

选择性抑制活化 T 淋巴细胞的功能 ——从中药及其成分中发现的崭新作用模式

徐 强

(南京大学 生命科学学院 生化系,江苏 南京 210093)

0 引言

新药发现的关键目标之一是新药的新作用特点。我国目前新药研究中,多数以仿制或跟踪性创新为主,且多集中在疾病机理相对清楚,既有药物种类较多的疾病;而对于许多难治性疾病,由于病理机制不明且缺少基本药物,可供仿制或修饰而获得新药信息十分有限,其新药研究则甚少。

针对难治病的新药研究需要对其发病机理进行深入的研究,以寻找适合药物作用的新靶点,建立接近于临床病理过程的动物模型寻找新的药物作用靶点是其中重要的一环;同时,有必要从祖国医学理论和经验中汲取营养,以中药作为新药发现的重要来源,寻找有新特点的治疗药物。

许多免疫性疾病均为难治性疾病,免疫抑制剂的发展经历了糖皮质激素类药物、抗癌类药物以及环孢素类药物等三个重要阶段,但前两类因其作用的非选择性和严重的毒副作用使其临床应用受到了极大的限制,而作为目前最好的免疫抑制剂,环孢素 A 和 FK-560 等能较选择性地作用于 T 淋巴细胞,但由于影响 T 细胞从活化到效应的全过程,因而也带来了较多的副作用,仍非真正意义上的选择性免疫抑制剂。可以说,对于许多免疫性疾病,目前仍缺乏理想的治疗药。

慢性肝炎属于这种难治性免疫性疾病之一,迄今尚缺少理想的治疗药,肝内免疫反应,特别是细胞免疫反应已被公认为造成肝损伤的重要机制之一,但其详细的病理过程仍不明了,CCl₄ 等化学性肝损伤模型一直是被用作评价保肝降酶药的主要

方法,但其致病机理与临床肝炎不同,并不适于评价免疫系统药物。因此,有必要在阐明细胞免疫机制引起肝损伤的详细机理、建立新的药物作用靶点的基础上,确立新的药效评价法,从而为研制高效、低毒且具有新作用特点的肝炎治疗药奠定基础。

2 迟发型变态反应性肝损伤动物模型的建立

为模拟临床肝炎的细胞免疫病理过程,我们设想将典型的细胞免疫反应-迟发型变态(DTH)反应导入肝脏,诱发肝内炎症反应。结果发现,模型组血清转氨酶显著上升,肝组织坏死,炎性细胞浸润,证实了肝损伤的成立,损伤的程度与免疫反应的强度成正比^[1,2]。

3 DTH 肝损伤的发病机理

我们发现,该肝损伤模型中脾细胞及肝非实质细胞表面淋巴细胞功能相关抗原 1(LFA-1)及肝细胞表面细胞间粘附分子 1(ICAM-1)的表达与血清转氨酶上升具有设计绵密的时间依从关系,尤以非实质细胞上 LFA-1 表达的变化为显著。事先摘除脾脏可显著抑制转氨酶的上升和 ICAM-1 的表达, LFA-1 表达高峰时分离得到的肝浸润淋巴细胞在体外有显著的杀伤肝细胞活性,用单克隆抗全封闭 LFA-1 或 ICAM-1 均可避免肝细胞受损,但封闭 CD4 或 CD8 则无效而须加补体去除 CD4⁺ 或 CD8⁺T 细胞才失去杀伤肝细胞的功能。非实质细胞中 CD4⁺ LFA-1⁺ 细胞的比例从诱发肝损伤后 0 小时的 24.4% 增加到 12 小时的 47.9%, CD8⁺

收稿日期:2001-04-17

作者简介:徐强(1956~),男,教授,博士生导师,研究方向:中药药理学。

LFA-1⁺则从 18.4%增加到 23.2% ,提示这些 T 淋巴细胞与肝细胞之间发生的 LFA-1/ICAM-1 相互作用系造成肝损伤的关键步骤[3]。纯化后的 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞具有显著的肝细胞毒作用 ,这种 CD4⁺ T 细胞主要为分泌细胞因子 IL-2 和 IFN- γ 的 Th1 亚型 ,两细胞因子出现在肝损伤前期 ,能通过促进 LFA-1 及 ICAM-1 的表达而使淋巴细胞获得对肝细胞的杀伤能力 ;而 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-5 则出现在急性肝损伤的后期 ,对非实质细胞杀伤肝细胞的能力呈抑制作用。表明 Th1 型和 Th2 型细胞因子对肝损伤的进展分别起正和负调节作用[4]。

由此我们推测该肝损伤发生在以下机理 :抗原攻击肝脏后 ,抗原情报从肝脏被传递至外周淋巴细胞(主要为 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞) ,促进其表面 LFA-1 分子的表达 ;LFA-1 阳性的细胞随后浸润至肝脏 ,通过 IL-2 和 IFN- γ 等促进肝细胞表面 ICAM-1 的表达 ;这些细胞通过 LFA-1/ICAM-1 的相互作用 ,从而导致肝细胞的破坏引起血清转氨酶上升和肝组织损伤[5]。

此外 ,肝组织 Ca²⁺含量及血浆内毒素水平也与肝损伤有正相关关系。钙拮抗剂硝苯吡啶或维拉帕米可显著降低血清转氨酶水平[6]。内毒素则通过激活枯否氏细胞释放 TNF- α ,并在肝浸润 T 淋巴细胞释放 IFN- γ 的协同下加剧了肝损伤[6]。这为临床肝炎内毒素血症的发生及与疾病进展的关系提供了理论依据。

4 DTH 肝损伤的慢性化过程及其免疫调节

皮肤 DTH 反应通常在诱发 24 小时后达到峰值 ,此后很快减弱并消失。出乎意料的是本模型肝损伤状态竟持续数月之久 ,这种肝内一次免疫反应后果长期存在的现象十分独特 ,在现有肝损伤模型中几无类似报道 ,但临床实际则极有可能存在 ,这种现象的多次发生或重复很可能就是肝炎慢性化之关键。

在该肝损伤心的慢性化进程中 ,血清及肝组织多种生化指标持续异常 ,肝细胞坏死、炎细胞浸润等长期存在 ,后期部分小鼠门管区增宽、结缔组织增生、甚则出现桥状坏死[7]。进一步发现 ,CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞对于肝损伤的慢性化过程分别起着正或负的调节作用[8]。以上特征及免疫调节与临床肝炎的实际较为吻合。必须强调的是 ,每次免疫反应

带来的病态变化及进展对于了解疾病的全过程是不可缺少的 ,本模型正好可弥补临床肝炎难以确切区分各个周期的问题 ,可以说是肝损伤研究中不可多得的重要手段之一。

5 现有各种肝炎药物对 DTH 肝损伤模型的影响

选用保肝、免疫调节和免疫抑制 3 种类型的多种现有肝炎药物给予肝损伤小鼠 ,按诱发肝损伤的 DTH 反应的诱导相 ,效应相及肝损伤的慢性化阶段给药。结果 ,联苯双酯和水飞蓟素诱导相给药 ,云芝多糖和甘草甜素效应相及慢性期给药对肝损伤均有显著的改善作用 ,环磷酰胺对诱导相或效应相均有显效 ,但在慢性化后期则无改善作用 ,而氢化泼尼松可能因直接损害肝细胞反而加剧了肝损伤[9]。上述结果基本上与这些药物的临床效果相一致 ,提示本模型可用作肝炎药物、尤其是免疫系统药物的药理学评价 ;同时也提示了临床慢性肝炎治疗中激素疗法的风险及现有免疫抑制剂应用的局限性。

6 清热利湿类中药对免疫性肝损伤的影响及选择性抑制活化 T 淋巴细胞功能这一新作用模型的发现

研究发现 ,临床上许多免疫性炎症疾病与中医的湿热证有关 ,用清热利湿类中药或方剂可抑制引起上述炎症反应的细胞免疫反应 ,其机理包括对活化 T 细胞功能的抑制。作为 DTH 肝损伤模型的配套研究 ,我们数年来对 DTH 抑制药进行了系统的探讨 ,发现了数种能选择性地抑制 DTH 反应不同阶段的中药及其有效成分。比如 ,蒺藜选择性地抑制诱导相[10] ;龙胆[11]、二妙散[12]抑制诱导相和效应相但无抗炎活性 ;土茯苓[13]、白鲜皮[14]及苦参、地肤子、赤芍[15]则选择性地抑制效应相 ;ruscogenoside C (Rus)[16]抑制两相但不抑制免疫器官等。上述中药及其成分的这些活性明显不同于糖皮质激素和免疫抑制剂 ,提示其应用于免疫性疾病治疗的重要价值。在此基础上将这些中药及成分用于 DTH 肝损伤模型 ,未出意料 ,蒺藜、二妙散[17]、龙胆[18]及 Rus 于诱导相给药 ,土茯苓、白鲜皮[17]及 Rus 于效应相给药 ,土茯苓和白鲜皮[17]于慢性期给药 ,显著地改善了肝损伤的各种症状。进一步将这些中药分别于诱导相和效应相配伍给药 ,蒺藜与土茯苓、二妙散

与白鲜皮的配伍有明显的协同作用^[17]。

对于土茯苓及其成分落新妇甙的作用机理还进行了深入的探讨,发现其事先处理肝浸润淋巴细胞可时间、剂量依赖性地抑制其杀伤肝细胞的能力,经口给药后分离获得的非实质细胞与不给药的对照组相比其杀伤肝细胞的能力显著受抑,与此时血清转氨酶活力的低下相平行,但处理肝细胞则无作用,预防给药对于 CCl₄ 所致小鼠肝损伤亦无保护作用,选择性地作用于因抗原攻击活化的淋巴细胞,促进其凋亡从而消除其功能,但对肝细胞及正常的淋巴细胞则无作用^[19]。这些结果表明,土茯苓和落新妇甙对肝损伤的改善作用并非通过现有的保肝模式,而系选择性地消除杀伤肝细胞的肝浸润 T 淋巴细胞的功能。这种选择性消除过度激活的免疫细胞功能而不伤及正常功能的作用特点过往几无报道,明显有别于现有免疫抑制剂的非选择性,因此具有催生新型免疫抑制剂的价值。

7 结语

针对于难治病的新药研制无疑有赖于疾病病理过程的阐明,而建立接近其病理过程的病态动物模型寻找新的药物作用靶点则是其中至关重要的环节,作为新药生命力的重要体现之一—新作用特点也往往衍生于对病理过程的阐明之中。本文介绍了我们数年来建立细胞免疫性肝损模型,开辟研制肝炎新药新途径的尝试,证实本模型在生化、免疫及病理学等方面与现有肝损伤模型相比,与临床肝炎较为接近,并证实可用于肝炎药物的药理学评价。这种模型的建立及其研制肝炎新药的途径在国内外均未见先例。在此基础上发现了一些新作用特点的药物,尤其是通过选择性地促进过度激活的免疫细胞凋亡从而消除其功能的作用特点,对于新一代免疫抑制剂的研制具有开拓性的意义,以此为开端,并结合其他模型,期望为难治性免疫性疾病寻找到理想的治疗药物。

参加本研究的人员有:

王蓉、蒋洁云、吴斐华、曹劲松、卢金福、陈啸春、陈婷、陆朝华、冯振卿、赵红、徐丽华、朱梅芬、苑可武、张宝玲

参考文献

- [1] 徐强,王蓉,徐丽华. 迟发型变态反应机制致肝损伤的动物模型的建立[J]. 中国免疫学杂志, 1993, 9: 287-290.
- [2] Xu Q, Wang R, Jiang J, et al. Liver injury model induced in mice by a cellular immunologic mechanism—Delayed—type hypersensitivity—induced liver injury to picryl chloride and phenotype of effector cell. *Immunol*, 1996, 167: 38-43.
- [3] Xu Q, Jiang J, Cao J, et al. LFA-1/ICAM-1 interaction is essentially involved in the pathogenesis of delayed—type hypersensitivity—induced liver injury to picryl chloride. *Life Sciences* 1998, 62: 1281-1292.
- [4] Xu Q, Cao J, Wu F, et al. Role of Th1/Th2 cytokines in regulating the liver injury induced by delayed type hypersensitivity to picryl chloride. *Liver* 1999, in press.
- [5] 曹劲松, 陆朝华, 徐强. 钙拮抗剂对小鼠迟发型变态反应性肝损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 124-127.
- [6] Chen X, Cao J and Xu Q. Endotoxin exacerbates the immunological liver injury in the cooperation of interferon- γ . Submitted to *J Hepatol*.
- [7] Xu Q, Wu F, Zhang B, et al. One—shot delayed—type hypersensitivity reaction in the mouse liver causes a sustained liver injury to picryl chloride. *Life Sciences* 1997; 60: 2417-2425.
- [8] Xu Q, Wu F, Jiang J, et al. role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in regulating the chronic development of liver injury induced by delayed—type hypersensitivity to picryl chloride. *Int Archs Allergy Immun*.
- [9] Xu Q, Lu J, Wang R, et al. Liver injury model induced in mice by a cellular immunologic mechanism—Study for use in immunopharmacological evaluations. *Pharmacol Res*, 1997, 35: 273-278.
- [10] 徐强, 赵红, 杭秉茜, 蒺藜对迟发型变态反应的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22: 12-16.
- [11] 徐强, 徐丽华. 龙胆对迟发型变态反应的抑制作用[J]. 中药药理与临床, 1993, 9(5):25-26.
- [12] 徐强, 陈婷, 朱梅芬, 等. 二妙散对迟发型变态反应的抑制作用[J]. 中国免疫学杂志, 1993, 9: 39-42.
- [13] 徐强, 王蓉, 徐丽华, 等. 土茯苓对细胞免疫和体液免疫的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1993, 9: 39-42.
- [14] 王蓉, 徐强, 徐丽华, 等. 白鲜皮的免疫药理学研究 I 对细胞免疫和体液免疫的影响[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23: 234-238
- [15] 徐强, 赵红, 王蓉. 数种中药对迟发型变态反应的影响[J]. 中药药理与临床, 1993, 9(4): 30-33.
- [16] 徐强, 王蓉, 余伯阳. 短葶山麦冬皂甙 C 对迟发型变态反应及炎症反应的影响[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24: 98-101.
- [17] Xu Q, Yuan K, Lu J, et al. A new strategy for regulating the immunological liver injury—Effectiveness of DTH—inhibiting agents on DTH—induced liver injury to picryl chloride. *Pharmacol Res*, 1997, 36: 401-409.
- [18] 徐丽华, 徐强. 龙胆对实验性肝损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 1994, 10(3): 20-22.
- [19] Xu Q, Wu F, Cao J, Saiki I, Koda A. Astilbin selectively induces dysfunction of liver—infiltrating cells—novel protection from liver damage. *Eur J Pharmacol*, 1999, 377: 93-100.