

# 源于中药选择性效应的新型免疫抑制疗法

徐 强\* 孙 洋

(南京大学生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

**摘 要** 近年来免疫学的发展日新月异,但与其他系统药物相比,免疫系统药物的发展十分落后。低选择性是现有免疫抑制剂的重要缺陷,这使得需要长期用药的自身免疫性疾病常因药物的严重副作用而使治疗无法持续。因此,免疫系统药物的研制必须另辟蹊径。本文在阐述免疫抑制剂发展现状的基础上,通过本课题组关于中药及其成分的研究结果,提出了选择性抑制活化 T 细胞的免疫抑制新模式,从作用特点、作用机理、代谢产物以及与现有免疫抑制剂的比较等角度论证了选择性免疫抑制的可行性,从而为免疫性疾病的治疗以及新型免疫抑制剂的研制提供新的思路。

**关键词** 选择性免疫抑制 中药 土茯苓 落新妇苷

中图分类号: R282.71; R967 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2009)01-0055-08

## Novel Immunosuppression Stemming from the Selective Activity of Chinese Herbal Drugs

Xu Qiang\* Sun Yang

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract** Despite the marked progress in immunology, the research and development of the remedies for immune diseases really dropped behind those for others. The broad-spectrum inhibition on various cells or tissues is the main problem existing in current immunosuppressive agents. Such low selectivity of the drug effect usually leads to the discontinuity of therapy for patients, who should receive long-term treatment. Thus, a new pathway is required for the discovery of remedies for immune diseases. This review summarizes some results on Chinese herbal drugs and their principles obtained in authors' laboratory after an overview of the current immunosuppressants for comparison. A novel regulation on immune response, selective inhibition of activated T lymphocytes, and its possible application as a selective immunosuppressive therapy are suggested.

**Key words** selective immunosuppression; Chinese herbal drugs; *Rhizoma Smilacis Glabrae*; astilbin

### Contents

- |   |   |
|---|---|
| 1 Introduction                                      | 3 The discovery of novel immunosuppressants from Chinese herbal drugs   |
| 2 The present situation of immunosuppressive agents | 4 The selectively immunosuppressive activity and their mechanisms of the extract from <i>Rhizoma Smilacis Glabrae</i> and its active principle astilbin |
| 2.1 Glucocorticoids                                 | 4.1 The selective inhibition of the extract from <i>Rhizoma Smilacis Glabrae</i> on T cell-mediated immune  |
| 2.2 Cytotoxic agents                                |   |
| 2.3 New generation of immunosuppressive agents      |   |

收稿: 2008 年 10 月(特约)

\*国家自然科学基金重点项目(No. 30230390, 30730107)资助

\*\*通讯联系人 e-mail: qiangxu.nju@163.com

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

response

4.2 Astilbin is the main active principle in the extract from *Rhizoma Smilacis Glabrae*

4.3 The mechanisms underlying the selective immunosuppression of astilbin

4.4 The metabolite of astilbin in vivo

4.5 The other flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae*

5 The prospect

## 1 引言

近年来,免疫学科的发展日新月异,许多功能蛋白、信号转导途径以及分子相互作用机制不断被发现,完善了对免疫体系以及免疫性疾病发病机制的认识。与此同时,药物发现的技术亦日臻完善,包括各种化合物的发现和合成技术的进步,新药物作用靶点的发现,高通量筛选方法的建立、出新和改进,生物信息学技术和计算机技术的应用等,这些进步均对药物发现起到了加速器样作用。但是,必须承认,与其他系统的药物相比,免疫系统药物的发展十分缓慢,这使得免疫性疾病的治疗仍不得不借助于本来并不属于免疫系统的药物,如糖皮质激素、抗癌药物等。

一方面是快速发展的免疫学理论与技术,另一方面则是举步维艰的免疫药物研制,为什么会产生如此矛盾的现象?如何才能化解这种矛盾?在免疫学的双刃剑面前,人们似乎是束手无策。这是因为免疫性疾病(如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等)大多需要长期用药,因而对药物的疗效和安全性应有更高的要求。而以“发病机理——功能蛋白——药物靶点——候选新药”为基轴的新药研究思路在免疫系统面前遇到了极大的障碍,免疫药物的研制不仅缺少理想的靶点,也缺乏可供选择的化学结构信息。

提高药物疗效、降低毒副作用的方法之一是提高药物作用的选择性,无选择的免疫抑制必然会带来严重的毒副作用。对于免疫性疾病的治疗来说,选择性免疫调控是有效且可行的途径,其基本理念是抑制引起免疫性疾病的过剩应答而不影响正常的免疫功能,这就需要选择合适的免疫应答环节或细胞/分子进行调控。但是,免疫应答过程中许多重要的功能分子往往并不能直接用作药物靶点,如何选择合适的切入点调控免疫应答至关重要。多年来,本研究组借助中药及天然产物展开了选择性调控免疫应答的实践,其目的是发现不同于现有药物的选

择性免疫抑制剂,在此基础上寻找一条适合免疫药物研制的新途径。由于许多深层次的研究尚在进行之中,本文仅就已取得的成绩作一初步的小结。

## 2 免疫抑制剂的现状

如前所述,与免疫学的理论和技术迅速发展极不协调的是,免疫系统相关药物的研发却十分滞后,无论是可供选择的药物种类还是其治疗效果均差强人意。众所周知,正常的免疫应答是机体维持自身平衡、抵御外来侵略的主要机制,过剩的免疫应答则会造成各种自身免疫性疾病、过敏及各种炎症反应等。以抑制过剩免疫应答为目的的现有免疫抑制剂,由于其作用对细胞和组织缺乏选择性,往往造成免疫应答的全面抑制,因而产生严重的毒副作用。目前的免疫抑制剂主要有以下几类。

### 2.1 糖皮质激素类免疫抑制剂

糖皮质激素类药物是广为人知且强效持久的抗炎药物,它对哮喘、皮炎、移植排斥等疾病均有良好的治疗作用,也可以用于治疗一些自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。以可的松为代表,在药物被细胞摄取后,药物分子与其在核内的受体结合后,调节许多炎症基因的转录表达,从而使可的松对许多疾病都有广谱的治疗作用。数十年来,通过化学合成和分子修饰的方法,可的松类药物形成了一个庞大的家族,这些在分子结构上大体类似的成员,很多都是临床上的一线治疗药物。然而,在糖皮质激素广谱治疗作用的背后,人们也发现这类药物广泛地干扰了机体各个系统的正常生理过程,用药后的副作用几乎是不可避免的,常导致病人出现骨质疏松、免疫功能下降等症状,有的还会罹患糖尿病和青光眼。广谱治疗作用背后产生的副作用,使得医生给病人使用可的松时不得不谨慎从事,很多病人甚至拒绝使用此类药物,严重时会影响疾病的治疗。

### 2.2 细胞毒类免疫抑制剂

这一类免疫抑制剂的代表性药物如环磷酰胺,最早用于肿瘤的治疗,目前也是治疗系统性红斑狼疮和用于辅助骨髓移植的常用药。其化学结构中的碳正离子和靶分子(如DNA分子)之间的亲电作用是其药理作用的物质基础。环磷酰胺对T细胞和B细胞均有强烈的抑制作用。用药后,患者的主诉症状得到改善的同时,却另外引起脱发、白细胞减少、出血性膀胱炎等新的症状。在有些病人身上,环磷酰胺还会表现出严重的心脏毒性<sup>[2]</sup>。另外还有报道指出,因细胞毒作用和致突变效应,长期使用环磷酰

胺罹患膀胱癌和肾癌的风险较普通人会大大增加<sup>[3]</sup>。这种以巨大毒副作用为代价换来的治疗效果,在实际临床应用中往往难以为继,但由于缺乏理想的药物,人们没有更多的选择余地。

### 2.3 新一代免疫抑制剂

事实上,前两代免疫抑制剂在真正意义上并不属于免疫系统药物。如糖皮质激素属于激素类药物,而环磷酰胺等则是抗肿瘤药物。直至 20 世纪 70 年代末环孢素 A 的问世,是免疫抑制剂研发史上的一个里程碑。环孢素 A 是第一种专为免疫相关疾病而开发的药物<sup>[4]</sup>。在治疗肾移植手术后出现的异体排斥反应中,环孢素 A 与甲氨蝶呤联合使用,可使患者的术后存活率由 50% 上升到 80%,极大地推进了器官移植手术的成熟和发展<sup>[5]</sup>。环孢素 A 是在环孢菌的代谢产物中发现的,其作用特点是主要抑制 T 细胞的活化和增殖,对其他类型的免疫细胞影响较小。这种相对选择性的作用机理是环孢素 A 可以和广泛存在于淋巴细胞胞浆内的环孢素结合蛋白(环亲和素,一种 18kDa 的胞浆蛋白)结合,二者结合后形成的复合体可以抑制钙调蛋白磷酸酶的功能,从而进一步抑制一些在炎症早期被活化的基因(比如 IL-2)的转录,发挥免疫抑制的作用<sup>[6]</sup>。因为环亲和素在不同的组织和细胞中含量存在较大的差异,使得环孢素的作用也具有相对的选择性,其对于富含环亲和素的 T 细胞活化和增殖的抑制作用较其他的免疫细胞要显著得多。这种相对选择性,与糖皮质激素类药物以及环磷酰胺等药物相比,有着较小的毒副作用,从而被广泛地应用于异体移植的排斥反应和一些自身免疫疾病的治疗中。但是,值得注意的是,环孢素 A 对于不同状态的 T 细胞(活化和非活化的)以及 T 细胞介导的所有相关免疫反应的抑制作用并无选择性,因此 T 细胞所担负的机体正常免疫功能也同时受其抑制。此外,其对 B 细胞、巨噬细胞以及肥大细胞等也存在一定的影响<sup>[7-9]</sup>。事实上,在长期使用环孢素 A 的病人身上,常可观察到药物对肾脏和神经系统的毒性,且发生感染性疾病和肿瘤的风险增高。因此,环孢素 A 亦非真正意义上的选择性免疫抑制剂。

分子靶向类免疫抑制剂是近年来发展起来的以抗体类制剂为主的新型免疫抑制剂,包括抗免疫细胞表面分子的抗体,如抗 CD40L 抗体、抗 CD20 抗体等,以及抗细胞因子及其受体的抗体,如抗 TNF- $\alpha$  抗体等。其设计理念是特异性地靶向免疫细胞或免疫应答过程中的关键分子,从而抑制该分子或其所在

细胞的功能,起到特异性的免疫抑制效果,其中一些制剂如抑制 TNF- $\alpha$  的制剂在类风湿性关节炎、克罗恩病上取得了良好的疗效。然而必须指出,这些制剂尽管靶向性很高,但由于免疫系统的特殊性,其对于免疫应答的抑制仍往往是非选择性的:如有报道指出,抗 TNF- $\alpha$  抗体可造成严重的肝损害<sup>[10]</sup>;抗 CD20 抗体可造成 B 细胞的去除,在治疗红斑狼疮取得疗效的同时,一些病例因免疫抑制而引发严重感染<sup>[11]</sup>;又如,抗 CD40L 抗体可引起血栓,抗 CD4 抗体可产生淋巴细胞减少症等副作用<sup>[12]</sup>。2008 年 9 月 4 日,美国 FDA 对治疗类风湿性关节炎和克罗恩病的 4 种 TNF 拮抗剂 Enbrel、Remicade、Humira 和 Cimzia 发出严重警告:这 4 种药可能引起致命的真菌感染,提示与不适当的免疫抑制有关。除生物类制剂外,尚未见小分子化合物作为免疫抑制的分子靶向药物的报道。因此,现有的分子靶向类免疫抑制药物并未实现对免疫应答的选择性抑制作用,与针对肿瘤分子靶向药物相比,免疫系统的分子靶向药物尤其是具有选择性免疫抑制作用的分子靶向药物的研制似乎更为困难。

除此之外,一些用于治疗免疫系统疾病的中药及其提取物,如雷公藤和从中得到的萜类成分雷公藤内酯醇,也因其对免疫细胞和免疫反应的抑制缺乏选择性,在治疗过程中常导致副作用,使其应用受到诸多限制<sup>[13]</sup>。

综上所述,现有的用于治疗免疫系统相关疾病药物,因其作用缺乏选择性,往往具有严重的毒副作用。这不仅限制了药物的临床应用,同时也造成了众多的自身免疫性疾病难治甚至无药可治的现状。

## 3 从中药中发现新型选择性免疫抑制药物

面对免疫性疾病治疗的困境,有必要重新思考免疫抑制剂研制的方法和途径。按常规的药物发现模式,从免疫应答过程中的关键功能分子出发寻找药物迄今收获无多,其原因就在于免疫细胞和免疫分子的双重作用。很显然,对于免疫应答(包括正常免疫应答)的全面抑制并非是我们所希望的,那么能否做到只选择性地抑制在疾病发生发展过程中扮演病理性角色的免疫细胞或分子,而不影响或较少地影响其他正常的免疫细胞呢?

在选择性调控免疫应答理念的指导下,十余年来,我们从一系列清热中药中发现了能选择性地作用于免疫应答不同阶段的中药及其成分,这些中药及成分对迟发型超敏反应(DTH)的不同时相有着选

择性的抑制作用<sup>[14-20]</sup>。DTH 是一种主要由 T 细胞介导的细胞免疫反应,根据抗原的致敏和攻击,可分为诱导相和效应相两个阶段,分别对应于 T 细胞的活化过程以及活化 T 细胞发挥效应的过程。我们发现,方剂四逆散、单味中药蒺藜和结血蒿等主要对 DTH 的诱导相有抑制作用,而对 DTH 的效应相无影响;苦参、地肤子、赤芍、土茯苓和白鲜皮等则主要作用于 DTH 的效应相,而对诱导相无显著影响;与此

相对照的是,氢化泼尼松和环孢素 A 对 DTH 的诱导相和效应相均有显著的抑制作用。因此,表 1 所列的中药,其抑制模式有所不同,体现了对免疫应答不同阶段的选择性,这种选择性显然是现有免疫抑制剂所不具备的。此外,我们的研究还发现,联合使用分别抑制 DTH 反应诱导相(蒺藜、二妙散)和效应相(土茯苓、白鲜皮)的中药,可以起到协同的治疗效果<sup>[21]</sup>。

表 1 一些中药及免疫抑制剂对迟发型变态反应及炎症反应的抑制作用

Table 1 Inhibition of delayed-type hypersensitivity (DTH) and inflammation by some kinds of herbal drugs and immunosuppressive agents

drug	induction phase of DTH	effector phase of DTH	inflammation
<i>Fnctus Tribuli</i> (蒺藜)	++	-	-
Si-Ni-San (四逆散)	++	-	-
<i>Herba Artemisiae Vestitae</i> (结血蒿)	++	±	++
<i>Radix Gentianae</i> (龙胆)	++	+	-
Er-Miao-San (二妙散)	++	+	-
<i>Radix Sophorae Flavescentis</i> (苦参)	-	++	ND
<i>Fnctus Kochiae</i> (地肤子)	-	++	ND
<i>Radix Paeoniae Rubra</i> (赤芍)	-	++	ND
<i>Rhizoma Smilacis Glabrae</i> (土茯苓)	-	++	++
<i>Cortex Dictamnii</i> (白鲜皮)	-	++	++
prednisolone/cyclosporin A	+++	+++	+++

+++; very strong; ++; strong; +; mild; ±; tendency; -; no effect; ND; not done

从以上结果可以看出,在 DTH 反应中,一些中药可以选择性地抑制 T 细胞的活化,而另一些则选择性地抑制活化后 T 细胞的功能,这些特点为开发选择性的免疫抑制剂提供了新的方向。为了进一步阐述这些中药作用的化学基础和选择性免疫抑制的分子机理,我们在此基础上进行了更为深入的研究。限于篇幅,本文将重点介绍可抑制活化 T 细胞功能的中药土茯苓及其主要活性成分落新妇苷的一些研究进展。

#### 4 土茯苓及其活性成分落新妇苷的选择性免疫抑制活性及其机理

##### 4.1 土茯苓对 T 细胞免疫应答的选择性抑制作用

土茯苓为百合科植物光叶菝葜(*Smilax Glabra* Roxb.)的干燥根茎,是一种常用的清热中药,为历代本草及中国药典收藏,具有除湿、解毒、通利关节等功效,用于治疗湿热淋浊、带下、痈肿、瘰疬、疥癣、梅毒及汞中毒所致的肢体拘挛、筋骨疼痛。现代药理实验表明土茯苓具有抗菌、抑制肿瘤细胞增殖、保护

肝细胞及心血管系统等多种活性。

我们的研究发现,土茯苓的水提物可显著抑制细胞免疫而不影响体液免疫,提示土茯苓水提物可能选择性作用于 T 淋巴细胞。于 DTH 的效应相给药,土茯苓水提物可以抑制 2, 4, 6-三硝基氯苯(picryl chloride)所致的小鼠接触性皮炎和绵羊红细胞所致的小鼠足跖肿胀<sup>[19]</sup>。在 picryl chloride 所致的 DTH 机制引发的肝损伤模型中,土茯苓水提物对肝细胞本身并无保护作用,但可通过诱导浸润至肝脏的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的凋亡,从而抑制 T 细胞对肝细胞的杀伤作用<sup>[22]</sup>。

大鼠佐剂性关节炎是由 T 淋巴细胞介导的以关节软骨损伤为特点的炎症反应。鉴于土茯苓临床上多用于类风湿性关节炎的治疗,我们在此模型上考察了其作用。结果发现,土茯苓水提物 200、400 和 800mg/kg 口服给药可剂量依赖性地抑制致炎足的肿胀,其中 400 和 800mg/kg 组的肿胀几乎得到完全的抑制,与 10mg/kg 的氢化泼尼松肌内注射的作用相当。进一步研究发现,土茯苓水提物对于大鼠佐剂

关节炎的后期继发炎症反应(佐剂非注射足)也具有显著的抑制作用,这种继发炎症通常由 T 淋巴细胞介导,表明土茯苓水提取物对 T 细胞介导的免疫炎症具有抑制活性。与此同时,对于炎症后期动物体重的下降、淋巴细胞的增殖能力以及产生 IL-2 能力的下降,土茯苓水提取物均有显著的恢复作用,而氢化泼尼松则显示了进一步的抑制作用。土茯苓水提取物可抑制腹腔巨噬细胞产生 IL-1、TNF 以及 NO 的活性,还可通过调节 CD4/CD8 细胞的比值调控免疫反应。这些结果提示土茯苓水提取物通过下调过度活化的巨噬细胞活性,上调炎症后期低下的 T 细胞功能而发挥抗慢性炎症的功能,这一特点对于慢性炎症疾病的长期治疗意义十分重大<sup>[23]</sup>。此外,土茯苓水提取物对于巴豆油所致炎症、角叉菜胶引起的炎症反应以及棉球肉芽肿试验均有显著的抑制作用,提示该水提取物兼有抑制 T 细胞和抗炎活性。必须强调指出的是,与氢化泼尼松不同,土茯苓水提取物对胸腺、肾上腺、脾脏重量及肾上腺中维生素 C 的含量均无影响,提示其具有较低的毒副作用<sup>[24]</sup>。

这些实验结果表明,土茯苓水提取物可直接作用于 DTH 反应的病理性 T 细胞,而对正常 T 细胞无影响。这一独特的作用特点使其具有现有免疫抑制药物不具备的优势,也促使我们对其选择性作用于病理性 T 细胞的机理及其物质基础展开深入的探讨,从而发现了选择性抑制活化 T 细胞这一崭新的作用模式。

#### 4.2 落新妇苷——土茯苓选择性免疫抑制作用的主要化学基础

表 2 落新妇苷与环孢素 A 免疫抑制模式的比较

Table 2 Comparison of the immunosuppressive patterns between astilbin and cyclosporin A

item	astilbin	cyclosporin A
collagen or adjuvant-induced arthritis	inhibition rate > 80%	inhibition rate > 80%
DTH reaction	inhibition in effector but not induction phase	inhibition in both effector and induction phases
selectivity of the effect on T cells	inhibition only on activated Th1 cells	inhibition on both activated and naive T cells
IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, etc	inhibition	inhibition
endogenous IL-10 production	enhancement	no effect
naive lymphocytes	no effect	inhibition
T cell proliferation	no effect	inhibition
humoral immunity	no effect	inhibition
body and organ weights	no effect	inhibition

#### 4.3 落新妇苷选择性免疫抑制作用的机理

落新妇苷发挥选择性免疫抑制的机理之一是可选择性诱导活化的 T 细胞凋亡而不影响正常的 T 细胞。于效应相给药对于 DTH 机制所引起的肝损伤能显著降低血清转氨酶活性、改善炎细胞浸润和肝

为进一步阐述土茯苓选择性免疫抑制作用的物质基础,我们从其水提取物中分离得到了一系列化合物<sup>[25-27]</sup>,主要为黄酮类化合物。其主要成分落新妇苷(astilbin)表现出和土茯苓水提取物相似的选择性免疫抑制效果。在 DTH 效应相给药,落新妇苷可显著抑制接触性皮炎、胶原性关节炎以及免疫性肝损伤<sup>[28-31]</sup>。值得强调的是,虽然落新妇苷和环孢素 A 都对胶原性关节炎有着类似的治疗效果(包括在组织学指标上的抑制关节肿胀、减少软骨损伤和关节腔内的滑液增生等),但是环孢素 A 在显示强大抗炎作用的同时明显降低了动物的体重,而落新妇苷则对体重无明显影响。比较研究的结果亦提示落新妇苷的作用环节可能有别于环孢素 A,并且具有更高的选择性。

结合我们的前期研究结果,落新妇苷选择性免疫抑制作用的特点可概括以下几个方面:选择性地抑制疾病的效应阶段而不影响诱导阶段;选择性地抑制活化 T 细胞而不影响正常 T 细胞及其他组织细胞;选择性抑制活化的 Th1 细胞而不影响 Th2 细胞。这样作用特点的药物或化合物迄今未见其他报道,其潜在的临床意义值得进一步关注。事实上,表 2 直观地比较了落新妇苷和环孢素 A 作用特点的异同。简言之,落新妇苷因其选择性免疫抑制作用区别于全面抑制 DTH 各时相以及 Th1 和 Th2 细胞的环孢素 A,有理由期望在取得同样治疗效果的同时,可避免相应的不良反应,从而为慢性免疫性疾病的长期用药提供可能。

细胞坏死等肝组织病理改变,但于诱导相给药无影响。前期研究已证明该肝损伤模型主要系抗原诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生并浸润至肝组织,通过细胞黏附分子与肝细胞相互作用杀伤肝细胞,CD4<sup>+</sup> T 细胞是其 主要效应细胞。在体外试验中观察到肝非实质细胞

(主要为 CD4<sup>+</sup> T 细胞)可杀伤肝细胞,事先用落新妇苷处理非实质细胞可浓度、时间依赖性地抑制非实质细胞杀伤肝细胞的能力,但是处理肝细胞则无影响,这一结果与体内给药后血清的转氨酶水平的变化相一致。此外,落新妇苷对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤无保护作用,提示其改善免疫性肝损伤并非通过保肝作用,而系通过抑制造成肝损伤的效应细胞——T 细胞的功能。进一步发现,落新妇苷能诱导肝非实质细胞中的 T 淋巴细胞的凋亡<sup>[28]</sup>。

为了验证这一选择性的作用特点,我们进一步考察了 T 细胞的活化与落新妇苷诱导 T 细胞凋亡的关系<sup>[32]</sup>。用植物凝集素 (PHA) 刺激 Jurkat T 细胞 72—144h 后,在细胞培养上清中检测到了 IL-2 的产生,提示细胞被活化,IL-2 产生的动态变化与落新妇苷诱导细胞凋亡的作用相一致,即落新妇苷的作用与细胞的活化程度成正比。而对非活化的细胞,落新妇苷则无诱导凋亡作用。与 PHA 同时加入环孢素 A 处理细胞显著地降低了 IL-2 的产生,同时也抑制了落新妇苷诱导凋亡的作用。在 PHA 活化 72h 后加入外源性的 IL-2 明显增强了细胞对落新妇苷的敏感性。以上结果表明,落新妇苷对 T 细胞的作用依赖于特定的细胞活化状态,即选择性地作用于活化的 T 细胞。

进一步研究证实,落新妇苷诱导活化 T 细胞凋亡的分子机制系通过线粒体途径,包括开启线粒体膜上的电压依赖性阴离子通道、倒塌线粒体跨膜电位、释放细胞色素 c 以及促进 caspase 级联反应等。

细胞因子负调控则是落新妇苷发挥选择性免疫抑制作用的另一环节。IL-10 是已知的炎症反应负调节因子,但外源性 IL-10 的临床应用受到一定的限制,而药物诱导内源性的 IL-10 从而改善炎症反应的报道很少。我们的研究发现,落新妇苷能在迟发型超敏反应的早期显著地诱导 IL-10 的表达,并在后期降低 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达,在体外试验中也得到了同样的结果。用抗 IL-10 抗体静脉注射中和血中的 IL-10 则使落新妇苷抑制迟发型超敏反应的作用显著受阻,表明落新妇苷抑制迟发型超敏反应的作用与诱导 IL-10 有关。进一步发现,落新妇苷能显著增加 IL-10 下游的信号分子细胞因子信号转导抑制蛋白 (SOCS)-1 和 3 的表达,而环孢素 A 虽能显著抑制上述炎症细胞因子的表达,但对 IL-10 及其下游的 SOCS-1 和 3 的表达均无影响<sup>[33]</sup>。

#### 4.4 落新妇苷的体内过程及代谢产物

落新妇苷独特的选择性免疫抑制作用对于免疫

性疾病的治疗具有重要的意义,阐明其体内过程等药代动力学特性及其在体内的活性形式,对于了解落新妇苷的体内作用,指导临床用药等均具有重要意义。我们通过用大鼠肝微粒体酶处理落新妇苷,分离到了落新妇苷的代谢产物,经质谱、核磁共振等鉴定了其结构为 3'-O-甲基落新妇苷<sup>[34]</sup>。这既是首次发现的落新妇苷的代谢产物,其本身也是一个新化合物。进一步将落新妇苷给大鼠灌胃,采取血液和尿样均证实了该代谢产物的存在。我们通过提取细胞微粒体,在体外制备得到了代谢产物的高纯度样品,发现和药物原型比,代谢物同样具有相同的药理活性,这为明确药物体内过程和药物疗效之间的关系打下了基础。同时,此类代谢反应在黄酮类化合物之中较为罕见,落新妇苷不同于其他黄酮类化合物在体内常被水解成糖和苷元而代谢清除的特性,可能是由于其带的鼠李糖难以被水解的缘故,一般以全苷的方式发挥作用和清除。这种代谢上的与众不同也提示我们,其结构特点和其选择性免疫抑制效果是密切相关的,通过建立这类分子及其代谢产物的化学样品库<sup>[35]</sup>,进而深入研究药物衍生物的构效关系,亦可为选择性免疫调控的研究提供有价值的小分子探针。

#### 4.5 土茯苓中的其他黄酮苷类化合物

我们从土茯苓中分离得到了落新妇苷的若干类似物,包括: engeletin、dihydroxyquercetin、eucryphin、resveratrol<sup>[25]</sup> 以及 5 个非黄酮苷类新化合物 smiglaside A—E 等<sup>[29]</sup>。进一步利用这些化合物探讨了对免疫性肝损伤的影响,并从中分析了构效关系,证实该类化合物能抑制肝浸润 T 淋巴细胞杀伤肝细胞的能力,其结构中的 3 位鼠李糖对于其作用的发挥至关重要,而 2 位的苯环可能增加位阻影响其活性的发挥。这些化合物的获得及其活性的阐明不仅有助于阐明土茯苓的作用,也有利于土茯苓制剂的质量控制<sup>[25]</sup>。

同时,我们建立了一个简便的检测家兔血浆中落新妇苷的 HPLC 方法,其在血浆中的检测范围为 0.44—22.17 $\mu$ M,最低检测浓度为 0.44 $\mu$ M。并在家兔上进行了落新妇苷静脉注射和口服给药的药代动力学研究<sup>[36]</sup>。此外,还建立了同时检测土茯苓中 5 个黄酮类化合物的 HPLC 方法,这 5 个化合物分别是: taxifolin、neoastilbin、astilbin、neoisoastilbin 和 isoastilbin,在 Lichrospher C18 柱获得了最佳分离和检测条件。该方法的建立将有助于土茯苓及其制品的质量控制<sup>[37]</sup>。

## 5 展望

免疫抑制疗法的维持是关乎免疫性疾病治疗成败的一个关键问题, 因为免疫性疾病大多缠绵难愈, 需要长期甚至终身服药, 现有免疫抑制剂常因毒副作用而不得不中途停药, 从而引起病情的反复甚至恶化。免疫抑制剂产生毒副作用的主要原因是其作用缺乏选择性, 因而极大地限制了其临床应用。免疫应答的两面性决定了现有免疫抑制剂的非选择性作用模式的极限, 这也是迄今为止免疫学在功能蛋白分子方面进展迅速却很少能为免疫药物研制贡献可供调控靶点的原因之一; 同时, 作为免疫药物候选的化合物结构信息也十分缺乏。这些限制和不足限制了免疫系统药物的研发进程, 或者说, 目前的新药研发模式在免疫药物的研究中较难期待取得新的突破。因此, 调控免疫应答必须另辟蹊径。毋庸置疑, 选择性是免疫抑制疗法的重要发展方向, 高选择性的免疫抑制剂应具备一些基本的特点, 包括对于疾病特定病理环节或特定细胞亚群及相关信号通路分子的选择性等, 从而期待更高的疗效和更低的副作用。在选择性免疫调控理念的指导下, 我们进行了不同于现有免疫药物发现方式的探索研究, 从清热中药中发现了一些能选择性地作用于疾病不同病理阶段以及不同细胞亚群的药物和成分, 尤其需要强调的是, 这些药物和成分的作用特点都是现有免疫抑制剂所不具备的, 对于相关疾病的治疗具有十分重要的意义。

必须指出, 选择性免疫抑制疗法的研究还须经历非常漫长的过程。通过已经发现的具有选择性免疫抑制作用的小分子化合物, 一方面探讨其作为新型免疫抑制剂治疗免疫性疾病的可能性, 另一方面通过阐明其靶蛋白发现 T 细胞免疫应答的新调控机制, 从而将选择性免疫调控理念从分子基础到治疗应用付诸更深层次的实践。

致谢: 关于选择性免疫抑制的系列研究得到了国家自然科学基金重点项目 (No. 30230390, 30730107)、面上项目 (No. 30070876, 30472174, 20572043, 30672472) 和国家杰出青年科学基金 (No. 39925041), 以及江苏省自然科学基金 (No. BK2002084, BK2003206) 和教育部重大项目培育资金项目 (No. 706026) 等资助。实验室多位老师和研究生参与了该研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Allison A C. *Immunopharmacology*, 2000 47(2/3): 63—83
- [ 2 ] Sitzia J, Huggins L. *Cancer Pract.*, 1998, 6(1): 13—21
- [ 3 ] Travis L B, Curtis R E, Adami J, et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, 87(7): 524—530
- [ 4 ] Caine R Y, Rolles K, Lewis P, et al. *Lancet*, 1979, 2(8151): 1033—1036
- [ 5 ] Kolata G. *Science*, 1983, 221: 40—42
- [ 6 ] Handschumacher R E, Harding M W, Speicher D W, et al. *Science*, 1984, 226(4674): 544—547
- [ 7 ] Andersson J, Nagy S, Andersson U, et al. *Immunology*, 1992 75 (1): 136—142
- [ 8 ] Williams C M, Coleman J W. *Immunology*, 1995, 86(2): 244—249
- [ 9 ] Tsai E Y, Yie J, Goldfeld A E, et al. *Mol. Cell Biol.*, 1996 16 (10): 5232—5244
- [ 10 ] Garcia Aparicio A M, Rey J R, Alvarez J S, et al. *Clin. Rheumatol.*, 2007, 26(5): 811—813
- [ 11 ] El-Hallak M, Binstadt B A, Sundel R P, et al. *J. Pediatr.*, 2007, 150(4): 376—382
- [ 12 ] Danese S, Semeraro S, Gasbarini A, et al. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2006 6(7): 771—784
- [ 13 ] Chang D M, Chang W Y, Chang M L, et al. *J. Rheumatol.*, 1997, 24(3): 436—441
- [ 14 ] 徐强(Xu Q), 赵红(Zhao H), 杭秉茜(Hang B Q). *中国药科大学学报(J. Chin. Pharm. Univ.)*, 1991, 22: 12—16
- [ 15 ] 徐强(Xu Q), 陈婷(Chen T), 朱梅芬(Zhu M F)等. *中国免疫学杂志(Chin. J. Immunol.)*, 1993, 9: 244—245
- [ 16 ] 徐强(Xu Q), 王蓉(Wang R), 徐丽华(Xu L H)等. *中国免疫学杂志(Chin. J. Immunol.)*, 1993, 9: 39—42
- [ 17 ] 王蓉(Wang R), 徐强(Xu Q), 杭秉茜(Hang B Q)等. *中国药科大学学报(J. Chin. Pharm. Univ.)*, 1992 23: 234—238
- [ 18 ] 徐强(Xu Q), 王蓉(Wang R), 余伯阳(Yu B Y). *中国药科大学学报(J. Chin. Pharm. Univ.)*, 1993, 24: 98—101
- [ 19 ] 徐强(Xu Q), 徐丽华(Xu L H). *中药药理与临床(Pharmacol. Clin. Chin. Mat. Med.)*, 1993 9(5): 25—26
- [ 20 ] 徐强(Xu Q), 赵红(Zhao H), 王蓉(Wang R). *中药药理与临床(Pharmacol. Clin. Chin. Mat. Med.)*, 1993, 9(4): 30—33
- [ 21 ] Xu Q, Yuan K, Lu J, et al. *Pharmacol. Res.*, 1997, 36: 401—409
- [ 22 ] Xu Q, Cao J, Wu F, et al. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 2000, 6: 41—47
- [ 23 ] Jiang J, Xu Q. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 85(1): 53—59
- [ 24 ] Jiang J, Wu F, Xu Q, et al. *Pharmacol Res.*, 1997, 36: 309—314
- [ 25 ] Chen T, Li J X, Namba T, et al. *Planta. Med.*, 1999, 65(1): 56—59
- [ 26 ] Chen T, Li J X, Xu Q. *Phytochemistry*, 2000, 53(8): 1051—1055
- [ 27 ] Chen T, Li J X, Xu Q, et al. *Chin. Chem. Lett.*, 2002, 6: 537—538
- [ 28 ] Xu Q, Wu F, Koda A, et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 1999 377: 93—100
- [ 29 ] Cai Y, Chen T, Xu Q. *Inflamm Res.*, 2003, 52(8): 334—340

- [30] Cai Y, Chen T, Xu Q. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003, 55: 691—696
- [31] Wang J, Zhao Y, Xu Q. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, 56: 495—502
- [32] Yan R, Xu Q. *Pharmacol. Res.*, 2001, 44: 135—139
- [33] Fei M, Wu X, Xu Q. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, 116(6): 1350—1356
- [34] Guo J M, Qian F, Chen T. et al. *Clin. Chem.*, 2007, 53(3): 465—471
- [35] Yang X L, Sun Y, Xu Q. et al. *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4(12): 2483—2491
- [36] Guo J M, Xu Q, Chen T. *J. Chromatography B*, 2004, 805: 357—360
- [37] Chen L, Yin Y, Yi H. et al. *J. Pharmaceutical Biomed. Anal.*, 2007, 43: 1715—1720

## 《化学进展——环境化学专辑》目次预告

我国酸沉降的研究进展(王文兴)

大气污染物研究进展(朱彤)

大气二次细颗粒物形成机理的前沿研究(叶兴南 陈建民)

大气持久性有机污染物(POPs)被动采样研究进展(张千 刘向)

活性卤素化学研究进展(葛茂发 马春平)

环境内分泌干扰物的定量结构-活性相关研究(季力 高士祥 王晓栋 张爱茜 王连生)

环境内分泌干扰物毒理学研究(史熊杰 刘春生 余珂 邓军 余丽琴 周炳升)

生态风险评估理论和方法进展(雷炳莉 黄圣彪 王子健)

PBDEs 研究的最新进展(罗孝俊 麦碧娴 陈社军)

全氟化合物环境问题研究新进展(史亚利 潘媛媛 王杰明 蔡亚歧)

多氯萘的研究(郭丽 巴特 郑明辉)

环境中的医药品与个人护理品(PPCPs)(贾琰 胡建英 孙建仙 施嘉琛)

新型污染物多溴联苯醚和氰尿酸的光化学降解(赵丹 孙春燕 陈春城 马万红 赵进才)

纳米异质结光催化材料在环境污染控制领域的研究进展(于洪涛 全燮)

膨润土吸附材料在有机污染控制中的应用(朱利中 陈宝梁)

碳纳米材料的细胞生物效应(李炜 赵峰 陈春英 赵宇亮)

环境汞污染研究进展(冯新斌 仇广乐 付学吾 何天容 李平 王少锋 李仲根 商立海)

砷的生物地球化学行为(胡立刚 蔡勇)

砷形态分析(苑春刚 X. Chris Le)

砷的生物监测与代谢机制(X. Chris Le)

体内和体外生物测定在环境监测中的应用(Margaret B. Murphy 林忠华 林群声)

环境污染物的免疫传感检测方法进展(韦明元 郭良宏)

DNA 加合物检测(冯峰 王超 吕美玲 汪海林)

环境污染物的自由溶解态浓度与生物有效性(胡霞林 刘景富 卢士燕 江桂斌)

环境污染物的光催化降解:活性物种与反应机理(许宜铭)

芳香族硝基化合物的微生物降解(滕少香 盛国平 刘贤伟 王曙光 俞汉青)

稳定同位素表征有机物甲烷化代谢动力学(何品晶 吕凡 邵立明 章骅)

电子垃圾的污染问题(彭平安)

污染土壤修复技术进展(骆永明)

环境净化中的微生物生态学(张昱 王振宇 杨敏)