

商陆抗病毒蛋白对兔 IgG 加速型小鼠肾毒血清肾炎的影响

朱 荃、李晓冬、史耕先 (南京中医学院药理教研室, 南京 210005)

提要 商陆抗病毒蛋白(PAP)与环磷酰胺组尿蛋白、血清尿素氮及血清总胆固醇显著低于对照组, 血清白蛋白显著高于对照组。PAP 组除尿蛋白高于环磷酰胺组外, 其余3项与环磷酰胺组无明显差异。外周血白细胞总数与腹腔巨噬吞噬%, 对照组高于环磷酰胺及PAP组, PAP组高于环磷酰胺组。提示PAP是一个潜在的抗肾炎药物。

关键词 肾炎; 抗病毒剂; 免疫球蛋白G; 免疫抑制; 环磷酰胺

垂序商陆(*Phytolacca americana* L)所含的商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein, PAP)能与核糖体亚单位上的延长因子EF-I及EF-II互相作用, 影响蛋白质合成⁽¹⁾。在体外, PAP与单克隆抗体B 43连接能抑制人类B细胞系统⁽²⁾。PAP 0.4 mg/kg ip即可表现抑制H₂组织不相容性同种皮肤移植反应等作用⁽³⁾。抗体介导的免疫机理, 在多种肾炎的发病过程中起到决定性的作用。近年的研究结果支持细胞免疫反应在肾脏病发病中起到一定的作用⁽⁴⁾。中医用商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb & *Phytolacca americana* L)治水腫尿少, 腹水胀

满, 肾炎水肿⁽⁵⁾。本文观察PAP ip对兔IgG加速型肾毒血清小鼠肾炎的影响。

材 料 与 方 法

C 57 BL/6 小鼠 26 只, 体重 20±SD 0.5 g, ♀♂兼用。南京医学院动物房提供。

PAP以垂序商陆嫩茎叶进行分离。植物经本院中药鉴定教研室王春耕副教授鉴定。除用40%饱和硫酸铵沉淀叶绿素及以DEAE-Sephadex A-50代替CM 52外, 以柱层析法⁽⁶⁾分离纯化。环磷酰胺(cyclophosphamide)上海第十二制药厂出品。

肾毒血清(nephrotoxic serum)制备 离心法分离小鼠肾小球基底膜加佐剂免疫兔⁽⁷⁾。

肾炎造型⁽⁷⁾ 兔IgG 0.5 mg与福氏完全佐剂0.25 ml充分乳化后, ip免疫小鼠, 免疫后d 5经尾iv肾毒血清。

尿蛋白等生化指标与腹腔巨噬细胞吞噬功能等的测定⁽⁸⁾ 取小鼠分别测定尿蛋白(双缩脲法), 血清尿素氮(二乙酰一肟 diacetyl monoxime 微量法), 血清总胆固醇(硫磷铁微量法), 血清白蛋白(醋酸纤维膜电泳法)的正常值。将已

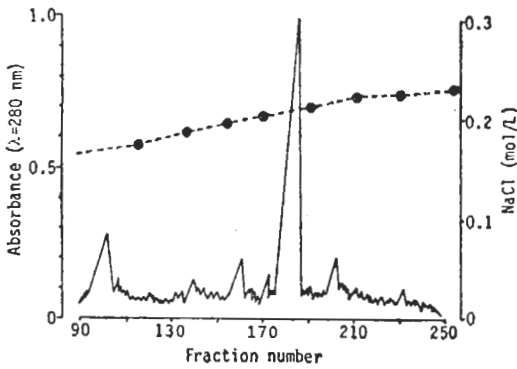


Fig 1. The 200 ml concentrated dialysed extract from 2000 g tender leaves and stems of pokeweed was chromatographed on a column of DEAE-sephadex A-50. Fractions (5 ml) were eluted with a NaCl 0-0.3 mol/L gradient (●) and their absorbance ($\lambda=280$ nm) was monitored.

测定正常值的小鼠分成：生理盐水组，环磷酰胺组，PAP组。按上述方法进行肾炎造型。于iv肾毒血清后d5起3组小鼠每天分别ip生理盐水10 ml/kg，环磷酰胺10 mg/kg，PAP 1.5 mg/kg，并从造型之日起，每5 d测定一次上述4项指标，d25测定外周血白细胞总数及腹腔巨噬细胞吞噬功能。

Tab 1. Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on urinary protein, serum cholesterol, serum albumin and blood urea nitrogen in rabbit IgG (RGG) accelerated nephrotoxic serum (NTS) nephritis mice. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs saline (NS) CY: cyclophosphamide

Drug (mg/kg)	n	Normal	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
Urinary protein (mg/24 h)							
NS	9		18.2 \pm 2.3	23.2 \pm 2.0	23.3 \pm 2.1	27.2 \pm 3.4	28.0 \pm 4.9
CY	10	7.5 \pm 2.3	17.6 \pm 1.7*	24.5 \pm 1.9*	10.9 \pm 1.6***	9.9 \pm 1.9***	9.1 \pm 1.4***
PAP	1.5		18.9 \pm 2.6*	23.0 \pm 1.0*	14.3 \pm 1.8***	12.9 \pm 1.3***	12.8 \pm 1.7***
Serum cholesterol (mmol/L)							
NS	9		4.79 \pm 0.41	3.83 \pm 0.2	3.99 \pm 0.32	3.55 \pm 0.29	3.55 \pm 0.29
CY	10	2.19 \pm 0.1	5.11 \pm 0.15*	3.63 \pm 0.31*	3.07 \pm 0.13***	2.96 \pm 0.27***	3.07 \pm 0.22***
PAP	1.5		5.03 \pm 0.13*	3.64 \pm 0.26*	3.38 \pm 0.17***	3.14 \pm 0.18***	3.25 \pm 0.16***
Serum albumin (g/L)							
NS	9		27.5 \pm 4.2	24.6 \pm 2.2	25.1 \pm 1.9	28.1 \pm 2.1	32.5 \pm 3.2
CY	10	37.6 \pm 1.9	24.0 \pm 2.6*	24.8 \pm 1.5*	29.1 \pm 2.3***	33.1 \pm 1.8***	33.8 \pm 2.2*
PAP	1.5		23.0 \pm 1.4*	29.7 \pm 3.0*	29.8 \pm 1.5***	33.4 \pm 2.5***	33.8 \pm 1.9*
Blood urea nitrogen (mmol/L)							
NS	9		7.32 \pm 1.7	15.5 \pm 0.86	19.7 \pm 1.0	19.4 \pm 1.2	19.1 \pm 1.3
CY	10	17.5 \pm 2.4	8.50 \pm 1.7*	18.7 \pm 1.1*	17.4 \pm 1.0***	17.6 \pm 1.5***	17.4 \pm 1.2***
PAP	1.5		6.28 \pm 1.2*	17.1 \pm 1.2*	18.1 \pm 0.9***	17.9 \pm 1.3**	17.9 \pm 1.4*

结 果

尿中蛋白质含量的变化 由表1可见，造型后3组小鼠尿蛋白均明显升高，ip环磷酰胺与PAP后小鼠尿蛋白明显下降，生理盐水对照组则持续上升，差异非常显著。环磷酰胺组尿蛋白低于PAP组($p < 0.01$)。

血清总胆固醇的变化 由表1可见，在兔IgG免疫后，小鼠血清总胆固醇含量明显升高。在iv肾毒血清后血清总胆固醇下降。该现象与文献(7)结果一致。给药后，生理盐水对照组血清总胆固醇依然维持较高水平，而环磷酰胺与PAP组血清总胆固醇含量明显低于生理盐水组($p < 0.01$)。PAP与环磷酰胺组之间无明显差异。

血清白蛋白的变化 由表1可见，小鼠在兔IgG免疫后，血清白蛋白急剧下降与文献(7)结果一致。ip环磷酰胺与PAP后，血清白蛋白明显回升，而生理盐水对照组仍维持在较低水平，差异非常显著。直到d25对照组血清白蛋白才趋于正常，PAP与环磷酰胺组之间无明显差异。

血清尿素氮 (blood urea nitrogen) 的变化 由表 1 可见, 兔 IgG 免疫后, 血清尿素氮急剧下降, iv 肾毒血清后又明显升高, 与文献(7) 结果一致. ip 环磷酰胺与 PAP 后, 血清尿素氮明显下降, 与对照组比较, $p < 0.01$. PAP 与环磷酰胺组之间 $p < 0.05$.

对腹腔巨噬细胞和外周血白细胞总数的影响 由表 1 可见, PAP 与环磷酰胺都能明显抑制兔 IgG 加速型肾毒血清肾炎小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能, 减少外周血白细胞总数 ($p < 0.01$). 表现为明显的免疫抑制作用. PAP 的免疫抑制作用明显小于环磷酰胺 ($p < 0.01$).

Tab 2. Effect of PAP on WBC and peritoneal macrophages in RGG accelerated NTS nephritis mice. $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.01$ vs NS**

Drug (mg/kg)	n	WBC($10^2/mm^3$)	Phagocytosis (%)
NS	9	91.4 \pm 0.6	21.9 \pm 1.7
CY	10	57.9 \pm 0.7***	10.9 \pm 1.3***
PAP	1.5	64.5 \pm 0.3***	16.6 \pm 1.2***

讨 论

本文观察到 PAP 能显著改善兔 IgG 加速型肾毒血清小鼠肾炎的 4 项生化指标. PAP 1.5 mg/kg 的作用与环磷酰胺 10 mg/kg 大致相当, 免疫抑制作用比环磷酰胺轻, 提示 PAP 是一个潜在的抗肾炎药物.

PAP 改善兔 IgG 加速型肾毒血清小鼠肾炎的病理过程的机理, 可能与其抑制体液与细胞免疫反应有关. 最近在实验性肾小球肾炎及临床肾小球肾炎研究过程中发现, 活性的巨噬细胞及 T 细胞与该病的发生发展密切相关⁽⁴⁾. 本文观察到 PAP 能显著抑制小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能. 作者还观察到从商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb) 分离到的 PAP 具有明显的抗大鼠佐剂性关节炎作用(待发表资料). 抑制巨噬细胞吞噬功能与抗炎作用, 可能是 PAP 改善兔 IgG 加速型肾毒血清小鼠肾炎病理过程的原因之一.

PAP 由一条多肽链构成, 该链与蓖麻毒蛋白 A 链(ricin A chain)类似, 具有细胞毒功能. 由于缺少蓖麻毒蛋白 B 链(ricin B chain), B 链可协助 A 链进入原生质内发挥细胞毒作用, 它的细胞毒作用远不如蓖麻毒蛋白⁽⁹⁾. PAP 对完整细胞或未感染病毒细胞无明显细胞毒作用, 对感染病毒的细胞或将 PAP 与抗细胞抗体连接起来, PAP 表现强大的细胞毒作用⁽¹⁰⁾. Masuho 等认为, 这是病毒或细胞抗体与细胞表面的结合, 导致细胞表面的变化, 使得 PAP 易于进行细胞内的结果⁽¹⁰⁾. 本文观察到 PAP 1.5 mg/kg ip 即可改善兔 IgG 加速型肾毒血清小鼠肾炎的病理过程, 而未观察到明显的毒性. 提示 PAP 能选择性地进入与兔 IgG 加速型肾毒血清小鼠肾炎病理损伤有关的某些细胞, 而不能进入正常细胞. 这一推测有待证实.

参 考 文 献

- Obrig TG, Irvin JD, Hardesty B. The effect of an antiviral peptide on the ribosomal reactions of the peptidelongation enzymes, EF-I and EF-II. *Arch Biochem Biophys* 1973; 155 : 278
- Uckun FM, Gajl-Peczalska KJ, Kersey JH, Houston LL, Vallera DA. Use of a novel colony assay to evaluate the cytotoxicity of an immunotoxin containing pokeweed antiviral protein against blast progenitor cells freshly obtained from patients with common B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 1986; 163 : 347
- Spreafico F, Malfiore C, Moras ML. The immunomodulatory activity of the plant proteins *Momordica charantia* inhibitor and pokeweed antiviral protein. *Int J Immunopharmacol* 1983; 5 : 335
- Cameron JS, Nolasco F, Hartley B. Glomerular T cells and macrophages in crescentic and noncrescentic proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1986; 29 : 267
- 薛子仁. 商陆对肾脏炎水肿之功效. *中医杂志* 1956; (11) : 586
- Barbieri L, Aron GM, Irvin JD, Stirpe F. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the

- seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed). *Biochem J* 1982; 203 : 55
- 7 Nagai H, Takizawa T, Nishiyori T, Koda A. Experimental glomerulonephritis in mice as a model for immunopharmacological studies. *Jpn J Pharmacol* 1982; 32 : 1117
- 8 湖南医学院第二附院检验科. 临床生化检验. 第1版. 长沙: 湖南科技出版社, 1981 : 205-6, 338-40, 342-8, 355-6
- 9 Houston LL, Ramakrishnan S, Hermodson MA. Seasonal variations in different forms of pokeweed antiviral protein, a potent inactivator of ribosomes. *J Biol Chem* 1983; 258 : 9601
- 10 Masuho Y, Kishida K, Hara T. Targeting of the antiviral protein from *Phytolacca americana* with an antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 105 : 462

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Sep; 9 (5) : 474-477

Effects of pokeweed antiviral protein on nephrotoxic serum nephritis accelerated by rabbit IgG in mice

ZHU Quan, LI Xiao-Dong, SHI Geng-Xian

(Department of Pharmacology, Nanjing College of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210005)

ABSTRACT In the mouse model, Pokeweed antiviral protein (PAP) significantly decreased the level of urinary protein excretion, blood urea nitrogen and blood cholesterol ($p < 0.01$), but increased the level of serum albumin ($p < 0.01$) in nephrotoxic serum nephritis accelerated by rabbit IgG. There was no significant difference between the PAP (ip 1.5 mg/(kg·d) × 14) and cyclophosphamide (ip 10 mg/(kg·d) × 14)

groups ($p > 0.05$). Peripheral WBC and peritoneal macrophage phagocytosis were decreased to a lesser extent by PAP than by cyclophosphamide ($p < 0.01$). The evidence suggests that PAP may be useful for inhibiting nephritic changes due to less immunosuppression.

KEY WORDS nephritis; antiviral agents; IgG; immunosuppression; cyclophosphamide