

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.004

山萘酚通过增强 Treg 细胞免疫抑制功能延长移植物生存时间

葛茹茹 徐辰鸣 顾蔚 程自豪 葛骥夫 秦燕 邱建新[△]

(上海交通大学附属第一人民医院 上海 200080)

摘要 目的:探讨应用山萘酚增强 Treg 细胞免疫抑制功能,从而抑制大鼠移植物排斥反应并改善移植物生存的作用和机制。**方法:**以 Wister 大鼠和 SD 大鼠分别为供、受体,建立同种异体皮肤移植排斥反应动物模型。观察受体大鼠皮肤移植物的情况,记录移植物失功时间(移植物皮片 80%面积发生排斥)。RT-PCR 检测移植 7 天后脾细胞、淋巴细胞 FOXP3、CTLA-4 和 IL-10 的 mRNA 水平,用 HE 染色组织病理学观察术后 7 天移植皮片的淋巴细胞浸润程度。体外实验 T 细胞增殖抑制试验加入山萘酚作为对照,观察 Treg 功能情况。**结果:**1.山萘酚能增强移植后同种异体移植物的生存时间(DMSO 组 6.3 ± 0.3 天,山萘酚组 13.7 ± 0.39 天, $P < 0.01$);2.RT-PCR 显示山萘酚可增强细胞 CTLA-4(对照组 9.24 ± 0.17 ,山萘酚组 12.48 ± 0.145 , $P < 0.05$)、FOXP3(对照组 0.96 ± 0.07 ,山萘酚组 1.41 ± 0.07 , $P < 0.01$)和 IL-10(对照组 0.95 ± 0.12 ,山萘酚组 1.50 ± 0.16 , $P < 0.05$)的 mRNA 水平;3.体外 T 细胞增殖抑制实验中,山萘酚可增强 Treg 细胞的免疫抑制功能。**结论:**在大鼠皮肤移植模型中,山萘酚可延长皮肤移植物的生存时间,提高 Treg 细胞相关 IL-10、FOXP3 和 CTLA-4 的 mRNA 水平;体外实验中,能抑制效应 T 细胞的增殖,表明山萘酚在提高移植物生存方面存在一定的价值。

关键词:山萘酚;皮肤移植;Treg 细胞;Foxp3;IL-10

中图分类号:R-33;R622.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)02-220-06

Kaempferol Prolongs the Graft Survival Time by Enhancing the Immunosuppressive Function of Treg Cells

GE Ru-ru, XU Chen-ming, GU Wei, CHENG Zi-hao, GE Ji-fu, QIN Yan, QIU Jian-xin[△]

(Department of neurosurgery, Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and mechanism of kaempferol on enhancing the immunosuppressive function of Treg cells, thereby inhibiting graft rejection and improving graft survival in rats. **Methods:** Wister rats and SD rats were used as donors and recipients to establish an allogeneic skin transplantation rejection animal model. The skin graft of recipient rats were observed, and the graft failure time was recorded(80% graft rejection). The mRNA levels of splenocytes and lymphocytes FOXP3, CTLA-4 and IL-10 were detected by RT-PCR 7 days after transplantation. The degree of lymphocyte infiltration of the transplanted skin grafts was observed by HE staining. In vitro T cell proliferation inhibition test, added kaempferol as a control group, observed the function of Treg cell. **Results:** 1.Kaempferol can prolong the survival time of allografts after transplantation(DMSO group 6.3 ± 0.3 days, kaempferol group 13.7 ± 0.39 days, $P < 0.01$). 2.RT-PCR shows that kaempferol can enhance the intracellular mRNA level of CTLA-4 (control group 9.24 ± 0.17 , kaempferol group 12.48 ± 0.145 , $P < 0.05$), FOXP3 (control group 0.96 ± 0.07 , kaempferol group 1.41 ± 0.07 , $P < 0.01$) and IL-10(control group 0.95 ± 0.12 , kaempferol group 1.50 ± 0.16 , $P < 0.05$). 3. In vitro T cell proliferation inhibition experiment, kaempferol can enhance the immunosuppressive function of Treg cells. **Conclusions:** In the rat skin graft model, kaempferol can prolong the survival time of skin grafts and increase the mRNA level of IL-10, FOXP3 and CTLA-4 in Treg cells. In vitro, it can inhibit the proliferation of effector T cells. The results indicated that kaempferol had certain value in improving the survival of grafts.

Key words: Kaempferol; Skin grafting; Treg cells; Foxp3; IL-10

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R622.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)02-220-06

前言

调节性 T 细胞(Treg)是目前免疫学领域的研究热点,它在维持免疫耐受及调控针对病原体及肿瘤的免疫应答中起着非常重要的作用^[1]。大量的研究显示了 CD4⁺CD25⁺T 细胞反而具

有抑制效应性 T 细胞的作用^[2]。人们发现 CD25 高表达的这两类 T 细胞中有一类细胞内有叉状头转录因子 FOXP3^[3],只有这类细胞内高表达这类转录因子,且这类 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞能抑制效应性 T 细胞的活性^[4]。在小鼠模型中敲除 FOXP3 的表达发现,小鼠出现了严重的淋巴组织过度增生的自身免疫疾

作者简介:葛茹茹,硕士研究生,电话:13003083600, E-mail: milannice@sjtu.edu.cn

[△] 通讯作者:邱建新,主任医师,教授,博士生导师,电话:13917389450, E-mail: jasonqiu@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2019-05-28 接受日期:2019-06-24)

病^[5]。同样,在人体中,FOXP3 基因的突变,也会引起各种自身免疫疾病,Treg 细胞的免疫抑制功能也逐渐被人们研究^[6]。2014 年 Martelli 的研究小组报道,43 名患有高危急性白血病在接受全 HLA 半相合移植的患者中,通过输注大量 Treg 过继免疫治疗可免于 GvHD^[7]。2014 年底开始的活体肾移植受者自体多克隆扩增 treg 的一期试验中并未发现相关的严重不良反应,且在后续的随访过程中也未出现迟发性排斥反应^[8]。山萘酚是一类天然的黄酮类化合物,人们现已可从银杏、桑叶、凤仙花等植物中提取纯净的山萘酚^[9]。山萘酚目前成为研究热点主要因它的三个主要功能:抗炎作用、抗肿瘤作用及抗氧化作用^[10]。尤其在自身免疫疾病方面,包括糖尿病、关节炎和哮喘^[11-13]。本文通过建立大鼠皮肤移植模型,山萘酚进行干预,以了解山萘酚对 Treg 细胞功能的影响及对同种异体免疫排斥的作用,并希望对其机制进行阐述。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年健康 SD 大鼠 30 只,WISTER 大鼠 15 只,7-8 周龄,SPF 级,雌性,体重 150 ± 10 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于上海巴斯德所无特定病原体环境实验动物房。所有实验程序都经过动物伦理委员会的批准,并在同样条件下饲养 2 周,一般情况稳定后进行实验。

1.2 主要试剂和器械

(1)山萘酚(50 mg)(11852)(艾美捷科技有限公司);(2)流式荧光偶联抗体:抗大鼠 CD4-FITC 抗体(OX35),抗大鼠 CD25-PerCP 抗体(OX39),抗大鼠 FOXP3-APC 抗体(236A/E7),抗大鼠 CTLA4-PE 抗体(eBio20A)和细胞活性染料抗体 eFluor-710(OX39)(所有抗体均购自上海拜力生物科技有限公司);(3)聚合酶链式反应(PCR)引物(TAKARA);(4)PCR 染料 SYBR GREEN MIX(TAKARA);(5)奥林巴斯 CX41 显微镜(OLYMPUS 上海市瑞金医院病理科);(6)组织细胞染色机(LEICA ST5020,上海市瑞金医院病理科);(7)石蜡切片机(LEICA RM2235,上海市瑞金医院病理科);(8)石蜡包埋机(LEICA EG1160,上海市瑞金医院病理科)等。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠皮肤移植模型建立 分组和给药方法:将受体 SD 大鼠分为 3 组,每组各 10 只,^[14] 对照组 I:SD 大鼠自体原位移植组;^[15] 对照组 II:SD 大鼠同种异体移植后不用药物治疗;^[16] 实验组:SD 大鼠移植后予山萘酚治疗,山萘酚以丙二醇为溶剂,配置浓度为 1 mg/0.1 mL,术后第一天起对大鼠进行灌胃,剂量为一日 50 mg/KG,第五天起每 2 天灌胃 1 次山萘酚至 14 天。

同种异体皮肤移植:Wister 大鼠作为供体,SD 大鼠作为受体,10%水合氯醛按 35 mg/100 g 体重,腹腔注射麻醉。背部剃毛,剃毛范围约为皮肤切去范围两倍(以周围正常皮肤作对比,观察移植物)。供体处理:供体背部中下 1/3 处,沿中线两侧各切取 1.5 cm×1.5 cm 正方形全层皮肤,放入 4℃生理盐水,修剪皮下浆膜层,仅留表皮全层,并暴露皮下血管。受体处理:背部同样位置,剪去一边 1.2 cm×1.2 cm 的正方形皮肤。同样剪去浆膜,暴露肌肉上的血管,生理盐水冲洗创口,棉球吸干。供体皮片按照毛生长相反的方向,放上受体切口处。8-0 三角针四

个角分别端端吻合。吻合好后碘伏擦拭伤口周围,并用纱布包裹^[14,15]。自体移植:手术操作方法同异体皮肤移植,吻合好后碘伏擦拭伤口周围,并用纱布包裹。术后每天观察皮片移植物的情况,排除手术失败情况(伤口裂开、移植皮片移位、脱落视为手术失败)。观察皮片移植红肿充血等炎症浸润情况。与周围正常皮肤对比,80%移植物出现坏死、变性、变硬则视为排斥(所有手术均在 SPF 级动物实验房中进行)。

1.3.2 HE 染色比较同种异体移植与同基因移植 将大鼠进行腹腔注射麻醉。麻醉后沿皮瓣吻合口边缘向外约 5 mm 剪下移植皮瓣(始终保持切缘距离吻合口约 5 mm),予以 PBS 溶液冲洗干净,保证剪下皮瓣无血细胞。将皮肤组织放置入 10%福尔马林固定液中固定。组织固定 72 小时后,将移植皮瓣放入包埋盒中,充分冲洗去除组织中的固定液。分别用 70%,85%,95%,100%乙醇脱水处理,待完全脱去组织中的水份后,再将组织块浸泡在二甲苯中透明 5 分钟二次。待干燥后,将融化的石蜡倒入包埋盒中,使皮肤组织充分浸润,等待石蜡完全冷却凝固完成石蜡的包埋。将刚才包埋好的移植皮瓣蜡块固定于切片机上,切成 5 微米厚度薄片。将切下的薄片放入热水中漂浮展平,然后用载玻片贴上组织薄片,放入恒温箱中烘干水份。再用二甲苯脱蜡二次,每次 15 分钟,再用 100%,95%,85%,70%乙醇浸泡 2 分钟,最后放入蒸馏水中浸泡 10 分钟。根据苏木素伊红(HE)染色试剂盒操作说明,放入苏木素染色 20 分钟,自来水冲洗,分化液分化 30 秒钟,自来水再浸泡 15 分钟,置入伊红染液 1 分钟,自来水冲洗后浸泡 2 分钟。再用 95%,100%乙醇脱水,分别 2 分钟,再用二甲苯石炭酸(3:1)浸泡 1 分钟,二甲苯浸泡 2 分钟二次透明。最后待干燥后用中性树脂封固,用光学显微镜观察并拍片。

1.3.3 定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)实验 取大鼠皮肤移植术后第七天大鼠,安乐死大鼠,取肠淋巴结、腹腔淋巴结、颈淋巴结、脾脏中的细胞,在液氮下研磨后放入 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL TRIzol 试剂(Invitrogen)裂解,室温放置 10 min。随后在 1 mL Trizol 液中加入 200 μ L 三氯甲烷,剧烈震荡 20 秒,室温放置 5 min,冰上放置 5 min。在 4℃12000 rpm 条件下高速离心 15 min,取最上层约 400 μ L 透明液体置入新 RNase-Free 管中,每管加入 500 μ L 异丙醇,剧烈震荡 20 秒,仍然室温放置 5 min,冰上放置 5 min。继续在 4℃12000 rpm 条件下高速离心 10 min,吸弃上清液,加入 75%乙醇 1 mL,混匀。在 7500 rpm 条件下继续离心 5 min,吸尽乙醇,并风干 5 min。干燥后将管底粉末溶解于 DEPC 水中,通过 NanoDrop 检测 RNA 的浓度及纯度,并记录。纯度测定 260/280 2.0 左右,230/260 大于 2.0,若偏离这个指标较大,考虑样本提取纯度较低或被污染,放弃此样本。将提取好的 mRNA 进行 PCR 检测,结果分析先计算 Δ Ct(Δ Ct=Ct-Ct 内参),再用 $2^{-\Delta$ Ct 进行统计学分析。所用引物为:

大鼠 CTLA-4 前引物 5'-GGCAGACAAATGACCAAGT-GAC-3';

大鼠 CTLA-4 后引物 5'-TCTGAATCTGGGCATG-GTTCT-3';

大鼠 Foxp3 前引物 5'-TGAGCTGGCTGCAATTCTGG-3';
大鼠 Foxp3 后引物 5'-ATCTAGCTGCTCTGCATGAGGT-

GA-3';

大鼠 *IL-10* 前引物 5'-CCTGGCTCAGCACTGCTATG-3';

大鼠 *IL-10* 后引物 5'-ACTGGGAAGTGGGTGCAGTT-3';

大鼠 *Hprt*-前引物 5'-GCGAAGTGGAAGCAAGT-3';

大鼠 *Hprt* -后引物 5'-GCCACATCAACAGGACTCTTG-TAG-3'。

1.3.4 体外 T 细胞增殖抑制实验 体外分选和移植组使用的

同一批大鼠外周血中的 T 淋巴细胞, 将分选出的 Treg 细胞培养液分为两组, 实验组及观察组(表 2), 实验组 Treg 予山萘酚预处理 3 天, 每天加入 0.03 mg 山萘酚。预准备好已经染色的 Teff 细胞, 第 3 天在圆底 96 孔板中上样, 按比例加入 Treg 和 Teff 细胞(表 3), 进行体外 T 细胞增殖抑制实验。37℃ 细胞培养箱培养 5 天后, 进行流式细胞学检测, 根据荧光染色强度判断 T 细胞增殖状况。

表 1 T 细胞增殖抑制实验 Treg 细胞处理

Table 1 T cell proliferation inhibition experimental Treg cell treatment methods

	Treg+ kaempferol	Treg+DMSO
Treg	0.5 M	0.5 M
kaempferol	100 μ mol/L/d	DMSO

表 2 T 细胞增殖抑制实验加样

Table 2 T cell proliferation inhibition experimental Treg cell treatment methods

Treg(Treatment group):Teff		Treg(Untreated group):Teff			
1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
1:2	1:2	1:21:2	1:2	1:2	1:2
1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4

1.4 统计学分析

各组实验数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 统计结果采用 SPSS12.0 统计学软件进行分析, 统计图表采用 Graphpad 5.0 软件绘制。两组计量资料比较采用 Student's t 检验, $P < 0.05$ 有显著性统计学差异, $P < 0.01$ 有非常显著性统计学差异。

2 结果

2.1 山萘酚给药的受体大鼠皮肤移植植物生存时间显著延长

在移植术后第 7 天, 根据皮肤移植物的临床表现判定移植物的存活状态。在各组受体大鼠中, 对照组皮肤移植植物坏死 80 % 以上, 治疗组移植植物存活 50 % 左右, 而自体移植组皮肤移植植物未见明显排斥反应。(见图 1)。

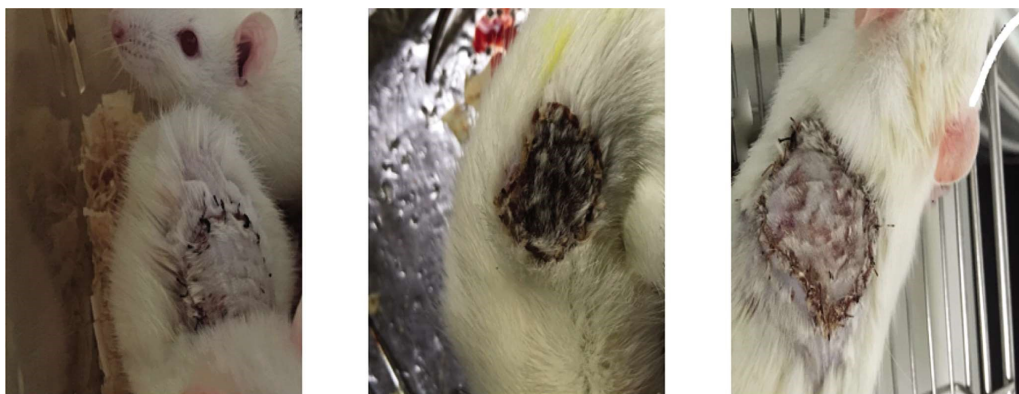


图 1 移植 7 天后 3 组受体移植物的形态、颜色比较

Fig.1 Appearance of allografts 7 days after transplantation

分析所有受体移植天数和皮片移植植物坏死面积, 皮肤移植受体中对对照组的急性排斥(80 % 以上面积坏死、变黑、变硬)天数为 6.3 ± 0.3 天, 而山萘酚处理组的急性排斥天数为 13.7 ± 0.39 天($P < 0.01$), 两组相比山萘酚治疗组可显著增加皮肤移植植物生存时间。(见图 2)。

在显微镜下观察病理切片, 分析各组中皮肤移植植物淋巴细胞浸润情况。发现在自体移植组的移植植物中几乎没有出现淋巴细胞浸润, 在对照组移植植物皮肤中可见大量淋巴细胞, 而山萘

酚治疗组移植植物皮肤的淋巴细胞浸润数量则要远少于对照组(见图 3)。

2.2 山萘酚提高细胞中 CTLA-4、FOXP3 和 IL-10 的 mRNA 水平

Treg 细胞相关的共刺激分子 CTLA-4、关键性转录因子 FOXP3 和细胞因子 IL-10 的表达是 Treg 细胞发挥免疫抑制作用的关键因素, 因此为了进一步研究山萘酚延长移植植物生存时间的原因, 取移植术后第 7 天受体大鼠的脾脏及淋巴结, 提取 RNA, 用 RT-PCR 检测 Treg 细胞 CTLA-4、FOXP3 和 IL-10 的

mRNA 水平, mRNA 水平用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 量化表示。发现山萘酚治疗组的 CTLA-4、FOXP3 和 IL-10 的 mRNA 水平高于对照组。(见图 4)。

2.3 山萘酚增强 Treg 的免疫抑制功能

为了进一步验证山萘酚对 Treg 细胞的功能的影响, 我们进一步做了体外 T 细胞增殖实验。分析 T_{eff} 细胞的增殖情况, 在只有 T_{eff} 细胞的孔内, DMSO 组占 91.2%, 山萘酚组 87.1%, 而按照不同比例加入 Treg 细胞后, 1:1 组分别为 62.6% 和 45.3%, 1:2 组分别为 78.3% 和 54.5%, 1:4 组 88.4% 和 70.3% (见图 5), 可见在加入 Treg 细胞后山萘酚处理组中的 T_{eff} 细胞增殖情况显著弱于 DMSO 对照组, 而山萘酚本身对 T_{eff} 几乎不产生作用, 说明山萘酚能够增强 Treg 细胞的免

疫抑制功能, 这也与之前 RT-PCR 显示的结果一致。

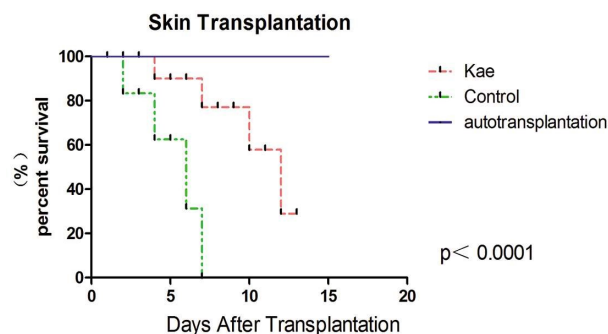


图 2 3 组受体的皮片移植生存曲线

Fig.2 Survival time curves of all three groups' allografts ($P < 0.01$)

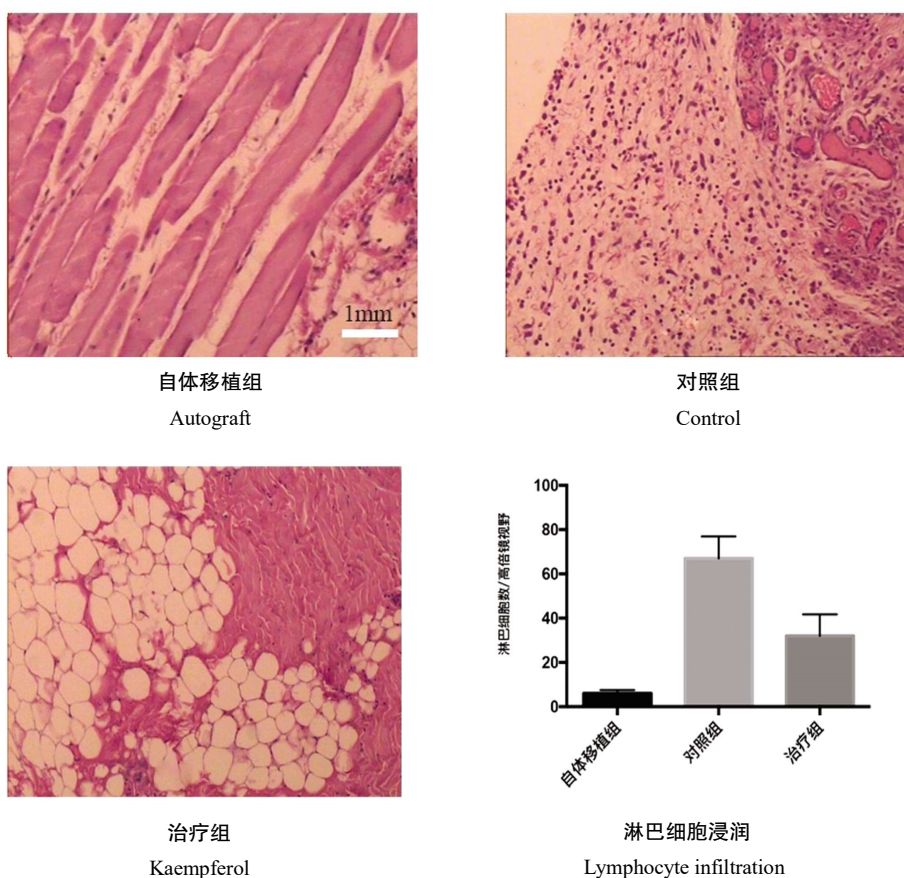


图 3 受体皮肤移植在移植后 7 天石蜡切片 H&E 染色, 10 倍镜下观察结果和淋巴细胞浸润结果统计。

Fig.3 Receptor skin grafts in paraffin HE staining 7 days after transplantation, observed under 10 times microscope and lymphocyte infiltration statistics ($P < 0.001$).

3 讨论

器官移植后, 机体通过 T 细胞直接识别供体移植物的抗原提呈细胞提呈的 MHC/ 微生物肽段和间接识别自身抗原提呈细胞提呈的移植物源性的肽段, 肽段结合 T 细胞表面 TCR, 从而激活 T 细胞^[16]。T 细胞活化后分泌各类细胞因子, 如 Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 等, Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-5、IL10 等细胞因子。IL-2、INF- γ 等 Th1 介导的免疫应答引发迟发性超敏反应 (以单核细胞和组织损伤为主的炎症反应), 溶细胞作用损伤移植物, 同时激活 CD8 细胞, 通过细胞毒作用和诱导靶细胞凋亡进一步损伤移植物^[17]。

活化的 T 细胞是导致移植物损伤的主要原因, 因此要抑制移植物排斥, 延长移植物生存时间, 针对 T 细胞活化的信号通路是目前移植术后免疫抑制剂的主要靶点^[18]。主流的免疫抑制剂主要有钙调磷酸酶抑制剂类药物, 像大多数肾移植术后病人服用的环孢素、他克莫司等^[19,20]; 酶酚酰胺类药物, 代表药物有骁悉等^[21]; 西罗莫司靶蛋白抑制剂, 又称为雷帕霉素, 被广泛用于移植术后病人的抗排斥治疗^[22]; 还有大家熟知的皮质固醇类激素以及常被用作手术前诱导免疫耐受的单克隆抗体和多克隆抗体等都是用于针对 T 细胞活化的药物^[23,24]。然而, 在人类体内本身存在着一些能够抑制效应 T 细胞的一群 T 细胞 -- 调节性 T 细胞 (Treg)。Treg 细胞是一类具有限制自身免疫应答, 维

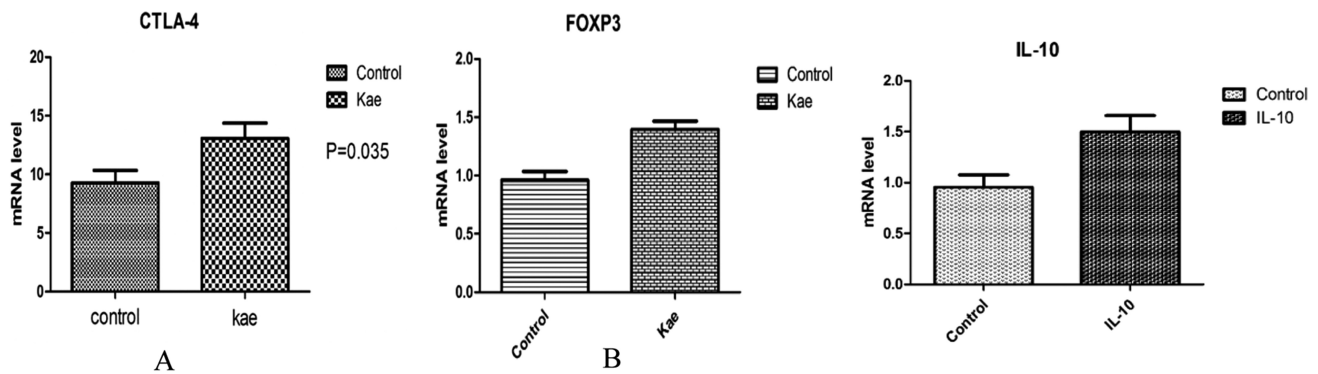


图4 提取移植后受体SD大鼠脾脏和外周淋巴结RNA,进行RT-PCR检测,结果显示山萘酚处理的受体大鼠淋巴细胞内CTLA-4($P<0.05$)、FOXP3($P<0.01$)和IL-10($P<0.05$)的mRNA水平高于对照组。

Fig.4 The spleen and peripheral lymph node RNA of the recipient SD rats were extracted and detected by RT-PCR. The results showed that the mRNA level of CTLA-4 ($P<0.05$), FOXP3 ($P<0.01$) and IL-10 ($P<0.05$) was higher in recipient rat lymphocytes treated with kaempferol than that of the control group.

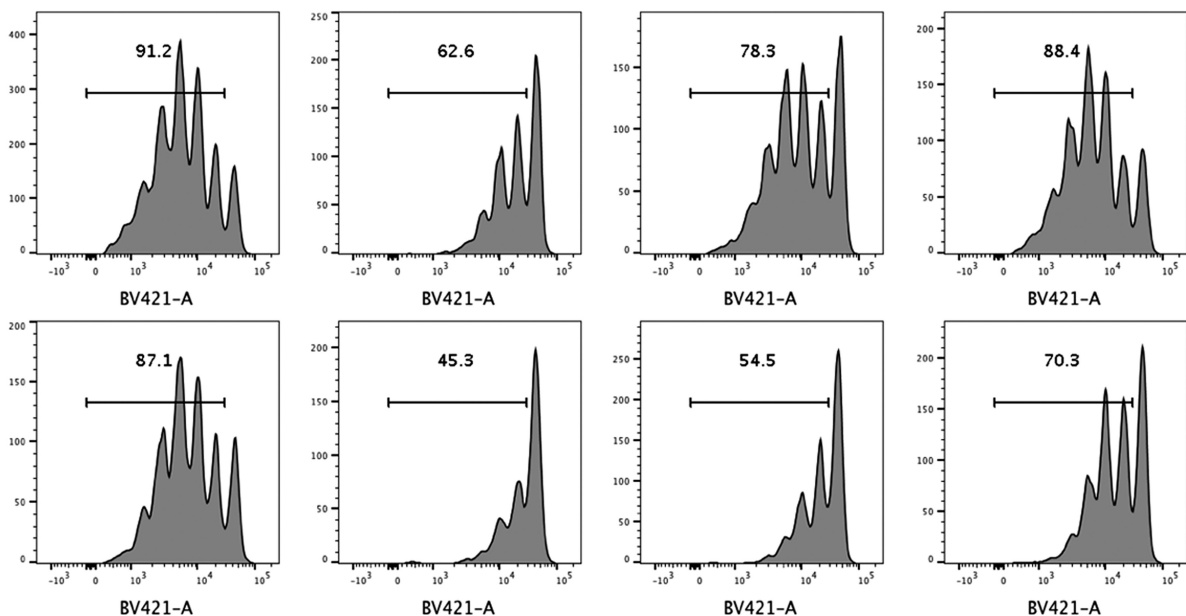


图5 T细胞增殖抑制实验,CFSE染色Teff细胞,流式检测T细胞增殖情况。为了进一步验证山萘酚作用,在T细胞增殖抑制实验中每天加入50 μ M山萘酚(下)和DMSO(对照上),CFSE的效应性说明T细胞的增殖情况。

Fig.5 T cell suppression assay, Teff cells stained by CFSE, FACS show the result. To further verify the effect of kaempferol, we added 50 μ M kaempferol and DMSO everyday in suppression assay, CFSE shows the proliferation of T cells.

持外周免疫稳态的T细胞^[25]。Treg细胞的作用主要依赖于三种方式,⁽¹⁾ 对效应性T细胞活性的阻抑;Treg实施免疫抑制的主要对象是效应T细胞,也包括与之相互作用的APC^[26]。⁽²⁾ 产生抑制性的细胞因子:Treg主要产生IL-10、TGF- β 和IL-35。其中IL-10是一类强有力的抑制性细胞因子^[27],IL-10是本实验检测Treg细胞下游的关键细胞因子,IL-10结合了IL-10R1、IL-10R2成为三聚体复合物,磷酸化修饰STAT3,阻断了促炎因子IL-6的信号通路(STAT3是IL-6发挥促炎功能的关键因子)^[28]。⁽³⁾ 抑制APC活性:Treg可诱导一种称为淋巴细胞激活基因(LAG)的表达,其产物LAG3(CD223)与CD4分子同源,可与成熟的DC(imDC)表达的MHC II类分子高亲和力结合,引发由ITIM及蛋白磷酸酶SHP1参与的抑制信号的启动和传导,阻抑DC的成熟,使其不能发挥正常的抗原提呈作用^[29]。本实验表明,山萘酚处理后的Treg,其分泌功能显著增强,

IL-10在mRNA水平上显著高于DMSO对照组的Treg细胞。显示了山萘酚可增强Treg细胞功能,并通过分泌IL-10抑制炎症的发生,致使山萘酚组的受体大鼠的皮肤移植物的淋巴细胞浸润明显少于DMSO处理的受体大鼠(病理见图3)。

山萘酚(C₁₅H₁₀O₆)是一类天然的黄酮类化合物,在自然界中广泛存在其高含量的蔬菜、水果,可食用方面,马铃薯、西兰花、葡萄、草莓、茶叶等,同时在很多中药中也大量存在^[9]。黄酮类化合物因为它可能的抗氧化作用、抗肿瘤和抗炎作用逐渐成为近年来的研究热点。人们现已可从银杏、桑叶、凤仙花等植物中提取纯净的山萘酚作为研究对象^[30]。山萘酚被发现对抑制自身免疫疾病有着不错的效果,有研究表明,在小鼠糖尿病模型中山萘酚诱导含氮化合物酶(iNOS)、环氧化酶2(COX-2)和激活了C反应蛋白(CRP),从而降低了治疗组的血糖^[31],而在胶原诱导的关节炎大鼠模型中,人们发现了山萘酚可以下调转录因

子 NF- κ B 的信号通路并抑制 IL-1 β 诱导的类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞的生成和增殖,同时抑制了 IL-1 β 的下游 MMP-1、环氧合酶-2、前列腺素-2 的 mRNA 水平从而改善关节炎的严重程度^[32]。X. Chen 等人报道了山萘酚抑制由于炎症环境而激活的 MAPKs 和 NF- κ B 信号通路,从而降低了炎症因子 IL-6、TNF- α 等^[33]。另有研究在构建 EAE 动物模型中发现了山萘酚可以通过磷酸化作用增强 Treg 细胞的抑制功能^[34]。

本实验中,我们建立了 Wister/SD 大鼠的皮肤移植模型,并用山萘酚对受体大鼠进行干预,通过 FACS 和 RT-PCR 检测淋巴细胞中 Treg 细胞的下游细胞因子 IL-10、关键转录因子 FOXP3 和表面分子 CTLA-4 的 mRNA 水平,结果发现山萘酚处理的细胞中 FOXP3、IL-10 和 CTLA-4 在 mRNA 水平上显著上升(见图 4)。为了确认这一结果,我们又进行了体外 T 细胞增殖抑制实验,也用山萘酚进行干预后发现山萘酚处理的 T 细胞增殖与对照组相比受到了明显抑制。

4 结论

山萘酚在大鼠皮肤移植模型中可显著延长皮片移植物的生存时间,并同时使 Treg 细胞相关的下游细胞因子 IL-10、转录因子 FOXP3、表面分子 CTLA-4 的 RNA 水平显著提升,并在体外 T 细胞增殖抑制实验中也得到了证实,表明山萘酚可以显著提升 Treg 细胞的免疫抑制功能,在提高移植物的生存方面有一定的价值。

参考文献(References)

- [1] Bilate AM, Lafaille JJ. Induced cd4+foxp3+ regulatory t cells in immune tolerance [J]. Annual review of immunology, 2012, 30: 733-758
- [2] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing il-2 receptor α -chains (cd25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164
- [3] Tatura R, Zeschmick M, Hansen W, et al. Relevance of foxp3 (+) regulatory t cells for early and late phases of murine sepsis [J]. Immunology, 2015, 146(1): 144-156
- [4] Alessandrini A, Turka LA. Foxp3-positive regulatory t cells and kidney allograft tolerance [J]. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 2017, 69(5): 667-674
- [5] Brunkow M, Jeffery E, Hjerrild K, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse[J]. Nat Genet, 2001, 27(1): 68-73
- [6] Bennett C, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome (ipex) is caused by mutations of foxp3[J]. Nat Genet, 2001, 27(1): 20-21
- [7] Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. Hla-haploidentical transplantation with regulatory and conventional t-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse[J]. Blood, 2014, 124(4): 638-644
- [8] Zwang NA, Leventhal JR. Cell therapy in kidney transplantation: Focus on regulatory t cells [J]. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 2017, 28(7): 1960-1972
- [9] Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine [J]. Pharmacological research, 2015, 99: 1-10
- [10] Harborne J, Williams C. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. Phytochemistry, 2000, 55(6): 481-504
- [11] Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders [J]. European journal of medicinal chemistry, 2014, 86(undefined): 103-112
- [12] Pan D, Li N, Liu Y, et al. Kaempferol inhibits the migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by blocking activation of the mapk pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 174-182
- [13] Yoon HY, Lee EG, Lee H, et al. Kaempferol inhibits il-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of cox-2, pge2 and mmps [J]. International journal of molecular medicine, 2013, 32(4): 971-977
- [14] B E, G SE. An easy and noninvasive technique for harvesting split thickness skin grafts in rats [J]. Burns: journal of the International Society for Burn Injuries, 2016, 42(4): 949-950
- [15] Cheng CH, Lee CF, Fryer M, et al. Murine full-thickness skin transplantation[J]. Journal of visualized experiments: JoVE, 2017, 119
- [16] Briscoe D, Sayegh M. A rendezvous before rejection: Where do t cells meet transplant antigens?[J]. Nat Med, 2002, 8(3): 220-222
- [17] Delves P, Roitt I. The immune system. First of two parts[J]. N Engl J Med, 2000, 343(1): 37-49
- [18] van den Heuvel H, Heidt S, Roelen DL, et al. T-cell alloreactivity and transplantation outcome: A budding role for heterologous immunity? [J]. Current opinion in organ transplantation, 2015, 20(4): 454-460
- [19] Malissen B, Bongrand P. Early t cell activation: Integrating biochemical, structural, and biophysical cues [J]. Annual review of immunology, 2015, 33: 539-561
- [20] Simmond J, Burch M. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression [J]. Pediatric transplantation, 2017, 21(1)
- [21] Maripuri S, Kasiske BL. The role of mycophenolate mofetil in kidney transplantation revisited [J]. Transplantation reviews (Orlando, Fla), 2014, 28(1): 26-31
- [22] Heisel O, Heisel R, Balshaw R, et al. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: A systematic review and meta-analysis[J]. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2004, 4(4): 583-595
- [23] Wang K, Xu X, Fan M. Induction therapy of basiliximab versus antithymocyte globulin in renal allograft: A systematic review and meta-analysis [J]. Clinical and experimental nephrology, 2018, 22(3): 684-693
- [24] Bamoulid J, Staecck O, Crepin T, et al. Anti-thymocyte globulins in kidney transplantation: Focus on current indications and long-term immunological side effects[J]. Nephrol Dial Transplant, 2017, 32(10): 1601-1608
- [25] Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of cd4⁺cd25⁺ regulatory t cells induced by an agonist self-peptide[J]. Nat Immunol, 2001, 2(4): 301-306

- [3] Lee WS, Kim J. Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going[J]. Korean J Intern Med, 2017, 32(3): 404-421
- [4] Du QH, Peng C, Zhang H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics[J]. Pharm Biol, 2013, 51(11): 1347-1354
- [5] Liu L T, Guo G, Wu M, et al. The progress of the research on cardio-vascular effects and acting mechanism of polydatin [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(9): 714-719
- [6] Zhang M, Wang S, Cheng Z, et al. Polydatin ameliorates diabetic cardiomyopathy via Sirt3 activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(3): 1280-1287
- [7] Szuszkiewicz-Garcia MM, Davidson JA. Cardiovascular disease in diabetes mellitus: risk factors and medical therapy [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014, 43(1): 25-40
- [8] Kibel A, Selthofer-Relatic K, Drenjancevic I, et al. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. J Int Med Res, 2017, 45(6): 1901-1929
- [9] Zhang M, Zhao Z, Shen M, et al. Polydatin protects cardiomyocytes against myocardial infarction injury by activating Sirt3 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(8): 1962-1972
- [10] Hao J, Chen C, Huang K, et al. Polydatin improves glucose and lipid metabolism in experimental diabetes through activating the Akt signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 745: 152-165
- [11] Wu Y, Xue L, Du W, et al. Polydatin Restores Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Aorta Rings Impaired by High Glucose: A Novel Insight into the PPARbeta-NO Signaling Pathway [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e126249
- [12] Yu L, Li Z, Dong X, et al. Polydatin Protects Diabetic Heart against Ischemia-Reperfusion Injury via Notch1/Hes1-Mediated Activation of Pten/Akt Signaling[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 2750695
- [13] Zou M H, Xie Z. Regulation of interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart: new role of AMPK [J]. Autophagy, 2013, 9(4): 624-625
- [14] Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 71: 71-80
- [15] Mei Y, Thompson MD, Cohen RA, et al. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 243-251
- [16] Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 252-261
- [17] Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, et al. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 232-42
- [18] Kubli DA, Gustafsson AB. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(17): 1527-1544
- [19] Yang B, Zhao S. Polydatin regulates proliferation, apoptosis and autophagy in multiple myeloma cells through mTOR/p70s6k pathway [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 935-944
- [20] Ling Y, Chen G, Deng Y, et al. Polydatin post-treatment alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury by promoting autophagic flux[J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(18): 1641-1653

(上接第 225 页)

- [26] Tanoue T, Atarashi K, Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory t cells [J]. Nature reviews Immunology, 2016, 16(5): 295-309
- [27] Liu J, Wang H, Li Y, et al. Anti-mouse cd52 treatment ameliorates colitis through suppressing th1/17 mediated inflammation and promoting tregs differentiation in il-10 deficient mice [J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2018, 41(9): 1423-1429
- [28] Asseman C, Mauze S, Leach M, et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory t cells that inhibit intestinal inflammation[J]. J Exp Med, 1999, 190(7): 995-1004
- [29] Akeus P, Szeponik L, Ahlmanner F, et al. Regulatory t cells control endothelial chemokine production and migration of t cells into intestinal tumors of apc (min/+) mice [J]. Cancer immunology, immunotherapy: CII, 2018, 67(7): 1067-1077
- [30] Varshney R, Gupta S, Roy P. Cytoprotective effect of kaempferol against palmitic acid-induced pancreatic beta-cell death through modulation of autophagy via ampk/mtor signaling pathway [J]. Molecular and cellular endocrinology, 2017, 448: 1-20
- [31] Zhang Y, Liu D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(1): 325-332
- [32] Yoon H, Lee E, Lee H, et al. Kaempferol inhibits il-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of cox-2, pge2 and mmps [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(4): 971-977
- [33] Chen X, Yang X, Liu T, et al. Kaempferol regulates mapks and nf- κ b signaling pathways to attenuate lps-induced acute lung injury in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(2): 209-216
- [34] Lin F, Luo X, Tsun A, et al. Kaempferol enhances the suppressive function of treg cells by inhibiting foxp3 phosphorylation [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(2): 859-865