银耳多糖对小鼠免疫功能的影响

夏　冬、林志彬　（北京医科大学药理教研室，北京 100083，中国）

提要　银耳多糖(TP)50，100，150和200 μg/ml能显著促进刀豆素A(Con A)诱导的淋巴细胞增殖。TP不影响氢可的松对淋巴细胞增殖反应的抑制作用。TP 50和100 mg/kg ip qd×5分别使羊红细胞诱导的小鼠空斑形成细胞(PFC)增加77.6%和81.8%。TP 150和200 μg/ml使小鼠脾细胞培养上清液中白细胞介素2的活性降低。TP 50 μg/ml可促进Con A诱导的14月龄小鼠淋巴细胞增殖。TP 50 mg/kg ip使14月龄老年小鼠PFC增加47.1%。

关键词　银耳；多糖；淋巴细胞；氢可的松；刀豆球蛋白A；空斑测定；白细胞介素2

*　*　*　*　*　*

中国药理学报　*Acta Pharmacologica Sinica*　1989 Sep; 10 (5): 457-460

氨茶碱对小鼠免疫功能的影响

刘　发、边　棣、郑慧琴、程瑞芬　（新疆医学院药理教研室，乌鲁木齐 830054，中国）

Influence of aminophylline on immune function of mice

LIU Fa, BIAN Di, ZHENG Hui-Qin, CHENG Rui-Fen
(*Department of Pharmacology, Xinjiang Medical College, Ürümqi 830054, China*)

ABSTRACT　The effects of aminophylline (Ami) on immune systems in normal NIH mice were studied. Ami ig 25, 50 and 100 mg/(kg·d) ×8-10 d increased hemolytic ability of plaque forming cells and antibody concentration while it decreased the delayed type hypersensitivity (DTH) reaction and peripheral white blood cells phagocytosing function. Ami 1, 5, 10 μg/ml also promoted lymphocyte transformation of [*methyl*-^{3}H] TdR incorporation induced by PHA *in vitro*.

KEY WORDS　aminophylline; hemolysins; delayed hypersensitivity; lymphocyte transformation; phagocytosis

提要　氨茶碱(aminophylline, Ami) 25, 50, 100 mg/kg可提高正常NIH小鼠空斑形成细胞的溶血能力，促进抗体生成；抑制SRBC诱导的足垫迟发型超敏反应，降低[*methyl*-^{3}H]TdR参入的全血白细胞吞噬白色葡萄球菌的作用。Ami 1, 5, 10 μg/ml在体外可促进PHA诱导的[*methyl*-^{3}H]TdR参入的淋巴细胞转化。

关键词　氨茶碱；溶血素；迟发型超敏感性；淋巴细胞转化；吞噬作用

Received 1988 Jun 27　Accepted 1989 Apr 5

氨茶碱(Ami)是腺苷受体(adenosine

receptors, AdR)的拮抗剂。各种免疫活性细胞都有 AdR, Ami 可通过阻断 AdR 影响多种免疫功能[1,2]，最典型的例证是腺苷脱氨酶缺乏，发生合并性 T 和 B 淋巴细胞免疫缺陷症。但报道不一，多数临床研究表明，Ami 对机体非特异性免疫有抑制作用，并可使哮喘患者的抑制性 T 细胞(T_s)增多[3,4]。本文经在体和离体实验，探讨了 Ami 对小鼠免疫功能的影响。

MATERIALS

NIH 小鼠，由新疆计划生育研究所动物室提供，♀♂兼用。

氨茶碱水针剂，北京制药厂出品。植物血凝素(PHA)美国 DIFCO 公司出品，批号 732413。RPMI-1640 培养基，美国 GIBCO 公司出品。[*methyl*-^{3}H]TdR, 740 GBq/mmol, 中国科学院上海原子核研究所出品。6 巯基嘌呤(6 MP)片剂，上海第七制药厂出品。地塞米松(dexamethasone, Dex)针剂，江苏常州第二制药厂出品。

白色葡萄球菌肉汤培养液，由新疆医学院微生物学教研室提供。49 型玻璃纤维滤膜，上海红光造纸厂出品。

METHODS AND RESULTS

对空斑形成细胞溶血能力的影响 小鼠 46 只，体重 22±SD 3 g，随机分组，ig 给药，次日用 SRBC (SRBC : NS, 3:5, vol:vol) 悬液 ip 致敏小鼠，末次给药 1 h 后，拉脱颈椎处死，剖腹取脾。以磷酸缓冲生理盐水 (PBS)液洗脾细胞悬液，700×g 离心 5 min，重悬为 4×10^6/ml，混匀。每管加入悬液 1 ml, SRBC 1 ml, 1:5 补体 1 ml。另设不加补体的对照管。37℃温育 1 h, 1600×g 离心 10 min, 吸取上清液 1 ml, 加 3 ml Drabkin 试剂，用 72-1 型分光光度计测吸收率 (absorbance, *A*), λ = 540 nm[5]。结果 Ami 的 3 个剂量组均提高空斑形成细胞的溶血能力，作用有剂量依赖关系。Dex 减弱空斑形成细胞的溶血能力 (Tab 1)。

Tab 1. Effects of aminophylline (Ami) and dexamethasone (Dex) mg/(kg·d) × 8 d on hemolytic ability of plaque forming cells in mice and on serum hemolysin concentration (HC) in mice. Number of mice in parentheses. $\bar{x}\pm$SD. $^{***}P<0.01$ *vs* NS, $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.01$ *vs* Dex.

	(mg/kg)	Absorbance	HC_{50}
NS	—	0.21±0.02(9)	187±27(10)
Dex	5	0.14±0.02(9)***	80±27(8)***
Ami	25	0.28±0.02(9)***†††	287±47(8)***†††
Ami	50	0.32±0.02(10)***†††	293±27(10)***†††
Ami	100	0.35±0.03(9)***†††	313±33(8)***†††

对血清溶血素形成的影响 小鼠分组和给药方法同上。给药后次日 ip SRBC 悬液免疫小鼠。末次给药 1 h 后，小鼠眼眶取血，放置 1 h, 700×g 离心 5 min 分出血清，用生理盐水稀释 800 倍。取血清、5% SRBC 和 1:5 豚鼠血清混匀。另设以生理盐水代替血清的空白管。37℃温育 30 min, 700×g 离心 5 min, 每管取上清 1 ml, 加 Drabkin 试剂 3 ml 混匀，10 min 后测 *A* 值(λ = 540 nm)。按 HC_{50} = (样品的吸收率值/半数溶血时的吸收率值) × 血清稀释倍数式算出各管的溶血素浓度[6,7]。结果，Ami 3 个剂量组均能明显提高溶血素含量，Dex 组则降低溶血素含量(Tab 1)。

对迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)的影响 小鼠 45 只，体重 23±3 g，分组与给药方法同前。给药前 1 h 用 5% SRBC 每鼠 50 μl 左后足垫 sc 免疫小鼠，于 d 7 以 5%SRBC 每鼠 50 μl 右后足垫 sc 攻击，用千分卡尺记录攻击前和攻击后 24 h 右后足垫厚度，以其差值表示肿胀度[8]。结果表明，Ami 3 个剂量组均抑制 DTH 反应，但抑制程度均比 Dex 低 (Tab 2)。

对 [*methyl*-^{3}H]TdR 参入的淋巴细胞转化的影响 无菌条件下小鼠心脏取血，每鼠 0.3 ml 置入 3 ml 含肝素和小牛血清的 RPMI-1640 培养液中，10 瓶为一组。设无 PHA 的阴性对照组、有 PHA 无药物的阳性对照组和 3 个不同剂量的 Ami 组 (1%PHA 溶液 0.15 ml 加入

Tab 2. Effects of Ami and 6-mercaptopurine (6-MP) mg/(kg·d)× 7 d on delayed type hypersensitivity reaction in mice immunized with sheep red blood cells. $\bar{x}\pm SD$. ***$P<0.01$ vs NS, †††$P<0.01$ vs 6-MP.

Drug	(mg/kg)	Mice	Increased thickness of footpad (mm)
NS	—	10	0.44±0.04
6-MP	20	8	0.24±0.03***
Ami	25	8	0.32±0.06***†††
Ami	50	9	0.31±0.05***†††
Ami	100	10	0.27±0.05***†††

3 ml 淋巴细胞培液中)。37℃温育 48 h，每瓶加入 20 μl[*methyl*-^{3}H]TdR 185 GBq/mmol，继续温育至 72 h，冰浴终止培养。每瓶培养液均在 49 型纤维滤膜上过滤，依次用 20 μl 双蒸水、5 ml 三氯乙酸溶液冲洗，再用 3 ml 无水乙醇脱色，滤膜在 60℃烘干，放入 5 ml 闪烁液中，用国产 FJ-2101 液体闪烁计数器计数 cpm 值。结果表明，3 个剂量的 Ami 均促进 PHA 诱导的淋巴细胞转化(Tab 3)。

Tab 3. Effects of Ami on PHA-induced peripheral blood lymphocyte transformation of [*methyl*-^{3}H] TdR incorporation in mice. PHA 1.5 mg/3 ml. $n=10$, $\bar{x}\pm SD$. ***$P<0.01$ vs control

Ami (μg/ml)	PHA (mg/ml)	cpm	Increase (%)
0	0	179±37***	—
0	0.5	4776±1107	0
1	0.5	9622±1679***	101
5	0.5	11216±3071***	135
10	0.5	12165±1361***	155

对全血白细胞吞噬功能的影响 小鼠 68 只体重 21±3 g，随机分组，给药 10 d 后，取血 0.1 ml 加入含肝素的 RPMI-1640 液 0.8 ml 中，再加 0.1 ml 白色葡萄球菌液(在 $\lambda=620$ nm 时用生理盐水调 A 至 0.5，然后稀释 320 倍备用)。另设不加血只加菌液的空白对照组。37℃温育 1 h 后，每瓶加入 10 μl [*methyl*-^{3}H] TdR 185 GBq/mmol，37℃再温育 1 h，冰浴终止培养。用 49 型玻璃纤维滤膜过滤，80℃烘干，置 5 ml 闪烁液中，用 FJ-2101 液体闪烁计数器测 cpm 值[9]。并按下式计算吞噬作用抑制%：1-(给药组 cpm—对照组 cpm)/给药组 cpm。结果，空白组 cpm 为 9586±5156，而对照组 cpm 降至 2070±199，说明全血白细胞的吞噬作用很强。Ami 3 个剂量组的 cpm 均高于对照组，但都低于 Dex 组。提示 Ami 和 Dex 两药都能抑制白细胞的吞噬功能(Tab 4)。

Tab 4. Effects of Ami and Dex on the ability of peripheral WBC phagocytosing *Staphylococcus albus* of [*methyl*-^{3}H] TdR incorporation in mice. $\bar{x}\pm SD$. ***$P<0.01$ vs saline, †††$P<0.01$ vs Dex.

Group	(mg/kg)qd ×10 d	n	cpm	Suppression (%)
No blood	—	13	9586±5156***	—
Saline	—	11	2070±199	—
Dex	5	10	3889±497***	53
Ami	25	13	2986±307***†††	69
Ami	50	13	2975±233***†††	70
Ami	100	8	3101±256***†††	67

DISCUSSION

实验结果表明，Ami 可提高小鼠空斑形成细胞(PFC)的溶血能力，使溶血素生成增多，促进 PHA 诱导的外周血淋巴细胞转化，抑制 DTH 反应，降低全血白细胞对细菌的吞噬功能。上述作用均有一定的剂量依赖关系。

腺苷通过 AdR 抑制某些免疫反应，Ami 可选择性地阻断 AdR，逆转 Ad 的免疫抑制作用，似为 Ami 提高 PFC 的溶血能力、促进抗体合成的原因[1]。据报道，辅助性 T 细胞(T_H)，分为两种亚型，T_H 1 介导 DTH，T_H 2 不介导或抑制 DTH，并促进细胞分化和抗体合成。另外 T_H 还分泌 IL-5 和 IL-4，后两者亦能促进细胞分化和抗体合成。Ami 可能是作用于 T_H 细胞亚型而发挥抑制 DTH 和促进细胞转化的[10,11]。这与 Pardi R 等的研究结果：茶碱激活 T_S 系统抑制排斥反应，又能促进人外周血淋巴细胞对 PHA 的增殖反应[12]是一致的。临床观察 Ami 使病人 T_S 数增多，使移植

物抗宿主反应(GVHR)转阴[13,14]，亦与本文Ami抑制DTH反应一致。

本研究发现Ami降低小鼠全血白细胞吞噬细菌的功能。Nelson S等让小鼠吸入含金葡菌和奇异变形杆菌的气雾剂，发现Ami降低肺的杀菌能力[3]；O'Neill等指出，Ami降低病人肺巨噬细胞的杀菌活性、减少过氧化氢的产生[4]。我们的Ami降低非特异性免疫功能的结果与之相符。

REFERENCES

1 Gilbertsen RB. Adenosine and adenosine receptors in immune function. *Agents Actions* 1987; 22 : 91

2 Birch RE, Polmar SH. Adenosine induced immunosuppression: the role of the adenosine receptor-adenylate cyclase interaction in the alteration of T-lymphocyte surface phenotype and immunoregulatory function. *Int J Immunopharmacol* 1986; 8 : 329

3 Nelson S, Summer WR, Jakab GJ. Aminophylline-induced suppression of pulmonary antibacterial defenses. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131 : 923

4 O'Neill SJ, Sitar DS, Klass DJ, Taraska VA, Kepron W, Mitenko PA. The pulmonary disposition of theophylline and its influence on human alveolar macrophage bactericidal function. *Ibid* 1986; 134 : 1225

5 Simpson MA, Gozzo JJ. Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis *in vitro*. *J Immunol Methods* 1978; 21 : 159

6 Zang XX, Qian BC. Spectrophotometric determination of hemolysin types and concentration. *Acta Pharm Sin* 1987; 22 : 301

7 Xu XY, Li Y, Xu J. A modified humoral immune assay method-A method of hemolysin determination. *Ibid* 1979; 14 : 443

8 Lagrange PH, Mackaness GB, Miller TE. Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. *J Exp Med* 1974; 139 : 528

9 杨 锋、章建民。用^{3}H-TdR掺入法测定全血白细胞吞噬功能。上海免疫学杂志 1986; 6 : 302

10 Mosmann TR, Coffman RL. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol Today* 1987; 8 : 223

11 Shore A, Dosch H-M, Gelfand EW. Induction and separation of antigen-dependent T helper and T suppressor cells in man. *Nature* 1978; 274 : 586

12 Pardi R, Zocchi MR, Ferrero E, Ciboddo GF, Inverardi L, Rugarli C. *In vivo* effects of a single infusion of theophylline on human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1984; 57 : 722

13 Shapira Z, Shohat B, Boner G, Levi J, Joshua H, Servadio C. Theophylline: A possible immunoregulatory of T-cells. *Transplant Proc* 1982; 14 : 113

14 Flink G, Mittelman M, Shohat B, Spitzer SA. Theophylline induced alterations in cellular immunity in asthmatic patients *Clin Allergy* 1987; 17 : 313

15 Sun B, Liu F, Li GH. Immunomodulation of cimetidine in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 89

Progrés récents dans la surveillance biologique des médicaments antithrombotiques

1989 Oct 13-14 Bordeaux

Please contact, Laboratoire d'Hématologie,
Faculté de Pharmacie,
3, Place de la Victoire,
33076 Bordeaux Cedex,
France.