

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.13.013

实验研究

狼疮定对系统性红斑狼疮活动期肝肾阴虚证患者外周血单个核细胞中 pDC 含量及 TLR7/TLR9/MyD88 通路的影响

汪梅姣, 谢志军, 王大维, 李海昌*

浙江中医药大学基础医学院, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053

摘要 目的 探讨狼疮定治疗系统性红斑狼疮 (SLE) 活动期肝肾阴虚证的可能作用机制。方法 收取 SLE 活动期肝肾阴虚证患者及正常人全血分离外周血单个核细胞 (PBMC), 并将 SLE 活动期肝肾阴虚证患者 PBMC 分为模型组、狼疮定组 (狼疮定冻干粉 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)、狼疮定 + 地塞米松组 (狼疮定冻干粉 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ + 地塞米松注射液 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、地塞米松组 (地塞米松注射液 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)。用药 24 h 后收集细胞, 采用流式细胞术检测正常人与活动期 SLE 患者及各组 PBMC 中浆细胞样树突状细胞 (pDC) 含量。采用 Realtime-PCR 法检测各组 PBMC 细胞 Toll 样受体 7 (TLR7)、Toll 样受体 9 (TLR9)、髓样分化因子 88 (MyD88) mRNA 表达水平, Western blotting 检测 TLR7、TLR9、MyD88、核因子- κB p65 (NF- κB p65) 蛋白表达, ELISA 法检测其上清中干扰素 α (IFN- α) 含量。结果 与正常人比较, SLE 活动期患者外周血 PBMC 中 pDC 含量减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 狼疮定组 pDC 含量、NF- κB p65 蛋白表达增多, MyD88 mRNA 及 TLR7、TLR9 蛋白表达、培养上清中 IFN- α 含量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 狼疮定 + 地塞米松组 TLR9、MyD88 mRNA 及 TLR9、MyD88、NF- κB p65 蛋白表达, 培养上清中 IFN- α 含量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与地塞米松组比较, 狼疮定组 pDC 含量增多, TLR7、MyD88 mRNA 表达降低, 培养上清中 IFN- α 含量降低; 狼疮定 + 地塞米松组 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达及 MyD88、NF- κB p65 蛋白表达, 培养上清中 IFN- α 含量均降低 ($P < 0.01$)。与狼疮定组比较, 狼疮定 + 地塞米松组 NF- κB p65 蛋白表达减少 ($P < 0.01$)。结论 狼疮定及狼疮定联合地塞米松可能通过增多活动期 SLE 患者 PBMC 中 pDC 含量, 抑制其 PBMC 的 TLR7/TLR9/MyD88 信号通路, 进而抑制 SLE 病情进展, 且狼疮定联合地塞米松效果更好。

关键词 系统性红斑狼疮; 狼疮定; 浆细胞样树突状细胞; Toll 样受体 7; Toll 样受体 9; 髓样分化因子 88

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种典型的多发于育龄期女性的自身免疫性疾病, 临床表现为面部蝶形红斑、多脏器受累, 疾病反复发作, 严重损害患者的健康和生活质量。目前西医治疗 SLE 仍以糖皮质激素为主, 虽有一定的疗效, 但往往不能完全缓解病情, 而且长期或者大剂量使用糖皮质激素常引起骨质疏松、股骨头坏死、病毒细菌感染等一系列副作用^[1]。有研究显示, 糖皮质激素治疗对 SLE 患者浆细胞样树突状细胞 (pDC) 的 Toll 样受体/干扰素 α

(TLR/IFN- α) 信号通路没有影响^[2]。SLE 患者由于免疫细胞活化异常, 产生大量病理性自身抗体, 抗原抗体结合形成免疫复合物, 通过激活机体树突状细胞 (DCs), 刺激 Toll 样受体 7/Toll 样受体 9 (TLR7/TLR9) 信号通路, 产生大量炎症因子, 导致 SLE 的发生发展^[3]。SLE 患者外周血 pDC 含量与病情活动度有关^[4], 患者 TLR7/TLR9/髓样分化因子 88 (MyD88) 信号通路的激活以及产生的 IFN- α 会促进 SLE 疾病进展^[5]。中医药治疗 SLE 有一定优势, 狼疮定为我们治疗 SLE 的经验方。经随机双盲对照临床研究发现, 狼疮定不但能够提高激素治疗 SLE 的疗效, 而且能够减少激素用量, 减轻毒副作用和并发症, 显著提高患者的生活质

基金项目: 国家自然科学基金 (81873266, 81973829); 国家中医药行业科研专项 (201507001-4); 国家重点研发计划 (2018YFC1705500)

* 通讯作者: lihaichang@163.com, (0571) 86613644

量^[6-7]。我们拟通过观察狼疮定及狼疮定联合地塞米松对 SLE 患者外周血单个核细胞 (PBMC) 中 pDC 含量, TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 及相关蛋白表达水平, 培养上清中 IFN- α 含量的影响, 进而探讨狼疮定治疗 SLE 增效减毒的可能内在机制。

1 资料

1.1 细胞

纳入邵逸夫医院、浙江大学医学院附属第二医院 2018 年 1—10 月门诊及住院 SLE 患者 20 例, 其中男 2 例, 女 18 例; 年龄 21 ~ 60 岁, 平均 (40.71 $\pm$ 10.82) 岁; 病程 0.5 ~ 19.5 年, 中位病程 3.14 年。所收录病例均符合美国风湿病协会 (ACR) 1997 年修订的诊断标准^[8]; 中医辨证属于肝肾阴虚证, 中医证候诊断标准参考《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[9]。所选病例均处于疾病活动期, SLE 疾病活动性评估 (SLE-DAI 评分)^[10] ≥ 5 分, 平均 (7.05 $\pm$ 2.68) 分; 补体 C3 (0.58 $\pm$ 0.23) g/L, 补体 C4 (0.14 $\pm$ 0.05) g/L。正常对照人群来自浙江中医药大学第一附属医院体检中心, 共 20 例, 其中男 3 例, 女 17 例; 年龄 20 ~ 60 岁, 平均 (41.95 $\pm$ 11.40) 岁, 均排除自身免疫性疾病及慢性炎症性疾病。SLE 患者与正常人年龄、性别比例比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。研究开始前均获得研究对象的知情同意。

PBMC 分离: 用 Ficoll 密度梯度离心法。抽取正常人外周血 5 ml 置于 EDTA 抗凝管中混匀, 室温离心机, 离心半径 8 cm, 2000 r/min 离心 10 min, 吸取血浆后加入等体积的 PBS 稀释下层血细胞, 缓慢加到等体积的淋巴细胞分离液上, 室温离心, 离心半径 8 cm, 2000 r/min 离心 15 min, 收集中间白膜层于 15 ml 离心管中, 用 PBS 洗涤两次, 得到 PBMC。抽取活动期 SLE 患者外周血 10 ml, 同上步骤分离 PBMC。

1.2 主要药物

狼疮定组成: 青蒿 12 g, 醋鳖甲 12 g, 升麻 9 g, 积雪草 15 g, 白花蛇舌草 15 g, 赤芍 12 g, 麸炒薏苡仁 15 g, 生地黄 15 g, 佛手 9 g, 甘草 6 g, 均由浙江中医药大学饮片厂提供。药物浸泡 1 h, 鳖甲先煎 1 h, 入余药, 武火煎开后换文火煎 1 h, 用旋转蒸发仪, 水浴温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 转速 150 r/min, 浓缩为生药浓度 0.5 g/ml。用冷冻干燥机制成冻干粉, 用 RPMI-1640 培养基溶解, 0.22 μm 滤膜过滤, 配成浓度 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 工作液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

TBD 人外周血淋巴细胞分离液 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, 货号: HY2015); 地塞米松注射液 (中国药品生物制品检验所, 货号: 100129); RPMI 1640 培养基 (货号: GNM31800-S)、PBS (货号: GNM20012), 吉诺生物医药技术有限公司; 胎牛血清 (美国 GEMINI 公司, 货号: 900-108); Trizol 试剂 (货号: 9109)、逆转录试剂盒 (货号: RR036A), TAKARA 公司; Real-time PCR 试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司, 货号: 172-5124); TLR7 抗体 (Sigma 公司, 货号: WH0051284M4-100UG); TLR9 抗体 (货号: ab12121)、MyD88 抗体 (货号: ab2064), Abcam 公司; 核因子 κB (NF- κB) p65 抗体 (CST 公司, 货号: 8242S); 人 IFN- α ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, 货号: CSB-E08636h); PE/Cy5 标记抗人 CD11c 抗体 (货号: 301610)、FITC 标记抗人 CD123 抗体 (货号: 306014)、PE 标记抗人 CD303 抗体 (货号: 354204)、同型对照 FITC 鼠 IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) (货号: 400109)、同型对照 PE 鼠 IgG1a Isotype Ctrl (货号: 400211), 流式抗体均购于德国 Biolegend 公司。

Centrifuge 5702 型离心机, Eppendorf 公司; RV10 型旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司; ALPHA 1-2 LD plus 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; FC500 型流式细胞仪, 美国 Beckman 公司; LightCycler 96 型 PCR 仪, Roche 公司; Scientific Varioskan flash 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; 311 型细胞培养箱, Thermo Scientific 公司; SW-CJ2F 型双人双面净化工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; Odyssey9120 型双色红外激光成像系统, Licon 公司。

2 方法

2.1 细胞分组及给药

将 1.1 中分离的活动期 SLE 肝肾阴虚证患者中 PBMC 细胞量较多的 10 例患者的 PBMC 细胞分为模型组、狼疮定组、狼疮定 + 地塞米松组、地塞米松组。各组细胞培养条件: 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (含青霉素 1×10^5 U/L、链霉素 100 mg/L), 饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 , 6 孔板中培养 24 h。模型组只加完全培养基, 狼疮定组加入狼疮定冻干粉溶液 (终浓度 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 狼疮定 + 地塞米松组加入狼疮定冻干粉溶液 (终浓度 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 和地塞米松注射液 (终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 地塞米松组加入地塞米松注射液 (终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。每组

10 个样本, 3 个重复。

2.2 PBMC 细胞中 pDC 含量测定

分离正常人和活动期 SLE 患者的 PBMC 计数后, 吸取 1×10^6 个 PBMC 细胞用流式抗体检测 pDC 含量。人类 pDC 缺乏 CD11c 表达, 特征性表达 CD123、CD303 (也称为 BDCA-2), 因此人类 PBMC 中 pDC 可以定义为 CD11c⁻ CD123⁺ CD303⁺ 细胞群^[11-12]。收集 2.1 中各组 PBMC 细胞, PBS 清洗, 加 PBS 重悬细胞, 检测 pDC 含量。取 100 μ l 细胞悬液, 加入 PE/Cy5 标记抗人 CD11c 抗体、FITC 标记抗人 CD123 抗体、PE 标记抗人 CD303 抗体、同型对照 FITC 鼠 IgG1, κ Isotype Ctrl (FC)、PE 鼠 IgG1a Isotype Ctrl, 混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心 (半径 7.5 cm, 1000 r/min) 5 min, 弃上清, 加入 500 μ l PBS 重悬细胞, 使用流式细胞仪检测。

2.3 Realtime-PCR 检测 PBMC 细胞中 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达

将 2.1 中各组 PBMC 细胞培养 24 h 后, 1500 r/min 离心 5 min, 收集上层培养上清用于检测 IFN- α , 下层细胞用于提取总 RNA 和蛋白。使用 Trizol 裂解细胞, 加入氯仿混匀后, 离心半径 7.5 cm, 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 15 min, 分 3 层, 小心吸取上层水相用于提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 检测 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达水平, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计与合成, 引物序列见表 1。Realtime-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环。结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 实验重复 3 次, 每次 3 个复孔。

表 1 TLR7、TLR9、MyD88、GAPDH 引物序列表

基因	引物	序列	长度 (bp)
TLR7	上游	TTCAACCAGACCTCTACATTCCATT	270
	下游	GCACTCCACGATCACATGGTT	
TLR9	上游	CAGGGCCTTCAGCTGGTTTC	570
	下游	CCGTGACAATTACCTGGCCTTC	
MyD88	上游	ATTTGCACTCAGCCTCTCTCCA	149
	下游	CGAGTCCAGAACCAAGATTGCG	
GAPDH	上游	CCACTCCTCCACCTTTGAC	101
	下游	ACCCTGTTGCTGTAGCCA	

注: TLR7, Toll 样受体 7; TLR9, Toll 样受体 9; MyD88, 髓样分化因子 88

2.4 Western blotting 法检测 TLR7、TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达

使用 2.3 中加入氯仿离心后的下层有机相提取

蛋白, 用 12% SDS-PAGE 蛋白电泳 (条件 60 V 30 min, 80 V 90 min), 转于 NC 膜上 (湿转法 80 V 2 h), 3% BSA 封闭 1.5 h, 分别孵育一抗 (TLR7 1 : 500; TLR9 1 : 500; MyD88 1 : 1000; NF- κ B 1 : 1000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 1 $\times$ TBST 漂洗, 荧光二抗室温避光孵育 2 h, 1 $\times$ TBST 漂洗。实验重复 3 次, 每次 3 个复孔。使用双色红外激光成像系统扫描。得到的图片使用 Quantity one 4.6 软件进行灰度值分析, 计算各目的蛋白与内参蛋白 β -actin (1 : 2000) 的比值。

2.5 ELISA 法测定上清中 IFN- α 含量

使用 2.3 中收集的各组 PBMC 细胞培养上清, 使用 ELISA 试剂盒检测 IFN- α 含量, 具体实验操作按照试剂盒说明书进行。

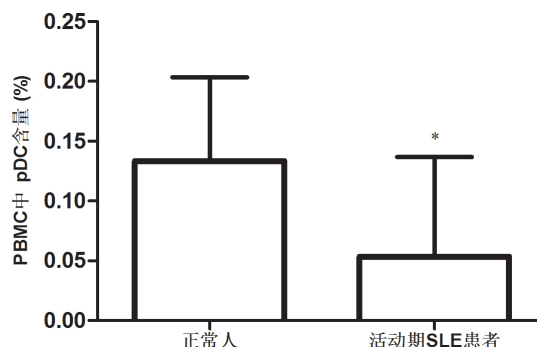
2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 定量指标采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较使用 t 检验; 多组间比较使用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验, 或 Games-Howell 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。图像采用 GraphPad Prism 5.0 绘制。

3 结果

3.1 各组 PBMC 细胞中 pDC 含量比较

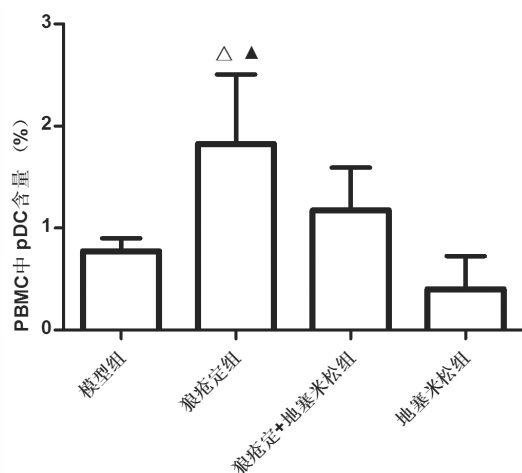
图 1 示, 与正常人比较, 活动期 SLE 患者外周血 PBMC 细胞 pDC 含量减少 ($P < 0.01$)。



注: SLE, 系统性红斑狼疮; PBMC, 外周血单个核细胞; pDC, 浆细胞样树突状细胞; 与正常人比较, * $P < 0.01$

图 1 活动期 SLE 患者与正常人 PBMC 细胞 pDC 含量比较

图 2 示, 与模型组比较, 狼疮定组 pDC 含量增多 ($P < 0.05$), 狼疮定 + 地塞米松组和地塞米松组 pDC 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与地塞米松组比较, 狼疮定组 pDC 含量增加 ($P < 0.01$), 狼疮定 + 地塞米松组 pDC 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 狼疮定组与狼疮定 + 地塞米松组比较, pDC 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

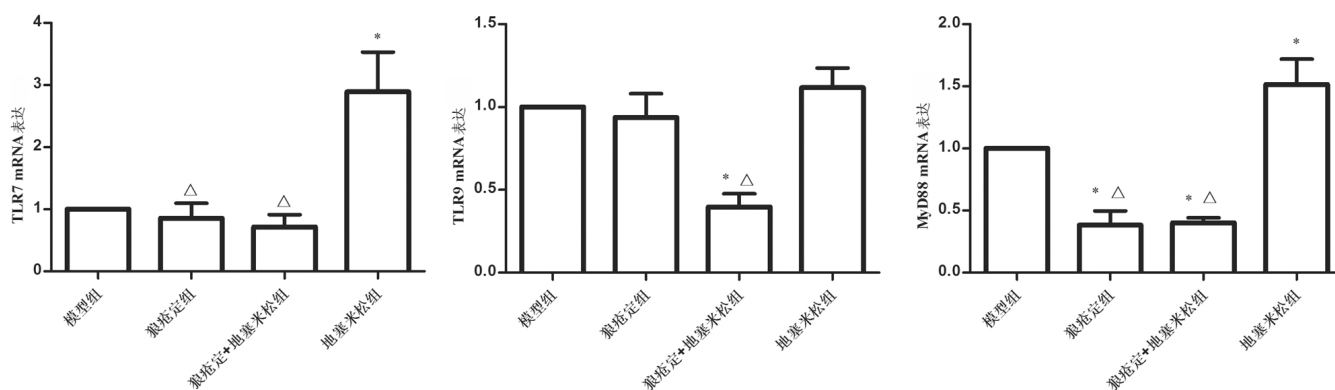


注: PBMC, 外周血单个核细胞; pDC, 浆细胞样树突状细胞; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与地塞米松组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

图2 各组 PBMC 细胞中 pDC 含量比较

3.2 各组 PBMC 细胞中 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达比较

图3示,与模型组比较,狼疮定组 PBMC 细胞 MyD88 mRNA,狼疮定+地塞米松组 TLR9、MyD88 mRNA 表达降低,地塞米松组 TLR7、MyD88 mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$);与地塞米松组比较,狼疮定组 TLR7、MyD88 mRNA,狼疮定+地塞米松组 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达



注: PBMC, 外周血单个核细胞; pDC, 浆细胞样树突状细胞; TLR7, Toll 样受体 7; TLR9, Toll 样受体 9; MyD88, 髓样分化因子 88; 与模型组比较, $* P < 0.01$; 与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.01$

图3 各组 PBMC 细胞中 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达比较

表2 各组 PBMC 细胞中 TLR7、TLR9、MyD88、NF- κ B 蛋白表达比较 ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TLR7	TLR9	MyD88	NF- κ B p65
模型组	10	0.58 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.16	0.47 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.06
狼疮定组	10	0.28 $\pm$ 0.02**	0.37 $\pm$ 0.12**	0.31 $\pm$ 0.09	1.18 $\pm$ 0.21*
狼疮定+地塞米松组	10	0.44 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.03**	0.22 $\pm$ 0.06** Δ	0.34 $\pm$ 0.10** Δ $\blacktriangle$
地塞米松组	10	0.31 $\pm$ 0.05**	0.43 $\pm$ 0.05**	0.42 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.04*

注: PBMC, 外周血单个核细胞; pDC, 浆细胞样树突状细胞; TLR7, Toll 样受体 7; TLR9, Toll 样受体 9; MyD88, 髓样分化因子 88; NF- κ B p65, 核因子- κ B p65; 与模型组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$; 与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$; 与狼疮定组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

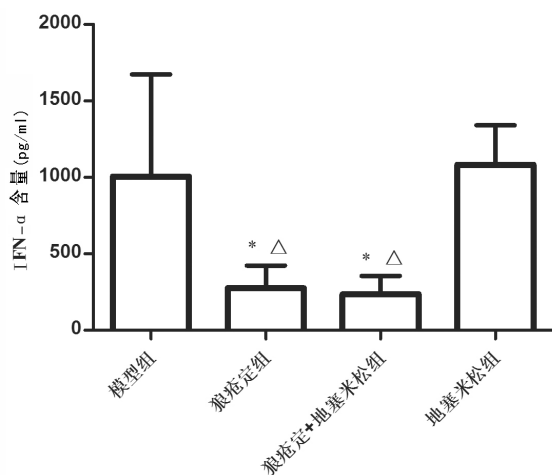
降低 ($P < 0.01$); 狼疮定组与狼疮定+地塞米松组 TLR7、TLR9、MyD88 mRNA 表达比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.3 各组 PBMC 细胞中 TLR7、TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达比较

表2示,与模型组比较,狼疮定组 PBMC 细胞的 TLR7、TLR9 蛋白表达均降低, NF- κ B p65 蛋白表达增多; 狼疮定+地塞米松组 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达均降低; 地塞米松组 TLR7、TLR9 蛋白表达均降低, NF- κ B p65 蛋白表达增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与地塞米松组比较,狼疮定+地塞米松组 MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 狼疮定组 TLR7、TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与狼疮定组比较,狼疮定+地塞米松组 NF- κ B p65 蛋白表达减少 ($P < 0.01$)。

3.4 各组 PBMC 细胞培养上清中 IFN- α 含量比较

图4示,与模型组比较,狼疮定组、狼疮定+地塞米松组 IFN- α 含量均降低 ($P < 0.01$), 地塞米松组 IFN- α 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与地塞米松组比较,狼疮定组和狼疮定+地塞米松组 IFN- α 含量均降低 ($P < 0.01$); 狼疮定组与狼疮定+地塞米松组 IFN- α 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: PBMC, 外周血单个核细胞; IFN- α , 干扰素 α ; 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与地塞米松组比较, $\Delta P < 0.01$

图4 各组 PBMC 细胞上清中 IFN- α 含量比较

4 讨论

SLE 根据其病因和临床表现, 多属于中医学“阴阳毒”“红蝴蝶疮”“温毒发斑”“日晒疮”“痹证”等范畴。SLE 的根本病因为先天不足、肝肾精血亏虚; 内在诱因为七情内伤、肝失疏泄, 外在诱因为外邪侵袭。热毒伤阴、灼伤营血而产生皮疹红斑、口腔溃疡; 热伤血脉、瘀血阻络而致关节肿痛、活动不利; 内热郁久伤阴、肝肾精血更亏而出现五心烦热、腰膝酸软、脱发、月经量少甚或闭经、舌质红、脉细数等症。本课题组认为, SLE 在活动期、慢性缓解期的大部分病程阶段均表现为以肝肾阴虚为本, 毒、热、瘀为标的虚实夹杂之证, 据此确立了以清热解毒、活血化瘀、滋阴益肾为主的治疗原则, 拟定解毒祛瘀滋阴法基础方狼疮定。该方以青蒿清热凉血透邪外出, 鳖甲补肾益阴入络搜邪为君; 白花蛇舌草、升麻清热解毒消斑, 赤芍、积雪草清热凉血、活血化瘀, 生地黄滋阴清热、凉血补血, 俱为臣; 薏苡仁、佛手健脾理气化湿为佐, 甘草解毒并调和诸药为使。诸药合用, 共奏清热解毒、活血化瘀、补肾养阴之功, 发挥标本兼治的作用。

TLR 是一组保守的模式识别受体, 可识别病原体相关的分子模式, 因此是先天免疫应答和针对感染的保护性免疫的主要参与者^[13]。pDC 是针对感染的保护性先天免疫反应的关键参与者, 是响应内体 TLR (例如 TLR7/TLR9) 活化的 I 型 IFN 的主要生产者^[14-16]。pDC 数量极微, 仅占健康人 PBMC 的 0.2%~0.8%^[17], 其不同分化阶段和不同刺激诱导下可以表现出不同的免疫调节功能, 而 pDC

功能异常可引起自身免疫性疾病, 在 SLE 发病中发挥至关重要的作用^[18-19]。有研究发现 SLE 患者外周血 pDC 数量减少, 并累积在炎症组织和靶器官 (如病变皮肤或肾脏)^[20-22], 并且外周血 pDC 含量与病情活动度有关, 活动期 SLE 外周血 pDC 含量降低更明显^[4]。IFN- α 是一种抗病毒和免疫调节作用的细胞因子, 可通过其下游一系列基因的功能引发自身免疫反应, 还可以活化巨噬细胞、自然杀伤细胞和细胞毒性 T 细胞, 增加炎症因子的产生, 最终导致全身器官受损^[23-24]。

本研究结果显示, 活动期 SLE 患者 PBMC 中 pDC 含量较正常人减少, 狼疮定及狼疮定联合地塞米松用药后患者 PBMC 中 pDC 含量增多, 同时狼疮定联合地塞米松能使 PBMC 的 TLR9、MyD88 mRNA 和蛋白表达及培养上清中 IFN- α 含量降低。SLE 患者特别是活动期患者外周血 pDC 含量减少, 而在炎症组织和靶器官中累积^[25], 狼疮定联合地塞米松体外实验可能通过增多活动期 SLE 患者 PBMC 中 pDC 含量, 从而减少炎症组织及靶器官中 pDC 积累而有利于病情好转, 但具体作用机制有待进一步研究。SLE 患者自身免疫复合物与 PBMC 的 TLR7/TLR9 结合, 诱导释放 IFN- α , 参与 SLE 复杂病理生理过程^[26]。狼疮定联合地塞米松体外能抑制活动期 SLE 患者 PBMC 的 TLR7/TLR9/MyD88 信号通路的激活, 减少 IFN- α 产生, 可能由此减少下游一系列基因和其他免疫细胞的活化引发的自身免疫反应而达到治疗 SLE 的效果, 其体内作用机制还有待研究。狼疮定联合地塞米松体外可能通过增多活动期 SLE 患者 PBMC 中 pDC 含量, 抑制其 PBMC 的 TLR7/TLR9/MyD88 信号通路, 进而抑制 SLE 病情进展, 这与我们前期的研究结果^[1, 6, 26-28]一致。因此, 在 SLE 治疗过程中, 可以尝试中西医结合治疗, 以达到降低毒副作用、减少激素用量、提高患者生存质量的目的。

参考文献

- 范永升, 温成平, 吴国琳, 等. 解毒祛瘀滋阴法对系统性红斑狼疮类固醇性骨质疏松症的防治作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(11): 667-669.
- GUIDUCCI C, GONG M, XU Z, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus [J]. Nature, 2010, 465(7300): 937-941.
- RÖNNBLÖM L, PASCUAL V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells [J]. Lupus, 2008, 17(5): 394-399.

- [4] 齐晖,李富荣,刘冬舟,等. 系统性红斑狼疮患者树突状细胞亚型绝对数及与疾病活动程度相关性研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(7): 546-548.
- [5] LYN-COOK BD, XIE C, OATES J, et al. Increased expression of Toll-like receptors (TLRs) 7 and 9 and other cytokines in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: ethnic differences and potential new targets for therapeutic drugs [J]. Mol Immunol, 2014, 61(1): 38-43.
- [6] 温成平,范永升,李夏玉,等. 中医解毒祛瘀滋阴法对 SLE 患者生存质量的影响研究 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(8): 1599-1602.
- [7] 杨辉,谢志军,李海昌,等. 中医药在系统性红斑狼疮激素撤减过程中的问题分析与对策 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 588-591.
- [8] HOCHBERG MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.
- [9] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 111-115.
- [10] BOMBARDIER C, GLADMAN DD, UROWITZ MB, et al. Derivation of the SLE-DAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE [J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(6): 630-640.
- [11] SWIECKI M, COLONNA M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(8): 471-485.
- [12] YU H, ZHANG P, YIN X, et al. Human BDCA2⁺ CD123⁺ CD56⁺ dendritic cells (DCs) related to blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm represent a unique myeloid DC subset [J]. Protein Cell, 2015, 6(4): 297-306.
- [13] TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- [14] RAYCHAUDHURI D, DUTTAGUPTA P, LIU CSC, et al. Role of Ca²⁺ in toll-like receptor 9 activation in human plasmacytoid dendritic cells [J]. Cytokine, 2020, 125: 154822. doi: 10.1016/j.cyt.2019.154822.
- [15] HAAS T, METZGER J, SCHMITZ F, et al. The DNA sugar backbone 2'-deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation [J]. Immunity, 2008, 28(3): 315-323.
- [16] GILLIET M, CAO W, LIU YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(8): 594-606.
- [17] LANDE R, GILLIET M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1183(1): 89-103.
- [18] CHARLES J, CHAPEROT L, SALAMEIRE D, et al. Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders: focus on their role in autoimmunity and cancer [J]. Eur J Dermatol, 2010, 20(1): 16-23.
- [19] MEANS TK, LATZ E, HAYASHI F, et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9 [J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 407-417.
- [20] FIORE N, CASTELLANO G, BLASI A, et al. Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis [J]. Mol Immunol, 2008, 45(1): 259-265.
- [21] FARKAS L, BEISKE K, LUND-JOHANSEN F, et al. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions [J]. Am J Pathol, 2001, 159(1): 237-243.
- [22] TOMASINI D, MENTZEL T, HANTSCHKE M, et al. Plasmacytoid dendritic cells: an overview of their presence and distribution in different inflammatory skin diseases, with special emphasis on Jessner's lymphocytic infiltrate of the skin and cutaneous lupus erythematosus [J]. J Cutan Pathol, 2010, 37(11): 1132-1139.
- [23] YE S, PANG H, GU YY, et al. Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus-associated gene, IFIT1 [J]. Rheumatology (Oxford), 2003, 42(10): 1155-1163.
- [24] LEE HM, MIMA T, SUGINO H, et al. Interactions among type I and type II interferon, tumor necrosis factor, and beta-estradiol in the regulation of immune response-related gene expressions in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(1): R1.
- [25] RÖMMLER F, HAMMEL M, WALDHUBER A, et al. Guanine-modified inhibitory oligonucleotides efficiently impair TLR7- and TLR9-mediated immune responses of human immune cells [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0116703.
- [26] 温成平,范永升,唐小颇,等. 解毒祛瘀滋阴法治疗 SLE 对甲状腺功能异常的调节作用研究 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(7): 1229-1232.
- [27] 范永升,温成平,李永伟,等. 解毒祛瘀滋阴法治疗 SLE 对撤减激素和保护下丘脑-垂体-肾上腺轴的作用研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(2): 199-202.
- [28] 温成平,范永升,李永伟,等. 解毒祛瘀滋阴法治疗系统性红斑狼疮并发血小板减少症 34 例 [J]. 中医杂志, 2007, 48(6): 529-530.

Effects of Langchuangding (狼疮定) on pDC Content and TLR7/TLR9/MyD88 Pathway in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients of Systemic Lupus Erythematosus in Active Stage with Syndrome of Liver and Kidney Yin Deficiency

WANG Meijiao, XIE Zhijun, WANG Dawei, LI Haichang

School of Basic Medicine, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310053, China

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanisms of Langchuangding in the treatment of liver and kidney yin deficiency syndrome in active stage of systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** Patients with liver and kidney yin deficiency syndrome and normal subject whole blood peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of active SLE were collected and divided into a model group, a Langchuangding group (Langchuangding freeze-dry powder $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$), a Langchuangding + dexamethasone group (Langchuangding freeze-dry powder $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ + dexamethasone injection $10\mu\text{g}/\text{ml}$), and a dexamethasone group (dexamethasone injection $10\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were collected 24 hours after drug administration and flow cytometry was used to detect plasmacytoid dendritic cells (pDC) content in normal and active SLE patients and PBMC in each group. Levels of toll-like receptor 7 (TLR7), toll-like receptor 9 (TLR9) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) mRNA expression in PBMC cells in each group were detected by Realtime-PCR. Protein expression levels of TLR7, TLR9, MyD88 and nuclear factor- κB p65 (NF- κB p65) were detected by Western blotting, and the content of IFN- α in the supernatant was detected by ELISA. **Results** Compared with normal subjects, pDC content in peripheral blood PBMC of active SLE patients decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, pDC content, NF- κB p65 protein expression increased, MyD88 mRNA and TLR7 and TLR9 protein expression decreased, and IFN- α content in culture supernatant decreased in the Langchuangding group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). TLR9, MyD88 mRNA and TLR9, MyD88, NF- κB p65 protein and IFN- α content in culture supernatant was decreased Langchuangding + dexamethasone group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with dexamethasone group, the content of pDC in Langchuangding group increased, the expression of TLR7 and MyD88 mRNA decreased, and the content of IFN- α in culture supernatant decreased. Expression of TLR7, TLR9, MyD88 mRNA and MyD88, NF- κB p65 protein and IFN- α content in culture supernatant in Langchuangding + dexamethasone group decreased ($P < 0.01$). Compared with Langchuangding group, the expression of NF- κB p65 protein in Langchuangding + dexamethasone group was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Langchuangding and the combination of Langchuangding and dexamethasone may inhibit the TLR7/TLR9/MyD88 signaling pathway of PBMC in active SLE patients by increasing pDC content in PBMC, thus inhibiting the progression of SLE, and the effects of Langchuangding combined with dexamethasone is superior.

Keywords systemic lupus erythematosus; Langchuangding; plasmacytoid dendritic cells; toll-like receptor 7; toll-like receptor 9; medullary differentiation factor 88

(收稿日期: 2019-09-26; 修回日期: 2020-01-06)

编辑: 王利芬

欢迎邮购 《中医杂志》 过刊

2000、2001 年合订本, 每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011 (缺 5、6 期) —2013 年每册 9.80 元, 2014 (缺 21 期) —2017 年 (缺 3、5、15、18 期) 每册 15 元, 2018 年每册 20 元 (缺 5、7、9 期), 2020 年每册 20 元 (缺 7、8 期)。2011—2013 年合订本, 每年 4 本, 全年 280 元, 2014、2015、2016、2017 年合订本 (每年 4 本), 全年 400 元。2018、2019 年合订本 (4 本), 600 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信 (zyzzgz) 购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。