

雷公藤内酯对 T 淋巴细胞功能的影响¹

蒲丽霞²、张草沐 (河南省医学科学研究所药理室, 郑州 450052, 中国)

Effects of triptolide on T lymphocyte functions in mice¹

PU Li-Xia², ZHANG Tan-Mu (He-nan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT Triptolide (Tri) is an active principle of *Tripterygium hypoglaucum* Hutch, which has been used to treat cancers and autoimmune diseases in folk medicine. The lymphocyte proliferation (LP) induced by Con A or Lipopolysaccharide (LPS) was suppressed by Tri at 50 and 500 ng/ml. At 5 ng/ml the suppressive effect on LP induced by Con A was much stronger than that by LPS. The humoral immune reaction monitored by quantitative hemolysis spectrophotometry (QHS) was suppressed by Tri 0.75 and 1 mg/kg ip. IL-2 production by mouse spleen cells were suppressed by Tri 5, 50, 500 ng/ml *in vitro* and 0.5, 0.75 and 1 mg/kg ip. IL-2 activity was assayed by assessing its ability to support proliferation of selected IL-2-dependent T cell line, measured by colorimetric method which is based on the ability of viable cells to cleave MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide). Ts cells induced by supraoptimal immune (SOI) were suppressed by Tri 0.5 and 0.75 mg/kg ip. These results suggest T or its subpopulations and B lymphocytes may be the target cells of Tri.

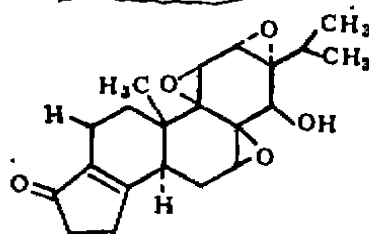
KEY WORDS triptolide; T lymphocytes; hemolysis; spectrophotometry; interleukin 2; immunosuppression

摘要 用 quantitative hemolysis spectrophotometry 法和 MTT 法研究雷公藤内酯(Tri)对小鼠 T 细胞功能的影响。Tri 0.75, 1 mg/kg ip 明显抑制抗体产生和分泌; 0.5, 0.75 mg/kg 抑制 Ts 细胞活化; 50, 500 ng/ml 明显抑制 T、B 细胞增殖反应; 5 ng/ml 仅对 T

细胞增殖反应有明显抑制作用; 5, 50, 500 及 0.5, 0.75, 1 mg/kg ip 均对 IL-2 产生或其活性有明显抑制作用。

关键词 雷公藤内酯; T 淋巴细胞; 溶血; 分光光度测定法; 白细胞介素 2; 免疫抑制

雷公藤属植物昆明山海棠(*Tripterygium hypoglaucum* Hutch)在民间用于治疗肿瘤和类风湿性关节炎等。我室已证实从中提取到的雷公藤内酯(triptolide, Tri)对 L 615 白血病有明显疗效, 不仅可使部分小鼠长期存活, 而且可使长期存活小鼠经数次攻击而不引致白血病, 并明显抑制小鼠溶血素反应⁽¹⁾。雷公藤对体液及细胞免疫均有抑制作用⁽²⁾, 但迄今未见有关从淋巴细胞亚群水平研究 Tri 的报道。本文报道 Tri 对抗体产生和分泌、对 T 和 B 细胞增殖反应及对 Th 和 Ts 细胞的影响, 以便进一步了解 Tri 的抗肿瘤及治疗自身免疫性疾病的作用机理, 为临床合理用药提供理论依据。



Triptolide

MATERIALS

雷公藤内酯(中国科学院昆明植物所); Con A(美国 Sigma 公司); Lipopolysaccharide (LPS, 美国 Difco Lab); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium(MTT, 瑞士 Fluka)。将 MTT 按 5 mg/ml 溶解于磷酸缓冲液(phosphatic buffer solution, PBS)中, 过滤除菌后 4 °C 避光保存; 异丙醇(上海试剂一厂); 2-巯基乙醇(上海试剂四厂); 小牛

Received 1989 Jan 17 Accepted 1989 Jul 25

¹ The abstract was accepted as a poster by the 4th International Conference on Immunopharmacology in Osaka, Japan on 1988 May 15-19.

² Now in Department of Pharmacology, Henan Institute of Ophthalmology, Zhengzhou 450052, China

血清(天津市生化制品厂); CTLL 细胞株(本院微生物教研室); C₅₇BL/6 小鼠和 BALB/c 小鼠(本院动物繁殖中心)。Hank's solution 与常规配方基本相同, 其中含 10% 灭活小牛血清, 且去除酚红, 用等 mol/L 的葡萄糖代之, 以消除其在波长为 413 nm 处及其附近的吸收峰, 调 pH 7.2-7.4。

METHODS AND RESULTS

Tri 对抗体生成和分泌的影响 C₅₇BL/6 小鼠 20 只, ♀, 体重 18.3±SD 1.1 g, 随机分组, 采用定量溶血分光光度法 (quantitative hemolysis spectrophotometry, QHS)^(3,4) 测定抗体形成细胞产生和分泌的抗体裂解 sheep red blood cell (SRBC) 而释放的血红蛋白相对含量。ip 5% SRBC 20ml/kg 致敏(d0), 各组 ip 不同剂量 Tri 连续 4d(d0-3)。于 d4 放血处死小鼠取脾脏, 制备 1×10⁷ 个/ml 的脾细胞悬液。将经处理的混合新鲜豚鼠血清用 Hank's solution 以 1:14 稀释。取脾细胞悬液、0.2% SRBC、1:14 处理后的混合新鲜豚鼠血清各 1 ml 混匀, 置 37℃ 水浴 1 h, 2000×g 离心 5 min, 在 721 型分光光度计 413 nm 波长处测其上清液的吸光率(A 值)。结果见 Tab 1。Tri 0.5 mg/(kg·d) 对抗体生成细胞产生和分泌抗体的功能无明显抑制作用; 0.75, 1 mg/(kg·d) 则有明显抑制作用。

Tab 1. Quantitative hemolysis spectrophotometry (QHS) reaction of ip triptolide (Tri) in mice. n=5, $\bar{x}\pm SD$ *P>0.05, **P<0.05.

Triptolide mg/(kg·d) × 4 d	QHS reaction (Absorbance, A)
0	0.36±0.14
0.5	0.33±0.09*
0.75	0.14±0.03**
1	0.11±0.04**

Tri 对淋巴细胞增殖反应的影响 采用 MTT 比色法⁽⁵⁻⁷⁾。C₅₇BL/6 小鼠 3 只, ♀, 体重 20.1±0.2 g, 处死取脾脏, 制备 6×10⁷ 个/

ml 脾细胞悬液。在无菌 40 孔微孔培养板上各孔加入 Con A 或 LPS 溶液 50 μl; 各药组加入相应浓度药物 100 μl; 所有各孔加入脾细胞悬液 50 μl。Con A, LPS 终孔浓度分别为 7.5, 7.8 μl/ml。将培养板置入 5%CO₂ 培养箱, 37℃ 及饱和湿度条件下培养 48 h, 1500×g 离心 5 min, 轻取各孔上清 100 μl, 弃去, 各孔加入 10 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h, 各孔加入 100 μl 酸化异丙醇(含 HCl 40 mmol/L), 充分混匀, 以使细胞代谢 MTT 生成的甲臍(formazan)充分溶解。各孔加入 100 μl 蒸馏水, 空白对照孔加入 200 μl 蒸馏水。用 GXM-201 型酶标分光光度计, 测各样品 A 值。选择测量波长为 570 nm, 参考波长为 630 nm, 以空白对照孔校正零点(加入酸化异丙醇后 0.5 h 内测定)。

1 对 Con A 诱导的淋巴细胞增殖反应的影响 Tri 在浓度为 5, 50, 500 ng/ml 时, 均对淋巴细胞增殖反应有明显抑制作用(Tab 2)。

2 对 LPS 诱导的淋巴细胞增殖反应的影响 在浓度为 50, 500 ng/ml, Tri 对淋巴细胞增殖反应有明显抑制作用。在浓度为 5 ng/ml 无显著抑制作用(P>0.05)(Tab 2)。

Tab 2. Effect of triptolide on lymphocyte proliferation induced by Con A (7.5 μg/ml) and Lipopolysaccharide (LPS 7.8 μg/ml) *in vitro*. n=3, $\bar{x}\pm SD$. *P>0.05 **P<0.05 ***P<0.01.

Triptolide (ng/ml)	Lymphocyte proliferation (Absorbance, A)	
	Con A	LPS
0	0.23±0.03	0.22±0.03
5	0.17±0.02**	0.20±0.03*
50	0.14±0.04**	0.14±0.05***
500	0.12±0.02***	0.11±0.05**

Tri 对 IL-2 产生及其活性的影响 用适量 Con A⁽⁸⁾ 诱生 IL-2。然后用 IL-2 依赖型细胞毒 T 细胞株(cytotoxic T lymphocyte line, CTLL)作为检测细胞, 用 MTT 法检测 CTLL 存活及增殖程度。

1 Tri 体外对 IL-2 产生及其活性的影响
实验用 BALB/c 小鼠 3 只, ♀, 体重 19.2 ± 1.3 g. 处死取脾脏, 制备 1×10^7 个/ml 的脾细胞悬液, 将其与含 2-巯基乙醇, Con A 及不同浓度药物的培养液等容量混匀。在培养板各孔加入 1ml 上述混合悬液, 置上述条件培养 24 h, $3000 \times g$ 离心 20 min, 取其上清液, 即为粗制 IL-2, 置 -20°C 备用。将 CTLL 洗涤 3 次, 每孔加入 2×10^5 个/ml 的 CTLL 细胞悬液和粗制 IL-2 各 100 μl 置上述条件培养 48 h, 用 MTT 法检测。

结果见 Tab 3. Tri 5, 50, 500 ng/ml 均抑制 IL-2 的产生及其活性, 且随剂量增大, 抑制作用增强。

Tab 3. Effect of Tri on IL-2 activity *in vitro* and *in mice*, $\bar{x} \pm \text{SD}$. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) culture supernatant.

Con A ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Triptolide		IL-2 activity (Absorbance, A)	
	ng/ml	mg/(kg·d) $\times 4$ d	<i>In vitro</i> (n = 3)	<i>In vivo</i> (n = 5)
0	0	0	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02
5	0	0	0.36 ± 0.01	0.20 ± 0.02
5	5	0.5	0.17 ± 0.04 ***	0.05 ± 0.01 ***
5	50	0.75	0.06 ± 0.01 ***	0.05 ± 0.01 ***
5	500	1	0.05 ± 0.01 ***	0.05 ± 0.03 ***

2 Tri 体内对 IL-2 产生及其活性的影响
BALB/c 小鼠 20 只, ♀, 体重 18.5 ± 1.1 g, 随机分组, 各组 ip 不同剂量的 Tri, 对照组以生理盐水代之, 连续用药 4 d (d 1-4), 于 d 5 处死小鼠取脾脏 制备 1×10^7 个/ml 的脾细胞悬液, 将其与含有 2-巯基乙醇、Con A 的培养液等容量混合。按上述方法制备粗制 IL-2, 并用 CTLL 细胞为检测细胞检测其活性。结果见 Tab 3. Tri 0.5, 0.75, 1 mg/(kg·d), 均明显抑制 IL-2 的产生及其活性。

Tri 对 Ts 细胞的影响 采用超适剂量免疫法 (supraoptimal immunization)⁽¹²⁾ 诱导鼠 Ts 细胞活性。C₅₇BL/6 小鼠 30 只, ♀, 随机分组, 每组 5 只, 每只 ip 4×10^8 个 SRBC. 用药组

(1) SOI + 环磷酰胺 (cyclophosphamide, CY), 于 SOI 当日 ip CY 50 mg/kg, (2) SOI + Tri 0.5, 0.75 mg/(kg·d) ip, SOI 当日起连续 4 d, d 15 取供体鼠脾脏, 洗涤 2 次, 用生理盐水配成含活细胞 2×10^8 个/ml 的细胞悬液。用此供体脾细胞悬液按 4×10^7 个/只 iv 同系受体鼠 (每组 5 只), 同时 ip 4×10^8 个 SRBC/只受体鼠。d 19 用 QHS 法测定受体鼠脾细胞抗体生成水平。结果见 Tab 4. 接受 SOI 供体鼠脾细胞转输后, 其受体鼠的 QHS 反应明显受到抑制; 接受 SOI + Tri 或 SOI + CY 供体鼠脾细胞转输后, 其受体鼠的 QHS 反应未受到明显抑制。

Tab 4. Effect of Tri and CY (Cyclophosphamide) on supraoptimal immunization (SOI) in mice. $\bar{x} \pm \text{SD}$. *** $P < 0.01$ vs SOI.

Administration	Tri mg/(kg·d) \times d	CY	QHS reaction (A)
Control	0	0	5 0.92 ± 0.06 ***
SOI	0	0	5 0.57 ± 0.24
SOI + Tri	0.5 \times 4	0	5 0.84 ± 0.05 ***
	0.75 \times 4	0	4 0.87 ± 0.18 ***
SOI + CY	0	50 \times 1	5 0.84 ± 0.12 ***

DISCUSSION

本文发现 Tri ip 对抗体产生和分泌有明显抑制作用, 与文献结果⁽¹⁾相符。在适当剂量时, 丝裂原 Con A 主要诱导 T 淋巴细胞增殖, 而 LPS 主要诱导 B 淋巴细胞增殖。Tri 50, 500 ng/ml *in vitro* 对 T 或 B 细胞增殖反应均有明显抑制作用, 而在 5 ng/ml Tri 仅对 T 细胞增殖反应有明显抑制作用, 表明 T 淋巴细胞对 Tri 更敏感, 其机理尚待研究。T 细胞亚群的研究是近年来免疫学的一个重大进展。它们互相联系互相制约, 尤以 Th 及 Ts 细胞的对立统一是正常免疫功能恒定的重要保证。IL-2 是主要由 Th 细胞产生的淋巴因子, Tri ip 及 *in vitro* 均可抑制 IL-2 的产生及其活性, 说明该药可能抑制了 Th 细胞的活性。在供体鼠 Ts 细胞诱导期 ip Tri 0.5, 0.75 mg/kg, 其

受体鼠 QHS 反应未受到明显抑制。推测 Tri 对 Ts 细胞活化过程有抑制作用。以上实验结果提示 T 或 Th、Ts 细胞及 B 细胞均是 Tri 的靶细胞。

REFERENCES

- 1 Zhang TM, Chen ZY, Lin C. Antineoplastic action of triptolide and its effect on the immunologic functions in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1981; 2 : 128
- 2 Zuo DM, Zhang SL. Different effects of triptolide on T and B cell function. *Chin J Immunol* 1986; 2 : 232
- 3 Simpson MA, Gozzo JJ. Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis *in vitro*. *J Immunol Methods* 1978; 21 : 159
- 4 Dijk HV, Bloksma N. Quantification of *in vitro* antibody secretion by immune spleen cells. *Ibid* 1977; 14 : 325
- 5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *Ibid* 1983; 65 : 55
- 6 Zhou DH, Shen YS, Zhao MR. The application of MTT colorimetric assay to measured the proliferation of lymphocytes and the activity of rat/mouse IL2. *Chin J Immunol* 1986; 2 : 39
- 7 Heek K, Reimann J, Kabelitz D, Hardt C, Wagner H. A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2-producing helper T cell frequencies. *J Immunol Methods* 1985; 77 : 237
- 8 Gearing AJH, Johnston AP, Thorpe R. Production and assay of the interleukins. *Ibid* 1985; 83 : 1
- 9 Wang TR, Xing ST, Zhou JH. The effect of polysaccharides and flavonoids of Yin-Yang-Ho (*Epimedium koreanum*) on Ts cells. *Chin J Immunol* 1986; 2 : 74

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Jan; 11 (1) : 79-85

6,7-二甲氧基香豆素对环磷酰胺的毒性及药效学的影响¹

万尧德、郑振源、黄家政、臧其中²、徐嘉红 (四川省中医药研究院中药研究所, 重庆 630065, 中国)

Influence of 6,7-dimethoxycoumarin on toxicity and pharmacodynamics of cyclophosphamide¹

WAN Yao-De, ZHENG Zhen-Yuan, HUANG Jia-Zheng, ZANG Qi-Zhong², XU Jia-Hong (Institute of Chinese Materia Medica, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine and Medica, Chongqing 630065, China)

ABSTRACT When 40 mg/kg of 6,7-dimethoxycoumarin (DMOC) was given (ip) 15 min before sc cyclophosphamide (Cy), the LD₅₀/7 d of Cy would be raised from 166±9 (100-245) to 294±4 (250-346) mg/kg (dose reduction factor

1.78) in Wistar rat. The 7 d survival rate of mice intoxicated by Cy was raised to 26.7%. To give 100 mg/(kg·d) of DMOC for 5 or 24 days, it prevented the chronic toxicity of Cy prolonged the life-span, elevated the 30 d survival rate of rats intoxicated by Cy to 45.3 and 42.5%, respectively. DMOC increased the WBC, weight of thymus and body of rats and mice intoxicated by Cy; raised colony-forming unit and reduced high plasma corticosterone of mice intoxicated by Cy. It also increased the RNA and DNA of bone marrow, liver and spleen. DMOC in combination with Cy did not reduce the antitumor effect of Cy.

KEY WORDS coumarins; 6,7-dimethoxycoumarin; cyclophosphamide; antidotes; survival; DNA; RNA; corticosterone; colony-forming units assay

摘要 sc 环磷酰胺(Cy) 前ig 6,7-二甲氧基香豆素(DMOC) 40 mg/(kg·d)能显著提高大、小鼠7 d的存活率, 大鼠剂量减低系数1.78, 每次ig Cy前(预防)

Received 1988 Apr 25 Accepted 1989 Jul 24

¹ Reported at the 5th Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, Beijing, 1988 Jul 4-8

² Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 630013, China