

样品比例为 10 : 1, 0.05 mL · s⁻¹), 每次 1 周, 提取液颜色变浅判定为渗漉终点。过滤, 回收溶剂, 粗提物加水适量悬浮, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 萃取液浓缩成浸膏得石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位浸膏。取雄性小鼠 80 只, 随机分成正常对照组、病理模型对照组、水飞蓟素组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、水部位组、总浸膏组, 每组 10 只。正常对照组和病理模型对照组每天灌胃给予等体积 0.5% 吐温-80 溶液; 水飞蓟素组灌胃给予水飞蓟素, 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; 其他组给药剂量折算成生药材, 均 10 g · kg⁻¹ · d⁻¹。均连续给药 10 d。第 10 天给药后 1 h, 正常对照组腹腔注射等体积大豆油, 其他组腹腔注射 0.2% 四氯化碳 (CCl₄) 油溶液, 采血前禁食不禁水 12 h, 腹腔注射 24 h 后眼眶取血, 静置 2 h, 3 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血清。赖氏法^[4]测定血清 ALT 和 AST 活性。摘取肝脏, 10% 甲醛溶液固定, HE 染色, 病理切片检查。结果见表 1。

由表 1 可知, 病理模型对照组 ALT 与 AST 均明显高于正常对照组 (均 $P < 0.05$), 提示模型制备成功。与病理模型对照组比较, 水飞蓟素组 ALT 与 AST 显著降低 (均 $P < 0.05$)。与病理模型组比较, 小鼠灌胃给予楮头红正丁醇部位后, 血清 ALT、AST 明显降低 (均 $P < 0.05$), 且其作用与阳性对照药差异无显著性。因此判定, 正丁醇部位为楮头红抑制 CCl₄ 所致肝损伤转氨酶升高的药效活性部位。

光镜下观察, 病理模型组肝小叶结构破坏, 肝细胞索状排列不明显, 可见明显淤血。肝细胞明显肿胀, 脂肪变性多见。水飞蓟素组和正丁醇部位组可见病变较病理模型组明显减轻, 肝小叶结构基本正常, 细胞索状排列较整齐, 肝内淤血及细胞肿胀明显减轻, 可见少量灶状坏死。病理检查结果亦表明小鼠灌胃给予楮头红正丁醇部位对肝损伤小鼠肝脏有一定修复作用。

3 讨论

肝损伤是多因素参与的复杂病理过程, 在其病变过程中多种酶、自由基和脂质过氧化反应均发生较大变化。CCl₄ 经肝微粒体细胞色素 P₄₅₀ 酶激活后产生自

表 1 8 组小鼠 AST 与 ALT 测定结果

Tab. 1 The serum levels of AST and ALT in mice

组别	U · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s, n = 10$	
	AST	ALT
总浸膏组	734.06 ± 339.38 ^{*1}	323.89 ± 247.52 ^{*1}
石油醚部位组	1 026.25 ± 192.96	839.50 ± 302.42
乙酸乙酯部位组	1 089.57 ± 48.09	904.17 ± 555.30
正丁醇部位组	791.38 ± 360.89 ^{*1}	766.94 ± 659.14 ^{*1}
水部位组	1 156.16 ± 93.18	1 111.56 ± 424.67
水飞蓟素组	685.32 ± 213.21 ^{*1}	542.45 ± 245.61 ^{*1}
病理模型对照组	1 866.55 ± 251.15 ^{*2}	1 419.00 ± 202.02 ^{*2}
正常对照组	112.36 ± 6.79	33.52 ± 3.47

与病理模型对照组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与正常对照组比较, ^{*2} $P < 0.05$

Compared with normal control group, ^{*1} $P < 0.05$; Compared with model control group, ^{*2} $P < 0.05$

由基, 引发脂质过氧化反应, 导致能量代谢障碍, 使肝细胞膜通透性增加, 细胞内转氨酶因巨大的浓度梯度而释放入血液^[5]。临床及药理实验结果表明, 楮头红能有效降低血清转氨酶, 对肝细胞有一定保护作用。本实验结果表明, 正丁醇部位为楮头红抑制 CCl₄ 所致肝损伤所引起的转氨酶升高药效活性部位。

[DOI] 10.3870/yddb.2010.05.006

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1997: 2290.

[2] 陈桂菲, 叶淑玲. 风柜斗草药用探讨 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(2): 129.

[3] 李莫愁. 风柜斗草治疗肝炎 72 例 [J]. 中国乡村医药杂志, 2001, 8(8): 5.

[4] REITMAN S, FRANKEL S A. Colorimetric method for the de-termination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases [J]. *Am J Clin Pathol*, 1957, 28(2): 56-63.

[5] MARTIN-ARAGON S, DELAS H B, SANCHEZ-REUS M I, et al. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2001, 53(2): 199-206.

软木酰苯胺氧肟酸免疫调节功能研究*

汪理, 昌盛, 刘涛, 王春友

(华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心, 武汉 430022)

[摘要] **目的** 通过体外实验观察软木酰苯胺氧肟酸(SAHA)对效应T细胞和调节性T细胞的作用。**方法** ①淋巴细胞增殖的检测:取CFSE标记的淋巴细胞、 CD_4^+ 或 CD_8^+ T细胞作为反应细胞,实验组加入不同浓度SAHA及CD3/CD28单抗作为刺激原培养,设阴性对照组(仅加入CD3/CD28单抗)和空白对照组,96h后检测各组细胞增殖情况;②以淋巴细胞作为反应细胞,实验组中加入不同浓度SAHA及CD3/CD28单抗作为刺激原培养,设阴性对照组(仅加入CD3/CD28单抗)和空白对照组。96h后检测各组 CD_4^+ Foxp3⁺T细胞比例。**结果** ①SAHA剂量依赖性抑制CD3/CD28单抗诱导的淋巴细胞、 CD_4^+ 和 CD_8^+ T细胞增殖(均 $P < 0.05$);②CD3/CD28单抗不能诱导 CD_4^+ Foxp3⁺T细胞比例增高,1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SAHA也未能诱导 CD_4^+ Foxp3⁺T细胞比例上调。但给予3和5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SAHA后, CD_4^+ Foxp3⁺T细胞比例显著提高,组内和组间比较,均差异有显著性(均 $P < 0.05$)。**结论** 体外实验表明,SAHA具有免疫调节功能,不仅能抑制效应性T细胞增殖,而且一定浓度药物作用能够促使调节性T细胞比例上调。

[关键词] 组蛋白乙酰化酶抑制剂;软木酰苯胺氧肟酸;调节性T细胞;Foxp3⁺

[中图分类号] R392.1;R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)05-0573-04

Evaluation of Immunomodulation by Histone Deacetylase Inhibitor SAHA

WANG Li, CHANG Sheng, LIU Tao, WANG Chun-you (Pancreatic Surgery Center, Union Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To investigate effects of histone deacetylase inhibitor SAHA on effector and regulatory T cells *in vitro*. **Methods** ①As the reactive cells, lymphocyte, CD_4^+ T and CD_8^+ T cells labelled with CFSE were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs in the presence and absence of SAHA (experimental group and control group) at different level, or no any stimulus instead of PBS (placebo group). After 96 hours, the proliferation of cells in each group was detected. ②As the reactive cells, lymphocyte were stimulated with anti-CD3 mAb and anti-CD28 mAb in the presence and absence of SAHA (experimental group and control group), or no any stimulus instead of PBS (placebo group). After 96 hours, the percentage changes of CD_4^+ Foxp3⁺T cells in each group were detected. **Results** ①The proliferation of CFSE-labelled lymphocyte, CD_4^+ T and CD_8^+ T cells mediated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs were inhibited by SAHA in a dose dependent manner ($P < 0.05$). ②In contrast to placebo group, anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and SAHA at a final concentration of 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ stimulation did not enhance the percentage of CD_4^+ Foxp3⁺T cells ($P > 0.05$). But in combination with SAHA at final concentration of 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the percentage of CD_4^+ Foxp3⁺T cells was notably elevated ($P < 0.05$).

Conclusion Our data suggest that SAHA has immunomodulation effects, which not only directly inhibiting T-effector cells proliferation but also increasing Treg cells with certain concentration *in vitro*.

KEY WORDS Histone deacetylase inhibitor; SAHA; Regulatory T cell; Foxp3⁺

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)与染色质重塑有关,在基因表达的表现遗传调控中扮演重要角色。近年来,抑制组蛋白去乙酰化酶成为逆转与肿瘤相关的表现遗传异常改变的潜在策略。HDACi通过抑制HDACs发挥生物学效应,大量研究表明,HDACi有明确的抗肿瘤作用^[1,2],尤其是在血液系统疾病、恶性肿瘤及骨髓移植后移植物抗宿主病等方面^[3]。除了上

述明确的生物学效应以外,最近研究还证实HDACi可能具有抗炎效应,能发挥较强的免疫抑制作用。软木酰苯胺氧肟酸(SAHA)为HDACi之一,笔者在本实验中以SAHA为例,观察HDACi类药物的免疫调节功能,从而探索其在临床移植免疫治疗方面的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级BALB/c小鼠由华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所动物中心提供。

1.2 主要试剂 FITC标记的抗CD4单抗、APC标记的抗CD8单抗、抗CD3单抗、抗CD28单抗均购于BioLegend公司,SAHA购于Sigma公司,CFSE购于Promega公司, CD_4^+ 、 CD_{25}^+ 调节性T细胞(Treg)流式检

[收稿日期] 2009-08-23 **[修回日期]** 2009-10-26

[基金项目] *国家自然科学基金资助项目(基金编号:30801098)

[作者简介] 汪理(1979-),男,湖北武汉人,在读博士,主要研究方向:胰腺外科。电话:(0)13797061886, E-mail: huanhuan1229@163.com。

[通讯作者] 王春友, E-mail: chunyouwang52@126.com。

测试剂盒购于 eBioscience 公司, CD_4^+ 、 CD_8^+ T 细胞分离柱购于 RnD 公司。

1.3 淋巴细胞悬液的制备 无菌条件下切取 BALB/c 小鼠脾脏,超净工作台下置于盛有淋巴细胞分离液的培养皿中。以 200 目尼龙滤网包裹,无齿弯镊轻轻挤压至无红色脾组织块。收集滤液,在其上方加入不完全培养基。800 × *g* 离心 30 min。收集单个核细胞层。再用不完全 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次,并调整终浓度至实验所需(1×10^8 个 · mL^{-1}),锥虫兰染色判定细胞活力 >95%。

1.4 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 细胞的分离 取上述悬液 2 mL,严格按照小鼠 CD4 亚群、CD8 亚群 T 细胞分离柱试剂盒说明书筛选出 CD_4^+ 或 CD_8^+ T 细胞。将分离出的细胞 250 × *g* 离心 5 min,弃去上清液,并用适当培养基重悬细胞。记数细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个 · mL^{-1} 。

1.5 CFSE 标记 CFDA-SE 冻干粉 500 μg 溶于 DMSO 180 μL 中,制成 $5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ CFDA-SE 原液。将原液用 PBS 缓冲液稀释至 $2.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$,37 $^\circ C$ 与实验用细胞(淋巴细胞、 CD_4^+ T 细胞和 CD_8^+ T 细胞)共同孵育 10 min。用完全 RPMI-1640 终止并洗涤细胞 1 次,经 37 $^\circ C$ 预热的 RPMI-1640 重悬标记细胞,再孵育 10 min,确保 CFDA-SE 完全作用。再次以 37 $^\circ C$ 预热的 RPMI-1640 洗细胞 1 次。记数细胞,调整细胞浓度为 1×10^7 个 · mL^{-1} 。

1.6 实验分组与检测

1.6.1 淋巴细胞增殖的检测 取 CFSE 标记的淋巴细胞、 CD_4^+ 或 CD_8^+ T 细胞。将上述细胞加入 96 孔培养板中,每孔加 5×10^5 个细胞(每孔 200 μL)。分别取 1,3,5 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA,加入 1 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 抗 CD3 单抗(第一信号)和抗 CD28 单抗(第二信号)共同刺激的作为实验组;抗 CD3/CD28 单抗刺激的作为阴性对照组;空白对照组以 PBS 代替抗 CD3/CD28 单抗。上述各组均培养 96 h,每组设 3 个复孔。FACSCalibur 流式细胞仪分析标记反应细胞的 CFSE 荧光强度变化。ModFit LT 软件拟合后,得到增殖细胞各代的百分率,同时用 CellQuest 软件分析增殖细胞的比例。

1.6.2 Treg 比例的检测 取未标记 CFSE 的淋巴细胞,加入 96 孔培养板,每孔加 5×10^5 个细胞。取 1,3,5 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA,加入抗 CD3/CD28 单抗共同刺激的作为实验组;抗 CD3/CD28 单抗刺激的作为阴性对照组;空白对照组则以 PBS 代替抗 CD3/CD28 单抗。上述各组均培养 96 h,每组均设 3 个复孔。取上述每孔未标记 CFSE 的细胞,调整至 100 μL 体系并加入 FITC-CD4 单抗、APC-CD25 单抗各 0.5 μL ,4 $^\circ C$ 避光孵

育 15 min 后再用 PBS 液洗脱富余抗体;加入 Foxp3 Fix/Perm buffer 固定,室温避光反应 30 min,离心弃去上清液后用 PBS 液洗一次,细胞再用 Foxp3 Perm buffer 打孔后加入 PE-Foxp3 单抗 1 μL ,室温避光反应 30 min;PBS 洗脱富余抗体,再用 PBS 重悬细胞调整终体积至 500 μL ,用流式细胞仪检测各组细胞中 Foxp3 的表达。

1.7 统计学方法 用 SPSS12.0 软件进行统计,采用方差分析检验各组均数间差异显著性,组间比较选用 SNK 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 分离的 CD_4^+ 或 CD_8^+ T 细胞活性与纯度 所得细胞的活细胞比例为 98.6% ($n = 6$);用流式细胞仪检测所获细胞纯度分别为 89.91% 和 91.20% ($n = 4$)。

2.2 流式检测淋巴细胞的增殖 细胞培养 96 h 后,空白对照组中 CFSE 标记的淋巴细胞在未受抗 CD3/CD28 单抗刺激的情况下,未见 CFSE 增殖峰;而阴性对照组中标记细胞在抗 CD3/CD28 单抗的作用下,出现多个 CFSE 分裂峰,表明标记细胞发生明显增殖,加入 1,3,5 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA 后,细胞分裂代数均递减,其中以 5 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA 加药组的抑制作用最为明显,未出现明显子代分裂峰;给予 5,3,1 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA 作用后,分别抑制了 98.4%,81.2%,42.5% 淋巴细胞增殖,同样 SAHA 也能明显抑制抗 CD3/CD28 单抗诱导的效应性的 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 细胞增殖,其细胞增殖的抑制率分别为 97.3%,34.1%,5.6% 和 100.0%,58.2%,18.5% ($P < 0.05$)。

2.3 流式检测 Treg 细胞比例 淋巴细胞仅受 CD3/CD28 刺激 96 h 后,阴性对照组 CD_4^+ Foxp3⁺ T 细胞占淋巴细胞的比例(1.78%)与空白对照组(1.67%)比较,差异无显著性($P > 0.05$);实验组加入 1 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA 后, CD_4^+ Foxp3⁺ T 细胞比例(1.82%)未明显提高,与空白对照组(1.67%)和阴性对照组(1.78%)比较,均差异无显著性(均 $P > 0.05$);给予 3 和 5 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA 作用后, CD_4^+ Foxp3⁺ T 细胞占淋巴细胞的比例明显升高(分别为 2.83% 和 7.64%),与空白对照组、阴性对照组及 1 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ SAHA 作用实验组(分别为 1.67%,1.78%,1.82%)比较,均差异有显著性(均 $P < 0.05$);3 个实验组比较,亦差异有显著性(均 $P < 0.05$)。通过流式软件分析,发现 Foxp3⁺ T 细胞多位于 CD_4^+ 、 CD_{25}^+ T 细胞亚群,约占 85%。

3 讨论

目前,对 HDACi 类药物在免疫系统中的作用仍然知之甚少。有研究证实 HDACi 具有明显抗炎作用。

骨髓移植后给予 HDACi 类药物 SAHA, 可显著降低炎症因子的表达, 减轻急性移植物抗宿主病的肠道损伤, 缓解疾病的严重程度, 降低疾病的致死率^[3]。TSA 是一种 SAHA 结构类似的药物, 能通过减少 Th₂ 细胞因子的表达和 IGE 的产生, 缓解哮喘样支气管过敏症^[10]; 也能阻断 MRL/lpr 小鼠中炎症递质的释放^[4]; 并且在实验性变态反应性脑脊髓炎的小鼠模型中, 减少 Th₁ 型细胞因子的产生, 并减轻了脱髓鞘作用^[5]。

笔者在本实验中通过 CFDA-SE 对目的细胞(淋巴细胞、CD₄⁺T 细胞和 CD₈⁺T 细胞)染色后, 在 FITC 荧光通道中, 检测均一染色的细胞群。根据细胞分裂一次其荧光强度倍减一半的原理, 动态追踪目的细胞增殖的情况。笔者使用 TCR 信号(抗 CD3 单抗)和协同刺激信号(抗 CD28 单抗)模拟体内同种异基因的抗原刺激, 作用于淋巴细胞, 后者发生明显增殖, 并见多个子代分裂峰。接下来, 笔者在细胞培养体系中加入不同浓度 SAHA, 观察其对淋巴细胞增殖的影响。发现使用 1 μmol · L⁻¹ SAHA 即能显著抑制淋巴细胞的增殖, 细胞增殖抑制率达到 42.5%, 同时可见细胞增殖各代的百分率明显减少($P < 0.05$)。并且随着药物浓度的提高, 抑制作用明显增强, 细胞分裂的代数发生递减, 细胞增殖的抑制率逐渐提高($P < 0.05$)。笔者使用 SAHA, 观察其对 CD₄⁺T 和 CD₈⁺T 细胞增殖的影响, 也取得类似结果, SAHA 剂量依赖性抑制 TCR/CD28 诱导的效应性 CD₄⁺T 细胞和 CD₈⁺T 细胞增殖($P < 0.05$)。上述结果表明 SAHA 能够明显抑制效应 T 细胞增殖, 进而下调 T 细胞介导的细胞免疫应答。

笔者将分离的淋巴细胞进行体外诱导实验, 观察 SAHA 对 Treg 细胞表达的影响。研究认为 Foxp3⁺ 可作为齧齿类动物调节性 T 细胞的特异性标志。在培养体系中加入抗 CD3/CD28 单抗刺激, 未能诱导 CD₄⁺Foxp3⁺T 细胞的比例上调, 并且使用 1 μmol · L⁻¹ SAHA 后, CD₄⁺Foxp3⁺T 细胞比例也未升高。但是给予 3 和 5 μmol · L⁻¹ SAHA 作用后, CD₄⁺Foxp3⁺T 细胞的比例明显提高, 组内和组间比较, 均差异有显著性(均 $P < 0.05$)。通过流式软件进一步分析, 发现 Foxp3⁺T 细胞多位于 CD₄⁺CD₂₅⁺T 细胞亚群, 约占 85%。有理由相信一定浓度的 SAHA 能够诱导 Foxp3⁺CD₄⁺CD₂₅⁺Treg 亚群的扩增。综上所述, SAHA 具有明显的双重作用, 不仅能够抑制效应性 T 细胞的增殖, 而且能够促使调节性 T 细胞的比例上调, 从而改变效应性 T 细胞与调节性 T 细胞间的平衡, 促使平衡导向有利于耐受形成的方向。

近年来, 随着器官移植技术不断进步, 给临床带来

新的课题, 如何处理与免疫抑制相关的药物引发肾毒性、心血管疾病、糖尿病和高脂血症等^[6-8], 如何处理移植术后淋巴组织增生紊乱^[9,10], 如何处理因慢性排斥所致的移植物失功^[11,12], 这些问题不断激励我们研究怎样诱导临床耐受, 或以最低剂量的免疫抑制药物达到“几乎耐受”。为 HDACi 药物的研究提供了一个新思路, 有望将此类药物用于控制宿主针对供体移植物发生的免疫排斥, 诱导临床免疫耐受的形成。下一步将着重于体内研究, 何种浓度 HDACi 类药物控制体内效应性 T 细胞的增殖, 并且使体内调节性 T 细胞达到稳定、持续表达。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.05.007

[参考文献]

- [1] FOURNEL M, TRACHY-BOURGET M C, YAN P T, et al. Sulfonamide anilides, a novel class of histone deacetylase inhibitors, are antiproliferative against human tumors [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 4325-4330.
- [2] JOHNSTONE R W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 287-299.
- [3] REDDY P, MAEDA Y, HOTARY K, et al. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 3921-3926.
- [4] MISHRA N, REILLY C M, BROWN D R, et al. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 539.
- [5] CAMELO S, IGLESIAS A H, HWANG D, et al. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 164: 10.
- [6] OJO A O, HELD P J, PORT F K, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ [J]. *N Engl J Med*, 2003, 349: 931-940.
- [7] HALLORAN P F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351: 2715-2729.
- [8] JARDINE A G, FELLSTROM B, LOGAN J O, et al. Cardiovascular risk and renal transplantation: post hoc analyses of the assessment of lescol in renal transplantation (ALERT) study [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 46: 529-536.
- [9] CAILLARD S, DHARNIDHARKA V, AGODOA L, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression [J]. *Transplantation*, 2005, 80: 1233-1243.

- [10] BUELL J F, GROSS T G, WOODLE E S. Malignancy after transplantation [J]. *Transplantation*, 2005, 80: 254 - 264.
- [11] NANKIVELL B J, CHAPMAN J R. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions [J]. *Transplantation*, 2006, 81: 643 - 654.
- [12] MEIER-KRIESCHE H U, SCHOLD J D, SRINIVAS T R, et al. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era [J]. *Am J Transplant*, 2004, 4: 378 - 383.

硒化壳聚糖对体外培养人皮肤成纤维细胞 分泌细胞因子与一氧化氮的影响*

邓守恒¹, 杨敬宁², 曹凤军¹, 蔡晓军¹, 李林均¹, 陈 萍¹

(鄖阳医学院 1. 附属人民医院肿瘤中心; 2. 免疫教研室, 湖北十堰 442000)

[摘要] 目的 观察硒化壳聚糖对体外培养人皮肤成纤维细胞分泌细胞因子及一氧化氮(NO)的影响。方法 测定经 25, 50, 100, 200, 400 mg · L⁻¹ 硒化壳聚糖作用后, 人皮肤成纤维细胞培养上清液中转化生长因子-α(TGF-α)、TGF-β₁、白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)及 NO 的水平; 对照组用等体积细胞培养液处理。结果 与对照组比较, 硒化壳聚糖作用后皮肤成纤维细胞培养液中 TGF-α、TGF-β₁、IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF 水平不同程度升高, 差异有显著性或极显著性(P < 0.05 或 P < 0.01); 而 NO 水平与对照组比较显著下降(均 P < 0.01)。结论 硒化壳聚糖通过促进细胞分泌 TGF-α、TGF-β₁、IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF, 抑制 NO 释放来促进皮肤成纤维细胞增殖和胶原合成。

[关键词] 硒化壳聚糖; 一氧化氮; 皮肤成纤维细胞; 细胞因子

[中图分类号] R286; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004 - 0781(2010)05 - 0576 - 03

Effects of Selenium Chitosan on the Release of Cytokines and Nitric Oxide in Cultured Human Skin Fibroblasts

DENG Shou-heng¹, YANG Jing-ning², CAO Feng-jun¹, CAI Xiao-jun¹, LI Lin-jun¹, CHEN Ping¹ (1. *Oncology Center, Renming Hospital Affiliated with the Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China*; 2. *Department of Immunology, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China*)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of selenium chitosan on the release of cytokines and nitric oxide(NO) in human skin fibroblasts *in vitro*. **Methods** The levels of transforming growth factor-α (TGF-α), TGF-β₁, interleukin-1β (IL-1β), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF) and NO in the supernatants of cultured fibroblasts containing selenium chitosan 25, 50, 100, 200 and 400 mg · L⁻¹, respectively were assayed. In control group equal volume of media was used instead.

Results Compared with control group, the levels of TGF-α, TGF-β₁, IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF in the supernatants of cultured fibroblasts added with selenium chitosan were significantly higher (P < 0.05 or P < 0.01). However, selenium chitosan markedly decreased the level of NO in a dose dependent manner (P < 0.01). **Conclusion** Selenium chitosan could promote the proliferation and collagen synthesis of human skin fibroblasts through secreting TGF-α, TGF-β₁, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF and inhibiting the release of NO.

KEY WORDS Selenium chitosan; Nitric oxide; Human skin fibroblasts; Cytokines

壳聚糖[β(1,4)-2-氨基-2-去氧-D-葡萄糖]是一种来源于海洋生物的碱性生物多糖, 具有抗肿瘤、抗

炎、抗菌等多种生物活性, 是药物制剂中常用的辅料^[1]。硒是人和动物体内必需微量元素, 还具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎等活性。硒化壳聚糖是将壳聚糖与亚硒酸在酸性条件下以混合金属离子为催化剂, 通过拼合原理制备而成的有机硒, 具有硒和多糖双重功效^[2]。研究发现, 硒化壳聚糖能促进体外培养皮肤成纤维细胞增殖和胶原合成, 促进创面愈合^[3]。已知细胞因子和一氧化氮(NO)在创面愈合过程中发挥重要作用, 可以通过调节创面愈合过程中的多种细胞反应影响细胞增殖、迁移、

[收稿日期] 2009 - 09 - 20 **[收稿日期]** 2010 - 01 - 06

[基金项目] * 鄖阳医学院附属太和医院基金资助项目(基金编号:20031207)

[作者简介] 邓守恒(1973 -), 男, 湖北十堰人, 博士, 副教授, 主要从事生化药理研究。电话: 0719 - 8637358, E-mail: dshblue@163.com。

[通讯作者] 陈 萍(1962 -), 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师。电话: (0)13635715388, E-mail: dshblue@163.com。