DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.03.001

论著

山莨菪碱对家兔急性实验性血清病的免疫调节作用

封莉莉 朱锡华（免疫学教研室）

提 要 本实验用山莨菪碱（654-2）处理急性实验性血清病家兔（AESSR），探讨了654-2对急性实验性血清病（AESS）的免疫调节作用。实验结果表明，654-2可降低循环中特异性抗体水平，减少特异性免疫复合物（IC）量，抑制血浆中组织蛋白酶D（Cath-D）活性，使补体水平下降不明显，并减轻肾脏病变程度。

关键词 山莨菪碱(654-2)—免疫学；山莨菪碱(654-2)—药效学；血清病—实验研究；肾脏疾病—免疫疗法

山莨菪碱（654-2）能通过对环核苷酸第二信使的调控，使某些免疫应答反应增强或减弱从而起免疫调节作用。654-2对溶酶体膜可能有稳定作用，并有一定的抗炎症作用[1]。虽然对654-2进行了广泛的研究，但它对特异性免疫应答反应的作用却鲜见报导。本实验以家兔急性实验性血清病（acute experimental serum sickness in rabbits, AESSR）为模型，用654-2于发病早期和晚期分别处理家兔，观察了血清中特异性IgG抗体、特异性免疫复合物(immune complex, IC)、补体和组织蛋白酶D(cathepsin D, Cath-D)的动态变化。并作了肾组织病理学观察。

材料与方法

一、AESSR模型的建立

平均体重2.5 kg的健康大耳白兔45只，按Dixon[2]方法取牛血清白蛋白（BSA）250mg/kg的剂量一次经兔耳静脉注射，造成“一过性”血清病。

二、654-2的施用

动物随机分三组。对照组（n=15），早期用药组（n=15，简称早期组），用药时间从BSA注射后1 h始至6天止；晚期用药组（n=15，简称晚期组），用药时间为BSA注射后6～11天。两组用药方法相同，40mg/kg/天，分三次注射。上午8时和下午3时各一次，15mg/kg，静脉注射晚间9时一次，10mg/kg，肌肉注射。

三、循环IgG、IC及补体水平测定

于BSA免疫前（0天）和免疫后第2～12天隔日从兔耳中央动脉抽取未抗凝血2 ml，分离血清，-40℃保存以备统一条件下测定。采用酶联免疫吸附实验（ELISA）测定IgG及IC量；采用50%溶血试验（CH_{50}试验）测定血清补体含量。

四、血浆Cath-D活性测定

于BSA免疫前（0天）和免疫后第4、8及12天抽取肝素抗凝血3 ml，4℃分离血浆0℃保存。按照Glenn和Furguson等人[3][4]的方法，用比色法测定Cath-D活性。另用双缩脲法测定血浆蛋白含量，以便计算比活性。

$$\text{Cath-D比活性 (U/mgpr)} = \frac{34.5}{\text{标准管O.D}} \times (\text{测定管O.D} - \text{对照管O.D}) \div \text{mgpr} \times 100$$

五、肾组织病理学观察

于免疫后第12天剖杀家兔取肾脏固定，经石蜡包埋、HE染色光镜下观察。根据病变的轻重程度分为以下五个等级：“-”未见明显病变；“±”肾

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

小球毛细血管袢充血；“+”少数肾小球毛细血管袢充血、血管球细胞肿胀增生，并有少量透明管型和红细胞管型；“++”1/3肾小球呈缺血性改变，血管球细胞肿胀增生更为明显，并有PMN（>3个/glom），肾间质炎细胞浸润，肾小管可见多量透明管型及细胞管型；“+++”1/3以上肾小球受累，上述病变加重。

六、统计学分析

计量资料用电子计算机进行双因素方差分析，然后用Newmen-Keul's等检验。肾组织病变的计数资料用二组列联表分析，计量资料采用t检验进行团体比较。还对一些资料作了相关性分析。

实验结果

一、血清中特异性IgG抗体及IC含量变化

对照组从第6天开始在血循环中出现抗BSAIgG抗体，并逐渐升高。与对照组比较，早期组从第6天以后各时相点的IgG抗体水平均显著降低（$p<0.01$），晚期组仅在第8天可见降低，其余各时相点无显著差异。

各组动物均在注射BSA 6天后血循环中出现特异性IC，第10天达峰值，尔后有下降趋势。早期组在第6天后的各时相点与对照组比较，相差非常显著（$p<0.01$），晚期组在第8天及其以后的各时相点也显著降低（$p<0.05$）。但显而易见，晚期组各时相点IC水平仍高于早期组(图1)。

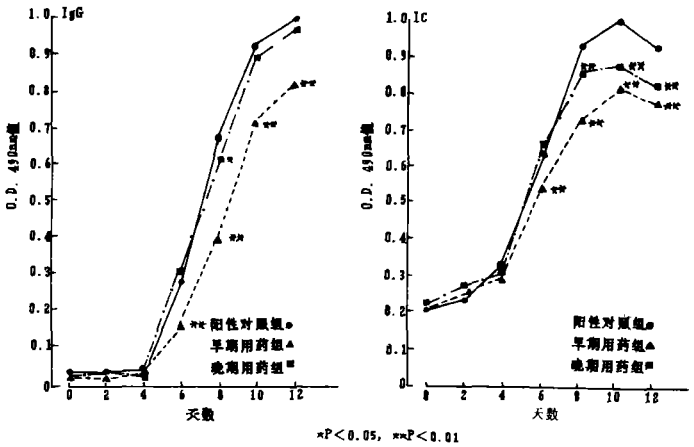


图1 、实验动物血清内抗BSA IgG和IC含量变化

二、血清总补体活性变化

早期组和晚期组对总补体活性的影响基本一致，和对照组比较补体水平在第8天以后各时相点均维持较高水平，尤以第8天和第10天为著（$p<0.01$）（图2）。

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

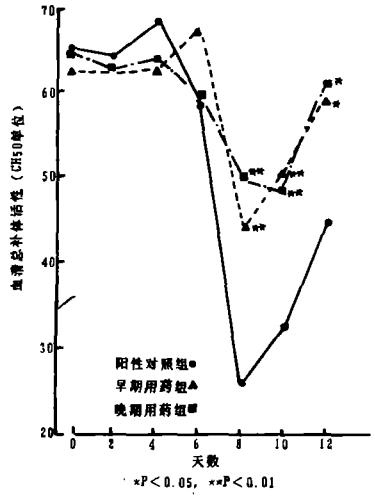


图2、实验动物血清总补体活性变化

三、血浆Cath-D比活性改变

BSA注射后，血浆Cath-D活性逐渐升高，第8天达峰值，尔后下降，第12天仍明显高于0天水平。早期组该酶的活性无显著改变，晚期组第8天以后酶活性下降非常显著（$p<0.01$）（图3）。

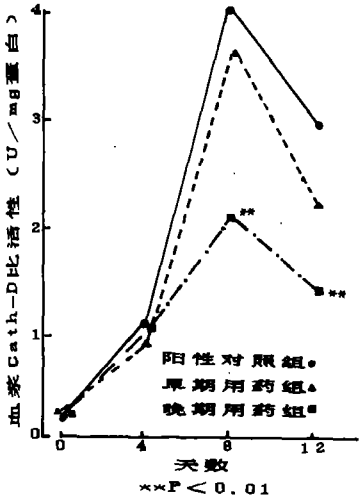


图3、实验动物血浆cath-D活性变化

四、肾组织病理学观察

早期组较对照组虽有所减轻，但无统计学意义。晚期组较对照组差异非常显著（$p<0.01$）。两用药组间也有非常显著的差异（$p<0.01$）（图4）。

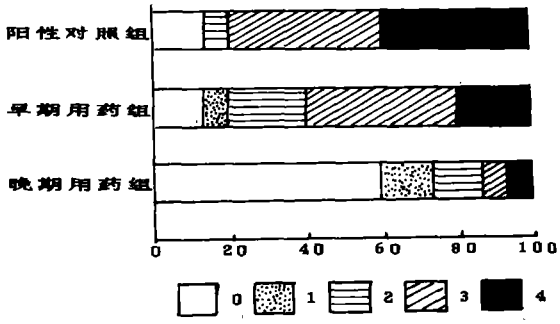


图4、三组实验动物肾脏病变程度分布

讨　论

早期大剂量使用654-2可直接减少特异性IgG抗体生成，IC含量亦随之下降。654-2可能通过影响淋巴细胞内的cAMP/cGMP的比值，使某些免疫应答反应增强或减弱，从而起免疫调节作用。从本实验来看，在免疫反应初期，大剂量的654-2呈现免疫抑制效应。晚期大剂量654-2对特异性IgG水平几乎无影响，但可明显降低IC含量。早期组IC含量下降是由于抗体减少之故，而晚期组已形成的IC显著减少的作用环节可能在巨噬细胞（Mφ）。循环IC的清除取决于单核吞噬系统。据报导，654-2具有调节Mφ的功能，促进吞噬的作用[6]。

实验组补体所受的影响也很明显，早期组和晚期组与对照组比较补体水平下降均显著减少。早期组可用IC减少致使补体消耗减少来解释。晚期组IC水平虽有下降，但仍较早期组为高，因此维持补体高水平除了消耗减少外，可能还有合成增加，654-2有可能通过激活Mφ从而使补体合成增加。补体可防止IC的组织沉积，又可使已沉积的IC重新游离[7]，因此，补体水平升高可能是654-2使肾脏病变减轻的原因之一。

IC形成后，随血循环在各组织器官沉积激活补体，吸引炎性细胞局部浸润，释放溶酶体酶等物质造成病理损伤。Cath-D是溶酶体中的一种作用于基底　　织的蛋白水

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

解酶[6]。其含量和分布可作为估价细胞损伤的一个指标。本实验观察了AESS家兔血浆Cath-D的动态变化，注射BSA前基本为0，第4天略有升高，第8天达峰值，此后有下降趋势。对照组Cath-D的活性变化和IC水平基本一致，二者正相关($r=0.945, p<0.01$)。早期组IgG抗体和IC水平显著降低，血浆Cath-D活性未能相应减少，肾脏病变的改善也不显著，这可能是因为早期组在第6天停止用药之故。晚期组自第6天开始用药，IgG抗体水平无明显变化，IC的降低远不如早期组明显，但血浆Cath-D活性却因受到654-2的直接作用降低非常显著，肾脏病变也得到相当明显的改善。由此看来，654-2并非由于降低IC水平而减少溶酶体酶的释放，可能是通过其它环节抑制了IC引起的溶酶体酶释放[7]。654-2对溶酶体酶释放的抑制作用是减轻肾脏病变的另一个重要因素。经相关性分析发现，IC水平与肾脏的病变相关性不显著，而Cath-D的活性变化与肾脏病变呈正相关($r=0.945, p<0.01$)。由此可见，Cath-D活性较循环中IC能更为真实地反映肾脏病变的轻重程度。

实验结果提示，早期大剂量654-2可抑制特异性免疫应答反应，晚期大剂量654-2有助于清除已形成的IC，这一作用具有重要临床价值。此外，654-2对补体的影响及其对IC引起的溶酶体酶释放的抑制作用，对IC疾病的防治也具有重要临床意义。

参考文献

1. 朱宇、苏静怡。山莨菪碱对失血性休克大鼠肝脏溶酶体的保护作用。北京医学院学报 1985; 17(3):161
2. Dixon FJ, et al. Experimental glomerulonephritis. J Exp Med 1960; 113:889
3. Glenn TM, et al. Protective effect of pancreatic duct ligation in splanchnic ischemia shock. Am J Physiol 1972; 222:1278
4. Furguson WW, et al. Mechanism of production of circulatory shock factors in isolated perfused pancreas. Am J Physiol 1972; 222:450
5. 王永怡，等。山莨菪碱促进免疫及防治感染的研究。 中国医科院药学杂志 1984; 4(6):2
6. Cochrane CG, et al. Polymorphonuclear leucocytes in immunologic reaction. J Exp Med 1966; 124:722
7. Marone G, et al. Possible role of calmodulin in the control of lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes. J Pharmacol Exp Ther 1984; 231:678

The Immunomodulatory Effects of Anisodamine on Rabbits with Acute Experimental Serum Sickness

Feng Lily and Zhu Xihua (Department of Immunology, Third Military Medical College)

Anisodamine (654-2) was administered to rabbits with acute experimental serum sickness (AESS) to study the immunomodulatory effects of 654-2 on AESS. The results suggested that 654-2 may decrease the serum specific antibody and immune complex(IC), inhibit the activity of serum cathepsin D (Cath-D), make the level of complemnts in narrow change, and improved the renal injury.

Key words: Anisodamine(654-2)/immunology; Anisodamine(654-2)/pharmacodynamics; Serum sickness/experimental study; Kidney diseases/immunotharapy serum sickness

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