

• 临床检验研究论著 •

母牛分枝杆菌菌苗对无症状期 HIV 感染者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞计数及病毒载量的影响*

何茂锐, 陈作芬, 杨 鸿, 曹永平, 谢伶华, 谢雪梅[△]

(重庆市第九人民医院感染科, 重庆 400700)

摘要:目的 探讨母牛分枝杆菌菌苗对无症状期 HIV 感染者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞计数及病毒载量的影响。方法 以无症状期 HIV 感染者为研究对象, 随机分为治疗组 I、II 和对照组 I、II, 治疗组予肌肉注射母牛分枝杆菌菌苗, 比较分析 4 组患者治疗 2 个月后 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞计数及病毒载量的变化。结果 治疗组 I、II 的 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 治疗后明显高于治疗前和对照组 I、II, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但病毒载量无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而对照组的 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 细胞计数及病毒载量治疗前后比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 母牛分枝杆菌菌苗对无症状期 HIV 感染者能增强细胞免疫功能但对 HIV 病毒载量无明显影响。

关键词: 母牛分枝杆菌菌苗; HIV 感染; 细胞免疫

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)06-0675-03

Impact of *Mycobacterium vaccae* vaccine on CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell counts and viral load in asymptomatic HIV-infected patients*

He Maorui, Chen Zuofen, Yang Hong, Cao Yongping, Xie Linghua, Xie Xuemei[△]

(Department of Infection, the Ninth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400700, China)

Abstract: Objective To investigate the impact of *Mycobacterium vaccae* vaccine on CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell counts and viral load in asymptomatic HIV-infected patients. **Methods** The asymptomatic HIV-infected patients as the research subjects were randomly divided into the treatment group I, II and the control group I, II. The treatment groups were intramuscularly injected by *Mycobacterium vaccae* vaccine. The CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell counts and viral load after 2 months of treatment were performed the comparative analysis among the four groups. **Results** The CD4⁺ T cell counts and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the treatment group I and II were significantly higher than those before treatment and the control group I and II, the differences had statistical significance ($P < 0.05$), but the viral load had no significant change without statistical difference ($P > 0.05$), while the CD4⁺ T cell count and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ and viral load in the control groups had no statistical differences between before and after treatment ($P > 0.05$). **Conclusion** *Mycobacterium vaccae* vaccine can enhance the cellular immune function on asymptomatic HIV-infected patients, but without significant influence on the HIV viral load.

Key words: *Mycobacterium vaccae* vaccine; HIV infections; cellular immunity

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所导致的以免疫系统功能缺陷为特征的慢性高致死率传染病。CD4⁺ T 细胞是 HIV 损害的主要靶细胞, HIV 可引起 CD4⁺ T 淋巴细胞进行性丢失与功能受限^[1]。而无症状 HIV 感染者所占比例较大, 其体内 CD4⁺ T 淋巴细胞数量虽达不到高效抗逆转录病毒疗法(HARRT)治疗标准, 但细胞免疫功能已不健全。母牛分枝杆菌菌苗能促进 T 淋巴细胞转化及增殖, 改善患者的细胞免疫功能, 使 CD3 和 CD4 值升高, CD8 值降低, 调节 Th1/Th2 平衡^[2]。本研究以无症状期 HIV 感染者为研究对象, 通过对其予母牛分枝杆菌菌苗治疗, 探讨对该类患者的细胞免疫功能改善治疗效果, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 10 月至 2013 年 9 月在重庆市北碚区及本院符合纳入标准的 102 病例纳入本次分析研究。纳入标准: 经重庆市疾病预防控制中心实验室确认为 HIV 阳

性者; 年龄为 18~60 岁; 符合世界卫生组织(WHO)界定的 HIV 无症状感染期(临床 1 期); 未接受抗病毒反转录病毒药物治疗; 签署知情同意书者。根据入组时 CD4⁺ T 淋巴细胞检查结果分 4 组, CD4⁺ T 淋巴细胞低下者(CD4⁺ T 细胞小于 500/ μ L)随机分为治疗组 I 和对照组 I, CD4⁺ T 淋巴细胞正常者(CD4⁺ T 细胞大于或等于 500/ μ L)为治疗组 II 和对照组 II, 各组的人口资料比较见表 1。各组间性别, 年龄范围比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 治疗方案 治疗组给予母牛分枝杆菌菌苗注射液(安徽龙科马生物制剂有限责任公司生产, 批号: 20120621-2), 每次 22.5 μ g 深部肌肉注射, 每周 1 次, 2 个月为 1 个疗程。

1.3 血液标本采集 使用 EDTA-K₂ 抗凝真空管分别采集患者治疗前以及治疗 2 月后晨起空腹静脉血液 5 mL, 6 h 内进行免疫功能检测, 剩余标本离心制备血浆后置液氮罐冻存送金域生物检验公司进行 HIV 病毒载量测定。

* 基金项目: 重庆市卫生局资助项目(2013-2-211)。作者简介: 何茂锐, 男, 主治医师, 主要从事艾滋病、病毒性肝炎研究。△ 通讯作者, E-mail: 28119481@qq.com。

1.4 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞计数 取新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血 50 μL, 加入含有已知数量标准微球的 TruCOUNT 管 (BD 公司), 加入 20 μL CD4/CD8/CD3 三色荧光团标记抗体 (Tritest CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP, BD 公司), 室温避光染色

20 min, 加入 10 倍稀释溶血素 450 μL, 混匀避光 15 min, FACS Calibur 流式细胞仪 (BD 公司) 检测。使用 Multi SET 软件, 计算 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞绝对值及相应百分比。

表 1 各组 HIV 无症状感染期患者的人口资料比较

项目	治疗组 I	对照组 I	治疗组 II	对照组 II	P
入组例数 (n)	29	29	22	22	—
男/女比例 (n/n)	20/9	21/8	16/6	16/6	0.76
年龄 (岁)	41.8 ± 13.9	35.0 ± 14.7	34.7 ± 13.0	33.0 ± 14.0	0.05

—: 无数据。

1.5 外周血浆中病毒载量测定 取 EDTA-K₂ 抗凝全血, 2 000 r/min 离心 10 min 分离血浆, 置液氮罐冻存备用, 待标本收集完全后送金域生物检验公司进行 HIV 病毒载量测定, 简要操作方法如下: 取 100 μL 血浆, 采用 RT-PCR 在 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 全自动病毒载量仪上 (Roche 公司) 定量检测血浆中 HIV RNA, 扩增的靶核酸位置是 HN gag 区, 可扩增 HIV-1 M 组的 A-H 亚型。实验设 1 个内部定量标准品, 阴性质控品、弱阳性质控品和强阳性质控品各 1 个。检测线性范围是 40~1 × 10⁷ copies/mL。

1.6 统计学处理 使用 Epidate3.02 建立数据库, 病毒载量低于检测下限的结果按 40 copies/mL 统计, 高于检测上限按 1 × 10⁷ copies/mL 统计。软件用 SPSS19.0 简体中文版分析, 计量资料用单因素方差分析, 用 Pearson 进行相关性检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫指标变化 治疗组 I、II 治疗后的 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 明显高于治疗前和对照组 I、II, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见表 2。

表 2 4 组细胞免疫功能恢复情况比较 (x̄ ± s)

组别	CD4 ⁺ (/μL)	CD8 ⁺ (/μL)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗组 I			
治疗前	223.36 ± 155.78	818.18 ± 483.73	0.27 ± 0.13
治疗后	278.81 ± 127.72*	784.47 ± 385.86	0.41 ± 0.27*
对照组 I			
治疗前	234.71 ± 167.12	816.82 ± 467.48	0.26 ± 0.25
治疗后	226.16 ± 135.85	821.57 ± 396.54	0.25 ± 0.19
治疗组 II			
治疗前	354.71 ± 160.62	816.82 ± 458.68	0.51 ± 0.22
治疗后	391.46 ± 141.75*	789.47 ± 389.84	0.62 ± 0.29*
对照组 II			
治疗前	375.71 ± 167.12	879.82 ± 467.48	0.50 ± 0.28
治疗后	368.96 ± 142.65	868.33 ± 391.56	0.49 ± 0.23

*: P < 0.05, 与治疗前和对照组 I、II 比较。

2.2 HIV 病毒载量变化 治疗组 I、II 病毒载量治疗后、治疗前和对照组 I、II 无明显变化, 差异无统计学意义 (P > 0.05), 而对对照组治疗前后比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05), 见表 3。

表 3 4 组病毒载量比较 (x̄ ± s)

组别	病毒载量对数值	t	P
治疗组 I			
治疗前	3.04 ± 0.79	0.513	0.69
治疗后	2.78 ± 1.52		
对照组 I			
治疗前	3.61 ± 0.84	-0.66	0.51
治疗后	3.69 ± 1.16		
治疗组 II			
治疗前	2.62 ± 0.74	-0.63	0.52
治疗后	2.71 ± 1.21		
对照组 II			
治疗前	2.41 ± 0.64	-0.68	0.59
治疗后	2.59 ± 1.26		

3 讨 论

在 HIV 感染早期, CD4⁺ T 细胞可在正常范围, 但增殖减慢和无能应答^[3]。无症状感染期, 血液中 CD4⁺ T 细胞进行性减少, 外周 CD8⁺ T 细胞反应性升高并发挥着重要的抑制病毒复制的作用^[4], CD4⁺/CD8⁺ 比值下降, 患者体内病毒载量处于相对较低水平。进入艾滋病期后, CD4⁺ T 细胞进一步下降, 而升高的 CD8⁺ T 细胞也降至接近健康人的水平。国际上通常建议当 CD4⁺ T 细胞小于 500/μL 作为抗病毒治疗的重要指标之一, 我国免费 HARRT 治疗标准为 CD4⁺ T 细胞小于 350/μL。无症状感染期患者病情仍处于缓慢进展中^[5], 故改善该期患者细胞免疫功能, 延缓各种并发症发生具有重要的临床意义。

母牛分枝杆菌菌苗富含与结核分支杆菌相似的共同抗原^[6], 是一种良好的免疫调节剂, 具有双向免疫调节功能^[7], 能促进 T 淋巴细胞转化、增殖, 释放出各种淋巴因子^[8], 显著改善患者的细胞免疫功能, 增强机体抵抗力^[9], 且能有效抑制结核杆菌等感染引起的过强变态反应所致的病理性损害^[10]。

研究结果提示母牛分枝杆菌菌苗通过调节细胞免疫, 促进 CD4⁺ T 细胞数量增加及功能恢复^[11], 对于控制艾滋病病毒感染者细胞免疫功能维持, 延缓患者发病具有重要意义, 为无症状期或达不到 HARRT 治疗的 HIV 感染者采取积极的应对措施提供科学依据。在无症状期 HIV 患者特别 (下转第 679 页)

缺陷,也导致尿蛋白产生,因此 HbA1c 是糖尿病肾损伤的良好监测指标,其重复性好、稳定性强,而且美国糖尿病学会(ADA)2010 年指南重新修订了糖尿病标准提出了 HbA1c \geq 6.5%可作为区分糖尿病的高危标志^[9],研究显示, DN 组的 HbA1c 检测结果高于另两组,差异有统计学意义($P<0.01$),表明 2 型糖尿病患者肾脏受损与 HbA1c 的控制有直接关系,糖尿病患者 HbA1c 和 U-mAlb 水平呈正相关,说明随着 HbA1c 水平增高患者的肾脏损伤逐渐严重, U-mAlb 增多,加大了患糖尿病肾病的风险^[10]。

不受血红蛋白代影响的血糖控制指标 GA,是葡萄糖与血浆清蛋白发生糖化非酶促反应的产物,由于清蛋白在体内的半衰期较短,其检测值反映糖尿病患者近 2~3 周内的平均血糖水平,与 HbA1c 联合检测可以提高糖尿病的筛查效率,同时还能对 DN 早期诊断及预后评估提供依据;体内清蛋白发生糖化非酶促反应虽然是时刻存在,但在糖尿病患者中明显增加,GA 能够通过增加系膜基质的扩张和减少肾小球系膜细胞的形成促使肾脏发生肾小球硬化,GA 表达增加会加速肾小球动脉硬化和蛋白尿的生成,从而加速 DN 的发生与发展^[11],GA 可能是造成糖尿病肾病的重要原因,结果显示,糖尿病患者各组的 GA 均高于对照组,糖尿病肾病组的 GA 均高于糖尿病非肾病组,差异有统计学意义($P<0.01$),GA 在 2 型糖尿病患者肾病的发生及发展中起到重要的作用,在临床上,GA 水平可作为对 2 型糖尿病患者肾病预测和病情变化的指标,表明 GA 水平也是影响 DN 发病及病情严重程度的独立危险因素^[12]。

DN 起病隐匿,常规检查方法难以确诊是否发生肾脏的早期损伤,血清 Cys-C、HbA1c、GA 和 U-mAlb/Cr 都是诊断早期 DN 的有效指标,联合检测可降低其他干扰因素,大大提高对早期 DN 诊断的敏感度,明显提高肾功能早期损伤的检出率,对早期预测、早期治疗 DN 及监测病情进展有较大的临床价值。

参考文献

[1] 府伟灵.临床生物化学检验[M].5 版.北京:人民卫生出版社,

(上接第 676 页)

是细胞免疫功能低下患者,应该给予免疫治疗^[12],而对于艾滋病患者在 HARRT 治疗基础上联合母牛分枝杆菌疫苗治疗是否提高其细胞免疫功能的恢复,将进一步研究探讨。

参考文献

[1] 李育芬,申峰. HIV 感染者和 AIDS 病人 CD4⁺ T 淋巴细胞的临床意义[J]. 中国公共卫生管理,2011,27(6):630-631.
 [2] 罗永艾. 微卡的临床疗效及安全性[J]. 临床肺科杂志,2002,7(3):F003.
 [3] Porichis F, Kaufmann DE. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication [J]. Curr Opin HIV AIDS,2011,6(3):174-180.
 [4] Navaneethapandian PG, Karunaianantham R, Subramanyan S, et al. CD4⁺ T-lymphocyte count/CD8⁺ T-lymphocyte count ratio: surrogate for HIV infection in infants? [J]. J Trop Pediatr,2012,58(5):394-397.
 [5] 蒋自强,郭会军,李强,等. 无症状期 HIV 感染者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞计数与病毒载量的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(5):531-532.
 [6] 张鑫,陶立峰. 国内外母牛分枝杆菌疫苗的研究动态[J]. 安徽医

2012;223.
 [2] 张培培,刘志红,谢红浪,等. 胱抑素 C 测定在糖尿病肾病肾功能评价中的应用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2007,16(6):501-508.
 [3] 潘风军,杨晓芳,司钰媚,等. 血清胱抑素 C 检测在早期糖尿病肾病损害诊断中的应用价值[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(25):3177-3178.
 [4] 杜国有,顾向明,黄阶胜. 血清胱抑素 C、超敏 C 反应蛋白联合检测在 2 型糖尿病早期肾损害诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):679-682.
 [5] 罗敏琪,尹小菁,宋志兴,等. 联合检测血清胱抑素 C 与尿微量白蛋白/肌酐比值对早期肾损伤的诊断价值[J]. 广东医学,2010,31(3):358-360.
 [6] 李雅雯,王晓蕾,王昌林,等. 血清胱抑素 C 在新生儿窒息后肾损伤早期诊断价值[J]. 新乡医学院学报,2011,28(4):479-480.
 [7] Kim JS, Kim MK, Lee JY, et al. The effects of proteinuria on urinary cystatin-C and glomerular filtration rate calculated by serum cystatin-C[J]. Ren Fail,2012,34(6):676-684.
 [8] 倪勇. 胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 与视黄醇结合蛋白对 2 型糖尿病肾病的早期诊断价值[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(14):1893-1894.
 [9] 美国糖尿病协会. 2010 年 ADA 糖尿病诊疗指南概述[J]. 糖尿病天地:临床刊,2010,4(1):4-12.
 [10] 崔国利,张旭,张文陆. 糖尿病肾病患者糖化血红蛋白与尿微量蛋白联合检测的临床价值[J]. 中国医药科学,2011,1(9):162.
 [11] Margo PC, Sheldon CH, Fuad NZ, et al. Evidence linking glycosylated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria and diabetic nephropathies [J] Kidney Int. 2005, 68(4):1554-1561.
 [12] 张晋. 2 型糖尿病患者血清糖化白蛋白水平与糖尿病肾病的相关性分析[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(1):113-115.

(收稿日期:2013-12-12)

药,2009,13(7):819-822.
 [7] Dhar N, Rao V, Tvagi AK, et al. Skewing of the Th1/Th2 responses in mice due to variation in the level of expression of an antigen in a recombinant BCG system [J]. Immunol Lett,2003,88(3):175-184.
 [8] 李国利,庄玉辉. 母牛分枝杆菌制剂对免疫功能低下小白鼠的免疫调节作用[J]. 中国防痨杂志,1998,20(4):194-196.
 [9] 李艳,谭守勇,邝浩斌,等. 母牛分枝杆菌疫苗辅助治疗对糖尿病并肺结核患者细胞免疫功能低下的疗效[J]. 实用医学杂志,2012,28(12):1994-1996.
 [10] 孙燕芝,顾美红,李少珍,等. 母牛分枝杆菌疫苗对 PPD 强阳性者预防性治疗效果[J]. 中国生物制品学杂志,2004,17(4):249-250.
 [11] Andersson J, Boasso A, Nilsson J, et al. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients[J]. J Immunol,2005,174(6):3143-3147.
 [12] Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, et al. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells[J]. PLoS Biol,2004,2(7):E198.

(收稿日期:2013-12-10)