DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.05.001

论 著

脂质体包裹的氮芥对家兔急性实验性血清病的影响

周 凡 朱锡华 (免疫学教研室)

提 要 本实验用脂质体包裹氮芥处理急性实验性血清病家兔，检测了血清抗BSA抗体，循环免疫复合物以及血清补体总活性的动态变化。观察了脾脏巨噬细胞酸性磷酸酶的活性、肾小球内免疫复合物的沉积及肾组织的病理改变。结果表明，氮芥-脂质体能增强急性血清病家兔巨噬细胞的活性，加重肾组织的病理损伤程度，提示家兔急性实验性血清病的发病可能是依赖于单核巨噬细胞的免疫病理机制。

关键词 氮芥；脂质体；巨噬细胞；免疫复合物病；血清病

一次静脉注射大剂量的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)可以引起家兔一过性急性实验性血清病(acute experimental serum sickness, AESS)。关于AESS的发病机制，目前尚未彻底阐明。Holdsworth[1]等发现肾小球内单核巨噬细胞的浸润程度与蛋白尿成正相关。除去循环中的单核巨噬细胞，可以减轻蛋白尿和肾组织的损伤程度，推测AESS的发病与单核巨噬细胞有关。但是，这只是从数量上而未能从巨噬细胞的功能活性方面加以研究。本实验用脂质体包裹氮芥处理AESS家兔，初步探讨了脂质体包裹的氮芥对巨噬细胞功能活性的调节作用以及对AESS发病过程的影响。

材料与方法

一、实验分组及家兔AESS模型的建立

体重为2.3±0.5kg的健康大耳白兔48只，随机分为四个组，每组12只。根据Dixon的方法，以牛血清白蛋白为抗原，大剂量(250mg/kg)一次经兔耳静脉注射，造成一过性急性实验性血清病。

二、包裹氮芥的脂质体的制备和使用

参照Connor[2]等方法，略加改进，用蛋黄卵磷脂，胆固醇和硬脂酰胺(7∶2∶1, mol/mol)制备包裹0.05%盐酸氮芥的反相蒸发脂质体(reverse-phase evaporation vesicles, REV)。用生理盐水代替盐酸氮芥按相同的方法制备空白脂质体。在免疫BSA后第5、7、9、11天，第一组AESS家兔耳静脉注射氮芥-脂质体1.0ml/kg (NL组)；第二组AESS家兔注射空白脂质体1.0ml/kg (EL组)；第三组AESS家兔注射0.05%盐酸氮芥生理盐水溶液1.0ml/kg (FN组)；第四组AESS家兔不做任何处理，做阳性对照(PC组)。

三、各项血清学指标检测及血液WBC计数

在注射BSA的前1天(即0天)以及注射后的第2、4、6、8、10和12天，分别从兔耳中央动脉采集抗凝血和不抗凝血。抗凝血即日进行WBC计数。不抗凝血分离血清，贮存于-40℃待检。血清特异性抗BSA抗体和特异性循环免疫复合物的检测均采用敏感的酶联免疫吸附试验(即ELISA)[3][4]。对血清补体总活性的测定用本室建立的50%溶血试验(即CH_{50}试验)。

四、脾巨噬细胞酸性磷酸酶活性的检测

免疫BSA后第12天后活杀家兔，取脾脏标本冰冻切片后进行酸性磷酸酶(ACPase)染色。底物溶液在染色前用0.01N的NaOH将pH调至4.9～5.2。在光镜下观察切片中棕红色颗粒的多少及分布，判断脾巨噬细胞的ACPase活性。

五、肾组织HE染色及免疫荧光染色观察

免疫BSA第12天取肾组织二份。一份标本经石蜡切片，HE染色，光学显微镜下计数肾小球内有核

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞数，并据肾小球内有核细胞及粒细胞数、肾间质炎症、蛋白/细胞管形等，给予肾损害的等级评定，表示为+～卌。另一份标本经冰冻切片，羊抗兔lgG荧光抗体染色，在荧光显微镜下观察肾小球内荧光的亮度及颗粒多少，用+～卌表示。

结　果

一、血清抗BSA抗体水平的动态变化

从免疫BSA第6天起，各组AESS家兔血清中均能检出特异性抗BSA抗体，并且逐日升高。与阳性对照组比较，注射游离氮芥能明显降低血清抗体的浓度（$P<0.05$），到第12天降低更为显著（$P<0.01$）。注射用脂质体包裹的氮芥或空白脂质体，对绝大多数AESS家兔的抗BSA抗体水平的动态变化无显著影响（$P>0.05$）（图1）。

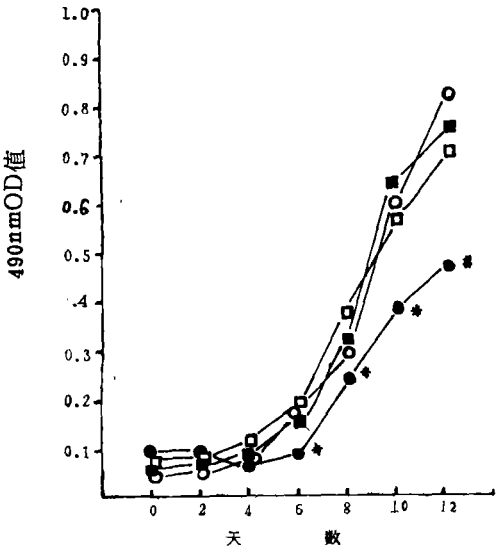


图1　AESS家兔血清抗体水平的动态变化

·——· FN组　　o——o PC组
■——■NL组　　□——□EL组
*P<0.01　　#P<0.05

二、血清免疫复合物水平的动态变化

所有AESS家兔血清中在第6天起出现特异性BSA-抗BSA免疫复合物，第10天达最高浓度，第12天开始下降。与阳性对照组比较，注射氮芥脂质体的家兔的循环免疫复合物水平从第6天起就显著低于阳性对照组（$P<0.01$）。注射游离氮芥或空白脂质体，能使AESS家兔循环复合物水平有下降趋势，但无统计学意义（$P<0.05$）（图2）。

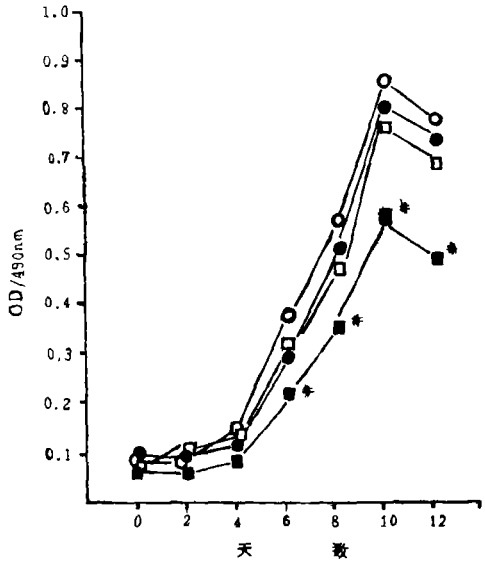


图2　AESS家兔血清免疫复合物的动态变化

·——· FN组　　o——o PC组
■——■NL组　　□——□EL组
*P<0.01　　#P<0.05

三、血清补体总活性水平的动态变化

阳性对照组的血清补体总活性（CH_{50}单位）从第6天起显著消耗（与0天比较$P<0.01$），至第10天开始回升，第12天接近正常水平。给AESS家兔注射氮芥-脂质体或空白脂质体以后，AESS过程最初几天（6～8天）血清补体消耗减少，但在AESS过程的第10～12天消耗加剧，在第12天显著低于阳性对照组（$P<0.01$）。游离氮芥组（FN组）的血清补体总活性变化基本与阳性对照组平行，补体消耗有减轻的趋势（$P<0.05$）（图3）。

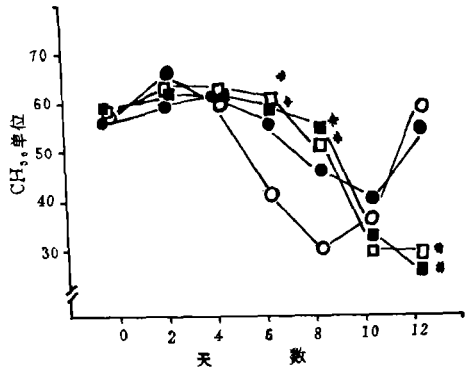


图3　AESS家兔血清补体总活性的动态变化

·——· FN组　　·——· PC组
■——■NL组　　□——□EL组
*P<0.01　　#P<0.05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

四、血液WBC计数的动态变化

注射游离盐酸氮芥（0.05%，0.5mg/kg）可以明显减少血液WBC计数（P＜0.01）。脂质体对照组和氮芥-脂质体实验组与阳性对照组比较，无WBC计数水平的明显改变（P＞0.05）（图4）。

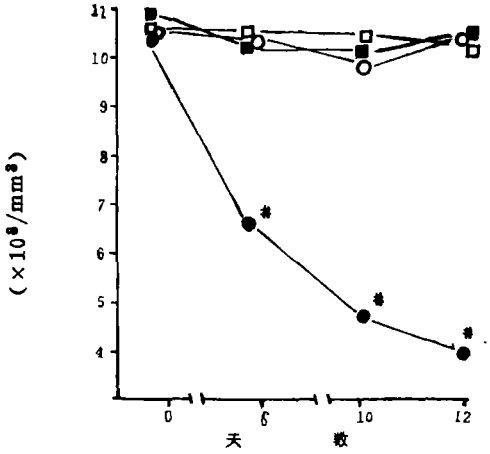


图4 AESS家兔血液WBC计数的变化

·——·FN组　·——·PC组

■——■NL组　□——□EL组

*P＜0.01　* P＜0.05

五、脾巨噬细胞ACPase活性的观察

注射氮芥-脂质体能明显增强脾脏巨噬细胞酸性磷酸酶的活性，与阳性对照组比较相差非常显著（P＜0.01）。单独使用氮芥或空白脂质体不能增加该酶的活性（P＞0.05）（表1）。

表1. AESS家兔脾脏ACPase染色结果

实验分组	例数	脾脏 ACPase 活性强度			
		+	++	+++	++++
NL组	12*	0	0	3	9
EL组	12	0	4	6	2
FN组	12	0	1	9	2
PC组	12	2	1	7	2

秩和检验表明，各组之间存在显著性差异（P＜0.01）。

* 表示与阳性对照组比较，相差非常显著（P＜0.01）。

六、肾脏病理学检查及免疫复合物沉积检查

肾组织病理学检查结果：氮芥-脂质体能增加肾小球内有核细胞数（P＜0.01），加重肾组织的病理损伤（P＜0.05）。游离氮芥或空白脂质体能一定程度上减少肾小球有核细胞数（P＞0.05），使肾组织损伤略有减轻（表2）。

表2. AESS家兔肾组织的病理学改变

实验分组	例数	肾组织损害程度				肾小球有核细胞计数（个/肾小肾）
		+	++	+++	++++	
NL组	12*	0	1	3	8	93.3±0.66*
EL组	12	2	4	4	2	86.5±0.93*
FN组	12	1	2	7	2	76.6±1.21*
PC组	12	1	3	6	2	89.9±1.53

* 表示与阳性对照组比较相差非常显著；* 表示与阳性对照组比较相差显著。

肾小球细胞计数以$\bar{X}$±SE表示。

肾组织免疫荧光染色结果：用氮芥-脂质体处理AESS家兔，可引起肾小球内免疫复合物沉积略增加（P＞0.05）。空白脂质体也不引起免疫复合物在肾小球内沉积的明显改变（P＞0.05）。注射游离盐酸氮芥却能减少免疫复合物在肾小球内的沉积（P＜0.05）（表3）。

表3 AESS家兔肾小球免疫荧光观察结果

实验分组	例数	肾小球内荧光颗粒沉积程度			
		+	++	+++	++++
NL组	12	0	0	3	9
EL组	12	0	1	7	4
FL组	12*	1	2	8	1
PC组	12	0	1	5	6

秩和检验表明，组间存在显著性差异（P＜0.05），

* 表示与阳性对照组比较相差显著（P＜0.05）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

讨　论

脂质体包裹抗肿瘤药物能激活巨噬细胞的功能活性已有不少文献报道[5][6]。但其机制未见阐明。有人推测，这是由于被脂质体包裹的抗癌药物先和溶酶体发生了作用，而没能直接作用于胞浆或胞核。本实验结果表明：包裹氮芥的脂质体被家兔脾脏巨噬细胞吞噬后，其溶酶体酸性磷酸酶活性增加，同时对血清免疫复合物的清除功能增强。注射空白脂质体或游离氮芥均不能改变脾脏巨噬细胞的酸性磷酸酶活性。因此，我们可以认为脂质体包裹的氮芥能增强AESS家兔巨噬细胞的功能活性。

氮芥-脂质体实验组和空白脂质体对照组的血清补体总活性水平的动态变化基本平行，似乎血清CH_{50}的变化主要取决于脂质体本身成分。脂质体引起AESS家兔血清补体消耗在最初几天减少，其作用原理尚无可参考的文献。而血清补体总活性在第10、12天的持续下降，可能是血清胆固醇水平由于脂质体多次注入而增加到一定程度时，血清补体C_3、C_4等被非特异性活化和消耗所致[7]。

巨噬细胞激活以后具有多种生物学功能。本实验中，由氮芥-脂质体作用于AESS家兔巨噬细胞引起的活性增强，具有双重作用。一方面巨噬细胞吞噬能力的增强，使得循环免疫复合物水平有一定程度的下降。另一方面巨噬细胞细胞毒性机制加强，引起肾脏损伤的加重。这种循环免疫复合物水平与肾组织病理损伤程度的不平行关系本室也曾有所报道[8]。这是否提示：循环免疫复合物的形成是导致AESS发病的板机，只要循环免疫复合物达到一定水平就能触发AESS的病理过程，而肾组织的病理损伤程度主要决定于肾小球内有核细胞（主要是单核巨噬细胞）和沉积在肾小球内免疫复合物的病理机制。由此还可以看出，氮芥-脂质体对AESS家兔巨噬细胞的激活，更偏重于细胞毒性机制的增强。

游离氮芥主要是B淋巴细胞的抑制剂[9]。较大剂量的氮芥能显著抑制抗体介导的免疫反应，引起骨髓枯竭和循环白细胞的减少，主要是粒细胞的减少（数据未列出）。如果氮芥被包裹在脂质体中，由于磷脂膜的屏蔽而使得对免疫系统和造血系统的毒性大幅度减少。并且对巨噬细胞引起功能活性增强。而脂质体本身是无抗原性和细胞毒性的[10]，因此，氮芥-脂质体对AESS免疫病理机制的影响不是氮芥和脂质体作用的简单相加，而是通过这个复合体对单核巨噬细胞的功能增强效应，从而改变了AESS的病理过程，导致肾组织病理损伤的加重。

参考文献

1. Holdsworth SR, et al. Abrogation of macrophage-dependent injury in experimental glomerulonephritis in rabbits. J Clin Invest 1981; 68:686
2. Connor J, et al. Efficient cytoplasmic delivery of a fluoresent dye by pH-sensitive immunoliposomes. J Cell Biol 1985; 101:582
3. Mcleish KR, et al. Treatment of murine complex glomerulonephritis with prostaglandin E_2. Clin Immunol Immunopathol 1983; 21:18
4. 赵菲莎，等。应用酶联免疫吸附试验检测家兔循环中特异性免疫复合物的研究。第三军医大学学报 1984；6：257
5. Abreeht LG, et al. Liposomality activated macrophages subsequent interaction with L1210 leukemic cell. Int J Cancer 1981; 27:837
6. 陶军，等。抗肿瘤药物新剂型——多相脂质体研究（Ⅱ）。中草药 1982；13:11
7. 王天保，等。胆固醇对血清补体激活作用的研究。病理生理学学报 1985；1(5)：22
8. 张晓宁，等。甲氰米胍对家兔急性实验性血清病的免疫调节作用。中华微生物免疫

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学杂志 1986; 6 (4) :306
9 Cottney J, et al. Modulation of immune system. Agents Actio 1980; 10:378
10. Schwerdener RA, et al. The effect of charge and size on the interactions of SUV with macrophages. Biochim Biophys Acta 1984; 772:93

(收稿: 1988.3.7, 修回: 1988.6.29)

Effects of Liposome-encapsulated Nitrogen Mustard on Acute Experimental Serum Sickness in Rabbits

Zhou Fan and Zhu Xihua

(Department of Immunology, Third Military Medical College)

Nitrogen mustard encapsulated with liposomes was administered to the rabbits with acute experimental serum sickness(AESS). Then the serum levels of anti-BSA antibodies and circulating immune complex(CIC), CH_{50}, and WBC count were determined. The ACPase activity of spleen macrophages was measured. And the sections of renal tissues, after HE-stained, were studied for the accumulation of CIC and the pathological changes. It was found that liposome-encapsulated nitrogen mustard can increase the macrophage activity and in turn aggravate the renal damages of AESS rabbits.

The results suggest that the renal damages of AESS rabbits can immunopathologically be attributed to the increased activity of macrophages.

Key words: Nitrogen mustard, Liposomes; Macrophages; Immune complex disease; Serum sickness

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net