·调查报告与分析·

IL-15 及其受体在 HIV 感染中表达及意义*

任园园，丁子丹，王盼，殷林波，傅雅静，姜拥军，张子宁

【摘　要】**目的**　研究人免疫缺陷病毒（HIV）感染者外周血单个核细胞（PBMC）中白细胞介素 15（IL-15）、白细胞介素 15 受体 α（IL-15Rα）及解聚素-金属蛋白酶 17（ADAM17）mRNA 的表达，探讨其在 HIV 感染疾病进展中的作用。**方法**　应用实时定量 PCR（RT-PCR）检测 9 例 HIV 早期感染者（感染 < 1 年，EHI 组）、30 例慢性 HIV 感染者（感染 ≥ 1 年，CHI 组）及 9 例健康对照（NC 组）PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM-17 mRNA 水平。**结果**　CHI 组 PBMC 中 IL-15 mRNA 的表达明显高于 NC 组（$P < 0.01$）；EHI 组及 CHI 组 PBMC 中 IL-15Rα、ADAM17 mRNA 的表达明显高于 NC 组（$P < 0.05$）；HIV 感染者 PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 的表达与病毒载量（VL）呈正相关（$P < 0.05$）；HIV 感染者 IL-15 mRNA 表达与 IL-15Rα mRNA 表达呈正相关（$P < 0.001$），IL-15Rα mRNA 表达与 ADAM17 mRNA 表达水平呈正相关（$P < 0.001$）。**结论**　HIV 感染后 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 表达上调，皆与 HIV 病毒复制水平相关。

【关键词】HIV；白细胞介素 15；白细胞介素 15 受体 α；解聚素-金属蛋白酶 17
中图分类号:R 512.91　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2019)02-0105-04　**DOI**:10.11847/zgggws1121092

Expression and significance of interleukin-15 and its receptor in HIV infection individuals

REN Yuan-yuan, DING Zi-dan, WANG Pan, et al (*National Health Commission Key Laboratory of AIDS Immunology*, *Key Laboratory of AIDS Immunology of Chinese Academy of Medical Sciences*, *Key Laboratory of AIDS Immunology of Liaoning Province*, *Department of Laboratory Medicine*, *The First Affiliated Hospital of* China *Medical University*, *Shenyang* , *Liaoning Province* 110001, China)

【**Abstract**】**Objective**　To study expressions of interleukin-15 (IL-15), interleukin-15 receptor α (IL-15Rα) and a disintegrin and metalloprotease domain 17 (ADAM17) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-infected individuals and to explore roles of the expressions in the progression of HIV infection. **Methods**　Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to detect IL-15, IL-15Rα and ADAM17 mRNA in PBMC of 9 early HIV-infected individuals (infected within one year, EHI group), 30 chronic HIV-infected individuals (infected for more than one year, CHI group), and 9 healthy controls (NC group). **Results**　The expression of IL-15 mRNA in PBMC of CHI group was significantly higher than that in NC group ($P < 0.01$). The expression of IL-15Rα and ADAM17 mRNA in PBMC of EHI group and CHI group was significantly higher than those in NC group (both $P < 0.05$). The expression of IL-15, IL-15Rα and ADAM17 mRNA in PBMC of HIV-infected individuals were positively correlated with viral load (VL) ($P < 0.05$). IL-15 mRNA expression in PBMC was positively correlated with IL-15Rα mRNA expression in HIV-infected individuals ($P < 0.001$), and IL-15Rα mRNA expression was positively correlated with ADAM17 mRNA expression ($P < 0.001$). **Conclusion**　HIV-infection increases the expression of IL-15, IL-15Rα, and ADAM17 in PBMCs and their expressions are related to HIV viral load in HIV-infected individuals.

【**Key words**】human immunodeficiency virus; interleukin-15; interleukin-15 receptor α; ADAM17

截止至 2018 年 6 月底，我国约 82 万人感染人免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）[1]，HIV 流行形势仍然严峻[2]。白细胞介素 15（interleukin-15, IL-15）是重要的 γ 链细胞因子，通过反式呈递的方式发挥作用，即与白细胞介素 15 受体 α 链（interleukin-15 receptor α, IL-15Rα）结合，呈递给表达 IL-15 受体 β 链/γ 链二聚体的细胞，发挥促进 $CD8^+$记忆性 T 细胞长期存活等多种生物学作用[3]。解聚素－金属蛋白酶 17（a disintegrin and metalloprotease domain 17, ADAM17）作为一种膜结合酶，具有水解细胞因子受体的活性[4]，可以切割 IL-15Rα[5]，影响其表达水平。以往研究发现 IL-15 在 HIV 感染者血浆中含量下降[6]，但近期有报道称 HIV 感染后血浆中 IL-15 水平增高[7]。鉴于文献中关于 HIV-1 感染后 IL-15 水平的差异，本研究通过 RT-PCR 检测 HIV 感染者外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells, PBMC）中 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达量的变化，探讨其与疾病进展的关系。

* **基金项目**：国家“十三五”重大科技专项（2017ZX10201101）；国家自然科学基金（81371884）
作者单位：中国医科大学附属第一医院检验科 国家卫生健康委员会艾滋病免疫学重点实验室（中国医科大学）中国医学科学院艾滋病免疫学重点实验室 辽宁省艾滋病免疫学重点实验室，辽宁 沈阳 110001
作者简介：任园园（1994－），女，蒙古族，内蒙古通辽人，硕士在读，研究方向：免疫学。（丁子丹同为本文第一作者）
通信作者：张子宁，E-mail：zi_ning101@hotmail.com
数字出版日期：2018 - 11 - 20 11:19
数字出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20181120.1119.002.html

1 对象与方法

1.1 对象　39 例未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者来自辽宁、吉林省等地，男性 38 名，女性 1 名，年龄分布为 18 ~ 70 岁。其中 9 例为 HIV 早期感染者（early HIV infection, EHI）组，入选标准为抗体阳转 1 年之内，平均年龄（27 ± 5.89）岁，$CD4^+T$ 细胞绝对值为（450.33 ± 222.85）cells/μL，病毒载量（4.27 ± 0.27）log/mL；30 例为慢性 HIV 感染者（chronic HIV infection, CHI）组，感染时间 ≥ 1 年，平均年龄（34.1 ± 12.45）岁，$CD4^+T$ 细胞绝对值为（444.53 ± 252.58）cells/μL，病毒载量（3.94 ± 0.73）log/ml；9 名健康者为对照（normal control, NC）组，为随机抽取的 HIV 抗体阴性，未暴露于 HIV 的健康人。

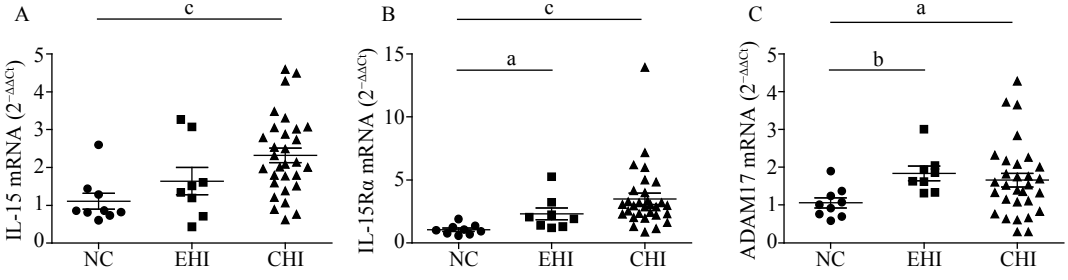
1.2 主要仪器与试剂　PCR 仪（德国 Eppendorf 公司），7500 型实时荧光定量 PCR 系统（美国 Applied Biosystems 公司），总 RNA 提取试剂盒（德国 QIAGEN 公司），反转录试剂盒（日本 Takara 公司），实时定量 PCR 试剂（日本 Takara 公司），mRNA 引物（北京六合华大基因科技有限公司合成）。

1.3 RT-PCR 检测 PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM-17 mRNA 表达　利用 Ficoll 梯度离心法分离 PBMC，按照试剂盒说明提取总 RNA。按照反转录试剂盒手册操作，合成 cDNA。实时定量 PCR 法检测 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达水平，*GAPDH* 做为内参照。引物序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计，引物：IL-15，上游引物：5′-TCT GAT CAT CCT AGC AAA CAA C-3′，下游引物：5′-CAA TCA AGA AGT GTT GAT GAA CAT-3′，产物片段 130 bp；IL-15Rα，上游引物：5′-AAC AGC CAA GAA CTG GGA ACT-3′，下游引物：5′-TTG CCT TGA CTT GAG GTA GCA T-3′，产物片段 136 bp；ADAM17，上游引物：5′-GTA TCT GAA CAA CGA CAC CTG-3′，下游引物：5′-CTC CTG GCA CTT CTT CTG G-3′，产物片段 108 bp。目的基因 mRNA 表达水平的计算方法为相对定量法，计算公式为 $2^{-\Delta\Delta CT}$。

1.4 统计分析　采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计量资料用 Unpaired t test with Welch′s correction 进行组间数据比较；用 Spearman 进行相关性分析；数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，$P < 0.05$ 时有统计学意义。应用 GraphPad Prism 5.0 绘图软件进行绘图。

2 结　果

2.1 PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM17mRNA 表达水平（图 1）　研究结果显示，随 HIV 疾病进展，PBMC 中 IL-15、IL-15*R*、ADAM17 mRNA 表达水平逐渐升高，CHI 组 PBMC 中 IL-15 mRNA 表达与 NC 组相比显著增高（$P < 0.001$）（图 1 A）。CHI 组及 EHI 组 PBMC 中 IL-15Rα mRNA 表达与 NC 组相比存在显著差异（$P < 0.05$）（图 1 B），而 CHI 组及 EHI 组 PBMC 中 ADAM17 mRNA 与 NC 组相比同样存在显著差异（$P < 0.05$）（图 1 C）。



注：a $P < 0.05$，b $P < 0.01$，c $P < 0.001$。

图 1　PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达水平

2.2 HIV 感染者 IL-15、IL-15Rα、ADAM17mRNA 表达与 $CD4^+T$ 细胞计数及病毒载量的相关性（图 2）　随着 HIV 疾病进展，在未治疗的前提下，患者病毒载量逐渐增高，$CD4^+T$ 淋巴细胞逐渐减少，患者 PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达水平逐渐升高，PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达水平与病毒载量皆呈正相关（$P < 0.05$）（图 2 A），另外，IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达水平与 $CD4^+T$ 细胞计数呈负相关趋势，其中 ADAM17 mRNA 表达水平与 $CD4^+T$ 细胞计数有显著负相关（图 2 B）。

2.3 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 3 者 mRNA 表达水平的相关性（图 3）　研究发现 HIV 感染者及 NC 组 PBMC 中 IL-15 mRNA 表达与 IL-15Rα mRNA 表达呈正相关（$r = 0.4734$, $P < 0.001$）（图 3 A）。另外还发现 HIV 感染者及健康对照组 PBMC 细胞中 ADAM17 mRNA 表达与 IL-15Rα mRNA 表达水平呈正相关（$r = 0.546\ 9$, $P < 0.001$）（图 3 C），但 HIV 感染者及健康对照组 PBMC 细胞中 ADAM17 mRNA 的表达与 IL-15 mRNA 表达无相关性（$r = 0.112\ 4$, $P > 0.05$）（图 3 B）。

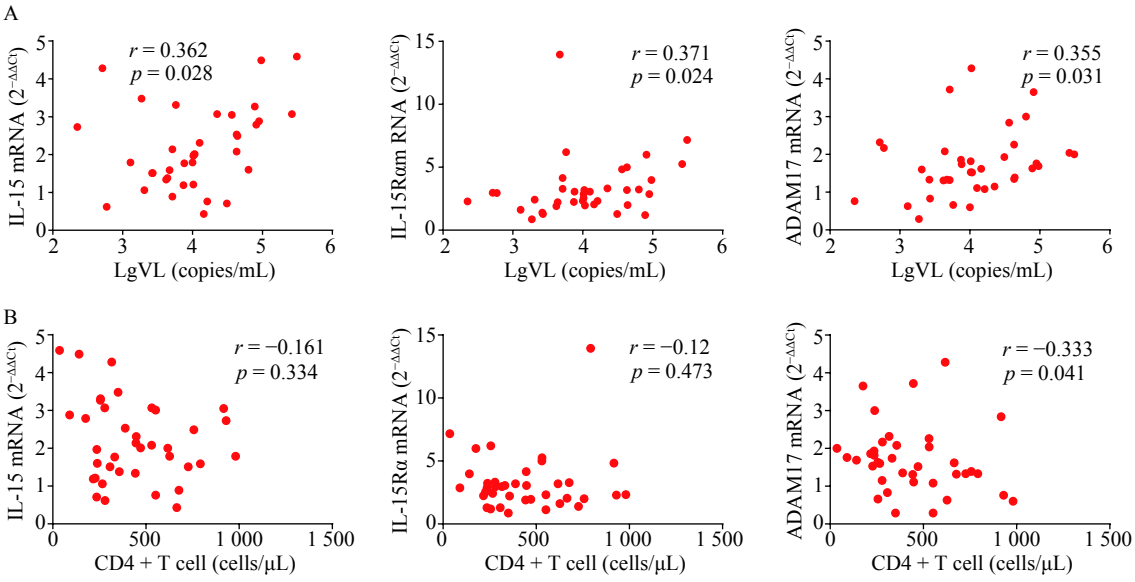


图 2　HIV 感染者 IL-15、IL-15Rα、ADAM17 mRNA 表达水平与 CD4⁺T 细胞计数及病毒载量的相关性

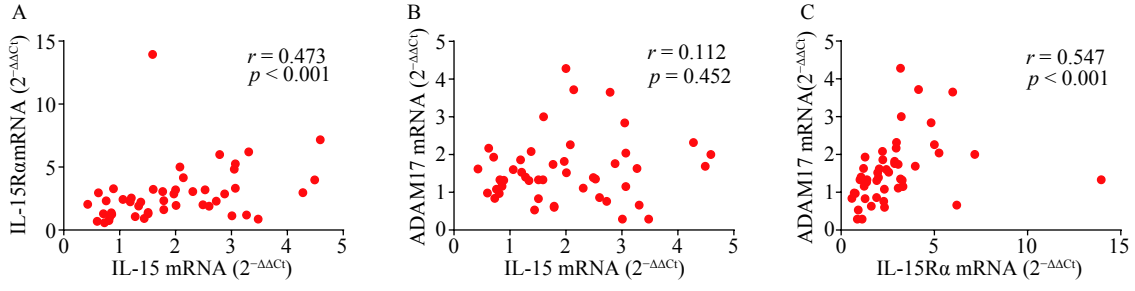


图 3　PBMC 中 IL-15、IL-15Rα、ADAM173 者 mRNA 表达相关性

3　讨　论

HIV 感染后体内免疫应答激活，淋巴细胞、单核-巨噬细胞等产生并分泌细胞因子，多种促炎性细胞因子血浆水平升高，增强机体抗病毒免疫应答，但机体细胞因子分泌失调，促炎性细胞因子的大量分泌可能导致免疫过度活化。IL-15 促进 T 细胞的生存及功能[8]，但同时作为促炎性细胞因子，可通过非 HIV-1 特异性 T 细胞过度激活机制等参与免疫异常激活[9]。Swaminathan 等[7]研究发现，HIV 感染者血浆中 IL-15 水平随病毒载量升高而升高，与本研究结论一致，提示病毒水平的升高，可能反馈性调控 IL-15 升高。此外，我们发现 HIV 感染早期 IL-15 mRNA 表达水平无显著增加，推测促炎性细胞因子等导致的免疫损伤是逐渐积累的过程，早期 HIV 感染者体内免疫损伤较轻，而发展至慢性期后机体免疫功能受损严重，导致机体 IL-15 及 IL-15Rα 等表达量反馈性增加。研究显示，慢性病毒感染小鼠体内，耗竭 CD8⁺T 细胞表面 CD122 表达降低，且对 IL-15 等细胞因子反应较差[10]。推测可能在 HIV-1 感染发展至慢性期后，CD4/CD8⁺T 淋巴细胞对涉及 IL-15 的信号转导途径及稳态调节反应不佳，需要通过高水平的 IL-15 表达量保持体内正常生理功能。

IL-15Rα 介导的反式呈递是 IL-15 主要信号传导机制，与 IL-15 结合后延长其血清半衰期，增加其稳定性及与 CD122 的亲和力[11]。ADAM17 通过减少膜结合型 IL-15Rα，增加可溶性 IL-15Rα（soluble interleukin-15 receptor α，sIL-15Rα）参与并调节 IL-15 的信号传导[5]。本研究发现，HIV 感染上调 IL-15Rα 及 ADAM17 的表达。Bouchaud 等[12−13]发现 sIL-15Rα 可能提高 IL-15Rβ/γ 对 IL-15 的亲和力，而在感染早期，IL-15 表达量尚未明显增高，提示机体可能通过增加 IL-15Rα 或增加 ADAM17 以产生 sIL-15Rα 的方式加强 IL-15 受体对 IL-15 的亲和力，促进 IL-15 与受体的结合及信号转导。最后，我们发现 IL-15 与 IL-15Rα 表达呈正相关，IL-15Rα 与 ADAM17 表达呈正相关。以往研究显示 IL-15 刺激不会诱导信号细胞上 IL-15Rα 表达的上调[14]，但本实验结果显示 IL-15 与 IL-15Rα 基因表达密切相关，提示体内可能存在同时控制两者基因活性的机制。如前所述，ADAM17 具有切割细胞表面 IL-15Rα 的功能[9]，可导致细胞表面 IL-15Rα 减少，IL-15Rα 表达反馈性增加，与本研究结果相符。

综上所述，IL-15 作为调节免疫应答的重要细胞因子，在 HIV 感染慢性期时表达增高，IL-15Rα 与 ADAM17 于 HIV 感染后表达上调，且 3 者表达水平

皆与 HIV 病毒载量相关，为明确 IL-15 在 HIV 感染中的作用提供重要数据。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心. 2018 年第 2 季度全国艾滋病性病疫情[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(8): 755.

[2] 周金玲, 王莉, 周丹, 等. 辽宁省 1993 — 2015 年艾滋病病例特征分析[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(8): 1209 – 1212.

[3] Bergamaschi C, Kulkarni V, Rosati M, et al. Intramuscular delivery of heterodimeric il-15 DNA in macaques produces systemic levels of bioactive cytokine inducing proliferation of NK and T cells[J]. Gene Therapy, 2015, 22(1): 76 – 86.

[4] Yan I, Schwarz J, Lücke K, et al. ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6Rα from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2015, 99(5): 749 – 760.

[5] Anthony SM, Howard ME, Hailemichael Y, et al. Soluble interleukin-15 complexes are generated *in vivo* by type I interferon dependent and independent pathways[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120274.

[6] Ahmad R, Sindhu ST, Toma E, et al. Studies on the production of IL-15 in HIV-infected/AIDS patients[J]. J Clin Immunol, 2003, 23(2): 81 – 90.

[7] Swaminathan S, Qiu J, Rupert AW, et al. Interleukin-15 (IL-15) strongly correlates with increasing HIV-1 viremia and markers of inflammation[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0167091.

[8] Wang Y, Bai Y, Li Y, et al. IL-15 enhances activation and IGF-1 production of dendritic epidermal T cells to promote wound healing in diabetic mice[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 1557.

[9] Bastidas S, Graw F, Smith MZ, et al. Cd8+ T cells are activated in an antigen-independent manner in HIV-infected individuals[J]. The Journal of Immunology, 2014, 192(4): 1732 – 1744.

[10] Wherry EJ. T cell exhaustion[J]. Nat Immunol, 2011, 12(6): 492 – 499.

[11] Ring AM, Lin JX, Feng D, et al. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between interleukin-2 and interleukin-15[J]. Nature Immunology, 2012, 13(12): 1187 – 1195.

[12] Bouchaud G, Garrigue-Antar L, Sole V, et al. The exon-3-encoded domain of IL-15 alpha ralpha contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15ralpha[J]. J Mol Biol, 2008, 382(1): 1 – 12.

[13] Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15r[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(24): 9166 – 9171.

[14] Park JY, Ligons DL, Park JH. Out-sourcing for trans-presentation: assessing T cell intrinsic and extrinsic IL-15 expression with IL-15 gene reporter mice[J]. Immune Netw, 2018, 18(1): e13.

收稿日期: 2018 - 08 - 31 （吴少慧编校）