

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.16.014

滋阴清热方对系统性红斑狼疮小鼠
细胞焦亡相关因子的影响

范萍, 梁康礼, 胡小倩, 凡慧, 程喜平*

(广州医科大学附属第一医院, 广东省广州市沿江西路 151 号, 510120)

摘要 目的 探讨滋阴清热方治疗系统性红斑狼疮的可能作用机制。方法 30 只狼疮鼠随机分为中药组、脂多糖组和模型组各 10 只, 另以正常 C57BL/6J 健康小鼠 10 只为空白组。中药组给予滋阴清热方 20 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 脂多糖组给予脂多糖 8 mg/kg 腹腔注射, 2 天 1 次; 模型组和正常组给予等容积灭菌蒸馏水灌胃, 每日 1 次, 各组均干预 6 周。检测各组小鼠肾组织半胱天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 蛋白及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)、Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达。结果 与空白组比较, 模型组小鼠肾组织 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达升高, NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达亦升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药组小鼠肾组织 IL-1 β 蛋白及 mRNA 表达降低, 而脂多糖组均升高 ($P < 0.05$); 中药组 Caspase-1 和 NLRP3 mRNA 表达与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 滋阴清热方可降低狼疮鼠细胞焦亡炎症因子, 且可能是其治疗系统性红斑狼疮的作用机制之一。

关键词 系统性红斑狼疮; 滋阴清热方; 细胞焦亡; 炎症因子

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是临床常见的自身免疫性疾病, 免疫炎症是其主要特征, 可累及机体主要器官。细胞焦亡是一种新发现的程序性细胞死亡, 具有鲜明免疫炎症特征, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)、半胱天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 及白细胞介素 1 β (IL-1 β) 是细胞焦亡重要的炎症因子^[1]。研究^[2]显示, 细胞焦亡与炎症反应的发生发展密切相关。国医大师禡国维认为, 阴虚内热、虚火上炎是 SLE 的基本病机, 根据多年临床经验总结的滋阴清热方治疗 SLE 疗效确切, 能有效协助撤减激素^[3]。本研究观察了狼疮鼠细胞焦亡炎症因子表现及滋阴清热方对狼疮鼠细胞焦亡炎症因子的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性 B6.MRL-Fas^{lpr}/JnJ 狼疮模型鼠 30 只,

基金项目: 国家自然科学基金 (81673983, 81373649), 广东省自然科学基金 (2014A030313504)

* 通讯作者: expgz@126.com

雌性 C57BL/6J 健康鼠 10 只, SPF 级, 周龄 6~8 周, 狼疮鼠由南京大学-南京生物医药研究院提供, 实验动物合格证编号: 32002100001274; 健康鼠购自广东省实验动物中心, 实验动物合格证编号: 44007200034870。

1.2 实验药物

滋阴清热方组成: 山萸肉 15 g、生地黄 20 g、茯苓 15 g、泽泻 15 g、牡丹皮 15 g、青蒿 8 g、甘草 6 g, 由广州医科大学附属第一医院中药房提供; 脂多糖 (LPS, 批号 378958) 购买于 Sigma 公司。

1.3 主要试剂及仪器

免疫组化一抗 Caspase-1 试剂 (批号 GR87056-1, Abcam 公司), IL-1 β (批号 NP2814081, R&D 公司); 抗鼠二抗 (批号 141020407Q)、抗羊二抗 (批号 141118402D) 和 DAB 显色试剂盒 (批号 1503190014), 购自福州迈新生物技术开发有限公司; Trizol 试剂 (批号 110403, 美国 Thermo 公司); PrimeScriptTM RT reagent Kit (批号 AK5301, TAKALA 公司); KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kits (批号 Z46010013252, Kapa Biosystems 分子生物公

司)。BM-VII 生物组织包埋机及冷冻机和 CS-VI 摊片烤片机, 购自湖北孝感医用仪器有限公司; RM2135 轮转切片机 (德国 Leica 公司); BX61 光学显微镜 (奥林巴斯公司); NanoDrop2000 超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司); 7900HT 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.4 分组及处理方法

30 只狼疮鼠使用 SPSS 13.0 软件随机区组分为中药组、脂多糖组、模型组各 10 只, 10 只健康鼠则作为空白组。中药组给予滋阴清热方 20 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次; 脂多糖组给予脂多糖 8 mg/kg 腹腔注射, 2 天 1 次; 模型组和正常组给予等容积灭菌蒸馏水, 每日灌胃 1 次。各组均干预 6 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 肾组织免疫组化染色 干预 6 周后, 取小鼠肾组织于 4% 多聚甲醛溶液固定, 另取部分肾皮质于 -80℃ 冻存。取各组固定肾组织制作成石蜡切片, 切片厚 4 μm, 一抗为 Caspase-1、IL-1β 多克隆抗体, 二抗为生物素化 IgG 抗体, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 石蜡切片脱蜡至水, 高压修复抗原 2 min 30 s, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶, 正常牛血清 37℃ 封闭 30 min, 滴加 1:200 稀释的一抗 4℃ 过夜, 次日滴加二抗, 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。光学显微镜下观察染色切片, 肾组织观察有棕黄色为阳性信号, 每只小鼠切片标本至少观察 10 个肾小球切面; 采用 Image-Pro Plus 6.0 图文分析系统 (Media Cybernetics 公司), 在高倍镜下 (×200), 选取切面染色均匀, 包含肾小球和肾小管等组织结构的肾皮质切面进行拍片, 每只小鼠分析 1 个标本切片, 每张切片随机选取 10 个切面进行分析, 分别测量出各图片和各指标的阳性区面积、阳性区光密度, 取二者相除后得阳性区平均光密度值^[4]。

1.5.2 肾组织 Real-time PCR 检测 取 -80℃ 冻存的肾皮质, Trizol 提取组织总 RNA。按照 TAKALA 逆转录试剂盒说明书操作, 将所提取的 RNA 逆转录为 cDNA。根据试剂盒步骤, 加样后加入 7900HT 实时荧光定量 PCR 仪, 采用两步法扩增标准程序: 95℃ 预变性 30 s, 变性 3 s; 60℃ 退火 20 s, 共 40 个循环, 按照 95℃ 5 s, 60℃ 15 s, 97℃ 30 s 的条件形成溶解曲线, 检测荧光信号, 以 GAPDH 为内参基因, 以空白组为对照, 得出变化倍数进行数据分析基因的相对表达水平。引物购自上海 Life

Technology 公司, GAPDH: 上游 ACCACAGTCCATGCCATCAC, 下游 TCCACCACCCTGTTGCTGTA; NLRP3: 上游 TCACAACCTCGCCCAAGGAGGAA, 下游 AAGAGACCACGGCAGAAGCTAG; Caspase-1: 上游 GAGAAGAGAGTGCTGAATCAG, 下游 CAA-GACGTGTACGAGTGTTG; IL-1β: 上游 GAGCACCTTCTTTTCCTTCATCTT, 下游 TCACACACCAGCAGGTTATCATC。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据, 结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾组织 Caspase-1、IL-1β 蛋白表达比较

小鼠肾组织免疫组化阳性部位呈棕黄色, 光学显微镜下见 Caspase-1 主要表达在肾小管和肾小球浆内; IL-1β 以分泌型为主, 在肾小管、肾小球和肾间质上都有表达, 空白组基本不表达。表 1 示, 与空白组比较, 模型组、中药组和脂多糖组小鼠肾组织 Caspase-1、IL-1β 阳性区平均光密度值均升高 (*P* < 0.05); 与模型组比较, 中药组小鼠肾组织 IL-1β 阳性区平均光密度值降低, 而脂多糖组明显升高 (*P* < 0.05); 中药组 Caspase-1 阳性区平均光密度值与模型组比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 而脂多糖组较模型组明显升高 (*P* < 0.05)。

表 1 各组小鼠肾组织 Caspase-1、IL-1β 阳性区平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Caspase-1	IL-1β
空白组	10	0.040 ± 0.021	0.012 ± 0.001
模型组	10	0.147 ± 0.136*	0.230 ± 0.197*
中药组	10	0.138 ± 0.008*	0.137 ± 0.156* [△]
脂多糖组	10	0.187 ± 0.012* [△]	0.338 ± 0.223* [△]

注: Caspase-1, 半胱天冬氨酸蛋白酶 1; IL-1β, 白细胞介素 1β; 与空白组比较, * *P* < 0.05; 与模型组比较, [△] *P* < 0.05

2.2 各组小鼠肾皮质 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β mRNA 表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组、中药组及脂多糖组 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β mRNA 表达均升高 (*P* < 0.05); 与模型组比较, 中药组 IL-1β mRNA 表达降低, 脂多糖组 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β mRNA 表达均升高 (*P* < 0.05); 中药组 NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 表达与模型组比较差异无

统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠肾皮质 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NLRP3	Caspase-1	IL-1 β
空白组	10	0.70 $\pm$ 0.47	2.33 $\pm$ 2.00	0.78 $\pm$ 0.47
模型组	10	6.50 $\pm$ 1.90*	14.44 $\pm$ 6.18*	3.62 $\pm$ 1.37*
中药组	10	5.40 $\pm$ 0.55*	22.28 $\pm$ 12.95*	2.33 $\pm$ 0.56* Δ
脂多糖组	10	12.29 $\pm$ 6.49* Δ	27.43 $\pm$ 13.99* Δ	7.72 $\pm$ 2.48* Δ

注: NLRP3, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; Caspase-1, 半胱天冬氨酸蛋白酶 1; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

系统性红斑狼疮以免疫复合物沉积引起的肾组织炎症为主要特征, 主要引起严重的肾小球病变, 导致肾功能下降^[1], 如何有效控制炎症反应是目前控制和减缓 SLE 发展的关键问题。细胞焦亡是一种新的依赖于 Caspase-1 的程序性细胞死亡方式, 细胞焦亡过程中离子膜破坏穿孔, 胞内物质释放到细胞外促进炎症反应, 这个过程伴有大量的促炎因子的产生, 激发机体的免疫反应, 目前有人认为细胞焦亡可能是 SLE 发病机理^[2]。Kahlenberg 等^[3]研究发现, 对比于正常鼠, Caspase-1 失活小鼠抗 ds-DNA 滴度明显减少, 同时可减少免疫复合物的沉积及肾组织炎症, 减少 IL-1 β 表达。NLRP3 炎性小体是一种体内多蛋白复合体, 可诱导促进细胞焦亡发生, 是炎性小体家族的主要成员, 在炎症反应发生和维持中起重要作用^[4]。NLRP3 可募集和激活促炎蛋白 Caspase-1, 将下游 Caspase-1 前体裂解成具有活性的 Caspase-1, Caspase-1 可促进炎症因子 IL-1 β 和白细胞介素 18 (IL-18) 前体成熟释放, 加剧组织免疫炎症, 使细胞在炎症和应激的病理条件下发生死亡^[5]。研究发现, 免疫复合物可触发来源于 SLE 患者巨噬细胞内 NLRP3 炎性小体活化释放增多, 从而导致细胞和组织损伤^[6], NLRP3 炎性小体释放增多, 促进 Caspase-1 释放, 增加 IL-1 β 和 IL-18 表达, 从而导致炎症反应增加^[7]。因此, 细胞焦亡通道的相关炎症因子 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 都与 SLE 炎症反应密切相关。

国医大师禩国维通过 40 年的临床实践研究认为, 阴虚内热是 SLE 的基本证型, 滋阴清热法是治疗 SLE 基本法则, 因此在六味地黄丸的基础上拟定了滋阴清热方, 方中生地黄、山萸肉滋阴清热凉血为君药; 泽泻、牡丹皮、茯苓清热养阴利湿为臣药; 青蒿清虚热, 甘草解毒并调诸药为佐药。诸

药合用, 共同起到滋阴清热、解毒凉血之功效。前期临床研究结果显示, 滋阴清热方配合皮质类固醇激素治疗阴虚内热型活动性 SLE, 疗效确切, 总有效率达 91.6%^[11]。基础研究发现, 滋阴清热方对 SLE 阴虚内热型基因表达谱的影响广泛而复杂, 涉及基因数目较多, 基因编码蛋白在细胞中分布广泛, 功能簇基因可上调或下调表达, 部分调节作用与地塞米松相似^[12]。

本研究结果发现, 各组狼疮小鼠肾组织 Caspase-1 与 IL-1 β 阳性区平均光密度值均比空白组高, 表明狼疮鼠的细胞焦亡所致的炎症反应增加; 而脂多糖组 Caspase-1 与 IL-1 β 阳性区平均光密度值比模型组更高, 提示在脂多糖刺激下狼疮鼠体内炎症反应的增多可引起细胞焦亡因子表达明显增加, 说明炎症反应程度与细胞焦亡因子表达相关。为进一步阐明细胞焦亡在 SLE 炎症反应中的作用, 我们采用荧光定量 PCR 检测 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达, 结果发现脂多糖组 NLRP3、Caspase-1 与 IL-1 β mRNA 表达比模型组及空白组均升高, 提示炎症反应增加的同时细胞焦亡因子 mRNA 表达也增加, 说明细胞焦亡可能是引起炎症反应增加的重要途径。采用滋阴清热方治疗狼疮鼠后, IL-1 β 阳性区平均光密度值和 mRNA 表达均比模型组减少, 表明滋阴清热方在一定程度上减少肾组织炎症反应, 达到控制狼疮鼠炎症反应作用。中药组 Caspase-1 和 NLRP3 mRNA 表达与模型组差异无统计学意义, 其中原因我们认为 IL-1 β 是下游炎症因子, 直接参与炎症反应, 而 NLRP3 和 Caspase-1 处于细胞焦亡上游, 对于药物治疗作用相对不够敏感。

参考文献

- [1] 邱珍, 夏中元, 周斌. 细胞焦亡的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(15): 2935-2938.
- [2] 黄云帆, 彭礼波. 细胞焦亡与炎症反应的研究进展 [J]. 海南医学, 2016, 27(21): 3533-3535.
- [3] 黄咏菁, 吴元胜, 陈建宏, 等. 中药狼疮 II 号胶囊结合激素治疗对活动期系统性红斑狼疮中医证候积分及激素积分影响的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(1): 44-46.
- [4] 李涛, 范好, 刘芳. 免疫组织化学图像光密度分析的标准化方法 [J]. 解剖学杂志, 2008, 31(5): 727-728.
- [5] MISTRY P, KAPLAN MJ. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis [J]. Clinical Immunology, 2016. doi: 10.1016/j.clim.2016.

08.010.

[6] MAGNA M, PISETSKY DS. The role of cell death in the pathogenesis of SLE: is pyroptosis the missing link? [J]. Scand J Immunol, 2015, 82(3):218-224.

[7] KAHLENBERG JM, YALAVARTHI S, ZHAO W, et al. An essential role of caspase 1 in the induction of murine lupus and its associated vascular damage [J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(1):152-162.

[8] HONARPISHEH M, DESAI J, MARSCHNER JA, et al. Regulated necrosis-related molecule mRNA expression in humans and mice and in murine acute tissue injury and systemic autoimmunity leading to progressive organ damage, and progressive fibrosis [J]. Biosci Rep, 2016, 36(6):e00425.

[9] KAHLENBERG JM, KAPLAN MJ. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? [J]. Curr Opin Rheumatol, 2014, 26(5):475-481.

[10] KAHLENBERG JM, CARMONA-RIVERA C, SMITH CK, et al. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages [J]. J Immunol, 2013, 190(3):1217-1226.

[11] 查旭山, 范瑞强. 禩国维教授中西医结合治疗系统性红斑狼疮 32 例 [J]. 新中医, 2001, 33(8):31-32.

[12] 范瑞强, 程喜平, 赖梅生, 等. 滋阴清热方对系统性红斑狼疮阴虚内热证患者 PBMC 基因表达谱的影响 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2011, 25(3):225-227.

The Effect of Ziyin Qingre Formula (滋阴清热方) on Pyroptosis Related Factors in Mice with Systemic Lupus Erythematosus

FAN Ping, LIANG Kangli, HU Xiaoqian, FAN Hui, CHENG Xiping

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510120)

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of Ziyin Qingre Formula (滋阴清热方) in treating systemic lupus erythematosus. **Methods** Thirty lupus mice were randomly divided into a Chinese medicine group, a lipopolysaccharide group and a model group, with 10 mice in each. Other 10 normal C57BL/6JN healthy mice were taken as the blank group. The Chinese medicine group was given 20 g/(kg · d) of Ziyin Qingre Formula for gavage, once per day; the lipopolysaccharide group was given 8 mg/kg of lipopolysaccharide for intraperitoneal injection, once every two days; and the model and the normal group were given equivalent sterilized distilled water for gavage, once every day. Each group was treated for 6 weeks. Expressions of protein of cysteine containing aspartate 1 (Caspase-1) and interleukin 1 β (IL-1 β), mRNA of nucleotide binding oligomerization domain like receptor 3 (NLRP3), Caspase-1 and IL-1 β in kidney tissues of mice in each group were examined. **Results** Compared with those in the blank group, expression of protein of Caspase-1 and IL-1 β , as well as mRNA of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β in kidney tissues of mice in the model group increased ($P < 0.05$). Compared with that in the model group, expression of IL-1 β protein and mRNA decreased in the Chinese medicine group, but increased in the lipopolysaccharide group ($P < 0.05$). There was no significant difference in Caspase-1 and NLRP3 mRNA expression between the Chinese medicine group and the model group ($P > 0.05$). **Conclusion** Ziyin Qingre Formula could decrease pyroptosis and inflammatory factors, which may be one of its action mechanisms in treating systemic lupus erythematosus.

Keywords systemic lupus erythematosus; Ziyin Qingre Formula (滋阴清热方); pyroptosis; inflammatory factor

(收稿日期: 2017-02-28; 修回日期: 2017-04-21)

编辑: 邓 媛

欢迎访问《中医杂志》微信小店

为了方便读者购买《中医杂志》期刊、光盘、合订本, 我们的微信小店上线了。手机操作即可查询、购买。

请扫描二维码直接访问《中医杂志》官方微信小店。

