

# 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 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )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  $1 \times 10^{-6}$  -  $1 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 浓度范围内对 TNF- $\alpha$  诱导的人滑膜细胞 IL-8 生成有抑制作用,并抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HSC IL-8 mRNA 表达。结论 Iso 抑制 TNF- $\alpha$  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<sup>[1]</sup>。

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 $\beta$ -葡糖醛酸酶释放有抑制作用<sup>[2,3]</sup>。本文观察了 Iso 对 TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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**<sup>[4]</sup> 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 mm<sup>3</sup> 小块。放入 25 cm<sup>2</sup> 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% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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 $\alpha$  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<sup>[5]</sup> 将细胞铺至 48 孔细胞培养板,待生长至融合,加入 TNF $\alpha$  使终浓度为 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, 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  $1.0 \times 10^{-7}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> -  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 15 min 后再加入 TNF $\alpha$ , 终浓度为 0.25 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, 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 $\alpha$  对 HSC IL-8 mRNA 表达的影响<sup>[6]</sup>** 在 6 孔细胞培养板中加 TNF $\alpha$ , 终浓度为 0.25 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, 设细胞对照孔, 分别培养 2 h 和 6 h, 备用。

**Iso 对 TNF $\alpha$  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  $1.0 \times 10^{-7}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> -  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 15 min 后加入 TNF $\alpha$ , 终浓度为 0.25 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>, 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<sup>[7]</sup>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  $\mu$ L 加入到终体积为 25  $\mu$ L 的反应体系中( AMV/ Tfl: 5  $\times$  reaction buffer 2.5  $\mu$ L; dNTP 0.2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>; Primer 1  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>; AMV 反转录酶 0.5 u $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>; Tfl DNA 合成酶 0.5 u $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>)。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  $\mu$ 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 $\alpha$ 对 HSC IL-8 生成的量效关系

TNF $\alpha$  在 0.1 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 即可刺激 IL-8 生成, 浓度在 0.1 - 0.5 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 有促进 HSC IL-8 生成作用, 结果见表 1。

**Tab 1 Effects of TNF $\alpha$  on IL-8 production in HSC**

Group	Concentration/ U $\cdot$ mL <sup>-1</sup>	IL-8/ ng $\cdot$ mL <sup>-1</sup>
Control	0	14.7 $\pm$ 1.2
TNF $\alpha$	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 $\alpha$  at concentrations of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 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  $1.0 \times 10^{-6}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> -  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 可显著抑制 TNF $\alpha$  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 $\alpha$  0.25 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup> for 24 h in HSC**

Group	Concentration / mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	IL-8 / ng $\cdot$ mL <sup>-1</sup>
Control	0	0.9 $\pm$ 0.09
TNF $\alpha$	0.25 (U $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	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  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  and  $1 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ , ### *P* < 0.05 vs control, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs TNF $\alpha$

### 3 TNF $\alpha$ 对 IL-8 mRNA 表达的诱导作用

由图 1 可见 TNF $\alpha$  明显促进 IL-8 mRNA 的表达, TNF $\alpha$  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 $\alpha$ (0.25 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) 刺激 2 h, 第 4 道为 TNF $\alpha$ (0.25  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) 刺激 6 h。

### 4 Iso 对 TNF $\alpha$ 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  $1.0 \times 10^{-6}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 和  $1.0 \times 10^{-5}$  mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 浓度明显抑制 TNF $\alpha$  诱导的 IL-8 mRNA 的表达。图中第 1 道为细胞对照, 第 2 道为

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

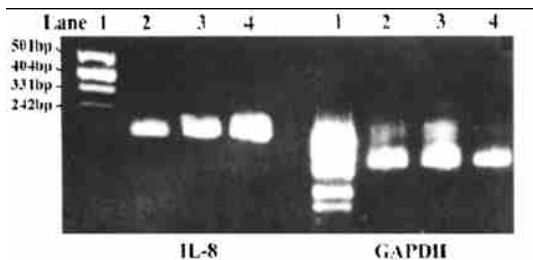


Fig 1 Effect of TNF $\alpha$  on IL-8 mRNA expression in cultured human synovium. GAPDH and IL-8 levels in cultured human synovium were detected with RT-PCR method. The samples were loaded on a 2% agarose gel. Lane 1: pUCI9DNA/ MspI DNA ladder; Lane 2: Control; Lane 3: TNF $\alpha$   $0.25 \text{ U}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

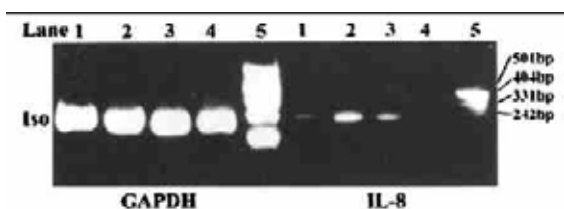


Fig 2 The inhibitory effect of Iso on IL-8 mRNA expression in cultured HSC stimulated with TNF $\alpha$  ( $0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). GAPDH and IL-8 levels in human synovium were detected with the method of RT-PCR. The samples were loaded on a 2% agarose gel. Lane 1: Control; Lane 2: TNF $\alpha$ ; Lane 3: TNF $\alpha$  ( $0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) + Iso  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Lane 4: TNF $\alpha$  + 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 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  等诱导下可生成大量的 IL-8 以及多种免疫炎症性因子,如 NO, PGE $_2$ , LTB $_4$ , TNF $\alpha$ , 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,导致组织炎症性损伤甚至坏死,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液循环中有较高浓度的 TNF $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  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<sup>[2,3,8]</sup>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  $\beta$ -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 $\alpha$ , PGE $_2$  生成以及核转录因子 NF- $\kappa$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$   $0.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$ . **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 $\alpha$  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 $\alpha$  (0.25 U $\cdot$ mL $^{-1}$ ) for 6 h. Iso at the concentrations of 1 $\times$ 10 $^{-6}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  to 1 $\times$ 10 $^{-5}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  showed inhibitory effects on IL-8 production induced with TNF $\alpha$  (0.25 U $\cdot$ mL $^{-1}$ ). The further study indicated that Iso at the concentrations of 1 $\times$ 10 $^{-6}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  to 1 $\times$ 10 $^{-5}$  mol $\cdot$ L $^{-1}$  inhibited IL-8 mRNA expression in HSC induced with TNF $\alpha$  (0.25 U $\cdot$ mL $^{-1}$ ). **CONCLUSION** TNF $\alpha$  promoted IL-8 production and mRNA expression in HSC. Iso inhibited IL-8 production and mRNA expression induced by TNF $\alpha$  (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