

倍半氧化羧乙基锗对小鼠免疫功能的调节作用

卫生部食品卫生监督检验所 研究生: 来向红 导师: 戴寅 徐晋康

摘要: 本实验研究了倍半氧化羧乙基锗(Ge-132)对C57BL/6j小鼠免疫功能的影响。实验结果表明, Ge-132能够增强小鼠T淋巴细胞转化反应、增加抗体形成细胞数量, 在一定范围内呈现剂量依赖性。Ge-132还具有诱生r型干扰素和白细胞介素-Ⅱ的作用。各项实验指标之间的相关性分析提示, Ge-132的免疫增强作用可能与其诱生免疫调节因子有关。

关键词 倍半氧化羧乙基锗 免疫增强

倍半氧化羧乙基锗(简称Ge-132)是人参、枸杞子等多种药用植物的有效成份, 1967年人工合成获得成功^[1]。高纯度的Ge-132为白色结晶, 分子量339.32, 无味、水溶性。Ge-132特殊的晶体结构和理化性质可能与其生物活性有关^[2,3], Ge-132毒性很低^[4,7], 具有广谱的药理活性: 降压^[8]、止痛^[9,10]、抗突变^[11]和抗衰老^[12]等。佐藤博等^[13]首次报道了Ge-132可能通过宿主介导的免疫反应发挥抗肿瘤效应, 使Ge-132成为新的免疫促进剂和调节剂的研究对象。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 Ge-132: 广州军区后勤部药物研究所提供。水溶液用NaOH调节PH至7.2, 置4℃冰箱保存。

1.1.2 实验动物: C₅₇BL/6j雄性小鼠, 6—8周龄, 中国医学科学院动物中心提供, 小鼠随机分成对照组和8个剂量组。

1.1.3 给受试物方案: 小鼠每天灌胃一次, 灌胃量0.2mL/10g体重, 连续14天, 对照组灌蒸馏水。

1.1.4 标准品与细胞系

1.1.4.1 小鼠干扰素标准品: 中国军事医学科学院微生物与流行病学研究所制品。

1.1.4.2 大鼠白细胞介素-Ⅱ标准品: SIGMA公司产品。

1.1.4.3 水泡性口炎病毒(VSV): Indiana株, 中国医学生物技术研究所病毒室赠。VSV用鸡胚纤维母细胞传代, TCID₅₀为10⁻⁵。(TCID₅₀指能使50%细胞出现细胞病变效应的最高病毒稀释度)。

1.1.4.4 鼠L-929(L929B)细胞系: 中国医学科学院医药生物技术研究病毒室赠。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾淋巴细胞转化反应: MTT比色法(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide比色法)^[14]。

1.2.2 抗体形成细胞溶血空斑试验: 琼脂玻片法^[15]。

1.2.3 小鼠体内诱生干扰素试验: 微量细胞病变抑制观察法^[16]。

1.2.4 白细胞介素-Ⅱ(IL-2)活性测定:

IL-2的制备^[17,18]: 不同剂量的Ge-132连续经口给予小鼠, 14天后处死, 无菌条件下取出脾脏, 用RPMI-1640完全培养液(含有灭活小牛血清, 谷氨酰胺和抗菌素)制备脾细胞悬液, 浓度为5×10⁶个/mL。以1mL/孔分装于24孔培养板, 每孔加入ConA 5ug, 设不加ConA刀豆球蛋白A对照孔, 置CO₂培养箱培养48h, 离心取上清液即为IL-2粗制品。—20℃冰箱保存。

ConA活化小鼠脾细胞制备^[10,20]：未用Ge-132处理的、正常的C₅₇BL/6j小鼠处死后，无菌制备脾细胞悬液(5×10^6 ml) 每毫升加ConA 5 μ g，置CO₂培养箱培养48h，收集培养细胞，用 α -甲基甘露糖苷洗液(每毫升RPMI-1640培养液中含 α -甲基甘露糖苷20mg)洗细胞三次，以除去ConA，然后用RPMI-1640完全培养液重新调制细胞悬液(5×10^6 个/ml)，作为小鼠IL-2活性的检测细胞。

IL-2活性测定：MTT比色法^[14]。

2 结果

2.1 Ge-132对小鼠脏器/体重比值的影响

各剂量组的胸腺/体重比和脾脏/体重比与对照组之间无显著差别(见表1)。

2.2 对脾淋巴细胞转化的影响

由图1可见，淋巴细胞转化反应自50mg/kg组开始增强，200mg/kg组达到高峰，随后略有下降，但仍高于对照组，其中200mg/kg组和400mg/kg组与对照相比，差异显著($P < 0.05$)。

表1 小鼠脏器/体重比值($\times 10^3$)g

剂量组 mg/kg	胸腺/体重比		脾脏/体重比	
	$\bar{X} \pm SD$	n	$\bar{X} \pm SD$	n
对 照	2.362 $\pm$ 0.395	22	4.568 $\pm$ 0.993	22
12.5	2.531 $\pm$ 0.669	12	4.528 $\pm$ 0.660	12
25.0	2.475 $\pm$ 0.542	11	4.610 $\pm$ 0.756	11
50.0	2.375 $\pm$ 0.617	22	5.261 $\pm$ 1.533	21
100.0	2.472 $\pm$ 0.572	13	4.970 $\pm$ 0.893	11
200.0	2.411 $\pm$ 0.711	22	5.010 $\pm$ 1.269	22
400.0	2.589 $\pm$ 0.658	22	4.757 $\pm$ 0.839	22
600.0	2.443 $\pm$ 0.457	15	4.434 $\pm$ 0.747	15
800.0	2.298 $\pm$ 0.561	15	4.455 $\pm$ 0.957	15

2.3 对抗体形成细胞的影响

Ge-132明显增加小鼠脾细胞的抗体形成细胞数(PFC数)，最小有效剂量为25mg/kg适宜剂量为100~200mg/kg，在此剂量以下，PFC数随Ge-132用量的增加而增多，两者的相关系数 $R = 0.8756$ ，呈高度正相

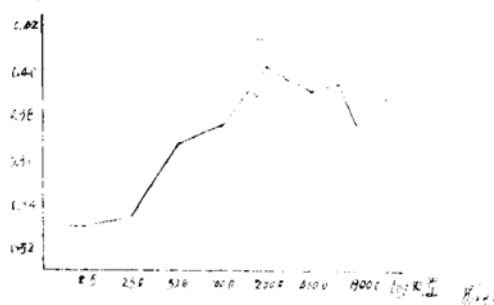


图1 小鼠脾淋巴细胞转化反应

关($P < 0.05$)；剂量超过400mg/kg，PFC数减少，但仍高于对照组(见图2)。

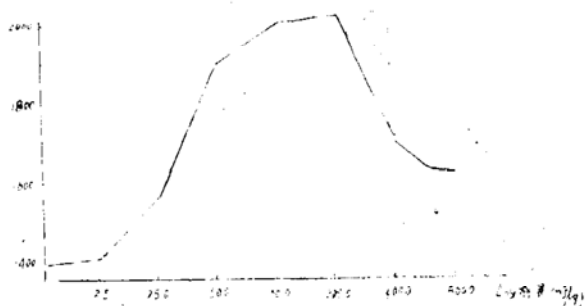


图2 Ge-132剂量与抗体形成细胞数

2.4 诱生血清干扰素的作用

2.4.1 血清干扰素(IFN)水平

小鼠血清中的干扰素滴度与Ge-132的剂量有关，12.5mg/kg组与对照组之间已具有显著性差异($P < 0.05$)，200mg/kg组和400mg/kg组的干扰素滴度分别为94U/ml和90U/ml，剂量大于400mg/kg，干扰素滴度趋于平稳(见图3)。

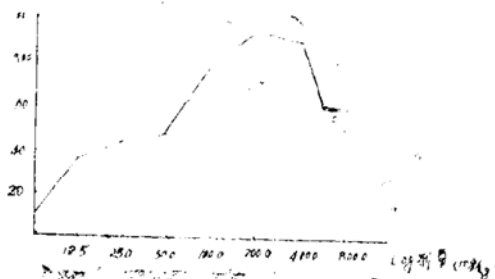


图3 Ge-132剂量与血清IFN滴度

2.4.2 诱生IFN的性质

Ge-132诱生的IFN经热处理，活性降

低70%；经酸处理，活性降低80%。这种对热和酸处理敏感的IFN初步确定为IFN- γ 。

表2 热酸处理对Ge-132诱生IFN活性的影响

处 理 方 法	干扰素滴度(U/ml)
对 照	75.0
56℃水浴 1小时	22.5
PH2.0 1小时	15.0

2.5 调节IL-2活性的作用

IL-2的活性单位参考修改的Andyers son'S方法，以平均增加指数表示¹⁰。平均增加指数是指某受试物在某浓度下增加指数的平均值。

增加指数 = 某浓度光密度值/Con A 对照组光密度值

每个剂量Ge-132的IL-2制品稀释度为1:2。

Ge-132对小鼠产生IL-2的诱导作用见表3。在实验剂量范围内，Ge-132增加IL-2的产生，其中200mg/kg组与对照组之间有显著性差异($P < 0.05$)。

表3 Ge-132对小鼠产生IL-2的影响

剂量组(mg/kg)	平均增加指数 $\pm$ SD	例数
对 照	2.267 $\pm$ 0.579	24
12.5	2.405 $\pm$ 0.663	12
25.0	2.376 $\pm$ 0.807	11
50.0	2.508 $\pm$ 0.677	22
100.0	2.678 $\pm$ 0.714	17
200.0	2.714 $\pm$ 0.677*	22
400.0	2.546 $\pm$ 0.567	22
600.0	2.333 $\pm$ 0.481	17
800.0	2.336 $\pm$ 0.409	17

*与对照组相比 $P < 0.05$

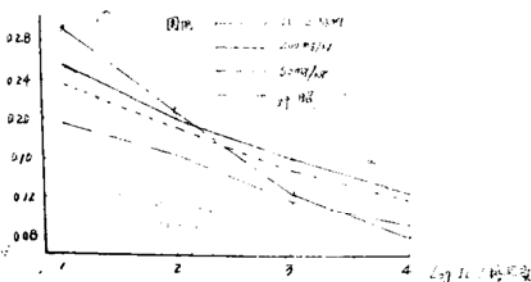


图4 活化脾细胞的增殖与IL-2稀释度的关系

由图4可见，随着小鼠IL-2制品稀释度的增加，MTT比色测得的光密度值不断降低，说明活化脾淋巴细胞的增殖对小鼠IL-2制品具有依赖关系。

3 讨论

3.1 免疫增强作用

根据药理学观点，免疫增强剂是指能提高机体免疫功能的一类药物，免疫调节剂是指使机体低下的免疫功能恢复正常但不超过正常水平；对异常过高的免疫状态又使之改善的药物，Ryan, JL²¹报道C₃H/HeJ小鼠免疫缺陷，老龄鼠常表现出免疫功能低下。用Ge-132处理老龄C₃H/HeJ小鼠，脾细胞在ConA刺激下，胸腺嘧啶核苷掺入量增加。100mg/kg Ge-132能使老龄C₃H/HeJ小鼠(40~50周龄)抗体形成细胞数量显著增加，使中年鼠(13~18周龄)轻度增加，两者的PFC数均接近正常水平，然而对PFC数正常的5~8周龄鼠没有影响。因此，Mizushima Yutaka²²认为，Ge-132是一种免疫调节剂。但是我们发现，Ge-132增强了6~8周龄C₅₇BL/6J小鼠的细胞免疫和体液免疫功能，在一定范围内呈现剂量一效应关系，说明Ge-132不仅增强免疫力低下小鼠的免疫功能，对正常小鼠同样具有免疫促进作用。

3.2 诱生免疫调节因子

关于Ge-132一次经口给予后诱生小鼠干扰素的作用已有报道²³。本实验观察了连续较长时间给予的诱生作用。随着Ge-132剂量增加，血清干扰素滴度呈上升趋势，适宜剂量为200~400mg/kg，但是，在适宜剂量下诱生干扰素的最高滴度明显低于文献报道的一次经口给予后诱生干扰素的最高滴度，也低于实验中的一次诱生滴度(结果从略)。推测出现这种现象的原因是干扰素诱生剂的低反应性。Ge-132诱生的干扰素对热和酸处理敏感，初步确定为干扰素- γ ，与文献报道一致，但尚需抗血清中和试验进

一步证实。

关于Ge—132诱生IL—2的效应,目前未见文献报道。IL—2是机体免疫应答过程中重要的免疫调节因子,能够促进T细胞增殖,诱导B细胞分泌免疫球蛋白,活化NK细胞和诱生干扰素。本实验结果表明,Ge—132具有诱导产生IL—2效应,对于探讨Ge—132的免疫增强和抗肿瘤作用的机制,可能具有一定意义。

3.3 免疫增强与免疫调节作用机理

日本学者认为,Ge—132增强和调节免疫功能的作用可能与其诱生干扰素有关。Hisashi Aso等一次经口给予Ge—132(300 mg/kg) 24h后,DDI小鼠血清中的干扰素滴度达到高峰值,与此同时,脾细胞中的NK活性增强;48h后,腹腔强Mφ活性增强。将Ge—132诱生IFN的血清制品移入其它小鼠体内,同样出现了增强NK活性, Mφ活性以及抗肿瘤活性效应^[24]。

在本次实验中,Ge—132诱生ILN和IL—2的作用趋势与Ge—132对脾淋巴细胞转化反应和抗体形成细胞溶血空斑试验的影响趋势基本相同,各项检测指标之间的相关性分析表明,IFN与T淋巴细胞转化和抗体形成细胞数之间,IL、2.5T淋巴细胞转化和抗体形成细胞之间以及IFN与IL—2之间均呈高度正相关,提示Ge—132在小鼠体内,可能通过诱生免疫调节因子,发挥免疫增强和抗肿瘤效应。

参 考 文 献

- [1] 浅井一彦,日本公开特许公报 昭46—2664
- [2] Tsutsui M Crystal structure of carboxyethylgermanium sesquioxide J Am Chem Soc 1976; 98: 8287
- [3] Kakimoto N. Organogermanium compound Synthesis and properties of bioactive germanium sesquisulfides Heterocycles 1985; 23(10)2681
- [9] Hachisu M Analgesic effect of novel organogermanium compound(Ge—132) JPharmacobiodyn. 1983; 6(1)814
- [10] Kumuro T Inhibitory effects of Ge132 (Carboxyethylgermanium sesquioxide) derivative on enkephalin-degrading enzymes Biotechnol Appl Biochem 1986; 8(5)379

- [11] Mechiru Ri H Antimutagenic effect of Ge—132 on rray—induced mutations in Escherichia Coli B/r wptp Int J Radiat Biol 1982; 42(6)653
- [12] Kuga N Inhibition of semile amyloidosis of mice by biocarboxyethylgermanium sesquioxide Acta patho Jpn 1976; 26(1) 63
- [14] Tim Mosman. Rapid colorimetric assay for growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays J Immunol Meth 1983; 6555
- [15] 陶义训主编. 临床免疫学检验, 上册 上海, 上海科学技术出版社 1983 102~104
- [16] 杜平主编 医用实验病毒学. 北京, 人民军医出版社 1985; 160~162
- [17] Seefan H E Biological functions of T cell lines with specificity for the intracellular bacterium listeria—Monocytogenes in vitro and in vivo J Experi Med 1982; 1551754
- [18] 翁晓春, 免疫调节剂对大鼠IL—2产生的影响中. 国免疫学杂志1987; 3(2)70
- [19] Aucleron I Studies on T lymphocyte activation Eur J Immunol. 1979; 9; 581
- [20] 郭实士: 斑秃病人IL—2产生能力的观察. 中国免疫学杂志1987; 3(4) 223
- [21] Yamagawa A Rira. Restoration of impaired immunoresponse by germanium mice Sei Marianna Ika Daigaku Zasshi 1981; 8(4) 313

参考文献中的第4、5、6、7、8、13、22、23、24、均系日文资料,若读者需要查询,请直接与作者联系,本刊注)