ผลของ INTERLEUKIN-2 ต่อการสร้าง mRNA ของ IL-2, IL-18, RANTES และ MIP-1α ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV

นางสาวจลินธร สินธุวัฒนวิบูลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-212-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 18816059

EFFECTS OF INTERLEUKIN-2 ON IL-2, IL-18, RANTES AND MIP-1α mRNA PRODUCTIONS IN HIV INFECTED PATIENTS

Miss Chalinthorn Sinthuwattanawibool

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-331-212-9

Thesis Title	Effects of interleukin-2 on IL-2, IL-18, RANTES and MIP-1 α mRNA productions in HIV infected patients.
By	Miss Chalinthorn Sinthuwattanawibool
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.

Accepted by the Graduate school, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Instructor Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

.....Member

(Instructor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.)

นางสาวจินธร สินธุวัฒนวิบูลย์ : ผลของ Interleukin-2 ต่อการสร้าง mRNA ของ IL-2, IL-18, RANTES และ MIP-1α ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม ; 70 หน้า. ISBN 974-331-212-9.

การติดเชื้อ HIV เป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าการสร้าง IL-2 ลดลงแต่มีการสร้าง chemokines เพิ่มขึ้น การรักษาด้วย IL-2 พบว่าสามารถทำให้จำนวนเซลล์ CD4+ T lymphocytes เพิ่มสูงขึ้นโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไวรัส อย่างไรก็ตามผลของการรักษาด้วย IL-2 ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ต่อการสร้าง cytokines และ chemokines นั้นยังมีการศึกษาน้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาแบบ *in vivo*

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการให้ IL-2 เข้าใต้ผิวหนังต่อการสร้าง mRNA ของ IL-2, IL-18, RANTES และ MIP-1α ในเม็ดเลือดขาว peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาประกอบด้วยผู้ป่วยติดเชื้อ HIV จำนวน 48 รายที่มีจำนวนเซลล์ CD4+ อย่างน้อย 350 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และไม่มีประวัติการติดเชื้อฉวยโอกาสมาก่อน ผู้ป่วยได้รับการแบ่งกลุ่มแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ 1 (24 ราย) ได้รับเพียงยาต้านไวรัสเอดส์ เช่น ddI และ d4T (ART) และกลุ่มที่ 2 (24 ราย) ได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ร่วมกับการฉีด IL-2 เข้าใต้ผิวหนัง (ART+IL-2) ด้วยขนาด 1.5, 4.5 และ 7.5 MIU ขนาดใดขนาดหนึ่ง วันละ 2 ครั้งติดต่อกัน 5 วันทุก 8 สัปดาห์รวม 3 รอบ (cycles) ได้ทำการตรวจวัด mRNA ของ IL-2, IL-18, RANTES และ MIP-1α ใน PBMC ของผู้ป่วย 10 รายในกลุ่ม ART ณ สัปดาห์ที่ 0 และ 8 และทำการตรวจวัด ณ รอบที่ 3 ของการให้ IL-2 (วันที่ 0, 4 และ 29 ของรอบที่ 3) ในกลุ่ม ART+IL-2 ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของ IL-2 ต่อการแสดงออกของยีน IL-2 ระหว่าง 2 กลุ่มโดยการตรวจวัด ณ สัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 16 และตรวจวัดการแสดงออกของยีน IL-2 ที่ตอบสนองต่อขนาดต่าง ๆของ IL-2 ที่ได้รับ ณ วันที่ 0 และ 4 ของรอบแรก

ผลการศึกษาพบว่า ณ สัปดาห์ที่ 16 ของการศึกษาพบว่าสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ IL-2 mRNA ในกลุ่ม ART+IL-2 เท่ากับร้อยละ 50 ซึ่งสูงกว่าในกลุ่ม ART (ร้อยละ 0) อย่างมีนัยสำคัญ (P=0.03) และยังพบว่าการแสดงออกของยีน IL-2 เพิ่มขึ้นตามขนาดของ IL-2 ที่ได้รับ นั่นคือร้อยละ 12.5, 71 และ 77 (P=0.04 และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ IL-2 ขนาด 1.5 MIU bid) ในกลุ่มที่ได้รับ IL-2 ขนาด 1.5, 4.5 และ 7.5 MIU bid ตามลำดับ ผู้ติดเชื้อทุกรายมีการแสดงออกของยีน IL-18, RANTES และ MIP-1α โดยไม่เกี่ยวข้องกับการฉีด IL-2

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการให้ยาต้านไวรัสเอดส์ร่วมกับการฉีด IL-2 เข้าใต้ผิวหนังทำให้สัดส่วนของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ IL-2 mRNA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และการเพิ่มนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของยาที่ได้รับ ส่วนการให้ยาต้านไวรัสเอดส์ร่วมกับการฉีด IL-2 เข้าใต้ผิวหนังไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ IL-18, RANTES และ MIP-1α ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV อย่างไรก็ตามควรศึกษาต่อไปโดยใช้วิธี quantitative RT-PCR เพื่อดูว่าปริมาณการสร้าง cytokine และ chemokine เหล่านี้ต่างกันหรือไม่ โดยสรุป ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าขนาดของ IL-2 ที่ฉีดรักษาควรเริ่มต้นอย่างน้อยที่ 4.5 MIU bid เพื่อกระตุ้นการสร้าง IL-2 ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ได้อย่างน้อยร้อยละ 70 ซึ่งน่าจะนำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและการเพิ่มขึ้นของ CD4+ T lymphocytes ได้อย่างมีประสิทธิภาพเพียงพอ

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C845571 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: HIV/ IL-2/ IL-18/ RANTES/ MIP-1α / RT-PCR/ mRNA
CHALINTHORN SINTHUWATTANAWIBOOL: EFFECTS OF INTERLEUKIN-2 ON IL-2, IL-18, RANTES AND MIP-1α mRNA PRODUCTIONS IN HIV INFECTED PATIENTS. THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR KIAT RUXRUNGTHAM, M.D. 70 pp. ISBN 974-331-212-9.

HIV infection results in a profound disturbance of immune function, characterised by the reduction of the *in vitro* production of IL-2; on the contrary, chemokine production is usually increased. IL-2 has been chosen for *in vivo* immunotherapy and shown a significant recovery of CD4+ T lymphocytes without increasing viral load. Little data on the effects of IL-2 administration in HIV-infected patients on the cytokine and chemokine production .

This study was to investigate the effects of IL-2 given subcutaneously on IL-2, IL-18, RANTES and MIP-1α mRNA production in PBMC from the IL-2 treated HIV-infected patients. Forty eight HIV-infected patients with CD4 cell counts ≥350 cells/mm^3 and no history of opportunistic infections were recruited. Patients were randomly assigned to receive either antiretrovirals alone; ddI and d4T (ART) or antiretrovirals plus sc. IL-2 (ART+IL-2) at one of three doses i.e., 1.5, 4.5 and 7.5 MIU bid, every 12 hours for five days per each cycle. The cycle were repeated in 8 weeks interval for a total of 3 cycles. IL-2, IL-18, RANTES and MIP-1α mRNA production were evaluated from PBMC of 10 patients at baseline and week 8 in ART group and at the third cycle (precycle 3, day 4, and day 29) of IL-2 administration in ART+IL-2 group. PBMC collected at baseline and week 16 in both groups were analysed to compare the IL-2 treatment on IL-2 gene expression. And to assess those effect in a dose response, PBMC collected from all of ART plus IL-2 at baseline and day 4 of cycle 1 were analysed.

The analysis demonstrated that the proportion of patients with IL-2 mRNA expression in PBMC was significantly higher in the ART plus IL-2 group than those of the ART group (50% vs 0%, P=0.03) at week 16. The percentages of IL-2 mRNA expression also increased in a dose-response fashion to the IL-2 dosage, i.e., 12.5%, 71% and 77% in 1.5, 4.5 and 7.5 MIU bid, respectively. There were no significant differences in the proportion of patients with IL-18, RANTES, MIP-1α and IL-2 mRNA production between baseline and week 8 in the ART group and at precycle 3, day 4, and day 29 in the ART+IL-2 group.

These results showed a significant increase in the proportion of patients with IL-2 mRNA expression which was a dose-dependent fashion. In contrast, sc. IL-2 showed no effect on IL-18, RANTES and MIP-1α mRNA production. However, a quantitative RT-PCR should be used for future study to quantitatively compare the difference if there was existing. Our findings suggest that a dose of at least 4.5 MIU bid of IL-2 given for 5 days per cycle for a minimum of 2 cycles is effective in enhancing endogenous IL-2 production. Consequently, this may translate into quantitative and qualitative restoration of the immune system.

ภาควิชา...สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2541..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The present investigator wishes to express her deep gratitude to the following, who had helped in making this thesis possible.

Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D., the lecturer of the Department of Medicine and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his excellent and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and encouragement throughout the period of this study.

Dr. Yamakasu Ohmoto, Cellular Technology Institute, Otsuka Pharmaceutical Ltd., Japan, for providing the primer sequences and the PCR protocol.

All the staffs of HIV-NAT, AIDS Research Center, Thai Red Cross Society, and those of Anonymous clinic for their kind help in collecting the blood specimens and follow up the patients.

Sincere thanks are also given to all staffs in the Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine and in the Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their assistance and advice.

Finally, the investigator is deeply indepted to her advisory committee for their kindness and helpful suggestion for the completeness of this thesis and to her family for their understanding and support during her study period.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

THAI ABSTACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENT..... vii

LIST OF TABLES..... x

LIST OF FIGURES..... xi

ABBREVIATIONS..... xii

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II LITERATURE REVIEW..... 4

HISTORY..... 4

VIRION STRUCTURE..... 4

RECEPTORS AND CELLULAR DISTRIBUTION..... 5

REPLICATION..... 5

MODE OF TRANSMISSION 6

MECHANISMS OF CD4 T LYMPHOCYTE DYSFUNCTION.....7

IMMUNOPATHOGENESIS OF HIV INFECTION..... 9

Clinical course of HIV infection.....9

1. Primary infection.....9

2. Clinical latency.....10

3. AIDS-defining illness.....10

HIV disease progression.....10

1. Typical progressors..... 10

2. Rapid progressors.....11

3. Long-term nonprogressors.....11

4. Long-term survivors.....12

HOST RESPONSE TO HIV INFECTION.....12

Humoral response.....12

Cellular response.....13

CYTOKINES AND HIV DISEASE.....14

CHEMOKINES AND HIV DISEASE..... 16

IL-18 (IFN-γ-inducing factor, IGIF)..... 17

TREATMENT OF HIV INFECTION.....18

Antiretroviral therapy..... 19

Immunotherapy..... 20

III MATERIALS AND METHODS..... 22

PART I Standardization of RT-PCR for IL-2, IL-18, RANTES and MIP-1α mRNA production 22

1. Study group..... 22

2. Preparation of PBMC.. 22

3. RNA isolation.....22

4. cDNA synthesis..... 23

5. PCR amplification..... 23

6. Analysis of PCR products..... 24

PART II Reproducibility of RT-PCR amplification.....26

PART III Study of IL-2, IL-18, RANTES and MIP-1α mRNA production in PBMC from HIV-infected patients 26

1. Patient population..... 26

2. Specimen collection and preparation of PBMC.. 27

3. RNA isolation, cDNA synthesis and PCR amplification..... 27

4. Analysis of PCR products.....27

5. Statistical analysis.....28

IV RESULTS.....29

V DISCUSSION.....43

VI CONCLUSION.....47

REFERENCES.....48

APPENDIX.....63

APPENDIX I..... 63

APPENDIX II..... 65

APPENDIX III.....68
BIOGRAPHY..... 70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
I	Cytokine and chemokine primers used for PCR	25
II	Randomization schedule and treatment assignments	26
III	Number of patients with IL-2 mRNA expression after three different doses of IL-2 treatment at baseline and day 4of cycle 1	34
IV	Number of patients with IL-2 mRNA expression in PBMC of ART and ART plus IL-2 group	35
V	Proportion of patients with cytokine and chemokine mRNA production in PBMC of ART group	40
VI	Proportion of patients with cytokine and chemokine mRNA production in PBMC of the ART plus IL-2 group at the third cycle of IL-2 administration	42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Standardization of RT-PCR analysis for cytokine and chemokine mRNA production in PBMC of HIV seronegative donors	30
2	Reproducibility of RT-PCR amplification	31
3	Densitometric integration analysis of A). β-actin and B) RANTES mRNA production	32
4.	Dose-dependent IL-2 mRNA expression in PBMC of the ART plus IL-2 group at day 4 of cycle 1 of IL-2 therapy	36
5.	Percentage of patients with IL-2 mRNA expression in the ART group compared with the ART plus IL-2 group at baseline and week 16	37
6.	mRNA production of cytokines and chemokines in antiretroviral alone group at baseline and week 8	39
7.	mRNA production of cytokines and chemokines in antiretroviral plus sc. IL-2 group at the third cycle of IL-2 administration	41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

ADCC	=	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AIDS	=	acquired immune deficiency syndrome
bp	=	base pair
°C	=	degree Celsius
CCR5	=	beta-chemokine receptor 5
CD	=	cluster of differentiation
CDC	=	center for disease control
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CTL	=	cytotoxic T lymphocyte
CXCR4	=	alpha- chemokine receptor 4
DDW	=	deionized distilled water
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates
DW	=	distilled water
env	=	envelope
et al.	=	et alii
g	=	gram
gp	=	glycoprotein
HAART	=	highly active antiretroviral therapy
HIV	=	human immunodeficiency virus
HLA	=	human leukocyte antigen
i.e.	=	id est
IFN-γ	=	interferon gamma
IGIF	=	interferon gamma inducing factor
IL	=	interleukin
LPS	=	lipopolysaccaride
IVDUs	=	intravenous drug users
LNTP	=	long-term nonprogressor
LTRs	=	long terminal repeats
M	=	molar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M-CSF	=	macrophage-colony stimulating factor
MHC	=	major histocompatibility complex
MIU	=	million unit
mg/l	=	milligram per liter
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
min	=	minute
MIP-1α	=	macrophage inflammatory protein -1 alpha
MIP-1β	=	macrophage inflammatory protein -1 beta
ml	=	milliliter
mm^3	=	cubic millimeter
MTD	=	maximally tolerated dose
M-tropic	=	macrophage-tropic
NK	=	natural killer
nm	=	nanometer
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cells
PCR	=	polymerase chain reaction
PHA	=	phytohemagglutinin
pol	=	polymerase
RANTES	=	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolution per minute
RT	=	reverse transcriptase
T-cells	=	thymus-derived lymphocytes
TGF-β	=	T cell growth factor-beta
TNF-α	=	tumor necrosis factor-alpha
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
T-tropic	=	T-cell line tropic
O.D.	=	optical density
μg/ml	=	microgram per milliliter
μl	=	microliter
UV	=	ultraviolet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย