

研究论文

小檗胺对系统性红斑狼疮小鼠的免疫调节作用

王慧莲, 展俊平*, 苗喜云, 孟庆良, 马俊福

河南省中医院风湿病科, 郑州 450053

摘要: 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是有多种并发症的自身免疫性疾病, 其确切病因尚不清楚, 治疗方法包括激素等药物治疗、血浆置换及免疫吸附治疗以及靶向生物治疗等。小檗胺(berbamine, BBM)是一种具有多种生物学功能的细胞免疫促进剂, 但其是否对SLE有免疫调节和治疗作用尚未见报道, 本研究对这一问题进行探讨。实验动物分为对照组, 模型组, 阳性药物组, 低、中、高浓度BBM组, 对照组为C57BL/6J野生小鼠腹腔注射生理盐水, 模型组为MRL/lpr狼疮模型小鼠腹腔注射生理盐水, 阳性药物组为模型小鼠灌胃给予硫酸羟氯喹片[纷乐, 150 mg/(kg·d)], BBM组为模型小鼠分别灌胃给予不同浓度BBM [20、50、100 mg/(kg·d)]。治疗8周后, 眼眶后静脉采血, 使用ELISA检测抗双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)抗体、抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)、抗小核糖核蛋白/Sm (small nuclear ribonucleoprotein/Sm, snRNP/Sm)抗体水平。收集各组小鼠脾脏组织, 流式细胞术检测Th1/Th2比值。提取脾脏总RNA和总蛋白, 分别进行qRT-PCR、Western blot检测T-box转录因子T-bet、GATA结合蛋白3 (GATA binding protein 3, GATA3)的mRNA和蛋白水平。血常规检测各组小鼠血液中白细胞的增殖情况。HE染色检测各组小鼠肾组织病理学变化。与模型组相比, BBM组的ANA、抗dsDNA抗体、抗snRNP/Sm抗体水平显著下降。模型组的Th1/Th2比值显著下降, BBM干预后逆转了Th1/Th2比值的下降。与对照组相比, 模型组中T-bet表达水平显著下降, GATA3的表达水平显著上调。与模型组相比, BBM干预后的T-bet表达水平显著上升, GATA3的表达水平下降。模型组小鼠的白细胞数量显著下降, BBM处理后的白细胞数量显著增加。模型组肾小球系膜及内皮细胞明显增生, 扩张的毛细血管中可见透明样血栓, 肾间质内炎症细胞浸润明显; 中、高浓度BBM干预后, 炎症细胞浸润及毛细血管血栓明显减少。以上结果表明, BBM对SLE有一定的免疫调节作用和促进白细胞增殖的作用。

关键词: 小檗胺; 系统性红斑狼疮; 免疫调节

The immunomodulatory effect of berbamine on mice with systemic lupus erythematosus

WANG Hui-Lian, ZHAN Jun-Ping*, MIAO Xi-Yun, MENG Qing-Liang, MA Jun-Fu

Department of Rheumatology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China

Abstract: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease accompanied by various complications, and the exact etiology remains unclear. Treatments for SLE encompass hormone therapy, plasma exchange and immunoadsorption, and targeted biological therapies. Berbamine (BBM), a cellular immunopotentiator with diverse biological functions, has not been reported to have immunomodulatory and therapeutic effects on SLE. The mice were divided into control group, model group, positive control group, low, medium and high BBM groups. In control group, C57BL/6J wild mice received intraperitoneal injection of saline. In model group, MRL/lpr lupus mice were treated with intraperitoneal injection of saline. In positive control group, MRL/lpr lupus mice received intragastric administration of hydroxychloroquine sulfate tablets [Plaquenil, 150 mg/(kg·d)]. In BBM groups, MRL/lpr lupus mice received intragastric administration of different concentration of BBM respectively [20 mg/(kg·d), 50 mg/(kg·d), 100 mg/(kg·d)]. After 8 weeks of treatment, blood was collected from the retro-orbital venous plexus, and ELISA was used to detect the levels of anti-

This work was supported by the Major Special Project of Henan Province Traditional Chinese Medicine Scientific Research (No. 20-21ZYD05), the National Natural Science Foundation of China (No. 81804050), and Top-notch Talent Cultivation Project of Henan Province Traditional Chinese Medicine.

*Corresponding author. E-mail: junping_zh@163.com

double-stranded DNA (dsDNA) antibodies, antinuclear antibodies (ANA), and anti-small nuclear ribonucleoprotein/Sm (snRNP/Sm) antibodies. Spleen tissues were collected for analysis of Th1/Th2 ratio by flow cytometry. The RNA and protein of spleen were extracted, and the levels of T-box transcription factor T-bet and GATA3 (GATA binding protein 3) mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blot. The proliferation of white blood cells in the blood was tested by blood routine test. The histopathological changes of kidneys of each group were detected by HE staining. Compared with the model group, the levels of ANA, anti-dsDNA, and anti-snRNP/Sm antibodies were significantly reduced in the BBM-treated groups. The Th1/Th2 ratio was significantly decreased in the model group, but reversed by BBM. Compared with the control group, T-bet expression was significantly downregulated, while GATA3 expression was significantly upregulated in the model group. After BBM intervention, T-bet expression significantly increased, while GATA3 expression decreased compared with the model group. The number of white blood cells significantly decreased in the model group, and increased in the BBM-treated groups. In the model group, the glomerular mesangial and endothelial cells showed significant hyperplasia, clear thrombus was observed in the dilated capillaries, and inflammatory cells infiltrated in the renal interstitium. In medium and high BBM groups, the infiltration of inflammatory cells and capillary thrombosis were significantly decreased. In conclusion, BBM exhibits certain immunomodulatory effects on SLE and promotes the proliferation of white blood cells.

Key words: berbamine; systemic lupus erythematosus; immunomodulation

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是自身免疫介导的,多系统、多器官受累的弥漫性结缔组织病,以免疫性炎症为突出特征,表现为B淋巴细胞呈多克隆活化,使患者体内产生多种自身抗体。CD4⁺辅助性T细胞(helper T cell, Th)亚群失衡及细胞因子水平失调与SLE的发病及病理损伤程度密切相关^[1]。研究表明, Th1细胞因子,如白介素2(interleukin-2, IL-2),肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)等,与SLE病情活动初期或病情加重有关^[2,3];而Th2细胞因子,如IL-4, IL-6及IL-10等,可促进B细胞活化,诱导IgG1产生^[4]。SLE的确切病因尚不清楚,其治疗方法包括激素等药物治疗、血浆置换及免疫吸附治疗以及靶向生物治疗等,需要临床医生根据患者的临床表现制定具体治疗措施。近期研究表明,一些天然和草药产品能通过调节免疫、抑制免疫反应控制SLE病情的发展^[5-7]。

小檗胺(berbamine, BBM)是从我国中草药小檗属植物中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱,具有多种生物学功能,包括促进白细胞增生、抗结核、扩张血管、抗心肌缺血缺氧、抗心律失常、降血压、抗炎、抗心律失常等^[8,9]。BBM作为一种细胞免疫促进剂,在体内外实验中呈剂量依赖性增强自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)活性,并诱导小鼠脾细胞IL-2的产生^[10];另外,其能刺激骨髓细胞增殖,提高造血干细胞集落因子含量,进而促进骨髓造血干细胞和粒祖细胞增殖,并向粒系细胞分化,促进白细胞增生^[11]。

BBM作为一种免疫促进剂,是否对SLE有免疫

调节和治疗作用尚未见报道。本研究旨在探索BBM对SLE小鼠的免疫调节作用,为SLE的治疗提供理论数据及思路。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂、仪器

BBM(SB8470)购自北京索莱宝;硫酸羟氯喹片(纷乐, Plaquenil)购自上海上药中西制药有限公司;小鼠抗双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)抗体ELISA试剂盒(ml063514)、小鼠抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)ELISA检测试剂盒(ml002245)、小鼠抗小核糖核蛋白/Sm(small nuclear ribonucleoprotein/Sm, snRNP/Sm)抗体ELISA检测试剂盒(ml002259)购自上海酶联生物科技有限公司;SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒(208054)购自QIAGEN公司;CD4-FITC(96127S)购自Cell Signaling;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(K1622)、Dynabeads™ Untouched™人CD4 T细胞试剂盒(11346D)、PE标记的IFN- γ 单克隆抗体(IFN- γ -PE)(MHCIFG04)、APC标记的IL-4单克隆抗体(IL-4-APC)(17-7041-81)、T-box转录因子T-bet单克隆抗体(14-5825-82)、GATA结合蛋白3(GATA binding protein 3, GATA3)单克隆抗体(MA1-028)和 β -actin单克隆抗体(MA5-32530)购自ThermoFisher Scientific公司;实时荧光定量PCR仪(Fast 7500)购自ThermoFisher Scientific公司;酶标仪680购自美国Bio-Rad公司产品;多功能M200酶标仪购自瑞士Tecan;CytoFLEX流式细胞仪购自美国Beckman Coulter。

1.2 方法

1.2.1 实验动物以及分组

雌性 MRL/lpr 狼疮模型小鼠(6~8 周龄, 25 g 左右)和雌性 C57BL/6J 野生小鼠(6~8 周龄, 25 g 左右)购自成都达硕实验动物有限公司。实验动物分为对照组(Con)、模型组(MRL/lpr)、纷乐组(阳性对照组, Plaquenil group)、低浓度 BBM 组(Low BBM)、中浓度 BBM 组(Medium BBM)、高浓度 BBM 组(High BBM), 每组 9 只。对照组为 C57BL/6J 野生小鼠, 腹腔注射生理盐水。模型组为 MRL/lpr 狼疮模型小鼠, 腹腔注射生理盐水。阳性对照组为 MRL/lpr 狼疮模型小鼠灌胃给予硫酸羟氯喹片[纷乐, 150 mg/(kg·d)]; 低、中、高浓度 BBM 组为 MRL/lpr 狼疮模型小鼠, 分别灌胃 20 mg/(kg·d)(低浓度)、50 mg/(kg·d)(中浓度)、100 mg/(kg·d)(高浓度) BBM。纷乐组及不同浓度 BBM 组治疗 8 周后, 分别收集各组小鼠全血或脾脏, 进行后续检测。对于生存率的检测, 每组 14 只小鼠, 纷乐及 BBM 分别治疗 32 周, 记录各组小鼠生存情况。本研究所涉及的实验动物方案均按照河南省中医院动物实验基本原则进行, 并得到了河南省中医院实验动物管理委员会的许可(批准文号: PZ-HNSZYY-2020-030)。

1.2.2 小鼠抗体水平检测

治疗结束后, 小鼠眼眶后静脉取血, 离心收集血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 ANA、抗 dsDNA 抗体、抗 snRNP/Sm 抗体水平。

1.2.3 流式细胞术检测 Th1 与 Th2 细胞数量

纷乐及 BBM 干预结束后, 麻醉并处死各组小鼠, 取小鼠脾脏。剪取 100 mg 脾脏组织, 研磨、离心并制备脾单细胞悬液。依次加入佛波酯(1 μg/mL)、离子霉素(50 μg/mL)和莫能菌素(0.1 mg/mL)刺激细胞 6 h。使用适量 PBS 洗涤细胞后, 制备单细胞悬液, 通过阴性分离从细胞悬液中分离出非接触 CD4⁺ T 细胞; 然后加入 CD4-FITC 抗体于 37 °C 避光孵育 30 min; 细胞通透打孔后, 分别加入 IFN-γ-PE 和 IL-4-APC, 37 °C 避光孵育 30 min。使用流式细胞仪测定 Th1 (CD4⁺ IFN-γ⁺) 与 Th2 (CD4⁺ IL-4⁺) 细胞数量。

1.2.4 RT-qPCR 检测 T-bet、GATA3 mRNA 水平

取各组小鼠脾脏组织 100 mg, 液氮研磨后加入 TRIzol 裂解液, 提取脾脏组织的总 RNA 并测定 RNA 浓度。依据逆转录试剂盒说明书将从 RNA 逆

转录为 cDNA; 以 cDNA 为模板进行荧光定量反应, 以 GAPDH 作为内参, 使用 2^{-ΔΔCt} 方法分析 T-bet 和 GATA3 的 mRNA 表达变化。所使用的上下游引物见表 1, 参考试剂盒使用说明书配制反应体系, PCR 仪的反应条件为: 95 °C 2 min, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环次数为 35 次。

表 1. RT-qPCR 引物序列
Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

Gene name	Primer sequence (5'→3')
GAPDH	Forward: GTCGGAGTGAACGGATTG
	Reverse: CGTTCTCTGCCTTGACTGTG
T-bet	Forward: GATTCCGGGAGAACTTTGAG
	Reverse: GAACAGGATACTGGTTGGATAG
GATA3	Forward: ACTCCAGTCCTCATCTCTTC
	Reverse: GATACTTGAGGCACTCTTTCTC

1.2.5 Western blot 检测 T-bet、GATA3 蛋白水平

分别收集各组小鼠的脾脏组织, 提取总蛋白进行 SDS-PAGE, 然后电转印到 PVDF 膜上。分别加入 T-bet、GATA3 和 β-actin 一抗稀释液孵育 PVDF 膜, 4 °C 孵育过夜, 次日, 加入 HRP 标记的二抗稀释液, 室温孵育 2 h。加入 ECL 蛋白发光液并使用 ImageLab™ 软件对蛋白条带进行灰度值分析。

1.2.6 小鼠血常规检查

药物干预结束后, 分别取各组小鼠的全血 500 μL, 血常规分析仪进行检测。

1.2.7 HE 染色

收集各组小鼠肾脏组织, 于 4% 多聚甲醛固定后, 进行常规石蜡包埋及石蜡切片制备, 切片厚度为 5 μm。切片进行常规脱蜡水化后, 进行 HE 染色, 步骤如下: 苏木素染细胞核 5 min, 流水冲洗 5 min, 1% 盐酸乙醇分化 30 s, 水洗 30 s, 0.5% 伊红染色液染色 1 min。完毕后, 切片进行常规脱水, 并用中性树胶封片。切片使用全景数字切片扫描仪 (3DHISTECH Ltd) 进行扫片, 并使用 Slide viewer 2.5 软件进行结果分析。

1.2.8 统计分析

使用 SPSS 18.0 软件对计量资料进行统计分析, 结果以 mean ± SD 表示, 采用 one-way ANOVA 和独立样本的 *t* 检验分析组间差异, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。统计分析做图采用 GraphPad Prism 6。

2 结果

2.1 BBM对MRL/lpr狼疮小鼠生存期的影响

各组小鼠处理32周后,对照组小鼠无死亡;随着年龄的增长,MRL/lpr狼疮小鼠死亡率逐渐增加,至32周时MRL/lpr狼疮小鼠死亡率累计达到40% (6/14),而低浓度BBM处理组死亡1只(1/14);阳性药物纷乐组、中浓度及高浓度BBM处理组小鼠无死亡(图1A)。

2.2 BBM对MRL/lpr狼疮鼠体内ANA、抗dsDNA抗体、抗snRNP/Sm抗体水平的影响

为探索BBM能否下调自身抗体水平,缓解血管炎症,进而发挥治疗作用,本研究首先检测了各组小鼠血液中ANA、抗dsDNA抗体、抗snRNP/Sm抗体水平变化。结果如图1B~D所示,与对照组小鼠相比,MRL/lpr狼疮模型小鼠的ANA、抗dsDNA抗体、抗snRNP/Sm抗体显著升高,而阳性药物纷乐能显著降低MRL/lpr狼疮模型小鼠三种抗体水平。与MRL/lpr狼疮小鼠相比,不同浓度BBM处理组小鼠血清ANA(图1B)、抗dsDNA抗体(图1C)、抗

snRNP/Sm抗体(图1D)水平显著下降;且与低浓度BBM组相比,高浓度BBM组血清三种抗体水平显著降低。

2.3 BBM对MRL/lpr狼疮小鼠Th1与Th2细胞数量的影响

Th1与Th2细胞主要参与体液免疫和细胞免疫,Th1/Th2的比例失衡会引起自身免疫疾病。本研究进一步使用流式细胞术检测BBM对小鼠脾脏中Th1细胞($CD4^+IFN-\gamma^+$)与Th2细胞($CD4^+IL-4^+$)比例的调节。结果显示,与对照组相比,MRL/lpr狼疮小鼠的Th1细胞数量下降(图2),且Th1/Th2比值显著下降(图3),纷乐处理能显著逆转MRL/lpr狼疮小鼠的Th1细胞数量下降(图2),提高Th1/Th2比值(图3)。与MRL/lpr狼疮小鼠相比,不同浓度BBM干预后Th1细胞数量上升,且Th1/Th2比值显著上升(图3)。

2.4 BBM对MRL/lpr狼疮鼠脾脏中T-bet、GATA3 mRNA及蛋白水平的影响

为进一步检测BBM对MRL/lpr狼疮鼠脾脏中Th1及Th2细胞分化的影响,使用qRT-PCR检测了

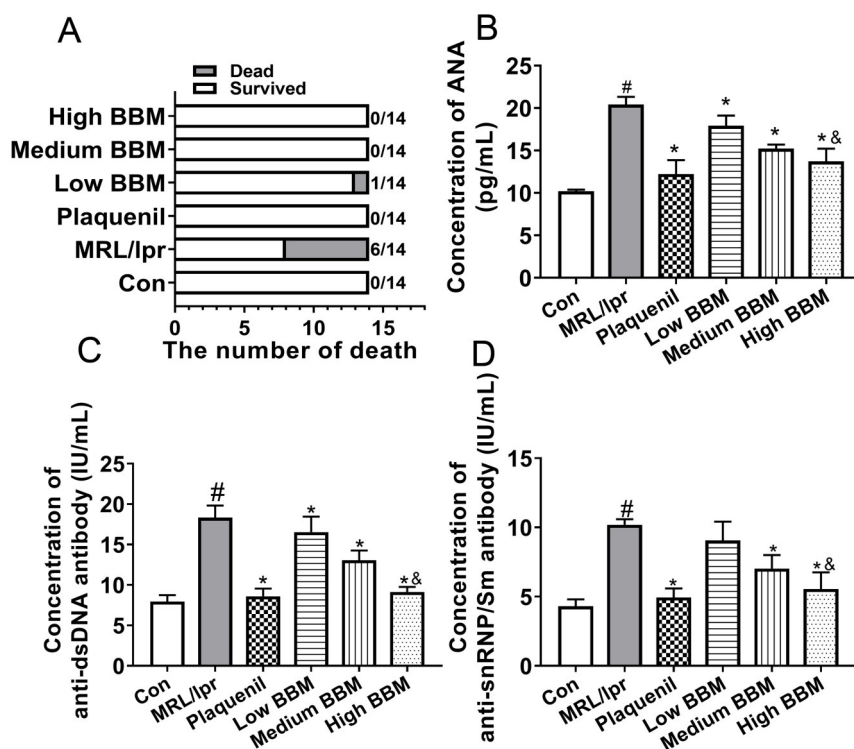


图 1. 小鼠死亡情况及血清抗体水平检测

Fig. 1. The number of death in each group and serum concentrations of different antibodies. A: The number of death after 32-week treatment. $n = 14$. B-D: Serum concentrations of antinuclear antibody (ANA), anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibody and anti-small nuclear ribonucleoprotein/Sm (snRNP/Sm) antibody of different groups. BBM: berbamine. $n = 9$. Mean $\pm$ SD. ^{*} $P < 0.05$ vs MRL/lpr mice, [#] $P < 0.05$ vs Con, [&] $P < 0.05$ vs Low BBM.

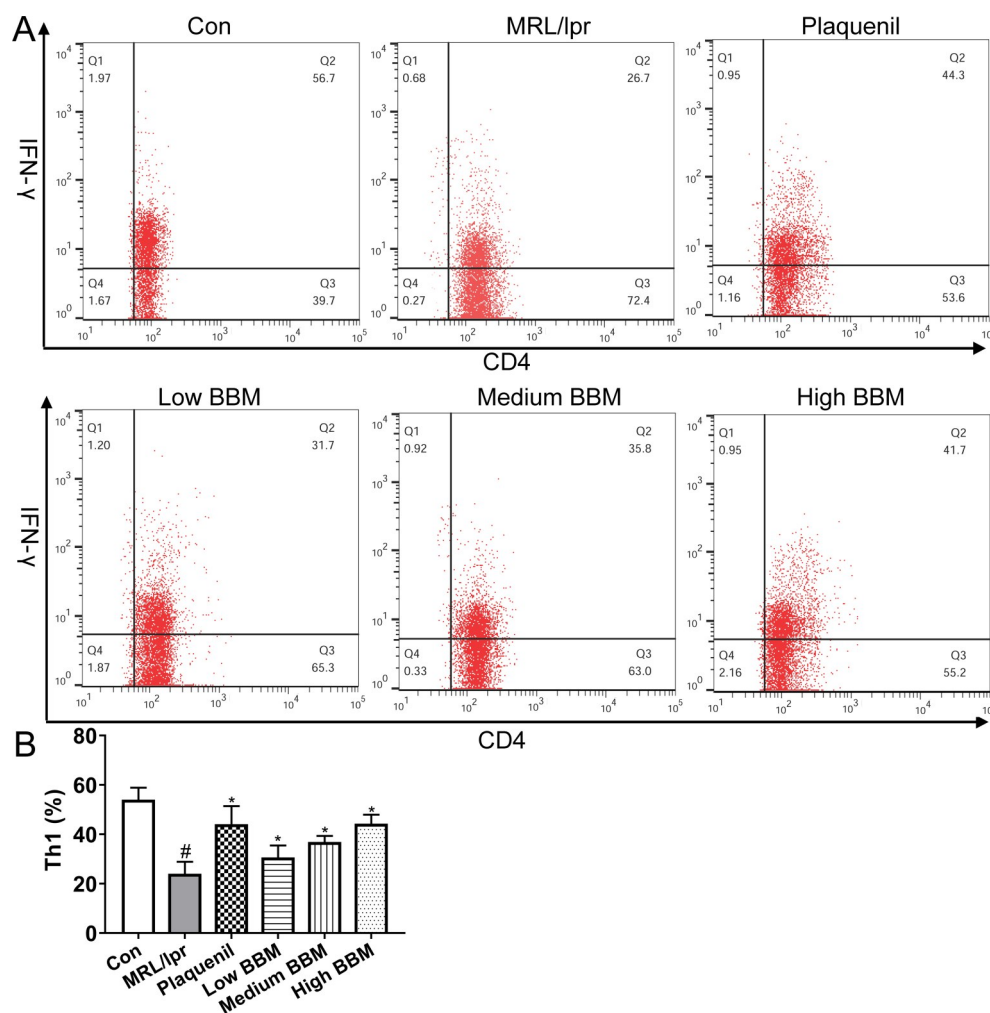


图 2. 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏中Th1细胞比例

Fig. 2. The proportion of Th1 cells in spleen of different groups detected by flow cytometry. *A*: Results of flow cytometry. Th1 cells are CD4⁺IFN- γ ⁺ cells. *B*: The proportion of spleen Th1 cells of different groups. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^{*} $P < 0.05$ vs MRL/lpr mice, [#] $P < 0.05$ vs Con. BBM: berbamine.

小鼠脾脏中Th1细胞特异性转录因子T-bet及Th2细胞功能分化关键转录因子GATA3的mRNA水平变化。T-bet是属于T-box家族转录因子，选择性地表达于Th1细胞，在Th1细胞分化中有决定性作用；而GATA3调控Th2细胞功能分化，二者的水平变化反映了Th1及Th2细胞的分化。结果显示，与对照组相比，MRL/lpr狼疮小鼠脾脏的T-bet mRNA水平显著下降，GATA3 mRNA水平显著上调，纷乐处理能显著提高MRL/lpr狼疮小鼠脾脏的T-bet mRNA水平(图4A)，降低GATA3 mRNA水平(图4B)。与MRL/lpr狼疮小鼠组相比，不同浓度BBM干预后T-bet mRNA水平显著上调，GATA3 mRNA水平显著下降。Western blot结果(图4C)显示：与对照组相比，MRL/lpr狼疮小鼠脾脏T-bet蛋白表达水平下

降，GATA3蛋白表达水平上调。与MRL/lpr狼疮小鼠相比，BBM干预后T-bet蛋白水平发生显著上调，GATA3蛋白表达水平显著下降，且BBM对T-bet及GATA3水平的影响呈剂量依赖性。

2.5 BBM对MRL/lpr狼疮小鼠外周血白细胞数目的影响

SLE常伴随血液系统异常，患者白细胞或粒细胞减少或缺乏，而BBM是常用的升白药物。各组小鼠血常规检测结果如图5显示：与对照组相比，MRL/lpr狼疮小鼠的外周血白细胞数目显著减少。纷乐治疗后，白细胞数量较MRL/lpr狼疮小鼠显著升高，与对照组无明显差异。与MRL/lpr狼疮小鼠相比，BBM干预后白细胞数目上升，且中浓度及高浓度组的白细胞数量显著上升。

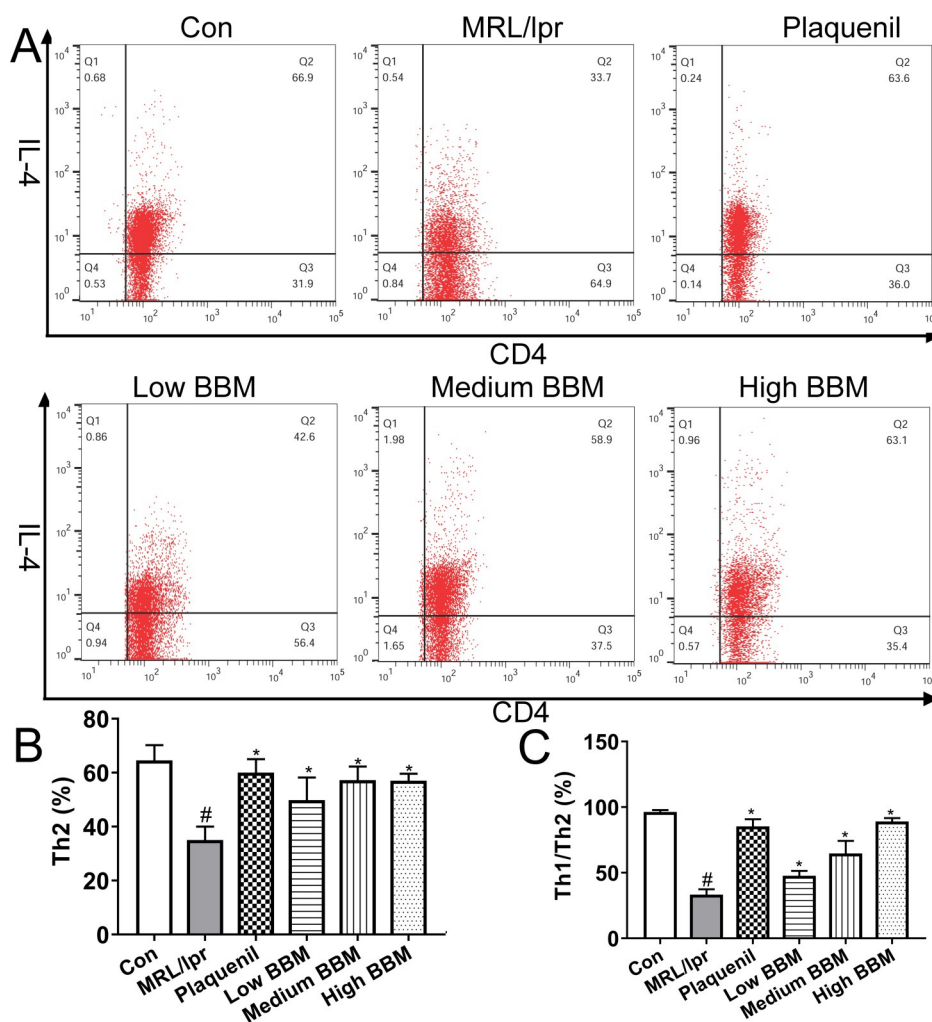


图 3. 流式细胞仪检测各组小鼠脾脏中 Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值

Fig. 3. The proportion of Th2 cells and the ratio of Th1/Th2 in spleen of different groups detected by flow cytometry. A: Results of flow cytometry. Th2 cells are CD4⁺IL-4⁺ cells. B: The proportion of spleen Th2 cells of different groups. C: The ratio of Th1/Th2. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^{*} $P < 0.05$ vs MRL/lpr mice, [#] $P < 0.05$ vs Con. BBM: berbamine.

2.6 BBM对MRL/lpr狼疮小鼠肾组织病理学变化的影响

我们进一步对各组小鼠的肾组织病理学进行检测。HE染色结果(图6)显示：对照组小鼠肾脏无异常病理学变化。MRL/lpr狼疮小鼠肾脏中肾小球系膜及内皮细胞明显增生，肾小球肿大、模糊(黑色框及箭头)，部分可见球囊粘连(红色框及箭头)，毛细血管扩张明显，管腔内可见大量透明样血栓(黄色框及箭头)，且肾间质内可见明显的炎症细胞浸润(绿色框及箭头)。纷乐及中、高浓度BBM治疗后，炎症细胞浸润均有明显好转，毛细血管血栓明显减少。低浓度BBM处理对MRL/lpr狼疮小鼠肾脏病理学无明显改善作用。

3 讨论

SLE是一种由多因素参与，导致多系统损害的自身免疫性疾病。其治疗需根据患者临床分型不同，制定个性化治疗方案，临床上多使用激素类药物和免疫药物等进行治疗^[1, 12, 13]。BBM是小檗属植物中提取的双苄基异喹啉类生物碱^[14]，具有促进白细胞增生、抗炎、降血压、治疗糖尿病，抗肿瘤等作用；同时对免疫系统有一定的调节作用，可抑制机体内细胞毒性淋巴细胞增殖，清除自由基，抗氧化等^[15]。本研究旨在探讨BBM用于治疗SLE的有效性。ANA、抗dsDNA抗体、抗snRNP/Sm抗体水平是筛查SLE的常用指标^[16]，本研究发现BBM可显著下调狼疮小鼠自身抗体水平，缓解血管炎症，

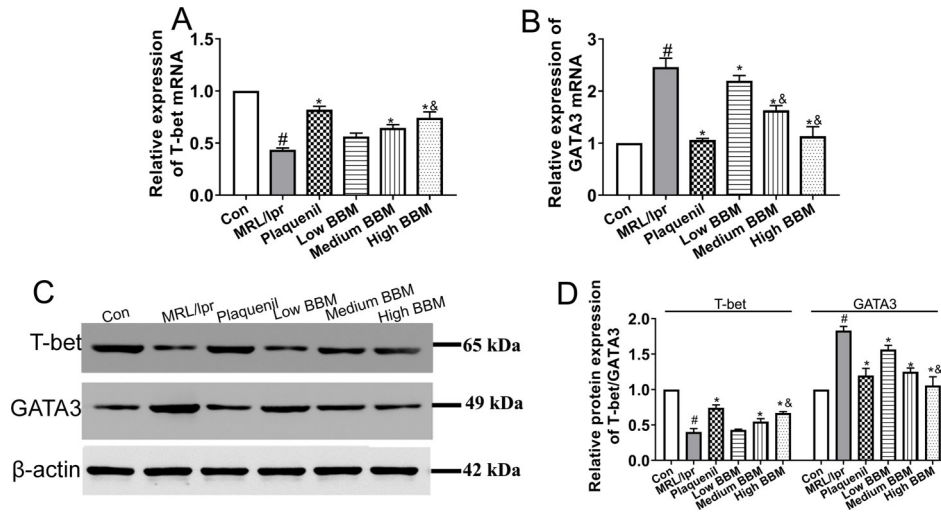


图 4. 各组小鼠脾脏 T-BET、GATA3 mRNA 及蛋白水平

Fig. 4. The mRNA and protein expression of spleen T-bet and GATA3 in different groups. A/B: The mRNA expression of spleen T-bet and GATA3. C: The protein expression of spleen T-bet and GATA3. D: Quantitative analysis of gray values of T-bet and GATA3. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^{*} $P < 0.05$ vs MRL/lpr mice, [#] $P < 0.05$ vs Con, [&] $P < 0.05$ vs Low BBM. BBM: berbamine.

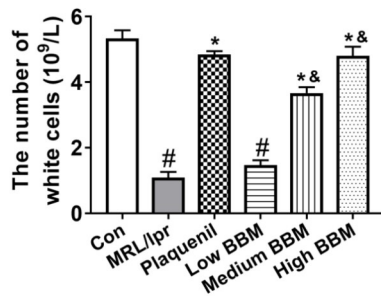


图 5. 各组小鼠血液白细胞数目

Fig. 5. The number of white blood cells in different groups. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ^{*} $P < 0.05$ vs MRL/lpr mice, [#] $P < 0.05$ vs Con, [&] $P < 0.05$ vs Low BBM. BBM: berbamine.

对 SLE 有一定的治疗作用。

导致 SLE 免疫功能障碍的机制极其复杂, 细胞因子产生的改变、补体激活、B 淋巴细胞过度激活伴随的免疫球蛋白库的改变等导致机体不断产生过度的自身抗体。SLE 的特征之一是抗体过度产生, 并使其丧失了对自身抗原的免疫耐受性。研究发现, SLE 的发病与机体内 Th1/Th2 细胞的比值有关。CD4⁺T 淋巴细胞可根据 IFN- γ /IL-4 的产生分为 Th1 和 Th2 亚群, 主要参与体液免疫和细胞免疫。SLE 患者的 Th1/Th2 细胞比例失调^[17–19]。Th1 细胞因子, 如 IL-2, TNF- α 和 IFN- γ , 参与细胞介导的对胞内细菌和病毒病原体的免疫, Th2 细胞因子, 如 IL-4, IL-6 及 IL-10, 参与增强体液免疫, 抵抗胞外细菌、

寄生虫、毒素和过敏原, 可促进 B 细胞活化, 诱导 IgG1 产生。本研究发现 SLE 小鼠脾脏组织中 Th1 细胞比例下降, Th1/Th2 比值显著降低, 而 BBM 治疗后可以提高 Th1 细胞比例, 逆转 Th1/Th2 比值的下调, 对机体有一定的免疫调节作用。有相关研究发现, 部分 SLE 患者 Th1/Th2 细胞比值上升^[2], 这可能与研究对象和发病机制尚未完全清楚有关, 有待进一步研究。T-bet 与 GATA3 分别是 Th1 和 Th2 细胞分化过程中的重要转录因子, 二者的表达水平间接反映了 Th1 及 Th2 细胞的分化^[20, 21]。本研究发现 T-bet 与 GATA3 mRNA 和蛋白水平在机体内与 Th1/Th2 细胞比值的变化一致。BBM 能促进 T-bet 的表达, 进而促进 Th1 细胞分化, 对 SLE 有一定的免疫调节作用。

SLE 患者常出现血液系统异常, 因白细胞或粒细胞减少或缺乏导致严重感染, 既影响系统性治疗效果, 也是患者临床死亡的主要原因之一。BBM 是临床常用的升白药物, 能提高造血干细胞集落因子水平, 促进白细胞增殖^[22]。本研究发现, BBM 治疗后能显著提高 SLE 小鼠中的外周血白细胞数量。

已有研究报道了 MRL/lpr 狼疮小鼠肾组织病理学变化: 肾间质内少量炎细胞浸润, 肾间质毛细血管扩张充血, 局灶性淋巴细胞、浆细胞及少量巨噬细胞、中性粒细胞浸润, 部分区域肾小管上皮细胞水样变性, 肾小球毛细血管基底膜略增厚, 血管扩

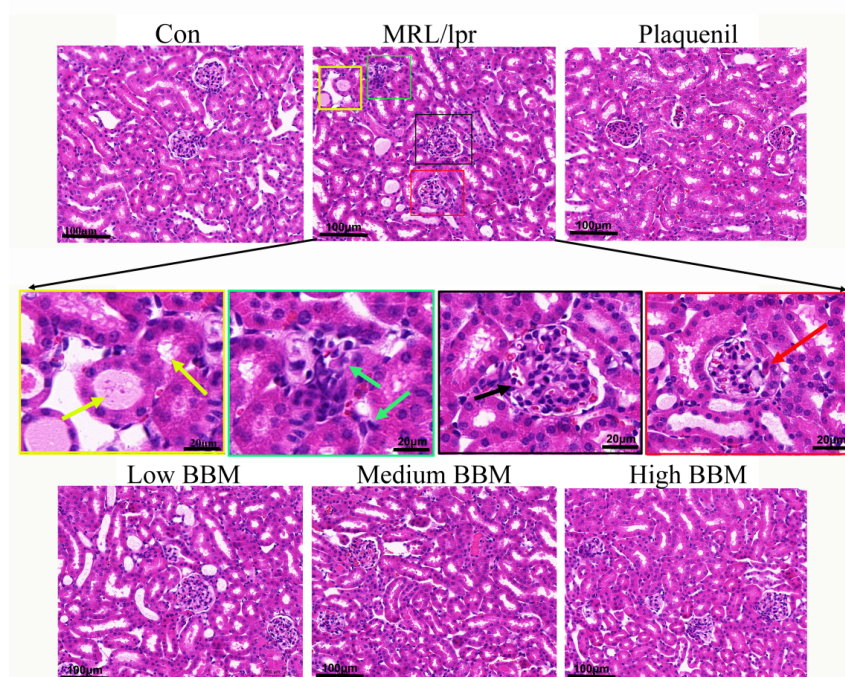


图 6. HE 染色检测各组小鼠肾组织病理学变化

Fig. 6. The histopathological changes of kidneys in each group of mice detected by HE staining. Black frame and arrows: the glomeruli are swollen and blurred. Red frame and arrows: glomerular capsule adhesion. Yellow frame and arrows: noticeable capillary dilation with numerous hyaline thrombi within the lumen. Green frame and arrows: inflammatory cell infiltration in the renal interstitium. BBM: berbamine. Scale bar, 100 μ m or 20 μ m.

张充血明显。偶见肾小球内细胞数增多，内见少量中性粒细胞浸润，基底膜略增厚^[23]。本研究发现，中、高浓度 BBM 干预后，能部分缓解 MRL/lpr 狼疮小鼠肾脏炎症细胞浸润，减少毛细血管血栓。

综上所述，BBM 对 SLE 有一定的免疫调节作用，且对 SLE 造成的血液白细胞的减少有一定的治疗作用，为 BBM 治疗 SLE 以及联合用药提供了一定的理论基础。

参考文献

- Kiriakidou M, Ching CL. [Systemic lupus erythematosus](#). *Ann Intern Med* 2020 2; 172(11): ITC81-ITC96.
- Li H, Boulougoura A, Endo Y, Tsokos GC. [Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus: new insights in pathogenesis and therapeutic strategies](#). *J Autoimmun* 2022; 132: 102870.
- Muhammad Yusoff F, Wong KK, Mohd Redzwan N. [Th1, Th2, and Th17 cytokines in systemic lupus erythematosus](#). *Autoimmunity* 2020; 53(1): 8-20.
- Hao HQ (郝慧琴), Zhang SR, Li XF, Chen JW, Luo J, Lv ZQ. Correlation between Th1 and Th2 cytokines and systemic lupus erythematosus. *Chin Remed Clin (中国药物与临床)* 2018; 18(1): 7-9 (in Chinese).
- Zhao GQ (赵国庆), Xu SZ, Li SP, Zhang L. Mixture injection of Chinese herbal drugs in the treatment of BXSB mouse systemic lupus erythematosus. *Chin J Rheumatol (中华风湿病学杂志)* 2001; 5(3): 175-177 (in Chinese).
- Shi CZ (史程志), Wang KJ, Yan YJ, Deng WH, Lu BY, Xie S, Sui DS. Analyzing the mechanism of Houttuyniae Herba-Leonuri Herba in treating systemic lupus erythematosus based on network pharmacology and molecular docking technology. *J J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报)* 2024; 41(12): 3293-3300 (in Chinese).
- Xie TH (谢添弘), Liu X, Wang P, Li P. Research progress on the treatment of systemic lupus erythematosus with traditional Chinese medicine. *Hebei J TCM (河北中医)* 2024; 46(9): 1575-1579 (in Chinese).
- Jia XJ, Li X, Wang F, Liu HQ, Zhang DJ, Chen Y. [Berbamine exerts anti-inflammatory effects via inhibition of NF-kappaB and MAPK signaling pathways](#). *Cell Physiol Biochem* 2017; 41(6): 2307-2318.
- Zhang H, Zhu T, Fu R, Peng Y, Jing P, Xu W, Wang H, Li S, Shu Z, Yin Y, Zhang X. [Combination of detoxified pneumolysin derivative \$\Delta\$ A146Ply and berbamine as a treatment approach for breast cancer](#). *Mol Ther Oncolytics* 2020; 18: 247-261.
- Liu X (刘新), Zhou ZR. The effects of berbamine on the

- immunoregulation of BALB/c mice. *J Chin Med Univ* (中国医科大学学报) 1996; 25(3): 229-231 (in Chinese).
- 11 Wu SG, Zhang GL. [Synthesis and antitumor activity *in vitro* of novel berbamine derivatives](#). *J Asian Nat Prod Res* 2021; 23(7): 681-691.
 - 12 Lazar S, Kahlenberg JM. [Systemic lupus erythematosus: new diagnostic and therapeutic approaches](#). *Annu Rev Med* 2023; 74: 339-352.
 - 13 Tunnicliffe DJ, Singh-Grewal D, Kim S, Craig JC, Tong A. [Diagnosis, monitoring, and treatment of systemic lupus erythematosus: a systematic review of clinical practice guidelines](#). *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2015; 67(10): 1440-1452.
 - 14 Zhang L (张蕾). [The anti-lymphoma activity and mechanism of novel 4-chlorobenzoyl Berberine in c-MYC positive diffuse large B cell lymphoma cells \[D\]](#). Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2018 (in Chinese).
 - 15 Zhu CY (朱灿阳). Analysis of the pharmaceutical action of EBB. *Chin Tropic Med* (中国热带医学) 2005; 5(1): 109-110 (in Chinese).
 - 16 Yu H, Nagafuchi Y, Fujio K. [Clinical and immunological biomarkers for systemic lupus erythematosus](#). *Biomolecules* 2021; 11(7): 928.
 - 17 Wu DH (吴东海). Systemic lupus erythematosus and Th1/Th2. *Chin J Rheumatol* (中华风湿病学杂志) 2002; 6(1): 5-6 (in Chinese).
 - 18 Wang YY(王元元), Chai JX, Sun MQ, He WX, Hu XD, Zou WY, Li HH, Lu Y, Xie CH. Glycyrrhizic acid modulates the immunity of MRL/lpr mice and related mechanism. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志) 2017; 33(3): 305-309 (in Chinese).
 - 19 Wang BA (王宝安), Yang AC, Huang Z. Changes of immune and vascular endothelial function in patients with newly diagnosed mild active systemic lupus erythematosus. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药) 2019; 23(6): 57-59 (in Chinese).
 - 20 Butcher MJ, Zhu J. [Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice](#). *Fac Rev* 2021; 10: 30.
 - 21 Levine AG, Mendoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, Hoyos BE, Putintseva EV, Chaudhry A, Dikiy S, Fujisawa S, Chudakov DM, Treuting PM, Rudensky AY. [Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet](#). *Nature* 2017; 546(7658): 421-425.
 - 22 Zhang XP (张喜平), Zhang X, Zou DH, Yang HJ. Experimental study on the treatment of chemotherapy-related leukopenia with oral drugs increasing white cell. *Chin J Clin Pharmacol Therap* (中国临床药理学与治疗学) 2015; 20(7): 860-865 (in Chinese).
 - 23 Peng XH (彭秀华), Feng YL, Yang H, Shen Y, Yang YX, Zhou WJ. Histopathological observations of kidney, spleen, and lymph nodes in MRL/lpr lupus mice. *Lab Anim Comp Med* (实验动物与比较医学) 2008; 28(1): 33-35 (in Chinese).