

· 原发性干燥综合征的临床与基础研究专题 ·

[编者按] 原发性干燥综合征(pSS)是常见的自身免疫性结缔组织病,临床异质性强,不仅易漏诊误诊,且缺乏针对性的治疗措施。在现代医学疗效欠佳的情况下,充分发挥中医优势治疗pSS,是适应临床需求,改善治疗困境的重要举措。近年来,以陶庆文教授为代表的一批中医药人开拓创新,在pSS的中医临床与基础研究方面开展了系列探索性工作,并取得了重要进展,为中医临床辨证论治pSS及后续针对性中药药物研发提供了科学依据。

该专题收录了6篇文章,以期对pSS的临床与基础研究提供范例。①组织中医风湿、西医风湿及药学领域专家,深入探讨干燥综合征(SS)的中医药治疗优势及优选方案,明确SS是中医药治疗优势病种,并在疾病诊治、优选方案等方面达成共识。②首次探索不同病程pSS患者的舌象特点及中医证候差异,发现pSS以阴虚燥热贯穿始终,病程早期多表现为燥湿同病,易见厚腻苔、痰湿证;中后期则主要表现为气阴两虚,易见剥脱苔、气虚证。临床可结合不同病程患者舌象与证候特点辨证用药。③首次采用调查研究的方法分析pSS舌苔剥脱患者的临床特点,发现超过40%的pSS患者存在舌苔剥脱,常伴舌体裂纹,与阴虚、气虚证呈正相关,与痰湿证呈负相关,提示此类患者临床治疗应以益气养阴为主。④总结分析200例pSS患者的舌象及证候特点,并首次探索了中医舌象、证候与pSS合并间质性肺病(ILD)的相关性,发现黄苔、肺气虚、补体C4水平是pSS合并ILD的相关因素。⑤采用临床对照研究的方法,评价了化湿润燥方治疗pSS燥湿互结证患者的疗效和安全性,结果表明化湿润燥方能有效改善pSS燥湿互结证患者的干燥、疲乏、肢体疼痛症状,降低疾病活动度,且安全性良好。⑥探索化湿润燥方对SS模型NOD/Ltj小鼠颌下腺组织病理损伤和功能的影响,及对颌下腺细胞水通道蛋白5(AQP5)表达的调节作用,发现该方能改善SS模型小鼠颌下腺腺泡细胞的分泌功能和腺体结构损害,其作用机制可能与上调颌下腺细胞AQP5蛋白的表达水平有关。

化湿润燥方对干燥综合征模型小鼠颌下腺结构和功能的影响

贺倩^{1,2}, 余新波^{1,2}, 黄子玮^{1,2}, 廖佳禾^{1,2}, 陈光耀^{1,2}, 吴子华^{1,2},
陈嘉琪^{1,2}, 杨建英^{1,2}, 罗静^{2,3*}, 陶庆文^{2,3*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029;

2. 中日友好医院, 北京 100029;

3. 免疫炎症性疾病北京市重点实验室, 北京 100029)

[摘要] 目的:探索化湿润燥方对干燥综合征(SS)模型NOD/Ltj小鼠颌下腺组织病理损伤和功能的影响,以及对颌下腺细胞水通道蛋白5(AQP5)表达的调节作用。方法:以NOD/Ltj小鼠构建SS动物模型,选取9周龄雌性NOD/Ltj小鼠随机分为模型组、化湿润燥方组(7.15 g·kg⁻¹·d⁻¹)、硫酸羟氯喹(HCQ)组(1.30 g·kg⁻¹·d⁻¹),选取9周龄雌性BALB/c小鼠为正常组,每组6只。给药8周,记录各组小鼠饮水量、唾液流率,观察各组小鼠颌下腺病理染色结果并进行评分,采用免疫组化法(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测AQP5蛋白的表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠饮水量明显增加($P<0.05$)、唾液流率明显减低($P<0.05$)。与模型组比较,化湿润燥方组小鼠饮水量明显降低($P<0.05$)、唾液流率明显增加($P<0.05$);HCQ组小鼠唾液流率明显增加($P<0.05$)。颌下腺组织病理结果显示,与正常组比较,模型组小鼠病理评分、淋巴细胞浸润灶数目、淋巴浸润灶面积百分比均明显增高($P<0.05$)。与模型组比较,化湿润燥方组的病理评分、淋巴细胞浸润灶数目均明显降低($P<0.05$),化湿润燥方组和HCQ组的淋巴浸润灶面积百分比明显降低($P<0.05$)。IHC及Western blot结果显示,与空白组比较,模型组小鼠AQP5蛋白表达水平明显下调($P<0.05$)。与模型组和HCQ组比较,化湿润燥方组AQP5蛋白表达水平明显上调($P<0.05$)。结论:化湿润燥方可以改善SS模型小鼠颌下腺腺泡细胞的分泌功能和腺体结构损害,其作用机制可能与上调颌下腺细胞AQP5蛋白的表达水平有关。

[关键词] 化湿润燥方; 干燥综合征; 颌下腺; NOD/Ltj小鼠; 水通道蛋白5(AQP5)

[收稿日期] 2022-11-24

[基金项目] 中央高水平医院临床科研业务费资助项目(2022-NHLHCRF-LX-02-0103);首都卫生发展科研专项青年优才项目(2020-4-40610);中日友好医院“菁英计划”人才培养工程项目(ZRJY2021-QM14)

[第一作者] 贺倩,在读博士,从事中医风湿病学方向研究,E-mail:zryhheqianbucm@163.com

[通信作者] *罗静,博士,从事中医风湿病学临床与基础研究,Tel:010-84205067,E-mail:luojinggg@sina.com;

*陶庆文,博士,主任医师,教授,博士生导师,博士后合作导师,从事中医风湿病学临床与基础研究,Tel:010-84205067,E-mail:taoqgl@sina.com

[中图分类号] R242; R2-0; R2-031; R593; R24; R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)08-0036-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231597

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230210.1131.005.html>

[网络出版日期] 2023-02-10 15:01:28

Effect of Huashi Runzao Prescription on Structure and Function of Submandibular Gland in Sjögren's Syndrome Model Mice

HE Qian^{1,2}, YU Xinbo^{1,2}, HUANG Ziwei^{1,2}, LIAO Jiahe^{1,2}, CHEN Guangyao^{1,2},
WU Zihua^{1,2}, CHEN Jiaqi^{1,2}, YANG Jianying^{1,2}, LUO Jing^{2,3*}, TAO Qingwen^{2,3*}

(1. *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;*

2. *China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China;*

3. *Beijing Key Lab for Immune-Mediated Inflammatory Diseases, Beijing 100029, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Huashi Runzao prescription (HRP) on the histopathological injury and function of submandibular gland in naive non-obese diabetic (NOD/Ltj) mouse model of Sjögren's syndrome (SS) and its regulatory effect on aquaporin 5 (AQP5) expression in submandibular gland cells. **Method:** The SS model was induced in NOD/Ltj mice. The NOD/Ltj female mice aged nine weeks were selected and randomly assigned into model group, HRP group ($7.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and hydroxychloroquine (HCQ) group ($1.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and female BALB/c mice in the same age were selected and assigned into the normal group, with six mice in each group. Drug intervention lasted eight weeks. The water consumption and salivary flow rate (SFR) of each group were recorded. The pathological staining results of the submandibular gland of mice in each group were observed and scored. AQP5 expression was determined by immunohistochemistry (IHC) and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased water consumption ($P < 0.05$) and reduced SFR ($P < 0.05$). Compared with the model group, the HRP group showed decreased water consumption ($P < 0.05$) and increased SFR ($P < 0.05$), and the HCQ group showed increased SFR ($P < 0.05$). In terms of histopathological results of the submandibular gland, compared with the normal group, the model group showed increased pathological score, number of lymphocyte infiltration foci, and percentage of lymphatic infiltration area ($P < 0.05$). Compared with the model group, the HRP group showed reduced pathological scores and number of lymphocyte infiltration foci ($P < 0.05$), and the HRP group and the HCQ group showed reduced percentage of lymphatic infiltration area ($P < 0.05$). The results of IHC and Western blot showed that compared with the normal group, the model group showed down-regulated expression level of AQP5 protein ($P < 0.05$), and compared with the model group and the HCQ group, the HRP group showed up-regulated expression level of AQP5 protein ($P < 0.05$). **Conclusion:** HRP can improve the secretion function of submandibular gland acinous cells and glandular structure injury in SS model mice, and its mechanism may be related to the up-regulation of AQP5 protein expression level in submandibular gland cells.

[Keywords] Huashi Runzao prescription; Sjögren's syndrome; submandibular gland; NOD/Ltj mice; aquaporin 5(AQP5)

干燥综合征(SS)是一种主要累及唾液腺和泪腺等外分泌腺的慢性自身免疫性疾病,以血清高水平的自身抗体、外分泌腺体破坏和组织淋巴细胞浸润为主要特征,可分为原发性和继发性2种^[1-3]。原

发性SS(pSS)好发于中老年女性^[1],在我国人群患病率为0.33%~0.77%,男女比约为1:22.9^[4]。pSS的发病机制尚未完全阐明,目前认为主要与遗传、环境和自身免疫异常有关^[5]。局部治疗缓解症状是本

病腺体受累的首要疗法,免疫抑制剂可用于存在活动性系统受累的患者,但疗效并不理想^[6]。SS属于中医“燥痹”的范畴,中医药能有效改善本病的临床症状^[7-9]。化湿润燥方是首都中青年名中医陶庆文教授结合多年临床经验创立的治疗SS的经验方,已获得国家发明专利,该方药味精简,效力专著,临床应用多年,能显著改善SS患者的口眼干等症状,但其作用机制尚不明确^[10-11]。

水通道蛋白(AQPs)是介导水跨膜转运的一大膜蛋白家族,与视神经脊髓炎、类风湿关节炎(RA)、SS、变应性鼻炎等多种自身免疫性疾病的发病相关^[12-16]。AQP5是AQPs的成员之一,主要分布于泪腺、唾液腺、角膜上皮细胞等组织细胞中,参与外分泌腺的腺体分泌过程^[17]。研究认为,外分泌腺腺体细胞中AQP5的转运缺陷或表达下调可能与pSS的发病密切相关^[17-19]。唾液腺及泪腺中的AQP5表达下调会引起腺泡细胞对水液的渗透功能下降、体液分泌减少,表现出口干、眼干等。因此,AQP5被认为是SS的一个关键生物标志物^[20-21],作为探索中药治疗SS潜在机制的生物学依据。非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠的衍生模型——NOD/Ltj小鼠是目前广泛应用的研究SS最适合的免疫缺陷动物模型,能够自发表现出SS一致症状,血清学可以检测出抗SSA、SSB等自身抗体^[22],该自发模型小鼠在第8周至第16周逐渐出现唾液腺淋巴细胞浸润,第21周时出现唾液腺纤维化^[23]。基于上述前期研究基础,本研究拟通过观察化湿润燥方对SS自发模型NOD/Ltj小鼠颌下腺组织病理损伤、腺体功能及颌下腺细胞AQP5表达的影响,探讨化湿润燥方治疗SS的作用及相关机制。

1 材料

1.1 动物 实验组选取健康无特定病原体(SPF)级雌性NOD/Ltj小鼠18只,9周龄,体质量(22.34±1.95)g,购自北京华阜康实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。SPF级雌性BALB/c小鼠6只,9周龄,体质量(21.28±1.72)g,购自北京斯贝福实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0001,作为正常组。动物体质量差异无统计学意义。购进小鼠后予以充足水和饲料,适应性喂养3d,以适应环境。本实验遵循北京中医药大学实验中心有关实验动物管理和使用的规定,通过实验动物伦理委员会批准(批准号BUCM-4-2021090307-3158)。每日12h光照,12h黑夜循环,室温20~26℃,湿度40%~60%,小鼠饲料、饮用水及

垫料等均经过高压灭菌处理,每4d更换1次垫料。

1.2 药物与试剂 化湿润燥方由生地黄15g、百合10g、茯苓15g、苏梗10g、生麦芽10g、桑叶5g组成,由中日友好医院中药房提供[中药饮片均购自中国北京同仁堂(集团)有限公司],由中日友好医院药剂科中药师鉴定并制备成质量浓度为0.72g·mL⁻¹的药液,经高温消毒后封装,供实验备用。硫酸羟氯喹(HCQ)片(纷乐,上海上药中西制药有限公司,批号H19990263,0.1g/片)。将上述药物溶解于生理盐水中,制备质量浓度为0.13g·mL⁻¹的药液,供实验备用。

毛果芸香碱(Pilocarpine)、RIPA裂解缓冲液(美国MedChemExpress公司,批号分别为133246、HY-K1001),苏木素-伊红(HE)染色液、0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液、DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司,货号分别为BA4025、25200-056、11965、P1003、10099-141),电化学发光液(ECL)、苯甲磺酰氟(PMSF)、聚偏二氟乙烯膜(PVDF)、小鼠抗AQP5抗体(美国Millipore公司,货号分别为WBKLS0500、P7626、HVLP04700、178615),TBST缓冲液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、Tween-20、柠檬酸钠抗原修复液(50×)(Sodium Citrate Antigen Retrieval Solution)(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为T1085、P1260、T8220、C1032),Tris-buffered saline(TBS)粉末、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白电泳缓冲粉(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G0001、B1216-2),DAB显色试剂盒、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为ZLI-9018、TA-09、ZB-5305)。

1.3 仪器 DYY-6D型电泳仪、DYCZ-24DN型迷你电泳槽(北京六一仪器厂),JY-ZY5型湿转印系统转印槽(北京君意东方电泳设备有限公司),HC-3018R型高速冷冻离心机(中科中佳科学仪器有限公司),Olympus CK31型正置光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将18只NOD/Ltj小鼠按照体质量随机分为模型组、化湿润燥方组、HCQ组,每组6只。每组小鼠的给药量按人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值计算(70kg标准体质量成人 $\times 9.1 = 0.02$ kg标准体质量小鼠用量)^[24],化湿润燥方组按7.15g·kg⁻¹·d⁻¹给药[相当于70kg成人每日

55 g的临床等效剂量,该处方剂量为临床有效剂量,已获国家发明专利(专利号 ZL 202210973056.X)],每次用药 0.20 mL;HCQ组按 $1.30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 给药(相当于 70 kg成人每日 200 mg的临床等效剂量),每次用药 0.20 mL。模型组、正常组予等体积生理盐水灌胃,每次 0.20 mL。每天 1次,连续给药 8周。

2.2 饮水量测定 分别在 0周、1周、4周、8周测量各组小鼠前 1 d晚 5时水壶重量(g_1)及次日晚 5时的水壶重量(g_2)。24 h平均饮水量(mL)= $(g_1-g_2)/(6\times 1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 。

2.3 唾液流率测定 各组在 8周给药结束后,使用 1%戊巴比妥钠,以 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉小鼠,5 min后再次腹腔注射 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 无菌毛果芸香碱。将适当大小的棉球塞入小鼠口腔中 5 min后取出称定湿质量。唾液流率($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)= $[\text{湿质量}(\text{mg})-\text{干质量}(\text{mg})]\times 10/(1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}\times 5 \text{ min})$ 。

2.4 标本收集 各组均在适应性喂养 3 d后每天灌胃 1次,持续 8周,灌胃结束后,禁食水 12 h后,经 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,脱颈处死,仰位固定于鼠板上,无菌分离颌下腺。

2.5 HE染色观察小鼠颌下腺组织病理形态学变化
每组小鼠取双侧颌下腺经 4%多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚度 $5 \mu\text{m}$),HE染色,光镜下观察,参照 Chisholm-Mason 进行病理学评分^[25]。按照各组小鼠颌下腺淋巴细胞浸润进行病理程度量化评定(1个浸润灶指每 4 mm^2 有至少 50个以上淋巴细胞浸润),无或极少淋巴细胞浸润为 0分,少量散在淋巴细胞浸润为 1分,淋巴细胞中度浸润(未成灶)、伴有轻度实质损伤为 2分,每 $4 \text{ mm}^2<1$ 个淋巴细胞浸润灶(4个低倍视野)为 3分,每 $4 \text{ mm}^2>1$ 个淋巴细胞浸润灶(4个低倍视野)为 4分。若评分达到 2分以上,则视为发病。用 Image Pro Plus v6.0软件计算各组小鼠颌下腺淋巴灶数量、炎症细胞浸润灶面积百分比作为量化染色结果。

2.6 颌下腺细胞 AQP5 的表达测定

2.6.1 免疫组化法(IHC)测定颌下腺细胞 AQP5 蛋白的表达 每组选取 3只小鼠,经 1%戊巴比妥钠($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉后脱颈处死,仰位固定,无菌分离双侧颌下腺,4%多聚甲醛固定,脱水,透明,石蜡包埋,连续切片(厚度 $5 \mu\text{m}$)。使用标准方案进行免疫组织化学染色,柠檬酸钠抗原稀释液加入双蒸水稀释 50倍,将切片浸泡在抗原修复液(1×)中,95~100℃加热约 20 min修复抗原,待修复液降

至室温后 PBS冲洗,5 min,3次;10%的正常山羊血清封闭,湿盒室温孵育 20 min后倾去,倾去血清,滴加 AQP5 一抗(1:1 000)75 μL 后,37℃室温湿盒中孵育 2 h,PBS冲洗 1 min×3次;滴加二抗(1:1 000)75 μL ,37℃室温孵育 30 min。新鲜配制 DAB 溶液,每张片子加 1~2滴指示颜色 2 min,苏木素染液复染 1 min,蒸馏水冲洗,脱水封片,使用 Image Pro Plus v6.0 软件评价各蛋白在组织中的表达。

2.6.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 AQP5 蛋白表达 每组取 3只小鼠,经 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后脱颈处死,仰位固定,无菌分离双侧颌下腺,称重,每 20 mg组织加入 RIPA 裂解缓冲液 200 μL (内含 PMSF 20 μL),在冰上进行组织匀浆,4℃,12 000×g离心 10 min,取上清液,制备 10%蛋白电泳胶,根据样品蛋白浓度计算上样量,将 Maker 及各组样品依次加入孔中,电泳。提前将合适的 PVDF 在甲醇中活化 10 min,浸泡在预冷的转膜液中反复按压,将转膜槽置于冰上,250 mA 恒流转膜 55 min。将转好蛋白的 PVDF 膜取出,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h后,加入 AQP5 一抗(1:100), β -actin (1:5 000),4℃冰箱孵育过夜。第 2天取出室温振荡 30 min,TBST 缓冲液冲洗,10 min,3次,二抗(1:1 000)孵育,室温摇床振荡反应 2 h,TBST 缓冲液冲洗,3次×10 min,按 A液-B液 1:1比例配置 ECL 显影液,混匀后均匀滴在膜上,曝光。应用 Image J 软件分析灰度值,根据灰度值与内参比值计算蛋白的相对表达量,AQP5 蛋白水平=AQP5 条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

2.7 统计学方法 实验数据采用 SPSS V17.0 软件统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不服从正态分布以中位数及四分位间距 M(IQR)描述;组间比较服从正态分布且方差齐时采用单因素方差分析;不服从正态分布或方差不齐采用非参数检验比较不同组间的差异。采用 Spearman 等级相关系数计算单样本平行变量间的相关系数,假设检验采用双侧检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠饮水量的影响 造模及治疗前后正常组小鼠饮水量基本保持稳定。第 0周、第 4周各组小鼠之间饮水量差异无统计学意义。8周后,与正常组比较,模型组小鼠饮水量明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,化湿润燥方组小鼠饮水量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);HCQ组小鼠饮水量有所下降,但差异无统计

学意义。见表1。

表1 化湿润燥方对小鼠饮水量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Huashi Runzao prescription on water consumption in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$) mL

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	4周	8周
正常组		4.08±0.46	4.03±0.48	4.15±0.81
模型组		4.03±0.38	4.33±0.28	5.70±0.53 ¹⁾
HCQ组	1.3	3.93±0.19	4.35±0.30	4.85±0.31
化湿润燥方组	7.15	3.93±0.20	3.94±0.75	4.64±0.51 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$;与HCQ组比较³⁾ $P<0.05$ (表2-表5同)

3.2 对小鼠唾液流率的影响 8周后,与正常组比较,模型组和HCQ组小鼠唾液流率明显减低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,化湿润燥方组和HCQ组小鼠唾液流率明显升高($P<0.05$)。见表2。

表2 化湿润燥方对小鼠唾液流率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Huashi Runzao prescription on salivary flow rate in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$) $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

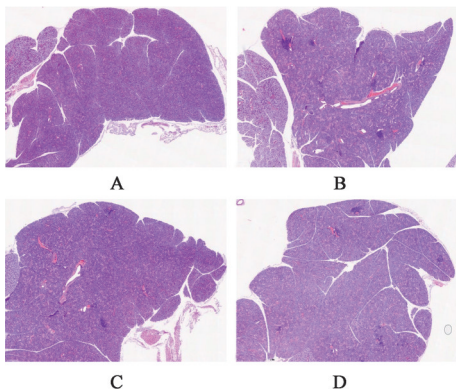
组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	8周
正常组		27.63±1.80	27.95±6.16
模型组		28.44±2.41	13.31±3.31 ¹⁾
HCQ组	1.3	27.54±2.41	20.44±0.60 ²⁾
化湿润燥方组	7.15	27.40±3.21	22.70±2.90 ²⁾

3.3 对小鼠颌下腺病理学评分、淋巴细胞浸润水平的影响 组织病理评分方面,与正常组比较,模型组病理评分、淋巴细胞浸润灶数目、淋巴浸润灶面积百分比增高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,化湿润燥方组的病理评分、淋巴细胞浸润灶数目均明显降低($P<0.05$);化湿润燥方组和HCQ组的淋巴浸润灶面积百分比明显降低($P<0.05$)。与HCQ组比较,化湿润燥方组病理评分、淋巴细胞浸润灶数目降低($P<0.05$)。见表3和图1。

表3 化湿润燥方对小鼠颌下腺病理学评分、淋巴细胞浸润水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Huashi Runzao prescription on pathological score and lymphocyte infiltration level of mice submandibular gland ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	病理评分/分	淋巴细胞浸润灶数目/个	淋巴浸润灶面积百分比/%
正常组		1.25±0.25	1.00±1.00	0.01±0.01
模型组		3.75±0.25 ¹⁾	13.33±2.52 ¹⁾	4.49±0.84 ¹⁾
HCQ组	1.3	3.50±0.25	11.67±1.53	1.64±0.13 ²⁾
化湿润燥方组	7.15	2.25±0.25 ^{2,3)}	6.33±2.52 ^{2,3)}	0.33±0.12 ²⁾



注:A.正常组;B.模型组;C.HCQ组;D.化湿润燥方组(图2和图3同)

图1 化湿润燥方对小鼠颌下腺组织病理形态的影响(HE,×25)

Fig. 1 Effect of Huashi Runzao prescription on pathological morphology of mice submandibular gland (HE,×25)

3.4 对小鼠颌下腺细胞AQP5蛋白表达的影响 IHC结果显示,8周后,与正常组比较,模型组颌下腺细胞AQP5蛋白表达明显下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组和HCQ组比较,化湿润

燥方组颌下腺细胞AQP5蛋白表达明显有增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表4和图2。

表4 化湿润燥方对小鼠颌下腺IHC AQP5蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Huashi Runzao prescription on AQP5 protein expression detected by immunohistochemistry of mice submandibular gland ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP5
正常组		5 646.33±372.90
模型组		1 773.33±93.78 ¹⁾
HCQ组	1.3	1 939.33±138.31
化湿润燥方组	7.15	5 182.67±373.33 ^{2,3)}

Western blot结果显示,8周后,与正常组比较,模型组颌下腺细胞AQP5蛋白表达明显下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,化湿润燥方组、HCQ组颌下腺细胞AQP5蛋白表达增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与HCQ组比

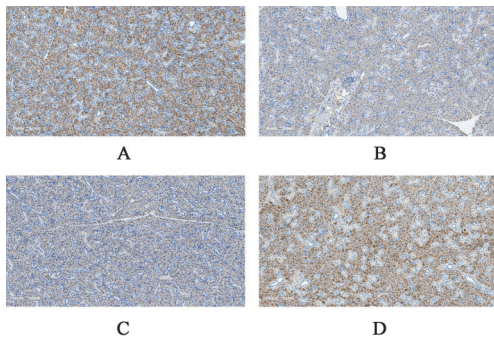


图2 化湿润燥方对小鼠颌下腺IHC检测AQP5蛋白表达的影响(IHC, ×100)

Fig. 2 Effect of Huashi Runzao prescription on AQP5 expression detected by immunohistochemistry in mice submandibular gland (IHC, ×100)

较,化湿润燥方组小鼠颌下腺细胞AQP5蛋白表达增加($P < 0.05$),差异有统计学意义。见表5和图3。

表5 化湿润燥方对小鼠颌下腺AQP5蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huashi Runzao prescription on AQP5 protein expression of mice submandibular gland ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	AQP5/ β -actin
正常组		0.81±0.03
模型组		0.33±0.02 ¹⁾
HCQ组	1.3	0.45±0.02 ²⁾
化湿润燥方组	7.15	0.58±0.04 ^{2,3)}

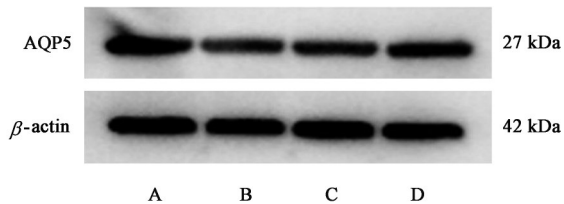


图3 小鼠颌下腺AQP5蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of AQP5 protein expression in submandibular gland of mice

4 讨论

SS以唾液腺、泪腺等外分泌腺体结构损害和腺体分泌功能减退为主要特征^[26],98%的SS患者均存在不同程度的口干、眼干症状^[1,27]。唾液分泌减少还可引起吞咽障碍、味觉障碍、口腔疼痛、猖獗性龋齿等,十分影响患者生活质量。环境因素如病毒,可能触发具有遗传易感性的个体的唾液腺上皮细胞的激活,树突状细胞激活并诱导高水平干扰素产生。活化的上皮细胞和树突状细胞分泌促炎因子和趋化因子,唾液腺中T、B淋巴细胞激活,进行性浸润,腺体上皮细胞增生后逐渐萎缩,最后纤维组织取代原有腺体结构,从而导致组织损伤以及相

应的分泌功能减退^[5,28]。目前,SS相关干燥治疗包括药物和非药物治疗,一线局部治疗包括人工泪液、人工唾液、口腔喷雾、凝胶和漱口水等,旨在替代和刺激腺体分泌,减少局部炎症^[6,29-30]。除局部用药暂时改善症状外,目前尚无获批的减缓疾病进展的治疗方法^[31]。最新临床试验表明,靶向B细胞单抗 Ianalumab对SS干燥症状疗效并不理想^[32]。SS目前尚缺乏高质量循证医学证据支持的有效药物^[33-34]。

中医药因其多途径、多靶点的特性,在SS治疗中前景广阔^[35-38]。基于不同的诊疗理念,不同医家的治法不尽相同,或治以养阴清热润燥^[39-44],或从“阴火”论治^[45-46],或通利三焦^[47-48],扶阳化气等^[49-51]。迄今为止,SS仍缺乏针对性的上市中成药,亟待研发。陶庆文教授在长期临床实践和临床研究发现,SS乃“内燥”偏盛,脏腑阴阳失调,气血津液运行不畅所致^[52-53]。“内燥”可因素体气阴两虚、大病耗伤气阴或饮食不节引起。气虚运化失常易致湿浊内生,饮食不节损伤脾胃又多夹湿,故SS常夹湿。燥与湿存在于SS的不同阶段,相互促进、转化,表现出不同的程度差异。正如清代《医原》中记载:“往往始也病湿,继则湿又化燥……往往始也病燥,继则燥又夹湿”^[54]。燥与湿夹杂同病,治疗当润燥相济,以平为期。化湿润燥方即是平调燥湿的有效经验方,具有化湿养阴润燥的功效,能有效缓解SS燥湿夹杂患者的口干症状,且安全性良好。

唾液分泌不足是引起口干的最直接原因^[55]。AQPs通过影响唾液腺腺泡细胞上的M₃受体、肾上腺素受体,调节唾液蛋白质的产生、电解质的释放,从而调节唾液腺功能^[56]。因此,AQPs表达异常可引起唾液分泌功能紊乱。SS患者外分泌腺组织中可以检测到多种AQPs^[12]。研究发现,AQP1基因治疗能够恢复SS模型小鼠腺体细胞的水液运动^[57],而腺病毒介导的AQP1 cDNA转移通过改善唾液功能能够缓解辐射诱导的动物模型的口干症状^[58]。AQP5表达于唾液腺浆液性腺泡上皮细胞^[56],有4个胞浆结构域,其C-末端结构域通过自噬小体或溶酶体突变参与调控AQP5的转运定位,形成唾液分泌的通道^[59]。多项研究显示,SS模型小鼠和pSS患者外分泌腺体细胞的AQP5表达明显下调^[18,60-61]。敲除AQP5基因后,SS模型小鼠颌下腺分泌功能显著降低^[57],唾液量、渗透压和电解质浓度表现异常^[62]。抗AQP5自身抗体可识别位于AQP5的3个细胞外环内的功能性表位,并抑制AQP5介导的水液流

动^[63]。一项队列研究表明,抗AQP5免疫球蛋白G水平与SS的血清学和组织病理学特征呈正相关^[64]。诱导抗AQP5自身抗体表达的小鼠模型中,淋巴细胞浸润同样得到改善^[65]。因此,AQP5的表达水平可能与SS的腺体结构损伤与功能减退密切相关。

本研究表明,SS模型鼠饮水量明显增加、唾液流率明显降低、组织形态学病理明显改变、淋巴细胞浸润灶面积百分比明显升高,表明SS模型小鼠颌下腺的结构损伤及功能存在异常。经过化湿润燥方、HCQ的干预,与模型组小鼠比较,化湿润燥方组、HCQ组的唾液流量、颌下腺指数、颌下腺组织病理学评分显著改善,且化湿润燥方组的病理评分等指标明显低于HCQ组,提示化湿润燥方与HCQ相比,具有更好地改善腺体结构损伤、恢复腺体分泌功能的功效。同时,本研究观察到,SS模型小鼠颌下腺细胞AQP5蛋白表达较正常小鼠显著下调,经化湿润燥方治疗后颌下腺组织AQP5蛋白的表达水平显著上调,提示化湿润燥方改善SS模型小鼠腺体结构损伤和功能减退的作用机制可能与上调AQP5表达有关,但是具体的调节机制和潜在作用途径仍需进一步研究。

综上所述,本研究进一步证实了化湿润燥方可以改善SS模型鼠的腺体结构损伤和功能减退,其作用机制可能与上调AQP5蛋白的表达有关,为临床应用化湿润燥方治疗SS进一步提供了生物学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] NEGRINI S, EMMI G, GRECO M, et al. Sjögren's syndrome: A systemic autoimmune disease [J]. Clin Exp Med, 2022, 22(1): 9-25.

[2] BOMBARDIERI M, ARGYROPOULOU O D, FERRO F, et al. One year in review 2020: Pathogenesis of primary Sjögren's syndrome [J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 126(4): 3-9.

[3] MAVRAGANI C P, MOUTSOPOULOS H M. Primary versus secondary Sjögren syndrome: Is it time to reconsider these terms? [J]. J Rheumatol, 2019, 46(7): 665-666.

[4] XU D, ZHAO S, LI Q, et al. Characteristics of Chinese patients with primary Sjögren's syndrome: Preliminary report of a multi-centre registration study [J]. Lupus, 2020, 29(1): 45-51.

[5] FASANO S, MAURO D, MACALUSO F, et al. Pathogenesis of primary Sjögren's syndrome beyond B lymphocytes [J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 126(4):

315-323.

[6] RAMOS-CASALS M, BRITO-ZERÓN P, BOMBARDIERI S, et al. EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome with topical and systemic therapies [J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(1): 3-18.

[7] 王钢, 漆文霞, 闫彦峰, 等. 中医药治疗干燥综合征的作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 227-235.

[8] 李方凯, 朱跃兰, 侯秀娟, 等. 活血解毒润燥方对干燥综合征小鼠颌下腺细胞凋亡抑制因子 Survivin 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 84-91.

[9] 程丹丹, 李永明, 侯佳奇, 等. 基于 Treg 细胞功能的稳定性探讨解毒通络生津方对干燥综合征模型鼠免疫调节作用 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志: 1-16 [2022-11-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220619.2244.005.html>

[10] 罗静, 张丽宁, 陈嘉琪, 等. 原发性干燥综合征患者舌象特点及其与证候的相关性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3653-3656.

[11] 罗静, 张丽宁, 陈嘉琪, 等. 原发性干燥综合征中医证候特点及其与疾病活动指数的相关性 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(6): 674-679.

[12] BILL R M, HEDFALK K. Aquaporins - expression, purification and characterization [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2021, 1863(9): 183650.

[13] 张迪, 张冬梅, 陆瑞敏, 等. 基于“肺主行水”理论探究小青龙汤调节肺水转运蛋白的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 1-11.

[14] 冯小聪, 黄唯, 周世卿, 等. 鼻敏方通过 NF- κ B 信号通路对肺脾气虚变应性鼻炎大鼠鼻黏膜水通道蛋白 5 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 81-88.

[15] 郝桂锋, 温成平, 李涯松. 不同清热中药对干燥综合征小鼠颌下腺水分子转运功能的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 178-181.

[16] 王月, 彪雅宁, 储心乔, 等. 车前子对腹泻大鼠炎症因子和结肠组织 AQP4 mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 52-58.

[17] TSUBOTA K, HIRAI S, KING L S, et al. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome [J]. Lancet, 2001, 357(9257): 688-689.

[18] 阮光峰. 水通道蛋白 5 在干燥综合征发病机制中的作用研究进展 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2016, 37(2): 113-117.

[19] 王领, 张娜, 王艳玲, 等. 原发性干燥综合征患者唇腺

- 组织水通道蛋白5的表达及意义[J]. 上海交通大学学报:医学版,2020,40(10):1425-1429.
- [20] 周瑾,周全,李纪高,等. 增液润燥汤对干燥综合征模型小鼠颌下腺INF- γ 、TNF- α 及水通道蛋白5的影响[J]. 中医学报,2020,35(11):2407-2411.
- [21] GOULES A V, TZIOUFAS A G. Primary Sjögren's syndrome: Clinical phenotypes, outcome and the development of biomarkers[J]. *Immunol Res*, 2017, 65(1):331-344.
- [22] 巩思静,王旭,高丽霞,等. 干燥综合征动物模型研究进展[J]. 中华风湿病学杂志,2022,26(2):130-133.
- [23] HWANG S H, WOO J S, MOON J, et al. IL-17 and CCR9+ $\alpha_4\beta_7$ -Th17 cells promote salivary gland inflammation, dysfunction, and cell death in Sjögren's syndrome[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:721453.
- [24] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息,2010(5):52-53.
- [25] CHISHOLM D M, MASON D K. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's disease [J]. *J Clin Pathol*, 1968, 21(5):656-660.
- [26] MARIETTE X, CRISWELL L A. Primary Sjögren's syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(10):931-939.
- [27] SKARLIS C, RAFTOPOULOU S, MAVRAGANI C P. Sjogren's syndrome: Recent updates [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(2):399.
- [28] LÓPEZ-VILLALOBOS E F, MUÑOZ-VALLE J F, PALAFOX-SÁNCHEZ C A, et al. Cytokine profiles and clinical characteristics in primary Sjögren's syndrome patient groups[J]. *J Clin Lab Anal*, 2021, 35(2):e23629.
- [29] AHN H, JI Y W, JUN I, et al. Comparison of treatment modalities for dry eye in primary Sjögren's syndrome [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(2):463.
- [30] SARAUX A, PERS J O, DEVAUCHELLE-PENSEC V. Treatment of primary Sjögren syndrome [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(8):456-471.
- [31] BRITO-ZERÓN P, RETAMOZO S, KOSTOV B, et al. Efficacy and safety of topical and systemic medications: A systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of Sjögren's syndrome [J]. *RMD Open*, 2019, 5(2):e001064.
- [32] BOWMAN S J, FOX R, DÖRNER T, et al. Safety and efficacy of subcutaneous ianalumab (VAY736) in patients with primary Sjögren's syndrome: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b dose-finding trial [J]. *Lancet*, 2022, 399(10320):161-171.
- [33] SEROR R, NOCTURNE G, MARIETTE X. Current and future therapies for primary Sjögren syndrome[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(8):475-486.
- [34] SARAUX A, DEVAUCHELLE-PENSEC V. Primary Sjögren's syndrome: New beginning for evidence-based trials[J]. *Lancet*, 2022, 399(10320):121-122.
- [35] 徐愿,罗静,韩曼,等. 中医药治疗风湿免疫领域临床优势病种的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(9):198-204.
- [36] WEI S J, HE Q M, ZHANG Q, et al. Traditional Chinese medicine is a useful and promising alternative strategy for treatment of Sjogren's syndrome: A review [J]. *J Integr Med*, 2021, 19(3):191-202.
- [37] LI S, OU R, LIU D, et al. Is Chinese herbal formula (nourishing Yin therapy) effective and well tolerated as an adjunct medication to hydroxychloroquine in the treatment of primary Sjögren's syndrome? A Meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2022, 13:20406223221077966.
- [38] ZENG Y, PENG X, WANG Y, et al. Therapeutic effect of modified zengye decoction on primary Sjogren's syndrome and its effect on plasma exosomal proteins [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:930638.
- [39] 张丽宁,姚传辉,罗静,等. 原发性干燥综合征中医治疗经验荟萃[J]. 中华中医药杂志,2021,36(5):2588-2592.
- [40] 葛琳,姜泉,张华东,等. 益胃汤加味方对原发性干燥综合征疲劳症状的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12):121-125.
- [41] 李增变,周全,张国胜,等. 基于津液代谢理论观察沙参麦冬汤联合白芍总苷胶囊治疗原发性干燥综合征 [J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(20):100-104.
- [42] LI C Y, WU S L, SUN L X, et al. Protective effect of Zengye Decoction (增液汤) on submandibular glands in nonobese diabetic mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(1):45-50.
- [43] 石艳阁. 养阴清肺汤加减结合滋阴生津润燥汤治疗干燥综合征(燥热阴亏型)的疗效观察[J]. 医学理论与实践,2022,35(13):2221-2223.
- [44] 郭伟民,项德坤,贾军峰,等. 益气养阴、化痰祛风方对原发性干燥综合征患者外分泌腺功能、炎症因子及免疫功能影响[J]. 世界中西医结合杂志,2022,17(3):546-550.
- [45] 程增玉,徐浩东,庞枫韬,等. 路志正从阴火论治干燥综合征经验[J]. 中医杂志,2022,63(6):516-520.
- [46] 徐浩东,唐晓颇,程增玉,等. 基于“燥气流行,肝木受邪”理论探讨从肝论治干燥综合征[J]. 北京中医药大学学报,2022,45(8):860-864.

- [47] 刘念,杨小黎,尹飞,等. 从“阴燥”立论探讨扶阳法治燥痹的理论依据[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3924-3928.
- [48] 李黔云,许雪梅,肖勇洪. 从郁燥论治干燥综合征[J]. 国际中医中药杂志, 2022, 44(7): 811-813.
- [49] 刘棒,施卫民,李正富. 范永升“通阳化饮法”治疗干燥综合征思路探析[J]. 浙江中医杂志, 2022, 57(8): 561-562.
- [50] 徐江喜,沈正东,杜芸,等. 从“玄府主气液宣通”论治干燥综合征[J]. 四川中医, 2022, 40(7): 45-48.
- [51] 沈正东,徐江喜,张赛,等. 从升降相因诊治干燥综合征[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(7): 3901-3904.
- [52] 陈嘉琪,贺倩,陈光耀,等. 陶庆文治疗原发性干燥综合征处方用药规律分析[J]. 中日友好医院学报, 2021, 35(6): 365-366.
- [53] 吴子华,黄子玮,陈嘉琪,等. 化湿润燥方治疗原发性干燥综合征的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志 2023, doi:10. 13422/j. cnki. syfjx. 20231593.
- [54] 石寿棠. 医原[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1983.
- [55] HU J, ANDABLO-REYES E, MIGHELL A, et al. Dry mouth diagnosis and saliva substitutes-A review from a textural perspective[J]. J Texture Stud, 2021, 52(2): 141-156.
- [56] BHATTARAI K R, JUNJAPPA R, HANDIGUND M, et al. The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions [J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(4): 376-390.
- [57] TZARTOS J S, STERGIOU C, DAOUSSIS D, et al. Antibodies to aquaporins are frequent in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. Rheumatology (Oxford), 2017, 56(12): 2114-2122.
- [58] LAI Z, YIN H, CABRERA-PÉREZ J, et al. Aquaporin gene therapy corrects Sjögren's syndrome phenotype in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(20): 5694-5699.
- [59] MUROI S I, ISOHAMA Y. C-terminal domain of aquaporin-5 is required to pass its protein quality control and ensure its trafficking to plasma membrane [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13461.
- [60] LEE S M, LEE S W, KANG M, et al. FoxO1 as a Regulator of Aquaporin 5 Expression in the Salivary Gland[J]. J Dent Res, 2021, 100(11): 1281-1288.
- [61] KONTTINEN Y T, TENSING E K, LAINE M, et al. Abnormal distribution of aquaporin-5 in salivary glands in the NOD mouse model for Sjögren's syndrome[J]. J Rheumatol, 2005, 32(6): 1071-1075.
- [62] DELPORTE C, STEINFELD S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(8): 1061-1070.
- [63] DELPORTE C, SOYFOO M. Aquaporins: Unexpected actors in autoimmune diseases [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(8): 103131.
- [64] TZARTOS J S, STERGIOU C, DAOUSSIS D, et al. Antibodies to aquaporins are frequent in patients with primary Sjögren's syndrome [J]. Rheumatology (Oxford), 2017, 56(12): 2114-2122.
- [65] LEE A, YOO D K, LEE Y, et al. Induction of anti-aquaporin 5 autoantibody production by immunization with a peptide derived from the aquaporin of prevotella melanogenica leads to reduced salivary flow in mice [J]. Immune Netw, 2021, 21(5): e34.

[责任编辑 王鑫]