

青蒿素丁二酸酯钠对小鼠脾细胞 $[^3\text{H}]$ 尿核苷参入及细胞膜的作用

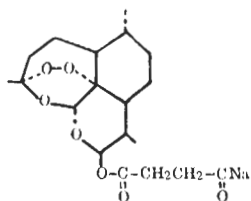
宋千里、林性玉、张入德、张惠珠

(上海市免疫学研究所免疫生化室和上海第二医科大学生化教研室, 上海 200025)

提要 青蒿素丁二酸酯钠(sodium artesunate, Art)在体外能抑制小鼠脾细胞经 Con A 刺激后的 $[^3\text{H}]$ UR 参入或其自发参入, 并能抑制小鼠纤维母细胞的 $[^3\text{H}]$ UR 参入。Art 能致羊红细胞溶血, $<10 \mu\text{g/ml}$ 时能增加细胞膜流动性, 大于此量时随剂量增大膜流动性降低。提示 Art 初始就影响细胞膜结构, 它对细胞的非特异性抑制可能与此有关。

关键词 青蒿素丁二酸酯钠; 脾细胞; 纤维母细胞; 刀豆球蛋白A; $[^3\text{H}]$ 尿核苷; 溶血; 荧光极化; 细胞膜; 膜流动性; 二苯己三烯

青蒿素(artemisinin)系从黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中提得的具有过氧桥结构的倍半萜内酯类化合物。



Sodium artesunate

它是一种低毒、高效抗疟药。我们曾报道它的水溶性衍生物 Art 在体外能抑制促分裂原刺激的淋巴细胞 DNA 合成及胸腺细胞和一些白血病细胞的自发 DNA 合成^(1,2), 也报告了青蒿素及其两种衍生物能抑制小鼠体液免疫反应⁽³⁾。因此我们提出青蒿素可能具有免疫抑制及抗癌作用。但产生这些作用所需药物的量远远大于抗疟剂量。本文研究 Art 对小鼠脾细胞 $[^3\text{H}]$ UR 参入的影响及对细胞膜的作用。

材料与 方法

材料 C57BL/6 J 系♀小鼠, 4-6 wk; 小

鼠纤维母细胞为上海第二医科大学组胚教研室提供的小鼠 L 细胞; 羊红细胞 (SRBC) 为上海县诸翟公社新分界大队产品; 刀豆球蛋白 A (Con A) Sigma 产品; 青蒿素丁二酸酯钠结晶是广西桂林制药厂产品; $[^3\text{H}]$ UR 为上海原子核研究所产品, 506.9 GBq/mmol , 2.22 MBq/ml ; 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(DPH)是 Aldrich 产品; 四氢呋喃由浙江仙居化肥厂出品 CP。

$[^3\text{H}]$ UR 参入试验

1. Con A 刺激 $[^3\text{H}]$ UR 参入 在每管反应液总容量为 1 ml 的 1640 培养液内, 含小鼠脾淋巴细胞 1×10^6 个, 正常人血清 5%, Con A $2.5 \mu\text{g}$, Art 含量分别为 0, 1, 5, 10, 20 μg 共 5 个实验组, 空白对照组不加 Con A 及 Art, 其余同上。上述各组每组三复管, 于 37°C 温育 18 h 后, 每管加入 $[^3\text{H}]$ UR $50 \mu\text{l}$ (111 kBq), 再温育 4 h, 用膜片抽滤法, 常规同位素液闪计数。计算不同实验组 Art 对小鼠脾淋巴细胞经 Con A 刺激的 $[^3\text{H}]$ UR 参入抑制率。

2. 自发 $[^3\text{H}]$ UR 参入 与上述 1 中方法基本相同。按加 Art 的量(1, 5, 10, 20 μg)分为 4 个实验组, 但每组均不加 Con A。

3. $[^3\text{H}]$ UR 参入纤维母细胞 同 2 中方法。但所用的细胞培养液为 Eagle 培养液, 小鼠纤维母细胞数为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。

SRBC 溶血分光光度法⁽⁴⁾ 参照 Simpson 法并加以改良。各组于 37°C 温育 6, 24, 48, 58, 72 h 后, 离心 $200 \text{ g} \times 10 \text{ min}$, 取上清液, 并以生理盐水作空白管, 于 413 nm 测定光密度 (OD) 值。Art 浓度致溶血作用温育时间 24 h, 仅改变测定管中 Art 浓度。

荧光偏振度测定⁽⁵⁾ 不同之处是用比重为

1.088 的 Ficoll-Hepaque 溶液以 $200 \times g$ 离心 10 min, 从小鼠脾细胞悬液中分离淋巴细胞。经 1640 培养液旋洗后, 稀释成每管反应液总容量为 2.5 ml, 细胞浓度为 3×10^6 /ml, 加入 10, 50, 100, 200, 400 μg 的 Art 后, 37°C 温育 22 h, $250 \times g$ 离心 10 min, 沉着的细胞用 PBS 旋洗两次, 然后以 PBS 恢复到 2.5 ml。在此测定管中加 2.5 ml DPH $2 \mu\text{mol/L}$ 工作液, 27°C 温育 30 min。荧光探针标记后离心沉淀, PBS 旋洗两次, 最后恢复总容量为 2.5 ml 进行荧光测定。

结 果

Art 对 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 参入小鼠脾细胞的影响

在 Con A 刺激的实验条件中, 选用 Con A 的最佳刺激浓度为 $2.5 \mu\text{g/ml}$, 刺激指数可达 9.2。在此 Con A 刺激的反应体系中, 若同时加入 Art, 则 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 的参入受到抑制, 在 Art 为 $1 \mu\text{g/ml}$ 时, 抑制率为 37%。随着 Art 浓度的增加, 则抑制率亦随之增加, 并有达到恒值的趋势。值得注意的是于图 1 中还可看到小鼠脾细胞在无 Con A 刺激条件下, Art 对小鼠脾细胞的自发 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 参入也有抑制作用, 其抑制曲线形状与有 Con A 刺激的结果相仿, 仅各抑制率略低。

Art 的作用时间对 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 参入小鼠脾细胞的影响 将小鼠脾细胞预先与 Art 分别温育不同时间后, 用 1640 细胞培养液旋洗细胞 2 次, 观察药物对小鼠脾细胞经 Con A 刺激及无 Con A 刺激的自发状态下 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 参入的影响。由图 1 可见预保温时间为 3 h, 不论刺激参入或自发参入均受抑制。随着预保温时间的延长, 抑制率递升。预保温 12 h 所产生的抑制作用已接近于药物连续温育 22 h 的水平。曾尝试将预保温时间缩短或将药物剂量减少以观察其效应。初步结果是在 Con A 刺激组于 Art $20 \mu\text{g/ml}$ 时与脾细胞预保温 0.5 h 即出现抑制, 而自发参入实验组中与 Art $0.5\text{--}2.5 \mu\text{g/ml}$ 预保温 2 h 后, 其 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 却出现促进现象。

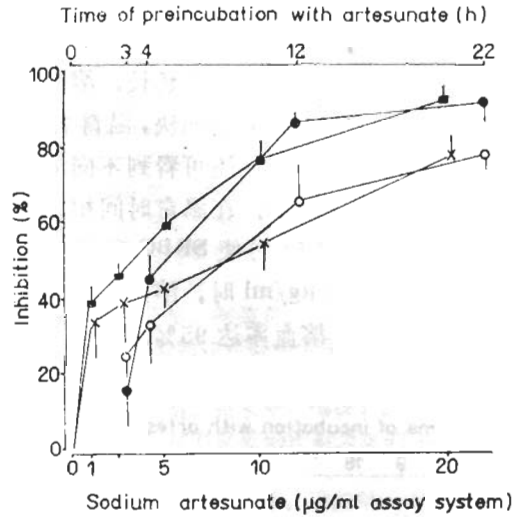


Fig 1. Effect of sodium artesunate on $[^3\text{H}]\text{UR}$ incorporation into mouse spleen cells incubated at 37°C for 22 h, Con A stimulated (■ $n=6$) and non-stimulated (× $n=3$). Effect of preincubation with sodium artesunate $20 \mu\text{g/ml}$ on the $[^3\text{H}]\text{UR}$ incorporation into mouse spleen cells, Con A stimulated (● $n=3$) and non-stimulated (○ $n=3$). Inhibition % = (mean cpm of control - mean cpm of expt) / mean cpm of control $\times 100\%$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

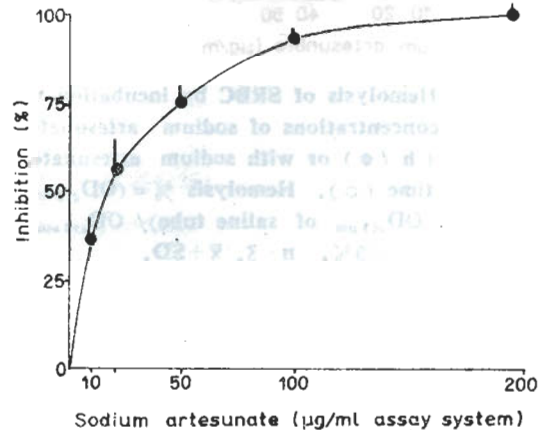


Fig 2. Effect of Sodium artesunate on $[^3\text{H}]\text{UR}$ incorporation into mouse fibroblasts. $n=3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Art 对小鼠纤维母细胞 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 自发参入的影响 本实验所用的纤维母细胞是来自与免疫功能无直接相关的小鼠 L 细胞, 从图 2 可见药物对纤维母细胞的 $[^3\text{H}]\text{UR}$ 自发参入亦具有抑制作用。

Art 致 SRBC 的溶血作用 从图 3 可见 Art 20 $\mu\text{g/ml}$ 与 SRBC 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 6 h 后, 即开始有少量溶血。随着作用时间的延长, 溶血程度增加。24 h 后溶血作用迅速加快, 温育 72 h 后已接近全部溶血。在图 3 还可看到不同浓度的药物对溶血作用的影响。在温育时间相同的条件下, Art 5 $\mu\text{g/ml}$ 已可使 SRBC 产生少量溶血, 在药物量 $>50 \mu\text{g/ml}$ 时, 溶血明显增加, 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, 溶血率达 95%。

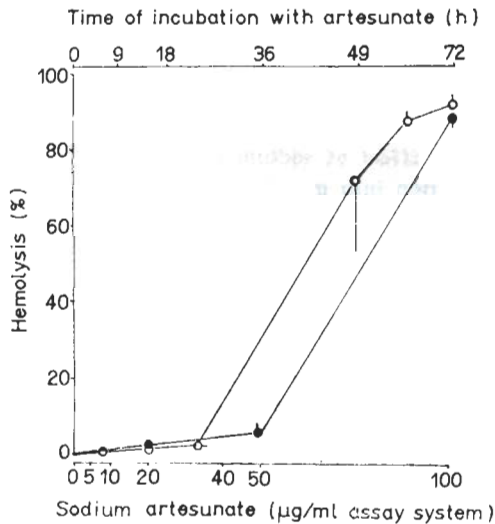


Fig 3. Hemolysis of SRBC by incubation with different concentrations of sodium artesunate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h (\bullet) or with sodium artesunate 20 $\mu\text{g/ml}$ for time (\circ). Hemolysis % = $(\text{OD}_{413 \text{ nm}}$ of Art tube - $\text{OD}_{413 \text{ nm}}$ of saline tube) / $\text{OD}_{413 \text{ nm}}$ of water tube $\times 100\%$. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

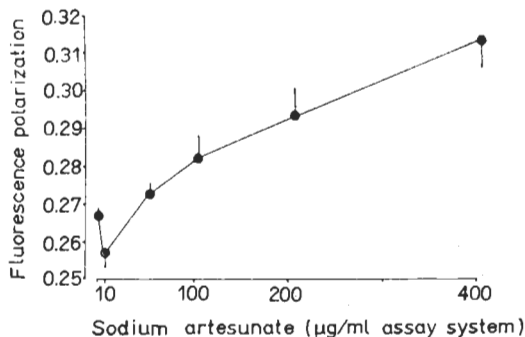


Fig 4. Effect of sodium artesunate on fluorescence polarization. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Art 对小鼠淋巴细胞膜流动性的影响 为进一步观察 Art 对细胞膜的作用, 测定了它对小鼠淋巴细胞荧光偏振度 (fluorescence polarization, P) 的影响, 从图 4 可见, 小鼠脾淋巴细胞与 Art 温育 22 h 后, 随着 Art 浓度的增加, P 值先下降而后上升, 表明膜流动性先升高而后降低。Art 为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, P 值极小; 浓度增加到 400 $\mu\text{g/ml}$ 时, P 值仍继续升高。

讨 论

一般认为致分裂原刺激淋巴细胞活化时先有 RNA, 蛋白质合成增加, 而后有 DNA 合成增加⁽⁶⁾。本实验室曾发现 Art 可抑制在 Con A 刺激下小鼠脾细胞的 [^3H]TdR 参入⁽¹⁾。本文表明该药对活化的小鼠脾细胞 RNA 的合成亦有抑制作用。但与此同时发现该药对无 Con A 刺激自发状态下的小鼠脾细胞 [^3H]UR 参入亦有抑制。这说明了 Art 对致分裂原刺激下淋巴细胞活化时 RNA, DNA 合成的抑制并不是直接影响细胞对致分裂原的反应性, 而主要是阻遏了细胞内 RNA 合成代谢的基本过程。由此我们认为不能把 Art 作为特异免疫抑制剂, 它是一种非特异的核酸合成代谢阻遏剂。另一方面, 从药物对小鼠纤维母细胞的 [^3H]UR 自发参入同样具有抑制作用来看, 也支持了上述观点。

从 Art 对 SRBC 致溶血作用可推测在导致血红蛋白外漏之前, SRBC 胞膜结构已发生改变, 这在荧光偏振度实验中得到证实。已知二苯己三烯为线型构象分子, 其 P 值反映了它绕分子纵轴旋转的速率⁽⁷⁾。当膜脂流动性下降时, 使完全嵌入双分子脂层的二苯己三烯旋转弛豫时间增大, P 值增高。本实验中 Art $>10 \mu\text{g/ml}$ 时, 膜脂流动性下降。有趣的是当药物浓度 $<10 \mu\text{g/ml}$ 时, 膜脂流动性升高。提示不同剂量的 Art 对细胞质膜具有不同作用。小剂量的药物与小鼠脾细胞缩短预保温时间对小鼠脾细胞的 [^3H]UR 参入具有促进作用, 这恰与大剂量的作用相反, 表明同样出现不同作用。但上述两种方法出现双相反应的所用药物剂量及

作用时间并不一致,有待进一步研究。

综上所述, Art 对致分裂原刺激下或静息小鼠脾细胞的浆膜结构及脂区微粘度、细胞内 RNA, DNA 合成均有作用。并对小鼠纤维母细胞及羊红细胞等非免疫细胞亦有作用。所以它是一种靶细胞种类特异性低而在同一细胞上作用部位广泛的药物。若把它作为免疫抑制剂或抗癌制剂临床应用时,可能会由于药物剂量大而带来较大的副反应。青蒿素对猫和小鼠有减慢心率的作用⁽⁸⁾,我们认为这可能是青蒿素改变了浆膜流动性,进一步影响心肌纤维膜的电活动。

参 考 文 献

- 1 沈明、葛海良、何尧祥、宋千里、张惠珠。青蒿素的免疫抑制作用。中国科学B辑 1983; 4: 928
- 2 何尧祥、葛海良、程枫、沈明、张来仪、张惠珠。青蒿素对白血病人外周血白细胞

[³H]TdR 自动参入的影响。上海第二医学院学报 1983; 3 (2): 40

- 3 林性玉、程枫、张来仪、宋千里、张惠珠。青蒿素及其两种衍生物免疫抑制作用的比较。上海免疫学杂志 1984; 4: 348
- 4 Simpson MA, Gozzo JJ. Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis *in vitro*. *J Immunol Methods* 1978; 21: 159
- 5 刘树森、韦美福、李清焕,等。正常和淋巴白血淋巴瘤细胞膜的 DPH 荧光偏振度和对 PHA 及 CaBP 刺激的反应——细胞膜的流动性和信息识别的研究。生物化学和生物物理进展 1983; (2): 36
- 6 O'Brien RL, Parker JW, Dixon JEP. Mechanism of lymphocyte transformation. In: Hahn FE, Kersten H, Kersten W, Szybalski W, eds. *Progress in molecular and subcellular biology*; vol 6. 1st ed. Berlin: Springer, 1978: 225-7
- 7 Inbar M, Shinitzky M, Sachs L. Microviscosity in the surface membrane lipid layer of intact normal lymphocytes and tenkemic cells. *FEBS Lett* 1974; 38: 268
- 8 中医研究院中药研究所药理研究室。青蒿的药理研究。新医药学杂志 1979; (1): 23

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jan, 8 (1): 72-76

Action of sodium artesunate on [³H]uridine incorporation and cell membrane of mouse spleen cells

SONG Qian-Li, LIN Xing-Yu, ZHANG Ren-De, ZHANG Hui-Zhu

(Lab Immunobiochemistry, Shanghai Immunology Institute, and Dept Biochemistry, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

ABSTRACT Artemisinin (qinghaosu), isolated from the Chinese herb *Artemisia annua* L. and identified as a unique sesquiterpene with a peroxide bridge and lactone, is an effective and nontoxic new antimalarial drug. The immunosuppressive action of its water-soluble derivative, sodium artesunate, has been reported on the proliferations of lymphocytes and blood cells taken from patients with acute lymphocytic and monocytic leukemia, and Hodgkin disease.

In the present study, sodium artesunate 10 μg/ml inhibited RNA synthesis in mouse

spleen cells stimulated by Con A or the non-stimulated fibroblasts as evidenced by [³H]UR incorporation, indicating that sodium artesunate is not a specific immunosuppressor but a metabolic inhibitor of the synthesis of nucleic acids in cells.

Sheep red blood cells were hemolysed by sodium artesunate >10 μg/ml. Studies on the influence of the drug on membrane lipid fluidity by means of fluorescence polarization with diphenylhexatriene showed that the degree of fluorescence polarization of lymphocytes increased with the

concentration of sodium artesunate $>10 \mu\text{g}/\text{ml}$. However, the fluorescence polarization was decreased after the lymphocytes were incubated with the drug $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ at 37°C for 2 h, indicating that there may be a different effect depending on the different concentrations of sodium artesunate

adopted.

KEY WORDS sodium artesunate; spleen cells; fibroblasts; concanavalin A; [^3H]uridine; hemolysis; fluorescence polarization; cell membrane; membrane fluidity; diphenylhexatriene

* * * * *