

## 齐墩果醇酸对免疫系统及 I 型变态反应的影响

戴岳<sup>1</sup>、杭秉茜、李佩珍、谭立武<sup>2</sup> (中国药科大学中药药理教研室, 南京 210009, 中国)

## Effects of oleanolic acid on immune system and type I allergic reaction

DAI Yue<sup>1</sup>, HANG Bing-Qian, LI Pei-Zheng, TAN Li-Wu<sup>2</sup>

(Department of Pharmacology of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** Oleanolic acid (OLA) 50, 100 mg/kg sc antagonised the inhibitory effect of cortisone on the weights of spleen and thymus, decreased the clearance rate of charcoal particles in mice. The production of serum specific antibody hemolysin was not clearly affected by OLA. The administration of OLA 100 mg/kg enhanced the development of serum antibody immunoglobulin G in mice and showed marked inhibition on the hemolytic activity of the total complement by classical pathway in guinea pigs.

In addition, the homologous passive cutaneous anaphylaxis in mice or rats and the degranulation of mast cells of calvarial periosteum in rats were significantly prevented by OLA 50, 100 mg/kg. The increased capillary permeability in the rat skin caused by intradermic injection of histamine was also reduced by OLA 100 mg/kg. These results indicate that OLA inhibited the type I allergic reaction.

**KEY WORDS** oleanolic acid; reticuloendothelial system; complement; immunoglobulin G; hemolysins; passive cutaneous anaphylaxis; mast cells; capillary permeability

**摘要** 齐墩果醇酸(OLA)对抗可的松所致小鼠胸腺、

Received 1988 Jun 1 . Accepted 1988 Oct 27

<sup>1</sup> Postgraduate, 1983

<sup>2</sup> 湖南省长沙中药厂, 长沙 410007

脾脏萎缩, 升高抗体 IgG 含量, 对溶血素抗体无明显影响, 减慢网状内皮系统对炭粒的廓清速率, 降低豚鼠血清补体总量; OLA 抑制大鼠、小鼠同种被动皮肤过敏反应及大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒, 降低组织胺所致大鼠皮肤毛细血管通透性增高, 表明 OLA 抑制 I 型变态反应。

**关键词** 齐墩果醇酸; 网状内皮系统; 补体成分; 免疫球蛋白 G; 溶血素类; 被动皮肤过敏; 肥大细胞; 毛细血管渗透性

齐墩果醇酸(oleanolic acid, OLA)属五环三萜类化合物, 可降低 CCl<sub>4</sub> 肝损伤大鼠血清谷丙转氨酶及肝内甘油三酯的蓄积<sup>(1)</sup>, 临床用于治疗急慢性肝炎。本文观察 OLA 对免疫系统及 I 型变态反应的影响, 探讨 OLA 抑制变态反应的作用机理。

## MATERIALS

OLA 白色粉末, 长沙中药厂产品, 纯度为 97.34%, 以 2% 吐温 80 配成混悬液; 印度墨汁, 上海向群中学化学试剂厂产品; 冻干羊抗小鼠 IgG 抗血清, 上海生物制品研究所产品(批号 8601); 环磷酰胺, 上海第十二制药厂产品; 色甘酸钠(DSCG)粉雾剂, 上海第二十一制药厂产品; 磷酸组胺, 上海生物化学研究所产品。小鼠、大鼠均由南京药物研究所动物房提供, 豚鼠由本校动物房提供。

## METHODS AND RESULTS

**对免疫器官重量的影响** ♂昆明种小鼠

55只, 体重 $19.9 \pm SD 1.7$  g, 随机分为6组, 每组7至10只。对照组, 2%吐温80 sc 10 ml/kg; 阳性对照组于实验组给药d5, im 醋酸可的松 25 mg/kg; 实验组, 分别sc OLA 50, 100 mg/(kg·d)×5, 末次给药后24 h, 称胸腺、脾脏重量。结果OLA对抗可的松造成的小鼠胸腺、脾脏萎缩, 对正常小鼠的脾脏无明显影响, OLA 100 mg/kg使正常小鼠胸腺有减重趋势(Tab 1)。

Tab 1. Effects of oleanolic acid (OLA) sc and cortisone im on the weights of spleen and thymus in mice.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs control; † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  vs cortisone.

OLA (mg/kg × d)	Cortisone	n	Thymus (mg/g body wt)	Spleen
2% Tween 80 10 ml/kg	—	9	$5.9 \pm 0.9$	$8.6 \pm 1.3$
50 × 5	—	9	$5.6 \pm 1.0^*$	$8.2 \pm 2.7^*$
100 × 5	—	10	$4.9 \pm 1.7^*$	$8.6 \pm 1.9^*$
—	25 × 1 (d 5)	7	$1.5 \pm 0.6^{***}$	$5.6 \pm 1.1^{***}$
50 × 5	25 × 1	10	$2.5 \pm 0.6^{†††}$	$7.2 \pm 1.9^{††}$
100 × 5	25 × 1	10	$4.3 \pm 0.7^{††}$	$8.1 \pm 1.2^{††}$

**对小鼠炭粒廓清作用的影响** ♂昆明种小鼠42只, 体重 $20.6 \pm 1.7$  g, 随机分为4组, 每组7至13只。OLA的给药剂量及方式同上, qd×5d; 阳性对照组于实验组给药d3始, ip 环磷酰胺 50 mg/(kg·d)×3。末次给药后24 h, 每鼠尾iv 印度墨汁 0.2 ml, 2和15 min后, 分别由眼后静脉丛取血 20 μl, 溶于2 ml 0.1% NaHCO<sub>3</sub> 溶液中, 静置1 h, 650 nm处测吸收率(A), 计算廓清指数  $K = (\log A_1 - \log A_2) / (t_2 - t_1)$  及校正廓清指数  $\alpha = \sqrt[3]{K} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$ 。结果OLA 50, 100 mg/kg组的K值及α值均明显小于对照组(Tab 2)。

**对豚鼠血清补体总量的影响** 豚鼠16只, ♀♂兼用, 体重 $293 \pm 26$  g, 随机分为2组, 每组8只。给药组sc OLA 100 mg/(kg·d)×4, 末次给药后1 h, 心脏无菌采血, 分离血清。

Tab 2. Effects of OLA sc and cyclophosphamide (Cy) ip on clearance rate of iv charcoal particles in mice.  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*\* $P < 0.01$  vs control.

Drug	(mg/kg × d)	n	$10^3 \times K$	α value
2% Tween 80 10 ml/kg	—	11	$33 \pm 8$	$4.7 \pm 0.5$
OLA	50 × 5	13	$23 \pm 8^{***}$	$3.5 \pm 0.6^{***}$
	100 × 5	11	$17 \pm 5^{***}$	$2.7 \pm 0.5^{***}$
Cy	50 × 3 (d 3-5)	7	$8 \pm 5^{***}$	$3.0 \pm 0.5^{***}$

按改良半量法<sup>(2)</sup>测血清补体总量, 计算半数溶血值(HC<sub>50</sub>)溶血单位(U/ml)。结果对照组、OLA 100 mg/kg组的HC<sub>50</sub>分别为 $498 \pm 148$ ,  $193 \pm 67$  ( $P < 0.01$ ), 表明OLA 100 mg/kg显著降低豚鼠血清补体总量。

### 对小鼠血清抗体的影响

**1 对溶血素抗体的影响** ♂ ICR 小鼠24只, 体重 $20.6 \pm 1.7$  g, 随机分为3组, 每组8只。给药组于绵羊红细胞(SRBC)致敏前d2始, 分别sc OLA 50, 100 mg/(kg·d)×7。末次给药后24 h, 小鼠眼眶采血, 分离血清, 按比色法<sup>(3)</sup>测定并计算样本的HC<sub>50</sub>。结果对照组、OLA 50, 100 mg/kg组HC<sub>50</sub>分别为 $243 \pm 17$ ,  $246 \pm 12$  ( $P > 0.05$ ),  $236 \pm 25$  ( $P > 0.05$ )。表明OLA对小鼠溶血素抗体影响不显著。

**2 对抗体IgG含量的影响** ♀ ICR 小鼠32只, 体重 $20 \pm 2$  g, 随机分为4组, 每组8只。实验组分别sc OLA 50, 100 mg/(kg·d)×6, 阳性对照组于实验组给药d4, ip 环磷酰胺 100 mg/kg。末次给药后24 h, 小鼠眼后静脉丛采血, 分离血清, 按琼脂单向扩散法<sup>(4)</sup>测IgG含量, IgG的量以沉淀环直径或面积表示。结果OLA 100 mg/kg显著升高小鼠血清IgG含量, OLA 50 mg/kg作用不明显(Tab 3)。

### 对同种被动皮肤过敏反应(PCA)的影响

**1 对小鼠同种PCA的影响** 于小鼠两后足垫分别sc以氢氧化铝凝胶配制的0.25%天花粉液 50 μl, 致敏后d14将小鼠放血处死, 制备小鼠抗天花粉抗血清, -20℃保存备用。另取昆明种小鼠28只, ♀♂兼用, 体重 $20.7 \pm 1.6$  g, 随机分为3组, 每组9至10只。给药组

Tab 3. Effects of OLA sc and Cy ip on serum immunoglobulin G in mice.  $n=8$ .  $\bar{x}\pm SD$ , \* $P>0.05$ , \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$  vs control.

Drug	(mg/kg × d)	Diffusing circle	
		Diameter(mm)	Area(mm <sup>2</sup> )
2% Tween	80 10 ml/kg	7.8±0.9	48±11
OLA	50 × 6	7.8±0.8*	48±10*
	100 × 6	9.0±1.1**	64±16**
Cy	100 × 1(d4)	6.0±0.8***	28±6***

sc OLA 50, 100 mg/(kg·d) × 5, 于给药 d 3, 将以 3 倍容量生理盐水稀释的抗血清于小鼠腹部皮内注射 2 点, 每点 30 μl, 48 h 后小鼠尾 iv 0.25% 天花粉液(以 1% Evans 蓝生理盐水溶液配制) 0.2 ml 攻击, 20 min 后处死小鼠, 翻转腹部皮肤, 将蓝斑点剪下, 剪碎后置丙酮-生理盐水(7:3) 混合液 5 ml 中, 放置至次日, 取上清液于 610 nm 处测定吸收率, 求得每一蓝斑的 Evans 蓝渗出量。结果不同剂量 OLA 均显著抑制小鼠同种 PCA (Tab 4)。

Tab 4. Effects of OLA and disodium cromoglycate (DSCG) iv on homologous cutaneous anaphylaxis (PCA), OLA sc for 5 d in mouse PCA and for 3 d in rat PCA. 8-10 animals/group.  $\bar{x}\pm SD$ . \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$  vs control (2% Tween 80 10 ml/kg).

Drug	(mg/kg)	Amount of Evans blue (μg/site)	
		Mice	Rats
Control		24±6	46±8
OLA	50	14±10**	28±7***
	100	12±9***	18±8***
DSCG	25	—	13±4***

2 对大鼠同种 PCA 的影响 于大鼠各足垫 sc 0.25% 天花粉液 0.1 ml, 随即 ip 百日咳疫苗 10<sup>8</sup>, 致敏后 d 12, 放血处死大鼠, 制备大鼠抗天花粉抗血清, -20℃ 保存备用。另取♂ Wistar 大鼠 32 只, 体重 186±19 g, 随机分为 4 组, 每组 8 只。各鼠背部皮内注射以生理盐水 1:20 稀释的上述抗血清, 每点 0.1 ml, 共 2 点。1 h 后给药组 sc OLA 50, 100 mg/(kg·d) × 3; 阳性对照组于抗原攻击前 30 min, 尾 iv DSCG 25 mg/kg。OLA 组末次给药后 1 h,

各鼠尾 iv 0.1% 天花粉液(以 1% Evans 蓝生理盐水溶液配制) 10 mg/kg, 20 min 后放血处死大鼠, 同小鼠 PCA 法, 测各蓝斑的染料渗出量。结果不同剂量 OLA 均显著抑制大鼠同种 PCA (Tab 4)。

对大鼠颅骨骨膜肥大细胞脱颗粒的影响 参见文献<sup>(4)</sup>取♂ Wistar 大鼠 28 只, 体重 165±12 g。OLA 及 DSCG 的给药剂量及方式同上, 给药后 d 2, 各鼠颅顶 sc 以生理盐水 1:60 稀释的大鼠抗天花粉抗血清 0.1 ml, 24 h 后各鼠尾 iv 0.1% 天花粉液 1 ml, 30 min 后处死大鼠, 剪下头顶部皮肤, 将颅盖骨剪下, 立刻浸泡于无水乙醇中, 1 h 后移至甲醇中固定 6 h, 以 2.5% 中性红(用无水乙醇配制) 染色 30 min, 经生理盐水冲洗后, 将颅骨骨膜平铺于载玻片上, 置显微镜下观察, 计数 200 个肥大细胞中脱颗粒细胞数, 计算脱颗粒肥大细胞百分数。结果不同剂量 OLA 均明显抑制肥大细胞脱颗粒 (Tab 5)。

Tab 5. Effects of OLA sc and DSCG iv on degranulation of mast cells of calvarial periosteum in rats.  $n=7$ ,  $\bar{x}\pm SD$ . \*\*\* $P<0.01$  vs control.

Drug	(mg/kg × d)	Degranulation (%)	Inhibition (%)
2% Tween	80 10 ml/kg	94±5	
OLA	50 × 3	58±14***	38
	100 × 3	50±9***	47
DSCG	25 × 1	47±12***	50

#### 对大鼠皮肤毛细血管通透性的影响 ♂

Wistar 大鼠 12 只, 体重 138±15 g, 随机分为 2 组, 每组 6 只。给药组 sc OLA 100 mg/(kg·d) × 3, 末次给药后 1 h, 沿大鼠腹中线两侧皮内注射磷酸组胺 0.05 μg/0.05 ml, 立刻尾 iv 0.1% Evans 蓝生理盐水溶液 10 mg/kg, 15 min 后剥离腹部皮肤, 用 PCA 法测出蓝斑的染料渗出量。结果对照组、给药组大鼠蓝斑的染料渗出量分别为 4.4±1.0, 2.3±0.6 ( $P<0.01$ ), 表明 OLA 明显抑制组胺所致大鼠皮肤毛细血管通透性增加。

## DISCUSSION

血液中炭粒主要在肝脾网状内皮系统清除,环磷酸胺使小鼠脾脏明显萎缩,而OLA作用不显著,提示两者抑制碳粒廓清速率的作用机理有不同之处,补体组分的合成主要在肝脾等单核巨噬细胞系统<sup>(6,8)</sup>,OLA降低豚鼠血清补体活性,表明它可能对单核巨噬系统的功能具有抑制作用。

补体是机体防御机理的一个重要组成部分,也在人类某些变态反应性及自身免疫性疾病中起着重要作用,假使寻得低毒有效的抗补体药物,可解除或减轻这些免疫性损伤<sup>(7,8)</sup>。作者前文报道<sup>(9)</sup>OLA抑制II, III, IV型实验性变态反应,其中III型变态反应为免疫复合物介导的补体依赖性反应<sup>(10)</sup>,OLA对以SRBC致敏小鼠的溶血素抗体(主要为IgM)的产生无明显影响,但升高正常小鼠血清抗体IgG的含量,表明OLA对抗体IgM, IgG的产生无抑制作用,不能阻止免疫复合物形成,仅由于它降低补体活性,消除了免疫复合物所致的组织损伤。

小鼠和大鼠同种被动皮肤过敏反应属于I型变态反应,OLA抑制I型变态反应的作用机理可能涉及两个方面:其一是稳定肥大细胞膜,抑制肥大细胞脱颗粒,减少炎症介质的释放;其二是直接对抗炎症介质的作用,如抑制组胺引起的大鼠皮肤毛细血管通透性增加等。

前文<sup>(9)</sup>及本文实验结果表明OLA是一广谱的抗变态反应药物。

**致谢** 本校1987届毕业生孟庆玉同志参加部分实验工作;南京铁道医学院药理教研室吴芬芬老师指导补体测定试验。

## REFERENCES

- 1 Ma XH, Zhao YC, Yin L, Han DW, Ji CX. Studies on the effect of oleanolic acid on experimental liver injury. *Acta Pharm Sin* 1982; 17 : 93
- 2 Li X, Vogt W. Activation of the classical complement pathway by a polysaccharide from sugar cane. *Immunopharmacology* 1982; 5 : 31
- 3 Dai Y, Hang BQ, Li PZ. Effect of fructus ligustri lucidi on immune system of mice. *J Chin Pharm Univ* 1987; 18 : 301
- 4 Xie QM, Bian RL. A new method for screening inhibitors of mediator releasing in anaphylaxis — Rat calvarian periosteum method. *J Zhejiang Med Univ* 1981; 10 : 87
- 5 Whaley K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 1980; 151 : 501
- 6 Strunk RC, Kunke KS, Giclas PC. Human peripheral blood monocyte-derived macrophages produce haemolytically active C3 *in vitro*. *Immunology* 1983; 49 : 169
- 7 Johnson BJ. Complement: A host defense mechanism ready for pharmacological manipulation. *J Pharm Sci* 1977; 66 : 1367
- 8 Cochrane CG, Müller-Eberhard HJ, Aikin BS. Depletion of plasma complement *in vivo* by a protein of cobra venom: Its effect on various immunological reactions. *J Immunol* 1970; 195 : 55
- 9 Dai Y, Hang BQ, Meng QY, Ma SP, Tan LW. Inhibition of hypersensitivity reactions by oleanolic acid. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 562
- 10 Nagai H, Shimazawa T, Matsuura N, Koda A. Immunopharmacological studies of the aqueous extract of *Cinnamomum cassia* (CCAq) I. Anti-allergic action. *Jpn J Pharmacol* 1982; 32 : 813