

IL-6 对 HIV 感染者 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞数量及功能的影响及其机制研究

张予晋, 汪海珍, 欧松, 王军文, 唐情

[摘要] 目的 探讨 IL-6 对 HIV 感染者 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞 [滤泡细胞毒性 T 细胞 (follicular cytotoxic T cells, TFC)] 数量及功能的影响。方法 将 2018 年 10 月—2020 年 12 月衡阳市第三人民医院就诊的 32 例未接受抗 HIV 治疗的 HIV 感染者纳入研究, 在有或者无 IL-6 刺激外周血单个核细胞或者 TFC 的情况下, 通过体外培养对比分析 TFC 数量、功能和凋亡的差异。结果 在 IL-6 刺激的情况下, TFC 的数量增加、功能增强及凋亡水平降低。结论 对于 HIV 感染者, IL-6 具有增强 TFC 数量和功能的作用。

[关键词] 人类免疫缺陷病毒; 艾滋病; 白细胞介素 -6; 滤泡细胞毒性 T 细胞; 滤泡辅助性 T 细胞

[中国图书资料分类号] R512.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2021)06-0498-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2021.06.005

Effect of IL-6 on number and function of CXCR5⁺CD8⁺ T cells in HIV-infected patients and its mechanism

ZHANG Yu-jin, WANG Hai-zhen, OU Song, WANG Jun-wen, TANG Qing*

Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China

*Corresponding author, E-mail: 857844031@qq.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of interleukin-6 (IL-6) on the number and function of CXCR5⁺CD8⁺ T cells, that is follicular cytotoxic T cells (TFC) in HIV-infected patients. **Methods** Thirty-two HIV-infected patients who were not treated with anti-HIV therapy and were admitted to Hengyang Third People's Hospital from October 2018 to December 2020 were enrolled. In the presence or absence of IL-6 stimulation for peripheral blood mononuclear cells and TFC, the difference regarding the number, function and apoptosis of TFC by *in vitro* culture were compared and analyzed. **Results** IL-6 stimulation could increase the number of TFC, enhance the function of TFC and reduce the apoptosis of TFC. **Conclusions** IL-6 can increase the number and enhance the function of TFC in HIV-infected patients.

[Key words] HIV; AIDS; IL-6; follicular cytotoxic T cells; follicular helper T cells

HIV 主要感染 CD4⁺ T 细胞, 而 HIV 特异性 CD8⁺ T 细胞具有抑制 HIV 复制的作用^[1]。在慢性 HIV 感染过程中, HIV 特异性 CD8⁺ T 细胞数量和功能会逐渐耗竭^[2], 对 HIV 的控制和清除作用也随之降低, 因此寻找增加或者维持 CD8⁺ T 细胞数量和功能措施对持续控制 HIV 复制至关重要。目前的抗 HIV 药物能够抑制或者消除复制的 HIV, 但在 HIV 感染过程中, 有部分 HIV 整合到静止的 CD4⁺ T 细胞并长期处于“休眠”状态, 这部分病毒称为潜伏 HIV, 目前药物无法清除潜伏 HIV, 并且停药后潜伏 HIV 能够迅速“苏醒”并反弹, 是目前抗病毒治疗不能停药的原因。近年研究发现, CD8⁺ T 细胞的亚群 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞 [滤泡细胞毒性 T 细胞 (follicular cytotoxic T cells, TFC)] 在控制慢性病毒感染中发挥重要作用^[3]。一些研究报道, TFC 主要分布于淋巴结^[4], 并且

具有控制潜伏或非潜伏 HIV 的作用^[5]。因此, 研究增加 TFC 数量及功能的措施对控制和清除 HIV 具有重要作用。

TFC 和滤泡辅助性 T 细胞 (follicular helper T cells, TFH) 都属于 T 细胞, 并且都存在于淋巴结。以前人们对于 TFH 的发育特点及调控机制研究的较多。有研究显示, 白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6) 具有促进 TFH 分化的作用^[6], 能够增加 CD4⁺ T 细胞中 CXCR5 的表达, 并且 IL-6 能够增强 TFH 的数量和功能。而在 HIV 感染中, IL-6 对 TFC 的作用尚不明确, 相关报道较少。本研究利用 HIV 感染者的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 标本, 通过体外实验检测 IL-6 对 TFC 数量及功能的影响及并探讨其机制, 为寻找提高 TFC 数量及功能的措施提供思路。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2018 年 10 月—2020 年 12 月在衡阳市第三人民医院就诊的 HIV 感染者 32 例为研究对象。所有感染者均经过确证实验及 HIV 载量检测为 HIV 感染。入选标准为 18 ~ 60 岁且未经过抗

[基金项目] 2020 年度湖南省教育厅科学研究项目 (20C1424); 2020 年度湖南省中医药科研计划项目 (2020101)

[作者单位] 410005 长沙, 湖南中医药大学第二附属医院皮肤科 (张予晋、汪海珍); 421005, 衡阳市第三人民医院传染科 (欧松); 410208 长沙, 湖南中医药大学国际教育学院院长办公室 (王军文), 2020 级研究生教学 1 班 (唐情); 410100, 长沙县妇幼保健院外科 (唐情)

[通信作者] 唐情, E-mail: 857844031@qq.com

病毒治疗的 HIV 感染者。排除孕妇、合并机会性感染、合并肿瘤、合并 HBV 或 HCV 感染者。32 例患者均为男性，平均年龄为 31.6 (18 ~ 57) 岁、CD4⁺ T 细胞计数平均为 277 (90 ~ 522) 个/μl，病毒载量平均为 2.26×10^5 ($7.57 \times 10^2 \sim 9.76 \times 10^6$) 拷贝/ml。提取同一感染者的 PBMC，同时进行 IL-6 刺激 (IL-6 刺激组) 或者不刺激 (对照组) 培养后进行 TFC 数量及功能的比较。

1.2 HIV 载量及 CD4⁺ T 细胞检测 采用罗氏 cobas TaqMan HIV 载量检测方法进行 HIV 载量检测，利用 BD 公司的 T 细胞计数检测试剂盒进行 CD4⁺ T 细胞计数检测。

1.3 流式检测 用密度梯度离心法得到 PBMC 后，进行流式染色，所用到的流式抗体包括 Anti-human CD3 PerCP、Anti-human CXCR5 BV421 及细胞凋亡试剂盒均来自美国 BD 公司，Anti-human CD8 FITC、Anti-human CD107a eFluor 660、Anti-human IFN-γ PE-Cy7、Anti-human TNF-α PE、CD28 均购自美国 eBioscience 公司。圈门策略包括先圈淋巴细胞群，再圈 CD3 阳性的 T 细胞群，在 CD3 阳性的细胞群中圈 CD8⁺ T 细胞群，在 CD8⁺ T 细胞群中圈 CXCR5 阳性亚群，然后针对 CXCR5 阳性亚群检测其分泌 CD107a、IFN-γ、TNF-α 水平及细胞凋亡水平。

1.4 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞的分选 每 10^7 个 PBMC 中加入 20 μl 的 CD8 Microbeads (购自德国美天妮公司)，充分混合，4 °C 冰箱孵育 15 min。洗涤

后，过 MS 柱 (购自德国美天妮公司) 后，收集 CD8⁺ T 细胞。上流式机器检测 CD8⁺ T 细胞的纯度。再用 CXCR5 BV421 染色后进行流式分选。

1.5 IL-6 刺激的细胞培养 将外周血分离的 PBMC 或从 PBMC 分离的 CXCR5⁺CD8⁺ T 细胞用培养液 (10% 胎牛血清，1% 双抗，89% 1640 培养液) 混悬，用 HIV pol、gag 和 env 抗原的重叠肽刺激 (JPT，柏林，德国，1 μg/ml)，加或者不加 IL-6 刺激 48 h 后进行流式染色。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22 软件对数据进行统计分析。计量资料符合正态分布者用 $\bar{x} \pm s$ 表示，非正态分布者用中位数 (四分位数) 表示，2 组间比较用成组 *t* 检验 (组间方差齐) 或非参数检验。计数资料用频数、率或构成比表示，2 组间比较用四格表 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-6 对 CXCR5 在 CD8⁺ T 细胞上的表达的影响 为研究 IL-6 对 TFC 数量和功能的影响，本研究首先分析了 IL-6 对 CD8⁺ T 细胞上 CXCR5 表达的影响。将 HIV 感染者的 PBMC 用 IL-6 刺激 (IL-6 刺激组) 及未用 IL-6 刺激 (对照组) 培养 48 h 后比较 CXCR5 在 CD8⁺ T 细胞上表达的差异。结果显示，用 IL-6 刺激 48 h 后，CXCR5 在 CD8⁺ T 细胞上表达水平明显增加 (图 1)。

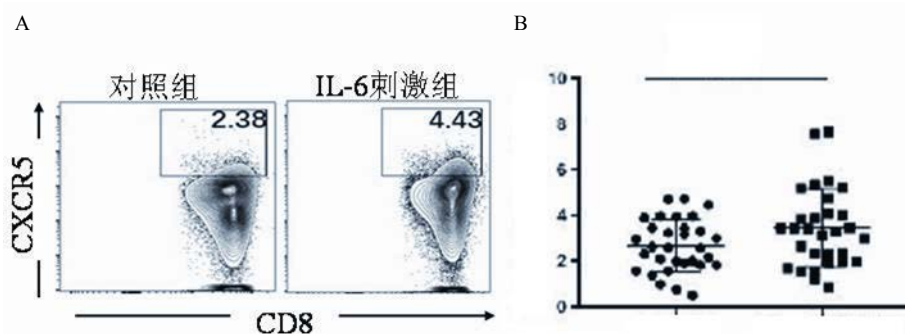


图 1 IL-6 刺激对 HIV 感染者 CXCR5 在 CD8⁺ T 细胞上表达水平的影响

A. 典型流式图; B. 统计分析图

Figure 1 Level of CXCR5 expression on CD8⁺ T cells in HIV-infected patients after IL-6 stimulation

2.2 IL-6 刺激对 TFC 功能的影响 为进一步研究 IL-6 对 TFC 功能的影响，将 HIV 感染者 PBMC 分离得到的 TFC 48 h 后检测 TFC 分泌 TNF-α、IFN-γ 及 CD107a 的水平。结果显示，TFC 分泌 CD107a (图 2A)，IFN-γ (图 2B) 及 TNF-α (图 2C) 的水平均显著升高。

2.3 IL-6 刺激对 TFC 凋亡水平的影响 因 IL-6 具有维持细胞生存的作用，为进一步探讨 IL-6 对 TFC 的影响，本研究检测了 IL-6 对 TFC 凋亡的影响。结果显示，体外刺激 TFC 48 h 后，IL-6 刺激组 TFC 的凋亡水平明显低于对照组 (图 3)。

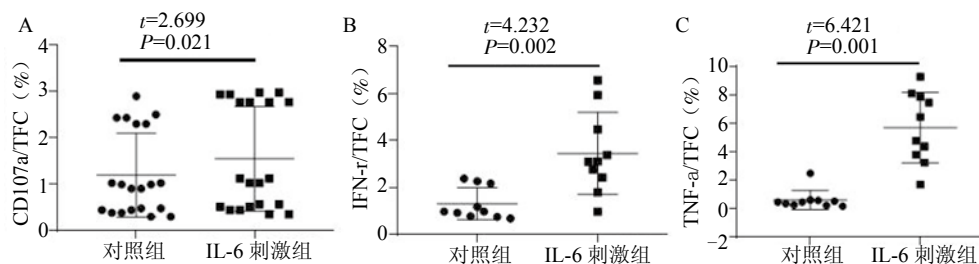


图 2 IL-6 刺激对 HIV 感染者 TFC 功能的影响

A. IL-6 刺激对 TFC 分泌 CD107a 的影响; B. IL-6 刺激对 TFC 分泌 IFN- γ 的影响; C. IL-6 刺激对 TFC 分泌 TNF- α 的影响

Figure 2 Effect of IL-6 stimulation on function of TFC in HIV-infected patients

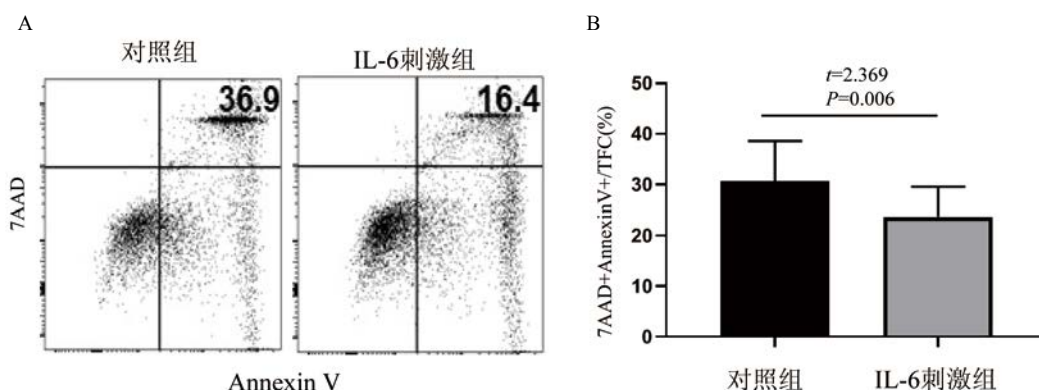


图 3 IL-6 刺激对 HIV 感染者 TFC 细胞凋亡的影响

A. 典型流式图; B. 统计图

Figure 3 Effect of IL-6 stimulation on apoptosis of TFC in HIV-infected patients

3 讨 论

TFH 和 TFC 分别属于 T 细胞的辅助细胞亚群和杀伤细胞亚群, 都主要分布于淋巴结。对于 TFH 的研究较早, 对于影响 TFH 数量和分化的细胞因子及其机制报道较多。有研究表明, IL-6 增强 TFH 功能, 并具有促进 TFH 分化和增值的作用。但关于 IL-6 对 TFC 的作用报道较少。IL-6 对 TFC 是否具有与 TFH 相似的作用值得研究。本研究利用体外实验, 研究了 IL-6 对 HIV 感染者 TFC 数量及功能的影响, 结果表明, IL-6 在体外能够增加 TFC 的数量和功能。这与 Hu 等^[7]报道的 IL-6 能够增加 TFC 的数量和功能观点一致。但与 Yang 等^[8]报道的不一致, Yang 等^[8]报道 IL-6 对 TFC 的功能具有一定的增强作用, 但无统计学差异, 这可能与培养时间有关, 本研究中的体外培养时间是 48 h, Yang 等^[8]的培养时间是 80 h。本研究进一步探讨 IL-6 对 TFC 的作用机制, 发现 IL-6 具有降低 TFC 凋亡的作用, 且具有一定的时效性, 这也可能是本研究与 Yang 等^[8]报道不一致的原因。

有多篇文献报道了 IL-6 对 TFH 作用机制的通路。IL-6 可通过 JAK-STAT 信号通路途径诱导

CD4⁺ T 细胞内 Bcl-6 的表达^[9], Bcl-6 能够增强 CXCR5 基因的转录和表达, 从而增加了 TFH 的数量和功能。对于 HIV 感染者 IL-6 对 TFC 作用的信号通路机制尚无报道。IL-6 对 TFC 作用通路的途径是否与 TFH 一致值得进一步研究。

本研究发现, IL-6 具有增强 TFC 数量和功能的作用, 可能与 IL-6 降低 TFC 的凋亡有关。TFC 的主要作用在于控制潜伏及非潜伏 HIV 的复制^[10]。鉴于本研究为体外实验, 该 IL-6 刺激的 TFC 在体内是否也具有抑制潜伏 HIV 的作用尚须进一步研究。有研究报道 TGF- β 具有增强 TFC 的作用^[8], TGF- β 和 IL-6 共同刺激能否进一步增加 TFC 的数量和功能值得深入探讨。

总之, 本研究通过体外实验证实了 IL-6 对 TFC 数量和功能的影响, 发现对于 HIV 感染者, IL-6 具有增强 TFC 数量和功能的作用, 该作用可能与 IL-6 能够降低 TFC 的凋亡有关。但其具体的信号通路尚须进一步探讨。此外, 鉴于 TFC 在 HIV 感染中具有抑制病毒的作用, IL-6 是否具有临床应用前景也值得进一步研究。

(下转第 522 页)

- susceptibilities of yeast isolates causing invasive infections across urban Beijing, China [J]. *Future Microbiol*, 2017, 12(12):1075–1086.
- [4] 田涸. 2015—2017 年某医院念珠菌感染及其耐药性分析 [J]. *中国真菌学杂志*, 2019, 14(1):37–41.
- [5] 张鑫, 陈华伟, 徐云雷, 等. 北京市平谷区医院的感染性疾病病原菌分布及耐药性 [J]. *传染病信息*, 2020, 33(6):562–565.
- [6] Nanchal RS, Ahmad S. Infections in liver disease [J]. *Crit Care Clin*, 2016, 32(3):411–424.
- [7] Ghobrial C, Mogahed EA, El-Karakasy H. Routine analysis of ascitic fluid for evidence of infection in children with chronic liver disease: is it mandatory? [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10):e203808.
- [8] Fernandez J, Acevedo J, Wiest R, *et al.* Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis [J]. *Gut*, 2018, 67(10):1870–1880.
- [9] 季柏林, 雷永良, 徐丽霞, 等. 肝病住院患者真菌感染调查与药敏分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(5):1047–1049, 1057.
- [10] Alexopoulou A, Vasilieva L, Agiasotelli D, *et al.* Fungal infections in patients with cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4):1043–1045.
- [11] Bucses T, Schwabl P, Mandorfer M, *et al.* Prognosis of cirrhotic patients with fungiascites and spontaneous fungal peritonitis (SFP) [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6):1452–1454.
- [12] Xiao M, Chen SC, Kong F, *et al.* Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in China: an update from the CHIF-NET study [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(Suppl 2):S139–S147.
- [13] Sikora M, Kuthan R, Piskorska-Malolepsza K, *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of the emerging fungal species, *Candida nivariensis*, isolated in a teaching hospital in Poland [J]. *Pol J Microbiol*, 2019, 68(3):303–308.
- [14] Gabaldon T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43(5):517–547.
- [15] Zeng ZR, Tian G, Ding YH, *et al.* Surveillance study of the prevalence, species distribution, antifungal susceptibility, risk factors and mortality of invasive candidiasis in a tertiary teaching hospital in Southwest China [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):939. DOI: 10.1186/s12879-019-4588-9.
- [16] Bezerra AR, Oliveira C, Correia I, *et al.* The role of non-standard translation in *Candida albicans* pathogenesis [J]. *FEMS Yeast Res*, 2021, 21(4). DOI: 10.1093/femsyr/foab032.
- [17] 张敬霞, 崔恩博, 张鞠玲, 等. 肝病患者无菌部位酵母菌感染的临床特征及抗真菌药物的敏感性分析 [J]. *中国真菌学杂志*, 2020, 15(1):15–21.
- [18] Tits J, Cools F, de Cremer K, *et al.* Combination of miconazole and domiphen bromide is fungicidal against biofilms of resistant *Candida* spp [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(10). DOI: 10.1128/AAC.01296–20.
- [19] Feng Y, Chen W, Jia Y, *et al.* N-Heterocyclic molecule-capped gold nanoparticles as effective antibiotics against multi-drug resistant bacteria [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(27):13223–13227.
- [20] 任晓慧, 周有骏, 陈新, 等. 深部真菌感染及其治疗药物研究现状 [J]. *武汉工业学院学报*, 2012, 31(1):22–27.
- (2021-06-01 收稿 2021-11-06 修回)
(本文编辑 揣征然)

(上接第 500 页)

【参考文献】

- [1] Morvan MG, Teque FC, Locher CP, *et al.* The CD8⁺ T cell noncytotoxic antiviral responses [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2021, 85(2):e00155–20. DOI: 10.1128/mmb.00155–20.
- [2] Zheltkova V, Argilaguet J, Peligero C, *et al.* Prediction of PD-L1 inhibition effects for HIV-infected individuals [J]. *PLoS Comput Biol*, 2019, 15(11):e1007401.
- [3] Leong YA, Chen Y, Ong HS, *et al.* CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(10):1187–1196.
- [4] Jiao YM, Yang HG, Huang HH, *et al.* Dichotomous roles of programmed cell death 1 on HIV-specific CXCR5(+) and CXCR5(-) CD8(+) T cells during chronic HIV infection [J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1786. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01786.
- [5] Yu D, Ye L. A portrait of CXCR5+ follicular cytotoxic CD8⁺ T cells [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(12):965–979.
- [6] Pontarini E, Murray-Brown WJ, Croia C, *et al.* Unique expansion of IL-21+ Tfh and Tph cells under control of ICOS identifies Sjogren's syndrome with ectopic germinal centres and MALT lymphoma [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(12):1588–1599.
- [7] Hu J, Feng X, Valdearcos M, *et al.* Interleukin-6 is both necessary and sufficient to produce perioperative neurocognitive disorder in mice [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 120(3):537–545.
- [8] Yang HG, Jiao YM, Huang HH, *et al.* Transforming growth factor-beta promotes the function of HIV-specific CXCR5(+) CD8 T cells [J]. *Microbiol Immunol*, 2020, 64(6):458–468.
- [9] Pedros C, Altman A, Kong KF. Role of TRAFs in signaling pathways controlling T follicular helper cell differentiation and T cell-dependent antibody responses [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2412. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02412.
- [10] 赵海燕, 刘萍萍, 尹飞. HIV 感染者滤泡细胞毒性 T 细胞与疾病进展的关系及功能分析 [J]. *传染病信息*, 2020, 33(6):509–512.
- (2021-08-30 收稿 2021-10-24 修回)
(本文编辑 张云辉)