



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02825873.8

[43] 公开日 2005 年 4 月 20 日

[11] 公开号 CN 1608204A

[22] 申请日 2002. 12. 20 [21] 申请号 02825873. 8
[30] 优先权
 [32] 2001. 12. 21 [33] US [31] 60/342,432
[86] 国际申请 PCT/US2002/040797 2002. 12. 20
[87] 国际公布 WO2003/060467 英 2003. 7. 24
[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 21
[71] 申请人 东弗吉尼亚医学院
 地址 美国弗吉尼亚州
[72] 发明人 邓玉萍

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
 代理人 陈文平

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 5 页

[54] 发明名称 分析药物效果的方法

[57] 摘要

本发明提供一种分析药物效果的方法，更具体地讲提供一种分析药物对人免疫系统效果的离体方法。

1. 一种检测药物对免疫应答的效果的方法，包括：
使药物与免疫应答细胞接触，形成药物 - 细胞混合物；和
5 用探测物检测药物 - 细胞混合物中的细胞活化。
2. 权利要求 1 的方法，其中用于检测药物 - 细胞混合物中细胞活化的探测物包括表型标志探测物、化学标志探测物、活化标志探测物或其组合。
3. 权利要求 1 的方法，其中用于检测抗原 - 细胞混合物中细胞活化的探测物包括细胞表面抗原的抗体、分泌型抗原的抗体、细胞内抗原的抗体或其组合。
10
4. 一种检测细胞对药物反应的方法，包括：
使药物与免疫应答细胞接触，形成药物 - 细胞混合物；和
检测药物 - 细胞混合物中至少两种表型标志的存在。
- 15 5. 权利要求 4 的方法，其中表型标志包括 CD4、CD8、CD56、CD19、CD14、CD3、CD16 或其组合。
6. 权利要求 4 的方法，进一步包括使药物 - 细胞混合物与化学标志的探测物接触，并检测药物 - 细胞混合物中化学标志的存在。
7. 一种检测细胞应答的方法，包括：
20 在植物材料的存在下温育外周血单个核细胞；和
使温育的外周血单个核细胞与一组探测物接触形成探测物 - 细胞复合体。
8. 权利要求 7 的方法，进一步包括检测探测物 - 细胞复合体。
9. 权利要求 7 的方法，进一步包括使温育的外周血单个核细胞与化学标志的探测物、活化标志的探测物或其组合接触，形成探测物 - 标志复合体，并检测该探测物 - 标志复合体。
25
10. 权利要求 7 的方法，进一步包括在感染性物质的存在下温育外周血单个核细胞。
11. 权利要求 1 和 4 的方法，其中药物包括来自 Panax 人参的材料。

分析药物效果的方法

5 发明背景

草药例如人参被认为是补品，研究显示人参能够提高人的免疫功能。人参包括红参、Panax 人参（又称美国人参）的提取物被报告在动物模型和人中具有抗肿瘤的效果。此外，临床试验显示人参提取物对老年人呼吸道感染有预防效果。关于人参是如何增强免疫系统来对抗呼吸

10 抗呼吸道感染的机制，目前还不知道。

通过更深入地理解草药等的作用机制，以及了解如何筛选具有保健价值的草药，可以更迅速地缓解诸如流行性感冒等细菌和病毒感染。流感感染是严重的公共健康问题。对已知免疫功能减弱的高龄人群，流感是灾难性的。可以增强免疫功能预防流感感染并且帮助患者

15 从流感中恢复的草药，能够给人们提供许多帮助。

对病毒感染的免疫应答可以被分为两个阶段：初期的固有免疫应答和随后的适应性免疫应答。作用于抗病毒感染前沿的固有免疫反应包括巨噬细胞（在人类又叫单核细胞）和自然杀伤（NK）细胞的活化，分泌细胞因子和趋化因子。这些细胞分泌的细胞因子/趋化因子可以具有直接的抗病毒功能，并且起到激活适应性免疫应答的作用。适应性免疫应答是抗原特异性的，因此也更复杂，可以进一步分为体液（抗体）和细胞介导的免疫应答。细胞所介导免疫应答的主要参与者包括 1 型 CD4 阳性 T 辅助细胞（Th1）和 CD8 阳性的细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）。在某种程度上 Th1 促进 CTL 的增值，CTL 可以通过

20 识别病毒抗原直接杀死病毒感染的细胞。

25

发明简述

本发明提供一种分析药物效果的方法，更具体地，提供一种分析药物对人免疫系统效果的离体方法。

药物如何影响细胞和/或刺激免疫系统在很大程度上还不为人所知。为了分析药物的潜在益处，在此提供了一种分析药物效果的方法。该方法通过使药物与细胞接触、并识别细胞对药物的反应来完成的。可以通过将药物与细胞共孵育或者通过其他本领域已知方法实现接
5 触。可以通过表型标志和/或化学标志的探测物来识别细胞反应。表型标志可以用来确定受药物影响的细胞类型，而化学标志可以用来识别细胞产生的分子。改变表型标志和化学标志，可以识别各种细胞和/或分子。

一方面，在此提供了一种检测药物对免疫应答的效果的方法。该
10 方法通过使药物接触免疫应答细胞形成药物-细胞混合物，并且向药物-细胞混合物提供至少一种探测物检测细胞活化来实现。在这里，“免疫应答细胞”指被细胞结合的或不结合的抗原直接或间接活化的任何种类细胞。探测物可以包括细胞表面抗原抗体、分泌型抗原抗体和/或细胞内抗原的抗体。细胞表面抗原的实例包括免疫应答细胞的表
15 面蛋白或细胞膜蛋白，或者本领域已知用于识别细胞种类的任何其它种类细胞表面抗原。细胞内抗原和/或分泌型抗原/分子的实例包括多肽，例如趋化因子和/或细胞因子。

在此还提供一种通过使药物与免疫应答细胞接触形成药物-细胞混合物，并且检测药物-细胞混合物中至少两种表型标志的存在来
20 检测细胞对药物反应的方法。每个表型标志被用来识别特定种类的活化免疫应答细胞。免疫应答细胞种类的实例包括T细胞、B细胞、自然杀伤细胞和单核细胞。此外，至少一种化学标志的探测物可以与药物-细胞混合物接触。每个化学标志探测物通常识别由免疫应答细胞产生的一种特定的蛋白质或一类蛋白质。免疫应答细胞产生的蛋白质
25 的实例包括细胞因子和趋化因子，其它细胞蛋白质也可以被识别。这些蛋白质可以是单一种类细胞产生的，也可以是一种以上细胞产生的。

可以以各种时间间隔筛查药物-细胞混合物，通过分析表型标志和/或化学标志来检测药物的效果。此外，筛查药物-细胞混合物以检

测活化免疫应答细胞是否存在之前，可以向混合物中加入细菌或病毒。根据所需参数和所用标志，可以在为特定实验所选的时间间隔进行筛查，包括按分钟、小时和/或天进行筛查。

其它种标志的探测物也可以被加入药物-细胞混合物中，包括活化标志的探测物。活化标志在细胞被活化时产生，在不同物质存在下通常抑制或加强特定肽的转录。活化标志的说明性实例包括 CD69(对应于 T 细胞和单核细胞)和 MHC II 类(也称 HLA-DR, 对应于 B 细胞)。活化标志也可以帮助检测药物对各种类型细胞的效果。

在此还提供了一种在植物材料存在下，通过温育外周血单个核细胞、使温育的外周血单个核细胞接触一组探测物形成互补的探测物-细胞复合体来检测细胞反应的方法。每种探测物都能够与一种免疫应答细胞的特定表型标志形成复合体。然后检测并分析探测物-细胞复合体。也可以使用化学和/或活化标志的探测物，并且也可以检测这些探测物-标志复合体。

15

附图简述

图 1: Panax 人参提取物对 CD14+单核细胞的剂量依赖性活化。

图 2A: 流感病毒存在下, Panax 人参提取物对 NK 细胞的特异性活化。

20 图 2B: 人参提取物对 NK 细胞的剂量依赖性活化。

图 3: 不同 Panax 人参提取物使 NK 细胞活化分泌 IFN-g 的效果比较。

图 4: Panax 人参提取物对 Th1CD4 阳性 T 细胞和 CD8 阳性 CTL 增殖的效果。

25 图 5: Panax 人参提取物 (CVT 2001 009) 对灭活流感病毒刺激的 CLT 培养物中 NK 细胞生长的效果。

发明详述

开发了一种分析药物效果的方法。药物可以包括天然来源和合成

制备的药物。天然来源药物的实例包括植物材料，例如草药。对植物材料没有限制，可以包括叶、根、茎皮、树液、浆果和/或它们的提取物或组合。此外，植物材料可以被研磨、干燥、分馏、渗出，或整体保留。

5 在一个实施方案中，药物与外周血单个核细胞（PBMC）接触。外周血单个核细胞是包括免疫应答细胞例如 Th1、CTL、NK、B 细胞和单核细胞（也称为巨噬细胞）在内的多种细胞混合物。每种这些免疫应答细胞具有至少一种表型标志，例如能够被检测的表面抗原。例如，CD4、CD8、CD56、CD19 和 CD14 分别是 Th1、CTL、NK、B
10 细胞和单核细胞的表型标志。Th1 和 CTL 细胞还具有抗原 CD3。NK 细胞还具有抗原 CD16。每个表面抗原（表型标志）可以被探测物识别。探测物通常是这些表面抗原的抗体，但也可以是任何其它能够用来识别表面抗原的探测物。探测物可以用放射性、荧光、颜色标签以及其它本领域已知的标记进行标记。

15 当免疫应答细胞被活化时，通常产生不同的化学标志，例如肽和/或其它因子。许多这些化学标志被称为细胞因子和趋化因子。细胞因子包括白细胞介素，例如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 和 IL-12。其它细胞因子包括干扰素- γ （ifn- γ ）和肿瘤坏死因子- α （tnf- α ），以及其它由免疫应答细胞产生的细胞因子。适宜检测的趋化因子（趋化吸引不同白细胞的低分子量多肽）的实例包括巨噬细胞趋化和活化因子
20 （MCAF）、巨噬细胞炎性蛋白-1a（MIF-1a）、巨噬细胞炎性蛋白-1b（MIF-1b）、RANTES 和白细胞介素 8（IL-8）。这些化学标志也可以用探测物来识别。这些探测物通常是针对每一个这些肽和/或因子的抗体，也可以是任何识别由免疫应答细胞产生的特异性分泌型或细胞
25 内肽或因子的探测物。

为了检测细胞反应，在药物例如草药存在下温育 PBMC。然后使温育的 PBMC 与一组探测物接触，检测至少针对两种特定免疫应答细胞种类（例如，Th1 细胞和 B 细胞）的两种表型标志。每种探测物特异性地识别一种特定的表型标志。当表型标志在温育细胞内存在、并

且与其特异性探测物接触时，形成探测物 - 标志复合体。然后通过本领域技术人员已知的方法和实验来检测并分析该探测物 - 标志复合体。

可以向温育的 PBMC 中加入另外的成分，提供关于药物效果的更多信息。例如，特定化学标志如细胞因子和趋化因子的探测物可以与温育的 PBMC 接触，形成可以被检测和分析的另外的探测物 - 标志复合体。感染性制剂，例如细菌或病毒等感染性物质也可以与 PBMC 以及表型标志和/或化学标志的探测物温育。最后，可以用其它种类探测物-包括活化标志的探测物和其它本领域技术人员已知标志的探测物-接触温育的 PBMC。其它本领域已知的制剂也可以与 PBMC 和药物温育，来检测是否获得有益或不利的效果。

下述实施例说明了分析药物效果的方法。这些实施例被用于说明而不是限制这里提出的本发明的范围。但是，在讨论每个实施例之前，将先讨论实验背景，以提供对达到每个实施例结果所使用方法的充分理解。当然，如本领域所知，为了获得相同或相似的结果，这些方法可以修改或改变，或者这些方法可以随着技术的进步而改进或改变。

Panax 人参提取物：选择用于以下实施例的药物是 Panax 人参。Panax 人参提取物由 CV Technologies (CVT), Edmonton, Canada 提供。有三个不同批次的 Panax 人参提取物：CVT2001 008、CVT2001 009、CVT2001 010，和两个不同批次的对照提取物：CVT HT1001-005 和 CVT HT1001-009。所有提取物都以粉末形式提供，并被溶于 PBS 缓冲液中。然后将提取物在含 10% FBS (Summit Biotech CO) 的组织培养基 RPMI (Gibco, MC) 中稀释至终浓度。

外周血单个核细胞的纯化：将健康个体的肝素化 PBMC (每次抽血 20 到 30ml) 以 1200RPM 离心 10 分钟，分离白细胞层。收集白细胞层并小心地加入菲可梯度 (Histopaque, Sigma, MO) 顶部。然后将细胞以 1700RPM 离心 30 分钟。从界面收集 PBMC，离心，在用于实验前用 RPMI 培养基洗涤两遍。

Panax 人参活化单核细胞的分析：200 μ l AIM-V 培养基 (Gibco,

MD) 中的 5×10^5 PBMC 与不同剂量 Panax 人参提取物温育过夜 (16 小时)。细胞被离心沉淀, 用表面抗原抗体 CD14-APC、CD69-FITC 和 CD86-PE 染色。用 FACSCalibur (Becton Dickinson, CA) 对染色的细胞进行流式细胞术分析, 用 CellQuest 软件 (Becton Dickinson, CA) 分析数据。圈选 CD14 阳性细胞, 用合适的抗体分析它们的活化标志 CD69 和 CD86 的表达。

人参活化树突细胞 (DC) 的分析: 通过本领域技术人员已知方法制备树突细胞, 例如以下简述的实例。3ml AIM-V 中新鲜分离的 1.5×10^7 PBMC 被置于 6 孔板的孔中, 在 37°C 温育 3 小时。取出不附着的细胞。附着细胞被轻柔地洗涤两次, 在含 GM-CSF (800 单位/ml) 和 IL-4 (1000 单位/ml) (BioSource, CA) 的 5ml AIM-V 中培养。温育 7 天后, 如通过培养物的富树突形态以及 MHC 和共刺激分子高表达所确定的, 培养物中通常含有超过 50% 的树突细胞。为了分析人参对树突细胞的效果, 在第 7 天收集树突细胞培养物中的细胞, 计数并与不同剂量的 Panax 人参提取物温育过夜。然后用 CD86、83 和 MHC II (也称为 HLA-DR) 抗体对细胞进行染色。

快速免疫检测: 1×10^6 PBMC 与不同剂量的 Panax 人参提取物和对照共温育。必要时, 将含等量 (10HA 单位/ml) 流感病毒株 A/H3N2/Calvadonia、A/H1N1/Panama 和 B/Yamanashi 的活流感病毒混合物加入 PBMC。用尿囊液作为活流感病毒的对照抗原。在有或没有流感病毒存在下, PBMC 被刺激 3 小时, 向细胞中加入布雷菲德菌素 A (BFA, $5 \mu\text{g/ml}$, Sigma, MO)。PBMC 被继续温育 15 小时。然后, PBMC 被固定 (1% 多聚甲醛, Sigma, MO)、透化 (透化缓冲液, Becton Dickinson, CA), 并用下列标记抗体染色: CD56-PE、CD4-APC、CD8-PerCP 和 IFN-g-FITC。用 FACSCalibur 细胞仪和 CellQuest 软件对染色的 PBMC 进行流式细胞术分析。在散点图中圈选淋巴细胞进行随后的分析。IFN-g 也为阳性的 NK 细胞 (CD56 阳性) 被定义为活化的 NK 细胞。

CTL 培养物: 1.5ml 完全培养基 (RPMI 加 10% FBS) 中的 $1.5 \times$

10⁶ PBMC 与不同剂量的人参提取物被置于 24 孔板的孔中。用流感病毒株 A Calvadonia、A Panama 和 B Yamanashi 的灭活流感病毒（来自 1: 1000 稀释的流感疫苗）刺激 PBMC。每 48 小时向培养物中添加低剂量的 IL-2（20IU/ml）和 IL-7（20ng/ml）。培养 7 到 9 天后，收获
5 细胞、计数并分析流感特异性 T 细胞的频度。

CTL 培养物中流感特异性 CD4 阳性或 CD8 阳性 T 细胞的定量分析：在收获 CTL 培养物用于分析之日，从其 PBMC 被用于建立 CTL 培养物的原供者再获取外周血。用流感病毒感染新鲜分离的 PBMC。这些新鲜分离的 PBMC 用于提供自身抗原呈递细胞。感染的 PBMC
10 与从 CTL 培养物中收获的细胞以 1:10（PBMC:CTL）的比例混合。作为对照，用未感染的 PBMC 与 CTL 培养物中的细胞混合。将细胞混合物温育 3 小时后，加入布雷菲德菌素 A（BFA）。用类似于上述方法的快速免疫分析对流感特异性 T 细胞进行定量分析。流感特异性 T 细胞的频度被定义为流感感染的细胞刺激后 IFN-g 也为阳性的 CD8
15 阳性或 CD4 阳性 T 细胞。

实施例 1 人参对抗原呈递细胞例如单核细胞和树突细胞的效果

抗原呈递细胞包括单核细胞或巨噬细胞和树突细胞，在病毒感染中，在通过向 T 细胞加工呈递病毒抗原来介导 T 细胞应答中起重要作用。由于更高地表达 MHC 和共刺激分子，已知活化的抗原呈递细胞
20 是更有效的抗原呈递细胞。此外，活化的抗原呈递细胞能够分泌细胞因子，例如 IL-12 和 IL-10，吸引 T 细胞并刺激 T 细胞增殖。

用以下两个实验检测人参对抗原呈递细胞的效果。第一个实验中，PBMC 与不同剂量的 Panax 人参提取物温育过夜（16 小时），检测单核细胞（CD14 阳性细胞）是否被 Panax 人参活化。用活化标志
25 CD69 和 CD86 双重阳性的单核细胞作为活化单核细胞的指标。第一个实验的结果是，在 Panax 人参提取物存在下活化的单核细胞增加，并且单核细胞的活化是剂量依赖性的（图 1）。

第二个实验用于检测人参对体外产生的树突细胞（职业抗原呈递细胞）的效果。在 GM-CSF 和 IL-4 存在下培养 PBMC 7 天，从附着

的 PBMC 中产生树突细胞。然后收获树突细胞，与不同剂量的人参提取物温育过夜，用可能的 MHC II、CD86 和 CD83 表达增加来分析活化效果。CD86 是共刺激分子 (B7.2)，CD83 是成熟树突细胞的标志。已知活化的树突细胞的 CD83、CD86 和 MHC II 表达增加。结果显示
5 树突细胞与人参提取物温育过夜后，CD83 的表达增加(数据未显示)。

实施例2 Panax 人参提取物对刺激NK细胞应答流感感染的效果

由于 NK 细胞能够直接杀死病毒感染的细胞，NK 细胞在病毒感染的初期起重要作用。此外，活化的 NK 细胞能够分泌细胞因子，例如 IFN-g 和 IL-2。IFN-g 具有直接抗病毒效果和促进 CTL 增殖的能力。
10 用实验检测人参是否刺激 NK 细胞，结果发现当 PBMC 与活流感病毒温育过夜时，人参提取物刺激 NK 细胞 (图 2A)。人参的刺激通过 NK 细胞分泌 IFN-g 来显示。NK 细胞的活化是人参提取物剂量依赖性的 (图 2B)。此外，人参对 NK 细胞的活化是 NK 细胞特异性的，因为人参不活化 CD3 阳性 T 细胞 (用于筛选 Th1 和 CTL 细胞) 或
15 NKT 细胞 (CD3 和 CD56 双阳性细胞)。发现人参对 NK 细胞的刺激也是病原体依赖性的，即仅在流感病毒存在时，人参才刺激 NK 细胞分泌 IFN-g (图 2A，第二和第四幅小图)。实验还被用来检测 CVT 提供的两种对照人参提取物 (CVT HT 1001-005 和 CVT HT 1001-009)。已知这些对照提取物没有可检测到的免疫学功能。即使
20 当培养物中存在流感病毒时，这两种对照提取物也不活化 NK 细胞(图 2，第三幅小图)。

这些实验显示人参通过特异性刺激/活化 NK 细胞，来刺激免疫系统对流感病毒感染产生应答。人参对 NK 细胞的活化是流感特异性的，并且是人参提取物剂量依赖性的。在所有检测的三种人参提取物和两
25 种对照提取物中，人参提取物显示对 NK 细胞的特异性刺激效果，使之分泌 IFN-g，这三种不同提取物的活化程度几乎没有变化(见图 3)。此外，未观察到两种对照提取物或不加入人参时对 NK 细胞的刺激。

实施例3 人参对流感特异性 CD4 阳性 Th1 细胞、CD8 阳性 CTL 细胞和 NK 细胞生长的效果

上述实施例 1 和实施例 2 的实验是利用新鲜分离的 PBMC 短期（过夜）培养物的离体实验。虽然在分析人参提取物作用的细胞机制时离体实验是优选的，但离体实验不能用于研究人参提取物对 CTL 或其它种类细胞增殖的长期效果。因此，在人参提取物存在下，建立用稀释流感疫苗（含灭活流感病毒）刺激的 PBMC 的 CTL 培养物。作为对照，用 CVT 对照提取物或不加入人参提取物进行实验。与疫苗共温育 7 到 9 天后，从 CTL 培养物中收获细胞，计数并进行快速免疫检测。在用被流感病毒感染的抗原呈递细胞活化后（见材料和方法部分），IFN-g 阳性的 T 细胞被定义为抗原特异性 T 细胞。在取自一名供者的 CTL 培养物中观察到人参提取物刺激更多的流感特异性 T 细胞生长，特别是 CD8 阳性 CTL 细胞（供者 1，CD8+细胞，图 4）。还发现与不加入人参提取物的对照相比，当加入人参提取物时，CTL 培养物中的 NK 细胞数目更多（图 5）。此外，结果显示有人参时的 NK 细胞的数目以人参提取物剂量依赖性的方式增加。当使用对照提取物（CVT HT 1001-005 或 CVT HT 1001-009）时，CTL 培养物中没有观察到 NK 细胞生长的增加（数据未显示）。该结果与被流感病毒活化的早期，Panax 人参提取物刺激 NK 细胞（分泌 IFN-g）的观察结果一致（图 2）。

如上述实施例所显示的，Panax 人参提取物直接活化单核细胞，提取物的存在还促进 NK 细胞活化应答流感感染。Panax 人参提取物还促进流感特异性 T 细胞-包括 Th1 CD4 阳性 T 细胞和 CD8 阳性 CTL 细胞-的增殖，以及总 NK 细胞的增殖。

还观察到，流感病毒诱导流感特异性记忆 T 细胞分泌 IFN-g（图 2A 右下格，第三幅图）。Panax 人参提取物对短期培养物中的 T 细胞，无论是流感特异性还是非流感特异性 T 细胞，都没有增加效果。虽然只流感病毒本身甚至没有人参提取物的存在下就可以观察到 NK 细胞的活化，但流感病毒对 NK 细胞的活化需要 PBMC 与活流感病毒长时间的温育（>16 小时）。在 PBMC 与病毒共温育 3 小时后所有细胞因子都停止分泌（通过 BFA）的体外条件下，除非加入 Panax 人参提取

物，否则观察不到 NK 细胞的活化。

最后，结果显示了研究药物如何影响细胞-包括免疫应答细胞-之机制的离体分析可行性。这提供了一种用于筛选药物、确定其是否能够刺激免疫系统的方法。该离体分析方法还可以进一步用来分析药物
5 -包括草药-在对特定目标病原体应答中的免疫学效果。

图 1: Panax 人参提取物对 CD14+ 单核细胞的剂量依赖性活化。新鲜分离的 PBMC 与 10 或 100 μ g/ml 的 Panax 人参提取物 (CVT 2001-009) 或不加人参提取物的对照温育过夜 (16 小时)。细胞用 CD14 (APC)、CD69 (PE) 和 CD86 (PerCP) (Becton Dickinson, CA) 染色, 然后进行流式细胞仪分析。CD14+ 细胞作为单核细胞 (巨噬细胞) 被圈选, 并且分析其 CD69 和 CD86 的表达。显示了 CD69 和 CD86 双阳性单核细胞的百分比。

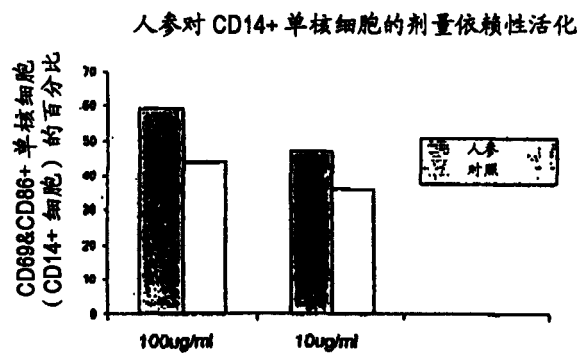


图 1

图 2A 和 2B: 通过 IFN-g 细胞内染色分析和 NK 细胞标志 CD56 检测 Panax 人参提取物对 NK 细胞的活化。从健康志愿者新鲜分离的 PBMC 与活流感病毒 (共 30HAU/ml) 在没有或有不同剂量人参提取物 (CVT 2001-009) - 包括对照提取物 (对照 HT 1001-005) - 的存在下温育。温育 16 小时后, 细胞被固定、透化, 并用下列抗体染色: INF-g (FITC)、CD56 (PE)、CD3 (PerCP) 或 CD19 (APC)。从正向 - 侧向散射图中选出淋巴细胞 (主要包括 T、B 和 NK 细胞), 进行作图分析: CD56 的表达对 IFN-g 的表达。出现在右上格的淋巴细胞 (CD56 和 IFN-g 双重阳性) 百分比被定义为活化的 NK 细胞 (图 2A)。此外, 人参提取物 CVT-2001-009 活化 NK 细胞的剂量依赖性方式被绘制在图 2B 中。类似的结果在两个其它实验中也观察到, 并且在取自三名不同健康供者的 PBMC 中得到证实。

流感病毒存在下, Panax 人参提取物对 NK 细胞的特异性活化。

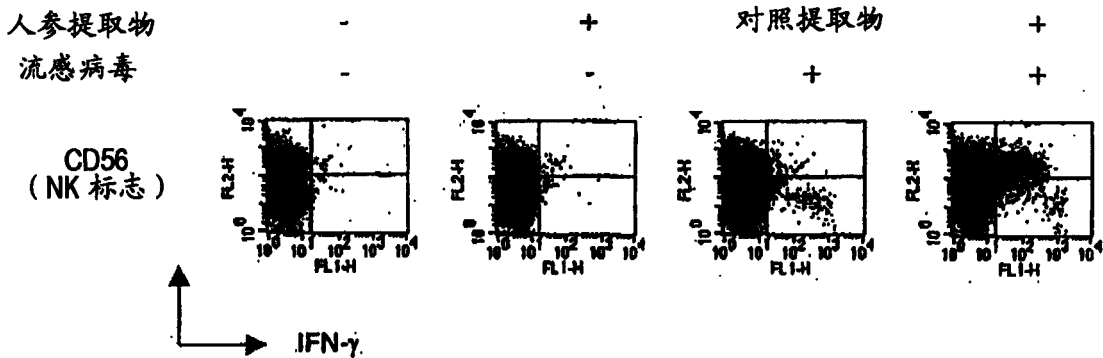


图 2A

人参提取物对 NK 细胞的剂量依赖性活化

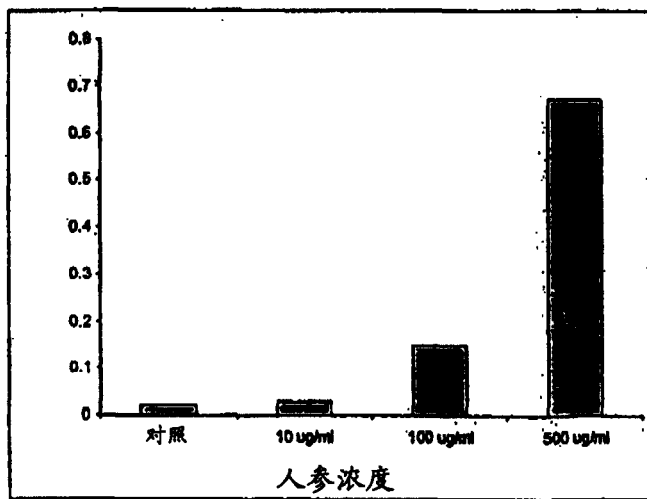


图 2B

图 3: 不同 Panax 人参提取物活化 NK 细胞分泌 IFN-g 的比较。本实验与图 2 说明中所述相似的方法进行, 不同之处是在本实验中比较不同 Panax 人参提取物。第一组柱形图 (左) 是在流感病毒不存在下处理 PBMC, 第二组柱形图 (右) 是在病毒存在下处理 PBMC。注意, 没有流感病毒存在下, NK 细胞不被人参提取物活化。

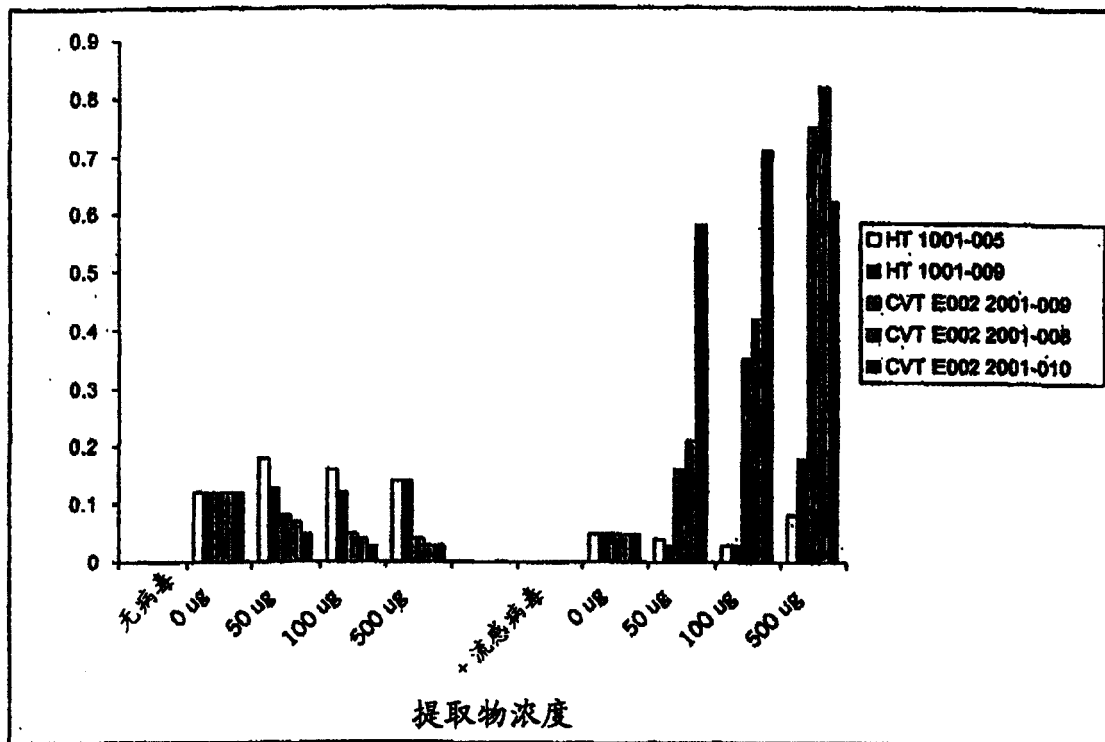


图 3

图 4: Panax 人参提取物对 Th1CD4 阳性 T 细胞和 CD8 阳性 CTL 增殖的效果。在不同剂量 Panax 人参提取物存在下，用灭活的流感病毒 (1:1000 × 稀释的流感疫苗) 刺激分离自两个健康供者的 PBMC。然后收获细胞、计数并与 1/10 新鲜分离的活流感病毒感染的自体 PBMC 混合。用未感染的 PBMC 作为对照刺激物。将混合细胞温育 3 小时，然后加入布雷菲德菌素 A (BFA) 阻止向细胞外分泌细胞因子。在 BFA 存在下，细胞被继续温育 13 小时。细胞被固定、透化并对 IFN-g (FITC) 以及 CD56 (PE)、CD8 (PerCP) 和 CD4 (APC) 进行细胞内细胞因子染色。圈选 CD4+ 或 CD8+ 阳性 T 细胞，检测其 IFN-g 的表达。据此，绘制出 IFN-g 也为阳性的 T 细胞 (CD4 或 CD8) 百分比。

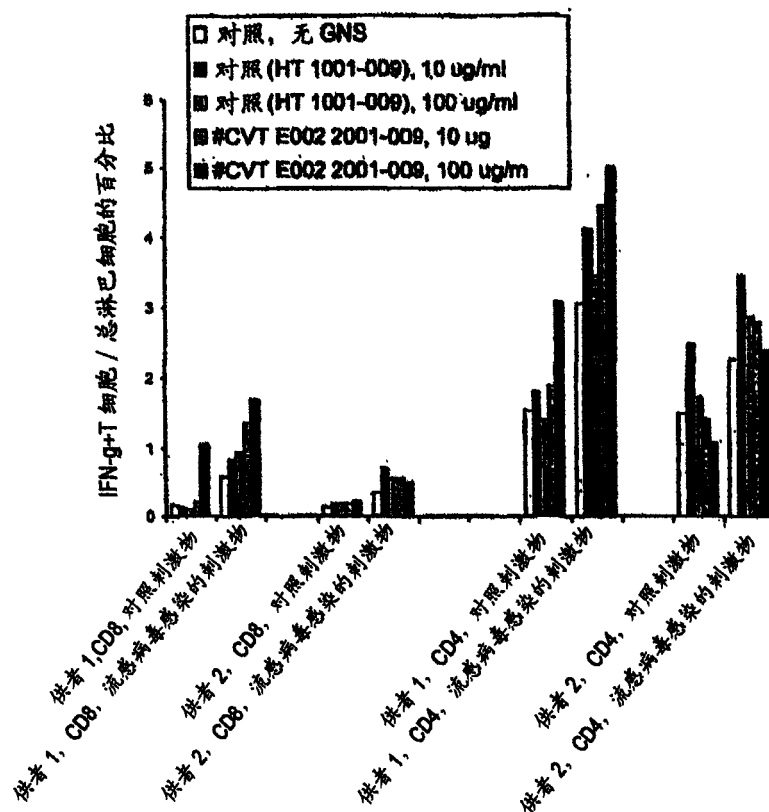


图 4

图 5: Panax 人参提取物 (CVT 2001 009) 对灭活流感病毒刺激的 CLT 培养物中 NK 细胞生长的效果。如图 4 的说明中所述建立流感病毒刺激的 CTL 培养物。在 CTL 培养结束时, 对 CD56 细胞进行染色。对 CD56+ 的细胞作为 NK 细胞进行计数, 用其百分比进行绘图。结果显示人参提取物 (CVT 2001-009) 剂量依赖性刺激效果的趋势。当使用对照提取物 (CVT HT 1001 005 或 009) 时 (数据未显示), 没有观察到 NK 细胞生长的增加。

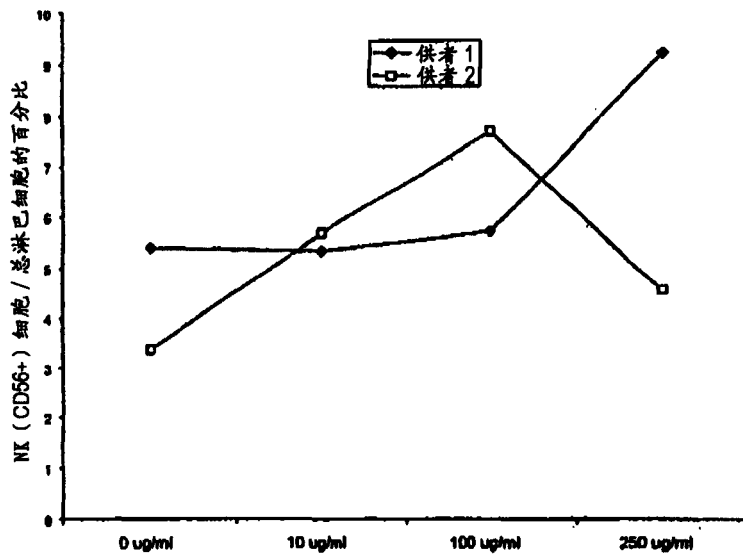


图 5

专利名称(译)	分析药物效果的方法		
公开(公告)号	CN1608204A	公开(公告)日	2005-04-20
申请号	CN02825873.8	申请日	2002-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
当前申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
[标]发明人	邓玉萍		
发明人	邓玉萍		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/567 G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N2333/705		
代理人(译)	陈文平		
优先权	60/342432 2001-12-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种分析药物效果的方法，更具体地讲提供一种分析药物对人免疫系统效果的离体方法。

人参对 CD14+ 单核细胞的剂量依赖性活化

