

淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响

刘铁汉^{*}, 王本祥^{**}, 王毅, 吴立军¹, 南陆彦², 永田年³, 池岛乔³(长春中医学院附属医院新药研究中心, 长春 130021; ¹ 沈阳药科大学天然药物研究室, 沈阳 110015;² 横浜市立大学医学部寄生虫学教研室, 横滨, 日本; ³ 滨松医科大学微生物教研室, 滨松, 日本)

摘要 目的: 比较淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对人组织细胞瘤 THP-1 细胞分泌 4 种细胞因子的影响。方法: 放射免疫测定方法(RIA)。结果: 在 LPS 和 PMA 存在下, 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物(宝藿苷 I 和淫羊藿苷元)对 IL-6 的产生有促进作用, 代谢物的作用更强, 对 IL-8 的产生有一定的抑制作用。当 LPS 和 PMA 不存在时, 对 IL-6 的产生无明显影响, 而对 IL-8 的产生则有促进作用。不论 LPS 和 PMA 存在与否, 原苷对 TNF α 的产生有抑制作用, 原苷及其肠菌代谢产物对 IL-1 α 的产生均有明显抑制作用。结论: 在不同的实验条件下, 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对各种炎症性细胞因子的产生均有特异的调节作用。

关键词 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 淫羊藿苷元; 细胞因子; THP-1 细胞株; 放免测定法(RIA)

实验证明^[1], 淫羊藿苷易被肠内细菌所代谢, 而且实验动物 po 淫羊藿苷后, 在尿液中仅检出少量的淫羊藿苷原药, 但却检出大量的宝藿苷 I。邱峰等^[2]也证明, 大鼠 po 给予淫羊藿苷后, 吸收入血的代谢产物为宝藿苷 I。这使我们不得不考虑, 宝藿苷 I 可能为口服淫羊藿苷后真正起药理作用的活性物质, 而淫羊藿苷应为前体药物。在本实验中, 我们对比了淫羊藿苷及其肠菌代谢产物调节 THP-1 细胞分泌炎症相关细胞因子活性的异同。

材 料

细胞 THP-1 (monocyte, human, America, ATCC, TIB 202, America)。

药品 淫羊藿苷(icariin)购于中国药品生物制品检定所; 宝藿苷 I(baohuoside I)购于沈阳药科大学植化室; 淫羊藿苷元(icaritin)为自制。

试剂 基因重组人细胞因子(rhIL-1 α , rhIL-6, rhIL-8, rhTNF α)由日本万有制药公司筑波研究所惠赠; 各种抗细胞因子抗体和抗家兔免疫球蛋白血清由本室自制; ¹²⁵I 购于中国原子能研究所同位素室; RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品; 新

生牛血清为大连生物试剂厂产品; HEPES, 细菌脂多糖(LPS, *E. coli* serotype 0111:B4)、佛波酯(PMA)、氯胺 T(chloramine T)均为美国 Sigma 公司产品。

磷酸盐缓冲液(PB) 0.5 mol·L⁻¹磷酸二氢钾与 0.5 mol·L⁻¹磷酸氢二钠按 2:5 混合, 调至 pH 7.4。

放免测定缓冲液(RIA buffer) 10 mL 0.5 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液, 12.5 mL 10%牛血清白蛋白, 2.5 mL 2%叠氮化钠, 加 0.15 mol·L⁻¹氯化钠至 500 mL。

仪器 CO₂ 培养箱(美国 Revco 公司); γ 闪烁计数器(FJ-2021 型, 北京国营 261 厂); 台式高速冷冻离心机(TLC-C 型, 北京四环科学仪器制造厂)。

¹²⁵I 标记的 4 种细胞因子的制备 采用 Chloramine T 方法^[3]。先取各种细胞因子 10 ng, 加入 0.5 mol·L⁻¹ pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 10 μ L, ¹²⁵I Na 5 μ L 和用 0.25 mol·L⁻¹ PB 现配制的 2.5 mg·mL⁻¹氯胺 T 4 μ L, 氯胺 T 作为氧化剂参与反应, 16 s 后加入用 0.25 mol·L⁻¹ PB 现配制的 5 mg·mL⁻¹焦亚硫酸 20 μ L, 使反应停止, 用 RIA 缓冲液平衡 5 mL 的 Sephadex G10 柱, 分离标记的细胞因子与游离的细胞因子。

THP-1 细胞的培养及含各种细胞因子上清液的制备 用 RPMI 1640 (含 10% 新生牛血清, 2 mmol·L⁻¹ L-glutamine, 100 μ g·mL⁻¹青霉素, 10 mmol·L⁻¹ HEPES, pH 7.4)培养 THP-1 细胞。调整

收稿日期: 1999-06-19

基金项目: 国家中医药管理局资助课题; 日中医学协会及万有制药株式会社资助

* 现址: 中国科学院微生物所 1998 博士生, 北京 100080;

Tel: (010) 62553628

** 联系人 Tel/Fax: (0431) 5650624

细胞浓度为 3.2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 后, 分别加于 96 孔细胞培养板内(每孔 180 μL)。然后加入诱导最高量细胞因子产生的 LPS 和 PMA 以刺激各种细胞因子的产生(PMA 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 LPS $1 \times 10^4 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用于诱导 IL-1 α , TNF α 和 IL-8 的产生; PMA 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 LPS $1 \times 10^5 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用于诱导 IL-6 的产生, 选择细胞密度及 LPS 和 PMA 浓度的具体实验数据未被列出), 最后加入样品并混合。每个样品设有样品对照(仅加样品, 不加 LPS 和 PMA), 每次实验设有阴性对照(LPS, PMA 和样品均不加)和阳性对照(加 LPS 和 PMA, 但不加样品)。各种试剂与样品加完后, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 4% CO_2 培养箱内培养 20 h, 然后用冻融法使细胞破碎, 收集样品于 EP 管中, $1.2 \times 10^3 \times g$ 离心 10 min, 使各种细胞因子溶于上清液中。

放免方法定量各种细胞因子^[3] 准备所需试管一套, 每份标本设 2 或 3 只复管。d1 在每一试管中分别加入不同浓度的标准抗原(0.04 ~ 320 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或待测样品 100 μL , 另加细胞因子抗体 100 μL , 其抗体量为可与 d2 加入 ¹²⁵I 标记的细胞因子抗原的 40% 相互结合, 最后加入 0.3% 正常家兔血清 300 μL 。d2 在每试管中加入等量 ¹²⁵I 标记的细胞因子抗原 100 μL 。d3 加入内含 6% 聚乙二醇和 1.4% 羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG) 血清的 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 700 μL 。1h 后, $900 \times g$ 离心 20 min 测定沉淀物的放射性强度, 并绘出标准曲线, 从标准曲线中查出待测样品中的抗原(细胞因子)含量。

结 果

1 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 THP-1 细胞生成 IL-1 α 的影响

如表 1 所示: 当诱导剂存在时(LPS + PMA), 阳性对照组 IL-1 α 产生量为 (109.34 \pm 88.63) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 淫羊藿苷的两个代谢产物(宝藿苷 I 和淫羊藿苷元)对 IL-1 α 的产生均有明显的抑制作用, 宝藿苷 I 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抑制作用最强, 为 (2.43 \pm 1.40) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。淫羊藿苷对 IL-1 α 产生的抑制作用则没有代谢物的作用明显。当诱导剂不存时, 阴性对照组 IL-1 α 的产生量为 (3.22 \pm 0.37) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 IL-1 α 的产生均有不同程度的抑制作用, 其中, 淫羊藿苷 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及宝藿苷 I 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 IL-1 α 的产生

量均小于 0.04 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Tab 1 Effect of icariin and its metabolites on the production of IL-1 α by THP-1 cells

Group	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Yield/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	
		Induced by LPS and PMA	Minus inducer
Control		109.34 \pm 88.63	3.22 \pm 0.37
Icariin	0.1	46.91 \pm 15.08**	0.11 \pm 0.04**
	1	87.95 \pm 11.39	0.25 \pm 0.07**
	10	98.84 \pm 45.23	< 0.04**
Baohuoside I	0.1	66.68 \pm 6.53**	< 0.04**
	1	54.45 \pm 11.39**	46.91 \pm 33.51
	10	2.43 \pm 1.40**	0.21 \pm 0.07**
Icaritin	0.1	32.67 \pm 2.01**	0.08 \pm 0.04**
	1	18.43 \pm 5.03**	1.68 \pm 0.01**
	10	11.71 \pm 3.69**	12.56 \pm 8.38

$\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$ compared with control group.

2 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 THP-1 细胞生成 IL-6 的影响

在诱导剂(LPS + PMA)存在时, 阳性对照组 IL-6 产生量为 (10.47 \pm 3.32) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物在浓度较低时可明显促进 IL-6 的产生, 如宝藿苷浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, IL-6 的产生量为 (170.57 \pm 14.26) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。当诱导剂不存在时, 阴性对照组 IL-6 产生量为 (0.791 \pm 0.243) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 宝藿苷 I 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 IL-6 的产生有明显的抑制作用。结果如表 2 所示。

Tab 2 Effect of icariin and its metabolites on the production of IL-6 by THP-1 cells

Group	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Yield/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	
		Induced by LPS and PMA	Minus inducer
Control		10.47 \pm 3.32	0.791 \pm 0.243
Icariin	0.1	38.34 \pm 2.42*	0.781 \pm 0.354
	1	61.21 \pm 17.7*	0.614 \pm 0.071
	10	35.44 \pm 3.22*	0.491 \pm 0.025
Baohuoside I	0.1	132.16 \pm 32.15*	0.665 \pm 0.134
	1	170.57 \pm 14.26*	1.123 \pm 0.172
	10	3.54 \pm 1.61	< 0.04*
Icaritin	0.1	105.51 \pm 11.58*	0.115 \pm 0.078
	1	77.32 \pm 35.44*	0.513 \pm 0.082
	10	12.89 \pm 8.05	1.611 \pm 0.224

$\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.01$ compared with control group.

3 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 THP-1 细胞生成 IL-8 的影响

结果表明,在诱导剂(LPS + PMA)存在时,阳性对照组 IL-8 的产生量为 $57.5 \pm 14.85 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,随着原苷及其代谢产物浓度的增加,它们对 THP-1 细胞产生 IL-8 的影响逐渐呈现出抑制倾向。如当淫羊藿苷元的浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,IL-8 的产生量为 $(4.19 \pm 1.08) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$)。当诱导剂不存在时,阴性对照组 IL-8 的产生量为 $(11.52 \pm 0.71) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,各组化合物对 IL-8 的产生又有不同程度的促进作用,如当苷元的浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,IL-8 的产生量为 $(83.02 \pm 12.73) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,远远高于阳性对照组 IL-8 的产生量。

4 淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 THP-1 细胞生成 TNF α 的影响

在诱导剂(LPS + PMA)存在下,阳性对照组 TNF α 的产生量为 $(9.13 \pm 0.14) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 TNF α 的产生有一定的抑制作用,宝藿苷 I 在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对 TNF α 的产生有极为明显的抑制作用,产生量为 $(0.41 \pm 0.02) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在诱导剂不存在时,阴性对照组 TNF α 的产生量为 $(0.303 \pm 0.069) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,提示淫羊藿苷及其肠菌代谢产物在各浓度下对 TNF α 的产生均无明显影响。

讨 论

THP-1 细胞是由人组织细胞瘤变的单核细胞,它与人的巨噬细胞在对外界刺激的反应性上十分相近^[4,5],因此用 THP-1 细胞来观察药物对细胞因子产生的影响。我们曾观察淫羊藿苷及其代谢产物对人外周血单核巨噬细胞(PBMC)增殖的影响,未发现对细胞有毒害作用;在刺激剂(LPS + PMA)存在条件下,虽然淫羊藿苷及其代谢产物对 TNF α , IL-1 α 及 IL-8 均有抑制倾向,但对 IL-6 的产生有促进作用,并且当诱导剂不存在时,淫羊藿苷及其代谢产物对于 IL-8 的产生有促进作用。因此可以推断这几种化合物对于 THP-1 细胞产生 IL-1 α , IL-8 及 TNF α 所出现的不同程度的抑制作用不是因为其细胞毒作用所引起。

IL-1 α , IL-6, TNF α , IL-8 均为内源性炎症介质。其中,IL-1 α 和 TNF α 可使机体体温迅速升高,IL-1 α 可使局部间质细胞分泌 PGE₂ 和胶原酶,促进滑膜细胞分解,抑制软骨组织增殖而最终导致其破坏,是诱导局部炎症(如关节炎)作用发生的关键性细胞因子^[6]。IL-8 是介导炎症的主要因子,又称中

性粒细胞趋化因子,主要吸引中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞及 T 细胞。IL-8 的趋化作用和诱导中性粒细胞脱颗粒作用有助于对病原微生物的杀伤效应,在局部炎症的起始和维持方面也发挥重要作用^[7]。本实验中,淫羊藿苷及其肠菌代谢产物均能显著抑制经过诱导的 THP-1 细胞分泌 IL-1 α 和 IL-8,尤其是原苷及其代谢产物在较低浓度时即可对关键性炎症因子 IL-1 α 的产生有明显抑制作用。这表明,无论是淫羊藿苷还是其肠菌代谢产物均有局部抗炎的潜能。

在本实验条件下,各样品在抑制经过诱导的 THP-1 细胞产生 IL-1 α 和 IL-8 的同时,对 IL-6 的产生则有明显的促进作用。这表明,同大多数情况相反^[7],IL-6 的提高并非由 IL-1 α 而诱生,并且 TNF α 的产生并没有因为 IL-6 的提高而增加。说明淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对各种细胞因子产生的影响存在着特殊的作用机制。IL-6 是影响 B 细胞的增殖和分化,诱导 B 细胞分泌 Ig 的必需因子之一,同时也可直接或间接增强 NK 细胞及 CTL 的杀瘤活性;因此,进一步考察各样品对 THP-1 细胞分泌 IL-2 以及其他相关细胞因子的影响将有助于了解淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对机体免疫能力的影响,同时也有助于探讨 THP-1 细胞产生各种细胞因子的特异诱生机制。

当诱导剂存在时,高浓度的淫羊藿苷,宝藿苷 I 及苷元均对 IL-8 有抑制作用,但当刺激剂不存在时,中浓度的淫羊藿苷,低浓度的苷元及高、低浓度的宝藿苷 I 对 IL-8 的产生有促进作用。PMA 能提高蛋白激酶 C(PKC)的活性,促进细胞表达 IL-8^[8]。但当 PMA 不存在时,淫羊藿苷及其代谢产物却能促进 IL-8 的产生。由上述可见,淫羊藿苷及其代谢产物对 IL-8 的产生可能有双向调节作用。即当机体受到外界的刺激使 IL-8 产生量提高,可能引起强烈的炎症反应,此时服用淫羊藿苷可起到抗炎作用。但当机体在正常情况下,淫羊藿苷及其代谢产物可促进 IL-8 的产生,引起中性粒细胞的趋化反应和增强对侵入机体各种病原微生物的杀伤作用。

随着淫羊藿苷分子中糖基的逐步降解,药物分子的构象和极性发生着明显的变化。虽然不同浓度的淫羊藿苷及其肠菌代谢产物对 THP-1 细胞分泌各种细胞因子影响无明显剂量依赖性关系,但在相同浓度下,淫羊藿苷及其肠菌代谢产物影响各细胞因子产生的强度有较大差异。因此口服淫羊藿苷之

后,原苷及其代谢产物在血液中出现的比例关系对淫羊藿苷药效的发挥将至关重要。

参 考 文 献

- 1 刘铁汉,王本祥,王毅,等.淫羊藿苷的肠菌代谢研究 I: 肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化. 中草药, 2000(待发表)
- 2 邱峰,陈英杰,鹿野美弘,等.淫羊藿苷在大鼠体内的代谢. 药学报, 1999, 34: 222
- 3 Van der Meer JWM, Endres S, Lonne mann Y, *et al.* Concentration of immunoreactive human tumor necrosis factor alpha produced by human mononuclear cells *in vitro*. *J Leukocyte Biol*, 1988, 43: 216
- 4 Grey ST, Csizmadia V, Hancock WW. Differential effect

- of tumor necrosis factor-alpha on thrombomodulin gene expression by human monocytoid (THP-1) cell versus endothelial cells. *Int J Hematol*, 1998, 67: 53
- 5 Baqui AA, Meiller TF, Chon JJ, *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor amplification of interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha production in THP-1 human monocytic cells stimulated with lipopolysaccharide of oral microorganisms. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1998, 5: 341
 - 6 李景鹏主编. 免疫生物学. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 1996. 54
 - 7 Wang GG, Clark SC. Multiple actions of Interleukins 6 within a cytokine network. *Immunol Today*, 1988, 9: 137
 - 8 沈同,王镜岩主编. 生物化学. 第2版,上册,北京: 高等教育出版社, 1991. 449

EFFECT OF ICARIIN AND ITS METABOLITES ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES BY THP 1 CELLS

Liu Tiehan, Wang Benxiang, Wang Yi, Guo Yingjie,
Wu Lijun¹, Mutsuhiko Minami², Toshi Nagata³ and Takashi Ikejima³

(New Drug Research Center, Changchun College of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021;

¹Research Department of Natural Drugs, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015;

²Department of Parasitology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Japan;

³Department of Microbiology, Hamamatsu Medical University, Hamamatsu, Japan)

ABSTRACT **AIM:** To study the effects of icariin and its metabolites (baohuoside I, icaritin) on the production of proinflammatory cytokines by THP-1 cells. **METHODS:** Radioimmunoassay (RIA) was used to quantitate human IL-1 α , IL-6, IL-8 and TNF α . **RESULTS:** Icariin and its metabolites were shown to stimulate production of IL-6 and inhibit production of IL-8 and TNF α in the presence of LPS and PMA. In the absence of LPS and PMA these metabolites stimulated IL-8 production, but suppressed IL-6 production. Whether LPS and PMA were used or not, icariin and its metabolites have significant inhibitory effect on the production of IL-1 α . **CONCLUSION:** These findings suggest that icariin and its metabolites, baohuoside I and icaritin, have modulatory effect on the production of cytokines.

KEY WORDS icariin; baohuoside I; icaritin; cytokines; THP-1 cell line; radioimmunoassay (RIA)