

[文章编号] 1000-1182(2011)02-0187-04

# 中药白芍总苷预防非肥胖型糖尿病小鼠 自发性涎腺炎的研究

李春蕾<sup>1</sup> 何菁<sup>2</sup> 华红<sup>1</sup>

(1.北京大学口腔医院 中医黏膜科, 北京 100081; 2.北京大学人民医院 风湿免疫科, 北京 100044)

**[摘要]** 目的 探讨中药白芍总苷对非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠自发性涎腺炎的预防作用及机制。方法 4周龄雌性NOD小鼠27只, 随机分成3组: 生理盐水组、羟氯喹组及白芍总苷组。自5周龄开始, 将等效剂量药物溶于0.4 mL生理盐水中每天灌胃给药, 直到20周龄处死。10、15及20周龄时收集每组小鼠的唾液流量以及血清、颌下腺组织。采用苏木精-伊红染色观察颌下腺组织病理学改变; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清自身抗体(SSA、SSB及 $\alpha$ -fodrin)及相关细胞因子水平。结果 与生理盐水组相比, 白芍总苷组及羟氯喹组小鼠治疗后唾液流量明显增加, 颌下腺炎性浸润减轻, 血清自身抗体水平明显下降, Th1/Th2型细胞因子表达失调有所改善。白芍总苷组和羟氯喹组间差异无显著性( $P>0.05$ )。结论 白芍总苷对NOD小鼠自发性涎腺炎有一定预防作用, 其作用机制可能与药物减轻颌下腺淋巴细胞灶性浸润程度及改善Th1/Th2型细胞因子表达失调等有一定关系。

**[关键词]** 干燥综合征; 自发性涎腺炎; 白芍总苷

**[中图分类号]** R 781.7 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.02.022

**Study on total glucosides of peony preventing non-obese diabetic mice from sialoadenitis** LI Chun-lei<sup>1</sup>, HE Jing<sup>2</sup>, HUA Hong<sup>1</sup>. (1. Dept. of Traditional Chinese Medicine and Oral Medicine, Hospital of Stomatology, Peking University, Beijing 100081, China; 2. Dept. of Rheumatology and Immunology, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the immunosuppressive effect of total glucosides of peony(TGP) on sialoadenitis in non-obese diabetic mice(NOD mice) and explore its possible mechanism. **Methods** 27 female five-week-old NOD mice were randomly divided into three groups: TGP, hydroxychloroquine(HCQ) and normal saline(NS) group. One week later, they were administered intragastrically in TGP, HCQ and NS respectively. Three mice from each group were sacrificed at the age of 10, 15 and 20 weeks. The saliva flow, serum and submandibular glands were collected at these time points. Histological changes of submandibular glands were examined by HE staining. The expression of autoantibodies(SSA, SSB and anti- $\alpha$ -fodrin) and associated cytokines in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with the NS group, salivary flow was significantly increased, the extent of the histological changes were ameliorated, the autoantibodies in serum were significantly decreased and the imbalance of Th1/Th2 cytokines was remedied in the mice treated with TGP and HCQ. There were no significant differences between the two groups treated with TGP and HCQ( $P>0.05$ ). **Conclusion** TGP can effectively ameliorate sialoadenitis on NOD mice. The mechanism was thought to be associated with the protection of submandibular gland from intense inflammation and the correction of Th1/Th2 cytokines imbalance.

**[Key words]** Sjögren's syndrome; sialoadenitis; total glucosides of peony

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种慢性系统性自身免疫性疾病, 以侵犯泪腺、唾液腺等外分泌腺为主要特征。临床表现为口干、眼干、猖獗龋、腮腺肿大等。SS分为原发性和继发性2种类型。

本病单独发生时, 称为原发性干燥综合征; 合并其他疾病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮时为继发性干燥综合征<sup>[1]</sup>。干燥综合征的病因和发病机制尚不清楚, 治疗上缺乏有效安全的手段, 是公认的难治性疾病, 目前治疗主要以局部替代治疗及系统性免疫治疗为主, 前者包括对干燥症状的治疗, 可以减轻患者眼干、口干, 如人工泪液、唾液等; 后者包括免疫抑制剂和激素等, 此类药物在治疗疾病的

[收稿日期] 2010-06-29; [修回日期] 2010-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672320)

[作者简介] 李春蕾(1984—), 女, 山东人, 硕士

[通讯作者] 华红, Tel: 010-62179977

同时,也给患者带来严重的不良反应。理想的治疗手段是在不破坏正常的免疫防御的前提下能够中止自身免疫反应的破坏作用。近年来研究已经证明了天然药物或有效成分在免疫调节、抗炎、抗菌、镇痛等方面均有良好作用,同时也具有安全、不良反应小等特点,与传统免疫抑制药物相比较,天然药物能够将异常的免疫功能调节到正常水平,同时不会降低正常有益的抗体抵抗力,对正常的机体细胞无影响<sup>[1-2]</sup>。干燥综合征在自身免疫性风湿性疾病中发生较多,在不破坏正常的免疫防御的前提下,阻断或终止自身免疫反应的破坏作用无疑是理想手段。中医治疗干燥综合征越来越受到国内外学者的重视,本实验旨在通过观察白芍总苷预防治疗非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠自发性涎腺炎的疗效,并初步探讨药物作用的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

NOD小鼠,雌性,4周龄,体重(16.49±1.43) g,购自上海斯莱克实验动物中心,无特殊病原菌环境常规饲养于北京大学医学部实验动物中心。

1.2 主要药物和试剂

羟氯喹(商品名纷乐,上海中西制药有限公司, H19990263),白芍总苷(商品名帕夫林,宁波立华制药有限公司, H20055058),SSA和SSB酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自欧蒙试剂公司,小鼠α-fodrin-G试剂盒(Aeskulisa公司,德国);小鼠白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)ELISA检测试剂盒(Rapidbio公司,美国)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术公司。硝酸毛果芸香碱(Sigma-aldrich公司,美国)。

1.3 实验动物分组及给药

小鼠随机分成3组,每组9只,自第5周开始,每天分别给予生理盐水、羟氯喹(5 mg·mL<sup>-1</sup>)、白芍总苷(10 mg·mL<sup>-1</sup>)0.4 mL灌胃给药(所有药物均溶于生理盐水中)。给药剂量按照动物与人等效剂量换算表计算。

1.4 刺激性唾液流量测定

小鼠10、15、20周龄时,每组随机选取3只,腹腔内注射10%水合氯醛0.1 mL麻醉,5 min后腹腔内注射0.05 mg每克体重硝酸毛果芸香碱注射液,收集刺激条件下唾液分泌量。注射后倒立固定小鼠,5 min后用毛细管收集全唾液20 min,称量毛细管收集前后重量,即可计算出小鼠唾液流量。

1.5 颌下腺组织学检测

小鼠10、15、20周龄时,每组处死3只,取颌下腺,置于10%中性甲醛室温固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,5 μm切片常规苏木精-伊红染色,观察组织病理学改变。淋巴细胞浸润采用Chisholm-Mason组织学评分标准分级。0级:无淋巴细胞浸润;1级:轻度淋巴细胞浸润;2级:中度浸润,每4 mm<sup>2</sup>小于1个浸润灶,每个浸润灶有至少50个以上淋巴细胞浸润;3级:每4 mm<sup>2</sup>有1个浸润灶;4级:每4 mm<sup>2</sup>内超过1个浸润灶。

1.6 自身抗体检测

处死小鼠同前,心脏取血,室温放置半小时以上,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,收集血清,冻存于-80 ℃。ELISA方法检测血清中自身抗SSA、SSB及抗α-fodrin等自身抗体,按照试剂盒说明书操作,绘制标准曲线,读取待测样本含量。

1.7 细胞因子测定

收集血清方法同前,以ELISA方法检测Th1型细胞因子IFN-γ及Th2型细胞因子IL-10,按照试剂盒说明书操作,绘制标准曲线,读取待测样本含量。

1.8 统计学分析

数据以均值±标准差表示,应用SPSS 11.5统计软件对相关数据进行分析, P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 刺激性唾液流量改变

各组小鼠唾液流量随着年龄增长总体呈下降趋势。自10周开始,到20周龄时,给药组小鼠唾液流量均显著高于生理盐水组(P<0.05)。同一周龄的白芍总苷组和羟氯喹组小鼠唾液流量无显著差异(P>0.05,表1)。

表1 各组NOD小鼠唾液流量变化的比较  
Tab 1 Different stimulate total saliva flow rate of mice in each group

组别	10周龄	15周龄	20周龄
生理盐水	6.53±4.17	6.19±3.37	5.45±3.45
羟氯喹	15.49±3.28*	13.93±4.37*	13.71±1.66*
白芍总苷	12.75±5.07*	16.82±8.74*	15.51±4.58*

注: \*代表同一周龄小鼠与生理盐水组比较, P<0.05。

2.2 颌下腺组织病理学改变

自10周龄开始,各组小鼠颌下腺均表现出不同程度的淋巴细胞浸润,浸润细胞多分布在血管及导管周围。随着年龄增长,浸润程度逐渐严重,主要表现为淋巴细胞浸润灶的增加及浸润灶面积的增大。在同一周龄,给药组小鼠较生理盐水组小鼠颌

下腺淋巴细胞浸润情况轻,即浸润灶较少或浸润面积较小(图1),而白芍总苷组和羟氯喹组没有明显差

异(表2、3)。

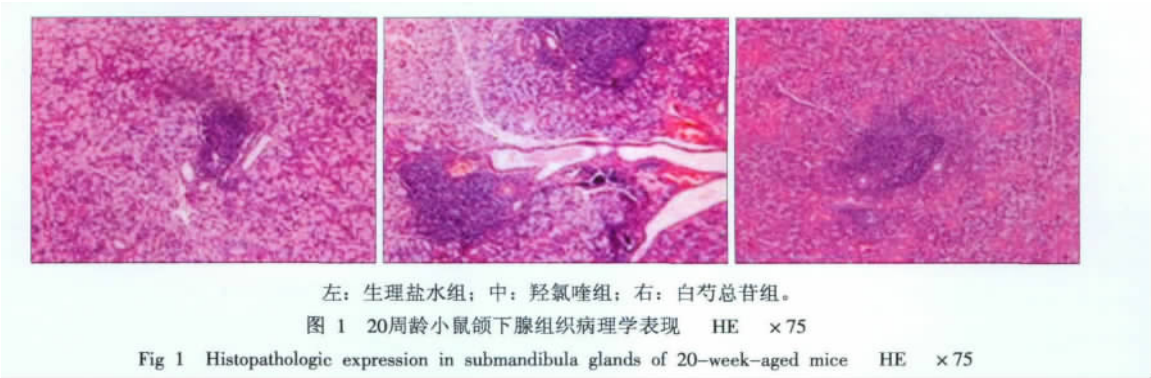


表 2 各组小鼠不同周龄颌下腺淋巴细胞浸润分级  
Tab 2 Different Chisholm-Mason grades in sub-mandibular glands of mice in each group

组别	10周龄		15周龄		20周龄	
	3级	4级	3级	4级	3级	4级
生理盐水	1/3	0	2/3	0	1/3	2/3
羟氯喹	0	0	1/3	0	1/3	0
白芍总苷	0	0	0	0	1/3	0

表 3 各组小鼠不同周龄颌下腺淋巴细胞浸润灶数的比较  
Tab 3 Number of lymphocytic foci of mice in each group

组别	10周龄		15周龄		20周龄	
	3级	4级	3级	4级	3级	4级
生理盐水	4.01±1.01	5.67±0.58	8.33±1.53			
羟氯喹	2.67±2.31	5.01±1.01	5.33±0.58*			
白芍总苷	1.67±1.53	4.33±0.58	4.01±1.01*			

注: \*同一周龄小鼠与生理盐水组比较,  $P<0.05$ 。

2.3 血清自身抗体的表达

各组小鼠SSA、SSB及抗 $\alpha$ -fodrin自身抗体的质量浓度随着年龄增长有不同程度的增高; 20周龄时给药组小鼠各个自身抗体质量浓度明显低于生理盐水组( $P<0.05$ ), 白芍总苷组与羟氯喹组没有显著差异( $P>0.05$ , 图2)。

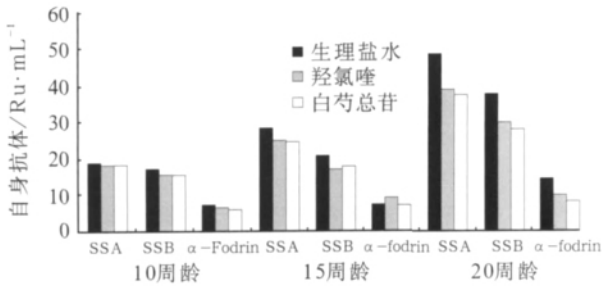


图 2 各组小鼠不同周龄血清自身抗体表达水平  
Fig 2 Different serum autoantibodies level of mice in each group

2.4 血清细胞因子的改变

随着年龄增长, 各组小鼠血清IFN- $\gamma$ 质量浓度均呈增高趋势, 20周龄时, 给药组小鼠血清含量显著低于生理盐水组( $P<0.05$ ); IL-10一直处于较低的水平, 在各组小鼠间没有显著差异( $P>0.05$ ), 同一年龄段, 仍可看出给药组高于生理盐水组的趋势(图3)。

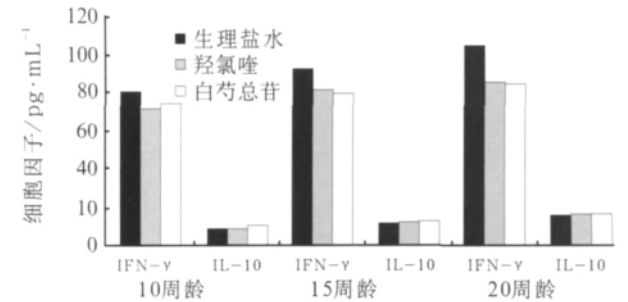


图 3 各组小鼠不同周龄血清细胞因子表达水平  
Fig 3 Different serum cytokines level of mice in each group

2.5 不良反应

羟氯喹组小鼠在15周龄时表现出类似于人类药物性皮炎的症状, 主要表现为头颈部脱毛, 发红等。而生理盐水组及白芍总苷组小鼠均无此表现。

3 讨论

干燥综合征主要以外分泌腺为靶器官, 破坏腺体结构和功能。之前研究发现: 患者腺体内以CD4<sup>+</sup>T细胞浸润为主, 除此还有CD8<sup>+</sup>T细胞、B细胞、巨噬细胞以及促炎症反应性细胞因子表达, 导致腺体炎性浸润灶形成, 腺泡萎缩和破坏。而疾病的发生发展可能经历以下几个阶段: 在免疫攻击出现之前, 与唾液腺发生相关的遗传学、生理学等活动紊乱; 外分泌腺淋巴细胞浸润; 自身抗体攻击, 唾液腺及泪腺等外分泌腺分泌功能障碍<sup>[3-4]</sup>。

NOD小鼠是自发性干燥综合征小鼠模型, 表现出与SS患者相似的症状, 如早期出现颌下腺及泪腺淋巴细胞灶性浸润、血清免疫学特征及唾液流量减少等症状, 因此, NOD小鼠是目前研究SS的最好动



物模型。

本研究观察中药白芍总苷对NOD小鼠自发性涎腺炎发病的抑制作用。白芍总苷具有较强的免疫抑制和免疫调节作用,在我国作为重要免疫抑制剂广泛应用于临床多种自身免疫性疾病的治疗,以往研究表明白芍总苷对风湿性自身免疫疾病有较好的治疗作用<sup>[3]</sup>。本实验通过与阴性对照生理盐水及阳性对照羟氯喹比较,结果显示白芍总苷能够较好地抑制干燥综合症发展。实验结果表明:随着年龄增长,生理盐水组NOD小鼠唾液流量进行性下降,颌下腺病理学改变逐渐加重,这与以往实验结果相符<sup>[5]</sup>,而经过白芍总苷和羟氯喹治疗后的小鼠各方面均显著改善。推测药物可能通过改善第一阶段中颌下腺生理病理活动改变,保留大部分正常的腺体组织,颌下腺淋巴细胞浸润情况明显减轻,腺体萎缩及破坏现象较轻,使腺体保存相对良好的分泌功能,减轻临床口干症状。

在SS发展过程中,自身抗体SSA和SSB的表达是SS患者具有显著意义的表现。有学者<sup>[6]</sup>认为:与SSA相比,SSB的特异性更有意义。抗 $\alpha$ -fodrin抗体最早从SS动物模型NFS/sld小鼠腺体中分离出来,其与SS发病密切相关。国内外学者在患者血清学中研究<sup>[7-8]</sup>发现:抗 $\alpha$ -fodrin抗体表现了较好的且差别不大的特异性及敏感性。本研究发现:各组小鼠血清中这些自身抗体浓度逐渐升高,类似于患者情况。随着周龄增加,白芍总苷及羟氯喹处理的小鼠SSA、SSB及抗 $\alpha$ -fodrin抗体均显著低于生理盐水组。提示药物能够调节NOD小鼠体内异常免疫系统,减少特异性自身抗体的表达。

目前多数学者<sup>[9-10]</sup>认为:Th1/Th2型细胞因子表达失衡是自身免疫疾病发生的重要原因,SS也不例外。本研究结果显示:随着周龄的增加,小鼠血清中Th1型细胞因子IFN- $\gamma$ 及Th2型细胞因子IL-10均增高,其中IFN- $\gamma$ 增加具有显著性,而IL-10则一直处于较低水平。同一年龄段,治疗组小鼠血清IFN- $\gamma$ 质量浓度较生理盐水组明显降低,20周龄时两者差异具有显著性。IL-10在小鼠血清中一直处于较低的水平,且3组之间没有显著差异。认为白芍总苷和羟氯喹可能是通过改善Th1/Th2型细胞因子表达失调而达到改善疾病情况作用的。

综上,白芍总苷在NOD小鼠早期就能积极改善其颌下腺病理生理学特点,显著改善腺体破坏及萎缩,保存腺体正常的分泌功能,缓解临床口干症状;调节机体免疫系统,减轻自身免疫攻击的程度,自身抗体的表达也显著减少<sup>[11-12]</sup>;改善Th1/Th2

型细胞因子表达失衡,增加炎症防御性细胞因子对机体的保护作用,从而改善整体情况;同时在研究过程中也发现:个别羟氯喹组小鼠在15~20周龄时有类似患者药物性皮疹的表现,而白芍总苷组无类似情况,说明药物对正常细胞、组织无害。

## [参考文献]

- [1] Fox RI. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Sjögren's syndrome[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 1996, 8(5): 438-445.
- [2] 赵岩. 关注干燥综合症的临床研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2009, 13(2): 73-75.  
ZHAO Yan. Follow the clinic study of Sjögren's syndrome[J]. *Chin J Rheumatol*, 2009, 13(2): 73-75.
- [3] Cha S, Peck AB, Humphreys-Beher MG. Progress in understanding autoimmune exocrinopathy using the non-obese diabetic mouse: An update[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13(1): 5-16.
- [4] Chiorini JA, Cihakova D, Ouellette CE, et al. Sjögren syndrome: Advances in the pathogenesis from animal models[J]. *J Autoimmun*, 2009, 33(3/4): 190-196.
- [5] 戚戈, 高岩, 华红, 等. 非肥胖型糖尿病小鼠自发性涎腺炎的发生与发展[J]. *现代口腔医学杂志*, 2007, 21(3): 245-248.  
QI Ge, GAO Yan, HUA Hong, et al. Development of sialoadenitis in non-obese diabetic mice[J]. *J Modern Stomatol*, 2007, 21(3): 245-248.
- [6] Nakamura H, Kawakami A, Eguchi K. Mechanisms of autoantibody production and the relationship between autoantibodies and the clinical manifestations in Sjögren's syndrome[J]. *Transl Res*, 2006, 148(6): 281-288.
- [7] Haneji N, Nakamura T, Takio K, et al. Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome[J]. *Science*, 1997, 276(5312): 604-607.
- [8] Kuwana M, Okano T, Ogawa Y, et al. Autoantibodies to the amino-terminal fragment of beta-fodrin expressed in glandular epithelial cells in patients with Sjögren's syndrome[J]. *J Immunol*, 2001, 167(9): 5449-5456.
- [9] Törnwall J, Lane TE, Fox RI, et al. T cell attractant chemokine expression initiates lacrimal gland destruction in nonobese diabetic mice[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(12): 1719-1726.
- [10] Brayer JB, Cha S, Nagashima H, et al. IL-4-dependent effector phase in autoimmune exocrinopathy as defined by the NOD. IL-4-gene knockout mouse model of Sjögren's syndrome[J]. *Scand J Immunol*, 2001, 54(1/2): 133-140.
- [11] Dawson LJ, Caulfield VL, Stanbury JB, et al. Hydroxychloroquine therapy in patients with primary Sjögren's syndrome may improve salivary gland hypofunction by inhibition of glandular cholinesterase[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2005, 44(4): 449-455.
- [12] 周强, 栗占国. 白芍总苷的药理作用及其在自身免疫性疾病中的应用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2003, 22(11): 687-691.  
ZHOU Qiang, LI Zhan-guo. Pharmaceutical effects of total glucosides of peony and its application in autoimmune diseases[J]. *Clin J New Drugs Clin Rem*, 2003, 22(11): 687-691.

(本文编辑 汤亚玲)