

氯喹啉对免疫反应影响的研究

郑武飞 高乃庄 曹根珩 陈庆荣 孙德蓉 王意静

(天津医学院微生物学教研组;河北省医学科学院流行病学研究所,天津)

过去二十年来免疫学进展很大,在免疫学研究领域中,自家免疫和同种异体移植问题是使人很感兴趣的问题中的一部分^[1,2],尤其是从 Burnet 提出其无性繁殖细胞群学说^[3]以后,对免疫学的发展起了很大的促进作用。由于研究自家免疫和移植问题,部分免疫学家的重点和兴趣从刺激免疫的形成转移到如何抑制免疫的反应,以便为治疗自家免疫病和进行移植打下理论和实验基础。免疫形成的抑制一般以抑制抗体形成(体液型反应)或迟发型变态反应(细胞型反应)作为指标,亦有以降低对传染的抵抗力作为指标。抑制免疫反应的情况甚多,其中包括天然的情况(例如无丙种球蛋白血症)^[4]或人工的方法(辐射^[5]、内分泌^[6-7]、营养^[8-11]等等)。人工方法中自从 Schwartz 等发现 6-硫氢基醇嘌呤(对抗体形成有抑制作用^[12]并用于治疗^[13]),引起了化学药物抑制免疫反应的广泛注意。我们在抑制免疫反应问题上也进行了一些工作,以临床上治疗某些过敏性和胶原性疾病有一定疗效的氯喹啉^[14-17]进行了一些实验观察,希望能探讨其作用机制。本文报告这部分工作结果。

材料和方法

动物 动物性别均为雌雄不分。家兔体重平均 2 公斤,豚鼠体重 200 克左右,均购自天津市专供科学研究动物的商店。饲以谷物熟料和蔬菜。小白鼠系由本校动物室供应的瑞士种小白鼠,体重 18—23 克,每五个一缸,饲以盐料和自由饮水。

抗原 将新鲜采得的绵羊血球以磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗净三次后,恢复到原来体积(全血)或配成 20% 血球悬液。对家兔为耳静脉注射 20% 悬液毫升/千克。对小白鼠用腹腔注射,剂量为每只注射全血 1 毫升,均注射一次。

药物 氯喹啉(英国卜内门公司出品“Avloclor”商标,批号 288182/1)口服时以蒸馏水溶解使成 20 毫克/毫升溶液。喂家兔时,一般剂量组为每次 20 毫克/千克,大剂量组为每次 40 毫克/千克,均一日二次。对照动物饲以同量的蒸馏水。

注射小白鼠时,将氯喹啉溶于生理盐水,使成 1 毫克/毫升每只肌肉注射 0.2 毫克,一日三次。对照动物注射同量生理盐水。

6-硫氢基醇嘌呤(6-MP)(北京制药厂出品,批号 6211175)先用 1 N NaOH 予以溶解,再以 0.1 M KH_2PO_4 调节 pH 至 9.0,最后以蒸馏水稀释成为 10 毫克/毫升、5 毫克/毫升和 2.5 毫克/毫升备用。家兔肌肉注射量为 8 毫克/千克/日。小白鼠每日腹腔注射 0.5 毫克。对照组注射同量不含药的溶剂。

药物注射均在免疫前 1—2 天开始,持续至注射抗原后第 8—9 天为止。以抗原注射日为“0”日,抗原注射前分别以“-”和“+”表示。

抗体含量的测定 兔疫前采血一次,兔疫后第一阶段每天采血,10天后隔日采血,家兔从耳静脉放血,小白鼠从眼眶后静脉丛采血。分出血清后置于 -20°C 下保存,或普通冰箱保存二日内滴定。溶血素滴定方法主要根据 Taliaferro 和 Taliaferro 法^[18]略加修改进行。简单说来,试验时全量为5毫升。将血清稀释成不同浓度后补足至3毫升,之后加1毫升1.66%羊血球(比悬液标定时,再稀释10倍,在EEL光电比色计以520—550毫微米滤板测定时,读数为45),最后加1毫升内含四个50%溶血度的补体。滴定小白鼠血清时按半量法进行。抗体滴度以1毫升内实含最小血清量仍显现50%溶血度者作为终点。每次实验前滴定补体和配制溶血标准管。试验同时附有已知溶血素、不同单位补体以及羊血球对照管。

形成抗体的能力是否受到药物作用从以下几方面比较:抗体开始出现期、抗体达到高峯期、以及每日平均滴度和抗体产生期平均滴度。

豚鼠过敏试验 先以0.2毫升灭活马血清(1:20)腹腔注射致敏,第14日时以1.2—2毫升马血清心脏注射进行攻击服药物及不服药者对照。

实验和结果

1. 氯喹啉在一般剂量(20毫克/千克,每天两次,服药期 $-1 \rightarrow +8$)时对家兔抗体形成的影响

家兔10只均分为服药和不服药组,一次注射羊血球后其抗体形成动态如表1所示。

表1 氯喹啉(20毫克/千克,每天两次, $-1 \rightarrow +8$)对家兔形成溶血素的影响

取血日期	实验组†	对照组†	取血日期	实验组	对照组
-3	—*	—	9	4063	4602
1	—	—	10	2417	3874
2	—	—	11	2277	1454
3	—	—	13	1654	1889
4	143**	186	15	1577	1305
5	390	708	17	1236	1487
6	908	1722	20	718	969
7	1840	2289	22	551	524
8	2109	3582	24	598	629

†——每組动物数5只

*——平均滴度不到1:100

**——所有数字均为平均滴度的倒数

这次实验结果的各种数据(开始产生抗体期,达到高峯期,以及每日平均滴度)从统计学处理来看,其差别均无意义。

2. 氯喹啉在大剂量(40毫克/千克,每天两次,服药期 $-2 \rightarrow +9$)时对抗体形成的影响

为了进一步观察大剂量是否有抑制作用,将用药剂量加大了一倍,在12只家兔中重复了实验。实验结果如表2所示。

从表2可以看到,实验组和对照组的溶血素形成是有差别的,在一日两次,每次40毫克/千克药量影响下,抗体的形成与原先预计相反,不但无抑制,反有所增长。虽然这种增高在诱导期和高峯期还未显出,但在每日抗体滴度和抗体产生期平均滴度上都已出现有

表 2 氯喹啉(40 毫克/千克, 每天两次, -2 → +9)对家兔形成溶血素的影响

取血日期	实验组†	对照组†	P	取血日期	实验组	对照组	P
- 3	—*	—		15	1078	995	
1	—	—		17	444	264	
2	—	—		19	444	189	<0.05
3	—	—		21	580	366	
4	—	—		23	500	350	<0.05
5	350**	175	<0.05	25	577	313	<0.02
6	664	314		27	283	218	
7	1499	293	<0.01	29	192	158	
8	1404	527	<0.02	31	167	—	<0.02
9	1642	829	<0.01	开始产生抗体期 第 5 天 第 5 天			
10	910	578		高峯期 第 10 天 第 12.7 天			
11	1128	447	<0.05	抗体产生期平均值 781 400 <0.02			
13	1422	689					

†——每組动物数 6 只

*——平均滴度不到 1:200

**——所有数字均为平均滴度的逆数

显著意义或非常显著意义的差异 ($P < 0.01 - > 0.05$)。

3. 氯喹啉和 6-MP 对小白鼠抗体形成的影响

鉴于在家兔中未发现氯喹啉对抗体形成的抑制作用, 考虑到不同的动物对药物感受作用不同, 乃进一步用小白鼠进行实验。将 120 只小白鼠分为三组: 一组为氯喹啉组(每只 0.2 毫克每天两次, 肌肉注射); 一组为 6-MP 组(每只 0.5 毫克/日, 腹腔注射); 另一组再分为两小组, 分别作为前两组的对照进行空白注射。每次采血每组使用 5 只小白鼠, 整大组采过一次后, 开始第二次循环。

在这次实验中并以 10 只家兔分为两组, 一组给以 6-MP (8 毫克/千克/日), 一组不给药物。以家兔的 6-MP 试验作为抑制抗体形成的阳性效果对照实验。

小白鼠注射氯喹啉或 6-MP 后, 其抗体形成动态与对照比较时如图 1 a 所示, 而平行进行的家兔组实验结果如图 1 b 所示。很明显的, 实验再次证实了, 家兔经注射 6-MP 后, 在用药期和停药阶段内抗体形成能力基本上完全受抑制, 而不注射药物的对照, 其抗体形成动态呈现典型的初次反应。相反的, 小白鼠不论注射氯喹啉或 6-MP 均能照常形成抗体, 不受抑制。

为了探讨大剂量是否能有所作用, 又进行了一组实验。将氯喹啉和 6-MP 增大 5 倍(即前者每只 1 毫克, 每天两次, 后者 2.5 毫克/日)。结果实验组和对照组形成抗体的能力仍无差别, 此时 6-MP 的毒性已相当严重, 部分小白鼠不能完成全程注射, 存活的小白鼠亦显著消瘦。

4. 氯喹啉对豚鼠过敏反应的影响

鉴于氯喹啉经反复试验对家兔及小白鼠形成抗体的能力并无抑制作用, 我们考虑到是否除了动物种别感受性不同外, 氯喹啉对自家免疫病和过敏性疾病的疗效不在于抑制抗体形成, 而是抑制抗原抗体之间的结合或者结合后的某一反应环节。我们以豚鼠进行了一组实验。14 只 200 克左右的豚鼠, 以 0.2 毫升 1:20 灭活马血清致敏后, 于第 13 天

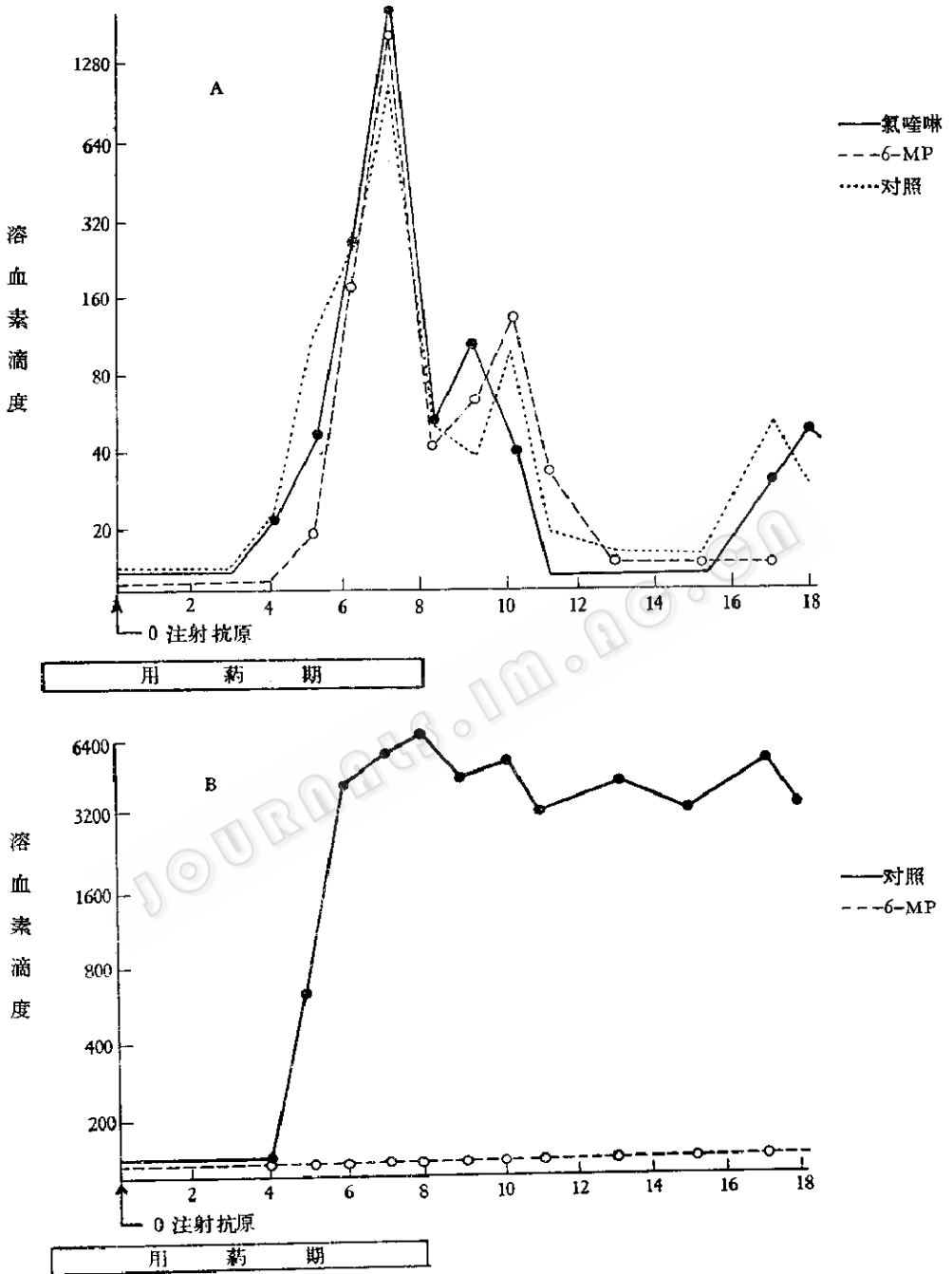


图1 A. 氯喹啉和6-MP对小白鼠形成溶血素的影响
 B. 6-MP对家兔形成溶血素的影响

晚10点开始给7只动物喂氯喹啉,第14天晨6点及下午2点重复喂药,剂量每次40毫克/千克。另7只每次喂水作为对照。第14天上午8点取3对进行决定性注射,结果均发生过敏性休克死亡。下午5点时对另4对进行攻击,结果实验组4只中死亡3只,对照组死亡3只,休克后延至次晨死亡者1只。因此两组基本无差别。

討 論

我們进行这些实验的出发点是因为氯喹啉在临床上对治疗一些自家免疫疾病和过敏性疾病有一定疗效,一方面从抑制抗体形成着手,另一方面从抑制抗原抗体结合或结合后某一反应环节着手,进行动物中的考验。从我们的实验结果来看,氯喹啉对免疫反应的抑制作用远不如 6-MP 那样显著和广泛。它对家兔和小白鼠形成抗体的能力均无抑制作用。其中可能理由之一,是所用动物模型对药物不是敏感的。不同动物种别反应性不一,这是免疫学工作者从事实验时常须想起的一个问题。以化学药物抑制免疫反应而言,豚鼠对 6-MP 的反应远远不如家兔那样敏感,所用剂量比家兔大 13 倍时仍未显示抑制作用^[19]。因此氯喹啉是否仅作用于人,而对家兔和小白鼠的作用极微或无,尚不能定论。如果在人体中经人工注射抗原后,也得到了类似的阴性结果,则除非氯喹啉的疗效是由于抑制抗体的形成就更有力。我们在豚鼠过敏试验中,也未看到氯喹啉对抗原抗体结合或结合后某一环节起作用。进一步的研究氯喹啉对人体中已知抗原抗体系统的结合是否起影响,如果也是阴性的话,则很容易使人想起氯喹啉的疗效不是免疫学反应,而是一种化学效应。正如 Parker 和 Irvin 二氏观察到氯喹啉能与核酸和核蛋白起反应从而阻止了抗体对核蛋白的作用^[20]。Holman 和 Kunkel 二氏进一步观察到将细胞核以阿的平处理后可以防止 LE 因子的吸收和 LE 细胞的形成^[21]。Kurnick 和 Radcliffe 二氏最近也报告了抗疟药物和去氧核糖核酸的反应研究^[22]。这些观察对于解释氯喹啉能治疗全身性红斑性脓疮是完全可以接受的。但是事实上,氯喹啉还用于治疗类风湿性关节炎、支气管哮喘、慢性肾炎等等^[13-17],而这些疾病根据目前知识水平即使属于过敏性或自家免疫病,也不是针对核质的。因此氯喹啉的疗效可能有一定的化学结合,同时可能有一定的免疫学机制。因此能进一步在人体中探求注射已知抗原后药物作用如何,对于解决其机制是有帮助的。我们也必须考虑到氯喹啉仅作用于自发的抗原抗体反应的可能性。果真如此,能以发生自发性自家免疫病的 NZB/B1 纯系小白鼠^[23]进行试验将会很有意义的。

在我们的实验中,还意外地观察到氯喹啉在较大剂量时,对家兔有刺激抗体形成的效果。这也象某些药物一样,在不同浓度时,作用有所不同,甚至完全相反。鉴于有此作用,在治疗自家免疫病时,合理地使用此具有双重性作用的药物,更应注意。临床上一些对此药物无好转的病例,是否将药量减少反有好处呢? 这一问题值得临床医师深思。

摘 要

1. 氯喹啉在 20—40 毫克/千克,每天两次,应用 10—12 天时,对家兔形成溶血素的能力无抑制作用,在 40 毫克时,反而刺激抗体形成 ($P < 0.01-0.05$)。

2. 氯喹啉在 0.2—1 毫克/只小白鼠,每天两次,应用 11 日时,对小白鼠形成溶血素能力无抑制作用。

3. 平行进行的 6-MP 试验,家兔形成抗体的能力受到抑制,小白鼠则不复有影响。

4. 氯喹啉对豚鼠过敏反应无防止发生的作用。

5. 根据实验结果进行了氯喹啉疗效机制的探讨,并指出进一步研究时的几个途径。

参 考 文 献

- [1] 謝少文、余濱主編：免疫学进展，上海科技出版社，上海，1962。
- [2] 郑武飞：有关自家免疫病发生机制的假說，天津医药杂志（即发表），1963。
- [3] Burnet, F. M.: *The Clonal Selection Theory of Immunity*, Vanderbilt Univ. Press, Nashville, Tenn., 1958.
- [4] Varco, R. L., *et al.*: *Ann. Surg.*, **142**:334, 1955.
- [5] Main, J. M., and Prehn, R. T.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **15**:1023, 1955.
- [6] Kass, E. H., *et al.*: *J. Exp. Med.*, **102**:767, 1955.
- [7] Berglund, K.: *Acta Path. et Microbiol. Scand.*, **55**:187, 1962.
- [8] Cannon, P. R.: *J. Immunol.*, **44**:107, 1942.
- [9] Axelrod, A. E., and Pruzansky, J.: *Vitamins and Hormones*, **13**:1, 1955.
- [10] Axelrod, A. E.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **63**:202, 1955.
- [11] Wissler, R. W., *et al.*: *Arch. Path.*, **62**:62, 1956.
- [12] Schwartz, R., *et al.*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**:164, 1958.
- [13] Schwartz, R., and Dameshek, W.: *Blood*, **19**:483, 1962.
- [14] Levin, M. B., and Pinkus, H.: *New Eng. J. Med.*, **264**:533, 1961.
- [15] Young, J. P.: *Ann. Int. Med.*, **51**:1159, 1959.
- [16] Calkin, E., *et al.*: *Med. Clin. N. Amer.*, **45**:1219, 1961.
- [17] 裴政：中华内科学杂志，**11**(4):309, 1963。
- [18] Taliaferro, W. H., and Taliaferro, J. *Inf. Dis.*, **87**:37, 1950.
- [19] Genghof, D. S., and Battisto, J. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**:933, 1961.
- [20] Parker, E. S., and Irvin, J. L.: *J. Biol. Chem.*, **199**:897, 1952.
- [21] Holman, H. R., and Kundel, H. G.: *Science*, **126**:162, 1957.
- [22] Kurnick, N. B., and Radcliffe, I. E.: *J. Lab. & V. Clin. Med.*, **60**:669, 1962.
- [23] Burnet, F. M.: *Proc. Roy. Soc. Med.*, **55**:619, 1962.

ATTEMPTS TO INHIBIT IMMUNOLOGICAL RESPONSE BY CHLOROQUINE

CHENG WU-FEI, GAO NAI-ZHUNG, CHAO GEN-HANG, CHEN QING-RONG,
SUN DE-RONG AND WANG YI-JING

(Department of Microbiology, Tientsin Medical College, Tientsin and Department of Microbiology; Institute of Epidemiology, Hopei Academy of Medical Science, Tientsin)

When chloroquine was given 20—40 mg/kg b.i.d. in an eleven day period beginning two days before antigen injection, it failed to inhibit hemolysin formation in rabbits. On the contrary, at a higher dosage level (40 mg/kg), it enhanced antibody formation ($p < 0.01-0.05$).

Chloroquine given to mice at 0.2—1 mg b.i.d. for twelve days also failed to suppress antibody formation.

In a parallel experiment, 6-MP showed inhibitory effect on antibody production in rabbits, but not in mice.

Chloroquine also failed to prevent anaphylaxis in guinea pigs.

The mechanism of the therapeutic effect of chloroquine is discussed in connection with the above results, and further study to approach this problem is pointed out.