, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou 510060, China; <sup>3</sup>Department of Respiratory Medicine, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Corresponding author: Wang Fuxiang, Email: 13927486077@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of HIV-1 co-infection with HCV on immune responses of HIV-1 specific cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells. **Methods** There were 49 confirmed HIV-1 infected patients selected at Guangzhou Eighth People's Hospital from September 2015 to May 2016. According to whether they were co-infected with HCV, 26 and 23 patients were assigned to HIV-1 infection group and HIV-1/HCV co-infection group, respectively. The peripheral CD4<sup>+</sup> T cells of the patients who had received HAART were stimulated *in vitro* by a peptide pool containing 12 overlapping peptides that synthesized from the amino acid sequence of HIV-1 P24 protein. The number of IFN- $\gamma$ -secreting cells secreted by specific CD4<sup>+</sup> T cells was detected by enzyme-linked immunospot assay. The response frequency of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells was calculated by the number of spot-forming cells (SFC). If SFC produced by  $1 \times 10^6$  cells was more than 50, and 3 times greater than that in respective non-specific stimulus control wells, it was defined as positive response of HIV-1 antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell. **Results** The positive response rate of specific cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-1 infection group was 80.8%, and the response frequency was 250 (100, 700) SFC/10<sup>6</sup> cells, which were both higher than those of 52.2% and 50 (0, 250) SFC/10<sup>6</sup> cells in HIV-1/HCV co-infection

group. The differences between the two groups were statistically significant ( $\chi^2=4.538, Z=-2.432, P$  both  $<0.05$ ).

**Conclusions** HCV co-infection in HIV-1 infected individuals may inhibit responses of specific cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells.

**[Key words]** HIV infections; Hepatitis C virus; Specific cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells; Inhibition

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81971915)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20200310-00058

HIV 和 HCV 感染途径类似,二者合并感染在临床中较为常见。据估计,全球约 30% 的 HIV 感染者可合并 HCV 感染<sup>[1-2]</sup>。HCV 感染引起的终末期肝病已经成为 HIV 合并 HCV 感染者死亡的重要原因。1984 年, Fleischer<sup>[3]</sup>发现 CD4<sup>+</sup> T 细胞在体外培养过程中可获得特异性杀伤能力。这类杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞同效应 CD8<sup>+</sup> T 细胞一样,主要通过 Fas/FasL 介导靶细胞凋亡和释放颗粒酶/穿孔素杀伤靶细胞两种途径发挥作用<sup>[4]</sup>。目前,研究杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的焦点主要集中在细胞表型和功能研究方面,合并其他病毒感染是否会干扰特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应尚未明确,本研究分析合并 HCV 感染对 HIV-1 感染者特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫应答的影响,为临床治疗提供参考。

## 对象与方法

### 一、研究对象

选取 2015 年 9 月至 2016 年 5 月在广州市第八人民医院艾滋病住院病区 and 专科门诊就诊的 49 例 HIV-1 感染者为研究对象。HIV-1 感染者的纳入标准为:① 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HIV-1 抗体初筛阳性,并经广州市 CDC 蛋白免疫印迹实验确诊为 HIV-1 感染;② CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞  $>200$  个/ $\mu\text{L}$ ;③ 接受 HAART 12 个月以上。对上述确诊的 HIV-1 感染者,再采用 ELISA 方法检测 HCV 抗体,荧光定量 PCR 检测 HCV RNA,二者均阳性即判为 HIV-1 合并 HCV 感染。排除标准:① 不符合上述条件的患者;② 存在组织学证据的肝硬化或肝癌;③ 合并恶性肿瘤;④ 合并自身免疫性肝病;⑤ 合并胆结石等阻塞性胆管疾病;⑥ 合并其他病毒性肝炎、酒精性肝病等。本研究内容已获得医院伦理委员会的批准(审批号:深圳三院伦审科研备案字[2020-002]号)和

患者书面知情同意。

### 二、免疫磁珠分选 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞

所有研究对象均采用抗凝管留取 10 mL 外周血,2 000 转/min(离心半径 27.5 mm)离心 5 min 弃上层血浆;取 5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)与剩余血液混合后转移至含 5 mL 淋巴细胞分离液的 15 mL 离心管中,2 000 转/min(离心半径 27.5 mm)离心 15 min,同时减慢降速过程;离心结束后将中间白色膜状层吸出,PBS 洗涤后,加入冻存液保存于液氮中。外周血单核细胞(PBMC)中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的分选采用 MiniMACS Saring 试剂盒、人 CD4 MicroBeads 试剂(德国 Miltenyi 公司),具体操作步骤按照参考文献[5]进行。

### 三、特异性抗原表位

以 HIV-1 P24 编码区(Gag133-199)的氨基酸序列人工合成的 12 个重叠多肽组成作为特异性抗原表位,序列来源于 AAB50258(GenBank Accession)<sup>[6]</sup>。

### 四、酶联免疫斑点试验(ELISPOT)

采用抗人 IFN- $\gamma$  单克隆抗体包被 96 孔 PVDF 膜板,用含 10% 人抗体血清的 RPMI-1640 进行封闭。37 °C 解冻 PBMC,调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,按每孔 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中。每次实验同时设置至少 2 个实验孔和 2 个非特异性刺激对照孔,实验孔加入上述 P24 肽段库(终浓度为每肽 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作为 HIV-1 特异性抗原刺激表位,同时加入 CD28 单克隆抗体(美国 BD 公司,终浓度 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作为反应辅助受体,非特异性刺激孔不加任何刺激物;此外,每块板设置多孔加入非特异性刺激原植物血凝素(PHA)(生物晶美公司)和多孔不加任何刺激原分别作为系统阳性对照和阴性对照。将上述反应板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后,用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗板,每孔加入试剂盒提供的检测抗

体 100 μL, 室温放置 2 h, 同前洗板; 然后采用过氧化酶底物显色试剂盒进行显色反应 (美国 BD 公司)。实验完成后, 用 ELISPOT 自动读板仪 (美国 CTL 公司, 型号 ImmunoSpot4) 读板计数, 计数的每个斑点代表 1 个 IFN-γ 分泌细胞, 称为斑点形成细胞 (SFC)。以 1×10<sup>6</sup> 个细胞产生的 SFC >50, 且 > 各自非特异性刺激对照孔 SFC 的 3 倍为阳性反应, 否则为阴性反应。阳性反应表示存在 HIV-1 抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应, SFC 数值表示抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答频率。

### 五、统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 对不符合正态分布的计量资料采用 *M* (*Q*<sub>25</sub>, *Q*<sub>75</sub>) 表示, 组间比较采用秩和 Mann-Whitney *U* 检验; 计数资料采用例数和率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、基本情况

49 例 HIV 感染者中, HIV 单纯感染者 26 例, 合并 HCV 感染者 23 例, 两组患者在年龄、CD4<sup>+</sup> T 细胞数量、CD8<sup>+</sup> T 细胞数量、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 之间比较差异均无统计学意义 (*t* = 1.793, *Z* = 1.523, -0.381 和 1.523, *P* 均 > 0.05), 但合并 HCV 感染者中男性比例为 82.6%, 明显高于单纯感染组的 34.6% ( $\chi^2$  = 10.053, *P* < 0.05), 见表 1。

### 二、合并 HCV 感染对 HIV-1 特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞阳性反应的影响

HIV-1 单纯感染者中, 有 21 例患者的特异性杀伤 CD4<sup>+</sup> T 细胞呈现阳性反应, 应答率为 80.8%; 合

并 HCV 感染者中, 仅有 12 例呈现阳性反应, 应答率为 52.2%。合并 HCV 感染者的特异性杀伤 CD4<sup>+</sup> T 细胞阳性应答率低于单纯 HIV-1 感染者, 差异有统计学意义 ( $\chi^2$  = 4.538, *P* < 0.05)。

### 三、合并 HCV 对 HIV-1 特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答频率的影响

进一步比较两组患者特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的应答频率, 发现 HIV-1 单纯感染组特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的应答频率为 250(100, 700) SFC/10<sup>6</sup> 个细胞, 合并 HCV 感染组为 50(0, 250) SFC/10<sup>6</sup> 个细胞, HIV-1 合并 HCV 感染者的特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的应答频率显著低于单纯 HIV-1 感染者 (*Z* = -2.432, *P* < 0.05)。

## 讨 论

据报道, HIV 合并感染 HCV 者中, 男男性行为人群占 5%~13%, 静脉吸毒人群为 52%~90%, 血友病患者甚至高达 85%<sup>[7-8]</sup>。本文合并 HCV 感染者中男性比例高达 82.6%, 明显高于单纯感染组男性比例, 与相关研究一致。杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞不属于已知的传统辅助性 T 细胞, 而是一群独立的效应细胞亚型, 目前为止, 杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞的表型虽仍未阐明, 但已有研究表明在 HIV-1 感染的急性期, 病毒数量与特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应的强弱相关, 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞对抗原的应答频率越高, 发挥 HIV-1 杀伤性作用就越强<sup>[9-10]</sup>。

为了探讨合并 HCV 感染是否会干扰 HIV-1 感染者中特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应, 本研究纳入了 HIV-1 单纯感染和 HIV-1 合并 HCV 感染两组患者, 发现合并 HCV 感染者的特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞在阳性反应及应答频率上均显著低于单纯感染组, 表

表 1 HIV-1 单纯感染组和 HIV-1 合并 HCV 感染组患者的一般资料比较

组别	总例数(例)	男性[例(%)]	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	CD4 <sup>+</sup> T 细胞 [个/μL, <i>M</i> ( <i>Q</i> <sub>25</sub> , <i>Q</i> <sub>75</sub> )]	CD8 <sup>+</sup> T 细胞 [个/μL, <i>M</i> ( <i>Q</i> <sub>25</sub> , <i>Q</i> <sub>75</sub> )]	CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> [ <i>M</i> ( <i>Q</i> <sub>25</sub> , <i>Q</i> <sub>75</sub> )]
单纯感染组	26	9(34.6)	39.7 ± 9.3	373.0(303.0, 559.3)	1 157.0(683.8, 1490.5)	0.4(0.3, 0.6)
合并感染组	23	19(82.6)	35.5 ± 6.7	335.0(256.0, 422.0)	1 349.0(731.0, 1555.0)	0.3(0.2, 0.5)
统计值		$\chi^2$ = 10.053	<i>t</i> = 1.793	<i>Z</i> = 1.523	<i>Z</i> = -0.381	<i>Z</i> = 1.523
<i>P</i> 值		< 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

注: 单纯感染组为 HIV-1 单纯感染者, 合并感染组为 HIV-1 合并 HCV 感染者

明合并 HCV 感染可能耗竭了感染者体内特异性杀伤性 T 细胞的数量,从而减少了特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应,提示合并 HCV 可能降低了 CD4<sup>+</sup> T 细胞对 HIV-1 的杀伤作用。目前,关于 HIV 和 HCV 合并感染引起的机体免疫应答、两种病毒复制能力的影响等相关的研究报道还较少,当合并 HCV 感染时,HCV 会下调机体对 HIV-1 特异性细胞应答强度<sup>[1]</sup>;与单纯 HCV 感染患者相比,HIV 合并 HCV 患者的 HCV 特异性 T 细胞反应明显降低,且 HCV 特异性 T 细胞反应的强弱与 CD4 淋巴细胞计数呈正相关<sup>[2]</sup>;由此可见,合并感染对两种疾病的进程都产生了一定的影响,但其中的影响作用机制尚未清楚。

综上,我们认为合并 HCV 感染可能抑制特异性杀伤性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应,但是否会影响合并患者的抗病毒治疗效果有待进一步研究证实。此外,考虑到本研究采用的样本量较少,可能导致分析的结果存在一定的偏倚和局限性,未来尚需加大样本量来进一步证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] Rockstroh JK, Lacombe K, Viani RM, et al. Efficacy and safety of glecaprevir/ pibrentasvir in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1: the expedition-2 study[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(7):1010-1017. DOI:10.1093/cid/ciy220.
- [2] Huerta L, Anaya-Covarrubias JY, Fierro NA. Human immunodeficiency virus and the liver: The impact of coinfection with hepatotropic viruses [J]. Ann Hepatol, 2019, 18(2):285-286. DOI:10.1016/j.aohep.2019.03.002.
- [3] Fleischer B. Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4<sup>+</sup> T lymphocytes in culture[J]. Nature, 1984, 308(5957): 365-367. DOI:10.1038/308365a0.
- [4] Sanchez-Martinez A, Perdomo-Celis F, Acevedo-Saenz L, et al. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T-cells during HIV infection: Targets or weapons? [J]. J Clin Virol, 2019, 119:17-23. DOI:10.1016/j.jcv.2019.08.004.
- [5] 唐漾波, 占哈琳, 曹孟丽, 等. 人类免疫缺陷病毒-1 单纯及合并丙型肝炎病毒感染中人类免疫缺陷病毒-1 特异性 T 淋巴细胞免疫应答[J]. 中华传染病杂志, 2013, 31(4):216-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2013.04.007.
- [6] 赵稳, 唐漾波, 唐小平, 等. 高效抗反转录病毒疗法对 HIV-1 特异性 CTL 免疫应答的影响[J]. 中华临床感染病杂志, 2010, 3(4): 209-212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2010.04.005.
- [7] Zhao W, Tang YB, Tang XP, et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on HIV-1 specific CTL immune responses [J]. Chin J Clin Infect Dis, 2010, 3 (4):209-212. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2010.04.005.
- [8] Sikavi C, Chen PH, Lee AD, et al. Hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection in the era of direct-acting antiviral agents: No longer a difficult-to-treat population [J]. Hepatology, 2018, 67(3):847-857. DOI:10.1002/hep.29642.
- [9] Platt L, Easterbrook P, Gower E, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(7):797-808. DOI:10.1016/S1473-3099(15)00485-5.
- [10] Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, et al. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(123):123-125. DOI:10.1126/scitranslmed.3003165.
- [11] Phetsouphanh C, Aldridge D, Marchi E, et al. Maintenance of functional CD57<sup>+</sup> cytolytic CD4<sup>+</sup> T cells in HIV+ elite controllers [J]. Front Immunol, 2019, 10:1844. DOI:10.3389/fimmu.2019.01844.
- [12] 唐漾波, 平岷, 占哈琳, 等. 抗病毒治疗中人类免疫缺陷病毒-1 单纯及合并丙型肝炎病毒感染相关细胞因子水平的变化[J]. 中华传染病杂志, 2014, 32 (10):622-624. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2014.10.010.
- [13] Tang YB, Ping Q, Zhan HL, et al. The change of cytokine levels in human immunodeficiency virus -1 mono-infected or human immunodeficiency virus-1/hepatitis C virus coinfecting individuals during antiviral therapy[J]. Chin J Infect Dis, 2014, 32(10):622-624. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2014.10.010.
- [14] 张新伟, 康富标, 赵敏. HIV/HCV 合并感染者肝损伤研究进展 [J]. 传染病信息, 2008, 21(06):329-332. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8134.2008.06.004.
- [15] Zhang XW, Kang FB, Zhao M. Advances of liver injury research in human immunodeficiency virus/ hepatitis C virus coinfecting patients[J]. Infect Dis Info, 2008, 21(6):329-332. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8134.2008.06.004.

(收稿日期:2020-03-10)