

氧代赖氨酸对免疫反应的增强作用

李晓玉、童乐民、金筠芳、曹翠玉、梁惠珍、汪家芳、朱芃芃、王结义¹

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 C 57/BL 纯系小鼠 ip 或 ig 氧代赖氨酸 (oxalylsine, I-677) 100 mg/kg × 5 d 可增加脾脏空斑形成细胞、血清溶血素及 IgG 水平, 促进抗体生成, 并增加补体 C3 的含量。I-677 ip 50 及 100 mg/kg × 3 d 或 ig 100 mg/kg × 5 d 可促进脾淋巴细胞转化; ip 100 mg/kg 还能显著提高 ICR 小鼠上 SRBC 诱发的迟发性超敏反应, 提示 I-677 对体液免疫和细胞免疫都有一定的增强作用。

关键词 氧代赖氨酸; 抗体生成细胞; 溶血素; 补体; 淋巴细胞转化; 迟发性超敏感性

氧代赖氨酸(L-4-oxalylsine, I-677)系我所从辽宁省大连地区土壤中分离到的新种玫瑰

绿褐链霉菌(*Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp.)所产生的碱性氨基酸类抗生素, 分子式为 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}^{(1,2)}$ 。它对多种实验性肿瘤有不同程度的抑制作用⁽³⁾, 对实验性急、慢性肝损伤有明显的保护作用⁽⁴⁾, 临床对慢性肝炎病人有改善肝功能的功效⁽⁵⁾。慢性肝炎患者往往免疫功能低下, 不能有效地清除病毒, 因此具有增强机体免疫功能的药物应是控制慢性肝炎有效的途径之一。本文报道 I-677 对小鼠体液免疫和细胞中介免疫的影响。

方法和结果

C 57/BL 纯系小鼠, ♀性, 鼠龄 3 月, 体

1986年1月2日收稿 1986年7月5日修回

¹ 上海医科大学药理专业 80 级毕业生

重 $18 \pm SD 1.3$ g, 于 0 d 每鼠 ip 3×10^8 SRBC 致敏, d 1-5 每天 ip 或 ig I-677 的生理盐水溶液 25, 50, 100 及 200 mg/kg. 于 d 6 摘眼球放血, 取血清测定溶血素、IgG、总补体及其 C3 组分含量, 取脾脏细胞测定空斑形成细胞数及淋巴细胞转化率。

对抗体形成的影响

1. I-677 对小鼠脾脏空斑形成细胞(PFC)的影响 小鼠脾脏取出后立即置于 RPMI 1640 培养液中(pH 6.8, 加青、链霉素), 剪碎后过滤制成 2×10^6 细胞/ml 的悬液, 取此悬液 0.5 ml 加 0.1 ml SRBC(3×10^9 /ml), 0.1 ml 补体(1:4 稀释的豚鼠血清)及 0.15 ml 培养液, 混合均匀后灌入两载玻片做成的小室中, 用石蜡封固后 37°C 培养 45 min, 然后在解剖镜下计数溶血空斑数, 结果见表 1. I-677 ip 50 mg/kg 或 ig 100 mg/kg 均可使小鼠脾脏 PFC 显著升高。

2. 对小鼠血清溶血素的影响 血清溶血素的测定方法见前文⁽⁶⁾. 血清用生理盐水作 1:1600 稀释后测定. 表 1 结果说明 I-677 ip 对小鼠血清溶血素水平影响不显著, 但 ig 100 mg/kg 能显著升高小鼠血清溶血素的半数溶血值(HC 50)。

3. 对小鼠血清 IgG 含量的影响 用单向免疫扩散法测定小鼠血清 IgG. 用自制兔抗鼠 IgG 血清加入 1% 琼脂糖浇板⁽⁷⁾, 小鼠血清用生理盐水作 1:20 稀释, 每孔加样 10 μ l, 用正

常小鼠混合血清作标准曲线, 用直线回归法求得各孔 IgG 含量. 表 1 可见: I-677 ip 100 mg/kg 能使小鼠血清 IgG 含量显著升高。

以上三种指标都说明: I-677 无论 ip 或 ig 给药, 在适当的剂量(如 100 mg/kg)下, 都可促进小鼠特异性抗体(PFC, 溶血素)和非特异性抗体(IgG)的形成。

对小鼠血清补体 C3 的影响 单向免疫扩散法测定血清 C3 含量. 用酵母多糖法自制兔抗小鼠 C3 抗血清⁽⁷⁾, 1:40 稀释加入 1% 琼脂糖巴比妥-EDTA 缓冲液浇板, 其它测定步骤同 IgG. 结果见表 2. I-677 ip 或 ig 50, 100 mg/kg 都能提高血清 C3 含量。

对小鼠脾脏淋巴细胞转化的影响

1. 体内试验 [³H]TdR 渗入法测定淋巴细胞转化率 上述 C57/BL 小鼠 ip I-677 $\times 3$ d 或 ig $\times 5$ d 后, 取脾脏剪碎, 蒸馏水破红细胞后, 用 RPMI 1640 培养液调节脾细胞浓度为 1.5×10^6 /ml, 取细胞悬液加入 40 孔酶标板孔中, 每孔加 200 μ l, 每个样本做 4 孔, 然后加入 Con A (Sigma, 100 μ g/ml) 10 μ l 置 37°C 5% CO₂ 培育箱中培育 72 h, 终止前 6 h, 每孔加入 [³H]TdR (中国科学院上海原子核所生产) 10 μ l (37 kBq), 用微量多头样品收集器将细胞收集于滤纸上, 烘干后放入闪烁液中测 cpm 值, 结果见表 3. I-677 ip 50 及 100 mg/kg $\times 3$ d 或 100 mg/kg ig $\times 5$ d 后, 均使脾淋巴细胞对 [³H]TdR 摄入增加, 促进其转化增殖。

Tab 1. Effect of oxalysine on production of antibody in mice. ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Route	Oxalysine (mg/kg)	Mice	Plaque forming cells/ 10 ⁶ spleen cells	Hemolysin HC ₅₀	Serum IgG (μ g/10 μ l)
ip	0	8	267 \pm 35	431 \pm 226	90 \pm 19
	50	8	443 \pm 40**	518 \pm 234*	130 \pm 20*
	100	8	242 \pm 29*	494 \pm 189*	127 \pm 19***
	200	8	275 \pm 34*	471 \pm 287*	92 \pm 18*
ig	0	9	283 \pm 31	526 \pm 98	80 \pm 8
	50	9	318 \pm 29*	577 \pm 101*	83 \pm 8*
	100	9	385 \pm 33**	673 \pm 171**	79 \pm 7*

Tab 2. Effect of oxalysine on serum complement C3 level in mice ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

Route	Oxalysine mg/kg	Mice	Complement C3 ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$)
ip	0	16	22 \pm 6
	50	17	27 \pm 7**
	100	17	26 \pm 5**
	200	8	29 \pm 9**
ig	0	9	16 \pm 1
	25	7	17 \pm 1*
	50	8	18 \pm 2**
	100	8	19 \pm 3**

2. 体外试验 ♂性 ICR 小鼠断头处死后, 取脾脏剪碎同上法制成脾细胞悬液加入酶标板孔中, 各孔 Con A 最终浓度均为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, I-677 浓度为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每种浓度做 3 孔, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培育箱中培育 72 h 后同法测定。结果随着 I-677 剂量增加 [^3H] TdR 渗入率逐渐减少, 至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 淋巴细胞转化完全被抑制。如培育孔中不加 Con A, I-677 对淋巴细胞无直接刺激或抑制作用, 与对照组无显著差异。

Tab 3. Effect of oxalysine on spleen lymphocyte blastogenesis in mice ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, * $p < 0.01$**

Route	Oxalysine mg/kg \times d	Mice	[^3H]TdR incorporation (cpm/ 3×10^5 cells)
ip	0	4	16827 \pm 3723
	25 \times 3	4	22613 \pm 3207*
	50 \times 3	4	24612 \pm 2875**
	100 \times 3	4	34304 \pm 3711***
ig	0	18	14500 \pm 1960
	25 \times 5	8	19003 \pm 5143*
	50 \times 5	17	13420 \pm 2386*
	100 \times 5	18	18748 \pm 3632**

对小鼠迟发性超敏反应(DTH)的影响

ICR ♀性小鼠, 出生 8 周, 体重 24 \pm 1.6 g. 于 d 0 每鼠 sc 1×10^7 或 5×10^7 SRBC 致敏, d 0-5 每天 ip I-677 100 mg/kg, d 5 在小鼠右足底内 sc 1×10^8 SRBC 20 μl 攻击, 左足底内 sc 生理盐水 20 μl 作为对照。攻击后 24 h, 齐踝关节剪下小鼠双足称重, 以两足重量差作为 DTH

程度⁽⁸⁾, 进行比较, 结果见表 4。两批实验均证明: 当用 1×10^7 SRBC 致敏小鼠时, I-677 能显著增强 DTH 作用, 但用 5×10^7 或更高浓度的 SRBC 致敏小鼠时, I-677 不再表现增强 DTH 的作用。

Tab 4. Effect of ip oxalysine 100 mg/kg daily \times 6 d on SRBC induced delayed type hypersensitivity (DTH) in mice ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$ compared with control; †† $p < 0.05$, ††† $p < 0.01$ compared with right footpad

	Mice	Weight of footpad (mg)		
		Right (SRBC)	Left (N.S.)	Difference
Control	17	137 \pm 15	127 \pm 11††	10 \pm 7
Oxalysine	18	149 \pm 18**	130 \pm 8*†††	19 \pm 14**

对小鼠 iv 碳粒廓清作用的影响 ICR ♂小鼠, 出生 8 周, 体重 27 \pm SD 0.7 g. I-677 ip 50, 100 mg/kg \times 4 d, 对照组 ip 生理盐水, 每组 9 鼠。于第 4 次给药后 30 min, 经尾静脉 iv 印度墨汁(英国 Winsor & Newton 出品, 批号 120607) 10 ml/kg, 于注射后 2 和 20 min 采血测 680 nm 吸收峰 O. D. 值, 并计算廓清率(K)及吞噬指数(α), 测定和计算方法详见前文⁽⁷⁾。实验结果表明: I-677 对网状内皮系统的吞噬功能无明显影响。

以上每批实验中都称取小鼠胸腺、脾、肝、淋巴结等免疫器官重量, I-677 只在高剂量(>200 mg/kg)时, 才表现胸腺抑制及肝脏增重作用。

讨 论

肝脏能滤过和清除有害的抗原物质从肠道侵入全身, 在机体的免疫防御机能中起着重要作用。慢性肝病时常伴有细胞免疫功能低下, 例如迟发性超敏皮肤试验往往反应降低, 免疫活性蛋白如补体 C3、C4 成分也往往下降, 且与病情的程度有关⁽⁹⁾。本文结果说明, I-677 能提高小鼠淋巴细胞转化率和迟发性超敏反应, 对细胞免疫有促进作用。在适当剂量下, 还能增加脾脏空斑形成细胞、血清溶血素及

IgG, 促进抗体生成, 对补体 C3 水平也有明显的提高。这些免疫功能的增强, 有利于机体对肝炎病毒的消除, 也有利于对肿瘤细胞的杀伤。临床曾观察到, 服用 I-677 后血清转氨酶降至正常的病例中, OT 皮试阳转率和原来低下的淋巴细胞转化率都有所提高; 以 [¹³¹I]BSP 体外扫描测定肝血流及排泄功能, 服药后 9 人中有 8 人明显改善⁽⁶⁾, 说明 I-677 治疗肝炎的作用机理是多方面的, 不仅仅是一个降转氨酶的药物。

I-677 的免疫调节作用与剂量有关, 在小鼠无论注射或口服, 以 50-100 mg/kg 作用较明显, 剂量增大至 400 mg/kg 以上, 连续给药可抑制胸腺及蛋白质合成, 从而抑制免疫反应, 但临床用药仅 10-20 mg/(kg·d), 不可能达到如此高的剂量, 而且前文⁽⁴⁾已报道, L-赖氨酸能对抗 I-677 对蛋白和脂肪代谢的不良影响, 必要时可以合并应用, 以避免万一药物过量时可能引起的副反应。

参 考 文 献

1 张鸿龙、梁淑芳、吴淑云、王富金、顾秀玉、

桂金珠. 抗代谢抗菌素的研究 I. L-4-氧代赖氨酸产生菌——玫瑰绿褐链霉菌 (*Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp.) 的分类鉴定. 微生物学报 1979; 19: 126

2 包琴珠、张海澜、徐少华、胡玉麟、刘树勋、叶蕴芬. 抗代谢抗菌素的研究 II. L-4-氧代赖氨酸的分离与化学结构. 同上 1981; 21: 218

3 乐秀芳、吴富根、胥彬. 抗菌素氧代赖氨酸 (I-677) 的抗肿瘤作用. 科学通报 1979; (1): 47

4 李晓玉、梁惠珍、刘明章, 等. 氧代赖氨酸对实验性肝炎的药理研究. 生物化学与生物物理学报 1979; 11: 151

5 上海市肝炎防治研究协作组临床组. I-677 治疗慢性病毒性肝炎 206 例临床疗效观察. 新医学 1980; 2: 93

6 金筠芳、梁惠珍、曹翠玉、王祖武、舒荣生、李晓玉. 甘蔗多糖的免疫活性. 中国药理学报 1981; 2: 269

7 李晓玉、林子英、朱芃芃、金筠芳. 环磷酰胺对小鼠补体的作用. 同上 1987; 1: 79

8 Descotes J, Tedone R, Evreux JD. Effects of cimetidine and ranitidine on delayed-type hypersensitivity. *Immunopharmacology* 1983; 6: 31

9 姚光弼. 肝病与免疫. 上海免疫学杂志 1983; 3: 185

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Mar, 8 (2): 173-177

Immunopotentiating effects of oxalysine

LI Xiao-Yu, TONG Le-Ming, JIN Yun-Fang, CAO Cui-Yu, LIANG Hui-Zhen, WANG Jia-Fang, ZHU Peng-Peng, WANG Jie-Yi

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT L-4-Oxalysine is an antibiotic agent isolated from a new species of *Streptomyces roseoviridofuscus* n. sp. in China. It inhibited the growth of several kinds of animal transplanted tumors and protected liver injuries from CCl₄ intoxications. Clinical trials showed improvement of liver function as well as liver blood flow in patients of chronic viral hepatitis.

Oxalysine 100 mg/kg ip or ig adminis-

tration to C57/BL mice caused a marked increase of spleen plaque forming cells as well as serum hemolysin and IgG levels. Serum complement C3 is also increased. Oxalysine 50 and 100 mg/kg ip for 3 d or 100 mg/kg ig for 5 d promoted the incorporation rate of [³H]TdR into spleen lymphocytes but showed no direct stimulating effect on lymphocyte blastogenesis *in vitro*. Oxalysine also elevated the SRBC

induced delayed-type hypersensitivity on ICR mice, but had no effect on the phagocytic activity of macrophages. It is therefore considered that oxalysine has the ability of potentiating both humoral and cell mediated immunological responses, which is benefit in ameliorating the immuno-

deficient condition in patients suffered with cancer or chronic viral hepatitis.

KEY WORDS oxalysine; antibody producing cells; hemolysins; complement; lymphocyte transformation; delayed hypersensitivity

