(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119139291 A
(43)申请公布日 2024.12.17

(21)申请号 202411386887.2

(22)申请日 2024.09.30

(71)申请人 同济大学
地址 200092 上海市杨浦区四平路1239号

(72)发明人 杜昌升 韩三省

(74)专利代理机构 上海科律专利代理事务所(特殊普通合伙) 31290
专利代理师 叶凤

(51)Int.Cl.
A61K 31/357(2006.01)
A61K 31/385(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

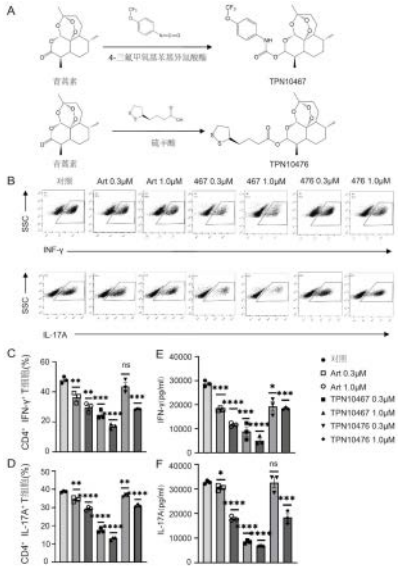
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54)发明名称

青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476在作为预防和治疗自身免疫性疾病药物中的应用

(57)摘要

本发明涉及生物药领域,具体涉及青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476在作为预防和治疗自身免疫性疾病药物中的应用。本发明在体外CD4+T细胞的分化实验中观察到两种青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476均可以降低Th1和Th17细胞的分化比例,其中TPN10467抑制分化的效果比青蒿素更为优越。本发明选择EAE小鼠模型进行在体实验的研究,在对EAE小鼠的给药治疗中,本发明发现TPN10467和TPN10476两种新型青蒿素衍生物对于EAE的临床表型有着较好的缓解作用,并降低了中枢神经系统内部的炎性细胞浸润数目和脱髓鞘比例。总而言之,本发明的数据表明TPN10467和TPN10476可以减轻自身免疫疾病症状,可为自身免疫疾病治疗提供新的潜在药物选择。



CN 119139291 A

1.青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476在作为预防和治疗自身免疫性疾病药物中的应用,其特征在于,青蒿素衍生物TPN10467、TPN10476以剂量依赖性的方式降低$CD4^+$ T细胞向Th1和Th17细胞分化的最终比例。

2.如权利要求1所述的应用,其特征在于,TPN10467和TPN10476灌胃给药处理可以缓解EAE小鼠临床症状。

3.如权利要求1所述的应用,其特征在于, TPN10467可减少小鼠CNS中炎性细胞总数,减轻脊髓损伤。

青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476在作为预防和治疗自身免疫性疾病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物药领域,具体涉及青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476在作为预防和治疗自身免疫性疾病药物中的应用。

背景技术

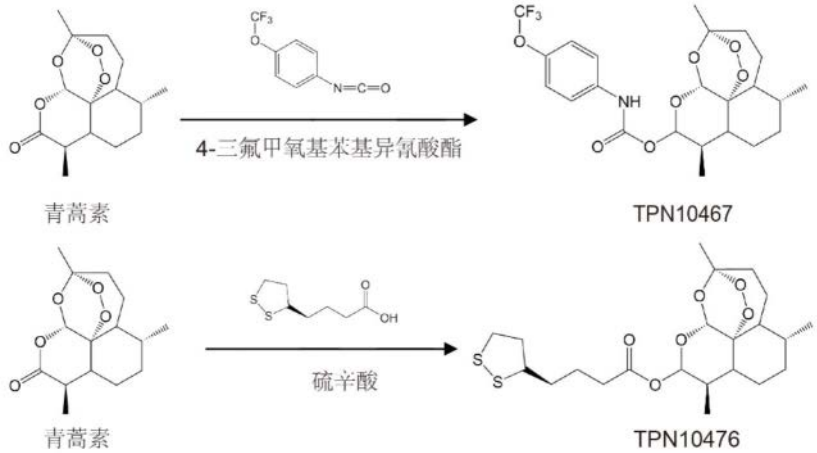
[0002] 自身免疫疾病是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害的疾病,而多发性硬化症(MS)正是由于免疫细胞对神经的损伤而导致发生的慢性脱髓鞘疾病,导致中枢神经系统的炎症性病变,从而造成组织损伤和残疾症状。EAE是一种与MS具有相似的临床、组织和病理相似性的动物疾病模型。由于MS病人样本不易获取,因此EAE是研究MS病理过程、发病机制的重要模型,在临床神经免疫学的研究中具有重要意义。$CD4^+$T细胞在多发性硬化症中的作用得到了广泛研究的支持:Th1和Th17细胞直接参与到多发性硬化症的病理过程中,两类$CD4^+$T细胞在外周免疫系统激活并迁移入CNS中后,所分泌的细胞因子会持续性导致神经损伤。

[0003] 作为广泛使用的抗疟药物,青蒿素疗法具有患者耐受性良好和价格低廉的优点。除对疟疾的良好治疗效果,之前的研究表明青蒿素也具有多种抗炎免疫调节作用。青蒿素可通过抑制 T 细胞增殖与活化,抑制 B 细胞活化和抗体产生,增加调节性 T 细胞以及减少致炎细胞因子的释放等多方面来实现抗炎免疫调节功能。

发明内容

[0004] 针对现有技术的问题,本发明首次公开两种新合成的青蒿素衍生物在自身免疫性疾病的治疗效果。

[0005]



体外实验展示了青蒿素衍生物TPN10467、TPN10476以剂量依赖性的方式降低$CD4^+$T细胞向Th1和Th17细胞分化的最终比例。

[0006] 进一步的,EAE疾病模型研究发现TPN10467和TPN10476灌胃给药处理可以对EAE小鼠临床症状有所缓解。

[0007] 进一步的,同时在检测中发现TPN10467处理小鼠CNS中的炎性细胞总数明显减少,脊髓损伤也有明显减轻。

[0008] 总结而言,本发明的工作提示TPN10467和TPN10476是治疗自身免疫性疾病的潜在药物。

[0009] 本发明有益效果:

Th1和Th17细胞是CD4+ T细胞的关键促炎亚群,在多种自身免疫性疾病和炎症的发作中发挥重要作用。本发明在体外CD4+ T细胞的分化实验中观察到两种青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476均可以降低Th1和Th17细胞的分化比例,其中TPN10467抑制分化的效果比青蒿素更为优越。多发性硬化症(Multiple sclerosis,MS)是一类慢性炎症神经退行性疾病,实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis ,EAE)是用于研究MS的主要疾病模型,研究已经阐明在MS病人中神经元轴突的损伤是行动障碍和其他残疾的主要原因。多发性硬化症发病过程中Th1 和Th17细胞进入CNS后,和其他炎性细胞如CD8+ 效应 T 细胞建立并维持炎性环境,导致脱髓鞘的发生,最终神经元功能丧失。在细胞实验的基础上,本发明选择EAE小鼠模型进行在体实验的研究,在对EAE小鼠的给药治疗中,本发明发现TPN10467和TPN10476两种新型青蒿素衍生物对于EAE的临床表型有着较好的缓解作用,并降低了中枢神经系统内部的炎性细胞浸润数目和脱髓鞘比例。总而言之,本发明的数据表明TPN10467和TPN10476可以减轻自身免疫疾病症状,可为自身免疫疾病治疗提供新的潜在药物选择。

附图说明

[0010] 图1为TPN10467和TPN10476抑制体外Th1和Th17细胞分化示意图;

图2为TPN10467和TPN10476在EAE疾病进程中全程给药抑制疾病临床症状示意图;

图3为TPN10467和TPN10476可以减轻EAE小鼠脊髓损伤示意图;

图4为TPN10467在治疗性给药中抑制EAE小鼠疾病临床症状示意图;

图5为TPN10467和TPN10476治疗性给药可以减轻EAE小鼠脊髓损伤示意图。

具体实施方式

[0011] 下面将结合具体实施例及其附图对本申请提供的技术方案作进一步说明。结合下面说明,本申请的优点和特征将更加清楚。

[0012] 下面所用的实施例中所采用的实验材料, 如无特殊说明, 均可由常规的生化试剂公司购买得到。

[0013] 材料与方法

动物

雄性C57BL/6小鼠购自集萃药康 (南京, 中国)。所有小鼠均保持在SPF级洁净条件下进行饲养。动物实验选用8-10周龄雄性小鼠。所有动物实验均经同济大学动物伦理委员会批准。

[0014] EAE诱导及治疗

用含有灭活结核分枝杆菌(H37Ra菌株,5 mg/ml,BD Diagnostics) 和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG) 35-55肽(ChinaPeptides)的完全弗氏佐剂免疫雄性C57BL/6小鼠(8-

10周),并于免疫第0天和第2天为小鼠注射百日咳毒素(200 ng/只,Millipore)。每天检查小鼠的疾病临床症状,并按0-5分进行评分,评分标准如下:0分,无临床症状;1分,尾部瘫痪;2分,轻度瘫痪(单侧或双侧后肢无力,不完全瘫痪);3分,截瘫(双侧后肢完全瘫痪);4分,截瘫并前肢无力或瘫痪;5分,濒死状态或死亡。在药物治疗方面,TPN10467和TPN10476分别溶于0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液中,从免疫后第0天开始,每天给小鼠灌胃10、30或100 mg/kg体重的药物(200 μl /只),直至实验结束。给药组给予等体积0.5% CMC-Na溶液。

[0015] 组织病理和免疫组织化学分析

每只小鼠用200 μL 10%水合氯醛进行深度麻醉,随后使用0.9% NaCl溶液进行心脏灌流去除各器官中的外周血。取腰髓部位组织样品,浸泡在4%多聚甲醛中并在4℃固定过夜。将固定完成的脊髓组织进行脱水、石蜡包埋和切片,HE染色观察脊髓炎性细胞浸润,LFB染色观察脊髓脱髓鞘情况,最终对显微镜下拍摄的图片使用Image-Pro软件进行统计分析。

[0016] 细胞染色和流式分析

收集的$CD4^+$T细胞用PMA (50 ng/ml,Sigma-Aldrich)、ionomycin (750 ng/ml,Sigma-Aldrich)和brefeldin A (5 μg/ml,Sigma-Aldrich)在37°C条件下刺激5小时。细胞表面标记CD4(1994141,1:100稀释,Invitrogen)用抗体4℃避光染色30min,然后细胞用固定通透液重悬,分别进行胞内IL-17A (BioLegend,506904,1:100)和IFN-γ (BioLegend,505810,1:100稀释)的流式抗体染色。流式分析为BD FACS Verse系统,并用Flow Jo V10软件进行分析

中枢神经系统浸润细胞分离

从EAE小鼠中取出脑和脊髓,将其研磨成组织匀浆,并通过70 μm细胞滤网过滤收集至50 ml离心管中,500 g 4 ℃ 离心10 min获得细胞,然后将细胞重悬在8 ml 37% Percoll溶液中,轻轻悬空滴加4 ml 70%Percoll溶液,780 g 25 ℃密度梯度离心25 min,收集位于37/70%Percoll界面处的细胞,进行后续分析。

[0017] $CD4^+$T细胞分离和体外分化

使用磁珠(Invitrogen,11415D)分离7-8周C57BL/6小鼠脾脏中$CD4^+$T细胞,按照4×10^5细胞/孔的密度接种至96孔板中,加入200 μL包含10%FBS、2 mM L-谷氨酰胺和50 μM β-巯基乙醇的1640完全培养基进行培养,加入anti-CD3(2 μg/ml,BD Pharmingen)和anti-CD28(2 μg/ml,BD Pharmingen)抗体激活细胞,加入IL-12(10 ng/ml,Peprotech)和anti-IL-4(10 μg/ml,BD Pharmingen)诱导Th1细胞分化。对于Th17细胞分化,除了加入anti-IL-4 (10 μg/ml)和anti-IFN-γ (10 μg/ml,BD Bioscience,551216)抗体外还需加入Th17细胞分化因子混合物,包括IL-6(30 ng/ml)、TGF-β1(3 ng/ml), TNF-α(10 ng/ml)和IL-1β(10 ng/ml)。不同浓度的TPN10467或TPN10476与细胞因子一同加入,培养3天后收集培养上清和细胞,检测其对$CD4^+$T细胞亚型分化的影响。

[0018] ELISA检测细胞因子水平

将培养基上清液或血清按一定比例稀释。根据制造商的说明,用相关的ELISA试剂盒(Invitrogen)检测培养上清液或血清中细胞因子的浓度。

[0019] 统计分析

EAE小鼠处理组间统计学差异用two-way ANOVA test分析,其他数据统计用

Student's t test分析差异性,数据统计图表示为mean±SEM,P＜0.05被认为有统计学意义。

[0020] 结果

实施例1:

TPN10467和TPN10476抑制体外Th1和Th17细胞分化

大量研究证实,同样具有倍半萜内酯结构的青蒿素及其衍生物对一些急慢性炎症性疾病具有一定的治疗作用,本发明预期通过将青蒿素与不同的抗炎分子结合,保留倍半萜内酯结构并引入新的基团使其发挥更好的治疗效果。TPN10467和TPN10476的合成过程与化学结构式如图1中A所示:本发明选择了4-三氟甲氧基苯基异氰酸酯和硫辛酸两种小分子分别用于和青蒿素合成TPN10467、TPN10476。4-三氟甲氧基苯基异氰酸酯经常作为合成药物的中间体,以该分子开发的双环杂芳基胺药物可以用来治疗疼痛,发炎和外伤性损伤;而硫辛酸一种抗氧化剂,是线粒体酶复合物的重要辅助因子,在之前的研究中硫辛酸可以抑制MMP-9活性和T细胞的活性、迁移能力,并通过抗氧化共同减轻EAE发病。

[0021] $CD4^+$T细胞在多发性硬化症的发病过程中发挥关键作用,其中分泌IFN-γ的Th1细胞和分泌IL-17A的Th17细胞促进了脊髓的损伤并进而加重疾病发展。本发明希望通过$CD4^+$T细胞的体外分化实验对两类青蒿素衍生物的效果进行初步评估。本发明取7-8周的C57BL/6小鼠的脾脏,通过对其中$CD4^+$T细胞的分选,得到未经分化的幼稚态$CD4^+$T细胞,分别在Th1和Th17 细胞的分化条件下进行培养,同时在培养基中给予不同浓度的青蒿素、TPN10467或TPN10476(300 nM, 1 μM,使用DMSO溶解),对照组加入等体积DMSO。分化持续3天后,经流式分析发现,TPN10467处理组、TPN10476处理组与对照组相比,Th1和Th17细胞比例明显下降,进一步分析结果发现:青蒿素衍生物浓度越高,其抑制T细胞向Th1和Th17 细胞分化的程度也越明显,如图1中B和图1中C、D所示。同时在与青蒿素处理组的统计结果进行比较后,本发明发现TPN10467对$CD4^+$T细胞体外分化的抑制作用比青蒿素更加显著。

[0022] 如图1:

A:TPN10467和TPN10476的合成反应和结构式。

[0023] B:从7-8周大的C57BL/6小鼠脾脏分离得到的幼稚态$CD4^+$T细胞在体外以不同的分化条件诱导分化为Th1和Th17细胞,并分别加入不同浓度(300 nM, 1 μM)的青蒿素、TPN10467、TPN10476或作为对照的溶媒DMSO,培养3天。Th1和Th17细胞通过FACS进行细胞内IFN-γ和IL-17A染色检测和分析。IFN-γ^+(C)和IL-$17A^+$(D) T细胞百分比及分化培养基中细胞因子水平(E,F)的统计分析。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001(Student's t test).

如图1中E和图1中F,在对细胞培养的上清液中IFN-γ和IL17A水平进行检测后,本发明所得到的结果也与流式分析结果相符合。

[0024] 实施例2:

TPN10467和TPN10476缓解EAE临床症状

多发性硬化症的发病与Th1、Th17 细胞密切相关。而本发明的结果发现TPN10467和TPN10476可有效抑制Th1和Th17 细胞体外分化。因此,本发明进一步评估TPN10467和TPN10476是否对多发性硬化症具有一定的治疗作用。首先,对8周C57BL/6雄鼠用MOG_{35-55}和百日咳毒素诱导EAE模型,然后分别用不同剂量的TPN10467或TPN10476(10 mg/kg, 30 mg/

kg, 100 mg/kg)在免疫当天开始灌胃给药,对照组给予相同体积(200 μL)的0.5% CMC-Na溶液,流程如图2中A所示。

如图2:

A:EAE建模及TPN10467和TPN10476灌胃给药处理示意图。

B、C:按照10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg体重的剂量对EAE小鼠进行TPN10467或TPN10476灌胃给药,使用相同体积的0.5%CMC-Na溶液做对照,记录EAE临床评分,数据表示为mean ± SEM (n = 5) *p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001 (two-way ANOVA test)。

[0025] 本发明每天评估EAE小鼠的临床评分直至实验结束,并绘制临床评分曲线如图2中B和图2中C所示,结果表明TPN10467和TPN10476均可对EAE的发病进行干预。

[0026] 实施例3:

本发明选择在统计学分析中表现出显著性差异的TPN10467(100 mg/kg)给药组和TPN10476(30 mg/kg)给药组对EAE小鼠的脊髓进行组织学分析,检测中枢神经系统白细胞的浸润及髓鞘损伤情况,如图3A所示,HE染色结果表明TPN10467给药组、TPN10476给药组与对照组相比脊髓中炎性细胞浸润数量明显降低。如图3B所示, LFB染色结果同样表明TPN10467和TPN10476给药可以减轻小鼠脊髓的脱髓鞘程度。使用Image-Pro软件进行统计分析,结果见图3C和图3D,TPN10467和TPN10476治疗组脊髓炎性细胞浸润减少和脱髓鞘的缓解与对照组之间具有显著性差异。

[0027] 总之,研究数据表明TPN10467和TPN10476对EAE具有一定的疗效和保护作用。

[0028] 附图解释,图3中:

A、B: 对照、TPN10467(100 mg/kg)、TPN10476(30 mg/kg)组脊髓HE、LFB染色切片展示,Scale bars, 200 μm。

[0029] C、D: 全程给药小鼠脊髓炎性细胞浸润和脱髓鞘情况统计分析。随机选择10-20个切片进行病理统计。数据为均数±SEM (n = 10),*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001 (Student's t test)。

[0030] 实施例4:

TPN10467和TPN10476在治疗性给药中发挥EAE缓解效果

上述结果显示,TPN10467和TPN10476在给药1个月左右的时间内减轻了EAE的症状。考虑到临床患者的情况,本发明希望进一步探索在发病后给予青蒿素衍生物,即治疗性给药是否会起作用。如图4中A所示在开始EAE造模至EAE发作期间,按正常程序饲喂小鼠。在所有小鼠发生EAE后,本发明将小鼠分为三组,并使每一组的初始平均临床评分相同:对照组和TPN10467(100 mg/kg)、TPN10476(30 mg/kg)组,给药组每天灌胃200 μL的药液,对照组给予相同体积的0.5% CMC-Na溶液。

[0031] 从图4中B的临床评分曲线中本发明发现在治疗性给药进程中TPN10467对EAE症状仍有明显的缓解作用;而TPN10476组临床评分略有下降,但与对照组比较无显著差异,本发明取出EAE小鼠的脑和脊髓分离免疫细胞,进行流式细胞术和病理切片分析。

[0032] 从CNS匀浆中分离免疫细胞后,本发明使用血细胞计数板计算细胞总数,在图4中C和图4中D的流式分析结果中本发明发现小鼠中枢神经系统中$CD4^+$T细胞亚群的比例没有表现出差异性。但计算得出淋巴细胞、$CD4^+$T细胞及Th1、Th17细胞亚群的数量后,与对照组相

比TPN10467组小鼠CNS中的免疫细胞显著减少,而TPN10476组与对照组无明显差异,结果如图4中E所示。

[0033] 附图解释,图4中:

A:EAE建模及TPN10467和TPN10476治疗性给药流程示意图。

B:按照相应的剂量对发病后的EAE小鼠进行TPN10467或TPN10476灌胃给药,使用相同体积的0.5%CMC-Na溶液做对照,记录EAE临床评分,数据表示为mean ± SEM (n =5) *p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001 (two-way ANOVA test)。

[0034] C、D:流式细胞术分析小鼠CNS中$CD4^+$T细胞和Th1、Th17细胞亚群比例。

[0035] E:CNS中淋巴细胞、$CD4^+$T细胞和Th1、Th17细胞的绝对数量。数据为均数±SEM (n =5),*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001 (Student's t test)。

[0036] 实施例5:

将治疗给药实验中EAE小鼠的脊髓样品制成病理切片进行观察和统计。如图5中A的HE染色结果所示,TPN10467和TPN10476治疗组与对照组相比脊髓中白细胞浸润明显降低,同时图5中B的LFB染色结果同样表明治疗组脱髓鞘程度明显减弱。从图5中C和图5中D的统计结果中本发明发现,TPN10467和TPN10476均可降低EAE小鼠脊髓炎症细胞浸润数和脱髓鞘损伤率。

[0037] 附图解释,图5中:

A、B:对照、TPN10467(100 mg/kg)、TPN10476(30 mg/kg)组脊髓HE、LFB染色切片展示,Scale bars, 200 μm。

C、D:治疗性给药EAE小鼠脊髓炎性细胞浸润和脱髓鞘情况统计分析。随机选择10-20个切片进行病理统计。数据为均数±SEM (n = 10),*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001 (Student's t test)。

[0038] 讨论

自身免疫性疾病是指一系列广泛的临床病症集合,由于自我免疫耐受的破坏而导致针对自身目标的免疫反应,进而形成组织病变和临床症状。其中多发性硬化症是一种中枢神经系统慢性炎症,研究表明,多发性硬化症患者神经元轴突的损伤是导致行动障碍和其他残疾的主要原因。过去已有研究表明,青蒿素可以通过多种方式缓解自身免疫性疾病,但长期用药引起的毒性使其难以进入临床使用。

[0039] 本发明研究了两种新型青蒿素衍生物TPN10467和TPN10476对多发性硬化症的治疗作用。多发性硬化症中主要的促炎$CD4^+$T细胞亚群是Th1和Th17细胞。这些细胞进入中枢神经系统后,与其他炎症细胞如$CD8^+$T细胞建立并维持炎症环境。Th1细胞分泌IFN-γ可直接损伤少突胶质细胞。Th17分泌的IL-17A可促进促炎细胞因子IL-6、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和肿瘤坏死因子α (TNF-α)的表达。这些细胞因子导致神经元脱髓鞘,并最终丧失正常神经信号传递功能。在$CD4^+$T细胞的体外分化实验中,本发明观察到TPN10467和TPN10476均能降低Th1和Th17细胞的分化率,而TPN10467的抑制分化效果优于青蒿素。

[0040] 接下来,本发明利用模拟MS发病的EAE小鼠模型报道了TPN10467和TPN10476对疾病表型的影响,在全程给药和治疗性给药中TPN10467和TPN10476均可以缓解EAE小鼠建模期间临床症状,并减轻中枢神经系统炎症细胞浸润和脱髓鞘。这些结果提示TPN10467和TPN10476对EAE小鼠具有神经保护作用,对自身免疫性疾病有着潜在的治疗应用价值。

[0041] 上述对实施例的描述是为了便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用本发明。显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

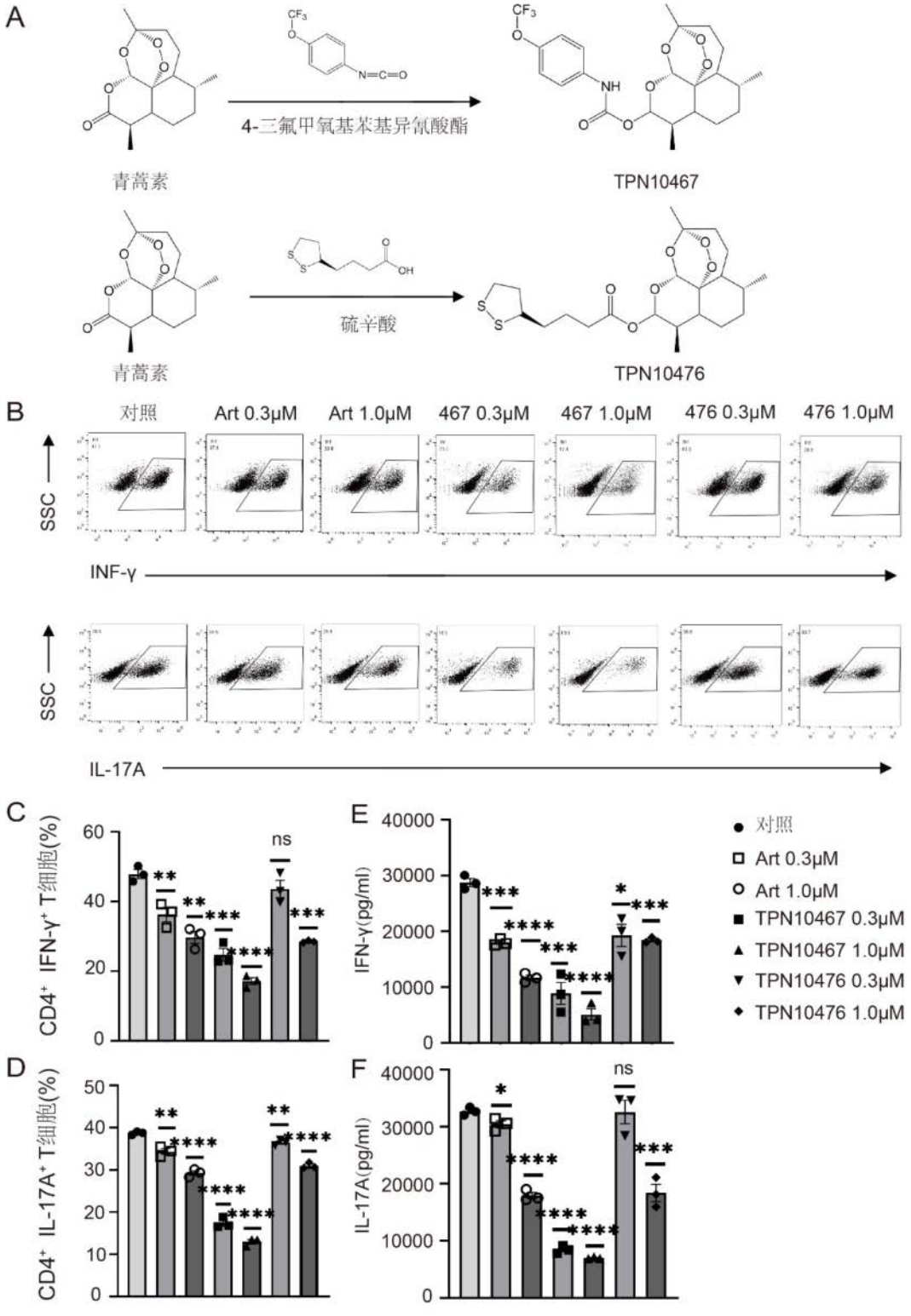

A
青蒿素
4-三氟甲氧基苯基异氰酸酯
TPN10467
青蒿素
硫辛酸
TPN10476
B
对照
Art 0.3μM
Art 1.0μM
467 0.3μM
467 1.0μM
476 0.3μM
476 1.0μM
SSC
INF-γ
SSC
IL-17A
C
CD4+ IFN-γ+ T细胞(%)
D
CD4+ IL-17A+ T细胞(%)
E
IFN-γ(pg/ml)
F
IL-17A(pg/ml)
ns
对照
Art 0.3μM
Art 1.0μM
TPN10467 0.3μM
TPN10467 1.0μM
TPN10476 0.3μM
TPN10476 1.0μM

图1

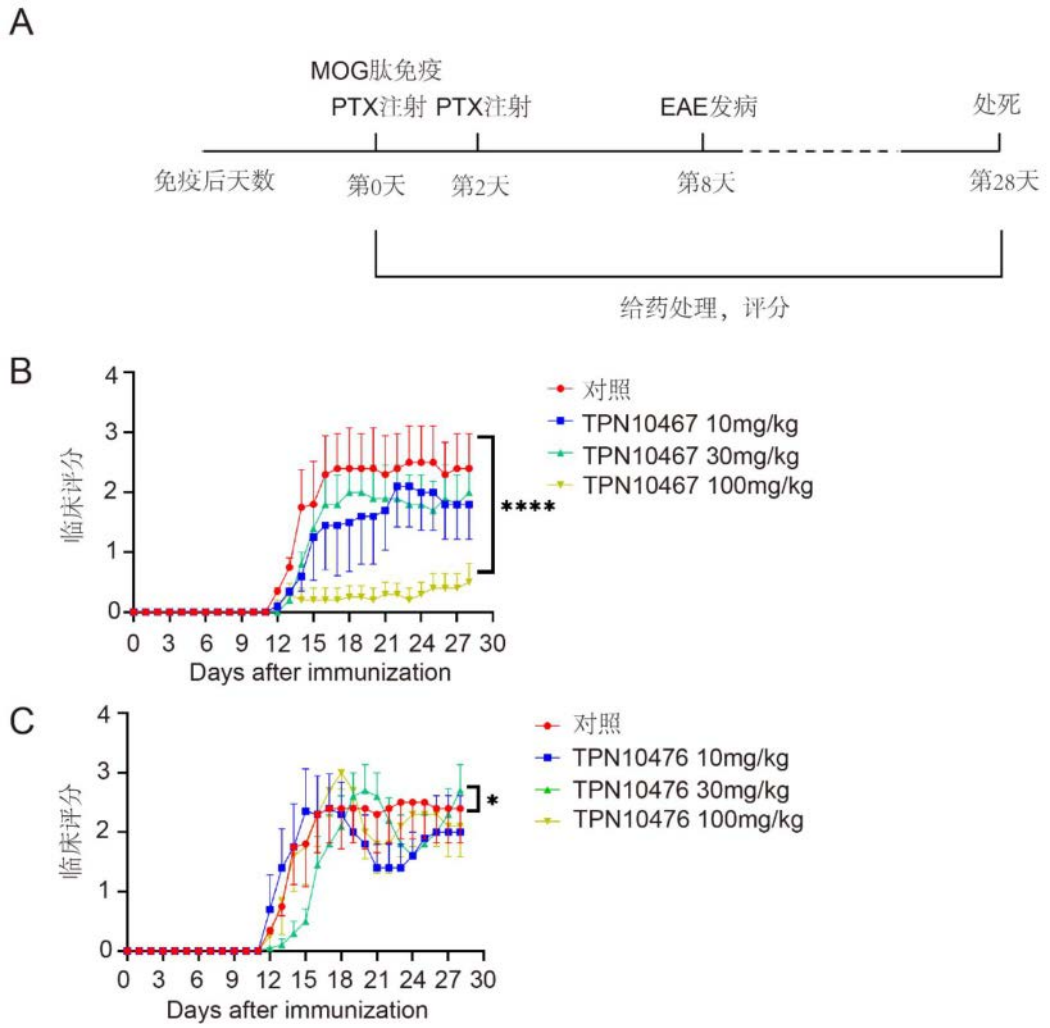

A
MOG肽免疫
PTX注射 PTX注射
EAE发病
处死
免疫后天数
第0天
第2天
第8天
第28天
给药处理，评分
B
临床评分
对照
TPN10467 10mg/kg
TPN10467 30mg/kg
TPN10467 100mg/kg
****
Days after immunization
C
临床评分
对照
TPN10476 10mg/kg
TPN10476 30mg/kg
TPN10476 100mg/kg
*
Days after immunization

图2

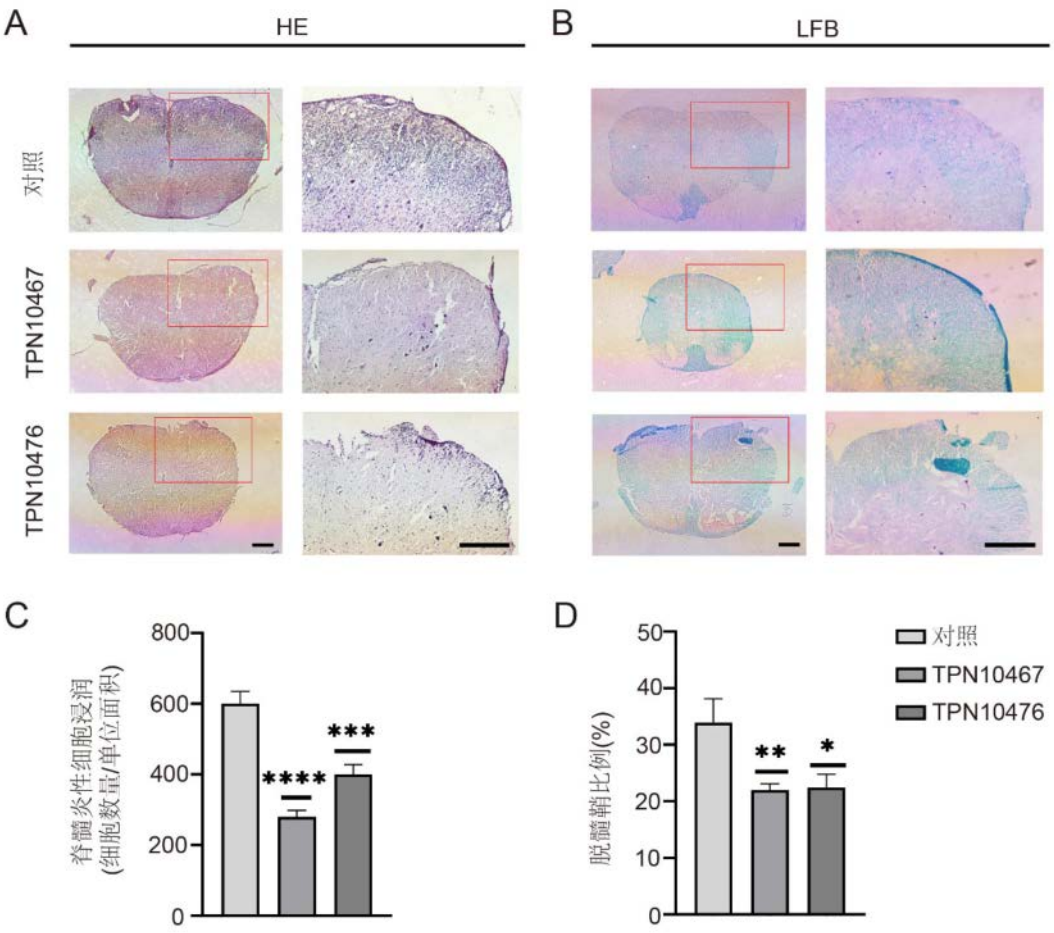

A
HE
B
LFB
对照
TPN10467
TPN10476
C
脊髓炎性细胞浸润
(细胞数量/单位面积)
800
600
400
200
0
****
***
D
脱髓鞘比例(%)
50
40
30
20
10
0
**
*
对照
TPN10467
TPN10476

图3

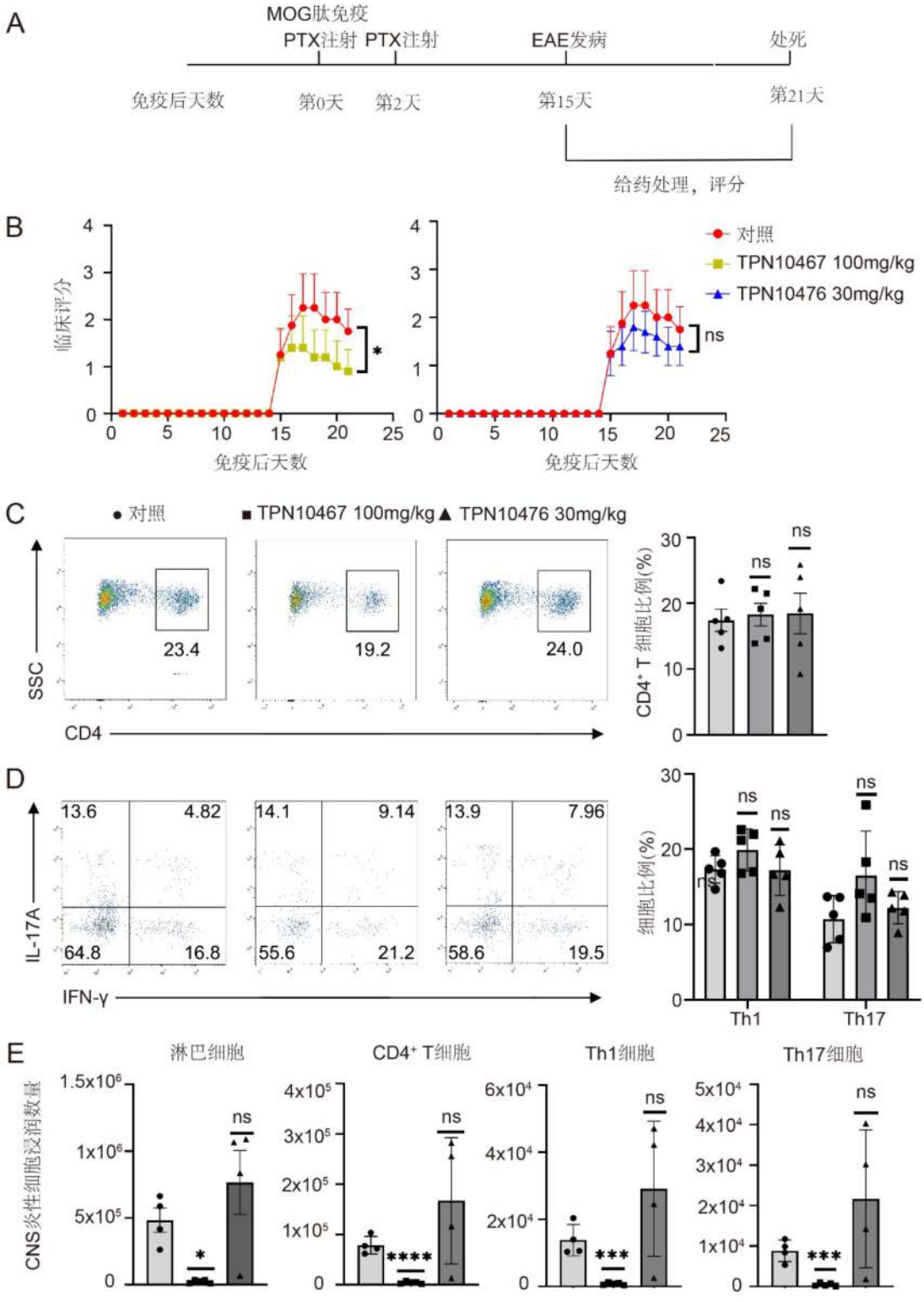

A
MOG肽免疫
PTX注射 PTX注射
EAE发病
处死
免疫后天数
第0天
第2天
第15天
第21天
给药处理，评分
B
临床评分
对照
TPN10467 100mg/kg
TPN10476 30mg/kg
*
ns
免疫后天数
免疫后天数
C
对照
TPN10467 100mg/kg
TPN10476 30mg/kg
SSC
CD4
23.4
19.2
24.0
CD4⁺ T 细胞比例(%)
ns
D
IL-17A
IFN-γ
13.6
4.82
64.8
16.8
14.1
9.14
55.6
21.2
13.9
7.96
58.6
19.5
细胞比例(%)
Th1
Th17
E
淋巴细胞
CD4⁺ T细胞
Th1细胞
Th17细胞
CNS炎性细胞浸润数量
*
****
***
***
ns

图4

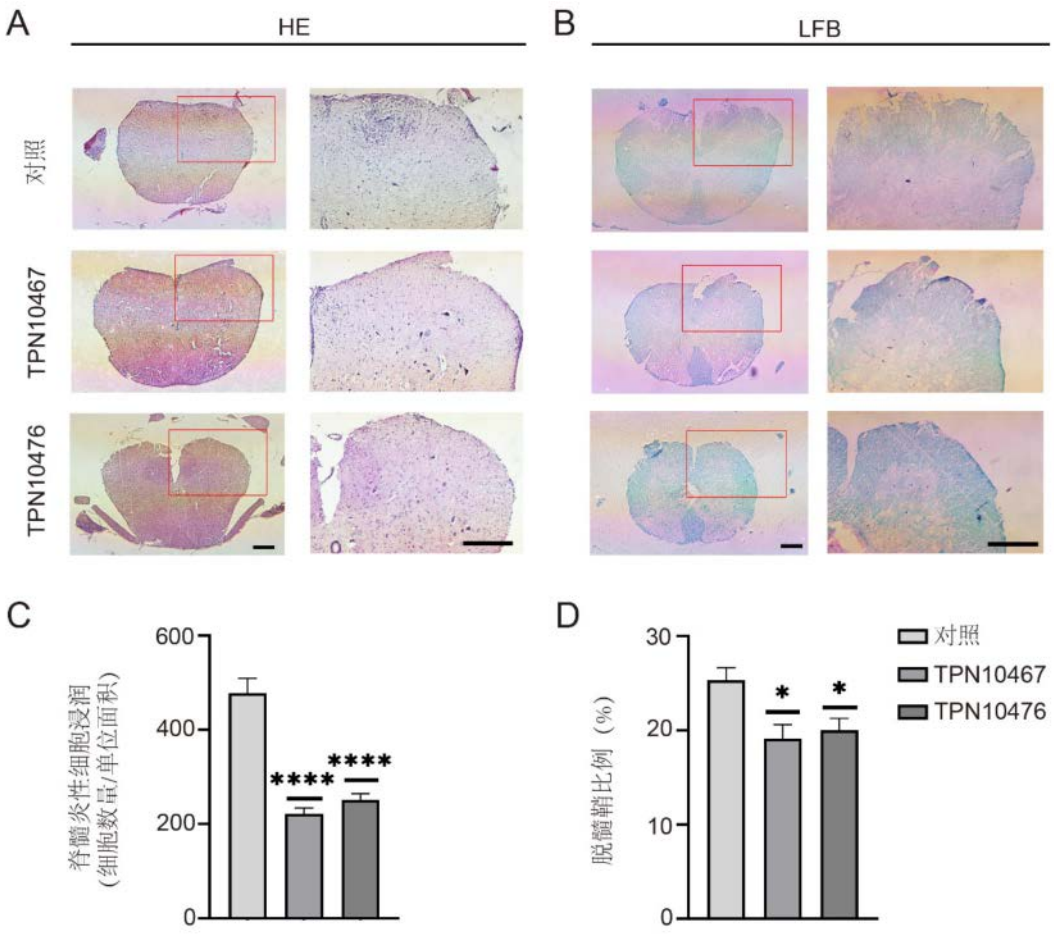

A
HE
B
LFB
对照
TPN10467
TPN10476
C
脊髓炎性细胞浸润
(细胞数量/单位面积)
600
400
200
0
****
****
D
脱髓鞘比例（%）
30
20
10
0
*
*
对照
TPN10467
TPN10476

图5