

环孢素对系统性红斑狼疮模型小鼠的肾保护作用及其机制研究^Δ

马松鹤^{1*},夏令杰^{1#},陶 熔¹,王 静¹,张洪峰²(1.河南省人民医院疼痛科,郑州 450003;2.大连医科大学附属第一医院风湿免疫科,辽宁大连 116044)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3381-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.16

摘要 目的:研究环孢素对降植烷诱导的系统性红斑狼疮(SLE)模型小鼠的肾保护作用及其机制。方法:选取雌性BALB/c小鼠,一次性腹腔注射降植烷0.5 mL以建立SLE模型,检测小鼠尿蛋白、抗双链DNA(ds-DNA)抗体水平以验证模型是否成功建立。6个月后,取造模成功的小鼠40只,随机分为模型组、阳性对照组(泼尼松,5 mg/kg)和环孢素高、低剂量组(30、10 mg/kg),另取10只未造模小鼠作为正常对照组(生理盐水),每天1次灌胃给药,每周5次,连续给药18周。采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中抗ds-DNA抗体、免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白M(IgM)等免疫指标水平和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、干扰素 γ (IFN- γ)等炎症因子水平;采用生物化学法检测24 h尿蛋白和血清中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平;采用苏木精-伊红染色法观察肾组织病理变化;采用免疫组化法考察肾组织中IgG免疫复合物沉积情况;采用逆转录-聚合酶链反应法检测肾组织中p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导物(TWEAK)mRNA的表达水平。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠血清中抗ds-DNA抗体、IgG、IgM、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、Cr、BUN和24 h尿蛋白水平均显著升高($P < 0.05$);肾组织出现明显病理变化,IgG免疫复合物表达水平显著增加($P < 0.05$);肾组织中p38MAPK、TWEAK mRNA的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,环孢素高剂量组小鼠血清中抗ds-DNA抗体、IgG、IgM、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、Cr、BUN和24 h尿蛋白水平,环孢素低剂量组小鼠血清中抗ds-DNA抗体、IgG、BUN水平均显著降低($P < 0.05$);环孢素高、低剂量组小鼠肾组织病理变化均明显减轻,IgG免疫复合物表达水平均显著降低($P < 0.05$);环孢素高剂量组小鼠肾组织中p38MAPK、TWEAK mRNA的表达水平,环孢素低剂量组小鼠肾组织中TWEAK mRNA的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结论:环孢素对降植烷致SLE模型小鼠有一定的肾组织保护作用,对其肾损伤有一定改善作用,其作用机制可能与抑制TWEAK-p38MAPK信号通路有关。

关键词 环孢素;系统性红斑狼疮;肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导物;p38丝裂原活化蛋白激酶;肾保护作用;机制

Study on Protective Effect of Cyclosporine on Renal Tissue of Systemic Lupus Erythematosus Model Mice and Its Mechanism

MA Songhe¹, XIA Lingjie¹, TAO Rong¹, WANG Jing¹, ZHANG Hongfeng² (1. Dept. of Pain, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; 2. Dept. of Rheumatology and Immunology, the First Affiliated People's Hospital of Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effects of cyclosporine on renal tissue of pristane-induced systemic lupus erythematosus (SLE) model mice and its mechanism. **METHODS:** Female BALB/c mice was given pristane 0.5 mL intraperitoneally to establish SLE model. The levels of urine protein and anti-ds-DNA antibody were detected to validate model establishment. 6 months later, 40 model mice were randomly divided into model group, positive control group (prednisone, 5 mg/kg), cyclosporine high-dose and low-dose groups (30, 10 mg/kg), once a day, 5 times a week, for consecutive 18 weeks. Another 10 un-modeled mice were included in normal control group and given normal saline intragastrically. The serum levels of immunological indexes as anti-ds-DNA antibody, IgG, IgM and inflammatory factors such as TNF- α , IL-6 and IFN- γ were detected by ELISA. 24 h urine protein and serum creatinine (Cr), urea nitrogen (BUN) levels were measured by biochemical method. The pathological changes of renal tissues were observed by HE staining. Immunohistochemistry was used to survey IgG immune complexes deposition in renal tissues. mRNA expression of p38MAPK and TWEAK were detected by RT-PCR. **RESULTS:** Compared with normal control group, the serum levels of anti-ds-DNA, IgG, IgM, TNF- α , IL-6, IFN- γ , Cr, BUN and 24 h urine protein in mice were significantly increased in model group ($P < 0.05$); obvious pathological changes were observed in renal tissue and the expression level of IgG immune complex increased significantly ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of p38MAPK and TWEAK in renal tissue were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the serum levels of anti-ds-DNA, IgG, IgM, TNF- α ,

^Δ 基金项目:辽宁省科学技术计划——自然科学基金指导计划项目(No.20150540615)

* 主治医师,硕士。研究方向:临床疼痛诊疗。电话:0371-65580595。E-mail:2077419635@qq.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:临床疼痛诊疗。电话:0371-65580595。E-mail:xialingjie@126.com

IL-6, IFN- γ , Cr, BUN and 24 h urine protein were significantly decreased in cyclosporine high-dose group, and the serum levels of anti-ds-DNA, IgG and BUN were also significantly decreased in cyclosporine low-dose group ($P < 0.05$); the pathological changes of renal tissue were relieved significantly in cyclosporine high-dose and low-dose groups, and expression

levels of IgG immune complex were decreased significantly ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of p38MAPK and TWEAK in renal tissue were decreased significantly in cyclosporine high-dose group, and those of TWEAK were also decreased significantly in cyclosporine low-dose group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Cyclosporine has certain protective effect on renal tissue of pristane-induced SLE model mice and can relieve renal injury to certain extent, which may be associated with inhibiting TWEAK-p38MAPK signaling pathway.

KEYWORDS Cyclosporine; Systemic lupus erythematosus; TWEAK; p38MAPK; Renal protective effect; Mechanism

系统性红斑狼疮(SLE)是一种典型的自身免疫性疾病,其发病的核心机制是自身免疫功能紊乱;T细胞异常活化是免疫功能紊乱的枢纽,其经过一系列机体免疫呈递过程后,最终活化B淋巴细胞,导致机体发生免疫反应产生多种自身抗体,累及多种组织器官^[1],尤其以肾脏受损最为常见。迄今,狼疮肾炎(LN)仍为SLE主要致死原因之一。肿瘤坏死因子样弱凋亡诱导物(TWEAK)在人体胰腺、肠、心脏、大脑、卵巢及骨骼肌等组织中均有表达,另外在体外培养的人外周淋巴细胞、人巨噬细胞和人体内皮细胞等中也检测到相应表达,其生物活性与免疫调节作用密切相关^[2-3]。已有研究发现,TWEAK表达水平与SLE疾病活动指数(SLEDAI)呈正相关^[4];SLE患者外周血T细胞中TWEAK的表达水平明显高于类风湿关节炎(RA)患者和健康人群,而后两者T细胞中TWEAK表达水平之间无明显差异^[5]。上述研究结果提示,TWEAK可作为判断SLE病情活跃程度的特异性参考指标之一。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)在淋巴T细胞和B细胞中均广泛表达,并参与这两种细胞的增殖和活化,同时在T细胞分化中也起着重要作用^[6-9]。环孢素在临床上可用于治疗SLE,能够有效抑制T细胞介导的细胞免疫反应,其机制主要是通过抑制白细胞介素2(IL-2)、干扰素 γ (IFN- γ)调控基因的转录,从而影响T细胞的增殖和活化^[10]。但环孢素是否通过TWEAK-p38MAPK信号通路对SLE发挥治疗作用,尚未见相关研究报道。因此,本课题组考察了环孢素对降植烷(Pristane)致SLE模型小鼠的免疫学指标、炎症因子、肾功能指标及肾组织病变的改善作用,并通过研究环孢素对TWEAK-p38MAPK信号通路的影响,以探索环孢素治疗SLE的作用机制,进而为阐明SLE的发病机制和拓展其诊治新思路提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

MK3型酶标仪(美国 Thermo Electron 公司);CKX31型光学显微镜(日本 Olympus 公司);MIKRO 220R型冷冻离心机(德国 Hettich 公司);RT-PCR扩增仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 药品与试剂

环孢素(上海寰荣生物科技有限公司,批号:20171220,纯度:98.9%);醋酸泼尼松片(上海信谊药厂有限公司,批号:180146,规格:5 mg);降植烷、免疫球蛋白G(IgG)检测试剂盒、免疫球蛋白M(IgM)检测试剂盒(美国 Sigma 公司);抗双链DNA(ds-DNA)酶联免疫吸

附(ELISA)法检测试剂盒[欧蒙(德国)医学实验诊断有限公司];白细胞介素6(IL-6)、IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒(美国 eBioscience 公司);血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);考马斯亮蓝法检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);免疫组化试剂盒(含小鼠源IgG型一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体,北京百奥莱博科技有限公司);SYBR Premix Ex Taq™ II 检测试剂盒(日本 Takara 公司);水为双蒸去离子水。

1.3 引物

TWEAK 上游引物 5'-ATCGCAGCCATTATGAA-GT-3'、下游引物 5'-GAAGAGTCCGAAGTAGGTGA-GG-3', p38MAPK 上游引物 5'-TCGAGACCGTTTCAG-TCCAT-3'、下游引物 5'-CCACGGACAAATATCCACT-3', GAPDH 上游引物 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'、下游引物 5'-CCTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'均由生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 动物

BALB/c 小鼠 60 只,SPF 级,雌性,体质量 18~22 g,由湖北省医学科学院动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0019。所有小鼠均在 20~25 °C 室温、12 h/12 h 昼夜交替的条件下饲养,每天早晚各喂料 1 次,同时清洗水瓶并更换饮用水。

2 方法

2.1 SLE 模型建立

取 60 只小鼠,随机分为正常对照组(10 只)和造模组(50 只)。造模组小鼠一次性腹腔注射降植烷 0.5 mL,正常对照组小鼠同法给予等体积生理盐水。注射前及注射后 2、3、4、5、6 个月时,采用 ELISA 法检测小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体;注射前及注射后每月 1 次采用目测尿蛋白试纸检测小鼠尿蛋白。结果,造模组小鼠注射降植烷 2 个月后,其抗 ds-DNA 抗体水平显著高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且在 6 个月内该抗体水平逐渐升高;第 6 个月时,90% 的造模组小鼠尿蛋白呈强阳性(++++),提示典型狼疮病变成形。

2.2 分组、给药及取样

注射降植烷 6 个月后,取造模成功的小鼠 40 只,随机分为模型组、阳性对照组(泼尼松,5 mg/kg)和环孢素高、低剂量组(30、10 mg/kg),每组 10 只。根据预实验结果,阳性对照组和环孢素各剂量组小鼠灌胃相应剂量的药物,每天 1 次,每周 5 次(固定在周一至周五早上 9 点给药),连续 18 周;模型组和正常对照组小鼠同法给予等体

积生理盐水。实验过程中,除模型组小鼠死亡4只、环孢素低剂量组小鼠死亡1只外,其余组小鼠均全部存活。记录实验过程中小鼠体质量变化情况。

所有存活小鼠均于末次灌胃1h后按压腹腔,每隔2h按压1次,采集24h尿液备用。然后采用摘眼球取血法处死小鼠,将血液置于无抗凝剂的EP管中,静置30min后,2000 r/min离心10min,取上层血清,于-80℃保存备用。解剖全部小鼠,摘取小鼠肾脏,剪取约1/3于-80℃条件下保存备用,剩余部分固定于10%甲醛溶液中备用。

2.3 小鼠血清免疫学指标和炎症因子水平检测

采用ELISA法检测小鼠血清中抗ds-DNA抗体、IgG、IgM、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 水平,按照相应试剂盒说明书进行操作。

2.4 小鼠24h尿蛋白和血清中Cr、BUN水平检测

采用生物化学法检测。取小鼠24h尿液样本,采用考马斯亮蓝法检测尿蛋白水平;取-80℃保存的血清样本,解冻至室温后,采用相应试剂盒检测Cr和BUN水平,以评估小鼠肾功能。

2.5 小鼠肾组织病理变化观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法观察。取部分10%甲醛溶液中固定48h的小鼠肾组织样本,以水洗3min \times 5次,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,切片;干燥后以二甲苯脱蜡,水化,HE染色;再以乙醇梯度脱水,二甲苯透明,封片。光学显微镜下观察肾组织损伤及炎症细胞浸润等情况。

2.6 小鼠肾组织中IgG免疫复合物沉积情况考察

采用免疫组化法考察。取10%甲醛溶液中固定48h的部分小鼠肾组织样本,按“2.5”项下“以水洗……浸蜡包埋,切片”操作,室温下以1%过氧化氢溶液孵育10min,以消除内源性过氧化氢酶活性;然后加入一抗(小鼠源IgG抗体,1:100),4℃过夜,磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)清洗3min \times 2次;羊血清(1:10)封闭15min,PBS清洗3min \times 2次;加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(1:100),室温孵育30min;DBA染液显色,苏木素染液复染,封片。每张切片在显微镜下取20个视野观察IgG免疫复合物沉积情况(细胞核呈蓝黑色,而沿肾小球毛细血管壁可见黄褐色沉积者为阳性),并采用Image Pro-Plus 6.0软件分析阳性染色的平均光密度(IOD)值以表示其表达水平。

2.7 小鼠肾组织中p38MAPK、TWEAK mRNA表达水平检测

采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测。取-80℃保存的肾组织样本解冻至室温(每组选取6只小鼠的肾脏,每个肾脏取5mg组织样本),制备匀浆。采用Trizol法提取RNA,逆转录合成cDNA。反应体系:5倍浓度的缓冲液2 μ L,逆转录酶1 μ L,RT-PCR混合液1 μ L,单链DNA(ss-DNA)2 μ L,不含RNase的水加至20 μ L。反应条件:37℃,15min;85℃,5s;-4℃保存。

依据SYBR Premix Ex Taq™ II检测试剂盒说明书操作进行扩增。扩增体系:2倍浓度的PCR扩增液10 μ L,上游引物0.4 μ L,下游引物0.4 μ L,cDNA 2 μ L,水7.2 μ L。反应条件:95℃预变性30s,95℃变性10s,60℃退火延伸25s,共42个循环。

按照上述操作步骤,以GAPDH为参比,检测各组小鼠p38MAPK、TWEAK mRNA的表达水平。

2.8 统计学方法

数据采用SPSS 22.0软件进行统计处理。首先进行正态分布检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠体质量变化情况

造模过程中大多数小鼠的体质量有所下降;开始给药后,随着时间推移,阳性对照组和环孢素高、低剂量组小鼠体质量下降趋势放缓或者有所增加,结果见表1。

表1 各组小鼠体质量变化情况($\bar{x} \pm s, g$)

Tab 1 Body weight change of mice in each group ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	给药时间			
		0周	6周	12周	18周
正常对照组	10	19.21 \pm 2.87	21.33 \pm 2.14	22.73 \pm 1.92	24.33 \pm 2.18
模型组	6	18.32 \pm 1.34 ^a	16.51 \pm 1.47 ^a	15.42 \pm 1.28 ^a	14.32 \pm 1.27 ^a
阳性对照组	10	18.45 \pm 2.11	20.55 \pm 1.63 ^b	19.44 \pm 1.39 ^b	18.75 \pm 2.15 ^b
环孢素高剂量组	10	19.23 \pm 2.18 ^a	18.80 \pm 2.15 ^a	18.93 \pm 2.11 ^b	18.34 \pm 1.28 ^a
环孢素低剂量组	9	19.07 \pm 1.23	18.46 \pm 1.25 ^a	17.38 \pm 3.01 ^b	16.32 \pm 2.12 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, ^a $P < 0.05$; vs. model group, ^b $P < 0.05$

3.2 各组小鼠血清免疫学指标水平检测结果

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中抗ds-DNA抗体、IgG、IgM水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明SLE模型成功建立。与模型组比较,阳性对照组小鼠抗ds-DNA抗体、IgM水平,环孢素高剂量组小鼠抗ds-DNA抗体、IgG、IgM水平,环孢素低剂量组小鼠抗ds-DNA抗体、IgG水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠血清免疫学指标水平检测结果见表2。

表2 各组小鼠血清免疫学指标水平检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Result of serum immunological indicators levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抗ds-DNA抗体,pg/mL	IgG,ng/L	IgM,ng/L
正常对照组	10	5.82 \pm 1.26	47.24 \pm 23.24	0.13 \pm 0.03
模型组	6	19.42 \pm 8.20 ^a	54.38 \pm 18.26 ^a	0.18 \pm 0.05 ^a
阳性对照组	10	7.41 \pm 2.11 ^b	50.44 \pm 12.43	0.12 \pm 0.02 ^b
环孢素高剂量组	10	6.92 \pm 1.79 ^a	43.27 \pm 14.22 ^a	0.13 \pm 0.04 ^a
环孢素低剂量组	9	7.31 \pm 2.17 ^a	47.41 \pm 15.37 ^a	0.16 \pm 0.04

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, ^a $P < 0.05$; vs. model group, ^b $P < 0.05$

3.3 各组小鼠血清炎症因子水平检测结果

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中TNF- α 、IL-6、

IFN- γ 水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和环孢素高剂量组的上述指标水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明环孢素能显著抑制SLE模型小鼠炎症因子的释放。各组小鼠血清炎症因子水平检测结果见表3。

表3 各组小鼠血清炎症因子水平检测结果($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)
Tab 3 Result of serum levels of inflammatory factor of mice in each group($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	n	TNF- α	IL-6	IFN- γ
正常对照组	10	10.22 \pm 4.58	11.73 \pm 2.19	18.33 \pm 6.36
模型组	6	84.35 \pm 9.02 ^a	112.42 \pm 23.11 ^a	52.52 \pm 11.29 ^a
阳性对照组	10	55.46 \pm 7.21 ^b	39.44 \pm 5.98 ^b	33.54 \pm 9.48 ^b
环孢素高剂量组	10	63.25 \pm 6.11 ^b	78.95 \pm 15.25 ^b	33.86 \pm 8.21 ^b
环孢素低剂量组	9	78.44 \pm 5.39	96.33 \pm 10.39	49.45 \pm 6.58

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

Note:vs. normal control group,^a $P<0.05$;vs. model group,^b $P<0.05$

3.4 各组小鼠24 h尿蛋白和血清中Cr、BUN水平检测结果

与正常对照组比较,模型组小鼠24 h尿蛋白和血清中Cr、BUN水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和环孢素高剂量组小鼠24 h尿蛋白和血清中Cr、BUN水平,环孢素低剂量组小鼠血清中BUN水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明环孢素能显著改善SLE模型小鼠的肾功能。各组小鼠24 h尿蛋白和血清中Cr、BUN水平检测结果见表4。

表4 各组小鼠24 h尿蛋白和血清中Cr、BUN水平检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Results of 24 h urine protein and serum levels of Cr and BUN of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h尿蛋白,mg	Cr, $\mu\text{mol/L}$	BUN,mmol/L
正常对照组	10	0	22.44 \pm 7.28	5.32 \pm 1.13
模型组	6	7.41 \pm 1.29 ^a	34.35 \pm 5.32 ^a	11.51 \pm 3.18 ^a
阳性对照组	10	3.45 \pm 1.16 ^b	21.44 \pm 4.87 ^b	7.08 \pm 1.21 ^b
环孢素高剂量组	10	3.52 \pm 0.73 ^b	25.27 \pm 5.18 ^b	7.85 \pm 1.27 ^b
环孢素低剂量组	9	6.38 \pm 1.21	30.43 \pm 8.28	9.47 \pm 2.01 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

Note:vs. normal control group,^a $P<0.05$;vs. model group,^b $P<0.05$

3.5 各组小鼠肾组织病理变化观察结果

正常对照组小鼠肾组织形态结构正常,无炎症细胞浸润,未见明显组织病理学变化;模型组小鼠肾组织结构不清晰,可见大量炎症细胞浸润,系膜基质增宽,且可见蛋白管型,部分管腔内皮细胞增生,毛细血管祥闭塞;阳性对照组和环孢素高、低剂量组小鼠肾组织炎症细胞浸润较少,系膜细胞增生、系膜基质增宽现象明显减轻。各组小鼠肾组织病理学显微图见图1。

3.6 各组小鼠肾组织中IgG免疫复合物沉积考察结果

与正常对照组比较,模型组小鼠肾小球内皮下和上皮可见大量黄褐色IgG免疫复合物沉积;IOD值显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和环孢素高、低剂量组小鼠肾组织中黄褐色IgG

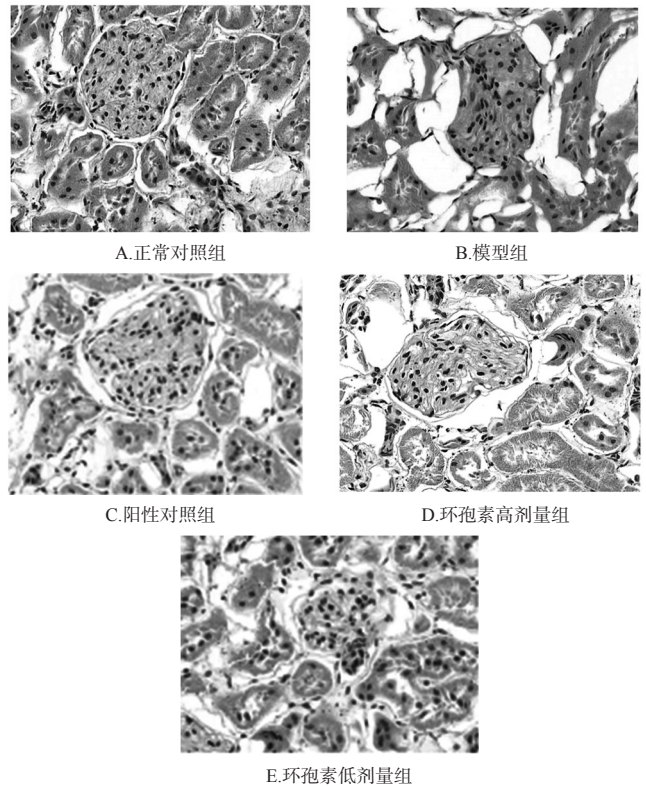


图1 各组小鼠肾组织病理学显微图(HE染色,×100)
Fig 1 Pathological microscopy of renal tissue of mice in each group(HE staining,×100)

免疫复合物沉积明显减少;IOD值均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各组小鼠肾组织中IgG免疫复合物表达水平检测结果见表5。

表5 各组小鼠肾组织中IgG免疫复合物表达水平检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Result of expression level of IgG immune complex in renal tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IOD值
正常对照组	10	1 213 \pm 158
模型组	6	1 845 \pm 102 ^a
阳性对照组	10	1 256 \pm 121 ^b
环孢素高剂量组	10	1 355 \pm 111 ^b
环孢素低剂量组	9	1 484 \pm 153 ^b

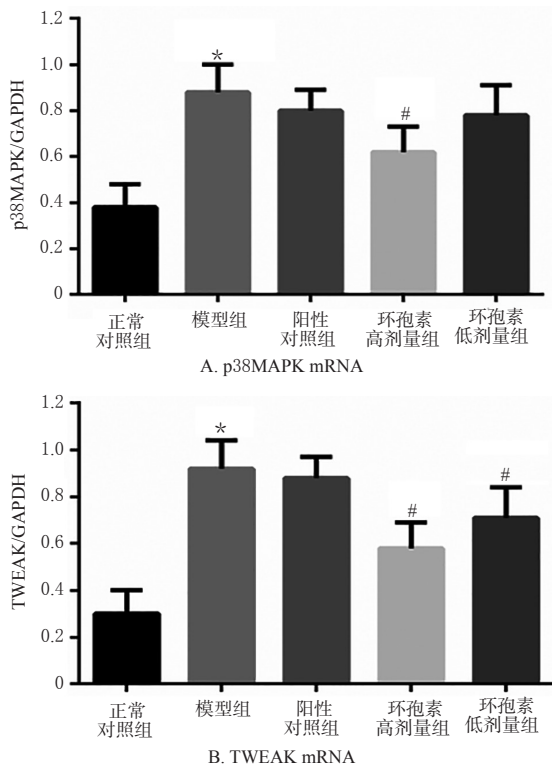
注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

Note:vs. normal control group,^a $P<0.05$;vs. model group,^b $P<0.05$

3.7 各组小鼠肾组织中p38MAPK、TWEAK mRNA的表达水平检测结果

与正常对照组比较,模型组小鼠肾组织中p38MAPK、TWEAK mRNA的表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组的上述指标水平差异均无统计学意义($P>0.05$);环孢素高剂量组小鼠p38MAPK、TWEAK mRNA的表达水平,环孢素低剂量组小鼠TWEAK mRNA的表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明环孢素能抑制SLE模型小鼠肾组织中p38MAPK、TWEAK mRNA的表达。各组小鼠肾组织中p38MAPK、TWEAK

mRNA 的表达水平柱形图见图 2。



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$
 Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

图 2 各组小鼠肾组织中 p38MAPK、TWEAK mRNA 的表达水平柱形图

Fig 2 Histogram of the expression level of p38MAPK and TWEAK mRNA in renal tissues of mice in each group

4 讨论

本研究中,小鼠单次腹腔给予 0.5 mL 降植烷 30 d 后,逐渐产生自身免疫性抗体,且抗体水平渐渐升高;第 6 个月时 90% 的小鼠出现肾脏病变,主要表现为免疫复合物性肾小球肾炎,表明典型狼疮病变形成,即 SLE 模型成功建立。有研究报道,降植烷能够促进间皮细胞凋亡,并能激活 Toll 样受体 7 (TLR7),使树突状细胞产生大量 I 型干扰素 (IFN- α) 和白细胞介素 12 (IL-12),从而促使小鼠产生狼疮样病变,此病变是发生肾脏病变的重要过程^[1]。虽然降植烷诱导 SLE 这一方法造模所需时间较长,但是能够成功诱导 90% 以上的小鼠发生狼疮样病变,且此病变与人类 SLE 极其相似;加之该方法适用于多种非狼疮易感性小鼠品系,因此现已广泛用于 SLE 发病机制研究、新药研发等领域^[12-13]。

SLE 作为一种常见的自身免疫性疾病,由于体内产生了大量致病性自身抗体和免疫复合物,可造成组织损伤,临床上可表现出多个系统和脏器的损害,其中肾脏是最常受损的器官。据统计,几乎所有 SLE 患者的肾组织均有病理变化,且大部分都有临床表现。p38MAPK 是狼疮肾炎发病的重要信号通路之一。在多

种动物模型与细胞研究中均发现,p38MAPK 参与调控 IL-10 及单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的表达^[5-9]。且研究发现,p38MAPK 信号通路可被 TWEAK 激活^[5]。TWEAK 是肿瘤坏死因子配体超家族的新成员,研究发现,TWEAK 转录子具有诱导炎症细胞因子产生、刺激细胞生长和血管生成的作用,在一定条件下还能诱导细胞凋亡;此外,许多 TWEAK 转录子还具有免疫调节的生物活性^[14-15]。已有研究发现,SLE 模型小鼠肾组织中 TWEAK mRNA 呈局部高表达,且其表达水平与肾病理损害程度呈正相关^[16]。

本研究结果显示,模型组小鼠血清免疫学指标 (抗 ds-DNA 抗体、IgG、IgM)、炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IFN- γ)、24 h 尿蛋白及血清中 Cr、BUN 的水平均显著升高;肾组织中 IgG 免疫复合物沉积明显增加,病理变化明显;肾组织中 p38MAPK、TWEAK mRNA 的表达水平均显著升高。环孢素给药 18 周后,SLE 模型小鼠血清免疫学指标、炎症因子、24 h 尿蛋白及血清中 Cr、BUN 的水平均显著降低;肾组织中 IgG 免疫复合物沉积明显减少,病理变化明显减轻;肾组织中 p38MAPK、TWEAK mRNA 的表达水平均显著降低。这表明环孢素对降植烷诱导的 SLE 模型小鼠的免疫学指标、炎症因子、肾功能指标及肾组织病变等均有一定的改善作用。

综上所述,环孢素对降植烷致 SLE 模型小鼠有一定的肾组织保护作用,对其肾损伤有一定改善作用,其机制可能与抑制 TWEAK-p38MAPK 信号通路有关。

参考文献

- [1] 徐雪,吕玲. Th17 与 Treg 在系统性红斑狼疮发病机制中的作用[J]. 现代免疫学, 2010, 30(3): 257-261.
- [2] CAMPBELL S, MICHAELSON J, BURKLY L, et al. The role of TWEAK/Fn14 in the pathogenesis of inflammation and systemic autoimmunity[J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 2273-2284.
- [3] ZHENG TS, BURKLY LC. No end in site: TWEAK/Fn14 activation and autoimmunity associated-end-organ pathologies[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(2): 338-347.
- [4] KAPLAN MJ, LEWIS EE, SHELDEN EA, et al. The apoptotic ligands TRALL, TWEAK and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells[J]. *J Immunol*, 2002, 169(10): 6020-6029.
- [5] LIU ZC, ZHOU QL, LIU ZQ, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) mediates p38 mitogen-activated protein kinase activation and signal transduction in peripheral blood mononuclear cells from patients with lupus nephritis[J]. *Inflammation*, 2012, 35(3): 935-943.
- [6] KIM JM, WHITE JM, SHAW AS, et al. MAPK p38 alpha is dispensable for lymphocyte development and proliferation[J]. *J Immunol*, 2005, 174(3): 1239-1244.
- [7] COOK R, WU CC, KANG YJ, et al. The role of the p38 pathway in adaptive immunity[J]. *Cell Mol Immunol*,

三棱、莪术提取物联合热疗对结肠癌 SW620 细胞凋亡及迁移、侵袭能力的影响^Δ

王振兴^{1*}, 李水芹^{2#}, 赵梓亦², 王飞¹(1. 成都中医药大学临床医学院, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院脾胃病科, 成都 610073)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3386-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.17

摘要 目的: 研究三棱、莪术提取物联合热疗对结肠癌 SW620 细胞凋亡及迁移、侵袭能力的影响。方法: 采用 MTT 法检测不同质量浓度的三棱提取物(1.25、2.5、5、7.5、10 μg/mL)、莪术提取物(5、10、15、20、25 μg/mL)对 SW620 细胞的毒性, 计算其 30% 细胞生长抑制浓度(IC₃₀)和 50% 细胞生长抑制浓度(IC₅₀)。采用 CFSE/PI 双荧光染色法、Annexin V/PI 双染色法+流式细胞术考察 IC₅₀ 三棱提取物、IC₅₀ 莪术提取物分别单用或联合热疗(42 °C 条件下处理 90 min)对 SW620 细胞死亡情况和凋亡率的影响; 采用划痕实验和 Transwell 侵袭实验考察 IC₃₀ 三棱提取物、IC₃₀ 莪术提取物分别单用或联合热疗对 SW620 细胞迁移和侵袭能力的影响。结果: 三棱提取物 IC₃₀ 为 3.24 μg/mL, IC₅₀ 为 4.69 μg/mL; 莪术提取物 IC₃₀ 为 11.27 μg/mL, IC₅₀ 为 16.81 μg/mL。与 IC₅₀ 三棱提取物组或 IC₅₀ 莪术提取物组比较, IC₅₀ 三棱提取物+热疗组或 IC₅₀ 莪术提取物+热疗组的死亡细胞显著增多, 细胞凋亡率显著升高(P<0.05)。与 0 h 时比较, IC₃₀ 三棱提取物组、IC₃₀ 莪术提取物组、IC₃₀ 三棱提取物+热疗组、IC₃₀ 莪术提取物+热疗组细胞划痕实验的愈合间距均未见明显变窄。与 IC₃₀ 三棱提取物组或 IC₃₀ 莪术提取物组比较, IC₃₀ 三棱提取物+热疗组或 IC₃₀ 莪术提取物+热疗组侵袭实验的跨膜细胞数均显著减少(P<0.05)。结论: 联用热疗能显著增强三棱或莪术提取物对 SW620 细胞的杀伤作用, 并能显著提高两种提取物对 SW620 细胞迁移和侵袭能力的抑制作用。

关键词 三棱; 莪术; 热疗; 结肠癌; SW620 细胞; 凋亡; 迁移; 侵袭

Effects of *Sparganium stolon* Extract or *Curcuma zedoaria* Extract Combined with Hyperthermia Treatment on Apoptosis, Migration and Invasion Ability of Colon Cancer SW620 Cell

WANG Zhenxing¹, LI Shuiqin², ZHAO Ziyi², WANG Fei¹(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 2. Dept. of Spleen and Stomach Disease, the Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610073, China)

- 2007, 4(4): 253-259.
- [8] IWATA Y, WADA T, FURUICHI K, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(1): 57-67.
- [9] OHASHI R, NAKAGAWA T, WATANABE S, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase augments progression of remnant kidney model by activating the ERK pathway[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(2): 477-485.
- [10] QUARTUCCIO L, SACCO S, FRANZOLINI N, et al. Efficacy of cyclosporin-A in the long-term management of thrombocytopenia associated with systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2006, 15(2): 76-79.
- [11] 陶云霞, 蔡磊, 沈辉, 等. 降植烷诱导小鼠类风湿关节炎的模型[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(11): 1498-1500.
- [12] REEVES WH, LEE PY, WEINSTEIN JS, et al. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons[J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(9): 455-464.
- [13] 李金枝, 丁隽, MERIM BOUKHEROUBA, 等. Pristane 诱导小鼠系统性红斑狼疮动物模型的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(2): 119-122.
- [14] NAKAYAMA M, ISHIDOH K, KAYAGAKI N, et al. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death[J]. *J Immunol*, 2002, 168(2): 734-743.
- [15] CHICHEPORTICHE Y, BOURDON PR, XU H, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 32401-32410.
- [16] ZHAO Z, BURKLY LC, CAMPBELL S, et al. TWEAK/Fn14 interactions are instrumental in the pathogenesis of nephritis in the chronic graft-versus-host model of systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol*, 2007, 179(11): 7949-7958.

Δ 基金项目: 四川省教育厅自然科学基金项目(No.16ZA0115); 成都中医药大学科技发展基金项目(No.ZRQN1524)

* 医师, 博士研究生。研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病和老年疾病。电话: 028-61800220。E-mail: vinpoet@163.com

通信作者: 副主任医师, 博士。研究方向: 围手术期的中医特色治疗、中医药防治呼吸系统疾病和老年疾病。电话: 028-87765294。E-mail: smallwater1985@126.com

(收稿日期: 2018-04-24 修回日期: 2018-10-19)

(编辑: 段思怡)