

中药复方提取物 HNA-1 对 SIV 慢性感染恒河猴 胸腺输出及胸腺细胞发育的影响

王小妹¹, 陈 颂², 陈滢宇², 胡 燕¹, 张晓宇³, 宁兴旺¹, 朱惠斌*

(1.湖南中医药大学第一附属医院医学检验中心,湖南 长沙 410007;2.广州中医药大学热带医学研究所,广东 广州 510405;3.湖南省第二人民医院手足外科,湖南 长沙 410007)

〔摘要〕 **目的** 探讨中药复方提取物湘 A-1 号方(HNA-1, 湖南省艾滋病防治小组推荐免费使用的两个中药复方之一的提取物)治疗 HIV-1 感染及艾滋病(Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)的疗效机制。**方法** 用 8 只已感染猴免疫缺陷病毒 SIVmac239 16~21 个月的中国恒河猴, 治疗组采用 2 个月的 HNA-1 治疗;对照组给予等体积生理盐水灌胃。在预设时间点采集外周血提取 DNA, 采用定量 PCR 检测 T 细胞受体重排删除环(T cell receptor excision circles, TRECs)来评价胸腺输出功能;并用酶消化法分离胸腺细胞, 利用流式细胞术检测胸腺内 CD34⁺ 前体细胞、CD4⁺T 细胞发育各阶段的比例改变。**结果** 与模型对照组比较, HNA-1 治疗组胸腺细胞输出明显增加($P<0.05$);且胸腺内 CD34⁺Lin⁻细胞比例明显增加($P<0.05$), 胸腺双阳性 T 细胞(Double positive, DP) II 阶段比例减少, 而 DP III 和 DP IV 阶段比例均增加。**结论** HNA-1 对艾滋病的疗效可能与其能显著增加胸腺输出有关;其作用机制可能涉及增加胸腺内前体细胞数量、以及促进胸腺细胞从 DP II 阶段发育至 DP III 等。

〔关键词〕 湘 A-1 号方; CD4⁺T 细胞; 胸腺输出; 胸腺细胞发育

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.002

Effects of HNA-1 Extracted from a Chinese Medicine Compound on the Thymic Output and Thymocyte Development in Rhesus Macaques with SIV Chronic Infection

WANG Xiaomei¹, CHEN Song², CHEN Yingyu², HU Yan¹, ZHANG Xiaoyu³, NING Xingwang¹, ZHU Huibin*

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Research Institute of Tropical Medicine of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510403, China; 3. Department of Surgery, the second People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the effect of Chinese herbal extract HNA-1 on HIV-1 infection and AIDS. **Methods** Eight Chinese rhesus macaques had been infected by SIVmac239 for 16 to 21 months were enrolled into this study, the treatment group received HNA-1, control group received normal saline for consecutively 2 months, respectively. In predesigned time-points, peripheral blood were drawn for DNA extraction, and thereby thymic output was evaluated by T-cell receptor excision circle (TRECs) quantification. The thymocyte cells were separated by enzyme digestion, the proportions of CD34⁺ cells and thymocytes in various development stages were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with control group, the thymic output function obviously was elevated in HNA-1 group ($P<0.05$). And the proportion of CD34⁺Lin-

〔收稿日期〕2015-11-03

〔基金项目〕国家自然科学基金资助项目(81274169);湖南省高等学校科学研究重点项目(12A102);湖南省教育厅项目(13C688);湖南省高校科技创新团队“感染性疾病中医药防治研究”资助项目(NO:15)。

〔作者简介〕王小妹,女,检验师,主要从事中药新药的研究与开发。

〔通讯作者〕*朱惠斌,女,教授,主任技师, E-mail: 1587370309@qq.com。

cells was significantly increased ($P < 0.05$). More interestingly, the thymocytes in double positive (DP) stage II decreased dramatically, while thymocytes in stage DP III and stage DP IV increased. **Conclusion** Enhanced thymic output function may contribute to the effect of HNA-1 on AIDS treatment with underlying mechanisms involving increased thymic progenitor cells and promoted development of thymocytes from stage DP II to stage DP III.

[**Keywords**] HNA-1; CD4⁺T cells; thymic output; thymocyte development

艾滋病毒和宿主免疫系统的相互作用是艾滋病发病的关键因素。CD4⁺T 是机体 T 细胞的重要功能群体,在机体的适应性免疫应答中发挥了关键作用,是 HIV 攻击的主要靶细胞^[1-2]。CD4⁺T 淋巴细胞数量的进行性减少和 CD4⁺T 淋巴细胞功能的受损是免疫系统损害的重要表现,是 HIV 感染进展的标志^[2]。

湘 A-1 号方(HNA-1, 湖南省艾滋病防治小组推荐免费使用的两个中药复方之一的提取物)是治疗艾滋病的有效方剂。本课题组在前期研究中发现 HNA-1 具有促进免疫重建的疗效,且研究中未发现毒、副作用^[3-4];能改善模型小鼠的免疫缺陷、提高其 CD4⁺T 细胞数量^[5];能明显提高猴免疫缺陷病毒 SIV-mac239 感染猴模型的 CD4⁺T 细胞数(尤其是初始型 CD4⁺T 细胞)、改善淋巴结组织结构的病理退变,对猴免疫缺陷病毒感染导致的免疫系统破坏具有一定的保护作用,同时有降低动物死亡率的趋势^[6]。本研究进一步利用流式细胞术和 T 细胞受体重排删除环(T cell receptor excision circles, TRECs)检测的方法,探讨 HNA-1 治疗机制与初始型 CD4⁺T 细胞、胸腺输出及胸腺细胞发育的关系。

1 材料

1.1 动物、药物

1.1.1 动物 恒河猴 8 头,全部为雄性,体质量 4.75~7.2 Kg,5~7 岁,外观健康。经血清学检测猴免疫缺陷病毒(SIV)、猴逆转录 D 型病毒(SRV)、猴疱疹病毒(Herpes B virus)和猴 T 淋巴细胞 I 型病毒(STLV-I)抗体阴性,结核菌素阴性,痢疾菌阴性。动物由广东康达实验动物公司繁育并提供动物实验室,动物许可证证号为 SCKX 粤 2009-0025,并参照美国《实验动物饲养和使用指南》的相应规范进行管理^[7]。实验获湖南中医药大学伦理委员会审批。

1.1.2 药物 HNA-1 组由白蔻仁 6 g,茵陈 15 g,石菖蒲 10 g,黄芩 10 g,连翘 10 g,白花蛇舌草 15 g,藿香 10 g,虎杖 15 g,滑石 15 g,川木通 6 g,薄荷 6 g,薏苡仁 30 g 组成,由湖南中医药大学药

学院制剂教研室制备,薄荷提取挥发油用 β 环糊精包裹,其余药物与提取后的薄荷水煎、醇沉,制备干膏粉。根据猴/人换算系数 3.08 估算临床等效剂量^[8],得出干膏粉与 β 环糊精包含物的等效剂量分别为 0.74 g/kg 和 5.74 mg/kg。配成水溶液混悬剂,使得每毫升混悬液含干膏粉 0.185 g、 β 环糊精包含物 1.44 mg(即 5 kg 猴灌胃 20 mL)。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 DNA 提取试剂盒(天跟有限公司),CD34-PE、CD4-FITC, Dispase II (Roche, 终浓度 1 mg/mL), Collagenase IV (Invitrogen, 终浓度 1 mg/mL) 和 DNase I (Roche, 终浓度 0.5 mg/mL), SIVmac239 毒种由美国 P.A. Marx 教授惠赠。

1.2.2 仪器 流式仪(Beckman Coulter); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas); Premix Ex Taq Version 2.0、RNAisoTM Plus、SYBR Premix-ExTaq (TaKaRa); Real-time PCR 探针(MBI 公司); C1 000 TM Thermal cycler 荧光定量 PCR 仪。

2 方法

2.1 动物分组感染

SIVmac239 毒种 5MID100(5 个 100%猴感染剂量),1 mL 静脉注射。经健康中国恒河猴外周血单核细胞体外扩增 2 代的病毒液,用 CEMx174 细胞滴定,病毒滴定为 10^5 TCID₅₀/mm³。感染时病毒液用双蒸水 1:50 稀释,静脉注入 1 mL(即 200TCID₅₀)。本实验使用 8 头恒河猴感染 SIV,为期 16~21 个月。8 头恒河猴均为本课题其他实验的模型对照组,感染后未进行过任何药物干预,其中 541 为直肠感染,其余均使用静脉感染。直肠感染方法为:动物禁食 40 h,经氯胺酮麻醉后,取膝胸卧位,清洁直肠后,以 2.5 mm 儿科胃管从肛门插入约 8 cm,注入 1 mL 含 10^4 TCID₅₀ SIVmac239 的病毒液;并保持该体位 20 min。静脉感染方法为经头静脉注射 1 mL 含 200 TCID₅₀ 的病毒液感染。

2.2 分组治疗

根据 CD4 数量对 8 头恒河猴分层后,随机分为对照组和治疗组,每组 4 只。治疗组给予 HNA-1 灌胃治疗,每日 1 次;对照组给予等体积生理盐水灌胃。两组均给药 2 个月。见表 1。

表 1 动物感染情况及分组表

| 组别 | 编号 | 年龄(岁) | 性别 | 感染后(月) | CD4 数(个/ μ L) | 感染途径 |
|-----|-----|-------|----|--------|-------------------|------|
| 对照组 | 507 | 5 | 雄 | 16 | 402 | 静脉 |
| | 509 | 5 | 雄 | 16 | 693 | 静脉 |
| | 514 | 5 | 雄 | 16 | 1 151 | 静脉 |
| | 541 | 7 | 雄 | 21 | 121 | 直肠* |
| 治疗组 | 505 | 5 | 雄 | 16 | 903 | 静脉 |
| | 506 | 5 | 雄 | 16 | 251 | 静脉 |
| | 510 | 5 | 雄 | 16 | 418 | 静脉 |
| | 515 | 6 | 雄 | 16 | 570 | 静脉 |

注:猴是大动物,价格昂贵且受配额限制,本批实验采用的是其他实验的对照组,感染后未经过任何干预;所以会有不同感染的时间、不同感染途径,类似于临床试验的不同病人。我们课题组对使用 SIV-mac239 病毒经不同途径感染中国恒河猴的方法,以及感染后的病毒、免疫学各项参数的改变,进行过详细的观察研究,未发现不同的感染途径,包括直肠感染和静脉感染,对于模型的各项参数有影响详情请参考我们发表的相关论文^[9]。

2.3 DNA 的提取

在不同时间点收集对照组和治疗组恒河猴外周血单个核细胞,提取其 DNA。DNA 提取按照天跟试剂说明书操作。

2.4 初始型 CD4⁺T 细胞的获得

处死对照组和 HNA-1 组的恒河猴,取出胸腺。胸腺细胞的分离采用酶消化法,所用酶为 Dispase II、Collagenase IV、和 DNase I,37 °C 消化 50 min。离心洗去消化液,提取纯化的初始型 CD4⁺T 细胞。使用 Real-time PCR 进行检测,25 μ L 反应体系包括:10 μ L 细胞裂解产物(2.5×10^4),0.6 μ mol/L primers:(正向引物:5'-ATCACTCTGTGTCTAGCT CCCAGC-3';反向引物:5'-ACTTGCTGAGTTTC ATGATGATT CCTCTA-3')0.2 μ mol/L Taqman 探针;FAM-TGCCGG CTC CAT CCT CTC CTG T-TAMRA 和 ABI Master Mix。循环条件为:50 °C,2 min;95 °C,10 min;40 cycles of 95 °C,15 s 和 60 °C,1 min,40 个循环。同时加入对 ccr5 基因检测作为细胞数量均一化的内参,扩增引物为:正向引物:5'-TTC TCT GGA ATC TTC TTC ATC C-3;反向引物:5'-CAA AGG TGA CTG TCC TGG CTT T-3;Taq-

man 探针为:VIC-AAC ACA GCA TGG ACG ATA GCC AGG TAC C-TAMRA。

2.5 指标检测

2.5.1 TREC_s 的检测 参照 Bains I 的方法^[10],使用 T 细胞受体重排删除环 (T cell receptor excision circles, TREC_s)检测的方法,计算胸腺输出细胞在初始 CD4⁺T 细胞中占的比例。

2.5.2 Ki-67 的检测 取 10^6-10^7 待测单个胸腺细胞悬液,CD4 分子染色洗涤后,每个流式管加入固定缓冲液 100 μ L,冰上避光孵育 30 min,PBS 液洗涤 1 遍,然后加入穿膜缓冲液 300 μ L,冰上避光孵育 30 min,PBS 液洗涤 1 遍,最后根据每管检测目的加入 Ki-67-APC1 μ L,轻轻混匀,置于冰上避光孵育 30 min,然后用 PBS 液洗涤 2 遍,1 200 r/min 离心 8 min,弃去上清,用手指弹匀细胞,保证流式管剩余 150~200 μ L 单细胞悬液,上流式细胞仪检测。

2.5.3 CD34⁺前体细胞的检测 分离的胸腺细胞以磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后,1 200 r/min 10 min 离心,弃掉上清液,加入适量鼠抗人 CD14-FITC、CD3-FITC、CD20-FITC、CD34-PE 荧光标记抗体 5 μ L,4 °C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 遍,4%多聚甲醛固定、洗去固定液并 PBS 重悬后,FACS 检测,计算 CD34⁺Lin⁻细胞的比例。

2.5.4 胸腺细胞发育阶段的检测 根据已有的文献^[11],使用鼠抗人 CD45RA (CD45 的一种亚型),CD3 (SP34.2) 将胸腺细胞 (及发育成熟的 T 细胞) 分为 CD45RACD3^{dim}(II 期)、CD45RACD3⁺(III 期)和 CD45RA⁺CD3⁺(IV 期)。再进一步用 CD69,CD27 分群进行检测分析。流式仪检测并统计分析胸腺细胞不同发育阶段的比例。

2.6 统计学分析

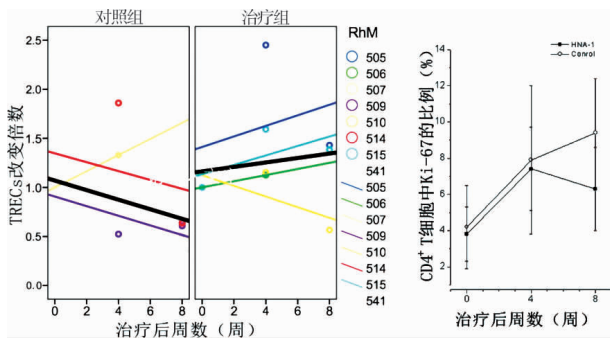
采用 SPSS 20.0 软件包进行分析。计量资料以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示,多个时点的比较采用重复测量;CD4⁺T 细胞的组间比较采用 Mann-Whitney 分析。部分数据进行线性拟合以观察其变化趋势。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TREC_s 的比例改变

TREC_s 统计分析结果显示,对照组经线性拟合后 TREC_s 改变倍数明显呈下降趋势,其中 3 只动物

降至接近治疗前的 1/2。HNA-1 治疗组在经过 HNA-1 治疗后, TRECs 改变倍数总体呈明显的上升趋势。经重复测量分析, 分析 T 值 14.423, $P < 0.05$ 显示两组间差异有统计学意义。同时, 由于 TRECs 的比例会随着细胞分裂被逐渐稀释; 因此增殖细胞减少可导致 TRECs 比例相对升高。而本研究同时显示 CD4⁺T 细胞表达 Ki67⁺ 的比例并未增加, 提示 HNA-1 治疗组 TRECs 比例的增高为胸腺细胞输出显著增加。如图 1 所示。

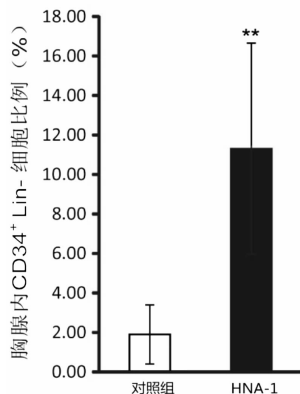


注: 与对照组相比 * $P < 0.05$ 。

图 1 HNA-1 治疗前、后 TRECs(左)及 Ki67(右)的改变

3.2 胸腺 CD34⁺Lin⁻细胞的比例

模型对照组和 HNA-1 组恒河猴胸腺内的细胞经流式检测, 分析比较发现, HNA-1 组 CD34⁺Lin⁻ 细胞明显增加, 提示 SIV 慢性感染后经 HNA-1 治疗, 胸腺的前体细胞比例明显增加, 分析 T 值 10.699, $P < 0.01$, 有统计学意义。见图 2。



注: 与对照组相比 ** $P < 0.01$ 。

图 2 HNA-1 治疗后胸腺 CD34⁺Lin⁻细胞的比较柱形图

3.3 不同发育阶段胸腺细胞的比例的改变

与模型对照组比较, HNA-1 组双阳性 T 细胞 (Double positive, DP) II 阶段的胸腺细胞比例减少,

而 DP III 和 DP IV 阶段的细胞比例均增加。这些研究结果提示, HNA-1 治疗后可能促进了胸腺细胞从 DP II 阶段发育至 DP III 和 DP IV 阶段。见图 3。

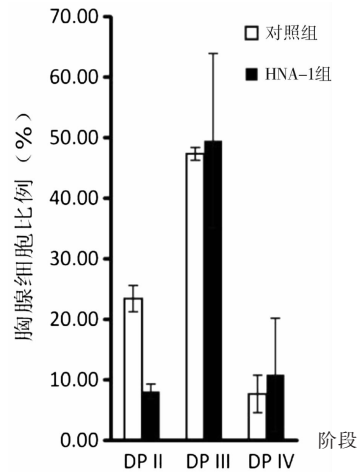


图 3 HNA-1 治疗后胸腺幼稚淋巴细胞不同发育阶段改变的柱形图

4 讨论

在前期研究中, 发现中药复方提取物 HNA-1 能有效增加外周血初始型 CD4⁺T 细胞的比例; 但 CD4⁺T 细胞来源于骨髓还是胸腺并不清楚。在本研究中, 首先使用 TRECs 检测的方法对胸腺输出功能进行了评价。TRECs 在 TCR 重排的过程中产生, 并在外周组织中的 T 细胞中稳定存在; 它不参与细胞染色体 DNA 的复制, 并随着细胞分裂被逐代稀释。本研究发现经 HNA-1 治疗 SIV 感染恒河猴后, 外周血 TRECs 的比例明显增加, 且随着 HNA-1 治疗的周数增加而更为显著; 同时细胞增殖并未明显降低。这提示 HNA-1 能提升胸腺输出功能。

在 AIDS 发病和免疫重建的过程中, 胸腺输出初始型 CD4⁺T 细胞起到了重要作用。在感染的前 3 个月左右^[12-13], 以及感染后期^[14], 胸腺输出初始型 CD4⁺T 细胞对于维持外周 CD4⁺T 细胞库的稳态起着主要作用。在高效抗逆转录病毒治疗法 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 治疗晚期感染的患者, 即使病毒载量被控制在低于检测水平, 也常常由于初始型 CD4⁺T 细胞无法恢复而免疫重建失败。因此, 我们发现 HNA-1 促进胸腺输出、提高外周血初始型 CD4⁺T 细胞比例, 可能有重要的临床价值。

然而, 如果 HNA-1 仅仅只是将未发育成熟的

初始型 CD4⁺T 细胞动员至外周,有可能一时取得疗效,而无法取得持续的疗效。因此,本研究进一步对胸腺细胞发育的情况进行了分析。我们发现,HNA-1 治疗后胸腺 CD34⁺Lin⁻细胞的比例显著增加,这表明 HNA-1 治疗能提高骨髓的前体细胞进入胸腺。此外,我们还进一步发现,HNA-1 治疗促进了胸腺细胞从 DP II 阶段发育至 DP III 和 DP IV 阶段。这就表明,HNA-1 不仅仅只是将胸腺细胞动员至外周,而是提高前体细胞比例、促进胸腺细胞分化,是有可能实现持久的疗效的。然而,这还需要更进一步的试验结果证明。

总之,本研究发现,HNA-1 治疗 SIV 感染的恒河猴后,通过提高胸腺输出初始型 CD4⁺T 细胞,从而起到维持 CD4⁺T 细胞数量、促进免疫重建的作用;且其机制与增高胸腺 CD34⁺细胞的比例、以及促进 CD4⁺T 细胞发育密切相关。

参考文献:

- [1] Mclean AR, Michie CA. In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1995,92(9):3 707-3 711.
- [2] 李太生. 艾滋病的免疫发病机理和免疫重建[J]. 中华医学杂志, 2001,81(5):310-313.
- [3] 卢芳国,朱惠斌,黄顺玲,等. 湘 A1 号、2 号对免疫缺陷模型小鼠 T 细胞亚群的影响[J]. 医学研究生学报,2009,22(8):804-806.
- [4] 朱惠斌,卢芳国,葛金文,等. 湘艾 1 号、2 号对免疫缺陷动物免疫保护作用的研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(4):804-807.
- [5] 朱惠斌,符春林,陈 頌,等. 中药复方提取物 HNA-1 治疗猴免疫缺陷病毒感染实验研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(4):91-94.
- [6] 朱惠斌,陈 頌,卢芳国,等. HNA-1 对 SIV 感染猴外周初始型 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国医药,2011,6(3): 618-619.
- [7] Washington DC. National Research Council, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition) [M]. National Academy of Sciences, 2011:35.
- [8] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学. 2004,9(9):1 069-1 072.
- [9] Chen S, Lai C, Wu X, et al. Variability of bio-clinical parameters in Chinese-origin Rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus: a nonhuman primate AIDS model [J]. PLoS One,2011, 6: e23177.
- [10] Bains I, Thiébaud R, Yates AJ, et al. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output[J]. J Immunol, 2009,183(7):4 329-4 336.
- [11] Gurney KB, Uittenbogaart CH. Human Immunodeficiency Virus Persistence and Production in T-Cell Development [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(11):1 237-1 245.
- [12] Sempowski GD, Hicks CB, Eron JJ, et al. Naïve T cells are maintained in the periphery during the first 3 months of acute HIV -1 infection: implications for analysis of thymus function[J]. J Clin Immunol, 2005,25(5):462-472.
- [13] Borghans JA, Hazenberg MD, Miedema F. Limited role for the thymus in SIV pathogenesis[J]. Eur J Immunol, 2005,35(1):42-45.
- [14] Ribeiro RM, de Boer RJ. The contribution of the thymus to the recovery of peripheral naive T-cell numbers during antiretroviral treatment for HIV infection [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2008,49(1):1-8.

(本文编辑 杨 瑛)