

· 实验研究 ·

紫柳素通过免疫抑制功能改善莫诺苯宗诱导白癜风小鼠毛发脱色的研究

黄海艳, 邹彦芬, 刘小明, 李云会, 张杰*

北京大学深圳医院 皮肤科, 广东 深圳 518036

摘要: 目的 探讨紫柳素通过免疫抑制功能对莫诺苯宗诱导白癜风小鼠毛发脱色的改善作用。方法 40%莫诺苯宗乳膏诱导小鼠脱色构建白癜风模型, 48只C57BL/6小鼠按体质量随机分对照组、模型组、他克莫司组和紫柳素组, 每组12只。模型组涂抹40%莫诺苯宗乳膏50mg, 1次/d, 他克莫司组在模型组的基础上7h后涂抹0.1%他克莫司乳膏30mg, 1次/d; 紫柳素组在模型组的基础上7h后0.1%紫柳素乳膏10mg, 1次/d, 连续用药50d。观察并记录小鼠的毛发脱色情况; 分离小鼠脾脏淋巴细胞, CFSE法检测T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖情况; 采用ELISA法检测各组小鼠血清中IgM、IgA和IgG水平; 3H-TdR标记法检测IL-2分泌活性; 流式细胞仪检测表面抗原CD19活性。结果 与模型组比较, 紫柳素能显著改善白癜风小鼠毛发脱色现象, 显著降低脱色发生率、显著减小脱色面积, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 紫柳素能显著抑制淋巴细胞增殖活性, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 紫柳素能显著降低小鼠血清中IgM、IgG、IgA水平($P < 0.05$), 上调IL-2分泌活性和增强表面抗原CD19活性($P < 0.05$)。结论 紫柳素可以改善白癜风小鼠毛发脱色的现象, 其作用机制可能是通过抑制小鼠自身免疫反应。

关键词: 紫柳素; 他克莫司; 白癜风; 免疫反应

中图分类号: R966; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)05-0825-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.05.001

Improvement of butin on decolorization in vitiligo mice induced by monobenzone by inhibiting immune function

HUANG Hai-yan, ZOU Yan-fang, LIU Xiao-ming, LI Yun-hui, ZHANG Jie

Department of Dermatology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China

Abstract: Objective To investigate the improvement of butin on decolorization in vitiligo mice induced by monobenzone by inhibiting immune function. **Methods** 40% Monorubicin cream was used to induce decolorization of mice to construct vitiligo model. 48 C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, tacrolimus group, and butin group according to the weight. Rats in the model group were applied with 40% Monobenzone Cream 50 mg, once daily. Rats in the tacrolimus group were applied with 0.1% Tacrolimus Cream 30 mg on the basis of model group after 7 h, once daily. Rats in the butin group were applied with 0.1% Butin Cream 10 mg on the basis of model group after 7 h, once daily. They were treated for 50 d. The hair discoloration of mice were observed and recorded. The spleen lymphocytes were isolated, and the proliferation of T lymphocytes and B lymphocytes were detected by CFSE assay. The levels of IgM, IgA and IgG in serum were detected by ELISA method. The secretion activity of IL-2 was detected by 3H-TdR labeling method, and the activity of CD19 was detected by flow cytometry. **Results** Compared with the model group, butin can significantly improve hair decolorization in mice with vitiligo, reduce the incidence and reduce the area of decolorization, with significantly difference between two groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, butin can significantly inhibit lymphocyte proliferation, with significantly difference between two groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, butin

收稿日期: 2020-04-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81803138、81502727)

作者简介: 黄海艳, 女, 主治医师, 研究方向为白癜风为主的色素性皮肤病。E-mail: huanghaiyan0530@163.com

*通信作者 张杰(1978—), 男, 主任医师, 主要从事变态反应性皮肤病等的临床基础研究。E-mail: 68346473@qq.com

can significantly decrease IgM, IgG, and IgA levels in serum ($P < 0.05$), and increase IL-2 secretion activity and surface antigen CD19 activity in serum ($P < 0.05$). **Conclusion** Butin can improve the hair discoloration in mice with vitiligo, and its mechanism may be through inhibiting the autoimmune activity of mice.

Key words: butin; tacrolimus; vitiligo; immune activity

白癜风是一种常见病,主要表现为皮肤呈斑片状脱色变白。病理上可见病损皮肤黑素颗粒减少,黑素细胞数量减少乃至消失。对该病的发病机制至今尚未形成明确的认识,现在多数学者认为该病属于自身免疫疾病^[1]。紫柳素是从驱虫斑鸠菊 *Vernonia antilelminifca* Willd. 中提取的一种黄酮苷元,有报道称紫柳素及其衍生物具有促进黑素细胞增殖、上调酪氨酸酶活性和增高黑素含量等功能,是治疗色素疾病如白癜风药物的潜在药物^[2]。紫柳素及其衍生物能够抑制小鼠脾淋巴细胞白细胞介素 4 (IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等细胞因子的分泌^[3]。本研究采用莫诺苯宗法先复制小鼠白癜风模型,然后分别给予他克莫司和紫柳素治疗,检测小鼠机体免疫反应活性,验证紫柳素是否通过免疫抑制作用改善白癜风小鼠毛发脱色。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠,雄性,体质量 (20 ± 2) g,购于北京维通利华实验动物有限公司,实验动物质量合格证许可证号 SCXK (京 2016-0008)。在 SPF 环境中饲养,自由摄食,进水,室温控制在 $20 \sim 25$ °C。

1.2 主要试剂

莫诺苯宗(产品批号 158348,质量分数为 98%) 和紫柳素(产品批号 F4043,质量分数 $\geq 98\%$) 均购自美国 Sigma 公司,分别制备成含量为 40% 和 0.1% 的乳膏。0.1% 他克莫司软膏购自安斯泰来制药(中国)有限公司,规格为 10 g : 10 mg, 产品批号 CG5716。Pan T 细胞分离试剂盒(货号 130-095-130) 和 B 细胞分离试剂盒(货号 130-090-862) 均购自德国美天旆,小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒(货号 BMS601) 购自美国 Thermo Fisher 公司,小鼠 IgM (货号 ab133047)、IgG (货号 ab151276) 和 IgA (货号 ab157717) ELISA 试剂盒均购自美国 Abcam 公司,CFSE 细胞增殖试剂盒(货号 C34554) 购自美国 Thermo Fisher 公司,FITC-CD19 单克隆抗体(货号 ab24936) 购自美国 Abcam 公司。

1.3 分组

C57BL/6 小鼠 48 只,按体质量随机分为对照

组、模型组、他克莫司组,紫柳素乳膏组共 4 组,每组 12 只,按参考文献的方法^[4]造模:小鼠背部脱毛 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$,对照组每日涂抹莫诺苯宗乳膏的基质 50 mg 1 次;模型组涂抹 40% 莫诺苯宗乳膏 50 mg, 1 次/d,他克莫司组在模型组的基础上 7 h 后涂抹 0.1% 他克莫司乳膏 30 mg, 1 次/d;紫柳素组在模型组的基础上 7 h 后 0.1% 紫柳素乳膏 10 mg, 1 次/d,连续用药 50 d。

1.4 小鼠毛发脱色评分标准^[6]

0 分毛发无脱色;1 分为毛发有脱色 $0 \sim 10\%$; 2 分为毛发脱色面积 $11\% \sim 25\%$, 3 分为毛发脱色面积 $26\% \sim 50\%$, 4 分为毛发脱色面积 $51\% \sim 75\%$, 5 分为毛发脱色面积 $76\% \sim 100\%$ 。将脱色部位分为用药部位和非用药部位,每个部位总分为 5 分,每只小鼠共 10 分。

1.5 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色的影响

应用激光共聚焦显微镜实时观察建模前后小鼠正常区和脱色区皮肤处在同一层面进行观察皮肤内黑素细胞,并拍照。并考察紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色发生率和脱色面积的影响。

1.6 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

实验结束后,按照试剂盒说明书操作步骤,收集各组小鼠脾脏,分离 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,用 CFSE 法检测 T 淋巴细胞增殖情况。小鼠 T 淋巴细胞以含有 2% FBS 的 PBS 调整浓度为 1×10^7 mL,加入 $10 \mu\text{mol/L}$ CFSE 避光染色 20 min,以大量含有血清的 PBS 重悬,洗涤,终止染色,用流式细胞仪检测。

1.7 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠血清抗体的影响

收集小鼠血液, $3\ 000 \text{ r/min}$ 、 4 °C 离心 15 min 后分离血清,ELISA 试剂盒分别检测小鼠血清中抗体免疫球蛋白 M (IgM)、IgG 和 IgA 的含量,检测步骤参照说明书。

1.8 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠 T 淋巴细胞分泌 IL-2 活性的影响

参照参考文献^[7]的方法分离各组小鼠脾脏,制成单细胞悬液,用 $5 \mu\text{g/mL}$ 刀豆蛋白处理 48 h 以诱导 IL-2 生成,测定 IL-2 含量。体外培养 CTLL-2

细胞，培养基中加入不同浓度梯度的 IL-2，继续培养 24 h 后，于培养基中加入 3H-TdR，按常规用 β 液体闪烁计数器测量 cpm 值，以测定 IL-2 活性。

1.9 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠 B 淋巴细胞表面 CD19 活性的影响

在从脾脏中分离得到的 B 淋巴细胞加入 2 μL FITC 标记的 CD19 单克隆抗体，充分混匀后在 4 °C 避光孵育 1 h，然后加入 200 μL PBS 缓冲液，混匀后流式细胞仪上机检测。

1.10 统计学方法

数据测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色发生率的影响

给予莫诺苯宗乳膏基质的对照组小鼠在整个实

验周期内未出现毛发脱色现象。模型组小鼠莫诺苯宗用药部位、非用药部位毛发的脱色发生率和总脱色发生率分别为 (86.12% ± 7.44%)、(75.86% ± 12.98%)、100%。与模型组比较，紫柳素组脱色发生率均显著降低，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，而紫柳素组与他克莫司组相比，脱色发生率无统计学意义。见表 1。表明紫柳素能延长脱色部位和非脱色部位的脱色时间，降低脱色发生率，且紫柳素的作用与他克莫司相当。在整个实验周期内，紫柳素组小鼠未出现由用药而出现的局部皮肤萎缩等不良反应。

2.2 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色面积评分的影响

与模型组比较，紫柳素组小鼠脱色面积评分显著降低，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而紫柳素组与他克莫司组相比，脱色面积评分差异无统计学意义，见表 2。

表 1 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色发生率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of butin on incidence of hair decolorization induced by monobenzone in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/mg	总脱色发生率/%	用药部位毛发脱色发生率/%	非用药部位毛发脱色发生率/%
对照	12	—	—	—	—
模型	12	—	100	86.12 ± 7.44	75.86 ± 12.98
他克莫司	12	30	65	56.38 ± 14.27 [#]	43.98 ± 12.48 [#]
紫柳素	12	10	81	68.48 ± 14.71 [#]	56.28 ± 14.38 [#]

与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs model group

表 2 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色面积评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of butin on decolorization area score of rats induced by monobenzone ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/mg	用药部位脱色面积评分	非用药部位脱色面积评分
对照	12	—	0	0
模型	12	—	4.56 ± 0.37 [*]	2.98 ± 0.46 [*]
他克莫司	12	30	2.13 ± 0.38 [#]	1.65 ± 0.38 [#]
紫柳素	12	10	2.57 ± 0.43 [#]	2.01 ± 0.42 [#]

与对照组比较: $^{\ast}P < 0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$

$^{\ast}P < 0.05$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs model group

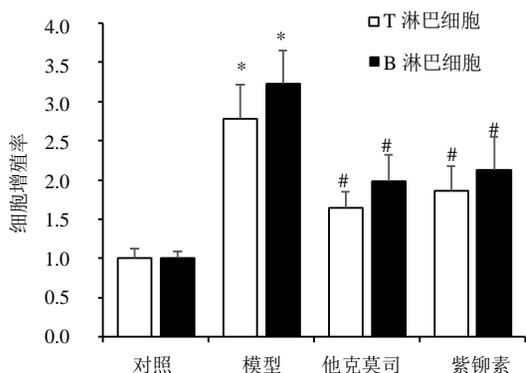
2.3 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

与对照组比较，模型组小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖反应显著增强 ($P < 0.05$)；与模型组比较，紫柳素能显著抑制 T、B 淋巴细胞的增殖反应 ($P < 0.05$)。而紫柳素组与他克莫司组相比，T、B 淋巴细胞的增殖反应无统计学意义。说明紫柳素对白癜

风小鼠细胞免疫具有明显抑制作用，且紫柳素的作用与他克莫司相当，见图 1。

2.4 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠血清抗体的影响

与对照组比较，模型组小鼠血清抗体 IgG、IgM、IgA 水平均有明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，紫柳素血清抗体 IgG、IgM、IgA 水平显著降低，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 3。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 1 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠脾 T、B 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

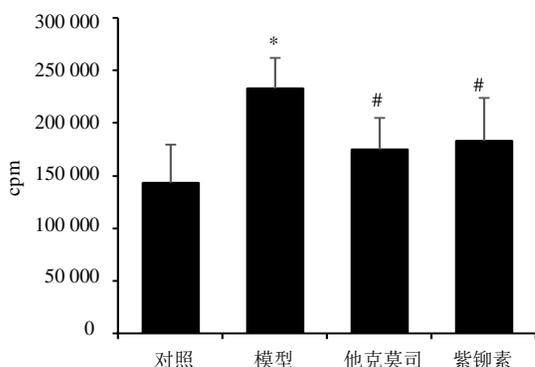
Fig. 1 Effect of butin on the proliferation of T and B spleen lymphocytes in rats induced by monobenzene ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

表 3 紫柳素和他克莫司对小鼠血清 IgG、IgM 和 IgA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of butin and tacrolimus on the content of IgG, IgM and IgA in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg	IgG/(ng·mL ⁻¹)	IgM/(ng·mL ⁻¹)	IgA/(μg·mL ⁻¹)
对照	—	437.81 ± 67.49	127.56 ± 24.57	183.29 ± 45.39
模型	—	734.28 ± 101.23*	252.32 ± 45.58*	382.10 ± 61.23*
他克莫司	30	549.47 ± 76.39#	198.17 ± 43.23#	283.20 ± 44.78#
紫柳素	10	601.23 ± 76.38#	212.47 ± 33.68#	296.83 ± 32.48#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 2 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠 T 淋巴细胞分泌 IL-2 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

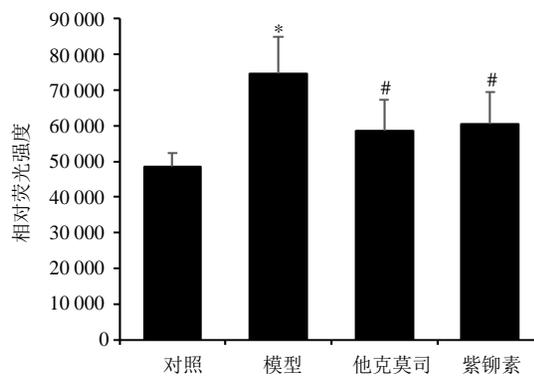
Fig. 2 Effects of butin on IL-2 activity of spleen T lymphocytes in rats induced by monobenzene ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

2.5 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠 T 淋巴细胞分泌 IL-2 活性的影响

与对照组比较, 模型组 3H-TdR 掺入量 (cpm) 显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 紫柳素组 3H-TdR 掺入量 (cpm) 显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而紫柳素组与他克莫司组相比, 3H-TdR 掺入量 (cpm) 无统计学意义。说明紫柳素对白癜风小鼠体液免疫具有明显抑制作用, 且紫柳素具有与他克莫司相似的作用效果, 见图 2。

2.6 紫柳素对莫诺苯宗诱导小鼠 B 淋巴细胞表面 CD19 活性的影响

与对照组比较, 模型组 CD19 荧光强度显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 紫柳素组 CD19 荧光强度显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 显示其对 B 细胞活性具有显著抑



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 3 紫柳素对白癜风小鼠 B 淋巴细胞表面 CD19 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Effect of butin on activity of CD19 on spleen B lymphocyte surface antigen in vitiligo mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

制作用; 而紫柳素组与他克莫司组相比, CD19 荧光强度无统计学意义, 见图 3。

3 讨论

白癜风是一种临床常见的色素障碍性皮肤病,

以表皮黑素细胞丧失而产生皮肤脱色斑为主要特征。病因主要有自身免疫、神经源、黑素细胞自身破坏、生化异常、氧化应激、遗传等多种学说。目前多数学者认为自身免疫异常学说在其发病中占据重要地位^[8]。

他克莫司是目前临床常用的一种免疫抑制剂，可通过抑制钙调神经磷酸酶的活动，抑制 IL-2 的释放而抑制 T 淋巴细胞的作用。目前常用于肝、肾、心、肺、肠等器官移植术后抗排斥^[9]。有报道称，他克莫司在治疗特应性皮炎（AD）、系统性红斑狼疮（SLE）等自身免疫性疾病中也发挥着积极的作用^[10]。自从 2002 年，Smith 等^[11]首次报道 0.1% 他克莫司软膏可用于白癜风治疗以来，越来越多的研究开始着眼于通过免疫抑制作用治疗白癜风。

紫柳素是从菊科植物驱虫斑鸠菊的成熟果实中提取的一种黄酮类成分。紫柳素及其衍生物具有抑制免疫、促进黑色素合成的作用^[12-13]，然而具体机制仍不清楚。有报道称紫柳素及其衍生物能够抑制脾淋巴细胞增殖，抑制炎症细胞因子的释放^[3]。因此，本研究拟通过体内实验检测紫柳素对莫诺苯宗诱导白癜风小鼠体液免疫和细胞免疫的作用。

本研究观察了紫柳素以及阳性对照药他克莫司对莫诺苯宗诱导小鼠毛发脱色程度的影响。结果发现，他克莫司和紫柳素均能够显著改善白癜风小鼠的脱色发生率和表皮脱色面积，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。这表明紫柳素和他克莫司均能够改善莫诺苯宗所诱导的小鼠皮肤色素脱失，能有效缓解白癜风的发病进程。

为了探讨他克莫司和紫柳素改善小鼠皮肤色素脱失的分子机制，本研究分离了用药物治疗后的白癜风小鼠脾脏 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞，用 CFSE 法检测了这两种淋巴细胞的增殖情况。结果发现，与对照组比较，白癜风模型组小鼠脾脏淋巴细胞增殖水平显著升高，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；紫柳素和他克莫司均能显著抑制淋巴细胞增殖，差异有统计学意义。又采用 ELISA 检测了各组小鼠血清中 IgG、IgM、IgA 3 种抗体的水平，发现与对照组比较，白癜风模型组小鼠血清抗体水平均显著升高，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；紫柳素和他克莫司均能显著降低小鼠血清抗体的水平，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

最后，以 CTLL-2 作为依赖细胞株，采用 3H-TdR 掺入法测定了小鼠脾脏 T 淋巴细胞分泌

IL-2 的活性，采用流式细胞仪测定 B 细胞表面抗原 CD19 活性。结果显示白癜风模型小鼠脾脏 T 淋巴细胞分泌活性和 B 细胞表面抗原 CD19 的活性均显著增强，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。紫柳素和他克莫司均能明显抑制其活性，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。以上结果提示紫柳素和他克莫司均能够通过抑制白癜风小鼠体液免疫和细胞免疫的途径改善皮肤色素脱失。且紫柳素与他克莫司组的作用相比，无显著差异，这表明紫柳素的免疫抑制作用与他克莫司相似。

本研究旨在探讨紫柳素通过免疫抑制作用改善白癜风小鼠色素脱失的效果和分子机制。紫柳素一方面可以抑制由白癜风引起的小鼠脾脏 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖，另一方面还能抑制 T 淋巴细胞 IL-2 的分泌活性和 B 淋巴细胞表面 CD19 抗原的活性，从而通过其免疫抑制作用改善白癜风小鼠表皮色素脱失。然而，目前紫柳素对机体免疫系统的作用以及对色素代谢及色素性皮肤病治疗的具体机制尚未完全阐明，仍需进一步的探究。

参考文献

- [1] Boniface K, Seneschal J, Picardo M, *et al.* Vitiligo: focus on clinical aspects, immunopathogenesis, and therapy [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 54(1): 52-67.
- [2] 尚 靖, 徐建国, 于鲁海, 等. 紫柳素及其衍生物在制备色素代谢疾病药物的用途 [P]. 中国: 1778294A, 2006-05-31.
- [3] 贾海盼, 吕金鹏, 张 茵, 等. 紫柳素类衍生物的合成及其体外免疫活性的评价 [J]. *中南药学*, 2013, 11(5): 321-327.
- [4] 祝逸平, 金 嵘, 王遂泉, 等. 黄芩苷对白癜风小鼠模型的作用机制研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(1): 27-32.
- [5] 李 情, 祝逸平, 许爱娥. 茶多酚、吡美莫司、他克莫司外用对莫诺苯宗诱导白癜风样模型小鼠的疗效比较 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2015, 48(1): 41-44.
- [6] Harris J E, Harris T H, Weninger W, *et al.* A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN- γ for autoreactive CD8+ T-cell accumulation in the skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(7): 1869-1876.
- [7] 邓瑞春, 周 勇, 徐建国, 等. 驱虫斑鸠菊对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2002, 18(B06): 13-16.
- [8] Richmond J M, Frisoli M L, Harris J E. Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(6):676-682.

- [9] Prytuła A, Gelder T. Clinical aspects of tacrolimus use in paediatric renal transplant recipients [J]. *Pediatr Nephrol*, 2018, 34(1): 31-43.
- [10] Ito A, Okada Y, Hashita T, *et al.* Sex differences in the blood concentration of tacrolimus in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients with CYP3A5*3/*3 [J]. *Biochem Genet*, 2017, 55(3): 268-277.
- [11] Smith D A, Tofte S J, Hanifin J M. Repigmentation of vitiligo with topical tacrolimus [J]. *Dermatol Basel Switz*, 2002, 205(3): 301-303.
- [12] Zhong H, Zhou J, An X H, *et al.* Natural product-based design, synthesis and biological evaluation of 2', 3, 4, 4'-tetrahydrochalcone analogues as antiviral agents [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 87:523-533.
- [13] Liang Y K, Yue Z Z, Li J X, *et al.* Natural product-based design, synthesis and biological evaluation of anthra[2, 1-d]thiazole-6, 11-dione derivatives from rhein as novel antitumour agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 84: 505-515.