

中图分类号:R932;R285

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2023)04-0051-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.04.011



白芍总苷对系统性红斑狼疮模型大鼠 *Trap1* 基因多态性与维生素 D 代谢的影响*

黄美琼,邢怡喜,梁金,陈维飞,刘赞[△]

(海南医学院第二附属医院风湿科,海南 海口 570311)

摘要:目的 探讨白芍总苷对系统性红斑狼疮(SLE)模型大鼠肿瘤坏死因子受体相关蛋白1(TRAP1)基因多态性与维生素D代谢的影响。方法 选取雄性SD大鼠50只,将其随机分为空白组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)及白芍总苷低、中、高剂量组(0.5,1,5 g/mL),各10只。腹腔注射降植烷,每只0.5 mL,每周1次,连续3周,以复制SLE大鼠模型,建模成功后,各组大鼠分别灌胃给予相应药物及生理盐水。检测大鼠尿蛋白水平;采用苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察大鼠肾脏组织病理形态;电化学发光法检测大鼠血清25(OH)D₃、1,25(OH)₂D₃水平;提取大鼠*Trap1*基因,记录各基因型的分布情况;分别采用反转录聚合酶链式反应法及Western blot法检测大鼠核因子κB(NF-κB)mRNA及其蛋白表达水平。结果 与模型组比较,白芍总苷中、高剂量组大鼠尿蛋白阳性例数较少,且随着剂量的增加而减少($P < 0.05$);白芍总苷各剂量组肾纤维化减轻、炎症减少,25(OH)D₃、1,25(OH)₂D₃水平均明显升高,NF-κB mRNA及其蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$)。结论 白芍总苷可改善SLE模型大鼠维生素D代谢不足,而对*Trap1*基因多态性并无明显影响,其可能通过调控NF-κB信号通路实现。

关键词:白芍总苷;系统性红斑狼疮;大鼠;肿瘤坏死因子受体相关蛋白1;NF-κB信号通路;维生素D

Effect of Total Glucosides of Paeonia on *Trap1* Polymorphism and Vitamin D Metabolism in Model Rats with Systemic Lupus Erythematosus

HUANG Meiqiong, XING Yixi, LIANG Jin, CHEN Weifei, LIU Zan

(Department of Rheumatology, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570311)

Abstract: Objective To investigate the effect of total glucosides of paeonia (TGP) on tumor necrosis factor receptor-associated protein-1 (TRAP1) gene polymorphism and vitamin D metabolism in model rats with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** A total of 50 male SD rats were selected and randomly divided into the blank group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline) and TGP low-, medium- and high-dose groups (0.5, 1, 5 g/mL), with 10 rats in each group. The rats were intraperitoneally injected with decalin to establish SLE rat model, 0.5 mL each for each rat, once a week for three consecutive weeks. After successful modeling, the rats in each group were given intragastric administration of corresponding drugs or normal saline. The level of urinary protein was detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological morphology of the kidney under the microscope. The levels of serum 25 (OH)D and 1,25 (OH)₂D₃ were measured by the electrochemiluminescence method. The *Trap1* gene of rats was extracted and the distribution of each genotype was recorded. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were used to detect the expression levels of nuclear factor-κB (NF-κB) mRNA and protein. **Results** Compared with those in the model group, the number of positive cases of urine protein in the TGP medium- and high-dose groups with different doses were fewer, which decreased with the increase of dose ($P < 0.05$), the renal fibrosis and inflammation in the TGP low-, medium- and high-dose group were alleviated. Compared with those in the model group, the levels of serum 25 (OH)D and 1,25 (OH)₂D₃ in the TGP low-, medium- and high-dose group were significantly higher ($P < 0.05$), the expression levels of NF-κB mRNA and protein in the TGP low-, medium- and high-dose groups were significantly lower ($P < 0.05$). The distribution of different genotypes (AA, AB, BB) types in each group was similar. **Conclusion** TGP can improve vitamin D metabolism in SLE model rats by regulating NF-κB signaling pathway, but has no significant effect on *Trap1* gene polymorphism.

Key words: total glucosides of paeonia; systemic lupus erythematosus; rats; tumor necrosis factor receptor-associated protein 1; NF-κB signaling pathway; vitamin D

系统性红斑狼疮(SLE)为多发于女性的免疫功能异常性疾病,其发病机制尚未明晰^[1]。目前临床多采用

糖皮质激素+免疫抑制剂治疗,但长期使用会导致免疫力低下、向心性肥胖,甚至精神异常^[2]。白芍总苷对自

*基金项目:海南省重点研发计划项目[ZDYF2019166]。

第一作者:黄美琼,女,大学本科,主治医师,研究方向为风湿病,(电子信箱)yimei499663920@163.com。

[△]通信作者:刘赞,女,大学本科,教授,研究方向为风湿病,(电子信箱)13036087586@163.com。

身免疫缺陷疾病有一定防治作用,其具有抑制活性氧自由基形成及清除多余自由基的作用,可通过发挥抗凋亡、抗氧化及抗炎等作用保护机体器官^[3]。近年来研究发现,从中药白芍根部提取的白芍总苷,具有调节机体神经及免疫的作用^[4],SLE患者使用后预后较好^[5]。肿瘤坏死因子受体相关蛋白1(TRAP1)为线粒体伴侣蛋白,其基因位于16号染色体(16p13.3区域),是热休克蛋白90(HSP90)家族的新成员。TRAP1可通过折叠、重折叠受损蛋白等机制保护细胞免受氧化应激等损伤,被认为是细胞氧化应激系统的关键成分。染色体16p13区域内存在和自身免疫性疾病发病有关的基因,如KIAA0350和MEFV基因^[6]。TRAP1基因的过表达也被认为与多药耐药性有关^[7]。研究表明,TRAP1在乳腺癌、结直肠癌等肿瘤中表达上调,但对其在免疫性疾病中的作用并无报道^[8]。维生素D缺乏被认为是SLE的病因^[9],但尚无白芍总苷与其相关性的报道。本研究旨在探讨白芍总苷可否通过调控核因子 κ B(NF- κ B)信号通路对SLE大鼠Trap1基因多态性与维生素D代谢产生影响,进而研究其对SLE的疗效。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:Thermo Histocentre3型全自动组织包埋机(美国Thermo公司);HH34000000全波长酶标仪(上海玮驰仪器有限公司);Leica-RM2135型高级组织切片机(德国Leica公司);ABI7500定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司);Cabas E601型全自动电化学发光免疫分析仪(德国Roche公司)。

试剂:白芍药材(亳州市沪谯药业有限公司,批号17052594);25(OH)D₃、1,25(OH)₂D₃试剂盒(深圳海思安生物技术有限公司,批号分别为20210196,20211021);兔抗大鼠一抗NF- κ B及辣根过氧化物酶标记(HRP)的山羊抗兔二抗(英国Abcam公司,批号分别为20210289,20211062);mRNA反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒(宝生物工程有限公司,批号分别为20210345,20210632);RIPA裂解液(北京索莱宝生物技术公司,批号为SL059234)。

动物:SD大鼠50只,健康,雄性,体质量180~200 g,6~8周龄。由安徽医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(皖)2017-001,该实验经我院动物实验医学伦理委员会批准(批准号202005010)。所有大鼠均置温度21~23℃、相对湿度40%~70%的实验条件下适应性喂养1周。

1.2 方法

1.2.1 白芍总苷制备

将白芍药材与亲水性溶液搅拌,50~90℃提取3次,

合并滤液、滤过,将其通过减压回收制成干燥的粗提取物;采用亲水性溶液溶解,过滤成水溶液;采用大孔吸附树脂进行吸附、纯化;再次洗脱减压,制成白芍总苷提取物。

1.2.2 建模与分组

将50只SD大鼠随机分为空白组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水)及白芍总苷低、中、高剂量组(0.5,1,5 g/mL),各10只。空白组大鼠单次腹腔注射生理盐水每10 g体质量0.2 mL,其余各组大鼠均注射降植烷,每只0.5 mL,每周1次,连续3周。以大鼠尿蛋白质量浓度介于0.1~1.0 g/L为模型复制成功。建模成功后,白芍总苷各剂量组分别灌胃给予相应剂量白芍总苷,每日1次,连续28周。

1.2.3 检测指标

尿蛋白水平:初始给药后每月1次提尾刺激大鼠排尿,收集尿液,浸湿Albustix检测试纸反应区,观察试纸颜色与色板比较,根据显色度分为-,+,++,++++。

肾脏组织病理形态:给药结束后,颈椎脱臼处死大鼠,解剖观察肾脏有无肉眼可见病变,病变组织制成石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察组织病变。

血清学指标及蛋白表达水平:大鼠麻醉后从眼底静脉丛取血,肝素抗凝,3 000 r/min离心10 min,分离得血清,采用电化学发光免疫法测定25(OH)D及1,25(OH)₂D₃水平,严格按试剂盒说明书要求操作;提取血清总RNA,按反转录试剂盒说明书要求,将总RNA反转录成cDNA,然后以GAPDH为内参进行扩增,检测NF- κ B的mRNA相对表达量: $\Delta C_t = \text{目的基因 } C_t - \text{内参基因 } C_t$,引物序列见表1;采用Western blot法检测大鼠NF- κ B蛋白表达水平。提取血清总蛋白,测定浓度,然后上样、电泳、转膜后,以牛血清白蛋白(BSA)封闭2 h,洗膜,孵育过夜,再加入一抗、二抗孵育,再次洗膜,显色,5 min后凝胶成像,采集图片。

1.2.4 Trap1 基因型检测

引物序列见表1,PCR反应总体积25 μ L,反应程序为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,60℃或62℃退火

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

基因		序列
Trap1	F	5'-CAGGGTTCCTCCAAACA-3'
	R	5'-TGGAGATCAGCTCCCGTATAA-3'
NF- κ B	F	5'-TGA GTCCCGCCCTTCTAAA-3'
	R	5'-CCTGGATCACTTCAATGGCCT-3'
GAPDH	F	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'
	R	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

30 s, 72 ℃延伸30 s, 35个循环; 72 ℃延伸10 min, 4 ℃保存。将PCR产物进行电泳, 进行单链构象多态性(SSCP)分析, 取PCR产物与Loading buffer混匀, 变性后再次电泳、显色。根据NCBI网站已知的大鼠单核苷酸多态性(SNP)基因库可确定突变位点, 此处将G/G定义为AA基因型, G/A定义为AB基因型, A/A定位为BB基因型。

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, 多组间比较行方差分析; 计数资料以率(%)表示, 行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

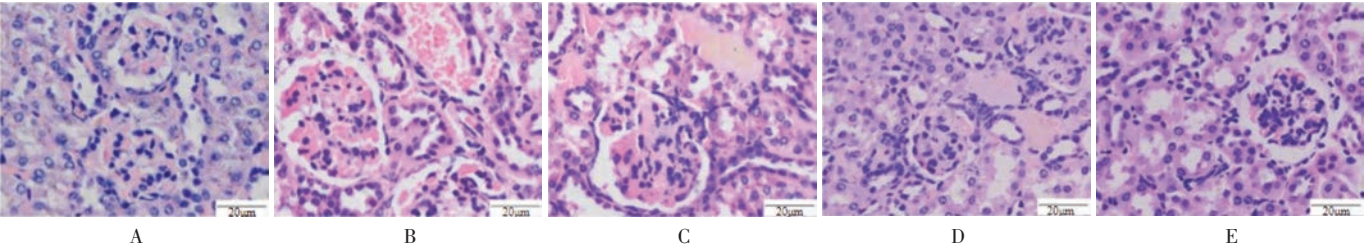
2.1 尿蛋白水平

与模型组比较, 白芍总苷中、高剂量组大鼠尿蛋白

阳性例数较少, 且随着剂量的增加而减少($P < 0.05$), 见表2。

表2 各组大鼠尿蛋白水平比较(例, $n = 10$)

Tab. 2 Comparison of urinary protein levels of rats in each group (case, $n = 10$)						
组别	-	±	+	++	+++	++++
空白组	6	3	1	0	0	0
模型组	1	2	2	2	2	1
白芍总苷低剂量组	1	2	2	3	2	0
白芍总苷中剂量组	3	3	2	2	0	0
白芍总苷高剂量组	4	3	3	0	0	0
χ^2 值	17.20					
P 值	0.004					



A. 空白组 B. 模型组 C. 白芍总苷低剂量组 D. 白芍总苷中剂量组 E. 白芍总苷高剂量组

图1 大鼠肾脏组织病理形态(HE, ×40)

A. Blank group B. Model group C. TGP low-dose group D. TGP medium-dose group E. TGP high-dose group

Fig. 1 Histopathological morphology of rats' kidney (HE, ×40)

表3 各组大鼠血清学指标比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Comparison of serological indexes of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	25(OH)D(ng/mL)	1,25(OH) ₂ D ₃ (pmol/L)	NF- κ B	NF- κ B mRNA
空白组	40.23 ± 8.24	92.18 ± 11.39	0.78 ± 0.08	0.81 ± 0.05
模型组	13.08 ± 5.69*	42.36 ± 8.74*	1.79 ± 0.09*	1.82 ± 0.04*
白芍总苷低剂量组	19.36 ± 2.28 [#]	55.29 ± 6.14 [#]	1.61 ± 0.05 [#]	1.64 ± 0.09 [#]
白芍总苷中剂量组	27.37 ± 2.41 [#]	61.47 ± 5.08 [#]	1.42 ± 0.06 [#]	1.45 ± 0.07 [#]
白芍总苷高剂量组	35.18 ± 2.17 [#]	79.24 ± 4.36 [#]	1.25 ± 0.04 [#]	1.26 ± 0.03 [#]
F 值	53.252	67.313	346.203	427.591
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in the blank group, * $P < 0.05$; Compared with those in the model group, [#] $P < 0.05$.

2.2 肾脏组织病理形态

与空白组比较, 模型组大鼠肾脏出现毛细血管增生, 肾小球肿大, 血管周围有炎性细胞浸润; 与模型组比较, 白芍总苷低、中、高剂量组肾纤维化与炎症程度减少, 且中、高剂量组改善更明显, 详见图1。

2.3 血清学指标

与模型组比较, 白芍总苷低、中、高剂量组25(OH)D、1,25(OH)₂D₃水平均明显升高, NF- κ B mRNA及其蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$)。详见表3及图2。

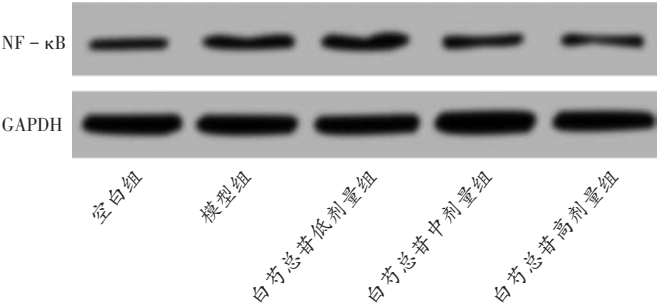


图2 大鼠NF- κ B蛋白表达

Fig. 2 Expression levels of NF- κ B protein in rats

2.4 *Trap1* 基因型分布

各组大鼠中 AA, AB, BB 基因型分布情况基本一致,且 AB, BB 型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 4。

表 4 各组大鼠基因型分布情况[例(%), $n = 10$]

Tab. 4 Distribution of rats' genotypes in each group [case (%), $n = 10$]

组别	AA 型	AB 型	BB 型
空白组	2(20.00)	5(50.00)	3(30.00)
模型组	1(10.00)	5(50.00)	4(40.00)
白芍总苷低剂量组	1(10.00)	4(40.00)	5(50.00)
白芍总苷中剂量组	1(10.00)	5(50.00)	4(40.00)
白芍总苷高剂量组	2(20.00)	5(50.00)	3(30.00)
χ^2 值	25.92	0.80	2.88
P 值	< 0.001	0.777	0.90

3 讨论

SLE 属自身免疫性疾病,突出表现为皮肤黏膜、骨骼肌肉、肾及中枢神经系统等多个器官和系统出现免疫性炎症^[6]。有关该病的发病机制与治疗方法是目前的研究热点,糖皮质激素和免疫抑制剂长期或大量使用,易引发或加重感染及溃疡性疾病,并增加高血压、动脉硬化等并发症的发生风险^[9-10]。作为潜在的环境因素,机体的维生素 D 水平对机体免疫力影响极大。而维生素 D 在 SLE 患者体内的作用机制可能是由可旁分泌的树突状细胞产生了 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$,进而影响血清中的细胞因子聚集来减少 SLE 患者的免疫^[11-12]。TRAP1 是参与癌细胞中能量代谢调节的分子伴侣,可调节癌细胞代谢,对癌基因和肿瘤抑制因子具有双重作用^[13]。还有研究指出, NF- κ B 通路在免疫物质发生特异性免疫效应过程中起重要作用,同样也参与调节特异性抗原产生特异性的细胞免疫或体液免疫过程,指出 NF- κ B 与炎症免疫反应有关^[14]。并且白芍总苷可调控 NF- κ B 信号通路,对炎症疾病具有一定的治疗作用。但其机制还不够明确,且对于 SLE 的疗效也无具体研究验证。

本研究结果显示,白芍总苷灌胃后,尿蛋白呈阳性的大鼠例数减少,这说明,其对 SLE 大鼠有一定的疗效。肾脏组织病理结果进一步明确,白芍总苷对 SLE 有较好的疗效,有利于改善器官病变。活性维生素 D 能抑制淋巴细胞的异常增殖活动,影响淋巴细胞的分化程度,从而影响机体的免疫调节^[15]。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可通过抑制机体内白细胞介素的产生和炎性细胞的活性来有效阻止机体树突状细胞的分化,如分泌不足就会导致血清维生素 D 代谢不足,与 SLE 发生发展有密不可分的关系^[16]。本研究结果显示,白芍总苷各剂量组 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平较模型组升高,说明其能影响维生素 D 的代谢,可提升维生素 D 水平,从而缓解病情。王医林

等^[17]发现,SLE 患者外周血中 $25(\text{OH})\text{D}$ 水平与免疫系统内功能最重要的细胞群相关,其可能是通过调节这一细胞群来治疗 SLE,这与本研究结果有一定的相通之处。

检测不同组大鼠中 *Trap1* 基因型的分布情况发现,其整体分布并无波动,因此认为,白芍总苷对大鼠模型的 *Trap1* 基因多态性影响不明显。NF- κ B 在大量研究中被证实与 SLE 的发生相关。本研究结果显示,与模型组比较,白芍总苷各剂量组 NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达水平较低,提示其可调控 NF- κ B 信号通路。潘冠和等^[18]研究发现,NF- κ B 功能异常可显著影响 SLE 的发生,还指出,其活化异常可能与皮损、狼疮肾炎有关,并提及 NF- κ B 参与调节辅助性 T 细胞 17(Th17)的分化,而 Th17 细胞在 SLE 疾病的发生发展中也发挥着一定作用,进一步佐证了本研究结果。

综上所述,白芍总苷对模型大鼠 SLE 有一定疗效,机制可能为通过抑制 NF- κ B 通路的活化改善大鼠体内维生素 D 代谢不足,这对 SLE 的临床治疗有一定的参考价值。

参考文献

[1] CHEN SF, WANG FM, LI ZY, et al. Erratum to: plasma complement factor H is associated with disease activity of patients with ANCA-associated vasculitis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1):82.

[2] KANG EJ, MOON SJ, MOON KH, et al. Endogenous cushing's syndrome in a patient with systemic lupus erythematosus [J]. Korean J Obesity, 2016, 25(3): 150.

[3] ZHU FY, XU S, ZHANG YS, et al. Total Glucosides of Paeony Promote Intestinal Motility in Slow Transit Constipation Rats through Amelioration of Interstitial Cells of Cajal [J]. PLoS One, 2016, 11(8):398-402.

[4] 高 晓. 白芍总苷胶囊联合羟氯喹治疗干燥综合征患者的疗效评价[J]. 黑龙江医药科学, 2021, 44(1): 164-165.

[5] 李雪琴, 郑宇蓝. 环磷酰胺结合白芍总苷治疗系统性红斑狼疮的临床疗效[J]. 实用中西医结合临床, 2020, 20(15): 123-124.

[6] ETEM EO, KOCA SS, EROL D, et al. Decreased MEFV gene expression in rheumatoid arthritis patients [J]. Genet Mol Res, 2015, 14: 1000-1007.

[7] LANDRISCINA M, AMOROSO MR, PISCAZZI A, et al. Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy [J]. Gynecol Oncol, 2010, 117: 177-182.

[8] ZHANG B, WANG J, HUANG Z, et al. Aberrantly upregulated TRAP1 is required for tumorigenesis of breast cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(42): 44495-44508.

[9] CHIU MC, BRO ET, YIN HL, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D₃ levels and flares of systemic lupus erythematosus: A longitudinal cohort analysis [J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(10): 2685-2692.