

伪石蒜碱抑制活化 T 细胞增殖与功能的机制研究

吴利红^a, 邓弘仙^a, 张云惠^a, 黄玲^b, 范诗逸^b, 蒋海静^c, 赖翼^c, 罗兴燕^d, 刘阳^d, 杨淑霞^{d*}(成都医学院, a.药学院, b.临床医学院, c.检验医学院, d.科研中心, 成都 610500)

摘要: 目的 探究伪石蒜碱抑制活化 T 细胞增殖与功能的机制。方法 密度梯度离心法和免疫磁珠法分离纯化 T 细胞, 抗 CD3/CD28 或植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA)活化 T 细胞。流式细胞术检测细胞增殖、细胞凋亡、CD25 表达及细胞周期; ELISA 检测细胞因子 IL-2、IL-6、IL-17A、IFN- γ 的分泌水平。结果 伪石蒜碱抑制抗 CD3/CD28 或 PHA 活化 T 细胞增殖, IC_{50} 分别为 $(0.97\pm 0.22) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(0.82\pm 0.07) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在完全抑制活化 T 细胞增殖的浓度下, 伪石蒜碱不诱导活化 T 细胞凋亡, 且不对静息 T 细胞的细胞活力产生显著影响。伪石蒜碱不影响活化 T 细胞表达 CD25 和分泌 IL-2, 但阻滞细胞周期于 G0/G1 期。伪石蒜碱显著抑制 IL-6、IL-17A、IFN- γ 的分泌。结论 伪石蒜碱不影响 T 细胞的活化, 但通过阻滞细胞周期于 G0/G1 期抑制活化 T 细胞的增殖, 提示伪石蒜碱有望成为先导化合物用于开发新型免疫抑制剂。

关键词: 免疫抑制剂; T 细胞增殖; 伪石蒜碱; 细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)15-1818-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.004

引用本文: 吴利红, 邓弘仙, 张云惠, 等. 伪石蒜碱抑制活化 T 细胞增殖与功能的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1818-1824.

Study on the Mechanism of Pseudolycorine Inhibiting the Proliferation and Function of Activated T Cell

WU Lihong^a, DENG Hongxian^a, ZHANG Yunhui^a, HUANG Ling^b, FAN Shiyi^b, JIANG Haijing^c, LAI Yi^c, LUO Xingyan^d, LIU Yang^d, YANG Shuxia^{d*}(Chengdu Medical College, a.School of Pharmacy, b.School of Clinical Medicine, c.School of Laboratory Medicine, d.Research Center, Chengdu 610500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the inhibitory effects of pseudolycorine on activated T cell proliferation and its mechanism. **METHODS** Human T cells were isolated and purified by density gradient centrifugation and the immunomagnetic microbeads, and activated by anti-CD3/CD28 mAbs or phytohemagglutinin(PHA). Cell proliferation, apoptosis, CD25 expression and cell cycle were detected by flow cytometry. Level of cytokines IL-2, IL-6, IL-17A and IFN- γ were measured by ELISA. **RESULTS** Pseudolycorine inhibited human T cell proliferation with anti-CD3/CD28 mAbs stimulation with an IC_{50} value of $(0.97\pm 0.22) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and PHA stimulation with an IC_{50} value of $(0.82\pm 0.07) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Pseudolycorine did not induce apoptosis of activated T cells and had no significant effect on the cell viability of resting T cells with the same concentration of inhibiting activated T cell proliferation. Pseudolycorine did not affect CD25 and IL-2 expression, but induced cell cycle arrest in G0/G1 phase. Pseudolycorine significantly inhibited IL-6, IL-17 and IFN- γ expression. **CONCLUSION** Pseudolycorine does not affect the activation of T cells, but inhibits the proliferation of T cells by blocking the cell cycle in G0/G1 phase. Pseudolycorine represents a potential lead compound for the design and development of new immunosuppressive drugs.

KEYWORDS: immunosuppressant; T cell proliferation; pseudolycorine; cytokines

T 细胞是特异性免疫中发挥重要功能的免疫细胞, 其正常的增殖、分化在机体免疫监视、防御中起关键作用。但 T 细胞的异常增殖、分化可能导致移植器官排斥反应或自身免疫性疾病, 如类风湿性关节炎^[1]、系统性红斑狼疮^[2]、多发性硬化症^[3]和溃疡性结肠炎^[4]等。抑制 T 细胞的活化和增殖可以调节 T 细胞介导的自身免疫反应。当前临床使

用的免疫抑制剂有环孢菌素 A、环磷酰胺、他克莫司、雷帕霉素等。由于自身免疫性疾病的发病机制与致病因素存在多样性, 并且患者存在个体差异, 对药物的敏感度和耐受性不同。因此, 现有的免疫抑制剂并非对所有患者均有效。继续探索新型免疫抑制剂并探究其作用靶点将为患者带来新的选择和希望。

基金项目: 四川省教育厅科研计划重点项目(18ZA0143); 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室开放项目(P2018-KF03); 成都医学院国家级、省级大学生创新创业训练计划项目(201913705049)

作者简介: 吴利红, 女 Tel: 15881817534 E-mail: 1726121672@qq.com **通信作者:** 杨淑霞, 女, 高级实验师 Tel: (028)62739161 E-mail: Shuxia@126.com

本实验室已建立了结合流式细胞术在细胞水平进行免疫抑制活性高通量筛选的技术平台,可以从植物、中药、微生物代谢产物及合成化合物库中筛选具有免疫抑制活性的小分子化合物。通过前期免疫抑制活性筛选,发现了一系列对 T 细胞增殖活性有显著抑制作用的化合物,如 BD750^[5]、PO-291^[6]等。

伪石蒜碱是石蒜科植物水仙(*Narcissus tazetta* L.var. *chinensis* Roem)及石蒜(*Lycoris radiata* Herb)中的一种生物碱^[7]。伪石蒜碱对 DNA 和蛋白质的合成具有抑制作用^[8-9],已被证明具有良好的生物活性,如抗疟原虫活性^[10]、抗病毒活性与抗肿瘤活性^[11-13]、抗有丝分裂活性^[14]等。但是,关于伪石蒜碱的免疫抑制活性还未见报道,通过 T 细胞增殖抑制活性筛选,发现伪石蒜碱对活化 T 细胞增殖具有显著的抑制作用,且对静息 T 细胞无显著细胞毒性,其结构不同于已发现的和应用于临床的小分子免疫抑制剂。本实验考察伪石蒜碱的生物学效应,探索其作用机制将为其发展为免疫抑制剂的先导化合物提供重要依据。

1 仪器与试剂

Quanteon 四激光 25 色艾森 NovoCyte 流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司]; PowerWave XS2 酶联免疫检测仪(美国 BioTek 公司); II 级 A2 型生物安全柜、3111 型 5% CO₂ 培养箱、Sorvall Lengend Micro17 型小型台式离心机均来自美国 Thermo 公司; AE2000LED 型倒置相差显微镜(日本 Olympus)。

伪石蒜碱、植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA)、雷帕霉素、碘化丙啶(propidium iodide, PI)均来自美国 Sigma-Aldrich; FBS 液(美国 Gibco 公司); LY294002(美国 Promega 公司); RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号: AD23107271); 抗人 CD3/CD28 Functional Grade Purified(Anti-CD3/CD28 mAbs)、抗人 CD25-PE-cy、人细胞因子 IL-2、IL-6、IL-17A 和 IFN- γ 酶联检测试剂盒(美国 eBioscience 公司,批号分别为 1986553, 2003211, 1820837, 0416AFC12 I1317, 040916AFC K1915, 1109AFC84 H2013, 0215AFC27 J2615); 5-羧基荧光素乙酰乙酸(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE, 美国 Invitrogen 公司,批号: B258747); 人淋巴细胞分离液(挪威 Axis-Shield POC 公司,批号: 71769262); 人 T 细胞 MACS 磁珠分离试剂盒(德国 Miltenyl Biotec,批号: 5170711130); 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(南京凯

基生物公司,批号分别为 20190302, 20181108)。

2 方法

2.1 分离人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)和纯化 T 细胞

PBMC 来源于健康人捐赠。密度梯度离心法分离 PBMC: 将采集的外周血与 PBS 混匀后,倾斜 45°贴壁缓缓加入到已预先加入人淋巴细胞分离液的玻璃离心管中,三者比例为 1:1:1,室温下 600 \times g 离心 20 min,分离出中间乳白色层,采用含 1% FBS 的 RPMI-1640 不完全培养基重悬离心(300 \times g 离心 10 min),重复洗涤 2 次。用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基重悬 PBMC。使用人 T 细胞 MACS 磁珠分离试剂盒阴性分选出 T 细胞。分选后,通过流式细胞仪结合 PE-anti-CD3 染色对 T 细胞进行检测。此时细胞纯度达到 95%,可用于后续实验^[15]。

2.2 CFSE 标记分析

根据文献[16]中的实验方法,采用 CFSE 结合流式细胞术检测细胞的增殖情况。向人 T 细胞悬液中加入浓度为 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CFSE,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,孵育后用 PBS 离心洗涤 2 次,并重悬于含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基中。将被标记好的静息 T 细胞加入预先包被好抗 CD3(2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)并含可溶性抗 CD28(1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的微孔板进行活化。采用浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PHA 对等数量数的 T 细胞进行活化。在与不同浓度的伪石蒜碱(0, 0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共同培养 96 h 后,经流式细胞术检测分别由抗 CD3/CD28 和 PHA 活化的 T 细胞的增殖情况。不活化且不加药的 T 细胞作为阴性对照(0%),活化而不加药的 T 细胞作为阳性对照(100%)。

2.3 细胞毒性分析

静息的 T 细胞($2\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$),与不同浓度的伪石蒜碱(0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共培养 48 h,采用流式细胞术观察细胞的存活率。

2.4 细胞凋亡分析

采用 Annexin V 和 PI 双染试剂盒检测伪石蒜碱对活化 T 细胞凋亡的影响。不同浓度伪石蒜碱(0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、LY294002(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于经抗 CD3(2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和抗 CD28(1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)活化的 T 细胞($2\times 10^6\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$)。培养 24, 48 h 后收集细胞至 1.5 mL EP 管中,2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后去除上清,再加入 200 μL PBS 清洗细胞,同样采取 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后去除上清。向 EP

管中加入 200 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 再加入 2 μL Annexin V-FITC 混匀后加入 2 μL PI 混匀, 室温避光反应 5~15 min 后通过流式细胞术对细胞凋亡情况进行分析。

2.5 CD25 的表达

伪石蒜碱(0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、LY294002 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于抗 CD3(2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和抗 CD28 (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)活化的 T 细胞($2\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$)。培养 48 h 后收集细胞至 1.5 mL EP 管中, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后去除上清, 再加入 200 μL PBS 清洗细胞, 同样采取 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后去除上清。按照每个 EP 管中应加入 20 μL PBS 和 0.5 μL CD25 的比例加入配制液, 室温避光反应 30 min 后, 再加入 180 μL PBS, 通过流式细胞术分析 T 细胞 CD25 的表达情况。

2.6 细胞周期分析

伪石蒜碱(0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、雷帕霉素 (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于抗 CD3(2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和抗 CD28 (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)活化的 T 细胞($2\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$)。72 h 后收集细胞, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后去除上清, 再洗涤细胞 1 次, 去除 PBS, 向每样本中加入 500 μL 70%乙醇固定细胞, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。离心去除乙醇并清洗细胞, 每样本加入 200 μL PI/RNase A 染色工作液(PI : RNase=1 : 9), 室温避光 30 min 后, 采用流式细胞术对细胞进行分析。

2.7 细胞因子酶联免疫吸附分析

伪石蒜碱(0, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、LY294002 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于抗 CD3(2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和抗 CD28

(1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)活化的 T 细胞($2\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$)。双抗夹心法酶联免疫吸附试验检测 24 h 上清 IL-2 的分泌水平, 以及 48 h 上清中 IL-6、IL-17A、IFN- γ 的分泌水平。

2.8 统计学分析

结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 6 计算出药物的增殖抑制 IC_{50} (药物减少一半细胞增殖的浓度)。单因素方差分析法和 Dunnet t 检验法分析组间差异。

3 结果

3.1 伪石蒜碱体外抑制 T 细胞增殖且无明显毒性

用 anti-CD3/CD28 活化 T 细胞, 当伪石蒜碱浓度为 0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, T 细胞的增殖情况与 OA 相近, 且随着伪石蒜碱浓度的增加, 对 T 细胞的抑制作用增强, 当浓度为 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, T 细胞的增殖情况与 UA 一致, 表现了伪石蒜碱的显著抑制作用。并且随着伪石蒜碱浓度的增加, 用 anti-CD3/CD28 和 PHA 活化 T 细胞的增殖比例显著降低, 说明伪石蒜碱对这 2 种诱导活化的 T 细胞增殖均有显著抑制作用, IC_{50} 分别为(0.97 \pm 0.22) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(0.82 \pm 0.07) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果见图 1。

采用 PI/Annexin V 染色分析检测伪石蒜碱诱导活化 T 细胞的凋亡情况, 结果显示, 在 24, 48 h, 随着伪石蒜碱浓度的增加, 活化 T 细胞的凋亡比例均无明显变化, 结果见图 2。并且不同浓度伪石蒜碱作用静息 T 细胞后, 其细胞存活率均与未加伪石蒜碱的 T 细胞一致, 结果见图 3。综上所述, 伪石蒜碱对诱导活化 T 细胞凋亡无明显作用且无明显细胞毒性。

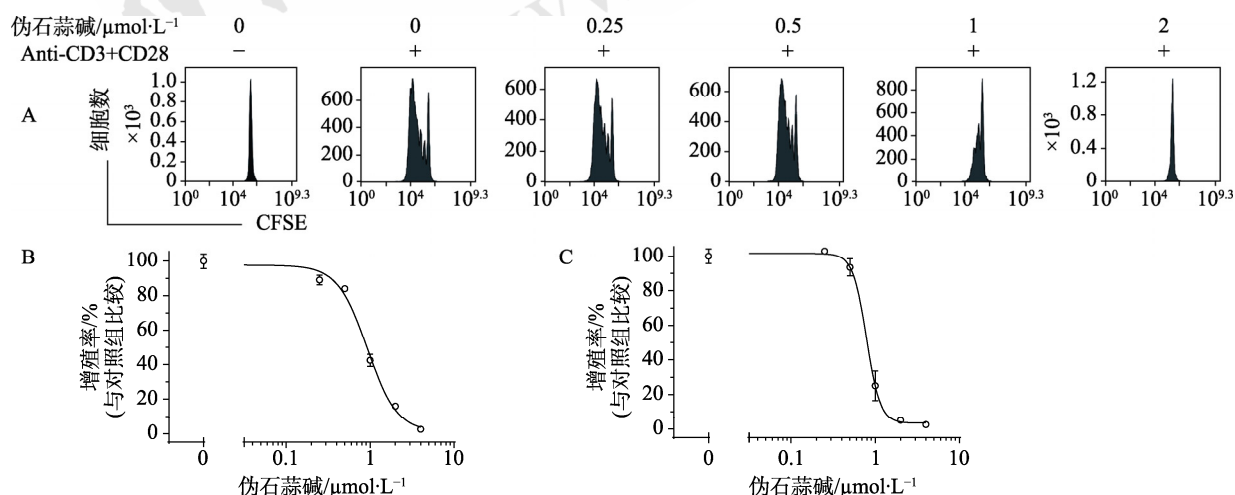


图 1 伪石蒜碱对 anti-CD3/CD28 抗体和 PHA 诱导活化 T 细胞的增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

A—anti-CD3/CD28 mAbs 诱导人活化的 T 细胞增殖水平; B—anti-CD3/CD28 mAbs 诱导活化 T 细胞增殖指数; C—PHA 诱导活化 T 细胞增殖指数。

Fig. 1 Effect of pseudolycorine on the proliferation of T cells stimulated by anti-CD3/anti-CD28 mAbs and PHA($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

A—proliferation level of T cells were induced by anti-CD3/CD28 mAbs; B—proliferation index T cells were induced by anti-CD3/CD28 mAbs; C—proliferation index T cells were activated with PHA.

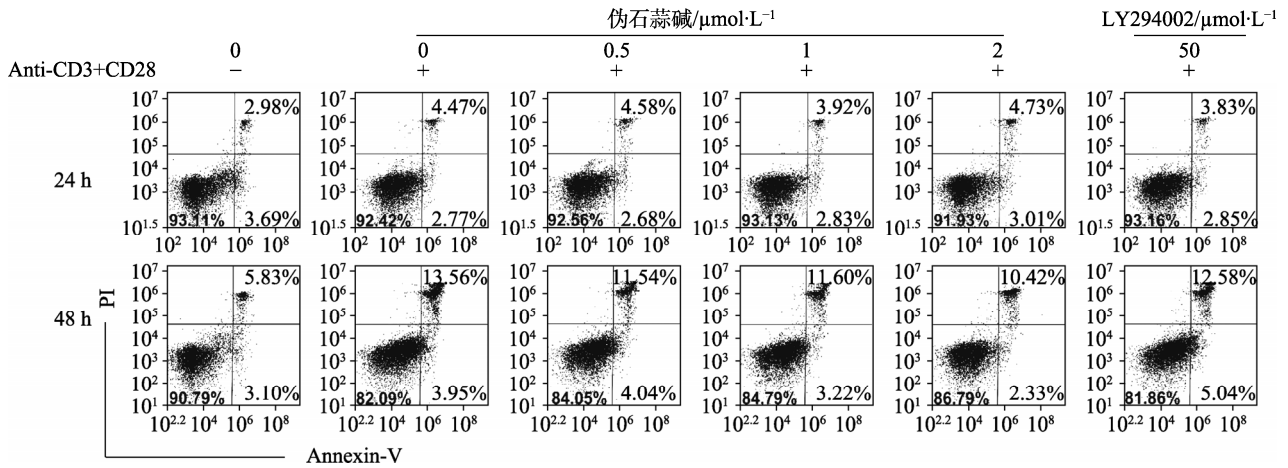


图2 流式细胞术结合 Annexin V/PI 染色分析检测伪石蒜碱作用于人活化 T 细胞后的细胞凋亡情况
 Fig. 2 Apoptosis of human activated T cells treated with pseudolycorine by flow cytometry with Annexin V and PI dual staining

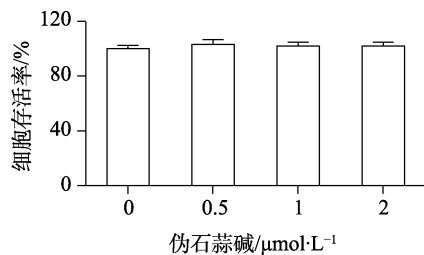


图3 伪石蒜碱作用于静息 T 细胞后的细胞存活率情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 2 Cell viability rate of resting T cells treated with pseudolycorine ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 伪石蒜碱对 T 细胞的活化无抑制作用

LY294002 是特异性 PI3K 激酶抑制剂, 对 T 细胞具有良好的抑制作用^[17]。流式细胞术检测结

果显示, LY294002 显著抑制 T 细胞 CD25 的表达; 与 LY294002 不同的是, 伪石蒜碱在完全抑制 T 细胞增殖的浓度内不影响 CD25 的表达, 同时伪石蒜碱不影响 T 细胞的 IL-2 分泌水平, 这说明伪石蒜碱对 T 细胞的活化无明显抑制作用, 结果见图 4。

3.3 伪石蒜碱诱导 T 细胞周期阻滞于 G0/G1 期

目前上市免疫抑制剂(如雷帕霉素)作用机制是通过阻滞 T 细胞周期于 G0/G1 期, 达到抑制 T 细胞的增殖作用。流式细胞术检测 T 细胞内 DNA 在各细胞周期的含量结果显示, 伪石蒜碱与雷帕霉素作用于 T 细胞的结果相似, 能将 T 细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 结果见图 5。

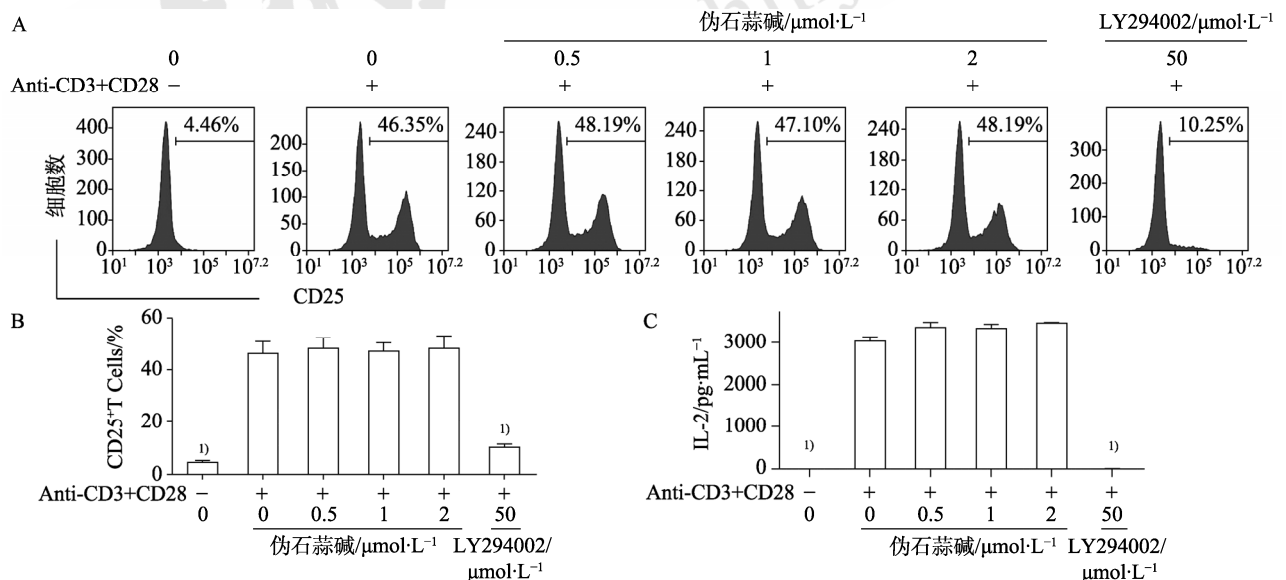


图4 伪石蒜碱和 LY294002 作用于抗 CD3/CD28 活化的 T 细胞表达情况及 IL-2 分泌情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 A-T 细胞表面分子 CD25 流式分析图; B-CD25 表达比例; C-ELISA 检测细胞上清中 IL-2 分泌水平; 与 0 μmol·L⁻¹ 伪石蒜碱比较, ¹⁾P<0.05。
 Fig. 4 Effect of pseudolycorine and LY294002 on the expression of anti-CD3/CD28 mAbs activated T cells and the secretion of IL-2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A-flow chart of T cell surface molecule CD25; B-CD25 scale diagram; C-the level of IL-2 in cell supernatant was assessed by ELISA; compared with 0 μmol·L⁻¹ pseudolycorine, ¹⁾P<0.05.

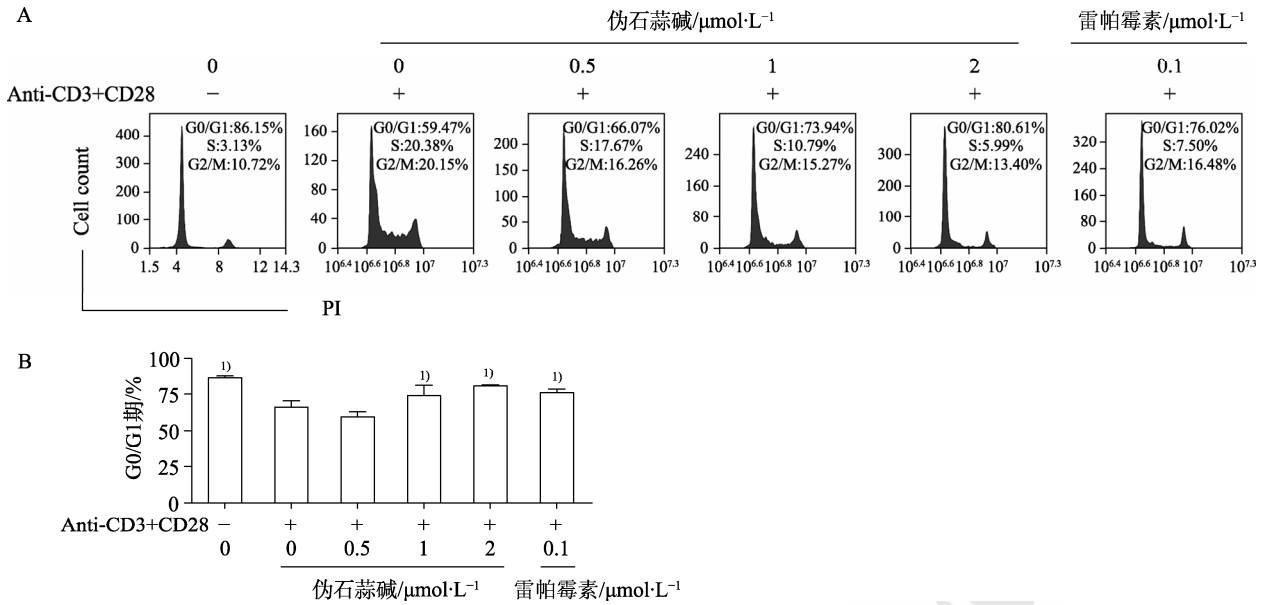


图5 流式细胞术检测伪石蒜碱和雷帕霉素作用于抗 CD3/CD28 活化的 T 细胞内 DNA 在各细胞周期的含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$) A-细胞周期分布情况; B-细胞周期 G0/G1 期比例; 与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 伪石蒜碱比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 5 DNA content in each cell phase of anti-CD3/CD28 mAbs activated T cells treated with pseudolycorine and rapamycin($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-distribution of cell phase; B-percentages of cells in the G0/G1 phase; compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pseudolycorine, $^{1)}P<0.05$.

3.4 伪石蒜碱抑制活化 T 细胞中促炎因子的产生

细胞因子与多种自身免疫性疾病的病理机制有关, 药物抑制促炎因子的分泌, 在改善自身免疫性疾病病症方面起着重要作用^[18]。采用双抗夹心法酶联免疫吸附试验检测活化 T 细胞上清液中

IL-2、IL-6、IL-17A、IFN- γ 的分泌水平, 结果显示, 伪石蒜碱对 IL-2 的分泌无影响, 但显著抑制 IL-6、IL-17A、IFN- γ 的产生, 并呈剂量依赖效应。表明伪石蒜碱能明显抑制 Th1、Th17 细胞释放促炎性细胞因子, 结果见图 6。

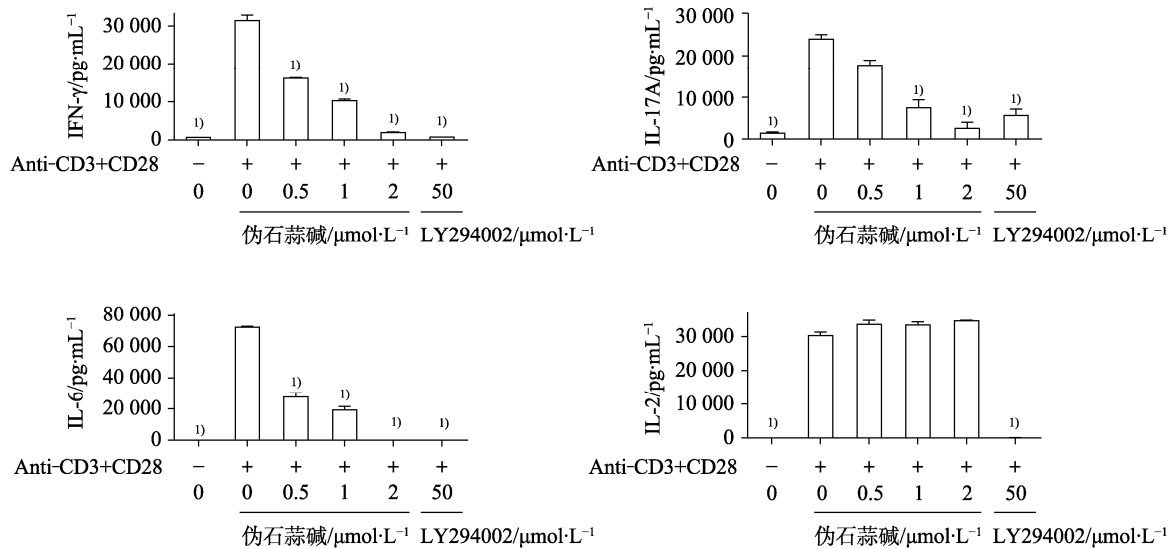


图6 伪石蒜碱和 LY294002 对抗 CD3/CD28 活化的 T 细胞的细胞因子分泌水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 伪石蒜碱比较, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 6 Effect of pseudolycorine and LY294002 on the levels of secretory factors of anti-CD3/CD28 mAbs activated T cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pseudolycorine, $^{1)}P<0.05$.

4 讨论

伪石蒜碱最初是由日本人近藤从红花石蒜中分离出来的生物碱，由上尾确定其化学结构，并发现伪石蒜碱与石蒜碱化学结构很相似^[19]。伪石蒜碱对多种病毒有抑制作用，如抗 HSV-1 活性，其作用机制可能与抑制 DNA 聚合酶活性、干扰病毒 DNA 的合成有关，伪石蒜碱能明显抑制艾氏腹水癌细胞、肺癌细胞、人食道鳞状癌细胞等的活性，可干扰 DNA 的模板功能，影响转录过程，抑制 RNA 的合成^[20-21]。此外伪石蒜碱对植物细胞的增殖分裂也有较强的抑制作用。

在前期实验中，通过对 T 细胞增殖抑制活性的高通量筛选，发现伪石蒜碱对 T 细胞具有显著的抑制作用。当浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，伪石蒜碱显示出对 T 细胞的抑制作用，但对肿瘤细胞无杀伤作用，因此，伪石蒜碱有较好的免疫抑制活性，且杀伤作用更小。自然界中绝大多数化合物当达到足够高的浓度，都会产生对 T 细胞的抑制效果，但这是由于化合物对细胞的毒性作用，而非免疫抑制活性。为了探究伪石蒜碱的具体作用机制，首先需要验证伪石蒜碱是否影响静息 T 细胞的存活，以及是否显著抑制抗 CD3/CD28 诱导 T 细胞活化增殖，再从细胞凋亡、细胞表面受体、细胞因子及细胞周期等方面探索伪石蒜碱对 T 细胞活化增殖的作用机制，为后续实验进一步探索伪石蒜碱作用于 T 细胞的具体信号通路和作用靶点提供先期条件。

IL-2 的分泌和 CD25 表面受体的表达是 T 细胞活化的重要标志，实验结果表明，伪石蒜碱对 T 细胞的 IL-2 分泌水平和 CD25 表达均无显著影响，提示伪石蒜碱可能作用于活化 T 细胞的增殖阶段。综合伪石蒜碱将 T 细胞的细胞周期阻滞于 G0/G1 期的结果分析，伪石蒜碱可能作用于已知的信号通路 JAK3-STAT5、PI3K-Akt 和 mTOR-p70S6K 或新的信号通路。本研究未验证伪石蒜碱作用于活化 T 细胞的具体信号通路和作用靶点，笔者下一步将探究伪石蒜碱对上述及其他信号通路的影响。

综上所述，伪石蒜碱不影响 T 细胞的活化，但通过将 T 细胞周期阻滞在 G0/G1 期，从而抑制 T 细胞的增殖。经典的免疫抑制剂如环孢霉素、他克莫司、雷帕霉素等，它们在治疗器官移植排斥反应和自身免疫性疾病方面效果显著，但也存在如肾脏毒性、肝脏毒性及神经毒性等不良反应。植物

药物的历史悠久，来源丰富，不良反应小，因此将其开发成新型免疫抑制剂是具有显著优势的。因此，伪石蒜碱有望作为先导化合物，为开发为疗效好、毒性小的新型免疫抑制剂提供新方向。

REFERENCES

- [1] YAO X M, CAO Y P, MA W K, et al. Elevated levels of Th17/regulatory T cells in peripheral blood are associated with disease activity of patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Cell Mol Immunol*(细胞与分子免疫学杂志), 2015, 31(1): 81-84.
- [2] OHL K, TENBROCK K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(2): 344-355.
- [3] CONSTANTINESCU C, GRAN B. The essential role of t cells in multiple sclerosis: A reappraisal [J]. *Biomed J*, 2014, 37(2): 34.
- [4] MA H Q, ZHAO X J, ZHANG H J. The expression of serum inflammatory markers and Th17/Treg cells in patients with ulcerative colitis and the clinical significance [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*(胃肠病学与肝病学杂志), 2018, 27(8): 885-890.
- [5] LIU Y, YANG T, LI H, et al. BD750, a benzothiazole derivative, inhibits T cell proliferation by affecting the JAK3/STAT5 signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(3): 632-643.
- [6] WANG S Y, XIONG J, ZHOU H, et al. Research on principle of benzoxazole derivative PO-291 inhibiting T cell proliferation [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2018, 34(7): 925-933.
- [7] DENG B Y, YE L, YIN H H, et al. Determination of pseudolycorine in the bulb of *Lycoris radiata* by capillary electrophoresis combined with online electrochemiluminescence using ultrasonic-assisted extraction [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(13/14): 927-932.
- [8] SCHRADER K K, AVOLIO F, ANDOLFI A, et al. Ungeremine and its hemisynthesized analogues as bactericides against *Flavobacterium columnare* [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(6): 1179-1183.
- [9] CAO R Q, FU T Z, ZHANG Z R. Inhibitory effect of pseudolycorine and pretazettine on cell Division and elongation [J]. *J Plant Physiol*(植物生理学报), 1979, 5(4): 417-419.
- [10] VAN GOIETSENOVEN G, ANDOLFI A, LALLEMAND B, et al. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(7): 1223-1227.
- [11] EVIDENTE A, KIRIEEV A S, JENKINS A R, et al. Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: Discovery of novel leads for anticancer drug design [J]. *Planta Med*, 2009, 75(5): 501-507.
- [12] JIMENEZ A, SANTOS A, ALONSO G, et al. Inhibitors of

- protein synthesis in eukaryotic cells: Comparative effects of some *Amaryllidaceae alkaloids* [J]. *Biochim et Biophys Acta BBA-Nucleic Acids Protein Synth*, 1976, 425(3): 342-348.
- [13] 孔祥彬, 潘启超, 陈秀英, 等. 伪石蒜碱抗癌作用原理的探讨[J]. *癌症*, 1983(3): 144.
- [14] BAEZ A, VAZQUEZ D. Binding of [3H]narciclasine to eukaryotic ribosomes A study on a structure-activity relationship [J]. *Biochim et Biophys Acta BBA-Nucleic Acids Protein Synth*, 1978, 518(1): 95-103.
- [15] GUO J, LOU Q Z, TIAN F, et al. A new approach of rapidly isolating lymphocytes from whole blood with immune magnetic beads for organ transplant flow cytometry cross-matching [J]. *Chin J Cell Stem Cell(Elec Ed)(中华细胞与干细胞杂志: 电子版)*, 2017, 7(3): 146-151.
- [16] LI M H, YANG P, YANG T, et al. A novel water-soluble benzothiazole derivative BD926 triggers ROS-mediated B lymphoma cell apoptosis via mitochondrial and endoplasmic Reticulum signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5): 2127-2134.
- [17] ZENG C, JIANG W, YANG X Y, et al. Pretreatment with total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. attenuates ischemia reperfusion-induced apoptosis [J]. *Sci Rep*, 8(1): 17491.
- [18] OPDENAKKER G, DAMME J V. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases [J]. *Immunol Today*, 1994, 15(3): 103-107.
- [19] 洪山海, 李静芳, 马广恩. 石蒜科生物碱的研究: IV.加兰他敏生产工艺及高含量植物的寻找[J]. *中国药学杂志*, 1979, 14(8): 372-373.
- [20] ZHANG C H, ZHU Q J, TIAN J Z. Progress in chemical constituents, bioactivities and clinical application of *Lycoris radiate* [J]. *Food Drug(食品与药品)*, 2017, 19(4): 298-301.
- [21] 常琳. 石蒜科植物生物碱抗肿瘤作用研究进展[J]. *黑龙江科技信息*, 2015(7): 95.

收稿日期: 2019-10-23
(本文责编: 蔡珊珊)

中国现代应用药学
http://www.chinjmap.com