

· 临床 ·

清热化痰滋阴方对狼疮患者外周血淋巴细胞凋亡 及相关基因表达的影响

梁 卫*, 蔡 鹰, 张丽玲, 唐永明, 龚 林, 金 琳, 蒋克春
(中国人民解放军第 454 医院中医科, 江苏南京 210002)

[摘要] 目的:探讨中药清热化痰滋阴方对系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血淋巴细胞凋亡及相关基因(Fas, Bcl-2)表达的影响。方法:临床筛选 SLE 患者 80 例,完全随机分为治疗组(清热化痰滋阴方配合激素组)和对照组(单用激素组)各 40 例,服药 3 个月,淋巴细胞分离液分离治疗前后 SLE 患者外周血淋巴细胞,采用流式细胞仪检测淋巴细胞凋亡率;采用 Rt-PCR 法检测淋巴细胞 Fas, Bcl-2 基因表达情况。结果:清热化痰滋阴方治疗后 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率较治疗前明显下降($P < 0.01$),并明显低于对照组($P < 0.01$);两组治疗后 Fas, Bcl-2 基因的表达均明显下降,治疗组 Fas 基因的表达明显低于对照组($P < 0.01$)。结论:清热化痰滋阴方可能通过降低 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率,下调淋巴细胞 Fas, Bcl-2 基因的表达水平,改善免疫紊乱而发挥作用。

[关键词] 清热化痰滋阴方;系统性红斑狼疮;凋亡;Fas 基因;Bcl-2 基因

[中图分类号] R285.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)02-0116-04

The Effect of Qingrehuayuzi Yin Prescription on Lymphocyte Apoptosis and Expression of Fas and Bcl-2 in Peripheral Blood in the Patients with Systemic Lupus Erythematosus

LIANG Wei*, CAI Ying, ZHANG Li-ling, TANG Yong-ming, GONG Ling, JIN Lin, JIANG Ke-chun
(Department of Traditional Medicine, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Qingrehuayuzi Yin prescription on lymphocyte apoptosis and expression of Fas and Bcl-2 in peripheral blood in the patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods:** Eighty patients with SLE were selected and divided randomly into two groups, 40 in the therapy group and 40 in control group respectively. Patients were got the treatment of Qingrehuayuzi Yin prescription combined hormone as therapy group and got hormone treating only as control group. After treating three months, the patients lymphocyte were collected and the rate of apoptosis were detected by flow cytometer. Meanwhile, the expression of Fas and Bcl-2 were analyzed by RT-PCR. **Results:** After 3 months treating, the rate of lymphocyte apoptosis was decreased significantly in therapy group compared with that in control group and with that in pre-treating ($P < 0.01$). The expression of Fas and Bcl-2, compared with that in control group, were also decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** Qingrehuayuzi Yin prescription is useful for treating SLE by suppressing lymphocyte apoptosis, decreasing the level of Fas and Bcl-2 in peripheral blood and further modifying the immune status.

[Key words] Systemic lupus erythematosus; Qingrehuayuzi Yin prescription; apoptosis; Fas; Bcl-2

[收稿日期] 2009-08-04

[基金项目] 南京军区“十一五”攻关课题资助项目(06MA73)

[通讯作者] *梁 卫, Tel: (025)80865466; E-mail: Liangwei69@163.com

系统性红斑狼疮(SLE)是一种多因素参与的多脏器多系统损害并伴有多种免疫学异常的自身免疫性疾病。目前多用激素、免疫抑制剂治疗,但副作用较多。2006年~2008年以来,我们针对SLE活动期以血热瘀毒,肾虚阴亏证为多见,采用清热化痰滋阴方配合激素治疗SLE患者,疗效较好。淋巴细胞凋亡异常及其调控基因Fas,Bcl-2的表达异常与SLE发病密切相关,本研究观察了药物干预对SLE患者外周血淋巴细胞凋亡率及Fas,Bcl-2基因表达的影响,探讨其药效作用机理。

1 材料与方法

1.1 研究对象 80例病例均符合1992年美国风湿病协会制定的SLE诊断标准^[1];中医证候诊断标准参照《中药(新药)临床研究指导原则》^[2]属“热毒、血瘀、阴虚”证者。排除妊娠期、哺乳期妇女,合并有心、肝、肾、肺、脑、造血系统有严重损伤或感染者。完全随机分为治疗组、对照组各40例。治疗组男6例,女36例;年龄18~60岁,平均30.5岁;病程2个月~5年,平均2.0年。对照组40例,男5例,女35例;年龄18~58岁,平均29.9岁;病程3个月~6年,平均2.3年。两组间一般资料经统计学分析无显著性差异,有可比性。

1.2 试剂及仪器 强的松由南京白敬宇制药有限公司生产(国药准字H32022566,批号061203);淋巴细胞分离液、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒均购于深圳晶美生物工程有限公司;流式细胞仪为美国B&G公司生产;9600型PCR仪购自美国PE公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;Taq酶、dNTP、反转录试剂盒购自Promega公司。

1.3 分组与治疗 治疗组采用清热化痰滋阴方与强的松治疗。清热化痰滋阴方组成:水牛角片15g(先煎),生地10g,丹皮12g,赤芍12g,白花蛇舌草20g,青风藤15g,秦艽10g,紫草15g,炒白术10g。每日1剂,分2次服。强的松用法用量同对照组。对照组口服强的松治疗,强的松30mg·d⁻¹,顿服。两组均以3个月为1个疗程。

1.4 SLE患者外周血淋巴细胞的分离 分别抽取患者服药前及服药3个月后清晨空腹时肘静脉血2mL,置100g·L⁻¹EDTA抗凝的无RNA酶的试管中,用生理盐水溶液对倍稀释,缓慢加入2mL淋巴细胞分离液之上,2000r·min⁻¹离心20min,取淋巴细胞层。加0.9%NaCl溶液稀释洗涤,

1500r·min⁻¹离心15min,弃上清。再加1mL0.9%NaCl溶液稀释混匀,移入1.5mLEppendorf管,1500r·min⁻¹离心10min,弃上清。

1.5 流式细胞仪检测SLE患者外周血淋巴细胞凋亡率 制备外周血淋巴细胞,去离子水按1:4稀释结合缓冲液,用预冷PBS洗细胞2次,用250μL结合缓冲液重悬细胞,浓度为1×10⁶mL⁻¹,取100μL细胞悬液于5mL流式管中,加5μLAnnexin V-FITC和10μL20μg·mL⁻¹碘化丙锭溶液,混匀后于室温避光孵育15min,加400μLPBS,流式细胞仪分析结果。

1.6 SLE患者外周血淋巴细胞Fas、Bcl-2基因表达的检测

1.6.1 淋巴细胞总RNA的提取 分离外周血淋巴细胞,加1mLTrizol,吹打后,静置10min。加200μL氯仿,振荡15s,室温放置5min,于4℃、12000r·min⁻¹离心15min。移上清入1.5mLEP管中,加入等体积异丙醇,混匀,室温放置10min,4℃、12000r·min⁻¹离心10min。弃上清,加75%乙醇1mL洗涤沉淀,于4℃、7500r·min⁻¹离心5min,尽可能将乙醇吸净,干燥3min,用20μL无RNA酶水溶解沉淀。将RNA样品1:20稀释后,用紫外分光光度计在260nm处测定其浓度及A260/A280值。5μL RNA样品用2.0%琼脂糖进行电泳,观察RNA的完整性。

1.6.2 RT-PCR反应 取总RNA2μg,按照Promega A3500反转录试剂盒操作说明进行反转录。反应体系为:5×AMV Buffer 5μL,10mmol·L⁻¹,dNTP 2.5μL,RNasin 1μL(10U·μL⁻¹),Random primer 1μL,AMV反转录酶1μL(10U·μL⁻¹),加无RNA酶水至25μL。37℃反应60min,94℃灭活5min。以cDNA为模板进行PCR扩增反应。引物由上海英骏生物技术公司合成,序列如下,Fas(238bp):上游引物:TGCCAAGAAGGGAAGGAGTA;下游引物:TGGTGTTCCTGGTGAGTGTG;Bcl-2(318bp):上游引物:CGACGACTTCTCCC GCCGCTACCGC;下游引物:CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC;β-actin(548bp):上游引物:GGGACCTGACTGACTACCTCAT;下游引物:GGACTCGTCATACTCCTGCTTG。取反转录的cDNA作为模板进行PCR扩增,反应体系为:10×Buffer 2.5μL,dNTP(10mmol·L⁻¹)1μL,MgCl₂(25mmol·L⁻¹)1.5μL。上游引物(10pmol

· L⁻¹) 2 μL, 下游引物 (10 pmol · L⁻¹) 2 μL, Taq DNA polymerase (5 U · μL⁻¹) 0.2 μL, cDNA 模板 1 μL, 加无 RNA 酶水至 25 μL。反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 45 s, 58℃ 60 s, 72℃ 60 s, 40 个循环, 72℃ 延伸 7 min。产物 4℃ 备用。2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭浸泡染色 20 min, 在紫外灯下显色并用 Acdsee 5.0 中文版凝胶成像分析系统进行光密度扫描, 测定其相对吸光度, 以目的基因光密度值与对应和内参基因光密度值的比值作为半定量指标。

1.7 统计学方法 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 计量资料数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数之间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 清热化痰滋阴方对 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡的影响 治疗组 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率治疗后较治疗前明显下降 (*P* < 0.01), 并明显低于对照组, 两者有显著性差异 (*P* < 0.01), 见表 1。

表 1 清热化痰滋阴方对 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 40, \%$)

组别	治疗前	治疗后
治疗组	11.97 ± 3.08	2.26 ± 0.62 ^{1,2)}
对照组	13.11 ± 2.58	6.35 ± 1.46 ¹⁾

注: 与本组治疗前比较¹⁾ *P* < 0.01; 与对照组比较, ²⁾ *P* < 0.01 (下同)

2.2 清热化痰滋阴方对 SLE 患者外周血淋巴细胞 Fas, Bcl-2 基因表达的影响 活动期 SLE 患者外周血淋巴细胞 Fas, Bcl-2 基因表达明显升高, 清热化痰滋阴方联合激素治疗后外周血淋巴细胞 Fas, Bcl-2 基因表达较治疗前显著下降 (*P* < 0.01), 且 Fas 基因的表达明显低于对照组 (*P* < 0.01)。单用激素组 Fas 基因表达治疗后较治疗前显著性下降 (*P* < 0.01), Bcl-2 基因表达治疗前后无显著性差异 (*P* > 0.05), 见表 2。

表 2 清热化痰滋阴方对 SLE 患者外周血淋巴细胞 Fas, Bcl-2 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 40$)

组别	Fas		Bcl-2	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	0.651 ± 0.12	0.361 ± 0.11 ^{1,2)}	0.237 ± 0.76	0.204 ± 0.36 ¹⁾
对照组	0.632 ± 0.15	0.472 ± 0.21 ¹⁾	0.221 ± 0.72	0.217 ± 0.43

3 讨论

SLE 是一种全身性多器官的自身免疫病, 近年研究认为 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡加速, 并与

SLE 的疾病活动程度呈正相关^[3]。当细胞凋亡增多时, 吞噬细胞不能迅速吞噬凋亡小体, 凋亡小体膜破裂, 其内含的核小体释放入血, 刺激机体产生抗 DNA 等多种自身抗体^[4]。核小体作为自身抗原也可刺激机体产生核小体抗体, 两者结合形成免疫复合物, 沉积于肾小球基底膜、血管内膜等各组织器官, 造成严重的免疫病理损伤^[5]。

Fas, Bcl-2 是细胞凋亡的重要调控基因。Fas 属于 TNF/NGF 受体家族成员, Fas 与 Fas 配体结合可以诱导细胞凋亡; Bcl-2 是原癌基因, 对细胞凋亡起抑制作用, 均与 SLE 发病密切相关。Eneslatt K 等发现 SLE 患者单核细胞和淋巴细胞的 mFas, mFasL 表达水平均高于正常健康对照^[6]。Bijl M 等指出 SLE 患者 mFas 表达增加是淋巴细胞活化的结果, mFas 表达率增加导致了淋巴细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性增加, 引起淋巴细胞凋亡率增高^[7]。Alvarado 等报道 Bcl-2 转基因鼠的 B 细胞寿命延长, 自身反应性 B 细胞克隆选择性受抑, 产生抗多种核酸成分的自身抗体, 发展为 SLE 样综合征^[8]。Xje M 等研究表明活动期 SLE 患者外周血 T 细胞及 B 细胞表达的 Bcl-2 蛋白多于非活动期患者及正常对照组, 且 Bcl-2 蛋白的量与疾病活动性呈正相关^[9]。由此可见 SLE 发病与淋巴细胞凋亡增多及 Fas, Bcl-2 基因表达的增高密切相关。

本项实验研究探讨了清热化痰滋阴方对 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率及其相关基因 Fas, Bcl-2 表达的影响。实验结果显示, 清热化痰滋阴方配合激素能明显降低 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率, 并显著低于单用激素组; 进一步研究发现, 该方能明显下调 Fas, Bcl-2 基因的表达, 且 Fas 基因的表达显著低于对照组。研究结果表明: 清热化痰滋阴方具有清热凉血、解毒散瘀、养阴扶正的作用, 可能通过减少淋巴细胞 Fas 基因的表达, 降低 SLE 患者外周血淋巴细胞凋亡率, 减少凋亡小体及自身抗体产生; 同时下调 Bcl-2 基因的表达, 缩短自身反应性 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞的存活时间, 减少自身抗体产生, 从而调节免疫紊乱, 使病情趋于稳定, 发挥治疗作用。

[参考文献]

[1] Wallace DJ, Haha BH Lupus erythematosus [M]. 5th ed. Baltimore Wialliams, 1997. 627.
 [2] 中华人民共和国卫生部. 中药 (新药) 临床研究指导原则 [S]. 1993, 221.

- [3] Mevorach D. Systemic lupus erythematosus and apoptosis: a question of balance [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2003, 25(1):49.
- [4] 张兴民, 蒋明, 郑德先. 细胞凋亡与系统性红斑狼疮 [J]. 国外医学免疫学分册, 1998, 21(3):148.
- [5] Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, *et al.* Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2004, 30(3):529.
- [6] Eneslatt K, Rantapaa-Dahlqvist S, Uddhammar A, *et al.* The regulation of FasL expression a distinguishing feature between monocytes and T lymphocytes/NK cells with possible implications for SLE [J]. J Clin Immunol, 2001, 21(3):183.
- [7] Bijl M, Horst G, Limburg PC, *et al.* Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity [J]. Lupus JT Lupus, 2001, 10(12):866.
- [8] Alvarado C, Alarcon Riquelme ME, Alcocer Varela J, *et al.* Participation of the Bcl-2 and Fas molecules in experimental apoptosis of spleen B lymphocytes [J]. Rev Inves Clin. 1997, 49(3):171.
- [9] Xje M, Liu CT, Wang ZL. Apoptosis and Fas/bcl-2 expression in peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus [J]. J Chin Med, 1999, 112(12):1072.