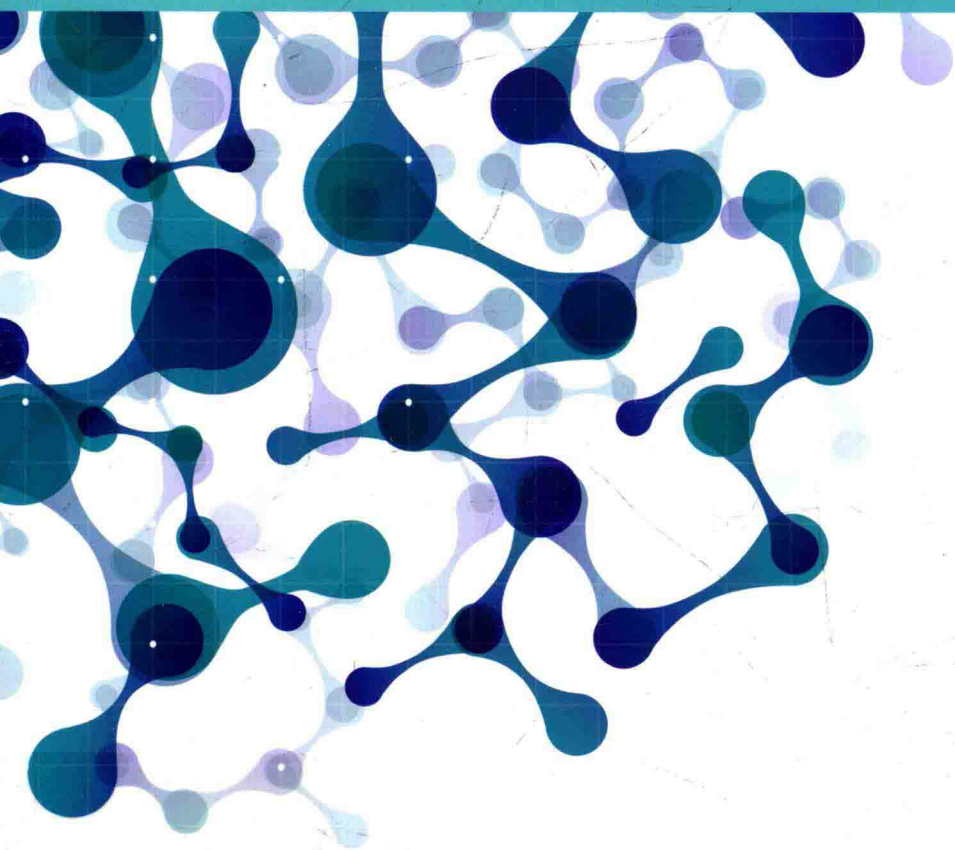


海南大学科研团队培育专项 (hdkytg201705)  
海南省重点研发计划项目 (ZDYF2017099)  
国家自然科学基金地区基金项目 (81660584)

# 新免疫抑制剂isogarcinol的发现及其作用机理研究

◎ 岑举人 著

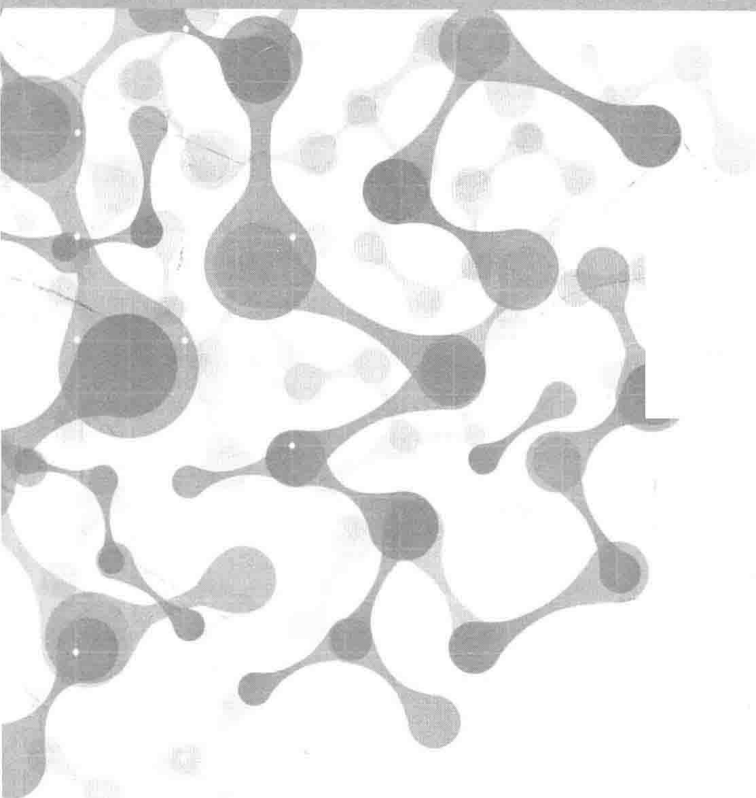


中国农业科学技术出版社

海南大学科研团队培育专项 (hdkytg201705)  
海南省重点研发计划项目 (ZDYF2017099)  
国家自然科学基金地区基金项目 (81660584)

# 新免疫抑制剂isogarcinol的 发现及其作用机理研究

◎ 岑举人 著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

新免疫抑制剂 isogarcinol 的发现及其作用机理研究 / 岑举人著. —  
北京: 中国农业科学技术出版社, 2017. 8

ISBN 978-7-5116-3196-1

I. ①新… II. ①岑… III. ①免疫抑制剂-研究 IV. ①R979.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 181420 号

责任编辑 王更新 李 华  
责任校对 李向荣

出 版 者 中国农业科学技术出版社  
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081  
电 话 (010) 82106664 (编辑室) (010) 82109702 (发行部)  
(010) 82109709 (读者服务部)  
传 真 (010) 82106631  
网 址 <http://www.castp.cn>  
经 销 者 各地新华书店  
印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司  
开 本 710mm×1 000mm 1/16  
印 张 9.25 彩插 8 面  
字 数 185 千字  
版 次 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷  
定 价 68.00 元

版权所有·翻印必究

# 前言

免疫伴随人的一生，无时无刻不在，与生老病死密切相关。人体的免疫功能包括3种：免疫防御功能、自身稳定功能和免疫监视功能。免疫防御功能可清除入侵的病原微生物和毒素，但防御应答过高时可致超敏反应，过低或缺失则发生免疫缺陷。自身稳定功能是指机体对自身成分耐受，可及时清除体内衰老、损伤、变性、死亡的细胞。免疫监视功能可及时识别和清除体内突变的细胞和外源异质性细胞。机体的免疫调节功能异常或某些功能亢进时，可引起类风湿关节炎等自身免疫性疾病、过敏、肿瘤等。当免疫功能亢进时，免疫抑制是临床上采用的治疗策略之一，免疫抑制疗法可通过应用免疫抑制剂、淋巴细胞及其表面分子的抗体、诱导免疫耐受等实现。

免疫抑制剂是一类具有抑制机体免疫功能的生物或非生物制剂，主要用于器官移植后排斥反应及各种自身免疫性疾病的治疗。自20世纪80年代起，钙调蛋白磷酸酶抑制剂CsA和FK506一直都是实质器官移植的首选药物，尤其是在肾脏移植中。但是，CsA和FK506有肾毒性，可能导致移植肾和正常肾出现长期衰竭，甚至还能加重高血压、高血脂，从而引起心血管系统的病变，增加肥胖的风险。因此，寻找高效低毒的新钙调蛋白磷酸酶抑制剂并研究其作用机理具有重要意义。

弩马十驾，功在不舍。经历多年的文献积累、教学积累和科研积累后，本人密切关注免疫抑制剂研究的前沿和进展，并结合自身多年的研究实践和体会，撰写了《新免疫抑制剂isogarcinol的发现及其作用机理研究》。本书以钙调蛋白磷酸酶为靶酶对中草药进行筛选，发现山竹子能抑制钙调蛋白磷酸酶的活性；对山竹子（*Garcinia mangostana* L.）中有效成分进行活性追踪，分离出具有很高生物活性的多异戊烯基取代的苯甲酮类化合物——isogarcinol，且isogarcinol对CN的抑制显浓度依赖性。研究发现，isogarcinol能在体外直接与钙调蛋白磷酸酶结合，有别于经典的免疫抑制剂CsA和FK506。Isogarcinol在细胞、动物水平上毒性很低，能够显著地抑制2,4-二硝基氟苯（DNFB）诱导小鼠耳肿胀、延长同种异体小鼠皮肤移植皮片的存活时间和显著减低Ⅱ型胶原诱导的小鼠关节肿胀。为了满足免疫抑制药物长期用药的需要，本研究的所有动物试验都采用口服给药的方式。这些研究结果表明，isogarcinol在细胞、

动物水平上毒性很低，且具有很显著的免疫抑制效果，有望作为一种新颖低毒的口服免疫抑制剂，用于器官移植排斥和自身免疫性疾病的治疗。

本书是在多年课题研究的基础上总结撰写而成。全书的研究思路与架构设计、主体内容研究与撰写工作均由本人负责完成。本书在撰写过程中，得到了魏群教授、杨小波教授、徐静教授、龙文兴副教授、付艳霞博士和王梦奇博士的悉心指导，在此表示深深的感谢！

本书参考或引用了大量相关文献，其中大多数已在书中注明出处，但难免有所疏漏。在此，向有关作者和专家表示感谢，并对没有标明出处的作者表示歉意。

本书的出版由海南大学科研团队培育专项（hdkytg201705）、海南省重点研发计划项目（ZDYF2017099）和国家自然科学基金地区基金项目（81660584）共同资助完成，在此一并表示诚挚的感谢。

本书理论联系实际，是免疫抑制剂研究和开发利用的参考书，也可供医药工作者和药学院校师生参考阅读。

尽管本书在撰写过程中力求逻辑严谨，内容充实，但由于著者水平有限，时间仓促，书中缺点和错误在所难免，恳请各位专家、同仁和广大读者批评指正，以便今后完善。

著 者

2017 年 6 月于东坡湖畔

# 目 录

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| 1 绪 论 .....                           | (1)  |
| 1.1 免疫抑制剂的研究进展 .....                  | (1)  |
| 1.2 钙调蛋白磷酸酶及其抑制剂概述 .....              | (8)  |
| 1.3 类风湿性关节炎概述 .....                   | (15) |
| 1.4 山竹子研究进展 .....                     | (24) |
| 1.5 蛋白质与小分子相互作用的研究方法概述 .....          | (24) |
| 参考文献 .....                            | (31) |
| 2 钙调蛋白磷酸酶及其突变体的表达及纯化 .....            | (41) |
| 2.1 试验材料及方法 .....                     | (42) |
| 2.2 试验结果 .....                        | (52) |
| 2.3 分析与讨论 .....                       | (54) |
| 2.4 试验小结 .....                        | (55) |
| 参考文献 .....                            | (55) |
| 3 以钙调蛋白磷酸酶为靶酶的天然活性小分子的筛选 .....        | (57) |
| 3.1 试验仪器与材料 .....                     | (57) |
| 3.2 试验方法 .....                        | (58) |
| 3.3 试验结果 .....                        | (61) |
| 3.4 分析与讨论 .....                       | (67) |
| 3.5 试验小结 .....                        | (69) |
| 参考文献 .....                            | (69) |
| 4 Isogarcinol 对钙调蛋白磷酸酶抑制作用的酶学研究 ..... | (71) |
| 4.1 试验材料及仪器 .....                     | (72) |
| 4.2 试验方法 .....                        | (73) |
| 4.3 试验结果 .....                        | (76) |
| 4.4 分析与讨论 .....                       | (80) |
| 4.5 试验小结 .....                        | (82) |
| 参考文献 .....                            | (82) |

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| <b>5 Isogarcinol 与钙调蛋白磷酸酶相互作用研究</b> | (84)  |
| 5.1 试验材料、方法及仪器设备                    | (85)  |
| 5.2 试验方法                            | (85)  |
| 5.3 试验结果                            | (87)  |
| 5.4 分析与讨论                           | (93)  |
| 5.5 试验小结                            | (94)  |
| 参考文献                                | (95)  |
| <b>6 Isogarcinol 的细胞药理学研究</b>       | (96)  |
| 6.1 试验仪器与材料                         | (97)  |
| 6.2 试验方法                            | (97)  |
| 6.3 试验结果                            | (99)  |
| 6.4 分析与讨论                           | (101) |
| 6.5 试验小结                            | (102) |
| 参考文献                                | (102) |
| <b>7 Isogarcinol 的动物药理学研究</b>       | (104) |
| 7.1 试验仪器与材料                         | (105) |
| 7.2 试验方法                            | (106) |
| 7.3 试验结果                            | (107) |
| 7.4 分析与讨论                           | (108) |
| 7.5 试验小结                            | (112) |
| 参考文献                                | (112) |
| <b>8 Isogacinol 对类风湿性关节炎作用的研究</b>   | (114) |
| 8.1 试验材料与方法                         | (115) |
| 8.2 试验方法                            | (116) |
| 8.3 试验结果                            | (122) |
| 8.4 分析与讨论                           | (129) |
| 8.5 试验小结                            | (132) |
| 参考文献                                | (133) |
| <b>9 总结与展望</b>                      | (138) |
| 9.1 总结及创新点                          | (138) |
| 9.2 研究展望                            | (139) |
| <b>英文缩略表</b>                        | (140) |

# 1 绪 论

## 1.1 免疫抑制剂的研究进展

免疫抑制剂 (immunosuppressants) 是一类具有抑制机体免疫功能的生物或非生物制剂, 主要用于器官移植后排斥反应及各种自身免疫性疾病的治疗<sup>[1]</sup>。在过去的 10 年里, 免疫抑制剂的发展为器官移植的长期、短期术后维护带来了显著改善, 并大大降低了急性排斥反应。

免疫抑制涉及降低免疫反应或免疫效率的反应, 它是指机体在致病因素的作用下, 免疫系统受到损害, 导致机体暂时性或持久性的免疫应答功能紊乱, 以及对疾病具有高度易感性。免疫抑制剂是用来控制剧烈的过敏反应、自身免疫、器官移植相关疾病。广谱的免疫抑制剂对机体伤害很大, 但是专一性的药物又容易因被其他代谢路径取代而失效。因此, 在治疗中往往联合用药, 以期减少不良反应, 防止免疫排斥。虽然联合用药对整体效果非常重要, 临床医生还要针对药物的持续性作用、疾病情况和病人个人状况为治疗做出相应调整。

可的松是第一个被认证的免疫抑制剂, 但是由于副作用太强, 使用范围很有限。1959 年出现了更强的免疫抑制剂——咪唑硫嘌呤。直到 1970 年, 出现了环孢素 A, 肾脏移植才不需要精确的受供匹配, 肝脏移植、肺移植、胰腺移植、心脏移植才得以广泛实施, 还有一些免疫抑制措施是通过免疫细胞的耗竭, 或者干预免疫调节来影响细胞活性, 抑制细胞因子。免疫抑制剂可分为以下 5 种, 即糖皮质激素类免疫抑制剂、细胞增殖抑制剂类免疫抑制剂、对细胞免疫具有相对特异性的免疫抑制剂、针对免疫应答过程关键分子的免疫抑制剂和其他类免疫抑制剂。

### 1.1.1 糖皮质激素类免疫抑制剂

糖皮质激素是临床上使用最早的免疫抑制剂, 它主要是免疫干预产生和维持阶段的重要免疫抑制剂。在高静脉内压下 (每天 250~1 000mg 的甲基强的松龙, 用药 3d), 就可以产生淋巴细胞的毒性作用。其活性与剂量有密切关系, 生理剂量主要影响糖、脂肪、蛋白质的代谢, 是维持机体正常代谢所必需

的;药理剂量则有显著的抗炎、免疫抑制、抗毒等作用,因此它就可以作为免疫抑制剂和抗炎药<sup>[2]</sup>。用量和用药时间则视病情而定。一些疾病,如哮喘,发病快,可以迅速终止;而大多数的风湿性疾病,需要几个月用药,药量递减,尤其是当强的松的单次用量达到毫克级,突然中止用药,不仅能使疾病复发,还会产生肾上腺皮质衰退。

糖皮质激素抑制细胞免疫反应,主要靠抑制编码细胞因子的基因——IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8 和 TNF- $\gamma$ , 其中最主要的是 IL-2。小分子的细胞因子能降低 T 细胞的增殖。糖皮质激素还可以抑制人体免疫反应,减少 B 细胞分泌 IL-2 和 IL-2 受体,即同时降低 B 细胞的增殖和分泌抗体<sup>[3]</sup>。第二类药物,可能在治疗的保持阶段有激素节制的作用,这些药物一般是抗增殖药物,如咪唑硫嘌呤、麦考酚酯、甲氨蝶呤,但是它们也有毒性。采用类固醇治疗的病人普遍有早期不良反应,如出汗、声音嘶哑、失眠、食欲增加。另外,罕见有严重的精神错乱,如亢奋、暴躁或者精神错乱。长期的难以逆转的副作用有库欣氏症候群、近端肌病、高血压、高血脂、肥胖、白内障、胃溃疡、骨质疏松和无菌性骨头坏死。

### 1.1.2 细胞增殖抑制剂类免疫抑制剂

这类免疫抑制剂是一类细胞增殖抑制剂,它通过干扰、破坏细胞的生命物质(DNA、叶酸等)的合成,从而主要杀伤体内增殖较快的淋巴细胞,直到免疫抑制的作用。在免疫治疗中的剂量比肿瘤治疗中的小。它们干扰 B 细胞和 T 细胞的增殖。由于其高效性,常用的是其嘌呤类似物,如烷化剂、抗代谢药、细胞毒的抗生素。

#### 1.1.2.1 烷化剂

免疫治疗所用的烷化剂是氮芥(环磷酰胺)、亚硝基脲和铂类化合物等。环磷酰胺是其中非常有效的免疫抑制化合物。环磷酰胺是一种可与 DNA 结合的烷化剂,可使 DNA 双链断裂,也可与 RNA 及蛋白质结合,进而影响 DNA 和蛋白质的结构和功能,干扰 DNA、RNA 及蛋白质的合成,抑制细胞增殖,甚至导致细胞死亡。环磷酰胺对 B 细胞的抑制作用强于 T 细胞,在特定条件下可以抑制细胞毒性 T 细胞。大剂量的环磷酰胺不具有细胞周期的特异性,对于快速增殖的淋巴细胞、造血细胞、生殖细胞等常伴有严重的、甚至是致死的不良反应。类风湿患者口服环磷酰胺较长时间后,自身抗体水平及血清免疫球蛋白水平都显著下降。环磷酰胺的主要副作用是对造血系统及生殖系统具有抑制作用;另外,环磷酰胺可引起秃发、出血性膀胱炎;长期用药还可导致感染及肿瘤的发生;大剂量使用环磷酰胺会对心脏产生毒性作用<sup>[4]</sup>。

### 1.1.2.2 抗代谢药

抗代谢药会干扰核酸的合成,如叶酸类似物和甲氨蝶呤;嘌呤类似物,如咪唑硫嘌呤和硫嘌呤嘧啶类似物。蛋白质合成抑制剂甲氨蝶呤(MTX)是叶酸合成的抑制剂,对二氢叶酸还原酶有较强的抑制作用,它是最早发现的具有抗恶性肿瘤的化合物之一。如果体内的二氢叶酸不能转化为四氢叶酸,胸苷酸及嘌呤核苷酸的生成将受到阻碍,进而阻断DNA及RNA的合成。MTX进入组织细胞后被转化成多谷氨酸化的MTX,可较长时间的停留在细胞内,进而产生长效抗增生和抗炎免疫的作用。自20世纪50年代起MTX被用于治疗RA,MTX通过上调RA中IL-4、IL-10等抗炎因子的表达,来抑制TNF- $\alpha$ 、IL-1等致炎因子的表达,达到其抗炎的作用;还可通过抑制中性粒细胞的趋化作用,改善早期RA的病情<sup>[5]</sup>。MTX常见的不良反应有胃肠道反应、骨髓抑制、药物性肺炎等;妊娠早期使用MTX可导致畸胎;高剂量使用时可出现肾脏损伤,联合甲酰四氢叶酸钙一起服用,可以减轻MTX的细胞毒性作用。

咪唑硫嘌呤是由甲硝唑取代了6-巯基嘌呤上的氢而形成的衍生物,属于第一代的免疫抑制剂之一,在环孢菌素发明以前,咪唑硫嘌呤+皮质激素是器官移植治疗的标准方案。咪唑硫嘌呤主要作用于S期的细胞,能够干扰嘌呤代谢的所有环节,抑制嘌呤核苷的生成,进而抑制DNA、RNA及蛋白质的合成,是周期特异性的细胞毒药物。小剂量的咪唑硫嘌呤通过干扰抗原识别与结合的过程,产生主要针对T细胞的免疫抑制作用。咪唑硫嘌呤主要的副作用是骨髓抑制,可以引起粒细胞和血小板下降,也可引起巨细胞性贫血<sup>[6]</sup>。硫嘌呤本身已经是认证药物,它能在免疫反应初期,通过抑制淋巴细胞的分裂,同时抑制细胞免疫和体液免疫,对自身免疫疾病同样有效<sup>[7]</sup>。

### 1.1.2.3 细胞毒性抗生素

这一类中的代表是用于肾脏移植的放线菌素D。其他细胞毒性抗生素还有安苄环霉素、丝裂霉素C、争光霉素和光神霉素。

## 1.1.3 对细胞免疫具有相对特异性的免疫抑制剂

这类免疫抑制剂的作用机制各不相同,但具有比较好的选择性,主要作用于T淋巴细胞,从而大大降低了副作用的发生范围和程度。这类免疫抑制剂主要有环孢菌素A、他克莫司、雷帕霉素、霉酚酸酯和FTY720。

### 1.1.3.1 环孢菌素

环孢菌素(Cyclosporin, CsA)和他克莫司(Tacrolimus, FK506)一样,都是钙调蛋白磷酸酶抑制剂,是现今使用最广的免疫抑制剂。它是一种由11个氨基酸组成的真菌多肽(图1.1),能结合来自免疫活性淋巴细胞的环孢菌

素结合蛋白 (Cyclophilin, Cyp) (一种免疫亲和素), 尤其是 T 淋巴细胞。这种环孢菌素和环孢菌素结合蛋白的复合物能够抑制钙调蛋白磷酸酶, 进而抑制 IL-2 基因的转录<sup>[8]</sup>。环孢菌素 A 能阻断 T 细胞中抗原识别引发的 JNK 和 p38 信号通路, 导致产生 IL-2 及其他细胞因子的 mRNA 减少, 从而抑制同种移植排斥反应毒性 T 细胞的增殖<sup>[9,10]</sup>。该药物还可以抑制淋巴因子的生成和白介素的释放, 降低效应 T 细胞的作用。1983 年, FDA 批准将 CsA 用于临床肾移植, 现在已广泛应用于器官移植排斥反应的治疗, 也用于治疗自身免疫性疾病, 如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病和皮炎等。CsA 口服吸收缓慢而不完全, 体内过程有明显的个体差异。剂型改善可有效提高其生物利用度并降低不良反应。目前 CsA 剂型主要有溶液剂、静滴浓缩液、滴眼剂、胶囊剂、软胶囊、口服液和微乳化剂型等。CsA 的不良反应发生率较高, 其严重程度、持续时间与剂量、血药浓度相关, 多为可逆性。最常见的是肾毒性, 其次为肝毒性。继发感染也较常见。此外, 还有胃肠道反应等, 但无骨髓抑制的副作用<sup>[11]</sup>。

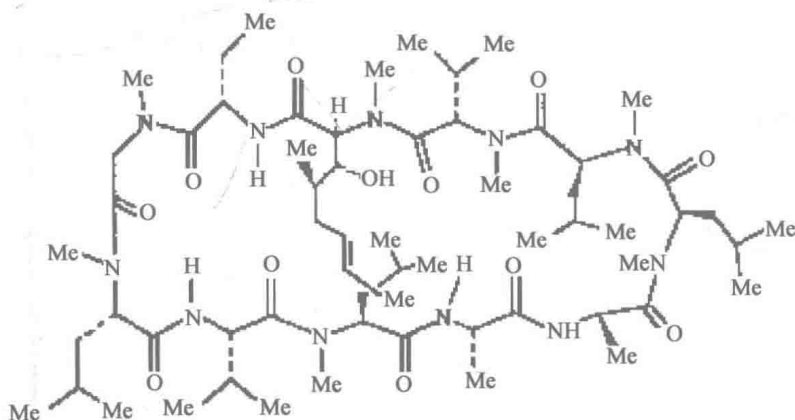


图 1.1 CsA 结构式

Fig. 1.1 The structural formula of CsA

#### 1.1.3.2 他克莫司

他克莫司 (FK506) 是在 1984 年从放线菌属 (*Streptomyces tsukubaensis*) 的发酵物中分离提取得到的二十三环大环内酯类抗生素 (图 1.2), 可分为与受体蛋白 FKBP 结合的区域和结合后发挥免疫抑制效应的区域两部分<sup>[12]</sup>。他克莫司与胞内受体蛋白 FKBP 结合抑制钙调蛋白磷酸酶, 特异性抑制 T 淋巴细胞的活化, 也作用于钙依赖信号通路, 从而抑制 Th 细胞的功能和 IL-2 的合成<sup>[13]</sup>。该药主要作用于肝脏和肾脏的移植, 也有报道用于心脏、肺和心肺的

移植。它结合免疫亲和素，然后以复合体形式结合钙调磷酸酶，抑制其磷酸化活性，阻止 G0 期向 G1 期转变<sup>[14]</sup>。FK506 比 CsA 的免疫抑制作用更广泛，其效力是后者的 10~100 倍。FK506 于 1984 年由日本 Fujisawa 制药有限公司正式生产上市，在 1994 年由 FDA 批准进入 II 期临床试验。主要用于治疗器官移植排斥反应及自身免疫病。临床常用剂型有静脉制剂、口服剂型和滴眼液等，口服吸收快。FK506 在口服使用时副作用较少，主要在静脉给药时常见胃肠道反应、失眠等症，并发症的发生率比 CsA 低。

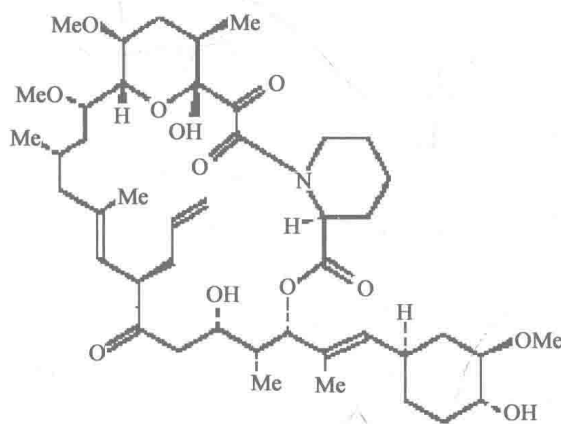


图 1.2 FK506 结构式

Fig. 1.2 The structural formula of FK506

### 1.1.3.3 雷帕霉素

雷帕霉素是一种放线菌产生的大环内酯，用来治疗排斥反应。虽然它是他克莫司的一种类似物，但作用机理却不一样，产生的副作用也不尽相同<sup>[15]</sup>。

与环孢霉素和他克莫司不同，雷帕霉素不是影响淋巴细胞活化的第一阶段，而是影响其第二阶段，即信号转导和克隆增殖。雷帕霉素进入体内后，能与相同的胞内亲和蛋白 FKBP 形成复合物后与哺乳类动物的雷帕霉素靶点 (mammalian Target of Rapamycin, mTOR) 结合抑制其活性<sup>[16]</sup>，可阻断 IL-2 和 CD28/B7 共刺激途径激活 mTOR 所引起的免疫反应，起到免疫抑制的作用<sup>[17]</sup>。因此，雷帕霉素可以和环孢菌素及其他免疫抑制剂协同作用，并减少副作用。它还可以间接抑制几种淋巴细胞的激酶和磷酸酶，阻止信号传递到活性部位，抑制细胞由 G1 期向 S 期转变。它同样抑制 B 细胞向浆细胞转变，进而降低抗体 IgM、IgA、IgG 的生成<sup>[18]</sup>。雷帕霉素作为一种免疫调节物质，对涉及 P13K/AKT/mTOR 的肿瘤细胞同样有用。

### 1.1.3.4 霉酚酸酯

霉酚酸酯 (MMF) 是霉酚酸 (MPA) 的酯类衍生物，本身无免疫抑制活

性。口服后吸收迅速,在体内水解为MPA发挥免疫抑制作用。MPA是在1896年由Gosio分离得到的,此后研究证明其具有抗菌、抑制癌细胞增殖等作用,是次黄嘌呤脱氢酶(IMPDH)的抑制剂。IMPDH作为嘌呤从头合成途径的关键酶,受到MPA选择性、可逆性地抑制,对嘌呤的合成产生影响,从而阻断淋巴细胞增殖所需DNA和RNA合成,最终抑制T、B淋巴细胞的增殖。此外,还能抑制单核巨噬细胞增生以减轻炎症发生,抑制血管平滑肌增生,还可诱导T细胞凋亡等。MMF于1995年由FDA批准用于预防肾移植排异反应,现在器官移植应用方面已得到广泛认可。自从霉酚酸酯于1996年引入澳大利亚,它已经基本代替了器官移植中用到的咪唑硫嘌呤。该药的一个优势是别嘌呤醇可以用于预防痛风,同时不必减少霉酚酸酯的剂量。这可能是由于其抗B细胞属性,霉酚酸酯对全身性红斑狼疮效果显著。作为非固醇类药物,霉酚酸酯在许多免疫失调症(尤其是血管炎)的维持阶段日益受到关注<sup>[19]</sup>。主要的副反应发生在血液和胃肠,一些患者在高剂量下出现腹泻,因此可采用肠溶衣剂型来减少胃肠上的副反应。

#### 1.1.3.5 FTY720

FTY720是一个新型免疫抑制剂,它是日本学者将冬虫夏草提取物中的有效成分LSP-1进行结构改造后的产物,目前处于临床试验第三阶段<sup>[20]</sup>。

FTY720是一种1-磷酸鞘氨醇受体(Sphingosine 1-Phosphate Receptors, S1PRs)高亲和力的拮抗剂;这些受体在细胞存活、细胞骨架重排、细胞运动和细胞迁移中具有重要的作用<sup>[21]</sup>;FTY720可以与这种受体作用,使细胞对S1P不反应。其免疫调节作用主要是隔离胸腺内淋巴细胞和次级淋巴器官,从而使它们失去再循环周边站点的炎症的能力<sup>[22]</sup>。它能增加淋巴细胞某种黏附分子的表达,或改变其功能,因此它在淋巴腺组织(淋巴结)中积累,在循环系统中含量很少<sup>[23]</sup>。这一点和其他免疫抑制剂有所不同。

#### 1.1.4 针对免疫应答过程关键分子的免疫抑制剂

针对免疫应答过程关键分子的免疫抑制剂是伴随免疫学基础理论发展而发现或者合成的一类抑制剂。其作用机制差别很大,针对的靶点也不相同。但都具有出色的选择性和副作用较小等特点。

OKT3(R)是现今唯一通过认证的CD3抗体。它是鼠源的抗CD-3的IgG2a型单克隆抗体,用来防止其结合到分化的T细胞后引起的T细胞活化和增殖<sup>[24]</sup>。因此,它是最有效的免疫抑制药物之一,临床上用于控制类固醇或多克隆抗体失效的免疫排斥反应。因为比多克隆抗体专一性更好,也用于移植排斥的预防阶段。该药的机理是结合T细胞受体复合物TCR/CD3,但是具体

细节现在还未完全确定。首次用药,该药会非特异性地激活 T 细胞,在 30~60min 后产生严重的综合征,表现为发热、肌肉疼痛、头痛、关节痛。在一些病例中,甚至出现致命的心血管反应,患者的中枢神经系统需要长期治疗才能康复。这个阶段之后,CD3 (R) 则无法和 TCR-抗原结合,发生构型改变,甚至脱离 T 细胞表面。可能通过上皮网状细胞的吸收,降低了 T 细胞的数量。CD3 分子的交叉结合同时激活细胞内信号,引发 T 细胞失效或凋亡(除非它们收到其他共刺激信号)。CD3 抗体还介导了 Th1 和 Th2 细胞的平衡<sup>[25]</sup>。

白介素-2 是一种重要的免疫系统调节分子,对会活化的 T 淋巴细胞的增殖、存活有着重要意义。它是由细胞表面受体 IL-2a ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  组成的三聚体复合物) 介导生效的。IL-2a (即 CD25, T 细胞活化抗原, TAG) 只能由已活化的 T 细胞分泌产生。因此,对选择性免疫抑制有特殊意义。现在研究的重点是开发出高效、安全的抗 IL-2 抗体。1998 年,人们利用基因重组技术,把鼠源的抗 Tac 抗体加以修饰,在鼠/人嵌合体上得到两种抗 Tac 抗体——巴利昔单抗和赛尼哌。这些药物通过结合 IL-2 受体的  $\alpha$  链,阻止 IL-2 激活的活化淋巴细胞的克隆增殖,并缩减其寿命<sup>[26]</sup>。这些药物用于预防肾移植的急性排异,药效很好而且副作用小。

IFN- $\beta$  抑制 Th1 细胞分泌细胞因子和单核细胞的活化,多用于减慢多发性硬化的病情。IFN- $\gamma$  则能够引发淋巴细胞的凋亡。

麦考酚酸是肌苷单磷酸盐脱氢酶 (Inosine Monophosphate Dehydrogenase, IMPDH) 的非竞争性可逆抑制剂。该脱氢酶是原发鸟苷酸合成的关键酶。B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞对该药物尤为敏感<sup>[27]</sup>。

### 1.1.5 其他类免疫抑制剂

除了化学合成提取药物及一些单克隆抗体外,一些中药类的免疫抑制剂及其提取物也在临床中使用。

雷公藤是卫矛科雷公藤属的植物,又名黄藤、断肠草等,其味苦,有大毒,其根、茎、叶均可入药,具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用。它是较早应用于临床研究和使用的中药类免疫抑制剂。其主要有效成分是二萜类化合物(雷公藤内酯醇、雷公藤内酯二醇、雷公藤内酯酮)、三萜内酯类化合物及生物碱等<sup>[28]</sup>。其中,雷公藤多苷目前已应用于临床。雷公藤多苷能抑制 T 细胞功能,抑制迟发超敏反应,抑制白介素-1 的分泌,抑制分裂原及抗原刺激的 T 细胞分裂与增殖<sup>[29]</sup>。雷公藤多苷在临床上已应用于治疗类风湿性关节炎、红斑狼疮等自身免疫性疾病,主要毒副作用是可能引起肝损伤,对更新较快的组织和细胞有明显的细胞毒副作用<sup>[30]</sup>。

山茱萸的有效成分是山茱萸总苷,可成功地延长同种小鼠耳后皮下心肌移植物的存活时间,疗效与 CsA 相当。在体外可以抑制淋巴细胞转化,IL-2 产生及 IL-2R 表达及 LAK 细胞诱导<sup>[31]</sup>。川芎中的生物碱具有免疫抑制作用,其主要成分是川芎嗪,在体内代谢为川芎醇,两者有相似的药理活性。试验研究川芎醇对大鼠心脏移植模型的作用,显示其可使移植心脏存活时间延长,移植病理损害减轻。川芎醇可显著降低外周血中 IL-2 及 IFN- $\gamma$  的含量和 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 细胞及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值。通过有效抑制 Th1 类细胞因子的表达和淋巴细胞增殖,改善移植物存活的免疫内环境,延长移植物生存时间<sup>[32]</sup>。

总之,自 20 世纪 80 年代起,钙调蛋白磷酸酶抑制剂 CsA 和 FK506 一直都是实质器官移植的首选药物,尤其是肾脏移植。通过阻滞 IL-2 的合成来阻止 T 淋巴细胞的活化,对细胞介导的免疫失调效果显著。现已确定该药对移植产生的急性细胞排斥、牛皮癣、肾病变综合征有显著效果。在其他自身免疫病中也有使用,但是在风湿性关节炎治疗和缓解自身免疫病上逐步被替代。在实体器官移植中,将 CsA (FK506) 和霉酚酸酯、强的松联合使用效果很好。但是, CsA 和 FK506 有肾毒性,可能导致移植肾和正常肾出现长期衰竭。它还能加重高血压、高血脂,会引起心血管系统的病变,也会增加肥胖的风险。因此,寻找高效低毒的新型钙调蛋白磷酸酶抑制剂具有重要的意义。

## 1.2 钙调蛋白磷酸酶及其抑制剂概述

蛋白质的磷酸化和脱磷酸化作用是生命活动中普遍存在的一种可逆的蛋白质转录后修饰 (reversible protein posttranslational modification, PTM),几乎参与每一个生命活动过程中,与生物体的基因表达与调控、细胞分化增殖与凋亡、新陈代谢、神经传导及生长发育等密切相关<sup>[33]</sup>。在生物体内,可逆的蛋白磷酸化主要由蛋白激酶 (protein kinases) 与蛋白磷酸酶 (protein phosphatases) 调控。在真核细胞中,磷酸化主要发生在丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸 3 个含羟基的氨基酸,其中丝氨酸是最主要的。相对较少的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶调控成千上万的特异磷蛋白底物的去磷酸化<sup>[34]</sup>。

蛋白质的可逆磷酸化受激酶 (Kinases) 和磷酸酶 (Phosphatases) 的共同调控,与发挥磷酸化作用的激酶相比,具有脱磷酸作用的磷酸酶在生物体内的种类要少很多。根据作用底物的不同,磷酸酶可分为丝/苏氨酸磷酸酶 (Protein Serine/Threonine Phosphatase, PSPs), 酪氨酸磷酸酶 (Protein Tyrosine Phosphatase, PTPs) 和双特异性磷酸酶 (Dual Specificity Phosphatases, DSPs)。其中, PSPs 作为磷酸酶中最大的一类,又包括了 PPP、PPM 和 FCP/

SCP 3 个家族。

钙调蛋白磷酸酶 (Calcineurin, CN) 是 PPP 家族中的一员 (彩插图 1.1), 是目前所知的真核生物中唯一的一种活性受  $\text{Ca}^{2+}$  和钙调素蛋白 (CaM) 调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶<sup>[35, 36]</sup>。它在信息从局部或全身钙信号到效应和基因转录的改变中起到关键的作用<sup>[37]</sup>。

### 1.2.1 钙调蛋白磷酸酶的结构

CN 是由一种催化亚基 A 亚基 (Calcineurin Subunit A, CNA) 和调节亚基 B 亚基 (Calcineurin subunit B, CNB) 组成的异源二聚体蛋白。催化亚基 CNA (59-62kD) N-末端区域、催化区域 (金属离子结合区, Catalytic Domain)、CNB 结合区域 (CNB Binding Domain, BBH)、CaM 结合区域 (CaM Binding Domain, CBD) 和自抑制区域 (Autoinhibitory, AI) 5 个部分组成 (彩插图 1.2), 其结构序列在所有真核生物中具有高度保守性<sup>[38]</sup>。CNA 只含有位于催化结构区域的 Trp134、Trp232、Trp342 和位于 BBH 区的 Trp352 4 个色氨酸<sup>[39]</sup> (图 1.3), 这有利于用 CNA 的内源荧光特性来研究 CN 结构的变化及其与药物小分子相互作用。调节亚基 CNB (19kDa) 是一个由 170 多个氨基酸组成的多肽片段, 其包含 CNA 结合域和两个球形  $\text{Ca}^{2+}$  结合域, 每个  $\text{Ca}^{2+}$  结合域又含两个与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的 EF-手臂序列<sup>[40]</sup> (图 1.4)。

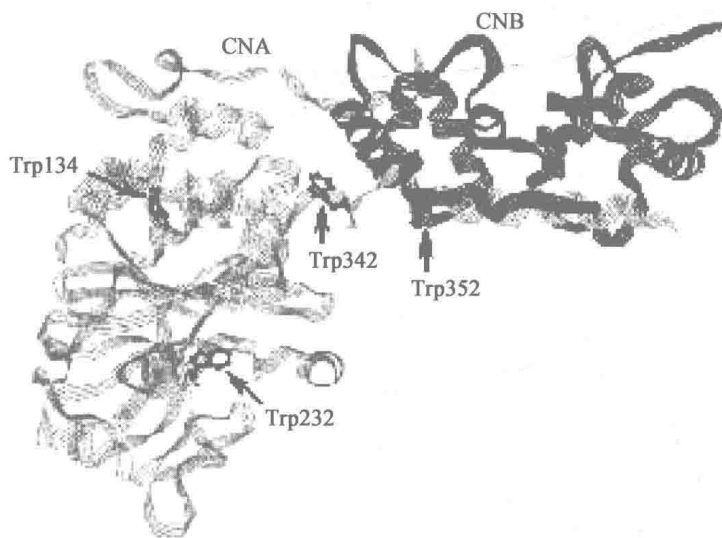


图 1.3 CNA 中的 4 个色氨酸残基的位置

Fig. 1.3 The four tryptophan in CNA

[摘自 Nature, 1995, 378 (7): 641-644]

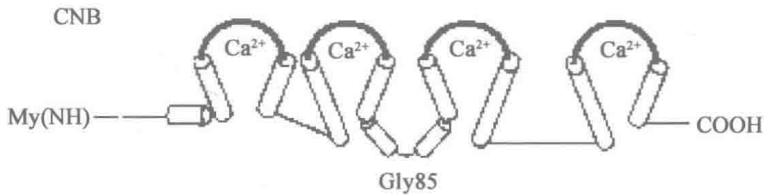


图 1.4 钙调蛋白磷酸酶 B 亚基 (CNB) 的结构

Fig. 1.4 The structure of regulatory subunit B of calcineurin

[摘自: Biochemical and biophysical research communications, 1997, 235 (2): 271-275]

### 1.2.2 钙调蛋白磷酸酶的活性调节

钙调蛋白磷酸酶的激活由  $\text{Ca}^{2+}$ 、CNB 和 CaM 的协同来实现, 其中涉及构象的改变如彩插图 1.3 所示。通常情况下, CNB 能牢固地结合到 CNA 上, 形成非活化状态的二聚体 (form I), 完全活化状态的 CN 需要构象的改变, 钙离子结合到 CNB 的低亲和力位点, 导致 CNA 中 CaM 结合结构域从 CNB 结合区分离出来, 使 CN 从 form I 过渡到 form II; 促使钙调素结合到上面形成 form III, 钙调素的结合导致自抑制区 AI 离开催化中心和完全活化状态的 CN (form IV) 形成<sup>[37]</sup>。

### 1.2.3 钙调蛋白磷酸酶的生理功能

随着科学技术的发展, 研究发现, CN 在生物体内具有重要的生理活性, 参与神经系统发育和记忆、免疫反应、心脏肥大、信号转导和肌肉发育、心血管系统疾病和骨骼肌的生长、睾丸中精子的发生、细胞的凋亡、过敏反应、关节炎、胰岛素的合成以及调节心血管的功能等生理生化过程<sup>[41,42]</sup>。CN 在免疫反应的 T 细胞的活化过程中起着关键作用, 以 CN 为靶点来治疗给临床器官移植带来技术革命, 特别是以 CN 为靶酶的免疫抑制剂 CsA 和 FK506 的发现, 给器官移植和自身免疫性疾病的药物治疗开辟了新的途径<sup>[43]</sup>。

### 1.2.4 钙调蛋白磷酸酶在免疫应答中的作用

免疫应答 (immune response) 是指机体受抗原刺激后, 体内抗原特异淋巴细胞识别抗原, 发生活化、增殖、分化或者无能、凋亡等一系列生理反应。

在 T 细胞活化过程中, CN 发挥着重要的脱磷酸化作用, 是 T 细胞活化过程中的一个关键的信号酶。T 细胞转录激活因子 (Nuclear Factor of Activated T cells, NFAT) 是一类在 T 细胞活化过程中调控 IL-2 以及其他 T 细胞早期分化