

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.15.011

白蒺藜皂苷对系统性红斑狼疮模型小鼠免疫功能和肾功能的影响*

王 晶,孟祖东,方 勇,阿彩岭,许 雪[△]

(湖北省十堰市人民医院·湖北医药学院附属人民医院,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨白蒺藜皂苷对系统性红斑狼疮模型小鼠免疫功能与肾功能的改善作用。方法 选取12只C57BL/6小鼠为正常对照组(等量生理盐水),48只MRL/lpr小鼠分为模型对照组(等量生理盐水)、醋酸泼尼松组(45 mg/kg),白蒺藜皂苷低、高剂量组(100,200 mg/kg),灌胃给药,持续8周。测定小鼠抗双链DNA(dsDNA)、抗SM、补体C3、补体C4、24 h尿蛋白、血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)水平;分别采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白质印迹(Western blotting)法测定小鼠肾脏组织匀浆中Janus激酶3(JAK3)、信号转导及转录激活因子5(STAT5)mRNA和蛋白表达水平;用光学显微镜观察肾脏组织苏木精-伊红(HE)染色情况,用荧光显微镜观察肾脏组织荧光染色情况;采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定小鼠血清中炎症因子白细胞介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素4(IL-4)的水平。结果 模型对照组小鼠肾小球体积变大,可见炎症细胞浸润;醋酸泼尼松组,白蒺藜皂苷低、高剂量组小鼠肾小球体积变小,炎症细胞浸润减轻;醋酸泼尼松组,白蒺藜皂苷低、高剂量组小鼠抗dsDNA,抗SM,BUN,SCr,24 h尿蛋白,肾脏组织JAK3、STAT5 mRNA和蛋白水平,炎症因子IL-2,TNF- α ,IL-4水平均显著低于模型对照组,补体C3、补体C4水平均显著高于模型对照组($P < 0.05$)。结论 白蒺藜皂苷能明显下调系统性红斑狼疮小鼠的抗体水平,改善肾功能,其作用机制可能与白蒺藜皂苷抑制JAK3/STAT5通路的激活有关。

关键词:白蒺藜皂苷;系统性红斑狼疮;免疫功能;肾功能;Janus激酶3/信号转导及转录激活因子5通路

中图分类号:R932;R285.5;R275

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)15-0051-06

Effect of Saponins from *Tribulus Terrestris* on Immune Function and Renal Function in Model Mice with Systemic Lupus Erythematosus

WANG Jing, MENG Zudong, FANG Yong, E Cailing, XU Xue

(Shiyan Renmin Hospital · People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the improvement effect of saponins from *Tribulus terrestris* (STT) on the immune function and renal function in the model mice with systemic lupus erythematosus. **Methods** A total of 12 C57BL/6 mice were selected and taken as the normal control group (equal volume of normal saline), and 48 MRL/lpr mice were selected and divided into the

*基金项目:湖北省卫生健康委员会指导性项目[WJ2021F043]。

第一作者:王晶,男,硕士,主治医师,研究方向为自身免疫性皮肤病、结缔组织疾病的诊治,(电子信箱)182192522@qq.com。

[△]通信作者:许雪,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为皮肤病的诊治,(电子信箱)704630584@qq.com。

- [5] 程 延,赵朝伟,李 浩,等.玄黄膏膏对急性软组织损伤大鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 陕西中医,2021,42(3):284-287.
- [6] ALSHBOOL FZ, KARIM ZA, ESPINOSA EVP, et al. Investigation of a Thromboxane A₂ Receptor - Based Vaccine for Managing Thrombogenesis[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(13):e009139.
- [7] KHAN GA, BHAGAT S, ALAM ML. PGE₂ - induced migration of human brain endothelial cell is mediated through protein kinase A in cooperation of EP receptors [J]. J Leukoc Biol, 2019, 105(4):705-717.
- [8] YU MX, MA XQ, SONG X, et al. Validation of the key active ingredients and anti-inflammatory and analgesic effects of Shen-jin Huoxue mixture against osteoarthritis by integrating network pharmacology approach and thin-layer chromatography analysis[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14:1145-1156.
- [9] 王青华,唐映红,朱敏丰,等.基于OPG/RANKL/RANK骨代谢通路探讨伤科黄水对急性软组织损伤模型大鼠的保护机制[J]. 中药材,2020,43(9):2264-2268.
- [10] 谢春莲,郑永周,李碧妍,等.近10年急性软组织损伤实验动物模型建立方法的研究进展[J]. 光明中医,2013, 28(4):854-855.
- [11] 朱力阳,罗 杰,马 建,等.二黄凝胶贴膏对急性软组织损伤大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 四川中医,2019, 37(12):38-41.
- [12] CRISCO JJ, JOKL P, HEINEN GT, et al. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology [J]. Am J Sports Med, 1994, 22(5):702-710.
- [13] JIANG S, CHEN Z, LAI W, et al. Decoction of heat-clearing, detoxifying and blood stasis removing relieves acute soft tissue injury via modulating MiR-26b-5p/COX2 axis to inhibit inflammation[J]. Biosci Rep, 2020, 40(12):1-10.
- [14] ZHOU XH, WANG C, QIU SD, et al. Non-invasive assessment of changes in muscle injury by ultrasound shear wave elastography: an experimental study in contusion model [J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(12):2759-2767.
- [15] SOMMERFELDT M, BOULIANE M, OTTO D, et al. The use of early immobilization in the management of acute soft-tissue injuries of the knee: results of a survey of emergency physicians, sports medicine physicians and orthopedic surgeons [J]. Can J Surg, 2015, 58(1):48-53.

(收稿日期:2021-11-02;修回日期:2022-03-23)

model control group (equal volume of normal saline), the prednisone acetate group (45 mg/kg), STT low- and high-dose groups (100, 200 mg/kg). All mice were given corresponding drugs by gavage for continuous eight weeks. The levels of anti-double stranded DNA (dsDNA), anti-SM, complement component 3 (C3), complement C4, 24 h urinary protein, serum creatinine (SCr) and urea nitrogen (BUN) were measured. The expression levels of Janus kinase 3 (JAK3), signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) mRNA and protein in the kidney homogenate of mice were measured by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the Western blotting, respectively. The hematoxylin-eosin (HE) staining result of kidney tissue was observed by the optical microscope. The fluorescence staining result of kidney tissue was observed by the fluorescence microscope. The levels of inflammatory factors in serum including interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-4 (IL-4) of mice were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The volume of glomerulus became larger, and inflammatory cell infiltration was observed in the model control group. The volume of glomerulus became smaller, and the inflammatory cell infiltration decreased in the prednisone acetate group, STT low- and high-dose groups. Compared with those in the model control group, the levels of anti-dsDNA, anti-SM, BUN, SCr and 24 h urinary protein, the mRNA and protein levels of JAK3 and STAT5 in the renal tissue, the levels of inflammatory factors IL-2, TNF- α and IL-4 in the prednisone acetate group, STT low- and high-dose groups were significantly lower, while the levels of complement C3 and complement C4 in the prednisone acetate group, STT low- and high-dose groups were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** STT can significantly down-regulate the antibody level of mice with systemic lupus erythematosus, and improve the renal function. Its mechanism may be related to its inhibition of JAK3/STAT5 pathway.

Key words: saponins from *Tribulus terrestris*; systemic lupus erythematosus; immune function; renal function; JAK3 / STAT5 pathway

系统性红斑狼疮(SLE)是一种难治性自身免疫性疾病,涉及多个器官和系统,临床表现复杂^[1]。SLE易引起全身或局部组织和器官损伤^[2]。糖皮质激素可有效治疗SLE,但长期使用会引起代谢紊乱、组织愈合延迟等不良反应^[3]。自身免疫系统在SLE的发病机制中非常重要,Janus激酶(JAK)起主导作用,其异常表达或过度激活均可能导致SLE发生^[4]。JAK是参与Toll样受体(TLR)信号传导的重要蛋白激酶,抑制JAK信号通路有利于减少炎症级联反应介导的组织损伤^[5]。信号转导及转录激活因子(STAT)是一种氧化还原敏感的转录因子,可调节免疫反应和炎症反应,STAT的异常表达已在SLE中得到证实^[6]。此外,JAK是STAT通路的关键调节因子,在自身免疫性疾病的发病中起重要作用^[7]。生化实验和临床证据表明,白蒺藜皂苷具有调节免疫、控制炎症、减少西药副作用、降低感染发生率等作用^[8-10]。本研究中探讨了白蒺藜皂苷对SLE模型小鼠免疫功能与肾功能的改善作用,以及对JAK/STAT通路的影响,为其临床治疗提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:AU-480型全自动生化分析仪(贝克曼库尔特生命科学有限公司);Zeiss LSM880型荧光显微镜(德国徕卡有限公司)。

试药:醋酸泼尼松原料药(上海施贵宝制药有限公司,批号为MN-569696.3);抗双链DNA(dsDNA)抗体、抗SM、补体C3、补体C4、24 h尿蛋白定量(24 h pro)、肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)试剂盒(贝克曼库尔特生命科学有限公司,批号分别为SD-48596.6, 41529.5, 52149.3, 48972.7, 89546.6, 23984.3, 51269.5);10%

苏木精染色(北京索拉尔生物科技有限公司,批号为1526963);0.5%曙红染色(北京索拉尔生物科技有限公司,批号为5263963),Tissue-Tek OCT复合物(美国赛默飞世尔有限公司,批号为XD-41589.36);0.3%TritonX-100(美国Sigma生物有限公司,批号为YU-526986.36);异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的山羊抗小鼠IgG(1:1 000,批号为ab23836),兔抗小鼠C3(1:2 000,批号为ab23836),购于英国Abcam生物有限公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,中生北控生物科技股份有限公司,批号425969),Trizol试剂(美国Invitrogen有限公司,批号为CD-599696.65);RevertAidTMM-MuLV逆转录酶(日本Fermentas有限公司,批号为MB-596563.36);蛋白酶抑制剂缓冲液(美国Cell Signaling Technology有限公司,批号为MN-658963.63);硝酸纤维素膜(德国Schleicher&Schuell BioScience Inc有限公司,批号为5896369);JAK3、STAT5、GAPDH一抗(美国SantaCruz有限公司,批号分别为CD-59693.33、XC-74856.69、KI-58741.36);偶联辣根过氧化物酶的二抗(美国Cell Signaling Technology有限公司,批号为56987.69);增强化学发光试剂盒(ECL,美国Cell Signaling Technology有限公司,批号为DC-574896.65);白细胞介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素4(IL-4)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(北京索拉尔生物科技有限公司,批号分别为B2021034、B2021095、B2021018)。

动物:12只C57BL/6小鼠,6~8周龄,雌雄各半,体重(25.2 $\pm$ 2.5)g,实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2018-0035,实验动物许可证号为SYXK(浙)2016-0158,购自西普尔凯实验动物有限公司。饲养于本院

实验中心的屏障环境(室温 20℃,相对湿度 40%~60%,日光 12 h),隔离于全封闭清洁状态,自由饮水进食。48 只 MRL/lpr 狼疮小鼠(MRL/lpr 小鼠第 19 号染色体 Fas^{lps} 突变,可自发产生系统性免疫性自身疾病,淋巴结肿大、T 细胞增生、关节炎和免疫复合物型肾小球肾炎),6~8 周龄,体质量(25.3±2.4)g,实验动物生产许可证号为 SCXK(沪)2017-0005,实验动物许可证号为 SYXK(浙)2019-0012,购自上海 Slac 实验动物有限公司。饲养于浙江中医药大学动物实验中心屏障环境(室温 20℃,相对湿度 40%~60%,日光 12 h),隔离于常闭无特定病原体(SPF)状态,自由饮水和进食。本研究已通过我院动物伦理协会批准。

1.2 方法

给药与分组:醋酸泼尼松组(45 mg/kg),白藜蘆皂苷低、高剂量组(100,200 mg/kg)MRL/lpr 狼疮小鼠给予相应药物灌胃,正常对照组(C57BL/6 小鼠)和模型对照组小鼠灌胃等量生理盐水,各 12 只,均持续 8 周。

抗 dsDNA、抗 SM、补体 C3、补体 C4、24 h 尿蛋白、SCr、BUN 测定:末次治疗后,所有小鼠空腹隔夜取血,静置 30 min,离心(转速为 3 000 r/min)10 min,分离取血清,同时收集小鼠 24 h 尿液;采用贝克曼 AU-480 型全自动生化分析仪测定抗 dsDNA、抗 SM、补体 C3、补体 C4、24 h 尿蛋白、SCr、BUN 水平。

小鼠肾脏病理、荧光切片制作:肾脏在 4% 甲醛中固定 24 h,常规脱钙,脱水,用切片机切成 5 μm 厚的切片。二甲苯 I、二甲苯 II 脱蜡,无水乙醇水化,10% 苏木精染色,盐酸和乙醇分化,用 0.5% 曙红染色 1 min,乙醇、二甲苯脱水。使用 Leica DM4000B 型光学显微镜观察肾脏组织的病理变化。将速冻的肾组织用于 IgG、补体 C3 的免疫荧光检查,将冷冻肾组织包埋在 Tissue-Tek OCT 复合物中,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 0.3% Triton X-100 透化 30 min,用 3% 牛血清白蛋白在室温下封闭 30 min,用 FITC 偶联的山羊抗小鼠 IgG、兔抗小鼠 C3 在 4℃ 下孵育过夜,用 DAPI 染色 5 min,用荧光显微镜观察染色情况。

小鼠肾脏 JAK3 及 STAT5 基因水平检测:Trizol 试剂提取肾脏中的总 RNA,使用 RevertAidTMM-MuLV 逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA,对 JAK3、STAT5、GAPDH 进行反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。95℃ 预变性 30 s 后,将 Rotor-Gene TM6000 PCR 系统的循环程序设置为在 95℃ 下进行 40 次循环 5 s,在 56℃ 下进行 30 s。当最后的循环结束时,将样品在 65℃ 保持 5 s,以进一步延长。序列如下,JAK3,正向 5'-TACGTAGTCGATC-GTAGCTAGCTAGCTAGCTAGTCGATCGATCGATCGCT-

AGT-3',反向 5'-TGTCGTAGCTAGTCGATCGTAGC-TAGCTAGCTAGCTGATCGATCGTAGCTCG-3';STAT5,正向 5'-TGCTAGTCGTAGTCGTAGCTAGTAGTCGTAGT-GTCGATCGTG-3',反向 5'-TGTGATGTAGCTGATC-GATGTCGTAGTAGTGATGTCGTACTG-3';GAPDH,正向 5'-TGTGCTGATGATGCTAGTCGTAGCTAGTCGAT-GCTAGCTGA-3',反向 5'-TGTCGTATCGATCG-TAGCTAGTCGATCGTAGTGAGTGTAGT-3'。每个反应重复 3 次。JAK3 和 STAT5 mRNA 的相对水平分别为 JAK3 和 STAT5 吸光度与 GAPDH 吸光度之比。

小鼠肾脏 JAK3 和 STAT5 蛋白水平检测:采用蛋白质印迹(Western blotting)法测定,肾组织在蛋白酶抑制剂缓冲液中裂解并匀浆,离心(15 000 g)。将提取的蛋白质用 7% 凝胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),并将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(含 0.1% Tween-20 的 TBS, pH 7.4)封闭后,将膜与 JAK3、STAT5、GAPDH 于 4℃ 温度下过夜。洗涤后,印迹与偶联辣根过氧化物酶的二抗一起孵育。膜上的蛋白印迹通过 ECL 试剂盒检测。使用 Quantity One(德国慕尼黑 BioRad 实验室)对测定结果进行定量。

小鼠肾脏组织炎症因子 IL-2、TNF-α、IL-4 水平检测:取细胞培养液 100 μL 于 96 孔板内,覆膜,37℃ 孵育 2 h。弃去孔内液体,每孔加 IL-2、TNF-α、IL-4 生物素抗体工作液 100 μL,覆膜,37℃ 孵育 1 h,弃去孔内液体,每孔加酶结合物工作液 100 μL,37℃ 孵育 1 h。弃去孔内液体,洗板 5 次。每孔用 200 μL 的洗涤液洗涤,浸泡 2 min,弃去酶标板内的液体,在吸水纸上将酶标板拍干。每孔加入 TMB 显色底物溶液 90 μL,37℃ 避光孵育 15~20 min。每孔加入终止液 50 μL,终止反应,立即用酶标仪测量。采用 ELISA 法测定小鼠肾脏组织炎症因子 IL-2、TNF-α、IL-4 的水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗 dsDNA、抗 SM、补体 C3、补体 C4 水平

由表 1 可见,模型对照组小鼠抗 dsDNA、抗 SM 水平均显著高于正常对照组,补体 C3、补体 C4 水平均显著低于正常对照组($P < 0.05$);醋酸泼尼松组,白藜蘆皂苷低、高剂量组小鼠抗 dsDNA、抗 SM 水平均显著低于模型对照组,补体 C3、补体 C4 水平均显著高于模型对照组($P < 0.05$);随着白藜蘆皂苷剂量的增加,白藜蘆皂苷低、高剂量组小鼠抗 dsDNA、抗 SM 水平逐渐降低,

补体 C3、补体 C4 水平逐渐升高($P < 0.05$),且上述指标水平均较醋酸泼尼松组变化显著($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠抗 dsDNA、抗 SM、补体 C3、补体 C4 水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 12$)

Tab. 1 Comparison of anti-dsDNA, anti-SM, complement C3 and complement C4 levels of mice in each group ($\bar{X} \pm s, n = 12$)

组别	抗 dsDNA(IU/mL)	抗 SM(IU/mL)	补体 C3(mmol/L)	补体 C4(mmol/L)
正常对照组	4.04 ± 1.52	2.16 ± 1.25	0.99 ± 0.15	1.34 ± 0.20
模型对照组	16.67 ± 1.35 ^a	12.89 ± 1.52 ^a	0.26 ± 0.11 ^a	0.33 ± 0.21 ^a
醋酸泼尼松组	6.52 ± 1.28 ^{ab}	4.68 ± 1.57 ^{ab}	0.82 ± 0.14 ^{ab}	1.02 ± 0.19 ^{ab}
白蔹藜皂苷低剂量组	13.63 ± 1.57 ^{abc}	10.52 ± 1.57 ^{abc}	0.35 ± 0.17 ^{abc}	0.56 ± 0.12 ^{abc}
白蔹藜皂苷高剂量组	9.56 ± 1.47 ^{abcd}	5.69 ± 1.68 ^{abcd}	0.49 ± 0.17 ^{abcd}	0.86 ± 0.09 ^{abcd}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与醋酸泼尼松组比较,^c $P < 0.05$;与白蔹藜皂苷低剂量组比较,^d $P < 0.05$ 。表 2 至表 4 同。

Note: Compared with those in the normal control group, ^a $P < 0.05$; Compared with those in the model control group, ^b $P < 0.05$; Compared with those in the prednisone acetate group, ^c $P < 0.05$; Compared with those in the STT low-dose group, ^d $P < 0.05$ (for Tab. 1-4).

2.2 BUN, SCr, 24 h 尿蛋白水平

由表 2 可见,模型对照组小鼠 BUN、SCr、24 h 尿蛋白水平均显著高于正常对照组($P < 0.05$);醋酸泼尼松组,白蔹藜皂苷低、高剂量组小鼠上述指标水平均显著低于模型对照组($P < 0.05$);随着白蔹藜皂苷剂量的增加,白蔹藜皂苷低、高剂量组小鼠上述指标水平逐渐降低($P < 0.05$),且显著高于醋酸泼尼松组($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠 BUN、SCr、24 h 尿蛋白水平比较($\bar{X} \pm s, n = 12$)
Tab. 2 Comparison of BUN, SCr and 24 h urinary protein levels of mice in each group ($\bar{X} \pm s, n = 12$)

组别	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)	24 h 尿蛋白(mg/24 h)
正常对照组	98.75 ± 1.24	6.48 ± 1.38	6.48 ± 1.41
模型对照组	27.56 ± 1.31 ^a	27.58 ± 1.39 ^a	96.75 ± 2.36 ^a
醋酸泼尼松组	12.52 ± 1.37 ^{ab}	11.64 ± 1.71 ^{ab}	16.45 ± 3.47 ^{ab}
白蔹藜皂苷低剂量组	23.41 ± 1.35 ^{bc}	20.74 ± 1.74 ^{bc}	56.35 ± 2.63 ^{bc}
白蔹藜皂苷高剂量组	16.45 ± 1.42 ^{abcd}	15.35 ± 1.68 ^{abcd}	28.47 ± 3.58 ^{abcd}

2.3 肾组织苏木精-伊红(HE)染色

由图 1 可见,正常对照组小鼠肾小球结构正常,模型对照组小鼠肾小球体积变大,可见炎性细胞浸润;醋酸泼尼松组,白蔹藜皂苷低、高剂量组小鼠肾小球体积变小,炎性细胞浸润减轻。

2.4 肾组织免疫荧光染色

由图 2 可见,正常对照组小鼠 IgG 和补体 C3 染色为阴性,模型对照组小鼠可见 IgG 沿毛细血管祥呈不连续的颗粒样沉积,荧光强度为 + + + +;醋酸泼尼松组,白蔹藜皂苷低、高剂量组小鼠肾小球 IgG 和补体 C3 沉积情况变弱。

2.5 肾组织 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平

由表 3 可见,模型对照组小鼠 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平均显著高于正常对照组($P < 0.05$);醋酸泼尼松组,白蔹藜皂苷低、高剂量组小鼠 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平均显著低于模型对照组($P < 0.05$);随着白蔹藜皂苷剂量的增加,白蔹藜皂苷低、高剂量组

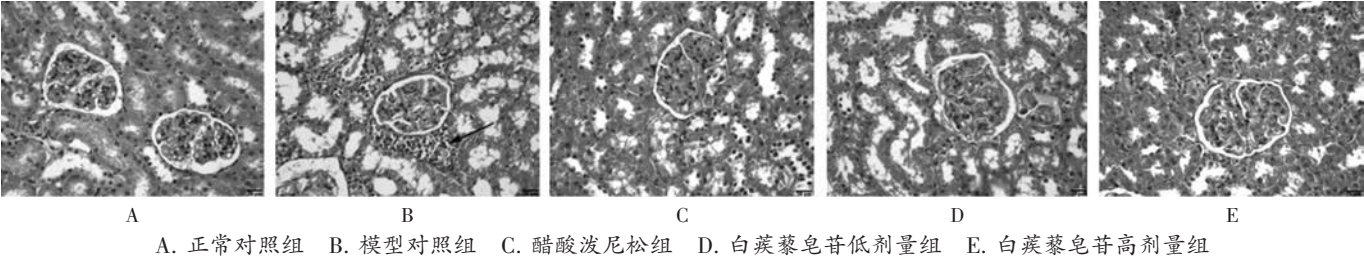


图 1 各组小鼠右侧肾组织 HE 染色比较(×400)

A. Normal control group B. Model control group C. Prednisone acetate group D. STT low-dose group E. STT high-dose group

Fig. 1 Comparison of HE staining results of the right kidney tissue of mice in each group (×400)

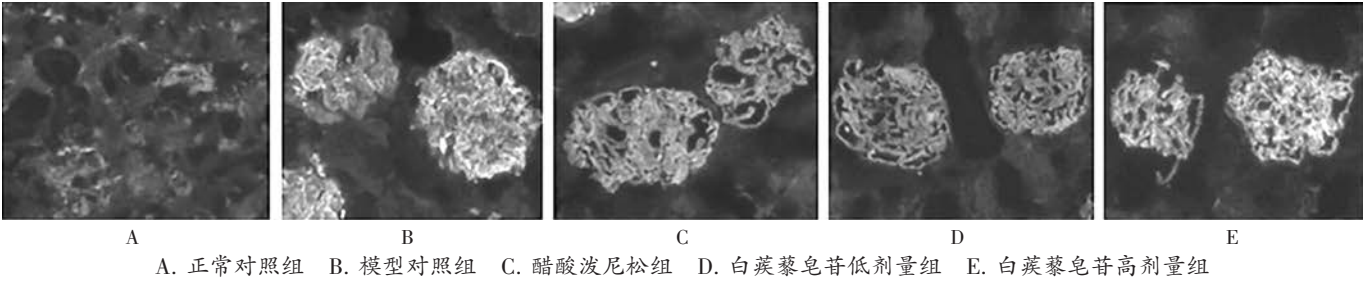


图 2 各组小鼠右侧肾组织免疫荧光染色比较(×400)

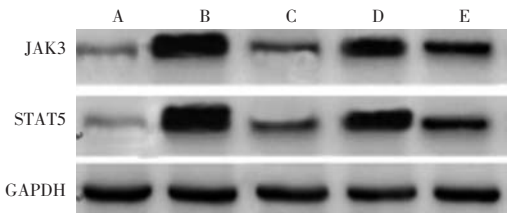
A. Normal control group B. Model control group C. Prednisone acetate group D. STT low-dose group E. STT high-dose group

Fig. 2 Comparison of immunofluorescence staining results of the right kidney tissue of mice in each group (×400)

表3 各组小鼠肾组织 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 12$)

Tab. 3 Comparison of the levels of JAK3, STAT5 mRNA and protein in the kidney tissue of mice in each group ($\bar{X} \pm s, n = 12$)

组别	JAK3 mRNA	STAT5 mRNA	JAK3 蛋白	STAT5 蛋白
正常对照组	0.92 ± 0.21	1.18 ± 0.22	0.32 ± 0.16	0.25 ± 0.10
模型对照组	6.42 ± 0.25 ^a	5.93 ± 0.25 ^a	1.24 ± 0.13 ^a	1.13 ± 0.13 ^a
醋酸泼尼松组	1.48 ± 0.22 ^{ab}	1.82 ± 0.23 ^{ab}	0.45 ± 0.12 ^{ab}	0.45 ± 0.12 ^{ab}
白藜藜皂苷低剂量组	4.64 ± 0.24 ^{abc}	3.81 ± 0.21 ^{abc}	0.65 ± 0.12 ^{abc}	0.69 ± 0.11 ^{abc}
白藜藜皂苷高剂量组	2.29 ± 0.24 ^{abcd}	2.18 ± 0.24 ^{abcd}	0.57 ± 0.13 ^{abcd}	0.52 ± 0.12 ^{abcd}



A. 正常对照组 B. 模型对照组 C. 醋酸泼尼松组 D. 白藜藜皂苷低剂量组 E. 白藜藜皂苷高剂量组

图3 各组小鼠肾组织 JAK3 及 STAT5 蛋白表达水平电泳图

A. Normal control group B. Model control group C. Prednisone acetate group D. STT low-dose group E. STT high-dose group

Fig. 3 Electrophoretograms of the expression levels of JAK3 and STAT5 proteins in the kidney tissue of mice in each group

小鼠 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平均逐渐降低 ($P < 0.05$), 且均显著高于醋酸泼尼松组 ($P < 0.05$)。各组小鼠肾组织 JAK3 及 STAT5 蛋白表达水平电泳图见图3。

2.6 肾组织炎症因子 IL-2, TNF- α , IL-4 水平

由表4可见, 模型对照组小鼠 IL-2, TNF- α , IL-4 水平均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$); 醋酸泼尼松组和白藜藜皂苷低、高剂量组小鼠上述指标水平均显著低于模型对照组 ($P < 0.05$); 随着白藜藜皂苷剂量的增加, 白藜藜皂苷低、高剂量组小鼠上述指标水平均逐渐降低 ($P < 0.05$), 且均显著高于醋酸泼尼松组 ($P < 0.05$)。

表4 各组小鼠肾组织炎症因子 IL-2, TNF- α , IL-4 水平比较
($\bar{X} \pm s, \text{mol} / \text{mL}, n = 12$)

Tab. 4 Comparison of the inflammatory factors IL-2, TNF- α and IL-4 levels in the kidney tissue of mice in each group
($\bar{X} \pm s, \text{mol} / \text{mL}, n = 12$)

组别	IL-2	TNF- α	IL-4
正常对照组	159.89 ± 18.37	146.99 ± 15.27	100.98 ± 10.35
模型对照组	459.35 ± 17.59 ^a	458.67 ± 17.65 ^a	353.47 ± 13.59 ^a
醋酸泼尼松组	184.27 ± 16.67 ^b	239.96 ± 20.45 ^{ab}	175.36 ± 14.97 ^{ab}
白藜藜皂苷低剂量组	329.92 ± 18.30 ^{abc}	318.87 ± 18.53 ^{abc}	208.09 ± 12.29 ^{abc}
白藜藜皂苷高剂量组	239.57 ± 16.70 ^{abcd}	370.30 ± 23.30 ^{abcd}	259.94 ± 11.04 ^{abcd}

3 讨论

随着免疫抑制方案和一般医疗保健措施的改进,

增殖性和膜性狼疮性肾炎长期治疗结果已无差异, 但 SLE 患者肾炎完全缓解率仍低于 12%, 且 40% 的 III ~ V 期狼疮性肾炎患者仍存在一定程度的肾功能损害^[11]。即使在良好的情况下, 免疫抑制剂对 SLE 肾炎的治疗效果仍远不能令人满意。因此, 有必要为 SLE 寻找新的药物靶点。

白藜藜皂苷具有抗氧化、抗炎和镇痛作用, 肝炎、高血压、关节炎、支气管炎、恶性肿瘤等多种疾病具有潜在的治疗作用^[12]。白藜藜皂苷诱导鼠和人 CD₄⁺T 淋巴细胞扩增为 Foxp3⁺ 调节性 T (Treg) 细胞, 可用于缓解急性结肠炎^[13]。白藜藜皂苷还可调节外周单核细胞的活性, 抑制 SLE 相关致病细胞因子的产生, 如 TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6^[14]。近期的研究表明, 白藜藜皂苷能与模式识别受体如 dectin-1 发生潜在相互抑制作用。Dectin-1 是一种 c 型凝集素, 可与 TLR2 协同触发抗原呈递细胞中的先天免疫反应, 诱导促炎作用。此外, TLR2 信号可能具有潜在增强体外和体内 Treg 细胞增殖的作用, 导致 Foxp3 表达的瞬时增加^[15]。本研究结果显示, 模型对照组小鼠抗 dsDNA、抗 SM、BUN、SCr、24 h 尿蛋白水平均显著高于正常对照组, 补体 C3、补体 C4 水平均显著低于正常对照组; 醋酸泼尼松组, 白藜藜皂苷低、高剂量组小鼠抗 dsDNA、抗 SM、BUN、SCr、24 h 尿蛋白水平均显著低于模型对照组, 补体 C3、补体 C4 水平均显著高于模型对照组。结果表明, 白藜藜皂苷能明显抑制 SLE 模型小鼠的免疫功能, 并改善肾功能。由病理、荧光染色结果可知, 经醋酸泼尼松、白藜藜皂苷治疗后, 各组小鼠肾小球减少, 炎性细胞浸润减轻, 肾小球 IgG 和补体 C3 沉积情况变弱。结果表明, 白藜藜皂苷可抑制 SEL 模型小鼠肾脏的炎症反应。

有研究表明, 抑制 JAK3 可改善核因子- κ B 抑制因子 α (IKB α) 磷酸化, 抑制免疫活性细胞中核因子- κ B (NF- κ B) 信号传导和下游促炎细胞因子产生, 减少狼疮相关的肾功能损伤^[16]。STAT5 是一种广泛表达的核转录因子, 在调节各种炎症介质中起重要作用, 通常存在于细胞质中。IKB α 的磷酸化使 STAT5 易位到细胞核, 并诱导转录^[17]。JAK3 是 SLE 发展的危险因素, JAK3 抑制剂可减弱易患狼疮的 MRL/lpr 小鼠和具有外周血单个核细胞 (PBMC) 的 SLE 患者脾单核细胞中的 NF- κ B 信号传导, 同时减少小鼠中促炎细胞因子的产生。因此, 抑制 JAK3 活性可能有助于发现 SLE 和其他炎症疾病的新疗法^[18]。另有研究表明, 脂多糖刺激 MRL/lpr 小鼠腹腔巨噬细胞后, 炎症信号通路 JAK3/STAT5 和炎症因子 TNF- α 及 IL-6 的表达显著增加^[19]。这表明脂多糖与 JAK 受体, 特别是 JAK3 的特异性结合, 异常激活 STAT5 信号通路, 启动免疫相关基因的转录并诱导

各种炎性反应。在细胞试验中, JAK3 通过 shRNA 慢病毒转染过表达, 作用于 MRL / lpr 小鼠腹腔巨噬细胞, JAK3 过表达后 STAT5 表达显著增加, 下游炎性分子的表达增加; 而抑制 JAK3 表达后, JAK3 下游分子中 STAT5、IKB α 、IKB 激酶(IKK)和 NF- κ B 的表达水平降低, 磷酸化水平显著降低^[20]。IL-2, TNF- α , IL-4 是 JAK3 / STAT5 通路的下游因子。本研究结果显示, 模型对照组小鼠 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$); 醋酸泼尼松组, 白藜藜皂苷低、高剂量组小鼠 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平均显著低于模型对照组 ($P < 0.05$), 且随着白藜藜皂苷剂量的增加, 白藜藜皂苷低、高剂量组小鼠的 JAK3 及 STAT5 mRNA 和蛋白水平均显著降低 ($P < 0.05$), 均显著高于醋酸泼尼松组 ($P < 0.05$); 同时, IL-2, TNF- α , IL-4 水平也被抑制。

综上所述, 白藜藜皂苷能明显抑制 SLE 模型小鼠的免疫功能, 改善肾功能, 其作用机制可能与白藜藜皂苷能抑制 JAK3 / STAT5 通路的激活有关。

参考文献

- [1] FANOIRAKIS A, KOSTOPOULOU M, ALUNNO A, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus [J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(6): 736-745.
- [2] MORANDE EF, FURIE R, TANAKA Y, et al. Trial of anifrolumab in active systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med, 2020, 382(3): 211-221.
- [3] DÖRNER T, FURIE R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus [J]. The Lancet, 2019, 393(10188): 2344-2358.
- [4] ALUNNO A, PADJEN I, FANOIRAKIS A, et al. Pathogenic and therapeutic relevance of JAK / STAT signaling in systemic lupus erythematosus: integration of distinct inflammatory pathways and the prospect of their inhibition with an oral agent [J]. Cells, 2019, 8(8): 898.
- [5] LI Y, HIGGS RE, HOFFMAN RW, et al. A Bayesian gene network reveals insight into the JAK-STAT pathway in systemic lupus erythematosus [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0225651.
- [6] MAESHIMA K, SHIBATA H. Efficacy of JAK 1 / 2 inhibition in the treatment of diffuse non-scarring alopecia due to systemic lupus erythematosus [J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(5): 674-675.
- [7] DULAK-LIS M, BUJAK A, GALA K, et al. A novel JAK / ROCK inhibitor, CPL409116, demonstrates potent efficacy in the mouse model of systemic lupus erythematosus [J]. J Pharmacol Sci, 2021, 145(4): 340-348.
- [8] GAUTAM M, RAMANATHAN M. Saponins of *Tribulus terrestris* attenuated neuropathic pain induced with vincristine through central and peripheral mechanism [J]. Inflammopharmacology, 2019, 27(4): 761-772.
- [9] TIAN CL, CHANG Y, WANG RX, et al. Optimization of ultrasound extraction of *Tribulus terrestris* L. leaves saponins and their HPLC-DAD-ESI-MSⁿ profiling, anti-inflammatory activity and mechanism *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114225.
- [10] QI P, ZHENG YY, SHEN Y, et al. Characterization and discrimination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* L. and its three different aerial parts by chemical profiling with chemometrics analysis [J]. J Sep Sci, 2018, 41(22): 4212-4221.
- [11] DURCAN L, O'DWYER T, PETRI M. Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults [J]. Lancet, 2019, 393(10188): 2332-2343.
- [12] WANG Y, GUO WJ, XIE SX, et al. Multi-omics analysis of brain tissue metabolome and proteome reveals the protective effect of gross saponins of *Tribulus terrestris* L. fruit against ischemic stroke in rat [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114280.
- [13] STEFANESCU R, TERO-VESCAN A, NEGROIU A, et al. A Comprehensive Review of the Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Properties of *Tribulus terrestris* L. [J]. Bio-molecules, 2020, 10(5): 752.
- [14] GHANBARI A, AKHSI N, NEDAEI SE, et al. *Tribulus terrestris* and female reproductive system health: A comprehensive review [J]. Phytomedicine, 2021, 84: 153462.
- [15] WANG Y, GUO WJ, LIU Y, et al. Investigating the Protective Effect of Gross Saponins of *Tribulus terrestris* Fruit against Ischemic Stroke in Rat Using Metabolomics and Network Pharmacology [J]. Metabolites, 2019, 9(10): 240.
- [16] CAI Z, ZHANG S, WU P, et al. A novel potential target of IL-35-regulated JAK / STAT signaling pathway in lupus nephritis [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(2): e309.
- [17] CASTEJON ML, SÁNCHEZ-HIDALGO M, APARICIO-SOTO M, et al. Dietary oleuropein and its new acyl-derivate attenuate murine lupus nephritis through HO-1 / Nrf2 activation and suppressing JAK / STAT, NF- κ B, MAPK and NLRP3 inflammasome signaling pathways [J]. J Nutr Biochem, 2019, 74: 108229.
- [18] KUBO S, NAKAYAMADA S, TANAKA Y. Baricitinib for the treatment of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a 2019 update [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2019, 15(7): 693-700.
- [19] ZHOU MJ, GUO CH, LI X, et al. JAK / STAT signaling controls the fate of CD₈⁺ CD₁₀₃⁺ tissue-resident memory T cell in lupus nephritis [J]. J Autoimmun, 2020, 109: 102424.
- [20] FAVOINO E, PRETE M, CATACCHIO G, et al. Working and safety profiles of JAK / STAT signaling inhibitors. Are these small molecules also smart? [J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(3): 102750.

(收稿日期: 2021-09-07; 修回日期: 2022-02-20)