

异丹叶大黄素对人滑膜细胞白细胞介素-8 生成及 mRNA 表达的影响

侯琦, 李良成, 郭颖, 程桂芳*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究异丹叶大黄素(isorhapotigenin, Iso)对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的人滑膜细胞(human synovial cell, HSC)白细胞介素-8(IL-8)生成和 mRNA 表达的影响。方法 用 RIA 方法测定 IL-8 的含量,以 RT-PCR 法测 IL-8 mRNA。结果 Iso 在 1×10^{-6} - 1×10^{-5} mol·L⁻¹ 浓度范围内对 TNF- α 诱导的人滑膜细胞 IL-8 生成有抑制作用,并抑制 TNF- α 诱导的 HSC IL-8 mRNA 表达。结论 Iso 抑制 TNF- α 诱导的 HSC IL-8 生成,可能与影响 IL-8 mRNA 表达有关。

关键词: 异丹叶大黄素; 白细胞介素-8; 放免测定法; 反转录聚合酶链式反应

中图分类号: R282.71; R967

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)06-0407-04

白细胞介素-8(interleukin 8, IL-8)是一种多源性炎性细胞因子,主要由粒细胞、单核细胞等产生,对白细胞有较强的趋化、聚集活性,可诱导细胞吞噬、粘附、呼吸爆发、脱颗粒、释放溶酶体酶和产生超氧阴离子等。近年研究表明 IL-8 与感染性和免疫性疾病如细菌感染、过敏性哮喘、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、AIDS 及癌症等较为密切^[1]。

丹叶大黄素(isorhapotigenin, Iso)是二苯乙烯低聚体,本组近年研究表明, Iso 能显著抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠腹腔巨噬细胞白细胞介素-6(IL-6)生成,并对炎性四肽(formyl-methionyl-leucyl-phenyl-phenylalanine, fMLPP)诱导的家兔外周血中性粒细胞趋化活性和 β -葡糖醛酸酶释放有抑制作用^[2,3]。本文观察了 Iso 对 TNF- α 诱导的正常人滑膜细胞白细胞介素-8 生成的影响,并通过 RNA 测定探讨其抗炎作用原理。

材料与 方法

药品及试剂 异丹叶大黄素(isorhapotigenin, Iso)为本所植化室林茂教授提供。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、胰酶(trypsin)和 II 型胶原酶(collagenase type II)为 Sigma 产品,胎牛血清

(FBS)为 Hyclone 产品, F-12 培养基为 Gibco 产品, rhTNF- α 购自 Beijing Bioting Tech. Co., IL-8 RIA Kits 为北京东亚免疫技术研究所提供。IL-8 引物 Sense 5'-CCG GAA GAA CCA TCT CAC T-3', antisense 5'-CCA GTT TTC CTT GGG GTC C-3', GAPDH 引物 Sense 5'-GAGG GGCC ATCC ACAG TCTT C-3' antisense 5'-CATC ACCT CTTC CAGG AGCG3' 为上海生工生物工程有限公司合成。pUC19DNA/MspI DNA 梯度标准品为 MBI 公司, 反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒为 Promega 产品。

人膝关节滑膜细胞培养^[4] 无菌条件下分离正常人膝关节关节囊的滑膜层,用无钙、镁 Dulbecco 缓冲液洗涤滑膜组织,剪成 1-2 mm³ 小块。放入 25 cm² 培养瓶(Costar)内,加入 10% FBS 的 F12 培养液 2 mL 和胶原酶 2 mL(终浓度 0.4%, w/v),在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中消化 2 h。将未贴壁细胞移入离心管,离心(300 × g, 10 min),弃上清液,再加入 0.25% 胰酶 4 mL,置培养箱内消化 0.5 h。经 200 目不锈钢网过滤,离心(300 × g, 10 min),用 10% FBS-F12 培养液 4 mL 在 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h,弃去未粘附细胞,此时的贴壁细胞为原代滑膜细胞,用台盼蓝拒染法检测细胞活力大于 95%,继续培养约 7 d 后,用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化使细胞游离,进行传代培养,选用 3-10 代滑膜细胞进行实验。

TNF α 对滑膜细胞(HSC)IL-8 生成的诱导作

收稿日期: 2000-09-17。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770911)。

作者简介: 侯琦,女,副研究员,博士研究生;

程桂芳,女,研究员,博士生导师。

* 通讯作者 Tel: (010)63165192, Fax: (010)63017757,

E-mail: chenggf@imm.ac.cn

用^[5] 将细胞铺至 48 孔细胞培养板,待生长至融合,加入 TNF α 使终浓度为 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 U \cdot mL⁻¹, 培养 24 h, 收集上清液, - 20 $^{\circ}$ C 冻存, RIA 法测 IL-8 含量。

Iso 对 IL-8 生成的影响 在细胞培养板中加入 Iso, 终浓度分别为 1.0×10^{-7} mol \cdot L⁻¹ - 1.0×10^{-5} mol \cdot L⁻¹, 15 min 后再加入 TNF α , 终浓度为 0.25 U \cdot mL⁻¹, 培养 24 h, 收集上清液, - 20 $^{\circ}$ C 冻存, 用 RIA 法测 IL-8 含量。实验数据用方差分析, 并用“Student” *t*-test 进行组间均数差异性检验。

TNF α 对 HSC IL-8 mRNA 表达的影响^[6] 在 6 孔细胞培养板中加 TNF α , 终浓度为 0.25 U \cdot mL⁻¹, 设细胞对照孔, 分别培养 2 h 和 6 h, 备用。

Iso 对 TNF α 诱导的 HSC IL-8 mRNA 表达的影响 在 6 孔细胞培养板中加 Iso, 终浓度分别为 1.0×10^{-7} mol \cdot L⁻¹ - 1.0×10^{-5} mol \cdot L⁻¹, 15 min 后加入 TNF α , 终浓度为 0.25 U \cdot mL⁻¹, 设细胞对照和刺激剂对照孔, 继续培养 6 h, 备用。

培养人滑膜细胞总 RNA 的制备 按文献方法^[7]将上述处理人滑膜细胞刮下, 收集, 提取总 RNA, - 70 $^{\circ}$ C 保存待测。

反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 将上述 RNA 3 μ L 加入到终体积为 25 μ L 的反应体系中(AMV/ Tfl: 5 \times reaction buffer 2.5 μ L; dNTP 0.2 mmol \cdot L⁻¹; Primer 1 μ mol \cdot L⁻¹; MgSO₄ 1 mmol \cdot L⁻¹; AMV 反转录酶 0.5 u \cdot μ L⁻¹; Tfl DNA 合成酶 0.5 u \cdot μ L⁻¹)。引物核苷酸序列为, IL-8: sense 5'-CCG GAA GAA CCA TCT CAC T-3'; antisense 5'-CCA GTT TTC CTT GGG GTC C-3', 282 bp。GAPDH: sense 5'-GAGG GGCC ATCC ACAG TCTT C-3'; antisense 5'-CATC ACCT CTTC CAGG AGCG-3', 357 bp。IL-8 的反应条件为: 48 $^{\circ}$ C 45 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 2 min 40 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。GAPDH 的反应条件为: 48 $^{\circ}$ C 45 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

准确吸取上述 PCR 产物 10 μ L, 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 用紫外凝胶成像系统照相。

结 果

1 TNF α 对 HSC IL-8 生成的量效关系

TNF α 在 0.1 U \cdot mL⁻¹ 即可刺激 IL-8 生成, 浓度在 0.1 - 0.5 U \cdot mL⁻¹ 有促进 HSC IL-8 生成作用, 结果见表 1。

Tab 1 Effects of TNF α on IL-8 production in HSC

Group	Concentration/ U \cdot mL ⁻¹	IL-8/ ng \cdot mL ⁻¹
Control	0	14.7 \pm 1.2
TNF α	0.05	23 \pm 7
	0.1	25 \pm 6*
	0.25	37 \pm 9*
	0.5	36 \pm 6**

The cultured human synovial cell (HSC) were stimulated with TNF α at concentrations of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 U \cdot mL⁻¹ for 24 h. The concentration of IL-8 in cultured supernatants was measured with the RIA method. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. * *P* < 0.01, ** *P* < 0.01 vs control

2 Iso 对 IL-8 生成的抑制作用

Iso 浓度在 1.0×10^{-6} mol \cdot L⁻¹ - 1.0×10^{-5} mol \cdot L⁻¹ 可显著抑制 TNF α 诱导的 HSC IL-8 生成, 结果见表 2。

Tab 2 Inhibitory effect of isorhapotigenin (Iso) on IL-8 production induced with TNF α 0.25 U \cdot mL⁻¹ for 24 h in HSC

Group	Concentration / mol \cdot L ⁻¹	IL-8 / ng \cdot mL ⁻¹
Control	0	0.9 \pm 0.09
TNF α	0.25 (U \cdot mL ⁻¹)	6.1 \pm 1.4###
Iso	10^{-7}	5.4 \pm 0.9
	10^{-6}	4.19 \pm 0.05*
	10^{-5}	2.51 \pm 0.16**

The concentrations of Iso were 1×10^{-7} , 1×10^{-6} and 1×10^{-5} mol \cdot L⁻¹. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$, ### *P* < 0.05 vs control, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs TNF α

3 TNF α 对 IL-8 mRNA 表达的诱导作用

由图 1 可见 TNF α 明显促进 IL-8 mRNA 的表达, TNF α 与 HSC 作用 6 h IL-8 mRNA 表达水平比作用 2 h 的表达水平高。图中第 1 道为 pUC19DNA/ MspI DNA 梯度标准品, 第 2 道为细胞对照, 第 3 道为 TNF α (0.25 U \cdot mL⁻¹) 刺激 2 h, 第 4 道为 TNF α (0.25 μ g \cdot mL⁻¹) 刺激 6 h。

4 Iso 对 TNF α 诱导的人滑膜细胞 IL-8 mRNA 表达的抑制作用

图 2 结果显示, Iso 在 1.0×10^{-6} mol \cdot L⁻¹ 和 1.0×10^{-5} mol \cdot L⁻¹ 浓度明显抑制 TNF α 诱导的 IL-8 mRNA 的表达。图中第 1 道为细胞对照, 第 2 道为

TNF α ($0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), 第3道为 TNF α + Iso $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 第4道为 TNF α + Iso $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 第5道为 pUCI9DNA/ MspI DNA 梯度标准品。

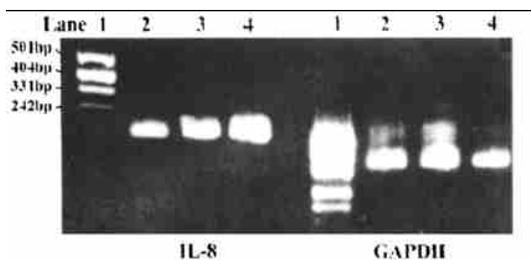


Fig 1 Effect of TNF α on IL-8 mRNA expression in cultured human synovium. GAPDH and IL-8 levels in cultured human synovium were detected with RT-PCR method. The samples were loaded on a 2% agarose gel. Lane 1: pUCI9DNA/ MspI DNA ladder; Lane 2: Control; Lane 3: TNF α $0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ stimulated 2 h; Lane 4: TNF α $0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ stimulated 6 h

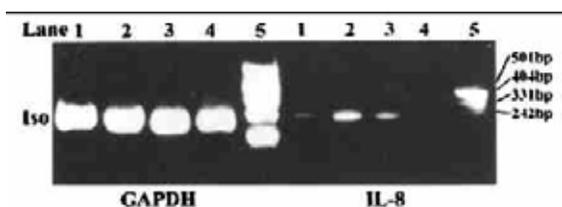


Fig 2 The inhibitory effect of Iso on IL-8 mRNA expression in cultured HSC stimulated with TNF α ($0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). GAPDH and IL-8 levels in human synovium were detected with the method of RT-PCR. The samples were loaded on a 2% agarose gel. Lane 1: Control; Lane 2: TNF α ; Lane 3: TNF α ($0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) + Iso $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Lane 4: TNF α + Iso $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Lane 5: pUCI9DNA/ MspI DNA ladder

讨 论

IL-8 是近年命名的与炎症极为密切的细胞因子,可能在宿主防御反应及疾病中起重要作用。IL-8 为诱导型表达。嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、内皮细胞、肝细胞和滑膜细胞等在外源性或内源性因子;如脂多糖(LPS), TNF α 和 IL-1 β 等诱导下可生成大量的 IL-8 以及多种免疫炎症因子,如 NO, PGE $_2$, LTB $_4$, TNF α , IL-1 和 IL-6 等,进一步介导一系列炎症反应,激活粒细胞发生形变、游走、趋化和聚集,在炎症部位产生浸

润、粘附和吞噬等炎症反应,导致组织炎症损伤甚至坏死,在急性炎症时呈现典型的红、肿、热、痛等征状。

有关研究表明,全身性炎症或免疫性疾病可影响关节滑膜产生反应。如感染或炎症可引起血循环中有较高浓度的 TNF α 及 IL-1 β 等炎症因子,从而引发关节局部的滑膜细胞增殖,表达生成 IL-8, IL-6 和 PGE $_2$ 等多种炎症介质,激活以粒细胞为主的炎症细胞浸润、粘附、吞噬和酶释放等反应,进一步诱导 HSC 异常增殖、滑膜增生、关节腔积液并导致关节肿胀和关节粘连等一系列的炎症或损伤,这可能是类风湿性关节炎(RA)发病及病程发展的主要原因之一。

本组近年对 Iso 研究^[2,3,8]表明, Iso 明显抑制 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 IL-6 生成及其 mRNA 表达,降低中性粒细胞趋化活性和 β -葡糖醛酸酶释放。相关实验亦显示, Iso 还抑制刺激剂诱导的巨噬细胞 TNF α , PGE $_2$ 生成以及核转录因子 NF- κ B 活化,具有较强的体外抗炎作用,并观察到有抑制小鼠足肿胀活性。由于机体免疫炎症细胞——细胞-细胞因子、细胞因子-细胞因子间以及与神经体液具有极为复杂的联系和调节网络,因此推测 Iso 呈现的对多种炎症因子生成抑制和抗炎作用,可能与影响上游调节通路中基因的活化和表达有关。

本文进一步研究了炎症因子 TNF α 对滑膜细胞 IL-8 生成及 mRNA 表达的影响,并观察了中草药成分 Iso 对 IL-8 生成的作用,试图为寻找新的抗 RA 药物提供新靶点和先导化合物。研究结果显示, TNF α 浓度为 $0.1 - 0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时有明显促进 HSC IL-8 生成作用,且呈一定的量效关系。刺激剂 TNF α $0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作用 6 h 可促进 HSC IL-8 mRNA 表达。Iso 在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制 TNF α 诱导的 HSC 的 IL-8 生成及其 mRNA 表达,提示 Iso 可能通过下调 mRNA 表达而抑制 IL-8 生成。

上述结果提示, IL-8 与免疫性炎症关系极为密切,研究以 IL-8 为靶点的生成抑制剂将为研制抗炎免疫药提供新途径。

REFERENCES:

- [1] Hebert C, Baker J. Interleukin-8: a review [J]. *Cancer Invest*, 1993, 11(6): 743-750.
- [2] Zhong M, Cheng GF, Lai CN, et al. Effects of isorhapotigenin and resveratrol on function of IL-6 mRNA expression in mouse macrophages [J]. *Acta Pharm Sin*

- (in Chinese), 1999, **34**(5) : 329 - 333.
- [3] Zhong M, Guo Y, Cheng GF, *et al.* Effects of isorhapotigenin and resveratrol on function of peripheral blood polymorphonuclear leukocytes from rabbits [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1998, **33**(11) : 812 - 815.
- [4] Goto M, Sasano M, Miyamoto T. Spontaneous production of an interleukin 1-like factor by cloned rheumatoid synovial cells in long-term culture [J]. *J Clin Invest*, 1987, **80**(3) : 786 - 796.
- [5] Smyth MJ, Zachariae COC, Norihisa Y, *et al.* IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets [J]. *J Immunol*, 1991, **146**(11) : 3615 - 3623.
- [6] Goto M, Digman JD, Russell M, *et al.* Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei [J]. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**(5) : 1475 - 1476.
- [7] Kotake S, Schumacher Jr HR, Wilder RL, *et al.* A simple nested RT-PCR method for quantitation of the relative amounts of multiple cytokine mRNAs in small tissue samples [J]. *J Immunol Methods*, 1996, **199**(2) : 193 - 203.
- [8] Li J, Cheng GF, Zhu XY. Inhibitory effects of three Gn compounds on TNF α production by murine peritoneal macrophages [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2000, **35**(5) : 335 - 337.

INHIBITORY EFFECTS OF ISORHAPOTIGENIN ON IL-8 PRODUCTION AND mRNA EXPRESSION INDUCED WITH TNF α IN NORMAL HUMAN SYNOVIAL CELLS

HOU Qi, LI Liang-cheng, GUO Ying, CHENG Gui-fang

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of isorhapotigenin (Iso) on interleukin-8 (IL-8) production and mRNA expression in normal human synovial cells (HSC) induced with TNF α . **METHODS** IL-8 were assayed with RIA method. The mRNA expression of IL-8 was detected by RT-PCR method. **RESULTS** It was shown that TNF α at concentrations of 0.05 to 0.5 U \cdot mL $^{-1}$ for 24 h significantly increased IL-8 production. The expression of IL-8 mRNA was also promoted by TNF α (0.25 U \cdot mL $^{-1}$) for 6 h. Iso at the concentrations of 1×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$ to 1×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ showed inhibitory effects on IL-8 production induced with TNF α (0.25 U \cdot mL $^{-1}$). The further study indicated that Iso at the concentrations of 1×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$ to 1×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ inhibited IL-8 mRNA expression in HSC induced with TNF α (0.25 U \cdot mL $^{-1}$). **CONCLUSION** TNF α promoted IL-8 production and mRNA expression in HSC. Iso inhibited IL-8 production and mRNA expression induced by TNF α (0.25 U \cdot mL $^{-1}$). This might be one of the anti-inflammatory mechanisms of Iso.

KEY WORDS: isorhapotigenin; interleukin-8; interleukin-8 mRNA; RIA; RT-PCR