

眼镜蛇蛇毒因子与大鼠中性白细胞吞噬功能减退的量效研究^①

区景松^{1,②} 孙培吾¹ 王传恩²

(1 中山医科大学附属第一医院心胸外科; 广州, 510080 2 中山医科大学微生物教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 研究中华眼镜蛇的蛇毒因子(CVF)与中性白细胞吞噬功能的量效关系及 CVF 在非协调性异种心脏移植应用中的意义。方法: ①用不同剂量的 CVF 腹腔腔内注射(i. p.) SD 大鼠, 测定大鼠血液中性白细胞噬菌率; ②经 CVF i. p. 处理后大鼠进行颈部豚鼠一大鼠异种心脏移植, 然后测定移植前后大鼠不同时点的血液中性白细胞噬菌率。结果: ①CVF 能使大鼠血液中性白细胞噬菌功能减退, 并呈量效关系; ②经 CVF 处理的大鼠移植后无发生超急排斥反应(HAR), 且血液中性白细胞噬菌率明显减退, 至术后 3 d 内仍未恢复。结论: ①CVF 有抑制中性白细胞噬菌功能, 且呈量效关系; ②CVF 可抑制非协调性异种心脏移植的 HAR, 测定中性白细胞噬菌功能是一种简便测定 CVF 体内抗补体活性的方法。

主题词 眼镜蛇毒液类; 中性白细胞; 吞噬作用; 心脏移植; 移植, 异种

中图分类号 R 967; R 392.4

The Dose-effect Relationship Between Cobra Venom Factor and the Phagocytosis of Neutrophilic Leucocytes

Ou Jingsong¹ Sun Peiwu¹ Wang Chuanen²

(1 Cardiac Surgery Division of First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080

2 Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To study the dose-effect relationship between cobra venom factor (CVF) separated from the Chinese cobra venom and the phagocytosis of neutrophilic leucocytes and its potential use in discordant cardiac xenotransplantation. **Method:** 10 ~ 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CVF were injected i. p. into rats and the blood samples were collected to measure the bacteriophagic rate of neutrophils, and then, the guinea pig to rat cardiac xenotransplantation was carried out. **Results:** ① CVF decreased the bacteriophagic rate of neutrophils with dose-dependent manner. ② In CVF-pretreated SD rats with guinea pig to rat cardiac xenotransplantation, CVF prolonged the survival of guinea pig hearts for 2 ~ 3 days. **Conclusions:** CVF can inhibit the bacteriophagic function of neutrophils with a dose-dependent manner and can inhibit hyperacute xenotransplantation rejection. Measuring bacteriophagic rate of neutrophils is a simple and convenient method for determination of CVF anticomplementary activity.

Subject headings cobra venoms; neutrophils; phagocytosis; heart transplantation; transplantation, heterotogous

眼镜蛇的蛇毒因子(CVF)具有耗竭补体、抑制非特异性免疫作用的研究早已有报道^[1]。近年还发现 CVF 剂量与血清总补体水平存在量效关系^[2], 且报道 CVF 可通过抑制吞噬细胞和抗原粘附影响吞噬细胞的吞噬功能^[3,4]。因此, CVF 是否

与吞噬细胞的吞噬功能也存在量效关系? 此外, 由于非协调性异种心脏移植是解决供心严重短缺问题的一种好办法, 国外不少学者利用 CVF 耗竭特性应用于抗非协调性异种心脏移植模型抗超急排斥反应(HAR), 并获良好效果^[5,6]。因此, 了解 CVF

① 1996 年度广东省卫生厅“五个一科教兴医工程”基金资助课题; ② 本校 97 级博士生

在非协调性异种心脏移植中的作用机制有助于研究非协调性异种心脏移植的排斥机理和扩宽 CVF 的用途。本文报道 CVF 与 SD 大鼠血液中性白细胞吞噬功能减退的量效关系,以及经 CVF 处理后的大鼠,进行非协调性异种心脏移植后血液中性白细胞吞噬功能的情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 CVF 中华眼镜蛇 CVF 由广西医科大学蛇毒研究所提供。CVF 的来源、提纯方法及其生化性质详见 Chen^[4] 文中所介绍。本品用中华眼镜蛇毒,依次经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱, CM-Sepharose CL-6B 柱及羟基磷灰石层析后,最后用高效液相 LKB TSK-G 3 000 SW 分子凝胶柱纯化而成,产量为粗毒蛇毒 w (CVF) $\approx 0.5\%$, 纯化后的 CVF 在聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上呈单一区带,相对分子质量为 225 000,等电点为 6.20,本品为糖蛋白,含 w (中性已糖)=2.21%, w (唾液酸)=0.61%,从氨基酸成分分析可见 CVF 含有较多的酸性氨基酸,在 280 nm 处的消光系数为 $E_{1\text{cm}}^{0.1\%} = 1.050$,本品无磷脂酶 A₂ 活性,活性测定其一个抗补体活力单位为 12.72 μg ,一个溶血活力单位为 371.5 ng。

1.1.2 实验动物 雄性 SD 大鼠 35 只,体重 300~400 g,由中山医科大学动物实验中心提供,供用药及抽血用,其中 5 只作异种心脏移植宿主;雄性豚鼠 5 只,体重 250~350 g,由中山医科大学动物实验中心提供,作心脏移植供体。

1.2 方法

1.2.1 分组 35 只 SD 大鼠随机分成 7 组,每组 5 只。

第 1 组:对照组:腹腔内注射(i. p.)生理盐水 2 mL;第 2~6 组:实验组:分别 i. p. CVF 10、20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (日剂量);第 7 组:移植组:i. p. CVF 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (在手术前的日剂量)。

1.2.2 给药 所有动物第 1 天及第 4 天给药,每天分 2 次,间隔 5 h,于注射前 1 d 和第 5 天用乙醚吸入麻醉下用心脏穿刺抽血 1 mL,并用 0.13 mmol/L 枸橼酸钠抗凝供测定白细胞吞噬金葡萄菌的噬菌率用,移植组于第 5 天进行豚鼠一大鼠异种心脏移植,并于移植后第 1 天及供心停止跳动时抽血供测定白细胞吞噬金葡萄菌的噬菌率用。

1.2.3 心脏移植 心脏移植方法采用 Cuff 法异位移植于颈部^[7]。简述为:以 SD 大鼠作宿主,用 30 g/L 戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,然后分离大鼠右侧颈总动脉和颈外静脉,并套上 cuff 管,然后以豚鼠作供体,取出供心,将供心的主动脉和肺动脉以外的血管全部结扎,然后将供心的主动脉和肺动脉分别与大鼠的右侧颈总动脉和颈外静脉对接。然后开放血管夹见供心自动复跳为移植成功。移植后用手于颈部触摸供心搏动情况来判别供心存活情况,以供心无搏动为供心被排斥标志,并取出供心送病理切片作 H-E 染色及用免疫荧光法检测血管内皮 C3 沉积情况。

1.2.4 血液中性白细胞吞噬功能测定^[8] 所有抗凝血于抽血后 2 h 内进行检测。过程:于抗凝血中加入 0.3 mL 的 $10 \times 10^{11}/\text{L}$ 金黄色葡萄球菌,混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中水浴 20 min,每 5 min 振摇 10~15 次,取出用上海手术器械厂生产的最高转速 4 000 r/min,最大离心力为 $1\,790 \times g$ 的 800 型离心机离心 10 min(2 000 r/min),吸取位于红细胞上层的白细胞,用冷 Hanks'液冲洗,离心 5 min(1 500 r/min),去上清 2/3,混匀涂片,用 Wrights 染色,油镜下检查计数 100 个中性白细胞吞噬细菌的细胞数,然后以噬菌率的对数单位(y)及 CVF 用量的对数单位(x)作图,以了解 CVF 与噬菌率的关系,噬菌率的对数 $y = \lg[\text{给 CVF 前噬菌率} - \text{给 CVF 后噬菌率}] / \text{给 CVF 前噬菌率}$,其量和单位表示为 $y = \{\lg[(\text{pre CVF} - \text{post CVF}) / \text{pre CVF}]\} / 1$, CVF 用量的对数 x 的量和单位表示为 $x = \{\lg[\lg \text{CVF} (\mu\text{g}/\text{kg})]\} / 1$ 。

1.2.5 统计分析 1~6 组 i. p. 前各组间中性白细胞噬菌率比较、移植组间比较用多组比较的方差分析,各组 i. p. 前后中性白细胞噬菌率比较用配对 t 检验, CVF 用量的对数单位与中性白细胞噬菌率的对数单位作相关分析。

2 结果

2.1 CVF 对大鼠血液中性白细胞吞噬功能的影响

1~6 组 SD 大鼠给药前、后血液中性白细胞噬菌率及其对数单位见表 1,表中所见,给 CVF 前各组间噬菌率差异无显著性($P > 0.05$),给 CVF 后除对照组噬菌率无变化外,各组噬菌率均显著下降,和 CVF i. p. 前的中性白细胞噬菌率相比有显著差异($P < 0.05$), CVF 用量越大,差值越大,表明有

随着 CVF 的用量增大而噬菌率下降加快的趋势。量效关系曲线可见 CVF 用量的对数单位与噬菌率下降的对数单位有量效关系, 其直线方程为: $y =$

$-0.777 + 2.097x$, $r = 0.960$, $n = 25$, $P < 0.05$, y 代表噬菌率下降的对数单位, x 代表 CVF 用量的对数单位, 见图 1。

表 1 CVF 剂量对血液中性白细胞噬菌率的影响

Table 1 The effect of CVF on bacteriophagic rate of neutrophils

($\bar{x} \pm s$)

Group	D_{CVF} ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	n	r (Bacteriophagic rate of neutrophils)/ (%)		$\lg[(\text{pre CVF} - \text{post CVF}) / \text{pre CVF}]^3$
			pre CVF ¹⁾	post CVF	
1	0	5	94 ± 4	93 ± 4	
2	10	5	95 ± 3	81 ± 4 ²⁾	-0.86 ± 0.08
3	20	5	93 ± 4	60 ± 3 ²⁾	-0.46 ± 0.04
4	40	5	94 ± 4	45 ± 3 ²⁾	-0.285 ± 0.018
5	80	5	94 ± 4	33.8 ± 2.7 ²⁾	-0.194 ± 0.010
6	160	5	93 ± 4	22.4 ± 2.1 ²⁾	-0.119 ± 0.009

1) Among of groups pre CVF, $F = 0.176$, $P > 0.05$; 2) compared with pre CVF, t -test, $P < 0.05$; 3) $\lg[(\text{pre CVF} - \text{post CVF}) / \text{pre CVF}]$; 4) [bacteriophagic rate of neutrophils (%)]

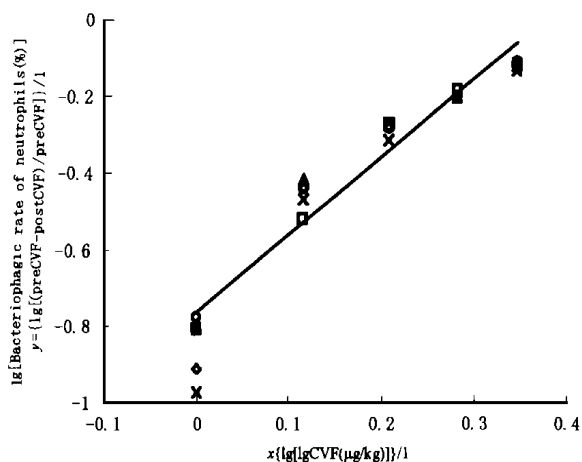


图 1 CVF 与血液中性白细胞噬菌率的量效关系

Fig. 1 The relationship between the CVF doses and the bacteriophagic rates of neutrophils

2.2 移植组情况

移植组 5 只豚鼠—大鼠非协调性异种颈部心脏移植均成功, 本组实验 5 个供心存活时间为 2~3 d, 在光学显微镜下呈现心肌间质炎症细胞浸润和广泛血栓等延迟排斥反应(DXR)的表现, 免疫检测血管内皮未见明显 C3 沉积, 故无 HAR 发生。各时间点血液中性白细胞噬菌率见表 2, 表中可见移植后血液中性白细胞噬菌率于术后第 1 天比给药前明显下降 ($P < 0.05$), 而且至供心停止跳动时仍未见恢复 ($P > 0.05$)。

表 2 给 CVF 前与豚鼠—SD 大鼠心脏移植后血液中性白细胞噬菌率

Table 2 The bacteriophagic rate of neutrophils of pre CVF medication and post guinea pig to SD rat cardiac xenotransplantation

	n	r (Bacteriophagic rate of neutrophils)/ (%) ¹⁾
Pre CVF medication	5	93 ± 4
Post-transplantation on the first day	5	24 ± 3 ²⁾
Donor heart arrest (post-transplantation 2-3 days)	5	25.4 ± 2.4 ^{3), 4)}

1) Among of groups $F = 740.1$, $P < 0.05$; 2) compared with pre CVF medication, $q = 47.39$, $P < 0.05$; 3) compared with pre CVF medication, $q = 46.43$, $P < 0.05$; 4) compared with post-transplantation on the first day, $q = 0.962$, $P > 0.05$

3 讨论

用 CVF 耗竭补体影响非特异性免疫功能得到广泛应用^{5,6)}。近年还发现, CVF 可影响吞噬细胞的吞噬功能^{3,4,9)}。国内庄茂辛发现, CVF 不但可以降低豚鼠体内的溶血补体浓度, 表现为 CH50 水平下降, 也可使豚鼠外周血中性白细胞计数增加, 但吞噬功能下降¹⁹⁾, 故进一步了解 CVF 对吞噬细胞的吞噬功能的影响将有助于扩宽 CVF 的用途。

本实验发现, 在 SD 大鼠体内给予不同剂量的

CVF后,大鼠血液中性白细胞吞噬金葡萄功能明显减退,而且也象消耗补体一样存在量效关系, CVF用量的对数单位与大鼠血液中性白细胞噬菌率下降的对数单位呈正相关,直线方程为 $y = -0.777 + 2.097x$,当 CVF 用量达 $160 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,大鼠血液中性白细胞噬菌率被抑制至 22.4% ,从而再次证实 CVF 有抑制中性白细胞吞噬功能。补体系统的激活可产生过敏毒素 C3a 和 C5a。C3a 可导致平滑肌收缩,增加血管的渗透性、嗜碱性白细胞脱粒并释放组胺;而 C5a 可激活吞噬细胞,肥大细胞和嗜碱性白细胞,增加中性白细胞的粘附并使其向微生物趋化、聚集。这样被 C5b-9 包裹调理的微生物就可通过存在吞噬细胞表面的补体受体与之结合而被固定,为 IgG 依赖的吞噬作用所必须,使微生物被摄入吞噬细胞内^[3,4]。CVF 具有强大的耗竭补体活性,它能通过旁路途径激活补体,降解 C3 和 C5,产生 C3a、C3b、C5a 和 C5b,被 H 因子和 I 因子清除而耗竭,干扰吞噬细胞和抗原的粘附。本实验相隔 3 d 分 4 次应用 CVF 的目的就是使补体及其产物 C3a、C5a 耗竭; CVF 还可使白细胞的释放氧减少,髓过氧化物酶活性降低,可能也是吞噬功能下降的内因。由于 CVF 具有耗竭补体和使中性白细胞吞噬功能减退双重功能,故可应用于移植研究和药物治疗非特异性免疫缺陷机制的研究。

此外,由于心脏移植的迅猛发展,供心来源短缺问题日益严重,而非协调性异种心脏移植是解决此问题的好办法。然而非协调性异种心脏移植存在严重的 HAR 和 DXR。目前,不少学者利用 CVF 的耗竭补体特性来抑制 HAR,并得到满意效果^[5,9],本实验发现,经 CVF 处理的 SD 大鼠进行豚鼠一大鼠异种心脏移植,移植后 5 个供心均存活 2~3 d,光学显微镜下呈 DXR 表现,血管内皮无明显 C3 沉积,表明 CVF 能耗竭补体抑制 HAR,这与文献报道的相似^[5,9]。实验还发现,移植术后第一天血液中性白细胞噬菌率明显降低,到供心停止跳动时仍未恢复,这与前面 CVF 有抑制中性白细胞吞噬功能结果相对应,进一步说明 CVF 的抑制中性白细胞的噬菌功能,这可能是 CVF 有较其它单纯抑制补体处理因素使非协调性异种心脏移植的供心存活时间更长的原因^[5,9]。抗原递呈细胞(APC)对抗原的处理需 C3 参与,而 CVF 耗竭 C3,使 APC 减弱递呈抗原功能而干扰 T 细胞的特异性免疫功能,

这对延长 DXR 的发生有一定作用,可能是 CVF 使供心存活时间较长的另一原因。因此, CVF 在非协调性异种心脏移植模型中是目前一种较理想的抗排斥药物。

另外,本实验将测定血液中性白细胞吞噬功能的方法稍作修改,先将细菌加入全血中水浴,让中性白细胞吞噬,这样可以模拟细菌在体内血液中的环境,而且造成白细胞破坏可能少,减少在体外保存白细胞的麻烦,故测得的噬菌率更能反映体内的吞噬功能情况,而且方法更简便和经济。

(感谢广西医科大学蛇毒研究所汤圣希教授为本实验提供 CVF 和指导;感谢中山医科大学药理教研室黄守坚教授对本文写作和数据整理的热情指导;感谢中山医科大学卫生统计学教研室方积乾教授对本文数据统计和作图的热情指导)

参 考 文 献

- 1 Ballow M, Cochrane C G. Two anticomplementary factors in cobra venom; hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them. *J Immunol*, 1969, 103(5): 944
- 2 Chen C, Shu Y, Zhuang M, *et al*. Studies on the isolation, characterization, antigenicity and anticomplementary activity of cobra anticomplementary factor. *J Natural Toxins*, 1996, 5(1): 73
- 3 Kinoshita T. Biology of complement; the overture. *Immunol Today*, 1991, 12(9): 291
- 4 Frank M M, Fries L F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 1991, 12(9): 322
- 5 Candinas D, Lesnikoski B A, Robson S C, *et al*. Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation*, 1996, 62(3): 336
- 6 Tanaka M, Murase N, Ye Q, *et al*. Effect of anticomplement agent K76COOH on hamster-to-rat and guinea pig-to-rat heart xenotransplantation. *Transplantation*, 1996, 62(5): 681
- 7 兰平,王吉甫. 袖套法异种心脏移植模型. *中华器官移植杂志*, 1997, 18(4): 212
- 8 张明安,朱作金,宋志军,等. 不同浓度 NO₂ 对免疫功能的影响. *广西医学院学报*, 1995, 2(1): 1
- 9 庄茂辛,吴耀生,李曼玲,等. 黄芪、党参、人参多糖对豚鼠免疫功能的影响. *中国药学杂志*, 1992, 27(11): 653

(1999-05-20 收稿 1999-06-08 修回)