短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0856-03

# 青藤碱对狼疮鼠外周血 IL-10、TNF-α、抗 dsDNA 抗体表达的影响

刘剑平[1],卢来春[2],张国元[1],刘增荣[1],杨 婧[1] (637000 四川 南充,川北医学院附属医院风湿免疫研究所[1];400038 重庆,第三军医大学新桥医院药剂科[2])

**[摘要]** **目的** 观察青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α、抗 dsDNA 抗体表达的影响。**方法** 32 只 NZB/W F1 代狼疮鼠分为 4 组:对照组、青藤碱 40、120、360 mg/(kg·d)剂量组。分别采用 ELISA 法和 Real-Time RT-PCR 法检测 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α、抗 dsDNA 抗体蛋白含量和 IL-10、TNF-α mRNA 表达。**结果** 3 种剂量青藤碱干预 3 周后, NZB/W F1 代狼疮鼠外周血血清中 IL-10、TNF-α、抗 dsDNA 抗体蛋白含量和 IL-10、TNF-α mRNA 表达均较对照组明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 青藤碱在一定程度上能减轻 NZB/W F1 代狼疮鼠的免疫学异常及炎症反应。

**[关键词]** 青藤碱;白细胞介素-10;肿瘤坏死因子-α;dsDNA

**[中图法分类号]** R282.71;R593.24;R392.11 **[文献标志码]** A

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种自身免疫性结缔组织疾病,表现为多克隆 B 淋巴细胞高度活化,产生大量自身抗体,同时,诸多炎症因子高表达,造成全身多系统、多脏器的损害,在这些炎症因子和自身抗体中,尤以 IL-10、TNF-α、抗 dsDNA 抗体等引人关注[1]。New Zealand 小鼠包括 NZB(New Zealand Black)和 NZW (New Zealand White)两个品系。NZB 和 NZW 的杂交一代(NZB/NZW F1)能发生严重的自身免疫病,研究发现该疾病与人类 SLE 的发病相似,该小鼠已被当作研究人类 SLE 的一个经典小鼠模型[2]。青藤碱(sinomenine, SIN)商品名正清风痛宁,是从中药防己科植物青风藤根茎中分离提取的一种单体生物碱,是治疗风湿性疾病的有效药物。近来有学者将其用于治疗 SLE 并取得一定疗效[3],但其作用机制尚不清楚。本研究选取 NZB/W F1 代狼疮鼠为研究对象,观察青藤碱对其外周血中白介素-10(interleukin 10, IL-10)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、抗 dsDNA 抗体表达的影响,对其作用机制进行探讨,进而为临床应用青藤碱提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雌性新西兰黑/白 (NZB/W) F1 代狼疮鼠 32 只,8 周龄,购于南京大学模式动物研究所。喂饲至 5 月龄时开始实验。

### 1.2 实验试剂与仪器

青藤碱片,白云山正清制药股份有限公司,批号 020118。TNF-α、抗 dsDNA 抗体、IL-10 ELISA 试剂盒(美国 Santa Cruz 公司),550 型酶标仪(Bio-Rad 公司),低温离心机(Sigma 公司),LightCycler Ⅱ型实时荧光定量基因扩增系统(德国 Roche 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 分组 将实验动物分为 4 组($n=8$)。常规饲养,对照组和青藤碱低、中、高剂量组分别腹腔注射给予灭菌水 3 ml/(kg·d),青藤碱 40、120、360 ml/(kg·d)(剂量参照文献[4]稍加调整),3 周后取血、处死。

1.3.2 ELISA 法检测血清中 IL-10、TNF-α、抗 dsDNA 抗体表达 所有动物于实验第 1 天和处死时眼眶取血 0.8 ml,4 ℃静置 4 h,1 500 r/min 离心 20 min,吸取上层血清。血细胞用于抽提总 RNA。血清按照试剂盒说明书操作,使用标准抗原作为对照,做标准曲线,检测血清中各因子的水平。

1.3.3 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 $10^5$ ~ $10^6$ 血细胞加入 1 ml Trizol,用加样枪吹打混匀,室温静置5 min,加入 0.2 ml 氯仿,摇匀,室温下静置 15 min,4 ℃ 10 000 × $g$ 离心 15 min,将上层水相转移至新的离心管中,加入等体积的异丙醇,摇匀,室温下静置 10 min 后,4 ℃ 10 000 × $g$ 离心 10 min,弃上清,75% 乙醇清洗 2 次,将 RNA 沉淀晾干,用 20 μl RNase free 去离子水溶解,-70 ℃保存待用。逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书:1 μl cDNA 样本作为 PCR 扩增模板,阴性对照扩增模板为去离子水;扩增条件为 94 ℃预变性 3 min;随后 94 ℃30 s,退火温度30 s,72 ℃ 20 s,共 40 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),引物由上海博尚公司合成。IL-10、TNF-α mRNA 表达量以 GAPDH 为参照。

**表 1 引物序列**

| 基因 | 引物(5′→3′) | 长度(bp) | 退火温度(℃) |
|---|---|---|---|
| IL-10 | 上游 CAACATACTGCTAACCGACTCCT | 293 | 59.0 |
| | 下游 TTCATTCATGGCCTTGTAGACAC | | |
| TNF-α | 上游 GAGTCCGGGCAGGTCTACTTT | 233 | 60.0 |
| | 下游 GGTCACTGTCCCAGCATCTTGT | | |
| GAPDH | 上游 CAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG | 176 | 61.0 |
| | 下游 CTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT | | |

**[通信作者]** 卢来春,E-mail:lulaicq@163.com

### 1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α mRNA 表达的影响

青藤碱干预前（第1天）外周血中 IL-10、TNF-α mRNA 表达均无统计学差异（$P>0.05$）。干预3周后，血清中 IL-10、TNF-α mRNA 表达显著下降，青藤碱低、中、高剂量组分别下降了25.0%、24.44%（$P<0.05$）；44.08%、46.67%（$P<0.01$）；49.38%、55.56%（$P<0.01$）。见表2。

**表2 青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α mRNA 表达的影响**（$n=8$，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | IL-10/GAPDH | | TNF-α/GAPDH | |
|---|---|---|---|---|
| | 干预前 | 干预3周后 | 干预前 | 干预3周后 |
| 对照组 | 0.071±0.012 | 0.160±0.027 | 0.096±0.014 | 0.453±0.067 |
| 青藤碱低剂量组 | 0.065±0.011 | 0.122±0.021[a] | 0.099±0.015 | 0.342±0.043[a] |
| 青藤碱中剂量组 | 0.065±0.011 | 0.089±0.018[b] | 0.094±0.012 | 0.243±0.034[b] |
| 青藤碱高剂量组 | 0.065±0.011 | 0.081±0.014[b] | 0.091±0.013 | 0.194±0.025[b] |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

### 2.2 青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α 蛋白表达的影响

青藤碱干预前（第1天）外周血中 IL-10、TNF-α 蛋白含量均无统计学差异（$P>0.05$）。干预3周后，血清中 IL-10、TNF-α 蛋白含量显著下降，青藤碱低、中、高剂量组分别下降了26.09%、22.61%（$P<0.05$）；36.24%、38.76%（$P<0.01$）；38.64%、41.09%（$P<0.01$）。见表3。

**表3 青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α 蛋白表达的影响**（pg/ml，$n=8$，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | IL-10 | | TNF-α | |
|---|---|---|---|---|
| | 干预前 | 干预3周后 | 干预前 | 干预3周后 |
| 对照组 | 71.38±11.24 | 129.18±18.25 | 48.25±7.16 | 110.08±18.84 |
| 青藤碱低剂量组 | 75.21±13.85 | 95.48±14.28[a] | 47.52±6.97 | 85.17±14.42[a] |
| 青藤碱中剂量组 | 73.69±12.74 | 82.37±11.96[b] | 50.81±8.70 | 67.41±11.28[b] |
| 青藤碱高剂量组 | 68.26±10.23 | 79.26±10.72[b] | 49.37±6.94 | 64.85±10.17[b] |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

### 2.3 青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中抗 dsDNA 抗体表达的影响

青藤碱干预前（第1天）外周血中抗 dsDNA 抗体含量均无统计学差异（$P>0.05$），干预3周后，血清中抗 dsDNA 抗体含量显著下降，青藤碱低、中、高剂量组分别下降了20.6%（$P<0.05$），34.57%（$P<0.01$），38.08%（$P<0.01$）。见表4。

**表4 青藤碱对 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中抗 dsDNA 抗体表达的影响**（$n=8$，pmol/L，$\bar{x} \pm s$）

| 组别 | 干预前 | 干预3周后 |
|---|---|---|
| 对照组 | 34.29±5.25 | 62.92±7.28 |
| 青藤碱低剂量组 | 35.04±6.01 | 49.96±7.01[a] |
| 青藤碱中剂量组 | 33.19±5.04 | 41.17±6.18[b] |
| 青藤碱高剂量组 | 34.08±4.86 | 38.96±5.62[b] |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

## 3 讨论

青藤碱能明显降低小鼠胸腺和脾脏的质量，对小鼠淋巴细胞转化率、IL-2、迟发型超敏反应、巨噬细胞的吞噬功能及抗体溶血素的形成均呈抑制作用，提示青藤碱对非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫均有抑制作用[5,6]。研究显示，青藤碱对人体免疫系统中不同的细胞亚群，比如树突状细胞、NK 细胞等有着不同程度的影响，进而证实青藤碱具有抗炎、免疫抑制、镇痛等药理作用，现已广泛应用于治疗类风湿关节炎。有学者将其用于 SLE 的治疗且疗效较明显[3]，但对其作用机制的研究鲜有报道。本研究结果显示，每天给予青藤碱 120 mg/kg，3 周后能显著下调 NZB/W F1 代狼疮鼠外周血中 IL-10、TNF-α mRNA 和相应蛋白的表达，且外周血中抗 dsDNA 抗体表达亦明显下降。

IL-10 主要由 Th2 细胞产生，是一种重要的 B 细胞刺激因子，其能够抑制巨噬细胞激活及其抗原呈递功能，从而直接或间接抑制 T 淋巴细胞功能及诱导 T 细胞的无反应性，从而减弱其对 B 淋巴细胞的调理作用，刺激 SLE 患者外周血 B 细胞产生抗 DNA 自身抗体[7,8]。1996 年 Hagiwara 等[9]报道 IL-10 可通过促进 Fas/FasL 表达影响 T 细胞的凋亡，使之发生活化诱导的细胞死亡。TNF-α 主要由单核巨噬细胞合成和分泌，并通过与其相应受体结合，参与自身免疫的炎症过程，是介导自身免疫反应的重要效应因子之一[10]，TNF-α 有助于自身细胞表面主要组织相容性复合体（MHC）抗原表达使自身细胞与激活 T 淋巴细胞相互反应，这为 SLE 疾病发生创造了先决条件[11]。抗 dsDNA 抗体与 SLE 有直接的联系，且对 SLE 有较高的特异性，70% ~ 90% 的活动期 SLE 患者该抗体阳性[12,13]；另一方面抗 DNA 抗体又能刺激单个核细胞分泌 IL-10 增加，如此恶性循环导致 SLE 病情进展。本实验选取这几种在 SLE 发病中有重要地位和作用的细胞因子和自身抗体为切入点，对青藤碱治疗 SLE 的可能机制进行探讨。本研究提示青藤碱治疗 SLE 可能是通过下调 IL-10 表达，抑制 B 细胞的活化，从而减少自身抗体的产生，同时又通过降低 TNF-α 的表达，减轻自身免疫的炎症反应，进而达到抑制 SLE 疾病进展的目的。

青藤碱对 SLE 患者的作用可能是整体性和多方面的，除了上述作用机制外，还可能存在其他作用机制，我们将深入探讨。

## 参考文献：

[1] Munoz L E, Gaipl U S, Herrmann M. Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay[J]. Autoimmun Rev, 2008, 7

(8): 594 - 597.
[2] 李英妮, 郭长占. 系统性红斑狼疮小鼠模型的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(7): 434 - 437.
[3] 刘强, 周莉玲, 李锐. 青藤碱的研究概况[J]. 中草药, 1997, 28(4): 247 - 249.
[4] 林峰, 慕宁, 王海梁, 等. 青藤碱对大鼠原位肝移植缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(12): 1433 - 1437.
[5] 周广宇, 毕黎琦. T细胞在系统性红斑狼疮中作用的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(4): 318 - 320.
[6] 王勇, 钟兵, 方勇飞, 等. 青藤碱对类风湿关节炎患者炎性细胞因子及抗环瓜氨酸肽抗体的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, (15): 1573 - 1575.
[7] Lopez P, Gomez J, Prado C, *et al*. Influence of functional interleukin 10/tumor necrosis factor-alpha polymorphisms on interferon-alpha, IL-10, and regulatory T cell population in patients with systemic lupus erythematosus receiving antimalarial treatment[J]. J Rheumatol, 2008, 35(8): 1559 - 1566.
[8] Chun H Y, Chung J W, Kim H A, *et al*. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus[J]. J Clin Immunol, 2007, 27(5): 461 - 466.
[9] Hagiwara E, Gourley M F, Lee S, *et al*. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10: interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood[J]. Arthritis Rheum, 1996, 39(3): 379 - 385.
[10] Aringer M, Smolen J S. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(1): 202.
[11] Mozes E, Lovchik J, Zinger H, *et al*. MHC class I expression regulates susceptibility to spontaneous autoimmune disease in (NZBxNZW)F1 mice[J]. Lupus, 2005, 14(4): 308 - 314.
[12] Sarmiento L F, Munoz L E, Chirinos P, *et al*. Opsonization by anti-dsDNA antibodies of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus[J]. Autoimmunity, 2007, 40(4): 337 - 339.
[13] Wilbe M, Jokinen P, Hermanrud C, *et al*. MHC class Ⅱ polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex[J]. Immunogenetics, 2009, 61(8): 557 - 564.

(收稿:2009-09-28;修回:2009-12-31)
(编辑 汪勤俭)

# 短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0858-03

# 重庆市2005 - 2008年出生窒息死亡新生儿的流行病学调查

罗 茜,周晓军,林晓宁 (400013 重庆,重庆市妇幼保健院保健部)

**[摘要]** **目的** 了解重庆市出生窒息死亡新生儿的流行病学特征及城乡差异,提出降低出生窒息病死率的干预措施。**方法** 根据《重庆市5岁以下儿童死亡监测方案》,采用城乡分层整群抽样的方法,对全市2005 - 2008年5岁以下儿童死亡监测中的326例出生窒息死亡案例进行统计分析。**结果** 重庆市新生儿出生窒息死因别病死率为151.11/10万,乡村户籍新生儿出生窒息死因别病死率显著高于城镇($\chi^2 = 18.79$, $P < 0.01$),死亡时间早于城镇:24 h内死亡的乡村新生儿比例显著高于城镇(79.55% *vs* 65.33%, $\chi^2 = 8.30$, $P < 0.01$);1 ~ 7 d内死亡的城镇新生儿比例(31.33%)与乡村(19.32%)比较有统计学差异($\chi^2 = 6.26$, $P < 0.01$);乡村新生儿死前未治疗比例为30.86%,是城镇(9.93%)的3.1倍,死前住院治疗比例(46.29%)显著低于城镇(78.81%, $P < 0.05$),死前诊断级别主要在乡镇医院(30.68%)及村诊所(26.14%)。**结论** 新生儿窒息是我市新生儿死亡首位原因,近年来呈逐渐下降趋势,但存在乡村新生儿病死率较高和死前医疗保健不足等问题。加强基层产儿科基础建设,提高高危妊娠的识别、产程处理及复苏技巧能力,推广新法窒息复苏技术培训,对不具备条件的地方开展胎儿腹中转运等是降低新生儿出生窒息病死率的有效措施。

**[关键词]** 窒息,新生儿;死亡;流行病学;重庆
**[中图法分类号]** R722.12;R195.4 **[文献标志码]** A

全球每年有1亿新生儿诞生,约有100万窒息死亡[1],我国占1/6 ~ 1/5,按年分娩数2 000万推算,我国新生儿窒息病死率为8‰ ~ 10‰。新生儿窒息是导致我国婴儿及新生儿死亡的第2位死因,仅次于早产低出生体质量儿[2]。据重庆市妇幼卫生监测办调查,新生儿窒息多年来一直是造成我市新生儿死亡的首要原因。本研究就我市2005 - 2008年5岁以下儿童死亡监测中326例出生窒息死亡新生儿的流行病学特征进行回顾性分析,并就如何降低新生儿窒息病死率提出建议。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

资料来源于重庆市妇幼卫生监测办2005 - 2008年5岁以下儿童死亡监测中的326例出生窒息死亡新生儿。筛选条件为监测地区所有妊娠满28周,娩出后有心跳、呼吸、随意肌收

[通信作者] 罗 茜,电话:(023)63703384,E-mail: luoqian@foxmail.com