

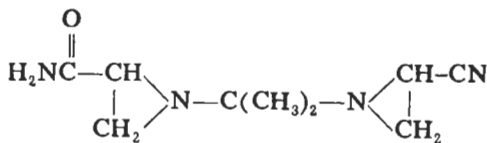
叠氮美宋在体外试验中对白细胞介素2和白细胞介素1产生的影响

宋锦平、钱定华 (第二军医大学药理学系中西药研究室, 上海 200433)

提要 免疫增强剂叠氮美宋(azimexon)在体外单独不能诱导小鼠脾细胞产生白细胞介素2(IL-2)但能增加Con A激活的脾细胞产生IL-2, 最适浓度为0.05 μg/ml. 叠氮美宋能增加LPS激活的小鼠腹腔巨噬细胞产生白细胞介素1(IL-1), 最适浓度为5 μg/ml. 动态观察表明它增加IL-2和IL-1的最适预处理时间分别是6和16 h.

关键词 叠氮美宋{2-[氰基吡丙啶基-(1)]-2-[2-氨基甲酰基吡丙啶基-(1)]-丙烷}; 免疫增强剂; 白细胞介素1; 白细胞介素2

叠氮美宋(2-[氰基吡丙啶基-(1)]-2-[2-氨基甲酰基吡丙啶基-(1)]-丙烷)是一种新类型的免疫增强剂, 已证明它能增强细胞免疫和体液免疫功能, 临床主要与化疗、放疗或手术治疗联合应用治疗恶性肿瘤, 以提高患者免疫功能, 降低化疗剂的毒性⁽¹⁻³⁾. 它还能改善爱滋病相关综合症患者的某些症状和免疫学参数⁽⁴⁾. 为进一步了解其作用机理, 本文探讨了叠氮美宋在体外对小鼠产生白细胞介素2(interleukin 2, IL-2, lymphocyte mitogenic factor), 淋巴细胞有丝分裂因子及白细胞介素1(interleukin 1, IL-1)的影响



Azimexone

2-[Cyanaziridinyl-(1)]-2-[2-carbamoyl-aziridinyl-(1)]-propane

材料和方法

叠氮美宋由本校药理学系中西药研究室合成, 临用前用RPMI-1640培养液配成溶液.

Con A和lipopolysaccharides (LPS)为Sigma公司产品. 硫代乙醇酸钠培养基干粉为上海生物制品研究所产品. RPMI-1640培养液: RPMI-1640培养基干粉16.4 g(Sigma产品, 含L-谷氨酰胺和HEPES Buffer 25 mmol/L)配成1000 ml溶液, 其中补充2-巯基乙醇0.1 mmol/L, 青霉素5000 IU, 链霉素25 mg, NaHCO₃ 2 g, 培养液经过滤除菌, 分装后-20℃保存. [³H]TdR为中科院上海原子核研究所产品, 比活度为481 GBq/mmol.

CTLL细胞的传代培养 CTLL₂细胞株(上海医科大学微生物教研室提供)用含10%小牛血清的RPMI-1640培养液加15—20%含IL-2的鼠脾细胞培养上清或rIL-2标准品4—6 U/ml, 于5%CO₂培养箱37℃培养, 每星期传2—3次.

IL-2的诱导及活性测定 BALB/c小鼠, ♀♂兼有, 2.5—3月龄, 制备脾细胞悬液⁽⁵⁾, 在24孔细胞培养板中加脾细胞5×10⁶/ml, Con A 3 μg/ml及不同浓度的叠氮美宋, 培养不同时间后, 取上清, 离心(350×g, 10 min), 所得样品于-20℃保存待测.

取传代培养的CTLL细胞, 用PBS洗涤3次, 然后用培养液将细胞浓度调整成1×10⁵/ml, 取0.1 ml加到96孔板中, 再加经系列倍比稀释的样品(4个稀释度)0.1 ml, 在CO₂培养箱中培养20 h后, 加[³H]TdR 18.5 kBq/孔, 继续培养4 h, 收集细胞, 测定CTLL细胞参与的cpm值, 取某一稀释度时cpm值进行比较(此时cpm值在30—50%最大增殖范围内).

IL-1的诱导及活性测定 C57BL/6小鼠, ♂, 3—3.5月龄, 上海医科大学动物部提供, ip 3%硫代乙醇酸钠培养液3 ml, d 6

时, 收集小鼠腹腔巨噬细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞悬液调整成 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 取此悬液 1 ml 加到 24 孔细胞培养板中, 置 5% CO_2 培养箱 37°C 培养 24 h 后, 用 PBS 洗除未贴壁的细胞, 然后加入一定量的药物和 LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 培养不同时间后, 取上清待测。

ICR 小鼠, 4-6 wk 龄, 制备胸腺细胞悬液⁽⁵⁾, 于 96 孔培养板中分别加胸腺细胞 $2 \times 10^6/\text{孔}$, Con A $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和待测样品(最终稀释度为 1:8), 每个样品一式 3 份, 培养 72 h 后加 $[\text{H}]$ TdR $18.5 \text{ kBq}/\text{孔}$ 继续培养 6 h, 然后收集细胞, 测 $[\text{H}]$ TdR 的参入值, 同时测定部分样品中 IL-2 活性。

结 果

叠氮美宋对小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响 不同浓度的叠氮美宋(8, 40, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 与小鼠脾细胞一起培养 24 h 后, 测上清中 IL-2 含量发现给药组 CTLL 细胞参入值依次为 412 ± 52 , 353 ± 124 , 129 ± 44 , 125 ± 7 , 与对照组 366 ± 35 无明显差别, 当叠氮美宋与 Con A 激活的脾细胞作用 24 h 后, 发现在 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能引起 IL-2 明显增加(图 1)。

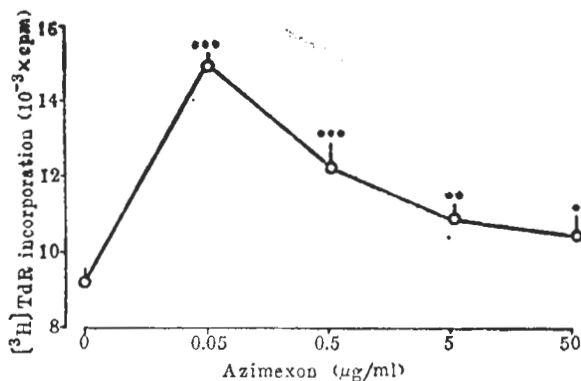


Fig 1. Interleukin 2 produced by murine splenocytes treated with azimexon and Con A ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. $n=3$ expts, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

如叠氮美宋与 Con A 激活的淋巴细胞分别预先作用 2, 6, 12 h 后, 洗除药物和 Con A

继续培养 24 h, 其上清中 IL-2 活性以 6 h 时最高, 叠氮美宋的最适浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 当预先作用 2 或 12 h 时, 对 IL-2 产生均无影响(表 1)。

Tab 1. Interleukin 2 produced by murine splenocytes pretreated with azimexon and Con A ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) for different times. Level of interleukin 2 was compared at 1:4 dilution for all samples. $n=9$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$ vs control

Azimexon ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$[\text{H}]$ TdR incorporation (cpm)		
	2 h	6 h	12 h
0	2940 \pm 251	3235 \pm 626	1564 \pm 116
0.05	2977 \pm 333*	4279 \pm 321***	1515 \pm 232*
0.5	3191 \pm 685*	4393 \pm 800***	1595 \pm 229*
5	2988 \pm 294*	3734 \pm 754*	1400 \pm 175*
50	3150 \pm 548*	3826 \pm 529*	1584 \pm 275*
500	2821 \pm 621*	3952 \pm 1117*	—

叠氮美宋对小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-1 的影响 当叠氮美宋 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 与 LPS 激活的小鼠腹腔巨噬细胞作用 24 h 可增加 IL-1 产生; 而作用 48 h 对 IL-1 产生无影响(图 2)。

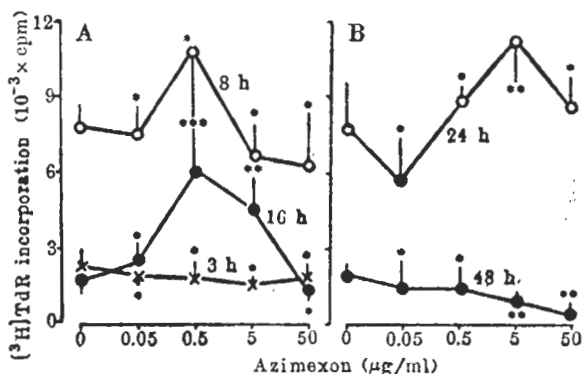


Fig 2. Interleukin 1 produced by murine peritoneal macrophages pretreated (A) and treated (B) with azimexon and lipopolysaccharides ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) for different times. $n=3$ expts, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

为进一步观察叠氮美宋影响 IL-1 产生的动态变化, 实验中将药物与 LPS 激活的腹腔巨噬细胞预先作用 3, 8, 16 h 后, 洗除药物和 LPS, 继续培养 24 h, 收集上清, 测定 IL-1 活性, 发现当作用时间为 3 h 时, 它对

IL-1 产生没有影响, 而作用 8 或 16 h 时, IL-1 有不同程度地增加。8 h 时, 最适作用浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$, IL-1 增加 40%; 16 h 时, 最适作用浓度亦为 0.5 $\mu\text{g/ml}$, IL-1 增加 244%。

实验还证明上述样品中均不含有 IL-2 活性(表 2)。

Tab 2. Interleukin 2 activities in cultured supernatant of macrophages pretreated with azimexon and lipopolysaccharide (10 $\mu\text{g/ml}$), $\bar{x} \pm \text{SD}$. Activity of standard interleukin 2 for 1:8 dilution was 14082 \pm 318 cpm.

Azimexon ($\mu\text{g/ml}$)	^3H]TdR incorporation (cpm)	
	8 h	16 h
0	176 \pm 30	194 \pm 14
0.05	131 \pm 62	178 \pm 61
0.5	160 \pm 47	152 \pm 72
5	219 \pm 70	143 \pm 31
50	154 \pm 40	151 \pm 17

讨 论

本实验结果表明: 叠氮美宋虽不能直接诱导 IL-2 产生, 但它能增加 Con A 激活的脾细胞产生 IL-2, 此作用与药物浓度及药物与 T 淋巴细胞作用的时间有关, 图 1 和表 1 均表明叠氮美宋增加 IL-2 产生的最适浓度为 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 且当作用时间为 6 h 时, 增加 IL-2 产生的作用最显著。

由于 IL-2 的产生需要抗原和 IL-1 的协同刺激⁽⁷⁾, 所以叠氮美宋增加巨噬细胞产生 IL-1 的作用可能是其增加 IL-2 产生的原因之一。

已知恶性肿瘤、免疫缺陷症如 AIDs 及某些自身免疫性疾病的发生与 IL-1, IL-2 产生低下有关^(8,9), 因此临床上提高患者 IL-1, IL-2 水平是治疗这些疾病的重要措施, 叠氮美宋能增加 IL-1 和 IL-2 的产生可能是它治疗恶性肿瘤和 AIDs 的作用机理之一。

致谢 得到郑钦岳老师的技术指导。本系中西药教研室徐炳祥老师提供叠氮美宋

参 考 文 献

- 1 Chirigos MA, Mastrangelo MJ. Immunorestitution by chemicals. In: Mihich E, ed. *Immunological approaches to cancer therapeutics*. NY: Wiley, 1982: 208-14
- 2 Goutner A, Florentin I, Bruley-Rosset M, Nasrat F. Immunological properties of azimexon in normal mice, aged mice and cancer patients. In: Serrou B, Rosenfeld C, eds. *New immunomodulating agents and biological response modifiers*. Amsterdam: Elsevier Biomedical, 1982: 95-102. (*Human cancer immunology*; vol 3)
- 3 Bicker U. Immunomodulation by 2-cyanaziridine derivatives. In: Serrou B, Rosenfeld C, Daniels JC, Saunders JP, eds. *Current concepts in human immunology and cancer immunomodulation*. Amsterdam: Elsevier Biomedical, 1982: 521-34. (*Developments in immunology*; vol 17)
- 4 Patt YZ, Mansell PWA, Reuben JM, et al. Effect of azimexon therapy on host defense parameters and disease-associated symptoms in the acquired immune deficiency syndrome and acquired immune deficiency syndrome-related complex. *AIDS Res* 1986; 2: 191
- 5 郑泽铤. 动物组织免疫活性细胞的收集. 见: 上海第二医科大学, 上海免疫研究所, 主编. 免疫学技术. 上海: 第二医科大学, 1985: 188-91
- 6 Mishell BB, Shiigi SM, Henry C, et al. Preparation of mouse cell suspensions. In: Mishell BB, Shiigi S, eds. *Selected methods in cellular immunology*. San Francisco: Freeman WH, 1980: 1-27
- 7 Grönvik K-O, Andersson J. The role of T cell growth stimulating factors in T cell triggering. *Immunol Rev* 1980; 51: 35
- 8 Flomenberg N, Welte K, Mertelsmann R, et al. Immunologic effects of interleukin 2 in primary immunodeficiency diseases. *J Immunol* 1983; 130: 2644
- 9 羽室淳爾. インターロイキン 2. インターフェロン. 血液と免疫. 1985; 7: 289

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Sep, 9 (5) : 468-471

Effects of azimexon on interleukin 2 and interleukin 1 production *in vitro*

SONG Jin-Ping, QIAN Ding-Hua (Department of Natural and Synthetic Drugs Research, Faculty of Pharmacy, The Second Military Medical College, Shanghai 200433)

ABSTRACT Azimexon, an immunostimulating agent, did not induce the production of interleukin 2 (IL-2) from murine splenocytes *in vitro*, but did enhance the secretion of IL-2 from Con A-stimulated splenocytes at an optimal concentration of 0.05 µg/ml. Azimexon increased the production of interleukin 1 (IL-1) from murine

peritoneal macrophages, with the optimal concentration being 5 µg/ml. Dynamic observation indicated that the optimal pretreatment times for increasing IL-2 and IL-1 were 6 and 16 h, respectively.

KEY WORDS azimexon; immunostimulating agents; interleukin 1; interleukin 2