

# 行政院國家科學委員會專題計畫研究成果報告

## 愛滋病疾病發展相關因子之研究

Study of the factors associated with AIDS disease progression

計畫編號：NSC – 89 – 2320 – B002 – 094

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：李君男 執行機構及單位：國立台灣大學醫學院醫事技術學

系

計畫參與人員：羅令佩、游大慶 執行機構及單位：國立台灣大學醫學

院醫事技術學系

### 一、中文摘要

愛滋病是由人類免疫缺乏病毒(HIV)引起的，HIV 感染人類的 CD4 細胞，造成免疫機能之下降，而導致愛滋病症狀的產生。與 HIV 疾病發展相關之因子，病毒與宿主同樣重要。HIV-1 感染者由開始感染發展至愛滋病的時間因人而異，由數月至超過十年不等，此與感染者本身之免疫力有密切之關連，其中又以細胞免疫力具關鍵性之作用。

本計畫為瞭解本地 HIV-1 感染者疾病病程之變化，研究疾病發展與細胞免疫力之間的關係，建立偵測 HIV-1 特異之細胞毒殺反應 (CTL)。首先建立病人之 B 細胞株，以 synthetic peptide 處理，以之做為目標細胞，進行 CTL 反應。目前 CTL 反應大都是利用放射線來進行偵測，本計畫嘗試利用非放射線之方法，7-AAD 染色法來偵測 CTL 反應中的凋亡細胞，研究其取代傳統放射線方法之可能性。結果

顯示 7-AAD 染色法與傳統之  $^{51}\text{Cr}$  釋放試驗之結果相符，惟敏感度較低，仍有待後續之改進。另亦建立台大醫院愛滋病人之 HLA class I 組織型資料，以 PCR 的方法首先篩選出 A2 之病人，在 106 個病人中 A2 約佔了 45%，再由核酸序列分析進一步鑑定 A2 亞型，以配合未來進行與 CTL 相關之 Tetramer 結合試驗之用。

關鍵詞：人類免疫缺乏病毒、愛滋病、細胞毒殺反應、HLA 組織型

### Abstract

The causative agent of acquired immunodeficiency syndrome is human immunodeficiency virus (HIV). HIV mainly infects human CD4<sup>+</sup> cells, that eventually induces the deficiency of immune system. Both viral and host factors are important for the disease progression. The time for

development to AIDS varied from several months to over ten years in different individuals, that is related to the immunity, especially cellular immunity, of the infected individual.

In order to understand the relationship between cellular immunity and disease progression. The cytotoxic T lymphocyte activity (CTL) was detected by  $^{51}\text{Cr}$  release assay. The B cell lines derived from the subjects were prepared and treated with synthetic peptides. Non-radioactive method, 7-AAD staining method, was applied to evaluate the possibility to replace the isotopes in CTL assay. The results shown by 7-AAD method were comparable to those obtained by CTL assay. Though the sensitivity was lower and needs to be improved in the future. We also examined the HLA class I types of 106 HIV-infected patients in NTUH by PCR. About 45% of them belonged to A2 type. The A2 subtype of these patients were further identified by nucleotide sequence analysis. These data will be useful for future application to tetramer binding assay, a CTL related assay.

Keywords: HIV-1, AIDS, CTL, HLA type

## 二、緣由與目的

愛滋病(AIDS)是由人類免疫缺乏病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)引起的。HIV 是一種反錄病毒(Retrovirus)，其外形呈球狀，直徑約在 80-100nm 之間(1)。它的外套膜上有兩個醣蛋白質 gp120 及 gp41。HIV 感染細胞的第一步是和細胞表面的受體 CD4 產生高度親和性

的結合，進而病毒和細胞膜融合在一起而進到細胞內。除了 CD4 受體外，近來亦發現 CXCR4、CCR5 等  $\beta$ -chemokine receptors 是 HIV-1 進入細胞主要的輔助受體。緊貼著外套膜之內，有一層 p17 蛋白質，再內層是一個正十二面體之核殼(Nucleocapsid)，主要是由 p24 蛋白質所組成。病毒的核心部份含有兩條單股正向的 RNA(各約 9.2 kb)，與 p9 及 p7 蛋白質緊密的結合在一起。與基因結合在一起的還有三種酵素，分別為反轉錄酶(Reverse transcriptase)、嵌入酶(Integrase)及蛋白酶(Protease)(1)。HIV 之基因體結構與同屬南提病毒屬(Lentivirus)之病毒相似，除了與一般反錄病毒一樣，均含有 *gag*、*pol*、*env* 基因，兩端各有長重覆序列(LTR)之外，尚有一些輔助性之基因，它們具有調控之功能，如 *tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpr* 等六個基因。

HIV-1 感染人體的 CD4 細胞，造成免疫機能之下降，而導致愛滋病症狀的產生。HIV-1 感染者由開始感染發展至愛滋病的時間因人而異，由數月至超過十年不定。此與感染者本身之免疫力有密切之關連，其中又以細胞免疫力具關鍵性之作用。病程發展快者稱為快速進行者(Fast progressor)，有少數人(約 5%)超過十年仍維持穩定之狀況，此種人稱為長期非進行性者(Long-term nonprogressor, LTNP)(2-4)。

研究 HIV-1 感染者在疾病發展過程中，體內各種生物標記(Biological marker)之變化，發現有些標記之變化與疾病之進行或惡化有關，如血漿中病毒負荷量(viral load)的增加、CD4 細胞數目的降低、CD8 細胞反應活性的降低、p24 抗原之出現、p24 抗體濃度下降，及一些非特異性的免疫活化之相關變化，如  $\beta$ -2-

microglobulin、neopterin、IgG、IgA 量之上升等(5-14)。HIV-1 感染者在抗體陽轉後,體內病毒負荷量之高低與疾病之預後有關,隨著病毒負荷量之增加,五年後發展成 AIDS 之機率亦隨之而上升(15)。

在追蹤 LTNP 之免疫機能時,發現其中有一些人測不到中和抗體,但有很強的 HIV-1 特異性的細胞毒殺反應(CTL),故推論 CTL 與保持穩定且非進行性之感染有關,而中和抗體則非絕對必需的(16)。CTL 主要是由 CD8 細胞執行,它們能認識病毒之抗原是受到 HLA-class I 之限制,故當感染了病毒之細胞,具有 CTL 抗原決定位(epitope)之蛋白質片段與 HLA-class I 之分子結合而表現於其表面,則會受到毒殺細胞之攻擊而被破壞。CTL 在控制病毒感染上極為重要。

目前國內尚無實驗室進行 HIV-1 之細胞免疫力之研究,本計畫為瞭解本地 HIV-1 感染者疾病病程之變化,研究疾病發展與細胞免疫力之間的關係。本實驗室擬建立偵測 HIV-1 特異之 CTL 試驗。目前 CTL 反應大都是利用放射線 ( $^{51}\text{Cr}$  釋放試驗)來做偵測,不久前有研究報告指出 Tetramer 結合試驗與 CTL 試驗之結果有甚佳之相關性。但在目前受限於 Tetramer 取得不易,尚無法進行 Tetramer 結合試驗。本計畫嘗試利用非放射線之方法,7-AAD 染色法(17, 18),以之偵測 CTL 反應中之凋亡細胞,研究其可行性及取代傳統放射線方法之可能性。期以細胞免疫力之測定應用於推測感染者疾病預後之狀況,及評估藥物治療之效果,所得結果將與血漿中病毒負荷量、CD4 細胞數目做一相關性比較。本計畫亦將針對國人之組織型研究,以配合未來進行 Tetramer 結合試驗之用。

### 三、結果與討論

本計畫為瞭解本地 HIV-1 感染者疾病病程之變化,研究疾病發展與細胞免疫力之間的關係,建立偵測 HIV-1 特異之細胞毒殺反應(CTL)因參考文獻中 HLA class I 組織型與 synthetic peptide 之搭配有限,A2 組織型是被研究得最多者,且國人中此型亦佔了相當的比例。故首先由台大醫院病人中篩選出 A2 組織型之病人,接著以 EB 病毒感染的方式建立病人之 B 細胞株,成功的建立了三個病人之 B 細胞株。接著以 p24 或 gp41 之 synthetic peptide 處理,以之做為目標細胞,進行 CTL 反應。CTL 反應除了利用傳統的放射線方法來進行偵測外,亦利用非放射線之方法,即以 7-AAD 染色法來偵測 CTL 反應中的凋亡細胞。結果顯示 7-AAD 染色法與傳統之  $^{51}\text{Cr}$  釋放試驗之結果相符,惟敏感度較低,欲取代傳統放射線方法仍有待後續之改進。CTL 反應之結果與病毒負荷量之結果呈負相關之關係。另亦建立台大醫院愛滋病人之 HLA class I 組織型資料,以 PCR 的方法首先篩選出 A2 之病人,在 106 個病人中 A2 約佔了 45%,此比例較一般國人中 A2 所佔之比例 30%(19)明顯的高些,台大醫院的愛滋病人代表的多是已出現過疾病症狀且曾經住院的病人,此是否與 A2 病人疾病之發展較快有關,將有待分析比較更多的病人方可下結論。針對 A2 之病人,利用核酸序列分析進一步鑑定 A2 亞型,發現 A2 亞型中,以 0201/09 與 0207/15N 者最多,分別佔了約三分之一,0203 佔了近兩成,0217 則不到一成。此亞型之結果未來可以配合進行與 CTL 相關之 Tetramer 結合試驗之用。

### 四、計畫成果自評;

本計畫莫立了研究細胞免疫力之基礎，細胞免疫力之研究必須長期進行，原來本計畫預定執行三年，但不幸被刪減成一年，此計畫無法繼續，殊為可惜。

## 五、參考文獻

1. Luciw PA. 1996. Human immunodeficiency viruses and their replication. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp.1881-1952. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman & S. E. Straus. Lippincott-Raven.
2. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrin J & Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:201-208.
3. Pantaleo G, Meno S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:209-216.
4. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E & Winkelstein W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* 1993;7:1159-1166.
5. Ho DD. Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996;272:1124-1125.
6. SAAG MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD & Volberding PA. HIV viral load markers in clinical practice. *Nature medicine* 1996;2:17-21.
7. Mellors JW, Rinaldo Jr. CR, Gupta P, White RM, Todd JA & Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-1170.
8. D'Souza MP & Mathieson BJ. Early phases of HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1996;12:1-9.
9. Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftink-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schuitemaker H & Miedema F. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: A longitudinal analysis of rapid progressors and longterm asymptomatics. *J. Exp. Med.* 1995;181:1365-1372.
10. Riddler SA & Mellors JW. HIV-1 viral load and clinical outcome: review of recent studies. *AIDS* 1997;11(suppl A):S141-148.
11. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP & Rinaldo CR. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.* 1997;126:946-954.
12. Tsoukas CM & Bernard NF. Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994;7:14-28.
13. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N. Engl.*

- J. Med. 1990;322:166-172.
14. Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftinck-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schitemaker H & Miedema F. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J. Exp. Med.* 1995;181:1365-1372.
  15. Ho, D.D. Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996;272:1124-1125.
  16. Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kakams, T. Elbeik, S. I. Staprans, M. B. Feiberg, Y. Cao, D. D. Ho, T. Yilma, A. M. Caliendo, R. P. Johnson, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996;12:585-592.
  17. Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, & Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluometric staining methods. *J. Immunol. Methods* 1997;209:11-123.
  18. Philpott NJ, Turner NJC, Scopes J, Westby M, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Dalgleish AG, & Gibson FM. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996;87:2244-2251.
  19. Shaw CK, Chang TK, Chen SN, & Wu S. HLA polymorphism and probability of

finding HLA-matched unrelated marrow donors for Chinese in Taiwan. *Tissue Antigens* 1997;50:610-619.