

封面式樣

計畫編號：DOH90-DC-1061

行政院衛生署九十年度科技研究發展計畫

中部愛滋病防治中心

研究報告

執行機構：中山醫學大學

計畫主持人：楊繼江

研究人員：楊繼江等

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

# 目 錄

摘要

中英文摘要

內文

- (1)前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。
- (2)材料與方法。
- (3)結果與討論。
- (4)參考文獻：

## 中文摘要

愛滋病對臺灣地區之威脅日益嚴重，解決此問題也是刻不容緩。本計畫延續之前在中山醫學大學成立之中部愛滋病防治中心，在此中心之下執行任務以達成下列目標：

### 目標一：研究監控臺灣中部地區愛滋病流行之現況

- (1) 台灣中部地區 HIV 之亞型
- (2) 台灣地區居民之遺傳變異多樣性

### 目標二：研究愛滋病感染之病理機制

- (1) 病毒學-HIV 感染之檢測
  - A. 血清學
  - B. CD4/CD8
  - C. 病毒載量 (Vrial load)
  - D. 病毒分離
- (2) 病毒學-台灣 HIV 病毒株之生物特性分析
- (3) 免疫學

### 目標三：研究臺灣地區愛滋病感染之臨床問題

- (1) 臨床 HAART 成效之評估
- (2) 臨床藥物抗性病毒株之研究
- (3) 新藥物開發
  - A. 天然化學物
  - B. 中草藥

中文關鍵詞(至少三個)：病毒載量, T細胞次群, HAART

## **Abstract:**

### **(1) Establishment**

The AIDS research center was established at December 1, 1998 with the financial support from Center for Disease Control, Department of Health, Executive Yuan. This center is directed by Professor Gregory J. Tsai and Dr. Chi-Chiang Yang for AIDS clinical research.

### **(2) Overall objective**

1. To establish a National AIDS Research Center at Chung Shan Medical & Dental College which will coordinate AIDS studies in Taiwan.

2. Three specific aims were determined.

( A ) To study the current AIDS epidemic in Taiwan. /

AIDS molecular epidemiology

( B ) To study the virology and immunology of HIV infection. /

National reference Lab.

( C ) To study the clinical aspects of HIV infection in Taiwan. /

Clinical network.

3. The aims including the surveill for prevalence of HIV, incidence of new HIV infection, HIV subtyping, correlates of host genetics, education and preventive campaigns ; the virological research for diagnosis, HIV isolation and biological characterization of HIV strains and the immunological research for humoral and cellular immune response, phenotypic analysis of T cell subpopulations and T cell regeneration ; the clinical aspects for the effect of antiviral therapy, the emergence of drug resistant virus, new drug development and clinical trials.

Keyword: Viral load, T cell subpopulations, HAART

## **(1) 前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。**

### **目標一：研究臺灣地區愛滋病流行之現況**

#### **1. 愛滋病流行病學研究**

基本方向為 A. 台灣地區 HIV 之流行情形，B. 台灣地區新增 HIV 感染之發生率。目前台灣地區關於愛滋病之病例報告及追蹤輔導均已建立一完整系統，因此加強與中部地區衛生單位之聯繫格外重要。

#### **2. 臺灣地區 HIV 之亞型**

HIV 可分為兩大型(HIV-1, HIV-2)，而由 HIV-1 所造成的感染及病情較 HIV-2 為嚴重。目前 HIV-1 依其蛋白質外套膜基因序列，可分為 O, M (主要型) 及 N 三大類，而在主要群中又可分為 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 等十個亞型。相同亞型間的基因序列變異性通常小於 15%，不同亞型則有 20-30% 的變異性。由於 HIV-1 亞型可能與感染的途徑、傳播的方式有關，同時決定亞型的外套膜基因對於疫苗的發展也有重要的影響，因此在流行病學的調查上便顯得相當重要。透過對 HIV 亞型在不同高危險群中的監測，可作為在 AIDS 防治上的參考，同時在了解亞型的流行趨勢及變異情形，對未來疫苗的研究與使用上，提供了很好的訊息。

#### **3. 與宿主之遺傳關聯(coreceptor 多樣性)**

在臨床上，嗜巨噬細胞 HIV-1 株使用 CCR5 為共同受體是早期病毒感染的主力，到了後期（愛滋病階段），絕大部份的病毒變為嗜 T 淋巴球 HIV-1 株並使用 CXCR4 為共同受體。由於 HIV-1 在不同的疾病階段，使用不同蛋白質做為感染不同細胞的共同受體，所以許多研究就針對 CXCR4, CCR5 這兩個蛋白質的表達做深入之探討。

#### **C. 臺灣 HIV 病毒株之生物特性分析**

HIV 可分為兩大型(HIV-1, HIV-2)，而由 HIV-1 所造成的感染及病情較 HIV-2 為嚴重。目前 HIV-1 依其蛋白質外套膜基因序列，可分為 O, M (主要型) 及 N 三大類，而在主要群中又可分為 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J 等十個亞型。相同亞型間的基因序列變異性通常小於 15%，不同亞型則有 20-30% 的變異性。由於 HIV-1 亞型可能與感染的途徑、傳播的方式有關，同時決定亞型的外套膜基因對於疫苗的發展也有重要的影響，因此在流行病學的調查上便顯得相當重要。透過對 HIV 亞型在不同高危險群中的監測，可作為在 AIDS 防治上的參考，同時在了解亞型的流行

趨勢及變異情形，對未來疫苗的研究與使用上，提供了很好的訊息。

### **3.與宿主之遺傳關聯(coreceptor多樣性)**

在臨床上，嗜巨噬細胞 HIV-1 株是早期病毒感染的主力，到了後期（愛滋病階段），絕大部份的病毒變為嗜 T 淋巴球 HIV-1 株並使用 CXCR4 為共同受體。由於 HIV-1 在不同的疾病階段，使用不同蛋白質做為感染不同細胞的共同受體，所以許多研究就針對 CXCR4, CCR5 這兩個蛋白質的表達做深入之探討。

## **目標二：研究愛滋病感染之病毒學與免疫學**

### **1. 病毒學 (Virology)**

#### **A. HIV 感染之檢測**

##### **(i) 血清學(Serology)**

##### **(ii) CD4 / CD8**

##### **(iii) 病毒載量(Viral load)**

#### **B.病毒分離(BL-3)**

臨床病毒的分離是臨床病毒檢驗之「黃金標準」(Gold standard)，也是本計畫最基本項目之一，具備了臨床之病毒株才能進一步對病毒本身之生物特性加以分析，也才能進行抗病毒藥物之開發與各種動物試驗等。

### **2.免疫學 (Immunology)**

## **目標三：研究臺灣地區愛滋病感染之臨床問題**

### **1. HAART 成效 (viral load, CD4/CD8 ratio, HIV residual replication)**

在抗HIV化學治療之藥效及預後之評估中，最有價值的指標乃為血漿中之 HIV 病毒載量。不過合併療法中定期檢驗CD4細胞數目，亦不可或缺，因其數值是療效及病患之免疫機能之重要參考。若是HIV 病毒載量與CD4值有出現互相矛盾現象時，則以前者較為可靠。血漿中HIV病毒載量之測量與評估，尚需注意下列事項：(1)單次HIV病毒載量測定可能因檢體之不當貯存與操作，或病患最近接種疫苗與發生伺機性感染等之因素而改變 (2)不同之測定方法，因為測定原理不同，所以難以比較其數據之臨床意義 (3) 因治療或HIV病毒突變而使檢驗結果不穩定，特別是應用血清學或病毒載量之檢驗 (4)病患本身之生活習慣改變也

可能影響檢驗數據 (5) 臨床所使用之合併療法可能改變檢驗數據。

## 2. 藥物抗性 (Genotypic & phenotypic analysis of drug resistant virus after HAART)

由於目前所使用的合併療法藥物，都是針對反轉錄酶與蛋白酶兩種，因此抗藥性的產生自然也以這兩種酵素為主要目標。目前全球已有共識"三合一"療法最有效，且被多數已開發國家所採用。所謂"三合一"乃包括兩種 NRTIs (Nucleoside reverse transcriptase inhibitors) 合併一種強有力之 PI (protease inhibitor)。例如 AZT、3TC 與 indinavir (IND) 三合一併用療法，對曾使用過 AZT 之群體，可將 85% 病患血漿中之 HIV RNA 降低至 500 copies/ml 以下。此種治療對未經使用過 AZT 之病患群，療效更佳。三合一強有力之抗 HIV 合併療法，已證明比過去的兩種 NRTIs 之合併療法，效果更強且更持久；同時已被証實對抗藥性 HIV 之出現，也有抑制作用。包括 RIT (Ritonavir) 或 SAQ (Saqinvir) 在內之其他三合一併合療法，亦被證明對死亡率之降低與病情進行之抑制有顯著療效。通常強有力之抗 HIV 治療可以在 2-3 週內控制血漿內 HIV 之繁殖。在三合一療法初期(4-8 週)，HIV RNA 下降迅速，之後 12-16 週時則下降速度緩慢。對於血漿 HIV RNA 較低，CD4 細胞較高，且疾病進行甚緩慢之病患，可以使用兩種 NRTIs 之併用療法；尤其對無症狀者，兩種 NRTIs 治療(例如：AZT+ddI，或 AZT+ddC)，可能長期維持現狀。最近 AZT+3TC、d4T+ddI、或 d4T+3TC 之方法，也曾被採用(6,7,9,13,22)；惟 AZT 與 d4T 等之併用，並不妥當。1995-1996 年代多數學者曾推薦兩種 NRTIs 併用療法，之後愈來愈多數學者認為若是短期間內有症狀進行者，應再加入一種 PI (16,25)。除了上述各種 NRTIs 與 PIs 三合一抗 HIV 藥劑之合併療法外，還有兩種 PIs 之併用，亦被報告使用(10,19,21,35)。而初期兩種 NRTIs 併用失敗後，改用後續之三合一併合療法時，至少兩種藥必需與初期者不同。

三合一療法可將大多數病患之血漿 HIV RNA 在半年內降至 400-500copies / ml 以下，不過至今尚無定論 (11,12)。HIV/AIDS 的治療方式日新月異，部分國外學者採取四種合併，甚至五種的合併療法。加上抗 HIV 新藥陸續推出，HIV 之變種也持續演化，因此治療療效應妥善評估。雖然對病患的 HIV RNA 或臨床各方面已有具體成效，但對 CD4 細胞之恢復，無論其數目、機能或其分化，則尚不理想。因此多數學者認為 HIV/AIDS 應在早期，尚未有不可逆性免疫障礙發生之前，施行合併療法。由於 HIV 之繁殖與新陳代謝迅速，難免造成突變種雜生；單種抗 HIV 藥劑之使用(2,5)，或不夠強力的合併療法，亦極容易誘發抗藥

性之株種選擇性地繁殖，因而時常導致治療失敗。所以合併療法的終極目的 必須達到 6 個月內將血漿中 HIV RNA 抑制至測不出為止，若是無法長期抑制血漿中 HIV RNA，則須考慮改變療法(29)。

在抗 HIV 化學治療之藥效及預後之評估中，最有價值的指標乃為血漿中之 HIV RNA 濃度(3)。但合併療法中亦應定期檢驗 CD4 細胞數目，因其數值是療效及病患之免疫機能之重要參考。CDC (Center for Diseases Control)之前對 AIDS 分期方法，主要仍以 CD4 數值加以定義：無論有否典型症狀，若是 CD4 少於  $200/\text{mm}^3$ ，則應被認定為 AIDS。若是 HIV RNA 與 CD4 值有出現互相矛盾現象時，則以前者較為可靠(26)。感染 HIV 之後，CD4 會逐漸被破壞導致進行性免疫缺陷，並在臨床上引起各種腫瘤與伺機性感染。但其臨床過程可依 HIV 與人體本身等因素而有差異。有研究顯示認為若是不治療，通常感染 HIV 者每年 CD4 降低  $80-90/\text{mm}^3$ (即每年下降 12-15%)，最終發病而死亡。

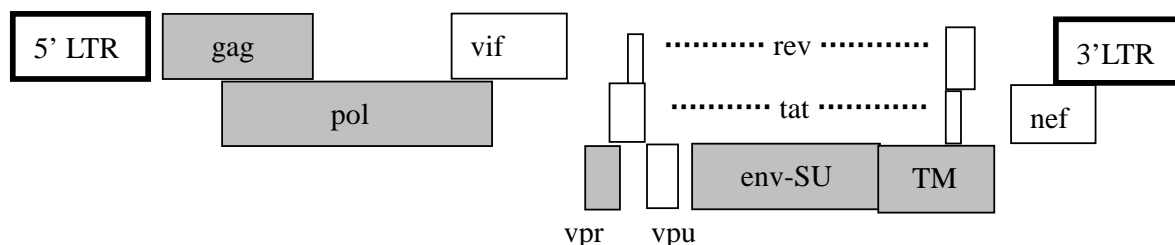
由於 HIV 本身之高突變機率與動態性的新陳代謝，因此有效之抗 HIV 治療必須將血漿 HIV 在 2-3 週內明顯地降下，並且必須以合併之強效療法，使 HIV 基因多處同時引起突變，而使之失去繁殖力，如此長期持續對 HIV 之控制，以期巨噬細胞等長壽命細胞內的 HIV burn out，而不致再生(1)。

由於目前所使用的合併療法藥物，都是針對反轉錄酶與蛋白酶兩種，因此抗藥性的產生自然也以這兩種酵素為主要目標(15,17,24,27,30,32,35)。例如 Winters 等人發現以 ddI 或 ddC 加上 AZT 治療病患可在 RT 基因 codons 69 與 70 之間增加一個 6-basepair 的 insert (34)。而 Schapiro 等人也發現以 saquinavir 及 zidovudine 可分別在 codons 48 及 90 與 codon 215，產生發生比率不等的突變機率(28)。在 HIV-1 基因中，反轉錄酶與蛋白酶皆由 pol 基因所製造(如圖一)。Pol 基因有部分與 gag 及 vif 基因重疊，可經由切割 Pr160<sup>gag-pol</sup> 而產生反轉錄酶、蛋白酶及嵌合酶等病毒酵素。由於現今所使用的愛滋病治療藥物，皆是利用反轉錄酶或蛋白酶之抑制劑來抑制 HIV 之複製，因此 HIV 突變之產生也是針對此二蛋白質基因位置發生。

目前台灣為全球唯一由健保給付愛滋病患治療費用之國家，而先前由國外進口之治療藥物以 AZT 為主，用來對愛滋病患進行治療。因此本計畫擬將於中山醫學大學附設醫學中心及台北市立仁愛醫院接受各種不同療法之病患分組(由中山醫學大學蔡嘉哲及仁愛醫院廖學聰醫師提供)，例如：兩種 NRTIs 治療或 NRTIs+PI 等，由於臺灣目前尚未進口 NNRTI(Non-nucleoside reverse transcriptase



inhibitor)類之藥物，因此較可能之療法組合為 AZT+3TC，AZT+3TC+SAQ，AZT+3TC+RIT 等。並於治療前後採集病患之血液檢體，首先進行病毒分離(BL-3)培養，保留病毒株(31)。並利用 RT-PCR 方法將病毒之 pol 基因擴增，再以自動基因序列分析方法(autosequencing)找出其突變點位置。



圖一、HIV-1 基因圖

### 3. 新藥物開發

愛滋病是全球性的致死性傳染病。這是由HIV感染引起的，導致免疫缺陷和機會性感染並最終死亡。最早應用Suramin、AZT等治療愛滋病。盡管在HIV的分子機理和HIV治療(AZT、ddC、ddI)等方面獲得很大進展，但這些藥物存在較大毒性和容易誘發病毒變異。近來應用3種藥物的聯合治療，可以升高CD4細胞數及降低血漿中的病毒量。但藥物昂貴，需不停服用，仍可能出現變異毒株，因此仍需繼續開發不同作用機制（例如針對不同病毒酵素）及較為便宜、有效的藥物。

藥物的開發可以以天然物及中草藥為研究目標，因為這些具有價格便宜、獲得容易及國人接受度高等優點。

## (2) 材料與方法

### 目標一：研究臺灣地區愛滋病流行之現況

#### 1. 臺灣地區 HIV 之亞型

透過 RT-PCR 對臨床 HIV 病毒株之 Env 基因擴增並序列分析，可對 HIV 亞型在不同高危險群中的監測，可作為在 AIDS 防治上的參考，同時在了解亞型的流行趨勢及變異情形，對未來疫苗的研究與使用上，提供了很好的訊息。

#### 2. 與宿主之遺傳關聯 (coreceptor 多樣性)

鑑於族群基因的特異性會影響到該族群對 HIV-1 的接受性，疾病進展速率，甚至醫療政策的制定，因此本計畫擬大量篩檢台灣不同族群(客家、原住民及平地人)的 CCR5 啟動子之多樣性及其基因型。利用分子生物技術如聚合酵素增幅法 ( PCR )、RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 及溫度梯形電泳法 (TGGE) 等來鑑定帶有變異的 CCR5 啟動子之基因型，進而再以核酸定序方法來確認變異的位置。藉由這個計畫的執行，我們可以了解中國族群的 CCR5 啟動子的多樣性、基因出現頻率 ( Allele frequencies )，及其與細胞表面 CCR5 蛋白數目的相互關係，以做為國人對 HIV-1 的接受性，或感染後的疾病進展速率等的醫療評估參考用。本計畫要達成的目標普查台灣不同族群(客家、原住民及平地人)和部分愛滋病患者的 CCR5 啟動子之多樣性及其基因型。分析這些基因型在不同族群中的基因出現頻率。同時經由 CCR5 FACSscan 實驗，可以分析不同的 CCR5 啟動子基因型與 CCR5 蛋白表達之相互關係。

### 目標二：研究愛滋病感染之病理機制

#### 1. 病毒學 (Virology)

##### A. HIV 感染之檢測

##### (ii) 血清學 (Serology)

##### (ii) CD4 / CD8

基本上 CD4/CD8 的臨床檢測可利用細胞流式計數儀 (Flow cytometry) 偵測染上特定抗體的細胞數而精確計算出。流式細胞分析除了可對白血球作進一步的分型外，應用多色抗體組合分析更可減少所需試劑與耗材，在免疫學與基礎醫學上有很大的助益。以流式細胞技術分析淋巴球細胞表面抗原，並藉以鑑別其中各種

亞型，稱為淋巴球免疫分型。為了偵測抗原，將專一性的單株抗體以螢光色素標記，在利用抗原與抗體的相互鍵結，來檢查細胞表面是否具有某一特定抗原。

流式細胞技術分析所用的抗凝劑有三種：Potassium EDTA、Acid Citrate Dextrose(ACD)及 Heparin。若是檢體在收集 30 個小時內處理，以上三種抗凝劑均可使用，如果無法在 30 小時內處理，則須選擇 ACD 或 Heparin，此兩種抗凝劑對保存細胞表面抗原之抗原性，持久性較佳。檢體收集時，將血液檢體與特异性抗體置於試管中，震盪讓抗體與細胞充分混合，放於黑暗處作用，以保持最強的螢光。清洗時以 300-400 xg 離心 3-5 分鐘，之後可震盪以打散細胞團塊，清洗液中可加入 BSA or FBS 以減少細胞凝塊及自體螢光。分析前以 1% Paraformaldehyde 固定細胞，固定液必須每個月製備以保新鮮。染色固定後的樣品可避光置於 4-10 °C 冰箱中，分析時才取出，分析前再震盪使細胞打散效果最佳。

愛滋病毒感染會導致病人有 CD4 受體的 T 淋巴球數目下降，而週邊血液中 CD4<sup>+</sup> T 細胞百分比與疾病嚴重程度有直接的相關，CD4 比例愈低，感染情況愈嚴重，因此以 CD4<sup>+</sup> T 細胞數目作為判斷預後與評估療效的標準，並且每 3-6 個月須做一次 CD4/CD8 測量，以密切追蹤病人狀況。此部分工作地點位於中山醫學院研究大樓 13 樓病毒研究中心。所需儀器設備以 Becton Dickson 或 Coulter 公司之流式細胞計數儀(FACS)為主，至於檢驗之抗體與試劑等則向該代理廠商直接購買。

### (iii) 病毒載量(Viral load)

目前市售之 PCR 檢驗試劑已相當簡化，不需要電泳分離手續，利用微孔盤 ELISA 系統判讀 PCR 之生成物。因此被稱為 ELOSA (enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay)，主要分為檢體收集與處理試劑、核酸偵測試劑等三部分。首先將 0.5ml 之全血檢體溶血後留下白血球，抽取白血球 DNA，加入 biotin-labeled primer，增幅 HIV 之特定 DNA (provirus) 序列後，加入塗覆有 BSA-conjugated DNA probes(對 HIV 具特异性)之微孔盤，將沒有雜交(hybridize)的 biotin-labeled primer 清洗掉後，加入 avidin HRP (horseradish peroxidase)，由於 avidin 對 biotin 具強吸力，會使酵素固定在微孔盤中，最後加入基質呈色，由吸光度判讀反應結果。

bDNA 技術與 PCR 技術同樣用來偵測檢體中微量之病毒核酸，不過，bDNA 技術是一種訊號增幅技術 (signal amplification technology)，而 PCR 技術則是一種核酸增幅技術。酵素 (alkaline Phosphatase) 標示之核酸探針與基質反應後，

產生冷光 (chemiluminescence)，再以冷光偵測儀 (luminometer) 測量冷光訊號強度，即可定量出病毒核酸。冷光不同於螢光 (fluorescence) 或呈色法，測定時不需要外部光源，可降低背景干擾，提高敏感度。bDNA 技術是 Chiron 所開發偵測病毒或其他微生物體核酸的技術，目前已在日本推出 bDNA 之 HCV 檢驗試劑，並被列入日本健保檢驗項目。Chiron 之 HIV bDNA 檢驗試劑，以合成之 bDNA 和病毒 RNA 雜交，再利用 bDNA 之分枝結構，使大量之酵素標識 probe 和 bDNA 結合 (即雜交)，最後才加入基質產生冷光訊號。可與 1000 各酵素標識之 probe 結合，增強了檢測訊號，而使敏感度大幅提升。美國 Pittsburgh Medical Center 曾利用此檢驗試劑，測量 HIV 感染者體內之病毒 RNA，並根據病毒 RNA 量來預測何時發展成 AIDS。

目前臨床上常用之病毒載量檢驗以 Chiron 之 bDNA 及 Roche 之 RT-PCR 兩種敏感性最佳，拷貝數最低可達到十位數，但此兩種之原理有些差異，Chiron 之 bDNA 方法是將偵測產物所得之訊號擴大，而 Roche 之 RT-PCR 方法則是直接將病毒 RNA 轉錄成 DNA 後直接擴大，兩者各有優劣。此部份也已使用上述 Chiron 之檢驗方法。

### **B. 病毒分離(BL-3)**

基本上 HIV 之培養以 T 淋巴球細胞為主，加上 PHA (phytohemagglutinin) mitogen 的刺激及 IL-2 的維持下生長。中山醫學大學病毒研究中心目前設有一間 BL-3 實驗室，可進行 HIV 病毒分離工作。分離所得之病毒株與所使用之細胞皆將妥善保存，提供中心標準實驗室本身與其他研究單位之所需。至於例行培養所使用之 PBMC，則由同樣位於台中市之台中捐血中心提供 Leuco-Pack 再加以分離。

### **C. 臺灣 HIV 病毒株之生物特性分析**

為了了解臨床個個不同的病毒株其生物特性，必須針對以下三項進行實驗 (1) 複製動力學 (Replication kinetics) (2) SI / NSI (3) 中和反應 (Neutralization)。因此此三項實驗為本部分計畫之主要工作。各病毒株之生物特性經分析確定後，用來建立本國之 HIV 病毒庫，並作為本計畫其他相關研究病毒來源之用。

## **目標三：研究臺灣地區愛滋病感染之臨床問題**

### **1. HAART 成效 (viral load, CD4/CD8 ratio, HIV residual replication)**

此計畫由中山醫學大學蔡嘉哲醫師負責主持，輔以臨床檢驗數據如

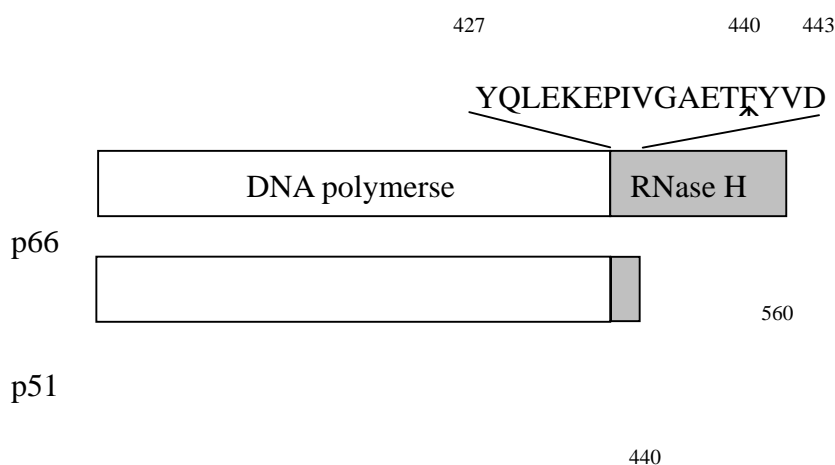
CD4/CD8、viral load等進行各種不同合併療法療效之評估。

## 2. 藥物抗性 (Genotypic & phenotypic analysis of drug resistant virus after HAART)

本計畫將接受各種不同療法之病患分組，並於治療前後採集其血液檢體，利用 RT-PCR 方法將病毒之 pol 基因擴增，再以自動基因序列分析方法找出其突變點位置，以此研究成果作為臨床用藥策略改進之依據。

因此本計畫將於中山醫學大學附設醫學中心及台北市立仁愛醫院接受各種不同療法之病患分組（由中山醫學大學蔡嘉哲及仁愛醫院廖學聰醫師提供），例如：兩種 NRTIs 治療或 NRTIs+PI 等，臺灣目前尚未進口 NNRTI (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor)類之藥物，因此較可能之療法組合為 AZT+3TC，AZT+3TC+SAQ，AZT+3TC+RIT (Ritonavir)等。並於治療採集其血液檢體，首先進行病毒分離(BL-3)培養，保留病毒株。並利用 RT-PCR 方法將病毒之 pol 基因擴增，再以自動基因序列分析方法(autosequencing)找出其突變點位置，以此研究成果作為臨床用藥策略改進之依據。並對感染者觀察追蹤，並且每 1~3 月接受例行 CD4 或 HIV RNA 病毒載量(viral load)追蹤檢查以便評估。計畫過程以 CD4(BD 公司)及病毒載量(Roche)之檢驗數值，評估病患是否治療成功，及有無抗藥性病毒株出現。

在 HIV 病毒酵素中，PR、RT 及 IN 三個酵素都是由 Gag-Pol polyprotein (Pr160<sup>gag-pol</sup>)經由切割後所形成的。PR 本身由 99 個 amino acids 組合，分子量約為 10K；而 RT 則由 p66 (66 kd) 與 p51 (51 kd) heterodimer 形成（如下圖）。



圖二、HIV-1 RT 次單位之組成

### 3.新藥物開發

本計畫擬開發具有醫藥、經濟價值，及符合國人醫療特性之高價值生物技術產業。藥物的開發可以以天然物及中草藥為研究目標，因為這些具有價格便宜、獲得容易及國人接受度高等優點。中藥對愛滋病的治療有一定的意義，因為中醫治病原則是扶正（免疫力）去邪（病原），對傳染病的治療原則也是強調增加機體的自然免疫力，清除病原。中藥複方即按此原則組成，由幾味單方或複方中藥配成，治療愛滋病這種免疫缺陷的疾病也是符合對中醫藥的治療原則的。除了複方之外，單方也可廣泛篩選具有增加免疫力、抗病毒藥效的中草藥加以科學化系統的研究，並釐清其作用之機制。應用HIV 感染PBMC、MT4、H9 和U937 等細胞及M-tropic、T-tropic和dual-tropic等HIV 病毒株研究化學物與中藥單味及複方對HIV 的抑制作用，檢測HIV 病毒的方法有EIA、p24 抗原檢測法、反轉錄酶活性測定法、蛋白酶活性測定法、嵌合酶活性測定法、西方墨點法和PCR。

目前關於化學物部份，已有一類可合成之天然化學物，為HIV integrase之抑制物，目前已進入動物實驗階段。另外也有中草藥單方，在初步的*in vitro*測試具有抗HIV複製之活性，經萃取濃縮其有效成分，再以HPLC分析其純度可高達85%。相關工作正持續進展中。

### (3) 結果與討論

目標一：研究監控臺灣中部地區愛滋病流行之現況

目標二：研究愛滋病感染之病理機制

目標三：研究臺灣地區愛滋病感染之臨床問題

本實驗室先前曾針對愛滋病患者與高危險群之病例，以 DNA 序列分析其 HIV 共同受體 (coreceptor) CCR5 之 promoter，結果發現有一高危險群病例，其高棉籍太太已感染 HIV，現已發病，過去一直暴露在感染 HIV 的威脅之狀況下，未採取任何保護措施與太太進行性行為，長達 3~4 年卻不被感染，可能是由於其 CCR5 之 promoter 區域，包括在第 85, 97 的位置轉為 G, C、第 650, 652 的位置由 C, G 轉為 C, T 產生變異等有關，而影響 CCR5 之蛋白質正常表達或減低表達之量所引起。因此本實驗室針對正常人與 HIV 感染者之 CCR5 蛋白質表達量與各項指標數據進行檢測(表一、二)並根據其族群(本省籍、外省籍)與 CCR5 promoter 序列分析，結果發現臺灣各族群變異位置與先前 Martin et al.(1998)等人之報告所顯示之十種 CCR5 promoter 之變異型 (P1 ~ P10) 並不完全一致，因此此變異或許為台灣地區本土之變異型(圖一)。而且本省籍、外省籍的 CCR5 promoter 序列與 CCR5 蛋白質表達量並無統計學之差異，但本研究之案例之 CCR5 蛋白質表達量卻明顯低於其他族群者，此項結果 (CCR5 蛋白質表達量卻明顯低於其他族群者) 與 HIV 感染量、CD4 %、CD8 %、WBC 數目、Lym 數目等皆無關，因此推測可能是由於其 CCR5 promoter 序列所影造成的結果。

表一、正常人之 CCR5 表達率

日期	姓名	CD4 %	CD8 %	CD4/CD8	WBC mm <sup>3</sup>	Lym %	Lym $\mu$ l	CD4 $\mu$ l	CD8 $\mu$ l	CCR-5 %
2000/6/13	呂□□	38.12	43.32	0.88	6500	40	2600	991.12	1126.44	18.02
2000/6/13	林□□	40.48	56.45	0.72	6500	46	2990	1210.40	1687.90	10.34
2000/6/13	郭□□	64.08	26.32	2.44	7800	30	2340	1499.45	615.79	18.5
2000/5/19	黃□□	48.87	43.50	1.12						16.37
2000/6/2	鄒□□	57.01	29.34	1.94						19.8
2000/6/19	楊□□	66.43	31.82	2.09	5100	38.4	1958.4	1300.89	623.13	21.52
2000/6/28	林□□	34.78	62.16	0.56	7710	42.3	3261.3	1134.38	2027.31	8.56

2000/6/28	鄒□□	51.51	33.50	1.54	7330	34.4	2521.5	1298.84	844.75	20.3
2000/6/28	黃□□	42.49	49.47	0.86	5740	40.1	2301.7	977.98	1138.65	18.8
2000/6/28	楊□□	56.79	38.96	1.46	5140	41.6	2138.2	1214.31	833.00	13.54
2001/6/22	賴□□	52.96	40.76	1.30	8610	30.2	2600.2	1376.98	1059.84	13.9
2001/6/22	林□□	60.06	41.52	1.45	8950	27.4	2452.3	1472.88	1018.08	15.9
2001/6/22	詹□□	45.96	49.71	0.92	6800	34.7	2359.6	1084.52	1172.88	16.8
2001/6/22	連□□	60.26	34.67	1.74	5800	37.4	2169.2	1307.13	752.08	13.8
2001/6/22	何□□	56.52	39.54	1.43	8630	31.7	2735.7	1546.27	1081.73	16.6
2001/6/28	楊□□	62.23	31.41	1.98	4620	38.5	1778.7	1106.80	558.74	21.9
2001/6/28	魏□□	47.06	44.31	1.06	6330	42.3	2677.6	1260.04	1186.50	17.4
2001/2/1	侯□□	42.60	34.10	1.24	8100	32.8	2656.8	1131.80	905.97	14.4
2000/6/8	唐□□	37.50	61.90	0.61	6000	26	1560.0	585.00	965.64	
2001/5/18	莊□□	58.49	38.57	1.52	8100	36.4	2948.4	1724.39	1137.24	13.9
2001/3/7	郭□□	49.35	44.48	1.11	16100	4.5	724.5	357.57	322.23	22.9

表二、HIV 感染者之 CCR5 表達率與病毒載量

日期	姓名	CD4 %	CD8 %	CD4/CD8	WBC mm <sup>3</sup>	Lym %	Lym $\mu$ l	CD4 $\mu$ l	CD8 $\mu$ l	CCR-5 %	Viral Load
2000/5/31	蘇□□	13.66	84.51	0.16	6300	42.6	2684.5	771.74	1732.87	16.8	47591.3
2000/6/2	郭□□	37.63	79.23	0.47	5800	38	2204.0	829.40	1746.29	8.98	1205.5
2000/6/15	陳□□	27.81	70.54	0.39	4850	32	1552.0	431.55	1094.84	22.3	2832
2000/6/23	林□□	29.49	67.86	0.43	8000	31.7	2536.0	747.74	1720.86	22.33	9019.3
2000/6/29	李□□	28.75	64.55	0.45	5900	45.5	2684.5	771.74	1732.87	20.5	<400
2000/7/10	蔡□□	1.26	95.75	0.01	10300	12.9	1328.7	16.79	1272.29	20.8	40709
2000/7/19	吳□□	3.91	89.77	0.04	4800	48.3	2318.4	90.72	2081.30	15.62	11756
2000/7/28	蔡□□	6.87	91.74	0.07	10300	7	721.0	49.56	661.45	20.4	7355
2000/8/10	楊□□	5.79	87.55	0.07	11000	8.2	902.0	52.23	789.74	18.9	10129
2000/8/31	陳□□	16.11	81.20	0.20	8100	45.1	3653.1	588.61	2966.39	63.8	105836
2000/9/21	郭□□	18.76	78.47	0.24	8100	35.7	2891.7	542.44	2268.99	9.37	3551
2000/10/5	蘇□□	17.63	82.52	0.21	6600	39.8	2626.8	462.99	2167.59	17.9	11241
2000/10/5	林□□	41.04	58.23	0.70	4300	39.3	1689.9	693.56	984.06	11.8	937
2000/10/19	李□□	28.30	63.87	0.44	5200	54.4	2828.8	800.60	1806.67	19.3	N.A.
2000/11/7	陳□□	15.59	81.62	0.19	7200	47.9	3448.8	537.82	2814.88	76.8	75751
2000/11/9	吳□□	12.10	80.26	0.15	5400	60.6	3272.4	396.07	2626.38	26.9	45000
2000/11/16	蔡□□	4.59	89.42	0.05	10300	17.1	1761.3	80.90	1575.03	24.6	<400
2000/12/7	陳□□	25.66	72.48	0.35	3700	35.8	1324.6	339.86	960.03	25	N.A.
2000/12/21	葉□□	1.48	92.99	0.02	5130	43.5	2231.6	33.07	2075.12	29.2	54833



2001/1/10	吳□□	44.21	59.67	0.74	10100	13.8	1393.8	616.27	831.69	24.8	39374
2001/1/11	郭□□	19.26	75.99	0.25	7200	36.3	2613.6	503.41	1986.20	27.5	N.A.
2001/2/20	李□□	3.95	92.85	0.04	16700	6	1002.0	39.57	930.37	35.8	225921
2001/3/1	吳□□	10.42	83.29	0.13	4800	58.6	2812.8	293.22	2342.87	30.4	46191
2001/3/29	林□□	37.50	61.96	0.61	4700	51.9	2439.3	914.74	1511.35	10.55	277241
2001/3/29	李□□	40.46	71.47	0.57	4900	47.2	2312.8	935.82	1652.95	17.2	<400
2001/4/12	陳□□	28.63	70.11	0.41	5200	28.7	1492.4	427.22	1046.40	14.5	4624
2001/4/12	王□□	4.02	85.97	0.05	4410	35.6	1570.0	63.09	1349.68	8.9	3264
2001/4/26	郭□□	25.91	72.29	0.36	5360	36.8	1972.5	510.99	1425.89	22.46	3215
2001/4/27	王□□	11.26	79.03	0.14	4800	13.9	667.2	75.09	527.30	7.14	N.A.
2001/5/21	袁□□	10.79	85.22	0.13	11190	30.8	3446.5	372.03	2937.07	17.9	48640
2001/5/22	羅□□	14.08	75.99	0.19	7600	8.1	615.6	86.69	467.82	20.1	79360
2001/5/23	王□□	16.45	80.16	0.21	2300	9.7	223.1	36.71	178.84	9.85	35986
2001/5/25	蘇□□	15.79	83.45	0.19	5100	58.1	2963.1	467.86	2472.63	20.7	N.A.
2001/6/19	王□□	15.86	79.40	0.20	4200	32.3	1356.6	215.17	1077.12	7.02	N.A.
2001/6/27	張□□	48.87	53.62	0.91	3100	32.8	1016.8	496.95	545.22	13.2	
2001/7/5	吳□□	9.98	80.26	0.12	5600	46.3	2592.8	258.80	2080.87	13.6	.
2001/7/12	鄭□□	11.73	71.96	0.16	3910	32.5	1270.8	149.12	914.41	18.5	

圖一、台灣地區各族群之 CCR-5 promoter polymorphisms 與國外各族群之比較

較

序列	103	112	208	239	308	313	314	374	381	385	524	546	599	600	609	621	627	630	676	744	756	839	841
P28	T	T	G	T	G	A	A	G	T	G	C	T	A	T	A		C	C	A	A	T		
P1								C		A							T						
P2																	T						
P3																	T						
P4																	T				C		
P5			T	C													T						
P6			T														T						
P7			T														T						
P8			T														T	T					
P9			T								T						T	T					
P10			T						C								T	T					
本省籍*	G	C	T											T			T		G				
本省籍														G	del						T		

P28:白人(Caucasian)基因序列

本省籍\*:本研究之特殊案例

### 目標三：研究臺灣地區愛滋病感染之臨床問題

為測試 CAPE, MC 與 PEDMC 之細胞毒性,先後於美國 ADARC, Rockefeller University 何大一教授之實驗室及中山醫學大學進行了實驗,首先是針對人類正常之 PBMC, 加入 0.1uM, 0.5uM, 1uM, 5uM, 10uM, 25uM, 50uM, 100uM, 200uM 及 400 uM 等之不同濃度,處理 48h 後,以 0.25% Trypan blue 測試細胞之存活率,發覺 PBMC 在即使高達 400uM 之高濃度 CAPE、MC、PEDMC 及 Bromo-CAPE 處理下,存活率仍沒有明顯差異。之後同樣以上列之濃度處理 PBMC,並同時感染 M-tropic (JRCSF), T-tropic (NL-43)或 Dual tropic (89.6)之 HIV-1 isolates 感染後,隔天將加入之化合物於 Washing 後移除或維持同等濃度,分為兩組於感染後第三天及第七天收集其培養基上之清液,使用 Abbott 公司之 p24 定量 EIA 試劑組,與未加化合物之對照濃度比較。結果顯示,除 PEDMC 及 Bromo-CAPE 外其餘兩者對於 HIV 之複製有明顯抑制作用,於濃度 10uM 至 100 uM 之間尤其明顯,可看出其變化(100% 抑制),而且此抑制作用並不因不同趨向性的 HIV (M-tropic, T-tropic 或 Dual tropic)而有所差異,顯示其抑制作用的發生,似乎並不是在吸附(attachment)步驟,而是在後續穿透(Penetration)之後發生。這初步結果顯示 CAPE 類的化合物可能有抑制 HIV 複製之作用。

在病毒分類當中,HTLV 與 HIV 分屬於不同的病毒屬,但屬同一反錄病毒科。而 HTLV-1 在臨床上與成人之白血病(Adult T-cell leukemia)相關。由於 CAPE 也曾被顯示可選擇性抑制白血病 HL-60 細胞之 DNA, RNA 與蛋白質之生成,而 HTLV 之 integrase 與 HIV 之 integrase 又有極高之相似性,因此針對此三種化合

物之細胞毒性及抑制 HIV 與 HTLV 之複製做一完整之研究。此部分的研究成果已委請理律法律事務所專利部申請 17 國專利權。因此擬再以此基礎進行中草藥抗 HIV 之研究，並已選定空心蓮子草作為研究材料，發現其具有抗 HIV 複製之活性。

## 參考文獻：

1. Aquaro S, Calio R, Balestra E, Bagnarelli P, Cenci A, Bertoli A, Tavazzi B, Di Pierro D, Francesconi M, Abdelahad D, Perno CF. Clinical implications of HIV dynamics and drug resistance in macrophages. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998;12(1-2 Suppl):23-7.
2. Atkins M, Strappe P, Kaye S, Loveday C, McLaughlin JE, Johnson MA, Tedder RS, Griffiths PD, Emery VC. Quantitative differences in the distribution of zidovudine resistance mutations in multiple post-mortem tissues from AIDS patients. *J Med Virol* 1998 Jun;55(2):138-46.
3. Blaak H, Wolf F, Wout AB, Pakker NG, Bakker M, Goudsmit J, and Schuitemaker H. Temporal relationship between human immunodeficiency virus type I RNA levels in serum and cellular infectious load in peripheral blood. *J Infect Dis* 1997;176:1383-7.
4. Drosopoulos WC, Rezende LF, Wainberg MA, Prasad VR. Virtues of being faithful: can we limit the genetic variation in human immunodeficiency virus? *J Mol Med* 1998 Aug;76(9):604-12.
5. Eastman PS, Mittler J, Kelso R, Gee C, Boyer E, Kolberg J, Urdea M, Leonard JM, Norbeck DW, Mo H, Markowitz M. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 associated with loss of suppression of plasma viral RNA levels in subjects treated with ritonavir (Norvir) monotherapy. *J Virol* 1998 Jun;72(6):5154-64.
6. Gilbert P, DeGruttola V, Hammer S. Efficient trial designs for studying combination antiretroviral treatments in patients with various resistance profiles. *J Infect Dis* 1998 Aug;178(2):340-8.
7. Gomez-Cano M, Rubio A, Puig T, Perez-Olmeda M, Ruiz L, Soriano V, Pineda

- JA, Zamora L, Xaus N, Clotet B, Leal M. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral-naive and antiretroviral-experienced HIV-infected patients in Spain. *AIDS* 1998 Jun 18;12(9):1015-20.
8. Gottlieb S. New HIV strain may be resistant to drugs. *BMJ* 1998 Jul 11;317(7151):100.
  9. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Jonas L, Meibohm A, Holder D, Schleif WA, Condra JH, Emini EA, Isaacs R, Chodakewitz JA, Richman DD Simultaneous vs sequential initiation of therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine for HIV-1 infection:100-week follow-up. *JAMA* 1998 Jul 1;280(1):35-41.
  10. Havlir DV, Lange JM. New antiretrovirals and new combinations. *AIDS* 1998;12 Suppl A:S165-74.
  11. Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Demeter LM, Hammer SM, Jacobsen DM, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Vella S, Richman DD Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel. *JAMA* 1998 Jun 24;279(24):1984-91.
  12. Jackson RC. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model of chemotherapy of human immunodeficiency virus infection that relates development of drug resistance to treatment intensity. *J Pharmacokinet Biopharm* 1997 Dec;25(6):713-30.
  13. Jarvis B, Faulds D. Nelfinavir. A review of its therapeutic efficacy in HIV infection. *Drugs* 1998 Jul;56(1):147-67.
  14. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, Cannon M, Meshnick SR. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 1998 May 28;12(8):873-8.

15. Kemp SD, Shi C, Bloor S, Harrigan PR, Mellors JW, Larder BA. A novel polymorphism at codon 333 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase can facilitate dual resistance to zidovudine and L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *J Virol* 1998 Jun;72(6):5093-8.
16. Kim AE, Dintaman JM, Waddell DS, Silverman JA. Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Sep;286(3):1439-45.
17. Kroeger Smith MB, Michejda CJ, Hughes SH, Boyer PL, Janssen PA, Andries K, Buckheit RW Jr, Smith RH Jr. Molecular modeling of HIV-1 reverse transcriptase drug-resistant mutant strains: implications for the mechanism of polymerase action. *Protein Eng* 1997 Dec;10(12):1379-83.
18. Lin HL, Haywood M, and Hollinger FB. Application of commercial kit for detection of PCR products to quantification of human immunodeficiency virus type I RNA and proviral DNA. *J. clin. microbiol* 1996;34:329-333.
19. Maenza J, Flexner C. Combination antiretroviral therapy for HIV infection. *Am Fam Physician* 1998 Jun;57(11):2789-98.
20. Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science*.1998;282:1907-11.
21. Medina DJ, Tung PP, Nelson CJ, Sathya B, Casareale D, Strair RK. Characterization and use of a recombinant retroviral system for the analysis of drug resistant HIV. *J Virol Methods* 1998 Apr;71(2):169-76.
22. Oh SY, Jeong SY, Park TG, Lee JH. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. *J Controlled Release* 1998 Feb 12;51(2-3):161-8.

23. Pillay D. Emergence and control of resistance to antiviral drugs in resistance in herpes viruses, hepatitis B virus, and HIV. *Commun Dis Public Health* 1998 Mar;1(1):5-13.
24. Quan Y, Gu Z, Li X, Liang C, Parniak MA, Wainberg MA. Endogenous reverse transcriptase assays reveal synergy between combinations of the M184V and other drug resistance-conferring mutations in interactions with nucleoside analog triphosphates. *J Mol Biol* 1998 Mar 27;277(2):237-47.
25. Rachlis AR, Zarowny DP. Guidelines for antiretroviral therapy for HIV infection. Canadian HIV Trials Network Antiretroviral Working Group. *CMAJ* 1998 Feb 24;158(4): 496-505.
26. Reichelderfer PS, Coombs RW. Cartesian coordinate analysis of viral burden and CD4+ T-cell count in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Antiviral Res* 1998 Jun;38(3):181-94.
27. Ren J, Esnouf RM, Hopkins AL, Jones EY, Kirby I, Keeling J, Ross CK, Larder BA, Stuart DI, Stammers DK. 3'-Azido-3'-deoxythymidine drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase can induce long range conformational changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Aug 4;95(16):9518-23.
28. Schapiro JM, Lawrence J, Speck R, Winters MA, Efrom B, Coombs RW, Collier AC, Merigan TC. Resistance mutations to zidovudine and saquinavir in patients receiving zidovudine plus saquinavir or zidovudine and zalcitabine plus saquinavir in AIDS clinical trials group 229. *J Infect Dis* 1999 Jan;179(1):249-53.
29. Schmit JC, Weber B. Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring. *Intervirology* 1997;40(5-6):304-21.
30. Shafer RW, Winters MA, Palmer S, Merigan TC. Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates

- from heavily treated patients. *Ann Intern Med* 1998 Jun 1;128(11):906-11.
31. Tedder RS, Kaye S, Loveday C, Weller IV, Jeffries D, Norman J, Weber J, Bourelly M, Foxall R, Babiker A, Darbyshire JH. Comparison of culture- and non-culture-based methods for quantification of viral load and resistance to antiretroviral drugs in patients given zidovudine monotherapy. *J Clin Microbiol* 1998 Apr;36(4):1056-63.
  32. Vial PA, Vial C, Abarca K, Noriega M, Jimenez G, Labarca J, Gasep J, Palacios O, Perez C, Acuna G. Resistance of human immunodeficiency virus (HIV) to zidovudine. Genotypic analysis in strains isolated from Chilean patients. *Rev Med Chil* 1998 Jan; 126(1): 17-26.
  33. Wainberg MA, Friedland G Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *JAMA* 1998 Jun 24;279(24):1977-83.
  34. Winters MA, Coolley KL, Girard YA, Levee DJ, Hamdan H, Shafer RW, Katzenstein DA, Merigan TC. A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* 1998 Nov 15;102(10):1769-75.
  35. Wlodawer A, Vondrasek J. Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998;27:249-84.