

· 基础研究 ·

EsA 对 BXSB 狼疮性肾炎小鼠作用观察*

马华林¹, 张祥贵², 张欣洲^{1△}, 徐莹³

(1. 暨南大学第二临床医学院/深圳市人民医院肾内科, 广东深圳 518020; 2. 遵义医学院第五附属医院肾内科, 广东珠海 519100; 3. 广东省佛山市禅城区中心医院康复科 528031)

摘要:目的 观察商陆皂苷甲(EsA)对 BXSB 小鼠狼疮性肾炎(LN)的治疗作用及 IL-6 及 TNF- α 分泌的影响,探讨 EsA 对 LN 的可能作用机制。方法 12 周龄雄性 BXSB 小鼠 24 只,随机分成模型对照组、EsA 低剂量治疗组和 EsA 高剂量治疗组。腹腔注射每日 1 次,4 周后达治疗终点。结果 EsA 能显著降低 BXSB 小鼠尿蛋白/尿肌酐比值,改善 BXSB 肾脏病变。结论 EsA 对 BXSB 狼疮性肾炎小鼠具有显著治疗作用,抑制 IL-6 及 TNF- α 分泌产生可能参与 EsA 抗炎机制。

关键词:商陆皂苷甲;狼疮肾炎;白细胞介素 6;肿瘤坏死因子 α ;BXSB 小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2954-02

Effect of Esculentoside A on therapeutic and cytokines secretion of lupus nephritis in BXSB mice*

Ma Hualin¹, Zhang Xiangui², Zhang Xinzhou^{1△}, Xu ying³

(1. Department of Nephrology, Shenzhen People's Hospital, The Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 2. Department of Nephrology, The Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519100, China;

3. Department of Rehabilitation, Chanchen District Central Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 528031, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Esculentoside A (EsA) on therapeutic and cytokines secretion in BXSB mice and the possible mechanism of EsA in treating lupus nephritis(LN). **Methods** 24 male BXSB mice at the age of 12 weeks were randomly divided into 3 groups: untreated model group, EsA(5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹)-treated model group and EsA(20mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹)-treated model group. All mice at the age of 16 weeks were killed to obtain samples. **Results** EsA administration markedly alleviated urine protein/urine creatinine, improved pathological kidney damage and reduced the serum IL-6 and TNF- α level. **Conclusion** EsA may play significant roles in the treatment of BXSB mice through modulation on inflammatory cytokines.

Key words: EsA; lupus nephritis; interleukin-6; tumor necrosis factor- α ; BXSB mice

商陆皂苷甲(esculentoside a, EsA)是从商陆块根中提取的一种三萜类皂苷。体内外实验已证明 EsA 对炎性细胞因子的释放有显著的抑制作用,从而对各种急慢性炎症均有明显的抗炎作用。本研究应用 BXSB 小鼠模型,将 EsA 制成注射剂,腹腔内注射治疗 BXSB 狼疮性肾炎(LN)小鼠,并测定血清细胞因子白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),初步探讨 EsA 对 BXSB 小鼠的治疗作用及其作用机制。

1 材料与方

1.1 药品与试剂 EsA 纯度大于 98%,购自西安文阳贸易有限公司(批号:65497076),用 RPMI-1640 培养液溶解。RPMI-1640 培养液购自 Genom 公司。尿蛋白、尿肌酐测定试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。

1.2 实验动物 北京大学免疫学教研室提供 12 周龄雄性 BXSB 小鼠共 24 只,体质量(22.8 \pm 3.1)g。

1.3 实验设计

1.3.1 实验动物分组及给药方案 小鼠 24 只随机分为成模型对照组、EsA 低剂量治疗组和 EsA 高剂量治疗组实验每组各 8 只。实验期间动物自由饮水、进食。每组小鼠分别根据以下干预方案进行给药,治疗 4 周达治疗终点。模型对照组:每只小鼠给予 RPMI-1640 培养液 0.2 mL 腹腔注射,每日 1 次,共 4 周。EsA 低剂量治疗组:每只小鼠给予 0.2 mL EsA 腹腔

注射 5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,每日 1 次,共 4 周。EsA 高剂量治疗组:每只小鼠给予 0.2 mL EsA 腹腔注射 20 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,每日 1 次,共 4 周。

1.3.2 标本采集与检测

1.3.2.1 尿标本 于治疗终点采用代谢笼收集尿液,采用双缩脉法测尿蛋白含量,分光光度计测定 540 nm 处吸光度,根据公式计算出尿蛋白含量。用二乙酰-胍法测定尿肌酐浓度,分光光度计测定 510 nm 处吸光度,根据公式计算出尿肌酐浓度。

1.3.2.2 血标本 乙醚麻醉后,通过摘取眼球收集血标本,1 500 r/min 离心 5 min,取血清行 IL-6 及 TNF- α 水平测定。血清 IL-6 及 TNF- α 测定采用 ELISA 试剂盒,检测步骤按说明书进行。

1.3.2.3 肾组织 处死小鼠后,取出部分肾组织,制成 4 μ m 厚石蜡切片,HE、PASM 染色后行光镜检查。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS16.0 统计软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EsA 对 BXSB 小鼠尿蛋白/尿肌酐比值的影响 模型对照组小鼠尿蛋白/尿肌酐比值明显高于 EsA 低剂量治疗组和 EsA 高剂量治疗组($P < 0.05$); EsA 低剂量治疗组和 EsA 高

剂量治疗组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠尿蛋白/尿肌酐比值和血肌酐浓度的比较 ($n=8$)

组别	尿蛋白/尿肌酐(mg/g)
模型对照组	17.09±4.88
EsA 低剂量治疗组	12.15±4.21*
EsA 高剂量治疗组	10.54±3.92*

*: $P < 0.05$, 与模型对照组比较。

2.2 EsA 对 BXSB 小鼠血清 TNF- α 浓度的影响 模型对照组血清 TNF- α 水平明显高于 EsA 低剂量治疗组 ($P < 0.05$) 和 EsA 高剂量治疗组 ($P < 0.01$); 与 EsA 低剂量治疗组比较, EsA 高剂量治疗组血清 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 EsA 对 BXSB 小鼠血清 IL-6 浓度的影响 模型对照组血清 IL-6 水平明显高于 EsA 低剂量治疗组 ($P < 0.05$) 和 EsA 高剂量治疗组 ($P < 0.01$); 与 EsA 低剂量治疗组比较, EsA 高剂量治疗组血清 IL-6 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	TNF- α 浓度	IL-6 浓度
模型对照组	144.36±13.49	43.44±7.62
EsA 低剂量治疗组	129.68±11.59*	30.06±6.54*
EsA 高剂量治疗组	115.67±13.48 Δ #	21.70±6.56 Δ #

*: $P < 0.05$, 与模型对照组比较; $\Delta P < 0.01$, #: $P < 0.05$, 与 EsA 低剂量治疗组比较。

2.4 肾脏病理光镜检查 在常规 HE 染色中, 各组小鼠均表现为肾小球内细胞的增生, 但组间比较差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。在 PASM 染色中, 治疗组 BXSB 小鼠肾组织病变明显减轻, 光镜下表现为肾小球毛细血管开放增多, 基底膜空泡变性, 肾小囊壁层上皮细胞增生均减轻, 而肾小管病变各组均不明显, 见彩插 II 图 1~6。

3 讨论

BXSB 小鼠是一种近年培育出的 LN 模型, 其发病非常接近人类。由于其 Y 染色体上携带有 Yaa 基因, 该基因能加速自身免疫反应, 故使得雄鼠较雌鼠发病早且病变更严重^[1-3]。雄性 BXSB 小鼠约 12 周龄开始发病, 到 20 周龄时大约 50% 死亡^[4], 因此, 作者选用 12 周龄的雄性 BXSB 小鼠为研究对象符合实验需要。

EsA 是中国商陆中含量最高的皂苷^[5]。有研究表明, EsA 对系膜增生性肾炎和膜性肾炎均有降尿蛋白、保护肾功能的作用^[6-7]。已有研究表明测定尿蛋白/尿肌酐比值评估尿蛋白不但具有较高灵敏度和准确性, 而且特异性亦强^[8-9]。这一比值应用还校正了各种因素引起的尿液浓度的变化, 比尿液的定时收集和定量测定更方便。本研究发现, 经治疗后小鼠尿蛋白/尿肌酐比值、肾脏病理学改变亦明显好转, 表明 EsA 具有治疗和缓解 LN 病情的作用。

近年来有研究^[10-11]表明 EsA 具有抑制淋巴细胞产生 IFN- α 、IL-1、IL-2、抑制巨噬细胞分泌 TNF 等炎性介质产生和分泌而发挥抗炎作用。TNF- α 不仅免疫调节作用, 在促发炎症及炎症维持过程中也有重要作用。鞠少卿^[12]的研究表明, SLE 患者血清及未经刺激的外周血单个核细胞 (PBMC) 培养上清液中, TNF- α 水平均高于常人, 且活动期升高更明显。董

妍君等^[13]研究发现, BXSB 小鼠 TNF- α 为 (151.17±32.31) pg/mL, 而同龄 C57BL/6J 雄性小鼠为 (55.01±6.98) pg/mL。本研究模型组 TNF- α 水平接近董妍君等的研究, 而各治疗组明显减少, 高剂量组更甚, 提示 EsA 可通过抑制 PBMC 对 TNF- α 的分泌, 进而减轻炎症反应阻止病程进展。EsA 下调 TNF- α 的机制可能是通过 EsA 的抗炎作用使 TNF- α 分泌减少, 达到下调 TNF- α 的作用。

IL-6 由多种细胞产生, 具有可影响 B 细胞的增殖、分化和诱导分泌免疫球蛋白的作用。正常人 B 细胞几乎不自发产生 IL-6, 而 SLE 患者可以自发地产生大量 IL-6^[14]。张学宁等^[15]研究指出, 在 SLE 患者血清中 IL-6 含量明显增加, 活动期 IL-6 增加更明显。而随着病情缓解, IL-6 水平也随之下降, 故可用于病情判断、疗效观察。本实验各治疗组对 IL-6 有明显的下调作用, EsA 高剂量尤为明显。EsA 降低 IL-6 的机制: (1) EsA 抑制 PBMC 自发分泌; (2) 通过 EsA 下调 TNF- α , 降低了 TNF- α 对 IL-6 mRNA 的作用, 使其转录和翻译下降, 从而降低 IL-6 水平。

参考文献:

- [1] Haywood ME, Rogers NJ, Rose SJ, et al. Dissection of BXSB lupus phenotype using mice congenic for chromosome 1 demonstrates that separate intervals direct different aspects of disease[J]. Immunol, 2004, 173(7): 4277-4285.
- [2] Hogarth MB, Slingsby JH, Allen PJ, et al. Multiple lupus susceptibility loci map to chromosome 1 in BXSB mice[J]. Immunol, 1998, 161(6): 2753-2761.
- [3] Fossati L, Iwamoto M, Merino R, et al. Selective enhancing effect of the Yaa gene on immune responses against self and foreign antigens[J]. Eur Immunol, 1995, 25(1): 166-173.
- [4] Cheung YH, Loh C, Pau E, et al. Insights into the genetic basis and immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus from the study of mouse models[J]. Semin Immunol, 2009, 21(6): 372-382.
- [5] 马杰. 商陆皂苷的化学及 2010 版《中国药典》商陆质量标准的修订研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.
- [6] 张克非, 张亮, 吴雄飞. 商陆皂苷甲治疗大鼠抗-Thy1.1 系膜增生性肾炎的实验研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(5): 662-664.
- [7] 张克非, 张亮, 吴雄飞. 商陆皂苷甲与地塞米松对系膜增生性肾炎模型疗效对比[J]. 中华中西医临床杂志, 2003, 3(6): 675-677.
- [8] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(3): 495-516.
- [9] Tait JF. Imaging of apoptosis[J]. J Nucl Med, 2008, 49(13): 1573-1576.
- [10] Xiao ZY, Zheng QY, Zhang JP, et al. Effect of esculentoside a on autoimmunity in mice and its possible mechanisms[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(7): 638-644.
- [11] Hu Z, Qiu L, Xiao Z, et al. Effects of esculentoside a on autoimmune syndrome induced by Campylobacter jejuni in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(1): 65-71.

比均较常温缺血组明显缩小,表明亚低温干预对脑缺血再灌注大鼠具有明显神经保护作用,与蔡斌等^[7]和刘昌云等^[8]的研究结果一致。

NGB 是德国科学家 Burmester 等^[9]研究发现的一种功能上类似于肌红蛋白的携氧球蛋白,它与氧有较高的亲和力,即使在血氧体积分数较低的环境下,NGB 也能成功携带氧跨越血脑脊液屏障,把氧转运到脑组织中,从而满足脑组织对氧的需求^[10]。研究发现只占全脑组织总蛋白含量 0.01% 的 NGB,无论离体或在体模型,其表达的增加都可以保护神经组织免受缺氧损伤,提示 NGB 具有脑保护作用^[11],但其机制并不十分明确,可能的机制主要包括以下几个方面:(1)促进氧向神经元线粒体的扩散或直接介导氧向线粒体的传递,促进三磷酸腺苷的产生,从而维持神经元的功能;(2)具有还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶的功能,该酶在三磷酸腺苷的生成中有重要作用,可增加细胞供能^[12]; (3)清除活性氧自由基和氮自由基^[13]; (4)作为信号转导中的调节子发挥作用。

本研究选取缺血侧海马 CA1 区为观察区域,结果显示,假手术组海马 CA1 区可见一定量 NGB 阳性表达,常温缺血组和亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区 NGB 阳性细胞数在再灌注 3 h 即高于假手术组,于再灌注 24 h 达高峰,较假手术组明显升高,以后逐渐下降,至再灌注 1 周恢复至假手术组水平。说明在缺血再灌注早期,缺血区脑组织 NGB 即合成增加,从而减轻了海马区缺氧性损伤,起到对神经元的保护作用。上述缺血侧海马 CA1 区 NGB 先升高后下降的表达趋势与赵斌^[14]报道的脑缺血再灌注损伤后海马区 NGB 表达规律一致,但 Shang 等^[15]认为脑缺血再灌注损伤后,海马区 NGB 的表达呈逐渐减少的趋势,这可能与采用动物模型和缺血程度的不同有关。

本研究还发现,常温缺血组和亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区阳性细胞数除再灌注 1 周外,其余各时间点均高于假手术组,差异有统计学意义。除再灌注 1 周外,亚低温缺血组缺血侧海马 CA1 区阳性细胞数均高于常温缺血组,差异有统计学意义。提示亚低温干预能促进脑缺血再灌注后 NGB 的表达。因此,亚低温的脑保护作用可能是通过促进 NGB 的表达,从而减少大鼠脑梗死灶体积,减轻神经功能缺损程度。

参考文献:

- [1] Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987, 7(6): 729-738.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without crani-ectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] 刘志超,李承晏,董红娟,等.亚低温对大鼠急性脑梗死后脑组织内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、EAA 及血浆 ET 变化的影响[J].

中华物理医学与康复杂志,2003,25(11):662-664.

- [4] 叶心国,余绍祖,李承晏.亚低温在大鼠脑缺血再灌注中的脑保护作用[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(3): 158-161.
- [5] Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, et al. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen[J]. *Stroke*, 2003, 34(6): 1526-1532.
- [6] 陶晓峰,刘畅,华正宇.亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 HIF-1 α 及凋亡相关蛋白变化的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2010, 27(10): 902-905.
- [7] 蔡斌,林毅,李智文,等.亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 MMP-9 表达和细胞凋亡的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(4): 414-416.
- [8] 刘昌云,陈龙飞,许国英,等.亚低温对局灶性脑缺血-再灌注大鼠脑皮质脑源性神经营养因子表达及神经元凋亡的影响[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2005, 5(6): 398-403.
- [9] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407(6): 520-523.
- [10] Wang X, Liu J, Zhu H, et al. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2008, 39(6): 1869-1874.
- [11] Shao G, Gong KR, Li J, et al. Antihypoxic effects of neuroglobin in hypoxia-preconditioned mice and SH-SY5Y cells[J]. *Neurosignals*, 2009, 17(3): 196-202.
- [12] Liu J, Yu Z, Guo S, et al. Effects of neuroglobin overexpression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(2): 164-1170.
- [13] Lechaue C, Rezaei H, Celier C, et al. Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction[J]. *J Mol Biol*, 2009, 388(5): 968-977.
- [14] 赵斌.大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤后 NGB、p-ERK1/2 表达与变化的研究[D].泰安:泰山医学院, 2009.
- [15] Shang A, Zhou D, Wang L, et al. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults [J]. *Brain Res*, 2006, 1078(1): 219-226.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-04-23)

(上接第 2955 页)

- [12] 鞠少卿. TNF 基因多态性与 SLE[J]. *国外医学:临床生物化学与检验学分册*, 2002, 23(2): 71-73.
- [13] 董妍君,李卫东,屠呦呦,等.双氢青蒿素对 BXS 狼疮小鼠自身抗体产生、TNF- α 分泌及狼疮性肾炎病理改变的影响[J]. *中国中西医结合临床杂志*, 2003, 23(9): 676-678.

- [14] 陈顺乐. 系统性红斑狼疮[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004: 80-81.

- [15] 张学宁,沈秀芬,杨红英,等.系统性红斑狼疮患者血清 sIL-2R 和 IL-6 水平的变化[J]. *上海医学检验杂志*, 2001, 16(2): 93-95.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-22)