

胎盘免疫调节因子的实验研究*

Experimental Study on Placenta Immunoregulatory Factor

张学荣 舒雨雁
Zhang Xuorong Shu Yuyan

(广西医科大学蛇毒研究所 南宁市滨湖路 6号 530021)

(The Snake Venom Research Institute of Guangxi

Medical University, 6 Binhu Road, Nanning Guangxi, 530021)

摘要 报道了改良的胎盘免疫调节因子 (PF) 提取方法, 并对制备的 PF理化性质、生物学活性、急性及长期毒性进行了系统的研究。结果表明 PF由 3个组分构成, 分子量为 3800~ 5000, 属核酸和多肽类物质, 性质稳定。有明显提高机体细胞免疫功能作用。毒性试验证实 PF无毒副作用, 长期应用安全。初步临床应用结果提示 PF对鼻咽癌、结核及慢性乙肝患者免疫功能有提高作用。

关键词 胎盘免疫调节因子 胎盘肽 制备 性质

Abstract It was reported that an improved preparative method of placenta immunoregulatory factor (PF). The physical and chemical property, biological activity, acute and chronic toxicity of prepared PF were studied systematically. The results showed that PF was composed of three components, those components had approximate molecular weight of about 3800~ 5000, belonging to low molecular weight ribonucleic acid and peptide. Being of a stable property, PF could promoted cell immunologic function. Toxicity test proved that PF had no side effect and was safe for long time use. Preliminary clinical application results indicated that PF could promote the immunologic function of patients with Nasopharyngeal carcinoma (NPC), tuberculosis and chronic hepatitis B.

Key words placenta immunoregulatory factor, placenta peptide, preparation, property

胎盘中含有能刺激机体免疫系统的小分子物质——胎盘免疫调节因子 (PF) 具有良好的免疫调节作用, 为了进一步探讨 PF的作用, 我们从健康产妇新鲜胎盘中提取出 PF, 对其理化性质、生物学活性以及毒性等进行实验, 并试用于临床治疗, 观察其近期疗效, 为临床应用提供理论依据, 现报道如下:

1 材料与方法

1.1 胎盘原料 健康足月产妇的胎盘由南宁市红十字会产科提供, 提供胎盘的产妇均做乙型肝炎二对半检查全部阴性。胎盘用无菌容器分装, 严防污染。

1.2 PF的制备 新鲜胎盘剪去筋膜, 用无菌水冲洗

干净剪碎称重, 按 1: 1加入生理盐水用高速组织捣碎机制成胎盘组织匀浆。匀浆置于 - 20℃ 冰箱冰冻 48 h以上。在 25℃ 水浴下解冻, 超声粉碎 15 min, 经反复冻融后低温离心, 提取上清液进行透析提取, 用 0.22 μ 滤膜过滤除菌, 调整浓度后, 分装得到 PF无菌注射液。

1.3 PF理化特性

1.3.1 分子量测定: 用高压液相色谱仪进行分子量测定, 层析柱为 Superose- 12, 标准品有核糖核酸酶 (MW 13700)、胰蛋白酶抑制剂 (MW 6800) 及胰岛素 A链 (MW 3200) Pharmacia产。

1.3.2 紫外分光光度计分析: 用紫外分光光度计进行扫描测定 OD 260及 OD 280值

1.3.3 蛋白试验: 向装有 1 mL PF溶液的小试管内滴入 20% 磺基水杨酸数滴观察有无沉淀混浊生成。

1996-09-16收稿。

* 区卫生厅资助项目。

1.4 生物学活性测定

1.4.1 活性 E花环试验^[1] (Ea试验): 分离胎儿脐带血淋巴细胞, 以脱受体法进行测定。实验设计如下:

- (1) 淋巴细胞脱受体前测定 Ea平均值;
- (2) 淋巴细胞经 45°C水浴 1 h后 (脱受体) 测定 Ea平均值。

(3) 淋巴细胞脱受体后分别加入 PF转移因子、 α 干扰素、胸腺肽及无菌生理盐水 37°C水浴 2 h再测 Ea

1.4.2 淋巴细胞转化试验: 采用³H-TdR掺入法。每孔中加 PHA 终浓度为 0.75 μ g 和不同稀释度的 PF 各 50 μ L, 其他步骤同文献^[1]。

1.5 毒性试验

1.5.1 急性毒性: 取体重 20 g左右的小白鼠 20只雌雄各半, 腹腔注射 PF 1 mL观察 7 d

1.5.2 长期毒性试验: 大白鼠 160只, 随机分成 4组, 每组 40只, 正常饲养 1周后抽血作血常规、肝功能及肾功能检查, 然后腹腔注射 PF 100 μ g、500 μ g、1 000 μ g对照组注射生理盐水。每天注射 1次, 连续注射 6个月, 抽血作血常规、肝功能及肾功能检查。饲养结束后处死动物取出心、肝、肺、脑等重要器官作病理学检查。

1.5.3 过敏试验: 取体重 300 g左右豚鼠 3只, 每只腹腔注射 PF 0.5 mL, 连续致敏 3次, 未次注射 2周后再给 1 mL只做过敏试验

1.6 临床试用观察

观察对象包括鼻咽癌 (NPC) 患者 45例, 结核病 (TB) 患者 22例, 慢性乙肝患者 27例。患者在常规治疗基础上辅以 PF治疗, 每天 4 mg肌注, 连用 1个月。治疗前后抽血检测 T淋巴细胞亚群 (APAAP法) 以 CD₄/CD₈比值升高作为免疫功能提高的疗效判断标准计算有效率

2 结果

2.1 理化特性 高压液相色谱分析见图 1, PF可分为 3个分子量相近的组分。其分子量介于标准品胰蛋白酶抑制剂 (MW 6 800) 与胰岛素 A链 (MW 3 800) 之间, 分子量为 3 800~5 000 PF透析, 以 20% 磺基水杨酸测定蛋白反应呈阴性。紫外分光光度计测得 OD_{260/280}值为 2.12 表明 PF为多个组分的小分子混合物, 主要成分为核酸和多肽。用紫外分光光度法测定 PF多肽含量为 2.03 mg/mL PF在 0°C~4°C下保存 1年半或室温放置 1个月未见生物活性有明显下降。本制备方法由于应用超声捣碎使产率明显提高, 同样条件下按刘月新法^[2]得到的 PF含量在 1 mg/mL以内, 本法提高产率 1倍左右

2.2 对活性 E花环试验 Ea值影响 淋巴细胞在脱受体前测定 Ea值为 4%, 经 45°C水浴 1 h后 Ea值降至 5%; 各加入 PF 转移因子、胸腺肽及 α 干扰素于 37°C水浴 2 h后测定 Ea值分别是: PF为 36%、转移因子为 38%、胸腺肽为 28%、 α 干扰素为 26%; 而生理盐水对照组只有 9%; 说明 PF具有促进人淋巴细胞上绵红细胞受体恢复作用

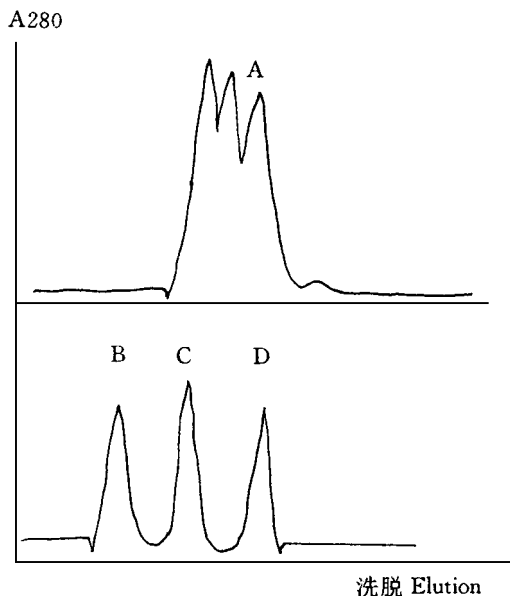


图 1 PF在 HPLC洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of PF on HPLC

A. 胎盘免疫调节因子 PF; B. 核糖核酸酶 Ribonuclease; C. 胰蛋白酶抑制剂 α -NTI; D. 胰岛素 A链 Isulin A Chain

2.3 对淋巴细胞转化试验的影响 单独 PF对淋巴细胞转化影响不明显, 但对 PHA 刺激的淋巴转化试验有促进作用, 且在 PF终浓度为 2 μ g/mL~20 μ g/mL 范围内呈剂量依赖关系。PF终浓度为 20 μ g/mL时对 PHA淋巴转化试验促进最明显。

2.4 毒性试验结果 小白鼠腹腔注射 1 mL PF后全部存活、活跃 过敏试验阴性, 动物无寒战、躁动等异常现象。长期毒性试验结果表明实验期间动物外观正常、活跃、食量及排便均无异常, 动物按正常生长 (见图 2)连续注射 PF对大鼠肝肾功能无影响, 对白细胞有升高作用。见表 1 2 病理检查证实各重要器官外观正常无药物导致的病理变化。

2.5 临床试用观察结果 见表 3, 3组病人经 PF治疗结束后病人外周血 T淋巴细胞亚群中 CD₄细胞数及 CD₄/CD₈比值均较治疗前明显升高 ($P < 0.05$) 有效率分别是鼻咽癌病人 NPC 86.7% (39/45), 结核病人 81.9% (18/22), 慢性乙肝病人 74.1% (20/27)。

表 1 PF对大白鼠血小板、白细胞、血红蛋白及红细胞影响

Table 1 Effect of PF on platelet WBC Hb and RBC in white rat

指标 Index name		对照组 Control group ($\bar{X} \pm S$)	小剂量组 Small dose group ($\bar{X} \pm S$)	中剂量组 Medium dose group ($\bar{X} \pm S$)	大剂量组 Large dose group ($\bar{X} \pm S$)
血小板 Platelet $10^9/L$	给药前 Before treatment	273.9 \pm 87.6	260.5 \pm 97.5	258.3 \pm 93.1	270.1 \pm 114.3
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	323.7 \pm 88.4	259.0 \pm 89.7	269.4 \pm 96.8	284.0 \pm 92.5
白细胞 WBC $10^9/L$	给药前 Before treatment	11.32 \pm 2.63	10.74 \pm 3.22	11.32 \pm 3.36	9.83 \pm 2.47
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	12.15 \pm 4.12	16.83 \pm 3.0 [*]	16.17 \pm 3.9 [*]	15.6 \pm 3.6 [*]
血红蛋白 Hb g/L	给药前 Before treatment	125 \pm 8.7	132 \pm 6.2	127 \pm 5.8	135 \pm 7.7
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	137 \pm 6.5	125 \pm 8.6	133 \pm 8.4	137 \pm 5.2
红细胞 RBC $10^{12}/L$	给药前 Before treatment	7.45 \pm 3.12	7.12 \pm 2.31	7.33 \pm 2.76	7.33 \pm 3.21
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	6.78 \pm 2.57	7.24 \pm 2.67	7.35 \pm 2.53	7.35 \pm 2.79

与用药前比较 Compare with before treatment * $P < 0.05$

表 2 PF对大鼠血清转氨酶、尿素氮及麝香草酚浊度的影响

Table 2 Effect of PF on SGPT BUN and TTT in white rat serum

指标 Index name		对照组 Control group ($\bar{X} \pm S$)	小剂量组 Small dose group ($\bar{X} \pm S$)	中剂量组 Medium dose group ($\bar{X} \pm S$)	大剂量组 Large dose group ($\bar{X} \pm S$)
转氨酶 SGPT	给药前 Before treatment	18.3 \pm 8.7	19.5 \pm 7.3	20.4 \pm 8.3	20.6 \pm 7.7
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	20.1 \pm 6.7	21.3 \pm 8.7	20.7 \pm 8.2	20.5 \pm 8.4
尿素氮 BUN (mmol/L)	给药前 Before treatment	12.0 \pm 4.92	13.29 \pm 3.83	12.70 \pm 6.83	11.70 \pm 7.46
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	13.9 \pm 5.06	14.6 \pm 3.77	14.8 \pm 6.34	14.9 \pm 8.43 [*]
麝香草酚浊度 TTT	给药前 Before treatment	2.59 \pm 1.18	2.93 \pm 0.89	3.33 \pm 1.59	2.18 \pm 1.13
	给 PF 6月 Give PF for 6 months	2.88 \pm 1.62	2.8 \pm 1.10	3.12 \pm 1.23	2.85 \pm 1.49 [*]

与给药前比较 Compare with before treatment * $P > 0.05$

表 3 PF对 T淋巴细胞亚群的影响

Table 3 Effect of PF on T lymphocyte subsets

		CD3 ($\bar{X} \pm S$)	CD4 ($\bar{X} \pm S$)	CD8 ($\bar{X} \pm S$)	CD4/CD8 ($\bar{X} \pm S$)
NPC病人 NPC n = 45	治疗前 Before treatment	47.97 ± 11.61	28.33 ± 8.63	32.17 ± 5.48	0.92 ± 0.24
	治疗后 After treatment	48.08 ± 8.94	38.22 ± 7.71*	30.89 ± 5.91	1.25 ± 0.14*
结核病人 tuberculosis n = 22	治疗前 Before treatment	59.97 ± 5.43	33.0 ± 5.37	23.87 ± 6.88	1.51 ± 0.58
	治疗后 After treatment	58.27 ± 12.41	37.64 ± 5.75*	22.22 ± 6.11	1.80 ± 0.43*
乙肝病人 Chronic hepatitis n = 27	B治疗前 Before treatment	58.59 ± 6.10	30.96 ± 5.76	27.5 ± 4.83	1.21 ± 0.31
	治疗后 After treatment	59.11 ± 6.78	35.19 ± 6.14*	26.7 ± 5.53	1.46 ± 0.25*

* 与治疗前比较 Compare with before treatment, $P < 0.05$.

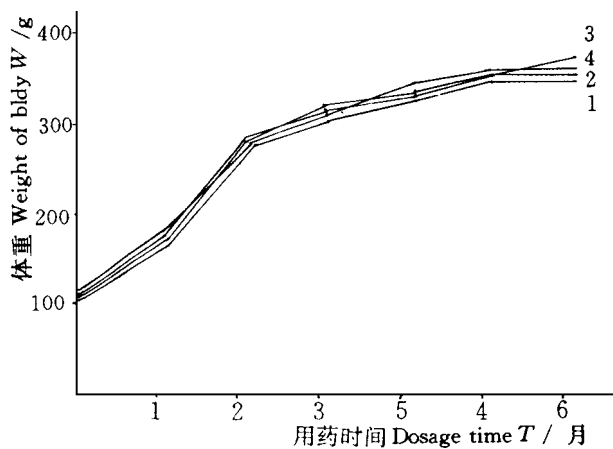


图 2 大鼠体重变化曲线

Fig. 2 Changing curves of white rat body weight

- ① 对照组 Control group; ② 小剂量组 Small doses group;
③ 中剂量组 Medium dose group; ④ 大剂量组 Large dose group

3 讨论

PF是从产妇胎盘中提取的一种可透析性小分子物质,具有多种免疫调节活性。我们用超声捣碎的方法得到高产量的PF,这可能是胎盘组织细胞比较坚固,一般方法破碎能力有限,本法在高速匀浆的基础上进行超声捣碎,使PF易于溶出因而得到较高产率。本文通过对制备的PF进行理化性质、生物学活性、毒性等方面进行实验研究在确认安全有效基础上进行临床观察试用,进一步证实PF为多个组分的小分子混合物,分子量为3800~5000,属小分子核酸及多肽物质,生物学活性类似于转移因子、胸腺肽及 α -

干扰素,与文献报道一致^[6]。毒性试验结果证实PF无急性毒性作用及过敏反应。实验大鼠经过长达6个月的给药饲养肝肾功能无改变,动物生长状况良好,重要器官无损伤。同时观察到PF能升高大鼠白细胞水平,说明长期使用PF是安全的。临床应用结果表明PF对鼻咽癌、结核及慢性乙肝患者的免疫功能有提高作用,有效率分别是87%、81.9%、74%。病人在PF治疗期间精神好转,食欲增加,体力增强,临床使用安全未观察到明显的副作用。PF原料来源方便,制备工艺又不十分复杂应用前景好,故是一种较理想的免疫调节剂。

参考文献

- 1 张子康,何光泽主编.医学微生物学与免疫学实验教程.成都:四川科学技术出版社,1989.212~213.
- 2 刘月新,李勋楚,段茂芳等.一种新的免疫调节剂——胎盘因子的制备与研究.中国免疫学杂志,1985,5(1):51.
- 3 杨琨,舒翠玲,赵宁等.胎盘因子对机体细胞免疫功能的调节作用.中国中西医结合杂志,1992,12(8):487.
- 4 马步仁,李素华,谢秩勋等.胎盘肽免疫活性的实验研究.解放军杂志,1988,13(5):335.
- 5 曹金旭,于宪基,张放中等.胎盘治疗反复呼吸道感染儿童的疗效观察.上海免疫学杂志,1992,12(3):167.
- 6 李恩善,董邦全,杨琨等.胎盘免疫调节因子理化性质及生物学活性的实验研究.上海免疫学杂志,1993,13(4):204.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)