

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.01.008

多西环素对 EAE 大鼠 Th1/Th2 细胞平衡及相关细胞因子的影响

肖凤娟¹, 杨元², 许学杰¹, 李作孝^{2△}

(1. 四川绵阳四〇四医院神经内科 621000; 2. 西南医科大学附属医院神经内科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨多西环素对实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)大鼠模型 Th1/Th2 细胞平衡的影响。**方法** 将 40 只雌性 Wistar 大鼠分为 EAE 对照组及低、中、高剂量多西环素组, 每组 10 只。观察大鼠发病情况及发病高峰期外周血单个核细胞(PBMC)分泌白细胞介素(IL)-4、干扰素- γ (IFN- γ)水平, 测定高峰期脑组织 IL-1 β 、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平及脑脊液和血清清蛋白水平, 计算脑脊液与血清清蛋白比值(QA 值)。**结果** 各剂量多西环素组大鼠临床症状较 EAE 对照组均减轻。各剂量多西环素组大鼠发病高峰期外周血单个核细胞(PBMC)分泌 IFN- γ 水平和 IFN- γ /IL-4 比值均较 EAE 对照组降低, 分泌 IL-4 水平均较 EAE 对照组升高($P < 0.01$); 高剂量多西环素组 IL-4 水平较中剂量多西环素组增高差异无统计学意义($P > 0.05$), 其余各剂量多西环素组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。各剂量多西环素组大鼠发病高峰期脑组织 IL-1 β 、TNF- α 水平及 QA 值较 EAE 对照组降低, IL-10 水平较 EAE 对照组升高($P < 0.05$)。随多西环素剂量增加, 各剂量多西环素组 IL-1 β 、TNF- α 水平及 QA 值越低, IL-10 水平越高, 且各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 多西环素可明显减轻 EAE 大鼠临床症状, 其机制可能与多西环素降低大鼠 Th1 细胞因子水平, 升高 Th2 细胞因子水平, 纠正 Th1/Th2 细胞平衡, 从而保护血脑屏障有关。

[关键词] 实验性变态反应性脑脊髓炎; 多西环素; Th1 细胞; Th2 细胞; QA 值; 大鼠, Wistar

[中图分类号] R744.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)01-0044-04

Effect of doxycycline on Th1/Th2 cell balance and related cytokines in experimental allergic encephalomyelitis rats

Xiao Fengjuan¹, Yang Yuan², Xu Xuejie¹, Li Zuoxiao^{2△}

(1. Department of Neurology, Mianyang 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China;

2. Department of Neurology, Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of doxycycline on the Th1/Th2 cell balance in experimental allergic encephalomyelitis(EAE) rats. **Methods** Forty female Wistar rats were randomly divided into the EAE control group, low, medium and high doses DOX treatment groups, 10 cases in each group. The onset situation in rats was observed. The IL-4 and IFN- γ levels secreted by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) at the peak stage were detected. The levels of IL-1 β , IL-10, TNF- α in brain tissue, and the albumin content in cerebrospinal fluid and serum were detected. The QA value was calculated. **Results** In each DOX group, the clinical symptoms of rats were alleviated compared with the EAE control group. In each DOX group, the PBMC secreting IFN- γ level and IFN- γ /IL-4 ratio in the onset peak stage were lower than those in the EAE control group, while the IL-4 level was higher than that in the EAE control group($P < 0.01$). Compared with the medium-dose DOX group, the increase of IL-4 level in the high-dose DOX group was unapparent($P > 0.05$), but the difference between other DOX groups had statistical significance($P < 0.01$). The IL-1 β and TNF- α levels of brain tissue and QA value during onset peak stage in various doses DOX groups were decreased compared with the EAE control group, while the IL-10 level was increased compared with the EAE control group($P < 0.05$). With the DOX dose increasing, the levels of IL-1 β , TNF- α and QA value in various doses DOX groups became lower, the IL-10 level became higher, there was statistically significant difference among various doses DOX groups ($P < 0.05$). **Conclusion** DOX can obviously alleviate the clinical symptoms of EAE rats, its mechanism may be related with that DOX could decrease the level of Th1 cytokine and increase the level of Th2 cytokine, correct the Th1/Th2 cell balance, thus protect the blood brain barrier(BBB).

[Key words] experimental allergic encephalomyelitis; doxycycline; Th1 cell; Th2 cell; QA; rats, Wistar

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种常见的中枢神经系统(CNS)多灶性、炎性、脱髓鞘性疾病,其发病兼有神经变性和免疫异常两方面^[1],但目前其具体的病因和发病机制仍不完全清楚,迄今也无肯定的有效治愈方法。而通过致敏抗原诱导敏感实验动物发生的由 T 细胞介导的迟发型超敏反应型自身免疫疾病-实验性变态反应性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE),是目前国际上公认的研究 MS 的理想动物模型^[2]。传统观点认为细胞免疫 Th1/Th2 平衡失调与 MS 和 EAE 发病密切相关, Th1 细胞为炎症促进细

胞,分泌的白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)等细胞因子,能诱导巨噬细胞活化,激活 T 细胞反应,增强抗原-提呈作用; Th2 细胞是炎症抑制细胞,分泌的 IL-4、IL-10 等具有抗炎作用,可下调 Th1 型免疫应答反应并抑制其细胞因子产生^[3]。Th1 细胞免疫应答增强和 Th2 细胞免疫应答减弱是 MS 发病重要机制^[4]。同时在此免疫功能失衡的状态下,血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的免疫屏障功能受到破坏,异常激活的 T 型免疫细胞及其细胞因子、血液中的蛋白等大分子成分则会通过受损的 BBB

进入 CNS,进而成为脑脊液成分。因此,有学者认为,脑脊液蛋白含量可以较理想地反映 BBB 的状态,血清清蛋白水平比值(QA 值)与 BBB 通透性受损程度呈正相关^[5]。

多西环素(doxycycline)作为半合成四环素类抗生素,不仅具有抗菌活性,在一定程度上也能抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、中性粒细胞弹力蛋白酶、一氧化氮合成酶,同时还具有生物利用度高、高脂溶性、易透过 BBB、安全性高等优点。本实验旨在探究多西环素对 EAE 大鼠体内 Th1/Th2 细胞平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 Wistar 大鼠 40 只(四川大学华西实验动物中心),6~8 周龄,体质量(200±20)g;豚鼠 6 只(四川大学华西实验动物中心),体质量(400±20)g。实验前 Wistar 大鼠在西南医科大学附属医院中心实验室常规饲养 1 周。

1.1.2 实验药品及试剂 多西环素针剂购自海口康力元制药有限公司;卡介苗(BCG)购自 BD 公司;不完全福氏佐剂(IFA)购自 Sigma 公司;IL-4、IL-10、IFN-γ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EAE 模型的制作 将 Wistar 大鼠分为 4 组:EAE 对照组及低、中、高剂量多西环素组,每组 10 只。将 BCG 加入 IFA 制成含 5 mg/mL BCG 浓度的完全福氏佐剂。在大鼠四足掌胶质垫皮下注射完全福氏佐剂,每只 0.5 mL。

1.2.2 模型干预 从造模前 3 天开始每天分别给予低、中、高剂量多西环素组多西环素 5、10、20 mg·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射;EAE 对照组予以相同剂量生理盐水,连续 10 d。

1.2.3 动物模型评价 每天定时对实验大鼠进行神经功能障碍评分。评分标准:0 分,未发病;1 分,后肢轻度无力(尾巴无力);2 分,中度后肢无力或轻度共济失调;3 分,中至重度后肢无力;4 分,严重后肢无力;5 分,中度以下四肢无力的截瘫;6 分,四肢全瘫或严重共济失调或者死亡^[6-7]。

1.2.4 实验终止 将大鼠在连续 3 d 症状评分无加重、四肢瘫痪或者大鼠死亡的发病高峰期处死,取大鼠脑脊液(CSF)、外周血和脾脏。

1.2.5 大鼠血清 IL-4、IFN-γ 水平测定 实验终止时,每只 Wistar 大鼠经眶静脉丛取血 8~9 mL,用肝素抗凝后以 2 000 r/min 离心 30 min,留取 1/2 血清保存于-20 ℃冰箱,按 IL-4、IFN-γ ELISA 试剂盒说明书检测。

1.2.6 脑组织 IL-1β、IL-10、TNF-α 水平的测定 实验终止时,取 300~400 mg 脑组织立即放入 1 mL 生理盐水研磨成匀浆,在 4 ℃以 3 000 r/min 离心 15 min,留取上清液保存于-20 ℃,15 d 内按 IL-10 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-10 水平,通过放射免疫法测定脑组织 IL-1β、TNF-α 水平。

1.2.7 CSF 和 QA 值检测 实验终止时,将剩余 1/2 血清与脑脊液送至医院检验科检测清蛋白水平,并计算脑脊液与血清清蛋白比值即 QA 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EAE 对照组及各剂量多西环素组发病情况 EAE 对照组大鼠多在免疫后 10 d 左右开始逐渐出现病情,如活动量减少、反应时间延长,继而出现单侧或双侧前后肢体无力、共济失调、瘫痪甚至死亡。各剂量多西环素组实验大鼠症状均较 EAE 组减轻,表现为潜伏期延长,进展期缩短,神经功能障碍评分减低。各剂量多西环素组并无大鼠死亡。

2.2 各组大鼠发病高峰期 PBMC 分泌 INF-γ、IL-4 水平及 IFN-γ/IL-4 比值 各剂量多西环素组大鼠发病高峰期 PBMC 分泌 IFN-γ 水平和 IFN-γ/IL-4 比值均较 EAE 对照组降低,分泌 IL-4 水平均较 EAE 对照组升高($P < 0.01$);高剂量多西环素组 IL-4 水平较中剂量多西环素组差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各剂量多西环素组间差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组发病高峰期 PBMC 分泌 INF-γ、IL-4 水平及 IFN-γ/IL-4 比值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN-γ(ng/mL)	IL-4(pg/mL)	IFN-γ/IL-4
EAE 对照组	10	0.82±0.07	10.82±0.62	75.44±8.27
低剂量多西环素组	10	0.71±0.05 ^a	13.41±0.34 ^a	52.30±7.26 ^a
中剂量多西环素组	10	0.52±0.03 ^{ab}	15.52±0.47 ^{ab}	32.44±3.76 ^{ab}
高剂量多西环素组	10	0.34±0.03 ^{abc}	15.57±0.57 ^{ab}	22.61±3.64 ^{abc}
F		167.3	192.5	146.9
P		<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P < 0.01$,与 EAE 对照组比较;^b: $P < 0.01$,与低剂量多西环素组比较;^c: $P < 0.01$,与中剂量多西环素组比较。

表 2 各组大鼠发病高峰期脑组织 IL-1β、IL-10、TNF-α 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1β (pg/mg)	IL-10 (ng/mg)	TNF-α (ng/mg)
EAE 对照组	10	2.90±0.28	0.59±0.18	2.97±0.39
低剂量多西环素组	10	2.19±0.21 ^a	0.90±0.20 ^b	2.56±0.21 ^a
中剂量多西环素组	10	1.50±0.19 ^{ac}	1.22±0.15 ^{ac}	1.92±0.25 ^{ac}
高剂量多西环素组	10	0.85±0.11 ^{acd}	1.46±0.09 ^{acd}	1.44±0.20 ^{acd}
F		179.5	46.4	57.2
P		<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P < 0.01$,^b: $P < 0.05$,与 EAE 对照组比较;^c: $P < 0.01$,与低剂量多西环素组比较;^d: $P < 0.01$,与中剂量多西环素组比较。

表 3 各组大鼠发病高峰期 QA 值变化

组别	n	QA 值($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2}$)
EAE 对照组	10	7.12±0.78
低剂量多西环素组	10	4.64±0.58 ^a
中剂量多西环素组	10	3.14±0.56 ^{ab}
高剂量多西环素组	10	1.71±0.53 ^{abc}
F		138.3
P		<0.01

^a: $P < 0.01$,与 EAE 对照组比较;^b: $P < 0.01$,与低剂量多西环素组比较;^c: $P < 0.01$,与中剂量多西环素组比较。

2.3 各组大鼠发病高峰期脑组织 IL-1 β 、IL-10、TNF- α 水平比较 各剂量多西环素组大鼠发病高峰期脑组织 IL-1 β 、TNF- α 水平较 EAE 对照组降低,IL-10 水平较 EAE 对照组升高($P < 0.05$)。随多西环素剂量增加,各剂量多西环素组 IL-1 β 、TNF- α 水平越低,IL-10 水平越高,各多西环素组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.4 各组大鼠发病高峰期 QA 值比较 各剂量多西环素组大鼠发病高峰期 QA 值较 EAE 对照组明显降低($P < 0.01$),随多西环素剂量增加,各剂量多西环素组大鼠脑组织 QA 值水平越低,各多西环素组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

3 讨 论

已有的研究发现,MS 是在易感基因和环境因素共同作用下诱发的异常自身免疫应答在 CNS 的表现,包括血脑屏障破坏,髓鞘蛋白破坏,T 细胞过度激活,少突胶质细胞修复减弱等^[8-9]。大量研究证实,EAE 是细胞免疫和体液免疫共同参与的复杂免疫病理过程,是由因 IFN- γ 介导的 Th1 型免疫反应过强,导致 Th1/Th2 免疫平衡失调^[10]。Th1 型免疫反应增强的同时伴随 Th1 型细胞因子激活,后者能明显上调 BBB 内皮黏附分子的表达,诱导激活的 T 细胞粘连、入侵 BBB,且活化的免疫成分能通过激活 MMPs,降解构成 BBB 的层黏蛋白、血管内皮基底膜等,进一步破坏 BBB^[11-12]。有研究显示,QA 值作为评估 BBB 功能受损的指标,在 EAE 病程早期已开始升高,且随着病程的进展、临床症状的逐渐加重,QA 值升高越明显,提示 QA 值与 BBB 受损程度有关^[13]。

Th1 细胞因子(IL-1、TNF- α 、IFN- γ)是一类炎性细胞因子,其中的 IL-1 目前认为是参与最初免疫反应的,在其增强机体免疫防御功能的同时也启动了炎症反应和组织损伤,并在神经免疫轴中起关键作用,循环中的 IL-1 活性大多来源于 IL-1 β 。IL-1 β 能通过诱导 MMP-9 表达间接破坏 BBB,介导髓鞘降解,诱导少突胶质细胞凋亡^[14]。Cantagrel 等^[15]研究发现,通过降低 IL-1 基因表达或敲除 IL-1 基因可减轻 EAE 病情的严重性,提示体内 IL-1 水平与疾病的严重程度相关。TNF- α 可促进星形胶质细胞分化、诱导少突胶质细胞凋亡、抑制髓鞘形成;TNF- α 也可诱导内皮细胞分泌黏附分子,增加 BBB 通透性;同时 TNF- α 可协同 IFN- γ 诱导抗原提呈细胞的 MHC-II 抗原表达,并能诱导 IL-1 活化、促进 IFN- γ 产生^[16-17]。Sun 等^[18]实验发现,将 TNF- α 注入实验大鼠大脑半球可加重 EAE 大鼠病情。IFN- γ 在 Th0 细胞分化时,可促进其向 Th1 细胞分化,弱化 Th2 细胞分化,打破 Th0 细胞的分化平衡。在 EAE 活动期,IFN- γ 可通过强化抗原-提呈作用、激活 T 细胞、增强淋巴毒素释放破坏髓鞘^[19]。在 MS 发病中,IFN- γ 可诱导巨噬细胞产生 IL-1,并与 IL-1 协同作用于星形细胞分泌 TNF- α ^[20]。

Th2 细胞因子(IL-4、IL-10)是炎症抑制因子,IL-4 可诱导 Th0 细胞向 Th2 细胞分化增强,并促进 B 细胞增殖、分化、分泌抗体,诱导免疫耐受;同时也能抑制 Th1 细胞分化并下调其功能^[21]。Bai 等^[22]研究发现,通过鼻黏膜途径给予髓磷脂碱性蛋白(MBP)诱导 EAE 大鼠免疫耐受,促进 Th2 细胞分泌 IL-4,能缓解 EAE 大鼠症状、预防复发。IL-10 能抑制抗原提呈作用和抗原特异性 T 细胞的作用,协同刺激因子,增强 Th2 细胞的免疫调节功能,抑制 Th1 细胞分泌 IL-6、TNF- α ^[23]。Sonobe 等^[24]发现,在 EAE 大鼠发病时脾脏 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞 IL-10 mRNA 表达下降,在疾病恢复期 IL-10 mRNA 表达开

始上调,认为调节性 T 细胞发挥免疫调节功能是来源于 IL-10。

Minagar 等^[25]研究显示,多西环素可抑制 IFN- γ 、IL-1 等炎性因子的表达,其机制可能是通过阻断细胞因子转录后过程实现的。Su 等^[26]在研究小鼠全身过敏反应时发现,多西环素可通过抑制 P13K/Akt/eNOS/VE-钙黏蛋白通路下调 TNF- α 、IFN- γ 等炎性因子的分泌水平、促进抑炎因子 IL-4 产生。而 IFN- γ 等炎性因子在 EAE 发病中分泌增强,不仅能抑制 Th2 细胞分化,下调 Th2 型抑炎因子水平,还可通过激活 MMPs 加重 BBB 的损伤和 CNS 的炎性变态反应。因而,多西环素通过抑制 IFN- γ 等炎性因子的活化,上调 IL-4 等抑炎因子水平,可间接抑制 MMPs 的激活,从而减轻 BBB 的破坏。本实验显示:在 EAE 的发病中,多西环素可抑制 Th1 型细胞因子分泌,促进 Th2 型细胞因子分泌,纠正 Th1/Th2 细胞平衡紊乱,保护 BBB,从而对 EAE 的发病起防治作用。

Th1/Th2 细胞免疫失衡在 EAE 发病中起重要作用,而多西环素可通过抑制 Th1 型细胞因子产生,促进 Th2 型细胞因子分泌,纠正 Th1/Th2 免疫平衡紊乱,从而减轻 BBB 的受损,其可能是 EAE 与 MS 治疗的一种有效途径。本实验研究为多西环素在以后神经病学临床应用提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis[J]. Prog Brain Res, 2009, 175(9):239-251.
- [2] Mancardi G, Hart BA, Capello E, et al. Restricted immune responses lead to CNS demyelination and axonal damage[J]. J Neuroimmunol, 2000, 107(2):178-183.
- [3] Jagessar SA, Heijmans N, Blezer EL, et al. Unravelling the T-cell-mediated autoimmune attack on CNS myelin in a new Primate EAE model induced with MOG34-56 peptide in incomplete adjuvant[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(1):217-227.
- [4] Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4[J]. J Immunol, 1998, 160(11):5314-5319.
- [5] Virgintino D, Robertson D, Benaglio V, et al. Immunogold cytochemistry of the blood-brain barrier glucose transporter GLUT1 and endogenous albumin in the developing human brain[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 123(1):95.
- [6] Baeten K, Adriaensens P, Hendriks J, et al. Tracking of myelin-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animals using small particles of Iron oxide and MRI[J]. NMR Biomed, 2010, 23(6):601-609.
- [7] Corrêa JO, Aarestrup BJ, Aarestrup FM. Effect of Thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)[J]. Exp Neurol, 2010, 226(1):15-23.
- [8] Stern EB. A mind "surrounded by a moat": a first-person account of cognitive impairment in multiple sclerosis[J]. Cogn Behav Neurol, 2011, 24(4):217-226.

- [9] Pietrolongo E, Giordano A, Kleinfeld M, et al. Decision-making in multiple sclerosis consultations in Italy: third observer and patient assessments[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):e60721.
- [10] Linker RA, Lühder F, Kallen KJ, et al. IL-6 transsignalling modulates the early effector phase of EAE and targets the blood-brain barrier[J]. *J Neuroimmunol*, 2008, 205(1/2): 64-72.
- [11] Shiryayev SA, Savinov AY, Cieplak P, et al. Matrix metalloproteinase proteolysis of the myelin basic protein isoforms is a source of immunogenic peptides in autoimmune multiple sclerosis[J]. *PLoS One*, 2009, 3(4):e4952.
- [12] Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis[J]. *Mult Scler*, 2007, 13(5):687-690.
- [13] Prat A, Biemacki K, Lavoi JF, et al. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium [J]. *Arch Neurol*, 2002(59):391-397.
- [14] Tomioka R, Matsui M. Biomarkers for multiple sclerosis [J]. *Intern Med*, 2014, 53(5):361-365.
- [15] Cantagrel A, Navaux F, Nourhashemi F, et al. Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-24, and interleukin-10 gene polymorphisms[J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(6):1093-1100.
- [16] 孙雅菲, 高娟, 檀国军, 等. 阿托伐他汀对实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠 TNF- α 和 iNOS 表达的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33(9):533-536.
- [17] 李婧, 曾丽, 邹东华. 外源性雄激素对 EAE 大鼠血中 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2008, 34(2):115-117.
- [18] Sun D, Newman TA, Perry VH, et al. Cytokine-induced enhancement of autoimmune inflammation in the brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2004, 30(4):374-384.
- [19] Ivanov H, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells[J]. *Cell*, 2006(126):1121-1133.
- [20] Chung IY, Norris JG, Benveniste EN. Differential tumor necrosis factor alpha expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis-susceptible and -resistant rat strains[J]. *J Exp Med*, 1991, 173(4):801-811.
- [21] Keating P, O'sullivan D, Tierney JB, et al. Protection from EAE by IL-4R α (-/-) macrophages depends upon T regulatory cell involvement [J]. *Immunol Cell Biol*, 2009, 87(7):534-545.
- [22] Bai XF, Shi FD, Xiao BG, et al. Nasal administration of myelin basic protein prevents relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats by activating regulatory cells expressing IL-4 and TGF- β mRNA[J]. *J Neuroimmunol*, 1997, 80(1/2):65-75.
- [23] Mes Z, Stem JN, Reddy J, et al. Modified amino acid copolymers suppress myelin basic protein 85-99-induced encephalomyelitis in humanized mice through different effects on T cells [J]. *PNAS*, 2004, 101(32):11749-11754.
- [24] Sonobe Y, Jin S, Wang J, et al. Chronological changes of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2007, 213(4):329-339.
- [25] Minagar A, Alexander JS, Schwendimann RN, et al. Combination therapy with interferon beta-1a and doxycycline in multiple sclerosis: an open-label trial[J]. *Arch Neurol*, 2008, 65(2):199-204.
- [26] Su W, Wan Q, Han L, et al. Doxycycline exerts multiple anti-allergy effects to attenuate murine allergic conjunctivitis and systemic anaphylaxis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(3):359-368.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-08-18)

(上接第 43 页)

- of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(9):3057-3060.
- [23] Li Y, Fu L, Yeo H, et al. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by helioxanthin and its derivative[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2005, 16(3):193-201.
- [24] Sharma KV, Davids LM. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2012, 9(2):156-163.
- [25] Malmström S, Larsson SB, Hannoun C, et al. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load--down-regulated transcription of PgRNA has limited impact[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e36349.
- [26] Tang H, Mclachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(4):1841-1846.
- [27] Tang H, Raney AK, Mclachlan A. Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture [J]. *J Virol*, 2001, 75(19):8937-8948.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-12)