

中药狼疮方对狼疮样小鼠脾细胞体外分泌 白细胞介素-6 和白细胞介素-10 的影响^{*}

梁 鸣¹ 李幼姬¹ 阳 晓¹ 魏 毅² 许韩师¹ 叶任高¹

内容提要 目的 探讨狼疮样小鼠脾细胞体外分泌白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)水平及其中药狼疮方对其影响。方法 采用慢性移植物抗宿主病小鼠模型,经中药狼疮方、强的松及联合治疗后分别检测抗 ds-DNA 抗体、刀豆蛋白 A(ConA)诱导的脾细胞增殖反应和 IL-6、IL-10 水平。结果:(1)脾细胞自身增殖反应性,模型组明显高于正常组($P<0.05$) 各治疗组治疗后脾细胞自身增殖反应性与正常组比较差异不显著($P>0.05$)。(2)模型组血清抗 ds-DNA 抗体为 1.75 ± 0.25 ,与正常组(1.20 ± 0.21)比较差异有显著性($P<0.01$)。各治疗组血清抗 ds-DNA 抗体与正常组比较差异不显著($P>0.05$)。(3)模型组狼疮样小鼠脾细胞经 ConA 诱导下分泌 Th2 细胞因子 IL-6 和 IL-10 水平明显高于正常组及各治疗组,差异有显著性($P<0.05$)。结论 狼疮方具有免疫抑制剂作用,可抑制 T 和 B 细胞活化,减少 Th2 细胞因子的形成和自身抗体产生,有效地治疗系统性红斑狼疮。

关键词 系统性红斑狼疮 慢性移植物抗宿主病 细胞因子

Effect of Lupus Recipe on IL-6 and IL-10 Secretion of Splenic Cells in Vitro in Lupoid Mice LIANG Ming, LI You-ji, YANG Xiao, et al *Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou (510080)*

Objective: To investigate the effect of Lupus Recipe (LR) on IL-6 and IL-10 secretion of splenic cells in vitro in lupoid model mice and on anti-dsDNA antibody. **Methods:** Chronic graft-versus-host disease model was used in the experiment. The model mice were divided into four groups, the model group was un-treated and the other three groups treated with LR, prednisone and combined treatment (prednisone + LR) respectively. The serum level of ds-DNA antibody, the ConA induced splenic cell proliferation in mice's splenic cell culture as well as the IL-6, IL-10 level in the supernatant of culture were determined after treatment and compared with those of normal controls. **Results:** (1) The splenic cell proliferative reaction in the model group splenic cells was obviously higher than that of the normal control ($P<0.05$); but that in the three treated groups was different from the control insignificantly ($P>0.05$); (2) The serum anti-dsDNA in the model group was higher than that in the normal control, 1.75 ± 0.25 vs 1.20 ± 0.21 ($P<0.01$), while the difference in comparison of the treated groups with the normal control was insignificant, ($P>0.05$); (3) Splenic cell IL-6 and IL-10 secretion in the model group induced by ConA was higher than those in the treated groups and the controls significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** LR reveals the effect of immunosuppressor, which could inhibit the activation of T- and B-cells, reduce the Th2 cytokine formation and auto-antibody production so as to treat lupus erythematosus effectively.

Key words systemic lupus erythematosus, chronic graft-versus-host disease, cytokine

系统性红斑狼疮(SLE)是一种侵犯多系统脏器的

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 39970933); 中山医科大学 211 重点科研基金资助项目(No. 98150); 广东省自然科学基金资助项目(No. 990073); 广东省中医管理局资助项目(No. 990073)

1. 中山医科大学附属第一医院肾内科 卫生部肾脏病临床研究重点实验室(广州 510080); 2. 第一军医大学中医系

万方数据

自身免疫性疾病,其发病机理尚未明确,目前认为与自身反应性免疫细胞异常活化及自身抗体的产生有关。免疫抑制剂的应用使本病的预后大为改观,尽管如此,肾脏受累及进行性肾功能衰竭仍是 SLE 主要死亡原因之一。在临床实践中,根据解毒活血法组成的狼疮方是叶任高教授“SLE 病证结合治疗方案”中专用的中药复方,其临床疗效得到广泛认可⁽¹⁾,但解毒活血法

在 SLE 治疗中的作用机制尚不明。本研究旨在探讨中药狼疮方治疗狼疮性肾炎的免疫学机理。

材料和方法

1 药品与试剂 中药狼疮方由白花蛇舌草 30g 半枝莲 9g 紫草 10g 丹参 15g 益母草 30g 等 7 味药组成,由第一军医大学中药系药剂炮制教研室制成浸膏(3.0g/ml),备用。刀豆蛋白 A(ConA)为 SIGMA 公司产品;MTT 为 Fluka 公司产品;RPMI 1640 培养粉为 GIBCO 公司产品;淋巴细胞分离液由上海试剂二厂提供。ELISA 试剂盒购于美国 ENDOGEN 公司。抗 ds-DNA 抗体 ELISA 检测试剂盒为上海太阳公司产品。辣根过氧化物酶标记-羊抗小鼠 IgG 为邦定公司产品。

2 动物模型建立、分组及用药 参考文献^[2,3]方法,建立慢性移植抗宿主病(cGVHD)小鼠模型。取 DBA/2 小鼠脾脏、胸腺、淋巴结细胞,制成单细胞悬液(约 60% 脾细胞,30% 胸腺,10% 淋巴结细胞),于 0、3、7 和 10 天静脉注射于 8~10 周龄雌性(C57BL/6JX DBA/2)F1 杂交小鼠,每次给予细胞数为 5×10^7 。分组及用药 取 24 只模型动物,分为模型组(生理盐水)、阳性对照组(强的松)、实验 I 组(狼疮方)、实验 II 组(狼疮方加强的松),其中强的松为 0.173mg/20g 体重、狼疮方为 30g 生药/20g 体重,每日灌胃治疗。另设正常组(生理盐水)6 只。于 12 周处死动物,立即在无菌条件下取血,离心取血清,用于指标检测。

3 检测指标和方法

3.1 抗 ds-DNA 抗体测定 用样品稀释液按 1:40 比例稀释标准品及待测血清。复孔加入标准品或待测样品,孵育 1.5h,洗板;除零孔外,每孔加辣根过氧化物酶-羊抗小鼠 IgG,孵育 1h,洗板;加底物避光显色;终止反应后立即在酶标仪 492nm 处读取 A 值,需减去零孔 A 值,计算待测样品与标准品 A 值之比,求出结合值数(BI)。

3.2 ConA 诱导的脾细胞增殖反应 无菌条件下,迅速取脾,制备脾细胞悬液,调细胞浓度为 5×10^7 个/ml,加入 96 孔板(100μl/孔),每个样品设 6 复孔,其中 3 复孔为自发转化孔,另 3 复孔为 ConA 诱导增殖孔(ConA 终浓度为 10μg/ml),加入培养液使每孔总体积为 200μl。37℃、5% CO₂ 孵育 48h 后,用 MTT 法,酶标仪 570nm 处测 A 值,以示细胞增殖程度。

3.3 ConA 诱导的脾细胞培养上清 IL-6、IL-10 含量测定 取上述已制备的脾细胞悬液(5×10^7 个/ml)0.5ml,加入 24 孔板中,再加入终浓度 10μg/ml 的

ConA,37℃、5% CO₂ 孵育 48h,无菌条件下离心取上清,即为含 IL-6、IL-10 的待测样本。采用 ELISA 方法测定 IL-6、IL-10 含量,具体步骤按试剂盒说明书。

4 统计学分析 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学处理,所有资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间资料间比较采用 One-Way ANOVA 分析。

结 果

1 各组小鼠血清抗 ds-DNA 抗体测定结果 模型组血清抗 ds-DNA 抗体 BI 值为 1.75 ± 0.25 ,与正常组(1.20 ± 0.21)比较,差异有显著性($P < 0.01$)。阳性对照组、实验 I 组、实验 II 组(分别为 1.35 ± 0.39 、 1.21 ± 0.10 、 1.37 ± 0.22)与正常组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。

2 各组小鼠脾细胞自身增殖反应性比较 见表 1。脾细胞自身增殖反应性模型组明显高于正常组($P < 0.05$)。阳性对照组、实验 I 组、实验 II 组与正常组比较,差异无显著性($P > 0.05$)。模型组与阳性对照组、实验 I 组、实验 II 组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。

3 各组小鼠 ConA 诱导的脾细胞增殖反应性比较 见表 1。对 ConA 诱导的脾细胞增殖反应性,阳性对照组、实验 I 组、实验 II 组表现为受抑制,与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠脾细胞自身增殖反应及 ConA 诱导的脾细胞增殖反应性比较 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	自身增殖	ConA 刺激
正常	6	$0.128 \pm 0.044^*$	$0.166 \pm 0.060^*$
阳性对照	6	$0.086 \pm 0.028^*$	$0.126 \pm 0.012^*$
实验 I	6	$0.095 \pm 0.005^*$	$0.170 \pm 0.026^*$
实验 II	6	$0.118 \pm 0.004^*$	$0.186 \pm 0.006^*$
模型	6	0.431 ± 0.007	0.638 ± 0.049

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

4 狼疮方对狼疮样小鼠脾细胞 IL-6、IL-10 产生的影响 见表 2。模型组小鼠脾细胞经 ConA 诱导分泌 Th2 细胞因子 IL-6 和 IL-10 水平明显高于正常组、阳性对照组、实验 I 组和实验 II 组,差异有显著性($P < 0.05$)。正常组、阳性对照组、实验 I 组和实验 II 组间 IL-6 和 IL-10 水平比较,差异无显著性($P > 0.05$)。

表 2 狼疮方对狼疮样小鼠脾细胞 IL-6 和 IL-10 产生的影响 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ConA 刺激		自身增殖	
		IL-6	IL-10	IL-6	IL-10
正常	6	$290.00 \pm 14.84^*$	$37.37 \pm 1.33^*$	$42.86 \pm 6.23^*$	$13.67 \pm 2.03^*$
阳性对照	6	$311.08 \pm 34.94^*$	$41.95 \pm 4.78^*$	$43.66 \pm 4.53^*$	$21.79 \pm 2.03^*$
实验 I	6	$339.60 \pm 22.85^*$	$40.25 \pm 0.33^*$	$46.29 \pm 7.24^*$	$22.07 \pm 6.08^*$
实验 II	6	$348.79 \pm 13.96^*$	$42.39 \pm 4.05^*$	$50.94 \pm 9.23^*$	$22.39 \pm 5.97^*$
模型	6	1260.33 ± 262.35	88.79 ± 18.29	173.33 ± 12.22	46.81 ± 7.30

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

讨 论

SLE 是一种累及多器官的自身免疫性疾病,目前观点认为,SLE 是非单一致病原引起的孤立疾病,而是在易感基因背景下,由环境、体液和免疫因素交叉作用介导发生的。T、B 细胞的过度激活、产生抗 DNA 抗体等自身抗体可能是 SLE 发生的关键,其原因和机制尚不十分清楚,可能存在 T 细胞调节功能异常,Th2 细胞效应过度激活 B 细胞和(或)内源性 T 细胞抑制功能缺陷,不足以调节正常的 B 细胞反应⁽⁴⁾。大量实验证实 Th2 细胞因子合成增多,特别是 IL-6 和 IL-10 与 SLE 的发病机制关系最为密切⁽⁵⁾。IL-6 的主要生物学功能之一是调节 B 细胞的增殖和分化,直接影响成熟 B 细胞分泌免疫球蛋白。IL-10 是一种多功能的细胞因子,能刺激 B 细胞增殖和分化,促进抗体产生。SLE 患者外周血中 IL-10 水平上升,在活动期患者中增高尤为显著。未经治疗的患者外周血单核细胞(PMBC)体外培养可自发分泌 IL-10,并在 IL-10 作用下分泌抗双链 DNA 抗体。抗 IL-10 单克隆抗体能抑制 PMBC 分泌抗双链 DNA 抗体。有研究提示 IL-10 通过增强 B 细胞存活,激活其分泌免疫球蛋白。同时有临床试验示:SLE 病情活动与 IL-10 上调相关,在 NWB/WF1 杂交狼疮倾向鼠经抗 IL-10 单克隆抗体治疗后,自身抗体合成减少,多种症状明显减轻。现已证实 cGVHD 小鼠体内血清 IL-4、IL-5 和 IL-10 水平增高,提示异常表达的 Th2 型细胞因子在 SLE 中有致病作用⁽⁶⁾。

中药治疗系统性红斑狼疮临床证实有效,但具体机制不清,为探讨中药狼疮方治疗的免疫学机制,本实验采用了 cGVHD 小鼠模型。cGVHD 小鼠模型是通过亲代淋巴细胞移植给 F1 杂交鼠而诱导,受者 H-2 不相容结构激活亲代淋巴细胞,亲代 CD₄⁺ 淋巴细胞识别同种异体 F1 宿主细胞的主要组织相容性复合 II (MHC II) 抗原,亲代 CD₄⁺ 淋巴细胞辅助自身反应性 B 细胞产生自身抗体,引起移植植物抗宿主同种免疫反应⁽⁷⁾。本组实验采用接种 DBA/2 淋巴细胞于 (C57BL/6JX DBA/2) F1 杂交鼠,则引起淋巴组织增生,B 细胞过度活化、自身抗体形成和免疫复合物性肾炎等类似人类系统性红斑狼疮的慢性 GVHD⁽⁸⁾。本实验结果显示 狼疮样小鼠脾细胞体外培养自发增殖反应性显著高于 F1 杂交鼠,提示狼疮样小鼠体内亲代 T 细胞识别宿主抗原,激活宿主 T、B 细胞,表现为脾细胞体外培养自发增殖反应性显著增高。ConA 为 T 细胞促有丝分裂剂,刺激 T 细胞增殖,体外培养的狼疮

样小鼠脾细胞在 ConA 作用下增殖反应性显著高于 F1 组。狼疮样小鼠脾细胞过度活化,存在 IL-6 和 IL-10 蛋白高表达,强的松、中药狼疮方可抑制体外培养的狼疮样小鼠脾细胞分泌 IL-6 和 IL-10,并可减少狼疮样小鼠体内自身抗体产生。激素是目前治疗 SLE 的第一线药物,有学者证实激素能够抑制 SLE 患者分泌 IL-6 和 IL-10。本组结果表明,狼疮方具有一定的免疫抑制剂作用,可有效地阻断 cGVHD 小鼠体内 T、B 细胞相互作用,抑制 T 和 B 细胞活化、减少 Th2 细胞因子的形成和自身抗体产生,有效地治疗狼疮性肾炎。

狼疮方具有清热解毒、活血祛瘀的功效,临床用于治疗狼疮性肾炎有一定的疗效,且无明显的毒副作用。活血化瘀的中药成分能够清除血液中过剩的抗原,防止免疫复合物产生⁽⁹⁾。具有清热解毒功效的白花蛇舌草大剂量应用有免疫抑制作用;具有凉血解毒及活血功效的紫草有免疫调节作用,并能抑制渗出性及增生性炎症⁽¹⁰⁾。从现有的实验资料来看,具有解毒活血功效的中药药效主要体现在调节免疫、抗炎及抗凝方面,但其有关免疫学机制不太清楚。本实验结果发现狼疮方主要通过调节机体免疫功能,特别是调节免疫抑制功能发挥作用的。据以上结果推论 狼疮方的免疫抑制作用,可能是其治疗狼疮的机制之一,其更多的作用机制有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Wellace DJ. Lupus Erythematosis. Baltimore: Williams, 1997:1180.
2. Kootstra CJ, Suttmuller M, Baelde HJ, et al. Association between leukocyte infiltration and development of glomerulonephritis in experimental lupus nephritis. J Pathology 1998;184(7):219-225.
3. 阳 晓,叶任高,陈伟英,等. 慢性移植植物抗宿主病狼疮性肾炎小鼠模型的研制. 中华肾脏病杂志 2000;16(5):277-286.
4. Richaud PY, Alcocer VJ, Liorente L. High levels of Th2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus. Rev Invest Clin 1995;47(4):267-272.
5. Liorente L, Richaud PY, Wijdenes J, et al. Spontaneous production of IL-10 by B lymphocytes and monocytes in SLE. Eur Cytokine Net 1993;4(6):421-427.
6. Rus V, Svetic A, Nguyen P. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD₈⁺ T cells. J Immunol 1995;155(5):2396-2406.
7. Vis CS, Shearman GM. T-cell interactions in host immunity: In-

- sights from a murine model of graft-versus-host disease. Immunol Today 1988;9(1):207-213.
8. Bruijn JA, Van Eleven EH, Hogendoorn PC, et al. Murine chronic graft-versus-host disease as a model for lupus nephritis. Am J Path 1988;130(3):639-640.

9. 周翠英. 系统性红斑狼疮. 山东中医杂志 1995;14(7):317-320.
10. 方晓力, 龙晓英. 白花蛇舌草成分、药理和临床应用概况. 中药材 1996;19(3):152-153.

(收稿 2001-02-11 修回 2001-09-18)

第七次全国莨菪类药研究学术交流会议纪要

2001 年 11 月 12~16 日在宁波召开了第七次全国莨菪类药研究学术交流会。会议共收到论文 40 余篇,其中大会宣读 15 篇。学术交流内容新颖实用,讨论热烈。大会特邀请有关专家讲学,其中有王一镗教授的“2000 年心肺复苏国际新指南的主要精神”,孙瑞元教授的“新药统计中的几个新问题”,魏尔清教授的“后基因组时代药理学研究趋向”,丁光生教授的“医学论文写作应注意的几个问题”。

在学术交流会上宁波市微循环与莨菪类药研究所杨国栋研究员报告了 40 年研究莨菪类药的历程、成果和教训,阐述了莨菪类药研究的新认识和多项非 M 受体药理作用,并提出以微循环障碍为中间环节的发病学新认识,介绍了临床多种疾病老药新用的适应症和以“化”为核心的莨菪疗法。他成功地把莨菪类药研究与微循环和戒毒相结合,比喻为一串葡萄上的两个先熟的果实,不是莨菪类药研究的全部。近几年宁波戒毒研究中心先后采用东莨菪碱疗法(即 1+1 杨氏脱毒法)已为 8500 多人次海洛因依赖者成功脱毒。1+1 杨氏脱毒法在用药期间系一种较浅的静脉复合麻醉,易造成误吸,应加强呼吸管理,及时处理并发症。该观察证明 1+1 戒毒法是有效而安全的脱毒方法,该方法近年已被同行广泛接受。

宁波微循环与莨菪类药研究所周文华探讨 M 受体在吗啡依赖过程中的作用机制,研究证实吗啡依赖时脊髓 M 受体发生适应性表达增加,可能与胶质细胞源性神经营养因子和神经生长因子表达有关,脊髓水平主要以 M₂ 和 M₃ 受体,脊髓上水平主要以 M₁ 受体介导吗啡戒断过程。行为药理学研究在药物依赖治疗中有重要价值。宁波微循环与莨菪类药研究所张富强报告东莨菪碱对大鼠程序诱导的烦渴(SIP)行为的影响,结果提示中枢胆碱能神经系统参与 SIP 行为的调节。

上海东方医院刘中民报告,在心脏移植中采用东莨菪碱能够比较安全地延长供心低温缺血的保存时间,认为东莨菪碱可维持心肌组织内一氧化氮(NO)的含量,使之处于正常水平,降低细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达,减轻炎症反应,减轻缺

血灌注损伤,保护心肌,促进心肌移植后心功能恢复。近几年他们开展了多项莨菪类药在心脏外科体外循环中的研究,表明迷走神经亢进的重要性,在人类冠脉血管上乙酰胆碱(Ach)受体分布众多,迷走神经及其递质 Ach 在冠脉血管内皮细胞的功能上发挥重要作用。

广东南海市妇幼保健院刘振寰采用中西医结合治疗小儿脑瘫 210 例(治疗组),其中头颅(CT)有器质性病变 166 例,认为治疗小儿脑瘫西方理学治疗固然重要,但疗效低,而加用莨菪类药和头针的中西医结合康复法能显著提高疗效。

杭州市红十字会医院章剑今报告,在兔内毒素模型上观察川芎嗪和东莨菪碱对扩血管活血化瘀几项指标影响,东莨菪碱组血压稳定,球结膜微循环正常,微动脉血流增快,无心律紊乱,显示良好的微循环疏通作用。徐州医学院陈锦明在对兔主动脉平滑肌细胞(ASMC)增殖的研究中,认为莨菪类药钙拮抗作用是降低血管平滑肌收缩力或张力与抑制 ASMC 增殖的主要原因,可能是抗休克,解除血管痉挛和抗心律失常的机理之一。

广东省药物研究所翁明翰,依据活血化瘀,强心运气与微循环学说及莨菪类药的临床应用,进行心脏药物的研究与开发,20 余年先后生产现代中药心脏系列药物:活心丸、心宝丸、心力丸等。采用中西医结合的方法研制新药,揭示微循环与莨菪类药研究和应用的开发很有潜力。解放军总院张澍教授在大会上讲述了采用莨菪类药治疗 DIC 经验,在论文中还有采用莨菪类药治疗格林-巴利综合征、婴儿毛细支气管炎、癫痫持续状态、过敏性紫癜、糖尿病伴周围神经病变等有效治疗的报道。

会议期间进行了专业委员会改选换届,成立了中西医结合学会第三届微循环专业委员会。经过投票,选举杨国栋为主任委员,周文华、刘中民、张向清、章剑今为副主任委员,推荐姚新民兼秘书,陈琦君为秘书。

(杨国栋 姚新民整理)

(收稿 2001-12-24)