

DOI:10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20256619

· 论 著 ·

梅毒患者外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞增强 HIV-1 复制及其潜在的分子机制

张 纯¹, 柯吴坚², 江银波², 唐时幸¹

(1. 南方医科大学公共卫生学院流行病学系, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学皮肤病医院, 广东 广州 510091)

[摘 要] 目的 研究梅毒患者外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞对人类免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)感染和复制的影响, 探讨梅毒螺旋体(TP)促进 HIV-1 复制的分子机制。方法 从梅毒患者和未感染 TP 的健康献血者分离外周血单核细胞(PBMCs), 体外感染 HIV-1, 研究 HIV-1 复制水平。用 TP 刺激健康人 PBMCs 再感染 HIV-1, 通过流式细胞术分离 CD4⁺ T 淋巴细胞, 采用信使 RNA(mRNA)高通量测序和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法验证宿主基因表达谱变化。结果 TP 感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞和 TP 刺激健康人 CD4⁺ T 淋巴细胞可显著增加 HIV-1 感染和病毒复制水平, 培养细胞上清液中 HIV-1 p24 含量以及细胞内 HIV-1 DNA 拷贝数均高于对照组(均 $P<0.05$)。TP 刺激合并 HIV-1 感染组与单纯 HIV-1 感染组细胞 mRNA 基因表达谱存在明显差异, 其中趋化因子 CXCL5 和 CXCL8 表达水平在 TP 刺激合并 HIV-1 感染组显著上调, 提示趋化因子在 TP 促进 HIV-1 感染和复制中可能发挥重要作用。结论 TP 感染可显著增强外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 的易感性和病毒复制, 为 TP 感染促进 HIV-1 感染提供了新的科学依据。

[关 键 词] 梅毒螺旋体; HIV-1; 感染; CXCL5; CXCL8

[中图分类号] R759.1⁺1 R377⁺.1 R373.9

Enhancement of HIV-1 replication by CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood of syphilis patients and its potential molecular mechanisms

ZHANG Chun¹, KE Wujian², JIANG Yinbo², TANG Shixing¹ (1. Department of Epidemiology, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dermatology Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510091, China)

[Abstract] Objective To study the effect of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes of syphilis patients on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and replication, and explore the molecular mechanism of *Treponema pallidum* (TP) in facilitating HIV-1 replication. Methods Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from syphilis patients and TP-uninfected healthy blood donors, then infected with HIV-1 *in vitro*. HIV-1 replication level was studied. PBMCs of healthy persons were stimulated with TP and then infected with HIV-1. CD4⁺ T lymphocytes were isolated using flow cytometry, and changes in host gene expression profiles were verified using messenger RNA (mRNA) high-throughput sequencing and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) methods. Results CD4⁺ T lymphocytes from TP-infected persons and TP-stimulated CD4⁺ T lymphocytes from healthy persons could significantly enhance HIV-1 infection and viral replication levels. The HIV-1 p24 content in the supernatant of cultured cells and intracellular HIV-1 DNA copy number were both higher than those in the control group (both $P<0.05$). There were significant differences in the mRNA gene expression profiles between the TP stimulation combined with HIV-1 infection group and the HIV-1 infection alone group. Among them, the expression levels of chemokines CXCL5 and CXCL8 were significantly upregulated in the TP stimulation combined with HIV-1 infection group, indicating that chemokines might play an important role in the

[收稿日期] 2024-06-13
[基金项目] 广州市协同创新重大专项性传播疾病防控新技术研究与应用课题(201704020219)
[作者简介] 张纯(1999-), 女(汉族), 广东省汕头市人, 硕士研究生在读, 主要从事性病传染病相关研究。
[通信作者] 唐时幸 E-mail: tamgshixing@smu.edu.cn

enhancement of HIV-1 infection and replication by TP. **Conclusion** TP infection can significantly enhance the susceptibility of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes to HIV-1 and promote virus replication, providing new scientific evidences for TP infection promoting HIV-1 infection.

[Key words] *Treponema pallidum*; HIV-1; infection; CXCL5; CXCL8

性传播疾病 (sexually transmitted diseases, STD) 常常合并感染人类免疫缺陷病毒 I 型 (human immunodeficiency type 1, HIV-1), 并通过多种机制促进 HIV-1 感染, 包括生殖道局部炎症反应募集大量 CD4⁺ T 淋巴细胞、黏膜屏障受损, 以及生殖道局部细胞表达感染 HIV-1 所需的受体增多等, 增加感染和传播 HIV-1 的风险^[1]。STD 患者更容易感染 HIV-1, 淋病、梅毒、滴虫病和生殖器疱疹等疾病可促进生殖器部位 HIV-1 复制和释放^[2]。坦桑尼亚 STD 人群干预试验结果表明, 使用抗菌药物治疗 STD, 控制人群 STD 发病率, HIV-1 新发感染率下降了 40%^[3]。在马拉维开展的人群研究^[4] 结果表明, 服用抗菌药物治疗 STD 可抑制生殖道 HIV-1 复制, 降低人群 HIV-1 新发感染率。然而, 在乌干达开展的大规模人群治疗试验显示, 抗菌药物治疗可减少人群梅毒、生殖道沙眼衣原体感染, 但不能降低 HIV-1 感染率^[5], 说明单纯治疗 STD 并不能有效防止 HIV-1 感染或传播。加上存在大量无症状 STD 患者, 由于治疗不及时或不充分, 影响了治疗 STD 患者对预防 HIV-1 感染的效果^[6]。因此, 探究 STD 与 HIV-1 感染的关系及其机制, 仍然是预防 HIV-1 感染的重要课题。

梅毒是由梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*, TP) 感染所致, 是常见的 STD 之一。在中国, HIV-1 和梅毒合并感染率为 19.9%^[7]。梅毒从多个方面影响 HIV-1 感染和疾病发展。梅毒会影响抗逆转录病毒疗法 (antiretroviral therapy, ART) 的效果, 降低 HIV-1 感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞数量^[8]。其次, 梅毒引起的病变会破坏生殖道黏膜的完整性, 并招募活化的靶细胞, 在病变部位富集, 产生促炎细胞因子, 增加生殖道局部炎症细胞的数量, 增强 HIV-1 在体内的复制。梅毒还可能增加 HIV-1 结合配体的表达, 增加对 HIV-1 的易感性, 促进 HIV-1 传播。梅毒溃疡可使 HIV-1 传播的风险增加 2~9 倍, 梅毒相关炎症可使 HIV-1 感染风险增加 2~4 倍^[9]。同时, HIV-1 会抑制宿主免疫反应, 降低其对 TP 的清除能力, 增加梅毒传播风险^[9]。我国男男性行为者 (men who have sex with men, MSM) HIV-1 感染率以及梅毒和 HIV 合并感染率显著上升^[10], 已成

为重要的公共卫生问题。

梅毒影响 HIV-1 感染和传播的机制是值得研究的重要课题。本课题组前期研究^[11] 表明, 生殖道沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, CT) 感染可上调外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 趋化因子 CCL3L1 高表达, 增加 HIV-1 组装与释放, 促进 HIV-1 感染和复制, 故提出了 STD 调节宿主外周血 PBMCs 基因表达谱, 影响 HIV-1 感染与复制的新机制。本研究旨在进一步探讨梅毒患者 PBMCs 对 HIV-1 感染和复制的影响以及 TP 对宿主细胞基因表达谱的调控, 从分子水平阐明 TP 促进 HIV-1 感染的潜在机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象及标本来源 血标本分别取自广州南方医科大学皮肤病医院梅毒患者和广州血库未感染梅毒的健康献血者。梅毒患者的纳入标准是随机选取未患有其他性病 (HIV-1、沙眼衣原体感染等), 并排除具有其他疾病或炎症的梅毒确诊患者。所有受试者均提供书面知情同意书, 本研究经南方医科大学皮肤病医院伦理委员会批准 (项目编号: 2018015)。TP 裂解液由南方医科大学皮肤病医院提供, 并在本实验室常规保存。

1.2 主要试剂和仪器 DMEM (Gibco, C11330500BT); 胎牛血清 (Gibco, 10099141C); 1% 青霉素链球菌霉素 (Gibco, 15140-122); Lipofectamine 3000 试剂盒 (Invitrogen, L3000015); HIV-1 p24 酶联免疫吸附试剂盒 (北京科跃中楷, 96T); LIVE/DEAD Fixable Aqua Blue (赛默飞, L34957); TransScript All-in-One first-strand cDNA Synthesis SuperMix (全式金, AH341-01); PCR 仪 (苏州东胜, ETC811); HIV-1 pNL4-3 质粒通过美国国立卫生研究院艾滋病试剂项目获得。

1.3 试验方法

1.3.1 293T 细胞培养 293T 细胞在 DMEM 中培养, DMEM 中添加 10% 胎牛血清、1% 青霉素链球菌霉素, 根据细胞状态传代培养。

1.3.2 TP 制备 选择周龄在 13~15 周、不含抗

菌药物食物饲养的健康雄性新西兰白兔。耳缘静脉采血后,梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)和快速血浆反应素环状卡片试验(RPR)检测结果均为阴性时,将动物纳入试验。无菌条件下使用一次性注射器将 TP 标准株(Nichols 株)接种至雄性新西兰白兔两侧睾丸实质内。当观察到明显的睾丸炎症且 RPR 和 TPPA 检测结果转为阳性时,麻醉处死动物,无菌提取睾丸组织。将处理好的睾丸组织置于 50 mL 离心管中,加入 2 mL 生理盐水并适度挤压,离心管水平放置在水平振荡器上以最大速度振荡 25 min,重复此步骤两次。收集上清液,并在 4℃ 预冷的离心机依次 500 g 离心 5 min,1 000 g 离心 5 min,12 000 g 离心 30 min。离心后,加入适量磷酸盐缓冲液(PBS),取 10 μ L TP 菌悬液放置暗视野显微镜下观察 TP 活性并计数。

1.3.3 HIV-1 病毒制备 将 2.5 μ g HIV-1 pNL4-3 质粒 DNA 与 Lipofectamine 3000 混合,转染 293T 细胞(每孔 5×10^5 个细胞)。6 h 后更换培养基,再培养 48 h。收集含有 HIV-1 的细胞上清液,使用 HIV-1 p24 酶联免疫吸附试剂盒检测 HIV-1 p24 含量,并在 -80℃ 下保存。

1.3.4 分离 PBMCs 25 mL 外周血加入淋巴细胞分离液,400 g 离心 30 min。将 PBMCs 部分转移到含有 25 mL PBS 的离心管中,室温下 350 g 离心 10 min。获取的 PBMCs 悬浮在 RPMI 1640 完全培养基中保存或用于进一步分离 CD4⁺ T 淋巴细胞。

1.3.5 TP 刺激 PBMCs 室温下 PBMCs 细胞以 350 g 离心 10 min,使用 5 mL 含 10% FBS 新鲜 RPMI 1640 培养基重悬细胞沉淀,调节细胞密度至 10^7 cells/mL。加入 500 μ L 含 5×10^7 个 TP 的菌悬液,使感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 1:1,刺激 12~24 h。

1.3.6 体外 HIV-1 感染和 DNA 拷贝数检测 TP 刺激健康受试者的 PBMCs 3 d 后,用 1.3.2 制备的相当于 50 ng/mL HIV-1 p24 的 HIV-1 病毒感染 PBMCs,继续培养细胞 3 d。采用流式细胞术检测细胞内 HIV-1 p24 的表达,确定感染 HIV-1 的细胞百分比。

检测细胞内 HIV-1 DNA 拷贝数,首先使用 TP 刺激健康受试者的 PBMCs 3 d,然后 HIV-1 感染 4 h 后使用 PBS 洗净细胞,继续培养 3 d 后收获细胞,提

取 DNA,确定 HIV-1 DNA 拷贝数。使用 HIV-1 Gag 和 GAPDH 质粒进行 qPCR 扩增,生成标准曲线,用于 HIV-1 DNA 拷贝数定量检测。

1.3.7 HIV-1 p24 ELISA 检测 按说明书使用 HIV-1 p24 酶联免疫吸附试剂盒检测细胞上清液 HIV-1 p24。

1.3.8 流式细胞术 使用流式细胞术确定 HIV-1 p24 阳性的 CD4⁺ T 淋巴细胞占比。首先使用 LIVE/DEAD Fixable Aqua Blue 对细胞进行活性染色,固定细胞后使用 p24-phycoerythrin、CD4-phycoerythrin-Cy5 抗体进行细胞内和表面标记染色。应用 FlowJo 9.2 版软件分析数据。

1.3.9 CD4⁺ T 细胞的分离 按照说明书,依据 1.3.8 方法进行 CD4⁺ T 淋巴细胞分选,分别分选出 CD4⁺ T 淋巴细胞根据试验感染的病原体分成两组:接受 TP 刺激和 HIV-1 感染分选的 CD4⁺ T 淋巴细胞定义为 TP 刺激合并 HIV-1 感染组(TP-HIV-1),仅感染 HIV-1 分选的 CD4⁺ T 淋巴细胞定义为单纯 HIV-1 感染组(HIV-1)。

1.3.10 mRNA 测序 高通量测序由北京基因组研究所(中国深圳)进行,并构建测序文库。使用 Fast QC 评估原始序列读数的质量。对已测序的 reads 进行适配器序列修剪,并对低复杂度或低质量序列进行屏蔽,要求碱基识别准确率在 99% 以上,并将平均质量分数未达标的碱基序列清除,应用 HISAT2、Bowtie2、RSEM 比对参考基因,去除 rRNA,使用 TPM(Transcripts Per Million)计算基因的原始表达量并标准化,比对参考基因组的测序 reads 进行样本定量。最后应用 R 语言软件进行差异表达、富集分析。

1.3.11 RNA 提取和实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR) 使用 Qiagen RNA 提取试剂盒提取抗原特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞和未刺激 CD4⁺ T 淋巴细胞中的总 RNA,并去除 DNA 污染。取 500 ng 总 RNA 加入 4 μ L 5 $\times$ TransScript All-in-One Super-Mix,1 μ L Oligo(dT) Primer 和无酶水配成 20 μ L 逆转录 cDNA 体系,混匀后放置于 PCR 仪中进行逆转录反应。以 2 μ L cDNA 样本为模板,加入 10 μ L 2 $\times$ SYBR Green Master Mix,正向、反向引物各 0.8 μ L,以及 6.4 μ L 无酶水进行 RT-qPCR。引物序列见表 1。

表 1 TP 刺激合并 HIV-1 感染组前 10 位显著上调 mRNA 的引物及序列

Table 1 Primers and sequences for the top 10 significantly up-regulated mRNA for TP stimulation combined with HIV-1 infection group

引物名称	引物序列(5'-3')
KRT72-F	TGTACCAGACCAAGTGTGCC
KRT72-R	GGCGATCTCCATATCCAGGG
GSTM1-F	GCAGGAAACAAGGGCTTGGA
GSTM1-R	GAGAACACAGGTCTTGGGAGG
VWF-F	TTTGTCCAGGGACCTTTGT
VWF-R	TTGCCATTCTGGAAGTCCCC
RPS28-F	CAGGGTCACCAAGGTCCTG
RPS28-R	ATGATGGATCGGCTCGTGTC
CXCL8-F	TCTCTTGGCAGCCTTCCTGATT
CXCL8-R	TGGGGTGGAAAGGTTTGAGTA
CXCL5-F	CAGACCACGCAAGGAGTTCA
CXCL5-R	CTTCCACCTTGAGCACTGT
KRT1-F	TCCGAAGGAGAGTGGACCAA
KRT1-R	AATCTCCACCATGTCCTGC
SERF1A-F	AATCAACGAGAACTTGCCCG
SERF1A-R	AGCTGCCTTCTGCTTTTCTTG
DGR6-F	GGCTTCTACGTGACCACCAA
DGR6-R	CTTTCTGGTCACACTGGGCA
MAP7D2-F	CGGGAGGACCAAAAGAGAGC
MAP7D2-R	GGGCCAAGAGGAGCATCAT

1.4 统计分析 应用 SPSS 27.0 统计学软件进行数据分析,组间差异采用两组间 *t* 检验、配对样本 *t* 检验,应用 GraphPad Prism 7 定量分析 3 个独立试验的数据。所有 RNA-Seq 数据均来自两次重复试验。

2 结果

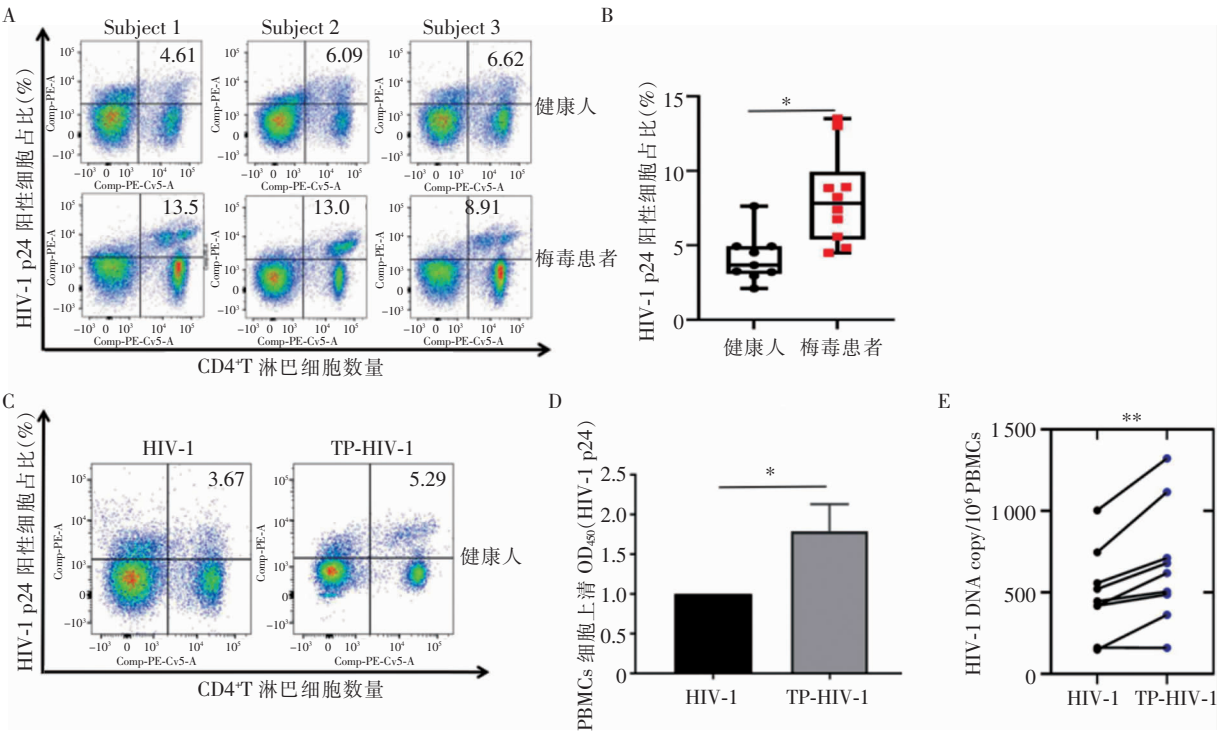
2.1 TP 刺激 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 易感性的影响 从 3 例梅毒患者和 3 名健康献血者外周血分离出 PBMCs 并感染 HIV-1。结果显示,梅毒患者和健康献血者的 CD4⁺ T 淋巴细胞中 HIV-1 p24 阳性细胞占比分别为 11.80%、5.77%,差异有统计学意义(*t* = -3.833, *P* < 0.05,图 1A、1B)。将 10 名健康献血者的 PBMCs 混匀后分成 2 组,一组使用 TP 刺激 3 d,另一组为未受 TP 刺激的对照,3 d 后均感染 HIV-1。与未受 TP 刺激的 CD4⁺ T 淋巴

细胞相比,受 TP 刺激组 HIV-1 p24 阳性 CD4⁺ T 淋巴细胞比率升高(5.29% VS 3.67%,图 1C),推测 TP 刺激提高 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 感染的易感性。细胞上清液中,受 TP 刺激与未受 TP 刺激 CD4⁺ T 淋巴细胞 HIV-1 p24 的 OD_{450nm} 值分别为 0.991、1.786, HIV-1 p24 浓度差异具有统计学意义(*t* = -5.212, *P* < 0.05,图 1D)。同时,与单纯 HIV-1 感染的 PBMCs 相比,TP 刺激后 PBMCs 中 HIV-1 DNA 拷贝数明显增加,TP 刺激与未刺激组 HIV-1 DNA 拷贝数分别为 248.59 × 10⁶、181.46 × 10⁶ (*t* = -3.749, *P* < 0.01,图 1E)。结果表明,梅毒患者或者 TP 刺激后外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 的易感性增加,并增强 HIV-1 在 PBMCs 中的复制。

2.2 TP 刺激合并 HIV-1 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞的基因表达谱分析 健康献血者 CD4⁺ T 淋巴细胞经 TP 刺激和 HIV-1 感染后,提取总 RNA 用于 mRNA 测序,并与单纯感染 HIV-1 的 CD4⁺ T 淋巴细胞比较(图 2A)。结果显示,TP 刺激合并 HIV-1 感染细胞和单纯 HIV-1 感染细胞中分别有 318、406 个基因的 mRNA 上调(图 2B),两组细胞间共有 15 个上调基因(图 2C)。此外,TP 刺激合并 HIV-1 感染细胞和单纯 HIV-1 感染细胞中分别有 347、679 个基因 mRNA 下调(图 2B),包括 106 个共有下调 mRNA 基因(图 2D)。TP 刺激导致的上调基因中,包括已知的参与调控 HIV-1 易感性的基因,如 RPS28、SLC7A8、CXCL8 和 CXCL9。

15 个共有的上调基因中,SLC7A8 基因的表达水平在两组细胞间差异明显。与单纯 HIV-1 感染细胞相比,TP 刺激合并 HIV-1 感染后,SLC7A8 基因表达水平升高 4 倍(图 3,表 2)。在 106 个共有的下调基因中,29 个基因的表达水平在两组间存在差异,包括 TAP1、ITPRIPL2、SOCS3、CISH、DAPK1、LAMP3、PLA2G4C、IFIT3、CCL22、MPEG1 等,其中 PLA2G4C、MPEG1 和 IFIT3 基因在 TP 刺激合并 HIV-1 感染细胞中下调更为明显。

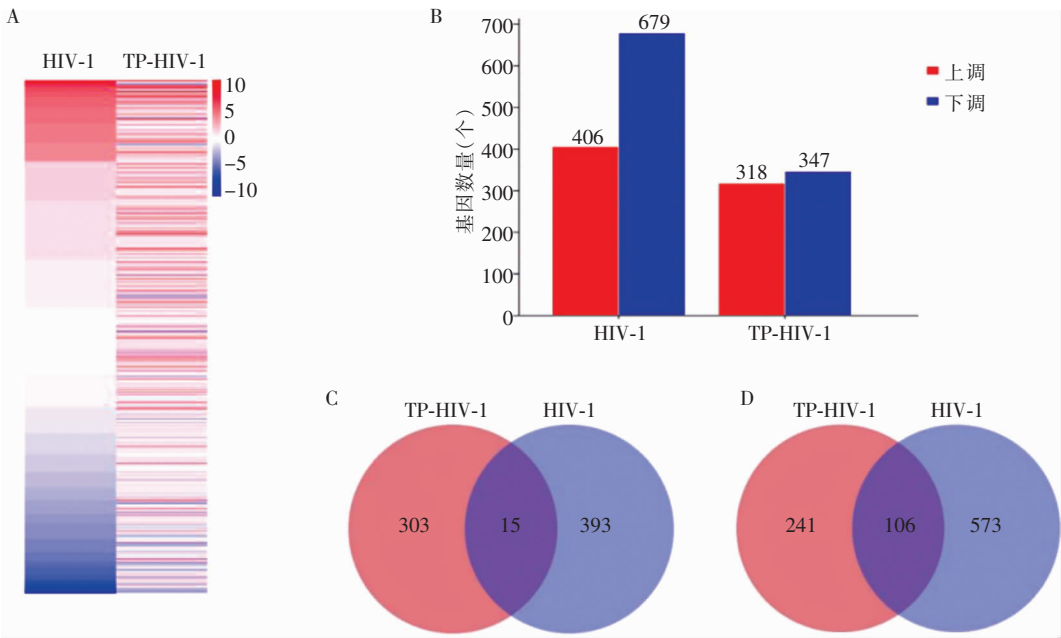
2.3 TP 刺激合并 HIV-1 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析 采用 GO 注释和 KEGG 分析 TP 刺激合并 HIV-1 感染导致表达上调的基因,发现与之对应的几个明显受调控的生物过程,包括细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路,以及与新型冠状病毒感染(COVID-19)相关的通路等(图 4A)。相反,单纯 HIV-1 感染



注：A、B 为从梅毒患者和健康献血者分离的 PBMCs 细胞 HIV-1 感染后，HIV-1 p24 阳性 CD4⁺ T 淋巴细胞占比；C、D、E 分别为健康献血者 PBMCs 细胞在 TP 刺激和未刺激后再感染 HIV-1，HIV-1 p24 阳性的 CD4⁺ T 淋巴细胞占比、培养细胞上清液中 HIV-1 p24 含量、细胞内 HIV-1 DNA 拷贝数。* 表示 $P<0.05$ ，** 表示 $P<0.01$ 。

图 1 梅毒患者或 TP 刺激后的 PBMCs 对 HIV-1 的易感性和复制水平

Figure 1 Susceptibility to HIV-1 and HIV-1 replication levels of PBMCs from syphilis patients or with TP-stimulation



注：A、B、C 分别为 TP 刺激合并 HIV-1 感染与单纯 HIV-1 感染的 CD4⁺ T 淋巴细胞 mRNA 基因表达谱火山图、差异性表达基因数量和差异性基因比较。

图 2 TP 刺激和 HIV-1 感染调控 CD4⁺ T 淋巴细胞基因表达

Figure 2 Gene expression in CD4⁺ T cells regulated by TP stimulation and HIV-1 infection

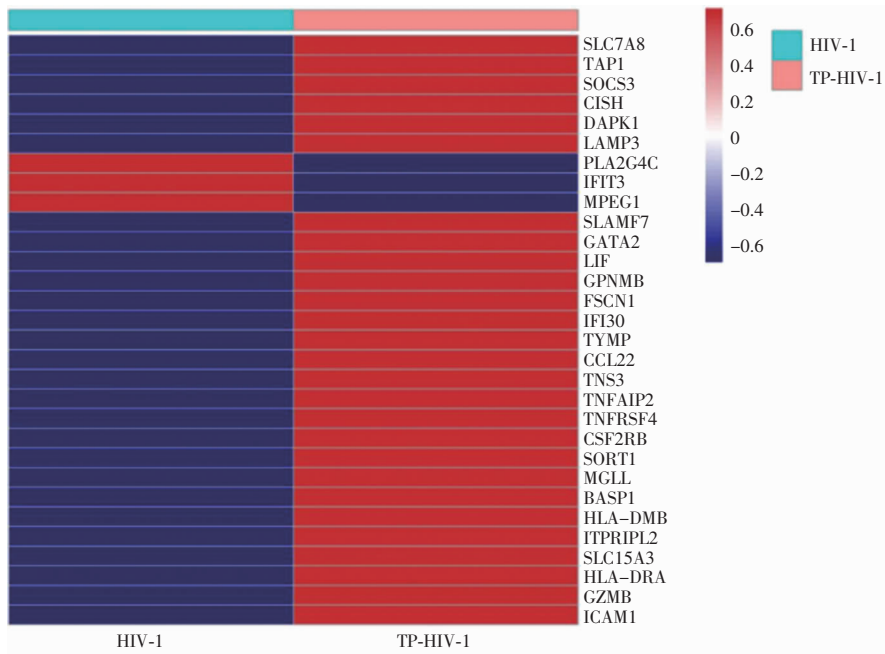


图 3 TP 刺激合并 HIV-1 感染与单纯 HIV-1 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞部分共有基因表达水平比较

Figure 3 Comparison of expression levels of partial common genes in CD4⁺ T lymphocytes between TP stimulation combined with HIV-1 infection group and HIV-1 infection alone group

表 2 单纯 HIV-1 感染或 TP 刺激合并 HIV-1 感染的 CD4⁺ T 淋巴细胞中共有基因 mRNA 差异表达水平

Table 2 Differential mRNA expression levels of common genes in CD4⁺ T lymphocytes from HIV-1 infection alone group and TP stimulation combined with HIV-1 infection group

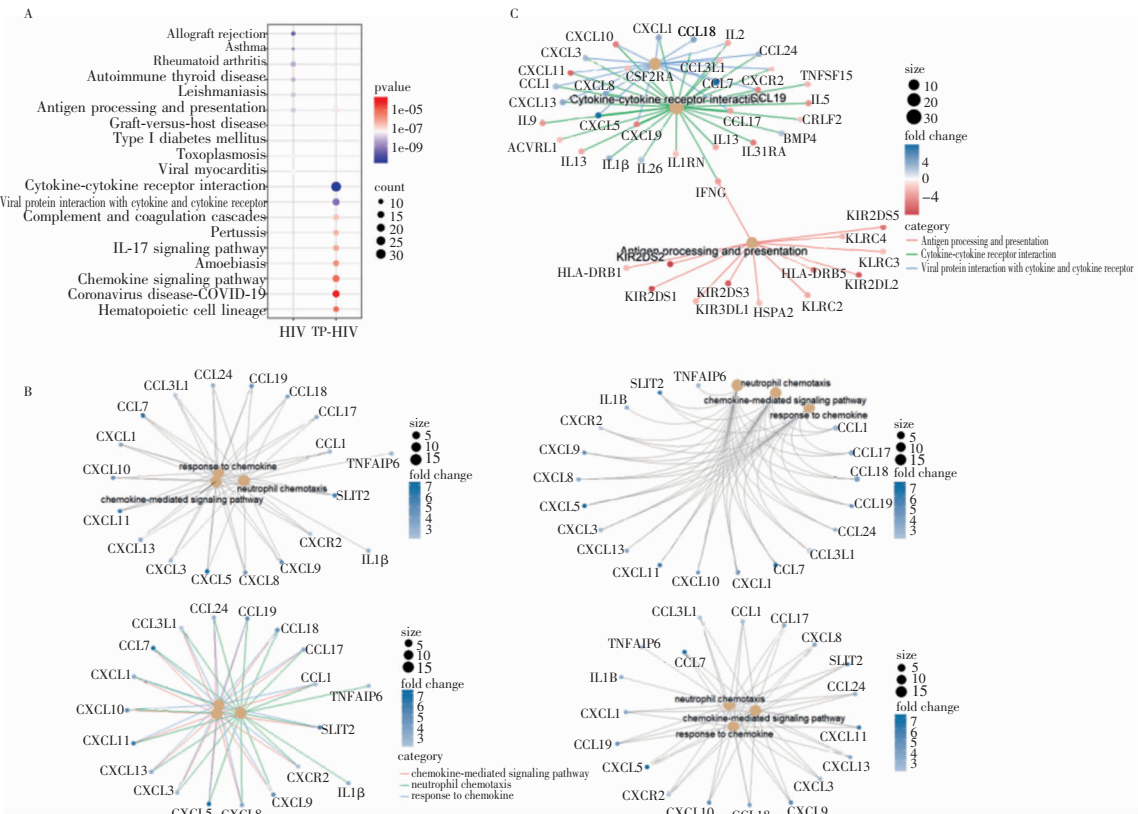
基因	HIV-1 组	TP-HIV-1 组	未处理对照组
SLC7A8	1.27	6.08	0.44
TAP1	69.97	153.22	324.76
SOCS3	7.83	15.10	59.93
CISH	6.70	29.27	86.12
DAPK1	0.36	1.81	4.00
LAMP3	2.67	8.18	34.39
PLA2G4C	1.68	0.67	5.08
IFIT3	19.18	8.82	43.48
MPEG1	0.81	0.40	2.30
SLAMF7	5.29	12.43	26.99
GATA2	1.15	3.52	7.32
LIF	1.08	3.15	9.58
GPNMB	0.65	3.78	10.14
FSCN1	5.21	11.87	101.88
IFI30	9.47	32.50	84.03
TYMP	3.55	17.07	84.30
CCL22	4.44	29.32	110.70

细胞诱导表达上调的基因主要影响与异体移植排斥反应、哮喘、类风湿性关节炎、自身免疫性甲状腺疾病和类似疾病有关的生物过程(图 4A)。比较 TP 刺激合并 HIV-1 感染细胞和单纯 HIV-1 感染细胞中富集的差异表达基因,发现 CCL1、CCL7、CCL17、CCL24、CXCL1、CXCL5、CXCL8、CXCL9、CXCL10、IL1 β 和 IL13 的表达存在显著差异(图 4B、4C)。其中,CCL1、CCL7、CCL17、CCL24、CXCL1、CXCL5、CXCL8、CXCL9 和 CXCL10 与趋化因子、趋化因子介导的信号通路、中性粒细胞趋化、细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体相互作用有关;IL1 可促进中性粒细胞趋化、细胞因子及细胞因子受体相互作用;IL13 激活细胞因子及细胞因子受体相互作用的途径。除了 IL13 基因表达在 TP 刺激合并 HIV-1 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞中下调外,其他差异表达基因的表达水平均上调。基因富集分析结果表明,TP 刺激诱导趋化因子相关信号通路活化,可能影响宿主细胞对 HIV-1 的易感性。

2.4 CXCL5 和 CXCL8 在 TP/HIV-1 共感染细胞中表达水平验证 为验证 TP 刺激合并 HIV-1 感染诱导的基因表达水平,对 mRNA 测序结果中前 10 个明显上调的基因(图 5A),采用 RT-qPCR 方法验证其表达水平(图 5B)。结果发现,除 RPS28 和

SERF1A 基因外,KRT72、GSTM1、VWF、CXCL8、CXCL5、KRT1 和 MAP7D2 基因的表达趋势一致,仅上调水平有所不同。CXCL5 和 CXCL8 在 TP 刺激合并 HIV-1 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞中的表达量明显增加,在 GO 和 KEGG 富集分析中也发现这两个

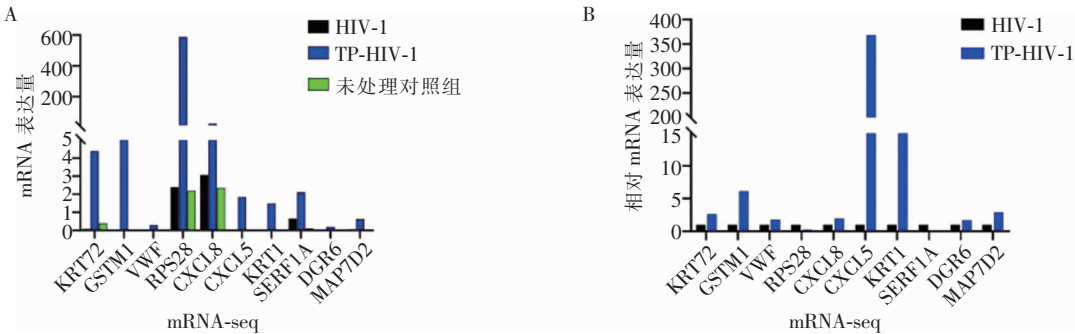
基因参与趋化因子反应、趋化因子介导的信号通路、中性粒细胞趋化、细胞因子 - 细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互作用等通路,提示在 TP 刺激合并 HIV-1 感染中发挥重要作用。



注:A 为 TP 刺激合并 HIV-1 感染诱导表达上调的基因及其对应的分子通路;B、C 分别为与上调基因相关的 GO 富集通路的网络图和 KEGG 富集途径网络图。

图 4 TP 刺激合并 HIV-1 感染与单纯 HIV-1 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Figure 4 GO and KEGG enrichment analysis of expressed genes in CD4⁺ T lymphocytes from TP stimulation combined with HIV-1 infection group and HIV-1 infection alone group



注:TP 刺激合并 HIV-1 感染的 CD4⁺ T 淋巴细胞,诱导宿主细胞基因表达水平升高,A 为 mRNA 测序结果中前 10 个明显上调的基因,B 为 RT-qPCR 方法验证的表达水平。

图 5 TP 刺激合并 HIV-1 感染的 CD4⁺ T 淋巴细胞基因表达水平比较

Figure 5 Comparison of gene expression levels in CD4⁺ T lymphocytes from TP stimulation combined with HIV-1 infection group

3 讨论

本研究证实梅毒患者或者 TP 刺激后的外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 易感性增高,病毒在细胞内复制增强。该结果与前期发现生殖道沙眼衣原体感染增加外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 的易感性和促进 HIV-1 复制的结果一致,说明 STD 病原体通过调控宿主外周血 PBMCs 基因表达,影响 HIV-1 的复制,是 STD 促进 HIV-1 感染和复制的共同机制之一。其潜在的分子机制是增加趋化因子在细胞内的表达水平,促进 HIV-1 复制。其中,CT 感染通过上调 CCL3L1 基因表达,影响 HIV-1 组装与释放,调控 HIV-1 复制与感染^[11]。本研究发现,TP 感染主要上调宿主细胞 CXCL5 和 CXCL8 表达水平,影响 HIV-1 的复制。

细胞因子是由各种细胞分泌的小蛋白,在 HIV-1 感染中起着至关重要的作用^[12-13]。HIV-1 感染的特点是促炎细胞因子/趋化因子的持续分泌,包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL) - 1 β 、干扰素 α (IFN- α)、IL-6 和 CXCL8 (IL-8)^[14]。这种促炎环境促进了免疫系统的长期过度激活,是 HIV-1 感染的特征^[15]。前期研究^[16]发现,神经梅毒患者脑脊液中 CXCL8、CXCL10 和 CXCL13 水平升高,可作为潜在的生物标志物;而耐药梅毒患者血清中的 CXCL8、CXCL9 和 CXCL10 水平也会升高。已经证实,CXCL8 通过 CXCR1 和 CXCR2 受体介导,促进单核细胞衍生巨噬细胞 (MDM) 和小胶质细胞感染 HIV-1。CXCL8 通过促进 NF- κ B 向细胞核转移,从而促进 HIV-1 长末端区域 (long-terminal region, LTR) 的活性,发挥其下游效应,增强 HIV-1 复制^[17]。结合前期研究^[17-18]结果推测,梅毒和 HIV-1 共同感染导致细胞中 CXCL8 的表达显著上调,进而增加 NF- κ B 进入细胞核,从而促进 HIV-1 LTR 的活性并增加 HIV-1 的复制,可能是梅毒患者 PBMCs 对 HIV-1 易感性和病毒复制水平增高的机制之一。此外,有文献^[19]支持在 HIV-1 感染的 MDM 中,CXCL5 和 IL1 在 mRNA 和蛋白水平上都有显著上调。HIV-1 感染的 MDM 中 CXCL5 表达上调部分受 IL-1 β 和 ERK1/2 磷酸化调控,而 CXCL5 的过表达可趋化中性粒细胞和 CXCR2 阳性细胞,促进 HIV-1 感染与复制^[15,20-22]。本研究结果表明,TP 刺激合并 HIV-1 共同感染时,IL-1 β 和 CXCL5 mRNA 水平明显升高。因此,认为梅毒和

HIV-1 共同感染可能调控 IL-1 β 分泌增加以及 ERK1/2 磷酸化升高,进而增加 CXCL5 表达。CXCL5 的过度表达会增强趋化 CXCR2 阳性细胞的能力,增加 HIV-1 的感染和复制。

但是,本研究中其他明显上调基因 KPR1、GSTM1 和 MAP7D2 对 HIV-1 复制的影响尚不清楚。TP 和 HIV-1 感染诱导氧化应激,导致甘露糖结合凝集素 (MBL) 与细胞角蛋白 (KPR1) 结合,激活补体 (LCP) 产生 C3 片段,刺激补体受体 1 (CR1) 和补体受体 3 (CR3),导致受感染单核细胞的病毒复制能力增强和 NF- κ B 转位^[23-26],可能影响 HIV-1 复制。GSTM1 基因翻译的谷胱甘肽 S-转移酶 M1 (GSTM1),负责环氧化物和二元醇修饰的多环芳烃 (PAHs) 的代谢,这些物质与 DNA 加合物的形成有关,可能会改变调控 HIV-1 复制转录因子结合位点的序列^[27]。MAP7D2 通过阻止 MYH9 泛素化来稳定 MYH9,从而抑制 HMGB1 的分泌,而细胞外低水平的 HMGB1 会促进单核巨噬细胞中 HIV-1 病毒的复制^[28-29]。谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 参与一系列外源代谢和自由基清除,但 GSTM1 与 HIV-1 感染之间的联系尚待证实。GSTM1 属于一组被称为 GST 的酶,负责代谢不同的致癌物质。研究^[23]表明,GSTM1 基因中的无效等位基因与 GST 的功能受损有关,GSTM1 基因的多态性与 CD4⁺ T 细胞数量减少和 HIV-1 病毒载量升高有关。另外,在 mRNA 测序和 qPCR 定量分析试验中,RPS28 基因表达趋势相反,RPS28 基因编码的是一种位于细胞质核糖体中的蛋白,属于核糖体蛋白的 S28E 家族。该蛋白质参与核糖体组装和蛋白质的生物合成过程。与编码核糖体蛋白的基因一样,RPS28 基因也存在多个经过加工的假基因分散在基因组中。假基因的存在可能导致 mRNA 测序基因表达量高于实际转录量,产生假信号或者不稳定表达,导致与 RT-qPCR 结果不符。因此,本研究未将 RPS28 纳入进一步研究和讨论。

此外,梅毒感染会增强宿主细胞的免疫激活,影响细胞因子 (包括 TNF- α) 的分泌,维持 HIV-1 病毒载量^[30]。本研究中,前三个富集的通路分别是细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用以及趋化因子信号通路。本研究还发现一个新的 GO 和 KEGG 富集途径,即 COVID-19。研究^[31-32]发现,HIV-1 感染者发生严重 COVID-19 的风险较高,HIV-1 感染合并 COVID-19 者的促炎单核细胞亚群炎症风暴相关基

因高表达,表明两者具有相似的机制或基因调控。提示 TP 刺激增强免疫细胞激活,增加细胞因子(趋化因子)的分泌,进而在合并感染中发挥重要作用。

综上所述,本研究初步表明 TP 刺激合并 HIV-1 感染可增加宿主 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV-1 的复制水平和易感性,为研究 STD 促进 HIV-1 感染的机制提供了新的证据。不足之处在于没有深入研究 TP 诱导宿主细胞高表达基因调控 HIV-1 复制的具体机制。

致谢:感谢广州血库(中国广州)和南方医科大学皮肤病医院提供血标本。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(1): 33 - 42.
- [2] Quilter L, Dhanireddy S, Marrazzo J. Prevention of sexually transmitted diseases in HIV-infected individuals [J]. Curr HIV/AIDS Rep, 2017, 14(2): 41 - 46.
- [3] Grosskurth H, Mosha F, Todd J, et al. Impact of improved treatment of sexually transmitted diseases on HIV infection in rural Tanzania: randomised controlled trial[J]. Lancet, 1995, 346(8974): 530 - 536.
- [4] Cohen MS. HIV and sexually transmitted diseases: lethal synergy[J]. Top HIV Med, 2004, 12(4): 104 - 107.
- [5] Wawer MJ, Sewankambo NK, Serwadda D, et al. Control of sexually transmitted diseases for AIDS prevention in Uganda: a randomised community trial. Rakai Project Study Group[J]. Lancet, 1999, 353(9152): 525 - 535.
- [6] Mayer KH, Venkatesh KK. Interactions of HIV, other sexually transmitted diseases, and genital tract inflammation facilitating local pathogen transmission and acquisition[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(3): 308 - 316.
- [7] Wu YL, Zhu WQ, Sun CQ, et al. Prevalence of syphilis among people living with HIV and its implication for enhanced coinfection monitoring and management in China: a Meta-analysis[J]. Front Public Health, 2022, 10: 1002342.
- [8] Fan LN, Yu AP, Zhang DF, et al. Consequences of HIV/syphilis co-infection on HIV viral load and immune response to antiretroviral therapy[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 2851 - 2862.
- [9] Witt LS, Wendy Fujita A, Ho J, et al. Orosyphilis[J]. Open Forum Infect Dis, 2022, 10(2): ofac685.
- [10] Chow EPF, Wilson DP, Zhang L. HIV and syphilis co-infection increasing among men who have sex with men in China: a

systematic review and Meta-analysis[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22768.

- [11] Dzakah EE, Zhao JC, Wang LY, et al. *Chlamydia trachomatis* stimulation enhances HIV-1 susceptibility through the modulation of a member of the macrophage inflammatory proteins [J]. J Invest Dermatol, 2022, 142(5): 1338 - 1348. e6.
- [12] Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells[J]. Chem Immunol Allergy, 2005, 87: 130 - 144.
- [13] Mensching L, Hoelzemer A. NK cells, monocytes and macrophages in HIV-1 control: impact of innate immune responses [J]. Front Immunol, 2022, 13: 883728.
- [14] Serrero M, Planès R, Bahraoui E. PKC- δ isoform plays a crucial role in Tat-TLR4 signalling pathway to activate NF- κ B and CXCL8 production[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2384.
- [15] Guha D, Klamar CR, Reinhart T, et al. Transcriptional regulation of CXCL5 in HIV-1-infected macrophages and its functional consequences on CNS pathology[J]. J Interferon Cytokine Res, 2015, 35(5): 373 - 384.
- [16] Dong XY, Zhang JW, Yang FF, et al. CXCL8, CXCL9, and CXCL10 serum levels increase in syphilitic patients with seroresistance[J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(11): e24016.
- [17] Mamik MK, Ghorpade A. Chemokine CXCL8 promotes HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages and primary microglia via nuclear factor- κ B pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92145.
- [18] Natarajan V, Moar P, Kaur US, et al. *Helicobacter pylori* reactivates human immunodeficiency virus-1 in latently infected monocytes with increased expression of IL-1 β and CXCL8[J]. Curr Genomics, 2019, 20(8): 556 - 568.
- [19] Duskova K, Nagilla P, Le HS, et al. MicroRNA regulation and its effects on cellular transcriptome in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected individuals with distinct viral load and CD4 cell counts[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 250.
- [20] Bron R, Klasse PJ, Wilkinson D, et al. Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein [J]. J Virol, 1997, 71(11): 8405 - 8415.
- [21] Caccuri F, Giagulli C, Reichelt J, et al. Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 matrix proteins specify different capabilities to modulate B cell growth [J]. J Virol, 2014, 88(10): 5706 - 5717.
- [22] Nair MP, Kandaswami C, Mahajan S, et al. Grape seed extract proanthocyanidins downregulate HIV-1 entry coreceptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells[J]. Biol Res, 2002, 35(3 - 4): 421 - 431.
- [23] Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, et al. Oxidative stress during HIV infection: mechanisms and consequences[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 8910396.
- [24] Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, et al. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1 [J]. Am J Pathol, 2001, 159(3): 1045 -

1054.

[25] Elbim C, Pillet S, Prevost MH, et al. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients; relationship with viral load[J]. J Virol, 1999, 73(6): 4561 – 4566.

[26] Liu FM, Dai S, Gordon J, et al. Complement and HIV-I infection/HIV-associated neurocognitive disorders[J]. J Neurovirol, 2014, 20(2): 184 – 198.

[27] Feldman DN, Feldman JG, Greenblatt R, et al. CYP1A1 genotype modifies the impact of smoking on effectiveness of HAART among women[J]. AIDS Educ Prev, 2009, 21(Suppl 3): 81 – 93.

[28] Cassetta L, Fortunato O, Adduce L, et al. Extracellular high mobility group box-1 inhibits R5 and X4 HIV-1 strains replication in mononuclear phagocytes without induction of chemokines and cytokines[J]. AIDS, 2009, 23(5): 567 – 577.

[29] Wu Q, Yue X, Liu HS, et al. MAP7D2 reduces CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte infiltration through MYH9-HMGB1 axis in colorectal cancer[J]. Mol Ther, 2023, 31(1): 90 – 104.

[30] Lawn SD, Shattock RJ, Acheampong JW, et al. Sustained plasma TNF-alpha and HIV-1 load despite resolution of other parameters of immune activation during treatment of tuberculosis in Africans[J]. AIDS, 1999, 13(16): 2231 – 2237.

[31] Spinelli MA, Jones BLH, Gandhi M. COVID-19 outcomes and risk factors among people living with HIV[J]. Curr HIV/AIDS Rep, 2022, 19(5): 425 – 432.

[32] Demoliou C, Papaneophytou C, Nicolaidou V. SARS-CoV-2 and HIV-1: so different yet so alike. Immune response at the cellular and molecular level[J]. Int J Med Sci, 2022, 19(12): 1787 – 1795.

(本文编辑:翟若南)

本文引用格式:张纯,柯吴坚,江银波,等. 梅毒患者外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞增强 HIV-1 复制及其潜在的分子机制[J]. 中国感染控制杂志, 2025, 24(5): 647 – 656. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 – 9638. 20256619.

Cite this article as: ZHANG Chun, KE Wujian, JIANG Yinbo, et al. Enhancement of HIV-1 replication by CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood of syphilis patients and its potential molecular mechanisms[J]. Chin J Infect Control, 2025, 24(5): 647 – 656. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 – 9638. 20256619.