DOI：10.3969/j.issn.1002－2694.2019.00.030

·实验研究·

HIV/AIDS患者外周血程序性死亡受体-1的表达及临床意义

陈　琛[1]，赵长城[2]，王　勇[1]，徐前明[1]，刘　亚[1]

摘　要：目的　探讨HIV感染及抗病毒治疗对程序性死亡受体-1（programmed death-1，PD-1）表达的影响。**方法**　根据是否接受抗病毒治疗将61例HIV/AIDS患者分为治疗组及未治疗组，并以35例健康者作为对照。利用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）技术探究基因*PD*-1 mRNA在人外周血单个核细胞（PBMC）中的表达；通过双夹心抗体ELISA法测定血清中可溶性PD-1（sPD-1）表达水平。并比较不同$CD4^+$ T淋巴细胞数的HIV/AIDS患者血清sPD-1的差异。**结果**　未治疗组、治疗组、健康组研究对象PBMC中*PD*-1 mRNA的相对表达量均数分别为0.337 8±0.064、0.578 2±0.073和0.771 5±0.124，健康组与未治疗组差异极显著，健康组与治疗组、治疗组与未治疗组之间差异显著（$P=0.031$、$P=0.043$）；未治疗组、治疗组、健康组血清sPD-1浓度分别为42.22±2.21 ng/mL、38.24±2.79 ng/mL和29.88±1.41 ng/mL。健康组与未治疗组、治疗组，治疗组与未治疗组分别具有显著性差异（$P=0.008$、$P=0.040$和$P=0.020$）。差异性分析结果表明，未治疗组、治疗组$CD4^+$ T淋巴细胞数＜350个/mm^3患者血清sPD-1水平均显著高于$CD4^+$ T淋巴细胞数＞350个/mm^3患者。**结论**　抗病毒治疗在一定程度上使高水平sPD-1表达下调以促使PD-1/PD-L1通路的恢复，从而促进机体免疫重建。监测*PD*-1 mRNA及sPD-1的表达在HIV的辅助诊断和推断病情发展上具有一定的价值。

关键词：程序性死亡受体-1；可溶性程序性死亡受体-1；实时荧光定量PCR

中图分类号：R446.6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002－2694(2019)04－0320－04

Expression of PD-1 in peripheral blood of the patients with HIV/AIDS and its clinical significance

CHEN Chen[1], ZHAO Chang-cheng[2], WANG Yong[1], XV Qian-ming[1], LIU Ya[1]

(1. *College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei* 230022, *China*;
2. *Department of Infectious Disease Hospital of Anhui Provincial Hospital, Hefei* 230022, *China*)

Abstract: In order to investigate the effect of HIV infection and antiviral therapy on expression of programmed death-1 (PD-1), 61 cases of HIV / AIDS patients were divided into treatment group and untreated group, 35 healthy people were taken as negative controls, expression of *PD*-1 mRNA were detected utilizing semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction. The levels of sPD-1 in serum were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The differences of serum sPD-1 in HIV / AIDS patients with different $CD4^+$ T lymphocyte levels were also compared. The results showed that the relative expression level of *PD*-1 mRNA in untreated group, treatment group and healthy group were 0.337 8±0.064, 0.578 2±0.073 and 0.771 5±0.124, respectively. There was significant difference between healthy group and untreated group ($P<0.001$). And also significant difference were found between healthy group and treated group, treated group and untreated group, respectively ($P=0.031$, $P=0.043$). The serum sPD-1 levels in untreated group, treatment group and healthy group were 42.22±2.21 ng/mL, 38.24±2.79 ng/mL and 29.88±1.41 ng/mL, respectively. There were significant difference between the healthy group and the untreated group, the healthy group and the treated group, and between the untreated group and the treated group ($P=0.008$, $P=0.040$, $P=0.020$). Moreover, the serum sPD-1 levels of $CD4^+$ T lymphocytes ＜350 cells/mm^3 in untreated group and treatment group were significantly higher than those in $CD4^+$ T lymphocyte count ＞350 cells / mm^3 ($P=0.035$, $P=0.047$). In conclusion, antiviral therapy down-regulates high level sPD-1 expression to a certain

合肥市卫生计生委2016年应用医学研究（重点）项目（No. hwk2016zd011）

通信作者：刘　亚，Email：liuya@ahau.edu.cn；
ORCID：0000-0002-7436-9156

作者单位：1. 安徽农业大学动物科技学院动物医学系，合肥　230036；
2. 安徽省立医院传染病院，合肥　230022

extent to recovery of PD-1 / PD-L1 pathway and promote the immune reconstitution. Monitoring the expression of *PD*-1 mRNA and sPD-1 is of value in auxiliary diagnosis and inferred prognosis of HIV.

Keywords: programmed death-1; soluble programmed death-1; RT-PCR

Supported by the Hefei Health and Family Planning Commission 2016 Applied Medicine Research (Key) Project (No. hwk2016zd011)

Corresponding author: Liu Ya, Email: liuya@ahau.edu.cn

艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)侵犯并破坏机体免疫系统引起的疾病，对人类健康造成极大威胁。最近，以调控协同刺激分子信号通路为代表的治疗策略，为改善HIV/AIDS患者的免疫功能提供了新的手段和理念。

程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)是与T淋巴细胞功能耗竭和凋亡有关的协同刺激分子，可以细胞膜型和可溶性两种形式存在。既往对该分子的研究大多采用流式细胞术对膜型蛋白进行测定，但对其可溶性形式(soluble PD-1, sPD-1)的表达水平及临床意义则鲜有报道。因此，本文拟通过半定量 RT-PCR 法测定 PD-1 mRNA 的表达，并使用 ELISA 方法测定血清中 sPD-1 蛋白的表达水平，以分析其在 HIV 致病过程中的作用。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　研究对象　收集安徽省立医院感染病院2017年6月－2017年12月HIV/AIDS病例共61例，包括31例依从性良好的接受抗病毒治疗及30例未接受抗病毒治疗的患者，均为男性，平均年龄40.81±14.11岁。所有病例确认均符合中华人民共和国HIV/AIDS国家诊断标准，排除梅毒、乙肝、丙肝、结核等系统性感染性疾病。另选健康者35例，均为男性，平均年龄42±6.38岁。本研究经安徽省立医院传染病院医学伦理学委员会批准(No. 20161124002)，并经患者知情同意。

1.1.2　主要试剂　淋巴细胞分离液(天津灏洋，LTS1077)；核酸提取试剂盒(厦门泰普，RNA-blood-M)；反转录试剂盒(TaKaRa，RR036A)；内参GAPDH引物(上海生工，B661104)；BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4(美国BD Pharmingen，340499)；人类免疫缺陷病毒Ⅰ型核酸定量检测试剂盒(厦门安普利，R2222)；Human PD-1 ELISA Kit(上海LanpaiBio公司，013655)。

表1　调查对象基本情况

Tab.1　Characteristics of the study population

项目	例数(百分比%)	
年龄	治疗组(n=31)	未治疗组(n=30)
＜20岁	4(12.90)	2(6.67)
20－55岁	20(64.52)	20(66.67)
＞55岁	7(22.58)	8(26.6)
$CD4^+$(个/mm^3)		
＞350	10(32.26)	8(26.67)
＜350	21(67.74)	22(73.33)
CD4/CD8		
＞1.5	5(16.13)	2(6.67)
0.5－1.5	17(54.84)	16(53.33)
＜0.5	9(29.03)	12(40.00)
HIV viral loads(IU/mL)		
＜1.00×10^3	18(56.07)	13(43.33)
1.00×10^3－1.00×10^5	9(29.03)	11(36.67)
＞10^5	4(12.90)	6(20.00)

1.2.3　主要仪器　TaqMan实时荧光定量RT-PCR扩增仪(厦门安普利9800型)；全自动核酸提取工作站(厦门安普利Anas 1000)；FACS Calibur流式细胞仪(BD公司，美国)；凝胶成像系统(上海勤翔，CLINX GenoSens1860)。

1.2　实验方法

1.2.1　标本的采集及处理　所有研究对象均为清晨空腹采血，用普通促凝真空采血管和EDTA-K2抗凝真空采血管采静脉血各2 mL。促凝血室温静置30 min，2 000× g离心10 min后取血清，－80 ℃冻存备用；抗凝血标本置4 ℃保存，6 h内送检。

1.2.2　$CD4^+$ T淋巴细胞数量的测定　在流式细胞分析管中加入EDTA-K2抗凝血50 μL，按照BD MultitestTM CD3/CD8/CD45/CD4抗体试剂盒说明书，用FACSCalibur流式细胞仪检测$CD4^+$ T淋巴细胞数。

1.2.3　*PD*-1 mRNA水平的测定

1.2.3.1　引物设计及合成　针对*PD*-1基因序列设

计特异性引物,引物序列为:上游:5-CGGCCAGTTCCAAACCCT-3′,下游:5′-CCATTCCGCTAGGAAAGACA-3′。交由南京擎科生物科技有限公司进行引物合成。

1.2.3.2 人外周血单个核淋巴细胞(PBMCs)的分离 按照人外周血淋巴细胞分离液说明书进行操作。将 EDTA-K2 抗凝血 350 × g 离心 10 min。将血浆弃去,保留血细胞,稀释。加入 Ficoll 淋巴细胞分层液。向分层液上面的淋巴细胞层中加入清洗液 10 mL,颠倒混匀。离心,倒掉上清,弹散细胞团后,将 PBMC 浓度调至 2.0×10^6 · mL^{-1},备用。

1.2.3.3 cDNA 的合成 按照说明书操作,采用 RNA 提取试剂盒提取 PBMCs 中的总 RNA。利用反转录试剂盒,将获得的总 RNA 逆转录合成 cDNA 第一链。反转录体系为:5× PrimeScript RT Master Mix 2 μL,Total RNA4 μL,Rnase Free ddH_2O 4 μL。反应条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃保存。

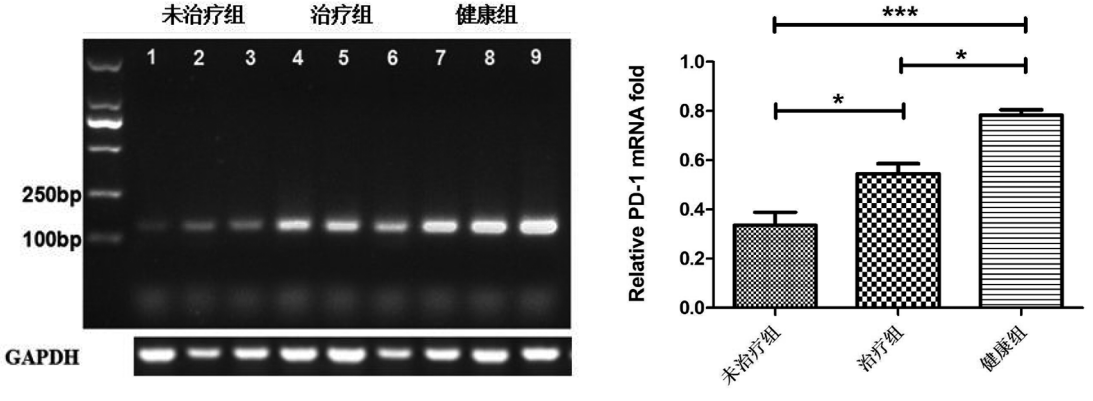
1.2.3.4 半定量 PCR 以反转录合成的 cDNA 为模板,同时对目的基因 PD-1 和内参基因 GAPDH 进行半定量 PCR 扩增。PCR 反应体系为:ddH_2O 7 μL,Premix Taq 10 μL,上下游引物各 1 μL(10 μmol · L-1),DNA 模板 1 μL。扩增条件为 95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 12 s,30 个循环,72 ℃终延伸 10 min。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。在凝胶成像分析仪中使用 Image-Pro Plus 观察扩增得目的片段,并得出其灰度值(IOD)。

1.2.4 血清 sPD-1 蛋白水平的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清 sPD-1 的浓度,操作步骤分别参照检测试剂盒说明书进行。简要操作步骤如下:将 sPD-1 标准品依次稀释,在 96 孔板中分别加入 50 μL 血清样品或标准品,室温孵育 1 h,洗涤 5 次,然后加入 50 μL 酶标二抗室温孵育 1 h,洗涤 5 次,加入 50 μL 显色剂避光孵育 15 min,反应结束后加入 50 μL 终止液,酶标仪读取 450 nm 吸光度值,根据标准品吸光度绘制标准曲线,然后计算血清 sPD-1 的浓度。sPD-1 检测试剂盒的检测下限分别是 1.2 pg/mL。

1.3 统计学分析 实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并用 GraphPad 5.0 软件进行绘图并进行差异显著性分析。

2 结 果

2.1 应用半定量 RT-PCR 检测临床标本的结果 选择 *GAPDH* 作为内参基因,半定量检测 HIV/AIDS 患者与健康人群 PBMCs 中 *PD*-1 mRNA 表达水平。结果显示,未治疗组、治疗组、健康组相对表达量均数分别为 0.337 8±0.064、0.578 2±0.073 和 0.771 5±0.124,健康组与未治疗组差异有统计学意义($P<0.001$),健康组与治疗组、治疗组与未治疗组差异有统计学意义($P=0.031$、$P=0.043$)(图 1)。



*,$P<0.05$; * *,$P<0.01$; * * *,$P<0.001$。

图 1 PD-1 mRNA 在健康人群及 HIV/AIDS 患者的相对表达量

Fig.1 Relative expression of PD-1 mRNA in healthy and HIV / AIDS groups

2.2 HIV/AIDS 患者血清 sPD-1 表达水平 未治疗组、治疗组、健康组血清 sPD-1 浓度分别为 42.22±2.21 ng/mL、38.24±2.79 ng/mL 和 29.88±1.41 ng/mL(图 2)。健康组与未治疗组、治疗组,治疗组与未治疗组分别具有统计学差异($P=0.008$、$P=0.040$ 和 $P=0.020$)。

2.3 不同 $CD4^+$ T 淋巴细胞数的 HIV/AIDS 患者血清 sPD-1 的差异 国家免费艾滋病抗病毒药物

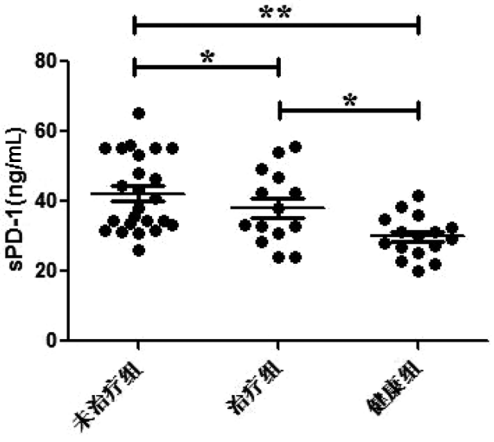


图 2　HIV/AIDS 患者与健康人群 sPD-1 含量

Fig.2　Concentrations of sPD-1 in serum from HIV-infected individuals and healthy controls

治疗手册[1]建议成人/青少年 HIV/AIDS 患者 $CD4^+$ T 淋巴细胞数低于 350 个/mm^3 时要给予抗病毒治疗。根据 $CD4^+$ T 淋巴细胞数高低，将 HIV/AIDS 患者治疗组及未治疗组分别再细分为＜350 个/mm^3 和＞350 个/mm^3 亚组进行差异性分析。结果表明，未治疗组、治疗组 $CD4^+$ T 淋巴细胞数＜350 个/mm^3 患者血清 sPD-1 水平均显著高于 $CD4^+$ T 淋巴细胞数＞350 个/mm^3 患者（$P=0.035$、$P=0.047$）。

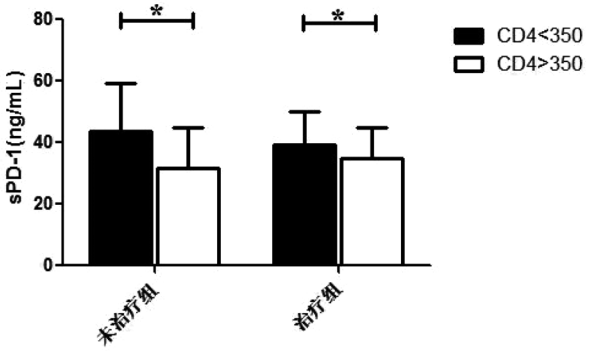


图 3　不同 $CD4^+$ T 淋巴细胞数量水平的 HIV/AIDS 患者血清 sPD-1

Fig.3　Serum sPD-1 in HIV / AIDS patients with different $CD4^+$ T lymphocyte levels

3　讨　论

近年来随着对机体免疫调节机制认识的逐步深入，协同刺激分子在机体免疫中发挥的作用受到了越来越广泛的重视。作为介导负性协同刺激信号的重要途径，PD-1/PD-L1 通路在机体免疫应答过程中扮演着重要的角色，在免疫耐受、移植排斥、自身免疫性疾病以及肿瘤和慢性病毒感染等方面发挥了极为重要的生物学作用[2]。

PD-1 与 HIV-1 感染具有紧密的联系。谢荣华[3]等人的研究证实了 PD-1 是 HIV 感染疾病进展的标志之一。另据报道，PD-1 在预测 HIV/AIDS 患者体内病毒储存库大小中具有重要作用，其表达水平与病毒反弹及耐药存在联系[4]。此外，Edward[5]等证实，阻断 PD-1 可抑制慢性 HIV 感染的人源化小鼠的病毒复制。本研究通过 RT-PCR 法对 HIV/AIDS 患者 PBMCs 中 *PD*-1 mRNA 的表达进行研究，与健康人群相比，*PD*-1 mRNA 的表达下降，结果表明 HIV 感染可诱导 PD-1 转录水平的下调。

T 细胞过度活化是 HIV 感染进程中的重要特征，不能仅根据膜型分子的表达情况来判断患者的免疫状态[6]，因为研究显示，sPD-1 参与 T 细胞活化的调控[7-10]。可溶性 PD-1 是由于 PD-1 的 3 号外显子缺失（PD-1 △ex3）[11]经翻译后形成的蛋白。据报道，sPD-1 水平在类风湿性关节炎[12]、慢性肝炎[13]、系统性红斑狼疮[14]等病理状态下明显高于健康人群。本文研究结果表明，sPD-1 水平未治疗组＞治疗组＞健康组，且 $CD4^+$ T 淋巴细胞数＜350 个/mm^3 患者血清 sPD-1 水平均高于 $CD4^+$ T 淋巴细胞数＞350 个/mm^3 患者（$P=0.035$、$P=0.047$），高水平的 sPD-1 可对 PD-1/PD-L1 通路产生抑制。而抗病毒治疗一方面抑制病毒复制，另一方面通过下调 sPD-1 水平的机制来恢复 PD-1/PD-L1 通路，使患者免疫功能得以部分重建。从这个角度讲，使用可溶性 PD-1 的治疗可能较抗 PD-1 抗体更有优势[13]。

综上，本文通过 RT-PCR 法与 ELISA 法证明了 PD-1 在 HIV/AIDS 患者 mRNA 表达下调，而 sPD-1 表达上调，两者的变化表明其共同参与维持免疫系统平衡，为今后进一步研究 PD-1 与 HIV 感染的关系提供有价值的实验数据，也为 PD-1 靶向诊断和治疗 HIV 感染的策略提供了理论依据。

利益冲突：无

本文引用格式：陈琛，赵长城，王勇，等. HIV/AIDS 患者外周血程序性死亡受体-1 的表达及临床意义[J]. 中国人兽共患病学报，2019，35(4)：320-323，329. DOI：10.3969/j.issn.1002-2692.2019.00.030

参考文献：

[1] 张福杰，王健，王福生，等. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 北京：人民卫生出版社，2012：6-7.

（下转第 329 页）