

· 基础研究 ·

益气养阴祛瘀中药对干燥综合征 NOD 小鼠
颌下腺 TLR-IFN-BAFF 信号通路的影响林崇泽¹ 黄绥心¹ 秦 源¹ 孙 晗¹ 李志宇¹ 王新昌²

摘要 **目的** 通过观察益气养阴祛瘀中药对 NOD 小鼠颌下腺组织中 Toll 样受体-5 (TLR5)、 α 干扰素 (IFN- α)、B 淋巴细胞刺激因子 (BAFF) 蛋白表达的影响, 以此来探究益气养阴祛瘀中药对干燥综合征 (Sjögren's Syndrome, SS) 的治疗机制。**方法** 将 30 只 8 周龄 NOD 小鼠随机分为模型组、羟氯喹组和中药组, 每组各 10 只。另将 10 只 8 周龄 ICR 小鼠作为正常对照组 (正常组)。正常组和模型组正常饲养, 羟氯喹组每日给予羟氯喹 75 mg/kg 灌胃治疗; 中药组每日给予益气养阴祛瘀中药煎剂 (27.4 g/kg) 灌胃治疗。饲养用药 12 周后, 各组小鼠股动脉取血, 断颈处死, 摘取颌下腺组织; 通过 Western blot 法检测各组小鼠颌下腺组织中 TLR5、IFN- α 和 BAFF 蛋白表达水平。**结果** 模型组 NOD 小鼠颌下腺组织中的 TLR5、IFN- α 和 BAFF 蛋白相对表达量较正常组 ICR 小鼠均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组小鼠颌下腺组织中的 TLR5、IFN- α 、BAFF 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组比较, 中药组 NOD 小鼠的 IFN- α 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。**结论** 益气养阴祛瘀中药对 SS 样 NOD 小鼠的治疗机制可能与调控 TLR-IFN-BAFF 信号通路有关。

关键词 益气养阴祛瘀中药; 干燥综合征; NOD 小鼠; Toll 样受体-5; α 干扰素; B 淋巴细胞刺激因子

Effect of Chinese Herbs for Qi Benefiting, Yin Nourishing, Stasis Removing on TLR-IFN-BAFF Signaling Pathway in Submaxillary Gland of NOD Mice with Sjögren's Syndrome LIN Chong-ze¹, HUANG Sui-xin¹, QIN Yuan¹, SUN Han¹, LI Zhi-yu¹, and WANG Xin-chang² 1 Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 Department of Rheumatism Immunity, Second Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Chinese herbs for qi benefiting, yin nourishing, stasis removing (CH-QBYNSR) on expressions of Toll-like receptor 5 (TLR5), interferon α (IFN- α) and BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family) in submaxillary gland of NOD mice, thus studying its therapeutic mechanism for treating Sjögren's syndrome (SS). **Methods** Totally 30 8-week-old NOD mice were randomly divided into model group, hydroxychloroquine group, and CH group, 10 in each group. Another ten 8-week-old ICR mice were recruited as a normal group. Mice in the normal group and the model group were normally fed. Hydroxychloroquine (75 mg/kg per day) was administered to those in the hydroxychloroquine group by gastrogavage. CH-QBYNSR was administered to those in the CH group by gastrogavage (27.4 g/kg per day). After 12 weeks of feeding and medication, mice were sacrificed by neck dissection, and blood collected from femoral artery. The submandibular gland tissue was collected. Protein expression levels of TLR5, IFN- α , and BAFF in submandibular gland tissue of mice were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the relative expression levels of TLR5, IFN- α , and BAFF in submandibular gland tissue of NOD mice were increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the relative expression levels of TLR5, IFN- α , and BAFF in submandibular gland tissue of the CH group were decreased ($P < 0.05$). Compared with the hydroxychloroquine group, the relative expression level of IFN- α in submandibular gland tissue of NOD mice were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The therapeutic mechanism of CH-QBYNSR for NOD mice was associated with regulating TLR-IFN-BAFF signaling pathway.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173248)

作者单位: 1. 浙江中医药大学第二临床医学院 (杭州 310053); 2. 浙江中医药大学第二附属医院风湿免疫科 (杭州 310053)

通讯作者: 王新昌, Tel: 0571-85288249, E-mail: ossani@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170828.251

KEYWORDS Chinese herbs for qi benefiting, yin nourishing, stasis removing; Sjögren's syndrome; NOD mouse; Toll-like receptor 5; interferon α ; B cell activating factor belonging to the TNF family

干燥综合征 (Sjögren syndrome, SS) 是一种常见于中老年女性的自身免疫性疾病, 临床主要表现为口眼干燥和高球蛋白血症, 甚者可累及其他脏器系统而出现复杂多变的症状。益气养阴祛瘀法是根据 SS 气虚阴亏血瘀的主要病机特点而确立的治疗法则, 经多年的临床应用, 证实对 SS 具有很好的治疗效果^[1]。本实验拟通过观察益气养阴祛瘀中药对自发性 SS 模型 NOD 小鼠颌下腺各细胞因子的干预作用, 以探明益气养阴祛瘀中药治疗 SS 的作用机制。

材料与方法

1 动物 NOD 小鼠 30 只, SPF 级, 8 周龄, 雌性, 体重 (20.7 ± 2.4) g, 由上海斯莱克动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK (沪) 2007 - 0005; ICR 小鼠 10 只, SPF 级, 8 周龄, 雌性, 体重 (22.9 ± 1.4) g, 由上海斯莱克动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK (沪) 2008 - 0016。所有实验动物均饲养于浙江中医药大学实验动物中心清洁级动物房, 室温 $22 \sim 25$ °C, 湿度 50% ~ 70%, 自由摄食, 饮水瓶给水。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 药物 益气养阴祛瘀中药组成: 生地 24 g 玄参 15 g 麦冬 15 g 石斛 12 g 白芍 12 g 黄芪 24 g 丹参 30 g 益母草 15 g, 上述生药由浙江中医药大学中药饮片厂提供, 由浙江中医药大学中药实验室煎制浓缩成含生药 1.37 g/mL 的溶液; 硫酸羟氯喹片: 每片 0.1 g, 上海中西制药有限公司, 生产批号: 101106。

3 试剂及仪器 小鼠 TLR5、BAFF 一抗检测液 (均为美国 Santa Cruz 生物技术公司)、小鼠 IFN- α 一抗检测液 (美国 BioVision 公司)、二抗使用羊抗鼠二抗 (美国 Santa Cruz 生物技术公司); 垂直电泳仪、转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); 红外激光双色成像系统 (基因有限公司)。

4 动物分组及给药方法 30 只 NOD 小鼠随机分为模型组、羟氯喹组和中药组, 每组 10 只; 10 只 ICR 小鼠作为正常对照组 (简称正常组)。模型组和正常组每天正常饲养。给药组在正常饲养的基础上, 于实验开始后每天 1 次定时给药, 给药剂量按照小鼠与人的等效剂量换算公式计算。羟氯喹组每天定时给予羟氯喹 75 mg/kg 灌胃 1 次; 中药组每天定时给予益气养阴祛瘀中药煎剂 27.4 g/kg 灌胃 1 次。连续灌胃饲养 12 周后,

各组小鼠股动脉取血, 断颈处死, 分离颌下腺进行检测。

5 观察指标及方法

5.1 颌下腺组织总蛋白的提取 将颌下腺置于已灭菌的玻璃匀浆器中, 加入 800 μ L 的细胞裂解液进行充分研磨后, 吸净液体于 1.5 mL 的 EP 管中, 将 EP 管置于旋转培养器中 30 min, 使其充分裂解。然后离心 (12 000 r/min, 4 °C) 10 min, 吸取上清液, 将样品分装后置于 -70 °C 环境下保存。

5.2 Western blot 法检测 TLR5、INF- α 、BAFF 蛋白表达 小鼠颌下腺中各蛋白的表达提取颌下腺组织总蛋白后, 每孔加样 10 ~ 25 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳 (60 V, 当溴酚蓝距分离胶底部约 1 cm 处时, 停止电泳), 120 mA (2 ~ 3 h) 湿转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 漂洗 3 次, 一抗 4 °C 震荡孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 二抗避光室温孵育 2 h, TBST 避光漂洗 3 次, 使用红外激光双色成像系统中进行红外激光扫膜, 扫膜后使用 Odessey V 3.0 软件对图像进行光密度分析。以目的蛋白的灰度值与对应的内参蛋白 β -actin 的灰度值比值作为该样品中目的蛋白的相对表达量。最后以目的蛋白的相对表达量为参数进行半定量统计分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 3 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

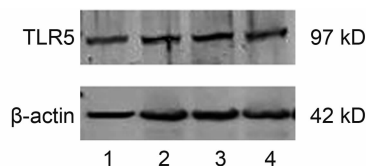
1 各组小鼠颌下腺 TLR5 蛋白表达比较 (表 1, 图 1) 与正常组 ICR 小鼠比较, 模型组 NOD 小鼠颌下腺中 TLR5 蛋白的相对表达量显著升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 中药组 TLR5 蛋白的相对表达量降低 (P < 0.05); 中药组与羟氯喹组表达量比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2 各组小鼠颌下腺 IFN- α 蛋白表达比较 (表 2, 图 2) 与正常组 ICR 小鼠比较, 模型组 NOD 小鼠颌

表 1 各组小鼠颌下腺 TLR5 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR5/ β -actin
正常	10	0.414 $\pm$ 0.022
模型	10	0.902 $\pm$ 0.033 *
羟氯喹	10	0.858 $\pm$ 0.022
中药	10	0.815 $\pm$ 0.016 Δ

注: 与正常组比较, *P < 0.05; 与模型组比较, Δ P < 0.05



注:1.正常组;2.羟氯喹组;3.模型组;4.中药组;图2、3同

图1 各组小鼠颌下腺 TLR5 蛋白电泳图

下腺中的 IFN- α 蛋白相对表达量显著增高 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药组和羟氯喹组的 IFN- α 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$),且中药组的 IFN- α 蛋白相对表达量低于羟氯喹组 ($P < 0.05$)。

表2 各组小鼠颌下腺 IFN- α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IFN- α / β -actin
正常	10	0.053 $\pm$ 0.004
模型	10	0.178 $\pm$ 0.027 *
羟氯喹	10	0.087 $\pm$ 0.004 Δ
中药	10	0.077 $\pm$ 0.005 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与羟氯喹组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

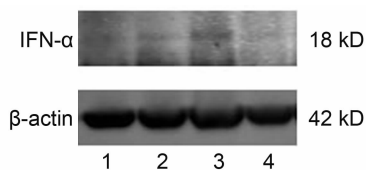


图2 各组小鼠颌下腺 IFN- α 蛋白电泳图

3 各组小鼠颌下腺 BAFF 蛋白表达比较(表3,图3) 与正常组 ICR 小鼠比较,模型组 NOD 小鼠颌下腺中的 BAFF 蛋白相对表达量明显增高 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药组和羟氯喹组的颌下腺 BAFF 蛋白相对表达量明显降低 ($P < 0.05$);中药组与羟氯喹组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表3 各组小鼠颌下腺 BAFF 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	BAFF/ β -actin
正常	10	0.257 $\pm$ 0.016
模型	10	0.469 $\pm$ 0.016 *
羟氯喹	10	0.389 $\pm$ 0.015 Δ
中药	10	0.370 $\pm$ 0.022 Δ

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

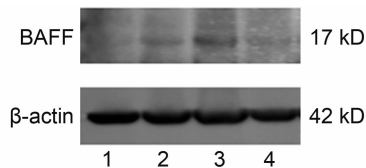


图3 各组小鼠颌下腺 BAFF 蛋白电泳图

讨 论

TLR5 蛋白主要分布于单核巨噬细胞、树突状细胞 (DC) 等免疫细胞的细胞膜表面,是 Toll 样受体蛋白家族 (Toll-like receptors, TLR) 中的一员,其功能与家族内其他蛋白相类似^[2]。TLR 是最初在果蝇体内被发现的 1 种 I 型跨膜蛋白,自 1997 年发现与果蝇同源的第 1 个人类 TLRs 以来,在人类基因组中已被发现的 TLRs 已有 11 个,TLR 1~11。TLR 主要通过结合病原相关分子模式而识别病原体,经活化后的 TLR 蛋白可以促进浆细胞样树突状细胞 (pDCs) 分泌大量的 I 型干扰素 (IFN- α/β) 和白介素,同时还可促进 T 淋巴细胞和 NK 细胞分泌大量的 II 型干扰素 (IFN- γ)^[3],最终激活先天性免疫和获得性免疫应答,在先天性免疫和获得性免疫两种机制中均发挥着重要的作用^[4]。

IFN- α 是最早被人们所熟知的细胞因子之一,是机体炎症与免疫应答中的重要调节因子,在免疫调节中发挥着重要的作用。IFN- α 作为 I 型干扰素的一种,主要由被称为“天然干扰素生产细胞”的 pDCs 分泌,参与到人体的先天性免疫和获得性免疫应答^[3]。I 型干扰素和 TLR 之间关系十分密切,在自身免疫疾病的发生及复发中发挥者重要的作用^[5]。在自身免疫疾病中,表达于 pDCs 表面的 TLR 经活化后,会刺激 pDCs 产生大量的 IFN- α ,进而激活自身反应型 T、B 淋巴细胞,诱导 B 细胞产生抗体,促进 DC 的成熟及分化,增强 DC 对自身抗原的捕获和提呈能力,从而打破免疫耐受,启动并维持了多种自身免疫疾病的发生发展^[6]。在 SS 患者的唾液腺中,可以观察到大量异常活化的 pDCs^[7],这可能是 SS 患者颌下腺中的 IFN- α 处于高表达水平的原因之一^[8]。

BAFF 是肿瘤坏死因子超家族中的成员,具有促进 B 细胞增殖、存活以及分化的能力,是 B 细胞存活的关键因子。但过量表达的 BAFF 会导致 B 细胞过度活化,使自身免疫性 B 细胞持续存活,同时刺激自身免疫性 B 细胞产生更多的自身抗体,从而引起多种自身免疫性疾病。虽然具体机制尚不明确,但在 SS 患者体内 BAFF 的高表达水平与 I 型干扰素有着直接的关系^[9]。同时在 SS 患者的唾液腺中,高表达的 IFN- α 可以刺激 SS 的唾液腺上皮细胞产生大量 BAFF,使 BAFF 在 SS 患者的唾液腺中处于高表达状态^[10]。

综上所述,在受到感染或其他因素的刺激后,表达于 pDCs 等免疫细胞表面的 TLR 蛋白被异常活化,激活了 IFN- α 的过量表达和释放;过量表达和释放的 IFN- α 会刺激机体分泌大量的 BAFF,同时活化细胞

毒性 T 细胞对自身细胞进行杀伤而产生自身抗体;过量表达的 BAFF 可以使自身免疫性 B 细胞免于凋亡,同时还可刺激自身免疫性 B 细胞产生更多的自身抗体;由自身免疫性 B 细胞产生的自身抗原和自身抗体相结合,形成了大量的免疫复合物,这些免疫复合物作为内源性的 I 型干扰素诱导剂又可被 TLRs 所识别,诱导产生更多的 IFN- α ,最终导致 SS 的发生与发展。由 TLR、IFN 和 BAFF 组成的 TLR-IFN-BAFF 信号传导通路贯穿了 SS 发病过程的始终,是 SS 疾病发病的重要致病轴。

目前对 SS 无根治的办法,临床治疗中重点在于改善患者的临床症状。西医对于 SS 的治疗主要采用免疫抑制剂和糖皮质激素治疗,长期使用其不良反应较大。益气养阴祛瘀法是我们课题组总结多年的临床经验后确立的 SS 中医治疗法则^[11],基于这一法则,我们选取黄芪、生地、玄参、麦冬、石斛、白芍、丹参、益母草等益气养阴祛瘀中药运用于 SS 的临床治疗中,收到了较好的临床治疗效果,且长期服用未见明显不良反应^[12]。

本课题前期研究发现,益气养阴祛瘀中药煎剂可以降低 NOD 小鼠的每日平均饮水量,增加唾液分泌量,同时还可明显改善 NOD 小鼠的胸腺、脾脏和颌下腺指数,这提示益气养阴祛瘀中药对 NOD 小鼠的 SS 样症状具有很好的改善作用^[13]。从本次实验结果可见,中药组 NOD 小鼠颌下腺中 TLR5、IFN- α 和 BAFF 蛋白相对表达量较模型组明显降低,这说明益气养阴祛瘀中药可以明显抑制 NOD 小鼠颌下腺中的 TLR5、IFN- α 和 BAFF 蛋白表达,可能是通过抑制 NOD 小鼠体内异常活化的 TLR,从而减少 IFN- α 的产生,使过量表达的 BAFF 得到改善,纠正了自身免疫性 T、B 细胞的异常活化,减少自身免疫复合物的产生,最终使 NOD 小鼠的 SS 样表现得到缓解。这提示益气养阴祛瘀中药很可能是通过调节 TLR-IFN-BAFF 信号传导通路来发挥对 SS 样 NOD 小鼠的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] 王新昌,谢志军,温成平,等.益气养阴祛瘀法治疗原发性干燥综合征的疗效观察[J].中国基层医学,2009,16(1):92-95.
- [2] Rozis G, Benlahrech A, Duraisingham S, et al. Human Langerhans' cells and dermal-type dendritic cells generated from CD34 stem cells express different Toll-like receptors and secrete different cytokines in response to Toll-like receptor ligands[J]. Immunology, 2008, 124(3): 329-338.
- [3] Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 275-306.
- [4] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.
- [5] Chen CJ, Lin KH, Lin SC, et al. High prevalence of immunoglobulin A antibody against Epstein Barr virus capsid antigen in adult patients with lupus with disease flare: case control studies[J]. Rheumatology, 2005, 32(1): 44-47.
- [6] Rönblom L, Alm GV. A pivotal role for the natural interferon- α -producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus[J]. J Exp Med, 2001, 194(12): 59-63.
- [7] Aziz KE, McCluskey PJ, Wakefield D. Characterization of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjögren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles[J]. Ann Rheum Dis, 1997, 56(2): 140-143.
- [8] Nordmark GI, Eloranta ML, Rönblom L. Primary Sjögren's syndrome and the type I interferon system[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012, 13(10): 2054-2062.
- [9] Hedegaard CJ, Sellebjerg F, Krakauer M, et al. Interferon-beta increases systemic BAFF levels in multiple sclerosis without increasing autoantibody production[J]. Mult Scler, 2011, 17(5): 567-577.
- [10] Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, et al. Expression of BAFF (BLyS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome[J]. J Pathol, 2004, 202(4): 496-502.
- [11] 王新昌,曹灵勇,范永升.干燥综合征病因病机刍议[J].浙江中医药大学学报,2011,(5):643-644.
- [12] 王新昌,唐晓阳,黄绥心,等.益气养阴祛瘀法对干燥综合征血清 IgG 及其 BAFF 作用的临床研究[J].浙江中医药大学学报,2013,37(3):223-225,233.
- [13] 黄绥心,王新昌,肖丽群,等.益气养阴祛瘀方与性激素对 NOD 小鼠的整体疗效及免疫功能的干预作用[J].中国中医急症,2014,23(5):788-791.

(收稿:2016-05-11 修回:2017-08-04)

责任编辑:段碧芳
英文责编:张晶晶