

益肾养阴合剂通过 CXCR4/STAT3 信号通路对 MRL/lpr 小鼠肾脏发挥保护作用

吴洋¹, 李东云², 张巍琼³, 吴松柏³

(1. 云南省中医医院, 昆明 650021; 2. 昆明市中医医院, 昆明 650041;
3. 云南中医学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**研究益肾养阴合剂对系统性红斑狼疮小鼠肾脏的保护作用并探讨其作用机制。**方法:**MRL/lpr 疾病模式小鼠饲养发病后,益肾养阴合剂灌胃给药($17.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),同时阳性药组用醋酸泼尼松灌胃给药($0.65 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),正常 C57 背景小鼠和实验 MRL/lpr 小鼠组灌胃同体积生理盐水,每天 2 次,连续给药 28 d,每 7 d 收集尿液,检测尿蛋白变化情况;第 29 天取材肾脏组织,免疫荧光染色检测免疫球蛋白 G(IgG)沉积情况;Raybiotech 抗体芯片检测 308 个细胞因子变化情况,酶联免疫吸附测定(ELISA)验证部分变化因子(小鼠肾脏组织与患者血清水平);蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Janus 激酶 2/信号转导和转录活化蛋白 3(JAK2/STAT3)信号的磷酸化水平、基质细胞衍生因子 1/趋化因子受体 4(SDF1/CXCR4)信号轴、辅助性 T 细胞 17(Th17)分泌因子白细胞介素-17(IL-17)的表达情况。**结果:**与 MRL/lpr 组比较,在中药和激素给药组,随着给药时间延长,尿蛋白含量逐渐降低,在第 4 周变化最为明显($P < 0.05$),在给药 28 d 后,益肾养阴合剂组与醋酸泼尼松组的肾脏 IgG 沉积均有减轻($P < 0.05$)。经 Raybiotech 抗体芯片筛查后发现,与 C57 正常小鼠,MRL/lpr 疾病小鼠的肾脏 SDF1, CXCR4 蛋白信号表达有显著增强($P < 0.01$);与 MRL/lpr 疾病小鼠比较,益肾养阴合剂组的小鼠肾脏 SDF1, CXCR4 蛋白信号表达显著降低($P < 0.01$),经大样本量 ELISA 实验验证后,SDF1/CXCR4 蛋白的抗体芯片结果可靠,进一步经 Western blot 实验检测发现,与正常 C57 小鼠比较,MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 JAK2/STAT3 信号通路被激活,其磷酸化蛋白表达增高($P < 0.05$),SDF1, CXCR4, IL-17 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与模型小鼠比较,给予中药和激素灌胃处理 28 d 后 JAK2, STAT3 的磷酸化水平明显降低($P < 0.05$),SDF1, CXCR4 蛋白表达下降($P < 0.05$),IL-17 的表达也有明显的减少($P < 0.05$)。**结论:**益肾养阴合剂可降低 MRL/lpr 模型小鼠的尿蛋白水平,其可通过抑制 JAK2/STAT3 与 SDF1/CXCR4 信号通路的激活,降低辅助性 T 细胞 17 的活性,减少 IL-17 的分泌,起到肾脏保护作用。

[关键词] 益肾养阴合剂; 狼疮肾炎; Janus 激酶 2/信号转导和转录活化蛋白 3 (JAK2/STAT3); 基质细胞衍生因子 1/趋化因子受体 4 (SDF1/CXCR4); 白细胞介素-17 (IL-17)

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0127-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180933

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1522.012.html>

[网络出版时间] 2018-02-15 14:54

Protective Effect of Yishen Yangyin Mixture on Lupus Nephritis in MRL/lpr Mice

WU Yang¹, LI Dong-yun², ZHANG Wei-qiong³, WU Song-bai³

(1. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Kunming 650021, China;
2. Kunming Municipal Hospital of TCM, Kunming 650041, China;
3. Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Yishen Yangyin mixture on lupus nephritis with systemic lupus erythematosus (SLE) and its molecular mechanism. **Method:** MRL/lpr model mice were given Yishen Yangyin mixture ($17.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) by gavage after the onset of disease, while the positive control group was

[收稿日期] 20171101(010)

[基金项目] 云南省医疗卫生单位内设研究机构项目(2014NS338);国家中医药管理局“十一五”中医痹病学重点学科项目

[第一作者] 吴洋,教授,主任医师,硕士生导师,从事中西医结合治疗系统性红斑狼疮研究,E-mail:455104220@qq.com

given prednisone by gavage ($0.65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Normal C57 background mice and MRL/lpr mice (experimental control group) were administered with normal saline, 2 times a day, for consecutively 28 days; urine was collected every 7 days to detect the urine protein changes. After twenty-eight day, immunofluorescence staining was used for detecting kidney deposition IgG. Raybiotech antibody arrays was used to detect the changes of 308 cytokines; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to confirm some changed factors (mouse kidney tissue and serum level of patient); Western blot was used to detect Janus kinase2/signal transduction and transcriptional activators (JAK2/STAT3) signal, stromal cell derived facto-1/chemokine receptor4 (SDF1/CXCR4) signal axis, expression of T helper 17 cells (TH17) cells secreted interleukin-17 (IL-17). **Result:** In the Yishen Yangyin mixture group and the prednisone group, with the extension of medication time, urine protein content decreased gradually, particularly in the fourth week ($P < 0.05$); 28 days later after administration, compared with the MRL/lpr group (experimental control group), the Yishen Yangyin mixture group and the prednisone group showed decrease in kidney IgG deposition ($P < 0.05$). According to Raybiotech antibody array screening, compared with normal C57 mice, the expression of kidney SDF1/CXCR4 signal in MRL/lpr mice was increased ($P < 0.01$). Compared with MRL/lpr mice, the expression of SDF1/CXCR4 signal in Yishen Yangyin mixture group was significantly decreased ($P < 0.01$). The results of SDF1/CXCR4 ELISA were consistent with the results of antibody array. Western blot assay showed that compared with normal C57 mice, the JAK2/STAT3 phosphorylation protein expression in kidney tissue of MRL/lpr mice was increased ($P < 0.05$); meanwhile, the SDF1, CXCR4, IL-17 protein expression were significantly increased ($P < 0.05$). When MRL/lpr mice was treated with Yishen Yangyin mixture and hormone by gavage for 28 days, compared with the MRL/lpr group, the phosphorylation level of JAK2, STAT3, the expression of SDF1, CXCR4 and the secretion of IL-17 significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yishen Yangyin mixture can reduce the urinary protein level of MRL/lpr mice, and can play a key role in renal protection by inhibiting activation of JAK2/STAT3 and SDF1/CXCR4 signaling pathway and decreasing the activity of T helper 17 cells and the secretion of IL-17.

[Key words] Yishen Yangyin mixture; lupus erythematosus; Janus kinase2/signal transduction and transcriptional activators (JAK2/STAT3); stromal cell derived facto-1/chemokine receptor4 (SDF1/CXCR4); interleukin-17 (IL-17)

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是自身免疫介导的疾病,能引起全身多系统的损伤,其中肾脏损伤及其并发症严重影响患者生存质量。免疫失衡是 SLE 发病的主要因素,增强调节性 T 细胞功能,可改善狼疮肾炎的患者症状^[1-2],单纯运用西药治疗常会导致免疫系统紊乱,而中药方刚好可以弥补这种不利^[3],益肾养阴合剂是根据云南省中医医院风湿科常见病种优化诊疗方案制定的协定方药,能较好的调节免疫功能且在云南省中医医院用于患者调理具有明显功效^[4]。本方对小鼠无明显毒性作用^[5],且在前期研究发现,生药量 $17.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药剂量可引起免疫 T 细胞活性增强,炎症因子表达降低^[6],但其具体作用的分子机制尚不明确。

目前对于狼疮肾炎的发病机制,主要论点有氧化应激增强、炎症反应增加以及免疫细胞功能紊乱,在其他的一些研究中,已证实信号转导和转录活化

蛋白 3 (STAT3) 信号通路参与了狼疮肾炎的发病过程^[7],有报道指出,在 SLE 的免疫失衡发生的过程中有检测到辅助性 T 细胞 17 的功能障碍^[8],但其具体的作用方式与机制尚不清楚。在本实验中,笔者使用 MRL/lpr 小鼠作为疾病模型小鼠,给予本方剂后进行了抗体芯片筛查,检测其显著变化因子,并与笔者的前期研究结合,进一步阐明了本方剂 (益肾养阴合剂) 减轻狼疮肾炎的作用机制。

1 材料

1.1 动物 6~8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 (MRL/lpr 背景小鼠), 20 只, 体质量 (22.0 ± 2.0) g。纯种 6~8 周 MRL/lpr 雌性小鼠, 50 只, 体质量 (23.0 ± 2.0) g。2 种小鼠均由南京大学-南京生物医药研究院提供, 合格证号 SCXK (苏) 2010-0001。饲养在昆明医科大学 SPF 级隔离饲养间, 温度 (23 ± 1) °C, 湿度 (55 ± 5) %, 12 h 循环光照, 给予清洁级无菌垫料、饲料和饮水, 让其自由摄食、饮水。实验规范严

格按照实验动物规范条例进行,并取得昆明医科大学实验动物中心伦理许可(编号 KY970831-m11)。动物适应性饲养 1 周后开始监测蛋白尿,继续饲养观察 2 周后开始给药处理[体质量约(29 ± 3) g]。

1.2 药物及试剂 本方剂组成:黄芪 30 g,党参 20 g,麦冬 20 g,五味子 10 g,女贞子 15 g,墨旱莲 15 g,熟地黄 15 g,山药 15 g,山茱萸 10 g,泽泻 10 g,牡丹皮 10 g,茯苓 15 g,丹参 15 g,白茅根 15 g,金樱子 10 g,甘草 5 g,共 230 g,所有药材均由云南中医药大学吴松柏教授鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范,云南省中医医院煎药房统一煎煮,制成益肾养阴合剂,4 ℃ 冰箱保存。醋酸泼尼松片(重庆科瑞制药,批号 H50020459)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司,批号 P0010);驴抗小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 抗体(美国 Thermo 公司,批号 R37115);小鼠抗体芯片,基质细胞衍生因子 1 (SDF1) 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国 Raybiotech 公司,批号分别为 AAM-BLM-308, ELM-SDF1a);趋化因子受体 4 (CXCR4) ELISA 试剂盒(美国 Cusabio 公司,批号 CSB-E12827m);SDF1 抗体,β-肌动蛋白(β-actin)抗体,p-Janus 激酶 2 (p-JAK2)抗体(美国 CST 公司,批号分别为 #3530, #4970, #3776);CXCR4 抗体,白细胞介素-17(IL-17)抗体,p-STAT3 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab74012, ab79056, ab76315);辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(Abmart 公司,批号 M21003)。

1.3 设备 MAX190 型全波长酶标仪(美国 Molecular Device 公司),CM1900 型冰冻切片机(德国 Leica 公司),ImageQuant LAS4000 型化学发光成像分析系统(美国 GE 公司),ChemiDoc XRS + 型化学发光仪(美国 Bio-Rad 公司),WH-986 型静音混匀仪(其林贝尔公司),D3024R 型高速冷冻离心机,SK-L180-E 型摇床(美国 Scilogex 公司),Mini-P3 蛋白电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 中药制生药 230 g,按照成人与小鼠体质量系数等比换算^[9],换算系数为 9.1。中药煎煮加水 800 mL,煎煮后得到中药汤剂 200 mL。计算后小鼠每次中药给药为 15 mL · kg⁻¹(生药量 1.15 g · mL⁻¹,换算小鼠给药量为 17.25 g · kg⁻¹),激素用量为 0.65 mg · kg⁻¹,加生理盐水制备混悬液。给药方式为灌胃给药。

2.2 动物分组与取材 将 20 只 C57 背景小鼠设为正常;MRL/lpr 小鼠每天测量体质量与尿蛋白情况,

将体质量(29 ± 3) g,尿蛋白(120 ± 10) g · L⁻¹的 MRL/lpr 小鼠随机分为 3 组,分别为实验组(给予等量生理盐水);中药组(益肾养阴合剂);激素组(醋酸泼尼松)。依上述方式给药处理 28 d 后,1%戊巴比妥钠(30 mg · kg⁻¹)腹腔麻醉小鼠。激素组 10 只动物,其余 3 组每组 20 只动物,其中 5 只用于灌注取材(冰冻切片检测 IgG 沉积),5 只新鲜取材用于蛋白质免疫印迹(Western blot)实验,其中 C57 正常组,MRL/lpr 实验组,中药组,共 3 组每组取 3 只小鼠的部分肾脏组织用于抗体芯片实验检测,这 3 组的其余 10 只用于 ELISA 验证实验。

2.3 尿蛋白检测 将所有尿液标本用双蒸水稀释 10 倍后使用,用 BCA 法检测样本中蛋白含量^[10]。使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒进行,按说明书操作,加入样本和标准品后,加入 BCA 200 μL 工作液,37 ℃ 孵育 30 min。酶标仪(波长 562 nm)测定吸光度 A。根据标准品计算样品的蛋白浓度。

2.4 免疫荧光检测各组肾脏 IgG 沉积情况 将肾脏组织样本用蔗糖溶液梯度脱水后,OCT 包埋,冰冻切片机切片,切片 10 μm 厚度;磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,每次 5 min;尽量吸干切片上的 PBS 液体,滴加 Alexa Fluor® 546 标记的 IgG 抗体(1:200),室温避光孵育 2 h。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。避光条件下甘油封片,在荧光显微镜下观察并拍照,应用 Image Pro Plus 6.0 软件进行荧光强度分析。

2.5 AAM-BLM 308 芯片筛查各组肾脏组织的细胞因子变化 将 C57 正常组,MRL/lpr 组与中药处理组,各取 3 个样本(肾脏组织),进行 AAM-BLM-308 抗体芯片检测,每张膜上镶嵌有 308 个锚定的抗体(小鼠抗体芯片检测图谱见 <https://www.raybiotech.com/files/manual/Antibody-Array/AAM-BLM-1B.pdf>),每张膜检测 1 个样本。参照 WU 等^[11]的方法,提取总蛋白后,统一各样本蛋白上样量为 60 μg,用生物素标记样本,并用封闭液稀释样本后,与抗体芯片膜一起 4 ℃ 孵育过夜。洗膜 3 次,加入 HRP-链霉亲和素,室温孵育 2 h,洗膜 3 次,加入显色反应液,使用 Image Quant LAS 4000 进行图像扫描,使用 Raybiotech 公司对应的分析软件进行数据处理,使用“去背景值后的 POS NORMALIZATION 2”进行数据分析。

2.6 ELISA 验证实验检测小鼠肾脏组织 SDF1, CXCR4 含量 用于 ELISA 验证的动物样本,取正常 C57, MRL 模型, MRL + 中药组, 3 组的小鼠肾脏组

织(每组 10 只,与抗体芯片取样分组一致),浸泡于预冷的 PBS 缓冲液中,研磨后制成匀浆液,离心后取上清。按相应试剂盒说明书操作,配置梯度标准品与检测试剂,每孔加入的样品/对照品 100 μ L,每个样品重复 2 次,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗板后加入检测抗体 100 μ L,室温孵育 1 h,洗板后加入 HRP-Streptavidin 工作液,室温 45 min,洗板后加入 TMB 显色液,室温 30 min;洗板后每孔加入终止液 50 μ L,在 450 nm 波长处读数 A,绘制标准曲线,计算出样品浓度,每个样品重复的 2 孔取均值用于数据分析。

2.7 Western blot 检测小鼠肾脏组织 SDF1, CXCR4, p-JAK2, p-STAT3, IL-17 蛋白表达 各组样本用预冷的 RIPA 裂解液(强)提取总蛋白。沸水变性后,取蛋白样品 80 μ g 进行上样、电泳,转膜。5% BSA 封闭 2 h, TBS 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。加入抗体工作液, β -actin(1:2 000), SDF1(1:1 000), CXCR4(1:500), p-JAK2(1:2 000), p-STAT3(1:2 000), IL-17(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液漂洗 5 次,每次 5 min。加入 HRP 标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C

振荡孵育 1 h, TBST 溶液洗膜 3 次,每次 5 min。HRP 底物显色试剂盒进行显影,化学发光仪扫描 PVDF 膜,所得蛋白条带用 Image J 软件分析灰度值,与内参 β -actin 条带灰度值的比值作为蛋白表达量的数据。

2.8 统计学分析 所得实验数据用 SPSS 18.0 统计软件包进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MRL/lpr 小鼠尿蛋白含量的影响 随着时间延长, MRL/lpr 组(生理盐水灌胃),尿蛋白含量有逐渐增高趋势,但统计学分析无明显差异。益肾养阴合剂灌胃的尿蛋白含量逐渐降低,且在第 4 周后降低最为明显($P < 0.01$)。醋酸泼尼松灌胃的尿蛋白含量也有逐渐降低,在第 4 周后尿蛋白含量降低最为明显($P < 0.01$)。本方剂(益肾养阴合剂)持续治疗可降低 MRL/lpr 疾病小鼠的肾脏蛋白析出,从而降低尿蛋白含量。见表 1。

表 1 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠尿蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 0 周 | 1 周 | 2 周 | 3 周 | 4 周 |
|------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|
| MRL/lpr 模型 | - | 116.01 \pm 5.18 | 124.80 \pm 6.74 | 121.43 \pm 9.84 | 122.45 \pm 4.52 | 124.52 \pm 8.65 ¹⁾ |
| 益肾养阴合剂 | 17.25 | 123.10 \pm 4.05 | 99.46 \pm 15.01 | 94.54 \pm 7.10 | 59.92 \pm 5.81 | 36.10 \pm 9.96 ¹⁾ |
| 醋酸泼尼松 | 6.5 \times 10 ⁻⁴ | 118.96 \pm 11.13 | 95.06 \pm 7.81 | 77.58 \pm 6.72 | 50.71 \pm 9.26 | 26.99 \pm 4.39 ¹⁾ |

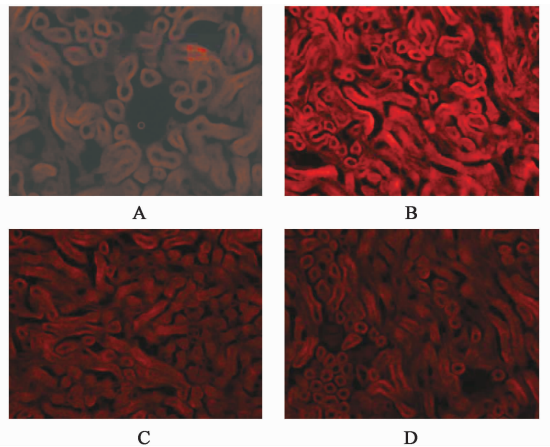
注:每组间与 0 周组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 MRL/lpr 小鼠肾脏 IgG 表达的影响 在正常 C57 小鼠肾脏中, IgG 沉积较少, MRL/lpr 疾病小鼠肾脏组织中有大量 IgG 沉积, 给予益肾养阴合剂或醋酸泼尼松灌胃给药 4 周后,肾脏组织中 IgG 沉积显著降低($P < 0.01$)。益肾养阴合剂可降低 MRL/lpr 小鼠肾脏组织的免疫球蛋白 IgG 沉积,从而减轻肾脏损伤。见表 2 和图 1。

表 2 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠肾脏 IgG 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 荧光强度 |
|------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 正常 C57 | - | 0.022 \pm 0.011 |
| MRL/lpr 模型 | - | 0.272 \pm 0.054 ¹⁾ |
| 益肾养阴合剂 | 17.25 | 0.124 \pm 0.013 ²⁾ |
| 醋酸泼尼松 | 6.5 \times 10 ⁻⁴ | 0.105 \pm 0.025 ²⁾ |

注:与正常 C57 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 MRL/lpr 模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。



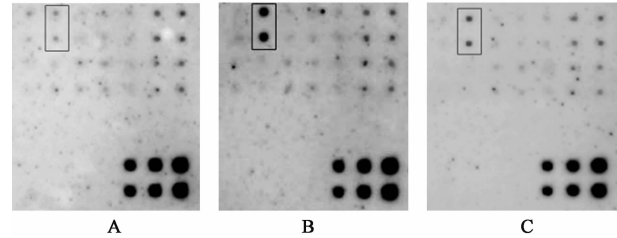
A. C57 小鼠组; B. MRL/lpr 模型组; C. 益肾养阴合剂组; D. 醋酸泼尼松组(图 4 同)

图 1 各组小鼠肾脏 IgG 荧光染色($\times 200$)

Fig.1 Results of IgG immunostaining in each mice kidney($\times 200$)

3.3 对 MRL/lpr 小鼠肾脏组织 SDF1, CXCR4 蛋白信号的影响 Mouse L308 Array 抗体芯片第 354 号

因子位置(SDF1 信号),与 C57 正常组比较,MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 SDF1 信号有显著增高($P < 0.01$);与 MRL/lpr 组比较,益肾养阴合剂处理组的 SDF1 信号出现明显减弱($P < 0.01$)。见图 2 和表 3。Mouse L308 Array 抗体芯片第 94 号因子位置(CXCR4 信号),各组的 CXCR4 表达情况与 SDF1 信号表达情况一致。见图 3 和表 3。说明红斑狼疮小鼠的肾脏组织中 SDF1/CXCR4 信号轴异常增高,而益肾养阴合剂可降低 SDF1/CXCR4 信号值。



A. 正常 C57 组;B. MRL/lpr 模型组;C. 益肾养阴合剂组(图 3 同)

图 2 SDF1 抗体芯片

Fig. 2 antibody array of SDF1

表 3 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠肾脏组织 SDF1, CXCR4 蛋白信号的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Yishen Yangyin mixture on signal density of SDF1, CXCR4 in MRL/lpr mice kidney($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | SDF1 | CXCR4 |
|------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 正常 C57 | - | 10.08 ± 2.35 | 26.04 ± 11.64 |
| MRL/lpr 模型 | - | 236.72 ± 39.89 ¹⁾ | 1 169.10 ± 127.92 ¹⁾ |
| 益肾养阴合剂 | 17.25 | 71.39 ± 16.48 ²⁾ | 223.84 ± 48.72 ²⁾ |

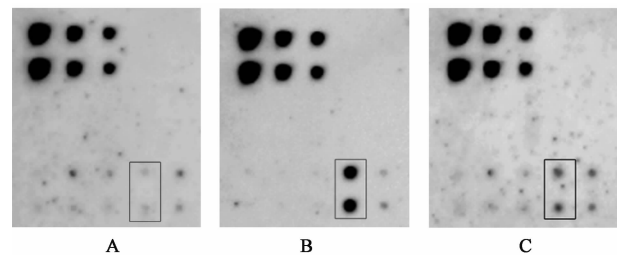


图 3 CXCR4 抗体芯片

Fig. 3 Qntibody array of CXCR4

表 5 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 SDF1, CXCR4, JAK2, STAT3, IL-17 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Yishen Yangyin mixture on SDF1, CXCR4, JAK2, STAT3, IL-17 protein expression in MRL/lpr mice kidney($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | SDF1/ β -actin | CXCR4/ β -actin | p-JAK2/ β -actin | p-STAT3/ β -actin | IL-17/ β -actin |
|------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常 C57 | - | 0.167 ± 0.095 | 0.190 ± 0.020 | 0.088 ± 0.032 | 0.227 ± 0.057 | 0.127 ± 0.047 |
| MRL/lpr 模型 | - | 0.760 ± 0.062 ¹⁾ | 0.940 ± 0.053 ¹⁾ | 0.843 ± 0.061 ¹⁾ | 0.923 ± 0.040 ¹⁾ | 0.907 ± 0.032 ¹⁾ |
| 益肾养阴合剂 | 17.25 | 0.450 ± 0.105 ²⁾ | 0.353 ± 0.040 ²⁾ | 0.457 ± 0.065 ²⁾ | 0.443 ± 0.071 ²⁾ | 0.407 ± 0.035 ²⁾ |
| 醋酸泼尼松 | 6.5 × 10 ⁻⁴ | 0.380 ± 0.104 ²⁾ | 0.363 ± 0.057 ²⁾ | 0.437 ± 0.095 ²⁾ | 0.483 ± 0.103 ²⁾ | 0.277 ± 0.045 ²⁾ |

3.4 ELISA 验证实验结果 为进一步落实抗体芯片的筛选结果,使用了更多样本量的各组小鼠肾脏样本进行 ELISA 实验验证检测小鼠肾脏组织 SDF1 和 CXCR4 的表达量, SDF1/CXCR4 信号在更大样本量时的表达与抗体芯片结果一致,与 C57 正常组比较,MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 SDF1 含量显著增高($P < 0.01$);与 MRL/lpr 组比较,益肾养阴合剂处理组的 SDF1 含量出现明显减弱($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 ELISA 结果的大样本量验证($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 ELISA results of confirmatory experiment in large sample size($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | SDF1 | CXCR4 |
|------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常 C57 | - | 11.58 ± 5.82 | 57.61 ± 28.68 |
| MRL/lpr 模型 | - | 531.49 ± 66.37 ¹⁾ | 713.21 ± 90.07 ¹⁾ |
| 益肾养阴合剂 | 17.25 | 225.52 ± 31.33 ²⁾ | 249.42 ± 56.83 ²⁾ |

3.5 对 MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 SDF1, CXCR4, JAK2, STAT3, IL-17 蛋白表达的影响 与正常 C57 小鼠比较, MRL/lpr 疾病模型小鼠的肾脏组织中 SDF1, CXCR4, JAK2, STAT3, IL-17 蛋白的表达显著增高($P < 0.01$),给予益肾养阴合剂或激素灌胃治疗 4 周后, SDF1, CXCR4 蛋白表达降低, JAK2, STAT3 的磷酸化蛋白信号表达减弱, IL-17 蛋白的表达降低($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

4 讨论

红斑狼疮在中医中又名阴阳毒、鬼脸疮、红蝴蝶斑、鸦陷疮、茱萸疮等,国家中医管理局诊断标准中为“蝶疮流注”。现代医学多采用激素、非甾体抗炎药治疗,但其毒副作用大,临床使用受到一定限制。中药对该病的治疗主要体现在调节和加强免疫功能,改善免疫紊乱。江雪纯等^[12]发现中药方剂狼疮静治疗 SLE 远期疗效显著,尤其在调节免疫、减轻西药的毒副作用等方面作用突出。其他研究也有证实中药组方治疗阴虚内热型系统性红斑狼疮具有较好的临床疗效,对辅助性 T 细胞 Th1/Th2 的平衡具

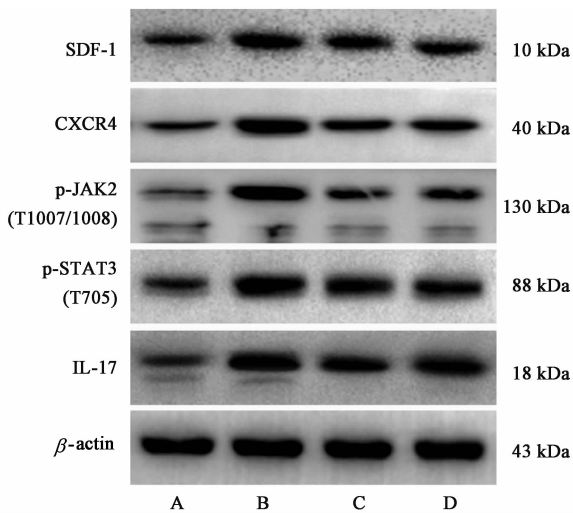


图 4 各组蛋白表达情况

Fig. 4 Expression of protein in each group

有调节作用^[13]。MRL/lpr 小鼠为自发性红斑狼疮小鼠,最早由 Murphy 和 Roths 于 1978 年建立品系^[14],由于 Fas 基因缺失,小鼠一般在生后 8 周后开始发病,可检出有自身抗体,12 周出现严重的淋巴病变,产生包括 dsDNA 在内的多种自身抗体,并有淋巴结肿大和免疫复合物相关性肾炎,蛋白尿进行性增高^[15-16],在本研究中,为进行组间比较,本课题组通过监测小鼠蛋白尿,选取(120 ± 10) g · L⁻¹ 尿蛋白浓度的 MRL/lpr 小鼠进行给药实验。

益肾养阴合剂是根据云南省中医医院风湿科常见病种优化诊疗方案制定的协定方药,该方具有益气固肾、养阴清热之功效,其主要组方为黄芪生脉六味二至丸加减化裁而成,本方基于黄芪生脉饮、二至丸、六味地黄汤为基础,以黄芪补阳气、固表益气为君药,针对不同辨证进行相应调整。在前期临床研究中已证实,本方是治疗气阴两虚型狼疮肾炎的安全有效的药物^[5],且可显著降低蛋白尿的同时有效辅助激素撤减^[4]。进一步使用 MRL/lpr 疾病小鼠模型,在动物水平证实本方在高剂量(17.25 g · kg⁻¹)时可降低 MRL/lpr 小鼠蛋白尿,且可调节改善小鼠免疫紊乱,平衡 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比例^[6]。在本实验中,笔者使用 MRL/lpr 小鼠并给予本方剂灌胃治疗,取材 MRL/lpr 疾病小鼠的肾脏组织,为进一步阐明本方剂的作用机制(而不是激素的作用机制),笔者重点将中药治疗组的小鼠肾脏样本和阴性组进行了细胞因子抗体芯片的检测筛查,结果发现,SDF1/CXCR4 信号轴出现显著变化,进一步大样本量的 ELISA 实验也证实了芯片结果,说明本方剂可以引起 MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 SDF1/CXCR4

信号轴的阻断。

免疫复合物沉积与自身抗体生成是系统性红斑狼疮的特征,B 淋巴细胞分化为浆细胞以及一些 T 细胞类别的失衡,可引起细胞因子分泌异常,从而导致自身抗体生成,这个过程高度依赖于 JAK2/STAT3 信号通路的活化。HE 等^[17]的研究指出,抑制 JAK2/STAT3 信号,可降低狼疮小鼠肾脏中 IgG 和 C3 免疫复合物的沉积。在笔者的研究中,益肾养阴合剂可降低狼疮小鼠肾脏组织的 IgG 沉积,同时检测到 JAK2/STAT3 信号通路的激活被抑制,说明益肾养阴合剂可通过降低 JAK2/STAT3 信号通路的激活,减轻炎症反应、进而降低小鼠肾脏组织中 IgG 的沉积,发挥肾脏保护作用。

在 SLE 患者的 B 细胞中发现有 CXCR4 的过度表达,且与疾病活动和肾脏受累程度呈正相关^[18],上调 CXCR4 可促进肾组织的炎性浸润^[19]。CXCR4/STAT3 信号轴还存在于肿瘤、心肌缺血等的疾病发生发展过程中。在一个上皮细胞间质转化诱导肝癌细胞的研究中发现,CXCR4 表达的上调可激活 STAT3 信号通路^[20]。在一个关于急性心肌梗死的研究中也指出 SDF1 α /CXCR4 信号轴与 STAT3 信号通路存在调控关系^[21]。DENG 等^[22]人指出,在肿瘤的免疫治疗领域,CXCR4/STAT3 信号轴的激活与肿瘤细胞的免疫抑制有密切相关性。结合我们的实验结果,益肾养阴合剂干预组的小鼠肾脏组织中 SDF1/CXCR4 信号轴与 STAT3 的磷酸化蛋白的变化一致,说明益肾养阴合剂可通过调控 CXCR4/STAT3 信号轴发挥肾脏保护作用,在这个过程中,CXCR4 可能是 STAT3 信号的上游调控因子。

在近年的研究发现,TH17 细胞是体内最重要的致炎因素之一,其浸润程度与自身免疫性疾病严重程度呈正相关,IL-17 是 TH17 的主要分泌因子,也是 TH17 发挥功能的关键蛋白。在一个关于银屑病(免疫性)的研究中发现,CXCR4 因子在抑制角质细胞增殖和辅助性 T 细胞 17 的增殖方面有关键作用^[23],而 TH17 细胞是导致自身免疫性疾病发生的主要促炎 T 细胞亚群。在一项关于免疫复合物肾炎的调查研究中发现,STAT3 基因的异常可导致 TH17 细胞的缺失^[24]。结合本研究的实验结果,益肾养阴合剂干预后,可降低 MRL/lpr 小鼠肾脏组织中 IL-17 的表达,说明本方剂可通过调控抑制 TH17 的细胞活性,从而调节增强免疫,发挥肾脏保护作用。

综上所述,本方剂益肾养阴合剂可有效减轻

MRL/lpr 小鼠的肾脏 IgG 免疫球蛋白沉积,减少尿蛋白含量,通过进一步的实验筛查发现,本方剂可通过阻断 CXCR4/STAT3 通路的信号传导,降低 SDF1 和 CXCR4 蛋白表达量,阻断 JAK2 与 STAT3 蛋白的磷酸化修饰,从而进一步抑制 Th17 细胞的活化,减弱 IL-17 的释放,调节增强免疫,最终发挥对 MRL/lpr 疾病小鼠的肾脏保护作用。

[参考文献]

[1] Singla S, Wenderfer S E, Muscal E, et al. Changes in frequency and activation status of major CD4⁺ T-cell subsets after initiation of immunosuppressive therapy in a patient with new diagnosis childhood-onset systemic lupus erythematosus[J]. *Front Pediatr*, 2017, 5: 104.

[2] Gupta S, Kaplan M J. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(7): 402-413.

[3] 刘辉, 郭月秋. 基于中药免疫组学对中药方剂免疫调节作用的评估[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(24): 2958-2960.

[4] 赖瑞. 益肾养阴合剂治疗狼疮性肾炎(气阴两虚型)的临床观察[D]. 昆明:云南中医学院, 2015.

[5] 张巍琼. 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠狼疮性肾炎的保护作用及部分机制研究[D]. 昆明:云南中医学院, 2014.

[6] 李东云, 张巍琼, 顾玲丽, 等. 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠免疫调节机制的研究[J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(8): 71-74.

[7] LIU D, ZHANG N, ZHANG X, et al. MiR-410 down-regulates the expression of interleukin-10 by targeting STAT3 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 303-315.

[8] LI D, GUO B, WU H, et al. Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: a comprehensive review [J]. *Autoimmunity*, 2015, 48(6): 353-361.

[9] 熊远珍. 实验动物与用人用药量的新换算[J]. *江西医学院学报*, 1997, 39(4): 41.

[10] 施冬艳, 李霞, 车楠, 等. N-乙酰半胱氨酸治疗系统性红斑狼疮动物模型的疗效分析[J]. *现代免疫学*, 2014, 34(3): 241-246.

[11] WU T, DING H, HAN J, et al. Antibody-array-based proteomic screening of serum markers in systemic lupus erythematosus: a discovery study[J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(7): 2102-2114.

[12] 江雪纯, 钱程亮, 张谨枫, 等. 狼疮静联合泼尼松治疗系统性红斑狼疮临床疗效[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(17): 126-129.

[13] 堵建岗, 沈建国, 王卫兰, 等. 中药组方对阴虚内热型系统性红斑狼疮的疗效及对 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(7): 1756-1758.

[14] Steinberg A D, Roths J B, Murphy E D, et al. Effects of thymectomy or androgen administration upon the autoimmune disease of MRL/Mp-lpr/lpr mice [J]. *J Immunol*, 1980, 125(2): 871-873.

[15] WANG F, LI B, Schall N, et al. Assessing autophagy in mouse models and patients with systemic autoimmune diseases[J]. *Cells*, 2017, 6(3): 16.

[16] Sugimoto K, Nakazato K, Sato A, et al. Autoimmune disease mouse model exhibits pulmonary arterial hypertension[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184990.

[17] HE Y Y, YAN Y, ZHANG H F, et al. Methyl salicylate 2-O-β-d-lactoside alleviates the pathological progression of pristane-induced systemic lupus erythematosus-like disease in mice via suppression of inflammatory response and signal transduction[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 3183-3196.

[18] ZHAO L D, LIANG D, WU X N, et al. Contribution and underlying mechanisms of CXCR4 overexpression in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(10): 842-849.

[19] Hanaoka H, Okazaki Y, Hashiguchi A, et al. Overexpression of CXCR4 on circulating B cells in patients with active systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(6): 863-870.

[20] Kim J H, Shim J W, Eum D Y, et al. Downregulation of UHRF1 increases tumor malignancy by activating the CXCR4/AKT-JNK/IL-6/Snail signaling axis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2798.

[21] QIU R, CAI A, DONG Y, et al. SDF-1α upregulation by atorvastatin in rats with acute myocardial infarction via nitric oxide production confers anti-inflammatory and anti-apoptotic effects[J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19: 99.

[22] DENG Y, CHENG J, FU B, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts enhance immune suppression by facilitating the generation of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(8): 1090-1101.

[23] Takekoshi T, WU X, Mitsui H, et al. CXCR4 negatively regulates keratinocyte proliferation in IL-23-mediated psoriasiform dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(11): 2530-2537.

[24] Ahmed S, Truong L D, Workeneh B. Fraternal twins with job's syndrome and immune complex nephritis[J]. *CEN Case Rep*, 2016, 5(1): 61-66.

[责任编辑 周冰冰]