

· 实验研究 ·

双氢青蒿素对 BXSB 狼疮小鼠自身抗体产生、TNF α 分泌及狼疮性肾炎病理改变的影响*

董妍君¹ 李卫东¹ 屠呦呦² 邹万忠¹ 滕慧玲¹ 林志彬¹

摘要 目的:观察双氢青蒿素(DQHS)对 BXSB 狼疮模型小鼠几项免疫指标及狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)病理改变的影响,探讨 DQHS 治疗系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的可能机制。方法:采用 ELISA 方法检测血清中的抗双链 DNA(ds-DNA)抗体,以 ELISA 试剂盒检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF α)的水平,对肾脏组织进行 HE 常规染色及 Masson 特殊染色。结果:血清中 TNF α 、抗 ds-DNA 抗体水平, DQHS 125mg/kg 给药组及 DQHS 25mg/kg 给药组与模型组比较,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各组肾脏组织 HE、Masson 染色病理改变差异有显著性。结论: DQHS 能抑制 BXSB 小鼠血清抗 ds-DNA 抗体的生成,对 BXSB 小鼠血清中 TNF α 的分泌有抑制作用,能明显改善 BXSB 小鼠 LN 的病理状态。

关键词 双氢青蒿素 BXSB 小鼠 抗双链 DNA 抗体 狼疮性肾炎 系统性红斑狼疮 肿瘤坏死因子 α

Effect of Dihydro-Qinghaosu on Auto-antibody Production, TNF α Secretion and Pathologic Change of Lupus Nephritis in BXSB Mice DONG Yan-jun, LI Wei-dong, TU You-you, et al *Department of Pharmacology, The school of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing (100831)*

Objective: To investigate the effect of dihydro-qinghaosu(DQHS) on auto-antibody production, TNF α secretion and pathologic change of lupus nephritis in BXSB mice and the possible mechanism of DQHS in treating systemic lupus erythematosus(SLE). **Methods:** Anti ds-DNA antibody and TNF α in serum of the BXSB mice were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Renal tissue was stained by HE and Masson. **Results:** In the high and moderate dose DQHS groups, as compared with the model group, levels of anti-ds-DNA antibody and serum TNF α were significantly lower($P < 0.05$); and renal pathological change was milder. **Conclusion:** DQHS could inhibit the production of anti-ds-DNA antibody and secretion of TNF α and improve the pathologic lesion of lupus nephritis in BXSB mice.

Key words dihydro-qinghaosu, BXSB mice, anti-ds-DNA antibody, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus, tumor necrosis factor α

系统性红斑狼疮(SLE)是一种严重累及全身多系统、多器官的自身免疫性疾病,其发病机制尚未阐明,目前认为主要原因之一是患者免疫功能异常。BXSB 小鼠属系统性红斑狼疮模型鼠,是雌性 C57BL 小鼠和雄性 SB 小鼠杂交后的重组近交品系,由于其 Y 染色体连锁的自身免疫增强子 Y_{aa} 基因的作用,雄性

BXSB 小鼠 2 月龄出现肾脏病理改变,3 月龄出现临床指标改变^[1]。其发病后可出现血清抗核抗体滴度升高、蛋白尿、水肿、淋巴结肿大、低补体血症、高丙种球蛋白血症等表现,肾病理以膜性增生性肾小球肾炎为特征,其临床和病理表现与人类 SLE 类似^[2]。青蒿素(artemisinin)是从蒿属植物青蒿(*Artemisia annua* L.)中分离鉴定出的一种具有过氧基新倍半萜内酯类化合物,分子式为 C₁₅H₂₂O₅,是目前我国首创的一类高效低毒的新型抗疟药,双氢青蒿素(dihydro-qinghaosu, DQHS)是从青蒿素中引入羟基的第一个衍生物,其抗疟疗效较青蒿素显著提高。近年的一些研究发现 DQHS 具有良好的免疫抑制作用并能加速免疫缺陷动

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30140024)

1. 北京大学医学部基础医学院药理学系(北京 100083) 2. 中国中医研究院中药研究所

通讯作者:李卫东, Tel: 010-62091421, E-mail: weidonglee@bta-mail.net.cn
万方数据

物的免疫功能重建^[3]。本研究观察了应用 DQHS 后, 5 月龄 BXSB 雄性小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体及 TNF α 水平的变化, 并观察了其对 BXSB 小鼠狼疮性肾炎(LN)的作用, 为探讨 DQHS 在治疗 SLE 方面的作用及机制提供了理论依据。

材料与方法

1 实验动物 BXSB 小鼠由北京大学第三临床医院陈学荣教授自美国 Jackson 实验室引进, 北京大学医学部免疫学系动物室饲养繁殖。选择雄性, 5 月龄小鼠。

2 药品及试剂 DQHS 由中国中医研究院中药研究所屠呦呦教授提供; TNF α 试剂盒(Sigma 分装)购自上海森雄公司; LPS、BSA 购自 Sigma 公司; 小牛胸腺 DNA、OPD 购自华美公司; 辣根过氧化物酶标记(HRP)羊抗小鼠 IgG 抗体购自华美公司; 细胞培养板及酶标板为美国 Costar 公司产品。

3 仪器 BIO-RAD 550 型酶标仪, BACKMAN 低温离心机, HERAEUS 恒温孵育箱。

4 实验方法 取 5 月龄 BXSB 雄性小鼠 26 只, 随机分成 4 组: 分别为模型组按 0.1ml/10g 体重给予生理盐水, DQHS 125mg/kg 给药组, DQHS 25mg/kg 给药组, DQHS 5mg/kg 给药组, 灌胃给药, 1 天 1 次, 连续 7 天。正常对照选用 C57BL/6J 雄性小鼠。

4.1 BXSB 小鼠血清抗 ds-DNA 抗体的测定 小鼠血清的制备: 摘眼球取血, 置 4 $^{\circ}$ C, 4h, 离心 2000 r/min, 10min。取上清, 用于测定抗 ds-DNA 抗体。

血清抗 ds-DNA 抗体的测定采用 ELISA 法: 参照文献^[4,5]进行, 步骤为: (1)将 DNA 用 PBS 稀释为 100 μ g/ml, 96 孔酶标板每孔内加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h。加洗涤液(PBS-Tween 20)250 μ l/孔, 置 3min 后弃去, 共 3 次。(2)用 2% BSA 封闭 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤同上。(3)将血清用 PBS 分别作 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 稀释, 每孔内加 100 μ l, 每孔 3 复孔, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h。洗涤同上。(4)用 PBS 将二抗(HRP-IgG)稀释为 1:1000, 每孔内加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 2h。洗涤同上。(5)每孔加 OPD 底物溶液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15~30min, 加 2N H $_2$ SO $_4$ 每孔 50 μ l 终止反应。(6)在酶标仪上测 490nm 下的光密度值。

4.2 血清 TNF α 水平的检测 采用小鼠 TNF α 检测 ELISA 试剂盒, 检测步骤按说明书进行。

4.3 狼疮肾的病理检查 将小鼠脱臼处死, 迅速取出肾脏, 固定于 4% 的甲醛溶液中。对肾脏石蜡切

块进行常规 HE 染色和 Masson 特殊染色, 观察不同组别肾脏的病理改变。

4.4 统计学方法 所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA)。

结果

1 DQHS 对 BXSB 小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体及 TNF α 水平的影响 见表 1。与模型组比较, DQHS 125mg/kg 给药组, DQHS 25mg/kg 给药组抗 ds-DNA 抗体及 TNF α 水平降低, 差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 DQHS 对 BXSB 小鼠血清中抗 ds-DNA 抗体及 TNF α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抗 ds-DNA 抗体(OD 值)	TNF α (μ g/L)
正常对照	8	0.0537 \pm 0.0097	55.01 \pm 6.98
模型	7	0.0887 \pm 0.0047*	151.17 \pm 32.31**
DQHS 125mg/kg	6	0.0570 \pm 0.0000 Δ	74.41 \pm 13.13 $\Delta\Delta$
DQHS 25mg/kg	6	0.0560 \pm 0.0046 Δ	107.72 \pm 16.05 Δ
DQHS 5mg/kg	7	0.0853 \pm 0.0046*	114.85 \pm 25.76*

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 DQHS 对 BXSB 小鼠 LN 病理改变的影响 以 HE 和 Masson 染色观察小鼠肾组织的改变, 光镜下可见: 正常肾组织(见图 1、2); 模型组的病理改变: 肾小球系膜细胞和内皮细胞弥漫性重度增生, 白细胞浸润, 系膜区及内皮下大量嗜复红蛋白沉积, 节段性白金耳样结构形成, 肾小管上皮细胞空泡及颗粒状变性(见图 3、4); 高剂量给药组(125mg/kg)的病理改变较模型组为轻: 肾小球系膜细胞轻度增生, 少数白细胞浸润, 伴少量嗜复红蛋白沉积, 无白金耳样结构形成, 未见肾小管上皮细胞空泡及颗粒状变性(见图 5、6); 中剂量给药组(25mg/kg)的病理改变: 基本同高剂量给药组(见图 7、8); 低剂量给药组(5mg/kg)的病理改变: 基本同模型组(见图 9、10)。

讨论

系统性红斑狼疮(SLE)是典型的自身免疫复合物性疾病, 患者的血清中含有多种自身抗体, 一般认为抗 ds-DNA 抗体是 SLE 的特异性标志。在临床上 SLE 的主要死亡原因之一是由于 LN 而发生了肾功能衰竭^[6]。有文献报道^[7,8]抗 ds-DNA 抗体阳性 LN 病理分型多为 WHO III、IV 型, 临床上常为活动性 LN, 而抗 ds-DNA 抗体阴性多为 WHO I、II 型, 临床上往往无活动, 两者之间差异有显著性($P < 0.05$)。故抗 ds-

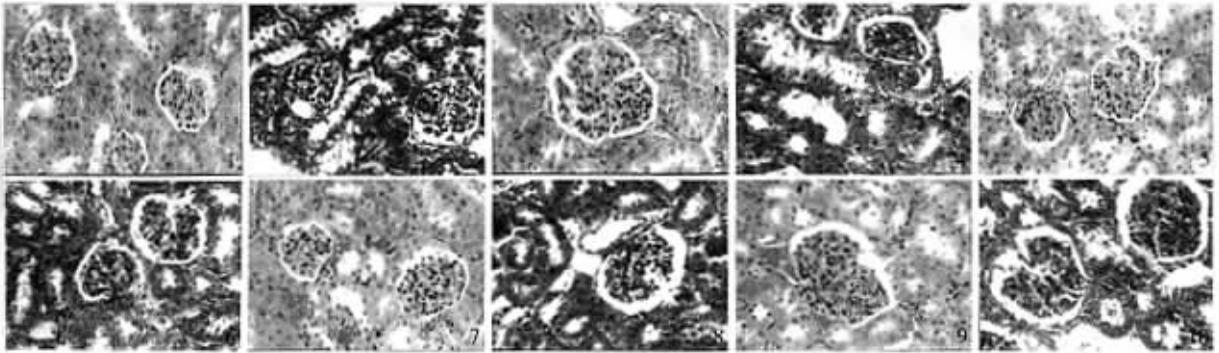


图 1-10 各组小鼠肾组织病理检查

注 图 1、2 分别为正常 C57BL/6J 小鼠肾组织(图 1 HE, 光镜×400; 图 2 Masson, 光镜×400); 图 3、4 分别为模型组 BXSB 小鼠肾组织的病理改变: 肾小球系膜细胞和内皮细胞弥漫性重度增生, 白细胞浸润(图 3 HE, 光镜×400); 系膜区及内皮下大量嗜复红蛋白沉积, 节段性白金耳样结构形成, 肾小管上皮细胞空泡及颗粒状变性(图 4 Masson, 光镜×400); 图 5、6 为 125mg/kg 给药组 BXSB 小鼠肾组织的病理改变: 肾小球系膜细胞轻度增生, 少数白细胞浸润(图 5 HE, 光镜×400); 有少量嗜复红蛋白沉积, 无白金耳样结构形成, 未见肾小管上皮细胞空泡及颗粒状变性(图 6 Masson, 光镜×400); 图 7、8 为 25mg/kg 给药组 BXSB 小鼠肾组织的病理改变, 基本同 125mg/kg 给药组(图 7 HE, 光镜×400; 图 8 Masson, 光镜×400); 图 9、10 为 5mg/kg 给药组 BXSB 小鼠肾组织的病理改变, 基本同模型组(图 9 HE, 光镜×400; 图 10 Masson, 光镜×400)

DNA 抗体的检测, 对判定 LN 是否活动, 是一个比较准确的指标。我们以抗 ds-DNA 抗体水平变化作为药物疗效的指标, 观察了不同剂量 DQHS 对 LN 的影响, 发现 125mg/kg、25mg/kg 两个剂量 DQHS 给 BXSB 小鼠连续灌服 7 天, 可明显降低血清中抗 ds-DNA 抗体水平, 改善 LN 的活动程度。这与报道^[9]的青蒿素类药物能提高 CD₈ 细胞的功能, 抑制 B 细胞的过度活化, 抑制自身抗体的形成, 从而使抗 ds-DNA 抗体与相应抗原结合形成的免疫复合物相应减少的结论一致。同时, 有实验证实, 肿瘤坏死因子(TNF)在自身免疫性疾病中是造成病理性损害的主要原因之一^[10-12], TNF α mRNA 肾脏局部表达量的增加可能会引起肾脏功能和结构多方面的改变, 在 SLE 肾炎向肾小球硬化的发展过程中起一定作用^[13]。我们发现 125mg/kg、25mg/kg、5mg/kg 3 个剂量的 DQHS 均能抑制血清中前炎性因子 TNF α 的分泌, 这与报道^[14]的青蒿提取物及青蒿素能抑制 TNF α 的产生相一致。

有关 DQHS 治疗 SLE 的其他机制, 可能与核转录因子 kappa B(NF- κ B)有关。NF- κ B 作为参与细胞信号转导的重要转录因子, 其主要生物学功能是调控基因特别是免疫炎症相关基因的转录, 从而在机体免疫炎症反应和免疫应答中具有重要作用^[15,16]。TNF 的基因可受 NF- κ B 的调控, NF- κ B 的结合位点也可受 TNF 的刺激而进一步激活^[11,17,18]。而且有实验表明^[19], 在 SLE 患者外周血单核细胞内的 NF- κ B 与正

常对照组相比更易于被外来因素所激活, 其体内 NF- κ B 可能处于高表达状态, 这在 DQHS 治疗 SLE 方面分子机制的探讨提供了理论依据。有关 DQHS 对 NF- κ B 的影响正在研究中。

参 考 文 献

- 1 周素荣, 刘传玉, 徐世正, 等. SLE 的 BXSB 小鼠模型病情进展状况的研究. 中国麻风皮肤病杂志 2002; 18(2): 112—114.
- 2 赵国庆, 徐世正, 李素萍, 等. 大黄和黄芪水提取醇沉液注射治疗 BXSB 狼疮鼠的实验研究. 中华风湿病学杂志 2001; 5(3): 175—177.
- 3 孙秀珍, 谢蜀生, 龙振洲, 等. 青蒿素及其衍生物免疫抑制作用的实验研究. 中国中西医结合杂志 1991; 11(1): 37—38.
- 4 蒋成淦主编. 酶免疫测定法. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 136—163.
- 5 梅 林, 汪静雪, 邓鸿业, 等. BXSB 小鼠血清抗 DNA 抗体水平及其对淋巴细胞转化的影响. 基础医学与临床 2000; 20(1): 10—14.
- 6 尹爱萍, 郝大鹏, 范春元, 等. 狼疮性肾炎 108 例临床与病理研究. 陕西医学杂志 2002; 31(12): 121—124.
- 7 Brenner BM. The kidney. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1996: 1498—1516.
- 8 洪明玉, 叶任高. 抗双链 DNA 抗体与狼疮性肾炎关系的探讨(附 776 例分析). 中国现代医学杂志 2001; 11(2): 53—54.

- 9 高春芳,高玉祥.青蒿琥酯对系统性红斑狼疮样小鼠模型的影响.中华皮肤科杂志 1995 28(1):17—19.
- 10 Aderka D, Engelmann H, Maor Y, et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. J Exp Med 1992 ;175:323—329.
- 11 Nina J Makhatadze. Tumor necrosis factor locus : genetic organization and biological implications. Human Immunol 1998 ;59:571—579.
- 12 Kollias G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity : specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. Cytokine Growth Factor Reviews 2002 ;13:315—321.
- 13 周平,陈学荣,李世荫,等.胰岛素样生长因子 I、白介素 1 和肿瘤坏死因子 α 基因在自发狼疮肾炎小鼠肾脏中的表达.中国皮肤性病学杂志 1999 ;13(4):201—202.
- 14 谭余庆,赵一,赵启云.青蒿提取物抗内毒素实验研究.中国中药杂志 1999 24(3):166—171.
- 15 Albert S, Baldwin JR. The NF- κ B and I κ B protein :new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 1996 ;14:649—683.
- 16 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. New Engl J Med 1997 ;336:1066.
- 17 戴书静. NF- κ B/I κ B :重要的转录调节因子.国外医学免疫学分册 1999 22(5):281—284.
- 18 Sergei S Makarov. NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation : recent advances. Molecular Medicine Today 2000 ;6:441—448.
- 19 许韩师,叶任高,张式鸿,等.系统性红斑狼疮患者外周血单核细胞 NF- κ B 信号通路活化检测.中华皮肤科杂志 2001 ;34(1):18—21.

(收稿 2003-03-15 修回 2003-06-20)

新世纪全国高等中医药院校规划教材(新一版,俗称七版)全面问世

在国家教育部和国家中医药管理局的规划与指导下,采用“政府指导,学会主办,学校联办,出版社协办”崭新机制,由全国中医药高等教育学会组织、全国 26 所高等中医药院校联合编写的“新世纪全国高等中医药院校规划教材(新一版,俗称统编七版教材)”,已由人民卫生出版社出版,已在人民大会堂举行了隆重的首发式。教育部、卫生部、国家中医药管理局、中医药界在京两院院士、全国各中医院校代表出席了首发式。

“新世纪全国高等中医药院校规划教材”的编写引入了竞争机制,编写人员全国招标,严格遴选,全国中医药界两院院士在内的“教材建设专家指导委员会”30 名教授严格审议,择优确定。教材编写实行主编全面负责制。教材出版前,王永炎、邓铁涛、胡之璧、肖培根、任继学等专家指导委员会的院士与教授进行了严格把关,以确保质量。已出版的 46 种教材(其中有 34 种被教育部评选为普通高等教育“十五”国家级规划教材),3300 万字,印制精美,为我国中医药高等院校教材建设和发展开创了新纪元。

中医学专业	针灸学(石学敏主编)	刺灸灸法学(陆寿康主编)
中国医学史(常存库主编)	中医耳鼻喉科学(王士贞主编)	针灸治疗学(王启才主编)
医古文(段逸山主编)	中医眼科学(曾庆华主编)	实验针灸学(李忠仁主编)
中医各家学说(严世芸主编)	中医急诊学(姜良铎主编)	推拿学(严隽陶主编)
中医基础理论(孙广仁主编)	正常人体解剖学(严振国主编)	推拿手法学(王国才主编)
中医诊断学(朱文峰主编)	组织学与胚胎学(蔡玉文主编)	针灸医籍选读(吴富东主编)
内经选读(王庆其主编)	生理学(施雪筠主编)	中药学专业
伤寒学(熊曼琪主编)	病理学(黄玉芳主编)	中医学基础(张登本主编)
金匱要略(范永生主编)	药理学(吕圭源主编)	药用植物学(姚振生主编)
温病学(林培政主编)	生物化学(王继峰主编)	中药药理学(侯家玉主编)
中药学(高学敏主编)	免疫学基础与病原生物学(杨黎青主编)	中药化学(匡海学主编)
方剂学(邓中甲主编)	诊断学基础(戴万亨主编)	中药炮制学(龚千峰主编)
中医内科学(周仲瑛主编)	内科学(徐蓉娟主编)	中药鉴定学(康廷国主编)
中医外科学(李曰庆主编)	西医外科学(李乃卿主编)	中药药剂学(张兆旺主编)
中医妇科学(张玉珍主编)	针灸推拿学专业	中药制剂分析(梁生旺主编)
中医儿科学(汪受传主编)	经络腧穴学(沈雪勇主编)	中药制药工程原理与设备(刘落宪主编)
中医伤科学(王和鸣主编)		