论著

文章编号:1000-5404(2008)09-0814-03

# HIV-1准种变化与人类白细胞抗原限制性细胞毒性T淋巴细胞表位的相关性研究

黄广宇,毛 青,邓国宏,兰 林,李俊刚,蒋 黎,周吉军,王宇明 (第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 研究HIV-1准种变化与人类白细胞抗原(human leucocyte antigen,HLA)限制性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)表位的相关性。方法 从2对母婴传播HIV-1感染者血清内提取HIV-1核酸,进行逆转录-套式PCR(RT-nested PCR)扩增,产物克隆后,挑选阳性克隆行CSGE分析,对优势和劣势准种进行克隆测序分析,对氨基酸序列中可能的CTL表位进行分析。结果 第1对感染的母子:母亲YJ体内存在的CTL表位在其54 d的女儿WYF体内都存在,而WYF体内存在1株突变准种,其CTL表位在YJ体内不存在;第2对感染的母子:母亲CM和其12个月的儿子ZDB体内HIV-1 env准种无相同的CTL表位。结论 HIV-1在改变宿主后,随着时间的延长,HIV-1突变准种所导致HLA限制性CTL表位发生改变的概率增大。

关键词:HIV-1;准种;CTL;表位
中图法分类号:R373.9;R392-33;R392.2 文献标识码:A

# Correlation of diversity of HIV-1 quasispecies and their HLA-restricted CTL epitopes

HUANG Guang-yu, MAO Qing, DENG Guo-hong, LAN Lin, LI Jun-gang, JIANG Li, ZHOU Ji-jun, WANG Yu-ming (Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To study the correlation of diversity of HIV-1 quasispecies and HLA-restricted CTL epitopes. Methods RNAs were extracted from the plasma samples of 2 pairs of individuals with HIV-1 vertical transmission (mother YJ and her 54-day daughter WYF, mother CM and her 12-month son ZDB) and polymersed by RT-nested PCR. PCR products were T-A cloned. Positive clones were analyzed by conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE). The clones of major and minor quasispecies were sequenced. Sequencing results were analyzed to determine CTL epitopes. Results For the first pair mother-child, all CTL epitopes in env region of mother YJ's HIV-1 quasispecies existed in env region of daughter WYF's HIV-1 quasispecies, but one of CTL epitopes in env region of WYF's HIV-1 minor quasispecies was not found in env region of mother YJ's HIV-1 quasispecies; while for the second pair mother-child, no same CTL epitodes was found in env region of mother CM's and son ZDB's HIV-1 quasispecies. Conclusion The longer time after vertical transmission is, the more likely HLA restricted-CTL epitopes will change in mutated HIV-1 quasispecies.

**Key words**: HIV-1; quasispecies; human leukemia antigen; cytotoxic T lymphocyte; epitope

人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)经垂直传播后,其env区准种会发生变化[1],env区包含多个细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)表位,该区域的突变可能会改变CTL的表位,从而影响CTL对HIV-1的识别。众所周知,CTL是宿主对抗HIV-1感染的重要方式,HIV-1突变导致CTL表位变化,进而不能被宿主CTL识别,这是HIV-1免疫逃逸发生的机制之一。本研究拟以env区准种为切入点,研究垂直传播后HIV-1 CTL表位的改变。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 研究对象 选取本科2003-2004年收治的2对垂直传播的HIV-1感染者。第1对母子:母亲YJ,33岁,无症状HIV感染者(CD4细胞计数:570 $\mu l^{-1}$,N1期),女儿WYF,54 d,艾滋病患者($CD4^+$ T细胞百分比:14%,消耗综合征,C3期);第2对母子:母亲CM,30岁,艾滋病患者($CD4^+$细胞计数:12 $\mu l^{-1}$,播散性真菌感染,C3期),儿子ZDB,12个月,无症状HIV感染者($CD4^+$ T细胞百分比:40%,无任何临床症状,N1期)。上述患者的疾病分期根据美国CDC艾滋病分期标准[2,3]。

作者简介:黄广宇,男,黑龙江省哈尔滨市人,博士研究生,主要从事HIV变异与发病机制方面的研究。电话:(023)68754475-8063,E-mail:guangyu_huang@hotmail.com
通信作者:王宇明,电话:(023)68754141,E-mail:wym417@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-11-05;修回日期:2008-01-21

1.1.2　**主要试剂**　QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自美国 Qiagen 公司，OneStep RT-PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司，RNasin Plus Ribonuclease Inhibitor 购自美国 Promega 公司，*Ex Taq* 酶和 dNTP Mixture 购自 TaKaRa 公司，引物由上海生工生物技术服务有限公司合成，玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物技术服务有限公司，TA-Cloning Kit 购自美国 Invitrogen 公司。

## 1.2　方法

1.2.1　RNA 提取　按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取血清内总 RNA。

1.2.2　RT-nested PCR　按照 OneStep RT-PCR Kit 和 *Ex Taq* 酶说明书进行，使用特异性引物：C2-V5-F1/R1 和 C2-V5-F2/R2，序列见表 1（简并碱基 W = A/T，R = A/G，Y = C/T/U）。扩增获得的目的 DNA 用玻璃珠 DNA 胶回收试剂盒纯化回收。

**表 1　RT-nested PCR 引物序列**

| 引物名称 | 引物序列 | 位置(nt) | 参考序列 |
|---|---|---|---|
| C2-V5-F1 | 5′-CTCCAGCTGGTTWTGCRATT-3′ | 6 201 ~ 6 228 | HXB2 |
| C2-V5-R1 | 5′-GCCTGTACCGTCAGCGTTAT-3′ | 7 887 ~ 7 913 | HXB2 |
| C2-V5-F2 | 5′-CAGCTGGTTWTGCGATTCTAA-3′ | 6 883 ~ 6 903 | HXB2 |
| C2-V5-R2 | 5′-RTYYCCTCCTCCAGGTCTGA-3′ | 7 627 ~ 7 646 | HXB2 |

1.2.3　克隆　目的 DNA 与 T-载体连接、转化，经蓝-白菌落筛选，得到阳性克隆，挑选 40 个阳性克隆用 PCR 法鉴定。经鉴定确实为阳性的产物进行 CSGE 分析。

1.2.4　异源双链的形成　挑选 30 个结果阳性的 PCR 产物与驱动子（Driver）PCR 产物，以等物质的量混合后加入灭菌 EDTA 至终浓度 10 mmol/L（抑制 DNA 多聚酶活性），驱动子为不相关个体阳性克隆的 PCR 产物。混合后于 98 ℃变性 5 min，68 ℃复性 1 h，使驱动子的 2 条 DNA 单链和样本的 2 条 DNA 单链两两结合，理论上形成 2 条同源双链和 2 条异源双链[4]。

1.2.5　构象敏感性凝胶电泳（conformation sensitive gel electrophoresis，CSGE）　配制 10% 变性聚丙烯酰胺溶液，具体配方：尿素 5.25 g + 5 × TTE 缓冲液 3.5 ml + 乙二醇 3.5 ml + 甲酰胺 5.25 ml + 30% 丙烯酰胺溶液 11.7 ml，然后加去离子水定容至 35 ml，最后加新鲜的 10% 过硫酸铵 240 μl 和 TEMED 22 μl。配制好的溶液注入双层玻璃板中，于 28 ℃聚合约 30 min，制成聚丙烯酰胺凝胶（polyacrylamide gel，PAG），于垂直电泳槽内电泳，上下槽内均为 0.5 × TTE 电泳缓冲液（1 × TTE：89 mmol/L Tris，15 mmol/L Taurine，0.5 mmol/L EDTA，pH = 9.0）[1]，室温下 300 V 预电泳 30 min，将异源双链产物与 2 × 载样缓冲液（20% 乙二醇，30% 甲酰胺，0.025% 溴酚蓝）等容积混合加入上样孔，冰浴下，300 V 电泳 48 h。电泳结束后 PAG 于 1 μg/ml 溴化乙锭溶液中染色 5 min，在凝胶成像仪上呈像并保存。

1.2.6　测序及结果分析　根据凝胶电泳呈像结果挑选优势准种和劣势准种的代表克隆型送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果采用 BioEdit 5.0，将目的 DNA 序列剪切整齐并进行比对，翻译为氨基酸序列与已知的 CTL 表位进行比较。

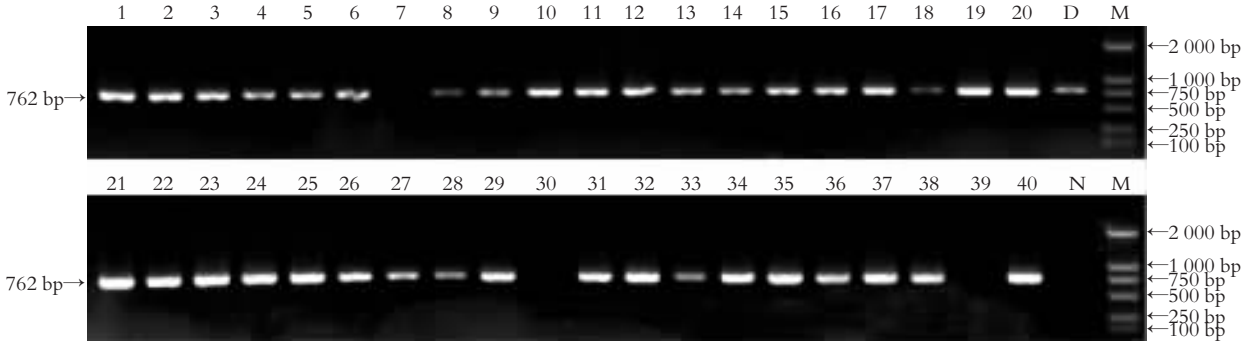
# 2　结果

## 2.1　阳性克隆 PCR 鉴定结果

阳性克隆行 PCR 后琼脂糖凝胶电泳鉴定结果（图 1），除 7、30、39 号样本为阴性结果外，其余样本均为阳性，阴性对照结果可排除假阳性结果的可能性。目的 DNA 片段大小为 762 bp，条带位置准确、清晰，无非特异性片段扩增。

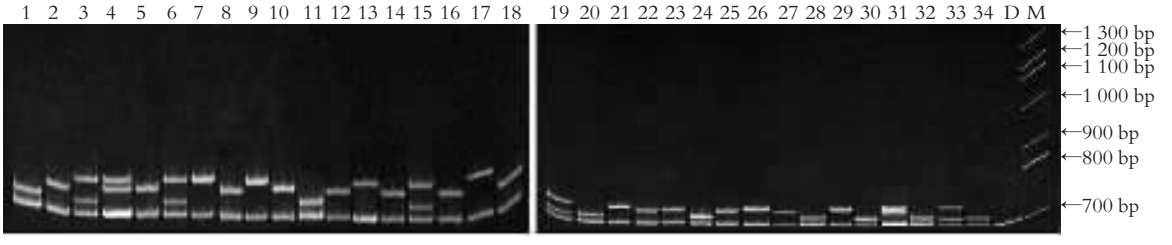
## 2.2　CSGE 凝胶成像结果

CSGE 结果于凝胶成像仪上成像（图 2）：所有样本均得到阳性结果，3、4、6、15、19、31、33 号样本出现 3 个条带，其余为 2 个条带，靠近图下端的条带为同源双链，其余为异源双链。




D：驱动子；M：DNA 标准（DL 2000）；N：阴性对照；1 – 40：阳性克隆样本

**图 1　阳性克隆 PCR 产物电泳图**




1 – 34：阳性克隆样本；D：驱动子；M：DNA 标准（100 bp DNA 梯度）

**图 2　阳性克隆 PCR 产物 CSGE 凝胶成像电泳图**

### 2.3 准种分析结果

第1对母子:母亲YJ有3个克隆型,在34个克隆型中的数目分别为28、4、2,准种复杂度(准种复杂度=克隆型数目/总克隆数×100%)为8.82%,女儿WYF有7个克隆型,其数目分别为8、7、6、5、3、3、1,准种复杂度为20.59%;第2对母子:母亲CM有6个克隆型,其数目分别为18、8、4、2、1、1,准种复杂度为17.65%,儿子ZDB有4个克隆型,其数目分别为24、6、2、2,准种复杂度为11.76%。

### 2.4 测序结果中寻找CTL表位的结果

各宿主准种CTL表位:以HXB2-ENV的核苷酸序列为参考序列,各代表克隆型测序结果与参考序列比对,在比对的结果中寻找可能的CTL表位。表2列出了目前env区已知的所有CTL表位,YJ-3、YJ-19、WYF-4、WYF-7、WYF-10、WYF-33、ZDB-25均含有"KPVVSTQLLL"表位(HLA-B7或B8限制性),WYF-7、WYF-10、CM-18、CM-22均含有"AKTIIVHL"表位(HLA-Cw*0602限制性),YJ-3、YJ-19、WYF-4、WYF-7、WYF-10、WYF-33均含有"SFNCRGEFFY"表位(HLA-A*29限制性),YJ-3、YJ-19、WYF-4均含有"RIKQIINMW"表位(HLA-A*3201或A32限制性)。

表2 HIV-1 env区(6 883~7 646 nt)CTL表位

| 表位序列 | 蛋白 | 位置(nt) | HLA分型 | 表位序列 | 蛋白 | 位置(nt) | HLA分型 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GPCKNVSTVQ | gp160 | 237~246 | B56 | PEIVTHS | gp160 | 369~375 | A2 |
| CKNVSTVQC | gp160 | 239~247 | Cw*0802 | HSFNCGGEF | gp160 | 374~382 | A3 |
| CTNVSTVQC | gp160 | 239~247 | Cw8 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | B*1516 |
| RPIVSTQLL | gp160 | 252~260 | B*3501 | SFTCGGEFF | gp160 | 375~383 | B15 |
| RPIVSTQLL | gp160 | 252~260 | B35 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | B15 |
| RPVVSTQLLL | gp160 | 252~261 | B7 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | B63 |
| KPVVSTQLLL | gp160 | 252~261 | B7, B8 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | B63, B15 |
| RPVVSTQLLL | gp160 | 252~261 | B7, B8 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | Cw*0401 |
| AKTIIVHL | gp160 | 281~288 | Cw*0602 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | Cw*0401, Cw*0407 |
| CTRPNNNTRK | gp160 | 296~305 | A3, A2 | | | | |
| RPNNNTRKSI | gp160 | 298~307 | B*07 | SFNCGGEFF | gp160 | 375~383 | Cw4 |
| RPNNNTRKSI | gp160 | 298~307 | B*0702 | SFNCRGEFFY | gp160 | 375~384 | A*29 |
| RPNNNTRKSI | gp160 | 298~307 | B*4201 | SFNCGGEFFY | gp160 | 375~384 | A29 |
| RPNNNTRKSI | gp160 | 298~307 | B7 | FNCGGEFF | gp160 | 376~383 | Cw4 |
| RPNNNTRRGI | gp160 | 298~307 | B7 | FNCGGEFFY | gp160 | 376~384 | A29 |
| RPNNNTRKSI | gp160 | 298~307 | B7 | PNCGGEFFY | gp160 | 376~384 | A29 |
| IYIGPGRAF | gp160 | 309~317 | A*2402 | FNCGGEFFY | gp160 | 376~384 | B8 |
| ITVGPGQVFY | gp160 | 309~318 | A11 | KNCGGEFFYCNS | gp160 | 376~387 | A2 |
| HIGPGRAFY | gp160 | 310~318 | A*3002 | NSGGEFFYSNS | gp160 | 377~387 | A2 |
| HIGPGRAFY | gp160 | 310~318 | A2 | FYCNITQLF | gp160 | 383~391 | A*2402 |
| RGPGRAFVTI | gp160 | 311~320 | A*0201 | LPCRIKQII | gp160 | 416~424 | B*5101 |
| RGPGRAFVTI | gp160 | 311~320 | A2 | LPCRIKQII | gp160 | 416~424 | B51 |
| MGPKRAFYAT | gp160 | 311~320 | A2 | RIKQIINMW | gp160 | 419~427 | A*3201 |
| GRAFVTIGK | gp160 | 314~322 | B*2705 | RIKQIINMW | gp160 | 419~427 | A29, A32 |
| GRAFVTIGK | gp160 | 314~322 | B27 | RIKQFINMW | gp160 | 419~427 | A32 |
| RVLKQVTEK | gp160 | 340~348 | A11 | RIKQIINMW | gp160 | 419~427 | A32 |
| PSSGGDLEITTHSF | gp160 | 363~376 | B*18 | | | | |

## 3 讨论

母婴传播中的婴儿作为一类特殊人群,其感染HIV-1后的免疫反应与成人有较大区别。成人有效的CTL反应能够降低HIV-1病毒载量,延缓疾病进展,但是由于婴儿的免疫功能不完善,在出生后最初的3~6个月内不能产生有效的特异性CTL反应抑制病毒复制,故病毒载量较高[4]。动物实验结果证实了这一点[5]。HIV-1通过母婴传播后,由于母子之间HLA基因型不同,CTL表位也不同,HIV-1在新宿主体内环境的压力下,准种的进化将会受到影响[6]。

本研究选择母婴传播这一特殊形式的HIV-1感染作为研究对象,原因是HIV-1传播传染源和被感染者的关系容易确认,且传播的具体时间很容易确定,而其他方式的HIV-1传播,如性传播或静脉吸毒传播,大多数情况不能确定传染源,传播的具体时间更难以确定。因此,选择母婴传播这一研究模型,有助于研究HIV-1准种进化与宿主间的关系[7]。

本研究表明,在2对母子体内的HIV-1 env区准种中存在4个HLA限制性CLT表位,母子之间的CTL表位并不完全相同,出生仅54 d的WYF与其母亲YJ的CTL表位绝大部分相同,但也出现了1个YJ体内没有的新表位,即"AKTIIVHL",提示HIV-1在进入新宿主体内后很快就可以突变进化而产生新的CTL表位;12个月大的ZDB体内的HIV-1 env区呈现为单一准种,该准种所包含的CTL表位与其母亲YJ完全不同,提示HIV-1在进入新宿主体内后,经过足够长时间的进化,形成了与原传播者体内完全不同的CTL表位。从以上两点可以看出,HIV-1经垂直传播进入新宿主体内后,随着时间的延长,HIV-1进化突变产生的新CTL表位的概率也增高。

## 参考文献:


[1] 黄广宇, 王宇明. 人类免疫缺陷病毒1型在垂直传播的个体间病毒基因型和准种的差异性的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(17):1785-1788.

[2] Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults[J]. MMWR Recomm Rep, 1992, 41(RR-17):1-19.

[3] Centers for Disease Control. 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age[J]. MMWR Recomm Rep, 1994, 43(RR-12):1-10.

[4] Feeney M E, Roosevelt K A, Tang Y, *et al*. Comprehensive screening reveals strong and broadly directed human immunodeficiency virus type 1-specific CD8 responses in perinatally infected children[J]. J Virol, 2003, 77(13):7492-7501.

[5] Ching N, Yang O O, Deville J G, *et al*. Pediatric HIV-1 specific cytotoxic T-lymphocyte responses suggesting ongoing viral replication despite combination antiretroviral therapy[J]. Peadiatr Res, 2007, 61(6):692-697.

[6] Addo M M, Yu X G, Rathod A, *et al*. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load[J]. J Virol, 2003, 77(3):2081-2092.

[7] Scott Z A, Chadwick E G, Gibson L L, *et al*. Infrequent detection of HIV-1 specific, but not cytomegalovirus-specific, $CD8^+$ T cell responses in young HIV-1 infected infants[J]. J Immunol, 2001, 167(12):7134-7140.


(编辑 张 维)