

·论 著·

枸杞黄颗粒对 MRL/Lpr 狼疮肾小鼠 Th17 细胞的影响及机制研究

汪 卫 于健宁 陶筱娟

摘 要 目的 探讨枸杞黄颗粒对 MRL/Lpr 狼疮肾小鼠 Th17 细胞的影响以及相关机制。方法 正常饲养 C57BL/6 小鼠 8 只为空白对照组, 8~10 周龄 MRL/Lpr 狼疮小鼠 24 只, 随机分为模型组、枸杞黄颗粒治疗组和地塞米松治疗组, 每组 8 只。MRL/Lpr 狼疮小鼠 12 周龄左右开始发病, 分别给予枸杞黄颗粒或地塞米松治疗, 检测各组处理前后 24h 尿蛋白定量、血清 TGF- β 、IL-17 含量、肾脏 RORC mRNA 表达水平。结果 与模型组比较, 地塞米松组和枸杞黄组小鼠治疗后尿蛋白含量明显下降[(245.87 \pm 47.25)mg/L、(333.18 \pm 22.19)mg/L 比(474.69 \pm 48.76)mg/L, P <0.05]; 与空白组比较, 地塞米松组、枸杞黄组 TGF- β 和 IL-17 均升高[TGF- β (262.69 \pm 23.53)ng/L、(352.05 \pm 26.77)ng/L 比(166.12 \pm 36.44)ng/L, P <0.01; IL-17 (265.25 \pm 44.29)pg/mL、(317.33 \pm 46.83)pg/mL 比(172.03 \pm 45.21)pg/mL, P <0.05, P <0.01]; 与模型组比较, 地塞米松组、枸杞黄组 TGF- β 和 IL-17 明显降低[TGF- β : (262.69 \pm 23.53)ng/L、(352.05 \pm 26.77)ng/L 比(593.84 \pm 35.02)ng/L, P <0.01; IL-17 (265.25 \pm 44.29)pg/mL、(317.33 \pm 46.83)pg/mL 比(602.13 \pm 58.30)pg/mL, P <0.01]; 与空白组比较, 模型组肾脏 Th17 细胞比例和细胞数、RORC mRNA 表达量显著上升[Th17 比例 (8.62 \pm 0.77)% 比(0.05 \pm 0.02)%, P <0.01; Th17 细胞数 : (8.62 \pm 0.77) 10^4 /mL 比(0.05 \pm 0.02) 10^4 /mL, P <0.01; RORC mRNA : (11.08 \pm 0.89) 比(1.00 \pm 0.05), P <0.01]; 与模型组比较, 地塞米松组、枸杞黄组肾脏 Th17 细胞比例和细胞数、RORC mRNA 表达显著下降[Th17 比例 (0.15 \pm 0.04)%、(4.06 \pm 0.43)% 比(8.62 \pm 0.77)%, P <0.01; Th17 细胞数 : (0.15 \pm 0.04) 10^4 /mL、(4.06 \pm 0.43) 10^4 /mL 比(8.62 \pm 0.77) 10^4 /mL, P <0.01; RORC mRNA : (3.67 \pm 0.39)、(5.53 \pm 0.49) 比(11.08 \pm 0.89), P <0.01]。结论 枸杞黄颗粒能减少狼疮肾小鼠尿蛋白排出, 调节 Th17 细胞分化, 其机制可能与下调 RORC mRNA 表达有关。

关键词 MRL/Lpr 狼疮小鼠; 系统性红斑狼疮; 枸杞黄; 地塞米松; 肾损伤; Th17 细胞

Effect of Huaiqihuang Granule on Th17 Cells of MRL/Lpr Mice with Lupus Nephritis and Its Underlying Mechanisms WANG Wei, YU jianing, TAO xiaojuan. *Department of Rheumatology, Immune & Nephrology, Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou (310003), China*

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Huaiqihuang(HQH) on Th17 cells of MRL/Lpr mice with lupus nephritis. **Methods** Eight normal 8–10 weeks C57BL/6 mice were fed as blank control group. MRL/Lpr lupus erythematosus mice were randomly arranged to three groups: model group, HQH treated group, dexamethasone (DXM) treated group. After the appearance of clinical symptoms at 12 weeks age, Mrl/lpr mice were treated with HQH or dexamethasone. The levels of 24h urine protein quantitation, TGF- β , IL-17, and RORC mRNA and the proportion of TH17 in CD4+ T cells of each group were detected before and after treatment. **Results** After treatment compared with model group, DXM group and HQH group had decreased 24h urinary protein content(245.87 \pm 47.25mg/L and 333.18 \pm 22.19mg/L vs 474.69 \pm 48.76mg/L, P <0.05); compared with blank group, DXM and HQH groups had increased TGF- β and IL-17(TGF- β : 262.69 \pm 23.53ng/L and 352.05 \pm 26.77ng/L vs 166.12 \pm 36.44ng/L, P <

基金项目 杭州市科技计划项目(No.20140733Q25)

作者单位 杭州市红十字会医院风湿免疫肾内科(杭州 310003)

通信作者 陶筱娟, Tel :13336098114, E-mail 93731496@qq.com

0.01; IL-17: 265.25±44.29pg/mL and 317.33±46.83pg/mL vs 172.03±45.21pg/mL, $P<0.05$); compared with model group, DXM group and HQH group had decreased TGF- β and IL-17 contents TGF- β :(262.69±23.53)ng/L and 352.05±26.77ng/L vs 593.84±35.02ng/L, $P<0.01$; IL-17: 265.25±44.29pg/mL and 317.33±46.83pg/mL vs 602.13±58.30pg/mL, $P<0.01$); compared with blank group, the proportion of Th17 cells and the cell number and renal mRNA expression of RORC in model group significantly increased [the proportion of Th17:(8.62±0.77)% vs (0.05±0.02)%, $P<0.01$; Th17 cell number:(8.62±0.77)×10⁴/mL vs (0.05±0.02)×10⁴/mL, $P<0.01$; RORC mRNA:(11.08±0.89) vs (1.00±0.05), $P<0.01$]; compared with model group, the proportion of Th17 cells and the cell number and the renal mRNA expression of RORC in DXM group and HQH group significantly reduced [the proportion of Th17:(0.15±0.04)% and (4.06±0.43)% vs (8.62±0.77)%, $P<0.01$; Th17 cell number: (0.15±0.04)×10⁴/mL and (4.06±0.43)×10⁴/mL vs (8.62±0.77)×10⁴/mL, $P<0.01$; RORC mRNA:(3.67±0.39) and (5.53±0.49) vs (11.08±0.89), $P<0.01$]. **Conclusion** HQH can decrease the excretion of proteinuria and regulate the differentiation of Th17 cells, which may be related to the down regulation of RORC mRNA expression.

KEY WORDS MRL/lpr lupus mice; systemic lupus erythematosus; huaiqihuang; dexamethasone; renal injury; th17 cells

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种常见而复杂的自身免疫性疾病,主要是因免疫耐受失衡导致的 T 细胞应答失调和 B 淋巴细胞功能亢进,使体内产生和沉积多种自身抗体和免疫复合物,从而引起组织损伤^[1]。研究表明, Th17 细胞数量和/或功能异常与 SLE 发生、发展密切相关^[2-5]。Th17 是一种重要的促炎性细胞,参与自身免疫性疾病,也是其主要致病性细胞^[5-6]。TGF- β 、IL-6 和 IL-23 可促进 Th17 细胞的分化发育^[7]。槐杞黄颗粒是由槐耳菌丝、枸杞子、黄精制成的颗粒剂,具有益气养阴功效。槐杞黄的主要有效成分槐耳富含 PS-T(槐耳菌质多糖),已证实 PS-T 可明显增强机体细胞免疫应答,具有免疫调节、抗肿瘤及抗病毒等功能^[8]。槐耳菌还能诱导免疫调节剂—TH1 类细胞因子^[9-10]。目前 SLE 无特异性的治疗方法。槐杞黄颗粒在系统性红斑狼疮的研究尚无文献报道,其机制也不清楚。本文通过 MRL/Lpr 狼疮小鼠模型,研究槐杞黄颗粒是否是通过其对 Th17 的调节从而起到改善狼疮小鼠肾损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 MRL/lpr 自发系统性红斑狼疮狼疮样模型小鼠 24 只,正常 C57BL/6 小鼠 8 只,雌性 8~10 周龄,购自广东省医学实验动物中心,由国家遗传工程小鼠资源库暨南京大学模式动物研究所提供,实验动物许可证号 SYXK(粤)2008—0002。环境温度稳定于 20~26℃,湿度 40%~70%,采用 10h:14h 昼夜自动循环交替照明。

1.2 药物及试剂 槐杞黄颗粒购自盖天力药业有限公司,地塞米松购自 Sigma, TGF- β 、IL-17 试剂盒购

自慧嘉生物科技有限公司, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自碧云天公司(批号 A0568), IgG 单抗购自 Abcam(批号 Ab6785), C3 单抗购自 Santa cruz(批号 Sc-28294), Anti-Mouse CD3 APC 购自 Biolegend(批号 100235), Anti-Mouse CD8 PE 购自 Biolegend(批号 100707), Anti-Mouse/Rat IL-17A FITC 购自 Ebioscience(批号 11-7177-80), 胎牛血清购自 GIBCO(批号 16000-044), RPMI-1640 购自 Hyclone(批号 SH30809.01B), PMA 购自 Sigma(P1585), 钙离子霉素购自 Solarbio(18800-1mg), Monensin(蛋白转运抑制剂)购自 Beyotime(CAS22373-78-0)。

1.3 仪器 Thermo 公司 Multiskan MK3 型全自动酶标仪, Leica 公司 DM6000B 型荧光显微镜, BD 公司 Accuri C6 型流式细胞仪(flow cytometry, FCM), IMS 图象分析系统, ABI 7300 Real-time PCR 仪器。

1.4 方法

1.4.1 分组及给药 24 只 MRL/Lpr 狼疮小鼠,按随机数字表法随机分为槐杞黄组、地塞米松组和模型组,各 8 只。正常 C57BL/6 小鼠 8 只为空白对照组。MRL/Lpr 狼疮小鼠 12 周龄左右开始发病,槐杞黄组予槐杞黄颗粒 4g/kg 灌胃,每天 1 次;地塞米松组予地塞米松 2.5mg/kg 灌胃,每天 1 次;模型组给予生理盐水灌胃,每天 1 次。各组均连续灌胃 15 天。

1.4.2 24h 尿蛋白检测 考马斯亮蓝(CBB 法)检测 24h 尿蛋白, G250 具有红色和青色两种色调,在游离状态下,呈红色型,一旦与蛋白质结合即变为青色,色素的最大吸收波长从 465nm 转移到 595nm。测定 595nm 处光密度值,即可进行定量。按照试剂盒说明书进行操作。

表 1 RT-PCR 引物

基因	正向引物	反向引物
RORC	5'TGCGACTGGAGGACCTTCTAC 3'	5' GTAGGCCCTGCACATTCTGAC 3'
GAPDH	5'ATCACTGCCACCCAGAAG 3'	5' TCCACGACGGACACATTG 3'

1.4.3 用酶联免疫吸附法(Elisa)测定血清 TGF- β 、IL-17 含量 各组小鼠灌胃结束后,摘取眼球法取各组小鼠外周血,室温血液自然凝固 10~20min,离心 20min 左右(2000~3000rpm/min),仔细收集上清,按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.4 肾单核细胞悬液制备 采用颈椎脱臼法处死小鼠,75%酒精中浸泡 10~15min;无菌分离肾脏,放入 PBS 溶液中清洗 2 遍,然后加入适量培养基,将剪碎后的组织经 200 目滤网过滤,得到肾细胞悬液,加入与细胞悬液等量体积的淋巴细胞分离液,之后将细胞悬液轻轻加到离心管的淋巴细胞分离液上层;离心完毕后吸取中间白膜层即为单个核细胞;培养基进行洗涤 1 次后,用红细胞裂解液去除红细胞,再次用培养基进行洗涤 1 次,重悬后进行细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,接种于 24 孔板中,加入 PMA300ng/mL,200 μ L 和离子霉素 1 μ g/mL,加入 RPMI-1640 至 1000 μ L 充分混匀后,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的培养箱培养 1h,取出后加入浓度为 2 μ mol/L 的蛋白质转运抑制剂莫能菌素 200 μ L,之后放入 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 6h,buffer 洗涤之后离心弃上清,沉淀用 buffer 重悬。

1.4.5 Th17 细胞检测 单核细胞计数后调整细胞浓度为 10^6 /mL。设置 14 个检测管:阴性对照管;同型对照管;CD3 单标管;CD8 单标管;IL-17 单标管;CD3 和 CD8 双标管;CD3+CD8+IL-17 三标管;4 $^{\circ}$ C避光孵育 1~2h。IL-17 单标管和 CD3+CD8+IL-17 三标管进行 3000rpm,10min 离心,弃上清,沉淀用 PBS 溶液洗涤 2 次,洗涤后的细胞沉淀用 0.5mL FIX buffer 重悬,放置 4 $^{\circ}$ C固定 30min;其他检测管可进行上机检测,固定结束后,IL-17 单标管和 CD3+CD8+IL-17 三标管每管分别用 0.5mL Permeabilization and Wash buffer 洗涤两次,洗涤结束后,IL-17 单标管和 CD3+CD8+IL-17 三标管每管分别加入 0.5mL Permeabilization and Wash buffer,放置 4 $^{\circ}$ C破膜 30min;破膜后,IL-17 单标管和 CD3+CD8+IL-17 三标管每管分别加入 IL-17 抗体 5 μ L,4 $^{\circ}$ C避光孵育 1h。流式细胞仪上机检测。

1.4.6 RT-PCR 检测 细胞总 RNA 提取后去除总 RNA 中的 DNA,然后进行反转录。反应程序 37 $^{\circ}$ C,

60min,85 $^{\circ}$ C,5min,4 $^{\circ}$ C,5min;置于-20 $^{\circ}$ C保存。Real-time PCR 扩增反应体系:12.5 μ L SYBRGreen Mix,0.5 μ L 上游引物 F,0.5 μ L 下游引物 R,2 μ L cDNA 模板,总体积 25 μ L;反应程序:95 $^{\circ}$ C,10min;(95 $^{\circ}$ C,15s;60 $^{\circ}$ C,45s) \times 40;(95 $^{\circ}$ C,15s;60 $^{\circ}$ C,1min;95 $^{\circ}$ C,15s;60 $^{\circ}$ C,15s);数据结果采用 ABI Prism 7300 SDS Software 仪器软件分析,结果数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。引物序列见表 1。

1.4.7 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,所有数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 *t* 检验,多组间两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)LSD 法(最小显著性法),*P*<0.05 为差异有统计学意义,并采用 GraphPad Prism 6 软件对结果绘制图。

2 结果

2.1 各组小鼠治疗前后 24h 尿蛋白定量比较 空白对照组、模型组治疗前后尿蛋白含量无显著变化(*P*>0.05),地塞米松组、槐杞黄组小鼠治疗后尿蛋白含量明显下降(*P*<0.01,*P*<0.05),地塞米松组、槐杞黄组小鼠治疗后尿蛋白含量明显低于模型组(*P*<0.05),见表 2。

表 2 各组小鼠治疗前后 24h 尿蛋白含量比较(mg/L $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	治疗前	治疗后
空白组	8	184.66 \pm 18.40	170.61 \pm 25.07
模型组	8	407.45 \pm 79.50	474.69 \pm 48.76
地塞米松组	8	459.63 \pm 31.62	245.87 \pm 47.25 ^{▲▲}
槐杞黄组	8	451.60 \pm 66.44	333.18 \pm 22.19 ^{▲▲}

注:与治疗前比较,▲*P*<0.05,▲▲*P*<0.01;与模型组比较,△*P*<0.05

2.2 各组小鼠血清 TGF- β 、IL-17 含量比较 与空白组比较,模型组、地塞米松组、槐杞黄组小鼠血清 TGF- β 、IL-17 含量显著升高(*P*<0.05,*P*<0.01);与模型组比较,地塞米松组、槐杞黄组小鼠血清 TGF- β 、IL-17 含量显著降低(*P*<0.01),见表 3。

表 3 各组小鼠血清 TGF- β 、IL-17 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TGF- β (ng/L)	IL-17(pg/mL)
空白组	8	166.12 \pm 36.44	172.03 \pm 45.21
模型组	8	593.84 \pm 35.02**	602.13 \pm 58.30**
地塞米松组	8	262.69 \pm 23.53** ^{△△}	265.25 \pm 44.29 ^{△△}
槐杞黄组	8	352.05 \pm 26.77** ^{△△}	317.33 \pm 46.83** ^{△△}

注:与空白组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与模型组比较,△△*P*<0.01

2.3 各组小鼠肾脏 Th17 细胞比例及细胞数比较

与空白组比较 模型组小鼠肾脏 Th17 细胞比例和细胞数显著上升($P<0.01$) ;经地塞米松和枸杞黄颗粒治疗后 狼疮小鼠肾脏 Th17 细胞比例和细胞数显著下降($P<0.01$)。见图 1~2。

2.4 各组小鼠肾脏 RORC mRNA 表达

与空白组比较, 模型组狼疮小鼠肾脏单核细胞维甲酸相关孤儿受体 (retinoic acid related orphan receptor ,RORC) mRNA 表达量显著上升($P<0.01$) 经地塞米松和枸杞黄颗粒治疗后, 狼疮小鼠肾脏单核细胞 RORC mRNA 表达显著下调($P<0.01$) ,见图 3。

3 讨论

SLE 确切的病因及发病机制尚不十分清楚。研究^[11]表明 ,CD4+T 细胞在 SLE 自身免疫反应以及器官损害方面发挥重要作用。调节性 T(regulatory cells ,Treg) 细胞和 Th17 细胞作为特殊的 T 细胞亚群 ,其失衡在 SLE 的发病机制中起到重要的作用。实验^[12]证明 ,Treg 细胞和 Th17 细胞失衡与自身免疫性疾病特别是 SLE 的发生发展密切相关。Treg 细胞在体内外都具有免疫抑制功能, 能够控制免疫应答的强度 ,减轻对机体组织损伤。Treg 细胞通过抑制效应 T 细胞的活化增殖达到机体的免疫耐受和预防自身

免疫性疾病的作。Th17 细胞被认为是一群重要的介导炎症反应的细胞, 是一种特定的 CD4+T 细胞亚群 ,主要是分泌促炎因子 IL-17^[12]。同时也可分泌其他细胞因子如 IL-17F、IL-21、IL-22、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等。IL-17 主要是通过促进中性粒细胞聚集, 诱导细胞释放前炎症因子, 在宿主抗细菌感染免疫中发挥重要作用。而 IL-17 的表达异常与慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病有着密切的关联^[13]。

近年研究表明 ,Th17 细胞在 SLE 的致病过程中发挥重要作用。在狼疮小鼠模型中已证实 ,Th17 细胞与狼疮的发生密切相关。Stanus 等^[14]在 BXD2 狼疮小鼠模型中研究发现, 脾 Th17 细胞数目均异常升高, 分离的初始 CD4+T 细胞在体外培养中更易于分化为 Th17 细胞。2000 年 Wong 等^[15]报道 ,华人 SLE 患者的外周血 Th17 细胞明显升高 ,并和 SLE 疾病活动性指数(SLEDAI)之间呈正相关。Ambrosi 等^[16]报道 ,在狼疮鼠模型和 SLE 患者中的研究表明 Th17 细胞通过分泌前炎症因子 IL-17 使其在推动疾病的进程中发挥着重要作用。本研究通过对 MRL/lpr 自发系统性红斑狼疮模型研究发现, 模型组小鼠 24h 尿蛋白定量下降 ,提示 HQH 能减少狼疮小鼠蛋白尿的排

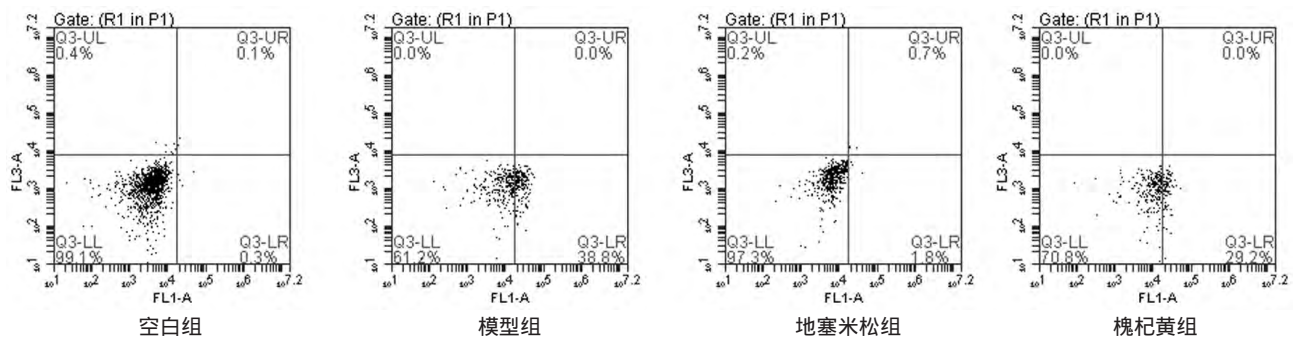


图 1 各组小鼠肾脏 Th17 细胞流式检测结果(CD4+IL-17+标记 Th17 细胞)

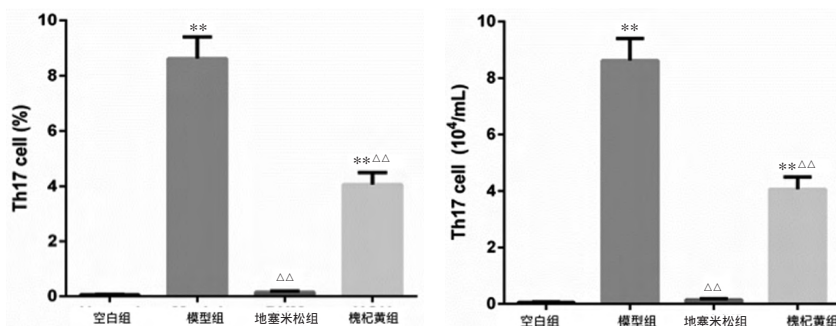


图 2 各组肾脏中 Th17 细胞比例及细胞数

注 :与空白组比较 ,** $P<0.01$;与模型组比较 , $\Delta\Delta P<0.01$

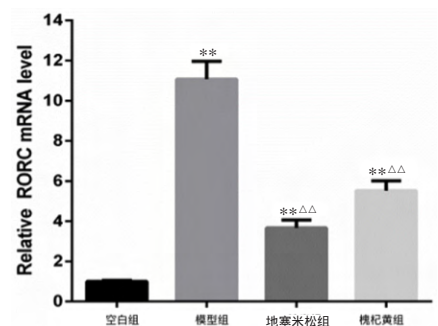


图 3 各组小鼠肾脏单核细胞 RORC mRNA 转录水平

注 :与空白组比较 ,** $P<0.01$;与模型组比较 , $\Delta\Delta P<0.01$

除相比空白对照组,模型组小鼠血清 TGF- β 、IL-17 含量都显著上升($P<0.001$);经地塞米松及枸杞黄颗粒治疗后,小鼠血清 TGF- β 、IL-17 含量不同程度下调($P<0.01$)。说明枸杞黄颗粒能抑制 MRL/lpr 自发系统性红斑狼疮小鼠 TGF- β 表达,从而使得初始 CD4+T 细胞不向 Th17 细胞分化,转而向调节性 T 细胞分化成为可能。同时地塞米松及枸杞黄颗粒治疗后,小鼠血清 IL-17 下降,也证实 CD4+T 细胞向 Th17 分化减少。各组肾脏 Th17 细胞检测结果显示,相比正常组小鼠,未治疗狼疮小鼠肾脏中 Th17 细胞比例和细胞数显著上升($P<0.01$);经地塞米松和枸杞黄颗粒治疗后,狼疮小鼠肾脏 Th17 细胞比例和细胞数显著下降($P<0.01$)。进一步证实,枸杞黄颗粒通过抑制 TGF- β 的表达,从而减少 CD4+T 细胞向 Th17 细胞分化,使得 Th17 细胞比例减少,降低 SLE 疾病活动性指数(SLEDAI),减缓 SLE 的发生。本研究也与武青等^[17]的研究结果一致^[18]。

维甲酸相关孤儿受体是 Th17 细胞的特异性转录因子,调控着 Th17 细胞的分化和发育^[18-19],控制 Th17 细胞效应性细胞因子 IL-17 的表达。Th17 细胞分泌的最主要细胞因子是 IL-17A,在初始 T 细胞内转入编码 RORC 的逆转录病毒可诱导 Th17 细胞分泌 IL-17。研究表明,当小鼠敲除 RORC 基因后,IL-17 表达下降^[19-20],Th17 细胞数量也相应减少^[19]。另外,Th17 与 Treg 细胞的分化成熟分别受其上游转录因子 RORC 及 Foxp3 基因表达水平调控^[21]。初始 T 细胞在 IL-6、TGF- β 以及转录因子 RORC 的参与下能够被诱导分化成 Th17 细胞^[22]。本研究结果表明,狼疮小鼠肾脏单核细胞 RORC mRNA 表达量较空白对照组小鼠显著上升($P<0.01$);经地塞米松和枸杞黄颗粒治疗后,狼疮小鼠肾脏单核细胞中 RORC mRNA 的表达显著下调($P<0.01$)。说明枸杞黄颗粒可以通过抑制 RORC 表达,从而降低其对 CD4+T 向 Th17 的分化趋势,使得 Th17 细胞减少,从而起到对 SLE 的治疗作用。

综上所述,枸杞黄颗粒可以抑制 TGF- β 和 RORC 表达,同时抑制 TGF- β 和 IL-6 联合诱导的 Th17 细胞的分化趋势,降低 Th17 细胞比例,减少 IL-17 表达,减缓 SLE 的发生,减轻 MRL/lpr 自发系统性红斑狼疮小鼠肾脏损害,对系统性红斑狼起到一定的治疗和缓解作用。

参 考 文 献

- [1] La CA.T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus [J].Lupus 2008 ,17(5) :421-425.
- [2] Conti G ,Coppo R ,Amore A.Pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J].2012 ,29 Suppl ,54(5) :S84-90.
- [3] Heo YJ ,Joo YB ,Oh HJ ,et al.IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4 + ,T cell population of rheumatoid arthritis patients[J].Immunol Lett 2010 ,127(2) :150-156.
- [4] Lin FJ ,Jiang GR ,Shan JP ,et al.Imbalance of regulatory T cells to Th17 cells in IgA nephropathy. Scandinavian [J]. J Clin Lab Inv 2012 ,72(3) :221-229.
- [5] Cua DJ ,Sherlock J ,Chen Y ,et al.Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain[J].Nature 2003 ,421(6924) :744-748.
- [6] Brembilla NC ,Chizzolini C.T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells[J].Eur Cytokine Netw , 2012 ,23(4) :128-139.
- [7] Abdulhad WH ,Boots AMH ,Kallenberg CGM.FoxP3+CD4+ T cells in systemic autoimmune diseases :The delicate balance between true regulatory T cells and effector Th-17 cells[J].Rheumatology 2010 ,50(4) :646-656.
- [8] 陈慎宝,丁如宁.槐耳菌质成分对小鼠免疫功能的影响[J].食用菌学报,1995 ,2(1) :21-25.
- [9] 陆慧瑜,张巧玲,蒋小云,等.枸杞黄对 IgA 肾病大鼠蛋白尿及肾组织 nephrin 及 podocin 的影响[J].中华妇幼临床医学杂志(电子版)2009 ,5(5) :458-465.
- [10] 孙楠.枸杞黄颗粒治疗小儿哮喘 60 例临床观察[J].中国现代医生 2010 ,48(2) :36-44.
- [11] Lewis JE ,Fu SM ,Gaskin F.Autoimmunity ,end organ damage and the origin of autoantibodies and autoreactive T cells in systemic lupus erythematosus [J].Discov Med , 2013 ,15(81) :85-92.
- [12] Park H ,Li Z ,Yang XO ,et al.A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J].Nat Immunol 2005 ,6(11) :1133-1141.
- [13] Gaffen SL.Recent advances in the IL-17 cytokine family [J].Curr Opin in Immunol 2011 ,23(5) :613-619.
- [14] Stanus AL.Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice[J].Nat Immunol , 2008 ,9(2) :166-175.
- [15] Wong CK ,Lit LC ,Tam LS ,et al.Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus : implications for Th17-mediated in- (下转第 746 页)

认为 杨梅树皮味苦,性温,功能散瘀止血、止痛,用于跌打损伤、骨折、痢疾、胃、十二指肠溃疡、牙痛、外用治创伤出血、烧烫伤^[8]。药理研究表明,杨梅树皮具有抗氧化、抗炎、抗病毒、免疫调节、清除自由基、抗雄激素活性及抗过敏等生物活性^[9-11]。本课题组前期研究^[4,7,12-13]发现杨梅醇具有很好的抗肿瘤作用。为进一步明确其抗肿瘤活性及构效关系,本研究在前期实验^[4,7,13]确定杨梅醇具有较强抗人肺腺癌 A549 细胞作用的背景下,进一步探究其衍生物 5-氟苄氧基杨梅醇抗肿瘤 A549 作用。并对三个同分异构体 5-对氟苄氧基杨梅醇、5-间氟苄氧基杨梅醇、5-邻氟苄氧基杨梅醇的抗肿瘤作用进行比较筛选,结果表明,5-对氟苄氧基杨梅醇抑癌作用效果最好,在 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,也有较好的抑癌作用,且在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的抑制率高于修饰前的杨梅醇 (CI=95.4%^[4])。但其特异性作用靶点、信号通路及基因调控的确切机制仍有待探索。

参 考 文 献

- [1] Dai G, Tong Y, Chen X et al. In vitro Anticancer Activity of Myricanone in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells [J]. Chemotherapy, 2014, 60(2): 81-87.
- [2] Tong Y, Zhou XM, Wang SJ et al. Analgesic activity of myricetin isolated from Myrica rubra Sieb. et Zucc. leaves [J]. Archives of pharmacal research, 2009, 32(4): 527-533.
- [3] Ting YC, Ko HH, Wang HC et al. Biological evaluation of secondary metabolites from the roots of Myrica adenophora [J]. Phytochemistry, 2014, 103(4): 89-98.
- [4] 戴关海, 童晔玲, 任泽民, 等. 杨梅醇对 A-(549)、HL-60 和 HepG-2 细胞增殖抑制作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(1): 52-54.
- [5] Martin MD, Calcul L, Smith C et al. Synthesis, stereochemical analysis and derivatization of myricanol provide new probes that promote autophagic tau clearance [J]. ACS chemical biology, 2015, 10(4): 1099-1109.
- [6] Zhang J, Yamada S, Ogihara E et al. Biological Activities of Triterpenoids and Phenolic Compounds from Myricacerifera Bark [J]. Chemistry & biodiversity, 2016, 13(11): 1601-1609.
- [7] Dai GH, Meng GM, Tong YL et al. Growth-inhibiting and apoptosis-inducing activities of Myricanol from the bark of Myrica rubra in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Phytomedicine, 2014, 21(11): 1490-1496.
- [8] 《全国中草药汇编》编写组编. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [9] Yang H, Ye X, Sun Y et al. Optimization of extraction of prodelphinidins from bayberry (Myrica rubra Sieb. et Zucc.) leaves [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(10): 2435-2444.
- [10] 刘霞, 戴关海, 童晔玲, 等. 东魁杨梅树皮不同提取物体内抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2015, 22(5): 512-514.
- [11] Tong Y, Zhou XM, Wang SJ et al. Analgesic activity of myricetin isolated from Myrica rubra Sieb. et Zucc. leaves [J]. Archives of pharmacal research, 2009, 32(4): 527-533.
- [12] Dai G, Tong Y, Chen X et al. Myricanol Induces Apoptotic Cell Death and Anti-Tumor Activity in Non-Small Cell Lung Carcinoma In Vitro [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(2): 2717-2731.
- [13] 戴关海, 童晔玲, 任泽民, 等. 杨梅树皮提取物体外抗人肺腺癌 A549 作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 81-82.
- (收稿 2017-04-02 修回 2017-05-24)
- (上接第 743 页) inflammation in auto-immunity [J]. Clin Immunol, 2008, 127(3): 385-393.
- [16] Ambrosi A, Espinosa A, Wahren-Herlenius M. IL-17 a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases [J]. Eur J Immunol, 2012, 42(9): 2274-2284.
- [17] 武青. 槐杞黄颗粒对过敏性紫癜性肾炎大鼠蛋白尿及肾组织 TGF- β 1 表达的影响 [D]. 南京中医药大学, 2015.
- [18] Lee WW, Kang SW, Choi J et al. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor [J]. Blood, 2010, 115(3): 530-540.
- [19] Ivanov II, McKenzie BS, Liang Z et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [20] Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ [J]. Nat Immunol, 2008, 9(6): 641-649.
- [21] Chen Z, Lin F, Gao Y et al. FOXP3 and ROR γ transcriptional regulation of Treg and Th17 [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(5): 536-542.
- [22] Zhou L, Lopes JE, Chong MM et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function [J]. Nature, 2008, 453(7192): 236-240.
- (收稿 2017-05-06 修回 2017-05-16)