

网络出版时间: 2023-09-19 17:24:57 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1411.014>

山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠肾炎症反应的改善作用及机制

罗慧臣¹, 胡丹慧², 曾宏宇³

摘要 目的 探讨山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠肾炎症反应的改善作用及可能的作用机制。方法 将 40 只 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠按随机数字表法分为模型组、山茱萸总苷低、中、高剂量组(27.5、55、110 mg/kg), 每组 10 只, 另取 10 只 C57BL/6 小鼠作为对照组。灌胃给药, 1 次/天, 连续 4 周。于药物干预前及干预后第 2、4 周, 收集 24 h 尿液, 测定尿蛋白含量。药物干预结束后, 取小鼠血清及肾脏组织, 采用试剂盒检测血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)和抗双链 DNA(dsDNA) 抗体水平; ELISA 法检测血清中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达水平; 流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群变化; HE 染色观察肾组织病理学变化; Western blot 检测肾组织中 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子-88(MyD88)、核转录因子(NF- κ B) p65 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织损伤严重, 24 h 尿蛋白、Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体以及 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均升高($P < 0.01$), 外周血 CD4⁺ T/CD8⁺ T 淋巴细胞值降低($P < 0.01$), 肾脏组织中 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平均上调($P < 0.01$); 与模型组比较, 山茱萸总苷各剂量组小鼠肾组织损伤改善明显, 24 h 尿蛋白、Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体及 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平均降低($P < 0.01$), 外周血 CD4⁺ T/CD8⁺ T 淋巴细胞值增加($P < 0.01$), 肾组织中 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达均下调($P < 0.01$), 其中高剂量组小鼠各指标变化最为显著; 而各组 NF- κ B p65 蛋白表达无显著性差异。结论 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠肾炎症反应具有一定改善作用, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关。

关键词 山茱萸总苷; 狼疮性肾炎; 炎症反应; TLR4/NF- κ B 信号通路

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)10-1689-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.014

2023-05-10 接收

基金项目 湖南省卫生健康委科研立项课题(编号: 202103100089、202106010111)

作者单位 南华大学衡阳医学院附属第一医院¹ 风湿免疫科、² 新生儿科、³ 风湿免疫实验室, 衡阳 421001

作者简介 罗慧臣, 男, 主治医师;

胡丹慧, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: hudanhui723@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种多发于青年女性的慢性多系统自身免疫性疾病, 可导致多脏器、多系统损害, 严重影响患者生活质量。狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN) 是 SLE 中发生率较高的并发症之一, 尤其是增殖性肾小球肾炎, 显著降低了 SLE 患者的预期寿命和生存率^[1]。近年来, 免疫抑制疗法能够显著改善 SLE 患者的预后, 然而部分 LN 患者采用免疫抑制治疗后效果不佳, 会出现多种不良反应, 从而导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)。相关统计数据显示, 中国超过 30% 的 LN 患者会在 20 年内会进展为 ESRD^[2]。近年来, 具有抗炎、免疫调节作用的中成药成为 LN 药物研发的重点关注方向^[3]。现代药理研究发现, 山茱萸提取物具有多种生物活性, 如抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗糖尿病、神经保护和心血管保护活性^[4], 被普遍用于治疗肝脏、肾脏及生殖系统疾病^[5]。山茱萸总苷(cornus officinalis glycosides, COG) 是从山茱萸科植物山茱萸果肉中提取的有效成分。研究^[6-7]表明, 山茱萸总苷可抑制 T 淋巴细胞增殖和白细胞介素(interleukin, IL)-2 分泌, 表现出较好的免疫抑制作用。该研究旨在探讨山茱萸总苷对 MRL/lpr 小鼠肾脏炎症的影响及作用机制, 为临床治疗 LN 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 山茱萸总苷(纯度 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、IL-1 β 特异性小鼠酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司; 血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐(serum creatinine, Scr) 购自江苏南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白检测试剂盒和 HE 染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 抗双链脱氧核糖核酸(double-stranded DNA, dsDNA) ELISA 检测试剂盒和 TLR4 抗体、MyD88 抗体、p-NF- κ B p65 抗体、NF- κ B p65 抗体及 GAPDH 抗体购自美国 CST 公司; FITC

标记的 CD4、CD8 抗体及 PE 标记的 CD3 抗体购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 雌性 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠 40 只, 8 周龄, 体质量 (24.5 ± 1.8) g, 引种自美国 Jackson 实验室。野生型雌性 C57BL/6 小鼠 10 只, 8 周龄, 体质量 (25.8 ± 1.2) g, 由南华大学实验动物学部提供, 动物生产许可证编号: SCXK(湘) 2020-0003。小鼠饲养于 (25.0 ± 1.0) °C 和 (50 ± 5) % 相对湿度的无特定病原体条件下, 以 12 h/12 h 的光/暗循环喂养。

1.2.2 分组与给药 采用数字表法将 40 只 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠随机分成 4 组: 模型组、山茱萸总苷低剂量 (27.5 mg/kg) 组、山茱萸总苷中剂量 (55 mg/kg) 组和山茱萸总苷高剂量 (110 mg/kg) 组, 每组 10 只, 另取 10 只 C57BL/6 小鼠作为对照组。分组后, 灌胃给药, 1 次/天, 连续 4 周。随后腹主动脉取血清后处死小鼠, 取肾脏组织测定各项指标。

1.2.3 尿蛋白含量检测 于小鼠给药前(第 0 周)及给药后第 2、4 周, 利用代谢笼搭配粪尿分离漏斗收集 24 h 尿液, 按照尿液: 双蒸水 = 1: 9 的比例稀释所有尿液样本, 按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书操作, 分别加入同体积的双蒸水、尿液样本和蛋白标准液, 再加入 BCA 应用液 200 μl , 充分混匀, 37 °C 孵育 30 min, 于 562 nm 处测定各管吸光度值, 根据标准液浓度计算样品蛋白浓度。

1.2.4 Scr、BUN 及抗 dsDNA 抗体水平检测 腹主动脉取血, 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 10 min 获得血清, 并储存于 -80 °C 保存。采用 Olympus AU 600 自动分析仪检测血清 Scr 和 BUN 水平; 根据试剂盒说明书操作, 采用 ELISA 测定血清中抗 dsDNA 抗体的水平。

1.2.5 ELISA 检测血清中细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的表达 根据试剂盒说明书, 采用 ELISA 法检测血清中细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平。应用 Bio-Rad 酶标仪读取 450 nm 处吸光度值, 根据标准曲线算出对应的浓度。

1.2.6 流式细胞术检测外周血 T 淋巴细胞亚群变化 采用流式细胞法测定 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞亚群比例, 即取 100 μl 外周全血用肝素抗凝, 分别加入用 FITC 标记的 CD4、CD8 抗体及 PE 标记的 CD3 抗体 (1: 100 稀释), 室温避光孵育 25 min。然后 PBS 洗涤 3 次, 离心后弃上清液, 加入 PBS 100

μl 重悬细胞, 用流式细胞仪检测, 并用 MRFlow 流式细胞分析软件自动进行淋巴细胞亚群分析, 以 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞亚群比例表示 CD4⁺ T 细胞亚群百分比, 以 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞亚群比例表示 CD8⁺ T 细胞亚群百分比, 并计算 CD4⁺ T/CD8⁺ T 值。

1.2.7 肾脏组织 HE 染色 将小鼠肾脏标本采用 4% 多聚甲醛固定过夜, 梯度乙醇脱水 4 次, 二甲苯透明 2 次后进行石蜡包埋, 切片 (5 μm)。然后, 石蜡切片经脱蜡、乙醇复水和水洗后用 HE 染色, 在光学显微镜下观察常规组织病理学变化。

1.2.8 Western blot 实验 取各组小鼠肾脏组织于预冷的研钵中, 迅速加入液氮研磨成匀浆, 等分后在 RIPA 裂解液中稀释, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 并转移至 PVDF 膜。在 TBST 溶液 (TBS + 0.1% Tween-20, pH = 7.4) 中用 5% 脱脂牛奶进行室温封闭 1 h, 将膜与抗体 TLR4、MyD88、p-NF- κB p65、NF- κB p65 和 GAPDH (1: 1 000) 在 4 °C 下孵育过夜。将膜用 TBST 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二级抗体在室温下孵育 1 h。在 ECL 孵育后曝光成像, 并用 Image J 软件进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 采用 Shapiro-Wilk 法对数据进行正态分布检验, 数据均符合正态分布, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 事后两两比较采用 LSD- t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠尿蛋白含量的影响 在药物干预的第 0、2、4 周, 与对照组比较, 模型组小鼠 24 h 尿蛋白含量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 在药物干预的第 2、4 周, 山茱萸总苷中和高剂量组小鼠 24 h 尿蛋白含量降低 ($P < 0.01$), 其中高剂量组最为显著。见图 1。

2.2 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠血清 Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体水平的影响 5 组小鼠血清 Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体水平相互比较, 差异有统计学意义 ($F = 282.381, 47.188, 142.251$, 均 $P < 0.001$)。与对照组比较, 模型组小鼠血清 Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 山茱萸总苷低、中、高剂量组小鼠 Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体水平降低 ($P < 0.01$), 其中高剂量组最为明显。见图 2。

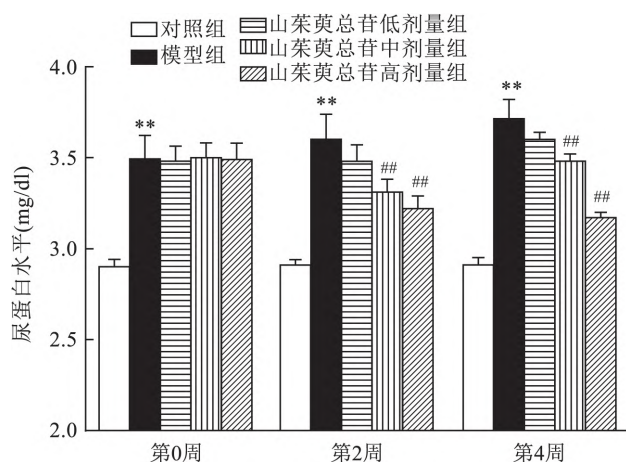


图1 各组小鼠各时间点尿蛋白水平

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.3 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠血清 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平的影响 5 组小鼠血清 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平相互比较, 差异有统计学意义 ($F = 341.369, 765.369, 32.582$, 均 $P < 0.001$)。与对照组比较, 模型组小鼠血清 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达水平均增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 山茱萸总苷低、中和高剂量组小鼠血清 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达水平降低 ($P < 0.01$), 其

中高剂量组最为明显。见图 3。

2.4 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 与对照组比较, 模型组小鼠外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞水平和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 淋巴细胞值降低 ($P < 0.01$), CD8⁺ T 淋巴细胞水平增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 山茱萸总苷低、中和高剂量组小鼠外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞水平和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 淋巴细胞值升高 ($P < 0.01$), 而 CD8⁺ T 淋巴细胞水平降低 ($P < 0.01$)。见图 4。

2.5 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠肾脏组织病理学的影响 HE 染色结果显示, 对照组小鼠显示出清晰、规则的肾小球结构和肾脏的细胞结构, 而模型组小鼠表现出肾脏疾病的典型特征, 如肾小球增生、肾小管上皮细胞脱落和间质性炎症; 与模型组比较, 低剂量山茱萸总苷组小鼠肾脏损伤得到缓解, 但与对照组小鼠比较仍表现出轻度肾小球增生和间质性炎症, 中、高剂量山茱萸总苷组小鼠肾脏损伤明显改善。见图 5。

2.6 山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠肾组织中 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织中 TLR4、MyD88 和

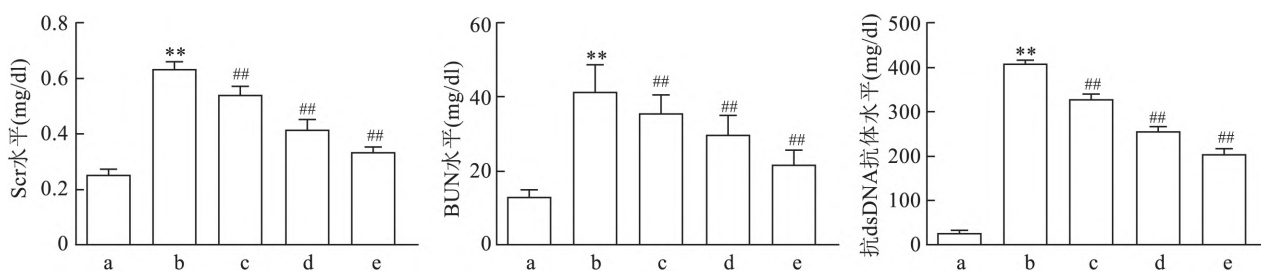
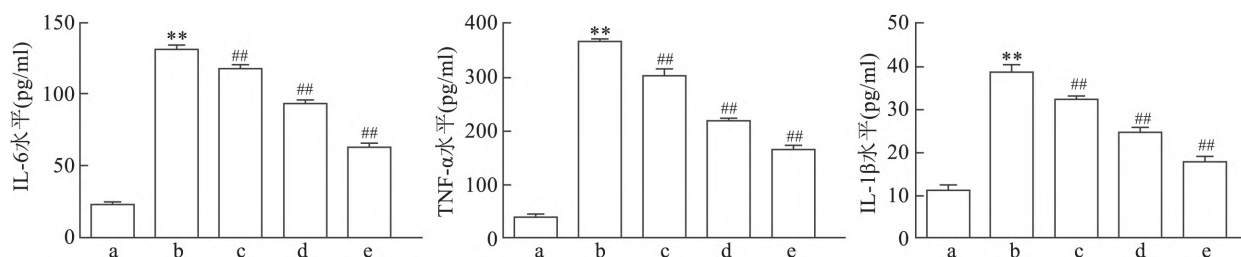


图2 各组小鼠血清 Scr、BUN 和抗 dsDNA 抗体水平

a: 对照组; b: 模型组; c: 山茱萸总苷低剂量组; d: 山茱萸总苷中剂量组; e: 山茱萸总苷高剂量组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

图3 各组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平的比较

a: 对照组; b: 模型组; c: 山茱萸总苷低剂量组; d: 山茱萸总苷中剂量组; e: 山茱萸总苷高剂量组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

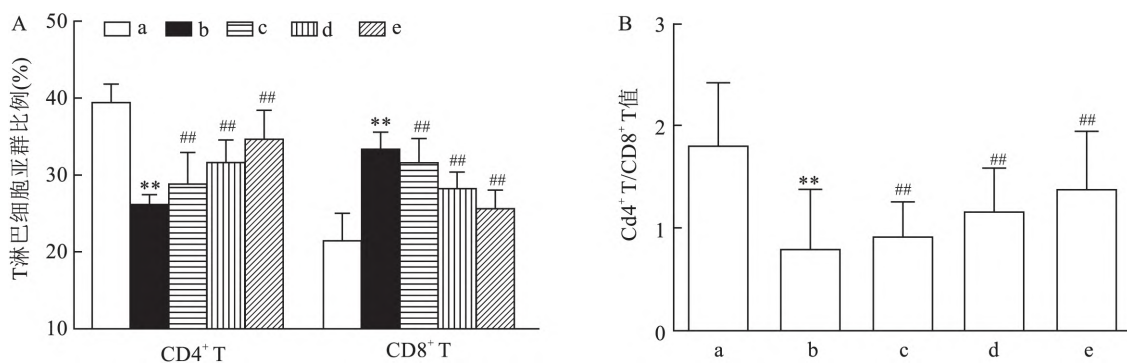


图4 各组小鼠外周血 T 淋巴细胞水平的比较

A: 外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群百分率; B: CD4⁺ T / CD8⁺ T 淋巴细胞值; a: 对照组; b: 模型组; c: 山茱萸总苷低剂量组; d: 山茱萸总苷中剂量组; e: 山茱萸总苷高剂量组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

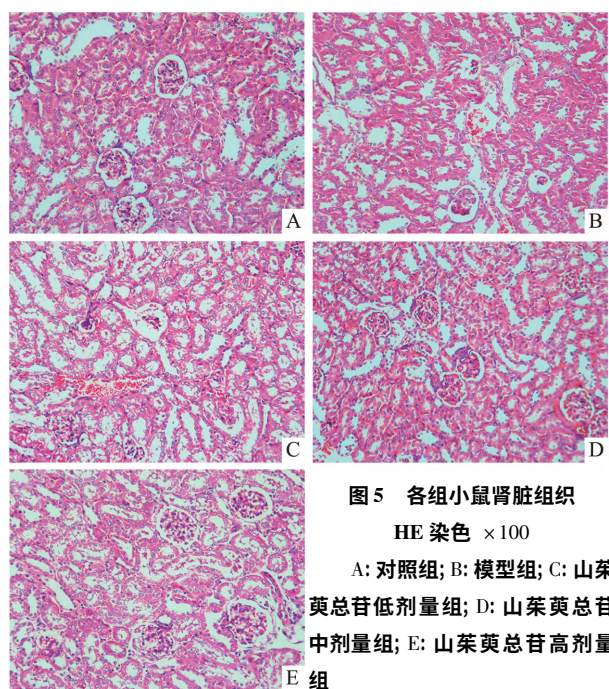


图5 各组小鼠肾脏组织

HE 染色 × 100

A: 对照组; B: 模型组; C: 山茱萸总苷低剂量组; D: 山茱萸总苷中剂量组; E: 山茱萸总苷高剂量组

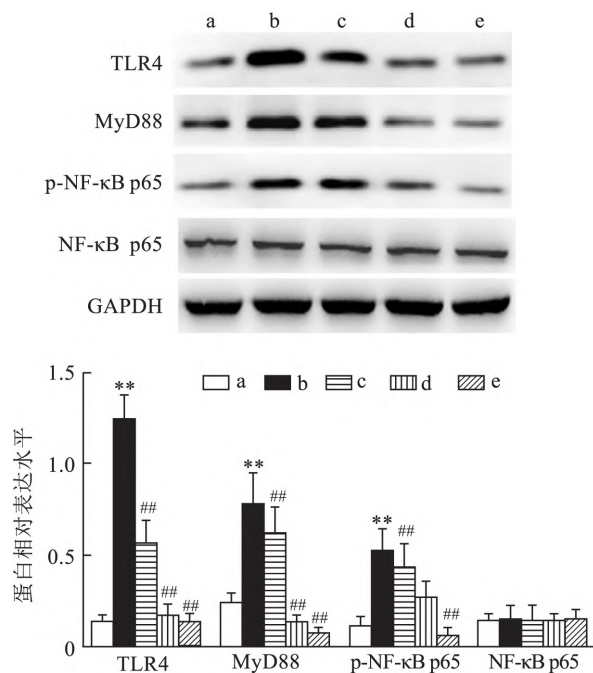


图6 Western blotting 检测小鼠肾组织中

TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达

a: 对照组; b: 模型组; c: 山茱萸总苷低剂量组; d: 山茱萸总苷中剂量组; e: 山茱萸总苷高剂量组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

p-NF-κB p65 等蛋白表达均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 山茱萸总苷低、中、高剂量组小鼠肾组织中 TLR4、MyD88 和 p-NF-κB p65 的蛋白表达均下调 ($P < 0.01$); 而各组 NF-κB p65 的蛋白表达无显著变化 ($P > 0.05$)。见图 6。

3 讨论

SLE 是一种自身免疫性疾病, 存在自身抗体诱导的免疫复合物, 这些免疫复合物最终会激活补体途径, 形成肾脏沉积, 并导致 LN 的发病^[8]。尽管临床上使用一些免疫抑制剂和抗炎剂帮助患者改善预后^[9], 但仍有患者发展为 ESRD^[10]。因此, SLE 疾病的有效治疗和药物的研究和开发越来越受到重视。

LN 是 MRL/lpr 小鼠的主要特征, 肾功能障碍可

能导致 LN 晚期小鼠死亡。蛋白尿是肾脏炎症的生物标志物, 反映了肾脏疾病的进展^[11]。在本研究中, 山茱萸总苷在给药 4 周后降低了 MRL/lpr 小鼠尿蛋白含量。LN 的关键发病机制是肾脏中自身抗体的产生和免疫复合物的持续沉积^[12]。BUN、Scr 和抗 dsDNA 抗体水平对 SLE 而言非常重要, 被广泛用于辅助 SLE 确诊和预测肾炎活动^[13]。本研究表明, 山茱萸总苷治疗降低 MRL/lpr 小鼠 BUN、Scr 和抗 dsDNA 抗体的水平 ($P < 0.01$)。此外, 免疫反应的激活和失调是 SLE 的特征, 这种调节缺陷的病理

生理学是由细胞因子的调节失衡导致的。因此,炎症在 LN 的进展中起着不可或缺的作用。研究^[4]表明,细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 在 SLE 疾病相关抗 dsDNA 抗体的产生中发挥重要作用。本研究结果表明,山茱萸总苷可抑制外周血 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的分泌($P < 0.01$),这与 Czerwińska et al^[5]的研究结果一致。此外,通过 HE 染色评估的肾脏病理变化表明,山茱萸总苷明显减轻肾脏病理损伤,如肾小球增生、间质性炎症。T 淋巴细胞是机体抵御病原体的一线“士兵”,CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞与 SLE 的系统性自身免疫及器官炎症的发展密切相关^[4]。李建民等^[6]研究表明,山茱萸总苷可抑制 T 淋巴细胞增殖,抑制 T 淋巴细胞膜表面 CD4⁺ T、CD8⁺ T 的表达。本研究表明,山茱萸总苷可提高 MRL/lpr 小鼠外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞水平,降低 CD8⁺ T 淋巴细胞水平,最终提高 CD4⁺ T/CD8⁺ T 淋巴细胞值,但山茱萸总苷抑制机体免疫功能的机制有待研究。已有研究^[7-18]表明,TLR2 和 TLR4 在 LN 的炎症反应中起重要作用,宿主先天免疫被激活后,它们可以通过 MyD88 依赖性信号传递途径,以激活转录因子活化 B 细胞的核因子 kappa 轻链增强 NF- κ B,而 NF- κ B 为 TLR4 介导的 MyD88 信号通路的下游的重要节点。Yamabe et al^[9]发现,从山茱萸中提取的环烯醚萜苷和低分子量多酚可以降低肾组织中 AGEs、RAGE、NF- κ B 和 TGF- β 的水平。p65 是 NF- κ B 家族中的一员,通常 p65 二聚体被 κ B 抑制剂以非活性形式隔离在细胞质中,活性 NF- κ B 从细胞质转移到细胞核,并导致炎症相关反应基因的上调^[19]。因此,NF- κ B 信号通路可作为治疗 LN 的潜在靶点。本研究结果显示,不同剂量山茱萸总苷可降低 MRL/lpr 小鼠肾组织中 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平,这表明山茱萸总苷可能通过抑制 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路的活化从而发挥保护作用。山茱萸总苷已被证明具有多种生物活性,其作为药物相对安全,具有开发治疗 LN 药物的潜能。

综上所述,山茱萸总苷对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠肾脏炎症反应具有一定改善作用,其作用机制可能与抑制 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路有关。本研究初步揭示了山茱萸总苷潜在的作用机制,为 LN 治疗提供了新思路,同时为山茱萸总苷在临床应用方面提供了理论基础。

参考文献

[1] Furie R, Rovin B, Houssiau F, et al. Two-year, randomized, con-

- trolled trial of belimumab in lupus nephritis [J]. N Engl J Med, 2020, 383(12): 1117-28.
- [2] Tamirou F, Arnaud L, Talarico R, et al. Systemic lupus erythematosus: state of the art on clinical practice guidelines [J]. RMD Open, 2018, 4(2): e000793.
- [3] Ayoub I, Birmingham D, Rovin B, et al. Commentary on the current guidelines for the diagnosis of lupus nephritis flare [J]. Curr Rheumatol Rep, 2019, 21(4): 12.
- [4] Gao X, Liu Y, An Z C, et al. Active components and pharmacological effects of cornus officinalis: literature review [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 633447.
- [5] Mesgari A M, Hassanilou T, Khordadmehr M, et al. Effects of cornus mas fruit hydro-methanolic extract on liver antioxidants and histopathologic changes induced by cisplatin in rats [J]. Indian J Clin Biochem, 2020, 35(6): 218-24.
- [6] 李建民, 周勇, 项静辰, 等. 山茱萸总苷对正常小鼠 T 淋巴细胞免疫功能影响的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(6): 30-2.
- [7] Yu H, Yao S, Zhou C, et al. Morroniside attenuates apoptosis and pyroptosis of chondrocytes and ameliorates osteoarthritic development by inhibiting NF- κ B signaling [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 266(1): 113447.
- [8] Morales E, Galindo M, Trujillo H, et al. Update on lupus nephritis: looking for a new vision [J]. Nephron, 2021, 145(1): 1-13.
- [9] Ugolini-Lopes M R, Santos L P S, Stagnaro C, et al. Late-onset biopsy-proven lupus nephritis without other associated autoimmune diseases: severity and long-term outcome [J]. Lupus, 2019, 28(1): 123-8.
- [10] Nie X L, Deng R, Xiang L, et al. Reno-protective effect and mechanism study of Huang Lian Jie Du Decoction on lupus nephritis MRL/lpr mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16(1): 448.
- [11] Arazi A, Rao D, Berthier C, et al. The immune cell landscape in kidneys of patients with lupus nephritis [J]. Nature Immunology, 2019, 20(7): 902-14.
- [12] Liu S, Shen H, Li J Y, et al. Loganin inhibits macrophage M1 polarization and modulates sirt1/NF- κ B signaling pathway to attenuate ulcerative colitis [J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 628-39.
- [13] 刘谓, 戴晖, 安乐美, 等. 姜黄素对 MRL/lpr 狼疮性肾炎小鼠的作用及机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1647-52.
- [14] Waldman M. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis [J]. Lupus, 2005, 14(1): 19-24.
- [15] Czerwińska M E, Bobińska A, Cichocka K, et al. Cornus mas and cornus officinalis—a comparison of antioxidant and immunomodulatory activities of standardized fruit extracts in human neutrophils and caco-2 models [J]. Plants, 2021, 10(11): 2347.
- [16] Dang W Z, Li H, Jiang B, et al. Therapeutic effects of artesunate on lupus-prone MRL/lpr mice are dependent on T follicular helper cell differentiation and activation of JAK2-STAT3 signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2019, 62: 152965.
- [17] Lu T W, Zhang Z, Zhang J J, et al. CD73 in small extracellular ves-

- icles derived from HNSCC defines tumour-associated immunosuppression mediated by macrophages in the microenvironment [11]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(5): e12218.
- [8] Purvis G S D, Collino M, Aranda T H, et al. Inhibition of Bruton's TK regulates macrophage NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation in metabolic inflammation [12]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(19): 4416–32.
- [9] Yamabe N, Kang K S, Goto E, et al. Beneficial effect of corni fructus, a constituent of hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats [13]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(3): 520–6.

Effect and mechanism of cornus officinalis glycosides on renal inflammation in mice lupus-prone MRL/lpr mice

Luo Huichen¹, Hu Danhui², Zeng Hongyu³

(¹Dept of Division of Rheumatology, ²Dept of Neonatology, ³Rheumatism Laboratory, The First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001)

Abstract Objective To investigate the improvement effect and possible mechanism of cornus officinalis glycosides on MRL/lpr lupus nephritis. **Methods** Forty mice lupus-prone MRL/lpr mice were divided into model group, cornus officinalis glycosides low-dose, medium-dose, high-dose group (27.5, 55, 110 mg/kg), with 10 mice in each group, and 10 C57BL/6 mice were taken as the control group. Gastric administration was carried out 1 time/day for 4 weeks. 24-hour urine was collected before drug intervention and 2 and 4 weeks after intervention to determine the content of urine protein. After the drug intervention, mouse serum and kidney tissues were taken and the levels of serum creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN) and anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibodies were detected by kits. The levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in serum were detected by ELISA. The changes in peripheral blood T lymphocyte subsets were detected by Flow cytometry; The changes of renal histopathology were observed by HE staining; The protein expression levels of toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor-88 (MyD88), nuclear transcription factor (NF- κ B) p65, and p-NF- κ B p65 in kidney tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the changes of renal histopathology of the model group was severe, and the levels of 24-hour urine protein, Scr, BUN and anti-dsDNA antibodies, IL-1 β , IL-6 and TNF- α significantly increased ($P < 0.01$), the peripheral blood CD4⁺ T/CD8⁺ T lymphocyte ratio was significantly reduced ($P < 0.01$), and the protein expression levels of TLR4, MyD88 and p-NF- κ B p65 in kidney tissue were significantly up-regulated ($P < 0.01$); Compared with the model group, the changes of renal histopathology of each dose group of cornus officinalis glycosides were significantly improved, the levels of 24-hour urine protein, Scr, BUN and anti-dsDNA antibodies, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly reduced ($P < 0.01$), the peripheral blood CD4⁺ T/CD8⁺ T lymphocyte ratio significantly increased ($P < 0.01$), and the protein expression levels of TLR4, MyD88 and p-NF- κ B p65 in renal tissue were significantly down-regulated ($P < 0.01$). Among them, the high-dose group had the most significant changes in each index. While there was no significant difference in the expression of NF- κ B p65 protein in the groups. **Conclusion** Cornus officinalis glycosides have a certain effect on renal inflammatory response in mice lupus-prone MRL/lpr mice, and the mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway.

Key words cornus officinalis glycosides; lupus nephritis; inflammation; TLR4/NF- κ B signaling pathway