

雷公藤红素对小鼠淋巴细胞增生的抑制作用

张罗修、潘德济、张纬江、吴怀英、楼亚平 (上海医科大学药理学系, 上海 200032)

提要 自雷公藤中分离得3个成分, 其中雷公藤红素(tripterine, celastrol)在试管内0.1-1.0 μg/ml可以明显抑制Con A, PHA, PWM及LPS诱导的小鼠脾细胞增生反应, 对淋巴结细胞增生有相似抑制作用, 但是对胸腺细胞的作用不明显. tripterine 1.0 μg/ml与细胞培养24 h已产生明显抑制作用.

关键词 雷公藤红素; 雷公藤内酯甲; 3β, 22α-二羟-Δ¹²-齐墩果烯-29-羧酸; [³H]胸苷; 淋巴细胞; 有丝分裂原

雷公藤对多种自身免疫病有效⁽¹⁻⁵⁾, 但所含单体成分对免疫功能的影响报道很少^(6,7). 作者从福建产雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. 的醋酸乙酯提取部分分离得到雷公藤红素(tripterine)⁽⁸⁾, 即南蛇藤素(celastrol)⁽⁹⁾, 雷公藤内酯甲(wilforlid A)以及3β, 22α-二羟-Δ¹²-齐墩果烯-29-羧酸(3β, 22α-dihydroxy-Δ¹²-oleanen-29-oic acid, DOOA), 结构式见图1. 本文报道这3个成分对小鼠淋巴细胞增生反应的影响.

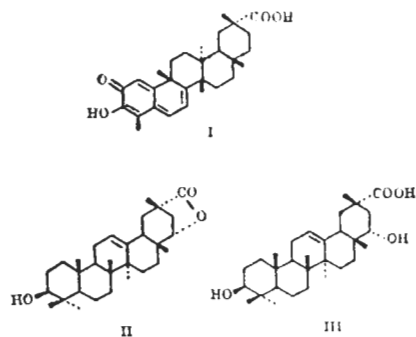


Fig 1. Structural formulae of tripterine (celastrol, I), wilforlid A (II) and 3β, 22α-dihydroxy-Δ¹²-oleanen-29-oic acid, DOOA (III)

材料与方 法

材料 雷公藤红素 mp 198-200°C, C₂₉H₃₈O₄

(MW 450), 自雷公藤根皮部分得. 雷公藤内酯甲⁽¹⁰⁾ mp 320-2°C, C₃₀H₄₈O₅ (MW 454)及 DOOA mp 315-8°C, C₃₀H₄₈O₄ (MW 472)均自雷公藤木部取得. 药物经吐温-80溶解后再稀释, 吐温-80最高浓度为0.02%, 该浓度的吐温80对淋巴细胞增生反应无影响. [³H]胸腺嘧啶脱氧核苷(TdR)1535.5 GBq/mmol 为中科院上海原子核研究所产品. 刀豆素 concanavalin A (Con A) 为本院生化教研室提供. 植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA) 为广州医药工业研究所产品. 大肠杆菌脂多糖(lipopolysacchride, LPS) Sigma 产品. 美洲商陆分裂原 (pokeweed mitogen, PWM), Sigma 产品. 培养液 RPMI-1640 (日本日水製藥株式会社产品) 含10%小牛血清、青霉素100 U/ml及链霉素100 μg/ml、2-巯基乙醇0.05 mM.

淋巴细胞增生试验 用我院动物室供给的近交系小鼠 C₅₇BL(H-2^b), ♀♂兼用, 8-12周龄, 按文献⁽¹¹⁾取其脾脏、肠系膜淋巴结或胸腺制备细胞悬液. 用0.17 M氯化铵溶涨红细胞, 洗3次后调节细胞浓度至3×10⁶/ml, 每管0.4ml, 加入药物20 μl及有丝分裂原溶液20 μl, 加培养液至0.5 ml, 于5% CO₂中37°C

Tab 1. Effects of tripterine, wilforlid A and DOOA on [³H]TdR incorporation in mouse splenocytes incubated with Con A 2.5 μg/ml. 1×10⁶ cells were incubated for 48 h. [³H]TdR was added at 44 h. cpm × 10⁻², $\bar{x} \pm SD$ of quadruplicate cultures. *p>0.05, ***p<0.01

μg/ml	0	0.01	0.1	1.0
—	353±155			
Triptertine	230±107*	31±17***	19±5***	
Wilforlid A	388±239*	405±274*	425±275*	
DOOA	336±105*	269±45*	265±125*	

Tab 2. Effects of tripterine on proliferation of mouse lymphocytes in the presence/absence of Con A stimulus. cpm $\times 10^{-2}$. $\bar{x} \pm SD$ of quadruplicate cultures. * $p > 0.05$, * $p < 0.01$**

Tripterine $\mu\text{g/ml}$	Con A $\mu\text{g/ml}$	Lymphonodus cells		Splenocytes		Thymus cells	
		cpm $\times 10^{-2}$	Inhibition	cpm $\times 10^{-2}$	Inhibition	cpm $\times 10^{-2}$	Inhibition
-	-	4.1 \pm 1.0	0%	21 \pm 3	0%	4.5 \pm 2.4	0%
0.1	-	3.3 \pm 2.1*	25%	5 \pm 3***	76%	4.0 \pm 1.4*	0%
1.0	-	2.7 \pm 0.9*	33%	3.3 \pm 1.2***	86%	2.2 \pm 0.5*	50%
-	2.5	280 \pm 130	0%	1127 \pm 530	0%	5.7 \pm 3.6	0%
0.1	2.5	20 \pm 8***	93%	35 \pm 24***	97%	3.9 \pm 0.5*	33%
1.0	2.5	2.6 \pm 0.6***	99%	2.9 \pm 0.9***	99%	4.4 \pm 1.1*	33%

培养 48 h。在培养终止前 4 h 加入 [^3H]TdR 74 kBq 培养终止后用多头细胞收集器进行抽滤, 滤膜烘干后以 LKB 液体闪烁计数仪进行自动测量记录。每组实验数据均以 cpm/ 1×10^6 cell 表示核酸合成能力。

结 果

雷公藤红素、雷公藤内酯甲及 DOOA 对脾淋巴细胞增生的影响 从表 1 可见雷公藤红素在 0.1-1.0 $\mu\text{g/ml}$ 能明显抑制 Con A 诱导的淋巴细胞增生($p < 0.01$), 雷公藤内酯甲及 DOOA 无明显作用。

雷公藤红素对小鼠胸腺、脾及肠系膜淋巴结细胞增生反应的影响 自表 2 可见未经 Con A 刺激的脾细胞在 0.1 及 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 雷公藤红素作用下, [^3H]TdR 参入的抑制率 76 和 86% ($p < 0.01$), 而经 Con A 刺激的小鼠脾细胞和淋巴结细胞在上述相同浓度时, 该抑制率达 95% 以上, 同时观察到胸腺细胞对 Con A 的作用不太敏感, 雷公藤红素仅产生轻度抑制作用。

雷公藤红素对多种有丝分裂原作用的影响 自表 3 及表 4 中可见雷公藤红素对多种有丝分裂原的诱导作用均呈明显抑制。

雷公藤红素抑制淋巴细胞的增生 在本实验 Con A 于 0 h 加入, 在 Con A 之后间歇不同时间加入雷公藤红素 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 总的培养时间为 48 h, 在培养终止前 4 h 加入同位素,

Tab 3. Effects of tripterine(1.0 $\mu\text{g/ml}$) on proliferation of mouse splenocytes to lipopolysaccharides (LPS). Quadruplicate cultures. * $p < 0.01$**

LPS $\mu\text{g/ml}$	cpm $\times 10^{-2}$ ($\bar{x} \pm SD$)		Stimulation index	
	Saline	Tripterine	Saline	Tripterine
10	81 \pm 10	0.80 \pm 0.15***	24.5	0.2
20	124 \pm 28	0.80 \pm 0.6***	37.6	0.2
40	214 \pm 28	0.86 \pm 0.13***	64.8	0.3

Tab 4. Effects of tripterine on response of mouse splenocytes to 3 mitogens in vitro. cpm $\times 10^{-2}$. $\bar{x} \pm SD$ of quadruplicate cultures. * $p > 0.05$, * $p < 0.01$**

Mitogen $\mu\text{g/ml}$	Tripterine($\mu\text{g/ml}$)			
	0	0.01	0.1	1.0
Con A 2.5	353 \pm 155	230 \pm 107*	31 \pm 17***	19 \pm 5***
PHA 50	40 \pm 7	44 \pm 9*	13 \pm 2***	9 \pm 3***
PWM 50	240 \pm 15	91 \pm 8***	10 \pm 3***	7 \pm 2***

结果证明雷公藤红素在 Con A 之后 4-8 h 加入已可抑制 ConA 的刺激作用($p < 0.01$)如在 24 h 之后加入也可抑制 59% ($p < 0.05$), 在培养最后 4 h 加入药物, 细胞增生亦有抑制趋势, 但不显著(图 2)。

雷公藤红素对细胞存活率的影响 小鼠脾细胞与雷公藤红素 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 培养 48 h 后用台盼蓝检测存活率, 并与对照及 Con A 组比较, 结果对照组为 60%, Con A 组 57%, 雷公藤红

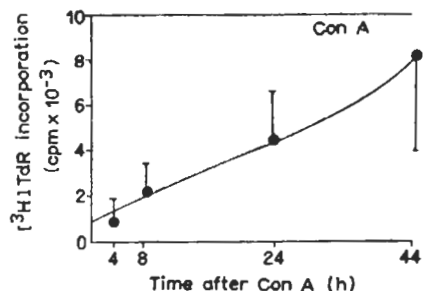


Fig 2. Effects of tripterine on mouse splenocytes response to Con A 2.5 µg/ml. Tripterine 1 µg/ml was added at different times. [³H] TdR was added at 44 h. 4 replications $\bar{x} \pm SD$.

素组为 64%，雷公藤内酯甲及 DOOA 0.1 µg/ml 分别在 77% 及 69%，各组间无显著差别。

讨 论

本文经多种实验设计均证明雷公藤红素在试管内可以抑制淋巴细胞增生，根据它对不同有丝分裂原 Con A, PHA, PWM 及 LPS 的刺激作用都能抑制，对脾细胞及淋巴结细胞反应的抑制程度也很接近，提示它对 T 及 B 细胞的抑制作用并无明显选择性。

胸腺细胞对 Con A 的反应较差，这一现象与文献⁽¹²⁾报道相符。这可能因胸腺内巨噬细胞的比例较少，导致白细胞介素-1(interleukine-1)水平的偏低，进而影响胸腺细胞的增殖⁽¹³⁾。亦有人用单克隆抗体鉴定胸腺细胞的分化程度与外周细胞不同⁽¹⁴⁾，可能导致胸腺细胞对 Con A 的反应不敏感。在胸腺细胞无明显增殖的情况下，雷公藤红素亦无明显抑制

作用。

雷公藤红素与淋巴细胞共同培养 48 h 后，各组细胞存活率均非常接近，说明在本实验条件下，药物主要抑制细胞的增生，并无明显细胞毒作用，由于药物对细胞有轻微损伤作用时台盼蓝可以不着色⁽¹¹⁾，故本实验并不排除在较高浓度或较长时间作用下雷公藤红素可能有细胞毒作用。

致谢 本文承吴珏教授审阅，曹致芳同志参加部分工作。

参 考 文 献

- 1 黎磊石、张训、陈惠平，等。中华医学杂志 1982；62：581
- 2 中国医学科学院皮肤病研究所雷公藤研究组。中华皮肤科杂志 1982；15：199
- 3 张覃沐、陈正玉、林焜、中国药理学报 1981；2：128
- 4 张益鹏。中西医结合杂志 1983；6：360
- 5 秦万章。上海中医药杂志 1981；4：46
- 6 Kupchan SM, Schubert RM. *Science* 1974；186：791
- 7 Kupchan SM, Court WA, Dailey RG, Gilmore CJ, Bryan RF. *J Am Chem Soc* 1972；94：7194
- 8 朱任宏。中国生理学杂志 1936；10：529
- 9 Gisvoid O. *J Am Pharm Assoc* 1939；28：440
- 10 秦国伟、杨学敏、顾文华，等。化学学报 1982；40：637
- 11 Hughes D, Caspary ZA. *Int Arch Allergy* 1970；37：506
- 12 Renoux G, Renoux M. *J Exp Med* 1977；145：466
- 13 Otterness IG, Lachman LB, Bliven ML. *Immunopharmacology* 1981；3：61
- 14 Haynes BF. *Immunol Rev* 1981；57：127

INHIBITORY EFFECT OF TRIPTERINE ON PROLIFERATION OF LYMPHOCYTES IN MICE

ZHANG Luo-xiu, PAN De-ji, Zhang Wei-jiang, WU Huai-ying, LOU Ya-ping
(School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT Three components were isolated from *Tripterygium wilfordii* Hook. They were identified as tripterine (celastrol), wilforlid A and 3 β , 22 α -dihydroxy- Δ^{12} -oleanen-29-oic acid (DOOA). Tripterine inhibited the proliferations of splenic cells in mice induced by mitogens including phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A), lipopolysaccharide (LPS) and pokeweed mitogen (PWM). Optimal effects were seen at 0.1 μ g/ml. Tripte-

rine also inhibited the proliferation of lymphonodus cells. However, no significant effect was seen on thymus cells. Neither wilforid A nor DOOA showed any effects on the proliferation of mouse lymphocytes.

KEY WORDS tripterine; wilforlid A; 3 β , 22 α -dihydroxy- Δ^{12} -oleanen-29-oic acid; [3 H]thymidine; lymphocytes; mitogens