

腺苷对小鼠非特异免疫和体液免疫的抑制作用

冯彦熙, 刘发¹, 边 棣, 胡 坚 (新疆医学院药理教研室, 乌鲁木齐830054, 中国)

Suppressive effects of adenosine on nonspecific and humoral immunities in mice

FENG Yan-Xi, LIU Fa¹, BIAN Di, HU Jian
(Department of Pharmacology, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT Adenosine (Ade) 1.3, 13, 130 mg·kg⁻¹ ip inhibited the ability of peripheral leukocytes and peritoneal macrophages in phagocytosing the *Staphylococcus albus* with [³H]TdR incorporation in mice, declined the hemolytic ability of plaque-forming cells and the production of antibody in mice immunized by sheep erythrocytes. Ade 13, 130 mg·kg⁻¹ ip decreased the mouse serum muramidase (lysozyme) concentration. Dipyridamole (Dip) 10 mg·kg⁻¹ ip attenuated the effects of Ade 130 mg·kg⁻¹ on humoral immunity reaction, but the nonspecific immunity was not attenuated. These results showed that the uptake of Ade may play an important role in the effects of Ade on humoral immunity reaction. Aminophylline (Ami) 100 mg·kg⁻¹ ip attenuated the effects of Ade 130 mg·kg⁻¹ on hemolytic ability of plaque-forming cells and the ability of peripheral leukocytes in phagocytosing *Staphylococcus albus*. These results suggested that the effects of Ade on murine humoral and nonspecific immunity reaction were mediated by Ade A₂ receptor (A₂DR).

KEY WORDS adenosine; phagocytosis; muramidase; hemolysins; dipyridamole; aminophylline

Received 1991-01-10

Accepted 1994-04-09

¹ To whom correspondence should be addressed.

A摘要 腺苷(adenosine, Ade) 1.3, 13, 130 mg·kg⁻¹抑制小鼠全血白细胞和腹腔巨噬细胞的吞噬功能;减少小鼠血清溶菌酶的含量;降低小鼠血清溶血素的生成和空斑形成细胞的溶血能力。双嘧达莫10 mg·kg⁻¹减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹的体液免疫抑制作用;氨茶碱100 mg·kg⁻¹可减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹对脾空斑形成细胞溶血能力和外周血白细胞吞噬功能的抑制作用。

关键词 腺苷;吞噬作用;溶菌酶类;溶血素类;双嘧达莫;氨茶碱

腺苷(adenosine, Ade)作为一种体内调节物,具有广泛的生理活性,如镇静、扩张血管、调节冠脉血流量及降低血压等^[1]。Ade对细胞免疫功能的影响,国外报道较多;对非特异性免疫和体液免疫的影响,国外研究较少,且仅限于单项免疫指标^[1-3]。国内仅见本室腺苷受体(adenosine receptor, ADR)拮抗剂氨茶碱(aminophylline, Ami)的免疫药理作用研究^[4]。本文以体内给药方法,探讨国产 Ade 对非特异性免疫和体液免疫功能的影响,为其临床应用提供药理学理论依据。

MATERIALS

C₅₇BL/6j 小鼠和昆明种小鼠,由新疆医学院动物室提供,♀♂兼用。

Ade 白色粉剂,江苏启东有机化工三厂产品。环磷酰胺(cyclophosphamide, Cyc)针剂,上海第十二制药厂产品,批号900516。地塞米松(dexamethasone, Dex)针剂,江苏苏州第六制药厂产品,批号910311。双嘧达莫(dipyridamole, Dip)针剂,上海第十制药厂产品,批号761112。氨茶碱针剂,北京制药厂产品。

473-476

29

糖原(glocogen)粉剂, 英国 Edward Gurr 公司产品。RPMI-1640培养基, 美国 GabcO 公司产品, 批号 430-1800。 [³H]胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine-2-deoxyribose, TdR)放射性活度 740 GBq·mmol⁻¹, 中国原子能科学研究院产品。溶菌酶标准品, 中国科学院上海生物化学研究所产品, 批号 8446847。

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。G-49型玻璃纤维滤膜, 上海红光造纸厂出品。

METHODS AND RESULTS

对全血白细胞吞噬功能的影响 采用 [³H]TdR 掺入法^[5]。C₅₇BL/6j 小鼠 60 只, ♀♂ 兼用, 体重 21 ± s 2 g, 随机分组, ip 给药, 连续 8 d, 于末次给药后 24 h 取血 0.1 ml, 加白色葡萄球菌悬液, 37 C 温育 1 h 后加 [³H]TdR, 再温育 1 h, 用滤膜法测定 dpm 值, 并计算吞噬指数 PI(%) = [1 - (给药组 dpm 均值/对照组 dpm 均值)] × 100。结果, Ade 3 个剂量组均对白细胞吞噬功能有抑制作用; Ade 膜转运抑制剂 Dip 10 mg·kg⁻¹ 不能减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹ 的抑制作用; Ade 受体拮抗剂 Ami 100 mg·kg⁻¹ 能减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹ 的抑制作用 (Tab 1)。

对腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 采用改良 [³H]TdR 掺入法^[6]。昆明种小鼠 52 只, ♀

♂ 兼用, 体重 21 ± s 2 g, 随机分组, ip 给药 7 d, 吸出腹腔液, 调细胞浓度为 1 × 10⁶ ml, 以滤膜法测定 dpm 值, 以确定对白葡萄球菌的吞噬作用, 并按下式计算吞噬指数 PI(%) = [1 - (实验孔 dpm 均值/对照孔 dpm 均值)] × 100。结果, 3 个剂量的 Ade 组均降低腹腔巨噬细胞的吞噬功能。Dip 10 mg·kg⁻¹ 不能减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹ 的抑制作用 (Tab 2)。

对血清溶菌酶含量的影响 采用比色法^[7]。C₅₇BL/6j 小鼠 45 只, ♀♂ 兼用, 体重 22 ± s 2 g, 随机分组, ip 给药 8 d 后测定小鼠血清中溶菌酶的含量, 在相同条件下所作溶菌酶的标准曲线为: $\hat{Y} = 0.04466 + 0.00379X$, $r = 0.99$ 。结果, 不同剂量的 Ade 组均降低血清溶菌酶的含量。Dip 10 mg·kg⁻¹ 不能减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹ 的抑制作用 (Tab 3)。

对血清溶血素生成的影响 采用比色法^[8]。C₅₇BL/6j 小鼠 60 只, ♀♂ 兼用, 体重 21 ± s 2 g。随机分组, ip 给药, d 4 后, ip SRBC 免疫小鼠, 继续给药 5 d 后, 小鼠眼眶取血, 测定每个样品的 A 值, 并按“HC₅₀ = (样品的吸收率值/半数溶血时的吸收率) × 血清稀释倍数”式, 计算出各样品的半数溶血值 (HC₅₀)。结果, Ade 3 个剂量组均明显降低血清溶血素的含量; Ade 130 mg·kg⁻¹ 的作用与 Cyc 10

Tab 1. Effect of ip adenosine (Ade) on ability of peripheral WBC phagocytosing *Staphylococcus albus* with [³H]TdR incorporation in mice. $\bar{x} \pm s$. *P > 0.05, ^bP < 0.05, ^cP < 0.01 vs NS; ^dP > 0.05 vs Dex; ^eP > 0.05, ^fP < 0.01 vs Ade 130 mg·kg⁻¹.

Group	Dose/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ × 8 d	Mice	dpm	Phagocytosis index/%
No blood	—	—	15 815 ± 6 292	
Normal saline	—	8	4 969 ± 1 831	69 ± 12
Dexamethasone	2.5	10	8 902 ± 3 064 ^c	44 ± 19
Ade	1.3	8	7 290 ± 1 426 ^{bd}	54 ± 9
	13	8	8 956 ± 4 036 ^{bd}	43 ± 25
	130	7	11 349 ± 3 413 ^{bd}	35 ± 12
Ade + Dipyridamole	130 + 100	9	8 610 ± 3 131 ^{be}	46 ± 20
Ade + Aminophylline	130 + 100	7	6 626 ± 2 033 ^{ef}	58 ± 13

Tab 2. Effect of ip adenosine (Ade) on peritoneal macrophages phagocytosing *Staphylococcus albus* with [³H]TdR incorporation in mice. $\bar{x} \pm s$. ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01 vs NS; ^d*P* > 0.05, ^e*P* < 0.05 vs Cyc; ^f*P* > 0.05 vs Ade 130 mg·kg⁻¹.

Group	Dose/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ × 9 d	Mice	dpm	Phagocytosis index/%
No macrophage	—	—	1 682 ± 274	—
Normal saline	—	7	782 ± 179	53.5 ± 10.6
Cyclophosphamide	20	8	1 051 ± 208 ^b	39.4 ± 12.8
Ade	1.3	7	1 305 ± 349 ^{cd}	24.6 ± 16.4
	13	7	1 387 ± 192 ^{ce}	21.4 ± 13.3
	130	7	1 233 ± 256 ^{cd}	26.6 ± 15.3
Ade + Dipyridamole	130 + 100	10	1 369 ± 179 ^{de}	18.6 ± 10.7

Tab 3. Effect of ip adenosine (Ade) on serum muramidase concentration in mice. $\bar{x} \pm s$. ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01 vs NS; ^d*P* > 0.05, vs Dex; ^e*P* > 0.05 vs Ade 130 mg·kg⁻¹.

Group	Dose/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ × 8 d	Mice	Concentration/μg·ml ⁻¹
Normal saline	—	10	26.3 ± 11.0
Dexamethasone	2.5	9	10.1 ± 6.4 ^c
Ade	13	9	14.2 ± 8.4 ^{bd}
	130	9	11.5 ± 3.4 ^{ce}
Ade + Dip	130 + 10	8	13.4 ± 7.4 ^{bd}

Tab 4. Effect of ip adenosine (Ade) on serum hemolysis concentration in mice immunized with SRBC. $\bar{x} \pm s$. ^a*P* > 0.05, ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01, vs NS; ^d*P* > 0.05 vs Cyc; ^e*P* < 0.01, vs Ade 130 mg·kg⁻¹.

Group	Dose/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ × 9 d	Mice	50 % hemolytic concn/(HC ₅₀)
Normal saline	—	10	216 ± 25
Cyclophosphamide	10	9	38 ± 10 ^e
Ade	1.3	9	57 ± 22 ^{cd}
	13	9	45 ± 16 ^{cd}
	130	8	39 ± 16 ^{cd}
Ade + Dip	130 + 10	10	240 ± 429 ^a

mg·kg⁻¹的作用相当; Dip能明显地减弱 Ade 130 mg·kg⁻¹对溶血素生成的抑制作用(Tab 4).

对空斑形成细胞溶血能力的影响 用定量溶血分光光度法(quantitative hemolysis spec-

trophotometry, QHS)^(9,10). C₅₇BL/6j小鼠52只,♀♂兼用,体重22±s 2 g.随机分组,ip给药3 d后,小鼠ip SRBC致敏,继续给药5 d,于末次给药后1 h,处死小鼠取脾,制成1×10⁷·ml⁻¹的脾细胞悬液,加入SRBC后测其A值.结果,Ade 3个剂量组均降低空斑形成细胞的溶血能力. Dip与Ami均明显对抗 Ade 130 mg·kg⁻¹对空斑形成细胞溶血能力的抑制作用(Tab 5).

Tab 5. Effect of ip adenosine (Ade) on hemolytic ability of plaque forming cells in mice. *n* = 8, $\bar{x} \pm s$. ^a*P* > 0.05, ^b*P* < 0.05, ^c*P* < 0.01, vs NS; ^d*P* > 0.05 vs Cyc; ^e*P* < 0.01, vs Ade 130 mg·kg⁻¹.

Group	Dose/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ × 8 d	10 ³ × A
Normal saline	—	424 ± 56
Cyclophosphamide	20	268 ± 30 ^e
Ade	1.3	285 ± 37 ^{cd}
	13	259 ± 42 ^{cd}
	130	246 ± 58 ^{cd}
Ade + Dipyridamole	130 + 10	378 ± 108 ^{ab}
Ade + Aminophylline	130 + 10	341 ± 62 ^{ab}

DISCUSSION

实验结果表明, Ade对体液免疫和非特异免疫功能均有抑制作用. Ade的免疫抑制作用与ADR有关,淋巴细胞存在ADR^(1,11);可分为R和P两种位点,其中R位点又分为A₁

和 A₂ 两种亚型^[12,13]。已经证明 A₂DR 存在于各种免疫活性细胞, Ade 作用于这些细胞的 A₂DR, 激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC), 使细胞内 AC 水平升高, 从而产生对体液免疫和非特异免疫的抑制作用。本研究中 Ade 降低小鼠全血白细胞和腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 抑制血清溶血素的生成, 降低脾空斑形成细胞的溶血能力是通过 A₂DR, 其最有力的实验依据是 A₂DR 拮抗剂 Ami 可减弱 Ade 对空斑形成细胞溶血能力和外周血白细胞吞噬功能的抑制作用, 此与我室刘发等 Ami 促进抗体生成相符^[4]。提示 B 淋巴细胞膜亦存在 A₂DR。

单核巨噬细胞可分泌溶菌酶, 并产生补体 C₂。本研究 Ade 抑制巨噬细胞的吞噬功能和降低血清溶菌酶的含量。与 Lappin 等所做 Ade 抑制巨噬细胞产生补体 C₂ 结果^[3]一致。

T 细胞经茶碱作用后, 分为茶碱抵抗型(T_R)和茶碱敏感型(T_S)。两种 T 细胞, T_R 具有 T_H 功能, 而 T_S 则有 T_S 活性。再以 Ade 作用于 T_R, 结果使 T_R 增加 OKT⁸ 抗原表达, 降低 OKT⁴ 的表达, 说明经 Ade 作用的外周血淋巴细胞, 其中一些 T 细胞亚群的表面抗原决定簇发生选择性地改变, 可能是 Ade 免疫抑制的另一机制。Ade 作用 T 细胞使表面抗原表达的变化, 是由 ADR 介导的, 并有 cAMP 水平的升高^[11]。

关于 Dip 减弱 Ade 对体液免疫的抑制作用, 可能系此药抑制 Ade 进入靶细胞内, 使之不能发挥细胞内 DNA 和蛋白质合成的抑制作用^[14]。

REFERENCES

- 1 Gilbertsen RB. Adenosine and adenosine receptors in immune function. *Agents Actions* 1987; **22**: 91-8.
- 2 Dosreis GA, Nobrega AF, Carvalho RP. Purineergic modulation of T-lymphocyte activation; differential sus-

ceptibility of distinct activation steps and correlation with intracellular 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation.

Cell Immunol 1986; **101**: 213-31.

- 3 Lappin D, Whaley K. Adenosine A₂ receptors on human monocytes modulate C₂ production. *Clin Exp Immunol* 1984; **57**: 454-60.
- 4 Liu F, Bian D, Zheng HQ, Cheng RF. Influence of aminophylline on immune function of mice. *Acta Pharmacol Sin* 1989; **10**: 457-60.
- 5 Yang F, Zhang JM. ³H-TdR incorporation method for measurement of peripheral whole white blood cells phagocytosing function. *Shanghai J Immunol* 1986; **6**: 302-3.
- 6 Mi MT, Yang JJ. Development of ³H-TdR incorporation method for measurement of phagocytic and bactericidal function by macrophages. *J Radioimmunol* 1989; **2**: 331-3.
- 7 杨贵贞. 溶菌酶测定法 见: 余贺、谢少文、杨贵贞、许少平, 主编. 临床免疫技术. 第1版. 上海: 上海科技出版社. 1982; 388-9.
- 8 Xu XY, Li Y, Xu J. A modified humoral immune assay method; a method of hemolysis determination. *Acta Pharm Sin* 1979; **14**: 443-6.
- 9 Simpson MA, Gozzo JJ. Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis *in vitro*. *J Immunol Methods* 1978; **21**: 159-65.
- 10 Dijk HV, Bloksma N. Quantification of *in vitro* antibody secretion by immune spleen cells. *J Immunol Methods* 1977; **14**: 325-31.
- 11 Birch RE, Polmar SH. Adenosine induced immunosuppression; the role the adenosine receptor-adenylate cyclase interaction in the alteration of T-lymphocyte surface phenotype and immunoregulatory function. *Int J Immunopharmacol* 1986; **8**: 329-38.
- 12 Londos C, Wolf J. Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5482-6.
- 13 Daly JW. Adenosine receptors; targets for future drugs. *J Med Chem* 1982; **25**: 197-207.
- 14 Ratch H, Kuritsky L, Thorbecke GJ, Hirschhorn R. Suppression of human lymphocyte DNA and protein synthesis *in vitro* by adenosine and eight modified adenine nucleosides in the presence or in the absence of adenosine deaminase inhibitors, 2,-deoxycoformycin (DCF) and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA). *Cell Immunol* 1982; **68**: 244-51.