

益肾养阴合剂抗自发性系统性红斑狼疮模型鼠 氧化应激损伤机制研究*

吴晶金, 李兆福, 李玲玉, 粟 荣, 殷世云

(云南省中医医院, 云南 昆明 650021)

摘要: **目的** 探讨益肾养阴合剂对自发性系统性红斑狼疮模型鼠氧化应激损伤的影响。**方法** 将 30 只 MRL/lpr 小鼠随机分为 6 组(每组 5 只):模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、激素组、中药配合激素组。用药 4 周后,心脏穿刺取血,4℃静置 2h 后 2500rpm 离心 20min 分离血清,以紫外分光光度法检测各组血清中 SOD、CAT、MDA 活性;脱颈处死小鼠,取新鲜肾脏组织检测 dsDNA 浓度。**结果** (1)治疗 4 周后,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组 SOD 水平明显升高,具有显著差异($P<0.01$),益肾养阴合剂中剂量组与模型组比较 SOD 数值有统计学意义;(2)与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组 CAT 活性明显升高,具有显著差异($P<0.01$),益肾养阴合剂中剂量组、低剂量组与模型组比较 CAT 数值有统计学意义($P<0.05$);(3)与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组 MDA 含量明显下降,具有显著差异($P<0.01$),益肾养阴合剂中剂量组与模型组比较 MDA 数值有统计学意义($P<0.05$);(4)与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组 dsDNA 水平明显降低,具有显著差异($P<0.01$),益肾养阴合剂中剂量组与模型组比较 dsDNA 数值有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 益肾养阴合剂可有效降低血清 MDA、dsDNA 水平,提高血清 SOD、CAT 活性。

关键词: 益肾养阴合剂; 系统性红斑狼疮; 氧化应激损伤机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)04-0026-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.04.006

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是自身免疫介导的,以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病^[1]。血清中出现以抗核抗体为代表的多种自身抗体和多系统受累是 SLE 的两个主要临床特征。本病好发于生育年龄女性,多见于 15~45 岁年龄段,女:男为 7~9:1。流行病学研究显示,我国患病率为 70/10 万,妇女中则高达 113/10 万人。SLE 急性期病人的死亡原因主要是多脏器严重损害和感染。其 5 年存活率为 90%,10 年存活率为 80%。SLE 临床表现复杂多样,可累及多个重要脏器,甚者出现狼疮危象,危及生命。中医认为气阴两虚是系统性红斑狼疮发生的病理基础^[2]。益肾养阴是治疗系统性红斑狼疮的重要手段,益肾养阴合剂主要由黄芪、太子参、麦冬、五味子、女贞子、旱莲草、丹参、白茅根等 10

余味中药组成。临床主要用于系统性红斑狼疮(气阴两虚型)的治疗。临床研究显示,益肾养阴合剂能明显改善 SLE 缓解期气阴两伤证的临床症状,降低 ESR、CRP、ANA 滴度等指标,总有效率达到 96.67%^[3]。氧化应激损伤在 SLE 致病作用中扮演重要作用。所有类型的细胞,包括淋巴细胞和免疫细胞,其氧化反应均由抗氧化酶复合物即超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),过氧化氢酶(Catalase, CAT),丙二醛(malondialdehyde, MDA)调节,并防止自由基介导的细胞毒作用。有研究报道,SLE 患者的过氧化物和羟基等自由基产物显著增加,脂质过氧化作用指标亦显著升高^[4-5]。脂质水平、过氧化水平的提高与疾病的严重程度和器官损伤有着极大的关联。氧应激可使损伤局部的吞噬细胞被激活,释放活性氧,活性

* 基金项目: 云南省自然科学基金青年项目(2014FD093); 云南省优秀中青年中医药领军人才项目

收稿日期: 2017-06-26

作者简介: 吴晶金(1984-), 云南大理人, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治风湿病。

E-mail: wujingjin2013@126.com

氧渗透入细胞膜与 DNA 发生反应,构象改变的 DNA 作为抗原引起抗 DNA 抗体的产生^[6]。本研究以 SOD、CAT、MDA、dsDNA 为切入点,拟通过自发性狼疮鼠模型,探讨益肾养阴合剂抗氧化应激损伤作用,为益肾养阴合剂治疗系统性红斑狼疮提供实验数据及理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

自发性系统性红斑狼疮模型鼠(MRL/lpr小鼠)30只,7~8周龄,体质量(20 ± 2)g,雄性,购自南京大学-南京生物医药研究院,动物许可证号SCXK(苏):2010-0001。饲养于昆明医科大学实验室动物房。实验前适应性喂养1周,自由摄食饮水,光暗循环。动物房温度维持在 25°C ,湿度维持在45%~55%之间。

1.2 药物及试剂

益肾养阴合剂(由云南省中医医院中药房提供);SOD试剂盒、CAT紫外线试剂盒、MDA测试盒,南京建成生物工程研究所。Mouse dsDNA ELISA kit,欣博盛生物科技有限公司。醋酸泼尼松片(重庆科瑞制药(集团)有限公司,批号:H50020459)。

1.3 实验方法

1.3.1 益肾养阴合剂对各组 MRL/lpr 小鼠 SOD、CAT、MDA 的影响

将30只MRL/lpr小鼠随机分为6组(每组5只):模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组、激素组、中药配合激素组。模型组:给予等量生理盐水灌胃,10mL/Kg/d;高剂量组:益肾养阴合剂,60g/Kg/d;中剂量组:益肾养阴合剂,30g/Kg/d;低剂量组:益肾养阴合剂,15g/Kg/d;激素组:醋酸泼尼松混悬液5mg/Kg/d;中药配合激素组:益肾养阴合剂生药30g/Kg/d+醋酸泼尼松混悬液5mg/Kg/d。用药4周后,心脏穿刺取血, 4°C 静置2h后2500rpm离心20min分离血清,以紫外分光光度法检测各组血清中SOD、CAT、MDA的OD值,结合结果,参考说明书进行公式计算,并根据总蛋白浓度换算为对应单位蛋白。

1.3.2 益肾养阴合剂对各组 MRL/lpr 小鼠 dsDNA 的影响

各组MRL/lpr小鼠肾脏组织,加入 4°C 的PBS在冰浴中进行匀浆,随后匀浆液 4°C 离心,取上清作为待测样品,用dsDNA检测试剂盒检测各孔浓度值。

1.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据比较采用方差分析(ANOVA);以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠 SOD 的影响

与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组SOD水平明显升高,具有显著差异($P<0.01$),益肾养阴合剂中剂量组与模型组比较SOD数值有统计学意义($P<0.05$)。见表1、图1。

表1 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 模型 SOD 的影响

组别	SOD/(Unit/mg)
益肾养阴合剂高剂量组	$60.10\pm 5.59^{**}$
益肾养阴合剂中剂量组	$37.97\pm 2.97^{*}$
益肾养阴合剂低剂量组	27.99 ± 1.38
激素组	$77.93\pm 4.94^{**}$
中药配合激素组	$92.72\pm 4.19^{**}$
模型组	22.95 ± 2.67

注:与模型对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

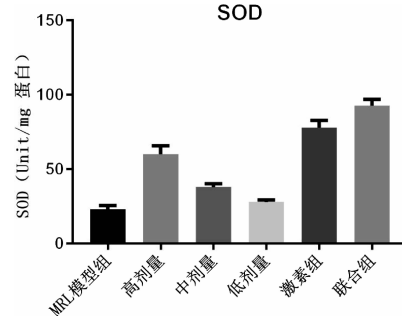


图1 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 模型 SOD 的影响

2.2 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠 CAT 的影响

与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组CAT水平明显升高,具有显著差异($P<0.01$),益肾养阴合剂中剂量组、低剂量组与模型组比较CAT数值有统计学意义($P<0.05$)。见表2、图2。

表2 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠 CAT 的影响

组别	CAT/(U/mg)
益肾养阴合剂高剂量组	$3.06\pm 0.20^{**}$
益肾养阴合剂中剂量组	$1.92\pm 0.31^{*}$
益肾养阴合剂低剂量组	$1.41\pm 0.34^{*}$
激素组	$2.94\pm 0.30^{**}$
中药配合激素组	$3.97\pm 0.28^{**}$
模型组	0.94 ± 0.19

注:与模型对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

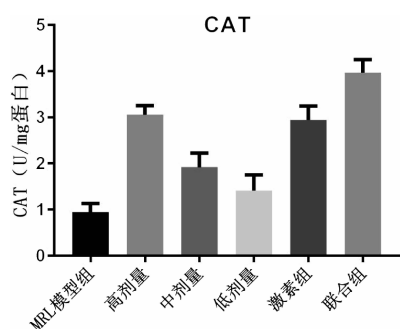


图2 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 模型 CAT 的影响

2.3 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠 MDA 的影响

表3 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 小鼠 MDA 的影响

组别	MDA / (nmol / mg)
益肾养阴合剂高剂量组	1.24 ± 0.39**
益肾养阴合剂中剂量组	1.66 ± 0.59*
益肾养阴合剂低剂量组	2.10 ± 0.51 ^{△△}
激素组	1.14 ± 0.41**
中药配合激素组	1.07 ± 0.41**
模型组	2.91 ± 0.92 ^{△△}

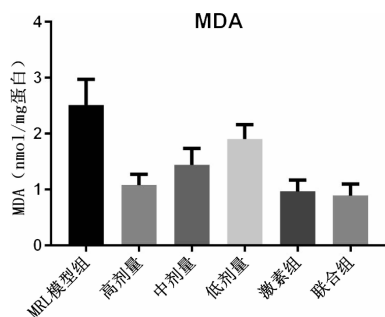
注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 

图3 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 模型 MDA 的影响

3 讨论

益肾养阴合剂是全国第二批名老中医学术经验继承工作指导老师,云南省名中医孟如教授基于多年的临床经验总结出治疗系统性红斑狼疮的有效良方。该方主要由黄芪生脉六味二至丸加减化裁而成,具有益气养阴、滋补肝肾之功。主治系统性红斑狼疮之气阴两伤证。益肾养阴合剂主要由黄芪、太子参、麦冬、五味子、女贞子、旱莲草、丹参、白茅根等 10 余味中药组成。其中黄芪补气升阳、益气固表为君药。太子参补气生津以补肺,麦冬养阴清热,润肺生津;五味子敛肺止汗,生津止咳,共为臣药。女贞子滋养肝肾,旱莲草养阴益精,丹参活血化瘀;白茅根凉血止血,共为佐药。该方已在临床大量使用,显示出良

与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组 MDA 水平明显下降,具有显著差异($P < 0.01$),益肾养阴合剂中剂量组与模型组比较 MDA 数值有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 3。

2.4 益肾养阴合剂对各组 MRL/lpr 小鼠 dsDNA 的影响

与模型组相比,益肾养阴合剂高剂量组、激素组、中药配合激素组 dsDNA 水平明显降低,具有显著差异($P < 0.01$),益肾养阴合剂中剂量组与模型组比较 dsDNA 数值有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4、图 4。

表4 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 模型 dsDNA 的影响

组别	dsDNA / (IU / mL)
益肾养阴合剂高剂量组	16.58 ± 4.20**
益肾养阴合剂中剂量组	37.35 ± 5.21*
益肾养阴合剂低剂量组	41.44 ± 2.86
激素组	12.70 ± 3.54**
中药配合激素组	8.95 ± 2.42**
模型组	42.87 ± 3.67

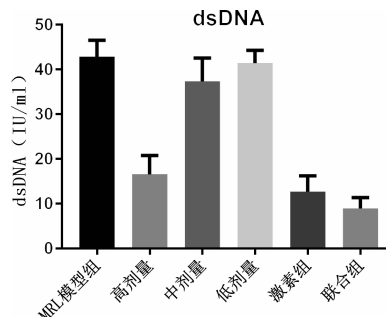
注:与模型对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 

图4 益肾养阴合剂对 MRL/lpr 模型 dsDNA 的影响

好的疗效。现代药理研究发现,生脉饮、六味地黄丸及二至丸均有较好的抗氧化作用。

氧应激可通过增强炎症、诱导细胞凋亡、打破免疫耐受^[7-8]而在自身免疫性疾病的发病中发挥重要作用。产生的自由基和改变的氧化还原状态可以诱导各种免疫和炎症分子的表达^[9],从而加剧炎症和造成组织损伤^[10]。机体免疫系统功能紊乱,出现大量的自身抗体,以及全身多系统、多脏器损害是系统性红斑狼疮的突出表现。大量研究报道,氧化应激在 SLE 发病中有着举足轻重的地位^[11]。在 SLE 患者的血清、红细胞以及淋巴细胞中的抗氧化酶如 SOD、CAT 和 MDA 的相关研究中发现,超氧化物歧化酶的活性下降导致 O_2^- 堆积过多, O_2^- 不能有效清理,导致不断生

成过氧化氢。同时 O_2^- 可直接灭活多种酶,如 CAT,导致 CAT 减少无法正常清除过氧化氢,从而启发 SLE 患者的脂质过氧化连锁反应^[12-16]。dsDNA 含量作为组织或细胞损伤的严重程度的指标,可反映体内脂质过氧化的强度和速率。本实验以 SOD、CAT、MDA、dsDNA 为切入点来探讨益肾养阴合剂抗氧化应激作用,观察益肾养阴合剂是否通过抗氧化应激减少靶脏器的损伤,从而达到保护作用。结果显示:益肾养阴合剂可有效降低血清 MDA、dsDNA 水平,提高血清 SOD、CAT 活性。减少活性氧对组织的损伤,从而达到保护靶脏器的目的。

参考文献:

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 系统红斑狼疮诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(5): 342-346.
- [2] 胡晓琳. 中药干预对气阴两虚型系统性红斑狼疮 PBMC 凋亡及相关指标的影响 [J]. 新中医, 2015, 47(6): 99-101.
- [3] 吴洋, 陈宇, 张巍琼, 等. 益气养阴合剂治疗气阴两伤型系统性红斑狼疮疗效观察 [J]. 新中医, 2014, 46(1): 51-53.
- [4] 金伟, 方雪辉, 苏虹, 等. 狼疮模型鼠体内氧化/抗氧化指标与抗 dsDNA 抗体水平以及肾脏病变的相关性 [J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(1): 24-28.
- [5] 卢国元, 谢燕, 沈蕾, 等. 狼疮肾炎患者血浆花生四烯酸代谢新指标的变化 [J]. 中华风湿病学杂志, 2004, 8(10): 614-617.
- [6] Blount S, Griffiths H, Emery P, et al. Reactive oxygen species modify human DNA, eliciting a more discriminating antigen for the diagnosis of systemic lupus erythematosus [J]. Clinical & Experimental Immunology, 1990, 81(3): 384-389.
- [7] Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens [J]. Autoimmunity Reviews, 2008, 7(7): 567-573.
- [8] Kumagai S, Jikimoto T, Saegusa J. Pathological roles of oxidative stress in autoimmune diseases [J]. Rinsho Byori the Japanese Journal of Clinical Pathology, 2003, 51(2): 126-132.
- [9] Azfar SF, Islam N. Suppression of mycobacterium tuberculosis induced reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α activity in human monocytes of systemic lupus erythematosus patients by reduced glutathione [J]. Oman Medical Journal, 2012, 27(1): 11-19.
- [10] Tsai KJ, Hung IJ, Chow CK, et al. Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient granulocytes [J]. FEBS Lett, 1998, 436(3): 411-414.
- [11] Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, et al. Synergistic effects of BuChE non-UU phenotype and paraoxonase (PON1)55 M allele on the risk of systemic lupus erythematosus: influence on lipid and lipoprotein metabolism and oxidative stress, preliminary report [J]. Lupus, 2014, 23(3): 263-272.
- [12] Jones DP, Eklow L, Thor H, et al. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2 [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1981, 210(2): 505-516.
- [13] Al-Shobaili HA, Rasheed Z. Immunological studies of oxidized superoxide dismutase in patients with systemic lupus erythematosus, Correlation with disease induction and progression [J]. Saudi Medical Journal, 2012, 33(11): 1177-1184.
- [14] Chou CT. Alternative therapies: what role do they have in the management of lupus [J]. Lupus, 2010, 19(12): 1425-1429.
- [15] Shah D, Kiran R, Wanchu A, et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity [J]. Immunol Letters, 2010, 129(1): 7-12.
- [16] 赵欣欣, 赵丽娟, 王晓非. 系统性红斑狼疮患者血浆脂质过氧化物测定及分析 [J]. 现代康复, 1997, 1(3): 189-190.

(编辑:徐建平)