

环磷酰胺对小鼠补体的作用

李晓玉、林子英¹、朱芃芃、金筠芳 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 C57BL纯系小鼠ip环磷酰胺(CY)70 mg/kg后, 血清补体C3含量升高, 持续3-6 d; 用眼镜蛇毒耗竭小鼠补体后, CY可加速C3生物合成速率。鉴于补体具有清除某些致病性免疫复合物的功能, CY增加补体产生、抑制特异性抗体形成及促进网状内皮系统吞噬功能的作用, 可能是它治疗自身免疫及免疫

复合物病有效的机理之一。

关键词 环磷酰胺; 补体C3; 溶血素; 眼镜蛇毒; 网状内皮系统; 免疫复合物; 自身免疫病

1985年7月25日收稿 1985年12月7日修回
本文提要曾送1985年5月第三届国际免疫药理会议

¹ 现在浙江医科大学药理教研室

环磷酰胺(CY)在经典免疫抑制剂中效果较强而毒性较低, 对自身免疫病的治疗优于硫唑嘌呤和皮质激素⁽¹⁾。CY也能选择性作用于

转化较快的短寿抑制性细胞,有时可增强细胞免疫反应^(2,3),其作用机理复杂,至今尚未完全阐明。

血清补体是免疫反应的一组效应分子,在自身免疫病中往往降低,不利于免疫复合物的溶解及吞噬调理⁽⁴⁾。CY对血清补体的作用迄今未见报道。本文就CY对小鼠血清C3含量及对网状内皮系统吞噬活性的影响进行了研究。

材 料

环磷酰胺:上海第十二制药厂出品,批号830216;临用前溶于生理盐水。

兔抗小鼠C3:酵母多糖与ICR小鼠混合血清温育制备酵母多糖-C3复合物,反复洗涤后与弗氏完全佐剂混匀,注射于家兔淋巴结内进行免疫,待效价达1:16以上时放血,用无C3之小鼠血清吸收抗IgG,即得纯化兔抗小鼠C3抗血清⁽⁵⁾。

兔抗小鼠IgG:饱和硫酸铵沉淀小鼠血清丙球蛋白后,通过DEAE-纤维素吸附纯化IgG,经透析浓缩后加入弗氏完全佐剂,同上法对家兔进行免疫,制备抗血清⁽⁶⁾。

印度墨汁:英国Winsor & Newton出品,批号120607,用前以生理盐水1:5稀释,经CPS-1型超声波发生器处理2 min,3000×g离心15 min,弃去沉淀使用。

琼脂糖:Serva进口分装,溶于缓冲液(pH 8.6),至56℃加入抗血清后浇板,终浓度为1-1.2%。

方法与结果

C57BL小鼠,♀,约3月龄,体重18.7±SD 1.3 g,随机分组,每鼠ip 5% SRBC 0.2 ml致敏(d 0),各组于致敏前后不同时间ip不同剂量CY,于d 6眼眶放血处死,取血清测定总补体CH50及C3含量、血清溶血素及IgG含量,同时解剖称取胸腺、脾、肝、淋巴结等主要免疫器官重量。

CY对小鼠血清补体的影响 小鼠血清总补体按改良的Mayer氏法测定⁽⁷⁾,由于小鼠补体含量低,用新鲜兔红细胞代替羊红细胞,以提高灵敏度⁽⁸⁾。合并3鼠血清为一本样本,计算CH50溶血单位(u/ml)。正常小鼠血清总补体为62.6±21.2 u/ml,SRBC致敏后为44.0±9.3 u/ml,降低显著。于致敏前或致敏后不同时间ip CY 10及70 mg/kg对正常或致敏小鼠CH 50无明显影响。

琼脂单向免疫扩散法及单向火箭免疫电泳法测定血清C3含量。单扩用兔抗鼠C3抗血清1:40稀释,加入琼脂糖巴比妥-EDTA缓冲液浇板,血清样本用生理盐水1:10稀释,每孔加入10 μl,37℃扩散24 h,以正常小鼠混合血清作为标准,绘制标准曲线,计算C3含量。火箭电泳参考文献⁽⁹⁾,稍作改进。抗血清1:20稀释,加入琼脂糖EDTA-Tris缓冲液浇板,每孔内加入1:20稀释的血清样本10 μl,端电压120 V,泳动4 h,同单扩法绘制标准曲线计算血清C3含量。

实验结果见表1。正常或SRBC致敏小鼠ip CY 70 mg/kg可使血清C3含量明显升高,单扩法和火箭电泳法结果基本一致。

正常小鼠ip CY 70 mg/kg一次后,血清C3在d 3开始明显升高,持续至d 6仍显著高于对照组水平,其动态变化见图1。眼镜蛇

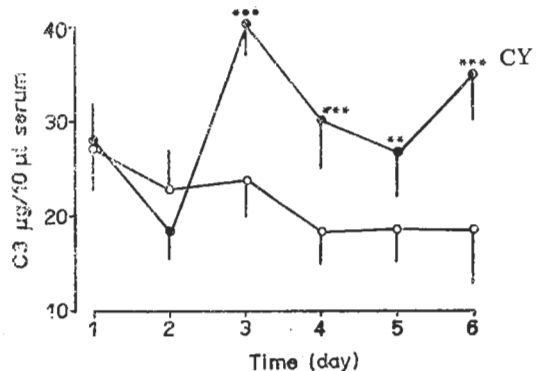


Fig 1. Effect of cyclophosphamide (CY) 70 mg/kg ip on serum complement 3 determined by radial immunodiffusion. CY caused a marked and sustained increase in serum C3 level. Each spot is the $\bar{x} \pm SD$ of 4 mice.

Tab 1. Effect of ip CY on serum C3 level in mice ($\bar{x} \pm SD$, $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$ compared with control

	Dose mg/kg \times d	mice	Immunodiffusion	Rocket immunoelectrophoresis
Normal	—	10	15.5 \pm 5.8	17.0 \pm 2.3
	70 \times 1 (d 1)	10	27.2 \pm 11.4**	24.3 \pm 9.9*
	70 \times 2 (d 1, 3)	10	34.9 \pm 22.7*	29.3 \pm 10.5**
Sensitized	—	25	11.7 \pm 3.5	19.1 \pm 1.8
	70 \times 1 (d -1)	17	18.5 \pm 7.3**	26.8 \pm 6.2*

毒(CVF) 1 mg/kg ip后 1 d, C3 几乎全部耗竭, d 4 尚未恢复正常水平; 如在 5 h 后 ip CY, 可加速 C3 在体内合成的速率, 于 d 3 已恢复至正常水平, 与对照组比较, 差异显著, 见图 2. 若在 ip CVF 前 2 d 给予 CY, 不能加速 C3 的生物合成。

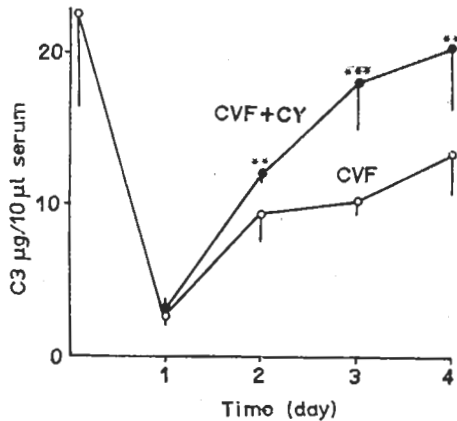


Fig 2. Effect of CY 70 mg/kg on C3 biosynthesis in mice. C3 was depleted by ip cobra venom factor (CVF) 1 mg/kg. CY accelerated the biosynthesis of C3, reached the normal level within 3 d. Each spot is the $\bar{x} \pm SD$ of 4 mice.

CY 对小鼠血清抗体的影响 SRBC 致敏后 d 6 测定小鼠血清特异性抗体-溶血素的生成⁽¹⁰⁾. 在致敏后给 CY, 随着给药次数及剂量的增加, 可以显著抑制血清溶血素的生成; 但在致敏前 1 d 给药则无明显抑制作用。结果见

Tab 3. Effect of CY on the clearance rate of iv charcoal particles in mice. ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

Dose mg/kg \times d	Route	Mice	K value	α value
—		43	0.020 \pm 0.008	4.35 \pm 0.64
20 \times 4 (d -3 \rightarrow 0)	sc	11	0.058 \pm 0.012***	5.74 \pm 0.52***
20 \times 4 (d -3 \rightarrow 0)	ip	12	0.022 \pm 0.006*	5.25 \pm 0.64***

表 2.

琼脂单扩散法测定小鼠血清 IgG 含量, 实验结果表明正常或 SRBC 致敏小鼠 ip CY, 血清 IgG 均有下降趋势, 10 mg/kg 于致敏后 1 及 3 d ip 可使血清 IgG 从 107.5 \pm 34.5 下降为 83.3 \pm 24.7 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 血清, 相差显著 ($p < 0.05$).

Tab 2. Effect of ip CY on serum hemolysin in mice. ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

Dose mg/kg \times d	Mice	HC ₅₀ (1:1600)
—	34	486 \pm 198
10 \times 2 (d 1, 3)	18	252 \pm 155***
10 \times 3 (d 1, 3, 5)	9	156 \pm 99***
10 \times 4 (d 2 \rightarrow 5)	8	125 \pm 58***
70 \times 1 (d 1)	17	13 \pm 11***
70 \times 1 (d -1)	8	313 \pm 170*

CY 70 mg/kg 在抗原攻击前后 1 d 或 10 mg/kg 连续 4 d ip, 可致胸腺及淋巴结重量显著下降, 10 mg/kg (d 2 \rightarrow 5 给药) 还可使脾、肝脏重量显著下降, 而 70 mg/kg 致敏前给药则使脾重明显增加。

CY 对小鼠 iv 碳粒廓清作用的影响 ICR 小鼠, σ^7 , 23.3 \pm 2.6 g, 尾 iv 印度墨汁 10 ml/kg 体重, 于注射后 2 (t_1) 及 20 (t_2) min 各从眼眶后静脉丛取血 20 μl , 溶于 2 ml Na_2CO_3 中, 680 nm 测光密度, 并称取小鼠肝脾重量, 计算

廓清指数 $K = (\log OD_1 - \log OD_2) / (t_2 - t_1)$ 及吞噬指数 $\alpha = \text{体重} / \text{肝脾重} \cdot \sqrt[3]{K}$ 。

结果见表 3。实验前连续 4 d ip 或 sc CY 20 mg/kg 均能提高小鼠对 iv 碳粒的廓清速率，而此时肝脾重量已下降，故按单位组织重量校正的吞噬指数升高更为显著，说明 CY 有增强网状内皮系统吞噬的功能。

讨 论

机体的免疫系统是一个复杂的网络系统，各种免疫功能之间存在着复杂的内在连系。本文发现 ip CY 能显著增加小鼠血清 C3 含量，一次 ip 可使 C3 升高持续 6 d 以上；在眼镜蛇毒耗竭补体后，CY 能加速 C3 在体内的生物合成。补体 C3 的合成主要在肝脏(90%)等单核巨噬细胞系统^(11,12)。本文证明 CY 也能增强肝脾网状内皮系统的功能，且 C3b 升高又有利于巨噬细胞的调理和吞噬。最近报道，C3 的产生是巨噬细胞激活的标志⁽¹³⁾，二作用间互为因果，与本文的结果是一致的。

CY 又能抑制抗体的生成，使免疫复合物形成减少，从而补体消耗减少，也可能是血清补体含量增加的原因。但表 1 和表 2 结果证明：在 SRBC 致敏前 1 d，ip CY 可使 C3 增高而溶血素并不降低，说明二者之间的量变并不完全是简单的因果关系。Turk 等⁽²⁾ 认为，CY 对转化较快的短寿抑制性细胞作用较强，如在抗原刺激前给药，抑制性作用受阻，可表现为免疫反应增强，因此 CY 对免疫系统的作用也受给药时间、剂量和机体原来免疫功能状态的影响。

以往对补体激活后释放炎症介质的作用了解较多，现在知道，完整的补体系统在免疫复合物的清除中也占有重要地位。补体 C3 肽段可嵌入免疫复合物网格结构中，减弱抗原-抗体间亲和力而使免疫复合物溶解，消除其致病作用⁽¹⁴⁾，因此临床治疗应着眼于提高患者补体水平。CY 增加 C3 并抑制抗体产生，可能是它治疗自身免疫和免疫复合物病有效的重要

机理之一。

致谢 王晴川教授惠赠眼镜蛇毒

参 考 文 献

- 1 Spreafico F, Tagliabue A, Vecchi A. Chemical immunodepressants. In: Sirois P, ed. *Immunopharmacology*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982: 315-48
- 2 Turk JL, Parker D. Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunol Rev* 1982; 65: 99
- 3 Shand FL. The immunopharmacology of cyclophosphamide. *Int J Immunopharmacol* 1979; 1: 165
- 4 李晓玉. 药物对补体系统的调控. 见: 中国药理学会抗炎免疫药理专业委员会编. 药理学进展(1982) 抗炎免疫药理分册. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 31-43
- 5 余 灏、许以平. 补体和补体结合试验. 见: 余 灏、谢少文、杨贵贞、许以平, 编. 临床免疫技术. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 129-35
- 6 吴安然、何惠珍. 免疫血清的制备与鉴定. 见: 王世中, 主编. 免疫化学技术. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1980: 158-63
- 7 Li XY, Vogt W. Activation of the classical complement pathway by a polysaccharide from sugar cane. *Immunopharmacology* 1982; 5: 31
- 8 Van Dijk H, Rademaker PM, Willers JMN. Estimation of classical pathway of mouse complement activity by use of sensitized rabbit erythrocytes. *J Immunol Methods* 1980; 39: 257
- 9 余 灏、许以平. 免疫沉淀反应测定血浆和体液中蛋白质. 见: 余 灏、谢少文、杨贵贞、许以平, 编. 临床免疫技术. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 44-8
- 10 金筠芳、梁惠珍、曹翠玉、王祖武、舒荣生、李晓玉. 甘蔗多糖的免疫活性. *中国药理学报* 1981; 2: 269
- 11 McPhaden AR, Lappin D, Whaley K. Biosynthesis of complement components. *J Clin Lab Immunol* 1982; 8: 1
- 12 Strunk RC, Kunke KS, Giclas PC. Human peripheral blood monocyte-derived macrophages produce hemolytically active C3 *in vitro*. *Immunology* 1983; 49: 169
- 13 Koestler TP, Kirsh R, Kline T, Rieman D, Greig R, Poste G. Production of C3 as a marker of lymphokine-mediated macrophage activation. *Cell Immunol* 1984; 87: 1

14 Nussenzweig V. Interaction between complement and immune complexes: Role of complement in containing immune complex

damage. In: Fougereau M, Dausset J, eds. *Progress in Immunology IV*; London: Academic Press, 1980: 1044-56

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jan; 8 (1) : 79-83

Effect of cyclophosphamide on serum complement in mice

LI Xiao-Yu, LIN Zi-Ying, ZHU Peng-Peng, JIN Yun-Fang

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Cyclophosphamide (CY) 70 mg/kg ip into C57BL inbred mice caused a marked increase in serum C3 level determined by both radial immunodiffusion and rocket immunoelectrophoresis. The elevation of C3 sustained for 6 d. Cobra venom (1 mg/kg) ip induced depletion of serum C3 which remained low for 4 d; CY accelerated the biosynthesis of C3, so that normal C3 levels were reached within 3 d.

It has been considered that complement plays a major role in the clearance of immune complexes. Increasing serum comple-

ment level, inhibiting the production of serum specific antibody-hemolysin and enhancing the phagocytosis of reticuloendothelial system by CY, as shown in this study, may be an important mechanism in its treatment of some auto-immune and immune complex diseases.

KEY WORDS cyclophosphamide; complement 3; hemolysin; cobra venoms; reticuloendothelial system; immune complex; auto-immune diseases