

白细胞介素 21 对 SHIV 感染的恒河猴外周血 CD8⁺ T 细胞分泌 γ 干扰素的影响

赵长城, 高锡强, 吴芳新, 张伟伦, 薛 婧, 魏 强, 秦 川

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 研究白细胞介素 21 (interleukin 21, IL-21) 对 SHIV 感染 CD8⁺ T 细胞分泌干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 的影响。方法 从 SHIV/恒河猴模型外周血中分选出 CD8⁺ T 细胞, 加入 IL-21 诱导培养, 应用 ELISA 方法检测细胞培养上清液中 IFN- γ 浓度, RT-PCR 方法检测细胞中 IFN- γ mRNA 的表达水平, 流式细胞术检测分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞所占的百分比。结果 10 ng/mL IL-21 明显促进 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ ($P < 0.05$), IFN- γ mRNA 的表达明显升高, 4 h 为刺激 CD8⁺ T 细胞胞内 IFN- γ 合成的最佳时间。结论 IL-21 对 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 有促进作用。

【关键词】 白细胞介素 21; 干扰素- γ ; 免疫调节; 细胞因子; 恒河猴

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0005-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.002

Effect of Interleukin 21 on the IFN- γ Secretion by Peripheral Blood CD8⁺ T Lymphocytes of SHIV-Challenged Rhesus Monkeys

ZHAO Chang-cheng, GAO Xi-qiang, WU Fang-xin, ZHANG Wei-lun, XUE Jing, WEI Qiang, QIN Chuan
(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical
Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human
Disease Animal Models, State administration of Traditional Chinese medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of IL-21 on secretion of IFN- γ in CD8⁺ T cells of rhesus monkeys infected by SHIV. **Methods** The in vitro study was carried out on the culture of CD8⁺ T cells isolated from rhesus monkey models infected by SHIV. CD8⁺ T cells were incubated with various concentrations of IL-21 (1 ~ 15 ng/mL). Then IFN- γ concentrations in the supernatant were detected by ELISA, RT-PCR was performed to detect the expression of IFN- γ mRNA in the CD8⁺ T cells, and the percentage of IFN- γ -positive CD8⁺ T cells was assayed by flow cytometry. **Results** IL-21 (10 ng/mL) significantly increased IFN- γ level ($P < 0.05$) in the supernatant of CD8⁺ T cell culture, compared with that in the control group. The expression of IFN- γ mRNA was significantly enhanced. IFN- γ which requires de novo synthesis following activation peaked at 4 h post stimulation. **Conclusion** IL-21 can increase the secretion of IFN- γ in vitro.

【Key words】 Interleukin 21; IFN- γ ; Immunoregulate; Cytokine; Rhesus monkey

[基金项目] 十二·五国家科技重大专项(2012ZX10004-501); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(DWS201015)资助。

[作者简介] 赵长城(1974-), 男, 博士, 研究方向: 病毒学和细胞因子研究; E-mail: zccand@163.com。

[通讯作者] 魏强, 教授, 博士生导师。E-mail: weiqiang0430@sohu.com; 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

IL-21 是一种新近发现的、具有免疫调节作用的细胞因子,可通过多条途径影响 CD8⁺ T 细胞介导的抗病原体作用^[1],但目前对于 IL-21 在抗 SIV/SHIV 感染中的作用研究很少。本研究测定了 IL-21 诱导 SHIV 感染猴外周血 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的水平,以期掌握 IL-21 体外诱导病毒特异性的细胞免疫的动力学规律,为今后艾滋病发病机制的研究、HIV 候选疫苗的筛选提供参考。

1 材料和方法

1.1 标本来源

健康猴和 SHIV_{1157ipd3N4} 感染的中国恒河猴 EDTA 抗凝全血。

1.2 主要试剂

Mouse anti-monkey CD3 Ab (Invitrogen), Purified anti-human CD28 Ab (BD), APC anti-human IFN- γ Ab (BioLegend), FITC anti-human CD4 Ab (BioLegend), PE anti-human CD8a Ab (BioLegend), Brefeldin A (BFA) (BioLegend), Triazol (Invitrogen), AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、Ex Taq DNA 聚合酶 (大连宝生物), rhIL-21 (Invitrogen), Monkey IFN- γ ELISA^{PRO} kit (Mabtech), 淋巴细胞分离液 Ficoll-PaqueTM PLUS (GE), RPMI 1640 完全培养基 (含 10% FCS、2.5% 丙酮酸钠、1% 非必需氨基酸、2% 双抗)。

1.3 RT-PCR 引物设计及合成

恒河猴 IFN- γ 基因上下游引物序列^[2]分别为 5'-GCTTTTCAGCTCTGCATTGT-3' 和 5'-CGACAGTTCAGCCATCATTTG-3', GAPDH 上下游引物序列^[3]分别为 5'-ACCACCATGGAGAAGGCTGG-3' 和 5'-GGATGATGTTCTGGAGAGCC-3', 所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.4 外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞的分离

分离猴外周血单个核细胞 (PBMCs), 用 CD8⁺ T 细胞阳性磁珠 CD8 microbead kit nonhuman-primate (Miltenyi Biotec) 分选出 CD8⁺ T 细胞。再用 RPMI 1640 完全培养基培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱, 备用。

1.5 ELISA 检测 IL-21 诱导 CD8⁺ T 细胞培养上清液中 IFN- γ 浓度

用 RPMI 1640 完全培养基调 PBMCs 浓度为 1.0 \times 10⁶/mL, 24 孔板中每孔加入 1 mL。每孔分别加入 0、1、5、10 和 15 ng/mL IL-21 和 1 μ g/mL anti-CD3 刺激 48 h 后, 收集细胞培养上清液。应用

Human IL-21 ELISA MAXTM Deluxe SET (BioLegend) 检测上清液中 IFN- γ 的浓度。

1.6 RT-PCR 检测 IL-21 诱导 CD8⁺ T 细胞 IFN- γ mRNA 的表达水平

加入 1 μ g/mL anti-CD3 和 10 ng/mL IL-21 刺激 5.0 \times 10⁵ 个健康猴和感染猴 CD8⁺ T 细胞 48 h, 同时以未刺激的 CD8⁺ T 细胞作为阴性对照。TRIzol 法提取细胞总 RNA。将 RNA 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, PCR 扩增 IFN- γ 基因片段。扩增体系为 20 μ L, 其中 10 \times Ex Taq buffer 2 μ L、dNTPs 2 μ L、Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L、上下游引物 (20 μ M/ μ L) 各 0.8 μ L、cDNA 2 μ L、灭菌去离子水 12.2 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s (\times 35), 60 $^{\circ}$ C 30 s (\times 35), 72 $^{\circ}$ C 1 min (\times 35), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物 5 μ L, 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.7 流式细胞术分析 IL-21 诱导 IFN- γ 阳性 CD8⁺ T 细胞百分比

用完全培养基调 PBMCs 浓度为 1.0 \times 10⁶/mL。实验一: 预先用 1 μ g/mL anti-CD3 和 1 μ g/mL anti-CD28 孵育 PBMC 1 h, 接着分别在加入 10 μ g/mL BFA 后 1、2、3、4、5 和 6 h 加入 10 ng/mL IL-21。实验二: 设 CD3/CD28 组、IL-21 组、CD3/CD28 + IL-21 组, 并设空白对照组。CD3/28 组和 CD3/28 + IL-21 组分别加入 1 μ g/mL anti-CD3 + 1 μ g/mL anti-CD28 孵育 48 h 后, IL-21 组和 CD3/CD28 + IL-21 组分别加入 10 ng/mL IL-21, 以上四组均在实验前 5 h 加入 1 μ g/mL BFA。

孵育结束后, 首先进行胞外 anti-CD8、CD3 Ab 染色, 接着固定细胞、渗透。最后, 染胞内 anti-IFN- γ 抗体。检测分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞所占的百分比。

1.8 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差表示, 应用 Prism 5.0 统计软件进行分析。各组间指标比较用 *t* 检验, ***表示 *P* < 0.0001, **表示 *P* < 0.05。

2 结果

2.1 IL-21 诱导 SHIV 感染的 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的最佳作用浓度分析

未用 IL-21 刺激时, CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的量为 1046.97 \pm 60.61 pg/mL。当 IL-21 的浓度从 1 ng/mL 增加到 10 ng/mL 时, 其诱导感染的 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的量也相应增加, 并在 IL-21 为 10

ng/mL 时 IFN- γ 分泌量达到峰值(3280.17 \pm 267.42 pg/mL)。与 5 ng/mL IL-21 诱导的 IFN- γ 分泌量(1406.93 \pm 345.84 pg/mL)相比,10 ng/mL IL-21 诱导的 IFN- γ 分泌量明显增加,两者之间的差异有统计学意义($P = 0.0018$)。但 15 ng/mL IL-21 诱导的 IFN- γ 分泌量(2964.40 \pm 135.92 pg/mL)与 10 ng/mL IL-21 组比较,差异无统计学意义($P = 0.1423$)(图 1)。

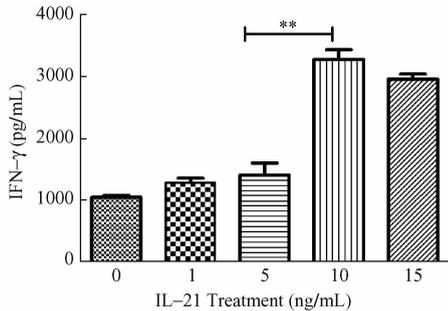


图 1 不同剂量 IL-21 处理的 CD8⁺ T 细胞培养上清液中 IFN- γ 浓度

Fig. 1 IFN- γ concentrations in the culture supernatant of CD8⁺ T cells stimulated with IL-21 at different doses

2.2 相同浓度 IL-21 刺激正常和感染 CD8⁺ T 细胞效果的比较

在没有加入 IL-21 之前,不论是正常还是感染的 CD8⁺ T 细胞,均产生一定基础水平的 IFN- γ (972.39 \pm 262.36 pg/mL vs. 1118.32 \pm 232.31 pg/mL),且两者差异不显著($P > 0.05$)。10 ng/mL IL-21 处理后,感染的 CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 量(3019.58 \pm 203.09 pg/mL)明显低于正常的 CD8⁺ T 细胞(7510.25 \pm 437.76 pg/mL) ($P < 0.0001$)(图 2)。

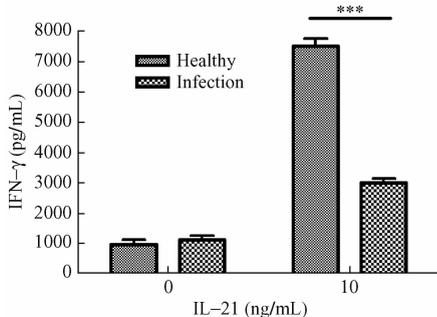


图 2 IL-21 诱导正常和感染 CD8⁺ T 细胞培养上清液中 IFN- γ 浓度

Fig. 2 IFN- γ concentrations in the culture supernatant of healthy and infected CD8⁺ T cells induced with IL-21

2.3 IL-21 处理后正常和感染 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的比较

RT-PCR 方法检测结果证实,IL-21 诱导组 IFN- γ mRNA 的表达较未刺激组明显增加(图 3)。

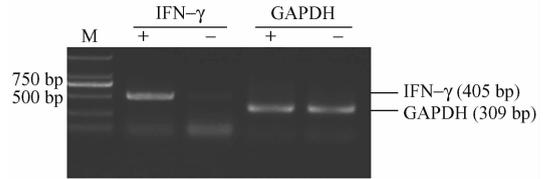


图 3 RT-PCR 检测感染 CD8⁺ T 细胞中 IFN- γ mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of IFN- γ mRNA in the infected CD8⁺ T cells by assayed by RT-PCR
M. 2000 bp marker; “+”: Stimulated with IL-21; “-”: Unstimulated with IL-21

2.4 IL-21 处理后 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的分析

适当的刺激时间是检测细胞因子的关键。因此,我们选择了不同时间点进行检测。结果显示,随着 IL-21 刺激时间的延长,分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞的百分比逐渐增加(图 4),并在刺激 4 h 时达到最高,随后逐渐下降。图 5 即为 IL-21 刺激 CD8⁺ T 细胞 4 h 时的流式图。

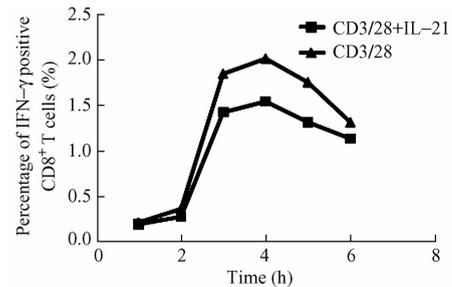


图 4 不同时间刺激后 IFN- γ 阳性 CD8⁺ T 细胞的百分比

Fig. 4 The percentage of IFN- γ -positive CD8⁺ T cells after different times of IL-21 stimulation

IL-21 诱导培养 PBMCs 48 h 后,应用流式技术检测不同刺激条件下,分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞所占全部 CD8⁺ T 细胞的百分比。与阴性对照组 [(0.28 \pm 0.08)%] 相比,CD3/CD28 组 [(1.55 \pm 0.15)%]、IL-21 组 [(0.74 \pm 0.10)%], CD3/CD28 + IL-21 联合组 [(2.04 \pm 0.20)%] 均能诱导 IFN- γ 阳性 CD8⁺ T 细胞所占的比例增加,且存在统计学上的差异($P < 0.0001$)。单独 IL-21 组诱导 IFN- γ 表达的作用弱于 CD3/CD28 组,但在 CD3/CD28 的

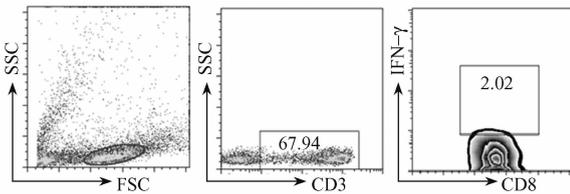


图 5 IL-21 刺激 CD8⁺ T 细胞 4 h 后 IFN- γ 阳性细胞百分率

Fig. 5 The percentage of IFN- γ -positive CD8⁺ T cells stimulated with IL-21 for 4 h

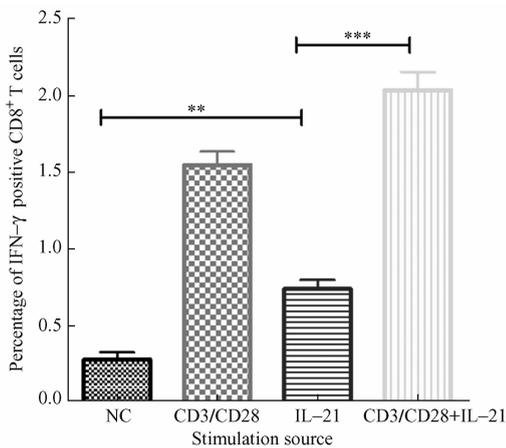


图 6 不同刺激源诱导的 IFN- γ 阳性 CD8⁺ T 细胞的比较

Fig. 6 Comparison of the percentages of IFN- γ -positive CD8⁺ T cells treated by different stimulators (CD3/CD28, IL-21, CD3/CD28 + IL-21 mixture), detected by flow cytometry.

协同下,IL-21 可以显著诱导 IFN- γ 的表达(图 6)。

3 讨论

适应性免疫反应在机体抗 HIV/SIV 感染中具有非常重要的作用。细胞免疫在控制病毒复制,延缓疾病进程的作用已得到证实^[4]。SHIV/恒河猴模型体内存在特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞参与的抗病毒免疫反应,IFN- γ 是免疫系统中非常重要的免疫调节因子,具有抗病毒,免疫调节和抗细胞异常增殖的作用,与病毒性疾病的严重程度密切相关。CD8⁺ T 细胞是 IFN- γ 合成的主要细胞^[5]。本文研究了 IL-21 对 SHIV 感染 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的作用,以及不同的条件培养基对于产生 IFN- γ 的影响。这些结果证实 IL-21 能调节 IFN- γ 的产生,提示 IL-21 在机体抗 HIV/SIV 感染中发挥积极的影响。

IL-21 具有促进感染 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的作用。CD8⁺ T 淋巴细胞是体内主要的效应细胞,研

究表明,体外实验中 IL-21 可诱导 CD8⁺ T 细胞产生 IFN- γ ^[6]。据报道,IL-21 对正常的 CD8⁺ T 细胞诱导 IFN- γ 呈剂量相关性^[7]。但本文应用 IL-21 刺激 SHIV 感染恒河猴外周血 CD8⁺ T 细胞,研究 IL-21 对 SHIV 感染的 CD8⁺ T 淋巴细胞诱导 IFN- γ 的能力,从图 1 可知,10 ng/mL IL-21 诱导 SHIV 感染恒河猴外周血 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 效果最佳,并不呈剂量相关性。由图 2 可见,使用相同浓度的 IL-21 分别诱导正常和感染的 CD8⁺ T 细胞,两者产生的 IFN- γ 均有不同程度的提高。但正常的 CD8⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 量显著高于感染的 CD8⁺ T 细胞。结果提示,SHIV 的感染部分影响了 CD8⁺ T 细胞的效应功能。本研究结果一方面证实了 IL-21 的确可以在一定程度上恢复缺失的 CD8⁺ T 细胞功能,同时也说明,单独 IL-21 尚不能完全纠正缺失的功能,以后需在 IL-21 与其协同作用物上深入研究。有报道证实,当它与 IL-15 或 IL-18 组合应用时,显示出明显的协同作用,强烈诱导细胞分泌 IFN- γ ^[8]。但其中机制尚不明了。应用 RT-PCR 方法从 mRNA 水平检测的结果,与应用 ELISA 方法从蛋白质水平检测的结果是一致的。

不同的条件培养基和刺激时间影响 IL-21 诱导的感染 CD8⁺ T 细胞产生 IFN- γ 的能力。目前,对细胞免疫的研究已经存在多种替代方法,而流式细胞术具有多色荧光染色的优势。应用其检测胞内细胞因子,特别是对 IFN- γ 的检测可以用来评价抗原特异性的细胞免疫水平。本研究应用流式技术检测 IL-21 诱导 PBMCs 后,结果证实,与对照组相比,IL-21 组、CD3/CD28 + IL-21 联合组中分泌 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞所占比例明显增加,且存在统计学上的差异($P < 0.0001$)。此外,在本次试验中我们也比较了不同的刺激时间产生 IFN- γ 的能力。结果表明 4 h 为刺激 CD8⁺ T 细胞胞内 IFN- γ 合成的最佳时间。因而推测 IL-21 对 SHIV/恒河猴模型的免疫水平有调节作用,其机制与诱导 IFN- γ 产生有关,但要充分理解 IL-21 的抗病毒作用尚需进行进一步的研究。

综上所述,本研究发现 IL-21 通过改善 CD8⁺ T 细胞的功能从而发挥重要的保护性作用,其作用机制可能与诱导 IFN- γ 分泌有关。本研究结果为 HIV/SIV 感染的治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Hogg AE, Bowick GC, Herzog NK, et al. Induction of

- granulysin in CD8⁺ T cells by IL-21 and IL-15 is suppressed by human immunodeficiency virus-1 [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5):1191-1203.
- [2] Huang D, Qiu L, Wang R, et al. Immune gene networks of mycobacterial vaccine-elicited cellular responses and immunity [J]. *J Infect Dis*, 2007, 195(1):55-69.
- [3] Nam K, Akari H, Terao K, et al. Peripheral blood extrathymic CD4⁺ CD8⁺ T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4⁺ CD8⁻ T cells in cynomolgus monkeys [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(7):1095-1103.
- [4] White L, Krishnan S, Strbo N, et al. Differential effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV) [J]. *Blood*, 2007, 109(9):3873-3880.
- [5] Melvin MJ, McGurn ME, Bort SJ, et al. Hypomethylation of the interferon gamma gene correlates with its expression by primary T-lineage cells [J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 246-230.
- [6] Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8⁺ T cell expansion and function [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(1):139-148.
- [7] Barker BR, Parvani JG, Meyer D, et al. IL-21 induces apoptosis of antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2007, 179(6):3596-3603.
- [8] Mari Strengell, Sampsa Matikainen, Jukka Sirén, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells [J]. *J Immunology*, 2003, 170: 5464-5469.

[修回日期]2012-02-06



2012 年中国实验动物学会科技奖奖项推荐启动

中国实验动物学会科技奖第二次推荐、评选和表彰活动将于 2012 年 2 月启动。2010 年首次学会科技奖评选共收到全国 24 个单位推荐的 31 项科研项目,经过形式审查,会议初审、终审、公示等程序,评选出了一等奖 1 项,二等奖 4 项,三等奖 11 个项目。该奖项 2008 年由科技部批准,为全国实验动物行业的最高科学技术奖。奖励面向全社会,凡在实验动物科学技术进步活动中做出突出贡献的单位、组织或个人均可申报。2012 年在基础研究类、技术发明类、应用研究类、国际科学技术合作类奖励基础上,增设了优秀青年人才类,奖励在实验动物科学研究、教育、普及,科技管理、成果推广转化等工作方面取出突出成绩,年龄 45 周岁以下的青年实验动物科技工作者。有关详细资料请登陆中国实验动物学会网站下载(<http://www.calas.org.cn>)。