

# 基于 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨白芍总苷抑制干燥综合征模型小鼠炎症的作用机制

梅寒颖, 刘炬, 汤曾耀[南昌大学附属九江医院(九江市第一人民医院)风湿免疫科, 江西 九江 332000]

**摘要:** **目的** 研究白芍总苷(TGP)对干燥综合征 NOD 小鼠的抗炎效果, 并基于 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨其可能的作用机制。**方法** 将 40 只 NOD 小鼠随机分为模型组、羟氯喹(HCQ)组及白芍总苷低、中、高剂量组, 另取 8 只同期 BALB/c 小鼠作为正常对照组; 干预组分别给予相应药物治疗, 模型组和正常对照组给予等量生理盐水。观察小鼠的平均摄水量、唾液流量及颌下腺组织学改变; ELISA 法检测小鼠血清中白细胞介素(IL)-17、转化生长因子(IFN)- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量; 分别采用 RT-PCR 和 Western Blot 法检测小鼠颌下腺组织中 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白的表达。**结果** 与模型组小鼠比, 经白芍总苷和羟氯喹干预后小鼠平均摄水量减少, 唾液流量增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 颌下腺病理损害减轻。模型组小鼠血清 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ ), 白芍总苷低、中、高剂量和羟氯喹均可明显降低 NOD 小鼠血清 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。RT-PCR 和 Western Blot 法检测结果显示, 模型组小鼠颌下腺 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白的表达较正常对照组明显升高( $P < 0.01$ ), 白芍总苷低、中、高剂量和羟氯喹均可明显降低 NOD 小鼠 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 及蛋白的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 白芍总苷可明显减轻干燥综合征小鼠的炎症反应, 其可能通过调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路活性, 从而减少炎症因子分泌, 最终发挥抗炎作用。

**关键词:** 白芍总苷; 干燥综合征; 炎症; TLR4; MyD88; NF- $\kappa$ B; 小鼠

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1293-07

**doi:** 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.09.009

## Mechanism of Total Glucosides of Paeony Inhibiting Inflammation in Sjogren's Syndrome Model Mice Based on TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

MEI Hanying, LIU Ju, TANG Zengyao (Department of Rheumatology and Immunology, Jiujiang First People's Hospital of Nanchang University, Jiujiang 332000 Jiangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To study the anti-inflammatory effect of total glucosides of paeony (TGP) on sjogren's syndrome model mice (NOD mice) and explore its possible mechanism based on TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Methods** 40 NOD mice were randomly divided into model group, TGP low-dose group, TGP medium-dose group, TGP high-dose group and hydroxychloroquine (HCQ) group. 8 BALB/c mice in the same period were selected as normal control group. The intervention groups were given TGP and HCQ treatment respectively. The model group and the normal control group were given the same amount of normal saline. The average daily water consumption, salivary flow and histological changes of submandibular gland were observed. The serum levels of IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were determined by ELISA method. The mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B in mice submandibular gland were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** The average daily water consumption decreased and the saliva flow increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), as well as the pathological damage of submandibular gland decreased in NOD mice after the intervention of TGP and HCQ.

收稿日期: 2021-01-26

作者简介: 梅寒颖, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 风湿免疫科结缔组织病。Email: meihanying123@163.com。通信作者: 刘炬, 男, 主任医师, 本科, 研究方向: 风湿免疫科结缔组织病。Email: 358042815@qq.com。

基金课题: 江西省中医药科技计划项目(2020A0019)。

The serum levels of IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the model group were significantly higher than those in the normal control group ( $P < 0.01$ ). The contents of IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  significantly decreased in all dosage level of TGP groups and positive control group of HCQ ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). RT-PCR and Western blot showed that the mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B in the model group were significantly higher than those in the normal control group ( $P < 0.01$ ). The mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B significantly decreased in all dosage level of TGP groups and positive control group of HCQ ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** TGP can significantly inhibit the inflammatory response in sjogren's syndrome mice, and its anti-inflammatory effect may be achieved by regulating the activity of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway, thus reducing the secretion of inflammatory factors.

**Keywords:** Total glucosides of paeonys; sjogren's syndrome; inflammation; TLR4; MyD88; NF- $\kappa$ B; mice

干燥综合征(Sjogren's syndrome, SS)是一种典型的自身免疫性疾病,在组织病理学上以外分泌腺中的淋巴细胞浸润为特征,临床表现为口眼干燥,未给予有效的治疗则可从黏膜干燥发展成为全身性不适<sup>[1]</sup>。尽管现在有多种治疗方案可选择,但是干燥综合征仍无法治愈,且长期药物治疗增加了不良反应的发生概率,患者的生活质量并没有得到实质性的改善,因此找到安全系数高和抗炎效果更好的药物用于治疗干燥综合征仍然是一项重要任务。

白芍总苷(TGP)是存在于中药白芍中的多组分活性物质,同时也是拥有抗氧化、抗凋亡和抗炎等多种药理活性的新型双向免疫调节剂,有望成为干燥综合征抗炎和免疫治疗的候选药物<sup>[2-5]</sup>。

Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)/髓系分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路涉及胆固醇代谢、细胞凋亡、炎症和免疫反应以及血管重构等多种病理过程,是调节免疫和炎症机制的关键途径,可控制炎性疾病的发展<sup>[6-7]</sup>。

目前已发现白芍总苷的作用与抑制不同的信号通路激活有关<sup>[8-10]</sup>,但白芍总苷是否通过TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路在干燥综合征中发挥抗炎和免疫调节作用尚不清楚。故本研究以干燥综合征小鼠(NOD/ShiLj小鼠)为研究对象,基于TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路研究白芍总苷的抗炎活性,探讨白芍总苷治疗干燥综合征的相关抗炎机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级NOD/ShiLj小鼠40只及BALB/c小鼠8只,雌性、8周龄、体质量(150±20)g,河南省实验动物中心提供,动物生产许可证号:

SCXK2019-0001、SCXK2019-0002,动物质量合格证号:DW2019120005、HG5300176。所有小鼠均被安置在室温(25±5)℃、相对湿度40%~70%的饲养环境中,提供标准啮齿动物饲料,允许自由饮水。实验经南昌大学附属九江医院动物实验伦理委员会批准,批准号:IACUC20190704-01。

**1.2 药品及试剂** 白芍总苷,宁波立华制药有限公司,批号:181029;硫酸羟氯喹片(HCQ),法国Sanofi-Synthelabo公司,批号:6R069;注射用生理盐水,四川科伦药业股份有限公司,批号:L219012211;白细胞介素(IL)-17、转化生长因子(IFN)- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 试剂盒,欣博盛生物科技有限公司,批号:DG20148D-48T、XY-E82476R、WSJH30135A;抗TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B抗体,美国Abcam公司,批号分别为:D220102-0025、D121009-0025、33198-2;BCA蛋白浓度测定试剂盒,碧云天生物技术研究,批号:P0012。

**1.3 仪器** 0105192001离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;BIOBASE-EL10C酶标仪,济南鑫贝西生物技术有限公司;E3296恒温箱,北京天威泰达科技有限公司;DYY-8C电泳仪,北京六一仪器厂;H2050R低温高速离心机,湖南湘仪公司;702超低温冰箱,美国FORMA公司。

**1.4 动物分组及给药方法** 所有小鼠在适应性喂养7d后进行分组。40只NOD/ShiLj小鼠被随机分为模型组、羟氯喹组和白芍总苷低、中、高剂量组,每组8只,另选8只同期BALB/c小鼠作为正常对照组。于小鼠9周龄时开始给药,白芍总苷组每天按照低、中、高(50、100、150 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量灌胃给药,阳性药羟氯喹组每天灌胃给药100 mg·kg<sup>-1</sup>,正常对照组、模型组小鼠同步灌胃等量生理盐水。直

至 16 周末即连续灌胃 8 周后停止给药, 腹腔注射 10% 水合氯醛(4 mL·kg<sup>-1</sup>) 对小鼠进行麻醉后, 采用断头法处死小鼠。

**1.5 小鼠一般情况观察** 实验期间, 每天记录各组小鼠有无死亡状况并定期观察各组小鼠的摄水量及唾液分泌量(SFR)。分别于小鼠 9、11、13 和 16 周末对其行腹腔注射 10% 水合氯醛(4 mL·kg<sup>-1</sup>), 5 min 后, 腹腔注射毛果芸香碱(0.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 刺激麻醉小鼠的唾液分泌。从注射后 90 s 开始, 用微量吸管从口腔收集唾液 7 min, 用重量法测定小鼠唾液量(mg·min<sup>-1</sup>)。另每天定时记录各组小鼠摄水量, 并将小鼠摄水量动态变化记录, 以周为单位统计小鼠的日均摄水量变化。

**1.6 小鼠颌下腺组织染色观察** 取小鼠颌下腺, 用 40 g·L<sup>-1</sup> 的多聚甲醛进行固定后, 用常规石蜡法制成蜡块进行连续切片, 厚度为 4 μm, 切片经脱蜡水洗后行标准苏木素-伊红(HE)染色。在显微镜下观察颌下腺细胞浸润和组织损伤情况。

**1.7 小鼠血清中 IL-17、IFN-γ 和 TNF-α 含量** 水合氯醛麻醉后进行小鼠眼球摘除取血, 于 4 °C 静置 3 h, 以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min(离心半径 5 cm), 取上清液即得血清, 采用 ELISA 法检测血清 IL-17、IFN-γ、TNF-α 炎症因子的含量。操作按照试剂盒说明进行。

**1.8 小鼠颌下腺组织中 TLR4、MyD88 及 NF-κB mRNA 表达水平** 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 法进行检测。取小鼠颌下腺组织加入 Trizol 试剂研成粉末, 提取颌下腺组织中的总 RNA, 并逆转录为 cDNA, 用 S1000 梯度 PCR 仪进行检测。引物由擎科生物科技合成, 序列见表 1。PCR 反应体系使用 GAPDH 作为内参基因, 以正常组 mRNA 的表达量作为“1”, 再根据校正值计算出其他各组 mRNA 相对含量, 进行组间相对量的比较。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列(5'-3')
TLR4	上游: AGGTTTCCTGTCAGTATCAAGTTT
	下游: TGATGCCTCCCTGGCTCCT
MyD88	上游: TATACCAACCCTTGCACCAAGTC
	下游: CAGGCTCCAAGTCAGCTCATC
NF-κB	上游: AGGCCGGTGCTGAGTATGTC
	下游: TGCCTGCTTACCACCTTCT

**1.9 小鼠颌下腺组织中 TLR4、MyD88 及 NF-κB 蛋白表达水平** 小鼠颌下腺组织经过适当处理后加

入裂解液裂解 10~15 min, 经低温离心机离心后吸取上清液并弃掉沉淀物, 采用 BCA 蛋白定量法测定样品蛋白含量。蛋白样品置于金属浴中使蛋白充分变性, 依次进行电泳、电转、封闭, 在 4 °C 下孵育相应的一抗过夜。孵育一抗后, 用 Tris 缓冲液洗条带后再进行二抗孵育 2 h, 用凝胶显微成像系统进行化学发光显影成像, 利用 ImageJ 软件测定目的蛋白条带灰度值。

**1.10 统计学处理方法** 运用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行分析, 计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采取独立样本 *T* 检验; *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 白芍总苷对小鼠唾液分泌量及平均摄水量的影响** 见表 2、表 3。唾液分泌量测定结果表明, 模型组小鼠唾液分泌量较正常对照组明显减少(*P* < 0.01), 且随着病程的发展呈下降趋势(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与模型组比, 白芍总苷中、高剂量组和羟氯喹组小鼠的唾液分泌量在 11 周龄即给药 3 周后明显增加(*P* < 0.05, *P* < 0.01); 给药 5 周(13 周龄)后白芍总苷各剂量组和羟氯喹组小鼠唾液分泌量均明显增加(*P* < 0.01); 且随着病程的发展呈上升趋势(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。与正常对照组比, 模型组小鼠的平均摄水量明显上升(*P* < 0.01), 且随着病程的发展摄水量呈增加趋势(*P* < 0.05, *P* < 0.01); 与模型组比, 白芍总苷各剂量组和羟氯喹组小鼠在 13 周龄即给药 5 周后平均摄水量均明显减少(*P* < 0.01), 且随着病程的发展摄水量呈不断减少的趋势(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

表 2 白芍总苷对小鼠唾液流量的影响( $\bar{x} \pm s$ , mg·min<sup>-1</sup>; *n*=8)

Table 2 Effect of total glucosides of paeon on salivary flow in mice ( $\bar{x} \pm s$ , mg·min<sup>-1</sup>; *n*=8)

分组	9 周龄	11 周龄	13 周龄	16 周龄
正常对照组	6.54±1.04	6.72±2.39	6.66±3.51	6.89±2.73
模型组	4.48±0.66**	4.36±0.24**	4.01±0.18**▲	3.51±0.21***▲▲▲*
白芍总苷低剂量组	4.56±0.67	4.61±0.40	4.86±0.33**	5.18±0.32**▲▲
白芍总苷中剂量组	4.49±0.73	4.97±0.69*	5.05±0.51**	5.53±0.36***
白芍总苷高剂量组	4.50±0.70 <sup>Δ</sup>	5.15±0.43**▲	5.63±0.49**▲▲	6.00±0.27**▲▲▲
羟氯喹组	4.58±0.71 <sup>Δ</sup>	5.17±0.35**▲	5.51±0.32**▲▲	6.03±0.34**▲▲▲*

注: 与同时期正常对照组比较, \*\**P* < 0.01; 与同时期模型组比较, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01; 与同组 9 周龄比较, ▲*P* < 0.05, ▲▲*P* < 0.01; 与同组 11 周龄比较, Δ*P* < 0.05, ΔΔ*P* < 0.01; 与同组 13 周龄比较, \**P* < 0.05

表 3 白芍总苷对小鼠平均摄水量的影响( $\bar{x} \pm s$ , mL;  $n=8$ )

Table 3 Effect of total glucosides of paeon on average water intake in mice( $\bar{x} \pm s$ , mL;  $n=8$ )

分组	9 周龄	10 周龄	11 周龄	12 周龄	13 周龄	14 周龄	15 周龄	16 周龄
正常对照组	4.53±0.21	4.61±0.38	4.57±0.31	4.72±0.27	4.91±0.45	4.94±0.24	5.00±0.29	5.06±0.30
模型组	6.67±0.70**	6.95±0.35**	7.01±0.27**	7.25±0.80**	7.35±0.50** <sup>▲</sup>	7.40±0.47** <sup>▲</sup>	7.45±0.31** <sup>▲▲</sup>	7.53±0.20** <sup>▲▲△</sup>
白芍总苷低剂量组	6.79±0.48	6.73±0.35	6.67±0.36	6.62±0.44	6.51±0.11 <sup>##</sup>	6.45±0.31 <sup>##</sup>	6.42±0.47 <sup>##</sup>	6.31±0.33 <sup>##</sup>
白芍总苷中剂量组	6.67±0.30	6.60±0.31	6.52±0.38	6.47±0.39 <sup>#</sup>	6.38±0.37 <sup>##</sup>	6.33±0.27 <sup>##</sup>	6.24±0.64 <sup>##</sup>	6.17±0.37 <sup>##△</sup>
白芍总苷高剂量组	6.78±0.87	6.43±0.18 <sup>##</sup>	6.32±0.14 <sup>#</sup>	6.25±0.32 <sup>#</sup>	6.18±0.33 <sup>##△</sup>	6.10±0.27 <sup>##△</sup>	6.01±0.20 <sup>##△△★</sup>	5.88±0.26 <sup>##△△★◆◇</sup>
羟氯喹组	6.62±0.44	6.47±0.53	6.35±0.46 <sup>#</sup>	6.25±0.34 <sup>#</sup>	6.17±0.25 <sup>##</sup>	6.05±0.31 <sup>##△△</sup>	5.99±0.42 <sup>##</sup>	5.86±0.75 <sup>##△△</sup>

注: 与同时期正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与同时期模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与同组 9 周龄比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与同组 10 周龄比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与同组 11 周龄比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与同组 12 周龄比较, <sup>◆</sup> $P < 0.01$ ; 与同组 13 周龄比较, <sup>◇</sup> $P < 0.05$

**2.2 白芍总苷对小鼠颌下腺组织病变的影响** 见图 1。颌下腺组织 HE 染色结果显示, 正常对照组小鼠颌下腺腺体未见肿大、萎缩等改变, 腺泡壁薄, 分布整齐, 边界清晰; 模型组小鼠腺泡损坏萎陷挤压明显, 边界不清晰, 腺体数量减少, 导管结构被破

坏, 有明显的淋巴细胞浸润并形成淋巴细胞灶; 白芍总苷各剂量组和羟氯喹组小鼠腺体组织损伤得到不同程度的改善, 腺泡边界较清晰, 分布较整齐, 腺体萎缩不明显, 淋巴细胞浸润现象减轻, 其中以白芍总苷高剂量改善最为明显。

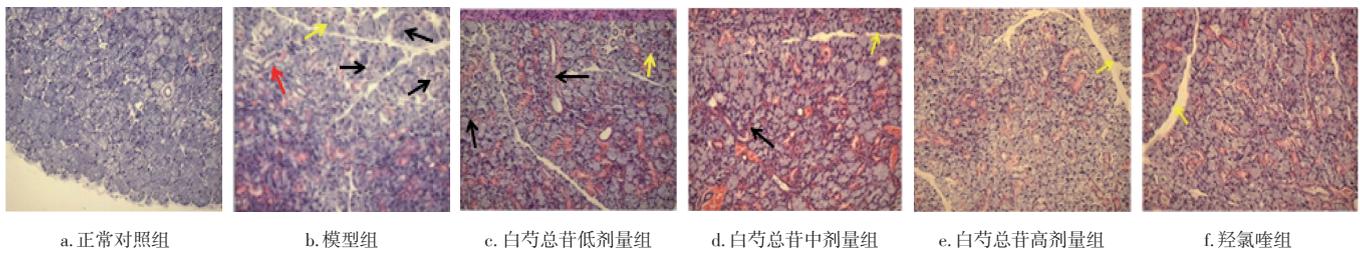


图 1 白芍总苷对小鼠颌下腺组织病变的影响(HE 染色, ×200)  
Figure 1 Effect of total glucosides of paeon on submandibular gland lesions in mice(HE, ×200)

**2.3 白芍总苷对小鼠血清中 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量的影响** 见表 4。ELISA 法检测结果显示, 模型组小鼠血清中 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量较正常对照组明显上升( $P < 0.01$ ); 白芍总苷各剂量组和羟氯喹组小鼠血清 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量均较模型组明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 4 白芍总苷对小鼠血清中 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Table 4 Effects of total glucosides of paeon on serum IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

分组	IL-17/(pg·mL <sup>-1</sup> )	IFN- $\gamma$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常对照组	32.74±7.23	11.45±2.62	49.74±5.59
模型组	74.21±5.46**	24.59±3.93**	87.85±4.91**
白芍总苷低剂量组	68.60±2.87 <sup>#</sup>	20.08±1.97 <sup>#</sup>	82.40±1.24 <sup>#</sup>
白芍总苷中剂量组	65.14±2.51 <sup>##</sup>	17.89±2.46 <sup>##</sup>	71.90±7.64 <sup>##</sup>
白芍总苷高剂量组	60.17±3.65 <sup>##</sup>	15.35±1.70 <sup>##</sup>	61.47±7.34 <sup>##</sup>
羟氯喹组	58.67±3.16 <sup>##</sup>	15.90±1.60 <sup>##</sup>	62.76±4.88 <sup>##</sup>

注: 与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

**2.4 白芍总苷对小鼠颌下腺组织 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达的影响** 见表 5。qRT-PCR 法检测结果显示, 模型组小鼠颌下腺 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平较正常对照组明显上调( $P < 0.01$ ); 与模型组比, 白芍总苷各剂量组和羟氯喹组小鼠颌下腺 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平明显下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且随着给药浓度增加 mRNA 表达水平呈减少趋势。

表 5 白芍总苷对小鼠颌下腺组织 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 5 Effects of total glucosides of paeon on mRNA expression of TLR4, MyD88 and NF-κB in mouse submandibular gland tissues( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	TLR4	MyD88	NF-κB
正常对照组	1.02 ± 0.12	1.00 ± 0.12	1.07 ± 0.11
模型组	4.56 ± 1.65**	7.01 ± 0.40**	9.38 ± 2.15**
白芍总苷低剂量组	3.15 ± 0.28 <sup>#</sup>	6.55 ± 0.24 <sup>#</sup>	7.31 ± 1.00 <sup>#</sup>
白芍总苷中剂量组	2.31 ± 0.45 <sup>##</sup>	5.05 ± 0.36 <sup>##</sup>	5.91 ± 0.78 <sup>##</sup>
白芍总苷高剂量组	1.93 ± 0.91 <sup>###</sup>	3.34 ± 0.92 <sup>###</sup>	4.65 ± 1.36 <sup>###</sup>
羟氯喹组	2.01 ± 0.52 <sup>###</sup>	3.24 ± 0.92 <sup>###</sup>	4.36 ± 1.30 <sup>###</sup>

注：与正常对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$

### 2.5 白芍总苷对小鼠颌下腺组织 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达的影响

见图 2、表 6。检测结果显示，模型组小鼠颌下腺 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平较正常对照组明显上调( $P < 0.01$ )；与模型组比，白芍总苷各剂量组和羟氯喹组小鼠颌下腺 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平明显下调( $P < 0.05, P < 0.01$ )，且随着给药浓度的增加蛋白表达水平呈减少趋势。

### 3 讨论

虽然干燥综合征主要表现为免疫复合物沉积引起的黏膜表面干燥，但也可以引起多个腺外部位(如关节、血管、肺、神经和肾脏)的全身性受累<sup>[11]</sup>。干燥综合征的发病机制是基于先天免疫反应和适应性反应之间复杂的相互作用，最终导致以丧失自身耐受

性为特征的自身免疫的爆发。由于自身免疫过程的复杂性和不可预测性，在一定程度上限制了疾病的治疗方法，目前的治疗方法仍然是基于对症治疗或使用免疫抑制及激素药物，但是治疗效果有限<sup>[12]</sup>。天然药物和中药有效成分被视为是高效低毒的有效抗炎药物，白芍总苷目前已被应用于干燥综合征实验研究和临床病例的观察当中，取得了良好的临床疗效且不良反应较少<sup>[13]</sup>，但关于白芍总苷治疗干燥综合征的作用机制尚不清楚。

作为干燥综合征的自发模型，NOD 小鼠可以自发地在特定器官(如唾液腺和泪腺)发生淋巴细胞浸润，表现为外分泌腺功能障碍，对于鉴定干燥综合征早期疾病标志物以及研究潜在的生物学和免疫失调机制具有极为重要的价值<sup>[14]</sup>。干燥综合征的病理基础是患者免疫系统的细胞错误地将泪腺和唾液腺细胞识别为异物，大量的淋巴细胞浸润到分泌腺组织中，由此产生的慢性炎症导致了腺体功能障碍，因此腺体的组织状态可作为诊断和监测疾病的一个重要的、量化的参数<sup>[15]</sup>。在本研究中，未经过药物干预的 NOD 小鼠颌下腺出现局部淋巴细胞浸润灶，腺体明显萎缩，表现出唾液流量明显减少、摄水量明显增加的生理异常。该结果提示小鼠颌下腺处于慢性炎症状态中，腺体分泌功能受到严重损害，与干燥综合征小鼠病理特征相符。钟琴等<sup>[16]</sup>在白芍总苷对干燥综合征模型小鼠影响的研究中发现，白芍总苷对改善干燥综合征小鼠唾液流量的效果明显，可减轻小鼠的口腔干燥引起的摄水量增加。本实验结

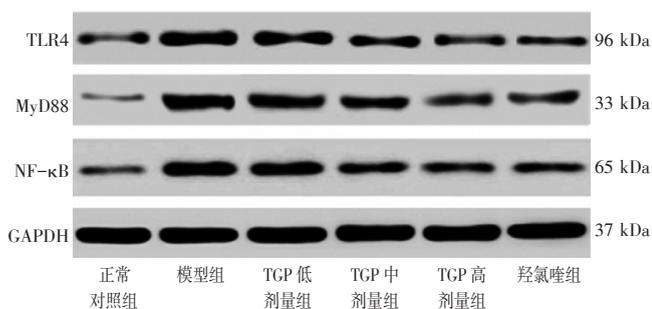


图 2 小鼠颌下腺组织 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达的影响条带图

Figure 2 Brand of protein expression of TLR4, MyD88 and NF-κB in mouse submandibular gland tissues

表 6 白芍总苷对小鼠颌下腺组织 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 6 Effects of total glucosides of paeon on the expression of TLR4, MyD88 and NF-κB in mouse submandibular gland tissues( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	TLR4	MyD88	NF-κB
正常对照组	0.41 ± 0.17	0.54 ± 0.15	0.87 ± 0.23
模型组	2.61 ± 0.11**	3.95 ± 0.21**	4.66 ± 0.48**
白芍总苷低剂量组	2.40 ± 0.17 <sup>#</sup>	3.53 ± 0.38 <sup>#</sup>	4.03 ± 0.48 <sup>#</sup>
白芍总苷中剂量组	1.95 ± 0.28 <sup>##</sup>	3.03 ± 0.19 <sup>##</sup>	3.19 ± 0.32 <sup>##</sup>
白芍总苷高剂量组	1.39 ± 0.27 <sup>###</sup>	2.57 ± 0.26 <sup>###</sup>	2.52 ± 0.35 <sup>###</sup>
羟氯喹组	1.44 ± 0.15 <sup>###</sup>	2.61 ± 0.39 <sup>###</sup>	2.48 ± 0.24 <sup>###</sup>

注：与正常对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$

果也显示对于 NOD 小鼠, 白芍总苷和阳性药羟氯喹的干预可明显改善分泌腺细胞浸润程度及腺泡萎缩等病理损伤, 恢复腺体的分泌功能, 在一定程度上缓解小鼠的粘膜干燥症状。

陈慧永等<sup>[17]</sup>发现急性胰腺炎大鼠经过白芍总苷治疗后, AMY、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的分泌能得到明显抑制。葛冰景等<sup>[18]</sup>通过研究白芍总苷对炎症性肠病小鼠的影响, 发现白芍总苷可减少促炎因子的分泌并上调抗炎因子的表达。由此可见白芍总苷具有良好的抗炎活性。目前的研究<sup>[19]</sup>表明, T 细胞构成了干燥综合征疾病早期浸润的淋巴细胞的很大一部分, 其分化的 Th1 和 Th17 细胞亚群被认为是干燥综合征病理早期的重要介质, 对炎症微环境的形成起着重要作用。IL-17、IFN- $\gamma$  是 Th1 和 Th17 细胞群诱导炎症反应的早期促炎因子, 与炎症损伤高度相关<sup>[20]</sup>; TNF- $\alpha$  则是另一种与干燥综合征发生发展相关的 Th1 细胞因子, 可以促进 T 细胞的增殖和活化, 诱导多种炎症因子的产生, 是激活炎症级联反应的重要因子<sup>[21]</sup>。本研究结果显示, 与模型组小鼠相比, 白芍总苷和阳性药羟氯喹治疗组小鼠的炎症因子 IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量明显下降, 此结果与在显微镜下观察颌下腺组织病理学的结果即炎症细胞浸润减少的实验结果相符。以上的临床、生化和组织病理学检查结果提示白芍总苷可以通过抑制炎症因子减轻炎症反应, 从而改善唾液分泌和减少淋巴细胞浸润, 粘膜干燥症状得到延缓, 达到对 NOD 小鼠的保护作用。

TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B 是上下游信号转导通路, 在启动细胞固有免疫反应中起着不可或缺的作用。Toll 样受体(TLR)家族中的 TLR4 可与抗原结合迅速, 并通过激活相关激酶向下游传递信号发挥其功能, 是激活炎症通路和合成、分泌高水平炎症介质的启动因素<sup>[22]</sup>。MyD88 是一种普遍表达的接头分子, IL-1 受体、IL-18 受体和多数 TLR 受体都需要通过 MyD88 来传递炎症信号。Kiripolsky J 等<sup>[23]</sup>发现 MyD88 缺陷小鼠不会出现干燥综合征外分泌腺和腺外疾病的相关表现, 证明 MyD88 在干燥综合征的发生发展过程中是必不可少的信号介质。NF- $\kappa$ B 是细胞中重要的核转录调节因子, 通常作为信号响应被激活, 是多种信号传导通路的融合点, 参与调控免疫、炎症、应激反应等多种生物学过程<sup>[24]</sup>。目前已发

现 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路形成信号轴, 其通过启动炎症反应相关靶基因的表达, 合成和释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和其他炎症因子, 从而调节炎性免疫反应并控制炎症疾病的发展<sup>[25]</sup>。本研究中, 模型组小鼠颌下腺中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于正常对照组小鼠, 推测可能是 NOD 小鼠的 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路异常激活, 导致相关基因转录和促炎因子大量释放, 加快了炎症的发展进程。通过分别给予低、中、高剂量的白芍总苷和阳性药羟氯喹干预后, 小鼠颌下腺 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 和蛋白表达水平明显下降, 表明白芍总苷可抑制 NOD 小鼠中 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的活性, 降低促炎因子的释放, 保护分泌腺功能, 发挥抗炎作用。

综上所述, 白芍总苷可能通过下调 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的活性, 减少炎症因子的表达, 改善外分泌腺组织的炎症损伤, 从而对 NOD 小鼠产生保护作用。

#### 参考文献:

- [1] 高丽霞, 郭惠芳. 2017年风湿免疫病主要临床进展[J]. 临床荟萃, 2018, 33(1): 54-59, 65.
- [2] 史晴晴, 杜欢, 于红梅, 等. 白芍总苷对全脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中国中医急症, 2017, 26(7): 1172-1174, 1185.
- [3] 郑亚萍, 刘春杰. 白芍总苷对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞内质网应激及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17): 108-112.
- [4] 刘国玲, 张玉霞, 芦琨, 等. 白芍总苷对大鼠佐剂关节炎抗炎作用及机制研究[J]. 现代预防医学, 2012, 39(20): 5348-5350, 5352.
- [5] FENG Z T, XU J, HE G C, et al. A systemic review and meta-analysis of the clinical efficacy and safety of total glucosides of peony combined with methotrexate in rheumatoid arthritis[J]. Clinical Rheumatology, 2018, 37(1): 35-42.
- [6] 李旭, 王玥, 刘国力. 基于TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路探讨木犀草素对MPTP诱导的帕金森病模型小鼠的炎症影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2021, 52(2): 218-223.
- [7] 徐化雪, 王佳, 李俊峰, 等. 基于TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路研究右美托咪定对肝癌切除术大鼠免疫功能的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2021, 27(6): 466-473.
- [8] 郑亚萍, 康红钰. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在白芍总苷干预大鼠心肌肥厚中的作用[J]. 中成药, 2018, 40(1): 194-197.
- [9] 杨以琳, 魏毅, 张贵平, 等. 白芍总苷对NAFLD大鼠HMGB1、TLR4通路的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 146-151.

- [10] 朱亚利, 关凤军, 安娜, 等. 白芍总苷通过下调TLR4/NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta$ 1信号通路改善阿霉素肾病大鼠肾纤维化[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(7): 43-46.
- [11] SANDHYA P, JEYASEELAN L, SCOFIELD R H, et al. Clinical characteristics and outcome of primary sjogren's syndrome: a Large asian indian cohort[J]. Open Rheumatology Journal, 2015, 9(1): 36.
- [12] RENAUD, FELTEN, FLORENCE, et al. The pipeline of targeted therapies under clinical development for primary Sjögren's syndrome: a systematic review of trials[J]. Autoimmunity Reviews, 2019, 18(6): 576-582.
- [13] 陆带果, 王璐瑶, 王贵红, 等. 白芍总苷胶囊联合硫酸羟氯喹治疗干燥综合症的临床效果[J]. 中国医药导报, 2019, 16(36): 115-118.
- [14] BRALEY-MULLEN H, YU S G. NOD. H-2h4 mice: an important and underutilized animal model of autoimmune thyroiditis and Sjogren's syndrome[J]. Advances in Immunology, 2015, 126: 1-43.
- [15] CHIARA R, GIULIA G, GIULIA M D C, et al. Primary sjogren syndrome: focus on innate immune cells and inflammation[J]. Vaccines, 2020, 8(2): 272.
- [16] 钟琴, 曹跃朋, 刘正奇, 等. 白芍总苷对干燥综合征模型小鼠饮水量和唾液量及T细胞亚群的影响[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(11): 39-41, 69.
- [17] 陈慧永, 孙超, 沈捷雯, 等. 白芍总苷对大鼠急性胰腺炎炎症反应及PKD1、NF- $\kappa$ B蛋白表达的影响研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(10): 1030-1033.
- [18] 葛冰景, 曹红燕, 戴彦成, 等. 白芍总苷对葡聚糖硫酸钠诱导的IBD模型小鼠炎症因子水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(8): 957-963.
- [19] RÍOSRÍOS W J, SOSALUIS S A, TORRES AGUILAR H. T cells subsets in the immunopathology and treatment of sjogren's syndrome[J]. Biomolecules, 2020, 10(11): 1539.
- [20] VERSTAPPEN G M, KROESE F G M, BOOTSMA H. T cells in primary sjogren's syndrome: targets for early intervention[J]. Rheumatology, 2021, 60(7): 3088-3098.
- [21] BONT C M D, STOKMAN M E M, FAAS P, et al. Autoantibodies to neutrophil extracellular traps represent a potential serological biomarker in rheumatoid arthritis[J]. Journal of Autoimmunity, 2020, 113: 102484.
- [22] 张菁华, 朱翔鸿, 叶莹燕, 等. 五味子乙素通过抑制TLR4-Myd88信号通路减轻脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞凋亡[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(10): 1119-1123.
- [23] KIRIPOLSKY J, MCCABE L G, GAILE D P, et al. Myd88 is required for disease development in a primary Sjögren's syndrome mouse model[J]. Journal of leukocyte biology, 2017, 102(6), 1411-1420.
- [24] HARRINGTON B S, ANNUNZIATA C M. NF- $\kappa$ B Signaling in ovarian cancer[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(8): 1182.
- [25] ZHANG J, YU P, CHEN M, et al. Remote ischaemic preconditioning and sevoflurane postconditioning synergistically protect rats from myocardial injury induced by ischemia and reperfusion partly via inhibition TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 41(1): 22-32.

(编辑: 修春)