

白芍总苷对原发性干燥综合征浆细胞样树突状细胞影响的研究

李晓玲, 汪国生, 李向培, 厉小梅

摘要 目的 探讨白芍总苷(TGP)治疗对原发性干燥综合征(pSS)患者外周血浆细胞样树突状细胞(pDC)的影响。方法 收集新发pSS患者17例作为疾病组,每日予以TGP 1.8 g治疗3个月,对照组17例。采用流式细胞术检测疾病组治疗前、后及对照组pDC及其表面CD32、CD86、CXCR4和Blys表达;ELISA法检测血浆干扰素- α (IFN- α)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;免疫组化法检测25例pSS患者唇腺pDC浸润。结果 ① pSS患者外周血pDC比例较对照组下降,pDC表达CXCR4比例较对照组增加,血浆IL-6、TNF- α 、IFN- α 水平较对照组上升,25例pSS患者唇腺中19例有pDC浸润;② TGP治疗后,pSS患者外周血pDC比例较治疗前上升;pDC表达CXCR4、Blys比例较治疗前下降;TGP治疗后血沉下降;血浆IL-6、TNF- α 水平治疗后下降。结论 新发pSS患者较正常者外周血pDC比例降低,表达CXCR4增加,唇腺组织中有pDC浸润;TGP可能抑制pSS患者pDC活化。

关键词 原发性干燥综合征;白芍总苷;浆细胞样树突状细胞;TNF- α ;IFN- α ;IL-6

中图分类号 R 392.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1281-05

原发性干燥综合征(primary Sjögren's syndrome, pSS)是一种主要累及外分泌腺体的自身免疫性疾病。研究^[1-2]表明固有免疫异常、B细胞活化在pSS疾病早期发生和发展中起主要作用,pSS中浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC)水平和功能异常逐渐被认识。研究^[3]显示,pSS患者外周血pDC数量减少,免疫组化发现唾液腺中有pDC的浸润,认为外周血中活化的pDC可能转移到靶器官中。白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)是芍药根部提炼的主要生物活性成分,动物实验^[4]曾显示TGP能抑制DC对抗原的递呈及DC的成熟,降低促炎症性细胞因子产生。目前关于TGP对pSS患者体内pDC影响暂无研究。该研究通过观察TGP治疗前后pSS患者外周血pDC比例、表面

CD32、CD86、趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)和B淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, Blys)表达变化,探索其作用机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学附属省立医院2013年10月~2014年6月门诊17例新发未用药的pSS患者作为疾病组,其中男1例,女16例;年龄29~56(42.1 \pm 14.3)岁,均符合美国风湿病协会(ACR)2002年修订的干燥综合征诊断标准,每日予以TGP 3次,每次0.6 g,治疗3个月;其中2例因继发肺部感染退出研究,剩余15例作为治疗组。17例健康志愿者作为对照组,其中男7例,女10例;年龄22~30(24.5 \pm 3.7)岁。研究对象均知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)的分离 所有研究对象抽取EDTA抗凝静脉血5 ml, Ficoll-hypaque密度梯度离心分离外周血PBMC, 190 r/min离心10 min, 留取血浆后用等体积的PBS液稀释一倍,加入淋巴细胞分离液密度梯度离心, 410 r/min离心25 min。收集单个核细胞层于15 ml离心管中,用PBS液洗涤2次,得到PBMC,细胞计数基本在 1×10^6 个。

1.2.2 pDC比例检测 流式细胞术检测pDC比例。将PBMC细胞悬液分别加入4根流式管内,每管150 μ l,均加入荧光标记Lin⁻-FITC 10 μ l, CD123⁺-Prep-Cy5.5 5 μ l, HLA-DR⁺-APC 5 μ l,每管分别加入荧光抗体CD32-PE 10 μ l、CXCR4-PE 10 μ l、CD86-PE 10 μ l、Blys-PE 5 μ l,震荡混匀后室温避光放置30 min。每管加入3 ml PBS混匀后洗涤(190 r/min 5 min),加入200 μ l PBS重悬,流式细胞仪检测,pDC比例以pDC占PBMC比例表示。

1.2.3 细胞因子测定 疾病组治疗前、对照组各17例,疾病组治疗后15例,双抗体夹心ABC-ELISA法检测血浆干扰素- α (interferon- α , IFN- α)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)水平。具体实验步骤按ELISA检测试剂盒说明书进行。标准品浓度按倍比稀释,标准品浓度2 000、1 000、500、250、125、62.5、

2015-05-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81072462)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科,合肥 230001

作者简介:李晓玲,女,硕士研究生;

汪国生,男,硕士生导师,责任作者,E-mail: gswang0551@163.com

31.25、0 pg/ml。酶标仪在 492 nm 处测光密度(optical density ,OD) 值。根据标准曲线测出样品浓度 ,结果以 pg/ml 表示。

1.2.4 唇腺免疫组化 选取 pSS 患者唇腺石蜡标本 25 例 均为女性 ,唇腺病理满足 Chisholm 标准 III 级及以上 ,标记免疫组化抗体观察 pDC (IL-3R/ CD123) 在唇腺组织中浸润及 pDC 表达 CD32、CX- CR4 情况。石蜡切块制成厚度为 2 μm 连续冰冻切片 ,常规脱蜡 ,免疫组化染色 ,加入稀释一抗 ,室温下孵育 3 h ,PBS 冲洗后加入二抗 ,室温下孵育 30 min ,冲洗后 DAB 显色、复染、封片后显微镜下观察并扫描 图像拍照及分析。

1.3 仪器与试剂 流式细胞仪型号为 BD Facscaibur; 淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司; Lin⁻-FITC、CD123⁺ Prep-Cy5. 5、HLA- DR⁺-APC、CD32-PE、CXCR4-PE、CD86-PE 购自美国 BD 公司; Blys-PE 购自美国 ebioscience 公司; IFN-α ELISA 试剂盒购自美国 Bender 公司; TNF-α、IL-6 ELISA 试剂盒购自深圳达科为公司; 兔抗 IL-3R 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 兔抗 CD32 多克隆抗体、兔抗 CXCR4 多克隆抗体购自北京博奥森生物科技公司。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism5 软件作数据处理 ,定量指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,正态分布资料多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA) 组间比较 SNK *q* 检验 ,配对定量资料的比较采用配对样本 *t* 检验。正态分布的相关分析采用双变量相关分析。

2 结果

2.1 疾病组临床资料分析 疾病组中 2 例 pSS 患者因继发肺部感染退出本次研究。其中抗 SSA 抗体阳性 9 例 ,抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体阳性 6 例 ,抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体均阴性 2 例; 白细胞减少者 4 例; 血沉(ESR) 为(34. 86 ± 7. 0) mm/h ,IgA(3. 08 ± 1. 4) g/L ,IgG(20. 36 ± 6. 0) g/L ,IgM(1. 29 ± 0. 83) g/L; 以口干、眼干为首表现者 13 例 ,腺体外表现 8 例 ,关节炎 2 例 ,发热 2 例 ,皮疹 2 例 ,猖獗性龋齿 2 例; 干燥综合征活动性评分(ESSDAI) 为 0 ~ 5 分。

2.2 TGP 治疗对 pSS 患者 pDC 的影响 pSS 治疗前后、对照组之间外周血 pDC 比例差异有统计学意义(*P* < 0. 05) 。新发 pSS 患者外周血 pDC 比例较对照组下降(*P* < 0. 05) ,TGP 治疗 3 个月 pSS 患者外周血 pDC 比例上升(*P* < 0. 05) 。见图 1。

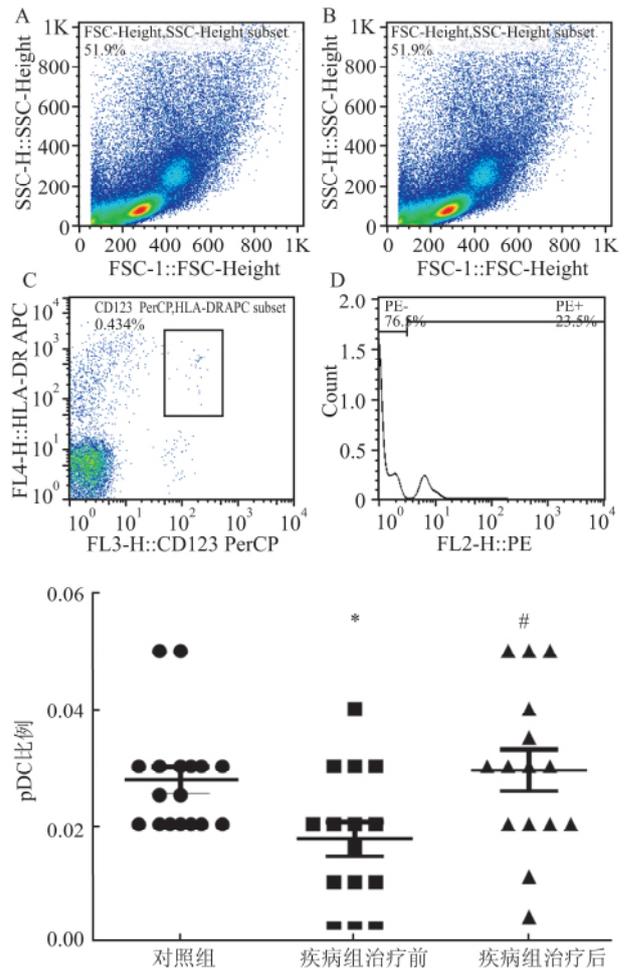


图 1 疾病组治疗前、治疗后及对照组 pDC 比例变化

A、B、C: pDC 占 PBMC 比例流式图; D: PE 标记(CD32、CD86、CXCR4、Blys) 阳性比例流式图; 与对照组比较: * *P* < 0. 05; 与治疗前比较: # *P* < 0. 05

2.3 TGP 治疗对 pSS 患者 pDC 表面 CXCR4、Blys、CD32 和 CD86 的影响 pSS 治疗前后、对照组 3 组间 pDC 表达 CXCR4 和 Blys 差异有统计学意义(*P* < 0. 05) ,表达 CD32、CD86 比例之间差异无统计学意义。新发 pSS 患者 pDC 表达 CXCR4 比例较对照组明显增加(*P* < 0. 05) ,TGP 治疗后 pDC 表达 CXCR4、Blys 比例较下降(*P* < 0. 05) 。见图 2。

2.4 pSS 患者唇腺 pDC 浸润情况 25 例 pSS 患者唇腺组织中 19 例有 pDC(IL-3R/CD123 标记) 浸润 ,为膜表达/质表达阳性 ,同时 pDC 表达 CD32 阳性 17 例、表达 CXCR4 阳性 18 例。其中 15 例唇腺病理分级为 III 级 ,10 例为 IV 级 ,16 例以口干为首表现 22 例口眼干燥实验异常(唾液流率 < 2 g/2 min ,泪液流率 < 10 mm/5 min) 。实验表明 pDC 浸润多位于唇腺组织间质(导管及腺泡) 周围 ,淋巴细胞灶性区域呈散在分布。见图 3。

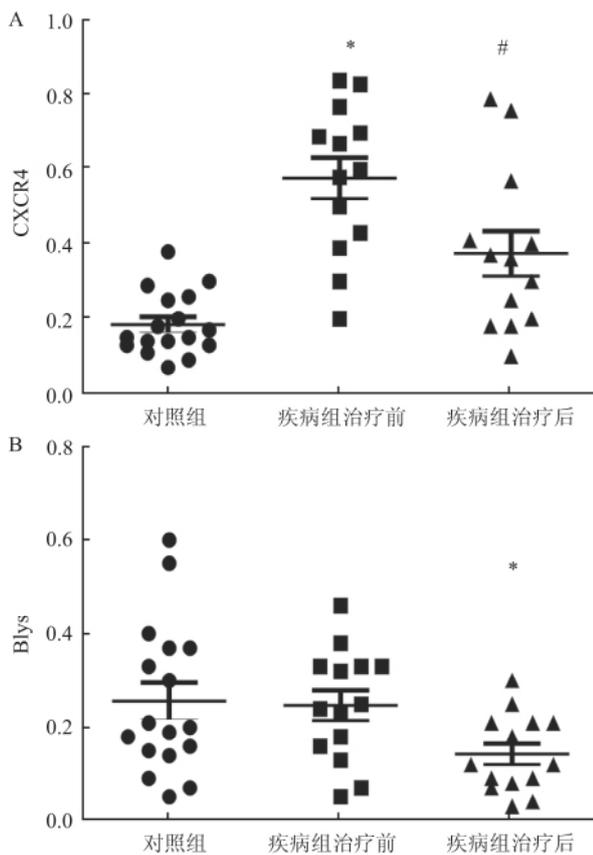


图2 疾病组治疗前、后及对照组 pDC 表达 CXCR4(图 A)、Blys(图 B) 比例变化
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与疾病组治疗前比较: # $P < 0.05$

2.5 pSS 患者 TGP 治疗后临床参数的变化 TGP 治疗后 ESR 下降, 差异有统计学意义 ($P = 0.033$)。见表 1。

表 1 pSS 患者 TGP 治疗后临床参数的变化

临床数据	治疗前	治疗后	t 值
WBC($\times 10^9/L$)	5.22 \pm 2.02	4.73 \pm 1.75	0.419
RBC($\times 10^{12}/L$)	4.04 \pm 0.47	4.09 \pm 0.45	-0.691
HB(g/L)	117.90 \pm 16.03	120.65 \pm 15.65	-1.130
PLT($\times 10^9/L$)	194.50 \pm 54.31	201.07 \pm 76.16	-0.278
Neu($\times 10^9/L$)	2.65 \pm 1.08	2.92 \pm 1.84	-0.282
Lym($\times 10^9/L$)	1.52 \pm 0.53	1.45 \pm 0.34	-0.050
ESR(mm/H)	34.85 \pm 24.10	20.90 \pm 15.34*	2.369
IgA(g/L)	3.15 \pm 1.09	2.93 \pm 0.95	0.371
IgG(g/L)	18.02 \pm 4.00	17.42 \pm 5.20	0.753
IgM(g/L)	1.21 \pm 0.52	1.12 \pm 0.44	0.420
ESSDAI(分)	2.58 \pm 1.70	2.00 \pm 1.47	1.020

与治疗前比较: * $P < 0.05$

2.6 TGP 治疗对 pSS 患者血浆 IL-6、TNF- α 、IFN- α 水平的影响 pSS 治疗前后、对照组 3 组间血浆 IL-6、TNF- α 、IFN- α 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。新发 pSS 患者血浆 IL-6、TNF- α 、IFN- α 水平较正常者升高 ($P < 0.05$) ,TGP 治疗后血浆 IL-6、TNF- α 水

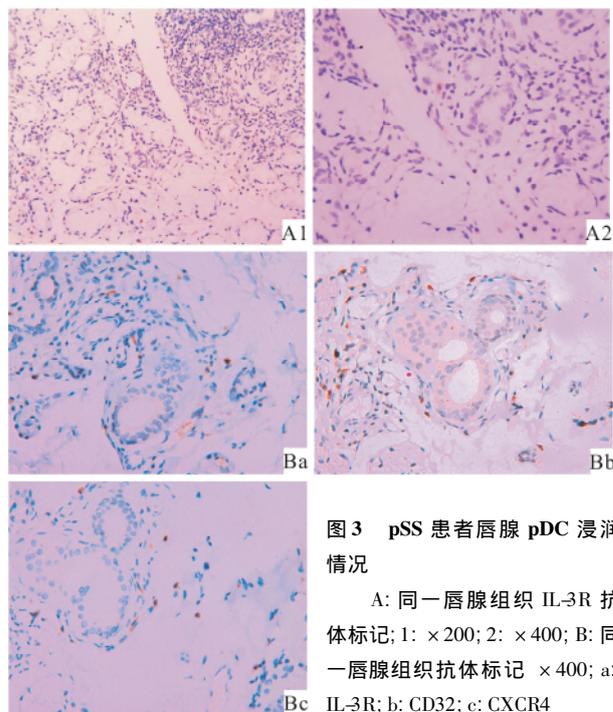


图 3 pSS 患者唇腺 pDC 浸润情况

A: 同一唇腺组织 IL-3R 抗体标记; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$; B: 同一唇腺组织抗体标记 $\times 400$; a: IL-3R; b: CD32; c: CXCR4

平下降 ($P < 0.05$)。新发 pSS 患者血浆 IL-6 水平与 pDC 比例呈显著负相关性 ($P < 0.05$) ; 新发 pSS 患者血浆 TNF- α 、IFN- α 水平间呈正相关性 ($r = -0.664, 0.562 P < 0.05$)。见图 4、5。

3 讨论

在系统性红斑狼疮、pSS 等自身免疫性疾病中, pDC 异常逐渐被认识。研究^[3, 5]显示 pDC 在 pSS 患者外周血中数目及占白细胞比例下降, 唾液腺中发现免疫组化标记的 pDC 浸润, 正常者唾液腺中无 pDC 浸润。本研究显示新发 pSS 患者外周血 pDC 比例较正常者减低, 表面趋化因子受体 CXCR4 表达增加, 唇腺组织中发现表达 CD32、CXCR4 的 pDC 浸润, 证实了外周血中活化的 pDC 在趋化因子 CXCL12 等作用下募集到外分泌腺体等组织中, 导致外周血中比例下降。动物实验^[4]显示, TGP 可以抑制 T、B 淋巴细胞增殖, 降低炎症性细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 及 IL-2 等产生; 体外实验^[6]显示 TGP 通过选择性抑制 NF- κ B、AP-1 阻断 TLR-4/5 信号途径从而抑制 DC 活化及趋化, 减少炎症性细胞因子产生。本研究显示经 TGP 治疗后 pSS 患者体内 pDC 比例上升, pDC 表达 CXCR4 比例下降, 提示 TGP 抑制 pSS 患者外周血 pDC 活化, 降低 pDC 表达 CXCR4 水平, 抑制 pDC 转移到外周组织, 减少组织中炎症性细胞因子释放, 避免系统累及及损害。

pDC 在炎性细胞因子、微生物、免疫复合物等刺

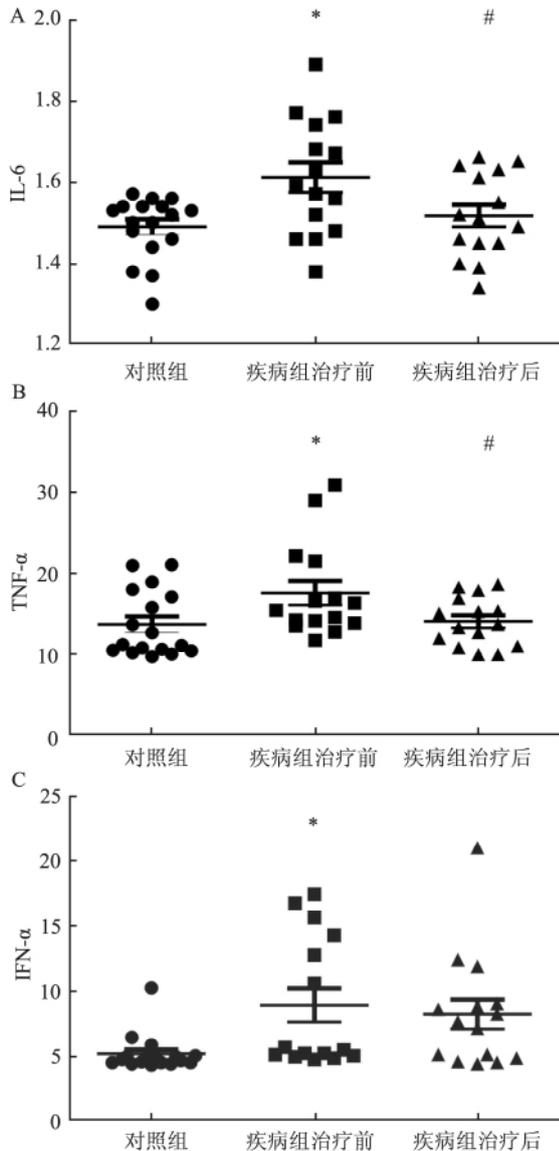


图4 疾病组治疗前后、对照组血浆 IL-6、TNF-α、IFN-α 水平
A: IL-6; B: TNF-α; C: IFN-α; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与疾病组治疗前比较: # $P < 0.05$

激下成熟, MHC II 类分子及共刺激分子 CD40、CD80、CD86 表达上调, 而研究^[7]显示脓毒症患者外周血中 DC 表达 MHCII 类及共刺激分子水平下降, 即使脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激下 CD86 表达依然没有上调, 分析其原因可能是刺激因素不足或缺乏树突状细胞共刺激信号因而削减了凋亡等诱发的 DC 活化。研究^[8]显示肺炎患者外周血 pDC 中, CD32、CD86 表达均无差异, 推测外周血中病毒、细菌等刺激成熟 DC 转移到外周组织中, 骨髓生成未成熟 DC 增加, 故外周血中检测 pDC 表达 CD32、CD86 减少。本研究未显示 TGP 治疗前后及对对照组 pDC 表达 CD32、CD86 之间有明显差异。Blys 体外经病毒等刺激下在外周血、唾液腺中表达增加, 促进

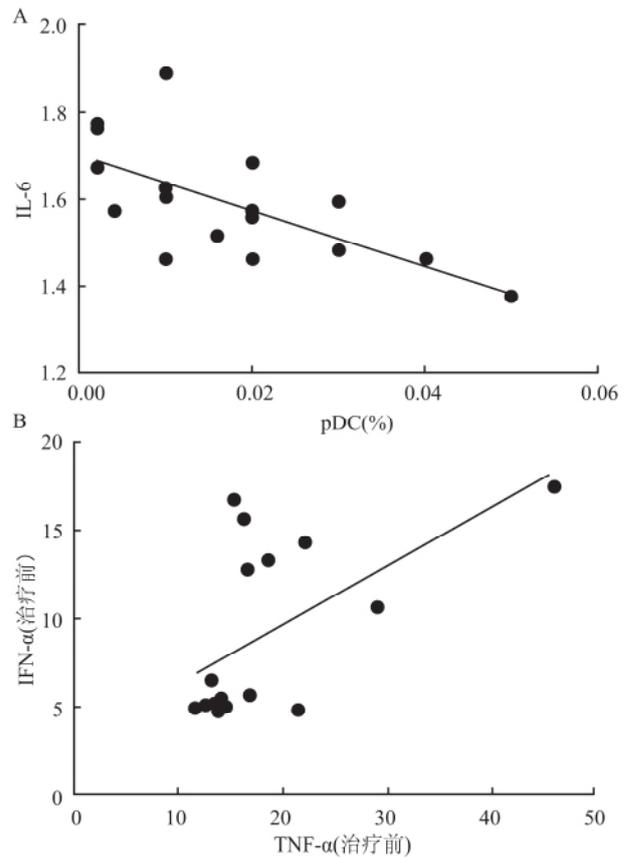


图5 细胞因子间相关性

A: pSS 患者 IL-6 与 pDC 比例与细胞因子间相关性; B: pSS 治疗前 IFN-α 与 TNF-α 间相关性

B 淋巴细胞成熟。研究^[9]显示 B 细胞能够提高 pDC 产生的 IFN-α 水平, 本研究中 TGP 治疗后 pDC 表达 Blys 下降, 意味着 TGP 抑制 pSS 患者体内 pDC 表达 Blys 水平, 从而减少 B 细胞活化, 影响自身抗体的产生、生发中心的形成及细胞因子水平。

pDC 被称作是天然的 I 型干扰素产生细胞, 分泌的 IFN-α/β 为其他细胞的 1 000 倍, 本研究用 ELISA 法检测新发 pSS 患者血浆 TNF-α、IFN-α、IL-6 水平, 显示其较正常者水平上升, 而 TGP 治疗可抑制 TNF-α、IL-6 分泌。此外, 有研究^[10]显示 TNF-α 可抑制 pDC 释放 IFN-α, 使用 TNF-α 抑制剂依那西普治疗后 pSS 患者 IFN-α 活性增加, 体外实验也证实 TNF-α 有抑制 SLE 血清 IFN-α 分泌的能力, 而本研究显示新发 pSS 患者 TNF-α 与 IFN-α 呈正相关性, 经 TGP 治疗后 TNF-α 与 IFN-α 呈负相关性趋势, 但差异无统计学意义, 关于 TGP 与 TNF-α 与 IFN-α 间相互作用仍需进一步研究。IL-6 是一种炎症急性期分泌的细胞因子, 促进 B 细胞增殖分化及浆细胞形成。Jego et al^[11]发现 CD40 信号刺激下

pDC 产生大量 IL-6 促进 B 细胞活化产生抗体。在 pSS 患者唾液腺上皮和血清中也发现 IL-6 的高表达 阻断 IL-6 或其受体能减少系统及局部的炎症, 减少 B 细胞活化、浆细胞形成, 以及自身抗体形成^[12-13]。本研究显示 pSS 患者血浆 IL-6 水平较正常者明显升高, 与外周血 pDC 水平负相关, 可能外周血中 pDC 活化后产生大量炎症细胞因子 IL-6, 引起血浆中 IL-6 水平升高。

本研究表明 TGP 可以降低 pSS 患者 ESR 在对于 pSS 患者症状改善及其余临床指标的治疗中无明显差异 可能与因为本研究中 TGP 治疗时间较短相关。

参考文献

- [1] Mariette X, Gottenberg J E. Pathogenesis of Sjögren's syndrome and therapeutic consequences [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, 22 (5): 471-7.
- [2] Båve U, Nordmark G, Lövgren T, et al. Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(4): 1185-95.
- [3] Vogelsang P, Brun J G, Ojordsbakken G, et al. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome [J]. *Ann Rheum Dis* 2010, 69(6): 1235-8.
- [4] Lin J, Xiao L, Ouyang G, et al. Total glucosides of paeony inhibits Th1/Th17 cells *via* decreasing dendritic cells activation in rheumatoid arthritis [J]. *Cell Immunol*, 2012, 280(2): 156-63.
- [5] Gottenberg J E, Cagnard N, Lucchesi C, et al. Activation of IFN

- pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2770-5.
- [6] Zhou Z, Lin J, Huo R, et al. Total glucosides of paeony attenuated functional maturation of dendritic cells *via* blocking TLR4/5 signaling *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol* 2012, 14(3): 275-82.
- [7] Riccardi F, Della Porta M G, Rovati B, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis [J]. *Cytometry B Clin Cytom* 2011, 80(1): 14-21.
- [8] Dreschler K, Bratke K, Petermann S, et al. Altered phenotype of blood dendritic cells in patients with pneumonia [J]. *Respiration*, 2012, 83(3): 209-17.
- [9] Berggren O, Hagberg N, Weber G, et al. B lymphocytes enhance the interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells [J]. *Arthritis Rheum* 2012, 64(10): 3409-19.
- [10] Mavragani C P, Niewold T B, Moutsopoulos N M, et al. Augmented interferon-alpha pathway activation in patients with Sjögren's syndrome treated with etanercept [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(12): 3995-4004.
- [11] Jego G, Palucka A K, Blanck J P, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6 [J]. *Immunity* 2003, 19(2): 225-34.
- [12] Fox R I, Kang H I, Ando D, et al. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome [J]. *J Immunol*, 1994, 152(11): 5532-9.
- [13] Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, et al. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease [J]. *Rheumatology (Oxford)* 2001, 40(6): 656-61.

Total glucosides of paeony attenuated activation of plasmacytoid dendritic cells in primary Sjögren's syndrome patients

Li Xiaoling, Wang Guosheng, Li Xiangpei, et al

(Dept of Rheumatology & Immunology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of TGP on pDCs in new pSS patients and its mechanism of anti-inflammatory effects. **Methods** 17 new pSS without any treatment were recruited as disease group, accepted total glucosides of paeony for 3 months, and 17 healthy subjects as control group. The percentages of peripheral blood pDCs, circulating plasma IFN- α , IL-6, TNF- α levels were analysed by Flow cytometry and ELISA. Immunohistochemistry method was used to observe the pDCs infiltration in labial gland. **Results** New pSS patients had significantly lesser pDCs in PB, and CXCR4 expressed by pDCs were higher than healthy controls. TGP could inhibit pDC activation and then reduce CXCR4 expression. Plasma IFN- α , IL-6, TNF- α levels of new pSS were increased, and TGP reduced IL-6, TNF- α levels. Moreover, pDCs were present in labial gland of pSS under the effect of chemokines receptor CXCR4. **Conclusion** The findings reveal that activated pDCs transfer to the labial gland under the effect of chemokines receptor CXCR4. Total glucosides of paeony inhibit the activation of pDCs in primary Sjögren's syndrome.

Key words primary Sjögren's syndrome; total glucosides of paeony; plasmacytoid dendritic cells; TNF- α ; IFN- α ; IL-6