

登革病毒感染对 T 细胞和 NK 细胞表达细胞因子的影响

庞贤武, 田 疆, 曾谷城, 刘 岩, 方丹云, 晏辉钧*, 江丽芳

(中山大学中山医学院微生物教研室//教育部热带病防治研究重点实验室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】本文探讨登革病毒体外感染人外周血单个核细胞后对 T 细胞和 NK 细胞表达细胞因子的影响,并初步探讨登革病毒感染引起的免疫效应。【方法】用登革 2 型病毒(DEN-2)感染健康人外周血单个核细胞(PBMC),流式细胞术检测登革 2 型病毒后 T 细胞和 NK 细胞的表型及细胞因子的表达水平。【结果】DEN-2 感染 18 h 后,T 细胞明显表达 CD69、IFN- γ 、TNF- α 和 perforin,NK 细胞表达 CD69、IFN- γ 和 perforin;随着感染复数(MOI)增加,表达 perforin 和 IFN- γ 的 T 细胞数及表达 perforin 的 NK 细胞数上升;随着感染时间的延长,表达 perforin 和 IL-4 的 T 细胞数及表达 perforin 的 NK 细胞数逐渐上升,而表达 IFN- γ 的 T 细胞数及表达 IFN- γ 的 NK 细胞数逐渐下降;表达 perforin 的 T 细胞亚型主要为 CD8⁺T 细胞。【结论】发现登革病毒在体外能够诱导 T 细胞表达 CD69、IFN- γ 、TNF- α 、perforin 和 IL-4,及 NK 细胞表达 CD69、IFN- γ 和 perforin,提示 T 细胞、NK 细胞可能在抗登革病毒感染或免疫损伤中起着重要的作用。

关键词:登革病毒;细胞因子;T 细胞;NK 细胞

中图分类号:R373.33

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2012)03-0336-05

Effects of Dengue Virus Infection on Expression of Cytokines in T cells and NK Cells

PANG Xian-wu, TIAN Jiang, ZENG Gu-cheng, LIU Yan, FANG Dan-yun, YAN Hui-jun*, JIANG Li-fang

(Department of Microbiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University//Key Laboratory of Tropical Disease Control Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of cytokines in T cells and NK cells from human peripheral blood mononuclear cells in response to dengue virus in vitro, and to explore the immune response after dengue virus infection. 【Methods】 Flow cytometry was used to detect the phenotype and cytokines of T cells and NK cells from PBMC after DEN-2 infection. 【Results】 T cells express CD69, IFN- γ , TNF- α , perforin, and NK cells express CD69, IFN- γ , perforin 18 hours after DEN-2 infection. The numbers of IFN- γ and perforin expressing T cells and perforin expressing NK cells have a positive correlation with dengue virus dose. The numbers of perforin and IL-4 expressing T cells and perforin expressing NK cells increase, whereas the numbers of IFN- γ expressing T cells and NK cells decrease follow infection times. T cells expressing perforin are mainly CD8⁺T cells. 【Conclusion】 With in vitro infection by dengue virus, T cells can express CD69, IFN- γ , TNF- α , perforin and IL-4. And NK cells can express IFN- γ and perforin at the same time. We can conclude that T and NK cells may play an important role in the anti-dengue virus infection or immunopathology.

Key words: Dengue virus; cytokines; T cells; NK cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(3):336-340]

登革病毒(Dengue virus, DEN)感染可引起人类登革热(Dengue fever, DF)、登革出血热(Dengue hemorrhagic fever, DHF)和登革休克综合征(Dengue shock syndrome, DSS)。目前 DHF/DSS 的发病机制有几种假设:抗体依赖增强^[1]、病毒变异^[2]和病毒

感染引起免疫病理损伤^[3]。近年来研究认为免疫机制或自身免疫机制在登革病毒感染的致病机制中发挥重要作用^[3-4]。但至今关于登革病毒感染引起的免疫病理过程尚未完全阐明。过去研究表明,DHF/DSS 患者体内的细胞因子水平高于 DF 患

收稿日期:2011-11-22

基金项目:“十一五”国家科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”(2008ZX10004-015)

作者简介:庞贤武,硕士生,研究方向:病毒分子生物学,E-mail:pangxianwu@yahoo.com.cn; *通信作者:晏辉钧,高级讲师,E-mail:yanhj@mail.sysu.edu.cn

者,提示免疫激活可能与致病的严重程度有关^[5]。随着研究进展,越来越多与登革病毒感染有关的细胞因子被发现,而它们的主要细胞来源、免疫调节及在登革病毒感染中得作用仍未清楚。本实验以健康人外周血单个核细胞为研究对象,检测与登革病毒感染有关的细胞因子表达情况,并探讨淋巴细胞在登革病毒感染中的免疫调节机制,为进一步研究细胞因子在登革病毒感染过程的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PE-Cy7-CD3、APC-CD8、FITC-CD4、APC-CD56、FITC-IFN- γ 、TNF- α -FITC、PE-perforin 及 FITC-IL-4 抗体(eBioscience,美国);红细胞裂解液(Sigma,美国);人淋巴细胞分离液(展晨,中国);破膜固定剂(B&D,美国);胎牛血清及 RPMI1640 培养基(Invitrogen,美国)。

1.2 研究对象

15名健康人外周血由广州市血液中心提供。

1.3 病毒培养

将本室保存的登革病毒2型新几内亚株(DEN-2, New guinea-C株)接种于含有维持液的C6/36细胞中,置于35℃培养箱中培养。每天观察细胞病变情况,收集上清液用于下面实验。未接种病毒的C6/36细胞上清液为对照组。

1.4 外周血单个核细胞(PBMC)的分离

健康人外周血加Hank's液稀释,用人淋巴细胞分离液进行密度梯度离心($800 \times g$, 22℃, 30 min),获取PBMC。红细胞裂解液孵育5 min后,用PBS充分洗涤,最后用含体积分数10% FBS的RPMI 1640完全培养基重悬细胞。

1.5 病毒感染PBMC

用含2% FBS的RPMI 1640完全培养基调节PBMC浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,取PBMC稀释液按 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 铺于96孔板中,同时加入一定量的DEN-2病毒液,MOI分别为1、2、5,将96孔板置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育2 h。补加含10% FBS的RPMI 1640完全培养基至200 μL ,置于37℃、5% CO₂培养箱中分别培养18 h、36 h和54 h。实验设对照组和实验组,对照组不加病毒,实验组用登革病毒感染。

1.6 细胞表面分子和细胞内因子染色

收集病毒感染后的PBMC,用PBS洗涤2次,加入CD3-PE-Cy7、CD3-APC、CD8-APC、CD4-FITC或CD56-APC等抗体,4℃避光孵育30 min。PBS洗涤后,加入破膜固定剂,4℃避光孵育20 min。用Wash buffer洗两次,加入perforin-PE、TNF- α -FITC、IFN- γ -FITC或IL-4-FITC等抗体,4℃避光孵育30 min。用Wash buffer洗涤两次,最后用20 g/L多聚甲醛溶液固定细胞。应用BD FACS Aria流式细胞仪检测细胞,并用FlowJo软件分析流式检测结果。

1.7 统计学方法结果

用SPSS12.0统计软件进行分析,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEN-2感染人PBMC后T细胞和NK细胞的表型分析

用DEN-2感染PBMC 18 h后,收集细胞进行表面分子染色,流式分析表明,DEN-2感染后T细胞表达CD69,且高于对照组(图1A);NK细胞大量表达CD69,且高于对照组(图1B)。

2.2 DEN-2感染人PBMC后T细胞和NK细胞的细胞因子表达情况

对DEN-2体外感染18 h的PBMC进行表型分析后,我们又对其细胞内因子进行了染色分析。实验结果表明,DEN-2感染18 h后T细胞明显表达IFN- γ 、perforin和TNF- α (图2A),与对照组相比,T细胞表达IFN- γ 、perforin和TNF- α 有统计学意义(图2B);NK细胞明显表达IFN- γ 和perforin(图2C),与对照组相比,NK细胞表达IFN- γ 和perforin有统计学意义(图2D)。

2.3 不同MOI时T细胞和NK细胞的细胞因子表达情况

设MOI分别为1、2和5的3个病毒剂量,通过DEN-2感染PBMC 18 h后,收集细胞进行胞内染色。实验结果表明,随着MOI的增加,表达IFN- γ 和perforin的T细胞数逐渐上升(图3A);表达perforin的NK细胞数逐渐上升,而表达IFN- γ 的NK细胞数没有明显变化(图3B)。

2.4 不同时间点T细胞和NK细胞的细胞因子表达情况

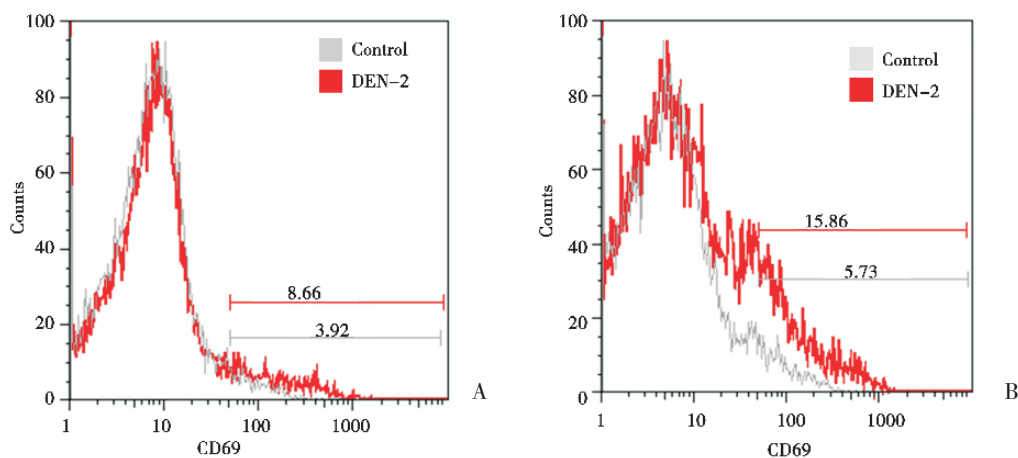


图 1 DEN-2 感染后 T 细胞和 NK 细胞的表型分析

Fig.1 Phenotype analysis of T cells and NK cells in response to Dengue virus

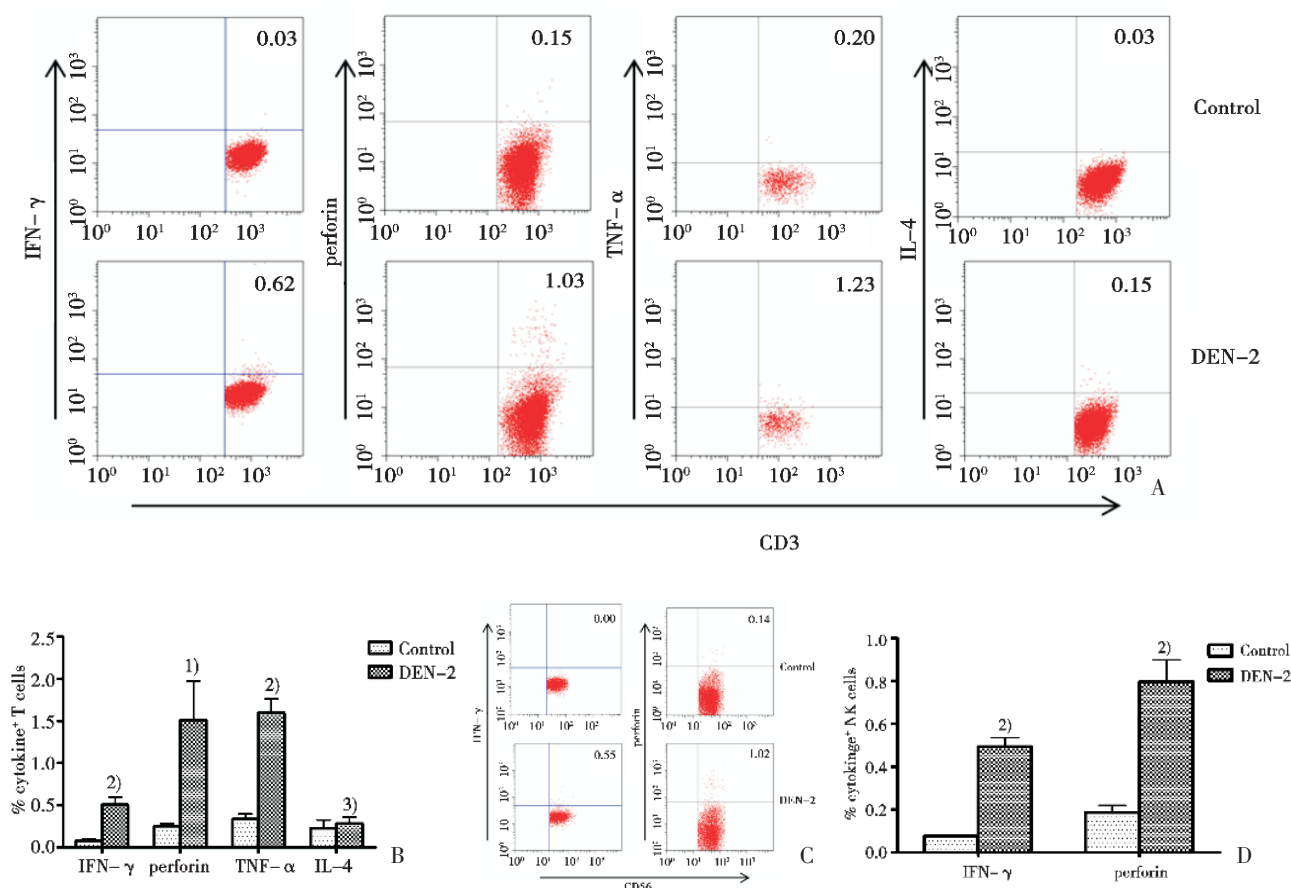
A: Production of CD69 in CD3⁺T cells; B: Production of CD69 in CD56⁺NK cells

图 2 登革病毒感染后 T 细胞和 NK 细胞的细胞因子表达情况

Fig.2 Production of cytokines in T cells and NK cells in response to dengue virus

A: Flow cytometric dot plots showed the percentages of cytokine⁺ CD3⁺ T cells; B: Bar graphic data of percentages of cytokine⁺ CD3⁺ T cells; C: Flow cytometric dot plots showed the percentages of cytokine⁺ CD56⁺ NK cells; D: Bar graphic data of percentages of cytokine⁺ CD56⁺ NK cells; 1) compared with control, $P < 0.05$; 2) compared with control, $P < 0.01$; 3) compared with control, $P > 0.05$

为了进一步了解 T 细胞和 NK 细胞在 DEN 感染机体过程中的动态情况,我们在 DEN-2 感染 PBMC 后 18 h、36 h 和 54 h 三个时间点分别收集细胞,并进行胞内染色。实验结果表明,随着感染时间的延长,表达 perforin 和 IL-4 的 T 细胞数呈上升趋势,而表达 IFN- γ 的 T 细胞数逐渐下降(图 4A);表达 perforin 的 NK 细胞数呈上升趋势,而表

达 IFN- γ 的 NK 细胞数逐渐下降(图 4B)。

2.5 表达 perforin 的 T 细胞亚型分析

通过 DEN-2 感染 PBMC 18 h 后,收集细胞进行胞内染色。对 perforin 阳性的 T 细胞设门,然后进行表面分子 CD4 和 CD8 分析。实验结果表明,表达 perforin 的 T 细胞主要以 CD8⁺T 细胞为主,同时有部分 CD4⁺T 细胞也表达 perforin(图 5)。

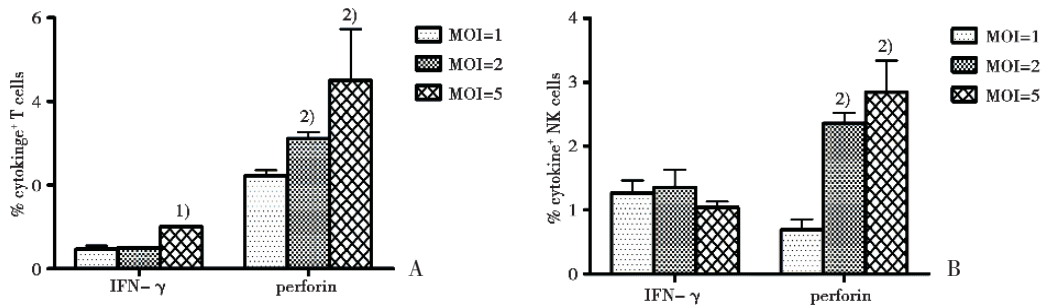


图3 不同 MOI 时 T 细胞和 NK 细胞表达细胞因子情况

Fig.3 Production of cytokines in T cells and NK cells at different MOI

A: Production of cytokines in CD3⁺T cells at different MOI; B: Production of cytokines in CD56⁺NK cells at different MOI; 1) compared with the first group (MOI = 1), $P < 0.05$, 2) compared with the first group (MOI=1), $P < 0.01$

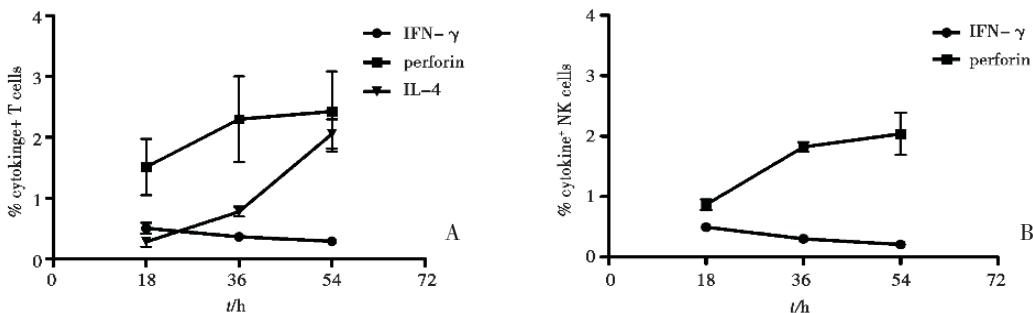


图4 不同时间点 T 细胞和 NK 细胞表达细胞因子情况

Fig.4 Production of cytokines in T cells and NK cells at different time

A: Production of cytokines in CD3⁺T cells at different time; B: Production of cytokines in CD56⁺ NK cells at different time

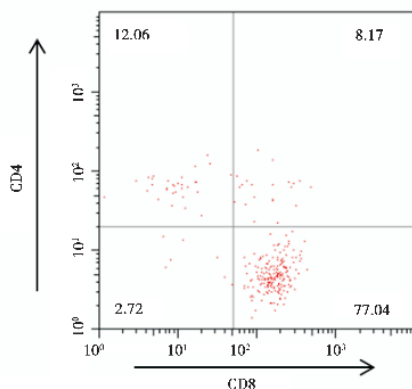


图5 表达 perforin 的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞亚型

Fig.5 Cell subsets of perforin producing CD4⁺ cells and CD8⁺ T cells

3 讨论

T细胞是淋巴细胞的主要组分,在抗早期病毒感染发挥重要的作用。T细胞被激活后分泌 IFN- γ 抑制病毒复制^[6],同时表达 perforin 介导病毒感染的细胞凋亡^[7]。这对清除体内大多数病毒感染起很大作用,但 T 细胞的激活和细胞因子分泌也可能加重损伤而诱发疾病。过去研究表明,DHF/DSS 患者外周血淋巴细胞内的 CD69⁺CD8⁺T 细胞比例高于 DF 患者,同时还伴有大量的登革表特异性的 CD8⁺T 细胞产生,这提示 T 细胞的激活在登革病毒致病发挥重要的作用^[8]。也有文献报道,DHF/

DSS患者体内存在型交叉反应的 T 细胞,当二次感染异性 DEN 时,这些 T 细胞快速增殖并大量分泌细胞因子,导致 DHF/DSS^[9]。而且发现 DHF/DSS 患者血清上 IL-4、IL-6、IL-12 和 TNF- α 等水平明显高于 DF 患者^[5]。然而,这些细胞因子的升高只能表明机体免疫系统被激活,却没有反映哪些细胞被激活。

在本研究中我们首先通过细胞表面标记,利用流式细胞术进行检测和分析,发现 DEN-2 感染健康人外周血 18 h 后,T 细胞明显表达 CD69,这说明 DEN-2 体外能诱导 T 细胞活化,实验结果与 Mathew 等^[10]报道相符。本实验结果显示,感染 18 h 后,T 细胞明显表达 IFN- γ 、TNF- α 和 perforin 等细胞因子,这提示 T 细胞表达 IFN- γ 和 perforin 可能在抗登革病毒感染中发挥作用。随后我们研究发现表达 IFN- γ 和 perforin 的 T 细胞数与 MOI 正相关,进一步说明 IFN- γ 和 perforin 可能在抗登革病毒感染中发挥重要作用。而 T 细胞表达 TNF- α 可能诱发疾病,而且有研究表明,TNF- α 表达上调与 DEN 致病有关^[11]。随着感染时间延长,表达 IFN- γ 的 T 细胞数逐渐下降,而表达 IL-4 和 perforin 的 T 细胞数逐渐上升,提示 Th1 型应答向 Th2 型应答优势转变。目前许多研究提示 Th1 型向 Th2 型应答优势转变是 DHF/DSS 发生的一个重要机制^[12]。所以 IL-4 表达上调可能是登革病毒感染机体后引发 DHF/DSS 的一个标志。Gagnon 等^[13]研究表明,登革病毒特异性 CD4⁺CTL 细胞表达 perforin 可能与肝组织损伤有关。而且我们的实验结果显示,表达 perforin 的 T 细胞主要为 CD8⁺T 细胞,其次为 CD4⁺T。所以我们认为,T 细胞表达 perforin 可能除了在清除登革病毒中起一定作用,而当其持续表达后可能引起组织损伤。至于其是否在登革病毒感染诱导细胞凋亡中起作用仍需进一步实验证明。

对于 NK 细胞在登革病毒感染中作用的研究,Azeredo 等^[14]研究发现,急性期的登革病毒感染患者体内大量 NK 细胞表达 CD69,而且 DF 患者体内的 NK 细胞比例高于 DHF/DSS 患者。这提示 NK 细胞在抗登革病毒感染中发挥重要作用。本研究结果也发现 DEN-2 感染健康人外周血 18 h 后,NK 细胞大量表达 CD69,而且表达比例高于 T 细胞。随后实验发现,表达 perforin 的 NK 细胞数与 MOI 正相关,提示 NK 细胞可能通过 perforin 介

导抗胞内病毒感染。随着感染时间增加,NK 细胞表达 IFN- γ 下降,表达 perforin 上升。我们推测,NK 细胞作为固有免疫的重要组分可能在抗早期 DEN 感染发挥主要作用。

综上所述,我们通过登革病毒体外感染 PBMC 后,发现登革病毒能激活人 T 细胞和 NK 细胞并表达 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 perforin 等细胞因子。目前关于 T 细胞表达 perforin 在登革病毒感染中的作用少有报道,所以 perforin 的发现为下一步研究 perforin 在登革病毒感染机体中的免疫机制提供基础。

参考文献:

- [1] Huang KJ, Yang YC, Lin YS, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection [J]. J Immunol, 2006, 176(5): 2825-2832.
- [2] Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, et al. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons [J]. J Virol, 2000, 74(11): 4957-4966.
- [3] Lin CF, Lei HY, Shiau AL, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage [J]. J Med Virol, 2003, 69(1): 82-90.
- [4] Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis [J]. Virol J, 2009, 6(1): 211-218.
- [5] Loke H, Bethell DB, Phuong CX, et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword [J]. J Infect Dis, 2001, 184(11): 1369-1373.
- [6] Shrestha S, Kyle JL, Snider HM, et al. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical [J]. J Virol, 2004, 78(6): 2701-2710.
- [7] Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, et al. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology [J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 35-54.
- [8] Zivna I, Green S, Vaughn DW, et al. T cell responses to an HLA-B * 07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity [J]. J Immunol, 2002, 168(11): 5959-5965.
- [9] Bashyam, HS, Green S, Rothman AL. Dengue virus-