

· 论 著 ·

两种中药方剂治疗系统性红斑狼疮的免疫机制的初步研究*

蒋 震,刁庆春[△]

(重庆市第一人民医院皮肤科 400011)

摘要:目的 探讨中药方 1 和中药方 2 对系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血单个核细胞(PBMC)的 IFN- γ 、IL-6、IL-10 及血清可溶性凋亡相关因子(sFas)水平的影响及意义。方法 根据血清药理学制备含药大鼠的血清,用密度离心法分离 SLE 患者 PBMC,在药物干预下培养 48 h,用 ELISA 法检测上清液中 IFN- γ 、IL-6、IL-10、sFas 水平。结果 与空白对照组比较,中药方 1 组 PBMC 的 IL-10 水平升高,sFas 水平降低。中药方 2 组 PBMC 的各指标无差异。结论 中药方 1 能使体外培养的 SLE 进行期患者 PBMC 的 IL-10 升高,sFas 降低。

关键词:中药方剂;系统性红斑狼疮;外周血单个核细胞; γ 干扰素;白介素 6;白介素 10;可溶性 Fas

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.022

中图分类号:R289;R593.241

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3205-02

Preliminary study on immunologic mechanism of two kinds of traditional chinese medicine treatment for patients with SLE*

JIANG Zhen, DIAO Qing-chun[△]

(Department of Dermatology, The First People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400011, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of two lupus recipes to IFN- γ , IL-6, IL-10 and sFas in PBMC of patients with SLE. **Methods** PBMC of patients with SLE were isolated and incubated for 48 hours with the serum which were made by two different lupus recipes of traditional chinese medicine by serum pharmacology. The IFN- γ , IL-6, IL-10, sFas secretion were measured in the supernatant by ELISA. **Results** By comparing the level of control group, the level of IL-10 in lupus recipe 1 group are higher, the level of sFas in lupus recipe 1 group are lower. By comparing the level of control group, the level of IFN- γ , IL-6, IL-10 and sFas in lupus recipe 2 are no differences. **Conclusion** Lupus recipe 1 can probably increase production of IL-10, and decrease production of sFas in PBMC.

Key words: traditional chinese medicine; SLE; PBMC; IFN- γ ; IL-6; IL-10; sFas

系统性红斑狼疮(SLE)是多因素性自身免疫性疾病,进行免疫学方面的治疗研究是目前的重要研究方向。多数学者认为淋巴细胞凋亡失衡是 SLE 发病的核心。本研究针对 SLE 进行期和缓解期提出两种中药方剂,研究两种方剂对 SLE 患者外周血单个核细胞(PBMC)部分凋亡相关因子的影响,初步探讨中医药治疗 SLE 的免疫学机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院门诊及住院部收治的 SLE 患者,诊断经临床及辅助检查证实,符合美国风湿病学会 1997 年制定的 SLE 诊断标准^[1]。均已使用糖皮质激素,但未使用免疫抑制剂。按 SLEDAI 评分标准^[2]: >9 分为进行期。进行期患者年龄 17~39 岁,病程 2 个月至 15 年,予泼尼松 15~60 mg/d。缓解期患者年龄 15~49 岁,病程 14 d 至 20 年,予泼尼松 5~40 mg/d,其他资料见表 1。

1.2 实验动物和试剂 1.5 月龄 SD 雄性大鼠 30 只(重庆大坪医院动物实验中心),体质量(200 \pm 10)g。淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司)及人 IFN- γ 、IL-6、IL-10、血清可溶性凋亡相关因子(sFas)ELISA 试剂盒(南京凯基生物公司)等。

1.3 方法

1.3.1 中药制备 中药方 1(生药共计 195 g):水牛角、黄芩、生地、丹皮、紫草、白花蛇舌草、半枝莲、忍冬藤、防风、秦艽、威灵仙、鸡血藤、甘草。中药方 2(生药共计 270 g):熟地黄、山茱萸、山药、北沙参、麦冬、玄参、生地黄、双花、丹皮、丹参、益母草、丝瓜络、菟丝子、白芍、党参、甘草。两组方剂各 2 副,煎煮浓缩至 200 mL,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 含药动物血清制备 将 30 只大鼠随机分为 5 组(空白对照组 10 只,其他各组 5 只),每天灌胃 1 次,中药方 1 组予 21.42 g/kg(按生药重量计算),中药方 2 组予 28.35 g/kg,泼尼松 1 组予 12.00 mg/kg,泼尼松 2 组予 6.00 mg/kg,空白对照组予生理盐水 2.50 mL,均用双蒸水调整至 2.50 mL。灌胃 7 d 后采血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.3.3 分离培养 PBMC 取 SLE 患者晨起静脉血 4 mL,用密度离心法分离 PBMC。用 RPMI1640 培养液调整 PBMC 至 1×10^6 /mL。每组取细胞悬液 1 mL,加入 0.1 mL 对应的含药大鼠血清,培养 48 h。将培养物离心,取上清液用 ELISA 法检测 IFN- γ 、IL-6、IL-10、sFas 等。

表 1 SLE 患者一般资料

时间	n	平均年龄(岁)	平均病程(年)	SLEDAI 平均得分(分)	泼尼松平均用量(mg)	泼尼松平均使用时间(年)
进行期	7	31.7	1.75	12.15	46.23	0.67
缓解期	12	29.9	6.78	5.42	25.61	5.12

* 基金项目:重庆市卫生局课题(2204-B-16,2007-1-7)。 [△] 通讯作者,E-mail: qchdiao@vip.sina.com。

表 2 SLE 患者各检测指标水平 (pg/mL)

检测指标	中药方 1 组	泼尼松 1 组	中药方 2 组	泼尼松 2 组	空白对照组
IFN- γ	0.050 \pm 0.006	0.049 \pm 0.004	0.045 \pm 0.006	0.052 \pm 0.006	0.049 \pm 0.009
IL-6	11.362 \pm 4.773	15.747 \pm 13.783 ^b	10.679 \pm 6.924	13.464 \pm 11.534	9.638 \pm 7.006
IL-10	43.362 \pm 34.773 ^a	55.747 \pm 43.783 ^b	10.679 \pm 6.924	13.464 \pm 11.534	9.638 \pm 7.006
sFas	199.500 \pm 6.379 ^a	202.000 \pm 8.414	209.167 \pm 7.859	213.667 \pm 12.832	214.500 \pm 9.649

^a: $P < 0.05$, 与泼尼松 1 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 配伍设计采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

见表 2。

3 讨 论

中医认为 SLE 进行期属于热毒炽盛、风湿内蕴证。症见自觉内热, 面部蝴蝶形红斑, 光敏感, 或面红充血, 或暗红斑, 口渴多饮并喜冷饮, 时有咽干咽痛、目赤眼涩、关节疼痛、心烦急躁、少眠多梦等。中药方 1 中水牛角为清热凉血的要药, 辅之以生地黄凉血, 合用丹皮凉血而不留瘀; 紫草凉血活血, 合用清解血分毒热的白花蛇舌草、半枝莲清热解毒; 防风、秦艽、威灵仙祛风除湿; 黄芩解毒清肺热, 泄皮毛之邪; 忍冬藤清热解毒通络, 鸡血藤养血通络, 二者合用法邪而不伤正; 甘草解毒调和众药。药理学认为方中药物具有兴奋垂体-肾上腺皮质系统(水牛角), 对抗糖皮质激素对垂体-肾上腺的抑制(生地), 升高外周 T 淋巴细胞、巨噬细胞、NK 细胞(水牛角、黄芩、生地黄、白花蛇草、鸡血藤、丹皮、甘草), 增强 LAK 淋巴因子活化杀伤细胞(鸡血藤), 抑制体液免疫(甘草), 抑制胸腺增生(忍冬藤), 抗炎、抗过敏(紫草、防风、秦艽)等作用。

SLE 缓解期属于肝肾阴虚、气虚血淤证。症见时有腰酸, 面部红斑, 头晕, 五心烦热, 或长期低热, 自汗盗汗。中药方 2 用北沙参、麦冬、玄参、生地黄、熟地黄滋阴养血, 党参、山药、菟丝子、山茱萸健脾补肾, 使阴血生化有源; 久病成淤, 丹参、丹皮、益母草养血活血, 兼使众药滋而不腻; 双花、丝瓜络合用解毒通络; 甘草健脾和中, 兼能调和众药, 共奏滋阴养血、健脾补肾、解毒通络之功效。药理学认为方中药物有提高体液免疫、降低细胞免疫(北沙参、山茱萸), 增强细胞免疫、抑制体液免疫(甘草、生地), 抑制多种免疫细胞因子产生(丹参), 促进细胞因子的产生(双花), 提高巨噬细胞功能(北沙参、熟地黄), 增强非特异免疫(北沙参、熟地黄、双花、菟丝子), 抑制 LAK(山茱萸)等作用。

IFN- γ 与 SLE 活动性的相关性报道尚存在争论, 曾惠琼等^[3]认为 IFN- γ 与 SLE 活动性指数(SLEDAI)评分和 SLE 疾病活动性呈正相关。其他研究则认为只有少部分的 SLE 患者 IFN- γ 升高, 其他患者的 IFN- γ 无变化, 这可能与 IFN- γ 抗体存在及诱导基因的多态性有关^[4]。本研究发现, 中药方 1、2 组 IFN- γ 与对照组之间均无差异。由于机体对 IFN- γ 存在多靶点调节作用, 而本研究只是体外分离培养了 PBMC, 因此还不能确定中药方 1、2 对 IFN- γ 是否有调节作用。但 IFN- γ 的升高与 SLE 肾脏损害密切相关^[5], 中药方 1、2 均未使 IFN- γ 升高, 推测二者均不会加重 SLE 肾脏的损害。

IL-6 是一种 B 细胞刺激因子, 可以刺激 PBMC 产生抗 dsDNA, 抗 dsDNA 又刺激 PBMC 分泌 IL-6, 两者形成一种恶性循环, 导致病情进展迅速, 与疾病活动度呈正相关^[6]。本研究发现, 进行期和缓解期泼尼松组 IL-6 均高于对照组, 与伍丽等^[7]的研究结果不同。有研究证明, IL-6 升高与幽门螺杆菌感染、消化道溃疡、高血糖、骨质疏松均有密切联系, 这些恰好

也是糖皮质激素的不良反应, 本实验发现的 IL-6 异常升高是否与糖皮质激素的不良反应有关, 值得进一步探讨。中药方 1、2 组的 IL-6 与对照无差异, 提示中药方 1、2 不易产生相应的不良反应。

IL-10 同时具有抗炎和致炎作用, 抑制参与炎症过程的大多数介质的生成, 抑制细胞免疫过程, 抑制单核巨噬细胞, 减轻慢性炎症过程中正常组织的破坏。SLE 患者的 IL-10 高于正常人, Yin 等^[8]认为 IL-10 通过下调致病性 Th1 类因子的反应性对淋巴细胞起保护作用, 王静等^[9]发现在治疗 SLE 的同时会使 IL-10 升高, 提示 IL-10 可能具有有益作用。有研究发现, 用抗 IL-10 单克隆抗体治疗 NZB/WF1 小鼠(自发性肾小球肾炎小鼠), 出生后立即给予治疗对肾有保护作用, 而出生 4 周再进行治疗则加重病情^[10], 提示在疾病的不同时期, IL-10 的作用可能完全相反。本研究发现, 泼尼松 1 组大于中药方 1 组大于空白对照组, 推测 IL-10 可能是作为 SLE 患者体内的“有益”因子反应性升高, 在进行期主要发挥其抗炎、保护机体的作用。中药方 1 和激素均可通过提高 IL-10 抑制体内炎症反应, 而中药方 1 组患者 IL-10 高于泼尼松 1 组, 提示中药方 1 抑制进行期炎症反应的作用强于泼尼松。中药方 2 组及泼尼松 2 组对缓解期 IL-10 无明显调节作用。

SLE 患者 Fas 基因缺失 63 个碱基, 形成 Fas 蛋白的可溶性形式 sFas。sFas 与 Fas 竞争结合 FasL, 但不转运凋亡信号, 抑制 Fas/FasL 介导的细胞凋亡, 产生自身抗体和释放炎症细胞因子。有研究显示, SLE 血中 sFas 升高, 与疾病活动性、SLEDAI 等呈正相关, 且多为进行期^[11-12]。本研究发现, 中药方 1 组 sFas 较空白对照组降低, 中药方 2 组、泼尼松 2 组与空白对照无明显差异, 从侧面反映 sFas 与进行期关系更为密切, 推测中药方 1 能降低 sFas, 减少自身抗体和炎症因子的产生, 对稳定进行期病情起到一定作用。

中药方 1 以清热、祛风湿为主, 药理学证明中药方 1 大多数药物均有增强细胞免疫, 特别是增强 T 细胞免疫的作用。中药方 2 以养阴、滋补为主, 药理学证明其部分药物均有增强体液免疫、抑制细胞免疫作用, 另一部分也有增强细胞免疫、抑制体液免疫作用。本研究发现中药方 1 对 SLE 进行期的 IL-10、sFas 有影响, 而中药方 2 各项指标均无差异, 从某方面证明了中、西医的相通之处, 推测在 SLE 进行期应增强 T 细胞功能, 抑制体液免疫, 抑制组织炎症; SLE 缓解期应维持免疫的平衡, 抑制组织炎症。

综上所述, 本研究推测中药方 1 通过升高 SLE 进行期患者体外培养 PBMC IL-10, 降低 sFas 水平, 控制 SLE 进行期并发的炎症反应, 对机体起到保护作用。中药方 2 对缓解期患者体外培养 PBMC 暂未发现明确调节作用。

参考文献:

- [1] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of SLE[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9):1725. (下转第 3209 页)

合蛋白:研究发现 KC 衰老的基因表达改变明显,首先,G 蛋白亚单位的活性和构成有变化,然后通过 PKC、PTK 等信号传导途径,最后影响 KC 的增殖和分化。本研究结果显示,随着年龄的增长 KC 中 G 蛋白逐渐高表达。

3.3 参与细胞骨架蛋白的构建 annexin A2:其参与细胞骨架的胞内信号传导,故在维持正常上皮细胞的形态及肿瘤发生中起着重要的作用^[5]。本研究结果表明随着年龄的增长 annexin A2 的表达降低,与以往的研究结果一致。ACTB:本研究发现在同一年龄段中非曝光部位高表达,而曝光部位低表达。Provost 等^[6]证实细胞骨架与细胞的收缩有关,研究显示 UVA 照射导致了肌动蛋白的解聚,细胞骨架的变形。在长期的 UVA 暴露中最终会导致细胞功能的衰竭,提示与光老化有关。并可能最终导致表皮肿瘤的形成。

3.4 调控细胞的生长、增殖、分化 谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases,GSTs):GSTA2 在曝光部位皮肤的表达量较低,可能与老化的表皮自我保护能力的降低、氧化和抗氧化的失衡密切相关。UVB 照射可导致 KC 产生大量的活性氧及自由基,损伤细胞的多种成分,引起细胞的凋亡、皮肤肿瘤的产生^[7]。

3.5 参与细胞的凋亡、免疫调控 P21(CDKN1A):有研究结果表明,UVB 照射正常人 KC 后,P21 蛋白表达增强。本研究结果显示 P21 既随年龄增长高表达,也在同一年龄段曝光组高表达。因此,p21 与自然老化及紫外线照射后引起的光老化可能都密切相关。HSP:本研究检测到两种 HSP27 和 HSP70,都在曝光部位高表达。Jean 等^[8]用 cDNA 芯片检测发现在给予单一剂量 UVA 后黑素细胞的 3 个编码应激反应蛋白(HSP70、HSP40、HSP86)的基因表达增加,表明单一剂量 UVA 即可诱导黑素细胞多种 HSP 基因表达增加,其中 HSP70 表现最为明显且水平持续增高。与本研究结果一致。

本研究建立了人表皮组织的双向电泳技术,获得了清晰、重复性高的双向电泳图谱,检测自然成长人不同年龄段、不同部位 KC 存在差异表达的蛋白;经分析和鉴定的 21 种蛋白质与皮肤的自然老化和(或)光老化关系密切,为进一步研究表皮细胞在光老化过程中的作用及分子机制奠定基础。但所鉴定

出的差异蛋白在皮肤自然老化和(或)光老化中的确切功能有待进一步验证。

参考文献:

- [1] Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing[J]. Mech Aging Dev,2002,123:801.
- [2] 李良平,魏莲枝,周建荣. 高低分化喉癌组织的二维电泳图谱的建立及质谱分析[J]. 重庆医学,2008,37(2):149.
- [3] Gartel A,Radhakrishnan S. Lost in transcription: p21 repression,mechanisms,and consequences[J]. Cancer Res,2005,65(10):3980.
- [4] Sano T,Kume T,Fujimura T,et al. Long-term alteration in the expression of keratins 6 and 16 in the epidermis of mice after chronic UVB exposure[J]. Arch Dermatol Res,2009,301(3):227.
- [5] Paweletz C,Ornstein D,Roth M,et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma[J]. Cancer Res,2000,60(22):6293.
- [6] Provost N,Moreau M,Leturque A,et al. Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2003,284:C51.
- [7] Black A,Gray J,Shakarjian M,et al. Distinct effects of ultraviolet B light on antioxidant expression in undifferentiated and differentiated mouse keratinocytes[J]. Carcinogenesis,2008,29(1):219.
- [8] Jean S,Bideau C,Bellon L,et al. The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365 nm UVA: study by cDNA arrays and real, time quantitative RT-PCR[J]. Biochim Biophys Acta,2001,1522:89.

(收稿日期:2010-06-13 修回日期:2010-07-13)

(上接第 3206 页)

- [2] 曾惠琼,叶志中,汪迅,等. SLE 患者外周血 IFN- γ 水平与疾病活动性的相关研究[J]. 现代免疫学杂志,2007,27(1):69.
- [3] Bombardier C,Gladman DD,Urowitz MB,et al. Derivation of the SLE;a disease activity index for lupus patients. The committee on Prognosis Studies in SLE [J]. Arthritis Rheum,1992,35(6):630.
- [4] Baechler EC,Batliwalla FM,Karypis G,et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(5):2610.
- [5] 陶金辉,李向培,厉小梅,等. IFN- γ 在 SLE 发病中的作用和临床意义[J]. 疾病控制杂志,2005,9(3):278.
- [6] Tackey E,Lipsky PE,Illei GG. Rationale for IL-6 blockade in SLE[J]. Lupus,2004,13(5):339.
- [7] 伍丽,马圣清,王光超. SLE 患者糖皮质激素治疗前后 IL-

2、sIL-2R 及 IL-6 水平的比较[J]. 临床皮肤科杂志,1995,1:8.

- [8] Yin Z,Bahtiyar G,Zhang N,et al. IL-10 regulates murine lupus[J]. J Immunol,2002,169(4):2148.
- [9] 王静,王俭勤,张筠,等. 1 α ,25-二羟维生素 D₃ 对患者 PB-MC 分泌的 IFN- α 和 IL-10 水平的影响[J]. 中国药物与临床,2004,4(9):677.
- [10] Ishida H,Muchamuel T,Sakaguchi S,et al. Continuous administration of anti-IL 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/WF1 mice[J]. J Exp Med,1994,179:305.
- [11] 韩晓枫,邹容良. 血清 sFas 和 sFasL 在系统性红斑狼疮诊治中的应用[J]. 临床检验杂志,2000,18(6):349.
- [12] 毛艳,王帆,胡文胜. 系统性红斑狼疮血 sFas 水平的变化及意义[J]. 中华中医药杂志,2002,26(3):154.

(收稿日期:2010-02-13 修回日期:2010-06-13)