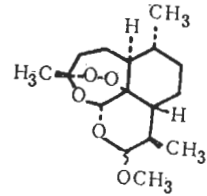


蒿甲醚对红细胞免疫功能的影响

李晓玉、梁惠珍 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 蒿甲醚能增加小鼠和猴疟疾病程中血清总补体和 C3 含量, 使患鼠中 CIC 维持在正常水平。感染疟原虫后, 红细胞膜 C3b 受体功能丧失, 经蒿甲醚治疗则两种花环率超过正常。疟鼠红细胞膜稳定性降低, 对低渗、低 pH、加热和皂素溶血都极为敏感, 蒿甲醚能保持膜的正常强度。因此认为它对感染疟原虫的红细胞免疫功能具有保护和调节作用。



Artemether

关键词 蒿甲醚; 免疫复合物; 补体; 红细胞膜; 补体 3b 受体; 溶血; 食蟹猴疟原虫; 伯氏疟原虫

方法和结果

疟疾的病型和转归与宿主对疟原虫抗原的免疫反应关系很大, 当抗原与机体产生的相应抗体结合后, 血清和组织中出现大量免疫复合物⁽¹⁾, 可激活补体并产生冷球蛋白, 在恶性脑疟的发作中起重要作用⁽²⁾。感染疟原虫后红细胞膜表面蛋白和糖蛋白等成分改变⁽³⁾, 可使膜上受体功能失常, 导致红细胞清除免疫复合物的能力降低, 并使免疫系统自我辨认机理错乱, 产生自身免疫性溶血反应⁽⁴⁾。应用抗疟药物时, 必须注意到对以上免疫功能的影响。

青蒿素是我国创制的抗疟新药⁽⁵⁾, 具有免疫抑制作用⁽⁶⁾, 临床也有用于治疗红斑狼疮等自身免疫病⁽⁷⁾。改造天然青蒿素, 合成了更为高效低毒的蒿甲醚, 对救治脑型疟和抗氯喹恶性疟均有较好疗效⁽⁸⁾。本文研究蒿甲醚对小鼠和猴在感染疟疾后循环免疫复合物(CIC)、血清总补体及 C3 组分含量的动态变化, 并用红细胞 C3b 受体酵母花环和 CIC 花环试验检测其清除 CIC 的能力, 以及蒿甲醚治疗对疟鼠红细胞膜稳定性的影响。

蒿甲醚对小鼠 CIC 的影响 Balb/c(SPF)

小鼠 72 只, ♀♂兼用, 体重 $18 \pm SD 4$ g, 接种伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)的抗氯喹株, 每鼠 ip 7.5×10^8 个感染的 RBC, 治疗组于接种后 1 至 10 d 每日 im 蒿甲醚(昆明制药厂生产) 2 mg/kg, 对照组每日注射等量油溶剂, 于感染后不同天数分别从眼后静脉丛放血, 取新鲜血清 100 μ l 与等量 7% 聚乙二醇(分子量 6000)混合, 放置冰箱 24 h 后, 在 4 $^{\circ}$ C 下 1500 \times g 离心 20 min, 沉淀用 3.5% 聚乙二醇洗 2 次后, 用 Folin 酚试剂测定蛋白质含量, 作为 CIC 含量。另设不感染的正常鼠组以作比较, 结果见表 1。

正常 Balb/c 小鼠 CIC 较低, 感染疟原虫后第 7 天 CIC 显著升高, 随着病程发展至 d 9, 升高更为明显, 患鼠多在此时死亡。蒿甲醚治疗组的 CIC 并不升高, 与正常鼠无差异, 感染后 d 9 较疟鼠 CIC 显著为低, 并继续存活, 至 d 14 CIC 仍维持在正常水平。

恒河猴 3 只, 感染食蟹猴疟原虫(*P. cynomolgi*)后, 血清 CIC 平均为 0.38 ± 0.14 mg 蛋白/ml 血清, iv 蒿甲醚乳剂 32 mg/kg 24 h 后降至 0.16 ± 0.04 mg 蛋白/ml 血清, 相差显著 ($p < 0.05$)。

蒿甲醚对血清总补体和 C3 含量的影响
实验动物同上。总补体测定采用 Meyer 氏免疫

Tab 1. Effects of im artemether 2 mg/kg daily for 3 d on circulating immune complexes (CIC, mg protein/ml serum) and total complement (C, complement hemolysis U/ml serum).

	Mice	Days after infection		
		0	7	9
CIC	Malarial		0.82±0.12(7)***	1.14±0.35(6)***
	Treated	0.53±0.12(8)	0.68±0.18(7)†	0.60±0.20(6)†††
C	Malarial		22±5(3)***	8±3(3)***
	Treated	38±2(5)	49±21(3)†	40±14(3)†††

Number of Balb/c mice in the parentheses. ($\bar{x}\pm SD$) * $p>0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$ compared with normal mice † $p>0.05$, †† $p<0.05$, ††† $p<0.01$ compared with malarial mice.

溶血法,以每 ml 血清半数溶血单位 CH_{50} 表示。小鼠血清补体较低,本文用新鲜兔红细胞代替羊红细胞,以提高灵敏度⁽⁹⁾。

表 1 说明 Balb/c 小鼠感染疟原虫后 d 7 和 d 9,血清总补体 CH_{50} 较正常鼠降低非常显著,而蒿甲醚治疗组总补体值维持在正常水平,感染后 d 9 与患鼠比较,相差非常显著。

3 只感染疟原虫的恒河猴,iv 蒿甲醚乳剂 32 mg/kg 24 h 或 im 蒿甲醚油剂 8 mg/kg 后,血清 CH_{50} 也都有不同程度的升高(图 1)。

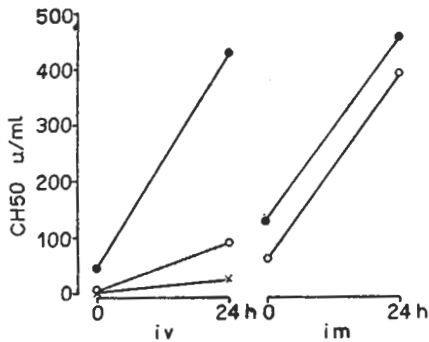


Fig 1. Serum total complement level increased after artemether emulsion 32 mg/kg iv or oil solution 8 mg/kg im on 3 monkeys inoculated with *P. cynomolgi*.

用酵母多糖-C3 复合体法制备兔抗小鼠 C3 抗血清,以琼脂单向免疫扩散法测定小鼠血清 C3 含量。2%琼脂糖(Serva)与 1:40 稀释的抗血清等量混合浇板;待测血清用生理盐水 1:10 稀释,琼脂板每孔加入 10 μ l, 37°C 扩散 24 h,然后漂洗染色,以正常小鼠混合血清

作标准曲线,计算 C3 含量。

Balb/c 小鼠感染疟原虫后,随着病程发展,血清 C3 水平逐渐下降,9 d 后陆续死亡,而蒿甲醚治疗鼠 C3 始终在正常水平,与未治疗组相差显著(表 2)。

Tab 2. Effect of im artemether 2 mg/kg daily for 10 d on serum complement 3(mg/ml \pm SD) of Balb/c mice. *† were same to Tab 1.

Days after infection	Malarial	Treated
0	1.9±0.6(11)	1.9±0.6(11)
5	1.3±0.3(3)*	2.1±0.5(3)†
7	1.3±0.3(10)***	1.8±0.4(13)††
9	0.9±0.3(9)***	1.6±0.4(9)†††
12	died	2.7±1.1(6)
14	died	2.1±0.8(9)

蒿甲醚对红细胞花环形成的影响 酵母菌煮沸后,其表面多糖外露,可激活并吸附血清 C3b,与红细胞膜上 C3b 受体结合形成花环,用以测定红细胞上 C3b 受体的相对数量。参照并改良文献(10)方法,将酵母菌干粉的生理盐水悬浮液煮沸 30 min,冷后离心,用盐水洗涤 3 次后,超声处理 1-2 min,使其分散,镜下计数,稀释成 1×10^{10} /ml,分装置 -20°C 冰箱保存。临用前加入等量小鼠血清,37°C 温育 15 min 致敏,配成 5×10^9 /ml。

Balb/c 小鼠 17 只,体重 $19\pm SD 3$ g 在感染疟原虫后 2-4 d im 蒿甲醚油剂 2 mg/kg,于 d 8 放血,EDTA 抗凝,血细胞洗 3 次后稀释

成 1×10^8 /ml, 取上述致敏酵母菌及小鼠红细胞悬液各 100 μ l, 在 37°C 温育 30 min 后加 2.5% 戊二醛 1 滴固定, 涂片吹干后染色镜检, 计数 200 个红细胞, 以结有 3 个以上酵母菌者为花环, 计算 C3b 受体花环率。不经小鼠血清致敏的酵母菌, 可直接粘附于红细胞膜上游离的 C3b 而形成花环, 称为红细胞 CIC 花环, 其数量代表红细胞清除 CIC 的能力(表 3)。

Tab 3. Effect of im artemether 2 mg/kg daily for 3 d on mouse RBC rosette formation. $\bar{x} \pm SD$. *† were same to Tab 1.

	Mice	C3b receptor rosette(%)	CIC rosette (%)
Normal	7	22 \pm 15	10 \pm 9
Malarial	5	0.9 \pm 0.7**	0.9 \pm 0.9***
Treated	5	38 \pm 15**†††	26 \pm 9**†††

在感染疟原虫后红细胞以上两种花环率都明显降低, 几至消失。用蒿甲醚治疗后则显著升高, 甚至超过正常鼠。

蒿甲醚对红细胞膜稳定性的影响 ICR 小鼠接种疟原虫后 +2 至 +4 d 每日 im 蒿甲醚油剂 2 mg/kg, 于 d 6 及 d 8 眼眶取血, EDTA 抗凝, 血细胞洗 3 次后制成 10% RBC 悬液, 用低渗(0.55% NaCl), 低 pH(pH 5.4)、加热(50°C, 30 min) 及皂素(0.1 mmol/L) 四种溶血方法, 测验红细胞膜稳定性。离心后上清液在

541 nm 测定溶血程度光密度(OD)(表 4)。感染疟原虫后, 小鼠红细胞膜稳定性降低, 对上述 4 种溶血方法均敏感, 溶血值升高非常明显。蒿甲醚治疗后, 大大提高了红细胞膜的稳定性, 不仅在低渗、低 pH 和加热引起的溶血反应中能保持正常的膜张力和强度, 在皂素性溶血试验中, 与疟鼠更有明显差别。

讨 论

红细胞不仅具有呼吸功能, 还具备免疫功能, 人体血循环中 95% 的 C3b 受体附属在红细胞膜上, 它们清除致病性 CIC 的能力是白细胞的 500 至 1000 倍⁽¹¹⁾。感染疟原虫后, 红细胞膜成分裂解为低分子蛋白或糖蛋白, 正常未感染的红细胞也发生同样变化⁽³⁾, 致使其免疫功能受损, 引起贫血、肾炎及脾肿大综合症, 这是疟疾的主要免疫病理基础。

本文实验证明: 小鼠和猴在感染疟原虫后, 随着病程发展, 血清中 CIC 逐渐增高而总补体和 C3 水平则相应下降, 蒿甲醚阻止了这种变化。补体 C3 肽段(C3b) 可结合在 IC 网络上, 破坏其立体构型, 引起 IC 的溶解⁽¹²⁾, 并可通过与红细胞表面 C3b 受体的结合, 使 CIC 得以清除, 从而防止了 IC 引起的病理过程。C3b 还具有调理和影响红细胞流变性质的作用⁽⁴⁾, 有利于肝脾对感染红细胞的滞留和吞噬⁽¹³⁾。

Tab 4. Effect of im artemether 2 mg/kg daily for 3 d on 4 kinds of hemolysis. Number of mice in parenthesis. Optical density (OD), $\bar{x} \pm SD$. *† were same to Tab 1.

Hemolysis by	d after infection	Normal	Malarial	Treated
0.55% NaCl	6	0.44 \pm 0.14 (31)	1.27 \pm 1.08 (24)***	1.01 \pm 0.83 (28)†
	8	0.46 \pm 0.11 (17)	0.71 \pm 0.19 (15)***	0.66 \pm 0.15 (14)†
pH 5.4	6	0.71 \pm 0.48 (31)	1.27 \pm 0.77 (24)***	0.72 \pm 0.31 (28)†††
	8	0.55 \pm 0.19 (12)	0.86 \pm 0.32 (7)***	0.67 \pm 0.21 (11)†
50°C 30 min	6	0.54 \pm 0.38 (28)	0.57 \pm 0.32 (23)*	0.57 \pm 0.31 (26)†
	8	0.37 \pm 0.12 (17)	0.54 \pm 0.20 (15)***	0.34 \pm 0.22 (14)††
saponin 0.1 mmol/L	6	0.28 \pm 0.07 (23)	0.77 \pm 0.33 (18)***	0.42 \pm 0.14 (21)†††
	8	0.17 \pm 0.06 (12)	0.63 \pm 0.26 (11)***	0.26 \pm 0.26 (11)†††

鉴于 C3b 在红细胞免疫功能上的重要性,血清 C3 水平可以作为评价抗疟药物疗效的主要免疫指标之一,蒿甲醚救治脑型等凶险性疟疾有效的机理可能与此有关。

红细胞花环率试验证明,感染疟原虫后红细胞膜上 C3b 受体和 CIC 花环率都明显减少,不能有效地清除 CIC。经蒿甲醚治疗鼠,花环率显著升高,甚至超过正常鼠,这可能是一种代偿性反应,与上述蒿甲醚治疗后 CIC 降低、补体升高的结果相符合。红细胞膜稳定性试验指出,蒿甲醚对抗皂素性溶血的效果较为明显,皂素是一种去垢剂,可引起膜受体的解离,蒿甲醚的这种作用可能也与它保护膜受体完整的作用有关。

过去几年对红细胞膜结构和功能有了新的认识,同时对疟原虫抗原在不同发育阶段的免疫特性也有了新的了解,提示这种免疫反应发生在红细胞本身⁽⁴⁾。蒿甲醚不仅是疟原虫红内期裂殖体杀灭剂⁽⁸⁾,也能纠正疟原虫引起的红细胞免疫功能缺陷,值得进一步试用于其他红细胞免疫性疾病和伴有 CIC 升高的自身免疫病的治疗。

致谢 张素胤同志提供 SPF 小鼠,吕宝芬、朱梅英同志协助感染疟原虫,曾衍霖、姜纪荣同志惠赠猴血。

参 考 文 献

- 1 Junc CH, Contreras CE, Perrin LC, Lambert PH, Miescher PA. Circulating and tissue bound immune complex formation in murine malaria. *J Immunol* 1979; 122 : 2154
- 2 Adam C, Géniteau M, Gougerot-Pocidaló M,

- et al.* Cryoglobulins, circulating immune complexes and complement activation in cerebral malaria. *Infect Immun* 1981; 31 : 530
- 3 Howard RJ. Alterations in the surface membrane of red blood cells during malaria. *Immunol Rev* 1982; 61 : 67
- 4 Jarra W. Protective immunity to malaria and antierythrocyte autoimmunity. In: Ciba Foundation Symposium 94: *Malaria and the red cell*. 1st ed. London: Pitman, 1983 : 137-58
- 5 Qinghaosu antimalaria coordinating research group. Antimalaria studies on qinghaosu. *Chin Med J* 1979; 92 : 811
- 6 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, 10 : 928
- 7 庄国康、邹铭西、许铎、朱毅。青蒿治疗盘形红斑狼疮临床研究。中华医学杂志 1982, 62 : 365
- 8 顾浩明、刘明章、吕宝芬,等。蒿甲醚在动物的抗疟作用和毒性。中国药理学报 1981, 2 : 138
- 9 Van Dijk H. Estimation of classical pathway of mouse complement activity by use of sensitized rabbit erythrocytes. *J Immunol Methods* 1980; 39 : 257
- 10 郭峰、虞紫茜、赵中平。红细胞免疫功能的初步研究。中华医学杂志 1982, 62 : 715
- 11 Siegel I, Liu TL, Gleicher N. The red-cell immune system. *Lancet* 1981; 2 : 556
- 12 Nussenzweig V. Interaction between complement and immune complexes: Role of complement in containing immune complex damage. In: Fougereau M, Dausset J, eds. *Progress in immunology; IV*. 1st ed. London: Academic Press, 1980; 1044-56
- 13 Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, Van Aman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erythrocyte immune complex clearing mechanism. *J Clin Invest* 1983; 71 : 236

Effects of artemether on red blood cell immunity in malaria

LI Xiao-yu, LIANG Hui-zhen

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

ABSTRACT Balb/c SPF mice were inoculated with 7.5×10^6 chloroquine-resistant *Plasmodium berghei*-infected RBC. Their serum circulating immune complex (CIC) increased on d 7 and peaked on d 9. A closely associated depression of serum total complement and C 3 to abnormal low levels were found. Mice died soon after. Methyl-dihydro-artemisinin (artemether), a new antimalarial drug with high activity and low toxicity im 2 mg/kg/d \times 10 d, maintained normal serum CIC and complement levels, and the mice survived. By means of zymosan rosette formation test, C 3 b receptors on mouse RBC decreased from $22 \pm 15\%$ to $0.9 \pm 0.7\%$ in malarial mice, but recovered to $38 \pm 15\%$ in artemether-treated mice. The erythrocytes of infected mice

were very sensitive to low osmosis (0.55% NaCl), low pH (5.4), heat (50°C, 30 min) and saponin (0.1 mmol/L) hemolysis. Artemether increased the membrane stability of plasmodia-infected RBC, especially in saponin hemolysis. It is suggested that artemether exerts some modulating effects on RBC immunity other than its schizonts killing effect. Normalized serum C 3 level and C 3 b receptors are favorable in the clearance of pathogenic CIC and malarial antigens.

KEY WORDS artemether; immune complex; complement; erythrocyte membrane; complement 3 b receptors; hemolysis; *Plasmodium cynomolgi*; *Plasmodium berghei*