

扶正祛邪中药复方对猴艾滋病模型实验研究

徐淑玲¹, 关崇芬¹, 翁新愚¹, 吴小娴², 卢耀增²

(1 中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700; 2 中国医学科学院实验动物研究所, 北京 100021)

摘要: 扶正祛邪中药复方“艾克冲剂”对猴 SIV 感染模型(SAIDS) 治疗作用。方法: 利用 SIVmac 病毒液静脉接种恒河猴造成猴艾滋病实验模型, 流式细胞仪测定感染及治疗动物外周血 CD₄⁺ 细胞、CD₈⁺ 细胞数及 CD₄⁺/CD₈⁺ 比值, 并以 MTT 法观察 T、B 细胞对有丝分裂原诱导分化增殖反应。结果: 艾克冲剂能提高 CD₄⁺ 细胞百分数及 CD₄⁺/CD₈⁺ 比值, 并能促进 T、B 淋巴细胞增殖。结论: 扶正祛邪中药艾克冲剂能够提高、改善 SIVmac 感染动物免疫功能。

关键词: 艾克冲剂; SIV 模型; CD₄⁺ 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9903(2003)01-0042-03

Study on Effect of Fuzheng Quxie Chinese Drugs on Monkey of SIV Infection Model

XU Shu-ling¹, GUAN Chongfen¹, WENG Xin-yu¹, WU Xiao-xian², LU Yao-zeng²

(1. Institute of Basic Theory, China Academy of TCM, Beijing 100700, China;

2. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Lyke Granule on simian immunodeficiency Virus (SIV) infection model. SAIDS model were used. Using monoclonal antibody label on CD₄⁺ and CD₈⁺ cells in PBMC with direct immunofluorescence, the percentage was analyzed by flow cytometry and analyzed CD₄⁺/CD₈⁺ ratio. T and B cells proliferation induced by mitogens was detected before treatment and after treatment with Lyke Granule. Results indicate that Lyke Granule enhanced the proliferation of T and B cells induced by mitogen. CD₄⁺ T cells were increased in PBMC and CD₄⁺/CD₈⁺ were changed.

Key words: Lyke Granule; SIV model; CD₄⁺ cell; cell proliferation

艾滋病的迅速蔓延已成为世界性灾难, 这种死亡率极高的传染病严重威胁人类健康。中医药对许多疑难症有其独到的治疗效果, 在治疗传染病方面也有丰富的经验。艾滋病是由 HIV 病毒感染所致, 病毒持续不断破坏 CD₄⁺ 细胞, 使 CD₄⁺ 细胞数量减少, CD₄⁺/CD₈⁺ 比例失调, 造成机体免疫功能严重受损, 并易引起多种机会性感染及肿瘤。中医认为艾滋病的发病过程以虚损为主, 常采用扶正固本、祛邪、标本兼顾的治疗原则。“艾克冲剂”是根据中医理论, 以扶正祛邪为原则, 经临床实践证实是治疗艾滋病的有效方剂, 建立猴 SIV_{mc} 感染动物模型, 观察艾克冲剂对模型动物免疫功能变化, 是研究抗艾滋病中药及其机理的重要途径。

1 材料和方法

1.1 药物: 艾克冲剂制备 甘草 50g, 黄芩 50g, 银花

50g, 丹参 50g 等, 水煮 1.5h, 乙醇提取, 过柱超滤, 收集小分子部分。紫草 50g, 紫花地丁 50g, 黄芪 100g, 水煮乙醇提取过柱超滤, 收集大分子部分。把大、小分子部分合并, 在水浴浓缩至所要求体积。所有药物经中国中医研究院中药所专家鉴定, 为符合药典规定之正品, 由本所制剂研究室监制。AZT (azidothymidine, zidovudine, Retrovir, 3'-azido-3' deoxythymidine 叠氮胸苷) 购自 Burroughs wellcome Co. 美国。

1.2 动物 恒河猴 5~7kg, 雄性健康, 感染前经 PCR 检测无 SIV 阳性, 血常规正常, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。

1.3 SIV_{mc} 感染动物模型 以美国加州灵长类中心 MarX 博士赠送 SIV_{mc} 病毒液, 感染剂量 10⁻²/ml 接种(约 10⁵MID50), 共感染 12 只恒河猴。

2 方法

2.1 实验分组和治疗方案 SIV_{mc} 感染成功动物随机分组, 艾克冲剂组 6 只, AZT 组 3 只, 生理盐水

组3只。感染后2周给药,艾克冲剂组每日给药12ml(相当于生药6.4克/公斤),AZT组每日给药200mg溶于12ml水中。生理盐水对照组,每日给生理盐水等量。每组每日给药一次,插胃管灌入。给药时间为两个月一个疗程,共观察18周,然后解剖进行病理观察。

2.2 观察指标与操作方法

2.2.1 T淋巴细胞亚群测定 以单克隆抗体直接标记动物外周血CD4⁺, CD8⁺细胞,单克隆抗体购自军事医学科学院生物制剂发展中心。按产品说明书操作,采用FACS420型流式细胞仪测定(美国B.D公司)。微机处理分析阳性率,并计算CD4⁺/CD8⁺细胞比值。

2.2.2 MTT法观察T、B淋巴细胞增殖 ①无菌取猴静脉血2ml,肝素抗凝,分离单个核细胞,调整细胞数1×10⁵/ml。②将调整细胞悬液种植在96孔培养板内,200μl/孔,并分别加入不同有丝分裂原诱导淋巴细胞分化,ConA 5μg/ml, LPS 30μg/ml浓度,培养48h后加入MTT(5mg/ml)继续培养4h,加入酸化异丙醇(0.04mol/L),利用TMRMC型酶标仪检测,波长570~630nm。

3 结果与分析

3.1 接种SIVmac病毒液感染的动物,经PCR检查PBMC DNA;结果全部阳性表明接种病毒液动物全部感染。感染后4周,动物体重均有下降,并出现皮疹,腋下及腹股沟淋巴结有不同程度肿大,触诊并发现脾脏肿大,血常规检查,感染4周后各组白细胞总数均下降,最低降至3500~4500/mm³,伴有腹泻及皮肤感染,口腔溃疡等症状。

3.2 艾克冲剂对SIV感染动物CD4⁺细胞影响。

表1 艾克冲剂对SIV模型动物CD4⁺T细胞百分率影响(均值)

组别	动物数	感染前	感染时间			
			4周	8周	14周	18周
艾克组	6	41.6	33.9	36.2	35.2	46.4
AZT组	3	42.1	32.1	34.7	27.4	28.1
N.S	3	40.26	27.8	30.0	30.7	29.4

表2 艾克冲剂对SIV模型动物CD4⁺/CD8⁺细胞比值变化

组别	动物数	感染前	感染时间			
			4周	8周	14周	18周
艾克组	6	1.375	0.997	1.135	0.976	1.364
AZT组	3	1.361	0.949	0.906	0.891	0.819
N.S	3	1.308	0.910	0.834	0.778	0.824

应用单克隆抗体直接荧光标记CD4⁺, CD8⁺细

胞,流式细胞仪检测,结果表明SIVmac感染4周时艾克组CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺比值下降,CD4⁺细胞百分数下降达10.7%,CD8⁺细胞变化不明显,CD4⁺/CD8⁺比值倒置,经用药后,感染18周时,艾克组CD4⁺细胞数及CD4⁺/CD8⁺比值均有回升,直到实验结束均有提高。AZT组及不治疗组CD4⁺及CD4⁺/CD8⁺比值出现下降趋势,低于艾克组。

3.3 艾克冲剂对SIV模型动物T淋巴细胞分化增殖影响 艾克冲剂对T细胞增殖影响,在动物SIVmac感染4周时,T细胞对ConA诱导分化增殖反应明显下降,与感染前相比有明显差异,P<0.05。经艾克冲剂治疗,在感染18周时(用药16周)与感染4周相比有明显回升P<0.05。可看出艾克冲剂治疗后能提高T细胞对有丝分裂原刺激的反应能力。AZT组动物感染后也出现T细胞降低P<0.05,经AZT治疗,T细胞回升明显P<0.05。

表3 艾克冲剂对SIV模型动物T淋巴细胞分化增殖影响($\bar{x} \pm s$, OD值)

组别	动物数	感染前	感染时间	
			感染4周	感染18周
艾克组	6	0.131±0.009	0.107±0.015*	0.147±0.013#
AZT组	3	0.190±0.021	0.103±0.012*	0.140±0.012#
N.S	3	0.155±0.007	0.139±0.010	0.141±0.011

注:* P<0.05与感染前相比较;# P<0.05与感染后相比较

3.4 艾克冲剂对SIV模型动物B淋巴细胞分化增殖影响 艾克冲剂对B细胞的作用,在感染4周时与感染前相比B细胞功能受损,增殖反应低于感染前,P<0.05,用药后较感4周相比明显上升P<0.05。AZT组感染4周同样低于感染前,P<0.05,经治疗后B细胞增殖有上升趋势,但未达到统计学差异。因此,可看出艾克冲剂治疗后能够提高T、B淋巴细胞对有丝分裂原诱导反应,对T、B细胞有一定的保护作用。

表4 艾克冲剂对SIV模型动物B淋巴细胞分化增殖影响($\bar{x} \pm s$, OD值)

组别	动物数	感染前	感染时间	
			感染4周	感染18周
艾克组	6	0.129±0.013	0.108±0.011*	0.150±0.012#
AZT组	3	0.178±0.007	0.123±0.010*	0.134±0.008
N.S	3	0.150±0.011	0.140±0.007	0.132±0.010

4 讨论

艾滋病又称获得性免疫缺陷综合症,由艾滋病毒所致,目前国际上采用哈特疗法(HAART),即几种优势互补西药联合应用,是公认的高效逆转录病毒治疗药物,但还是不能使病毒彻底杀灭,而且

副作用多,使患者生活质量下降。中医药在治疗病毒性疾病有很大优势,艾滋病属温病范畴,病因病机有毒邪肆虐,内侵气血,伤阴耗精,消耗元气,为之本虚标实,艾克冲剂是根据中医理论,辨证论治,治病求本,采用扶正祛邪,攻补兼施治疗原则确立的方剂,临床治疗有较好的效果。猴免疫缺陷病毒(SIV)诱发猴艾滋病(SAIDS)感染实验动物模型,是1989年经WHO专家推荐抗艾滋病药物治疗动物模型,它在病原学,临床、病理、免疫学及发病机理等方面与人感染艾滋病极为相似,国外已较多用于评价抗艾滋病药物的效果。中国医学科学院实验动物研究所采用SIVmac感染中国恒河猴获得成功并通过鉴定,因此,感染模型是成熟可靠的。在实验过程中,设西药AZT阳性对照及感染不治疗组进行对比观察,对探索中药治疗艾滋病效果及其机理有一定的意义。

艾克冲剂是由黄芪、甘草、金银花、黄芩、紫草、紫花地丁等中药组成,以扶正为主兼补虚为原则。临床观察能够抗病毒,减轻症状,控制病毒发展,减少机会性感染,提高病人生活质量。实验观察SIVmac感染猴模型出现慢性消耗性疾病特征,如消瘦,腹泻,全身淋巴结肿大及皮肤溃疡,口疮等机会性感染症状,经艾克冲剂治疗,可看到整体症状得以改善,机会性感染得到控制。实验室观察艾克冲剂能降低血浆及外周血单个核细胞病毒滴度,能控制艾滋病毒及逆转录酶活性(有另文报导)。CD₄⁺细胞是维护机体免疫功能的重要细胞,也是SIV破坏的主要细胞,因此CD₄⁺阳性细胞数降低对免疫缺陷进展有直接关系。它的数量,及功能变化是评价疾病发展和药物疗效的重要指标。正常人体CD₄⁺细胞与CD₈⁺细胞相对制约维持机体的免疫平衡,由于HIV/AIDS患者CD₄⁺细胞数量不断减少及功能受损至使CD₄⁺/CD₈⁺细胞比例倒置,CD₈⁺细胞较CD₄⁺细胞相对占优势,增强免疫抑制作用,造成免疫功能失调,如HIV进一步侵犯机体其它免疫细胞,即会导致机体免疫功能缺陷。由于病毒在体内持续不断的复制,破坏机体免疫细胞,致使SIV模型动物外周血CD₄⁺细胞数量明显降低,实验过程中可看出感染4周时CD₄⁺细胞以及CD₄⁺/CD₈⁺比值明显下降,CD₄⁺细胞百分比下降了10.7%,感染8周(用药6周)CD₄⁺细胞及CD₄⁺/CD₈⁺比值回升,并一直持续到实验结束。AZT组及不治疗组CD₄⁺细胞及CD₄⁺/CD₈⁺

比值均呈下降趋势,低于艾克组。CD₄⁺细胞被破坏,数量减少,淋巴细胞正常功能受到抑制,致使T淋巴细胞对有丝分裂原诱导反应能力降低,感染SIV动物B细胞对细菌脂多糖LPS反应能力也下降,但不及T细胞明显,呈迟缓下降趋势。在感染18周时(用药16周)艾克冲剂对SIV感染动物T、B淋巴细胞对有丝分裂原诱导反应均较感染4周时有明显提高,并使增殖反应稳定持久,这与CD₄⁺细胞上升结果一致,可看出艾克冲剂对病毒复制有一定抑制作用。即“祛邪”抗病毒作用,并能保护机体免疫功能,使免疫细胞得以修复,即“扶正”效果。由于T、B淋巴细胞得以恢复,可通过所产生的细胞因子及细胞因子网络调节细胞与细胞间功能,调动机体抗病毒作用。西药AZT(蛋白酶抑制剂)能够明显抑制病毒复制,近期效果明显,长期观察不如中药组稳定,这可能与西药主要针对病毒,中药是注重整体调节有关。在SIV感染过程,正邪相搏始终存在于疾病中,以多种中药益气补虚,扶助提高正气,调动机体防御系统,抑制抵抗艾滋病毒复制繁衍,是艾克冲剂扶正祛邪治疗核心。实验证实,有效的中药治疗对提高CD₄⁺细胞数及改善免疫功能调整免疫平衡有明显效果,这也是中药独特的优势,其不足是抑制病毒能力往往不如西药联合抗病毒(HAART)疗法,作用快和明显。因此,对艾滋病的治疗,既要重视近期疗效,也要关注远期效果,如何把中西医结合恰到好处针对艾滋病发病过程中的环节进行有效治疗,值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] 吕维柏. 艾滋病中西医防治学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 170-187.
- [2] 吕维柏. 艾滋病人的希望[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2000. 165-175.
- [3] 张福杰, 张晨阳. 抗逆转录病毒治疗的时机和用药方案[J]. 中国性病艾滋病防治, 2001, 7(4): 253-255.
- [4] 王爱雷. 艾滋病中西医防治学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 111-116.
- [5] 关崇芬. 运用猴艾滋病毒筛选中药的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 13(3): 162-163.
- [6] 周道洪, 沈元珊, 赵曼瑞, 等. 测定淋巴细胞转化和鼠的细胞间素2活性新方法MTT比色分析法[J]. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 39-43.
- [7] 吴尊友, 祁国明, 张家鹏. 艾滋病流行与控制[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 41.
- [8] 侯冬. 艾滋病的预防和治疗[J]. 中国性病艾滋病防治, 2000, 6(1): 52.