

雷公藤红素对 IL-1 和 IL-2 活性 及 PGE₂ 释放的抑制作用

徐维敏 张罗修 程彰华
蔡为众* 缪红华** 潘德济

(上海医科大学药学院, 上海 200032)

摘要 雷公藤红素 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 在试管内能降低 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞外和细胞内白细胞介素-1(IL-1)的活性, 也能抑制 ConA 诱导的小鼠脾细胞产生白细胞介素-2(IL-2)。动态观察表明, 雷公藤红素经预处理 8 h 和 3 h 后已能分别抑制 IL-1 和 IL-2 的产生。此外, 雷公藤红素能降低 A23187 刺激家兔滑膜细胞释放前列腺素 E₂(PGE₂)。

关键词 雷公藤红素; 白细胞介素-1; 白细胞介素-2; 滑膜细胞; 前列腺素 E₂

IL-1 及 IL-2 有重要的诱导和调节免疫应答细胞功能表达的作用。另外, IL-1 还在炎症部位如关节腔起作用。它可促使滑膜细胞等间质细胞产生 PGE₂ 及胶原蛋白酶等, 后者可增加骨质重吸收和降解胶原组织而引起关节的损伤。有资料表明, IL-1 和 IL-2 活性的异常, 可能对一些自身免疫性疾病, 如类风湿性关节炎的病理过程产生影响。因此, 调节 IL-1 与 IL-2 水平对维持机体免疫平衡和某些疾病的治疗将有重要意义。

雷公藤红素是从雷公藤醋酸乙酯提取物中分离得到的单体成分, 已往的研究表明, 雷公藤红素对体液免疫、细胞免疫及炎症反应均具有明显的抑制作用, 是雷公藤的主要活性成分之一^(1~4)。本文观察它对 IL-1 和 IL-2 产生的作用及对滑膜细胞释放 PGE₂ 的影响, 以进一步阐明雷公藤红素抗炎免疫抑制作用的机制, 为雷公藤的临床应用提供理论依据, 并为研究其他有效成份起促进作用。

材 料 与 方 法

动物 Wistar 大鼠, 200 ~ 250 g, 雄性; C57BL/6 小鼠, 9 ~ 12 周龄; BALB/C 小鼠, 6 ~ 7 周龄; 家兔 2.5 ~ 3.0 kg, 雌雄兼用, 均由本校动物部供应。

试剂 RPMI 1640 培养基, GIBCO 产品, 含丙酮酸钠 1 μmol , HEPES 15 mmol, 小牛血清 10%, 2-巯基乙醇 5×10^{-5} mol。MEM 培养基, 日本水制薬株式会社产品, 含 L-谷氨酰胺 2 mmol。刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 及 A23187 均为 Sigma 产品。³H-胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR), 为中科院上海原子核研究所产品, 比活度为 1110 GBq/mmol。PGE₂ 药盒, 购于中国医学科学院基础医学研究所。

药物 雷公藤红素 mp 198 ~ 200 °C, C₂₀H₃₈O₄, 由本校天然药化教研室提供, 用吐温 80 溶解后再稀释, 吐温 80 最高浓度为 0.001%。

本文于 1990 年 9 月 18 日收到。

* 本校 86 级夜大学毕业生; ** 本校 85 级药理专业毕业生

CTLL₂ 细胞株的传代培养 CTLL₂ 细胞株由本校免疫教研室提供, 用含10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液加含 20% IL-2 的大鼠因子(大鼠脾细胞 5×10^6 ml 与 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}$ ConA 孵育 24 h 所得上清液), 于 37°C 、5% CO_2 作传代培养。

IL-1 的诱导 按文献⁽⁵⁾稍加改良。C57BL/6 小鼠, ip 5% 硫代乙醇酸钠培养基 1.0 ml, 4 天以后收集腹腔细胞, 洗后计数, 加 2×10^6 细胞至 24 孔平底培养板, 37°C 5% CO_2 孵育 2 h, 洗去非粘附细胞, 加 LPS ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 和药物, 培养 24 h 后, 离心取上清液, 此上清液含细胞外 IL-1; 在留下的巨噬细胞中加入 100 μl 重蒸馏水, -30°C 冻融三次, 然后用 RPMI 1640 培养液补足到 1.0 ml/孔, 离心收上清液, 此上清液含细胞内 IL-1。两部分上清液在 pH 7.2 磷酸缓冲液中于 4°C 透析 24 h, 过滤除菌后用于测定 IL-1 活性。另外, 部分标本在加入 LPS 和药物培养不同时间后, 洗去药物及 LPS, 继续培养 24 h, 取上清液待测。

IL-1 活性测定⁽⁶⁾ BALB/C 小鼠, 取胸腺制备成单个细胞悬液, 计数后于 96 孔培养板中加细胞 1×10^6 , ConA $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及待测上清 0.1 ml, 复管 3 只, 37°C 、5% CO_2 中培养 72 h, 在最后 6 h 加 ^3H -TdR 9.25 kBq , 然后收获细胞至醋酸纤维薄膜, 测定 ^3H -TdR 的掺入值。

IL-2 的诱导⁽⁷⁾ C57BL/6 小鼠, 取脾制备成细胞悬液, 于 24 孔培养板中加脾细胞 5×10^6 , ConA $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及药物, 培养 24 h 后取上清液测定。部分实验在加入药物培养不同时间后, 洗去药物, 加入含 ConA 的 RPMI 1640 培养液继续培养 24 h, 收取上清待测。

IL-2 活性的测定 按照文献⁽⁸⁾, 取传代培养的 CTLL 细胞, 洗三次后调细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 在 96 孔培养板中加 1×10^4 CTLL 细胞, 待测上清液 0.1 ml, 于 37°C 、5% CO_2 培养至 24 h, 在最后 6 h 加 ^3H -TdR 9.25 kBq , 收集细胞测定 cpm 值。

滑膜细胞产生 PGE₂ 的检测 以组织块种植法和关节腔穿刺酶消化法⁽⁹⁾从家兔膝关节获取初代滑膜细胞, 然后取第 2 ~ 4 代培养的滑膜细胞, 洗三次后细胞计数, 用含 10% 小牛血清的 MEM 培养液调至细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 取 1 ml 细胞悬液至 24 孔培养板, 置 37°C 、5% CO_2 , 24 h 使细胞贴壁, 洗细胞二次, 加入 A23187 及药物, 继续培养 48 h, 离心取上清液, 用放免法测定上清液中 PGE₂ 的含量⁽¹⁰⁾。

结 果

一、雷公藤红素对巨噬细胞内与细胞外 IL-1 活性的影响

为避免上清液中所含雷公藤红素对 IL-1 活性测定的干扰, 将上清液先透析, 然后用于测定, 结果(表 1)显示, 雷公藤红素 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 能使细胞内与细胞外 IL-1 活性均降低, 尤以对细胞内 IL-1 活性影响更为明显。

Tab 1. Effect of Tripterine on intracellular and extracellular IL-1 activities from murine peritoneal macrophages ($n=3$, $\bar{X} \pm \text{SD}$)

Tripterine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IL-1 activity	
	Intracellular	Extracellular
0	12128 ± 2208	10423 ± 810
0.01	11336 ± 1589	9373 ± 813
0.1	$7267 \pm 227^*$	$8296 \pm 506^*$
1.0	$3317 \pm 489^{**}$	$7225 \pm 412^{**}$

IL-1 activity expressed as cpm. 1×10^6 thymocytes. ^3H -TdR incorporation of thymocytes: 193 ± 12 and ConA-thymocytes: 3082 ± 963 . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

二. 雷公藤红素抑制 IL-1 产生的动力学观察

将药物与 LPS 预先作用于腹腔巨噬细胞 4、8 或 16 h 后, 洗去药物和 LPS, 继续培养 24 h, 测定上清液中的 IL-1 活性。结果表明, 除 4 h 组外, 其余两组在药物浓度为 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 时, 均能抑制 IL-1 的产生(图 1)。

三. 雷公藤红素对 IL-2 产生的影响

雷公藤红素 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 与 ConA 激活的小鼠脾细胞作用 24 h 后, 能减少 IL-2 的产生, 且抑制程度随药物浓度的加大而增强(图 2)。

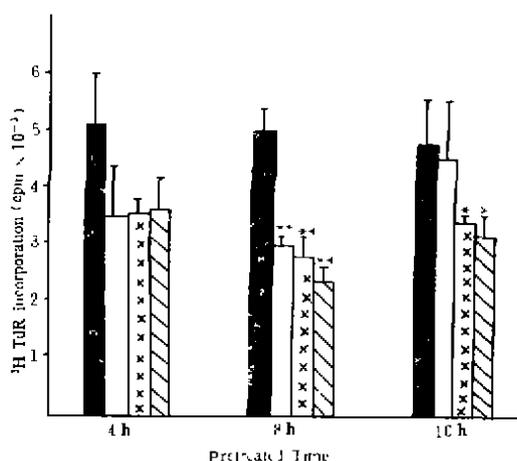


Fig1. IL-1 production from murine peritoneal macrophages pretreated with tripterine and LPS for different times.

■ Control; □ 0.01 $\mu\text{g/ml}$; ▨ 0.1 $\mu\text{g/ml}$; ▩ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 activity expressed as $\text{cpm}/1 \times 10^6$ thymocytes. ^3H -TdR incorporation of thymocytes: 57 ± 8 and ConA-thymocytes: 3595 ± 1237 . $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

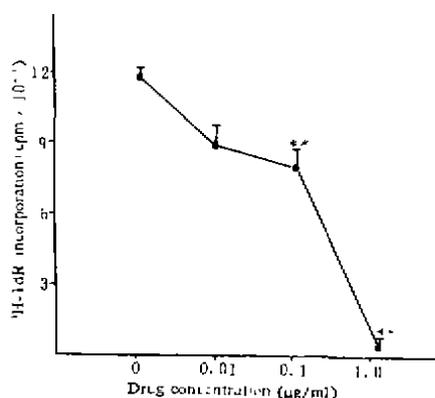


Fig2. Effect of tripterine on IL-2 production of murine splenocytes.

IL-2 activity expressed as $\text{cpm}/1 \times 10^4$ CTLL cells. ^3H -TdR incorporation by CTLL cells cultured with medium: 152 ± 24 and with ConA: 135 ± 7 . $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 3$, ** $p < 0.01$.

四. 雷公藤红素抑制 IL-2 产生的动态观察

为观察雷公藤红素对小鼠脾细胞产生 IL-2 动态变化的影响, 将药物预处理脾细胞 3、6 或 12 h 后, 洗去药物, 加入 ConA 继续培养 24 h 后测定上清中 IL-2 的活性。由表 2 可见, 雷公藤红素 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 作用于脾细胞 3 h 后已能抑制 IL-2 的产生。

Tab 2. IL-2 production of murine splenocytes pretreated with tripterine for different times ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 3$)

Tripterine ($\mu\text{g/ml}$)	IL-2 activity		
	3 h	6 h	12 h
0	7708 ± 1035	7632 ± 531	10288 ± 249
0.01	5542 ± 972	6941 ± 1030	8563 ± 1172
0.1	$4803 \pm 326^{**}$	$5261 \pm 568^{**}$	$8912 \pm 83^{**}$
1.0	$1401 \pm 31^{**}$	$264 \pm 19^{**}$	$139 \pm 23^{**}$

IL-2 activity expressed as $\text{cpm}/1 \times 10^4$ CTLL cells. ** $p < 0.01$.

五. 雷公藤红素对家兔滑膜细胞释放 PGE₂ 的影响

滑膜细胞与 A23187 及药物共同孵育 48 h 之上清用于测定 PGE₂ 含量。结果表明, 雷公藤红素 0.1 ~ 1.0 μg/ml 能降低 A23187 诱导的家兔滑膜细胞合成 PGE₂, 且无论是对由关节腔穿刺酶消化还是从组织块种植获得的细胞, 药物具有相同的抑制趋势(表 3)。

Tab 3. Effect of tripterine on PGE₂ release from rabbit synovial cells stimulated by A23187

Tripterine (μg/ml)	A23187 (μmol)	PGE ₂ (ng/10 ⁶ cells)	
		Explant	Trypsin digestion
-	-	37.13 ± 10.08	48.25 ± 3.18
0	3.0	64.05 ± 4.88	135.75 ± 4.24
0.01	"	44.25 ± 7.42	116.13 ± 14.32
0.1	"	16.25 ± 4.60**	88.25 ± 6.01*
1.0	"	24.38 ± 16.44	32.63 ± 1.59**
0	0.3	99.75 ± 1.06	ND
0.01	"	60.90 ± 1.27**	"
0.1	"	6.75 ± 0.35**	"
1.0	"	4.31 ± 0.27**	"

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ND: not done.

讨 论

本文结果显示, 雷公藤红素能明显降低腹腔巨噬细胞内和细胞外 IL-1 活性, 表明药物在抑制 IL-1 合成的同时, 对 IL-1 的分泌过程也有影响。动力学研究证明, 药物抑制 IL-1 活性的作用与药物浓度及药物作用时间有关。雷公藤红素对 IL-2 的产生具有很强的抑制作用, 这一效应在药物接触细胞 3 h 时已能呈现。

IL-1 和 IL-2 对机体免疫功能的作用是多方面的, 雷公藤红素由于抑制了 IL-1 和 IL-2 的产生, 进而影响免疫细胞的分化、成熟, 使细胞免疫和体液免疫反应均受抑制。鉴于雷公藤红素是雷公藤的主要活性成分之一, 故考虑雷公藤红素对 IL-1 和 IL-2 产生的抑制效应可能是临床雷公藤治疗某些自身免疫性疾病有效的机制之一。

滑膜细胞是关节腔 PGE₂ 的重要来源, 其对关节损伤有重要的影响。本文结果表明, 雷公藤红素能明显抑制滑膜细胞在 A23187 刺激下产生 PGE₂, 该结果与药物对巨噬细胞释放 PGE₂ 的作用相类似⁽⁴⁾。雷公藤的抗炎作用, 特别是减轻关节炎的局部炎症反应, 可能与其对巨噬细胞和滑膜细胞释放 PGE₂ 的双重抑制作用有关。另外, 可能与药物抑制 IL-1 活性而引起的继发效应也有关, 因为巨噬细胞和滑膜细胞合成 PGE₂ 的能力可受 IL-1 刺激而加强。

致谢 在实验中曾得到何正瑞同志的指教。

参 考 文 献

1. 张罗修, 等. 雷公藤红素对某些免疫功能的影响. 上海免疫学杂志 1986; 6: 277.
2. 张罗修, 等. 雷公藤红素抑制抗体形成及抗炎镇痛作用. 药理学报 1990; 25: 573.

3. 张罗修, 等. 雷公藤红素对小鼠淋巴细胞增生的抑制作用. 中国药理学报 1986; 7: 85.
4. 张罗修, 等. 雷公藤红素对巨噬细胞合成及释放前列腺素 E_2 及吞噬功能的影响. 中药药理与临床 1988; 4: 18.
5. Yang SX and Li XY. Enhancement of interleukin-1 production in mouse peritoneal macrophages by methionine-enkephalin. 中国药理学报 1989; 10: 266.
6. Paetkau V, et al. Proliferation of murine thymic lymphocyte *in vitro* is mediated by the concanavalin A-induced release of a lymphokine (co-stimulator). *J Immunol* 1976; 117: 1320.
7. Gearing AJH, et al. Production and assay of the interleukins. *J Immunol Methods* 1985; 83: 1.
8. 钱琴芳, 等. 体外诱生 IL-2 的实验条件. 上海医科大学学报 1987; 14: 321.
9. 范冷艳, 等. 体外培养滑膜细胞形态学和吞噬作用的观察. 解剖学杂志 1987; 10: 95.
10. Korn JH, et al. Synergy of interleukin 1 (IL-1) with arachidonic acid and A23187 in stimulating PGE synthesis in human fibroblasts. IL-1 stimulates fibroblast cyclooxygenase. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 50: 196.

INHIBITORY EFFECT OF TRIPTERINE ON ACTIVITIES OF IL-1, IL-2 AND RELEASE OF PGE₂

WM Xu, LX Zhang, ZH Cheng, WZ Cai, HH Miao and DJ Pan

(School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT Tripterine is one of the components isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook. Previous studies demonstrated that tripterine inhibited not only humoral and cellular immune responses but also some inflammatory responses. The present investigation attempted to observe effect of the drug on productions of IL-1 from macrophages, IL-2 from splenocytes and PGE₂ from synovial cells.

The results showed that tripterine (0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) significantly inhibited IL-1 activity of murine peritoneal macrophages induced by LPS. Because both intracellular and extracellular IL-1 activities were decreased, so tripterine might be able to reduce the production and release of IL-1. Besides, inhibition of IL-1 production was observed when macrophages were pretreated with the drug for 8 h and 16 h.

A good relationship was found between the effect and concentration of tripterine which inhibited IL-2 production from ConA-activated murine splenocytes. Kinetic study indicated that IL-2 production was decreased when splenocytes were pretreated with the drug for 3 h, 6h and 12 h.

Synovial cells obtained from rabbit knee joint were cultured successfully. A23187 was found to augment PGE₂ synthesis modestly. Tripterine significantly reduced PGE₂ release from synovial cells in a concentration dependent manner.

Key words Tripterine; Interleukin-1; Interleukin-2; Synovial cells; Prostaglandin E_2