

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00717

穿心莲内酯对肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 表达的抑制作用

覃林花^{1*}, 郑智武¹, 孔玲², 吕礁¹, 施云星¹, 李永平¹

1. 解放军 411 医院消化内科, 上海 200081

2. 中国科学院上海健康中心信号传导实验室, 上海 200025

[摘要] **目的** 研究穿心莲内酯对细胞因子肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 水平的影响。**方法** 用巯基乙酸腹腔注射小鼠, 取小鼠的腹腔巨噬细胞进行体外培养, 以穿心莲内酯预先作用于巨噬细胞, 随后添加脂多糖刺激巨噬细胞, 以 RT-PCR 检测巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 、白介素-12a 和白介素-12b mRNA 水平, 以 ELISA 检测巨噬细胞培养上清的肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 蛋白水平。**结果** 穿心莲内酯能抑制活化小鼠腹腔巨噬细胞的肿瘤坏死因子- α mRNA 和蛋白水平, 并能抑制白介素-12a mRNA、白介素-12b mRNA 和白介素-12 蛋白水平, 且抑制作用随穿心莲内酯浓度增加而增强。12 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯能抑制肿瘤坏死因子- α mRNA ($P < 0.05$), 25 $\mu\text{g/ml}$ 抑制肿瘤坏死因子- α mRNA 水平 ($P < 0.01$), 1 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯能抑制肿瘤坏死因子- α 蛋白 ($P < 0.05$), 12 $\mu\text{g/ml}$ 抑制肿瘤坏死因子- α 蛋白水平 ($P < 0.01$)。1 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯抑制白介素-12b mRNA 水平 ($P < 0.01$), 12 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯抑制白介素-12a mRNA 水平 ($P < 0.01$), 1 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯抑制白介素-12 蛋白水平 ($P < 0.01$)。**结论** 穿心莲内酯能抑制活化巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- α 和白介素-12。

[关键词] 穿心莲; 穿心莲内酯; 肿瘤坏死因子 α ; 白介素 12

[中图分类号] R 286 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0717-04

Andrographolide inhibits expression of TNF- α and IL-12 in activated macrophages

QIN Lin-hua^{1*}, ZHENG Zhi-wu¹, KONG Ling², LÜ Jiao¹, SHI Yun-xing¹, LI Yong-ping¹

1. Department of Gastroenterology, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China

2. Shanghai Health Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of andrographolide on the expression of TNF- α and IL-12 in activated macrophages. **Methods** The peritoneal macrophages were harvested from mice intraperitoneally injected with thioglycollate. The macrophages were pretreated with andrographolide and then stimulated with lipopolysaccharide. RT-PCR was used to examine the expression of TNF- α , IL-12a, and IL-12b in the macrophages, and ELISA was used to measure the protein levels of TNF- α and IL-12 in the supernatant. **Results** Andrographolide inhibited the mRNA levels of TNF- α , IL-12a, and IL-12b, and the protein levels of TNF- α and IL-12 in activated macrophages, and the inhibition increased with the increase of andrographolide concentration. Andrographolide at 12 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$) and 25 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.01$) significantly inhibited TNF- α mRNA level in macrophages; andrographolide at 1 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$) and 12 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.01$) significantly inhibited TNF- α protein level ($P < 0.01$). Andrographolide at 1 $\mu\text{g/ml}$ significantly inhibited IL-12b mRNA level and at 12 $\mu\text{g/ml}$ significantly inhibited IL-12a mRNA level ($P < 0.01$); and andrographolide at 1 $\mu\text{g/ml}$ also significantly inhibited IL-12 protein level ($P < 0.01$). **Conclusion** Andrographolide can inhibit both the expression of TNF- α and IL-12 in activated macrophages.

[Key words] *Andrographis paniculata*; andrographolide; tumor necrosis factor- α ; interleukin-12

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7):717-720]

肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 均是非常重要的细胞因子, 两者均可由活化巨噬细胞产生^[1-2]。肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 均能诱导产生多种细胞因子。肿瘤坏死因子- α 还可诱导细胞凋亡^[3]和激活 T 细胞等免疫细胞。白介素-12 能增强 T 细胞及 NK 细胞的细胞毒性作用。因而, 肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 在增强机体免疫反应中有重要作用。但过

多的肿瘤坏死因子- α 和白介素-12 均对炎症性肠病、细菌性休克产生作用, 过多的肿瘤坏死因子- α 还能引起组织损伤^[4-6], 白介素-12 过量可使机体产生多发性硬化和风湿性关节炎等自身免疫性疾病^[7]。

穿心莲内酯是穿心莲活性成分中的一种。穿心莲内酯有多种药用活性, 如杀伤原虫、抑制血小板聚集、抑制蛋白转换酶和弗林蛋白酶、刺激细胞分化、

[收稿日期] 2011-02-23 **[接受日期]** 2011-05-03

[作者简介] 覃林花, 博士, 副主任医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81824212, E-mail: ando_8171@yahoo.com.cn

抗肝细胞毒性及免疫调节等^[8-10]。Chiou等^[11]在RAW 264.7巨噬细胞中发现,穿心莲内酯能抑制脂多糖诱导的NO(nitric oxide,一氧化氮)释放。Chandrasekaran等^[12]在巨噬细胞J774A.1中发现,穿心莲内酯不仅能抑制脂多糖诱导的NO释放,还能抑制前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)的产生。为了更多地了解穿心莲内酯对肿瘤坏死因子- α 和白介素-12生成的作用,本研究以穿心莲内酯作用于脂多糖激活的小鼠腹腔巨噬细胞,通过RT-PCR,对巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 、白介素-12a和白介素-12b mRNA进行了检测,通过ELISA对巨噬细胞培养上清的肿瘤坏死因子- α 和白介素-12蛋白进行检测。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 穿心莲内酯提取自穿心莲,其结构通过IR、NMR、MS验证,纯度经HPLC分析达99.5%,由上海中医药大学中药标准化研究中心提供。脂多糖(*Escherichia coli* 055:B5)和巯基乙酸购自Sigma公司。RPMI 1640培养基购自Hyclone。细胞计数试剂盒8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)购自日本Dojindo Laboratories公司。TRIzol Reagent和反转录酶购自Invitrogen公司。小鼠白介素-12和小鼠肿瘤坏死因子- α 检测DUOSET ELISA试剂盒均购自R&D System。

1.2 实验动物 C57BL/6J小鼠,雌性,8周龄,购自中国科学院实验动物中心。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞的制备 按常规方法^[10-11]制备。取8周龄小鼠,腹腔注射1 ml 4% 巯基乙酸,第4天收获小鼠腹水,计数细胞,以含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基制成密度为 5×10^5 个/ml的细胞悬液。接种到96孔板,每孔接种100 μ l(含细胞 5×10^4 个),用于穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬细胞的细胞毒实验。接种到24孔板,每孔接种0.5 ml(含细胞 2.5×10^5 个),用于检测穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子- α mRNA和蛋白的影响。上述细胞培养板均置37℃、5% CO₂ 孵箱培养1 h,去除非贴壁细胞,贴壁细胞为腹腔巨噬细胞。

1.4 穿心莲内酯处理脂多糖活化的小鼠腹腔巨噬细胞 96孔板中的小鼠腹腔巨噬细胞,在含0、1、12、25、50、100、200 μ g/ml穿心莲内酯的RPMI 1640培养基中培养1 h,随后在含相应浓度穿心莲内酯和0.5 μ g/ml脂多糖的培养基中继续培养48 h,之后用于检测穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬细胞的细胞毒作用,每种浓度均设3个复孔。24孔板中的小鼠腹腔巨噬细胞,在含0、0.5、1、12、25 μ g/ml穿心莲内酯的RPMI 1640培养基中培养1 h,随后在含相应浓度穿心莲内酯及0.5 μ g/ml脂多糖

的培养基中继续培养。培养1 h后,取细胞检测肿瘤坏死因子- α mRNA;培养2 h后取细胞检测白介素-12a和白介素-12b mRNA;培养24 h后,收集细胞培养上清检测肿瘤坏死因子- α ;培养48 h后收集上清检测白介素-12。各实验均重复3次。

1.5 穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬的细胞毒作用的检测 经穿心莲内酯处理过的小鼠腹腔巨噬细胞,每孔中加入10 μ l CCK-8液,37℃、5% CO₂ 孵箱培养4 h,在酶标仪上450 nm处检测光密度值(D)。实验重复3次。

1.6 RT-PCR检测肿瘤坏死因子- α 、白介素-12a和白介素-12b mRNA 经穿心莲内酯处理的活化小鼠巨噬细胞,以PBS洗涤2次后用于提取总RNA。简述如下:每 5×10^6 个细胞以1 ml TRIzol裂解5 min,加入0.2 ml氯仿抽提,离心后的上层溶液以等体积异丙醇沉淀,离心后的沉淀以不含RNA酶的去离子水溶解,即为总RNA溶液。cDNA的合成以1 μ g总RNA为模板,olig(dT)₁₅为引物、在反转录酶的作用下完成,其产物作为PCR模板。引物如下:IL-12a-U: 5'-TCA ATC ACG CTA CCT CCT C-3'; IL-12a-L: 5'-CAG AGC TTC ATT TTC ACT C-3'; IL-12b-U: 5'-TCC TCA GAA GCT AAC CAT C-3'; IL-12b-L: 5'-AGC TGG TGC TGT AGT TCT C-3'; TNF- α -U: 5'-ATG GAT CCA CCA TGA GCA CAG AAA GC-3'; TNF- α -L: 5'-ATG AAT TCT CAC AGA GCA ATG ACT CC-3'; GAPDH-U: 5'-TTT GTG ATG GGT GTG AAC CAC GAG-3'; GAPDH-L: 5'-GGA GAC AAC CTG GTC CTC AGT GTA-3'。

白介素-12a和白介素-12b各扩增35个循环,肿瘤坏死因子- α 和GAPDH各扩增30个循环。白介素-12a、白介素-12b、肿瘤坏死因子- α 和GAPDH的PCR产物分别为569、667、708和457 bp。对DNA条带进行灰度分析,计算各组目的DNA和内参扩增的比值。各实验均分别重复3次。

1.7 细胞因子检测 穿心莲内酯处理过的小鼠腹腔巨噬细胞培养上清,培养24 h后收集上清检测肿瘤坏死因子- α ,培养48 h后收集上清检测白介素-12。ELISA根据检测试剂盒提供的方法进行,每种待测培养上清设3个复孔。实验重复3次。

1.8 统计学处理 应用SPSS统计学分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用单因素方差分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬细胞的细胞毒作用 1、12、25、50和100 μ g/ml穿心莲内酯对脂

多糖活化的小鼠腹腔巨噬细胞无细胞毒作用 ($2.61 \pm 0.35, 2.64 \pm 0.22, 2.58 \pm 0.27, 2.56 \pm 0.32, 2.48 \pm 0.31, P > 0.05$); $200 \mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯对脂多糖活化的小鼠腹腔巨噬细胞有细胞毒作用 (1.28 ± 0.12 vs $2.39 \pm 0.17, P < 0.01$).

2.2 穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 水平的抑制作用 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 脂多糖使小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子- α mRNA 水平增高 (图 1A、1B)。穿心莲内酯能抑制脂多糖活化小鼠腹腔巨噬细胞的肿瘤坏死因子- α mRNA 水平, 抑制作用随穿心莲内酯浓度增加而增强, $12 \mu\text{g/ml}$ 和 $25 \mu\text{g/ml}$ 的穿心莲内酯有抑制作用 (图 1A 和 1B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 脂多糖刺激小鼠腹腔巨噬细胞 24 h, 其培养上清可检测到肿瘤坏死因子- α 蛋白 (图 1C)。穿心莲内酯可抑制肿瘤坏死因子- α 蛋白水平, 其抑制作用随着穿心莲内酯浓度增加而增强。 $12, 25 \mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯可抑制脂多糖活化小鼠腹腔巨噬细胞中的肿瘤坏死因子- α 蛋白水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

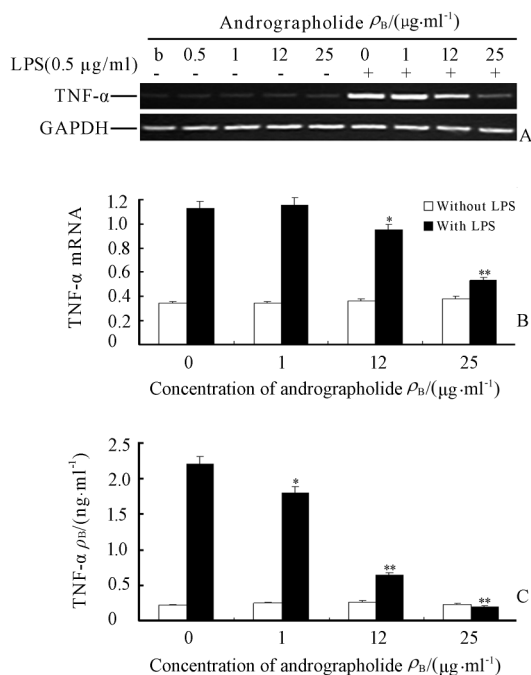


图 1 穿心莲内酯抑制活化小鼠腹腔巨噬细胞的肿瘤坏死因子- α 水平

Fig 1 Andrographolide-inhibited TNF- α in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages

Mouse peritoneal macrophages were first treated with andrographolide for 1 h; after further cultured with andrographolide in presence or absence of $0.5 \mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide for 1 h, the expression of TNF- α was examined by RT-PCR (A,B). After a further culture for 24 h, TNF- α protein expression was examined by ELISA (C). b: Blank; LPS: Lipopolysaccharide. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group(0). $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 穿心莲内酯对活化小鼠腹腔巨噬细胞白介素-12 的抑制作用 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 脂多糖使小鼠腹腔巨噬细胞白介素-12a mRNA 和白介素-12b mRNA 增高 (图 2A、2B、2C)。穿心莲内酯能抑制脂多糖活化小鼠腹腔巨噬细胞的白介素-12a mRNA 和白介素-12b mRNA 增高。 $1, 12, 25 \mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯均能抑制白介素-12b mRNA 水平 ($P < 0.01$), 抑制作用随穿心莲内酯浓度增加而增强 (图 2A、2C)。 $12, 25 \mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯均抑制白介素-12a mRNA 水平 ($P < 0.01$), 抑制作用随穿心莲内酯浓度增加而增强 (图 2A、2B)。 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 脂多糖刺激小鼠腹腔巨噬细胞 48 h, 其培养上清可检测到白介素-12 (图 2D)。穿心莲内酯可降低细胞培养上清的白介素-12 蛋白水平, $1, 12, 25 \mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯均降低活化小鼠腹腔巨噬细胞中培养上清的白介素-12 水平 ($P < 0.01$), 抑制作用随穿心莲内酯浓度增加而增强 (图 2D)。

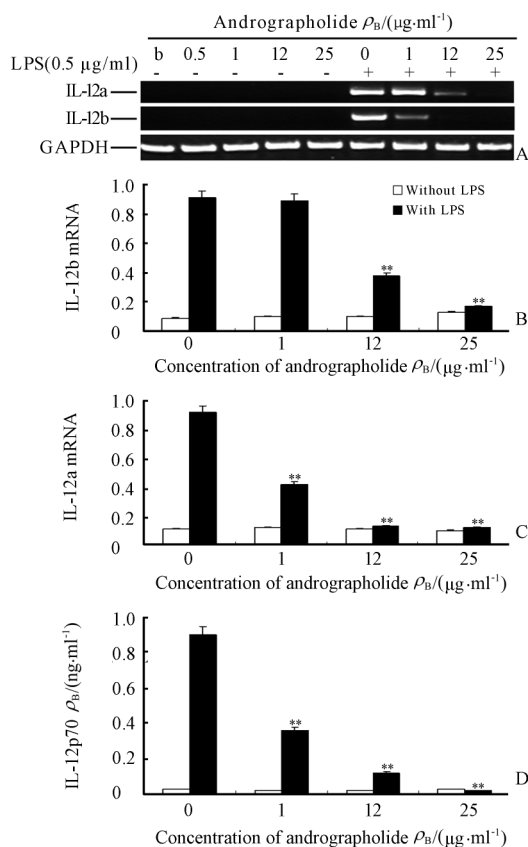


图 2 穿心莲内酯抑制活化小鼠腹腔巨噬细胞的白介素-12 水平

Fig 2 Andrographolide inhibited IL-12 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages

Mouse peritoneal macrophages were first treated with andrographolide for 1 h; after further culture with andrographolide in presence or absence of $0.5 \mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide for 2 h, RT-PCR was used to examine IL-12a and IL-12b mRNA expression (A, B, C). After a further culture for 24 h, ELISA was used to examine IL-12p70 in the supernatants (D). b: Blank; LPS: Lipopolysaccharide. ** $P < 0.01$ vs control group(0). $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

传统中草药有着几千年的悠久历史,临床上使用的中草药通常以几种或数种中草药组成复方的形式用于治疗患者,但现代医学认为这种中草药的混合运用缺乏科学的依据。如今,对中草药复方的药理、药效等的评价,甚至对来自传统中草药的小分子天然化合物的分离、鉴定、定性、定量,以及它们对人潜在用途的评价,已经成为药物研究的一个重要领域。穿心莲是在中药及印度传统药物中使用的一种草本植物。穿心莲的甲醇抽提物有促进小鼠骨髓白血细胞分化的作用,并有报道显示它能同时激活抗原特异及非特异性免疫反应^[13]。穿心莲提取物中含有二萜内酯类化合物、类黄酮和类固醇^[13]。穿心莲提取物的主要成分是双萜内酯,而穿心莲内酯就是其主要成分,其占穿心莲提取物抽提物的70%^[13]。已报道穿心莲内酯有着多种药理活性,可开发出抗炎症药物^[8-10]。在细菌等病原体引起的炎症反应中,适量诱导的肿瘤坏死因子- α 和白介素-12能增强机体的免疫反应,当这类细胞因子过量时,会导致细菌性休克等严重的后果^[4],因而控制肿瘤坏死因子- α 或白介素-12至一定水平有利于感染性及炎症性疾病的恢复。在感染性疾病中,巨噬细胞不仅能释放NO,还是肿瘤坏死因子- α 和白介素-12等细胞因子的主要来源。有报道表明,穿心莲内酯可以抑制脂多糖诱导巨噬细胞系中NO和PGE₂释放^[11-12]。

本研究表明,穿心莲内酯对脂多糖活化小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 和白介素-12的表达有抑制作用,其抑制作用强度与穿心莲内酯的浓度正相关。12、25 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯均能抑制脂多糖活化小鼠腹腔巨噬细胞的肿瘤坏死因子- α 水平,其中25 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯的抑制作用最强。12、25 $\mu\text{g/ml}$ 穿心莲内酯均能抑制白介素-12的表达,其抑制作用随穿心莲内酯的浓度增加而增强。脂多糖来自革兰阴性菌,因而穿心莲内酯可能对控制革兰阴性菌感染引起的肿瘤坏死因子- α 和白介素-12过量表达、阻止革兰阴性菌感染发展为细菌性休克有一定的应用前景。肽聚糖来自革兰阳性菌,也能诱导肿瘤坏死因子- α 和白介素-12的表达。因而,穿心莲内酯可能对控制这些细胞因子的表达、控制感染恶化有一定的作用。肿瘤坏死因子- α 对组织损伤、炎症性肠病有一定作用^[4-6],白介素-12还对多发性硬化症、炎症性肠病、胰岛素依赖型糖尿病、风湿性关节炎等自身免疫性疾病^[7]有一定的作用,穿心莲内酯在防治这些疾病方面可能有一定的应用前景。

综上所述,穿心莲内酯可以抑制脂多糖诱导小

鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子- α 和白介素-12的表达。因此,穿心莲内酯可能在治疗自身免疫性疾病和炎症性疾病有潜在应用前景。在随后的工作中,我们将研究穿心莲内酯抑制活化巨噬细胞的信号转导机制,并在炎症性疾病和自身免疫性疾病模型中,进一步研究穿心莲内酯对这些疾病的治疗作用。

[参考文献]

- [1] Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology[J]. Cell, 2001, 104: 487-501.
- [2] Aoki R, Suzuki C, Kimoto H, Nomura M, Mizumachi K. Lactococcus strains treated with heat and hen-egg-white lysozyme induce abundant interleukin-12 production by J774. 1 macrophages and murine spleen cells[J]. J Dairy Sci, 2011, 94: 3262-3270.
- [3] Varfolomeev E E, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie[J]? Cell, 2004, 116: 491-497.
- [4] De Kock I, Van Daele C, Poelaert J. Sepsis and septic shock: pathophysiological and cardiovascular background as basis for therapy[J]. Acta Clin Belg, 2010, 65: 323-329.
- [5] Lim A W, Panaccione R, Seow C H. Exploring the role of monitoring anti-TNF α drug and antibody levels in the management of inflammatory bowel disease[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2011, 4: 145-151.
- [6] Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response[J]. J Exp Med, 1996, 184: 1397-1411.
- [7] Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12[J]. Int Rev Immunol, 1998, 16 (3-4): 365-396.
- [8] 韩俊伟, 吕世明, 谭艾娟, 尹泽东, 杜海燕, 陈淑萍, 等. 穿心莲内酯对小鼠呼吸道免疫功能的影响[J]. 山地农业生物学报, 2009, 28: 51-54.
- [9] 戴桂馥, 徐海伟, 王俊峰, 李奇科, 王芳, 徐曼, 等. 穿心莲内酯3,19-缩醛(酮)衍生物对小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响[J]. 中国新药杂志, 2007, 16: 378-381.
- [10] 张培宪. 穿心莲内酯抗病毒感染的临床现状[J]. 山西医药, 2009, 25: 39-40.
- [11] Chiou W F, Chen C F, Lin J J. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase(iNOS) expression in RAW 264. 7 cells by andrographolide[J]. Brit J Pharmacol, 2000, 129: 1553-1560.
- [12] Chandrasekaran C V, Thiyagarajan P, Deepak H B, Agarwal A. In vitro modulation of LPS/calcimycin induced inflammatory and allergic mediators by pure compounds of *Andrographis paniculata* (King of bitters) extract[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11: 79-84.
- [13] Siripong P, Konckathip B, Preechanukool K, Picha P, Tunsuwan K, Taylor W C. Cytotoxic diterpenoid constituents from *Andrographis paniculata* nees leaves[J]. J Sci Soc Thai, 1992, 18: 187-194.

[本文编辑] 尹茶