

健脾益肾中药对 HIV 特异性 T 细胞免疫功能的影响

李伟华¹ 李传云² 闫惠平¹ 张欣¹ 赵丹彤¹ 李秀惠³

摘要 目的 探讨健脾益肾中药对 HIV/AIDS 患者、HIV 感染者特异性 T 细胞免疫功能的影响。**方法** 从 2010 年 6 月—2012 年 6 月在北京佑安医院随访的 HIV/AIDS 感染者中随机抽出健脾益肾中药联合高效抗逆转录病毒疗法 (highly active anti-retroviral therapy, HAART) 治疗组患者 20 例, 单独 HAART 治疗组患者 23 例。检测 CD4⁺ T 淋巴细胞绝对计数及病毒载量, 同时使用 HIV 全基因重叠多肽作为刺激抗原, 应用酶联免疫斑点实验 (enzyme-linked immunospot, ELISPOT) 技术测定两组 HIV 特异性 T 淋巴细胞免疫反应强度。**结果** 两组 CD4⁺ T 淋巴细胞绝对计数及病毒载量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与单独 HAART 治疗组比较, 健脾益肾中药联合 HAART 治疗组患者的 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着治疗时间的延长 (6、12、18、24 个月), 健脾益肾中药联合 HAART 组 HIV 特异性 T 细胞有增强的趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 健脾益肾中药治疗可增强 HIV/AIDS 患者 HIV 特异性 T 细胞免疫功能。

关键词 人类免疫缺陷病毒; 健脾益肾中药治疗; 高效抗逆转录病毒疗法; 酶联免疫斑点试验; T 淋巴细胞免疫应答

Effect of Chinese Drugs for Pi Strengthening Shen Benefiting on the Immunity Function of HIV Patients' Specific T Cells LI Wei-hua¹, LI Chuan-yun², YAN Hui-ping¹, ZHANG Xin¹, ZHAO Dan-tong¹, and LI Xiu-hui³ 1 Infection and Immunity Research Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing (100069), China; 2 Liver Transplantation Center of Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing (100069), China; 3 Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing (100069), China

ABSTRACT Objective To explore the effect of Chinese drugs for Pi strengthening Shen benefiting (CDPSSB) on the immunity function of HIV/AIDS patients' specific T cells. **Methods** Totally 20 patients were randomly recruited from the treated group [treated by CDPSSB combined highly active anti-retroviral therapy (HAART)] and 23 patients were randomly recruited from the control group (treated by HAART alone). All patients were follow-up infected persons from You'an Hospital between from June 2010 to June 2012. CD4⁺ T absolute counts and HIV viral load were detected. Meanwhile, HIV whole gene overlapping peptides were used as stimulating antigen. The response intensity of HIV specific T cells was detected in the two groups. **Results** There was no statistical difference in CD4⁺ T absolute counts or HIV viral load between the two groups ($P > 0.05$). The response intensity of HIV specific T cells was significantly enhanced in the treated group, when compared with the control group ($P < 0.05$). Along with elongation of treatment time (6, 12, 18, and 24 months) in the treated group, the response intensity of HIV specific T cells showed enhancing tendency, but there was no statistical difference among these time points ($P > 0.05$). **Conclusion** CDPSSB could enhance improve the immunity function of HIV specific T

基金项目: 国家“十二五”传染病重大专项资助项目 (No. 2012ZX10001001-008); 北京市中医药科技发展基金项目 (No. JJ2009-31); 北京市中医管理局青年科学研究资助项目 (No. QN2011-122011); 北京佑安肝病艾滋病基金 (No. BJYAH-2011-023)

作者单位: 1. 首都医科大学附属北京佑安医院感染与免疫研究中心 (北京 100069); 2. 首都医科大学附属北京佑安医院肝脏移植中心 (北京 100069); 3. 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合中心 (北京 100069)

通讯作者: 李秀惠, Tel: 010-83997040, E-mail: lixiuhui@sohu.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0812

cells, which might be one of its mechanisms.

KEYWORDS HIV; Pi Strengthening Shen Benefiting Chinese medical therapy; highly active antiretroviral therapy; enzyme-linked immunospot assay; T lymphocyte response

大量的研究表明中药不仅能够改善患者体质,增强免疫力,延长患者的生命时间,还可改善患者的临床症状,降低机会性感染的发生率和病死率等^[1-3]。虽然目前中药在治疗艾滋病方面有着独特的优势,但如何来评价和体现其优势以及其治疗艾滋病的作用机制尚不清楚。本研究从 T 细胞的功能角度出发,使用非常特异和敏感的酶联免疫斑点实验(enzyme-linked immunospot, ELISPOT)方法从单个细胞水平来评价健脾益肾中药对艾滋病的干预作用。

资料与方法

1 诊断标准 AIDS 及 HIV 感染诊断参照中华医学会组织编写的《艾滋病诊疗指南》(2011 版)^[4]。中医辨证标准参照《中医药治疗艾滋病临床技术方案(试行)》(2005 年)^[5]中脾肾亏虚证标准拟定。

2 纳入标准 年龄 18 ~ 65 岁; CD4 > 100 个/mm³; 所有病例均经北京市或当地疾病预防控制中心免疫印迹试验确定为 HIV 感染。本研究经北京佑安医院医学伦理委员会审批,所有受试者均签署知情同意书。

3 排除标准 合并其他自身免疫性疾病; 合并其他机会性感染; 活动性肺结核; 孕妇; 精神病史; 严重心脏病; 失代偿性肝硬化及严重的全血细胞减少。

4 一般资料 此研究为回顾性试验,按照设定的纳入和排除标准,从 2010 年 6 月—2012 年 6 月在北京佑安医院随访的 HIV/AIDS 感染者中按照简单随机抽样方法抽出健脾益肾中药联合高效抗逆转录病毒疗法(highly active anti-retroviral therapy, HAART)治疗组(简称中药联合 HAART 组)患者 20 例,男 17 例,女 3 例,年龄 28 ~ 55 岁,平均(39.69 ± 10.25)岁。单用 HAART 治疗组(简称 HAART 组)患者 23 例,男 19 例,女 4 例,年龄 25 ~ 56 岁,平均(38.95 ± 9.42)岁。

5 治疗方法 HAART 组口服齐多夫定片(AZT, 每片 200 mg, 东北制药总厂, 批号 H20020324), 每次 200 mg, 每日 2 次; 或司他夫定(D4T, 每片 15 mg, 上海迪赛诺生物医药有限公司, 批号 H20050839), 每次 30 mg, 每日 2 次; 拉米夫定(3TC, 每片 300 mg, 葛兰素史克制药有限公司, 批号 H20090626), 每次 300 mg, 每日 1 次; 依非韦伦(EFV, 每片 600 mg, 澳大利亚, Merck Sharpe Dohme 公司, 批号 H20080218), 每次 600 mg, 每晚

1 次。中药联合 HAART 治疗组, 在 HAART 治疗基础上给予健脾益肾中药, 组成: 黄芪 30 g 甘草 15 g 白术 10 g 女贞子 15 g 山药 15 g 茯苓 15 g 党参 15 g 丹参 15 g。每日 1 剂, 患者每 30 天复诊 1 次, 详细记录病情变化。病情有变化时随时来诊处理。90 天为 1 个疗程。每 180 天采集 1 次标本[包括血浆和外周血单个核细胞(PBMC)等]。

6 PBMC 的准备 应用 Ficoll 密度梯度离心法(挪威 Axis-shield PoC AS 公司)分离获得 PBMC, 放入液氮冻存储备用。使用时将复苏好的 PBMC 加入完全 RPMI1640 培养液(美国 Hyclone 公司)培养过夜后使用。在研究过程中如出现培养液混浊、培养液明显变黄或镜下观察有菌丝出现则为细胞污染, 应重新复苏细胞或抽取患者 PBMC 重新实验。

7 Elispot 实验 HIV 全基因重叠多肽[由英国牛津大学分子医学研究所人类免疫研究中心惠赠(美国 Sigma 公司), 每个肽段长 18 个氨基酸, 相邻肽段间重叠 10 个氨基酸]。每孔放入终浓度为 2 μg/mL 的单肽, 设 3 个复孔, 进行 Elispot 筛选。先用浓度为 10 μg/mL 抗 IFN-γ McA(瑞典 Mabtech 公司)包被 96 孔板(美国 Millipore) 4 ℃ 过夜, 将感染者 PBMC 调整浓度为 2 × 10⁶ 个/mL, 每孔加入细胞悬液 50 μL 和浓度为 4 μg/mL 肽 50 μL。阴性对照孔为 1 × 10⁵ 个细胞加终浓度为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 100 μL, 阳性对照为 1 × 10⁵ 个细胞加终浓度为 10 μg/mL 的植物血凝素(PHA, 购于德国 Bio Stat 公司)。37 ℃, 体积分数为 0.05 CO₂ 温育 12 ~ 16 h。含 0.01% 吐温的 PBS(美国 BD 公司)洗板 3 次。加入生物素标记的鼠抗人 IFN-γ 的二抗 100 μL(终浓度 1 μg/mL), 室温温育 2 h, 同上方法洗板 6 次。每孔加入 100 μL 碱性磷酸酶标记的链球菌亲和素(终浓度 1 μg/mL), 室温避光温育 45 min, 同上方法洗板 6 次。加入终浓度为 0.3 mg/mL 的四唑硝基蓝底物(NBT, 美国 BioRad 公司)和 0.15 mg/mL 的 5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸底物(BCIP, 美国 BioRad 公司)显色液 100 μL/孔, 室温反应 10 min, 流水冲洗终止反应。用酶联免疫斑点读板仪(Elispot Reader, 德国 AID 公司产品)读取每个孔中的点数, 并将每孔测得值减去阴性对照值, 以每一百万个 PBMC 产生的斑点形成单位数(spot forming unit, SFU)/10⁶ PBMC 为计算单位。单孔 > 37 SFU/10⁶ PBMC 并且高于阴性对照孔 3 倍以上

为阳性^[6]。阳性对照孔大于 400 SFU/10⁶ PBMC 的实验为有效数据。HIV 特异性 T 细胞反应强度是指每个 HIV-1 感染者各个阳性孔中 SFU 数值之和。

8 CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数 仪器采用 FACS Calibur Flow Cytometry System (美国 BD 公司), 试剂采用 TriTEST three-color Reagent (美国 BD 公司)。检测分析软件为 CELLQUEST 自动软件。严格参照仪器及试剂操作规程执行。

9 HIV-1 病毒载量检测 采集外周静脉血, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 用 NucliSense EasyQHIV-1 v1.2 技术平台系统 (法国 BioMerieux 公司), 进行 HIV-1 病毒载量检测, 检测范围是 1.70 ~ 6.48 Log 值。

10 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。本文数据均为正态分布, 两组间均数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组患者基线 CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数及病毒载量比较 (图 1、图 2) 中药联合 HAART 组患者的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数平均值 353.44 个/ μ L (91 ~ 733 个/ μ L), 病毒载量平均值 3.00 Log (0 ~ 5.82 Log)。HAART 组患者的 CD4⁺T 淋巴细胞绝对

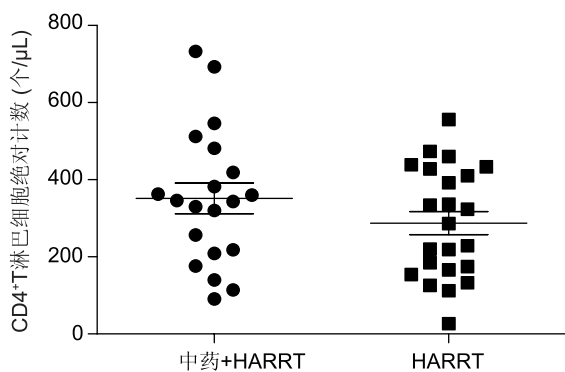


图 1 两组 CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数比较

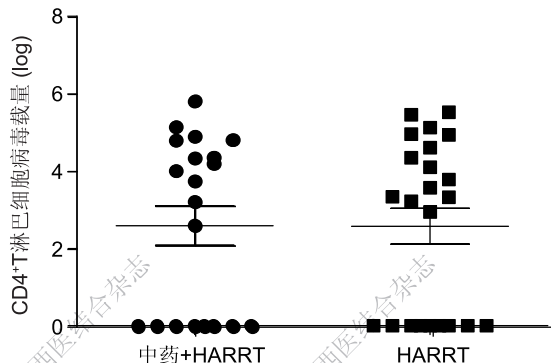
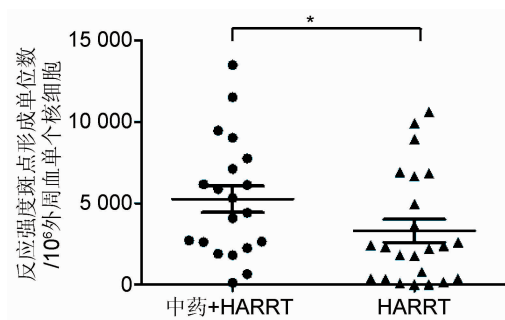


图 2 两组 CD4⁺T 淋巴细胞病毒载量

计数平均值 287.76 个/ μ L (27 ~ 556 个/ μ L), 病毒载量平均值 2.59 Log (0 ~ 5.54 Log)。两组 CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数及病毒载量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 两组患者 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度情况比较 (图 3) 中药联合 HAART 组患者 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度的平均值是 5244.41 SFU/10⁶ PBMC (104 ~ 13497 SFU/10⁶ PBMC)。HAART 组 HIV/AIDS 患者中有 2 例未检测到 HIV 特异性 T 细胞阳性反应, 其余 21 例 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度的平均值是 3 298.18 SFU/10⁶ PBMC (80 ~ 10 542 SFU/10⁶ PBMC)。与 HAART 组比较, 中药联合 HAART 治疗组 HIV 特异性 T 细胞免疫反应强度明显增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 与 HAART 组比较, * $P < 0.05$

图 3 两组患者 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度情况比较

3 中药联合 HAART 组不同时间点 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度比较 (图 4) 在 20 例健脾益肾中药联合 HAART 治疗的 HIV/AIDS 患者中, 有 10 例患者留取了治疗 6、12、18、24 个月的细胞标本, 不同时间点 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

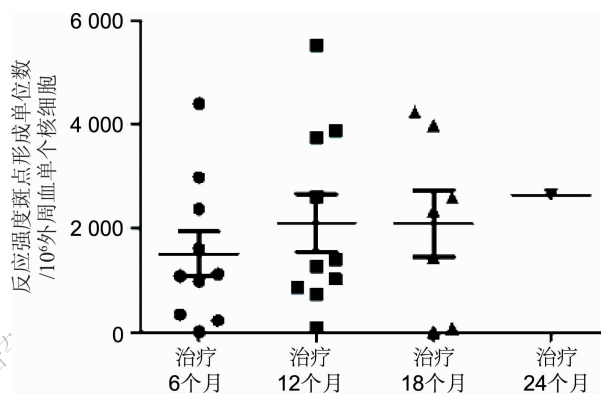


图 4 中药联合 HAART 治疗不同时间点 HIV 特异性 T 细胞免疫应答情况

讨 论

本研究使用的健脾益肾中药基本方剂是北京佑安医院的协定处方健脾益肾方,其组方有黄芪、山药、茯苓、党参、白术、丹参等,临床应用过程中发现此方剂能明显改善患者临床症状、提高生活质量、减轻肝脏损伤^[3]。但其具体的作用机制还不清楚。HIV-1 特异性细胞毒 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)在控制 HIV-1 感染的发病中起着关键作用^[7]。通过对 HIV 自然感染过程的观察发现,在 HIV 感染初期,甚至在 HIV 特异性抗体出现之前,感染者的外周血中已有大量有活性的 CTL 存在。CTL 应答是在 HIV 感染急性期能测出的最早的 HIV 特异性免疫应答反应^[8,9]; HIV-1 感染后病情进展缓慢或长期不进展者 HIV-1 特异性 CTL 功能强^[9],抗逆转录病毒治疗有效者 CTL 功能明显增高。因此, HIV 特异性 T 细胞的功能的增强甚至比 CD4⁺T 细胞数目的增高意义更大。以 CTL 为基础的 HIV-1 疫苗设计也成为当前研究的热点^[9]。CTL 识别多肽的数量和强度直接反映了抗病毒治疗疗效或 HIV 疫苗应用的成功与否,因此 HIV-1 特异性 CTL 功能在 HIV 疾病进展中起了非常关键的作用。ELISPOT 技术是目前国际公认的检测细胞免疫功能的最可靠的方法之一,已经成为抗原特异性 T 细胞研究的主流技术^[10]。因此,本研究使用 HIV 全基因多肽和 ELISPOT 技术从单个细胞水平来评价中药对艾滋病的干预机制。ELISPOT 方法检测到的特异性 T 细胞 90% 以上的是 CD8⁺T 细胞,也就是细胞毒 T 细胞,所以也有人直接称 ELISPOT 方法检测到的特异性 T 细胞的免疫反应是特异性 CTL 的免疫反应^[11]。因此,本研究采用 ELISPOT 方法检测药物治疗后 HIV 特异性 T 细胞的功能变化具有非常好的可靠性。

CD4⁺T 细胞计数和 HIV 病毒载量是评判 HIV 疾病进程的 2 个主要指标^[4,12]。并且文献^[11,13]报道 HIV 特异性 T 细胞免疫功能与 CD4⁺T 细胞计数呈正相关,与 HIV 病毒载量呈负相关。本研究中两组基线 CD4⁺T 细胞计数和病毒载量比较差异无统计学意义,说明这两组患者的疾病进程和疾病状况均衡可比,这样就去除了疾病本身对试验的干扰。本研究结果显示健脾益肾中药联合 HAART 治疗组患者的 HIV 特异性 T 细胞的免疫应答强度明显高于 HAART 组,说明健脾益肾中药可以增强 HIV/AIDS 患者 HIV 特异性 T 细胞免疫功能。健脾益肾中药治疗 6、12、18、24 个月 4 个时间点 HIV 特异性 T 细胞免疫应答强度比较差异

无统计学意义,其原因可能与样本量小有关,下一步应加大样本量进一步观察健脾益肾中药治疗时间与 HIV 特异性 T 细胞免疫应答的关系。

总之,本研究结果提示健脾益肾中药治疗可能增强 HIV/AIDS 患者 HIV 特异性 T 细胞免疫功能,这可能是健脾益肾中药有效治疗艾滋病的机制之一。

参 考 文 献

- [1] 苗芊. 益气解毒法治疗艾滋病 123 例临床观察[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2006, 13(6): 43-44.
- [2] 李秀惠, 胡建华, 刘翠娥, 等. 中西医结合治疗 85 例艾滋病患者临床疗效观察[J]. 北京中医, 2007, 26(1): 11-12.
- [3] 刘翠娥, 李秀惠, 吴昊, 等. 益气健脾汤联合高效抗逆转录病毒疗法治疗艾滋病病毒感染者或艾滋病患者 43 例临床观察[J]. 中医杂志, 2013, 54(19): 1657-1659.
- [4] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组制定. 艾滋病诊疗指南(2011 版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(6): 321-330.
- [5] 2004 年国家中医药管理局组织的专家论证小组. 中医药治疗艾滋病临床技术方案(试行)[A]. 第一次全国中西医结合传染病学术会议论文汇编[C]. 2006 年.
- [6] 李伟华, 闫惠平, 杨虹冰, 等. 中国人类免疫缺陷病毒-1B 亚型 Gag 蛋白特异性 T 淋巴细胞免疫应答[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(9): 558-561.
- [7] Yan J, Sabbaj S, Bansal A, et al. HIV-Specific CD8⁺ T Cells from elite controllers are primed for survival[J]. J Virol, 2013, 87(9): 5170-5181.
- [8] Ritchie AJ, Campion SL, Kopycinski J, et al. Differences in HIV-specific T cell responses between HIV-exposed and -unexposed HIV-seronegative individuals[J]. J Virol, 2011, 85(7): 3507-3516.
- [9] McMichael AJ. In pursuit of an HIV vaccine: an interview with Andrew McMichael[OL]. BMC Biology <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/11/60>.
- [10] 陈茶, 黄彬, 姜悦. 一种细胞免疫学新技术—酶联免疫斑点技术[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 243-246.
- [11] 尚红, 韩晓旭, 王亚男, 等. HIV/AIDS 患者特异性细胞毒性 T 细胞功能的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(9): 696-699.
- [12] 梁娟英, CD4⁺、病毒载量检测对 HAART 联合中药治疗艾滋病效果观察的作用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2010, 32(3): 401-402.
- [13] 李伟华, 闫惠平, 杨虹冰, 等. 中国人类免疫缺陷病毒-1B 亚型 Gag 蛋白特异性 T 淋巴细胞的免疫应答[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(9): 558-561.

(收稿:2013-05-19 修回:2013-12-04)