

赵勇, 武文卿, 谭邓旭, 等. 人脑胶质瘤小型猪原位移植模型的建立及评估 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 651-656.
Zhao Y, Wu WQ, Tan DX, et al. Establishment and evaluation of orthotopic transplantation model of human glioma in miniature pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 651-656.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.012

人脑胶质瘤小型猪原位移植模型的建立及评估

赵勇^{1#}, 武文卿^{2#}, 谭邓旭¹, 丁桂荣³, 师长宏^{1*}

(1. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710322; 2. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071;
3. 空军军医大学放射医学教研室, 西安 710032)

【摘要】 目的 利用免疫抑制剂处理小型猪, 建立人脑胶质瘤小型猪原位移植模型, 为胶质瘤药物筛选和影像学研究提供与人体相近的实验工具。**方法** 人胶质瘤细胞 U87-MG 移植于裸鼠皮下, 待形成肉眼可见肿瘤后备用。选择小型猪联合口服免疫抑制剂环孢素软胶囊 (20 mg/kg) 和他克莫司胶囊 (0.01 mg/kg) 进行免疫干预。3 d 后, 取裸鼠皮下新鲜的 U87-MG 肿瘤组织, 将其修剪为 1 mm³ 组织块, 通过立体定向仪和套管针将肿瘤组织移植于经免疫抑制剂处理的小型猪大脑纹状体, 持续使用免疫抑制剂 21 d, 进行核磁共振成像, 确认肿瘤的位置。必要时处死动物并解剖, 取肿瘤组织固定, 进行 HE 和 IHC 染色以确定肿瘤的组织形态。**结果** 12 头猪进行了原位移植, 3 周后, 核磁检测确认 11 头猪成像, 肿瘤发生率达到 90% 以上, 胶质瘤猪原位移植模型肿瘤组织 HE 染色结果、生长特征均符合肿瘤特征; 人线粒体抗体染色显示其为人源性组织, 胶质瘤特异性标志物 GFAP 表达阳性。**结论** 联合环孢素软胶囊和他克莫司免疫抑制处理, 通过移植肿瘤组织成功建立人脑胶质瘤小型猪原位移植模型。

【关键词】 人脑胶质瘤; 异种移植; 猪; 免疫抑制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0651-06

Establishment and evaluation of orthotopic transplantation model of human glioma in miniature pigs

ZHAO Yong^{1#}, WU Wenqing^{2#}, TAN Dengxu¹, DING Guirong³, SHI Changhong^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710322, China. 2. Laboratory Animal Center, Military Medical Science Academy, Beijing 100071. 3. Department of Radiology, Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fuuu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish an orthotopic xenograft model of human glioma miniature pigs by treatment with immunosuppressive agents, and provide ideal experimental tools for screening glioma drug and imaging studies. **Methods** Human glioma cells U87-MG were transplanted into nude mice subcutaneously, and tumors were visible after two weeks. Then, we choose miniature pigs to be treated with oral immunosuppressant both cyclosporine soft capsules (20 mg/kg) and tacrolimus capsules (0.01 mg/kg). Three days later, the fresh tumor tissue derived from nude mice were collected and trim them into 1 mm³ tissue pieces. The tumor tissue were transplanted into cerebral striatum of the miniature pigs treated with immunosuppressive agents through a stereotactic instrument. After 21 days of continuous use of immunosuppressive agents, the animals displayed obviously thin, and space-occupying lesions in the brain were detected by

【基金项目】 基础加强计划重点基础研究项目 (2017-JCJQ-ZD-051-04), 军队实验动物专项课题 (SYDW(2017)02, SYDW(2017)05)。Funded by Key Basic Research Projects of the Foundation Strengthening Plan (2017-JCJQ-ZD-051-04), Laboratory Animal Foundation of Military (SYDW(2017)02, SYDW(2017)05)。

【作者简介】 赵勇 (1982—), 男, 实验师, 研究方向: 疾病动物模型制备。Email: zhaoyong8@aliyun.com;

武文卿 (1984—), 男, 助理研究员, 研究方向: 动物实验技术与管理。Email: wwq5206@sina.cn。

#共同第一作者

【通信作者】 师长宏 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 疾病动物模型制备。Email: changhong@fmmu.edu.cn

Magnetic Resonance Imaging (MRI) to confirm tumors formation. These miniature pigs were sacrificed and dissected, then the tumor tissues were fixed. The histomorphological characteristics of tumor were confirmed by H&E and IHC staining.

Results Three weeks after orthotopic transplantation of the glioma tissue into the brain striatum of miniature pigs, 12 pigs have been implanted with U87-MG, 11 have presented a macroscopic significant tumor, with radiological and pathological characteristics of high-grade glioma. we found that the tumor incidence reached more than 90% by MRI scan. Both the HE staining result and growth characteristics of the tissue were consistent with tumor characteristics. The staining of human mitochondrial antibody demonstrated that this tumor was human-derived tissue and the glioma-specific marker GFAP was expressed positively. **Conclusions** Combined with cyclosporine soft capsule and tacrolimus immunosuppressive treatment, an orthotopic xenograft miniature pig model of human glioma was successfully established by transplanting tumor tissue.

【Keywords】 glioma; xenograft; pig; immunosuppression

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

恶性脑胶质瘤是成人最常见的侵袭性、原发性恶性脑肿瘤^[1],目前还没有确切的治疗方法,因其高度侵袭性和脑实质浸润导致多数患者死亡^[2]。其通常局限于中枢神经系统,不向外转移。恶性脑胶质瘤占所有原发性中枢神经系统肿瘤的近 25%, 占所有神经胶质瘤的 55%^[3-4]。恶性脑胶质瘤的治疗是一个世界性难题,其治疗效果差的关键问题在于恶性的胶质瘤细胞分化不全且深入神经细胞深处,导致手术不可能全部切除,复发率极高^[1]。预后最差的是多形性胶质母细胞瘤^[5],其中位生存时间为 14.6 个月,迫切需要更有效的肿瘤特异性疗法^[6-7]。建立有效、稳定的脑胶质瘤动物模型对其治疗研究具有重要意义^[8-9]。通常建立肿瘤移植模型的方法是采用小鼠或者大鼠来源的细胞系进行原位移植或者选取裸鼠移植人的肿瘤细胞^[10]。前者的鼠源性细胞系与人体存在很大差别,后者裸鼠体型较小并且生存期短,在建立模型之后进行肿瘤干预性治疗窗口期短,动物实验操作和饲养要求严格^[11]。

既往的研究成果是以大、小鼠为实验对象获得的,而人体脑组织结构和颅骨厚度与小动物相比差异较大,故不能将其效应及参数推及到人^[12-13]。小型猪体型适中,与人体较为接近,猪在解剖、组织和生理生化等许多生物学指标上与人类非常相似,被认为是研究人类疾病最合适的实验动物模型,特别在肿瘤相关的代谢、影像和治疗研究的理想动物模型。本研究将人脑胶质瘤细胞移植裸鼠后成瘤,进一步将该肿瘤组织原位移植免疫抑制剂处理的小型猪大脑形成胶质瘤,建立猪胶质瘤异种原位移植模型。核磁检测确认肿瘤的发生,处死动物解剖后能够观察到脑部肿瘤的形成,进一步进行 HE 染色和组化分析确认肿瘤的组织形态,从而为人胶质瘤药物筛选和影像学研究提供与人体接近的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠, 20 ~ 22 g, 购自北京维通利华【SCXK(京)2016-0011】, 饲养在空军军医大学实验动物中心屏障设施内【SYXK(陕)2019-001】。环境温度 23 ~ 25℃, 相对湿度 40%, 12 h/12 h 昼夜交替, 饮用水经高压灭菌处理, 动物自由摄食和饮水。12 头 4 ~ 5 月龄普通巴马小型猪, 雌性, 体重 15 ~ 20 kg。购自北京创世世纪小型猪养殖基地【SCXK(京)2018-0011】, 饲养在空军军医大学实验动物中心普通设施内【SYXK(陕)2019-001】。本研究通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会审核(IACUC-20200602)。

1.1.2 主要试剂与仪器

环孢霉素软胶囊(新赛斯平)和他克莫司(普乐可复)(空军军医大学第一附属医院);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);苏木精和伊红(H&E)染色液(北京雷根生物技术有限公司);人线粒体抗体和胶质纤维酸性蛋白(gial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(美国 abcam 公司, 货号: ab92824, ab7260), 前者是小鼠单克隆抗体仅与人源化组织标本反应, 不与大小鼠反应, 工作液 1 : 1000 稀释;二抗为生物素标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物科技有限公司);DAB 显色试剂盒、小鼠 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司);人胶质瘤细胞 U87-MG(ATCC HTB-14)。

大动物脑立体定位仪(瑞沃德 68868 N), 颅钻(瑞沃德 78067)和核磁共振(西门子 skyra 3.0 T)。

1.2 方法

1.2.1 人胶质瘤 U87-MG 细胞培养及移植

人胶质瘤细胞系 U87-MG 由本实验室保存, 培

养在 37℃, 5% CO₂ 的加湿培养箱中, 培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 加入青霉素 (100 IU/mL)/链霉素 (100 μg/mL), 收集对数期 U87-MG 肿瘤细胞, 胰酶/EDTA 联合消化后用 PBS 重选至 2×10^7 备用。收集的 U87-MG 肿瘤细胞接种于裸鼠右侧背部皮下。待肿瘤体积长至 500 ~ 600 mm³ 时, CO₂ 安乐死处死裸鼠, 分离 U87-MG 肿瘤组织并修剪成 1 mm³ 组织块备用。

1.2.2 小型猪免疫抑制剂处理

术前 3 d 选用两种免疫抑制剂对小型猪进行预处理, 分别为环孢素软胶囊 (新赛斯平)^[14] 和他克莫司胶囊 (普乐可复)^[15]。联合使用剂量分别为环孢素 20 mg/kg; 他克莫司 0.01 mg/kg。免疫抑制剂给药方式为口服, 将两种胶囊拌在液体饲料中进食。给药后动物出现消瘦等免疫抑制症状, 但并未出现死亡和并发症的发生。术后持续上述药物剂量连续用药 21 d。当动物出现偏头、颤抖、体重下降大于 20% 时, 提前终止实验, 对动物实施安乐死。

1.2.3 小型猪的麻醉和手术

麻醉剂选择丙泊酚注射液, 麻醉剂量 4 mg/kg, 麻醉方式为耳静脉注射。实验前适应性饲养 1 周。头部皮肤去毛消毒, 在枕骨嵴前颅骨中线上, 纵向切开 4 ~ 5 cm 的颅骨皮肤。在枕骨嵴前 3 cm, 距中线 1 cm 处用 1.2 mm 颅钻开颅骨孔, 硬脑膜用注射器穿透。将修剪备用的裸鼠皮下 U87-MG 肿瘤组织用套管针将其移入深度为硬脑膜下 9 ~ 10.5 mm 的纹状体位置。颅骨钻孔用骨蜡填充, 创口消毒后缝合, 关闭皮肤层 (手术过程如图 1)。术后持续观察动物的生存状况。

1.2.4 核磁影像学检测

丙泊酚麻醉实验猪, 西门子 skyra 3.0 T 磁共振检测, 分别执行横断面 T2W1 加权、矢状面 T2W1 加权、横断面 T1 加权、弥散序列等成像序列检测肿瘤

的大小和位置。

1.2.5 HE 染色和免疫组织化学分析

核磁检测后, 200 mg/mL 戊巴比妥心内注射处死动物并解剖。解剖后分离出小型猪的大脑, 依据影像结果, 肉眼观察, 初步确认肿瘤发生的部位, 取该部位组织 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋制作切片, 脱蜡和水化后, HE 染色确认其胶质瘤组织形态。同时用非特异性蛋白封闭并消除内源性过氧化物酶活性, 一抗分别选择人线粒体抗体和 GFAP 在 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 (羊抗鼠) 室温孵育 20 min, DAB 显色后苏木素复染, 酒精脱水, 甲醛透明并中性树脂封片, 光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 建立人胶质瘤裸鼠皮下移植模型

收集对数生长期的人胶质瘤细胞 U87-MG, 皮下接种裸鼠, 3 周后肿瘤体积达到 500 ~ 600 mm³。裸鼠实施安乐死, 一部分肿瘤组织用于小型猪原位较重, 另一部分肿瘤组织 4% 多聚甲醛固定后, 石蜡包埋切片 HE 染色确认其胶质瘤组织形态。GFAP 染色后肿瘤组织强阳性表达确认其胶质瘤特征, 人线粒体特异性抗体强阳性表达确认其人性特征, 而正常鼠脑组织表达为阴性 (图 2)。病理组织学观察, 正常裸鼠脑组织皮质结构清晰, 细胞结构完整, 无炎症细胞浸润; 而小鼠脑胶质瘤细胞呈多边形或纺锤形, 存在少量的纤维血管间质。胞浆嗜酸性, 细胞核圆形或不规则, 有 1 或 2 个核仁。确认裸鼠皮下瘤为人源性胶质细胞瘤。

2.2 免疫抑制剂处理效果

环孢素软胶囊临床上使用剂量为 10 ~ 15 mg/(kg·d), 两次给药, 该剂量维持至术后 1 ~ 2 周。在本研究中, 结合临床用药剂量和实验动物的表现, 进行多个浓度批次的摸索。在使用高剂量时, 先后出现部分动物死亡, 或表现出腹泻、体格消瘦、皮肤炎症等不良反应, 最后确定环孢素的每次使用浓度为 20 mg/kg。环孢素和他克莫司联合使用可以进一步限制 T 细胞功能, 因此联合使用环孢素 (20 mg/kg) 和他克莫司 (0.01 mg/kg), 动物出现消瘦等症状, 但并未出现死亡和并发症, 说明该剂量的控制是有效的。基于术前和术后免疫干预, 免疫抑制方案从术前 3 d 开始一直持续到术后 3 周, 并伴随体重的变化及时调整用量。

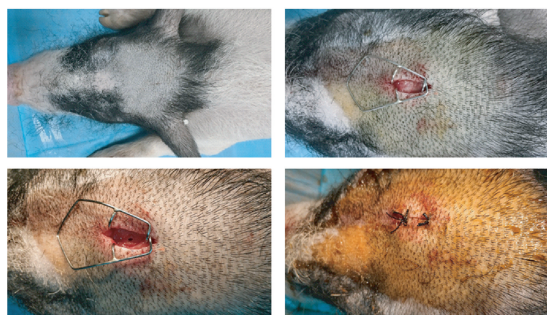


图 1 人脑胶质瘤组织小型猪原位移植手术过程

Figure 1 Operative procedure of human glioma orthotopic xenograft in miniature pigs

2.3 核磁扫描结果

术后 3 周,麻醉小型猪进行核磁检测。西门子 skyra 3.0 T 磁共振成像序列检测肿瘤的大小和位置(图 3)。累计共完成 12 例小型猪脑胶质瘤模型手术制备,有 11 例通过核磁检测发现脑部肿瘤形成,肿瘤大小约 15 mm × 20 mm。

2.4 肿瘤组织形态和特异性标志物的表达

持续观察小型猪神经行为症状,必要时使用 200 mg/mL 戊巴比妥心内注射处死动物并解剖。分离颅内肿瘤组织,4%多聚甲醛固定后切片,HE 染色结果显示为胶质瘤特征(图 4)。免疫组织化学染色结果如图 5 和图 6 所示,人线粒体抗体和 GFAP 在胶质瘤发生部位均表达阳性,而正常的猪脑组织表达为阴性。

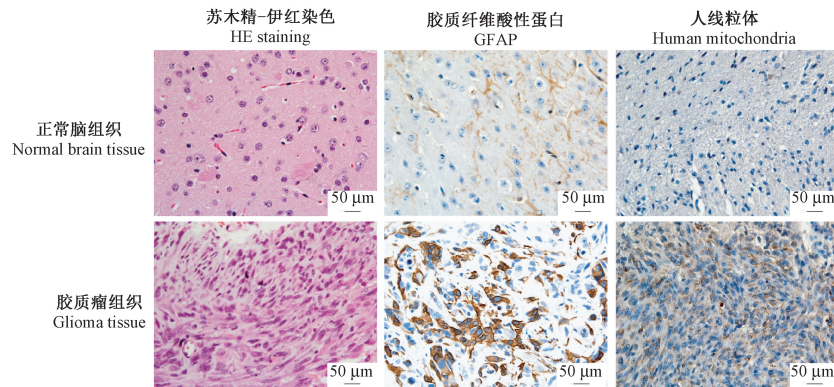


图 2 U87-MG 脑胶质瘤裸鼠移植瘤组织形态特征

Figure 2 Morphological changes of transplanted tumor of U87-MG glioma in nude mice

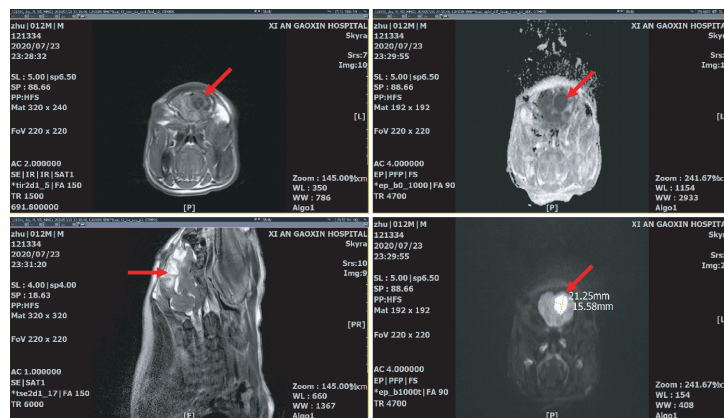


图 3 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部核磁扫描结果(箭头所指部位为肿瘤病灶)

Figure 3 MRI result for 3 weeks transplanted tumor of U87 glioma in miniature pigs (Arrow shows tumor)

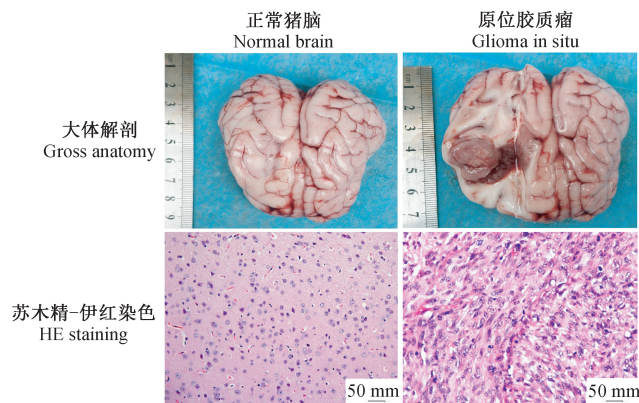


图 4 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部肿瘤组织形态

Figure 4 Histomorphology of 3 weeks brain tumor of U87 glioma in miniature pigs

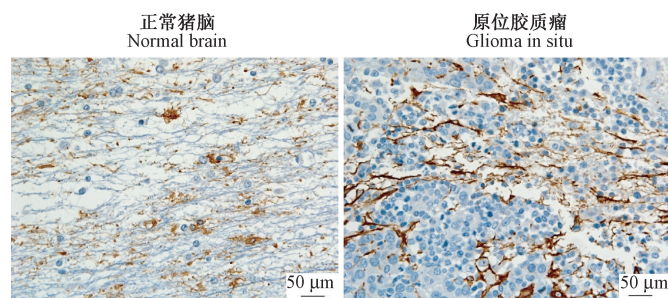


图 5 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部肿瘤组织中 GFAP 表达阳性

Figure 5 IHC result shows GFAP express positive in 3 weeks brain tumor of U87 glioma in miniature pigs

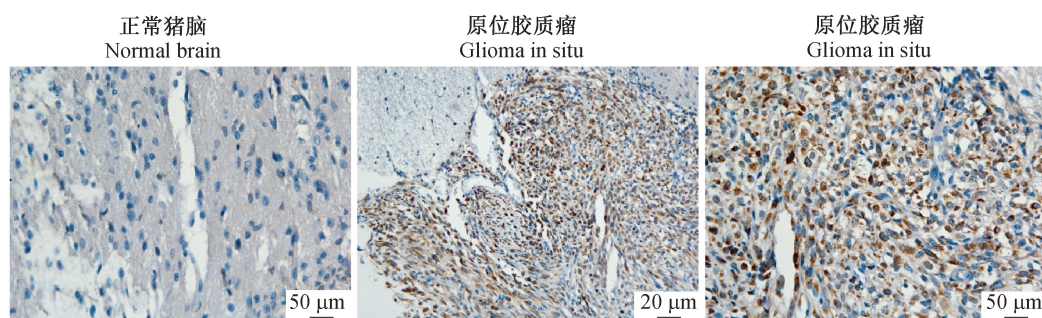


图 6 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部肿瘤组织中人线粒体表达阳性

Figure 6 IHC result shows human mitochondria express positive in 3 weeks brain tumor of U87 glioma in miniature pigs

3 讨论

利用小型猪建立肿瘤模型报道相对较少,主要集中在自发性皮肤黑色素瘤模型^[16],不同来源和遗传背景的小型猪可自发皮肤黑色素瘤。但该类模型发生比率不宜控制、时间长、个体差异大、短期内很难获取大量肿瘤学资料^[17]。在胶质瘤研究方面,已报道的脑胶质瘤动物模型多以啮齿类动物为主。但啮齿类动物大脑皮层光滑,无脑沟和脑回,与人脑解剖结构差异较大,导致大多成功用于小动物模型的肿瘤疗法在人类身上无法复制。猪脑因其解剖学、组织学和血管分布于人脑相似,制备小型猪脑胶质瘤模型对开展脑胶质瘤临床前应用研究具有重要的价值和意义。建立小型猪异种移植模型,最重要的问题是解决猪本身对人体组织细胞的免疫排斥反应,即必须选择合适的免疫抑制剂确定相应的剂量。环孢霉素软胶囊和他克莫司均是临床常用的免疫抑制剂,多用于器官移植和自身免疫疾病^[14,18]。环孢素软胶囊主要是通过选择性抑制 T 淋巴细胞活化而发挥免疫抑制作用^[19]。他克莫司主要通过抑制 IL-2 的释放,全面抑制 T 淋巴细胞的作用,从而达到免疫水平的抑制^[20]。结合实验

探索,本实验设计他克莫司和环孢素软胶囊联合用药进行免疫抑制,确定的联合剂量用于小型猪并未出现死亡和并发症的发生。体重变化一定程度上反应了免疫抑制剂的药效,联合用药组体重增长最慢,同时说明该剂量的控制是有效的。

相比于肿瘤细胞系移植模型,本实验将人脑胶质瘤细胞 U87-MG 接种裸鼠,将获取的荷瘤鼠肿瘤组织原位移植到小型猪脑部纹状体,不仅可以较好地保留瘤组织的结构和微环境,而且有利于肿瘤的生长,有效提高异种移植的成功率。同时,直接移植分散的人体肿瘤细胞,很容易被猪(免疫抑制剂处理)体内残存的免疫系统-排斥,前期直接移植人 U87-MG 肿瘤细胞均未在免疫抑制剂处理的猪建立起肿瘤模型;而移植的肿瘤组织,已经形成完整的组织结构且细胞成分复杂,猪体内的免疫体统很难排斥完整肿瘤组织,从而会有利于肿瘤的形成,提高肿瘤异种移植的成功率。因此,本研究通过将人胶质瘤细胞移植裸鼠,获得肿瘤组织,进一步通过移植肿瘤组织建立小型猪脑胶质瘤原位移植模型,建模成功率达到 90%。

本实验成功建立了小型猪脑胶质瘤模型,能确保术后小型猪的存活。胶质瘤组织块原位移植到

猪脑纹状体 3 周时,核磁检测确认肿瘤发生率达到 90% 以上,处死动物解剖后能够观察到脑部肿瘤的形成,进一步进行 H&E 染色确认肿瘤的组织形态;人特异性线粒体表达强阳性确定该移植瘤来源于人;星形胶质细胞活化的标志物 GFAP 表达呈阳性,确认了其胶质瘤特性。总之,本实验获得的人脑胶质瘤小型猪移植模型可为人胶质瘤药物筛选和影像学研究提供与人体接近的实验工具。

参 考 文 献(References)

- [1] Dréan A, Goldwirth L, Verreault M, et al. Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma [J]. Expert Rev Neurother, 2016, 16(11): 1285-1300.
- [2] Ferreira WA, Pinheiro Ddo R, Costa Junior CA, et al. An update on the epigenetics of glioblastomas [J]. Epigenomics, 2016, 8(9): 1289-1305.
- [3] Mujokoro B, Adabi M, Sadroddiny E, et al. Nano-structures mediated co-delivery of therapeutic agents for glioblastoma treatment: A review [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 69: 1092-1102.
- [4] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review [J]. JAMA, 2013, 310(17): 1842-1850.
- [5] Welling L, Lynch JC, Pereira C, et al. Glioblastoma Multiforme. The experience at the hospital dos Servidores do Estado in Rio de Janeiro [J]. J Brasileiro De Neurocirurgia, 2018, 24(1): 21-26.
- [6] Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, et al. Angiogenesis and invasion in glioma [J]. Brain Tumor Pathol, 2011, 28(1): 13-24.
- [7] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683-2710.
- [8] 朱惠芳, 张远旭, 赵旭东. 脑胶质瘤动物模型的研究及应用进展 [J]. 动物学研究, 2012, 33(3): 337-342.
Zhu HF, Zhang YX, Zhao XD. Animal models of human glioma: the progress of application and investigation [J]. Zool Res, 2012, 33(3): 337-342.
- [9] 仰滨臻, 刘瑜洁, 齐宪荣. 脑胶质瘤治疗及其动物模型的研究进展 [J]. 药学研究, 2014, 33(10): 559-563.
Yang ZZ, Liu YJ, Qi XR. Advances in glioma therapy and its animal models [J]. J Pharm Res, 2014, 33(10): 559-563.
- [10] Lyustikman Y, Lassman AB. Glioma oncogenesis and animal models of glioma formation [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2006, 20(6): 1193-1214.
- [11] Seleak L, Seigneuret E, Nugue G, et al. Imaging and histological characterization of a human brain xenograft in pig: the first induced glioma model in a large animal [J]. J Neurosci Methods, 2014, 221(2): 159-165.
- [12] 张冬, 吴悝, 冯晓源, 等. 适于 MRI 研究的脑干胶质瘤模型的建立 [J]. 临床放射学杂志, 2005, 24(4): 357-360.
Zhang D, Wu X, Feng X, et al. The Establishment of rat glioma model of brain stem for MRI study [J]. J Clin Radiol, 2005, 24(4): 357-360.
- [13] Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, et al. *In vivo* MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma [J]. Neuroimage, 2008, 40(37): 47-58.
- [14] Selby R, Ramirez CB, Singh R, et al. Brain abscess in solid organ transplant recipients receiving cyclosporine-based immunosuppression [J]. Arch Surg, 1997, 132(3): 304-310.
- [15] Mcalister VC, Gao Z, Peltekian K, et al. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression [J]. Lancet, 2000, 355(9201): 376-377.
- [16] Bourneuf E. The MeLiM minipig: an original spontaneous model to explore cutaneous melanoma genetic basis [J]. Frontiers in Genetics, 2017, 8: 146.
- [17] van der Weyden L, Brenn T, Patton EE, et al. Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma [J]. J Pathol, 2020, 252(1): 4-21.
- [18] Khoshnevis M, Carozzo C, Bonnefont-Rebeix C, et al. Development of induced glioblastoma by implantation of a human xenograft in Yucatan minipig as a large animal model [J]. J Neurosci Methods, 2017, 282: 61-68.
- [19] Haczku A, Alexander A, Brown P, et al. The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation *in vitro*: Comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93(2): 510-519.
- [20] Vafadari R, Kraaijeveld R, Weimar W, et al. Tacrolimus inhibits NF- κ B activation in peripheral human T cells [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60784.

[收稿日期] 2020-01-04