

# 拟黑多刺蚁活性组分对系统性红斑狼疮的 治疗作用及机制

毛长智<sup>1</sup>, 何俊慧<sup>2</sup>, 李冬梅<sup>2</sup>, 何飞<sup>2</sup>, 陆国寿<sup>2</sup>, 胡筱希<sup>2</sup>, 韦桂宁<sup>2\*</sup>

(1. 南宁市第三人民医院, 南宁 530003;

2. 广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022)

**[摘要]** **目的:** 采用动物模型和细胞模型, 探讨拟黑多刺蚁活性组分 (AFPV) 对系统性红斑狼疮 (SLE) 的作用及可能机制。**方法:** 采用大鼠 Arthus 反应, 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 醋酸泼尼松组 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), AFPV 高、中、低剂量组 ( $400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。采用牛血清蛋白-弗氏完全 (不完全) 佐剂复制 SLE 模型。观察 AFPV 对 SLE 大鼠背部皮肤红肿直径的影响, 酶联免疫吸附测定检测血清抗双链 DNA (dsDNA) 抗体, 补体 3 (C3), 补体 4 (C4), 免疫球蛋白 M (IgM), 白细胞介素-1 (IL-1), 白细胞介素-6 (IL-6), 白细胞介素-31 (IL-31), 白细胞介素-33 (IL-33) 水平; 免疫磁珠法分选 16~18 周 MRL/lpr 狼疮小鼠和 C57BL/6J 正常小鼠脾脏  $\text{CD4}^+$  T 细胞, 观察 AFPV 对 miR-200a, miR-155 的表达及沉默 E 盒锌指结合蛋白 1 (ZEB1) 和细胞因子信号转导抑制因子 1 (SOCS1) 水平的影响, 探讨 AFPV 对 SLE 的作用及可能机制。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠背部皮肤红肿直径显著增大 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, AFPV 高、中剂量组可显著降低 SLE 大鼠背部皮肤红肿直径 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与正常组比较, 模型组大鼠血清 IgM, IL-6, IL-33 明显增高 ( $P < 0.05$ ), 与模型组大鼠比较, AFPV 高、中剂量组 IgM, IL-6, IL-33 明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与正常组比较, MRL/lpr 狼疮小鼠的  $\text{CD4}^+$  T 细胞 miR-200a 的表达显著降低, miR-155 的表达显著增高及 ZEB1 水平显著增高而 SOCS1 的表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, AFPV 干预后 miR-200a 的表达显著增高, miR-155 的表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), ZEB1 水平显著降低而 SOCS1 的表达显著增高 ( $P < 0.01$ )。**结论:** AFPV 对 SLE 大鼠具有一定的治疗作用, 其机制可能与其对 miR-200a, miR-155 及 ZEB1 和 SOCS1 的调节有关。

**[关键词]** 拟黑多刺蚁活性组分; 系统性红斑狼疮; Arthus 反应;  $\text{CD4}^+$  T 细胞

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0065-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191703

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1644.003.html>

**[网络出版时间]** 2019-05-16 17:19

## Effect and Mechanism of Active Fraction of *Polyrhachis vicina* in Treatment of Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

MAO Zhang-zhi<sup>1</sup>, HE Jun-hui<sup>2</sup>, LI Dong-mei<sup>2</sup>, HE Fei<sup>2</sup>, LU Guo-shou<sup>2</sup>, HU Xiao-xi<sup>2</sup>, WEI Gui-ning<sup>2\*</sup>

(1. Nanning Third People's Hospital, Nanning 530003, China;

2. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of an active fraction of *Polyrhachis vicina* (AFPV) on systemic lupus erythematosus (SLE) and its possible mechanism based on animal and cell models. **Method:** Totally 60 SD rats were randomly divided into normal control group, model group, prednisone acetate group ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and high, medium and low-dose AFPV groups ( $400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). SLE model was

**[收稿日期]** 20190208(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81360653, 81560663, 81703769); 广西科技计划项目 (2018GXNSFDA281046, 桂科 AD18216002, 2011GXNSFA018258)

**[第一作者]** 毛长智, 副主任药师, 从事医院药学研究, E-mail: 339581018@qq.com

**[通信作者]** \* 韦桂宁, 硕士, 主任药师, 从事中药药理毒理研究, Tel: 0771-5869102, E-mail: weiguining2004@163.com

replicated with bovine serum albumin-Freund's complete (incomplete) adjuvant. Arthus reaction was observed to study the effect of AFPV on the diameter of back skin redness in rats with SLE. The expressions of anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibody, complements 3 (C3), complement 4 (C4), immunoglobulin M (IgM), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-31 (IL-31) and interleukin-33 (IL-33) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from the spleens of MRL/lpr and C57BL/6J mice at the age of 16 to 18 weeks by immunomagnetic beads method. The expressions of miR-200a and miR-155 and the levels of zinc-finger-enhancer binding protein 1 (ZEB1) and suppressor of cytokine signaling1 (SOCS1) in CD4<sup>+</sup> T cells were observed to explore the effect of AFPV on SLE and its possible mechanism.

**Result:** Compared with the normal group, the diameter of back skin swelling in the model group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the high and medium-dose AFPV groups significantly reduce the skin redness on the back of SLE rats ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Compared with the normal group, the serum levels of IgM, IL-6 and IL-33 were significantly increased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the serum levels of IgM, IL-6 and IL-33 were significantly decreased after the intervention of AFPV ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, the expression of miR-200a was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and its target protein ZEB1 was significantly increased ( $P < 0.01$ ) in the CD4<sup>+</sup> T cells of MRL/lpr lupus mice. Compared with the model group, the expression of microRNA-200a increased significantly, the expression of microRNA-155 decreased significantly ( $P < 0.01$ ), the level of ZEB1 decreased significantly, and the expression of SOCS1 increased significantly after AFPV intervention ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** AFPV has therapeutic effect on rats with SLE, its mechanism may be related to the regulation of miR-200a/ZEB1 and miR-155/SOCS1.

**[Key words]** active fraction of *Polyrhachis vicina*; systemic lupus erythematosus (SLE); Arthus reaction; CD4<sup>+</sup> T cells

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多系统、多器官并有多种自身抗体出现的自身免疫性疾病,由于体内有大量致病性自身抗体和免疫复合物而造成组织损伤,临床上可出现各个系统和脏器损伤的表现,如皮肤、关节、浆膜、心脏、肾脏,中枢神经系统、血液系统等。该病在世界范围内很多地方,成人患病率为80/10万~100/10万,女性、非白人种族、社会经济地位低下人群患病率较高,育龄妇女为发病高峰,老人及儿童也可患病<sup>[1-3]</sup>。SLE还是肾功能衰竭等的重要致病因素,严重危害人类健康。

拟黑多刺蚁,又称鼎突多刺蚁、俗称黑蚂蚁,是指蚁科多刺蚁属昆虫,中国南方各省均有分布。拟黑多刺蚁,味咸、酸,性平;归肝、肾经;具补肾益精,通经活络,解毒消肿之功效;主治肾虚头晕耳鸣,失眠多梦,阳痿遗精,风湿痹痛,中风偏瘫,手足麻木,红斑狼疮,毒蛇咬伤等。拟黑多刺蚁在玄驹珍丸、蚁力康胶囊等方中均为君药,有扶正固本的功效。拟黑多刺蚁活性组分(AFPV)为拟黑多刺蚁经过醇提、石油醚萃取物,具有较好的药理活性,前期研究结果表明,AFPV具有抗痛风、抗抑郁、止痒作用,其机制主要与抗炎及抗氧化应激有关<sup>[4-8]</sup>。虽有文献报道其对红斑狼疮具有一定的治疗作用,但文献

较少。本研究通过大鼠 Arthus 反应和 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 细胞,观察 AFPV 对 SLE 的治疗作用及可能机制,以期研制具有独立知识产权的抗 SLE 药物提供一定的药理学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠,体质量 180~220 g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2014-0002;MRL/lpr 狼疮小鼠和 C57BL/6J 小鼠,由南京大学提供,动物合格证号 SCXK(苏)2010-0001,伦理审查批准编号 2018101801。

**1.2 药物与试剂** AFPV 由广西中医药研究院配制;醋酸泼尼松(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 180182);弗氏完全佐剂,弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBF9338V,SLBM7415V);牛血清蛋白(北京索莱宝科技有限公司,批号 A1080);大鼠免疫球蛋白(Ig)M,大鼠补体 3(C3),C4,血清抗双链 DNA(dsDNA),白细胞介素(IL)-1,IL-6,IL-31,IL-33,IgM 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 CK-E30443R,CK-E30235R,CK-E30443R,CK-E30721R,CK-E30076R,CK-E30418R,CK-E30646R,CK-E93759R,CK-E93645);沉默 E 盒锌指结合蛋白

1(ZEB1)和细胞因子信号转导抑制因子 1(SOCS1)抗体(德国 Novus 公司,批号分别为 NBPI-05987, NB100-56637SS);PCR 引物由广州市锐博生物科技有限公司设计合成。

**1.3 仪器** Synergy H1 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);LightCycler 480 II 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司);TDL-5000B 型低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);FA1004 型电子天平(上海精科天平仪器厂);Wes™ 型全自动蛋白质定量分析系统(美国 Protein Simple 公司)。

## 2 方法

### 2.1 AFPV 对大鼠 Arthus 反应的影响<sup>[9]</sup>

**2.1.1 分组、造模及给药** 取健康 SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组,分别为正常组,模型组,醋酸泼尼松组( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),AFPV 高、中、低剂量组(400, 200,  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,根据成人日用量设定)。除正常组外,各组大鼠每周肌肉注射 0.2 mL,共 6 次,前 3 次为牛血清蛋白-弗氏完全佐剂,后 3 次为牛血清蛋白-弗氏不完全佐剂,正常组给予蒸馏水。造模开始即给药,每日 1 次,连续给药 28 d。

**2.1.2 各指标检测** 第 28 天大鼠背部皮内注射 1%牛血清蛋白(抗原攻击),每点注射量 0.2 mL。测量抗原攻击后 2, 4, 6, 7 h 大鼠背部皮肤红肿直径,最后各组大鼠眼球取血,测定血清 C3, C4, IgM, dsDNA, IL-1, IL-6, IL-31, IL-33 等的水平。

### 2.2 MRL/lpr 狼疮小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞 miR-200a, miR-155 的表达及 ZEB1 和 SOCS1 水平的影响<sup>[10]</sup>

**2.2.1 CD4<sup>+</sup>T 细胞的制备** 颈椎脱臼法处死 MRL/lpr 狼疮小鼠, C57BL/6J, 无菌环境下取脾脏, 剪碎, 置于 200 目无菌网上, 加入 RPMI 1640 培养基 5 mL, 研磨, 收集细胞悬液,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清, 加入磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 混匀,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清。加入 RPMI 1640 培养基 4 mL 混匀。将单个核细胞悬液离心, 收集细胞, 加入免疫磁珠分选缓冲液 1 mL,  $4\ ^\circ\text{C}$ ,  $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清。用免疫磁珠分选缓冲液  $100\ \mu\text{L}$  重悬细胞, 加入抗 CD4 (L3T4) MicroBeads (小鼠)  $20\ \mu\text{L}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$  共同孵育 15 min。用 10~20 倍重悬细胞体积的分选缓冲液洗涤细胞, 离心 5 min, 弃上清。重复 1 次。细胞重悬于免疫磁珠分选缓冲液, 将分离柱安装到磁场中, 用分选缓冲液预先润柱。将细胞悬液加入到分选柱中, 待自然流出。用 PBS  $500\ \mu\text{L}$  洗分

离柱, 每次自然流出, 共洗柱 3 次。从磁场中取下分离柱, 用 PBS 1 mL 冲出阳性结合 CD4<sup>+</sup>T 细胞。用分选缓冲液重悬洗涤,  $4\ ^\circ\text{C}$ ,  $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清。重复 1 次。用 PBS 重悬洗涤,  $4\ ^\circ\text{C}$ ,  $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清。重复 1 次。用 RPMI1640 培养基将细胞稀释备用。

**2.2.2 Real-time PCR 检测 U6, miR-200a, miR-155 mRNA 的表达** C57BL/6J(B6)鼠的 CD4<sup>+</sup>T 细胞为正常组, MRL/lpr 鼠的 CD4<sup>+</sup>T 细胞为模型组, 选择最适质量浓度的 AFPV( $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + MRL/lpr 鼠的 CD4<sup>+</sup>T 细胞为 AFPV 干预组。孵育 24 h。 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 收集细胞, trizol 法<sup>[9]</sup>提取细胞中的总 RNA, 使用逆转录引物进行反转录, 反转录条件为  $25\ ^\circ\text{C}$  10 min,  $50\ ^\circ\text{C}$  30 min,  $85\ ^\circ\text{C}$  5 min, 以反转录产物为模板进行 PCR 扩增, U6 为内参。PCR 扩增条件为  $95\ ^\circ\text{C}$  5 min;  $95\ ^\circ\text{C}$  10 s,  $55\ ^\circ\text{C}$  30 s,  $72\ ^\circ\text{C}$  30 s, 共 40 个循环; 最后,  $65\ ^\circ\text{C}$  延伸 5 min。以  $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$  表示相对表达量。实验重复 6 次。引物序列为 U6 上游 (17 bp) 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', 下游 (16 bp) 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'; miR-200a 上游 (21 bp) 5'-GCCGTCTAACACTGTCTGGTA-3', 下游 (22 bp) 5'-CCTACGCCACAATTAACAAGCC-3'; miR-155 上游 (24 bp) 5'-CGCCATGTTTAATGCTAATCGTGA-3', 下游 (22 bp) 5'-TTCCAGAAACCGATCAGAGTGT-3'。

**2.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ZEB1 和 SOCS1 蛋白的表达** 分组同 2.2.2 项, 将 CD4<sup>+</sup>T 细胞于 6 孔板中培养, 设为正常组、模型组和给药组。培养过夜, 给药组加入含药培养液, 正常组和模型组加入等体积培养液, 培养 24 h, PBS 润洗 2 次, 离心收集细胞, 加入裂解液于冰上裂解 30 min,  $4\ ^\circ\text{C}$  条件下  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液, 用 BCA 法蛋白定量。使用全自动蛋白质定量分析系统, 按照试剂盒方法加入一抗 ZEB1 (1:40) 和 SOCS1 (1:25) 的蛋白表达量, ZEB1 抗体浓度为使用 Wes 系统软件测定其灰度值, 并计算各组的相对灰度值。

### 2.3 AFPV 的 GC-MS 分析<sup>[11-12]</sup>

**2.3.1 石油醚部位甲脂化** 取石油醚部位, 加苯-石油醚(1:1)20 mL 使之溶解, 再加 KOH-MeOH 溶液( $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )10 mL, 振荡混匀, 在  $40\ ^\circ\text{C}$  下恒温水浴 30 min, 加入超纯水 20 mL, 静置, 待分层清晰后取上清液用丙酮稀释 10 倍作为色谱分析试样。

**2.3.2 气相色谱-质谱联用(GC-MS)条件** HP-5MS 石英毛细管柱( $0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}, 0.25\ \mu\text{m}$ );

程序升温,起始温度 150 °C,3 °C·min<sup>-1</sup>至 260 °C;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样口温度 250 °C;柱前压 100 kPa;进样量 0.10 μL;分流比 10:1;载气为高纯氦气。MS 条件为电离方式 EI;电子能量 70 eV;传输线温度 250 °C;离子源温度 230 °C;四极杆温度 150 °C;质量范围 *m/z* 35~500;采用 wiley7n.1 标准谱库计算机检索定性。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间采用 One-way ANOVA 进

行统计学分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对大鼠 Arthus 反应的影响

**3.1.1 对大鼠 Arthus 反应背部皮肤红肿直径的影响** 抗原攻击后不同时间,与正常组比较,模型组大鼠背部皮肤出现红肿,红肿直径显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,在抗原攻击后 2,4 h,AFPV 400,200 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组的背部皮肤红肿直径明显减小( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 AFPV 对 SLE 大鼠 Arthus 反应背部皮肤红肿直径的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of AFPV on diameter of back skin redness in rats with SLE( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	2 h	4 h	6 h	7 h
正常	-	0	0	0	0
模型	-	6.67 ± 3.34 <sup>1)</sup>	6.46 ± 2.91 <sup>1)</sup>	6.45 ± 3.41 <sup>1)</sup>	4.75 ± 4.33 <sup>1)</sup>
醋酸泼尼松	5	3.80 ± 2.54 <sup>1)</sup>	4.81 ± 3.88	3.86 ± 2.90	3.70 ± 3.56
AFPV	400	3.15 ± 1.86 <sup>3)</sup>	3.46 ± 2.20 <sup>2)</sup>	4.61 ± 4.10	2.36 ± 2.30
	200	3.33 ± 3.29 <sup>2)</sup>	3.90 ± 3.81	6.99 ± 3.49	2.30 ± 2.18
	100	5.99 ± 4.17	6.22 ± 3.71	5.73 ± 4.32	4.15 ± 3.91

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.1.2 对 SLE 大鼠 Arthus 反应血清 IL-1, IL-6, IL-31, IL-33 水平的影响** 与正常组比较,模型组血清 IL-6, IL-33 水平显著增高( $P < 0.01$ ), IL-1 和 IL-33 水

平有升高趋势;与模型组比较,AFPV 400 mg·kg<sup>-1</sup> 可明显降低血清 IL-6, IL-33 水平, AFPV 200 mg·kg<sup>-1</sup> 组可明显降低血清 IL-33 水平( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 AFPV 对 SLE 大鼠 Arthus 反应血清 IL-1, IL-6, IL-31, IL-33 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of AFPV on levels of IL-1, IL-6, IL-31 and IL-33 in serum in rats with SLE( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	IL-1	IL-6	IL-31	IL-33
正常	-	34.80 ± 3.71	20.94 ± 7.93	25.83 ± 4.67	17.94 ± 5.19
模型	-	39.55 ± 11.38	33.24 ± 15.74 <sup>1)</sup>	28.77 ± 7.94	26.72 ± 8.37 <sup>1)</sup>
醋酸泼尼松	5	39.35 ± 9.91	19.36 ± 10.71 <sup>2)</sup>	23.55 ± 5.26	18.07 ± 8.65 <sup>2)</sup>
AFPV	400	37.52 ± 9.97	17.45 ± 7.45 <sup>2)</sup>	23.20 ± 6.22	17.77 ± 8.82 <sup>2)</sup>
	200	38.32 ± 11.44	20.58 ± 9.66	25.57 ± 5.34	19.12 ± 7.03 <sup>2)</sup>
	100	37.03 ± 6.88	21.70 ± 11.53	25.13 ± 5.76	21.47 ± 6.41

**3.1.3 对 SLE 大鼠 Arthus 反应血清 C3, C4, IgM, dsDNA 水平的影响** 与正常组比较, AFPV 模型组血清 IgM 水平明显增高( $P < 0.05$ );与模型组比较, AFPV 400, 200 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量组可明显降低血清 IgM 水平( $P < 0.05$ )。见表 3。

**3.2 对狼疮鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞 miR-200a 和 miR-155 及靶蛋白的影响** 与正常组(B6 鼠脾 CD4<sup>+</sup> T 细胞)比较,模型组(MRL/lpr 狼疮鼠脾 CD4<sup>+</sup> T 细胞)中 miR-200a 表达显著下调, miR-155 的表达显著上调( $P < 0.01$ );与模型组比较,给药组能显著提高

miR-200a 的表达,降低 miR-155 的表达水平( $P < 0.05$ )。见表 4。与模型组比较, AFPV 可以抑制 ZEB1 的蛋白表达,而促进 SOCS1 的表达。见图 1, 2, 表 5。

**3.3 AFPV 拟黑多刺蚁油醚部位的组成及其相对含量** 按照色谱-质谱条件对样品进行分析,获得的拟黑多刺蚁脂溶性成分的总离子流图(见图 3)。各色谱峰相应的质谱图经人工解析及 NIST27 和 NIS~47 谱库检索定性,面积归一法定量,最终共鉴定出多种脂肪酸,含量最多的为十八碳烯酸甲酯。

表 3 AFPV 对 Arthus 反应大鼠血清 C3, C4, IgM, dsDNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of AFPV on levels of C3, C4, IgM and dsDNA in serum of rats with SLE ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	C3/mg·L <sup>-1</sup>	C4/mg·L <sup>-1</sup>	IgM/g·L <sup>-1</sup>	dsDNA/U·mL <sup>-1</sup>
正常	-	128.81 ± 25.20	147.37 ± 10.00	127.30 ± 16.12	38.33 ± 3.24
模型	-	136.83 ± 33.77	137.63 ± 11.61	140.51 ± 7.76 <sup>1)</sup>	37.12 ± 3.96
醋酸泼尼松	5	136.24 ± 24.33	146.02 ± 8.11	128.93 ± 19.07	38.88 ± 2.20
AFPV	400	125.14 ± 15.55	135.49 ± 6.86	123.54 ± 11.27 <sup>2)</sup>	36.74 ± 2.00
	200	130.18 ± 14.65	142.90 ± 8.97	130.06 ± 9.65 <sup>2)</sup>	38.43 ± 1.41
	100	141.33 ± 12.02	146.77 ± 11.17	130.84 ± 13.11	38.72 ± 2.10

表 4 AFPV 对狼疮鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞 miR-200a 和 miR-155 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of AFPV on expression levels of miR-200a and miR-155 in CD4<sup>+</sup>T cells of MRL/lpr lupus mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	miR-200a/GAPDH	miR-155/GAPDH
正常	-	2.08 ± 0.45	0.48 ± 0.11
模型	-	0.55 ± 0.23 <sup>1)</sup>	1.98 ± 0.27 <sup>1)</sup>
AFPV	7.5	0.98 ± 0.18 <sup>2)</sup>	1.12 ± 0.28 <sup>2)</sup>

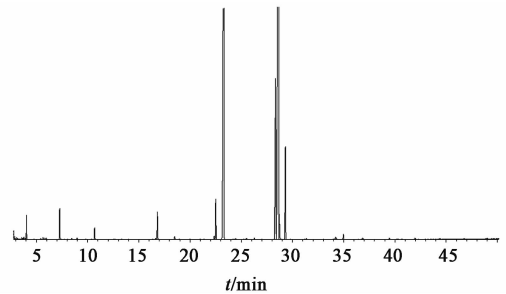
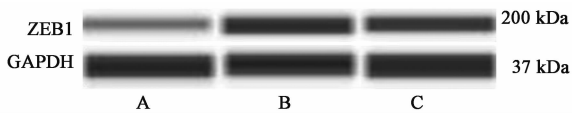


图 3 AFPV 总离子流

Fig. 3 Total ions chromatogram of AFPV analyzed with GC-MS



A. 正常组; B. 模型组; C. AFPV 组(图 2 同)

图 1 狼疮鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞 ZEB1 的蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of AFPV on level of ZEB1 in CD4<sup>+</sup>T cells of MRL/lpr lupus mice

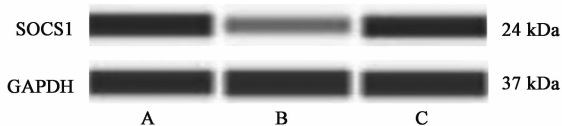


图 2 狼疮鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞 SOCS1 的蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of level of SOCS1 in CD4<sup>+</sup>T cells of MRL/lpr lupus mice

表 5 AFPV 对狼疮鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞 ZEB1 和 SOCS1 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of AFPV on protein expression levels of ZEB1 and SOCS1 in CD4<sup>+</sup>T cells of MRL/lpr lupus mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	ZEB1/GAPDH	SOCS1/GAPDH
正常	-	0.29 ± 0.03	0.63 ± 0.06
模型	-	0.67 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.23 ± 0.10 <sup>1)</sup>
AFPV	7.5	0.43 ± 0.10 <sup>2)</sup>	0.49 ± 0.11 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05。

#### 4 讨论

AFPV 可显著抑制大鼠 Arthus 反应背部皮肤

红肿直径,初步证实,AFPV 具有一定的抗 SLE 作用。AFPV 的成分主要为饱和及不饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸含量较多,这和前期的研究结果一致<sup>[11]</sup>。近年的研究表明,不饱和脂肪酸具有广泛的药理活性,对许多心血管系统疾病、代谢性疾病、免疫性疾病方面具有一定的防治作用<sup>[12]</sup>,AFPV 抗 SLE 的药理活性可能与其有关。SLE 是一种难治性免疫性疾病,目前还没有有效地能根治该病的药物。中药在对 SLE 的治疗具有高效低毒显著的优势,和青蒿素一样<sup>[13]</sup>,AFPV 具有广阔的研究前景。

AFPV 可调节 SLE 小鼠 IL-6, IL-33 及 IgM 水平。文献报道,IL-33 主要刺激免疫细胞产生促炎症细胞因子,介导 Th2 型免疫应答,在炎症反应中发挥重要作用<sup>[14-16]</sup>,IL-6, IL-10 以及 BAFF 和嗜碱性粒细胞诱导产生的 IL-17 促进了 B 细胞的过度激活,使 IgE, IgG, IgM 等抗体过度产生,导致了 SLE 的发病<sup>[17-18]</sup>。因此,AFPV 抗 SLE 作用可能与 IL-33 免疫应答体系有关。为进一步探讨 AFPV 抗 SLE 作用的内在规律,在动物实验成果的基础上,笔者选择一个有效剂量,对 CD4<sup>+</sup>T 细胞相关分子机制进行深入的探讨。研究结果表明,AFPV 可调节狼疮鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞 miR-200a 和 miR-155 及靶蛋白的水平。研究报道,microRNA 在 SLE 患者及动物模型中异常表达,参与 SLE 的发生发展,其中 miR-200a 在 MRL/

lpr 狼疮鼠模型表达下调,通过靶向 ZEB1,促进 SLE 的进展;而 miR-155 在 SLE 患者外周血中表达上调,通过抑制 SOCS1,导致 IL-21 表达上调,促进 SLE 的疾病发展<sup>[19]</sup>。AFPV 影响 MRL/lpr 狼疮鼠脾 CD4<sup>+</sup> T 细胞 miR-200a 和 miR-155 的表达,对 ZEB1 和 SOCS1 的蛋白表达也有显著的影响。提示,AFPV 抗 SLE 作用,其机制可能涉及其对 miR-200a 和 miR-155 等 microRNA 的调节。综上所述,AFPV 为饱和脂肪酸和非饱和脂肪酸,抗 SLE 具有多靶点性,其详实的物质基础和药理活性的分子机制,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Gergianaki I, Bortoluzzi A, Bertias G. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of systemic lupus erythematosus [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2018,32(2): 188-205.

[2] El Qadiry R, Bourrahout A, Aitsab I, et al. Systemic lupus erythematosus-related pancreatitis in children; severe and lethal form [J]. Case Rep Pediatr, 2018,9: e4612754.

[3] Ali A, Sayyed Z, Ameer M A, et al. Systemic lupus erythematosus: an overview of the disease pathology and its management [J]. Cureus, 2018,10(9): e3288.

[4] 何飞,李冬梅,苏启表,等.拟黑多刺蚁活性组分治疗小鼠皮肤瘙痒的实验研究[J].中药材,2018,41(5):1201-1204.

[5] 韦桂宁,曾宪彪,牙启康,等.拟黑多翅蚁抗痛风作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20): 205-208.

[6] 张欣,龙倩,楚世峰,等.拟黑多刺蚁石油醚部位对抑郁大鼠神经炎症反应的抑制作用[J].药学学报,2018,53(7):1042-1047.

[7] SU Q, SU H, NONG Z, et al. Hypouricemic and nephroprotective effects of an active fraction from polyrhachis vicina roger on potassium oxonate-induced hyperuricemia in rats [J]. Kidney Blood Press Res, 2018,43(1): 220-233.

[8] WEI G N, CHU S F, SU Q B, et al. Antidepressant-like effect of active fraction of Polyrhachisvicina Roger in a rat depression model [J]. J Tradit Chin Med, 2018,38(1):12-21.

[9] 王璟,汪悦,夏卫军,等.解毒祛斑汤对大鼠 Arthus 反应的影响[J].中国中医急症,2007,16(2):204-205.

[10] 张萍,刘红云,刘晓燕,等.调节性 T 细胞在小鼠 ITP

发病中的作用[J].中国实验血液学杂志,2016,24(3):784-787.

[11] 罗建蓉,肖怀,张成桂,等.两种药用蜚蠊油脂成分的 GC-MS 分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):55-58.

[12] 杜晨晖,闫艳,朱羽尧,等.山西不同产地酸枣仁中脂肪酸类成分的 GC-MS 分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(24):19-25.

[13] SU Q B, SU H, NONG Z H, et al. Hypouricemic and nephroprotective effects of an active fraction from Polyrhachis vicina Roger on potassium oxonate-induced hyperuricemia in rats [J]. Kidney Blood Press Res, 2018,43(1):220-233.

[14] 曹文婷,孙萍,李华艳,等. n-3 多不饱和脂肪酸在不同疾病中的研究进展[J].山西医药杂志,2014,43(14):1668-1670.

[15] 徐丽敏,陈学荣,屠呦呦.双氢青蒿素对红斑狼疮性 BXS 小鼠的作用[J].中国中西医结合皮肤性病学期刊,2002,1(1):19-20.

[16] MO Y M, FANG P H, WAI K I, et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. Rheumatology (Oxford), 2010,49(3):520-527.

[17] Düster M, Becker M, Gnirck A C, et al. T cell-derived IFN-downregulates protective group 2 innate lymphoid cells in murine lupus erythematosus [J]. Eur J Immunol, 2018,48(8):1364-1375.

[18] GUO J, XIANG Y, PENG Y F, et al. The association of novel IL-33 polymorphisms with sIL-33 and risk of systemic lupus erythematosus [J]. Mol Immunol, 2016,77:1-7.

[19] WAN A W, Mohd Shahrir M S, Asrul W, et al. The association between serum prolactin levels and interleukin-6 and systemic lupus erythematosus activity [J]. Reumatismo, 2018,70(4): 241-250.

[20] Karampetsou M P, Comte D, Suárez-Fueyo A, et al. Signaling lymphocytic activation molecule family member 1 engagement inhibits T cell-B cell interaction and diminishes interleukin-6 production and plasmablast differentiation in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheumatol, 2019,71(1):99-108.

[21] Lashine Y A, Salah S, Aboelenein H R, et al. Correcting the expression of miRNA-155 represses PP2AC and enhances the release of IL-2 in pbmcs of juvenile SLE patients [J]. Lupus, 2015,24(3): 240-247.

[责任编辑 周冰冰]