

6-巯基嘌呤(6-Mercaptopurine)对流行性感冒病毒抗体产生的影响

朱錫華 藍懋功 梁蔭蓀 曹文飛

1958年 Schwartz 与 Dameshek^[1]首次证明,6-巯基嘌呤(以下简称为6-MP)有抑制家兔产生抗体的作用。翌年,二氏^[2]又发表了6-MP可以引起成年家兔形成免疫耐受性(Immunological tolerance)的报告。由于这些成果在理论和实践上的意义较大,近几年来学者们使用6-MP所进行的研究工作日趋增加^[1-15]。但是对影响微生物抗体产生的报告,极为少见。Berenbaum^[17]在研究细胞毒性因子对抗体产生的影响时,曾以伤寒、副伤寒甲乙三联菌苗作为抗原,所研究的24种细胞子中也有6-MP在内。我们认为研究6-MP对微生物抗原之抗体产生的影响,在理论与实践上具有一定的意义。为此我们进行了以下的实验,现介绍如下。

材料与方 法

实验动物 系本校动物室饲养的白色家兔,体重平均在2公斤左右。实验及对照组各为12只,分别饲养于本室专用动物房内。

6-MP 系国产,北京制药厂出品。先将6-MP用1N NaOH稀释成0.1毫升中含10毫克,待其充分溶解后,再以生理盐水稀释10倍,使每毫升中含10毫克6-MP。实验动物每公斤体重每日肌肉内注射0.6毫升(即每公斤体重注射6-MP 6毫克)。

病毒 系在本室传代保存的PR₈株流行性感冒病毒(以下简称为流感病毒)。将病毒注射于10天胎龄之莱亨鸡胚尿囊内,35℃孵育48小时后,置4℃冰箱内过夜,翌日收获尿液。以鸡血球浓缩病毒,最后以生理盐水稀释成每毫升含4,000血凝单位的病毒。经56℃加温1小时灭活后,置4℃冰箱内保存,以备作免疫的抗原。

免疫 所有动物均以上述抗原1毫升经耳静脉免疫1次,并以免疫当天作为“零”天。实验动物于注射前2天开始至免疫后第13天止,共注射16天6-MP(每公斤体重每日肌肉注射6毫克,16天每公斤体重共注射96毫克)。对照组动物每公斤体重每日注射以生理盐水稀释10倍之1N NaOH 0.6毫升,注射天数与实验组同。

两组动物于免疫前分别自心脏采血1次;免疫后第4、6、8、10、14、19、24天各采血1次;每只动物共采血8次。分出血清置4℃冰箱保存,以备测定抗体。

血凝抑制试验 为除去家兔血清中非特异抑制物,每份血清均以CO₂处理^[18]。然后按本室常规法进行血凝抑制试验。血清灭活为56℃50分钟。

补体结合试验 按本室常规法进行。血清经65℃40分钟灭活,并采用了PR₈株流感病毒的尿膜抗原^[19]。

中和试验 血清经生理盐水1:2稀释后,以65℃40分钟灭活。PR₈株流感病毒新鲜尿液以生理盐

水按 2×10^{-1} 、 2×10^{-2} ... 2×10^{-10} 稀释。不同稀释度的病毒各加等量灭活血清,置 37°C 孵箱内 30 分钟,然后进行鸡胚接种。以上记血清病毒混合液 0.1 毫升注射 10 天龄之鸡胚尿囊内,每一病毒稀释液注射 4 只鸡胚,经 35°C 48 小时孵育后,再置 4°C 冰箱内过夜,然后收集尿液以血凝试验滴定每一鸡胚有无病毒存在。结果以 Reed-Muench 二氏法计算之。

纸上电泳试验 使用 3×33 厘米新华滤纸普通倒 V 形装置,巴比妥缓冲液(pH 8.6, μ 0.1),于电势梯度 7V/厘米及室温($27-30^{\circ}\text{C}$)下电泳 10 小时。每份血清用纸 4 条,每条加血清 0.03 毫升。泳后取出其中 1 条经 105°C 10 分钟固定后,作偶氮胭脂红染色。

同一标本未经染色之 3 条泳后滤纸,按照已染色滤纸条上的区带分别剪开,属同一区带之各纸段加在一起,分别以 1.35 毫升生理盐水浸渍 2 小时(4°C)。离心除去纸渣,上清液经 56°C 30 分钟灭活后,用血凝抑制试验测定抗体。

实 验 结 果

(一) 血凝抑制试验的结果

实验组动物因药物毒性作用死亡 4 只,故仅以 8 只动物血清进行实验,对照组也选用了 8 只动物血清。每只动物共采血

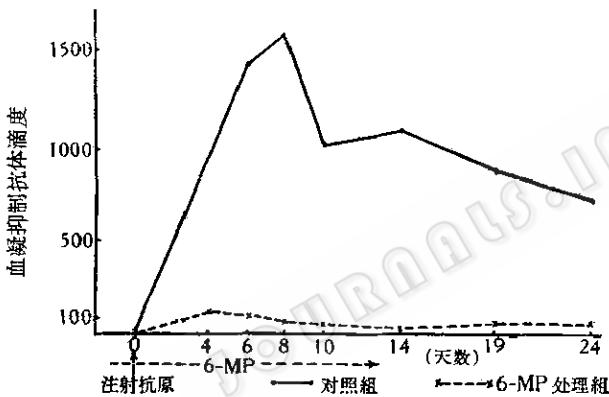


图 1 6-MP 处理组和对照组动物血清的血凝抑制抗体滴度的比较

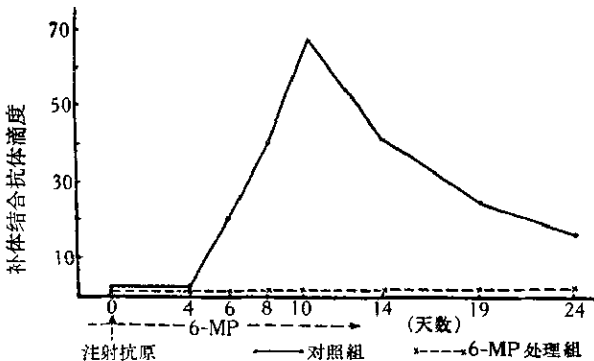


图 2 6-MP 处理组和对照组动物血清的补体结合抗体滴度比较

8 次,每组 8 只,故每组有 64 份血清标本。其血凝抑制抗体的平均滴度比较如图 1。

(二) 补体结合试验的结果

将两组动物同一天所采的 8 份血清,每 4 份合为 1 份。每组所采的 8 次血清共混合为 16 份标本,进行了补体结合试验。结果见图 2。

(三) 中和试验的结果

正常家兔血清 1 份,6-MP 处理组免疫后第 8、10 天标本各 1 份,对照组免疫后第 8、10 天标本各 1 份,共 5 份标本,每份标本皆为同一天所采的 8 份家兔的混合血清。结果如表 1。

(四) 纸上电泳试验结果

以实验组及对照组各 6 只家兔之免疫后第 8 天血清,分别混合为两份标本,免疫后第 10 天两组各 4 只家兔的单份血清共 12 份标本,进行纸上电泳及洗脱后血凝抑制抗体的测定。结果如图 3。

就电泳所得血清蛋白区带图象来看,不论混合血清或单个血清,实验组及对照组均无明显区别。但洗脱液抗体滴度却有明显区别。而且经实验证明,正常血清各区带之洗脱

表 1 6-MP 处理组及对照组动物血清的中和试验结果

血 清		*EID ₅₀	中 和 指 数
正 常 家 兔		8.5	0
6-MP 处理家兔	免疫后第 8 天	7.0	31.62
	免疫后第 10 天	6.33	147.9
对 照 组 家 兔	免疫后第 8 天	0.65	70,790,000
	免疫后第 10 天	0.53	93,330,000

* EID₅₀ 表示鸡胚的 50% 感染量。

液无特异性抑制物存在。在作标本的结果一致显示流感病毒家兔免疫血清的特异性抗体存在于丙种球蛋白中。此点与文献记载^[20,21]相一致。

根据上述 4 种实验所得的数据来看, 6-MP 确有抑制家兔产生 PR₈ 株流感病毒抗体的作用。

讨 论

上述结果表明, 当家兔以加温灭活之 PR₈ 株流感病毒进行免疫时, 如在免疫前后连续注射 16 天 6-MP (每公斤体重每日肌肉注射 6 毫克) 可以完全抑制家兔产生 PR₈ 株流感病毒的抗体。这一结果促使我们提出以下两个推论: (1) 6-MP 常被医学家用于治疗肿瘤, 若病人在用药期间, 不幸遇有病原微生物的侵袭, 果真也和本实验的结果一样, 丧失了产生抗体的能力, 其后果肯定不会太好, 此点不能不引起人们的注意。 (2) 是否考虑用 6-MP 来降低动物的防御功能, 从而增强其对某种病原微生物的感受性。为证明以上两点推论是否正确, 需今后进一步深入研究。

某些学者们^[12,16]发现若将可溶性抗原加上辅佐剂(adjvant)后免疫家兔, 则 6-MP 不能抑制动物产生抗体, 他们认为这是因为辅佐剂赋与了更强烈刺激条件的缘故。Genghof^[6]等证明, 对豚鼠使用大量 6-MP 也不能抑制抗体的产生, 由此可以发现 6-MP 不能对所有动物产生抗体均有抑制作用。我们的实验使用了灭活而较纯的病毒, 就是想尽量除去可能加强抗原刺激强度的因素; 我们为除去家兔血清中的抑制物花了一定时间, 目的是用家兔作实验动物。从而得到了阳性结果。

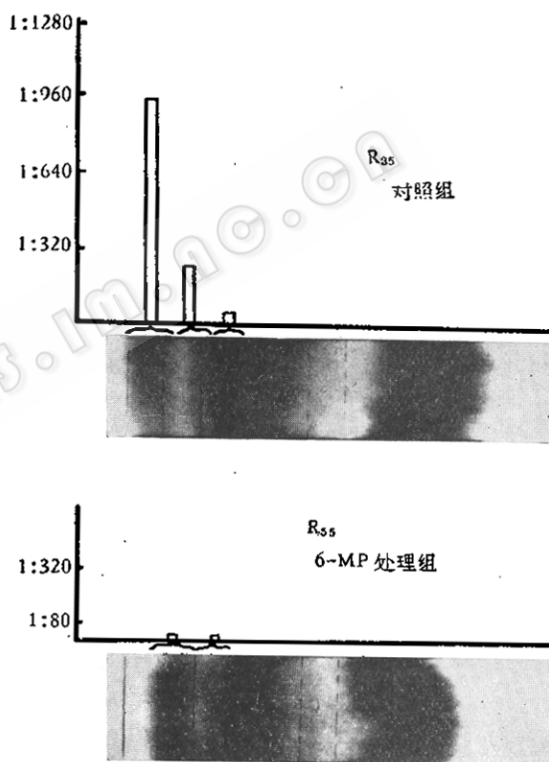


图 3 免疫后 8 天 6-MP 处理组 and 对照组血清(混合)电泳及特异性血凝抑制抗体滴度比较

結 論

实验证明家兔每公斤体重每日注射 6 毫克 6-MP, 可以抑制家兔产生抗 PR₈ 株流感病毒的抗体。根据这一结果, 我们提出了两个推论: (1) 以 6-MP 治疗肿瘤时, 若遇有病原微生物的侵害, 是否将要产生不良后果。(2) 是否可以考虑使用 6-MP 来降低动物的抵抗力, 从而增强该动物对某种病原微生物的感受性。

参 考 文 献

- [1] Schwartz, R. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**:164, 1958.
- [2] Schwartz, R. et al.: *Nature*, **183**:1682, 1959.
- [3] Schwartz, R.: *Clin. Res.*, **7**:39, 1959.
- [4] Schwartz, R. et al.: *J. Clin. Invest.*, **38**:1394, 1959.
- [5] Laplante, E. S. et al.: *Fed. Proc.*, **19**:200, 1960.
- [6] Genghof, D. S. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**:933, 1961.
- [7] Goh, K. et al.: *J. Immun.*, **86**:606, 1961.
- [8] Шенлягин, В. Я.: Бюл. Экспер. Биол. Мед., **8**:69, 1962.
- [9] Feldman, M. et al.: *Mechanisms of Immunological Tolerance*, p. 305, 1962 (Prague).
- [10] Mecker, W. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**:459, 1959.
- [11] Schwartz, R. et al.: *J. Clin. Invest.*, **39**:952, 1960.
- [12] Robinson, J. L. et al.: *Nature*, **187**:796, 1960.
- [13] Meeker, W. et al.: *Fed. Proc.*, **19**:217, 1960.
- [14] Nathan, P. et al.: *Fed. Proc.*, **19**:216, 1960.
- [15] Jacina, J. et al.: *Mechanisms of Immunological Tolerance*, p. 315, 1962 (Prague).
- [16] Hoyer, L. et al.: *Fed. Proc.*, **19**:208, 1960.
- [17] Berenbaum, M. C.: *Nature*, **185**:167, 1960.
- [18] 刘锦棠等: 微生物学报, **7**:284, 1959.
- [19] 闻仲权等: 微生物学报, **4**:167, 1956.
- [20] Tyrrell, A. J.: *J. Immun.*, **72**:494, 1954.
- [21] Styk, B. et al.: *Acta Virol.*, **4**:365, 1960.

EFFECT OF 6-MERCAPTOPURINE ON ANTIBODY PRODUCTION OF INFLUENZAE VIRUS

CHU HSI-HUA, LAN MAO-GUN, LEAN IN-SUN AND SHO WUN-FE

Antibody production against PR₈ strains of Influenza virus was found to be inhibited by 6-MP in a dosage of 6 mg/kg per day in rabbits.

This reduction in antibody response was demonstrated by hemagglutinin-inhibition test, complement fixation and neutralization test, as well as by paper chromatography for gamma globulin fraction. The significance of the results was briefly discussed.