

# HIV/AIDS 患者机体氧化还原态研究

韩晓群 熊悦安 周虹 张丽

**【摘要】 目的** 探讨 HIV/AIDS 患者机体的氧化还原态特点。**方法** 应用流式细胞术检测 80 例抗-HIV 阳性患者血中 CD4 细胞水平,根据 CD4 水平将 80 例患者分为两组:AIDS 组 50 例、HIV 感染组 30 例。选取健康体检者 30 例为对照组。取患者静脉血,检测血浆还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG),还原型辅酶 II (NADPH)与氧化型辅酶 II (NADP<sup>+</sup>),计算 GSH/GSSG 和 NADPH/NADP<sup>+</sup> 的氧化还原电位,评价 HIV/AIDS 患者机体氧化还原态。**结果** HIV/AIDS 患者血浆氧化还原态向氧化方向偏移。**结论** 氧化还原态失衡、氧化还原态向氧化方向偏移与 AIDS 发生、发展密切相关。

**【关键词】** HIV 感染;获得性免疫缺陷综合征;氧化还原

**Research on the redox status in patients with HIV/AIDS** HAN Xiao-qun, XIONG Yue-an, ZHOU Hong, ZHANG Li. Department of Infectious Diseases, Wuhan Medical Treatment Center, Wuhan 430023, China

Corresponding author: XIONG Yue-an, Email: 347798085@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the redox status in HIV/AIDS patients. **Methods** The levels of CD4 were detected by flow cytometry in 80 patients with HIV antibody-positive. The patients were divided into two groups: AIDS group ( $n = 50$ ) and HIV infection group ( $n = 30$ ). Healthy people were taken as control group ( $n = 30$ ). Plasma glutathione (reduced form GSH and oxidized form GSSG) were measured by fluorescence spectrophotometry, reduced form NADPH and oxidized form NADP<sup>+</sup> were measured by UV spectrophotometry. Redox status was evaluated by GSH/GSSG and NADPH/NADP<sup>+</sup>. The GSH/GSSG and NADPH/NADP<sup>+</sup> redox potential were calculated according to Nernst equation. **Results** The GSH/GSSG and NADPH/NADP<sup>+</sup> redox status in plasma of patients with HIV/AIDS deviated to pro-oxidative direction. **Conclusions** The imbalance and deviation to pro-oxidative direction of redox status closely related with the occurrence and development of AIDS.

**【Key words】** HIV infection; Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); Oxidation-reduction

艾滋病自 1981 年由美国疾病控制中心首次确认以来,迅速在全球蔓延。迄今为止,艾滋病已经遍及全球五大洲,病死率高达 50% 以上,是当今世界流行的一种“新瘟疫”。在治疗方面,仍以西药抑制病毒复制为主,但这类药物不能治愈艾滋病,且价格昂贵,毒性大,有耐药性等,导致获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)患者需要长期或终身用药。因而,探讨 HIV/AIDS 新的治疗方法已成为目前临床研究的热点。

已有研究表明,机体谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平及氧化应激与 HIV/AIDS 的发生、发展(机会性感染、其他相关并发症的发生等)以及预后

均有着密切的关系,如病毒蛋白能够上调活性氧水平,从而增加 HIV-1 患者发生心血管系统、呼吸系统及神经系统等疾病的风险<sup>[1-3]</sup>。但 HIV/AIDS 机体氧化还原态如何改变尚少见报道。本研究分别对 30 例 HIV 感染者、50 例 AIDS 患者机体氧化还原态进行检测,以期 HIV/AIDS 防治提供新思路。

## 资料与方法

### 一、研究对象

研究对象为 2008 年 7 月至 2010 年 9 月于武汉市传染病医院就诊的患者,共 80 例,其中男性 52 例,女性 28 例;年龄 32 ~ 58 岁,平均年龄 46.3 岁。根据《中华人民共和国国家标准 HIV/AIDS 诊断标准及处理原则》(GB 16000-1995),将研究对象分两组:(1) HIV 组:抗-HIV 阳性,CD4 淋巴细胞总数大于 350/μl。包括急性 HIV 感染者和无症状 HIV 感染者共 30 例。(2) AIDS 组:CD4 淋巴细胞总数小于

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.015

基金项目:武汉市卫生局科研项目基金资助(WX09B11)

作者单位:430023 武汉市,湖北省武汉市医疗救治中心感染性疾病科

通讯作者:熊悦安,Email:347798085@qq.com

350/ $\mu$ l, CD4/CD8 < 1 者共 50 例。同时选取本院体检的健康人 30 例作为对照组。

## 二、仪器设备及试剂

1. 主要仪器设备:低温冷冻离心机(20PR-52D, HITACHI),超低温保存箱(MDF-382E, 三洋),离心机(TDL-5-A, 上海安亭),高速冷冻离心机(1-15K, Sigma)。

2. 主要试剂:GSH 和 GSSG 检测试剂盒为武汉巴菲尔生物有限公司产品(S0053),按照试剂盒说明书要求,配制各种储备液(GSSG、DTNB、蛋白去除试剂 M 溶液、NADPH 储备液)及工作液(40 倍稀释谷胱甘肽还原酶、总谷胱甘肽检测工作液等)。NADP<sup>+</sup> 和 NADPH 试剂盒为武汉巴菲尔生物有限公司产品。按照说明书要求配制 NADPH 贮备液、NADP<sup>+</sup>/NADPH 反应复合物及不同浓度的 NADPH 标准品。

## 三、研究方法

1. 血标本采集、贮存:研究对象均清晨空腹肘静脉取血 3 ml,放入预冷肝素抗凝管中,低温离心后,将血浆 -70℃ 保存,备测还原型辅酶 II (NADPH)和氧化型辅酶 II (NADP<sup>+</sup>)、还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)<sup>[4]</sup>。所有标本测定前需置于室温复溶。

2. 还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽的测定:(1)应用比色法测定血浆 GSH 和 GSSG 水平,所有标本均严格按照试剂盒说明要求进行处理<sup>[5]</sup>。(2) GSH/GSSG 氧化还原电位按 Nernst 方程计算<sup>[2]</sup>: $E_h = E_0 + RT/2F \ln[(GSSG/GSH)^2]$ 。其中,R 为气体常数,T 为温度,F 为法拉第常数。 $E_0$  为 GSH/GSSG 标准电位值,以血液 pH 值 = 7.4 时,标准  $E_0$  为 -264 mV。根据此公式计算 GSH/GSSG 氧化还原电位值。

3. NADP<sup>+</sup> 和 NADPH 的测定:应用酶联免疫吸附法测定血清 NADP<sup>+</sup>/NADPH 水平,实验均严格按照试剂盒说明操作。NADP<sup>+</sup> 和 NADPH 氧化还原电

位按 Nernst 方程计算: $E_h = E_0 + RT/2F \ln[(NADP^+)/(NADPH)]$ 。其中,R 为气体常数,T 为温度,F 为法拉第常数。 $E_0$  为 NADP<sup>+</sup>/NADPH 标准电位值,以血液 pH = 7.4 时,标准  $E_0$  为 -342 mV。根据此公式计算 NADPH/NADP<sup>+</sup> 的氧化还原电位值。

## 四、统计学处理

所获得数据采用 SPSS 11.5 统计分析软件包进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、血浆中谷胱甘肽氧化还原态

随着疾病严重程度的增加,血浆 GSH 含量渐减少,GSSG 含量渐增多,GSH/GSSG 降低,血浆中谷胱甘肽氧化还原态向氧化方向偏移。各组血浆中 GSH、GSSG、GSH/GSSG 比值如表 1 所示。

### 二、血浆中辅酶 II 氧化还原态

各组血浆中 NADP<sup>+</sup>、NADPH、NADPH/NADP<sup>+</sup> 比值如表 2 所示。随着疾病严重程度的增加,血浆 NADPH/NADP<sup>+</sup> 氧化还原态显示与谷胱甘肽相似的变化,但不如谷胱甘肽氧化还原态变化显著。

### 三、血浆中氧化还原电位

各组患者血浆中 NADPH/NADP<sup>+</sup>、GSH/GSSG 氧化还原电位均向氧化方向偏移,且偏移程度随着疾病严重程度的增加而增大。

表 3 各组患者机体氧化还原电位( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	NADPH/NADP <sup>+</sup> 氧化还原电位	GSH/GSSG 氧化还原电位
AIDS 组	50	-244.1 $\pm$ 2.7 <sup>ab</sup>	-184.4 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>
HIV 组	30	-284.8 $\pm$ 2.9 <sup>c</sup>	-177.93 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>
对照组	30	-329.0 $\pm$ 2.7	-164.61 $\pm$ 1.5

注:AIDS 组与 HIV 组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;AIDS 组与对照组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;HIV 组与对照组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 1 各组血浆中谷胱甘肽氧化还原态( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	GSH ( $\mu$ mol/L)	GSSG ( $\mu$ mol/L)	GSH/GSSG
AIDS 组	50	192.68 $\pm$ 37.00 <sup>ab</sup>	63.64 $\pm$ 1.80 <sup>ab</sup>	3.01 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>
HIV 组	30	233.28 $\pm$ 45.00 <sup>c</sup>	55.63 $\pm$ 1.50 <sup>c</sup>	4.19 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>
对照组	30	297.35 $\pm$ 56.00	31.14 $\pm$ 1.50	9.55 $\pm$ 0.70

注:AIDS 组与 HIV 组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;AIDS 组与对照组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;HIV 组与对照组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 2 各组血浆中辅酶 II 氧化还原态( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	NADPH ( $\mu$ mol/L)	NADP <sup>+</sup> ( $\mu$ mol/L)	NADPH/NADP <sup>+</sup>
AIDS 组	50	0.54 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	2.49 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	0.22 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>
HIV 组	30	0.96 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup>	2.53 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	0.38 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>
对照组	30	2.23 $\pm$ 0.56	2.59 $\pm$ 0.27	0.86 $\pm$ 0.31

注:AIDS 组与 HIV 组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;AIDS 组与对照组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;HIV 组与对照组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

氧化还原调节是免疫系统发挥正常作用的重要因素。已有研究表明, T 细胞活化和增殖需要还原性外部环境<sup>[6]</sup>, 而受一系列活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)影响 CD4<sup>+</sup> T 细胞凋亡是慢性 HIV 感染过程发生免疫缺陷的机制之一<sup>[7]</sup>。氧化应激通过影响 HIV-1 复制、诱导 NF- $\kappa$ B 活化和细胞凋亡等机制而在 AIDS 发生发展中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。HIV 感染者的细胞内和血浆 GSH 水平降低, 且与感染者存活率的降低密切相关<sup>[9-10]</sup>。在 AIDS 患者机会性感染、HIV-相关性肾病及神经系统损伤等并发症发生中, 都有氧化应激参与<sup>[11]</sup>。但机体对于氧化应激又有着强大的防御机制, 两者的平衡构成了机体内环境的一个重要稳态机制, 即氧化还原态。氧化还原态指机体的氧化还原态势, 机体通过各种氧化和抗氧化物质及相关酶系统的综合作用, 使机体氧化-抗氧化防御间维持一个相对恒定的氧化还原态。研究报道, 通过测定血液中氧化还原环境可以反映整个机体的氧化还原环境。虽然血浆中存在大量的氧化还原对, 但 GSH/GSSG 氧化还原对是机体的主要内源性氧化-还原态调控因子, 巯基(-SH)和二硫键(-S-S-)间的转换调控着许多生物大分子的活性, 被称为“分子开关”。目前认为, 血浆中 GSH/GSSG 可一定程度上反映机体氧化还原内稳态的改变, GSH/GSSG 向氧化方向偏移时可产生类似过氧化氢增多而产生的氧化损伤效应<sup>[12]</sup>。

NADPH/NADP<sup>+</sup> 氧化还原对是维持 GSH/GSSG 平衡的关键因素, GSH 的消耗须由 NADPH 递氢、经 GSH 还原酶(GSH reductase)催化重新生成<sup>[13]</sup>。GSH 才可重复利用。因而 GSH/GSSG 和 NADPH/NADP<sup>+</sup> 是用以评价机体氧化还原态的最佳指标。检测 GSH/GSSG 和 NADPH/NADP<sup>+</sup> 的浓度后, 即可根据 Nernst 方程计算出相应的氧化还原电位。

本研究结果显示, HIV/AIDS 患者无论依据 GSH/GSSG 浓度还是依据 NADPH/NADP<sup>+</sup> 浓度, 所计算出的氧化还原电位均向氧化方向偏移, 且 AIDS 组(CD4 淋巴细胞总数 < 350/ $\mu$ l)偏移程度更为明显。可见, AIDS 疾病对细胞外氧化还原态具有一定的影响<sup>[14]</sup>。而且持续的促氧化状态能够抑制 T 细胞增殖, 促进其凋亡<sup>[15]</sup>。因而, 机体的氧化还原态改变是 AIDS 发生发展的重要机制之一。

由于 GSH/GSSG、NADPH/NADP<sup>+</sup> 在维持细胞的氧化还原态平衡中的特殊作用, 因此了解 HIV/AIDS

患者机体氧化还原态、特别是 GSH/GSSG、NADPH/NADP<sup>+</sup> 氧化还原态的偏移程度, 制定相应的氧化还原态纠正方案并观察效果, 可以从干预机体氧化还原态的方面, 为 HIV/AIDS 的治疗打开一个新视角。

## 参 考 文 献

- 1 Kline ER, Kleinhenz DJ, Liang B, et al. Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(6):H2792-H2804.
- 2 Lassiter C, Fan X, Joshi PC, et al. HIV-1 transgene expression in rats causes oxidant stress and alveolar epithelial barrier dysfunction. *AIDS Res Ther*, 2009, 6:1.
- 3 Deshmane SL, Mukerjee R, Fan S, et al. Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression. *Biol Chem*, 2009, 284(17):11364-11373.
- 4 黄彦生, 孙琳, 赵士超, 等. 老年人血浆氧化还原状态的改变及意义. *中国循证心血管医学杂志*, 2010, 3(1):31-33.
- 5 Huang JZ, Chen YZ, Su M, et al. dl-3-n-Butylphthalide prevents oxidative damage and reduces mitochondrial dysfunction in an MPP(+) -induced cellular model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2010, 475(2):89-94.
- 6 Yan ZH, Garg SK, Kipnis J, et al. Extracellular redox modulation by regulatory T cells. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(10):721-723.
- 7 Redhage LA, Shintani A, Haas DW, et al. Clinical factors associated with plasma F2-isoprostane levels in HIV-Infected adults. *HIV Clin Trials*, 2009, 10(3):181-192.
- 8 Pollicita M, Muscoli C, Sgura A, et al. Apoptosis and telomeres shortening related to HIV-1 induced oxidative stress in an astrocytoma cell line. *BMC Neurosci*, 2009, 10:51.
- 9 Wanchu A, Rana SV, Pallikuth S, et al. Short communication: oxidative stress in HIV-infected individuals: a cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retro-viruses*, 2009, 25(12):1307-1311.
- 10 Nazzareno B, Suzanne M, Krance S, et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 2009, 390(3):191-214.
- 11 Hahn K, Robinson B, Anderson C, et al. Differential effects of HIV infected macrophages on dorsal root ganglia neurons and axons. *NIHPA Author Manuscripts*, 2008, 210(1):30-40.
- 12 黄彦生, 吴彧, 孙琳, 等. 辛伐他汀对冠心病患者血浆氧化还原态的影响. *天津医药*, 2010, 38(2):140-141.
- 13 Yap LP, Garcia JV, Han D, et al. The energy-redox axis in aging and age-related neurodegeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(14):1283-1298.
- 14 Yan ZH, Banerjee R. Redox Remodeling as an Immunoregulatory Strategy. *Biochemistry*, 2010, 49(6):1059-1066.
- 15 Thorén FB, Betten A, Romero AI, et al. Cutting edge: Antioxidative properties of myeloid dendritic cells: protection of T cells and NK cells from oxygen radical-induced inactivation and apoptosis. *J Immunol*, 2007, 179(1):21-25.

(收稿日期:2011-06-30)

(本文编辑:孙荣华)