

· 基础研究 ·

基于 NF- κ B P65/I κ B α 信号通路探讨养阴益气
活血方治疗干燥综合征作用机制傅天啸¹ 李天一² 吴方平² 卢雯雯¹ 熊福林¹ 吴国琳¹

摘要 **目的** 研究养阴益气活血方对干燥综合征非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠颌下腺组织核因子- κ B P65 蛋白 (NF- κ B P65) / 核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 信号通路的影响。**方法** 取 NOD 小鼠 24 只随机分为 4 组, 每组 6 只。模型组灌服去离子水 0.4 mL (3 mg/mL), 西药组灌服羟氯喹 0.4 mL (2.5 mg/mL), 中药组灌服中药养阴益气活血方 0.4 mL, 中西药组灌服中药养阴益气活血方及羟氯喹各 0.4 mL, 选取 6 只同龄 Balb/c 小鼠作为正常组灌服去离子水 0.4 mL。给药 8 周后摘取双侧颌下腺组织进行 PCR 检测, 镜下观察各组小鼠颌下腺组织免疫组化后蛋白变化。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠颌下腺组织 P65 mRNA 表达著增高, I κ B α mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 西药组、中药组、中西药组 P65 mRNA 表达降低, I κ B α mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与西药组比较, 中西药组 P65 mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 中药组 I κ B α mRNA 相对表达量降低 ($P<0.05$)。镜下, 模型组小鼠颌下腺组织 P65 蛋白呈高表达, I κ B α 蛋白呈低表达, 中药组、西药组和中西药组 P65 蛋白散在表达, 正常组表达最弱; I κ B α 蛋白在其余三组高表达, 正常组表达最强。与正常组比较, 模型组 P65 平均吸光度增高, I κ B α 平均吸光度减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 中药组、西药组和中西药组 P65 平均吸光度降低, I κ B α 平均吸光度增加 ($P<0.05$)。从药效比较, 中西药组抑制 NF- κ B / I κ B α 通路中 P65 表达的疗效最好, 西药组和中药组次之, 且疗效相近; 中西药组抑制 I κ B α 磷酸化的效果最佳, 其次是西药组, 中药组最次。**结论** 联合使用养阴益气活血方和羟氯喹能通过减少 P65 mRNA 及蛋白表达, 维持 I κ B α mRNA 及蛋白高表达, 抑制 NF- κ B P65/I κ B α 信号通路, 减少颌下腺炎症反应, 从而发挥治疗干燥综合征的作用。

关键词 干燥综合征; 养阴益气活血方; NF- κ B P65/I κ B α 信号通路; NOD 小鼠; 中药

Study on the Mechanism of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe in Treating Sjögren's Syndrome Based on NF- κ B P65/I κ B α Signal Pathway FU Tian-xiao¹, LI Tian-yi², WU Fang-ping², LU Wen-wen¹, XIONG Fu-lin¹, and WU Guo-lin¹ 1 Department of Chinese Medicine, First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou (310003); 2 Functional Laboratory of Basic Medical College, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou (310053)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe on NF- κ B P65 nuclear factor kappa-B (NF- κ B P65) inhibitor alpha of NF- κ B (I κ B α) signal pathway in submandibular gland tissue of no obesity diabetes (NOD) mice with Sjögren's syndrome. **Methods** Twenty-four NOD mice were selected as the control group, and the NOD mice were randomly divided into four groups, with six mice in each group. The model group was administered intragastrically with 0.4 mL deionized water, the Western medicine (WM) group was administered intragastrically with 0.4 mL hydroxychloroquine, the Chinese medicine (CM) group was administered intragastrically with 0.4 mL Yangyin Yiqi Huoxue Recipe, and the Chinese and Western medicine (CWM) group was administered intragastrically with 0.4 mL Yangyin Yiqi Huoxue Recipe and 0.4 mL hydroxychloroquine respectively. Selected six balb/c mice of the same age as the normal group, and 0.4 mL

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81473604); 浙江省自然科学基金资助项目 (No. LY19H270013)

作者单位: 1. 浙江大学医学院附属第一医院中医科 (杭州 310003); 2. 浙江中医药大学基础医学院机能实验室 (杭州 310053)

通讯作者: 吴国琳, Tel: 0571-87236341, E-mail: wuguolin28@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20220729.084

deionized water was perfused. After 8 weeks of administration, bilateral submandibular gland tissues were extracted for PCR detection, and the protein changes of submandibular gland tissues of mice in each group after immunohistochemistry were observed under microscope. **Results** Compared with the normal group, the mRNA expression of P65 increased, and the mRNA expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ decreased in the submandibular gland tissue of the mice in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the mRNA expression of P65 WM decreased, and the mRNA expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ increased in the WM group, the CM group and the CWM group ($P<0.05$). Compared with the WM group, the mRNA expression of P65 was significantly decreased in the CWM group ($P<0.05$), and the mRNA expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ was decreased in the CM group ($P<0.05$). Microscopically, P65 protein was highly expressed and $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ protein was lowly expressed in the submandibular gland tissue of mice in the model group, and P65 protein was scattered in CM, WM and the CWM groups, with the weakest expression in the normal group. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ protein was highly expressed in the other three groups, and the normal group had the strongest expression. Compared with the normal group, the mean absorbance of P65 was significantly increased and the mean absorbance of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ was significantly decreased in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the mean absorbance of P65 was significantly decreased and the mean absorbance of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ was significantly increased in the CM, WM and the Chinese and Western medicine groups ($P<0.05$). In terms of efficacy comparison, the CWM group had the best efficacy in inhibiting P65 expression in the NF- κB / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ pathway, followed by the WM group and the CM group with similar efficacy. The CWM group had the best efficacy in inhibiting $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylation, followed by the WM group and the CM group the least. **Conclusion** The combination of Yangyin Yiqi Huoxue Recipe and hydroxychloroquine can play a role in the treatment of Sjögren's syndrome by reducing P65 mRNA and protein expression, maintaining high $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mRNA and protein expression, inhibiting NF- κB P65/ $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ signaling pathway and reducing the inflammatory response of submandibular gland.

KEYWORDS Sjögren's syndrome; Yangyin Yiqi Huoxue Recipe; NF- κB P65 / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ signaling pathway; NOD mice; Chinese medicine

干燥综合征 (Sjögren's syndrome, SS) 是一种高度异质性的系统性自身免疫病, 临床上多侵犯唾液腺和泪腺等外分泌腺为主, 严重者可累及多系统损伤。目前 SS 尚无特效治疗方法, 现代医学常使用激素或免疫抑制剂改善症状及延缓组织器官损害, 但会产生一定的不良反应, 而中医药治疗 SS 具有一定优势, 并取得了较好的临床疗效^[1]。笔者课题组前期研究表明养阴益气活血方对 SS 患者临床疗效确切, 不仅改善口干、眼干等症状, 还明显提高患者生活质量; 动物实验研究发现该方可调节非肥胖糖尿病 (no obesity diabetes, NOD) 小鼠颌下腺辅助性 T 细胞 (Th) 1/Th2 免疫平衡、减少核因子- κB P65 蛋白 (nuclear factor kappa-B, NF- κB 65 protein, NF- κB P65) / 核因子 κB 抑制蛋白 α (inhibitor alpha of NF- κB , $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) 主导的细胞凋亡、降低 Tfh 细胞相关分子 B 细胞淋巴瘤因子-6 (B-cell lymphoma 6 protein, BCL-6)、C-X-C 趋化因子受体 5 (C-X-C chemokine receptor type 5, CXCR5) 表达, 减少炎症因子 TNF- α 、IL-1 产生, 从而减轻颌下腺组织病理损害, 减少饮水量^[2-5]。近年研究发现 SS 打破 T 细胞免疫平衡后, 炎症因子除直接损伤内皮细胞

外, 还会进一步诱导核因子- κB P65 蛋白 (nuclear factor kappa-B, NF- κB) 异常活化, 而 NF- κB 反过来又能刺激 TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达, 进一步激活 NF- κB , 引起炎症瀑布反应, 形成复杂的炎症-细胞因子网络, 使组织细胞与内皮细胞之间存在一个恶性循环的持续损伤, 由此可见 NF- κB 信号通路参与 SS 发生发展, 促进炎症反应及各类炎症因子释放, 损伤颌下腺组织^[6, 7]。因此, 本研究以目前公认的 SS 动物模型 NOD 小鼠为研究对象^[8], 通过研究 NOD 小鼠及其颌下腺的核因子- κB P65 蛋白 (nuclear factor kappa-B, NF- κB 65 protein, NF- κB P65) / 核因子 κB 抑制蛋白 α (inhibitor alpha of NF- κB , $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) 信号通路变化, 进一步探讨养阴益气活血方治疗 SS 的可能作用机制。

材料与方法

1 动物 24 只 SPF 级 NOD 小鼠及 6 只同龄 Balb/c 小鼠, 8 周龄, 雌性, 体重 (20 ± 2) g, 饲养于浙江中医药大学动物实验中心, 于无特殊病菌的 SPF 级动物室恒温条件下喂养。所有动物均购于上海西普尔必凯实验动物有限公司 (合格证号:

20130016000707、20130016000706), 通过浙江大学医学院附属第一医院实验动物伦理委员会审查批准 (No.2018 实动快审第 048 号)。盲法实施情况: 实验操作人员对具体动物分组不知情。

2 药物 中药养阴益气活血方 (组成太子参 24 g 五味子 10 g 女贞子 15 g 白芍 15 g 黄精 15 g 山药 30 g 乌梅 12 g 红景天 15 g 肿节风 12 g), 中药饮片由浙江大学医学院附属第一医院中药房提供, 经过煎煮、过滤, 浓缩成含生药 2.25 g/mL (按成人和小鼠等效剂量换算, 大约相当于成人临床用量的 8 倍^[9])。硫酸羟氯喹片: 由上海上药中西制药有限公司生产 (规格 0.1g/片, 批号: H19990263), 用蒸馏水稀释成含生药量 3 mg/mL 的混悬液。兔抗鼠 P65、I κ B α 、多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司生产, 批号: SC-3932); P65、I κ B α 、原位杂交检测试剂盒 (武汉博士德公司, 批号: BS3719); 原位杂交专用 PBS (武汉博士德公司, 批号: BS4528); Sp-9001 (北京中杉金桥分装 Zymed, 18 mL, 批号: 861208); Pv-9003 (北京中杉金桥分装 Zymed, 3 mL, 批号: 861129)。

4 动物分组及给药方法 24 只 NOD 小鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字法分为 4 组, 即模型组 6 只 (灌服去离子水 0.4 mL), 西药组 6 只 (灌服羟氯喹 0.4 mL), 中药组 6 只 (灌服中药养阴益气活血方 0.4 mL, 100 g/kg), 中西药组 6 只 (灌服中药养阴益气活血方及羟氯喹各 0.4 mL), 选取 6 只同龄 Balb/c 小鼠作为正常组 (灌服去离子水 0.4 mL)。持续灌胃 8 周, 实验期间各组小鼠自由进食, 饮水。末次给药后各组小鼠禁食不禁水, 于第 2 天将小鼠颈椎脱臼处死, 立即摘取双侧颌下腺组织进行指标检测。

5 PCR 检测颌下腺 P65、I κ B α mRNA 表达水平 以 GAPDH 为内参, 实验过程按试剂盒说明书进行, 具体步骤如下: 用 Trisol 试剂盒提取颌下腺总 RNA, 取 1 μ L 进行 RT-PCR 分析。GAPDH 引物序列: 上游 5' -AAGGGTGGAGCCAAAAGGG-3', 下游 5' -TGGGGGTAGGAACACGGAA-3', 大小均为 19 bp。P65 引物序列: 上游 5' -GATGTGCATCGGCAAGTGG-3', 大小为 19 bp; 下游 5' -AGAAGTTGAGTTTCGGGTAGGC-3', 大小为 22 bp。I κ B α 引物序列: 5' -ATTCGGCTGTGTCTTTGTGA-3', 下游 5' -CTTAGTTGG GGGCGACTTTTA-3', 大小为 21 bp。扩增条件如下: 94 $^{\circ}$ C 初始变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 40 个循环, 60 $^{\circ}$ C 检测荧光值。P65、I κ B α mRNA 及内参 GAPDH 分别在两个管中同时

进行 PCR 反应, 除探针与引物外, 两管中加入 RNA 模板与其他反应试剂均一致。结果通过 ABI Stepone plus 荧光定量 PCR 仪测定并取其循环阈值均值 (CT 值), 以各组 Δ CT 值进行统计学分析, 本实验以模型组做为未处理组, 与其他各组进行比较。

6 免疫组化 SP 法检测颌下腺组织 P65、I κ B α 蛋白含量 免疫组化 SP 检测小鼠颌下腺组织 P65、I κ B α 蛋白的含量, 按照说明书操作后, 利用多功能真彩色细胞图象分析管理系统, 选取 400 倍图像, 以最终细胞质或胞膜为棕黄色判定为阳性表达细胞。随机选取 5 个视野进行平均光密度测定, 取其平均值作为该切片的代表值进行统计分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布且方差齐时采用单因素方差分析, 否则采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况 在饲养给药过程中, 与正常组相比, 其余各组小鼠出现不同程度毛发干枯脱落, 躁动不安、易激惹、反应过度灵敏, 体重减轻, 饮水增多, 唾液分泌量减少等阴虚阳亢的症状, 以模型组小鼠表现最为显著。予药物治疗后各药物干预组小鼠躁动及易激惹症状明显减轻, 饮水量减少, 体重下降趋势减缓, 其他症状也不同程度缓解。

2 各组小鼠颌下腺组织 P65、I κ B α mRNA 表达水平 (表 1) 与正常组比较, 模型组 P65 mRNA 表达增高 ($P < 0.05$), I κ B α mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 西药组、中药组、中西药组 P65 mRNA 表达降低, I κ B α mRNA 表达增高 ($P < 0.05$); 与西药组比较, 中西药组 P65 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 中药组 I κ B α mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠颌下腺 P65、I κ B α mRNA

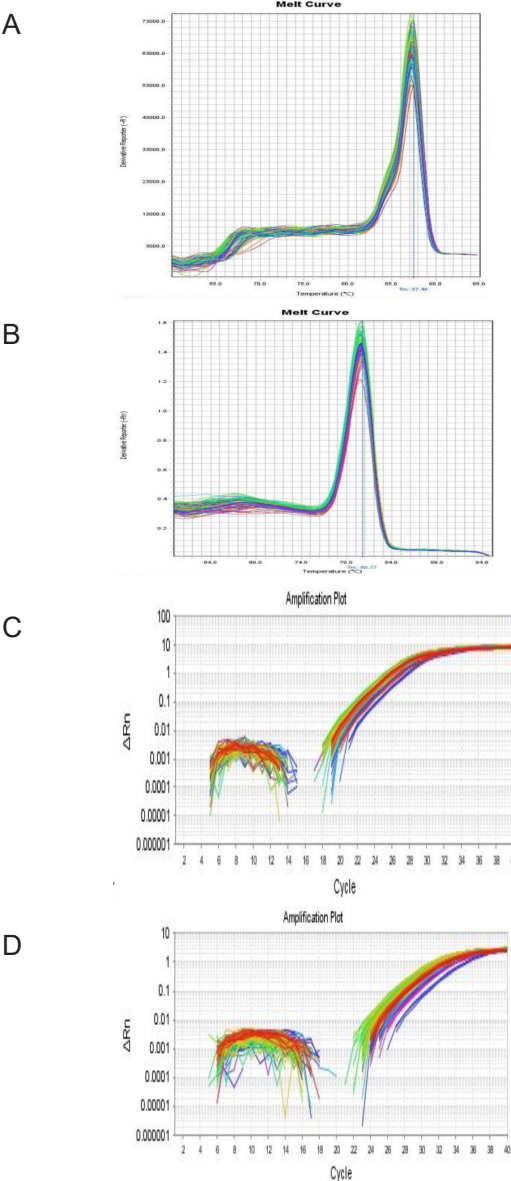
相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P65	I κ B α
正常	6	-3.45 $\pm$ 0.37	4.47 $\pm$ 0.34
模型	6	-0.88 $\pm$ 0.11*	1.39 $\pm$ 0.12*
西药	6	-2.64 $\pm$ 0.22 $^{\Delta}$	4.35 $\pm$ 0.16 $^{\Delta}$
中药	6	-2.57 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	2.73 $\pm$ 0.37 $^{\Delta\Delta}$
中西药	6	-3.20 $\pm$ 0.13 $^{\Delta\Delta}$	4.42 $\pm$ 0.22 $^{\Delta\Delta}$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与西药组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$

3 各组小鼠 P65、I κ B α mRNA 溶解及扩增曲线结果 (图 1) 荧光定量 P65 mRNA、I κ B α

mRNA PCR 产物的熔解曲线峰值分别为 87.5 ℃、80.8 ℃，二者熔解温度均一，为单一锐利主峰。扩增曲线显示所有样本均呈指数增长，无引物二聚体及非特异性扩增，效率较高，且达到平台期，扩增产物单一，避免检测过程中存在假阳性。



注:A 为 P65 mRNA 产物熔解曲线;B 为 P65 mRNA 产物扩增曲线;C 为 IκBα mRNA 产物熔解曲线;D 为 IκBα mRNA 产物扩增曲线

图 1 P65 mRNA、IκBα mRNA 熔解及扩增曲线图

4 各组小鼠颌下腺组织 P65 及 IκBα 蛋白表达水平 (图 2、3) SP 免疫组化后阳性染色显示 P65 及 IκBα 表达呈棕色颗粒。在模型组小鼠颌下腺组织腺泡内顶膜、基侧膜、闰管处可见比较明显的 P65 棕色颗粒聚集性表达, 中药组、西药组和中西药组棕色颗粒明显少于模型组, 但仍有散在表达, 正常组偶见淡黄色颗粒, 表达最弱。在正常组小鼠下腺

组织腺泡内顶膜、基侧膜、导管上皮内可见许多分散不均匀的 IκBα 棕色颗粒, 其余四组表达相对集中, 差异不明显, 但较正常组总体浅棕色颗粒偏少。

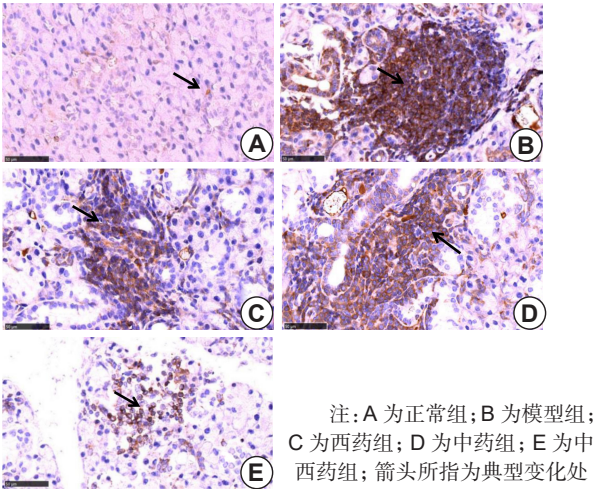


图 2 各组小鼠颌下腺组织 P65 蛋白表达 (SP, × 100)

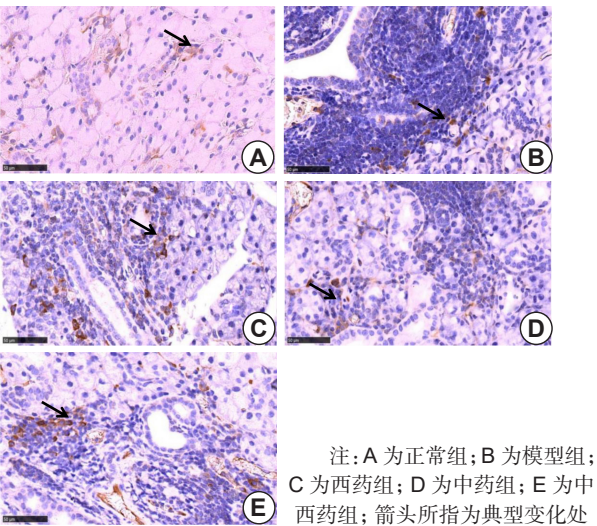


图 3 各组颌下腺组织 IκBα 蛋白表达 (SP, × 100)

5 各组小鼠 P65 及 IκBα 平均吸光度比较 (表 3) 与正常组比较, 模型组 P65 平均吸光度增高, IκBα 平均吸光度减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 西药组、中药组、中西药组 P65 平均吸光度显著降低, IκBα 平均吸光度显著增加 ($P<0.05$)。

表 3 NOD 小鼠颌下腺组织 P65 及 IκBα 平均吸光度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P65	IκBα
正常	6	0.09 ± 0.05	0.59 ± 0.05
模型	6	0.52 ± 0.08*	0.10 ± 0.04*
西药	6	0.21 ± 0.09 [△]	0.28 ± 0.10 [△]
中药	6	0.23 ± 0.06 [△]	0.18 ± 0.08 [△]
中西药	6	0.14 ± 0.06 [△]	0.31 ± 0.07 [△]

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$

讨 论

SS 在我国患病率为 0.30%~0.77%，存在女性倾向，男女比例为 1: 9^[10]。目前发病机制尚不明确，西医大多采用局部缓解外分泌腺干燥症状作替代治疗，当组织脏器受累时加用激素或免疫抑制剂如羟氯喹来延缓自身免疫反应^[11]，但西药尤其激素等存在不良反应多，病情迁延易复发等缺点。中医学中 SS 属于“燥痹”范畴，课题组长期研究发现临床上 SS 患者辨证多以气阴两虚为主，兼有血瘀。课题组 20 余年临床经验总结的中药复方——养阴益气活血方，主要由太子参、白芍、女贞子、五味子、黄精、乌梅、红景天、肿节风等中药组成。中重用太子参以补气为君药，白芍、女贞子养肝肾之阴为臣药，五味子、乌梅为佐药酸敛生津，黄精益气养精，三药同用辅助君臣药增加益气养阴之功，肿节风、红景天活血化瘀、通络止痛，诸药合用，具有养阴滋肾、益气生津、活血化瘀功效，诸药合用，可治疗阴虚气虚兼血瘀证型患者。

研究发现，SS 患者存在 Th 参与的免疫失衡，在体内表现为促炎因子的升高和抑炎因子的降低^[12]，而 NF- κ B 是经典的促炎信号通路，p65 是 NF- κ B 活化的最常见形式，在 SS 免疫固有反应中介导多种细胞增殖分化和炎症因子释放等^[13]，NF- κ B 活化后能刺激众多炎症因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6 等表达增加，而这些炎症因子反过来能进一步活化 NF- κ B，通过炎症瀑布使得内皮细胞与组织细胞持续损伤，形成恶性循环。此外，激活的 NF- κ B 又能介导 SS 患者 B 淋巴细胞的过度表达，产生大量自身抗体，破坏外分泌腺体^[14]。NF- κ B 的抑制蛋白 I κ B 是 NF- κ B 信号通路中的重要组成部分，其中 I κ B α 是 I κ B 家族中的重要成员之一，因其能最快速的磷酸化成为抑制 NF- κ B 活性中的关键成分^[15]，当 I κ B α 缺乏或活性改变可导致 NF- κ B 失活，介导 SS 发生，在 SS 发病中扮演不可或缺的角色^[16-18]。有研究发现沉默的 B 细胞表达低水平的 p65 和高水平的 I κ B α ，过度激活的 B 细胞表达高水平的 p65 和低水平的 I κ B α ，表明 p65 与 I κ B α 两者呈负相关比关系^[19]。因此，若抑制 NF- κ B 信号通路上游激酶的活化，分解 I κ B α 从而阻止 NF- κ B 核移位，下调其转录调控的炎性因子 p65 表达，促使 I κ B α 的磷酸化，从而抑制 NF- κ B 活性，减少炎症因子释放，可延缓 SS 的发生发展。可见调控 NF- κ B P65/I κ B α 信号通路对研究 SS 的发病机制以及药物治疗作用机制具有重要意义。

本实验研究发现，与正常组比较，模型组颌下腺 P65 mRNA 表达量明显升高、I κ B α mRNA 表达量显著降低，两者表达呈负相关性，说明 NOD 小鼠模型成功，同时也表明 I κ B α 在 SS 发生中不断磷酸化，NF- κ B 信号通路活化，炎症介质释放增加，体现 NF- κ B P65/I κ B α 在 SS 炎症形成过程中扮演重要角色，提示炎症信号通路激活是 SS 发病的重要机制之一。与模型组比较，西药组、中药组与中西药组均能提高 I κ B α mRNA 表达，抑制 P65 mRNA 表达，且中西药组优于单用西药，表明养阴益气活血方联用西药能通过上调 NF- κ B 信号通路的上游激酶 I κ B α 含量来阻止 NF- κ B 核移位，下调转录调控的炎症因子来削弱 SS 炎症反应，减少炎症介质 P65 释放。与西药组比较，中药组 P65 mRNA 表达量差异无统计学意义，而 I κ B α mRNA 表达量却显著降低，虽然也明显高于模型组 I κ B α mRNA，说明养阴益气活血方抑制炎症反应的机制不仅仅通过减弱 I κ B α 磷酸化，还能通过其他途径或通路。另外，因为 I κ B 有 α 、 β 等多种形式，本实验只检测 I κ B α 抗体，并未对 I κ B β 等其他受体进行研究，从中西药组显著高于西药组的 P65 mRNA 表达，但通路下游两者的 I κ B α mRNA 表达却相仿，进一步佐证单用养阴益气活血方对下游通路中 I κ B α 受体影响较小，可能存在其他通路或受体参与，后续可进一步寻找 NF- κ B 上游的通路或不同抑制蛋白形式进行深入探讨。同时模型组 P65 及 I κ B α 的吸光度对比正常组有显著改变，3 组药物干预后吸光度得到不同程度改善，提示养阴益气活血方和羟氯喹都能通过上述 NF- κ B P65/I κ B α 通路抑制炎症从而改善 NOD 小鼠的病理状态。另外，本次实验的扩增曲线看出 PCR 过程有明显的基线期、指数期和平台期，曲线拐点清楚，特别是低浓度样本指数期明显，扩增曲线整体平行性好，基线略微下降平而无上扬现象，低浓度样本扩增曲线指数期明显，扩增整体效率较高。溶解曲线的目的基因峰值在 80~90℃ 之间，图象呈单峰说明产物只有一条，验证扩增产物的特异性。以上曲线保证了本次实验 PCR 的稳定性、特异性及扩增的高效率。

本研究结果从基因与蛋白及病理层面共同表明 NOD 小鼠存在炎症状态，提示 SS 发病与炎症相关，养阴益气活血方干预后，确能通过 NF- κ B P65/I κ B α 信号通路减少炎症反应，改善颌下腺病理产物的堆积，发挥治疗 SS 的作用，为今后进一步深入研究养阴益气活血方的调节机制提供新思路。

利益冲突: 本文无利益相关冲突。

参 考 文 献

- [1] 姜晨光, 梁家华, 庄振杰, 等. 中医药治疗干燥综合征研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(2): 280-282.
- [2] 王庆, 李天一, 吴国琳, 等. 养阴益气活血方对干燥综合征 NOD 小鼠颌下腺 BCL-6 和 CXCR5 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(3): 261-266.
- [3] 吴国琳, 李天一, 卢雯雯, 等. 养阴益气活血方药对干燥综合征 NOD 小鼠颌下腺 Fas/FasL 及其 mRNA 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4148-4151.
- [4] Wu GL, Li TY, Fan YS, et al. Effect of Chinese herbal medicine for nourishing yin, supplementing qi, and activating blood on the Th1/Th2 immune balance in peripheral blood in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(9): 696-700.
- [5] Wu GL, Wu NY, Li TY, et al. Effect of Chinese herbal medicines for nourishing yin, supplementing qi, and activating blood on reproductive endocrine activity and immune functions in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(10): 778-783.
- [6] Bezzina OM, Gallagher P, Mitchell S, et al. Subjective and objective measures of dryness symptoms in primary Sjögren's syndrome - capturing the discrepancy[J]. Arthritis Care Res, 2017, 69(11): 1714-1723.
- [7] Li B, Liu G, Liu R, et al. Total glucosides of paeony (TGP) alleviates Sjögren's syndrome through inhibiting inflammatory responses in mice[J]. Phytomedicine, 2020, 71: 153203.
- [8] Inoue H, Kishimoto A, Ushikoshi-Nakayama R, et al. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjögren's syndrome[J]. J Clin Biochem Nutr, 2016, 59(2): 107-112.
- [9] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1103.
- [10] Maciel G, Crowson CS, Matteson EL, et al. Incidence and mortality of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome: time trends over a 40-year period in a population-based US cohort[J]. Mayo Clin Proc, 2017, 92(5): 734-743.
- [11] Faizal B, Gangadharan S, Thankappan K. Comparison between sialendoscopy and conventional methods in the treatment of sialolithiasis[J]. Malays J Med Sci, 2017, 24(5): 94-100.
- [12] Jin L, Yu D, Li X, et al. CD4⁺CXCR5⁺ follicular helper T cells in salivary gland promote B cells maturation in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5): 1988-1996.
- [13] Sisto M, Barca A, Lofrumento DD, et al. Downstream activation of NF- κ B in the EDA-AI/EDAR signalling in Sjögren's syndrome and its regulation by the ubiquitin-editing enzyme A20[J]. Clin Exp Immunol, 2016, 184(2): 183-196.
- [14] Xiaoyu T, Lingling Z, Wei W. Roles of TRAFs in NF- κ B signaling pathways mediated by BAFF[J]. Immunol Lett, 2018, 196(10): 113-118.
- [15] Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs[J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 77-94.
- [16] Zheng Y, Deng Y, Gao JM, et al. Icariside II inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and amyloid production in rat astrocytes by regulating I κ B/K κ B/NF- κ B/BACE1 signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(2): 154-162.
- [17] 邹福兰, 骆娟, 黄蓉, 等. I κ B α 在 NF- κ B 信号通路中的作用及临床意义[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(3): 513-516.
- [18] Lee HJ, Seo HS, Kim GJ. Houttuynia cordata thunb inhibits the production of proinflammatory cytokines through inhibition of the NF- κ B signaling pathway in HMC-1 human mast cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(3): 731-736.
- [19] Zhang HZ, Liu SY, Lian CF, et al. Elevated EPST11 promote B cell hyperactivation through NF- κ B signalling in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(4): 518-524.

(收稿: 2021-06-16 在线: 2022-08-24)

责任编辑: 汤 静