

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.016

基于深圳男男同性性行为人群的 HIV-1 广谱中和抗体筛选分析*

钟一帆^{1,2} 杨峥嵘^{2Δ} 王晓辉² 吕星² 赵锦² 张燕² 甘永霞² 程锦泉^{2Δ}

(1 深圳大学生命与海洋学院 广东 深圳 518060; 2 深圳市疾病预防控制中心艾滋病防制科 广东 深圳 518055)

摘要 目的:筛选基于深圳本地男男同性性行为者(Men who have sex with men, MSM)人群队列中 HIV-1 流行毒株的广谱中和抗体(Broadly neutralizing antibodies, bnAbs), 为下一步机制和应用研究奠定基础。**方法:**建立小型 MSM 队列, 按计划分别定期随访、留样, 测序分析人群中 HIV-1 病毒流行亚型。选取将骨架质粒与系列标准 HIV-1 env 质粒 12 款, 分别共转染 293 细胞制备单次感染能力假病毒。建立 TZM-bl 细胞实验测定并计算中和活性(ID50 Titers)技术平台, 用于选定病毒亚型样品的筛选。最后取所获具有一定广谱中和抗性的代表性血样, 通过抗体竞争实验初步分析其结合位点。**结果:**近年来, 深圳 MSM 的 HIV-1 流行亚型分布中, CRF07_BC(43.4%)和 CRF55_01B(15.4%)占比快速增长。选择来自该人群队列 CRF07_BC 感染者 34 人 88 份血样进行广谱中和抗性检测, 筛选出具有一定广谱中和抗性的血样 10 份(ID50 Titer $\geq$ 25), 其中 2 例显示了较佳中和宽度, 可作用于全部 12 种假病毒中的 7 种(58.3%)。初步分析其结合机制均非靶向 gp120。**结论:**本研究成功建立小型 MSM 队列和 TZM-bl 检测分析技术并应用于实践, 初步筛选结果提示部分具有中和活性的患者血清内存在 bnAbs。

关键词:人类免疫缺陷病毒; 广谱中和抗体; 男男同性性行为人群

中图分类号:R593.3; R392.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-74-04

Screening and Analysis of the HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies based on Shenzhen MSM Crowd*

ZHONG Yi-fan^{1,2}, YANG Zheng-rong^{2Δ}, WANG Xiao-hui², LV Xing², ZHAO Jin², ZHANG Yan², GAN Yong-xia², CHENG Jin-quan^{2Δ}

(1 College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong, 518060, China;

2 Department of HIV/AIDS prevention and control, Shenzhen Center for Disease Control and prevention, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

ABSTRACT Objective: To screen broadly neutralizing antibodies(bnAbs) of HIV-1 epidemic strains in Men who have sex with men (MSM) lived in Shenzhen, and provide basis for the mechanism and application research. **Methods:** A small crowd of local MSM was established. Participants were followed up and saved samples regularly, HIV-1 subtype distribution from these sampled local MSM was also analyzed by sequencing. In this study, 12 kinds of Standard HIV-1 Env-pseudotyped viruses were prepared, which were produced by cotransfecting 293T cells with env expression plasmid and HIV-1 backbone expression plasmid, for TZM-bl-based neutralization assay. Samples selected from local MSM crowd were detected and ID50 titers were calculated through sera neutralization curves. Individuals showed relatively more broad or potent neutralizing activity would be analyzed by additional neutralization competition assay. **Results:** HIV-1 subtype distribution from local MSM significantly changed in recently years, The prevalence of CRF07_BC (43.4 %) and CRF55_01B(15.4 %)increased rapidly. We detected 88 samples from 34 MSM with CRF07_BC infection, 10 samples from 6 individuals shown cross-clade neutralizing activity, 2 of them showed plasma neutralization breadth of 58.3 % against a multi-subtype panel, the primary analysis indicated that the plasma neutralization in these two individuals is not directed to gp120. **Conclusions:** A local MSM crowd and TZM-bl-based neutralization assay technology platform were successfully established in this study and applied to practice. Primary results indicated that HIV-1 bnAbs existed in part of samples.

Key words: Human Immunodeficiency Virus; Broadly neutralizing antibodies; Men who have sex with men

Chinese Library Classification(CLC): R593.3; R392.12 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-74-04

前言

近年来,我国男男同性性行为人群(Men who have sex with men, MSM)艾滋疫情的迅猛增长引起了广泛关注。我国 MSM

* 基金项目: 国家人社部 2016 年度回国留学人员科技活动择优资助项目;

深圳市科技创新委基础研究学科布局项目(JCYJ20160331173336891); 基础研究项目(JCYJ20150402102135510)

作者简介: 钟一帆(1993-), 硕士研究生, 主要研究方向: HIV 分子病毒学, 电话: 18565705170, E-mail: zhongyifan15@hotmail.com

Δ 通讯作者: 程锦泉, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 分子流行病学, E-mail: cjinquan@szcdc.net;

杨峥嵘, 博士, 副研究员, 主要研究方向: 分子病毒学, E-mail: yangzr@szcdc.net

(收稿日期: 2017-05-08 接受日期: 2017-06-30)

群体中 HIV-1 病毒的遗传特性和生物特征正在通过国内外多个高危群体持续引入,并不断进化得更为复杂^[1,2],有证据表明该人群中已有相当部分毒株对国际上新近开发的 HIV-1 广谱中和抗体(Broadly neutralizing antibodies, bnAbs)显示出较强的耐受性,给未来的疫苗研发和抗体治疗带来了极大的挑战^[3]。深圳是国内 MSM 主要集散地和我国最大的口岸城市之一,本研究分析了本地 MSM 毒株进化及其可能对 bnAbs 的影响。

1 材料与方法

1.1 队列建设与采样

阳性开放队列始建于 2010 年,入组条件:已确证 HIV-1 阳性、18 岁以上、常住深圳、CD4 计数 ≥ 350 cell/ μ L、过去 6 个月有过男男性行为、尚未启动抗病毒治疗的 MSM,并知情同意。最初入组 1500 人,其后视脱失情况定期增补,目前维持在 1000 人左右。研究对象按计划分别定期随访、留样(血清、PBMC)和分析检测,启动抗病毒治疗或失访(含死亡、退出等)即视为观测终点。上述人群中新近感染者在初次检出 HIV 阳性后第 1、6、12 个月各留样一次,此后常规每年一次定期留样;老病人每年一次。

阴性队列建于 2015 年,定期增补,维持 300 人左右。入组条件:HIV 检测阴性、18 岁以上、常住深圳、CD4 计数 ≥ 500 cell/ μ L、过去 6 个月有过男男性行为的 MSM,并知情同意。所有研究对象留阴性血样备用,常规每半年采样检测一次,如有新性伴或随机性伴,则每 3 个月一次;若存在无保护性行为,高度怀疑原发性 HIV 感染,应尽快接受 HIV 核酸检测及窗口期外抗体检测。如确认 HIV 阳性后参照阳性队列管理。

1.2 HIV-1 亚型测序鉴定

QIAmp Viral RNA kit (Qiagen, CA) 抽提病人血清中 HIV RNA,方法参见试剂盒说明。巢式 PCR 扩增 env 片段(C2-V5)及 pol 片段^[4,5,7],PCR 产物送上海生工测序,PhyloPlace 软件(NIH HIV sequence database)分析亚型。

1.3 假病毒制备

将骨架质粒 pSG3 Δ Env 与含系列标准 HIV-1 env 的质粒 12 款(来自 NIH regent program,详见表 1),分别用 PEI(Sigma)法共转染 293 细胞(本室存),扩增包括 A、B、C、BC、AE、AC、G 等亚型在内的单次感染能力假病毒。具体步骤如下:① 293 细胞培养贴壁,转染前换液;② 制备 PEI-DNA 混合物,以 100 mm 细胞培养皿为例。准备两支 1.5 mL 离心管,一管将质粒 DNA (HIV- Env、SIV 骨架质粒各 8-10 μ g/种)加入无血清培养基中,总体积 0.5 mL;另一管中则取 400 μ M 的 PEI 储存液 100 μ L,加无血清培养基至 0.5 mL。各自摇匀后两管充分混合,室温静置 20 min 加预热无血清培养基至细胞培养体系,总体积 8-10 mL,轻摇混匀。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 温箱孵育 6-10 h 后更换为含血清培养基,继续培养,次日收集上清,检测病毒滴度后 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.4 广谱中和抗性检测

将梯度稀释的待测病人血清及阴、阳性对照分别与假病毒作用,混合液加入经 Polybrene(Sigma)预处理、96 孔板培养的 TZM-bl 细胞(清华大学张林琦教授惠赠),37 $^{\circ}$ C 孵育 2-3 小时后换完全培养液,常规培养 72 小时, Luciferase assay kit(Promega)

测定并计算血清的中和活性(ID₅₀ titers 1/X,导致 50%中和效果所需的血清稀释倍数)。方法详见文献^[3,8]。

1.5 抗体竞争实验

取所获具有一定广谱中和抗性的代表性血样,通过 W479A gp120(美国洛克菲勒大学伍雪玲博士惠赠)等抗体竞争实验,分析结合位点。具体操作参见文献^[9]。

1.6 统计学分析

使用 Graphpad Prism 5.0 作图并分析计算 ID₅₀(1/X)等。

2 结果

2.1 深圳 MSM 人群 HIV-1 流行毒株亚型分布与广谱中和抗性检出情况

2010 年以来,我室相继完成 5000 例以上 MSM 队列样本采集,本研究分析 2015-2016 年部分 HIV-1 阳性样本的流行亚型分布特点,发现以 CRF07_BC(43.4%,144/332)、CRF 01_AE(31.9%,106/332)为主,其次为 CRF55_01B(15.4%,51/332)以及 B'(4.8%,16/332)。其中 07_BC 亚型占比较本室先前报导(2008 年以前 13.8%^[4],2010 年 33.3%^[5])持续增长,已超过 01_AE 居第 1 位;同时 2010 年深圳 MSM 人群中首次报告的新型重组株 CRF55_01B^[6],已在本地迅速上升到第 3 位。

广谱中和抗性检出随感染时长变化情况如图 1:深圳 MSM 人群感染 HIV 后 1 年以内,能产生跨亚型(Cross-clade)中和抗性的非常罕见(1/328),1-2 年后逐渐增加(10/737),2-3 年后进一步增多(16/254),3 年以上则已较为常见(42/258)。

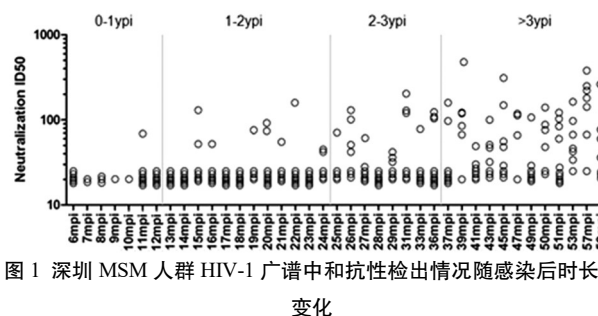


图 1 深圳 MSM 人群 HIV-1 广谱中和抗性检出情况随感染时长后的变化

Fig. 1 The variation of broadly neutralization detected in Shenzhen MSM with time post-infection

Note: ypi=year post-infection; mpi=month post-infection.

2.2 广谱中和抗性筛选结果

鉴于 BC 亚型引人注目的增长,本项目选择了感染时长超过 2 年,留有 2 个以上时间点血样、尚未启动抗病毒治疗(最近一次病毒载量检测 >1000 copies/mL 者优先)的 HIV-1 CRF07_BC 感染者 34 人。研究对象平均年龄 30.5 ± 8.7 岁, CD4 细胞计数 350.3 ± 77.8 cell/ μ L,感染时长从 24 个月到 68 个月不等。

如下图 2A,经 TZM-bl 方法筛选,从 88 份血样中找到具有一定广谱中和抗性(跨 2 个及以上亚型, ID₅₀ Titer ≥ 25)的血清样品 10 份,分别来自 6 名不同病例。其中,2 例血清 M07BC_03 mpi58、M07BC_09 mpi31 有较佳中和范围,可分别中和全部 12 种假病毒中的 7 种(58.3%)。在所有测得 Cross-clade 中和抗性中,源自 07_BC 患者的抗体较多显示了对 B、C 亚型的中和效

果,而未检测到对 A、G、和 AE 的 Cross-clade 中和抗性。ID₅₀ titers 计算如图 2 B 示, 曲线与 50% inhibition 线交点所对应 X 轴(稀释倍数)上的读数,依次为 182、307、417,即 M07BC_03 三个时间点样品对 BJOX2000 的 ID₅₀ titer 1/X。

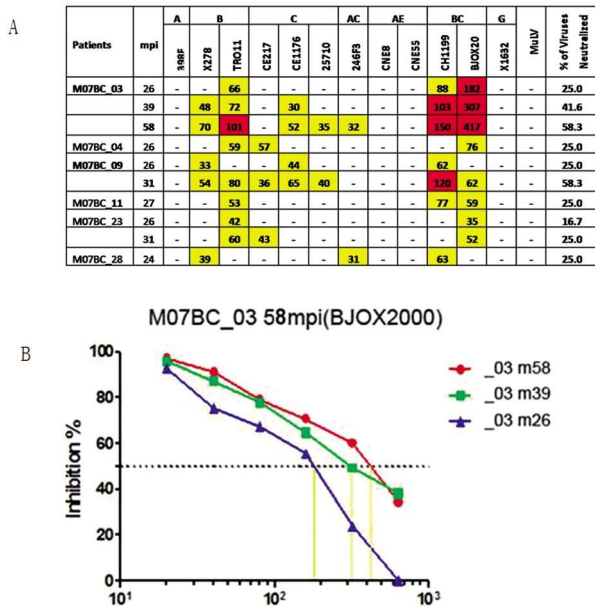


图 2 基于 TSM-bl 细胞实验的中和抗性分析(ID₅₀ 1/X)

Fig.2 TSM-bl-based neutralization assay(ID₅₀ 1/X)

Note: A.TSM-bl-based Cross-clade neutralization assay. Titres at IC₅₀ are shown and coloured; "-" means ID₅₀ titers 1/X lower than 25. B.ID₅₀ titers calculated through sera neutralization curves.

2.3 抗体竞争实验结果

W479A 突变能导致 gp120 不能形成有效的受体空间构象。由下图 3 可见, 加了相应突变抗体后, 编号 M07BC_03 mpi58 和 M07BC_09 mpi31 血清的中和曲线均未右移, 未表现出竞争性抑制效果, 提示这两例血清中 bnAbs 的结合机制, 并非靶向 gp120。

3 讨论

2015 年 10 月, 中国医科大学尚红教授和清华大学张林琦教授联合发表评论文章, 指出中国的 "男男同性恋人群已经到了艾滋全面爆发的边缘", 引起了很大的社会反响^[1]。事实上, 早在 2009 年, 一项在 61 个城市实施的全国性调查就已显示南方广州、深圳等主要城市 MSM 群体的 HIV 携带率普遍高达 10%, 远远高于全国平均 5% 的携带率^[2]。本室统计 2015 年, 深圳当年全部新报告 HIV/ADS 病例总数中 MSM 占到了 52.4%, 新发感染率高达 6-7 每百人/年(100 人中每年有 6-7 人新感染 HIV), 2016 年全年新报告病例中 MSM 占比进一步上升到约 60%, 快速蔓延态势给城市公共卫生带来了沉重压力。

MSM 人群中 HIV-1 病毒不断进化和扩散, 也给 bnAbs 逆向疫苗研发和抗体治疗研究带来了重大挑战。首先, 在 MSM 群体流行的 HIV 病毒中, 有相当一部分毒株对新近开发的 bnAbs 显示强耐受性, 提示可能有独特抗原特征的存在^[3], 而我们对此所知甚少; 其次, 部分城市如深圳等监测到该人群中 HIV-1 流行亚型持续大幅变化, 其深层次原因是否会进一步导致新耐受株的产生或者已有耐受毒株流行? 尚缺乏深入了解;

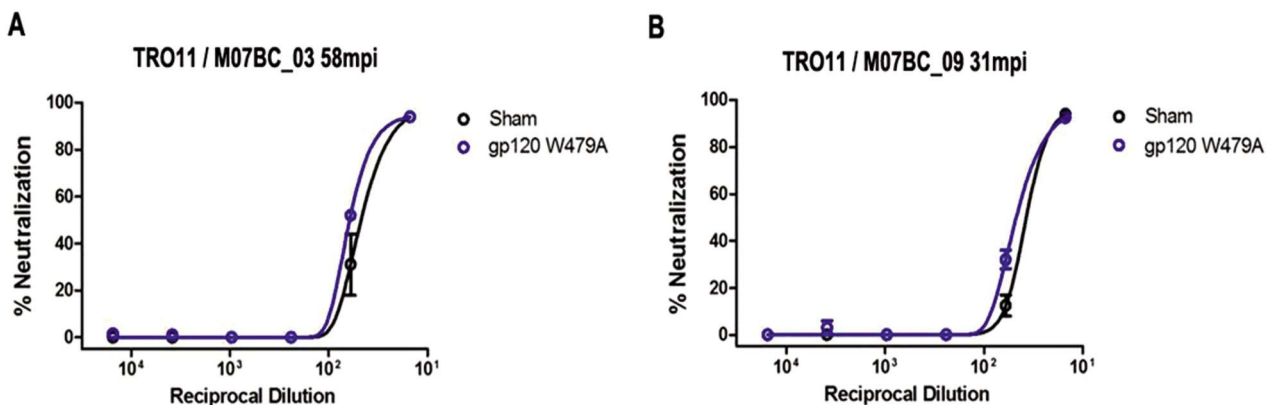


图 3 抗体竞争实验情况

Fig.3 Neutralization competition assay

Note: The addition of gp120 W479A shown in blue did not shift the neutralization curves, indicating that the plasma neutralization in these two cases is not directed to gp120.

最后, 一些新的重要重组毒株如 CRF55_01B 和 CRF59_01B 等, 在广谱中和抗性方面的研究还近乎空白, 也亟待开展研究。本项目依托既往 MSM 人群队列, 组织样本对本地 MSM 人群的亚型特征、bnAbs 产生与感染时间的关联进行了分析, 结果提示: 深圳与我国北方地区流行特点有非常显著的差异: 北方辽宁、北京等地 MSM 人群是 CRF_01AE 占比居绝对优势, 往往达到 75% 以上, B 和 B' 以及 CRF_07/08 BC 亚型加起来也只占到 20% 左右^[1,2]。而深圳虽然 CRF_01AE 占比一直也不低,

2006-2008 年曾经达到 64%^[4], 但近年来随着 CRF_07BC 和 55_01B(01_AE 和 B 亚型重组) 的快速增加(已分别占到 40% 和 15% 以上^[2,4-7]), CRF_01AE 重组株在 MSM 感染者中所占比例已逐步减至 30% 左右。

鉴于本地 CRF_07_BC 亚型引人注目的增长 (55_01B 由于收集到样本较少待以后跟进), 本研究选择了感染时长超过 2 年的 CRF_07_BC 感染者 34 人 88 份血样进一步开展 bnAbs 相关研究。初步研究结果表明来自 6 个病例的 10 份血样显示具

有一定异体、跨型别的广谱中和抗性,其中2例有较佳中和范围和一定中和效能,提示我们上述患者血清中有bnAbs的存在。新近多个报导^[10-12]指出HIV病毒亚型、人种、病毒载量、感染未治疗时长等均对bnAbs形成有较大影响,如Rusert P等^[10]认为B亚型更可能导致靶向病毒表面的CD4结合位点(CD4-binding site,CD4bs)的抗体,而非B亚型偏好产生与V2区结合的抗体等。本研究发现的2例源自07BC患者的抗体,中和机制可能确与gp120、CD4bs无关,同时较少对AE、A、G、AC等亚型的假病毒显示中和效力。加上已知基于西方B、C亚型开发的bnAbs(如VRC01、PG9、PG16等),对许多重组亚型也效果欠佳^[3,8,9],提示我们在寻找针对本地07_BC、01_AE等流行株的强力bNAbs上,需要进一步加大力度和投入。由于本室MSM队列以及T2M-bl筛选平台建立时间尚短,更大范围的筛选和研究尚未来得及展开。

目前,国内外对bnAbs的研究异常重视,其在HIV疫苗逆向设计方面的重要性毋庸置疑^[16-18],大量新的、更为强力和广谱的bnAbs不断出现^[12,13],VRC01、3BNC117等知名抗体在动物和人体实验中也显示了可喜的临床应用前景^[17,19-21]。但领域对bnAbs诱导/成熟关键表位的认识仍有待积累,需要发现和研究更多的bNAbs,来自结构学方面的支持尤为重要^[13-15],另一方面,随着我国启动艾滋病抗病毒治疗的标准一再前移,理想样本资源的获取难度也在进一步加大,相关领域的协作亟待加强。

参考文献(References)

- [1] Shang H, Zhang LQ. MSM and HIV-1 infection in China [J]. National Science Review, 2015, 2(4): 388-391
- [2] 汪宁, 钟平. 中国 HIV 分子流行病学 30 年 [J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(6): 541-546
Wang Ning, Zhong Ping. Molecular epidemiology of HIV in China: 1985-2015[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2015, 36(6): 541-546
- [3] Thenin S, Roch E, Samleerat T, et al. Naturally occurring substitutions of conserved residues in human immunodeficiency virus type 1 variants of different clades are involved in PG9 and PG16 resistance to neutralization[J]. J Gen Virol, 2012, 93(Pt 7): 1495-1505
- [4] 赵广录, 于微, 张娟娟, 等. 深圳地区 1992-2008 年 HIV-1 分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(1): 82-87
Zhao Guang-lu, Yu Wei, Zhang Juan-juan, et al. Study on the molecular-epidemiological characteristics of HIV-1 in Shenzhen, 1992-2008 [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2012, 33(1): 82-87
- [5] 何太平, 鲍毅, 王晓辉, 等. 深圳艾滋病病毒 1 型传播途径及优势流行株分析[J]. 中国公共卫生, 2013, 27(12): 1525-1527
He Tai-ping, Bao Yi, Wang Xiao-hui, et al. Predominant epidemic strains of human immunodeficiency virus type 1 in Shenzhen[J]. Chin J public health, 2013, 27(12): 1525-1527
- [6] Zhao J, Cai W, Zhang C, et al. Origin and outbreak of HIV-1 CRF55_01B among MSM in Shenzhen, China [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2014, 66(3): e65-67
- [7] Zhao J, Chen L, Chaillon A, et al. The dynamics of the HIV epidemic among men who have sex with men (MSM) from 2005 to 2012 in Shenzhen, China[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28703
- [8] Zhang M, Jiao Y, Wang S, et al. Serum neutralizing activities from a Beijing homosexual male cohort infected with different subtypes of HIV-1 in China[J]. Plos ONE, 2012, 7(10): e47548
- [9] Guo D, Shi X, Arledge KC, et al. A single residue within the V5 region of HIV-1 envelope facilitates viral escape from the broadly neutralizing monoclonal antibody VRC01 [J]. J Biol Chem, 2012, 287(51): 43170-43179
- [10] Rusert P, Kouyos RD, Kadelka C, et al. Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction [J]. Nat Med, 2016, 22(11): 1260-1267
- [11] Landais E, Huang X, Havenar-Daughton C, et al. Broadly Neutralizing Antibody Responses in a Large Longitudinal Sub-Saharan HIV Primary Infection Cohort[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(1): e1005369
- [12] Huang J, Kang BH, Ishida E, et al. Identification of a CD4- Binding-Site Antibody to HIV that Evolved Near-Pan Neutralization Breadth [J]. Immunity, 2016, 45(5): 1108-1121
- [13] Mabuka J, Goo L, Omenda MM, et al. HIV- 1 maternal and infant variants show similar sensitivity to broadly neutralizing antibodies, but sensitivity varies by subtype[J]. AIDS, 2013, 27(10): 1535-1544
- [14] Kepler TB, Wiehe K. Genetic and structural analyses of affinity maturation in the humoral response to HIV-1[J]. Immunol Rev, 2017, 275 (1): 129-144
- [15] Georgiev IS, Gordon JM, Zhou T, et al. Elicitation of HIV-1-neutralizing antibodies against the CD4-binding site [J]. Curr Opin HIV AIDS, 2013, 8(5): 382-392
- [16] Kelsoe G, Haynes BF. Host controls of HIV broadly neutralizing antibody development[J]. Immunol Rev, 2017, 275(1): 79-88
- [17] McCoy LE, Burton DR. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV [J]. Immunol Rev, 2017, 275 (1): 11-20
- [18] Briney B, Sok D, Jardine JG, et al. Tailored Immunogens Direct Affinity Maturation toward HIV Neutralizing Antibodies [J]. Cell, 2016, 166(6): 1459-1470
- [19] Pegu A, Hessel AJ, Mascola JR, et al. Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention [J]. Immunol Rev, 2017, 275 (1): 296-312
- [20] Scheid JF, Horwitz JA, Bar-On Y, et al. HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption[J]. Nature. 2016, 535(7613): 556-560
- [21] Bar KJ, Sneller MC, Harrison LJ, et al. Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption [J]. N Engl J Med, 2016, 375(21): 2037-2050