

中研 I、II号方对猴 SIV 感染模型免疫功能研究

徐淑玲, 关崇芬, 王 慧, 翁新愚 (中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

摘要: 目的: 中研 I、II号复方对恒河猴感染 SIVmac SIVmac251 实验观察 T、B 淋巴细胞增殖, 血清 β_2 -MG 含量, T 细胞亚群变化的实验研究。方法: 以猴免疫缺陷病毒 SIVmac 及 SIVmac251 感染猴, 检测猴 T、B 细胞增殖变化, 对感染猴血清 β_2 -MG 含量测定及对外周血 CD₄⁺ T 细胞百分数检测, 观察中研 I、II号对感染动物免疫调节作用和对免疫功能的影响。结果: 中研 I 号能提高感染动物 T、B 细胞增殖。中研 II号提高模型动物 CD₄⁺ T 细胞百分比, 并降低动物血清 β_2 -MG 含量。结论: 中研 I、II号复方均能提高感染动物免疫功能, 并对动物免疫细胞有保护作用。

关键词: 猴免疫缺陷病毒; 中研 I、II号; β_2 -MG; CD₄⁺ T 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)06-0032-03

Experimental Study of Immune Function on Monkey of SIV Infection with Zhong Yan- I and Zhong Yan- II

XU Shu-ling, GUAN Chongfen, WANG Hui, WENG Xin-yu

(Institute of Basic Theory, CHINA Academy of TCM, Beijing 100700)

Abstract: In order to research the effect of ZY- I and ZY- II on simian immunodeficiency virus (SIV mac and SIV mac251), we used SAIDS model to observe the influence of T and B cell proliferation induced by mitogens before and after treatment with ZY- I. Using monoclonal antibody to label on CD₄⁺ T cells in PBMC with indirect immunofluorescence, the percentage was analyzed by flow cytometry. Serum β_2 -microglobulin (β_2 MG) was measured by ELISA in ZY- II group. Results indicate that ZY- I enhanced the proliferation of T and B cells induced by mitogen, CD₄⁺ T cells were increased in PBMC. and serum β_2 MG level was decreased by ZY- II.

Key words: Simian immunodeficiency virus; ZY- I、ZY- II; SIV mac; β_2 MG; monkey model

目前艾滋病是严重威胁人类健康的一大杀手, 全球寻求各种克服艾滋病的手段和方法, 至今尚未发现最有效的治疗药物及可靠的预防疫苗。中国传统医学在与疾病斗争过程积累丰富经验, 在治疗各种病毒性疾病方面有很多好方法, 对于提高机体免疫功能也有许多有效的方药。猴免疫缺陷病毒 (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) 感染造成猴艾滋病 (SAIDS) 模型是目前公认的研究治疗艾滋病实验动物模型, 利用猴艾滋病模型观察中研 I、II号复方对感染动物免疫功能影响及对机体“扶正祛邪”的调理作用, 是观察中医药治疗研究艾滋病的好方法, 也是发现治疗艾滋病有效药物的手段。

1 材料和方法

1.1 病毒 猴免疫缺陷病毒株 SIVmac, SIVmac251, 美国艾滋病研究中心 MarX 博士惠赠。

1.2 动物及模型的建立 恒河猴 (*Rhesus Macaques*)

中国医学科学院实验动物研究所提供, 无任何病毒感染健康动物。感染剂量以每猴 SIVmac 为 10^{-2} /毫升, 静脉接种 (约 10^5 MID₅₀)。SIVmac251 以每猴 3MID/ml (100% minimal infection dose) 静脉接种感染动物。

1.3 实验用药 中研 I 号复方由中国中医研究院基础所药化室提供。

中研 II号复方由北京长城制药厂提供。

AZT (叠氮胸苷) 购自 Burroughs wellcome Co. 美国。

1.4 实验分组及给药方式 SIVmac 感染后以中研 I 号治疗, 感染后 2 周给药, 每只每日给药 12ml (相当于生药 6.4g/kg), AZT 组每只每日给药 200mg, 溶 12ml 水中, 对照组生理盐水等量。每组每日给药一次, 插胃管饲入, 给药时间为二个月一疗程, 共两个疗程。

SIVmac251 感染后以中研 II号治疗。感染后立

即给药, 每只每日 10ml(相当于生药 2.9 克/公斤), AZT 组 100mg/粒溶于 10ml 蒸馏水中经胃管灌饲每日一次。对照组灌服同等剂量生理盐水, 连续给药二个月, 停药后继续观察一个月。

1.5 观察指标与操作方法

1.5.1 中研 I 号对 T、B 淋巴细胞增殖影响 ① 无菌取猴静脉血 2ml 抗凝, 并分离出单个核细胞, 调整细胞数 1×10^5 个细胞/ml。②将细胞悬液种植在 96 孔培养板内, 200 μ l/孔, 分别加入不同有丝分裂原诱导淋巴细胞分化, ConA5 μ g/ml, LPS30 μ g/ml, 用 1640 培养基培养 48h 后加入 MTT5mg/ml, 继续培养 4h。③加入酸化异丙醇 0.04mol/L, 利用 TM^Rmc 型酶标仪检测, 波长 570~ 630nm。

1.5.2 中研 II 号对猴血清 β_2 -MG 测定 ELISA 法免疫酶联试剂盒, 由 Immunotech Co. 提供。按说明书要求操作, 并绘制标准曲线。猴血清按不同治疗时间采血, 常规分离出血清, -20℃保存。实验标本采用法国全自动酶标仪测定, 并按标准曲线测定相应蛋白含量。

1.5.3 猴外周血 CD₄⁺T 细胞百分比测定 实验采用单克隆抗体, 荧光标记抗体均由邦定公司提供。常规分离猴外周血单个核细胞, 进行间接荧光法标记 CD₄⁺T 细胞, 2% 多聚甲醛固定, 采用流式细胞仪 FACS420 测定。

2 结果与分析

2.1 整体情况 感染 SIVmac、SIVmac251 动物进行病毒分离, 血浆病毒呈现阳性, 证实模型动物全部感染。实验动物明显消瘦, 伴有腹泻, 皮肤感染, 口腔溃疡, 四肢躯干部位有出血斑, 腋下、腹股沟淋巴结肿大。动物机体抵抗力呈明显下降趋势。

2.2 中研 I 号方治疗组动物在 SIVmac 感染 4 周时, T 细胞对 ConA 诱导增殖分化能力下降, T 细胞功能受损, 与感染前相比有明显差异 $P < 0.05$ 。经中研 I 号治疗 16 周, T 细胞增殖能力回升, 与感染 4 周相比, $P < 0.05$, 有明显差异。可看出中研 I 号能够提高 T 细胞增殖分化能力。AZT 组动物感染后 T 细

胞增殖明显低于感染前 $P < 0.05$, 经 AZT 治疗后出现明显回升 $P < 0.05$ 。

表 1 中研 I 号对 SAIDS 模型 T 细胞增殖分化影响($\bar{x} \pm s$, OD 值)

组别	动物数	感染前	感染 4 周	治疗 16 周
中研 I 号	6	0.131 \pm 0.009	0.107 \pm 0.015*	0.147 \pm 0.013#
AZT	3	0.190 \pm 0.021	0.103 \pm 0.012*	0.140 \pm 0.012#
N·S	3	0.155 \pm 0.007	0.139 \pm 0.010	0.141 \pm 0.011

注: 感染前与感染 4 周相比* $P < 0.05$; 治疗 16 周与感染 4 周相比# $P < 0.05$ (下同)。

表 2 中研 I 号对 SAIDS 模型 B 细胞增殖分化影响($\bar{x} \pm s$, OD 值)

组别	动物数	感染前	感染 4 周	治疗 16 周
中研 I 号	6	0.129 \pm 0.013	0.108 \pm 0.011*	0.150 \pm 0.012#
AZT	3	0.178 \pm 0.007	0.123 \pm 0.010*	0.134 \pm 0.008
N·S	3	0.150 \pm 0.011	0.140 \pm 0.007	0.132 \pm 0.010

2.3 中研 I 号对 B 淋巴细胞影响, 感染 SIVmac 后 B 细胞增殖受损 $P < 0.05$, 明显低于感染前; 经 16 周治疗有明显回升 $P < 0.05$ 。AZT 组动物感染 4 周 B 细胞同样下降, 低于感染前 $P < 0.05$, 经治疗 16 周后 B 细胞有上升趋势, 未有统计学差异。

2.4 血清 β_2 -MG 含量在动物感染 2 周各组血清 β_2 -MG 含量上升, 可看出病毒对免疫细胞有不同程度损害, 中研 II 号组用药 4 周时 β_2 -MG 开始下降, 8 周时趋于稳定, 停药后 4 周 β_2 -MG 维持感染前水平。从总的趋势中研 II 号组随用药时间动物血清 β_2 -MG 含量不断下降。AZT 组在用药 8 周时血清 β_2 -MG 下降, 停药 4 周 β_2 -MG 未见上升也恢复至感染前水平。中研 II 号 AZT 组治疗期间有下降趋势, 未见统计学意义。

2.5 CD₄⁺T 细胞感染前三组百分数接近(29.0~31.8%), 感染 SIVmac251 两周后, 各组 CD₄⁺T 细胞明显下降, 中研 II 号组用药 4 周 CD₄⁺T 细胞上升, 用药 8 周已接近感染前, 停药后仍维持稳定状态。可看出中研 II 号作用持续平稳。AZT 组用药 4~8 周 CD₄⁺T 细胞未见回升, 停药后观察 CD₄⁺T 细胞上升, 但不及中研 II 号明显。

表 3 中研 II 号对模型动物血清 β_2 -MG 含量变化(mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	感染前	感染后用药			
			2W	4W	8W	12W
中研 II 号	4	0.0427 \pm 0.010	0.0850 \pm 0.025	0.0623 \pm 0.007	0.0780 \pm 0.021	0.0350 \pm 0.009
AZT	4	0.0300 \pm 0.012	0.0541 \pm 0.002	0.0575 \pm 0.023	0.0425 \pm 0.011	0.0300 \pm 0.002
N·S	3	0.0573 \pm 0.017	0.0727 \pm 0.010	0.0470 \pm 0.004	0.0467 \pm 0.007	0.0355 \pm 0.008

表4 中研II号对模型动物CD4⁺T细胞数变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	感染前	感染后用药			
			2W	4W	8W	12W
中研II号	4	31.80 ± 5.44	18.30 ± 1.30	27.40 ± 4.12	30.80 ± 1.30	28.10 ± 2.95
AZI	4	29.00 ± 5.30	19.95 ± 12.05	19.00 ± 0.00	16.85 ± 6.75	25.50 ± 6.15
N·S	3	29.80 ± 3.46	18.67 ± 4.38	19.20 ± 7.43	23.80 ± 16.07	24.65 ± 4.95

3 讨论

中医研究院专家在总结中药治疗其他病毒感染性疾病的基础上,根据辨证论治,组定方剂中研I、II号复方,并在非洲坦桑尼亚临床现场治疗当地艾滋病人,证实是确有疗效的中药复方,本文再进行动物实验观察,进一步研究其作用机理。中研I号主要以黄芪、甘草、金银花、黄芩、紫草、紫花地丁为主的扶正祛邪方,能够改善病人的免疫功能及临床综合情况,总有效率51.92%。中研I号对猴SIVmac感染治疗的观察,从整体可见动物全身症状有所改善,动物精神状态明显活跃,病毒滴度下降,CD4⁺T细胞绝对数回升,T细胞亚群百分数提高,CD4/CD8比值接近正常(有另文报导)。T淋巴细胞对有丝分裂原刺激增殖反应由感染时下降,当治疗16周时上升接近感染前水平。可看出中研I号方对病毒侵害的T细胞有保护及修复作用,并且中研I号方使动物T细胞增殖趋势较西药AZI平稳,实验观察AZI组治疗早期使T细胞增殖明显,随治疗时间的延长,T细胞的增殖出现波动,不及中研I号持续稳定。中研I号对B细胞的影响也很明显,治疗16周较感染4周时有明显差异,AZI组B淋巴细胞增殖情况不如中研I号明显,可见中研I号对SIVmac感染模型T、B细胞增殖效果较AZI明显。中研II号,由当归、黄芪、麦冬、甘草等中药组成,以气血双补、扶正固本为首要,同时协调阴阳,驱邪抗毒,临床观察具有抑制HIV和增强免疫功能作用。从实验结果可见中研II号复方使动物CD4⁺T细胞得以明显提高,并在治疗8周后恢复感染前水平,停药后仍能维持稳定。β₂-MG血清含量变化与病情进展与治疗效果关系密切,当病毒侵入淋巴细胞内进行复制,严重破坏淋巴细胞功能,破坏的细胞表面β₂-MG释放入体液,使血清β₂-MG含量增高,中研II号治疗4周后血清β₂-MG下降明显,随治疗时间延长血清β₂-MG下降至感染前水平。AZI组也使血清β₂-MG下降,但较中研II号缓慢。从其他的免疫指标也可看出,在病毒感染机体后,中药有一种潜在的保护免疫细胞的功能,中研II号具有促进免疫细胞趋于平衡稳定的作用,在用药治疗过程中使机体逐渐恢复,

即停药后,机体仍能处于平稳状态。由于实验条件所限,未能观察更长的时间。从中研I、II号对猴SIV感染治疗,可看出中药复方能够提高机体免疫功能,抑制病毒复制作用。从坦桑尼亚临床现场的治疗观察,病人症状明显改善,CD4⁺细胞数上升,病毒载量降低,可见中药治疗艾滋病是有一定的效果,值得深入研究探讨。中医中药在调节整体、扶助正气、提高机体抗病毒能力达到祛邪目的。目前专家分析,我国艾滋病病毒感染者实际人数已超过50万人,并以每年30%的速度增长。面对这种严峻形势,一要预防,二要发挥祖国医学防病治病作用,筛选抑制艾滋病毒有效的中药复方,有效的控制和治疗艾滋病已是当务之急。

参考文献:

- [1] 吕维柏. 中国防治艾滋病的战略意义[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, (8): 41.
- [2] 吕维柏. 应该重视艾滋病的治疗[M]. 中国性病艾滋病防治, 1995, (1): 30.
- [3] 关崇芬. 艾滋病与中医研究途径[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, (8): 493.
- [4] 史久华, 章谷生, 向建之译. β₂-微球蛋白[M]. 艾滋病临床医师指南, 97-98.
- [5] 周道洪, 沈元珊, 赵曼瑞. 测定淋巴细胞转化和鼠的细胞间素之活性新方法 MIT 比色法[J]. 中国免疫学杂志, 1986, 2(1): 39-43.
- [6] 王允惠, 王增林, 柳立军, 等. 血清β₂-微球蛋白在肺癌诊断中的应用价值[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1997, 9(3): 36.
- [7] 关文明, 周健, 刘军, 等. 脑胶质瘤患者外周血T淋巴细胞亚群及β₂-微球蛋白的初步研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14(3): 170.
- [8] 雨谷皓次, 太田善介. T细胞B细胞测定[J]. 日本临床, 1985年增刊下卷326.
- [9] Smith, K, A. T-cell growth factor[J]. Immunol, Rew 1980, 51: 337.
- [10] Evrin PE. β₂-MG Production is Virto by human hematopoietic mesenchymal and epithelial cell[J]. Immunol, 1974, 8: 112.