

· 实验室研究 ·

艾滋病病毒长期不进展者、缓慢进展者、 高危暴露者以及正常人群 APOBEC3G mRNA 水平的差异

刘永健 李林 鲍作义 刘思扬 庄道民 李韩平 李敬云

【摘要】 目的 检测我国中部地区艾滋病病毒(HIV)流行区 4 类不同人群 APOBEC3G(hA3G) mRNA 水平的差异并分析其与疾病进程的关系。方法 采集研究人群的静脉全血标本,分离外周血单核细胞(PBMCs),冻存于液氮中;复苏 PBMCs,提取总 RNA, mRNA 体外逆转录为 cDNA,应用实时定量聚合酶链反应(PCR)检测不同人群血标本 APOBEC3G mRNA 的水平。结果 HIV 长期不进展者标本 13 份,其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数平均为(716 ± 169)个/μl,平均感染时间为(12.5 ± 2.3)年; HIV 缓慢进展者标本 48 份,其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数平均为(233 ± 144)个/μl,平均感染时间为(10.7 ± 2.2)年。HIV 长期不进展者 APOBEC3G mRNA 水平高于正常人群的水平; HIV 缓慢进展者 APOBEC3G mRNA 水平高于高危人群和正常人群的水平。HIV 长期不进展者和缓慢进展者的 CD₄⁺ T 淋巴细胞数量与 APOBEC3G mRNA 水平无相关性。结论 我国中部地区 HIV 流行区 4 类不同人群 APOBEC3G mRNA 水平存在差异,并且 HIV 长期不进展者和缓慢进展者 CD₄⁺ T 淋巴细胞数量与 APOBEC3G mRNA 水平无相关性。

【关键词】 艾滋病病毒; APOBEC 蛋白; mRNA 水平

Study on the difference of the APOBEC3G mRNA levels among HIV long-term nonprogressors, slow progressors, people at high risks and normal people LIU Yong-jian, LI Lin, BAO Zuo-yi, LIU Si-yang, ZHUANG Dao-min, LI Han-ping, LI Jing-yun. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China
Corresponding author: LI Jing-yun, Email: lijy@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective To examine the APOBEC3G (hA3G) mRNA levels of four different groups in the human immunodeficiency virus (HIV) prevalent areas in central China and to analyze the relationship between hA3G mRNA levels and HIV disease progression. **Methods** We collected peripheral blood and isolated the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and then cryo-preserved the PBMCs in liquid nitrogen. Prior to the total extraction of RNA, PBMCs were resuscitated and mRNA were reverse Transcribed to cDNA in vitro. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to test hA3G mRNA levels of different groups. **Results** There were 13 HIV long term non-progressors with the mean CD₄⁺ T lymphocyte count as (716 ± 169) per μl and the mean affection time as (12.5 ± 2.3) years. There were 48 HIV slow progressors with the mean CD₄⁺ T lymphocyte count as (233 ± 144) per μl and the mean affection time as (10.7 ± 2.2) years. The hA3G mRNA level of HIV long term nonprogressors was higher than that of normal people while the hA3G mRNA level of HIV slow progressors was higher than that of normal people and high risk people. There were no correlations between CD₄⁺ T lymphocyte count and hA3G mRNA levels of HIV long term nonprogressors as well as in HIV slow progressors. **Conclusion** There was difference found in the hA3G mRNA levels of four groups in the HIV popular area in central China while no correlation between CD₄⁺ T lymphocyte count and hA3G mRNA levels of HIV long term nonprogressors as well as in HIV slow progressors were found.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; APOBEC protein; mRNA level

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471496)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室

通讯作者:李敬云, Email:lijy@nic.bmi.ac.cn

APOBEC 蛋白可以使胞嘧啶脱氨基,具有体外抗逆转录病毒的作用^[1-3]。其中 APOBEC3 家族有 A~G 七个成员,它们排列在 22 号染色体上^[4],APOBEC3G(hA3G)是研究较多的一个。在 HIV-1 的辅助蛋白 Vif 不存在的情况下,hA3G 被打包进入病毒颗粒,并且导致病毒基因组发生 G→A 的高度变异^[3,5]。在病毒颗粒内部,Vif 蛋白通过阻止 hA3G 蛋白的壳体化和诱导 hA3G 蛋白酶体途径降解,来抵抗 hA3G 蛋白的作用^[6,7]。然而,过量表达 hA3G 能够阻断 Vif 对 hA3G 的降解作用,表明调控 hA3G 的表达是抗病毒治疗的一个新的策略^[8,9]。本研究应用了 $\Delta\Delta C_t$ 相对定量法,检测了 HIV 感染者中的部分长期不进展人群、缓慢进展人群、高危暴露人群以及正常人群 hA3G mRNA 的相对水平,并比较不同人群之间的差异。

材料与方 法

1. 人群定义: HIV 感染长期不进展者(LTNPs):感染时间 > 10 年,没有接受过抗病毒治疗,CD₄⁺ T 淋巴细胞数 > 500 个/ μ l^[10-12]。HIV 感染缓慢进展者(SP):感染时间 > 10 年,没有接受过抗病毒治疗,CD₄⁺ T 淋巴细胞数 < 500 个/ μ l^[13,14]。HIV 高危暴露者(HR):HIV 感染者的配偶,有正常的夫妻生活,本人 HIV 抗体阴性。正常人群(NP):未曾暴露于 HIV,HIV 抗体阴性的人群。

2. 样本: 13 份 HIV 感染 LTNPs 血标本,其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数均 > 500 个/ μ l; 48 份 HIV 感染 SP 标本,其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数均 < 500 个/ μ l; 29 份 HIV HR 标本;以上标本均于 2002 年采集自河南省农村;11 份 2004 年采集的 NP 静脉全血标本。实验对照:2004 年分离的 NP 外周血单核细胞(PBMCs)20 管,每次实验以其中一管为对照。所有样本均分离 PBMCs,液氮冻存待检。

3. CD₄⁺ T 淋巴细胞计数:HIV LTNPs 和 SP 全血标本经 EDTA 抗凝,以 BD 公司 CD₃/CD₄/CD₈ 三色试剂,上流式细胞仪使用 Multiset 软件测定 CD₄⁺ T 淋巴细胞绝对计数。

4. PBMCs 总 RNA 提取:37℃ 复苏液氮冻存的 PBMCs,吸取细胞悬液 100 μ l,使用 Bioflux 公司总 RNA 提取试剂盒(Simply P Total RNA Extraction Kit)提取总 RNA。

5. 由 mRNA 逆转录生成 cDNA:使用 TaqMan

Reverse Transcription Reagent (ABI) 试剂盒,采用 10 μ l 的反应体系:1 μ l 10× TaqMan RT 缓冲液,2.2 μ l MgCl₂ (25 mmol), 2 μ l dNTP (10 mmol), 0.5 μ l 随机引物 (50 μ mol), 0.2 μ l RNA 酶抑制剂 (20 U), 0.25 μ l 反转录酶 (50 U), 3.85 μ l RNA 样本。反应条件:25℃ 孵育 10 min, 48℃ 反转录 30 min, 95℃ 灭活反转录酶 5 min。

6. 实时荧光定量 PCR:以 SYBR Green 作为荧光染料,以人 β -actin 作为标准化对照,设计针对 hA3G 和 β -actin 的特异性引物,应用 $\Delta\Delta C_t$ 相对定量法,测定 hA3G mRNA 的相对水平。每份样本做 2 复孔。引物序列见表 1。采用 50 μ l 的反应体系:25 μ l Power SYBR Green PCR Master Mix,浓度为 20 μ mol 的正向引物、反向引物各 0.5 μ l, cDNA 产物 1 μ l, 水 23 μ l。反应条件:50℃ 2 min→ 95℃ 10 min;然后 95℃ 15 s→60℃ 1 min,40 个循环,在 60℃ 步骤收集荧光信号。

表1 实时定量 PCR 反应引物序列

引物	引物序列(5'~3')	参考序列
hA3G	正向 GCTCCACATAAACACGGTTTC	NM_021822
	反向 AAGGGAATCACGTCAGGAA	
β -actin	正向 CTGGCACCCAGCACAAATG	NM_001101
	反向 GCCGATCCACACGGAGTACT	

7. hA3G mRNA 丰度水平的计算:以健康人群的 PBMCs 为实验对照,将其 hA3G mRNA 相对于 β -actin mRNA 的水平定为 1,其余标本与实验对照作比较。每次实验均以一管 2004 年分离的 NP PBMCs 为实验对照,这样就使每次实验有了可比性。表 2 是选取了 3 份标本,计算其 hA3G mRNA 水平的方法。

表2 hA3G mRNA 水平的计算

标本	平均 C _t		标准化的 hA3G 表达 (ΔC_t)	校准的 hA3G 表达 ($\Delta\Delta C_t$)	变化倍数 $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$
	hA3G	β -actin			
对照	27.715	25.715	2.000	0.000	1.00
1	25.455	23.550	1.905	-0.095	1.07
2	25.780	23.690	2.090	0.090	0.94
3	27.765	26.220	1.545	-0.455	1.37

8. 统计学分析:应用 SPSS 10.0 软件对结果进行统计分析。

结 果

1. HIV LTNPs、SP CD₄⁺ T 淋巴细胞数目检测:

使用流式细胞仪 FACSCalibur 测定 CD₄⁺ T 淋巴细胞绝对计数, HIV LTNP 标本 13 份, 其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数平均为 (716 ± 169) 个/μl; HIV SP 标本 48 份, 其 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数平均为 (233 ± 144) 个/μl。

2. 检测 hA3G mRNA 的实时定量 PCR 扩增: 图 1 是一个标本的实时定量 PCR 扩增曲线图, 横轴是检测标本的 C_t 值, 纵轴是 ΔRn (荧光信号减去基线的信号, 它随着 PCR 扩增的而增加, 直至 PCR 到达平台期)。hA3G 和 β-actin 各做 2 孔, 其扩增曲线几乎是重叠的, 说明一致性很好。

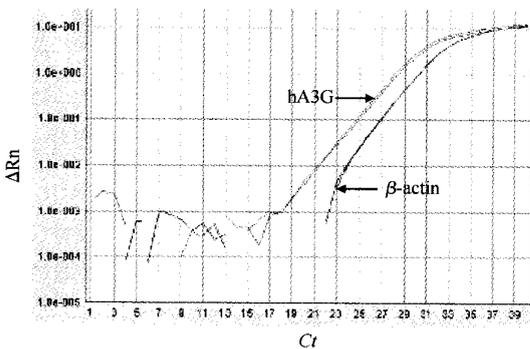


图1 实时定量 PCR 扩增曲线

实验对照还起到质量控制的作用, 实验中共使用实验对照 10 次。10 次实验中检测 hA3G 和 β-actin 的 2 复孔平均 C_t 值变异系数 (CV) 分别是 1.33% 和 1.46%, 变异系数很小, 实验的重复性很好。

3. 不同人群标本 hA3G mRNA 水平: HIV LTNP、HIV SP、HIV HR、HIV NP 标本的 hA3G mRNA 平均水平分别是 1.24 ± 0.16、1.23 ± 0.18、1.14 ± 0.21、1.02 ± 0.05。应用 SPSS 10.0 软件 independent sample T test 方法对结果进行统计分析, 结果见表 3。

表3 不同人群标本的 hA3G mRNA 水平统计分析

组间比较	t 值	P 值
SP 与 LTNP	0.222	0.827 ^a
SP 与 HR	2.094	0.042 ^b
SP 与 NP	4.213	0.000 ^b
LTNP 与 HR	1.312	0.201 ^a
LTNP 与 NP	3.553	0.002 ^b
HR 与 NP	1.823	0.076 ^a

注: ^a 无统计学意义; ^b 有统计学意义

HIV LTNP 人群 hA3G mRNA 水平大于 NP

水平, HIV SP hA3G mRNA 水平大于 HR 和 NP 水平。HIV LTNP 与 HIV SP、HIV LTNP 与 HR、HR 与 NP 之间 hA3G mRNA 水平差异无统计学意义。

4. HIV LTNP 和 HIV SP 的 CD₄⁺ T 淋巴细胞数量与 hA3G mRNA 水平的关系: 应用 SPSS 10.0 软件 Regression 方法对 CD₄⁺ T 淋巴细胞数目和 hA3G mRNA 的水平进行线性回归分析, 见图 2。回归方程为 $y = 2E-05x + 1.2302$ ($R = 0.033$, $P = 0.801$), 回归方程无意义, 提示 HIV LTNP 和 HIV SP 的 CD₄⁺ T 淋巴细胞数量与 hA3G mRNA 水平无相关性。

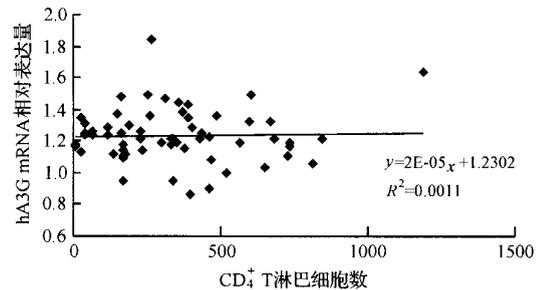


图2 CD₄⁺ T 淋巴细胞数量与 hA3G mRNA 水平的关系

讨 论

大约 5% ~ 10% 的 HIV 感染者在没有进行抗病毒治疗的情况下, 能够维持较高的 CD₄⁺ T 淋巴细胞数和较低 HIV 病毒载量, 疾病进程非常缓慢, 此类 HIV 感染者称为长期不进展者^[15]。HIV 感染者长期生存的潜在机制包含病毒、免疫和遗传方面^[16]。此外, 有研究报道, 在一个 539 例的 HIV 感染者队列中 (感染时间至少 10 年) 有 31.0% 没有进展为 AIDS, 并且了解为什么有些人在 CD₄⁺ T 淋巴细胞数较低的情况下能够生存很长的时间, 甚至在免疫系统遭到破坏的情况下^[17]。

hA3G/CEM15 是最近发现的一个抗 HIV 感染的宿主蛋白, 它属于 APOBEC3 相关蛋白家族。它具有胞嘧啶脱氨酶的作用, 使 HIV 基因组产生高度变异, 是抵抗 HIV 感染的一个重要因子。hA3G mRNA 水平的上调表达, 可能是 HIV LTNP 和 SP 能够长期生存、控制疾病进程的一个重要因素。

在本研究中, 我们选取河南省某地区的 HIV 感染者为研究对象, 他们没有接受过 HARRT 治疗, 但在 HIV 感染后均存活了 10 年, 我们根据 CD₄⁺ T 细

胞计数将他们分为了 HIV LTNP 和 SP 组。研究显示, HIV LTNP、SP 与 NP 对比, 确实存在 hA3G mRNA 水平的上调现象。证实 hA3G mRNA 水平的上调表达可能是导致 HIV LTNP 和 SP 能够长期生存的重要因素。此外, 我们还比较了 HIV LTNP 和 SP 的 hA3G mRNA 水平与 CD₄⁺ T 淋巴细胞数量的关系, 结果显示两者之间没有相关性, 这与 Cho 等^[9]的结果是一致的。这一结果表明, 无论 HIV 感染者的 CD₄⁺ T 淋巴细胞数是高还是低, 只要 hA3G mRNA 水平处于较高的水平, 这部分 HIV 感染者就能够生存较长的时间。这一结果给我们的另一个提示就是, CD₄⁺ T 淋巴细胞数和病毒载量可能并不是评价 HIV 感染者疾病进程的惟一指标, hA3G mRNA 水平可能也是一个重要的指标。人体有许多自有的抗病毒蛋白, APOBEC3 家族就是其中之一, 这个家族的蛋白都具有抗逆转录病毒作用^[2]。hA3G 和 3F 是其中的两个关系最近的成员, 它们在 HIV LTNP 中的水平都有上调现象^[9], 并且 hA3G 和 3F 可以形成异源二聚体^[17]。可能正是由于这部分 HIV 感染者存在 APOBEC3A-G mRNA 水平都有上调现象, 以致产生协同效应, 使得这些 CD₄⁺ T 淋巴细胞数较低 HIV 感染者能够生存很长的时间。

本研究由于 LTNP 的标本数较少, 导致 LTNP 和 HR 的 hA3G mRNA 水平没有统计学意义。另外, 缺少没有接受过 HART 治疗的典型进展人群的液氮冻存标本, 不能分析 HIV LTNP、SP 与典型进展者之间 hA3G mRNA 水平的差异。有文献报道, 不同进展类型 HIV 感染者中 hA3G mRNA 的水平是 HIV LTNP > HIV 阴性人群 > HIV 典型进展者^[15]。为什么 hA3G mRNA 的水平 HIV LTNP > HIV 典型进展者, 我们推测应该是由宿主决定的。可能是 HIV LTNP 在感染 HIV 后, 通过体内某个转录激活因子, 诱导了 hA3G mRNA 的上调表达。APOBEC 蛋白和 Vif 蛋白之间存在一个平衡^[2], 它们之间平衡的破坏, 可能就导致了两种不同的结果。如果平衡向有利于累积 APOBEC 蛋白的方向转移, 就发展为 HIV LTNP; 如果平衡向不利于累积 APOBEC 蛋白的方向转移, 就发展为 HIV 典型进展者。

打破 APOBEC 蛋白和 Vif 蛋白之间的平衡, 过量表达 APOBEC, 特别是 hA3G 和 hA3F, 应该是以后抗病毒治疗、延长 HIV 感染者生命的一个新的

策略。

参 考 文 献

- [1] Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, et al. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol*, 2004, 14:1392-1396.
- [2] Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4:868-877.
- [3] Mangeat B, Turelli P, Caron G, et al. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 2003, 424:99-103.
- [4] Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, et al. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, 2002, 79:285-296.
- [5] Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, et al. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, 2003, 424:94-98.
- [6] Conticello SG, Harris RS, Neuberger MS. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol*, 2003, 13:2009-2013.
- [7] Kao S, Khan MA, Miyagi E, et al. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol*, 2003, 77:11398-11407.
- [8] Mehle A, Strack B, Ancuta P, et al. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279:7792-7798.
- [9] Cho SJ, Drechsler HN, Ryan C Burke, et al. APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD₄⁺ T-cell count. *J Virol*, 2006, 80(4):2069-2072.
- [10] Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, et al. Long-term HIV-1 infection without immunological progressions. *AIDS*, 1994, 8:1123-1128.
- [11] Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, et al. The characterization of nonprogressors: long-term HIV-1 infection with stable CD₄⁺ T-cell levels. *AIDS*, 1993, 7:1159-1166.
- [12] Munoz A, Kirby A, He Y, et al. Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD₄ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1995, 8:496-505.
- [13] Koizumi Y, Kageyama S, Fujiyama Y, et al. RANTES-28G delays and DC-SIGN-139C enhances AIDS progression in HIV type 1 infected Japanese hemophiliacs. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23(5):713-719.
- [14] Casartelli N, Di Matteo G, Argentini C, et al. Structural defects and variations in the HIV-1 nef gene from rapid, slow and non-progressor children. *AIDS*, 2003, 17(9):1291-1301.
- [15] Jin X, Brooks A, Chen HY, et al. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol*, 2005, 79(17):11513-11516.
- [16] Cao Y, Qin L, Zhang L, et al. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 1995, 332:201-208.
- [17] Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, et al. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J*, 2004, 23:2451-2458.

(收稿日期:2007-11-23)

(本文编辑:尹廉)