

# 益气破瘀法对狼疮鼠血清IL-10与IFN- $\gamma$ 及肾脏病理的影响

王 骁 苏 励 曲环汝 杨亚旭 薛轶燕 茅建春 顾军花

上海中医药大学附属龙华医院风湿科 (上海 200032)

【摘 要】 目的 观察益气破瘀法对 NZB/W F1 狼疮鼠的疗效,并探讨其作用机制。方法:将 NZB/W F1 小鼠随机分为模型组、中药组、西药组与中西医结合组。分别以生理盐水、益气破瘀小复方和骁悉对其进行干预治疗。以双抗夹心 ELISA 法检测血清 IL-10、IFN- $\gamma$  水平,肾组织行常规 HE 染色。结果:中药组、西药组、中西医结合组与模型组相比,血清 IL-10、IFN- $\gamma$  均有显著降低( $P < 0.01$ );各治疗组之间比较未见差异显著( $P > 0.05$ )。HE 染色显示,中药组、西药组、中西医结合组肾脏病变与模型组相比,系膜细胞增生、系膜基质增宽等情况较轻,内皮下免疫复合物沉积较少,其中以中西医结合组病变最轻。结论:益气破瘀法能明显降低狼疮鼠血清 IL-10、IFN- $\gamma$  水平,延缓肾脏损害。采用中西医结合治疗的效果优于单用中药和单用西药。

【关键词】 益气破瘀法;红斑狼疮;白细胞介素-10;干扰素-

【中图分类号】 R593.24;R285.5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1008-861X(2007)06-0051-03

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多系统多器官的自身免疫性疾病,目前主要采用激素及免疫抑制剂治疗,属难治性疾病。我科多年来以益气破瘀法为主治疗 SLE 及狼疮性肾炎临床疗效确切,并做了相关的临床研究与动物实验<sup>[1,2]</sup>。为进一步揭示该治法的作用机制,我们在前期大量临床工作的基础上筛选出黄芪、莪术、白花蛇舌草 3 味药组成益气破瘀小复方,以国际公认的与人类红斑狼疮最为相似的 NZB/W F1 狼疮鼠为研究对象,观察该方对狼疮鼠血清白细胞介素-10 (IL-10)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )及肾脏病理的影响,以期探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物 2月龄 SPF 级 NZB/W F1 狼疮鼠,雌性,52只,由南京遗传小鼠动物模式中心提供,上海中医药大学附属龙华医院动物饲养中心 SPF 级封

闭饲养。

1.1.2 试剂与药物 霉酚酸酯(商品名:骁悉),250 mg/片,上海罗氏有限公司提供(批号:SH0010)。中药制剂:益气破瘀小复方由上海中医药大学附属龙华医院制剂室按既定工艺完成并提供。小鼠 IL-10 ELISA 检测试剂盒、小鼠 IFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒、RapidBio Lab(批号:25040655),均购自上海轩昊科技有限公司。

1.2 实验药物制备 骁悉:配成浓度为 1.3 mg/ml、2.6 mg/ml 水溶液;益气破瘀小复方:分别配制成含生药浓度 600 mg/ml(相当于含原生黄芪 300 mg、莪术 150 mg、白花蛇舌草 150 mg)、1200 mg/ml(相当于含原生黄芪 600 mg、莪术 300 mg、白花蛇舌草 300 mg)两种不同浓度的水煎液。

1.3 实验分组及给药 将 52 只 NZB/W F1 狼疮鼠随机分为模型组(13只)、中药组(13只)、西药组(14只)、中西医结合组(12只)。于饲养至 5 月龄时开始分别给药灌胃,给药干预总时间为 2 个月。模型组生理盐水灌胃,0.5 ml/d;中药组 600 mg/ml 中药复方灌胃,0.5 ml/d;西药治疗组 1.3 mg/ml 骁悉灌胃,0.5 ml/d;中西医结合组 2.6 mg/ml 骁悉(0.25 ml/d)+1200 mg/ml 中药复方(0.25 ml/d)灌胃。

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(30472205);上海市博士点基金资助项目(2006B09)

【作者简介】王骁(1981-),男,四川成都人,硕士,医师,主要从事风湿性疾病的中西医结合防治研究。

【通讯作者】苏励,主任医师,博士生导师。

E-mail:suli2002@vip.sina.com

1.4 IL-10、IFN- $\gamma$  检测 所有小鼠均于7月龄时摘除眼球,采集血液后断颈处死。4 离心分离血清,以双抗夹心ELISA法检测血清IL-10、IFN- $\gamma$ 水平。

1.5 肾脏病理检测 以10%中性福尔马林溶液固定左肾,常规脱水、石蜡包埋,切片厚3  $\mu$ m,脱蜡至水,行HE染色,脱水,透明,封片,镜检。

1.6 统计学方法 采用SPSS 11.5 for Windows 统计分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态性和方差齐性时,多组均数比较用方差分析法。两两比较,方差齐性时用LSD法,方差不齐时选用Dunnett's T3法。

## 2 结果

2.1 干预治疗2个月后各组存活小鼠情况 模型组自然死亡1只,中药组自然死亡2只,西药组自然死亡3只,中西医结合组无死亡。

2.2 血清IL-10及IFN- $\gamma$  比较 中药组、西药组、中西医结合组与模型组比较均有显著降低( $P < 0.01$ );各治疗组之间比较未见显著差异( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 各组血清IL-10及IFN- $\gamma$  比较( $\bar{x} \pm s$  ng/L)

组别	n	IL-10	IFN- $\gamma$
模型组	12	799.53 $\pm$ 80.12	1691.91 $\pm$ 89.65
中药组	11	145.92 $\pm$ 40.35**	1042.79 $\pm$ 209.45**
西药组	11	158.77 $\pm$ 57.90**	922.32 $\pm$ 207.86**
中西医结合组	12	196.73 $\pm$ 80.24**	988.84 $\pm$ 53.74**

注:与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

2.3 肾脏HE染色 模型组未经药物干预而呈现典型自发狼疮样肾脏病理改变,可见中到重度系膜细胞增多,系膜基质显著增宽,肾小球呈节段性硬化,毛细血管内皮细胞增生,管腔狭窄明显,病变程度在4个组中最为严重;中药组可见轻度到中度系膜细胞增生,系膜基质轻度增宽,少数毛细血管内皮细胞轻度增生,部分毛细血管腔稍显狭窄;西药组系膜细胞增生也较轻,系膜基质轻度增宽,部分毛细血管内皮细胞增生,管腔稍显狭窄;中西医结合组仅见局部轻度系膜细胞增生和基质增宽,毛细血管内皮增生不明显,管腔通畅,近似于正常肾小球结构。中药组、西药组、中西医结合组系膜细胞增生、系膜基质增宽等肾脏病变的情况较模型组减轻,其中以中西医结合组病变最轻。见图1。

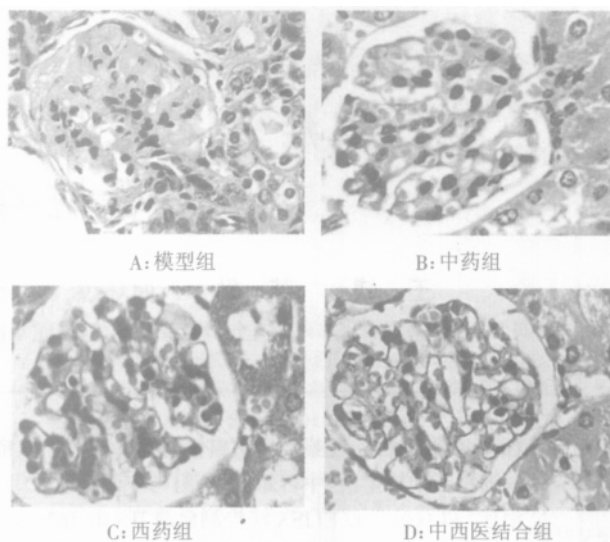


图1 各组肾脏病理检测(HE染色,  $\times 400$ )

## 3 讨论

系统性红斑狼疮病因未明,目前多认为在遗传、环境与性激素等因素共同作用下,机体发生异常免疫应答,持续产生大量致病性自身抗体和免疫复合物,引起组织损伤,导致疾病发生。由于SLE可累及人体各个系统,故临床表现多样,而以狼疮性肾炎最为常见。在长期临床实践中我们逐步认识到SLE,尤其是狼疮性肾炎的病因可分为内外两方面,内因为禀赋不足(遗传因素),脾肾亏虚,气虚不运,以致气滞血瘀;外因主要为湿热与热毒,还包括日晒之毒(环境因素)等。内外病因共同作用于人体,正虚邪实,而成本病。“正虚、瘀毒”是其病机主线,故针对病机,以益气破瘀法为主治疗。

益气破瘀小复方中,黄芪双补脾肾,针对“正虚”。正如王好古所言“黄芪……益脾胃是中州药,治伤寒尺脉不至,补肾元是里药”。莪术善走血分,荡涤凝瘀,《本草经疏》谓其能“破气中之血”;白花蛇舌草清热化湿解毒,两药合用针对“瘀毒”。三药相合,恰投该病病机主线,标本兼顾,虚实并调,共奏扶正祛邪,托里解毒之功。现代药理证实,黄芪对免疫系统具有双向调节作用,能使紊乱的免疫机能恢复有序,对治疗肾脏疾病尤其有利<sup>[3]</sup>。刘迟等<sup>[4]</sup>在对肾间质病变引起的早期慢性肾功能衰竭的临床观察中发现,莪术可能有拮抗ET-1血管收缩的作用,通过该作用扩张肾动脉血管,改善微循环,并可能通过调节TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>系统,减轻肾间质损伤,改善肾功能。白花蛇舌草则具有抗菌消炎、免疫调控等诸多功效<sup>[5]</sup>。

IL-10 主要由 Th2 细胞产生, 是一种典型的 B 细胞刺激因子, 它可以刺激 SLE 病人外周血单核细胞(PBMC)产生抗 DNA 自身抗体<sup>[6]</sup>, 而抗双链 DNA 抗体又能刺激 PBMC 分泌 IL-10 增加<sup>[7]</sup>, 二者相互促进, 导致病情进展。IFN- $\gamma$  属于 Th1 型细胞因子, 它主要通过激活 PBMC、淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK)来调控淋巴因子、细胞因子的生成, 诱导细胞表面受体表达等, 在调节免疫应答中发挥作用。Fan 等<sup>[8]</sup>证实了狼疮性肾炎模型中, MHC 抗原表达增加, 直接促进了肾小球及肾小管的免疫损伤, 而 IFN- $\gamma$  即是其中介因子之一。刘华锋等研究表明<sup>[9]</sup>, 全身循环及肾组织局部 IFN- $\gamma$  的高表达和高分泌在 SLE 的发生和发展中均起关键的作用。本研究显示, 模型组狼疮鼠周围血 IL-10 及 IFN- $\gamma$  明显升高, 而各治疗组狼疮鼠周围血 IL-10 及 IFN- $\gamma$  较模型组狼疮鼠有显著性下降, 与文献报道相符<sup>[10]</sup>。这提示益气破瘀小复方可能通过直接或间接抑制 IL-10 及 IFN- $\gamma$  而起到延缓病情进展, 保护肾脏的作用。

肾脏病理显示, 与模型组比较, 中药、西药和中西医结合三组都能在一定程度上延缓病情进展, 保护肾脏, 证实了益气破瘀法对狼疮鼠肾损伤确有疗效。三组中以中西医结合组疗效最为显著, 说明益气破瘀方在作用靶点与机制上可能与骁悉不同, 两者存在一定的协同作用。

#### 参考文献:

- [1] 苏励 陈湘君 胡建东 等. 大剂量黄芪为主配合丹参静脉滴注治疗狼疮性肾炎 30 例临床观察[J]. 中医杂志, 1999, 40(8): 476-478.
- [2] 苏励 陈湘君 胡建东 等. 不同剂量黄芪及黄芪加丹参对大鼠蛋白尿作用的比较[J]. 中国新药与临床杂志, 2000, 19(3): 205-208.
- [3] 张建新 邱世翠 李波清 等. 黄芪对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(6): 488-490.
- [4] 刘迟 胡仲仪. 裁术对肾间质病变引起的早期慢性肾功能衰竭影响的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(11): 15-16.
- [5] 谭宁华 王双明 杨亚滨 等. 白花蛇舌草的抗肿瘤活性和初步化学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 33-36.
- [6] Liorente L, Zou W, Levy Y, et al. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus[J]. J Exp Med, 1995, 181(3): 839-844.
- [7] Sun KH, Yu CL, Tang SJ, et al. Monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody stimulates the expression and release of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  from normal human mononuclear cells involving in the lupus pathogenesis[J]. Immunology, 2000, 99(3): 352-360.
- [8] Fan X, Wuthrich RP. Upregulation of lymphoid and renal interferon-gamma mRNA in autoimmune MRL-Fas(lpr) mice with lupus nephritis[J]. Inflammation, 1997, 21(1): 105-112.
- [9] 刘华锋 唐德察 路杰 等. BXS 狼疮小鼠外周血及脾、肾组织干扰素- $\gamma$  表达水平以及 FK506 对其表达的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(4): 202-205.
- [10] Gereiz L, Shkolnik T, Hirschmann O, et al. Hyperinducible expression of interferon gamma gene and its suppression in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 109(2): 296-303.

编辑: 白玉金

收稿日期: 2007-08-19

## Effects of Qi-Enriching and Stasis-Breaking Therapy on Serum IL-10, IFN- $\gamma$ and Renal Pathology in Mice

WANG Xiao SU Li QU Huan-ru YANG Ya-kui XUE Yi-yan MAO Jian-chun GU Jun-hua  
Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

**ABSTRACT** Objective: To investigate the therapeutic effects of qi-enriching and stasis-breaking therapy on NZB/W F1 mice, and to approach its mechanism. Methods: NZB/W F1 mice were divided into model group, herb decoction group, Cellcept group and herb-Cellcept group, and were given normal saline, qi-enriching and stasis-breaking decoction and Cellcept solution respectively every day. Two months later, serum IL-10 and IFN- $\gamma$  were determined by double-antibody sandwich ELISA. Kidney slices of these mice were stained by regular HE methods. Results: The serum IL-10 and IFN- $\gamma$  levels in herb decoction group, Cellcept group and herb-Cellcept group were significantly lower than those of model group,  $P < 0.01$ . But no difference was found among the three different therapeutic groups. HE slice showed proliferation of mesenterium cells and matrix in the four therapeutic groups which was milder than model group, especially in herb-Cellcept group. Conclusion: Qi-enriching and stasis-breaking decoction can down-regulate the levels of serum IL-10 and IFN- $\gamma$  of NZB/W F1 mice and relieve their renal lesion. Therapeutic effect of herb-Cellcept is superior to herb decoction or Cellcept.

**KEY WORDS** Qi-enriching and stasis-breaking therapy; lupus erythematosus; IL-10; IFN