

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.017.html>

◇ 药学研究 ◇

人参皂苷 CK 活化糖皮质激素受体抑制佐剂型关节炎大鼠 T 细胞活化

司敏 陈镜宇 马 旻 常 艳 魏 伟

摘要 目的 探讨人参皂苷 CK 对活化的 T 细胞的抑制作用及机制。方法 完全弗氏佐剂(CFA)诱导大鼠佐剂型关节炎(AA),分离纯化正常和 AA 大鼠的 T 细胞,分离培养 AA 大鼠的成纤维样滑膜细胞(FLS)和骨髓来源的树突细胞(DC)。体外分别以刀豆蛋白 A(ConA)、AA 大鼠 FLS、AA 大鼠 DC 诱导 T 细胞活化,以不同浓度的人参皂苷 CK(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L)以及糖皮质激素受体(GR)拮抗剂(RU486 10 μmol/L)预处理,CCK 法检测 T 细胞增殖能力,流式细胞术检测 T 细胞 CD25、DC 表面分子(CD40、CD80、CD86、MHC II)的表达。结果 CK(10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L)体外给药能明显抑制刀豆蛋白 A(ConA)诱导的 AA 大鼠 T 细胞的增殖,GR 拮抗剂 RU486 可以阻断 CK(10、100 nmol/L)的作用,但是对 CK(1、10 μmol/L)引起的 T 细胞增殖的抑制作用没有影响。AA 大鼠 FLS 和 DC 可以诱导正常大鼠 T 细胞表面 CD25 的表达增加,CK(1 μmol/L)预处理的 AA 大鼠 FLS 和 DC 与分离纯化的正常大鼠 T 细胞进行共培养,T 细胞表面分子 CD25 表达明显减少,而 RU486 可以阻断 CK(1 μmol/L)的这种作用。CK(1 μmol/L)体外给药能明显抑制上述(CD40、CD80、CD86、MHC II) DC 表面分子的表达,RU486 可以阻断 CK 对上述分子(CD40、CD86)表达的抑制作用。结论 CK 可能通过多个环节发挥对 T 细胞活化的抑制作用,包括直接抑制 T 细胞的活化,以及抑制 FLS 和 DC 对 T 细胞的活化,CK 的这些作用与其活化 GR 有关,GR 可能是 CK 发挥作用的靶点之一。

关键词 人参皂苷 CK; 佐剂型关节炎; T 细胞活化; 糖皮质激素受体

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1567-07

2018-04-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81503084、81330081、31200675、81502123);安徽医科大学博士科研资助项目(编号:XJ201427)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:司敏,女,硕士研究生;

陈镜宇,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:cyjanyi@126.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.017

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以关节的滑膜炎为特征的慢性全身性自身免疫性疾病^[1]。T 细胞与 RA 的发生密切相关,大量的研究^[2-5]表明活化的 T 细胞是 RA 免疫紊乱和关节损伤的主要诱导因子。大量过度激活的 T 细胞浸润关节滑膜,与滑膜细胞、免疫细胞相互活化,引起关节滑膜炎和关节软骨和骨质破坏。人参皂苷 CK 为人参皂苷在人肠道内的主要降解产物,是人参皂苷在体内吸收和发挥活性作用的主要形式^[6]。前期研究^[7-9]显示 CK 对佐剂性关节炎(adjuvant-induced arthritis, AA)大鼠和胶原性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)小鼠 T 细胞异常的活化有抑制作用,CK 可以下调共刺激分子 CD28 和 T 细胞受体(T cell receptor, TCR),上调共抑制分子细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)和程序性死亡受体 1(programmed cell death protein1, PD-1),上调初始 T 细胞数量;减少 T 细胞表面 CD25 的表达和 IL-2 的分泌,下调活化 T 细胞数量;抑制活化的 T 细胞增殖与效应 T 细胞分化,同时上调 Treg 的数量;CK 可以减少 T 细胞活化的共刺激信号,抑制 T 细胞的活化。但是这种抑制作用的作用机制和作用靶点仍不清楚。有文献^[10]报道 CK 具有与甾体类激素相似的化学结构,CK 可与地塞米松竞争性结合激动糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR),CK 对免疫细胞的作用是否与活化 GR 有关仍不清楚。该研究采用 GR 拮抗剂,对 CK 抑制 AA 大鼠 T 细胞过度活化的作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体质量(150 ± 20) g,购自安徽省实验动物中心,许可证编号:SCXK(皖)2011-002。实验中涉及的

动物实验方案均经安徽医科大学临床药理研究所动物伦理委员会批准。

1.1.2 药物和试剂 人参皂苷 CK(分子量 622.18, 批号: S141001) 购自浙江海正药业有限公司; 糖皮质激素受体拮抗剂(RU486)、地塞米松(Dexamethasone) 购自美国 Sigma 公司; DMEM、1640 培养基购自美国 BI 公司; 抗 CD25、CD40、CD80、CD86、MHCII 流式抗体(美国 BD 公司); IL-4、GM-CSF(美国 Peprotech 公司); CCK8 试剂盒(日本同仁公司)。

1.1.3 主要实验仪器 IX-40 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司); Tecan Infinite M1000 PRO 酶标仪(瑞士 Tecan 公司); SW-CJ-1F 超净工作台(苏州苏净集团安泰公司); KDC-40 超速离心机(科大创新中佳公司); 2306-2 型 CO₂ 培养箱(美国 SHEL LAB 公司); GL20A 全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表总厂离心机厂); -80 °C 超低温冰箱(美国 Advantage 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 制备 AA 大鼠模型 将 10 mg/ml 完全弗氏佐剂(Freund's complete adjuvant, CFA) 充分混匀, 于每只大鼠右后足跖皮内注射 CFA 0.1 ml 致炎, 得 AA 大鼠模型。正常组同法注射生理盐水。

1.2.2 T 细胞增殖检测 无菌取大鼠胸腺, 常规方法制备正常和 AA 大鼠 T 淋巴细胞悬液(1 × 10⁷/ml), 分别将细胞铺于 96 孔板中, 每孔加入 50 μl 细胞悬液, AA 大鼠的 T 淋巴细胞用不同浓度的 CK(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 以及糖皮质激素受体(GR) 拮抗剂(RU486 10 μmol/L) 预处理后加 ConA(终浓度 5 mg/L), 终体积为 100 μl, 设复孔, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 诱导 T 淋巴细胞增殖。终止培养前 3 h, 每孔加入 10 μl CCK, 酶标仪检测 450 nm 吸光度值。

1.2.3 T 细胞的纯化 正常大鼠和 AA 大鼠处死后, 剪下大鼠的脾脏, 进行破碎处理并使用 70 μm 的尼龙网获得脾脏的单细胞悬液, 室温静置 2 min 以除去其中的红细胞。细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 洗 2 遍并离心(1 500 r/min 8 min)。弃去上清液并重悬于 10% 胎牛血清(FBS) RPMI-1640 中以调节细胞浓度至 2 × 10⁸/ml。细胞通过尼龙柱分选 T 淋巴细胞。将超净台内垂直固定的尼龙柱下端连接变速开关, 加 20 ml 预热的无血清 RPMI-1640 平衡, 之后加预热的 15 ml 含 5% FBS 的 RPMI-1640 平衡。关闭开关, 加入 2 ml 以上制备好的细胞悬液, 慢慢打开开关, 待细胞悬液

全部进入尼龙柱, 关闭开关, 加入 1 ml 含 5% FBS 的 RPMI-1640, 盖上无菌容器, 37 °C 孵育 60 min。温育结束后, 打开开关, 加入 20 ml 预热的 5% FBS 的 RPMI-1640, 通过重力作用洗脱柱中的细胞, 收集流出的细胞即为 T 细胞(回收率约为 20%)。用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液制备细胞悬液(1 × 10⁶ 细胞/ml), 备用。

1.2.4 成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS) 的培养 AA 大鼠处死, 在 0.1% 苯扎溴铵溶液中浸泡 5 min 灭菌。在膝关节纵行切开皮肤, 肌肉、关节囊滑膜和纤维层分离, 暴露出滑膜组织。无菌取双侧膝关节滑膜组织, 剔除脂肪和纤维, 用含双抗(100 IU/ml 青霉素, 100 IU/ml 链霉素)的 PBS 反复冲洗后切成 1~2 mm³ 小块, 均匀排列在细胞培养瓶底壁(用含有 20% FBS 的 DMEM 培养基预先润湿), 将培养瓶底部向上在 5% CO₂ 培养箱中于 37 °C 温育 3 h。待细胞黏附在壁上后, 轻轻将培养瓶翻正(底部向下), 培养基刚刚覆盖组织块, 每隔 2~3 d 换 1 次培养基, 观察培养基颜色和细胞形态的变化, 得到大量的成纤维细胞后轻轻去除组织块, 继续培养至细胞生长至 80% 左右, 用含乙二胺四乙酸(EDTA)的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并传代培养, 取第 3 代 FLS 进行实验。

1.2.5 树突状细胞(dendritic cell, DC) 培养 取正常大鼠和 AA 大鼠股骨及胫骨, 在超净台中将两端骨髓剪去暴露出骨髓腔, RPMI-1640 培养基洗涤骨髓腔, 过 200 目纱网, 离心收集骨髓细胞, 接种于 6 孔板(2 × 10⁶ 个细胞/孔), 将 6 孔板在培养箱温育 2~3 h 后弃去上清液。沿着壁缓慢加入 2 ml 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, AA 大鼠骨髓细胞中加入细胞因子 GM-CSF 和 IL-4 终浓度均为 20 ng/ml, 置于培养箱中继续培养; 48 h 后半量换液, 并加入足量的细胞因子。第 6 天收集悬浮细胞作为未成熟 DC, 并用脂多糖(LPS)(终浓度 100 ng/ml) 刺激 24 h。第 7 天收集的细胞为成熟的 DC。

1.2.6 DC 成熟试验 AADC 中加入 CK(1 μmol/L) 和 RU486(10 μmol/L), 在培养箱中培养 24 h 后, 加入抗 CD40、CD80、CD86 和 MHC II 荧光抗体, 并设同型对照组。贝克曼(Beckman) 流式细胞仪检测这些分子的表达以反映 DC 的成熟。

1.2.7 T 细胞与 FLS 共培养 AA 大鼠 FLS 加入 CK(1 μmol/L) 以及 RU486(10 μmol/L) 预处理 6 h, 收集细胞, 离心(2 000 r/min, 10 min), 以 300 μl DMEM 培养液重悬, 与正常大鼠 T 细胞共培养,

FLS : T细胞的数量为 1 : 20 ,Beckman 流式细胞仪检测 T 细胞表面 CD25 的表达 ,并设同型对照组。

1.2.8 T 细胞和 DC 共培养 用 CK(1 μmol/L) 和 RU486(10 μmol/L) 预处理 AA 大鼠的 DC ,与正常大鼠 T 细胞共培养 ,按 DC : T 细胞的数量为 1 : 20。Beckman 流式细胞仪检测 T 细胞表面 CD25 的表达 ,反映 DC 活化 T 细胞能力 ,并设同型对照组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行分析 ,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用方差分析 , $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CK 对 ConA 诱导的 AA 大鼠 T 细胞增殖的影响 ConA 诱导的 AA 大鼠 T 细胞增殖反应 (0.636 ± 0.175) 较正常大鼠 T 细胞增殖反应 (0.477 ± 0.042) 明显增高。CK (10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L) 体外给药能明显抑制

AA 大鼠 T 细胞的增殖 ,GR 拮抗剂 RU486 (10 μmol/L) 可以阻断 CK (10、100 nmol/L) 的作用 ,各组间差异有统计学意义 ($F = 2.19, P < 0.05$) ,提示 CK 对 T 细胞增殖的抑制作用可能与 GR 的活化有关 ;然而 ,GR 拮抗剂 RU486 (1、10 μmol/L) 对 CK (1、10 μmol/L) 引起的 T 细胞的增殖的抑制作用没有影响 ,提示除了活化 GR 以外 ,高浓度的 CK 可能还通过其他途径抑制 T 细胞的增殖(图 1)。

2.2 CK 对 AA 大鼠 FLS 诱导 T 细胞活化的影响 AA 大鼠 FLS 与分离纯化的正常 T 细胞进行共培养 ,流式结果显示 T 细胞表面 CD25 的表达增加 ($3\ 396.5 \pm 144.957$) ,AA 大鼠 FLS 加入 CK(1 μmol/L) 后与分离纯化的 T 细胞进行共培养 ,结果显示 T 细胞表面 CD25 的表达明显减少 ($2\ 889.6 \pm 214.183$) ,而 GR 拮抗剂 RU486(10 μmol/L) 可以阻断 CK 对 T 细胞活化的抑制作用 ($3\ 435.3 \pm 271.482$) ,各组间差异有统计学意义 ($F = 2.19, P < 0.05$) (图 2)。

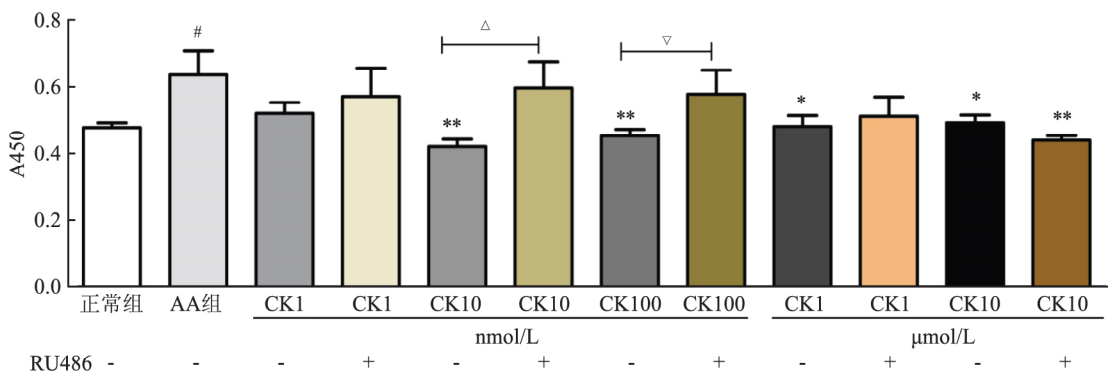


图 1 CK 对 AA 大鼠 T 细胞增殖的影响

与正常组比较: # $P < 0.05$; 与 AA 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CK 10 nmol/L 组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 CK 100 nmol/L 组比较: $\nabla P < 0.05$

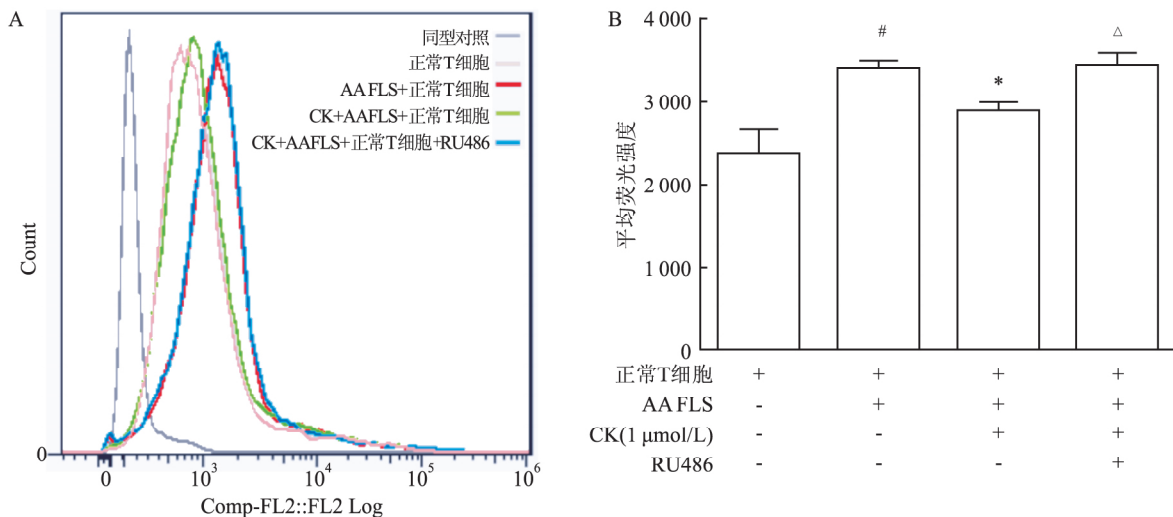


图 2 CK 对 AA 大鼠滑膜细胞诱导正常 T 细胞活化的影响

A: 流式细胞术测定 T 细胞表面 CD25; B: 各组平均荧光强度; 与正常 T 细胞比较: # $P < 0.05$; 与 AA FLS + 正常 T 细胞比较: * $P < 0.05$; 与 CK + AA FLS + 正常 T 细胞比较: $\Delta P < 0.05$

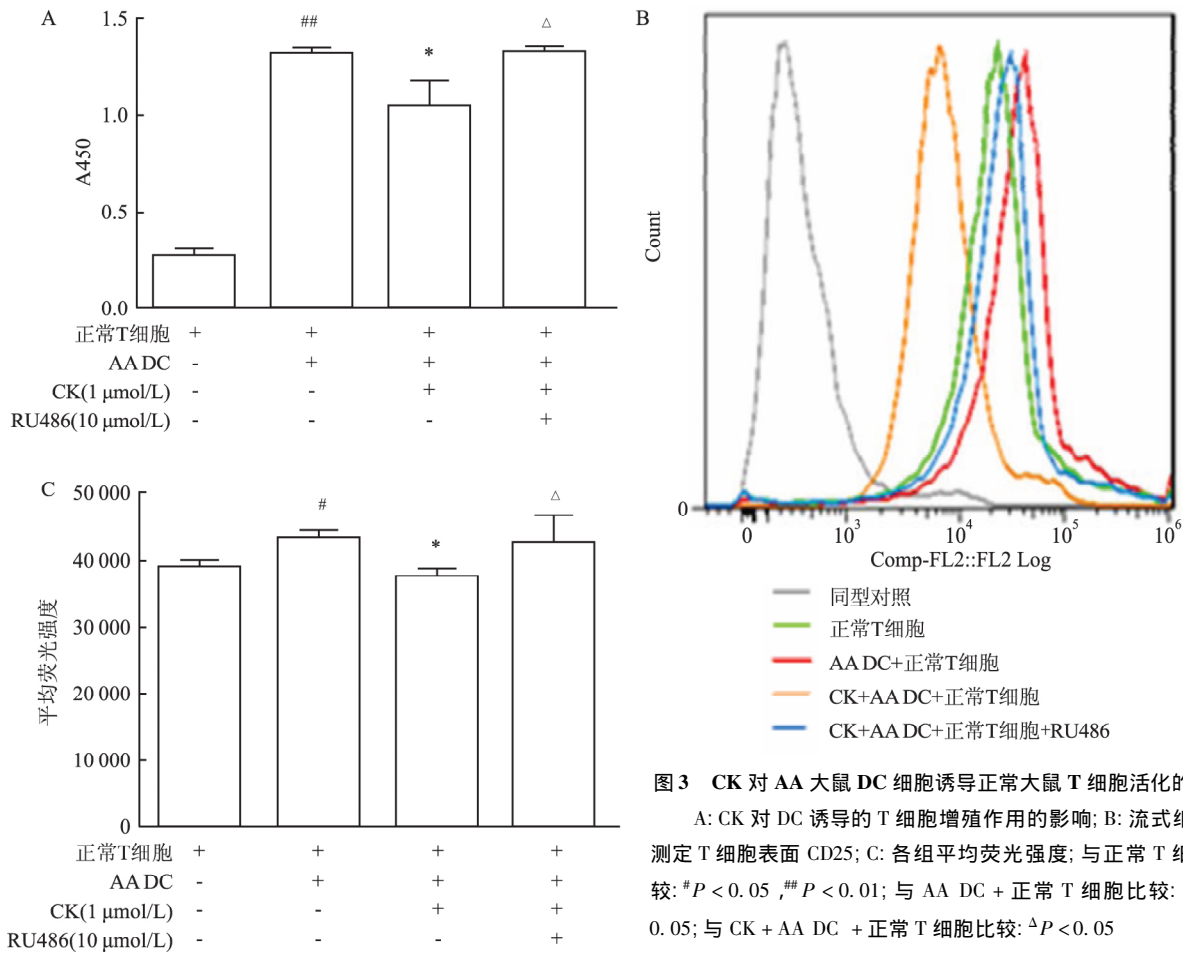


图3 CK对AA大鼠DC细胞诱导正常大鼠T细胞活化的影响
 A: CK对DC诱导的T细胞增殖作用的影响; B: 流式细胞术测定T细胞表面CD25; C: 各组平均荧光强度; 与正常T细胞比较: [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; 与AA DC + 正常T细胞比较: ^{*}*P* < 0.05; 与CK + AA DC + 正常T细胞比较: [△]*P* < 0.05

2.3 CK对AA大鼠DC细胞诱导的大鼠T细胞活化的影响 AA大鼠的DC可以明显促进正常T细胞的增殖,诱导T细胞表面CD25的表达增加(1.317 ± 0.108),CK(1 μmol/L)体外作用于AA大鼠DC后与正常T细胞共培养,可以显著抑制DC诱导的T细胞的增殖作用(1.050 4 ± 0.399),各组间差异有统计学意义(*F* = 7.958, *P* < 0.05),减少DC诱导的T细胞表面CD25的表达,GR拮抗剂RU486(10 μmol/L)可以阻断CK(1 μmol/L)对DC诱导的T细胞的抑制作用(1.317 ± 0.137),各组间差异有统计学意义(*F* = 8.311, *P* < 0.05)(图3)。CK(1 μmol/L)体外给药能明显抑制AA大鼠DC细胞表面分子(CD40、CD80、CD86、MHC II)的表达,GR拮抗剂RU486(10 μmol/L)可以阻断CK(1 μmol/L)对上述分子(CD40、CD86)表达的抑制作用,各组间差异有统计学意义(CD40: *F* = 15.123, *P* < 0.05; CD86: *F* = 22.624, *P* < 0.05)(图4)。

3 讨论

人参皂苷是人参成分中最有效的药用成分,按

照骨架类型可分达玛烷型(包括原人参二醇型和原人参三醇型皂苷)和齐墩果型皂苷(R0、Rh3)两种。研究^[11-14]显示这些人参皂苷单体的抗炎作用与核受体及其介导的信号有关,包括过氧化物酶体增殖物激活受体、雌激素受体、GR、肝X受体、孤儿受体等,这些核受体与炎症和免疫密切相关,已经成为治疗炎症免疫性疾病的靶点。

糖皮质激素具有广泛的免疫抑制作用,可以通过多种免疫细胞发挥其免疫抑制作用,抑制效应T细胞的分化活化;提高Treg的数量,促进其功能;减少粒细胞数量;抑制树突细胞的分化以及炎症细胞因子的分泌;抑制巨噬细胞分泌;抑制B细胞分泌抗体。糖皮质激素具有强大的抗炎作用而被用于治疗炎症性疾病,也包括用于RA的治疗^[15]。糖皮质激素通过与GR结合、激活GR,GR进入细胞核内,通过结合靶基因序列,调节基因转录,还可以与胞质蛋白发生相互作用,发挥信号转导功能。CK在结构上具有类似糖皮质激素样的甾环结构,其抗炎免疫调节作用是否与核受体及其介导的信号有关?有文献报道^[10],CK可以与GR结合,诱导GR的活化。为

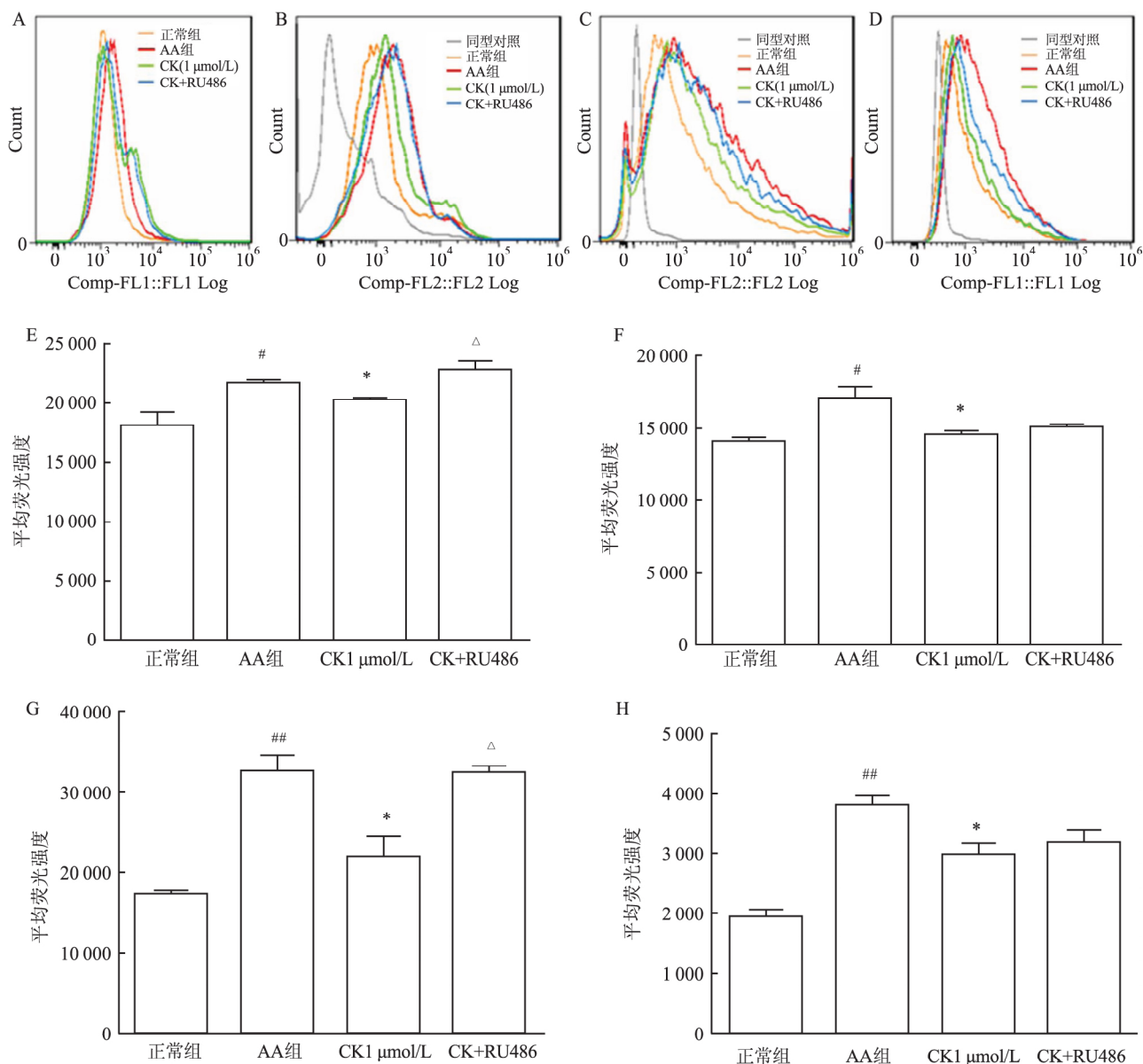


图4 CK对DC细胞成熟的影响

A、B、C、D: 分别为流式细胞术测定DC细胞表面分子CD40、CD80、CD86、MHC II的表达; E、F、G、H: 分别为CD40、CD80、CD86、MHC II平均荧光强度; 与正常组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与AA组比较: * $P < 0.05$; 与CK 1 μmol/L组比较: Δ $P < 0.05$

为了验证GR是否是CK作用的靶点,本研究利用GR的拮抗剂RU486对滑膜细胞、T细胞、DC细胞进行了探讨。

T细胞的异常激活是RA免疫异常的关键环节。T细胞活化、分化成效应T细胞,导致滑膜细胞的增殖以及骨质破坏。前期研究^[7-9]已经显示CK对AA和CIA异常的T细胞增殖和活化有抑制作用,CK可以下调共刺激分子CD28和TCR,上调共抑制分子CTLA4和PD1,减少T细胞表面CD25的表达和IL2的分泌;上调初始T细胞数量,下调活化T细胞数量,同时上调Treg的数量。而且CK可以

减少CCL21/CCR7介导的DC向淋巴结的迁移,减少DC提供的T细胞活化的共刺激信号,抑制T细胞的活化。本研究表明CK对AA异常的T细胞增殖的抑制作用,对T细胞表面活化分子CD25的表达的抑制作用,都可以被GR拮抗剂RU486阻断,这些结果提示CK对T细胞活化的抑制作用与活化GR有关,可能是GR依赖的。而且CK可以通过抑制FLS与T细胞的相互作用以及DC与T细胞的相互作用,从而抑制FLS或者DC诱导的T细胞活化,而且此作用与活化FLS以及DC的GR有关。

综上所述,CK可能通过多个环节发挥对T细

胞活化的抑制作用,包括直接抑制 T 细胞的活化,以及抑制 FLS 和 DC 对 T 细胞的活化,CK 的这些作用与 GR 的活化有关,GR 可能是 CK 发挥作用的靶点。本研究显示 GR 拮抗剂 RU486 对高浓度 CK (10 $\mu\text{mol/L}$) 引起的 T 细胞的增殖的抑制作用没有影响,提示除了活化 GR 以外,高浓度的 CK 可能还通过其他途径抑制 T 细胞的增殖。除 GR 以外,许多核受体与炎症和免疫的密切相关,已经成为治疗炎症免疫性疾病的靶点。这些核受体包括过氧化物增殖酶激活受体、肝 X 受体、雌激素受体、孤儿受体等。研究^[11-14]显示一些人参皂苷单体 Rb1、Re、Rf、Rg1、Rh1、Rh2、Rg3 的抗炎作用与过氧化物酶体增殖物激活受体、雌激素受体、GR 相关。CK 作为人参肠道内的主要降解产物,除了活化 GR 之外,是否也能通过其他核受体发挥作用,仍需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 熊 莺,李运曼.上调 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞在治疗类风湿性关节炎策略中的意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(9):1270-5.
- [2] Rodeghero R, Cao Y, Olalekan S A, et al. Location of CD4 + T cell priming regulates the differentiation of Th1 and Th17 cells and their contribution to arthritis [J]. *J Immunol*, 2013, 190(11): 5423-35.
- [3] Chang Y, Wu Y, Wang D, et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis *via* attenuating inflammatory responses [J]. *Rheumatology*, 2011, 50(5): 862-70.
- [4] Lundy S K, Sarkar S, Tesmer L A, et al. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis T lymphocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(1): 202.
- [5] Song S S, Huang B, Wang Q T, et al. BF02, a recombinant TNFR2 fusion protein, alleviates adjuvant arthritis by regulating T lymphocytes in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(3): 414-23.
- [6] Kim J S, Kim Y, Han S H, et al. Development and validation of

- an LC-MS/MS method for determination of compound K in human plasma and clinical application [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(1): 135-41.
- [7] Liu K K, Wang Q T, Yang S M, et al. Ginsenoside compound K suppresses the abnormal activation of T lymphocytes in mice with collagen-induced arthritis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(5): 599-612.
 - [8] Wu H, Chen J, Wang Q, et al. Ginsenoside metabolite compound K attenuates inflammatory responses of adjuvant-induced arthritis rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2014, 36(2): 124-9.
 - [9] Chen J, Wu H, Wang Q, et al. Ginsenoside metabolite compound K suppresses T-cell priming *via* modulation of dendritic cell trafficking and costimulatory signals, resulting in alleviation of collagen-induced arthritis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 353(1): 71-9.
 - [10] Yang C S, Ko S R, Cho B G, et al. The ginsenoside metabolite compound K, a novel agonist of glucocorticoid receptor, induces tolerance to endotoxin-induced lethal shock [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5A): 1739-53.
 - [11] Du J, Cheng B, Zhu X, et al. Ginsenoside Rg1, a novel glucocorticoid receptor agonist of plant origin, maintains glucocorticoid efficacy with reduced side effects [J]. *J Immunol*, 2011, 187(2): 942-50.
 - [12] Gao Y, Chu S, Li J, et al. Anti-inflammatory function of ginsenoside Rg1 on alcoholic hepatitis through glucocorticoid receptor related nuclear factor-kappa B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 231-40.
 - [13] Chan L S, Yue P Y, Kok T W, et al. Ginsenoside-Rb1 promotes adipogenesis through regulation of PPAR γ and microRNA-27b [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44(11): 819-24.
 - [14] Cho J, Park W, Lee S, et al. Ginsenoside-Rb1 from *Panax ginseng* C. A. Meyer activates estrogen receptor- α and - β , independent of ligand binding [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(7): 3510-5.
 - [15] Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 120(2-3): 69-75.

Ginsenoside compound K suppresses the activation of T lymphocytes in rats with adjuvant-induced arthritis *via* activating glucocorticoid receptor

Si Min, Chen Jingyu, Ma Yang, et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of CK on the activation of T cells and its mechanism.

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.018.html

特立氟胺微乳的制备及其体外透皮吸收研究

王东^{1,2}, 曹雅茹¹, 金涌¹, 程节玲¹, 颜传文¹

摘要 目的 制备特立氟胺微乳,考察其体外经皮渗透性能。方法 基于伪三元相图,以形成微乳的区域面积大小确定微乳最佳处方比,制备特立氟胺微乳并考察其稳定性;利用 Franz 扩散池,进行离体鼠皮的透皮实验。比较 0.1%、0.25% 特立氟胺微乳与 0.1% 特立氟胺普通乳剂、水溶液的单位面积累积渗透量(Q_n)。结果 微乳的最佳处方比为肉豆蔻酸异丙酯:大豆磷脂:无水乙醇:双蒸水=42.12:21.06:21.06:15.76。制备的微乳圆整,稳定性好,平均粒径在(35.18±0.28) nm,分布集中。4种样品的 Q_{24h} 分别为157.82、357.76、65.15、17.27 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。结论 制备的特立氟胺微乳稳定性好,粒径适宜,经皮吸收作用强,有望制备其外用微乳制剂用于临床。

关键词 特立氟胺;伪三元相图;微乳;透皮吸收

中图分类号 R 944.7; R 945

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1573-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.018

特立氟胺(teriflunomide, TEF)是类风湿关节炎治疗药物来氟米特(leflunomide, LEF)在体内的活性代谢物。LEF通过体内生成 TEF 而抑制二氢乳酸脱氢酶(DHODH),阻碍来自淋巴细胞的嘧啶生成,干扰酪氨酸脱氢酶的活性。LEF 由于其严重的肝损害,2010年美国FDA予以黑框警告。2012年特立氟胺口服制剂Aubagio在美国上市,上市后患者因无法耐受胃肠道反应和肝毒性而停止服药。FDA已对Aubagio致严重肝损伤风险予黑框警告。因此如何能减轻或避免 TEF 肝损害的研究具有重要意义。微乳(microemulsion, ME)是由四相(油相、水相、乳化剂和助乳化剂)组成的,具有澄清透明、黏度低、热力学稳定和各向同性等特点的油水混合体系。其粒径介于10~100 nm,制备程序简单,操作方便,无需特殊设备,可通过过滤除菌^[1-3]。外

2018-04-25 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2013A153)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032²铜陵市人民医院药学部,铜陵 244000

作者简介:王东,男,硕士研究生;

金涌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: jinyong

@ahmu.edu.cn

Methods Complete Freund's adjuvant(CFA) was used to induce adjuvant arthritis(AA). T cells from normal and AA rats were isolated and purified. Fibroblast-like synoviocyte(FLS) and bone marrow-derived dendritic cells(DC) from AA rats were isolated and cultured *in vitro*, conA, FLS, DCs were used to induce T cells activation. Pretreatment with different concentrations of ginsenoside CK(1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) and glucocorticoid receptor(GR) antagonist(RU486 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Cell counting kit-8(CCK) was used to assay the proliferation of T cells. The expression of CD25 on T cells and surface markers(CD40, CD80, CD86, MHC II) of DCs were detected by flow cytometry. **Results** *In vitro* administration of CK(10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) significantly inhibited the proliferation of AA rat T lymphocytes induced by conA. GR antagonist RU486 could reverse the effect of CK(10 nmol/L, 100 nmol/L), but had no effect on the inhibitory effect of CK(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$). FLS and DC of AA rats induced the expression of CD25 on the surface of T lymphocytes in normal rats. CK(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) pretreated FLS and DC of AA rats co-cultured with isolated and purified normal rat T cells, the expression of CD25 on T cells was significantly reduced, while RU486 blocked the effect of CK(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$). CK(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) significantly inhibited the expression of CD40, CD80, CD86 and MHC II on the surface of DC, and these effects(the inhibited effect of CD40, CD86) could be reversed by RU486. **Conclusion** CK exert its inhibitory effect on T cells activation in different way including direct inhibition of T cell activation and suppression of T cell activation induced by FLS and DC. These effects of CK are related to the activation of GR, and GR may be one of the targets of CK.

Key words ginsenoside compound K; adjuvant-induced arthritis; T cell activation; glucocorticoid receptor