

长期高效抗逆转录病毒治疗对 HIV-1 感染者体内 异常免疫激活和免疫重建的影响

孙 健¹, 吴南屏¹, 冯婷婷¹, 冯 磊¹, Norbert Brockmeyer²

(1. 浙江大学医学院附属第一医院国家传染病诊治重点实验室, 浙江 杭州 310006;

2. 德国鲁尔大学约瑟夫艾滋病中心)

[摘要] 目的:研究长期高效抗逆转录病毒治疗(HAART)对于人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)感染者体内异常免疫激活和免疫重建的影响。方法:德国鲁尔大学艾滋病中心 HIV-1 感染者 55 例,在 HAART 治疗前及 HAART 治疗后(治疗 1、3、5 年),检测其外周血中 CD4⁺T, CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T 细胞和 NK 细胞数。结果:与健康对照比较,治疗前的 HIV-1 感染者体内 CD4⁺T 和 NK 细胞数量显著下降(P 均 <0.05), CD8⁺T, CD8⁺HLADR⁺T 细胞数量显著升高(P 均 <0.05)。HAART 治疗后 CD4⁺T 和 NK 细胞数回升(P 均 <0.05),但仍低于正常水平(P <0.05);HAART 治疗 1 年、3 年和 5 年的机体 CD4⁺T 细胞数各组间无统计学差异;NK 细胞数随 HAART 治疗进程有下降趋势,1 年组和 5 年组间数据有统计学差异(P <0.05)。CD8⁺HLADR⁺T 细胞数迅速降低减少(P <0.05),治疗前和治疗后各组、3 年组和 5 年组间、1 年组和 5 年组间数据皆有统计学差异(P 均 <0.05)。CD8⁺CD38⁺T 细胞数 HAART 治疗前、后,治疗后各组间均无统计学差异。结论:HAART 治疗能有效升高免疫细胞数,降低体内异常免疫激活水平,一定程度上实现免疫重建,但即使长期 HAART 治疗也难以使免疫细胞数恢复到完全正常水平;HLADR 对于 HAART 治疗更敏感;长期 HAART 治疗过程中 HIV-1 病毒可能通过某种方式继续损害 NK 细胞。

[关键词] 获得性免疫缺陷综合征/药物治疗;抗逆转录病毒治疗,高效/治疗应用;杀伤细胞,天然/血液;艾滋病;HAART;NK;CD38;HLADR

[中图分类号] R 512.91 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)06-0618-05

Effect of long-term highly active antiretroviral therapy on abnormal immune activation and immune reconstruction in HIV-1 infected individuals

SUN Jian¹, WU Nan-ping¹, FENG Ting-ting, FENG Lei, Norbert Brockmeyer² (1. State Key Laboratory of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. The Department of Dermatology and Allergology, Ruhr-University, Bochum, Germany)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long-term highly active antiretroviral therapy

收稿日期:2009-11-17 修回日期:2010-08-25

基金项目:国家十一五“艾滋病结核肝炎传染病重大专项”(2008ZX10001-006)

作者简介:孙健(1983-),男,硕士。

通讯作者:吴南屏(1957-),女,博士,教授,博导,主要从事艾滋病研究工作;E-mail:flwnp@yahoo.com.cn

(HAART) on the abnormal activation state and immune reconstitution in HIV-1 infected individuals. **Methods:** CD4⁺T, CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T and NK cell counts in the peripheral blood of 55 cases of HIV-1 infected individuals were measured by flow cytometry before and after HAART, and 30 healthy individuals served as controls. **Results:** Compared to healthy individuals, the CD4⁺T and NK cells decreased ($P < 0.05$) and CD8⁺T and CD8⁺HLADR⁺T cells increased significantly ($P < 0.05$) in HIV-1 infected individuals before HAART. After HAART, CD4⁺T and NK cells were recovered ($P < 0.05$), but still lower than normal ($P < 0.05$); CD4⁺T cell count in HIV-1 infected individuals remained stable at 1, 3 and 5 years after treatment, there were no significant differences among each groups; NK cell count had a downward trend with HAART ($P < 0.05$), there were statistical differences between 1-year and 5-year-HAART groups ($P < 0.05$). CD8⁺HLADR⁺T cells decreased promptly ($P < 0.05$), there were statistical differences between before and after HAART groups, 1-year and 5-year, 3-year and 5-year HAART groups ($P < 0.05$). CD8⁺CD38⁺T cells declined slowly, with no statistical differences among each groups. **Conclusion:** HAART can effectively reduce abnormal immune activation in HIV-1 infected individuals and achieve immune reconstitution to a certain degree.

[**Key words**] Acquired immunodeficiency syndrome/drug ther; Antiretroviral therapy, highly active/ther use; Killer cells, natural/blood; AIDS; HAART; Natural killer (NK) cells; CD38; HLADR

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010, 39(6): 618-622.]

国内外研究表明, 高效抗逆转录病毒疗法 (highly active anti-retroviral therapy, HAART) 能有效地抑制人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 复制, 促进机体免疫重建, 降低异常免疫激活。但目前国内外相关研究多受限于病例较少, 或者 HAART 治疗的时间较短 (多少于 2 年), 不能进行长期 HAART 治疗效果的追踪报道。为此, 本研究采用合作单位德国鲁尔大学艾滋病中心持续 HAART 治疗长达 5 年的 HIV-1 感染者的数据, 进行 HAART 治疗前后的比较, 并选取 HAART 治疗后多个时间点持续检测 HAART 治疗效果。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2003 年起在德国鲁尔大学艾滋病中心接受治疗的 HIV-1 感染者 55 例, 男 35 例, 女 20 例, 年龄 21 ~ 60 岁, 所有患者均经过确证试验为抗 HIV-1 阳性。HAART 治疗前和治疗后的第 1 年, 第 3 年和第 5 年采集全血和血浆用于各细胞亚群计数和 HIV 病毒载量的检测。5 年中总随访率为 87%, 失访率

13%。健康对照组 30 例, 男 18 例, 女 12 例, 年龄 29 ~ 45 岁, 均无特殊病史, 体检无异常发现, 近 2 个月无感染史, 同样方法检测各细胞亚群计数和 HIV 病毒载量的检测。

1.2 实验材料和方法 血浆 HIV-RNA 病毒载量测定: 采用 HIV-1 Monitor 1.5 commercial Kit (美国 Roche 公司), 行荧光定量 PCR (COBAS Amplisensor PCR), 对血浆样品的 HIV-RNA 作定量分析, 操作严格按照试剂盒说明进行, 结果以每毫升血浆含病毒拷贝数表示 (cps/ml)。

流式细胞术分析: 抗 CD3, CD4, CD8, CD38, HLADR 和 CD56 抗体, 购自美国 R&D 公司, FACS 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。取 100 μ l 全血, 加入 CD3 PerCP/CD4 FITC/CD56 PE 或 CD3 PerCP /CD8 FITC/CD38 PE/Anti-HLA-DR APC 抗体试剂各 20 μ l, 室温避光孵育 20 min。加入红细胞溶解液 1 ml, 震荡混匀后然后置于流式细胞仪上进行检测分析, 计算 CD4⁺T, CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T 细胞和 NK 细胞绝对数 (/ml)。

1.3 统计学处理 使用统计学软件 SPSS 16.0

中的 K-S 法, 检验数据是否服从正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 对健康对照组和治疗前组数据进行两独立样本 t 检验; 对治疗前、治疗后多个检测时间点的数据进行重复测量方差分析, 再用 q 检验做组间两两比较; $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 HIV-1 感染者 HAART 治疗后外周血 HIV RNA 载量 HAART 治疗效果较好, 各检测时间点 HIV-1 感染者体内 HIV RNA 载量基本上处于检测水平以下 (< 50 cps/ml)。

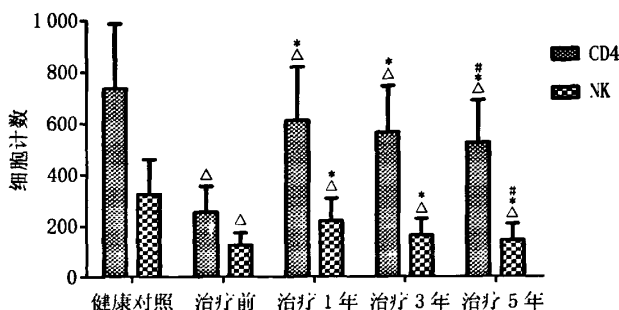
2.2 健康对照、HIV-1 感染者 (HAART 治疗前、后) 外周血 CD4⁺T, NK 细胞绝对数比较 由图 1 可见, 与健康对照比较, 治疗前的 HIV-1 感染者体内 CD4⁺T 和 NK 细胞数量显著下降 (P 均 < 0.05); HAART 后机体 CD4⁺T 和 NK 细胞数均高于治疗前 (P 均 < 0.05), 治疗 1、3、5 年组数据均低于健康组 (P 均 < 0.05); CD4⁺T 细胞数 HAART 治疗各年限组间比较均无统计学差异; NK 细胞数随 HAART 治疗进程有下降趋势, 1 年组和 5 年组间数据有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.3 健康对照、HIV-1 感染者 (HAART 治疗前、后) 外周血 CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T 细胞绝对数比较 由图 2 可见, 与健康对照比较, 治疗前的 HIV-1 感染者体内 CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T 细胞数量显著升高 (P 均 < 0.05); CD8⁺T 细胞数 HAART 治疗前、后, 及治疗各年限组间比较均无统计学差异; CD8⁺HLADR⁺T 细胞数 HAART 治疗后下降 ($P < 0.05$), 随 HAART 治疗进程迅速降低, 治疗前和治疗后各组, 3 年组和 5 年组间, 1 年组和 5 年组间数据均有统计学差异 (P 均 $<$

0.05); CD8⁺CD38⁺T 细胞数 HAART 治疗前、后, 及治疗各年限组间比较均无统计学差异。

3 讨论

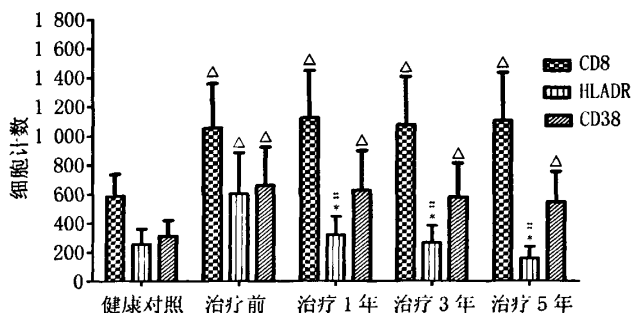
HIV-1 感染首先是通过侵犯靶细胞 CD4⁺T 细胞, 造成其细胞大量破坏和分化、调节功能损



与对照组比较, $\Delta: P$ 均 < 0.05 ; *: 与治疗前或对照组比较, P 均 < 0.05 ; #: 1 年组与 5 年组比较, P 均 < 0.05 。

图 1 30 例健康对照、55 例 HIV-1 感染者 (HAART 治疗前、后) 外周血 CD4⁺T, NK 细胞绝对数 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Peripheral blood CD4⁺T, NK cell counts of 30 cases of healthy controls and 55 cases of AIDS patients (before and after HAART)



与对照组比较, $\Delta: P < 0.05$; *: 与治疗前比较, $P < 0.05$; #: 治疗前与治疗各年限组、3 年组与 5 年组、1 年组与 5 年组比较, P 均 < 0.05 。

图 2 30 例健康对照、55 例 HIV-1 感染者 (HAART 治疗前、后) 外周血 CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T 细胞绝对数 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Peripheral blood CD8⁺T, CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺HLADR⁺T cell counts of 30 cases of healthy controls and 55 cases of AIDS patients (before and after HAART)

害,同时病毒复制不断产生抗原,刺激 $CD4^+T$ 、 $CD8^+T$ 细胞表面的免疫活化分子 HLADR、CD38 表达增高,使得 T 淋巴细胞处于一种异常的免疫激活状态^[1-2]。国内外相关研究表明,HAART 治疗能够有效控制 HIV-1 感染者体内的病毒载量,降低 T 细胞的免疫激活状态,一定程度上实现了免疫重建。研究 HIV-1 感染者体内免疫细胞及免疫活化分子表达的改变,对于临床检测 HIV-1 疾病进展以及 HAART 疗效具有重要意义。但是,目前国内外缺乏长时间 HAART 治疗的持续追踪报道,此外,国内外对于 NK 细胞在 HIV 感染中作用的具体机制和 HAART 治疗下的恢复效果看法不一。本研究中 HIV-1 感染者体内 $CD4^+T$ 、NK 细胞显著下降, $CD8^+CD38^+T$ 、 $CD8^+HLADR^+T$ 细胞显著升高,反映了 HIV 感染造成了机体免疫细胞破坏和异常免疫激活状态,这同国内外研究结果是一致的。长期 HAART 治疗使 $CD4^+T$ 细胞有效恢复并保持平稳, $CD8^+T$ 细胞数则下降缓慢。这提示了在 HAART 过程中, $CD8^+T$ 细胞的恢复与 $CD4^+T$ 细胞有不同机制,可能与胸腺产生两类细胞的速率、两类细胞增殖和凋亡的速度有关,也可能与 $CD8^+T$ 细胞向记忆性细胞的转化有关^[3]。

CD38 和 HLADR 都是反映 HIV 感染条件下机体免疫激活和疾病进程的重要指标,国内外研究表明, HIV-1 感染者体内 CD38 和 HLADR 均有大幅度的升高,这同本研究的结果是一致的。Kentens^[4]等观察到, HLADR⁺ $CD8^+T$ 淋巴细胞在感染的早期即升高,并预示患者进展为 AIDS 的可能性大。但在整个感染过程中,两者升高的动态变化有所差异, HLADR 一直处于高水平状态,而 CD38 则随着疾病的进展逐渐升高^[5]。HAART 治疗有效降低了机体异常的免疫激活状态, CD38、HLADR 也逐渐减低,但两者变化情况仍有所差异。本研究显示,随着 HAART 治疗的进行, HLADR 表达迅速下降,治疗 3 年后基本恢复正常水平,比一些报道中 HLADR 恢复的速度要慢,可能和人种的差异,实验对象的敏感性以及治疗用药相关^[6]。而 CD38 降低则十分缓慢,这提示 CD38 在细胞免疫中可能发挥着多重作用,或者

存在其他因素导致 CD38 水平变化的缓慢,而 HLADR 表达水平对于 HIV 感染和 HAART 治疗更为敏感。

近年来研究显示, NK 细胞在 HIV-1 感染的免疫中发挥了重要作用^[7]。 HIV-1 可以感染 NK 细胞,直接导致细胞死亡^[8], 还可通过分泌 nef 蛋白主要下调 HLA-I 分子表达,从而逃避了 NK 细胞的细胞杀伤作用^[9-10]。Ullum 等人的实验表明, AIDS 患者的 NK 细胞数目明显减少,但无症状感染者无显著变化^[11]。Mansour 等发现,不同临床分期 HIV-1 感染者的 NK 细胞数目均低于健康对照组^[12], 本研究结果也如此。 HAART 治疗可以有效地提升 HIV-1 患者体内的 NK 细胞数^[13], 但国内外相关报道采用的 HAART 治疗时间多少于 2 年,缺乏长期治疗的持续跟踪报道。本研究显示, HIV-1 患者在 5 年的 HAART 治疗过程中,体内 $CD4^+T$ 细胞已稳定恢复到接近正常水平,体内免疫激活也得到有效控制,但 NK 细胞数仍明显低于健康人群,且随 HAART 治疗进行有逐年下降趋势,这一点是值得注意的。

HAART 治疗通过有效控制 HIV-1 病毒载量,减少病毒复制,短期内一定程度上阻止了 NK 细胞被破坏,但作为 HIV-1 病毒潜伏的靶细胞之一,即使经过数年的 HAART 治疗,外周血提取的 NK 细胞中仍然可以检测出 HIV-1 病毒 DNA^[14]。国外有研究表明,由于 NK 细胞内高表达作为蛋白酶抑制剂底物的 p 糖蛋白,影响了蛋白酶抑制剂的作用,导致 HAART 治疗无法彻底杀灭 NK 细胞中潜伏的 HIV-1 病毒^[15-16]。另外, HIV-1 患者体内 $CD3^-CD56^{high}CD16^-$ 亚型在 HAART 治疗中仍持续减少,并生成了大量的一种原本非常稀少的 NK 细胞亚型— $CD3^-CD56^-CD16^+$, 该亚型得 NK 细胞缺乏细胞毒性、细胞因子分泌及 ADCC 等诸多正常 NK 细胞功能,很可能 NK 细胞亚群种类和比例的改变导致了 HIV-1 感染中 NK 细胞功能的损害,但 HIV 感染的不同阶段 NK 亚群改变情况并不一致,有待进一步研究^[7]。

综上所述, HIV-1 感染造成了机体免疫细胞的大量破坏,以及 T 淋巴细胞系统的异常激活状态。 CD38 和 HLADR 在 HIV-1 感染与

HAART 治疗中的动态变化存在差异,HLADR 对于 HIV-1 感染和 HAART 治疗更敏感。HAART 治疗能有效地降低体内异常免疫激活水平,一定程度上实现免疫重建,但即使长期 HAART 治疗也难以使免疫细胞恢复到完全正常水平。在 HAART 过程中,CD8⁺T 细胞的恢复与 CD4⁺T 细胞可能有着不同的机制。此外,长期 HAART 治疗过程中 HIV-1 病毒可能通过某种方式继续损害 NK 细胞。这些问题的解决,需要我们对 HIV-1 感染的具体机制进行更深入地研究。

References:

- [1] LIU Shui-qing, XU Bing, WU Hao (刘水青, 徐斌, 吴昊). Immune mechanism of HIV infection and immune reconstruction [J]. *Inter J Epidemiol infect Dis* (国际流行病学传染病学杂志), 2003, 30(6): 323-325. (in Chinese)
- [2] CHEN Zhi, WU Nan-ping (陈智, 吴南屏). Immune reconstitution in the era highly active antiretroviral therapy [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2003, 38(2): 87-89. (in Chinese)
- [3] DI MASEIO M, SERETHI I, MATTHEWS L T. Naive T-cell dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection; effects of highly active antiretroviral therapy provide insights into the mechanisms of naive T-cell depletion [J]. *J Virol*, 2006, 80(6): 2665-2674.
- [4] KESTENS L, VANHAM G, GIGAM P, et al. Expression of activation antigen, HLA-DR and CD38 on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection [J]. *AIDS*, 1992, 6: 793-797.
- [5] GIORGI J V, DETELS R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID multicenter AIDS cohort study [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1989, 52: 10.
- [6] HAN YANG, QIU ZHI-FENG, LI TAI-SHENG, et al (韩扬, 邱志峰, 李太生, 等). The correlation of HIV-1 viral load to expression of CD8⁺T lymphocyte activators CD38 and HLA-DR [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科学杂志), 2006, 45(6): 459-462. (in Chinese)
- [7] ALTER G & ALTFELD M. NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection [J]. *J Intern Med*, 2008, 10. 1111/j. 1365-2796.
- [8] CHEHIMI J, BANDYOPADHYAY S, PRAKASH K, et al. In vitro infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates [J]. *J Virol*, 1991, 65(4): 1812-1822.
- [9] LE GALL S, ERDTMANN L, BENICHOUS S, et al. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules [J]. *Immunity*, 1998, 8: 483-495.
- [10] COHEN G B, GANDHI R T, DAVIS D M, et al. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells [J]. *Immunity*, 1999, 10: 661-671.
- [11] ULLUM H, GOTZSCHE P C, VICTOR J, et al. Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection [J]. *J Exp Med*, 1995, 182(3): 789-799.
- [12] MANSOUR I, DOINEL C, ROUGER P. CD16⁺ NK cells decrease in all stages of HIV infection through a selective depletion of the CD16⁺ CD3⁻ subset [J]. *Immunol Today*, 1990, 11: 81-82.
- [13] WEBER K, MEYER D, GROSSE V, et al. Reconstitution of NK cell activity in HIV-1 infected individuals receiving antiretroviral therapy [J]. *Immunobiology*, 2000, 202: 172-178.
- [14] ANTONIO V, MARGHERITA R, DANIEL J, et al. Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy [J]. *PNAS*, 2002, 99(10): 7015-7020.
- [15] SRINIVAS R V, MIDDLEMAS D, FLYNN P, et al. Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters [J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1998, 42: 3157-3162.
- [16] LEE C G, GOTTESMAN M M, CARDARELLI C O, et al. HIV-1 protease inhibitors and the MDR1 multidrug transporter [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 3594-3601.

[责任编辑 张荣连]