

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2020.04.009

脂质体二甲基姜黄素体内体外抑制大鼠脾淋巴细胞增殖并调节细胞周期

孙芝源,郭亚鸣,戈 兴,陆晨曦,邵丹迪,周晓鹰

(常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164)

摘要:二甲基姜黄素是姜黄素的一种结构衍生物,具有抗炎抗肿瘤作用,具有缓释作用的新剂型脂质体二甲基姜黄素(Lipo-DiMC)有较好的生物利用度和代谢稳定性。淋巴细胞的过度增殖、细胞周期紊乱和细胞凋亡异常是类风湿疾病的病理特征。采用薄膜法制备小粒径($0.2\ \mu\text{m}$)的 Lipo-DiMC、建立胶原诱导的关节炎(CIA)大鼠模型(正常组,CIA 模型组和 CIA+Lipo-DiMC 治疗组)和体外细胞模型,探讨 Lipo-DiMC 对大鼠脾淋巴细胞增殖和淋巴细胞周期的影响。Lipo-DiMC 关节腔注射治疗 CIA 大鼠($120\ \mu\text{g/mL}$,每 3 d 关节腔注射治疗一次,每次 $400\ \mu\text{L}$,共治疗 6 次)。在 CIA 发病进程中和 Lipo-DiMC 治疗过程中,对关节炎严重程度进行生理评估和指数评分;血常规检测外周血中各免疫细胞数量的变化。新鲜提取的大鼠脾淋巴细胞建立体外细胞模型,MTT 法检测 Lipo-DiMC 对大鼠脾淋巴细胞增殖作用,细胞流式仪检测 Lipo-DiMC 对脾淋巴细胞周期作用。实验结果显示 Lipo-DiMC 在体内和体外均对大鼠脾淋巴细胞的细胞周期有调节作用。

关键词:脂质体二甲基姜黄素;胶原诱导关节炎大鼠;淋巴细胞;细胞增殖;细胞周期

中图分类号:R 562.1

文献标志码:A

文章编号:2095-0411(2020)04-0063-08

Liposomal Dimethyl Curcumin Inhibits Cell Proliferation and Regulates Cell Cycle of Rat Spleen Lymphocytes *in vivo* and *in vitro*

SUN Zhiyuan, GUO Yaming, GE Xing, LU Chenxi, SHAO Dandi, ZHOU Xiaoying

(School of Pharmaceutical Engineering & Life Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Dimethyl curcumin (DiMC) is one analogue of curcumin with anti-inflammatory property. Liposome dimethyl curcumin (Lipo-DiMC) has improved bioavailability, metabolic-stability and slow-release compared with DiMC. The excessive lymphocyte proliferation is one of characteristic of Rheu-

收稿日期:2020-02-20。

基金项目:常州大学高层次人才引进启动基金(ZMF14020066);常州大学大学生创新创业基金暨“挑战杯-卓越”计划项目(Z13)。

作者简介:孙芝源(1993—),女,江苏张家港人,硕士生。通信联系人:周晓鹰(1957—),E-mail: xiaoyingzhou@cczu.edu.cn

引用本文:孙芝源,郭亚鸣,戈兴,等. 脂质体二甲基姜黄素体内体外抑制大鼠脾淋巴细胞增殖并调节细胞周期[J]. 常州大学学报(自然科学版),2020,32(4):63-70.

matoid arthritis (RA). The study is to investigate the effects of Lipo-DiMC on proliferation and cell cycle of rat spleen lymphocytes. Lipo-DiMC (particle size $0.2\ \mu\text{m}$) was prepared by a thin film method. Collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established (normal group, CIA model group and CIA+Lipo-DiMC treatment group) successfully. CIA rats were treated with Lipo-DiMC by intra-articular injection ($120\ \mu\text{g/mL}$, treated once every 3 d, $400\ \mu\text{L}$ each time, 6 treatments in total). Physiological assessment and index scores of arthritis severity were monitored over the CIA process and treatments; the dynamic change of cells number in peripheral blood of CIA rats and Lipo-DiMC treated rats were recorded by Routine blood test. *In vivo* cell cycle of spleen lymphocytes of normal, CIA and Lipo-DiMC treated CIA rats were detected by flow cytometry (PI staining). Freshly extracted rat spleen lymphocytes were used to established cell model to study the anti-proliferative and cell cycle regulatory effects of Lipo-DiMC *in vitro*. MTT assay was used to detect the proliferation rate of rat spleen lymphocytes with or without Lipo-DiMC added. Cell flow cytometry was used to detect the effect of Lipo-DiMC on cell cycle of spleen lymphocyte *in vitro*. Experiments showed that Lipo-DiMC demonstrated a regulatory effect on cell cycle of rat spleen lymphocyte *in vitro* and *in vivo*.

Key words: liposome dimethyl curcumin; collagen induced arthritis; lymphocyte; cell proliferation; cell cycle

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种全身性自身免疫性疾病,其特征为淋巴细胞和滑膜细胞的过度增殖,细胞周期紊乱和细胞凋亡异常等^[1-3]。前期研究表明 RA 患者的淋巴细胞增殖和分化失调^[2]。活化的外周血淋巴细胞有细胞凋亡缺陷,并与 RA 的严重程度相关^[3-4]。胶原诱导关节炎(Collagen induced arthritis, CIA)大鼠模型的研究表明淋巴细胞的增殖和分化出现改变^[5-6];CIA 大鼠发病早期外周血中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,淋巴细胞和单核细胞数量增加^[7]。

姜黄素是姜黄根茎药草(姜黄属)中的一种主要成分^[8],姜黄素通过调节多个分子靶点来表现其抗诱变和抗癌潜能,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒等多种药理作用,且不良反应少而轻微,药源充足,极具开发前景^[9-10],二甲基姜黄素(Dimethyl curcumin, DiMC)是姜黄素的衍生物,比姜黄素显示出更好的抗癌活性,并且可以抑制癌细胞的增殖、诱导癌细胞的凋亡和抑制癌细胞的迁移、侵袭以及肿瘤的血管形成^[11]。

姜黄素和二甲基姜黄素都有重要的药用价值,有抗癌、抗炎、抗病毒和抗关节炎的作用,但作用机制尚不明确。在体外研究中,DiMC 在小鼠和人淋巴细胞中表现出抗炎症活性以及对淋巴细胞增殖的抑制作用^[12],但其在体内的功能和作用机制从未有过报道。脂质体是由胆固醇和双亲性小分子磷脂组成的双分子层所形成的囊泡包裹药物而形成的制剂^[13-14],具有靶向性、缓释作用、降低药物毒性和提高药物稳定性等特点。本研究通过制备脂质体包封的二甲基姜黄素(Liposome-encapsulated dimethyl curcumin, Lipo-DiMC,粒径 $<0.2\ \mu\text{m}$)以提高 DiMC 体内的生物利用度,生物稳定性和缓慢释放。同时,本研究建立了胶原诱导的关节炎大鼠模型和体外细胞模型,探讨 Lipo-DiMC 对大鼠脾淋巴细胞和外周血淋巴细胞的增殖的抑制作用以及对淋巴细胞周期的调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

二甲基姜黄素(中国上海同田生物技术有限公司),大豆磷脂酰胆碱(SPC)和胆固醇(CHOL)和无

水乙醇(分析试剂,AR)(中国上海国药集团化学试剂有限公司),SD大鼠(雌性,5~6周龄),体重(132.1 ± 5.5) g,由常州卡文思实验动物有限公司提供;RPMI 1640细胞培养液(美国sigma公司);胎牛血清(中国上海耐思生物有限公司);磷酸缓冲溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS 北京雷根生物技术有限公司);细胞96孔培养板(中国上海耐思生物有限公司)。牛II型胶原蛋白(美国Chondrex公司),完全弗式佐剂(Complete Freund's adjuvant, CFA 美国sigma公司),噻唑蓝(MTT 美国sigma公司),碘化丙啶(Propidium Iodide, PI 北京百奥莱博科技有限公司),ConA(美国sigma公司)。

1.2 脂质体二甲基姜黄素的制备

用薄膜分散法制备脂质体二甲基姜黄素,将原料大豆卵磷脂、胆固醇和二甲基姜黄素按4:4:1质量比溶解于无水乙醇中,在旋转蒸发器中减压蒸发形成干燥薄膜。将磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)和干燥薄膜加入容器中,在55℃下搅拌0.5 h使干燥薄膜分散,然后通过脂质体挤出机上的聚碳酸酯膜(0.1 μm和0.2 μm孔径)挤出脂质体。制备的脂质体二甲基姜黄素的粒径小于0.2 μm。

1.3 CIA大鼠模型建立和Lipo-DiMC治疗

SD大鼠购买后圈养在稳定环境中3~4 d后开始实验使用。所有操作均经常州大学伦理学会批准。实验组的全部动物为随机选择,全部检测为盲选。

胶原诱导的关节炎大鼠模型(CIA)是广泛应用于类风湿性关节炎研究的动物模型^[5]。如前所述建立CIA大鼠模型^[7],简而言之,在无菌状态下将2 mg/mL的牛II型胶原蛋白与等体积完全弗式佐剂等比例混合制成乳剂,大鼠尾根部皮内注射乳剂200 μL(每次每只0.2 mL)3次(第1 d第一次注射,第3 d和第7 d加强注射),每天观察大鼠体重和脚趾肿胀。大鼠分为正常组,CIA模型组和Lipo-DiMC治疗组,每组40只。治疗组的CIA大鼠关节腔内注射400 μL除菌过滤的脂质体二甲基姜黄素(120 μg/mL),每3 d一次,即在免疫后的第5,8,11,14,17,20 d治疗,共治疗6次。CIA模型组大鼠作为对照组。

1.4 关节炎严重程度的生理评估和指数评分

在免疫前和免疫后及治疗后的各个时间点,全部大鼠进行生理评估(体重和脚趾厚度的测量)。同时,关节炎指数积分法评定大鼠的关节肿胀度,具体为5级评分法:0分,没有关节受累;1分,1个关节或1个关节区受累(出现关节红肿);2分,2个关节或2个关节区受累;3分,2个或2个以上关节区受累;4分,整个肢体受累;四只肢体评分相加得到每只大鼠在0~16分的关节炎指数总分。

1.5 血常规检测

CIA组大鼠和CIA-DiMC治疗组大鼠在免疫前即第0 d(正常状态)和免疫/治疗后第1,6,9,12,15,18,21 d连续眼眶取血,肝素化真空管(BD Biosciences, USA)收集新鲜外周血液。各个时间点收集的新鲜大鼠血液通过血液分析仪(Beckman UniCel DxH 800 Coulter, USA)检测。在整个CIA发展过程和Lipo-DiMC治疗过程中连续观察CIA组大鼠和CIA-DiMC治疗组大鼠外周血液中免疫细胞(包括嗜中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,淋巴细胞和单核细胞)数量的变化。

1.6 大鼠脾淋巴细胞的分离及体外培养

脱颈椎处死大鼠,解剖取出脾脏,放入含有4%青霉素-链霉素溶液(Hyclone, USA)的PBS的离心管中。在无菌条件下,将脾脏研磨,通过74 μm细胞筛(Sigma, USA)过滤成细胞悬液,Tris-NH₄Cl红细胞裂解液去除细胞悬液中的红细胞,PBS洗涤细胞,在含有10%胎牛血清(FBS, GIBCO, USA),

100 U/mL青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基(GIBCO, USA)中过夜培养以除去贴壁细胞,最终获得较纯的脾淋巴细胞。

体外细胞模型中,大鼠脾淋巴细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中体外培养,培养液为 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 1640 培养液。

1.7 MTT 法检测 Lipo-DiMC 对大鼠脾淋巴细胞增殖的作用

无血清条件下,以 5 个不同质量浓度梯度(0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60 $\mu\text{g/mL}$)的 Lipo-DiMC 干预大鼠脾淋巴细胞和 ConA(5 $\mu\text{g/mL}$)诱导的脾淋巴细胞 24 h 后,MTT 法检测其细胞活力。

1.8 大鼠脾淋巴细胞周期分析

PBS 洗涤大鼠脾淋巴细胞(在免疫后第 21 d 处死的正常组、CIA 组和 CIA+Lipo-DiMC 治疗组大鼠新鲜提取获得),在不同浓度 Lipo-DiMC 体外 24 h 干预之后,在冰上用 70%乙醇固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 50 $\mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶(Sigma, USA)染色 30 min,细胞流式仪(BD FACSCalibur)检测脾淋巴细胞的细胞周期;ModFit LT 3.1 软件用于细胞周期分析。

1.9 统计分析

Prism 软件 7.0 版用于统计分析和图表。所有值均表示为平均值 \pm SEM(观察次数)。对非配对变量的 Mann-Whitney 非参数检验用于比较组间的差异。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 Lipo-DiMC 的关节注射减轻 CIA 大鼠的脚趾肿胀

CIA 大鼠模型成功建立,与正常大鼠相比,CIA 大鼠在免疫后出现明显的脚趾肿胀和体重减轻。脚趾肿胀是 CIA 发展早期的症状之一。Lipo-DiMC 治疗在免疫后第 5 d 开始进行,每间隔 3 d 治疗一次,共治疗 6 次。第 4 次治疗后(即免疫后第 14 d),与未治疗的 CIA 大鼠相比,治疗组 CIA 大鼠的脚趾肿胀逐渐缓解(图 1),Lipo-DiMC 可以有效减轻大鼠的 CIA 疾病进展。

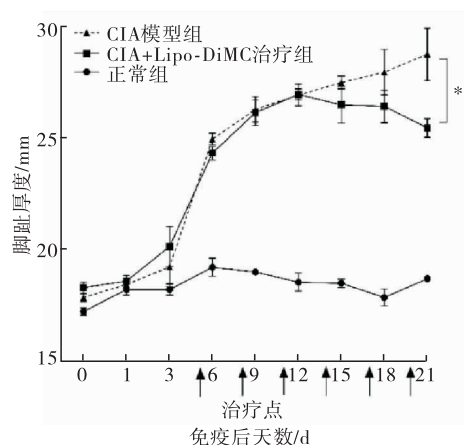


图 1 Lipo-DiMC 减轻 CIA 大鼠脚趾肿胀

Fig.1 Lipo-DiMC reduces toe swelling in CIA rats

2.2 Lipo-DiMC 在体内抑制 CIA 大鼠外周血中免疫细胞数量的激增

通过观察同一个大鼠在不同时间点血常规检测发现,在 CIA 发展期间,新鲜外周血中的中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和白细胞的细胞数量发生变化,而 Lipo-DiMC 关节注射治疗抑制了这一变化。血常规检测中白细胞是一类细胞包括淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞。CIA 组大鼠外周血白细胞数量在免疫后迅速增加,在免疫后第 6 d 达到最高,是正常状态时(即免疫前第 0 d)的 3 倍(图 2(a))。而 Lipo-DiMC 在第 1 次治疗后,与未治疗 CIA 组相比,Lipo-DiMC 治疗组大鼠外周白细胞数降低了 24.5%(图 2(a))。CIA 组大鼠外周血淋巴细胞数量持续增加并在免疫后第 21 d 达到最高,与正常状态时(即免疫前第 0 d)外周血淋巴细胞数相比增加了约 2 倍(图 2(b))。

Lipo-DiMC 治疗抑制了大鼠淋巴细胞过度增加(图 2(b))。CIA 组大鼠外周血嗜中性粒细胞的数量在免疫后明显增加,在免疫后第 12 d 达到最高,随后下降(图 2(c))。Lipo-DiMC 第 1 次治疗后,与未治疗 CIA 组相比,Lipo-DiMC 治疗组大鼠外周血嗜中性粒细胞数降低约 56.5%(图 2(c))。CIA 组大鼠外周血嗜酸性粒细胞在免疫后迅速增加,而 Lipo-DiMC 治疗抑制了淋巴细胞过度增加(图 2(d))。CIA 大鼠血常规检测的数据表明,在 Lipo-DiMC 治疗后,CIA 大鼠外周血中性粒细胞数量的过度增加最先被明显抑制(免疫后第 6 d/第 1 次治疗后),外周血淋巴细胞数、白细胞数和嗜酸性粒细胞数的过度增加均有被抑制($n = 3/\text{组}$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$)。Lipo-DiMC 通过抑制外周血淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和白细胞数量的过度增加,从而抑制大鼠 CIA 发展过程中产生的炎症和免疫反应。

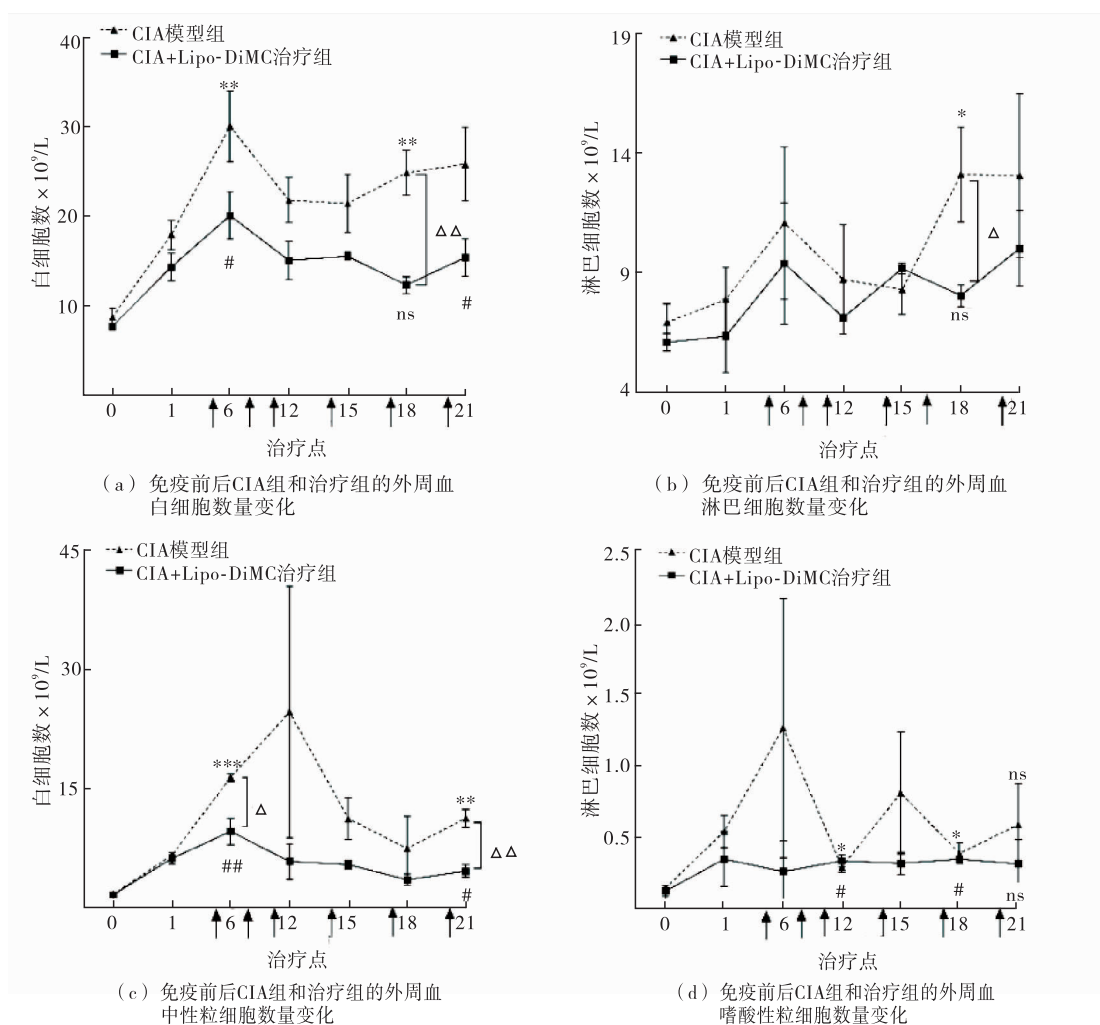


图2 Lipo-DiMC 抑制 CIA 大鼠外周血各免疫细胞数量的变化

Fig.2 Lipo-DiMC inhibits the proliferation of various immune cells in the peripheral blood of CIA rats

2.3 Lipo-DiMC 在体内调节 CIA 大鼠脾淋巴细胞周期紊乱

与正常大鼠相比,CIA 组大鼠脾淋巴细胞 G0/G1 期百分比明显降低,S 期百分比增加,G2/M 期百分比不变(图 3(a),图 3(b));与 CIA 组大鼠相比,CIA+Lipo-DiMC 组大鼠,G0/G1 期百分比升高,S 期百分比降低,G2/M 期百分比不变(图 3(b),图 3(c))。通过比较正常组、CIA 模型组及 CIA+Lipo-DiMC 治疗组大鼠脾淋巴细胞的细胞周期发现,三组大鼠脾淋巴细胞 G2/M 期百分比差异较小,CIA 增加脾脏淋巴细胞 G0/G1 期的百分比,而 Lipo-DiMC 抑制这种进展(图 3(d))($n = 3/\text{组}$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$)。

细胞周期是细胞静息,增殖,分化和凋亡的关键生物学过程。不同阶段的细胞百分比反映了细胞的生长状态。结果表明,Lipo-DiMC 可以在大鼠体内调整 CIA 导致的脾淋巴细胞周期紊乱。CIA 将细胞周期从 G0/G1 期驱动到 S 期来促进细胞增殖而 Lipo-DiMC 抑制了这一进程并将细胞周期调整回正常状态。

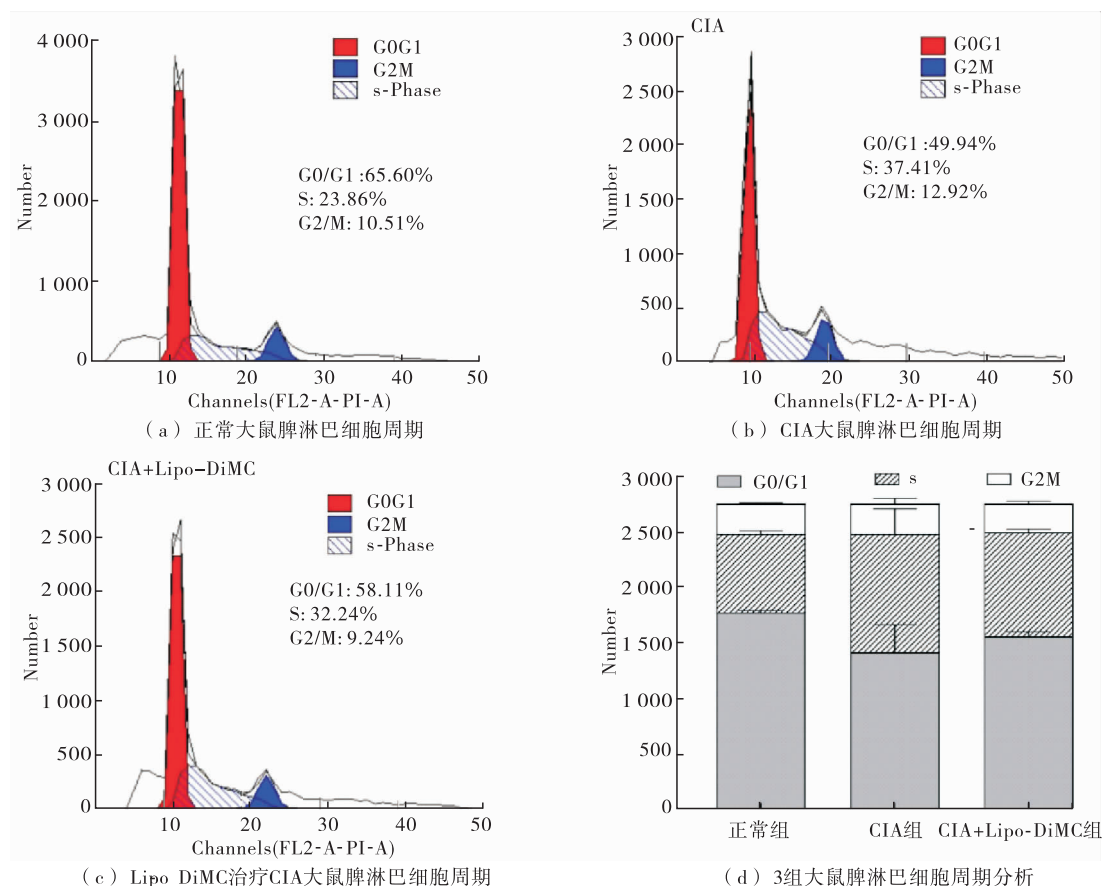


图3 Lipo-DiMC在体内调节CIA大鼠脾淋巴细胞的周期

Fig.3 Lipo-DiMC regulates the spleen lymphocyte cycle of CIA rats *in vivo*

2.4 Lipo-DiMC在体外抑制大鼠脾淋巴细胞增殖

MTT方法检测了Lipo-DiMC对大鼠脾淋巴细胞的增殖的影响。结果发现,在ConA激活或未激活大鼠脾淋巴细胞,Lipo-DiMC对大鼠脾淋巴细胞均有抑制作用(图4)。Lipo-DiMC质量浓度达到 $7.5 \mu\text{g/mL}$ 时对正常大鼠脾淋巴细胞增殖有抑制作用,而Lipo-DiMC浓度在 $3.75 \mu\text{g/mL}$ 时对ConA诱导激活的大鼠脾淋巴细胞增殖则产生抑制作用,且其抑制作用呈浓度依赖性($n = 3/\text{组}$, $\text{mean} \pm \text{SEM}$)。

2.5 Lipo-DiMC在体外调节大鼠脾淋巴细胞的细胞周期

体外细胞实验显示,Lipo-DiMC体外干预(无血清条件)大鼠脾淋巴细胞24 h后,和未干预的细胞比较,Lipo-DiMC($12 \mu\text{g/mL}$)降低了3.8%的G0/G1

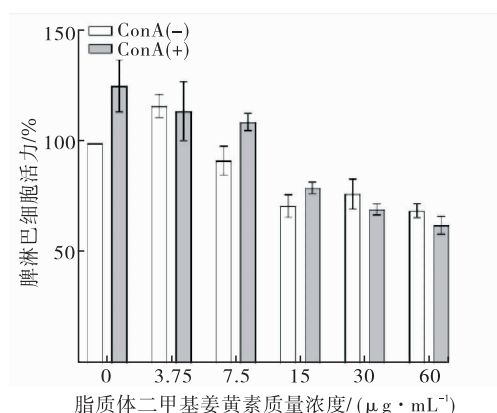


图4 Lipo-DiMC体外抑制大鼠脾淋巴细胞增殖

Fig.4 Lipo-DiMC inhibits rat splenic lymphocyte proliferation *in vitro*

期脾淋巴细胞,增加了 6.85% 的 S 期细胞,降低了 3.06% 的 G2/M 期细胞(图 5);这个结果结合 Lipo-DiMC 体外对大鼠脾淋巴细胞增殖抑制的实验结果(MTT 法)一起分析评估, Lipo-DiMC 可能通过使脾淋巴细胞停滞在 S 期,以抑制淋巴细胞增殖, Lipo-DiMC 可能是调节细胞周期中的 G1/S 检查点。

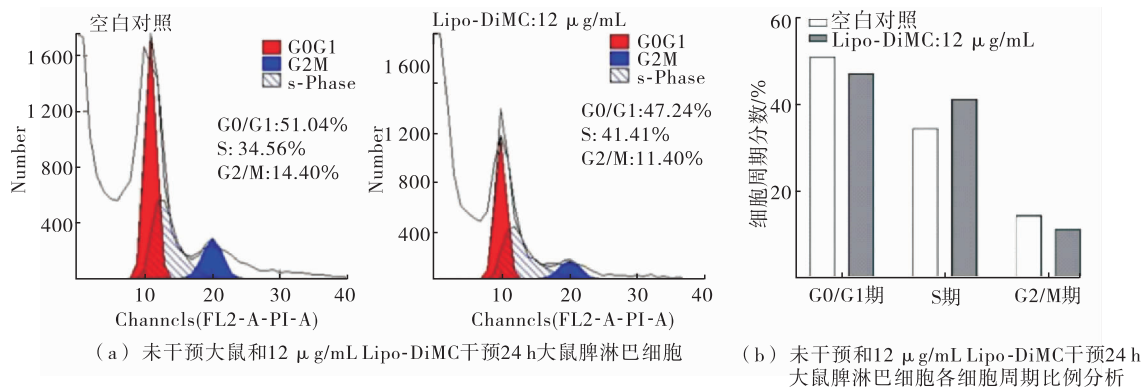


图 5 Lipo-DiMC 在体外对大鼠脾淋巴细胞周期的影响

Fig.5 Effect of Lipo-DiMC on rat splenic lymphocyte cycle *in vitro*

3 结 论

RA 是一种慢性自身免疫性疾病,其病因和发病机制尚不完全明确。研究认为淋巴细胞,粒细胞和巨噬细胞被认为可以介导 RA 的发展^[15-16]。RA 患者外周血中淋巴细胞增殖和分化失调^[2],淋巴细胞状态在 RA 发展的不同阶段有所不同^[17]。

本研究通过利用 CIA 大鼠/Lipo-DiMC 关节注射的体内研究模型,结果表明 Lipo-DiMC 在体内可以抑制 CIA 大鼠外周血中免疫细胞数(包括淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、白细胞)的激增。在 CIA 诱导的关节炎大鼠中,脾淋巴细胞 S 期细胞比例增加,这和脾淋巴细胞过度增殖相关;通过和外周血细胞的分析结果联合评估认为:淋巴细胞的过度增殖是类风湿的表征之一, Lipo-DiMC 治疗抑制了 CIA 诱导的大鼠脾淋巴细胞 S 期细胞的过度增加,从而抑制脾淋巴细胞的过度增殖,起到治疗作用。而在体外细胞模型中, Lipo-DiMC 干预大鼠脾淋巴细胞后, S 期细胞比例增加, G0/G1 期和 G2/M 期细胞比例减少,结合 MTT 结果(Lipo-DiMC 体外抑制大鼠脾淋巴细胞增殖,并呈浓度依赖性), Lipo-DiMC 可能使脾淋巴细胞停滞在 S 期,以抑制淋巴细胞增殖, Lipo-DiMC 可能是调节细胞周期中的 G1/S 检查点。 Lipo-DiMC 在体内体外对大鼠脾淋巴细胞周期的调节不同。在体内, Lipo-DiMC 经历了 CIA 大鼠吸收、代谢、运输和分布,从而对众多细胞类型和蛋白类型的作用。 Lipo-DiMC 对 CIA 大鼠的治疗作用结果是一个细胞/组织/器官/机体综合作用的结果。较之单一细胞的细胞模型,活体动物模型是一个更复杂的过程。综上,研究结果发现 Lipo-DiMC 抑制大鼠脾淋巴细胞的过度增殖并对大鼠脾淋巴细胞周期有调节作用; Lipo-DiMC 对 RA 治疗机制提供新的见解,并且 Lipo-DiMC 可以被认为 RA 治疗的潜在药物。

参考文献:

- [1] KOCH A E. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. American Journal of Orthopedics, 2007, 36(s7):5.
- [2] PONCHEL F, MORGAN A W, BINGHAM S J, et al. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis[J]. Blood, 2002, 100(13):4550.
- [3] CHEN R L, TAO Y, HUANG W H. Correlation between CD4+CD28-T cells and lymphocytic apoptosis in rheuma-

- toid arthritis patients[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2010, 26(9):1824-1827.
- [4] VALLEJO A N, SCHIRMER M, WEYAND C M, et al. Clonality and longevity of CD4+CD28 null T cells are associated with defects in apoptotic pathways[J]. Journal of Immunology, 2000, 165(11): 6301.
- [5] MCNAMEE K, WILLIAMS R, SEED M. Animal models of rheumatoid arthritis: how informative are they? [J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 759:278-286.
- [6] ZHAO M J, WU A M, WANG J, et al. Yiqihuoxuejiedu formula inhibits vascular remodeling by reducing proliferation and secretion of adventitial fibroblast after balloon injury[J]. Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2014(2014):1-8.
- [7] CHU Y, GUO Y, WALLS A F, et al. The regulatory role of dipeptidyl peptidase 1 on the activation of immune granulocytes[J]. Cell Biology International, 2017, 41(10):1093-1102.
- [8] PREETHA A, KUNNUMAKARA A B, CHITRA S, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes[J]. Pharmaceutical Research, 2008, 25(9): 2097-2116.
- [9] ANAND P, SUNDARAM C, JHURANJ S, et al. Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution[J]. Cancer Letters, 2008, 267(1):133-164.
- [10] GAO Y, LI Z, SUN M, et al. Preparation and characterization of intravenously injectable curcumin nanosuspension [J]. Drug Delivery, 2011, 18(2):131.
- [11] DAI H S, SHAN T Y, GAO Y, et al. Extraction of curcumin from turmeric and study of its methylating [J]. Nat Prod Res Dev, 2008, 20: 254-256.
- [12] PATWARDHAN R S, CHECKER R, SHARMA D, et al. Dimethoxycurcumin, a metabolically stable analogue of curcumin, exhibits anti-inflammatory activities in murine and human lymphocytes[J]. Biochemical Pharmacology, 2011, 82(6):642-657.
- [13] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998: 230-232.
- [14] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1995: 607-608.
- [15] SILVERMAN G J, CARSON D A. Roles of B cells in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Research & Therapy, 2003, 5(s4): 1-6.
- [16] FOX D A. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives[J]. Arthritis & Rheumatology, 2010, 40(4): 598-609.
- [17] PAWLOWSKA J, SMOLENSKA Z, WITKOWSKI J, et al. Different pattern of T-cell subpopulations in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis at various stages of disease development[J]. Polskie Archiwum Medycyny Wewne trznej, 2014, 124(1/2): 43.

(责任编辑:殷丽莉)