

乙双吗啉对小鼠免疫应答反应的影响

但 宁、张卓沐 (河南省医学科学研究所, 郑州 450052)

提要 乙双吗啉可抑制 SRBC 引起的小鼠 PFC 反应, 减少 SRFC 数量。在 $6.25 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 7 \text{ ip}$ 时, 此药可抑制 BSA 攻击致敏小鼠后 3 h 出现的肿胀反应; $50 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 7 \text{ ip}$ 时, 也能抑制 BSA 攻击后 24 h 出现的 DTH。表明乙双吗啉在低剂量时可选择性抑制小鼠的体液免疫反应; 高剂量时, 也能抑制小鼠的细胞免疫反应。此药对小鼠的炭粒廓清能力无明显影响。

关键词 乙双吗啉; 免疫抑制; 玫瑰花结形成; 迟发型超敏反应; 空斑形成细胞

乙双吗啉(bimolane, AT-1727)是哌嗪二酮类化合物——乙亚胺(ICRF-154)的衍生物⁽¹⁾, 对多种实验肿瘤和人体恶性淋巴瘤等有明显治疗作用, 对葡萄膜炎等免疫性疾病也有较好疗效。乙双吗啉可抑制小鼠的溶血素反

应⁽²⁾。为了较全面了解此药对免疫系统的作用特点, 寻找其治疗免疫性疾病的免疫学作用特点, 为指导临床合理用药提供线索, 本文初步探讨了乙双吗啉对正常小鼠免疫反应的影响。

材料与 方法

615 纯种小鼠 25 只, 体重 $19.0 \pm \text{SD } 0.8 \text{ g}$; 昆明种小鼠 110 只, 体重 $19.6 \pm 1.0 \text{ g}$, ♀♂ 兼用, 均由河南医科大学动物繁殖中心供应。

乙双吗啉为白色鳞片状结晶, 由中国科学院上海药物研究所提供。实验时, 用 0.5% 羧甲基纤维素(CMC)将其配成混悬剂, 供 ip 用。

培养液为含 10% 小牛血清的 Hank's 液, 其中无酚红。

溶血空斑(FFC)实验 本实验参照溶血分光光度法⁽³⁾, 并做了一些修改。采用 615 纯种

小鼠。经 ip, 用 5% 绵羊红细胞 (SRBC) 20 ml/kg 致敏小鼠, 同时, 开始给药。4 d 后, 放血处死小鼠, 取脾脏剪成绿豆大小; 挤出脾细胞, 加入培养液。静置 1 min 后, 吸取上部细胞悬液, 洗一次后, 用台盼兰排除法计数活细胞, 活细胞达 95% 以上。最后, 将脾细胞悬液的浓度调至 1.6×10^7 /ml, 将 1:8 稀释的经 SRBC 吸收的混合新鲜豚鼠血清、0.4% SRBC 悬液和脾细胞悬液各取 1 ml, 混匀。把所有样品同时置 37°C 水浴 1 h。2000 × g 离心 5 min 后, 在 721 型分光光度计 413 nm 波长处测上清液 A 值。

特异性玫瑰花结形成细胞 (SRFC) 实验⁽⁴⁾
将上述实验的脾细胞悬液稀释至 8×10^6 /ml。将此细胞悬液、灭活小牛血清和浓度为 2×10^8 /ml 的 SRBC 悬液各取 0.1 ml, 混匀; 1000 × g 离心 10 min 后, 置 4°C 冰箱 2 h; 最后, 加入甲苯胺蓝染色后, 在高倍显微镜下计数 SRFC 数。

迟发型变态反应 (DTH)⁽⁵⁾ 采用昆明种小鼠。在用牛血清白蛋白 (BSA) 致敏小鼠的同时, 开始给药。致敏后 8 d, 用热凝聚 BSA 在小鼠左足垫皮下进行攻击。分别于 3 h、24 h 后, 用千分卡测量左右足垫厚度, 二足垫厚度之差为肿胀程度。

炭粒廓清实验 采用昆明种小鼠。用药 6 d 后, 每只小鼠经尾 iv 1:2 稀释的印度墨汁 8.0 ml/kg。分别于 1, 5, 13, 20 min 后, 经眶内静脉丛取血 25 μl。将其加入 2 ml 0.1% 碳酸钠溶液中, 混匀后在 721 型分光光度计 650 nm 波长处测其 A 值。测定前用 0.1% 碳酸钠溶液校正零点。每样品连测 3 次, 取其均值。

结 果

乙双吗啉可抑制小鼠的 PFC 反应, 减少 SRFC 数量 (表 1)。12.5 mg/(kg·d) × 4 ip 时, 此药对这两类反应均开始出现明显抑制作用。剂量愈大作用也愈强。

Tab 1. Effects of ip bimolane (AT-1727) on specific rosette forming cells (SRFC) and plaque forming cells (PFC) responses in mice. n = 5, $\bar{x} \pm SD$, *p > 0.05, ***p < 0.01 vs control (0.5% CMC). A: absorbance

Bimolane mg/(kg·d) × 4	PFC 10 ³ × A	SRFC/10 ⁶ spleen cells
Control	836 ± 30	13 054 ± 807
6.25	818 ± 38*	12 965 ± 1013*
12.5	458 ± 14***	6482 ± 866***
25	221 ± 22***	2398 ± 506***
50	111 ± 87***	1421 ± 580***

在 BSA 诱发的 DTH 模型中也观察到, 乙双吗啉在较低剂量 6.25 mg/(kg·d) × 7 ip 时可明显抑制 BSA 攻击后 3 h 出现的肿胀反应 (表 2), 剂量愈大作用愈明显。当剂量增大至 50 mg/(kg·d) × 7 ip 时, 乙双吗啉也能抑制 BSA 攻击后 24 h 出现的肿胀反应 (表 2)。

Tab 2. Effects of ip bimolane (AT-1727) on the murine delayed type hypersensitivity (DTH) response. The thickness of the antigen-challenged footpad was measured at 3 and 24 h after challenge with BSA. n = 16 mice, $\bar{x} \pm SD$, *p > 0.05, **p < 0.05, ***p < 0.01 vs control (0.5% CMC)

Bimolane mg/(kg·d) × 4	Increase of footpad thickness (mm)	
	at 3 h	at 24 h
Control	1.16 ± 0.15	1.28 ± 0.18
3.125	1.00 ± 0.19*	1.21 ± 0.20*
6.25	0.87 ± 0.13***	1.19 ± 0.20*
25	0.80 ± 0.19***	1.08 ± 0.11**
50		0.99 ± 0.17***

Tab 3. Effect of ip bimolane (AT-1727) qd × 6 on clearance rate of iv charcoal particles in mice. n = 15, $\bar{x} \pm SD$. *p > 0.05

Time (min)	10 ² × Absorbance	
	0.5% CMC 10 ml/kg	Bimolane 50 mg/kg
1	34 ± 5	35 ± 6*
5	18 ± 4	21 ± 6*
13	10 ± 4	10 ± 5*
20	7 ± 3	6 ± 2*

实验还发现,乙双吗啉 $50 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 6 \text{ ip}$ 对小鼠的炭粒廓清能力并无明显影响(表 3)。

讨 论

PFC 反应是胸腺依赖抗原——SRBC 引起的小鼠体液免疫反应。SRFC 数量的多少可以反映机体免疫反应能力,常被用来评价药物对免疫系统的作用⁽⁴⁾。乙双吗啉可以抑制这两类反应,且对两者的抑制作用表现出一定的平行关系(表 1)。说明此药可抑制小鼠的体液免疫反应。此结果与文献报道的乙双吗啉可抑制小鼠溶血素反应的结果⁽²⁾相一致。

在 BSA 诱发的 DTH 模型中,热凝聚 BSA 攻击后 3 h 出现的肿胀反应仅可随血清特异性转移给非致敏小鼠,是由特异性抗体介导的反应。BSA 攻击后 24 h 出现的肿胀反应则是 T 细胞介导的 DTH 反应⁽⁵⁾。这两种反应分别反映了与体液免疫和细胞免疫有关的两种效应。乙双吗啉在较低剂量 $6.25 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 7 \text{ ip}$ 时可抑制 BSA 攻击后 3 h 出现的肿胀反应,在高剂量 $50 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 7 \text{ ip}$ 时才可抑制 BSA 攻击后 24 h 出现的肿胀反应,此现象说明此药在低剂量时可选择性抑制小鼠的体液免疫反应,高剂量时也能抑制细胞免疫反应。本实验有关乙双吗啉在高剂量时可抑制小鼠的细胞免疫反应的结果与文献报道的结果⁽²⁾不太一致,这可能与文献中所用药量不够大($25 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 5 \text{ ip}$)等因素有关。若先用抗癌药,停药数

天后再致敏动物,有些抗癌药可增强小鼠的 DTH 反应⁽⁶⁾。乙双吗啉在致敏小鼠之前给药时将产生何种影响有待研究。

乙双吗啉不改变小鼠炭粒廓清能力,说明此药可能对小鼠吞噬细胞系统的吞噬能力无明显影响。但是,由于这种实验方法的实验误差较大,影响因素较多,因此,还必须用更为精确的方法进一步证实此药对吞噬细胞系统的确切作用。

致谢 刘腾先同志参加本文实验工作。

参 考 文 献

- 1 任云峰、舒汉丽、张覃沐、陈正玉、林 晟。抗癌新药乙双吗啉(AT-1727)的研究。科学通报 1980; 25: 189
- 2 张覃沐、陈正玉、林 晟。抗癌新药——乙双吗啉(AT-1727)的药理研究 药学报 1980; 15: 577
- 3 江子卿。抗体生成细胞的检测(溶血空斑试验)。见:上海市医学化验所,主编。临床免疫学检验(上册)。上海:上海科学技术出版社,1983: 100-5
- 4 北京医学院基础部微生物教研组。中药对免疫细胞及其功能的作用。北京医学院学报 1978; 3: 156
- 5 Titus RG, Chiller JM. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *J Immunol Methods* 1981; 45: 56
- 6 Goto M, Mitsuoka A, Sugiyama M, Kitano M. Enhancement of delayed hypersensitivity reaction with varieties of anti-cancer drugs. *J Exp Med* 1981; 154: 204

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Sep; 9 (5): 471-474

Effects of bimolane on immune responses in mice

DAN Ning, ZHANG Tan-Mu (Henan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT Bimolane (AT-1727), 1,2-bis (4-morpholinomethyl-3,5-dioxopiperazinyl)-ethane, has been reported to be clinically effective for malignant tumors and autoimmune diseases in clinics. The effects

of bimolane on the immune responses in normal mice have been studied in this experiment. Bimolane suppressed the PFC (plaque forming cells) response and decreased the number of SRFC (specific rosette form-

ing cells) in mice sensitized with sheep red blood cells 4 d earlier. In the DTH (delayed-type hypersensitivity) model elicited by a challenge to BSA-sensitized mice with heat-aggregated BSA, the agent at the lower dosage ($6.25 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 7, \text{ip}$) obviously inhibited the immediate swelling response which was measured 3 h after elicitation, and at higher dosage ($50 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d}) \times 7 \text{ ip}$), it also suppressed the delayed swelling response determined 24 h

after challenge. These results suggest that bimolane inhibits either humoral or cellular immunity in normal mice, with the inhibitory action on humoral immunity being more potent. Bimolane had no effect on the clearance rate of iv charcoal particles in normal mice.

KEY WORDS bimolane; immunosuppression; rosette formation; delayed hypersensitivity; plaque forming cells

* * * * *