

·论 著·

## HIV-1 B 亚型病毒感染者辅助蛋白 Vpr 特异性细胞免疫应答

刘沙,贾明明\*,郑扬,邵一鸣,洪坤学\*

**摘要:**目的 探讨 HIV-1 B 亚型病毒感染者针对辅助蛋白 Vpr 的细胞免疫(CTL)反应特征及其与病毒复制控制的关系。方法 利用检测 IFN- $\gamma$  分泌的 ELISPOT 方法,以覆盖 HIV-1 B 亚型 Vpr 蛋白全长的重叠肽段作为刺激抗原检测 143 例未接受抗病毒治疗的 HIV-1 B 亚型病毒感染者针对 Vpr 蛋白的特异性细胞免疫反应,并分析其与病毒载量的关系。结果 有 16.8% 的感染者可以产生针对 Vpr 蛋白的特异性 CTL 反应,能识别至少一条 Vpr 多肽的感染者的病毒载量低于不能识别 Vpr 多肽的感染者的病毒载量,差别有统计学意义( $P=0.0191$ )。对 VPR-B-3 多肽的识别与低病毒载量紧密相关,该多肽可能包含与 Vpr 蛋白的生物学功能相关的关键氨基酸位点。Vpr 蛋白区多肽在人群中的识别水平的差异与其序列变异程度有关。结论 Vpr 蛋白特异性的 CTL 反应与宿主对病毒复制的控制具有一定的相关性,对 Vpr 蛋白区所包含的 CTL 表位进行鉴定并探讨其在感染过程中的作用,可为 HIV 疫苗设计提供参考依据。

**关键词:** 人类免疫缺陷病毒;免疫应答;细胞毒性 T 淋巴细胞;病毒载量

中图分类号:R34 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)7-779-04

CTL responses directed against accessory protein Vpr in HIV-1 clade B infected individuals. LIU Sha, JIA Ming-ming, ZHENG Yang, et al. (National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China)

**Abstract:** Aim To investigate HIV-1 specific CTL responses directed against accessory protein Vpr and its impact on virus replication in HIV-1 clade B infected individuals. **Methods** 143 anti-retroviral therapy naive HIV-1 clade B infected subjects were assessed for HIV-1 specific CTL responses with an IFN- $\gamma$  Elispot assay by using overlapping peptides covering Vpr protein consensus sequence. Association between CTL responses and viral load was analysed. **Results** 16.8% of the study subjects recognized at least one overlapping Vpr peptide. Vpr-responsive subjects had lower plasma viral loads than that of non-responsive subjects, the difference is statistically significant ( $P=0.0191$ ). CTL recognition against OLP VPR-B-3 was correlated with low viral load suggesting that this peptide may contain amino acids critical for biological functions of Vpr protein. CTL responses against Vpr peptides in the study population were associated with Vpr sequence variation. **Conclusion** Vpr-specific CTL responses were correlated to the control of viral replication in the study population. Further characterization of the epitopes and their roles in pathogenesis of HIV-1 natural infection will benefit the design and testing of candidate vaccines.

**Key words:** HIV-1; Immune responses; Cytotoxic T-lymphocytes; Viral load

宿主的细胞免疫反应在 HIV 感染过程中对于控制病毒的复制具有重要作用<sup>[1,2]</sup>。研究 HIV 感染者体内的 T 细胞免疫反应特征并探索其与控制病毒复制间的关系可为免疫保护机制分析和 HIV 疫苗研究提供实验依据。HIV 辅助蛋白 Vpr 虽然仅由 96 个氨基酸构成,但其在 HIV 生活史和对宿主的致病机制中发挥重要的生物功能<sup>[3,4]</sup>。Vpr 蛋白特异性的 CTL 反应与控制病毒的复制的关系尚不明,但有报道显示 Vpr 蛋白在 HIV-1 感染过程中存在广泛的多态性,这可能与宿主体内的 CTL 识别压力相关<sup>[5]</sup>。本研究以我国中部地区 143 例未接受抗病毒治疗的 HIV-1 B 亚型病毒感染者为研究对象,利用 ELISPOT 技术检测 Vpr 蛋白特异性的 CTL 反应,并分析其与控制病毒复制的

关系。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 143 例未经抗病毒治疗的 HIV-1 感染者均经 Vironostika HIV Uni-Form II plus O 诊断试剂盒(BioMerix)作 HIV 抗体初筛,并用 GENELABS HIV BLOT 2.2 确证试剂盒(Genelabs)做 HIV 感染的确认,所有研究对象初次诊断时间均在 5 年以上。

**1.2 病毒载量测定** 用 Roche 公司 COBAS AMPLOCOR HIV-1 定量检测试剂盒(RT-PCR 法)在 COBAS AMPLOCOR 全自动 PCR 检测仪上定量测定感染者血浆中 HIV-1 RNA 含量,检测下限为 50 拷贝/ml。

**1.3 酶联免疫斑点实验(ELISPOT)** 刺激抗原为覆盖

基金项目 国家自然科学基金项目(No.81172809) 国家传染病防治研究项目(No.2012ZX10001-008)

作者单位 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心传染病预防控制国家重点实验室 北京 102206

作者简介 刘沙(1982~),女,大专,技师,主要从事免疫检验工作。

\*通讯作者 Email: hongkx@chinaaids.cn; jiamingming@gmail.com

HIV-1 B 亚型 Vpr 蛋白氨基酸序列全长的 11 条肽段 , 肽段长 15~18 个氨基酸 , 相邻肽段有 10 个氨基酸重叠。应用 Ficoll 密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞(PBMC)。ELISpot 实验步骤如下 :以抗人 IFN- $\gamma$  的单克隆抗体包被 96 孔 PVDF 膜酶标板 ,4℃ 过夜 ,PBS 洗板后 ,加入抗原肽 10 $\mu$ l 和 1.0 $\times$ 10<sup>5</sup> PBMC ,阳性对照孔以 PMA 和 Ionomycin 为刺激源 ,于 37℃ CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 14h。先后加入生物素标记的抗人 IFN- $\gamma$  的单克隆抗体和碱性磷酸酶标记的链酶亲和素 Streptavidin-ALP-PQ ,最后加入底物显色液 NBT 和 BCIP 显色 ,Immunospot 读数仪(CTL 公司)读数 ,结果以斑点形成细胞数 (spot forming cell,SFC)表示 ,以反应孔斑点数扣除阴性对照斑点数来计算结果 ,单孔大于 50SFC/10<sup>6</sup> PBMC 并且大于阴性对照三倍以上为阳性。

1.4 统计学分析 统计分析及作图使用 SigmaPlot10.0 和 GraphPad Prism 5.0 完成。两组之间的差异用 Mann-Whitney U 分析完成 ;两组之间率的比较用 Fisher s 精确概率法完成。

2 结果

2.1 Vpr 蛋白在 HIV-1 B 亚型病毒感染者中的 CTL 识别特征 在 Vpr 蛋白区的 11 条多肽中 ,有 10 条可以被至少一位感染者所识别。其中 ,人群识别率最

高的为 VPR-B-2 (GPQREPYNEWTLLEEL) ,有 7.0%(10/143)的感染者可以检测到针对该多肽的特异性 CTL 反应。就整个 Vpr 蛋白来说 ,有 16.8%(24/143)的感染者可以识别至少一条 Vpr 蛋白区的多肽 (图 1)。我们还分析了针对 Vpr 蛋白区各多肽的 CTL 免疫反应的反应强度 (SFC/10<sup>6</sup> PBMC) ,以及针对 Vpr 蛋白的 CTL 免疫反应的累积反应强度 (SFC/10<sup>6</sup> PBMC) ,结果显示各肽段的识别率和反应强度存在较大差异 ,见表 1。

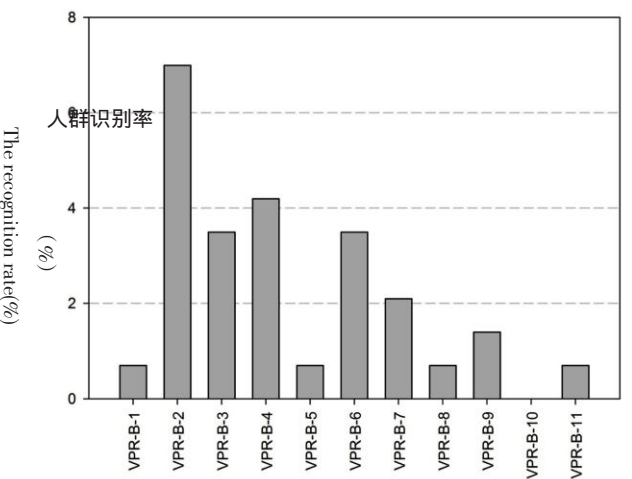


图 1 Vpr 多肽在 HIV-1 B 感染者中的识别频率  
Figure 1 Recognition frequency of Vpr peptides in HIV-1 clade B infected individuals

表 1 Vpr 蛋白在 HIV-1 B 亚型病毒感染者中的 CTL 识别特征

Table 1 CTL recognition characteristics of Vpr proteins in HIV-1 clade B infected individuals

类别 A category	Average Entropy	阳性识别人数 Positive identification number	反应强度(SFC/10 <sup>6</sup> PBMC)Response strength			
			最小值	最大值	平均值	中位数
			Minimun value	Maximun value	Mean value	Median
VPR-B-1	0.1862	1	150.0	150.0	150.0	150.0
VPR-B-2	0.1831	10	58.3	426.7	199.8	182.5
VPR-B-3	0.2048	5	68.3	456.7	243.5	272.5
VPR-B-4	0.3351	6	70.0	420.0	185.1	112.5
VPR-B-5	0.3093	1	90.0	90.0	90.0	90.0
VPR-B-6	0.2349	5	70.0	180.0	148.0	155.0
VPR-B-7	0.2543	3	60.0	430.0	183.9	61.67
VPR-B-8	0.2597	1	280.0	280.0	280.0	280.0
VPR-B-9	0.2006	2	90.0	120.0	105.0	105.0
VPR-B-10	0.3434	0	-	-	-	-
VPR-B-11	0.3857	1	92.5	92.5	92.5	92.5
Vpr 蛋白	0.2621	24	70.0	945.0	268.3	180.0

2.2 Vpr 蛋白特异性的 CTL 反应与病毒载量的关系 对能识别至少一条 Vpr 多肽和不能识别 Vpr 多肽的感染者间病毒载量水平进行比较分析 ,结果表明能识别至少一条 Vpr 多肽的感染者的病毒载量要低于不能识别 Vpr 多肽的感染者的病毒载量 ,差别有统计学

意义 (Mann-Whitney U 值=994.0 ;P=0.0191)(图 2)。提示 Vpr 蛋白特异性的 T 细胞反应与病毒复制的控制具有一定关联性。为进一步分析 Vpr 蛋白区各多肽在控制病毒复制中的作用 ,将 24 位可以识别 Vpr 蛋白区多肽的感染

者根据病毒载量分为病毒控制组(病毒载量低于检测限,共9人)和非病毒控制组(病毒载量高于检测限,共15人),比较两组间Vpr蛋白各多肽的识别频率。经Fisher's精确概率法分析表明VPR-B-3(EWTLELLEELKREAVRHF)多肽在病毒控制组中的识别频率(5/9)要明显高于非病毒控制组中的识别频率(0/15)( $P=0.0030$ )。而其余多肽在两组之间的识别频率的差异均没有统计学意义。

2.3 Vpr蛋白序列多样性与CTL免疫应答的关系从LANL数据库([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov))下载748条HIV-1 B亚型Vpr基因序列,利用该数据库提供的Shannon Entropy-One工具对各氨基酸位点进行Entropy值的计算,从而判断各位点氨基酸变异情况(图3)。通过对11条Vpr多肽所包含氨基酸位点的平均Entropy值分析,发现在所有肽段中识别频率最高的多肽VPR-B-2(GPQREPYNEWTLLEEL)所包含氨基酸位点的平均Entropy值最低(0.1831),表明其序列最为保守(表1)。而序列变异性最大的多肽VPR-B-11(SRIGIRQRRARNGASRS)平均Entropy值为0.3857,在本研究中仅可以被1位感染者识别。多肽VPR-B-10(HFRIGCQHSRIGIRQRR)的平均Entropy值0.3434仅次于VPR-B-11,本研究中没有感染者可以识别该多肽。

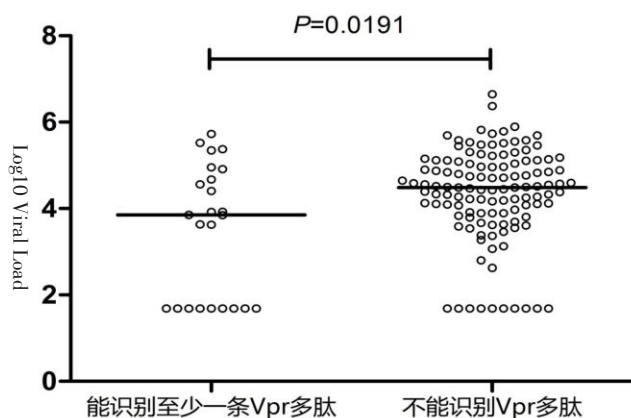


图2 识别及不识别Vpr蛋白感染者之间病毒载量水平比较  
Figure 2 Comparison of viral load between Vpr-responsive subjects and non-responsive subjects

### 3 讨论

Vpr蛋白由96个氨基酸组成,仅有14kDa大小,但其在HIV的复制周期及致病机制中具有十分重要的生物学功能,包括影响逆转录过程的准确性、引导整合前复合体(包含病毒cDNA)入核、使被感染的宿主细胞停留在细胞分裂周期的G2/M期、诱导宿主细胞凋亡、反式激活某些宿主基因、抑制宿主免疫激活等功能<sup>[3]</sup>。虽然Vpr蛋白是HIV晚期表达产物,但是其在前一复制周期即通过与Gag-p6蛋白的相互作用

,被装配入HIV病毒颗粒内,在感染新的宿主细胞时,Vpr蛋白在感染初期即发挥重要作用<sup>[6]</sup>。由于Vpr蛋白的重要功能,任何影响其功能的氨基酸突变都会造成病毒复制能力的变化。本研究结果显示能够识别Vpr蛋白的感染者的病毒载量水平显著低于不能识别Vpr蛋白的感染者,这表明针对Vpr蛋白的CTL反应与控制病毒的复制有关。可能是在宿主的CTL压力下,Vpr蛋白的某些关键的氨基酸位点发生了逃逸突变,导致Vpr蛋白的生物学功能下降甚至丧失,从而造成病毒复制能力和致病性的下降<sup>[7-8]</sup>。

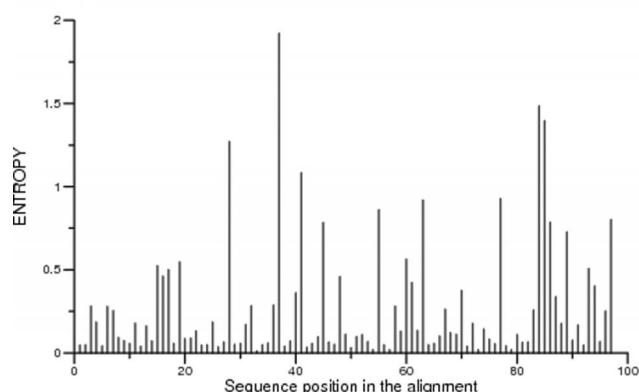


图3 Vpr蛋白氨基酸位点的变异程度分析(Entropy)

Figure 3 Variation analysis of amino acids of Vpr protein (Entropy)

本研究中能够识别VPR-B-3多肽(EWTLELLEELKREAVRHF, 17~34aa)的5位感染者病毒载量均低于检测低限(50拷贝/ml)。在Vpr蛋白的结构中,17~33aa氨基酸区段为N端第一个 $\alpha$ 螺旋结构域<sup>[9]</sup>。序列分析发现VPR-B-3多肽的平均Entropy值为0.2048,保守性仅次于VPR-B-1和VPR-B-2。在这5位能够识别VPR-B-3多肽的感染者中有4位也可以识别VPR-B-2,提示这些感染者中识别的CTL表位可能位于两条肽段的重叠区域(EWTLELLEEL, EL10, 17~26aa)。EL10中氨基酸位点的平均Entropy值仅为0.1730,说明保守程度高的氨基酸位点可能对于病毒本身的复制更为重要,一旦这些氨基酸位点因承受了较大的免疫选择压力而发生突变,将造成病毒复制能力的下降。进一步分析发现,EL10中序列变异程度最小的两个氨基酸位点分别为N端第二位氨基酸(Entropy=0.057)和C末端氨基酸(Entropy=0.036)。如果EL10肽段是被识别的CTL表位,上述两个氨基酸位点正好是该表位的锚定残基位。锚定残基位的突变会导致其与MHC分子的不匹配而发生逃逸。而高度保守的锚定残基位说明该表位在HIV感染者体内很少发生逃逸,一旦针对该表位的CTL反应被诱导,病毒将很难通过突变来逃脱宿主的免疫压力。通过表位鉴定实验来验证这种推

测,将是我们下一步工作的重点。

本研究结合序列分析的结果发现,最保守的氨基酸区段能够更多地被 HIV 感染者识别,而相对不保守的区段由于宿主体内病毒在相应位置容易发生突变从而逃避 CTL 的识别。另外由于宿主体内病毒序列和本研究中所用的共享序列(consensus)检测肽段序列不完全匹配,可能造成一部分针对突变病毒的 CTL 反应不能被检测出来。利用宿主自体来源的序列而非共享序列来设计检测肽段,将有利于提高检测 HIV 感染者体内的 CTL 反应效率。由于人群遗传背景的不同和 HIV 流行毒株的差异,不同人群针对 Vpr 蛋白识别的免疫优势区域也不相同。Novitsky 等在非洲感染 HIV-1 C 亚型病毒的人群进行的研究中,其 Vpr 蛋白区的免疫优势区域为 31~50aa<sup>[10]</sup>。本研究中识别率最高的免疫优势区域为 VPR-B-2 (GPQREPYNEWTLELLEEL, 9~26aa),而 31~50aa 氨基酸区段所覆盖的多肽 VPR-B-5 (HFPRPWLHGLGQHIYETY, 33~50aa)仅能被 1 位感染者识别。

本研究分析了 HIV-1 B 亚型病毒感染者中针对 Vpr 蛋白的细胞免疫反应特征,发现 Vpr 蛋白特异性的 CTL 反应与病毒复制的控制具有一定的关联。Vpr 蛋白区多肽在人群中的识别水平的差异与其序列变异程度有关。对 VPR-B-3 多肽的识别与低病毒载量紧密相关,该多肽可能包含与 Vpr 蛋白的生物学功能相关的关键氨基酸位点。进一步对 Vpr 蛋白区所包含的 CTL 表位进行精细鉴定,将有利于我们更加深入地了解 Vpr 蛋白特异性的 CTL 反应在 HIV 感染病程控制中的作用。

## 参考文献

- [1] Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load [J]. *Nat Med* 2007, 13:46-53.
- [2] Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells [J]. *Blood*, 2006, 107:4781-4789.
- [3] Romani B, Engelbrecht S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions[J]. *J Gen Virol* 2009, 90: 1795-1805.
- [4] Majumder B, Venkatachari NJ, Srinivasan A, et al. HIV-1 mediated immune pathogenesis: spotlight on the role of viral protein R (Vpr)[J]. *Curr HIV Res* 2009, 7:169-177.
- [5] Srinivasan A, Ayyavoo V, Mahalingam S, et al. A comprehensive analysis of the naturally occurring polymorphisms in HIV-1 Vpr: potential impact on CTL epitopes[J]. *Virol J*. 2008, 5:99-106.
- [6] Muller B, Tessmer U, Schubert U, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells[J]. *J Virol* 2000, 74:9727-9731.
- [7] Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention[J]. *Retrovirology*. 2011, 8:25.
- [8] Brumme ZL, Brumme CJ, Heckerman D, et al. Evidence of differential HLA class I-mediated viral evolution in functional and accessory/regulatory genes of HIV-1[J]. *PLoS Pathog*. 2007, 3(7):e94.
- [9] Sharifi HJ, Furuya AM, de Noronha CM. The role of HIV-1 Vpr in promoting the infection of nondividing cells and in cell cycle arrest[J]. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012, 7(2): 187-94.
- [10] Novitsky V, Cao H, Rybak N, et al. Magnitude and frequency of cytotoxic T-lymphocyte responses: identification of immunodominant regions of human immunodeficiency virus type 1 subtype C[J]. *J Virol* 2002, 76:10155-10168.

收稿日期 2012-04-12 编辑 符式刚