

3味解毒中药单用或不同组合对MRL/lpr小鼠分泌活性因子表达的影响

范永升¹ 温成平¹ 谢志军¹ 孙 静²

摘要 目的 探讨解毒祛瘀滋肾方中3味解毒中药单用或不同组合对MRL/lpr小鼠血清及肾组织调节正常T细胞表达和分泌活性因子 (regulated on activation normal T cell expressed and secreted, RANTES) 表达的影响。**方法** 54只MRL/lpr小鼠随机分成9组, 每组6只, 分别以青蒿、蛇舌草、升麻、青蒿蛇舌草、青蒿升麻、蛇舌草升麻、青蒿蛇舌草升麻煎剂、泼尼松混悬液、生理盐水灌胃, 12周后取血及肾脏, 以ELISA法及RT-PCR法分别检测血清和肾组织中RANTES的表达。**结果** 治疗12周末, 泼尼松组的RANTES表达水平显著下降; 青蒿、升麻对RANTES表达水平的抑制作用不明显, 蛇舌草、青蒿联合蛇舌草、青蒿联合升麻、蛇舌草联合升麻虽均有一定的抑制作用, 但均不如青蒿联合蛇舌草及升麻的抑制作用明显。**结论** 青蒿、蛇舌草、升麻三药联用能抑制RANTES的表达。

关键词 解毒祛瘀滋肾方; 系统性红斑狼疮; MRL/lpr小鼠; 分泌活性因子

Effects of Three Chinese Herbal Antidotes (*Herba Artemisiae annuae*, *Herba Hedyotis diffusae* and *Rhizoma Cimicifugae*) and Their Different Combinations on Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted Expression in MRL/lpr Mice FAN Yong-sheng, WEN Cheng-ping, XIE Zhi-jun, et al
College of Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou (310053)

ABSTRACT Objective To explore the effects of three Chinese herbal antidotes, i.e. *Herba Artemisiae annuae* (A), *Herba Hedyotis diffusae* (H) and *Rhizoma Cimicifugae* (C), all were ingredients of Jiedu Quyu Ziyin Recipe, for adjusting the regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), gene expression in serum and renal tissue of MRL/lpr mice. **Methods** Fifty-four MRL/lpr mice were randomized into 9 groups, with 6 in each, and intragastrically infused with A, H, C, A+H, H+C, A+C, A+H+C (all in dosage-form of decoction), prednisone suspension and physiological saline, respectively for 12 weeks. RANTES expression in serum and renal tissue of animals were detected with ELISA and RT-PCR at the end of the study. **Results** Levels of RANTES expression was significantly reduced in the prednisone treated group after treatment. Excepting no significant change being observed in the groups treated with A and C, the changes in the other groups were all milder than those in the group treated with A+H+C. **Conclusion** Chinese herbal antidotes A, H and C in combination can significantly inhibit the RANTES expression in serum and renal tissue of MRL/lpr mice.

KEYWORDS Jiedu Quyu Ziyin Recipe; systemic lupus erythematosus; MRL/lpr mice; regulated on activation normal T cell expressed and secreted

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是累及多系统的难治性自身免疫性疾病。趋化因子对特异白细胞的趋化和功能活化是启动与自身免疫反应有关的病变关键环节之一。目前西医临床多采用糖皮质激素、免疫抑制剂等治疗, 虽有一定疗效, 但易出现一系列不良反应或并发症, 已成为临床严重关注的问题。大量研究表明, 中医药在治疗SLE具有明显

优势^[1-3]。本课题组前期研究发现, 解毒祛瘀滋肾方结合激素治疗SLE取得了较好的协同作用。本课题组进行了解毒祛瘀滋肾方 (青蒿、白花蛇舌草、升麻、生地、炙鳖甲、赤芍、积雪草等) 拆方研究, 将其中的解毒药拆方对MRL/lpr小鼠外周血及肾组织调节正常T细胞表达和分泌活性因子 (regulated on activation normal T cell expressed and secreted, RANTES) 表达的影响研究介绍如下。

材料与方

1 材料

1.1 动物及分组 无特定病原体 (SPF) 级MRL/

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目“重大疑难病 (SLE) 中医防治研究” (No. 2006BAI04A10)

作者单位: 1. 浙江中医药大学基础医学院 (杭州 310053);
2. 浙江中医药大学附属第二医院

通讯作者: 温成平, Tel: 13906514781, E-mail: wengcp@163.com

lpr狼疮小鼠，雌性，8周龄，体重(26.9±2.3)g，共54只，由中国科学院上海实验动物中心从美国Jackson实验室引种培育[SCXK(沪)2008-0007]，由本校实验动物中心购进，在SPF级的饲养条件下适应性喂养1周后(9周龄)，按体重将54只MRL/lpr小鼠随机分成9组：青蒿组、蛇舌草组、升麻组、青蛇组、青升组、蛇升组、青蛇升组、泼尼松组及模型组，每组6只。

1.2 药物 升麻(黑龙江绥芬河市)，蛇舌草(浙江衢州)，青蒿(浙江杭州)，泼尼松片：5 mg/片，浙江仙居制药厂，批号：080380。

1.3 试剂及仪器 调节活化正常T细胞表达与分泌的趋化因子(RANTES)ELISA试剂盒(ADL公司，美国)，Trizol试剂(Invitrogen公司，美国)，M-MLV逆转录酶、RNasin(RNA酶抑制剂)、Taq酶(Promega，美国)，上下游引物(上海生物工程科技服务有限公司合成)等。

PCR仪(Eppendorf公司，Model AG22331)，酶链免疫分析仪(Bio-RAD公司，Model 680)，电泳仪，凝胶图像分析系统(Bio-RAD公司，Model Gel DocTM XR)等。

2 方法

2.1 给药方法 青蒿组给予青蒿煎剂、蛇舌草组给予蛇舌草煎剂、升麻组给予升麻煎剂、青蛇组给予青蒿蛇舌草煎剂、青升组给予青蒿升麻煎剂、蛇升组给予蛇舌草升麻煎剂、青蛇升组给予青蒿蛇舌草升麻煎剂、泼尼松组给予泼尼松混悬液，模型组给予生理盐水灌胃。以70 kg体重成人用量换算小鼠各药使用量，并将各中药煎剂浓缩成以下各浓度：青蒿：0.34 g/mL；蛇舌草：0.56 g/mL；升麻：0.44 g/mL；青蒿合蛇舌草：0.90 g/mL；青蒿合升麻：1.00 g/mL；蛇舌草合升麻：0.78 g/mL；青蒿、蛇舌草合升麻：1.34 g/mL。泼尼松混悬液：由泼尼松片溶于生理盐水，配制成2.6 mg/mL混悬液。各药灌胃剂量：每次0.05 mL/10g，每天1次，连续灌胃12周。12周末，分别在无菌且麻醉下小鼠股动脉取血(在无菌室，麻醉剂用10%的乌奈糖按1.5 g/kg体重，腹腔给药)并分离血清，备用；然后颈椎脱臼处死小鼠，取肾脏并液氮冻存。

2.2 观察项目及检测方法

2.2.1 血清RANTES的检测 严格依照RANTES ELISA检测试剂盒说明书操作处理各组血清，在酶标仪上于波长450 nm处读取各孔OD值；以B=标准品OD值，B0=标准品0点OD值，以B/B 0%值为纵坐标，以标准品的浓度为横坐标，绘制标准曲线；然后再计算各样本血清RANTES的浓度。

2.2.2 肾组织RANTES mRNA表达 采用RT-PCR检测首先，异硫氰酸胍-酚：氯仿一步法提取肾组织总mRNA，再逆转录生成cDNA：逆转录体系总体积为：总RNA 2 μL、Oligo(dT) 5 μL、5×M-MLV Buffer 4 μL、dNTP(2.5 mol/L) 6 μL、Rnase Inhibitor 0.5 μL、M-MLV 0.5 μL加DEPC处理的双氧水至25 μL；将EP管插入泡沫漂浮排的孔中放入42℃水浴箱反应1 h。然后立即置碎冰中备用。在各反应体系中分别加入RANTES或β-actin特定引物(表1)，将cDNA进行PCR扩增后分别进行琼脂糖凝胶电泳，再以凝胶成像仪拍照并分析图像。

表1 RANTES及内参β-actin cDNA上下游引物

cDNA	引物	引物序列
RANTES	上游引物	5'-CTCCCTGCTGCTTTGCTAC-3'
	下游引物	5'-TCAGAATCAAGAAACCTCTATCC-3'
β-actin	上游引物	5'-ACTGCCGATCCTCTCTCTC-3'
	下游引物	5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3'

2.3 统计学方法 采用SPSS 16.0 for Windows统计软件进行统计分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，方差齐性检验采用Levene检验；多组间比较方差齐性时采用方差分析，组间两两比较采用LSD-t法；P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 灌胃给药第1、2周时，青蒿组及升麻组各死亡1只小鼠。泼尼松组灌胃2周后小鼠表现较其他各组兴奋、多动、易激惹。治疗后期，模型组小鼠尿量较少而黄。

2 各组血清RANTES水平比较(表2) 用药12周末，各组间血清RANTES浓度差异均有统计学意义(P<0.05)。其中，青蛇组、蛇升组、青蛇升组、泼尼松组明显低于模型组(均P<0.01)；泼尼松组血清RANTES浓度明显低于其他各组，差异均有统计学意义(P<0.01, P<0.05)；青蛇升组明显低于青蒿组及升麻组，差异均有统计学意义(P<0.01, P<0.05)。

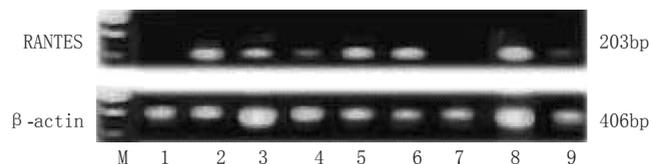
表2 各组血清RANTES比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RANTES (ng/L)
青蒿	5	19.68 ± 1.27 ^{△△▲▲}
蛇舌草	6	12.69 ± 1.34 ^{△△}
升麻	5	14.88 ± 1.89 ^{△△▲}
青蛇	6	11.39 ± 1.12 ^{*△}
青升	6	12.53 ± 1.46 [△]
蛇升	6	10.26 ± 1.17 ^{*△}
青蛇升	6	9.59 ± 1.32 ^{*△}
泼尼松	6	6.48 ± 1.97 [*]
模型	6	22.93 ± 2.18 ^{△△}

注：与模型组比较，*P<0.01；与泼尼松组比较，[△]P<0.05，^{△△}P<0.01；与蛇青升组比较，[▲]P<0.05，^{▲▲}P<0.01

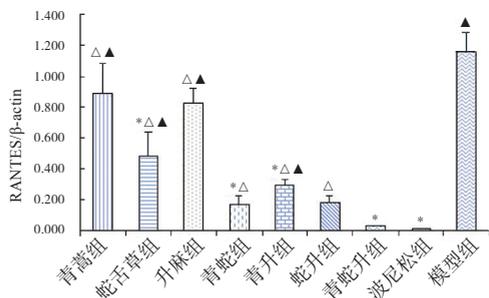
3 各组肾组织RANTES mRNA表达水平比较(图

1, 2) 用药12周末, 各组小鼠肾组织RANTES mRNA表达水平的RANTES/ β -actin数据统计分析显示各组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中, 青蛇升组显著低于青蒿组、蛇舌草组、升麻组、青升组 (均 $P < 0.01$); 蛇舌草组、青蛇组、青升组、青蛇升组、泼尼松组明显低于模型组 (均 $P < 0.01$), 青蒿组、升麻组、蛇升组与模型组的表达水平无明显差异 (均 $P > 0.05$); 青蒿组、蛇舌草组、升麻组、青蛇组、青升组、蛇升组明显高于泼尼松组 (均 $P < 0.01$)。



注: M: DNA mark; 1: 泼尼松组; 2: 青蒿组; 3: 青升组; 4: 青蛇组; 5: 升麻组; 6: 模型组; 7: 青蛇升组; 8: 蛇舌草组; 9: 蛇升组

图1 各组肾组织RANTES mRNA的表达水平电泳图



注: 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与泼尼松组比较, $\Delta P < 0.01$; 与青蛇升组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

图2 各组肾组织RANTES mRNA的表达水平比较

讨 论

SLE是多系统性自身免疫性疾病, 以B淋巴细胞高度活化、形成多种自身抗体、免疫复合物沉积于重要器官为特征。组织损伤和功能失调主要通过免疫复合物的沉积和多种活性炎症介质与细胞间复杂的相互作用而产生, 其中趋化因子对特异白细胞的趋化和功能活化是启动与自身免疫反应有关病变的关键环节之一。RANTES为CC类趋化因子家族重要成员, 由肾小管上皮细胞和肾小球系膜细胞产生, 对单核细胞具有强大的趋化活性, 还能促进不同T细胞亚群在肾组织中浸润, 辅助并促进肾组织的损伤。大量研究表明SLE患者RANTES、巨噬细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、趋化因子干扰素诱导蛋白10 (IP-10) 等表达增加^[4, 5], 狼疮肾炎易感鼠MRL/lpr小鼠的肾损伤发生之前, 肾组织中的RANTES表达即增加^[6-8], 而地塞米松则可减少其产生^[9], 这表明CC类趋化因子在狼疮肾炎的发生和发展中起着重要的作用。

中医学认为先天不足, 肝肾精血亏虚是SLE发生的根本原因, 热毒等外邪入侵是诱发本病的主要原因, 故

解毒祛瘀滋肾是中医治疗SLE的基本法则^[10, 11]。解毒祛瘀滋肾方以青蒿、蛇舌草、升麻、生地黄、炙鳖甲、赤芍、积雪草等药为基本方药。全方以生地黄清热凉血益阴为君, 蛇舌草、升麻清热解斑为臣, 炙鳖甲补阴益肾退热, 赤芍、积雪草活血散血俱为佐药, 青蒿退热, 芳香体轻, 开胃养脾, 疏理少阳气机, 以为使药。方中生地黄与赤芍及积雪草相伍, 凉血散血, 凉血而不留瘀; 升麻与鳖甲相配, 既散在表之毒邪, 又清阴亏之内热, 互为协同, 相得益彰。诸药合用, 共奏清热解毒, 活血化瘀, 益肾养阴之功。

综合本研究中肾组织RT-PCR及血清ELISA检测结果, 泼尼松治疗后, RANTES表达水平均显著下降, 证明了泼尼松抗炎作用; 青蒿、升麻对RANTES表达水平的抑制作用不明显, 蛇舌草、青蒿联合蛇舌草、青蒿联合升麻、蛇舌草联合升麻虽均有一定的抑制作用, 但均不如青蒿联合蛇舌草及升麻的抑制作用明显; 由此可见, 青蒿联合蛇舌草及升麻的三药合用方案较之单味药或两味药合用方案的抑制趋化因子RANTES的作用更明显。

参 考 文 献

- [1] 刘书珍, 刘广西, 刘三运, 等. 中西医结合治疗系统性红斑狼疮疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28 (11): 994-997.
Liu SZ, Liu GX, Liu SY, et al. Curative effect of integrative medical therapy for systematic lupus erythematosus[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28 (11): 994-997.
- [2] 郭冬萍, 谢锐龙, 梁其彬. 八珍汤加减治疗系统性红斑狼疮 (稳定期) 贫血临床观察[J]. 中国中医急症, 2008, 17 (1): 44-45.
Guo DP, Xie LL, Lang QB. Clinical observation of Bazhen Decoction in treating stable SLE anemia[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2008, 17 (1): 44-45.
- [3] 吴国琳, 李天一, 范永升. 养阴解毒活血方治疗系统性红斑狼疮临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26 (9): 851-852.
Wu GL, Li TY, Fan YS. Clinical observation of Yangying Jiedu Huoxue Decoction in treating systematic lupus erythematosus[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2006, 26 (9): 851-852.
- [4] Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, et al. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48 (9): 2555-2566.
- [5] Wada T, Yokoyama H, Su SB, et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis[J]. Kidney Int, 1996, 49 (3): 761-767.
- [6] Moore KJ, Wada T, Barbee SD, et al. Gene transfer of RANTES elicits autoimmune renal injury in MRL-Fas (lpr) mice[J]. Kidney Int, 1998, 53 (6): 1631-1641.

- [7] Stahl RA, Thaiss F, Disser M, et al. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 1993, 44 (5): 1036-1047.
- [8] Chan RW, Tam LS, Li EK, et al. Inflammatory cytokine gene expression in the urinary sediment of patients with lupus nephritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48 (5): 1326-1331.
- [9] Baer PC, Scherberich JE, Bereiter-hahn J, et al. Induction of RANTES, HLA-DR, and intercellular adhesion molecule-1 on highly purified distal tubular cells from human kidney[J]. *Transplantation*, 2000, 69 (1): 2456-2459.
- [10] 范永升, 温成平, 李学铭, 等. 激素并用解毒祛瘀滋阴法治疗SLE的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19 (10): 626-627.
- Fan YS, Wen CP, Li XM, et al. Clinical observation of toxin removing, stasis removing and yin supplementing therapy combined with glucocorticoid in treating systematic lupus erythematosus[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1999, 19 (10): 626-627.
- [11] 范永升. 结缔组织病治疗五法[J]. *中国医药学报*, 1995, 10 (3): 38-40.
- Fan YS. Five therapeutic methods in treating connective tissue disease[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 1995, 10 (3): 38-40.

(收稿: 2009-11-20 修回: 2010-05-24)

全国中西医结合围绝经期综合征专题学术会议在上海召开

全国中西医结合围绝经期综合征学术会议于2010年10月8—10日在上海召开。来自全国各地的130余名代表出席了会议, 会议共收到学术论文44篇。其中特邀报告12篇, 会议交流论文32篇。本次会议围绕围绝经期综合征的中西医结合基础研究、临床治疗进展和成果等方面进行了深入而广泛的交流。现将学术交流的内容简要介绍如下。

骨免疫学是近年来提出的新概念, 复旦大学附属妇产科医院的李大金教授作了题为“骨免疫学与中西医结合疗法”专题报告。报告系统阐述了骨免疫学的概念、免疫细胞与成骨细胞/破骨细胞间的相互作用及协同刺激信号与骨代谢的关系及中药干预后的影响, 为围绝经期骨质疏松症的研究带来了新的思路。复旦大学妇产科医院、上海坤泰女性健康中心俞瑾教授在“我对当代女性卵巢功能的认识”报告中提出了生命网络理论, 指出中医学对生命网络失控辨病与辨证结合的干预、结合辨证地使用西医的治疗, 可以收到明显高于中医或西医的效果。复旦大学妇产科医院王文君教授等从围绝经期角度阐述围绝经期生命网络衰退和中西医结合的正面干预作用。浙江大学医学院附属妇产科医院黄荷凤教授的专题讲座“卵巢早衰”综述了卵巢衰老相关的内分泌基础、遗传和环境因素、相关的临床和人口健康问题, 为相关问题的积极防治提供了借鉴。华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所黄光英教授的专题讲座“卵巢早衰的中西医结合研究”报告了慢性身心应激对雌性大鼠卵巢内分泌的影响及可能的作用机制、补肾活血方对自身免疫性卵巢早衰模型小鼠的治疗作用。山东中医药大学附属医院连方教授在“中西医结合改善卵巢储备的研究”报告中, 探讨了影响卵巢储备能力的因素及中药的积极干预作用。围绝经期综合征是本次会议的主题, 而中医药治疗围绝经期综合征是中西医结合领域的主要方向。广州中医药大学第二临床医学院王小云教授报告了采用“心身同治法”治疗围绝经期综合症的随机对照研究。中国中医科学院马堃教授的专题报告“中药在妇女围绝经期综合征治疗方面的合理应用”就围绝经的辩证治疗做了全面地阐述。第二军医大学附属长海

医院俞超芹教授在专题报告“植物雌激素治疗围绝经期综合征”中介绍了植物雌激素治疗围绝经期综合征的研究概况。围绝经期妇女由于雌激素水平的降低, 盆底功能障碍的发病率明显增加。如何进行盆底功能重建、术后复发如何预防和处理是妇科从业者关心的问题。复旦大学妇产科医院华克勤教授在“盆底功能重建术后复发的认识和处理”的专题讲座中就以上几个方面做了较深入的探讨。多囊卵巢综合征(PCOS)是一种覆盖女性一生的内分泌代谢紊乱性疾病。黑龙江中医药大学吴效科教授介绍了PCOS绝经期并发症, 使与会代表对PCOS给女性的健康带来长期危害有了进一步的认识。

围绝经期综合征是妇科的常见病, 上海中医药大学附属龙华医院妇科郑锦、宋琳奕等对城镇和近郊三个社区围绝经期妇女对围绝经期知识的认知程度、围绝经期状态以及围绝经期相关症状对其生活的影响程度等进行了流行病学调查, 并根据辨证予以相应中成药, 并结合中医情志疗法、太极拳和耳针进行综合治疗, 取得了满意的疗效。上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院董莉等采用卵巢切除与慢性长期不可预见应激相结合建立更年期抑郁症的动物模型, 探讨补肾解郁清心方对更年期抑郁症大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响。辽宁中医药大学附属医院孟安琪、上海市中医药大学附属岳阳中西医结合医院妇科曹琛、陕西中医学院杨鉴冰等分别采用自拟更年汤、滋肾平肝结合情志疗法、自拟静心宁汤等治疗围绝经期综合征均取得满意疗效。南昌大学第二附属医院胡辉从雷公藤对卵巢功能的影响方面进行综述, 为雷公藤的进一步药理研究和妇科临床应用提供参考。

本次学术会议主题明确。论文内容涉及围绝经期综合征病因病机、认知程度等流行病学调查、动物实验研究及临床治疗探索等多个方面, 还涉及卵巢功能维护、中医药在辅助生殖技术中的应用等多个领域, 内容广而丰富, 学术氛围浓厚, 完成了预期的目标, 取得了圆满成功。

(中西医结合妇科专业委员会 供稿)

(收稿: 2010-11-20)