

柚皮素：新一代免疫调节剂*

曾文峰¹⁾ 张发云¹⁾ 杜刚军^{1,2)} 金凌涛^{1,3)} 秦 蕾^{1,4)} 董文娟^{1,5)} 张 超¹⁾
 王洛洋^{1,6)} 尹晓哲¹⁾ 张春玲¹⁾ 梁 伟^{1)**}

¹⁾ 中国科学院生物物理研究所蛋白质与多肽药物实验室, 北京 100101; ²⁾ 河南大学药学院, 开封 475004;

³⁾ Winship Cancer Institute of Emory University, Atlanta GA 30322, USA;

⁴⁾ Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago IL 60611, USA;

⁵⁾ Ohio State University Medical Center, Columbus OH 43210, USA; ⁶⁾ 清华大学化工学院, 北京 100084)

摘要 大量研究表明, 植物来源的黄酮类化合物具有广泛的生理活性和药理作用, 日常摄取适量的黄酮类化合物能够显著降低许多疾病的发生. 柚皮素作为一种自然界分布广泛的黄酮类化合物富含于水果、蔬菜、坚果、咖啡、茶和红酒等日常饮食中, 与其他黄酮类化合物相比柚皮素易于胃肠道吸收、生物利用度高且安全剂量大. 自 2004 年起我们对柚皮素调节免疫的分子机制进行了深入系统的研究. 本文将重点介绍柚皮素作为一种新型免疫调节剂的研究进展.

关键词 柚皮素, TGF- β , 免疫调节剂, 炎性细胞因子, 肿瘤免疫治疗

学科分类号 R966

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0189

1 柚皮素生物学活性研究的概况

1.1 雌激素样作用

体内雌激素发挥着重要的生理功能, 能够调控细胞增殖、分化及代谢. 细胞响应雌激素信号的方式有两种: 一种是基因组调节方式, 即雌激素与其受体结合, 转移到细胞核中, 与其他共调节因子一起对下游目的基因行使转录调控; 另一种是非基因组调节方式, 即雌激素直接影响细胞内的第二信使分子(包括钙离子、磷酸肌醇和环腺苷酸等), 快速对下游信号通路(包括 PKC、PI3K/AKT、ERK/MAPK 等)进行调节, 而雌激素受体中半胱氨酸的棕榈酸化是雌激素启动其非基因组调节方式的必要条件^[1].

由于柚皮素的化学结构与雌激素类似, 通常被认为具有雌激素样作用^[2]. 人宫颈癌细胞系 HeLa 中天然缺失雌激素受体, 在转染雌激素受体 α 的表达载体之后, 柚皮素可以启动响应雌激素信号的基因转录, 证明柚皮素可以作为雌激素类似物启动雌激素受体 α 的转录活性^[3]. 但是在雌激素存在的情况下, 柚皮素反而抑制雌激素敏感的肿瘤细胞, 例如人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖^[4], 提示柚皮素可

以通过非基因组方式调控雌激素的作用^[5]. 进一步的研究证实柚皮素可以在短时间内(1 min)降低雌激素受体 α 的棕榈酸化, 并导致雌激素受体 α 与 caveolin-1 蛋白解离, 进而抑制 ERK/MAPK 和 PI3K/AKT 通路的激活^[5].

基于柚皮素的雌激素样作用, 柚皮素可用于绝经后妇女雌激素的替代治疗, 以避免长期服用雌激素导致的严重不良反应. 在骨骼肌细胞的分化过程中柚皮素可以特异性抑制雌激素受体 α 介导的 AKT 活化, 进而减少骨骼肌分化标志物的产生. 此外, 柚皮素还可以通过激活雌激素受体 β 及其下游 p38/MAPK 信号通路来减少骨骼肌分化过程中产生的过量活性氧分子. 因此柚皮素通过差异化调控雌激素受体 α 与 β 介导的下游相关信号通路在控制骨骼肌的分化, 同时避免过量氧化压力带来

* 国家自然科学基金(81503106, 81773288, 81173633), 国家卫生健康委员会“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201001-001-004)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-84889861, E-mail: weixx@ibp.ac.cn

收稿日期: 2018-07-09, 接受日期: 2018-08-20

的毒性^[6]。

1.2 对机体能量代谢的影响

流行病学调查显示, 如果人们通过食物摄取黄酮类化合物(包含柚皮素)越多, 则罹患冠心病、中风、高血脂和糖尿病等慢性疾病的几率更低^[7-10]。研究表明, 柚皮素可以调控血糖水平, 以及外周组织对胰岛素的敏感性, 从而达到预防糖尿病和心血管疾病的发生。在分子水平上, 柚皮素能快速激活胰岛素下游信号蛋白 PI3K 和 ERK/MAPK 激酶^[11-12], 并增加细胞对胰岛素信号的敏感性^[13], 促进骨骼肌细胞对葡萄糖的吸收^[14]。在动物模型中, 柚皮素降低糖异生相关酶的基因表达^[15], 显著降低高脂诱导的小鼠血糖和血浆中胰岛素的水平, 改善外周组织的葡萄糖耐受症状, 增加骨骼肌对葡萄糖的摄取和利用^[16-17]。

此外, 柚皮素对脂类代谢的影响较为显著。坚持每天服用 400 mg 柚皮苷(柚皮素的糖苷形式)连续 8w 后, 患有高胆固醇症状患者的血液中总胆固醇含量和低密度脂蛋白携带的胆固醇含量均显著降低^[10]。在高脂高胆固醇饲料喂养的动物模型中, 柚皮素能够显著改善高血脂症状^[18-19]。给予 50 mg/kg 柚皮素 90d 后, 高胆固醇饲料喂养的 Wistar 大鼠血浆中的脂类含量、肝脏中贮存的脂类含量和肝纤维化程度均有显著改善^[20]。分子机制的研究揭示柚皮素可以通过抑制 MTP(microsomal triglyceride transfer protein)介导的甘油三酯堆积, 进而减少肝细胞分泌载脂蛋白 B100 所携带的脂蛋白^[21]。此外, 柚皮素还可以促进 apoB100 的降解。由于 apoB100 的降解不仅可以通过蛋白酶体完成, 还可以通过内质网上的蛋白酶或低密度脂蛋白受体 LDLR 介导的溶酶体完成, 因为柚皮素可以增加细胞中 LDLR 的 mRNA 表达^[11, 22]。

1.3 抗炎活性

柚皮素具有类似非甾体抗炎药物的活性, 通过抑制环氧化酶 COX 减少前列腺素 PGE2 的合成, 起到解热镇痛和缓解炎症的作用。柚皮素除了抑制 COX-2 的表达外, 还能显著减少免疫细胞如巨噬细胞激活后产生的炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 β 等^[23-29]。

1.4 调节细胞内氧化压力

活性氧(reactive oxygen species, ROS)主要由细胞内线粒体和细胞质膜上的 NOX 家族成员产生, 它们是胞内氧化压力的来源。细胞内产生的 ROS 参与调控诸多复杂的细胞功能, 例如促进肿瘤细胞

的生长^[30]、干细胞分化^[31]、细胞因子的表达、活化和信号转导^[32], 甚至免疫细胞的功能(如 DC 的抗原呈递和 T 细胞的活化)^[30, 33]。当氧化压力超过细胞的承受能力将导致细胞凋亡或坏死, 而在特定的时间和胞内特定的区域适度的氧化压力是细胞增殖、存活以及行使各种细胞功能所必需的^[31, 34]。因此为了维持细胞时空内的氧化压力平衡, 细胞进化出了能精确调控 ROS 产生和清除的机制。

黄酮类化合物的各种生物学活性通常被认为是其抗氧化作用的结果, 如直接与自由基反应、线粒体氧化磷酸化、解偶联和诱导抗氧化相关基因的表达等^[35]。然而, 黄酮类化合物也被认为具有自氧化或抑制线粒体电子传递从而发挥促氧化作用^[36]。黄酮类化合物的“抗氧化”或“促氧化”之争使人们难以基于其作用机制有目的地开发和利用这一宝贵自然资源。我们的研究揭示, 黄酮类化合物并不能清除细胞内的自由基, 而是以酚自由基的形式将呼吸链中产生的电子暂时储存起来并传递给胞内其他分子起到电子载体和电子调节器(electron carrier and electronic regulator)的作用。实际上, 细胞摄入黄酮类化合物提升了细胞内总的氧化压力(图 1)。基于此原理, 我们可以清晰地认识到, 由于黄酮类化合物结构上差异导致它们携带和调节电子能力的巨大反差, 进而表现出不同的甚至相反的生物学活性^[37]。

免疫细胞行使功能需要 ROS 的参与, 例如巨噬细胞杀死病原体时产生的大量 ROS^[38], Toll 样受体的激活需要线粒体产生的 ROS 参与后续信号转导^[39], TNF- α 通过增加线粒体 ROS 的产生控制 NF- κ B 的活化和内皮细胞的炎症水平^[40-41], 以及 ROS 帮助活化炎症小体^[42]等。此外, T 细胞的活化也伴随着 ROS 的快速产生^[43]。早在 1986 年, Chaudhri 等^[44]就发现 T 细胞激活的同时加入抗氧化剂会抑制 T 细胞的增殖以及 IL-2 受体的表达。线粒体电子传递链复合物 III 的缺失使 T 细胞无法充分激活, 因此线粒体产生的 ROS 被认为是 T 细胞激活过程中 ROS 的主要来源^[45]。而 T 细胞激活早期线粒体快速产生的 ROS 还能激活 NOX 家族成员 NOX2 和 DUOX1, 前者负责维持 T 细胞激活需要的 ROS 水平^[46], 后者协助 T 细胞受体下游激酶 ZAP-70 和 ERK 的磷酸化, 以及分泌细胞因子^[47]。因此, 我们推断黄酮类化合物通过调节免疫细胞中 ROS 的产生, 进而调节免疫细胞的功能。

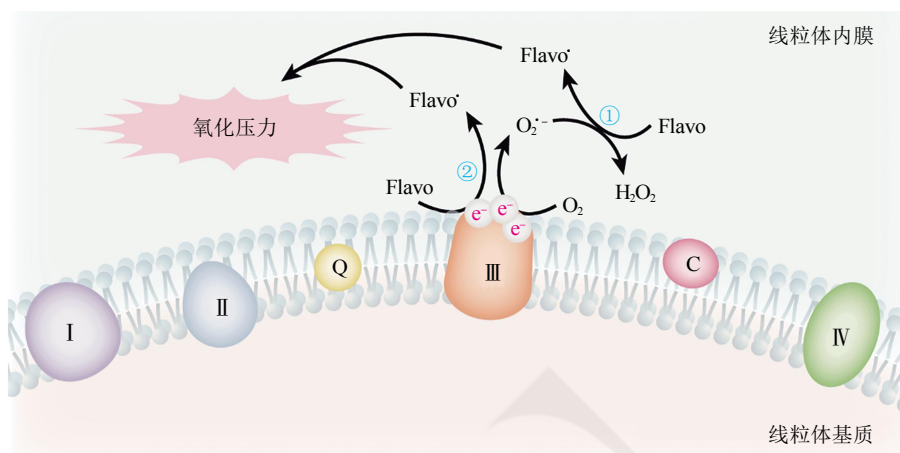


Fig. 1 Proposed the mechanism of flavonoids (Flavo) interfering intracellular electron transfer

图1 黄酮类化合物 (Flavo) 影响线粒体电子传递的分子机制示意图

本文以柚皮素为例, 重点论述我们实验室关于柚皮素调节免疫应答的分子机制——调控 TGF- β 信号通路及维持机体细胞因子稳态.

2 柚皮素调节免疫应答的机制研究

2.1 柚皮素对 TGF- β 信号通路的调节

2.1.1 TGF- β 信号通路

TGF- β 信号通路参与了诸如细胞生长、分化、凋亡和胚胎发育等生理过程, 并在肿瘤发生和发展过程中起着重要的作用^[48], 其家族成员包括 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3^[49]. 肿瘤细胞中最常见的是 TGF- β 1 高表达(后文中的 TGF- β 即指 TGF- β 1), 作为配体与其细胞膜表面的 I 型和 II 型受体结合. 与 II 型受体结合后, I 型受体被招募过来并被 II 型受体磷酸化, 从而使胞质内的下游效应蛋白 SMAD2 和 SMAD3 磷酸化. 磷酸化的 SMAD2 和 SMAD3 与 SMAD4 结合, 并转移到细胞核中调控下游基因的转录^[50]. SMAD7 是 TGF- β /SMAD 信号通路中的负调控因子, 与 SMAD3 竞争 SMAD4, 从而抑制 SMAD3 的激活对下游基因转录的影响. 除了依赖 SMAD 蛋白的信号转导之外, TGF- β 还可以激活许多其他诸如 PI3K、p38 和小 GTP 酶等来转导信号^[49].

TGF- β 既可以抑制肿瘤生长, 也可以促进肿瘤进展, 目前这种双重角色的潜在分子机制尚不明确. 在肿瘤免疫反应中, TGF- β 发挥全身免疫抑制作用, 抑制宿主免疫监视能力. 其中一个重要的机制就是 TGF- β 诱导的调节性 T 细胞抑制了具有抗

肿瘤活性的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞, 而 TGF- β 的中和抗体能够增强 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫反应. TGF- β 除了对肿瘤直接产生影响外, 还可以使肿瘤免疫抑制的微环境进一步恶化并导致大量细胞外基质的产生^[48]. 此外, TGF- β 还参与了诸如化疗/放疗引起的组织纤维化进程, 并促进肿瘤转移到已经形成纤维化的器官, 影响患者的生存期^[51-52].

目前, 基于 TGF- β 信号通路的抑制剂包括: 抗体、寡核苷酸和小分子化合物, TGF- β 中和抗体可以阻断 TGF- β 与其受体结合; 寡核苷酸靶向 TGF- β 的 mRNA 抑制其表达; 而小分子抑制剂则通过结合 I 型 TGF- β 受体酶活性区域的 ATP 结合位点. 上述抑制剂在不同环节上阻断了 TGF- β 信号通路, 实现抑制其功能的目的.

2.1.2 柚皮素选择性下调 SMAD3 表达抑制 TGF- β 信号通路

肝纤维化过程中, TGF- β 能够增加细胞外基质相关基因的表达, 有证据显示由 TGF- β 激活的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)产生细胞外基质具有 SMAD3 依赖的分子机制. 实验室早期研究显示柚皮素可以抑制由 TGF- β 引起的 HSC 细胞外基质相关蛋白质的产生, 包括 I 型胶原蛋白(collagen I)、纤连蛋白(fibronectin)和纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)^[53]. 进一步研究发现, 柚皮素可以直接下调 SMAD3 基因的表达进而减少其磷酸水平但并不影响 SMAD 家族的其他成员(包括 SMAD7、SMAD2 和 SMAD4)以及 I 型和 II 型

TGF- β 受体的表达量。因此,我们首次提出柚皮素可以作为 SMAD3 的选择性抑制剂这个概念。

之后在对胰腺癌细胞的研究中我们还发现,即使在没有 TGF- β 的情况下柚皮素依然能抑制 SMAD3 磷酸化^[54]。此外,在 TGF- β 刺激下,柚皮素提高了胰腺癌细胞对一线化疗药物吉西他滨的敏感度,而且显著降低了胰腺癌细胞的间质转换(通过间质转换标志物如波形蛋白、N-钙黏蛋白、金属蛋白酶 2 和金属蛋白酶 9 表征)和迁移能力,柚皮素的这一作用同样通过抑制了胞内 SMAD3 的表达和磷酸化水平来实现的。在当胰腺癌细胞中过表达 SMAD3 后,柚皮素的作用将减弱,进一步说明柚皮素对 SMAD3 的特异性调控作用。

在博来霉素诱导的肺纤维化模型中,我们检测到柚皮素能够显著降低血清中 TGF- β 的含量^[55]。与此同时,柚皮素显著升高抗纤维化细胞因子 IFN- γ 和 IL-2 的含量。在正常小鼠中,未观察到柚皮素能够改变这些细胞因子的含量。进一步研究发现,在肺纤维化小鼠中柚皮素通过改变这些细胞因子的含量,在减少 TGF- β 诱导产生的调节性 T 细胞种群数量的同时,增加了活化状态的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的种群比例以及功能。综上,我们推断在荷瘤动物模型中,柚皮素不仅可以直接降低肿瘤细胞的侵袭能力,减少 T 细胞分泌 TGF- β , 还可以通过减少 TGF- β 诱导产生的调节性 T 细胞,提高 CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤能力,从而降低肿瘤转移的几率。由此,我们在小鼠乳腺癌手术切除模型中考察了柚皮素的联合治疗效果。实验结果与我们的预期一致:柚皮素极大地降低了手术切除后乳腺癌的肺转移,并显著延长了小鼠的生存期。给予柚皮素的小鼠表现出调节性 T 细胞比例显著降低,相应的活化状态的 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞的种群比例以及 IFN- γ 、IL-2 的分泌水平都大幅上升^[56]。

2.1.3 柚皮素减少了 TGF- β 与其膜受体的结合

在对肝星状细胞和胰腺癌细胞的研究中,我们使用市售的 TGF- β 小分子抑制剂 SB-431542 与柚皮素作比较。作为 I 型 TGF- β 受体的特异性抑制剂,SB-431542 可以在体外抑制 SMAD2/SMAD3 的磷酸化。与柚皮素类似的是,SB-431542 抑制了 TGF- β 引起的 SMAD3 磷酸化;与柚皮素不同的是,SB-431542 并不影响 SMAD3 的 mRNA 或蛋白质水平,实验结果证实柚皮素与 SB-431542 具有不同的分子机制。由于 TGF- β 与其受体的结合是 SMAD3 磷酸化和下游信号转导的前提,为了深入

探究柚皮素抑制 TGF- β 信号通路的机制,我们采用单分子荧光成像和单分子力谱的方法,考察柚皮素对 TGF- β 与其受体结合过程的影响。结果显示,在没有 TGF- β 处理的细胞膜表面柚皮素不影响 TGF- β 受体的二聚化。但是在 TGF- β 处理的情况下,柚皮素显著降低了细胞膜表面 TGF- β 受体二聚体的形成,提示柚皮素对 TGF- β 与其受体的结合产生了抑制作用。使用单分子力谱进一步分析柚皮素对 TGF- β 与 II 型 TGF- β 受体的结合力以及结合概率时发现,柚皮素并不影响 TGF- β 与其 II 型受体结合力,但却能显著地降低它们的结合概率(具备浓度依赖性)^[57]。这可能是由于柚皮素能够与 II 型 TGF- β 受体的胞外区结合并提高其构象变动速率。如果我们假设 II 型 TGF- β 受体一直处于构象变动过程中,且只有一部分恰好处于“正确”构象的受体分子才能够结合 TGF- β 的话,那么构象变动速率的提升无疑在单位时间内降低了受体与 TGF- β 正确配对结合的概率。无论是否存在 TGF- β 刺激,SB-431542 在同样的检测条件下未发现其能够改变 TGF- β 与其受体的结合。

2.1.4 柚皮素抑制 TGF- β 的分泌

在乳腺癌模型中,柚皮素与 TGF- β 中和抗体表现出类似的抗转移效果,对两者的具体机制进行研究时我们发现,柚皮素在不影响 TGF- β 的转录水平前提下,通过限制 TGF- β 的胞内转运而达到减少肿瘤细胞分泌 TGF- β 的作用。由于 TGF- β 蛋白在胞内以前体形式合成,经胞内转运途径运输到细胞膜表面释放和进入溶酶体降解。在溶酶体抑制剂存在下,更多的 TGF- β 被分泌到胞外,柚皮素减少 TGF- β 分泌的作用依然存在,这一发现排除柚皮素对 TGF- β 胞内降解的影响。柚皮素可能是影响了 TGF- β 前体蛋白在胞内的转运过程,我们的这一假设得到了证实:柚皮素通过抑制 PKC ϵ 和 PKC ζ 的磷酸化阻止 TGF- β 由反式高尔基体到细胞膜的转运进而减少 TGF- β 的分泌^[58]。

2.1.5 柚皮素调控 TGF- β 信号通路的机制总结

实验室多年的研究揭示柚皮素可在以下 3 个层次上对 TGF- β 信号通路进行调控(图 2):

a. 调控 TGF- β 与其受体结合——柚皮素通过与 TGF- β II 型受体胞外区的结合,降低 TGF- β 与 II 型受体的结合概率,进而减少 I 型和 II 型 TGF- β 受体的二聚化,抑制下游信号通路的激活。此外柚皮素还可以减少胞内 SMAD3 蛋白的上膜过程,阻止 SMAD3 蛋白与 I 型受体胞内区的结合。

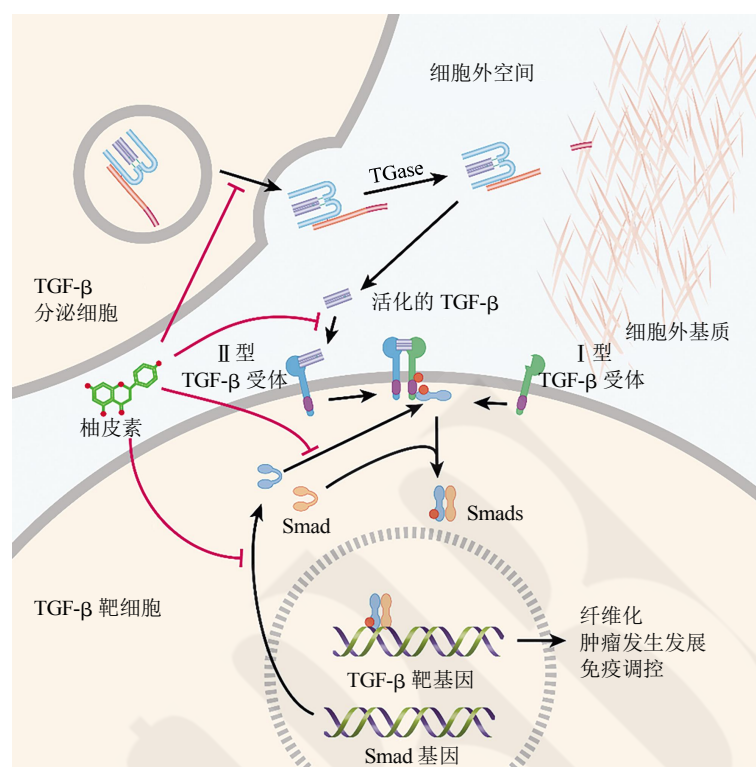


Fig. 2 The mechanism of naringenin regulating TGF- β signaling pathway

图2 柚皮素调控 TGF- β 信号通路的分子机制

b. 调控 TGF- β 下游 SMAD3 表达——柚皮素可以选择性地降低 SMAD3 蛋白的表达及其磷酸化水平, 但不影响其他 SMAD 家族成员, 从而直接抑制 TGF- β 信号通路的信号转导。

c. 调控 TGF- β 分泌——通过减少前体形式的 TGF- β 转运到细胞膜释放, 柚皮素可以直接减少肿瘤细胞和 T 淋巴细胞分泌 TGF- β , 而这一机制相信同样适用于其他细胞类型, 例如成纤维细胞等。

2.2 柚皮素对细胞因子稳态的调控

有观点认为, 柚皮素之所以能够降低高脂饮食喂养动物的血脂, 是因为柚皮素可以激活肝脏中的 AMPK 信号通路, 并降低炎性细胞因子的表达^[18], 同时也能减少巨噬细胞的浸润^[20]。我们也在高脂饲料喂养的小鼠肥胖模型中观察到柚皮素给药能够有效减少脂肪组织炎性细胞的浸润及细胞因子的表达, 并抑制诸如 JNK、NF- κ B 和内质网压力相关信号通路的激活(待发表)。这些发现提示柚皮素对慢性炎症具有良好的缓解作用。而在急性炎症模型中, 我们的研究显示柚皮素通过两种方式调控炎性细胞因子的稳态: a. 除了目前绝大多数文献中报道的转录水平调控之外; b. 柚皮素还能够促进炎

性细胞因子在溶酶体中的降解^[29]。转录水平的调控是晚期事件, 溶酶体途径的调控属于早期事件, 柚皮素分别作用于不同时相进而实现其对细胞因子的精确调控。

2.2.1 柚皮素对 TNF- α 、IL-6 等细胞因子的调控

我们发现柚皮素在博来霉素诱导的纤维化模型中不仅显著降低了 TGF- β 的含量, 同时也降低了 IL-4 的含量。那么, 柚皮素对其他细胞因子是否也具有一定的调节能力成为我们的另一个关注点。在最常用而且符合临床特点的急性炎症模型——LPS 诱导小鼠急性肝损伤模型中, 我们发现无论是预防性给药还是治疗性给药柚皮素均可显著降低小鼠的死亡率, 而且血清中各种炎性相关的细胞因子, 包括 TNF- α 、IFN- γ 、IL-17a、IL-5 和 IL-6 水平均显著下降。为了排除柚皮素对肝细胞的直接保护作用, 我们发现当诱导肝细胞的直接凋亡(不依赖于炎性细胞因子介导的凋亡)时, 柚皮素的保护作用消失了。该发现反向验证了柚皮素对小鼠的保护作用是通过降低炎性细胞因子水平来实现的。令人意外的是: 在不影响 TNF- α 和 IL-6 的转录及 mRNA 降解速率的前提下, 柚皮素既减少了 LPS 活化的

巨噬细胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的量, 同时还减少了胞内这两种炎性细胞因子的蛋白质水平(图 3). 这一点与上述提及的 $\text{TGF-}\beta$ 有所不同. 最终, 我们揭示了柚皮素通过促进 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 在溶酶体内降解实现对其稳态水平的调控, 这一过程依赖于柚皮素激活溶酶体的主要调控因子 TFEB ^[29].

2.2.2 柚皮素对 $\text{IL-1}\beta$ 的调控

受到柚皮素缓解博来霉素诱导肺纤维化研究的启发, 我们发现在放射引起的肺损伤(早期肺炎发展为晚期肺纤维化)模型中, 柚皮素能够显著缓解肺损伤、减少肺部炎性细胞浸润, 纠正了由放射线导致的细胞因子紊乱, 其中 $\text{IL-1}\beta$ 是受柚皮素调控

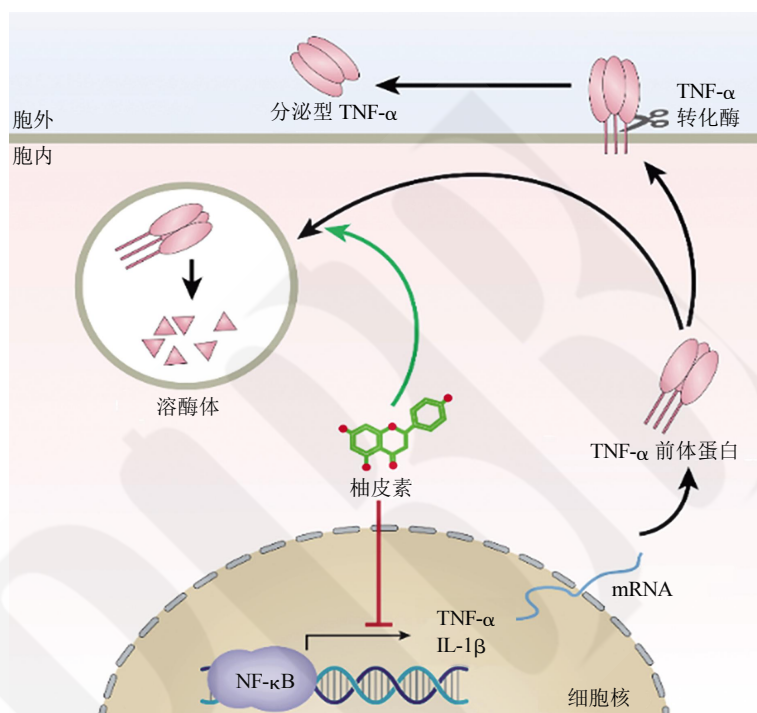


Fig. 3 The mechanism of naringenin regulating secretion of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$

图 3 柚皮素调控 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 分泌的分子机制

最为显著的细胞因子. 为验证这一发现, 我们建立 DNA 刺激巨噬细胞的体外模型以模拟体内细胞受到射线损伤后释放 DNA 片段激活免疫细胞. 柚皮素通过抑制 ERK 激酶的磷酸化显著降低了 DNA 激活的巨噬细胞中 $\text{IL-1}\beta$ 的转录. 柚皮素不仅展现出了与 $\text{IL-1}\beta$ 中和抗体类似的放射性肺损伤保护效果, 而且在荷瘤动物接受放射治疗的模型中, 柚皮素联合放疗的治疗效果显著优于 $\text{IL-1}\beta$ 中和抗体联合放疗的效果, 治疗后荷瘤动物的生存期得到明显的延长^[59].

3 应用与展望

近年来, 肿瘤免疫治疗成为肿瘤治疗研究领域的热点. 该疗法的策略是通过药物等手段激活人体

的抗肿瘤免疫反应, 利用自身免疫系统达到抑制或清除肿瘤的目的. 在此理论基础上, 开发出了包括免疫检查点抑制剂、CAR-T 以及治疗性肿瘤疫苗在内的新型抗肿瘤药物或治疗手段. 虽然临床上这些治疗措施表现出优异的抗肿瘤效果, 但还存在巨大的提升空间, 诸如患者的整体响应率不高、长期用药后会发生获得性耐药、适应症的局限性以及治疗后发生严重的免疫相关毒副作用(细胞因子释放综合征, cytokine release syndrome, CRS)等现象. 结合上述柚皮素调控免疫应答的机制, 作为一种新型的免疫调节剂, 其特点是能够将失衡的免疫状态(病理状态)恢复到接近正常的免疫平衡状态(生理状态), 而并非单向地增强或抑制免疫反应. 因此, 柚皮素具有提高肿瘤免疫治疗及放化疗的疗效并降低毒副作用的应用潜力.

3.1 与治疗性肿瘤疫苗联合

细胞内氧化压力水平能够影响 DC 细胞的抗原呈递能力, 因为 ROS 可以通过调控内吞体的 pH 或直接氧化抗原分子来调控 MHC I 型分子对抗原的呈递能力^[33, 60]. 此外 NOX2 产生的 ROS 通过氧化内吞体膜上的脂类成分导致抗原分子泄露到胞浆中促进抗原分子的交叉呈递效率. 但是, 通过直接外源添加 ROS 成分来调控上述抗原呈递过程是不现实的, 因为细胞中线粒体可以从容地承受一定程度的氧化压力, 但是如果氧化压力过于剧烈而又没有选择性, 如外源添加 H_2O_2 , 则会对细胞产生迅速、剧烈且不可逆的毒性.

柚皮素(100 $\mu\text{mol/L}$ 以内)可以适度地增加 DC 胞内的氧化压力, 导致抗原从内吞体泄露到胞浆中, 促进抗原的交叉呈递(待发表). 我们利用柚皮素能够精细调控细胞内氧化压力的这一特性, 在不影响细胞增值的剂量范围内对细胞的功能施加影响. 为进一步验证我们的设想, 小鼠经柚皮素处理后再接种疫苗进行免疫, 小鼠体内产生了更强的抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞免疫反应, 柚皮素并不影响佐剂对 DC 的活化作用. 符合我们的预期, 与疫苗单用组相比, 柚皮素联合疫苗组体现出更为优异的抗肿瘤效果, 无瘤生存的小鼠百分比显著提高(待发表). 柚皮素通过提高抗原的呈递效率与疫苗联合用进而增强疫苗的免疫效应, 柚皮素的这一作用不仅可以用于肿瘤疫苗的治疗而且也可用于病毒、细菌等治疗性疫苗.

3.2 与免疫检查点抑制剂联合

免疫检查点抑制剂(CTLA-4、PD-1 或 PD-L1 抗体)疗法能够极大地改善肿瘤微环境, 提高 T 淋巴细胞的浸润水平, 释放肿瘤相关抗原, 增强肿瘤杀伤性 T 细胞的功能^[61-64]. 该疗法前期能有效激活免疫细胞, 特别是 T 细胞, 产生极好的抗肿瘤效果, 但是后期肿瘤往往会复发, 这是因为残余的肿瘤细胞产生了获得性抵抗能力. 肿瘤部位持续的慢性炎症, 特别是 $IFN-\gamma$ 和 I 型 IFN 诱导肿瘤细胞以及骨髓来源的单核细胞表达更高水平的 PD-L1 和 $TGF-\beta$ 等, 使免疫检查点抑制剂无法发挥其功能. 这种慢性炎症信号还可以从表观遗传学水平改变肿瘤细胞的基因表达谱, 使之更加适应免疫抑制性微环境. 相对的, 肿瘤部位持续的炎症也能诱导 T 细胞进入一种表观遗传水平的“锁定”状态, 以至于 T 细胞在免疫抑制性微环境中进入耗竭状态后很难恢复到正常状态^[65]. 因此, 无论对于肿瘤细胞

还是免疫细胞, 肿瘤部位的炎症起始的时间、持续时间和强度都深刻地影响并塑造了肿瘤部位的免疫抑制性微环境, 为有效治疗肿瘤带来了极大的困难. 回顾之前的研究, 柚皮素不仅仅单方面地下调炎症细胞因子水平, 它对表征 T 细胞功能的 $IFN-\gamma$ 和 IL-2 具有显著的上调作用. 类似的, 在放射引起的肺损伤模型中, 柚皮素也能提高肺部 $IFN-\gamma$ 以及一些化学趋化因子的水平. 我们认为, 与炎症细胞因子的中和抗体不同, 柚皮素不是单一地下调、减少炎症细胞因子的含量, 其次柚皮素对炎症细胞因子的调控策略是使它们恢复到接近于正常的稳态水平, 从而改变微环境, 使免疫系统功能正常化.

此外, 免疫治疗(包括免疫检查点抑制剂和 CAR-T 疗法)过程中常伴随免疫相关的急性毒性反应 CRS. CRS 与单核细胞的过度活化, 大量分泌炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 等密切相关^[66-67], 而通过中和 IL-1 β , 能够极大地缓解 CRS. 柚皮素对急性炎症模型中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子具有良好的控制作用, 理论上可以一定程度上缓解免疫治疗过程中产生的 CRS, 使患者获益. 我们认为与免疫治疗联用, 柚皮素可以控制其副作用进而提高免疫治疗的疗效. 初步的实验结果验证了我们的上述假设, 系统的研究正在进行中.

3.3 与放疗联合

放疗已经在肿瘤治疗中使用了数十年, 它对肿瘤生长的控制效果非常好, 但是放射引起的正常细胞毒性限制了放疗的使用剂量. 临床放疗方案的设计往往需要在消除肿瘤细胞和保护正常组织之间取得平衡. 放射线(无论是 X 射线还是 γ 射线)对正常组织的毒性主要体现在两个方面, 一方面放射线引起胞内产生 ROS, 另一方面放射线造成的大量细胞死亡, 在照射野范围内引起局部慢性炎症, 最终可能发展成放射性组织纤维化, 影响患者的正常生理活动.

放射肿瘤学家曾经试图使用抗氧化剂辅助放疗, 以此来保护正常组织免受放射引起的 ROS 损伤, 但是治疗效果也同时降低了, 因为抗氧化剂同样能够保护肿瘤细胞抵抗放射引起的死亡^[68]. 相反, 也有一种观点是希望借助于肿瘤细胞胞内 ROS 本底水平高于正常细胞的特点, 在放疗的同时加入促氧化剂或抗氧化酶抑制剂以促使肿瘤细胞胞内积累的 ROS 更快达到致死阈值, 增强放疗对肿瘤细胞的杀伤作用^[69]. 根据前期研究结论, 柚皮素能适度地增加胞内总 ROS 水平, 我们尝试了柚

皮素与放疗的联用策略。在多个小鼠肿瘤模型中均能观察到柚皮素联合放疗组比单独放疗组能够更好地控制肿瘤生长,显著延长荷瘤小鼠的生存期(待发表)。同时,柚皮素对放射性肺损伤还体现出良好的保护作用。

很多化疗药物也能通过增加肿瘤细胞胞内的 ROS 水平进而达到杀伤肿瘤细胞的目的。阿霉素就是一个很好的例子,它除了作为拓扑异构酶的抑制剂外,还能够干扰线粒体电子传递链,促进肿瘤细胞线粒体 ROS 的产生。我们观察到柚皮素可以通过阻止阿霉素从肿瘤细胞中排出,从而达到增加胞内阿霉素含量,实现与阿霉素协同作用杀伤肿瘤细胞的现象^[70]。我们可以从另一个角度理解该协同作用:柚皮素除了能自身增加细胞胞内总氧化压力,还可以将更多的阿霉素保留在肿瘤细胞内,产生更多的氧化压力,促使其更快死亡。在荷瘤小鼠模型上这一协同作用也得到了验证,柚皮素联合化疗药物不仅增加化疗药物的效果,还可以显著降低其毒性。我们在小鼠肺癌模型中观察到柚皮素联合阿霉素能够缓解阿霉素带来的系统毒性^[70],而在博来霉素治疗乳腺癌肺转移模型中也能显著改善肺纤维化的症状^[55]。

3.4 自身免疫性疾病

风湿性关节炎是一种自身免疫疾病^[71],通常表现为持续性外周关节炎,并导致骨组织受损^[72]。全球约 1%的人口受到风湿性关节炎的影响^[73]。虽然具体的发病原因依然不明,但是风湿性关节炎患者表现出高水平 Th1 类细胞因子,低 Th2 类细胞因子^[74],而且伴有 Th17/ 调节性 T 细胞比例失衡^[75]。研究显示,柚皮素能够缓解大鼠风湿性关节炎症状,并减少血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量^[76]。而在小鼠风湿性关节炎模型中,柚皮苷不仅能够降低 Th1/Th2 的 T 细胞亚群比例,还可以提升调节性 T 细胞与 Th17 T 细胞的比例,从而改善风湿性关节炎症状^[77]。上述研究均提示柚皮素能够恢复自身免疫疾病状态下的免疫失衡,并应用于自身免疫疾病的治疗。

3.5 总结

除了具备雌激素样作用、调节机体能量代谢以及抗炎外,我们进一步揭示了柚皮素的免疫调节功能。基于细胞内电子载体的假说,柚皮素通过调节线粒体内电子的流向维持胞内特定时间和特定区域适度的氧化压力平衡。因此,柚皮素的免疫调节功能不同于传统的单纯的免疫增强剂或免疫抑制剂,

而是通过调节机体的免疫功能使其保持在正常的平衡状态。具体而言,柚皮素不仅适用于增强抗肿瘤免疫反应(免疫系统功能低下状态),还适用于缓解自身免疫疾病的症状(免疫系统功能过度活化状态),所以柚皮素可能是新一代极具潜力和用途广泛的免疫调节剂。

致谢 感谢天方药业对柚皮素产品研发工作的资助和支持;感谢天津药物研究院负责完成柚皮素的非临床药代动力学和毒理学研究工作以及武汉大学人民医院肿瘤中心在柚皮素保护放射性肺损伤临床疗效的探索性研究工作。

参 考 文 献

- [1] Marino M, Ascenzi P, Acconcia F. S-palmitoylation modulates estrogen receptor α localization and functions. *Steroids*, 2006, **71**(4): 298–303
- [2] Matthews J, Celius T, Halgren R, *et al.* Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, **74**(4): 223–234
- [3] Virgili F, Acconcia F, Ambra R, *et al.* Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor α signaling. *IUBMB Life*, 2008, **56**(3): 145–151
- [4] Ruh M F, Zacharewski T, Connor K, *et al.* Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochemical Pharmacology*, 1995, **50**(9): 1485–1493
- [5] Totta P, Acconcia F, Leone S, *et al.* Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor α and β signalling. *IUBMB Life*, 2008, **56**(8): 491–499
- [6] Pellegrini M, Bulzomi P, Galluzzo P, *et al.* Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor α and β signal pathway regulation. *Genes & Nutrition*, 2014, **9**(5): 425
- [7] Bazzano L A, Li T Y, Joshipura K J, *et al.* Intake of fruit, vegetables, and fruit juices and risk of diabetes in women. *Diabetes Care*, 2008, **31**(7): 1311–1317
- [8] Chanet A, Milenkovic D, Deval C, *et al.* Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012, **23**(5): 469–477
- [9] Deboer M D, Gurka M J, Woo J G, *et al.* Severity of the metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes between childhood and adulthood: the princeton lipid research cohort study. *Diabetologia*, 2015, **58**(12): 2745–2752
- [10] Jung U J, Kim H J, Lee J S, *et al.* Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clinical Nutrition*, 2003, **22**(6): 561–568
- [11] Borradaile N M, De Dreu L E, Huff M W. Inhibition of net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin

- involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes*, 2003, **52**(10): 2554–2561
- [12] Allister E M, Borradaile N M, Edwards J Y, *et al.* Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein expression and apolipoprotein B100 secretion by the citrus flavonoid naringenin and by insulin involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in hepatocytes. *Diabetes*, 2005, **54**(6): 1676–1683
- [13] Allister E M, Mulvihill E E, Barrett P H, *et al.* Inhibition of apoB secretion from HepG2 cells by insulin is amplified by naringenin, independent of the insulin receptor. *Journal of Lipid Research*, 2008, **49**(10): 2218–2229
- [14] Zygmunt K, Faubert B, Macneil J, *et al.* Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake *via* AMPK. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, **398**(2): 178–183
- [15] Kannappan S, Anuradha C V. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition*, 2010, **49**(2): 101–109
- [16] Assini J M, Mulvihill E E, Sutherland B G, *et al.* Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis in Ldlr(-)/(-) mice. *Journal of Lipid Research*, 2013, **54**(3): 711–724
- [17] Mulvihill E E, Allister E M, Sutherland B G, *et al.* Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2009, **58**(10): 2198–2210
- [18] Sharma A K, Bharti S, Ojha S, *et al.* Up-regulation of PPARgamma, heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, beta-cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *The British Journal of Nutrition*, 2011, **106**(11): 1713–1723
- [19] Shin Y W, Bok S H, Jeong T S, *et al.* Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 1999, **69**(5): 341–347
- [20] Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, *et al.* Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 *via* inhibition of nuclear factor kappaB pathway. *European Journal of Pharmacology*, 2015, **746**: 96–105
- [21] Borradaile N M, De Dreu L E, Barrett P H, *et al.* Hepatocyte apoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, *via* inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. *Biochemistry*, 2003, **42**(5): 1283–1291
- [22] Borradaile N M, De Dreu L E, Barrett P H, *et al.* Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *Journal of Lipid Research*, 2002, **43** (9): 1544–1554
- [23] Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, *et al.* Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007, **2007**: 45673
- [24] Bodet C, La V D, Epifano F, *et al.* Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and *ex vivo* human whole-blood models. *Journal of Periodontal Research*, 2008, **43**(4): 400–407
- [25] Raso G M, Meli R, Di Carlo G, *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A1. *Life Sciences*, 2001, **68**(8): 921–931
- [26] Vafeiadou K, Vauzour D, Lee H Y, *et al.* The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, **484**(1): 100–109
- [27] Chao C L, Weng C S, Chang N C, *et al.* Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutrition Research*, 2010, **30**(12): 858–864
- [28] Lin W C, Lin J Y. Five bitter compounds display different anti-inflammatory effects through modulating cytokine secretion using mouse primary splenocytes *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, **59**(1): 184–192
- [29] Jin L, Zeng W, Zhang F, *et al.* Naringenin ameliorates acute inflammation by regulating intracellular cytokine degradation. *The Journal of Immunology*, 2017, **199**(10): 3466–3477
- [30] Kong H, Chandel N S. Regulation of redox balance in cancer and T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, **293**(20): 7499–7507
- [31] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2012, **24**(5): 981–990
- [32] Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, *et al.* Transforming growth factor-Beta and oxidative stress interplay: implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, **2015**: 654594
- [33] Teoh C Y, Davies K J. Potential roles of protein oxidation and the immunoproteasome in MHC class I antigen presentation: the 'ProXI' hypothesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, **423**(1): 88–96
- [34] Zhou G, Meng S, Li Y, *et al.* Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming. *Cell Reports*, 2016, **15**(5): 919–925
- [35] Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, *et al.* Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *Journal of Neuroinflammation*, 2010, **7**: 3
- [36] Oxygen radicals in biology and medicine. Papers presented at the Fourth International Congress on Oxygen Radicals. June 27–July 3,

- 1987, La Jolla, California. Basic Life Sciences, 1988, **49**: 1–1095
- [37] Dong W, Wei X, Zhang F, *et al.* A dual character of flavonoids in influenza A virus replication and spread through modulating cell-autonomous immunity by MAPK signaling pathways. *Scientific Reports*, 2014, **4**: 7237
- [38] Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, *et al.* Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nature Genetics*, 2000, **26**(4): 435–439
- [39] West A P, Brodsky I E, Rahner C, *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 2011, **472**(7344): 476–480
- [40] Chandel N S, Schumacker P T, Arch R H. Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(46): 42728–42736
- [41] Rowlands D J, Islam M N, Das S R, *et al.* Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca^{2+} determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, **121**(5): 1986–1999
- [42] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology*, 2010, **10**(3): 210–215
- [43] Devadas S, Zaritskaya L, Rhee S G, *et al.* Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 2002, **195**(1): 59–70
- [44] Chaudhri G, Clark I A, Hunt N H, *et al.* Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *Journal of Immunology*, 1986, **137**(8): 2646–2652
- [45] Sena L A, Li S, Jairaman A, *et al.* Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 2013, **38**(2): 225–236
- [46] Kaminski M, Kiessling M, Suss D, *et al.* Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, **27**(10): 3625–3639
- [47] Kwon J, Shatynski K E, Chen H, *et al.* The nonphagocytic NADPH oxidase Duox1 mediates a positive feedback loop during T cell receptor signaling. *Science Signaling*, 2010, **3**(133): ra59
- [48] Yang L, Pang Y, Moses H L. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, 2010, **31**(6): 220–227
- [49] Brier B, Moses H L. Tumour microenvironment: TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2006, **6**(7): 506–520
- [50] Hata A, Shi Y, Massague J. TGF- β signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Molecular Medicine Today*, 1998, **4**(6): 257–262
- [51] Mancini M L, Sonis S T. Mechanisms of cellular fibrosis associated with cancer regimen-related toxicities. *Frontiers in Pharmacology*, 2014, **5**: 51
- [52] Kumar P, Goldstraw P, Yamada K, *et al.* Pulmonary fibrosis and lung cancer: risk and benefit analysis of pulmonary resection. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2003, **125**(6): 1321–1327
- [53] Liu X, Wang W, Hu H, *et al.* Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF- β 1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharmaceutical Research*, 2006, **23**(1): 82–89
- [54] Lou C, Zhang F, Yang M, *et al.* Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Plos One*, 2012, **7**(12): e50956
- [55] Du G, Jin L, Han X, *et al.* Naringenin: a potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. *Cancer Research*, 2009, **69**(7): 3205–3212
- [56] Qin L, Jin L, Lu L, *et al.* Naringenin reduces lung metastasis in a breast cancer resection model. *Protein & Cell*, 2011, **2**(6): 507–516
- [57] Yang Y, Xu Y, Xia T, *et al.* A single-molecule study of the inhibition effect of Naringenin on transforming growth factor- β ligand-receptor binding. *Chemical Communications*, 2011, **47**(19): 5440–5442
- [58] Zhang F, Dong W, Zeng W, *et al.* Naringenin prevents TGF- β 1 secretion from breast cancer and suppresses pulmonary metastasis by inhibiting PKC activation. *Breast Cancer Research*, 2016, **18**(1)
- [59] Zhang C, Zeng W, Yao Y, *et al.* Naringenin ameliorates radiation-induced lung injury by lowering IL-1 β level. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2018, **366**(2): 1–8
- [60] Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 2010, **22**(1): 109–117
- [61] Vanpouille-Box C, Diamond J M, Pilonis K A, *et al.* TGF β is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity. *Cancer Research*, 2015, **75**(11): 2232–2242
- [62] Mariathasan S, Turley S J, Nickles D, *et al.* TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*, 2018, **554**(7693): 544–548
- [63] Tauriello D V F, Palomo-Ponce S, Stork D, *et al.* TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*, 2018, **554**(7693): 538–543
- [64] Soares K C, Rucki A A, Kim V, *et al.* TGF- β blockade depletes T regulatory cells from metastatic pancreatic tumors in a vaccine dependent manner. *Oncotarget*, 2015, **6**(40): 43005–43015
- [65] Patel S A, Minn A J. Combination cancer therapy with immune checkpoint blockade: mechanisms and strategies. *Immunity*, 2018, **48**(3): 417–433
- [66] Giavridis T, Van Der Stegen S J C, Eyquem J, *et al.* CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nature Medicine*, 2018, **24**(6): 731–738
- [67] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, *et al.* Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and

- neurotoxicity due to CAR T cells. *Nature Medicine*, 2018, **24**(6): 739–748
- [68] Borek C, Ong A, Mason H. Distinctive transforming genes in x-ray-transformed mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(3): 794–798
- [69] Nogueira V, Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 2013, **19**(16): 4309–4314
- [70] Zhang F Y, Du G J, Zhang L, *et al.* Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*, 2009, **26**(4): 914–925
- [71] Zheng W, Flavell R A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 1997, **89**(4): 587–596
- [72] Schulze-Koops H, Kalden J R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2001, **15**(5): 677–691
- [73] Lee D M, Weinblatt M E. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2001, **358**(9285): 903–911
- [74] Raziuddin S, Bahabri S, Al-Dalaan A, *et al.* A mixed Th1/Th2 cell cytokine response predominates in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: immunoregulatory IL-10 function. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1998, **86**(2): 192–198
- [75] Niu Q, Huang Z C, Cai B, *et al.* Study on ratio imbalance of peripheral blood Th17/Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2010, **26**(3): 267–269, 272
- [76] Zhu L, Wang J, Wei T, *et al.* Effects of Naringenin on inflammation in complete freund's adjuvant-induced arthritis by regulating Bax/Bcl-2 balance. *Inflammation*, 2015, **38**(1): 245–251
- [77] Ahmad S F, Zoheir K M, Abdel-Hamied H E, *et al.* Amelioration of autoimmune arthritis by naringin through modulation of T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines. *Cellular Immunology*, 2014, **287**(2): 112–120

Research Updates on a Novel Immunomodulator, Naringenin*

ZENG Wen-Feng¹⁾, ZHANG Fa-Yun¹⁾, DU Gang-Jun^{1,2)}, JIN Ling-Tao^{1,3)}, QIN Lei^{1,4)}, DONG Wen-Juan^{1,5)},
ZHANG Chao¹⁾, WANG Luo-Yang^{1,6)}, YIN Xiao-Zhe¹⁾, ZHANG Chun-Ling¹⁾, LIANG Wei^{1)**}

¹⁾ Protein & Peptide Pharmaceutical Laboratory, Institute of Biophysics Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China;

³⁾ Winship Cancer Institute of Emory University, Atlanta GA 30322, USA;

⁴⁾ Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago IL 60611, USA;

⁵⁾ Ohio State University Medical Center, Columbus OH 43210, USA;

⁶⁾ Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Lots of researches have indicated wide physiological and pharmacological effects of plant derived natural flavonoids. Daily intake of flavonoids can prevent various diseases. Naringenin is an abundant flavonoid compound in daily food and drinks like fruits, vegetables, nuts, coffee, tea and wine, which can be more easily absorbed by intestines compared to other flavonoids. Since 2004 we have been interested in naringenin due to its superior bioavailability, and then have investigated its immunomodulatory effects with interdisciplinary sciences. The present review will mainly discuss about the recent updates of naringenin as a novel immunomodulator in immune deregulated settings.

Key words naringenin, TGF- β , immunomodulator, proinflammatory cytokines, tumor immunotherapy

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0189

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (81503106, 81773288, 81173633) and National Health Commission for Significant New Drugs Development (2018ZX09201001-001-004).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64889861, E-mail: weixx@ibp.ac.cn

Received: July 9, 2018 Accepted: August 20, 2018