

· 论 著 ·

## 两种中药方剂对 MRL/lpr 狼疮小鼠血浆中 B 淋巴细胞刺激因子和 IL-10 表达的影响\*

万 焰,刁庆春<sup>△</sup>,冯 林

(重庆市第一人民医院皮肤科 400011)

**摘要:**目的 探讨两种中药方剂对 MRL/lpr 狼疮小鼠血浆中的 B 淋巴细胞刺激因子(Blys)、IL-10 的影响,为中药及中西医结合治疗红斑狼疮提供实验和理论基础。方法 将 34 只 MRL/lpr 狼疮小鼠随机分为 6 组。A 组:中药方 1 组(清热凉血、祛风除湿方);B 组:中药方 2 组(养阴清热活血、滋补肝肾方);C 组:泼尼松组;D 组:中药方 1 加泼尼松组;E 组:中药方 2 加泼尼松组;F 组:空白对照组。ELISA 法测小鼠血浆中 Blys、IL-10 的含量。结果 各药物组治疗后的 Blys 水平均显著低于 F 组( $P < 0.01$ )。D、E 组的 Blys 水平与 A、B、C 组、激素组差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。A、B 组与 F 组比较,IL-10 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。D、E 组 IL-10 水平与 F 组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )、与 C 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 中药方剂与糖皮质激素均对 MRL/lpr 狼疮小鼠有治疗作用,中西医结合治疗疗效优于单纯使用中药或糖皮质激素,能显著降低 Blys 水平。

**关键词:**中药方剂;B 淋巴细胞刺激因子;IL-10

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.026

中图分类号:R289;R593.241

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3214-03

### Influence of two kinds of traditional chinese medicine in expressins of B lymphocyte stimulator and IL-10 in plasma of MRL/lpr mice\*

WAN Yan, DIAO Qing-chun<sup>△</sup>, FENG Lin

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

**Abstract:**Objective To investigate the effects and the mechanisms of two lupus recipes including lupus recipe 1(LR1)and lupus recipe 2(LR2)which was traditional Chinese medicine(TCM)to the MRL/lpr mice, to provide the data and basis for the treatment of systemic lupus erythematosus with traditional Chinese medicine and combined Chinese-Western medicine. **Methods** 34 MRL/lpr mice were randomly divided into 6 different groups: Group A was LR1. Group B was LR2. Group C was prednisone. Group D was LR1+prednisone. Group E was LR2+ prednisone. Group F was negative control. Serum Blys and IL-10 were measured by ELISA. **Results** The change of Blys: The level of Blys in group A, B, C, D and E were all lower than that of group F( $P < 0.01$ ). Compared with group A, B or C, the group D and E were all significant lower( $P < 0.01$ ). The change of IL-10: Compared with the group F, the group A and B were no significant difference( $P > 0.05$ ). Compared with the group D and E, the group F was significant difference ( $P < 0.01$ ), and group C was no difference( $P > 0.05$ ). **Conclusion** LR and prednisone should be effective to the treatment of MRL/lpr mice. Both of them can decrease the level of Blys. The TCM and glucocorticoid used in combination was superior to that used alone.

**Key words:** traditional chinese medicine; B lymphocyte stimulator; IL-10

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种典型的自身免疫性炎症性结缔组织疾病,临床上可表现为多系统、多脏器受累。作者针对 SLE 急性期和缓解期研制出两种中药方剂,临床应用取得了一定疗效,为探讨其作用机制,本实验通过对 MRL/lpr 狼疮小鼠相关指标进行检测,观察中药对它们的调节作用。本实验选用的 MRL/lpr 狼疮小鼠由 LG/J、AKR/J、C3H/D 及 C57BL/6 几种不同品系小鼠经过一系列复杂的杂交至第 12 代时产生,含有与细胞自发性程序性死亡有关的 Fas 基因隐性突变,出现淋巴细胞增生基因,导致 T 细胞增生,全身淋巴肿大,加速了自身免疫反应<sup>[1]</sup>。由于 MRL/lpr 狼疮小鼠的血清学与人类 SLE 极为相似,所以选择此狼疮模型鼠对评价 SLE 药物疗效及其对药物的筛选有重大意义,得出的结果应具有可靠性及真实性。

#### 1 材料与方

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 8~10 周龄雌性 MRL/lpr 狼疮小鼠 34 只,体质量 20~25 g,由上海斯莱克动物实验有限公司提供,第三军医大学大坪医院动物实验中心 25℃ 恒温室封闭 SPF 清洁级饲养。

**1.1.2 实验仪器** AIR TECH 超净工作台(苏净集团安泰公司),ELX800 型酶标仪(美国 BioTek 公司),超低温冰箱(日本三洋公司,-80℃)等。

**1.1.3 药品与试剂** 中药方 1(水牛角、生地、丹皮、紫草、白花蛇舌草、半枝莲、防风、秦艽、甘草等),中药方 2(北沙参、麦冬、丹皮、玄参、益母草、丹参、双花、丝瓜络、生地、甘草等)分别配备中药 1 副,严格称量,加蒸馏水 600 mL 煎煮为中药液 400 mL,采用蒸馏法浓缩为 200 mL 药液,用高温蒸汽法灭菌后于 4℃ 保存备用。小鼠 Blys、IL-10 ELISA 试剂盒(北京四

正柏生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 给药方法 将 34 只 MRL/lpr 狼疮小鼠随机分为 6 组。A 组:中药方 1 组(6 只),灌胃中药方 1[25.35 g/(kg·d)];B 组:中药方 2 组(6 只),灌胃中药方 2[35.1 g/(kg·d)];C 组:泼尼松组(5 只),灌胃泼尼松混悬液[5 mg/(kg·d)];D 组:中药方 1 加泼尼松组(6 只):灌胃中药方 1[25.35 g/(kg·d)]和泼尼松混悬液[2.5 mg/(kg·d)];E 组:中药方 2 加泼尼松组(6 只),灌胃中药方 2[35.1g/(kg·d)]和泼尼松混悬液[2.5mg/(kg·d)];F 组:空白对照组(5 只),灌胃等量生理盐水,均调整药液体积至 0.5 mL,连续 30 d 灌胃。实验期间剔除 A、B、D、E 组死亡小鼠各 1 只,于第 31 天取材。

1.2.2 检测方法 ELISA 法检测 Blys、IL-10,按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 检测 Blys 结果 见表 1。

表 1 各组 Blys 浓度水平的比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	鼠 1	鼠 2	鼠 3	鼠 4	鼠 5	$\bar{x} \pm s$
A 组	1.034	0.920	0.038	0.418	0.495	0.501±0.272#★
B 组	0.442	0.413	0.079	0.217	0.085	0.259±0.126#★
C 组	0.972	0.859	0.859	0.859	0.775	0.8648±0.070#
D 组	0.068	0.010	0.254	0.116	0.128	0.115±0.091#☆
E 组	0.006	0.031	0.036	0.129	0.021	0.045±0.011#■
F 组	1.182	1.211	1.102	1.003	1.075	1.114±0.0836

# :  $P < 0.01$ , 与 F 组比较;★ :  $P > 0.05$ , 与 C 组比较;☆ :  $P < 0.01$ , 与 A 组比较;■ :  $P < 0.01$ , 与 B 组比较。

2.2 ELISA 检测 IL-10 结果 见表 2。

表 2 各组 IL-10 水平 (浓度 pg/mL) 的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	鼠 1	鼠 2	鼠 3	鼠 4	鼠 5	$\bar{x} \pm s$
A 组	5.445	25.141	13.155	1.991	3.447	17.835±15.792#
B 组	15.493	32.963	12.061	1.991	6.515	13.804±11.891#
C 组	22.616	0.901	2.337	1.032	1.859	5.377±3.681★
D 组	16.046	1.463	0.901	13.704	2.784	6.979±5.365★
E 组	0.931	7.993	0.936	2.123	0.378	2.4722±1.001★
F 组	2.784	26.741	20.083	25.312	17.571	18.498±9.548

# :  $P > 0.05$ , 与 F 组比较;★ :  $P < 0.01$ , 与 F 组比较。

3 讨论

现代医学认为 SLE 及狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)发病是多因素性的,在遗传素质、性激素、环境因素等相互作用下,使免疫活性细胞数量和功能失常,导致免疫功能紊乱,体内产生大量的自身抗体,引起免疫复合型(Ⅲ型)及细胞毒型(Ⅱ型)超敏反应,最终造成广泛的组织损伤和多系统的临床症状<sup>[2]</sup>。其病理形成机制为 B 淋巴细胞的多克隆活化及 T 淋巴细胞的功能异常。前期通过研究两种中药方剂治疗 SLE 的免疫机制,初步得出结论:中药方 1 能使体外培养的 SLE 进行期患者外周血单个细胞(PBMC)的 IL-10 水平升高,血清可溶性凋亡相关因子(sFas)水平降低。中药方 2 能使体外培养的

SLE 缓解期患者 PBMC 的凋亡率降低。

Blys 是 1999 年发现的肿瘤坏死因子(TNF)配体超家族新成员<sup>[3]</sup>。Blys 作为一种 B 淋巴细胞共刺激因子,参与了 B 细胞的增殖和分化,在体液免疫中亦具有重要的作用。而其在体内的过量表达又与自身免疫性疾病,特别是与 SLE 的发病关系密切。SLE 患者血浆或血清的 Blys 水平较空白对照组显著升高,并且循环中的 Blys 生物学活性较对照组显著增强<sup>[4]</sup>。动态研究显示,Blys 水平的变化与血清抗 dsDNA 抗体水平变化一致;经大剂量皮质类固醇激素冲击治疗后,其血清中 Blys 水平明显下降,随着激素的递减,血清中 Blys 水平逐渐回升<sup>[5-6]</sup>。Blys 转基因小鼠 Blys 过度表达与 SLE 样表现有明显相关性;SLE 易感小鼠在疾病早期即出现循环 Blys 水平升高;Blys 拮抗剂可以延缓疾病进程、提高生存率<sup>[7]</sup>。动物模型研究均证实 Blys 在 SLE 的发生发展中具有重要作用。因此,从 1999 年 Blys 被发现以后,已有数家世界知名的生物技术公司着手进行 Blys 及其可溶性受体和单克隆抗体的研究开发<sup>[8-9]</sup>。目前国内对于中医药治疗 SLE 的作用机制方面研究尚未有中药对 Blys 作用的相关报道,故鉴于 Blys 在发病机制中的重要性及抗 Blys 抗体的治疗作用,本研究选定其作为一个检测指标。本实验发现,D、E 组的 Blys 均低于 A、B、C 组,提示中西医结合治疗可更好的降低 Blys 水平,与目前开展的生物疗法相比,中药可显著降低治疗成本,因此本研究初步为 SLE 以及狼疮性肾炎的治疗研究提供了新的实验依据,但尚需进行进一步深入细致的研究。

IL-10 是一个多效性细胞因子,具有免疫刺激和免疫抑制双重作用,其免疫刺激作用主要是提高 B 细胞的存活率,促进 B 细胞的增殖、MHC-II 类抗原表达以及抗体的分泌。IL-10 同时具有抗炎和致炎作用:一方面,可以抑制参与炎症过程的大多数介质的生成,同时上调抑炎分子的表达,下调单核/巨噬细胞表达,主要组织相容性复合体 MHC-I 类分子以及细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、CD80 和 CD86 等辅助刺激分子,抑制其抗原呈递作用,IL-10 阻止树突状细胞分化为成熟高效的抗原呈递细胞(APC),影响 IL-12 的分泌,使幼稚 T 细胞不能转化为成熟 Th1 细胞从而抑制细胞免疫过程,IL-10 还能抑制单核/巨噬细胞生成明胶酶和胶原酶,促进其合成金属蛋白酶抑制剂,以此减轻慢性炎症过程中正常组织的大量破坏<sup>[10-11]</sup>。另一方面,IL-10 对于 CD8<sup>+</sup>T 细胞具有正相调节作用,诱导其增殖、活化和细胞毒作用,刺激前 B 细胞和成熟 B 细胞的增殖和分化,增加 MHC-II 类分子的表达以及免疫球蛋白的分泌和类别转换<sup>[12-13]</sup>。Yin 等<sup>[14]</sup>研究发现 MRL/lpr 小鼠的细胞免疫和炎症反应不能被 IL-10 抑制,可能是由于其信号转导过程中的缺陷所致,提示 IL-10 在 SLE 疾病早期可能是一种保护性因子。说明在疾病的不同时期,IL-10 的作用可能完全相反,这和中医的辨证施治有一定的相似之处。目前观点趋向于 IL-10 在疾病形成早期作为一种保护性因子,发挥抗炎作用,但疾病形成后,它参与炎症损伤,成为致病因子。实验中发现 A、B 组与 F 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与文献报道一致,本实验结果说明其确实促进了疾病的发展。并且与此前研究推测的“中药方 1 中 IL-10 的水平升高可能是作为 SLE 患者体内的”有益“因子拮抗高凋亡率、强炎症而反应性升高,其在 SLE 进行期主要发挥抗炎的作用”较一致。A、E 组与 F 组比较,IL-10 水平差异有统计学意义( $P < 0.01$ )、与 C 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。综上所述,单纯用中药治疗,虽然早期 IL-10 升高,对其有保护作用,但随着疾病的发展,如果

IL-10 水平一直不降,将会转为促进疾病的发展与加剧;如果中西医结合治疗,一方面可以使 IL-10 水平在适当的时候减低,另一方面在提高疗效的同时,能有效地减少激素的不良反应。关于 IL-10 的研究目前仍存在争议,尚需进一步进行深入研究,目前国内有关于中药与 IL-10 水平的高低与 SLE 中医辨证分型关系的研究,发现对其含量的测定与 SLE 的诊断与辨证有一定参考价值<sup>[15]</sup>,但尚无动态水平的观察,考虑如在临床疗效观察中进行连续的不同时相的 IL-10 水平测定,观察其与用中药治疗、中西医结合治疗与病情变化的关系等,可能才能更好地评价中药的疗效。

通过以上分析,本研究从细胞分子水平进一步深入分析相关细胞因子在中药治疗 SLE 中的变化及意义,不仅可为今后系统研究中中药治疗 SLE 的免疫学机制提供参考,也可为临床进行针对性治疗提供依据。

#### 参考文献:

- [1] Santiago-Raber ML, Laporte C, Reininger L, et al. Genetic basis of murine lupus[J]. *Autoimmun Rev*, 2004, 3: 33.
- [2] Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation[J]. *Immunity*, 2008, 28(1): 18.
- [3] Stohl W. BlyS fulness does not equal bliss fulness in systemic lupus erythematosus: a therapeutic role for BlyS antagonists[J]. *Curr Dir Autoimmun*, 2005, 8: 289.
- [4] Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(6): 1313.
- [5] Gavin AL, Ait-Azzouzene D, Ware CF, et al. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and bio presentation of the B cell survival cytokine, BAFF [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38220.
- [6] 郭建晖, 鞠少卿, 臧红兵. 系统性红斑狼疮患者血清 B 淋巴细胞刺激因子的水平研究[J]. *检验医学与临床*, 2007,

4(7): 609.

- [7] Schmidt MR, Appel MC, Giassi LJ, et al. Human BlyS facilitates engraftment of human PBL derived B cells in immunodeficient mice[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): 1234.
- [8] Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(12): 3475.
- [9] 周丽春, 郝飞. 系统性红斑狼疮的生物制剂治疗进展[J]. *重庆医学*, 2009, 38(3): 345.
- [10] Sigal LH. Basic science for the clinician 42; handling the corpses: apoptosis, necrosis, nucleosomes and (quite possibly) the immunopathogenesis of SLE[J]. *J Clin Rheumatol*, 2007, 13(1): 44.
- [11] 吴凯, 韩日成, 张家明, 等. 系统性红斑狼疮患者血清中 IL-18, IL-10 和 IFN- $\gamma$  的变化 [J]. *海南医学*, 2007, 13(2): 120.
- [12] Zhang GF, Zhang X, Dong GF. Combined mesenchymal stem cells and allogenic bone marrow transplantation in treatment of MRL/lpr mice [J]. *Zhonghua Neike Zazhi*, 2008, 47(9): 754.
- [13] Csiszar A, Nagy G, Gergely P, et al. Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(3): 464.
- [14] Yin Z, Bahtiyar G, Zhang N, et al. IL-10 regulates murine lupus [J]. *J Immunol*, 2002, 169(4): 2148.
- [15] 袁娜, 荣大奇. 系统性红斑狼疮患者中医辨证分型与外周血 IL-10 的相关性研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2008, 24(1): 58.

(收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-06-13)

(上接第 3213 页)

- [3] Levitt NC, Hickson ID. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity [J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8: 179.
- [4] BrashD E, Ziegler A, Jonason A, et al. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1996, 1: 136.
- [5] Karlne G, Isabelle P, Nathalie P, et al. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1, and TNF-recapitulates some features of Psoriasis [J]. *J Immunol*, 2010, 184: 5263.
- [6] Birgit Poppelmann, Kerstin Klimmek, Elwira Strozyk, et al. NF- $\kappa$ B dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 15635.
- [7] Rivas J. M, Ullrich SE. The role of IL-4, IL-10, and TNF- $\alpha$  in the immune suppression induced by ultraviolet radiation [J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 56: 769.
- [8] Abu-Yousif AO, Smith KA, Getsios S, et al. Enhancement

of UVB-Induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 3057.

- [9] Shannon RS, Jorien B, Nihal AM. Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes [J]. *J Cancer Ther*, 2006, 5: 418.
- [10] Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, 21(4): 195.
- [11] 陈向齐, 刘向农, 牛高祥. 中波紫外线对人永生角质形成细胞株凋亡和死亡的影响 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2008, 24(2): 118.
- [12] Skiba B, Neill B, Piva TJ. Gene expression profile of TNF- $\alpha$ , TACE, furin, IL-1 $\beta$  and matrilysin in UVA and UVB-irradiated HaCat cells [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, 21(4): 173.

(收稿日期: 2010-05-13 修回日期: 2010-06-15)