

羟氯喹抑制 TLR9/MyD88/NF- κ B 通路减轻系统性红斑狼疮小鼠肾损伤作用

王莉平¹, 郭金明¹, 付永涛^{1*}, 张娜², 张红霞², 许冰³

1. 邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056001

2. 石家庄市第四医院, 河北 石家庄 050000

3. 邯郸市邯钢医院, 河北 邯郸 056001

摘要: 目的 探讨羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤的影响, 并基于 Toll 样受体 9/髓样分化因子 88/核因子- κ B (TLR9/MyD88/NF- κ B) 信号通路探索其潜在机制。方法 采用 ip 降植烷的方法构建系统性红斑狼疮雌性小鼠模型, 设模型组、羟氯喹 (ig 80 mg/kg) 组、TLR9 抑制剂 (ODN2088, ip 4 mg/kg) 组、羟氯喹+ODN2088 组, 另设对照组, 每组 8 只。分别 1 次/d 连续给药 5 周后采集标本, 称体质量、肾脏质量并计算肾脏指数 (RI), 检测 24 h 尿蛋白量 (24 h-UTP) 和血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 水平; 苏木精-伊红染色法 (HE) 和 Masson 染色观察肾组织病变和纤维化程度, 进行病理评分和胶原容积分数 (CVF); 检测肾组织干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4) 水平; RT-PCR 法和 Western blotting 法检测肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达。结果 与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和 HCQ+ODN2088 组小鼠体质量显著升高, RI、24 h-UTP、血清 Scr、BUN 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 肾组织病变和纤维化状况均明显改善, 肾小球、肾小管病理评分和 CVF 均显著降低 ($P < 0.05$); 肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 水平显著降低, IL-2 水平显著升高 ($P < 0.05$); 肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。羟氯喹+ODN2088 组对系统性红斑狼疮小鼠各检测指标的影响显著优于羟氯喹组和 ODN2088 组 ($P < 0.05$)。结论 羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤具有保护作用, 其机制可能与抑制 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路, 减轻炎症反应有关。

关键词: 系统性红斑狼疮; 羟氯喹; 肾损伤; Toll 样受体 9/髓样分化因子 88/核因子- κ B 信号通路; 24 h 尿蛋白量

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)08-1857-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.008

Hydroxychloroquine alleviates renal injury in mice with systemic lupus erythematosus by inhibiting TLR9/MyD88/NF- κ B pathway

WANG Li-ping¹, GUO Jin-ming¹, FU Yong-tao¹, ZHANG Na², ZHANG Hong-xia², XU Bing³

1. Handan Central Hospital, Handan 056001, China

2. The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China

3. Handan Iron and Steel Hospital, Handan 056001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of hydroxychloroquine on renal injury in systemic lupus erythematosus mice, and explore the potential mechanism based on toll-like receptor 9/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor- κ B (TLR9/MyD88/NF- κ B) pathway. **Methods** The female mice model with systemic lupus erythematosus was established by ip of nophytanes, and the model group, hydroxychloroquine (ig 80 mg/kg hydroxychloroquine) group, TLR9 inhibitor (ip 4 mg/kg ODN2088) group, hydroxychloroquine + ODN2088 group, and the normal control group was set up, with 8 mice in each group. The samples were collected after 5 weeks of continuous administration once daily. The body mass, renal mass was weighted and the RI was calculated. 24 h-UTP and the level of Scr, BUN in serum were measured. The renal tissue histopathological changes and fibrosis were observed through HE staining or Masson staining, and the pathological score and CVF were performed. The level of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4

收稿日期: 2023-05-25

基金项目: 石家庄市科学技术研究与发展计划项目 (201200773)

作者简介: 王莉平, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药理学和药理学研究。E-mail: wlp2672@126.com

*通信作者: 付永涛 E-mail: ssm0518@126.com

in renal tissues were measured. The mRNA and protein expressions of TLR9, MyD88, NF- κ B p65 in renal tissues were detected by RT-PCR or Western blotting. **Results** Compared with the model group, the body mass in hydroxychloroquine group, ODN2088 group, and hydroxychloroquine + ODN2088 group was significantly increased, while the RI and the level of 24 h-UTP, Scr, BUN were significantly decreased ($P < 0.05$). The pathological changes and fibrosis of renal tissue were significantly improved, and the pathological scores of glomeruli, renal tubules and the CVF were significantly decreased ($P < 0.05$). The level of IFN- γ , TNF- α , IL-4 in renal tissue were significantly decreased, while the IL-2 was significantly increased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of TLR9, MyD88, NF- κ B p65 in renal tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). The effects of hydroxychloroquine + ODN2088 group on the detection indexes of systemic lupus erythematosus mice were significantly better than those of hydroxychloroquine group and ODN2088 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Hydroxychloroquine has protective effect on renal injury in systemic lupus erythematosus mice, which mechanism may be related to inhibiting TLR9/MyD88/NF- κ B signaling pathway and reducing inflammatory response.

Key words: systemic lupus erythematosus; hydroxychloroquine; renal injury; TLR9/MyD88/ NF- κ B signaling pathway; 24 h-UTP

系统性红斑狼疮是一种较常见的慢性自身免疫性疾病,男女患者比例约 1:9,以 20~40 岁育龄期女性较为多见^[1]。系统性红斑狼疮呈反复发作、迁延难愈的特点,可导致多脏器损伤,有文献报道超过 70% 的系统性红斑狼疮患者并发不同程度肾损伤,其中约 20% 的患者最终发展为终末期肾病,是导致系统性红斑狼疮患者死亡的主要因素^[2]。系统性红斑狼疮病理机制复杂,其中炎症反应是系统性红斑狼疮所致多脏器并发症发生发展的关键因素。研究证实,肾炎是系统性红斑狼疮肾损伤发展为终末期肾病的重要病理通路^[3-4]。Toll 样受体 9/髓样分化因子 88/核因子- κ B (TLR9/MyD88/NF- κ B) 是机体炎症反应机制中重要的信号传导通路,有文献报道通过抑制 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路及其介导的炎症反应,可有效减轻系统性红斑狼疮所致肾损伤^[5-7]。

羟氯喹化学结构属于 4-氨基喹啉衍生物,临床上常用于类风湿关节炎以及潜在不良反应较小药物疗效不佳的盘状红斑狼疮、系统性红斑狼疮的治疗。研究证实,羟氯喹具有抑制系统性红斑狼疮所致视网膜病变、动脉粥样硬化等并发症的作用^[8-9],并且羟氯喹能够通过抑制 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达对小鼠肠炎和肝缺血再灌注损伤起到保护作用^[10-11]。但羟氯喹是否能通过 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路对系统性红斑狼疮所致肾损伤起到治疗作用尚未见文献报道,本研究通过制备系统性红斑狼疮小鼠模型,探讨羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤的影响,并基于 TLR9/MyD88/NF- κ B 信号通路探索其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

45 只清洁级雌性 BALB/c 小鼠,7~8 周龄,体

质量 19~22 g,购自河北伊维沃生物科技有限公司 [SCXK (冀) 2020-002]。在 12 h/12 h 光暗交替、室温 23~25 °C、相对湿度 45%~65% 的条件下饲养,自由进食饮水。实验过程遵循减少、替换、优化的原则给予实验动物人道主义关怀。实验方案获得邯郸市中心医院伦理委员通过,伦理批件号 HDZXLL (K) 2022-013。

1.2 药物和试剂

硫酸羟氯喹片 (上海上药中西制药有限公司,规格 0.1 g,批号 2021S03018); TLR9 抑制剂 ODN2088 (美国 CST 公司,批号 21A004F27); 降植烷 (美国 Sigma 公司,批号 07162S); ELISA 法抗双链 DNA (ds-DNA) 抗体检测试剂盒 (北京华英生物技术研究,货号 HY-2458); 磺基水杨酸法尿蛋白 (UTP)、分光光度法血肌酐 (Scr)、血尿素氮 (BUN)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4) 试剂盒 (北京索莱宝公司,货号 BC8141、BC4910、BC1530、SEKM-0031、SEKM-0034、SEKM-0004、SEKM-0007); 苏木精-伊红染色法 (HE) 试剂盒 (上海碧云天生物科技公司,货号 C0105M); Masson 染色试剂盒、IgG 二抗、ECL 显色液 (北京博奥森生物技术公司,货号 S0075、bs-0293P、C05-07004); 逆转录试剂盒、RT-PCR 扩增试剂盒、TRIzol 试剂、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝公司,货号 RP1100、RP1105、R1100、R0010、PC0020); TLR9、MyD88、NF- κ B p65、 β -actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司,货号 sc-52966、sc-37016、sc-54135、sc-13074)。

1.3 主要仪器

AU-480 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman 公司); 1510 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司);

RM2245 型石蜡组织切片机（德国 Leica 公司）；MIKRO 220R 型高速冷冻离心机（德国 Hettich 公司）；QuantStudio 5 型 PCR 仪（美国 ABI 公司）；552BR 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；DYY-7C 型转模仪（北京六一生物技术公司）；5200 型化学发光成像系统（上海天能科技有限公司）。

1.4 实验方法

1.4.1 造模、分组与给药 随机取 45 只 BALB/c 小鼠中的 8 只设为对照组，剩余 37 只则参照马松鹤等^[12]报道的方法，通过 ip 降植烷 0.5 mL 构建系统性红斑狼疮小鼠模型，6 个月后血清 ds-DNA 抗体水平显著升高且尿蛋白呈强阳性（++++），则可判定系统性红斑狼疮小鼠模型构建成功^[12]。共成模 33 只，去除 ds-DNA 抗体水平最低的 1 只后，将剩余的 32 只成模小鼠随机分为模型组、羟氯喹组、ODN2088 组、硫酸羟氯喹片+ODN2088 组，每组 8 只。羟氯喹组 ig 80 mg/kg（根据人与小鼠剂量换算公式计算所得），ODN2088 组 ip 给药 4 mg/kg^[13]，羟氯喹+ODN2088 组 ig 硫酸羟氯喹片 80 mg/kg 和 ODN2088 4 mg/kg，对照组和模型组 ig 给予生理盐水，各组均 1 次/d 给药连续治疗 5 周。

1.4.2 标本采集 末次给药 2 h 后称量大鼠体质量，每隔 2 h 通过按压腹腔收集尿液，共收集 24 h 的尿液备检。通过摘眼球取血 1 mL 后离心（2 000 r/min，5 min）取血清，-20 °C 保存备检。颈椎脱臼处死后，开腹取双侧肾脏，4 °C 生理盐水冲洗干净后称量双侧肾质量，然后左侧肾脏-20 °C 保存备检，右侧肾脏置于 10% 中性甲醛溶液实施固定。

1.4.3 肾脏指数（RI） 按照以下公式计算 RI。

$$RI = \text{双侧肾质量} / \text{体质量}$$

1.4.4 24 h-UTP 及血清 Scr、BUN 水平检测 取收集的 24 h 尿液，遵照试剂盒说明处理后，采用碘基水杨酸法检测 24 h-UTP 含量。取血清，遵照试剂盒说明进行处理后，采用分光光度法检测血清 Scr、BUN 水平。

1.4.5 肾组织病理学检查及纤维化状况观察 取经 10% 中性甲醛溶液固定 72 h 后的右侧肾脏，梯度乙醇溶液脱水处理后浸蜡包埋，4 μm 厚度连续切片、贴附于涂有多聚赖氨酸的防脱载玻片上，经梯度乙醇溶液脱蜡水化后按照试剂盒操作说明行 HE 染色，显微镜观察肾组织病理学改变，参照王双^[14]报道的方法进行病理评分，即（1）肾小球病理评分：未见异常，记 0 分；出现系膜增生、炎性细胞浸润，

为轻度，记 1 分；在轻度基础上出现内皮细胞增生，为中度，记 2 分；在中度基础上出现新月体样病变，为重度，记 3 分。（2）肾小管病理评分：未见异常，记 0 分；受损肾小管数量占肾小管总数 < 25%、25%~50%、> 50%~75%、> 75% 分别记 1、2、3、4 分。

按照试剂盒操作说明行 Masson 染色，显微镜下观察肾组织纤维化状况，Masson 染色图片中蓝色为胶原纤维着色计算胶原容积分数（CVF）。

$$CVF = \text{蓝染面积} / \text{总面积}$$

1.4.6 肾组织 IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4 检测 取部分左侧肾组织，加入适量生理盐水后研磨匀浆，离心（3 500 r/min，10 min）取上清液，遵照试剂盒说明进行处理后，采用 ELISA 法检测肾组织 IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4 水平。

1.4.7 肾组织 TLR9、MyD88、NF-κB p65 mRNA 表达检测 取部分左侧肾组织剪碎后，加入 4 °C TRIzol 试剂提取肾组织总 RNA，逆转录合成 cDNA，然后以 cDNA 为模板通过 PCR 仪行基因扩增反应，反应条件设置：95 °C 预变性 2 min，然后 95 °C 变性 15 s、55 °C 退火 15 s，共进行 40 个循环。β-actin 作为内参以公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 TLR9、MyD88、NF-κB p65 mRNA 相对表达量。PCR 引物由生工生物工程（上海）公司提供，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
TLR9	上游 5'-GCTTTGGCCTTTCACCTCTTG-3' 下游 5'-AACTGCGCTCTGTGCGCTTAT-3'	194
MyD88	上游 5'-AAGTTCAGCCCTTCTTTGAC-3' 下游 5'-AGAATCAGACAGGCACGA-3'	186
NF-κB p65	上游 5'-AGGCTTCTGGGCTTATGTG-3' 下游 5'-TGCTTCTCTCGCCAGGAATAC-3'	111
β-actin	上游 5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGC-3' 下游 5'-CGTCATCCATGGCGAACTGG-3'	70

1.4.8 肾组织 TLR9、MyD88、NF-κB p65 蛋白表达检测 取左侧肾组织 100 mg，加入 1 mL 4 °C RIPA 裂解液研磨匀浆提取总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度，均取 30 μg 蛋白量上样，通过 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白、转 PVDF 膜、室温 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 后，加 TLR9（1：1 000）、MyD88（1：1 000）、NF-κB p65（1：800）、β-actin（1：2 000）抗体稀释液 4 °C 孵育过夜，洗膜后二抗（1：2 000）稀释液室温孵育 1 h，洗膜后 ECL 显影，蛋白相对表达量以其与内参蛋白（β-actin）灰度值比值表示。

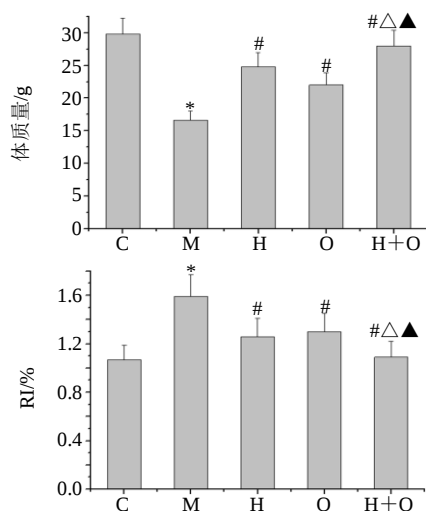
1.5 统计学处理

运用统计学软件 SPSS 20.0 进行处理。计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数行单因素方差分析, 两组间比较行 LSD-*t* 检验。

2 结果

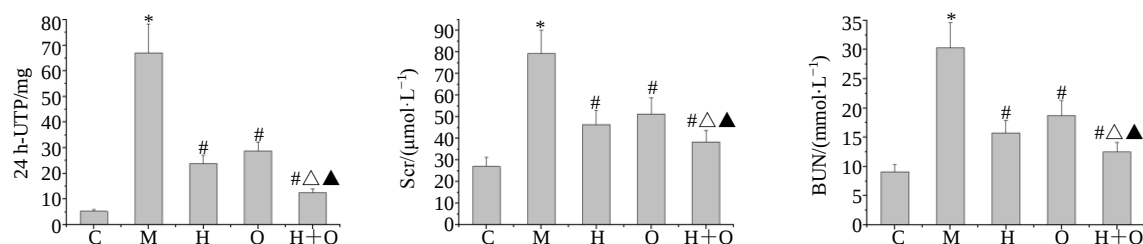
2.1 羟氯喹对小鼠体质量和 RI 的影响

与对照组比较, 模型组体质量显著降低, RI 显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组体质量显著升高, RI 显著降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组和 ODN2088 组比较, 羟氯喹+ODN2088 组体质量显著升高, RI 显著降低 ($P < 0.05$), 见图 1。



C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+ODN2088 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与羟氯喹组比较: △ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

图 1 羟氯喹对小鼠体质量和 RI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Fig. 1 Effects of hydroxychloroquine on body mass and RI in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)



C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+ODN2088 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与羟氯喹组比较: △ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

图 2 羟氯喹对小鼠 24 h-UTP 和血清 Scr、BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Fig. 2 Effects of hydroxychloroquine on 24 h-UTP and the level of Scr, BUN in serum in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

2.2 羟氯喹对小鼠 24 h-UTP 和血清 Scr、BUN 水平的影响

与对照组比较, 模型组 24 h-UTP 和血清 Scr、BUN 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组 24 h-UTP 和血清 Scr、BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组、ODN2088 组比较, 羟氯喹+ODN2088 组 24 h-UTP 和血清 Scr、BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

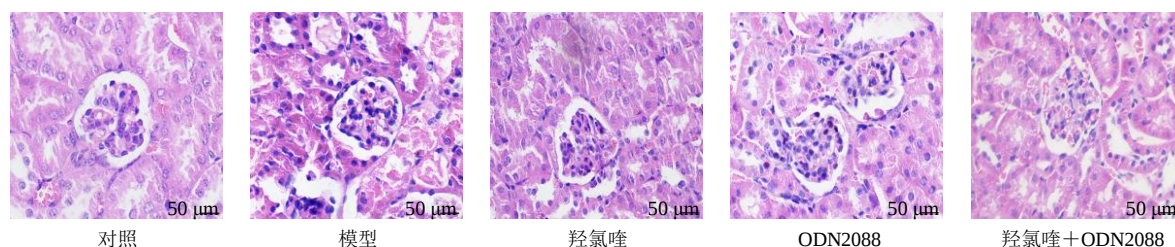
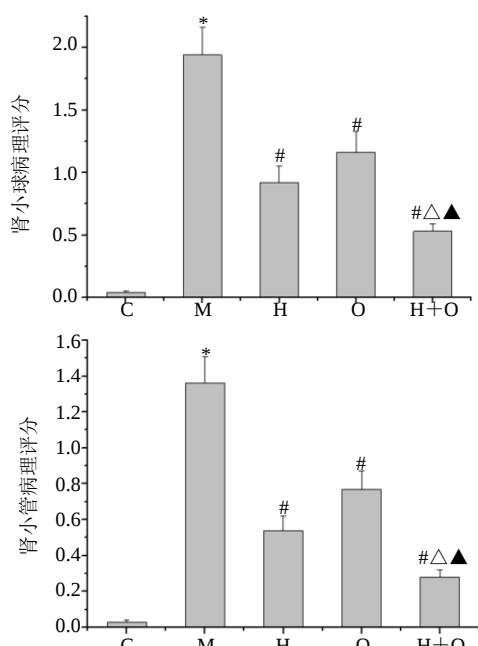
2.3 羟氯喹对小鼠肾组织病变的影响

对照组小鼠肾组织形态结构未见病理性改变。模型组小鼠肾组织呈现明显的病理性改变, 包括肾小球系膜增生、炎性细胞浸润、内皮细胞增生以及新月体样病变; 肾小管上皮细胞空泡样变、坏死呈颗粒状; 肾间质炎性细胞浸润。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组肾组织病理性改变均明显改善, 其中羟氯喹+ODN2088 组效果优于羟氯喹组和 ODN2088 组。

与对照组比较, 模型组肾小球和肾小管病理评分显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组肾小球和肾小管病理评分显著降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组和 ODN2088 组比较, 羟氯喹+ODN2088 组肾小球和肾小管病理评分显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3、4。

2.4 羟氯喹对小鼠肾组织纤维化的影响

对照组小鼠肾组织肾小球系膜区和肾小管周围间质区可见少量散在分布的胶原纤维。与对照组比较, 模型组小鼠肾组织胶原纤维明显增多, 以肾小管周围间质区胶原纤维沉积最多。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组胶原纤维明显减少, 其中羟氯喹+ODN2088 组效果优于羟氯喹组和 ODN2088 组。

图3 羟氯喹对小鼠肾组织病变的影响 (HE 染色, $\times 400$)Fig.3 Effects of hydroxychloroquine on renal histopathological changes in mice (HE staining, $\times 400$)

C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+ODN2088
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$;
与羟氯喹组比较: ^ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ^ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

图4 羟氯喹对小鼠肾组织肾小球和肾小管病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Fig.4 Effects of hydroxychloroquine on the pathological scores of glomeruli, renal tubules in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

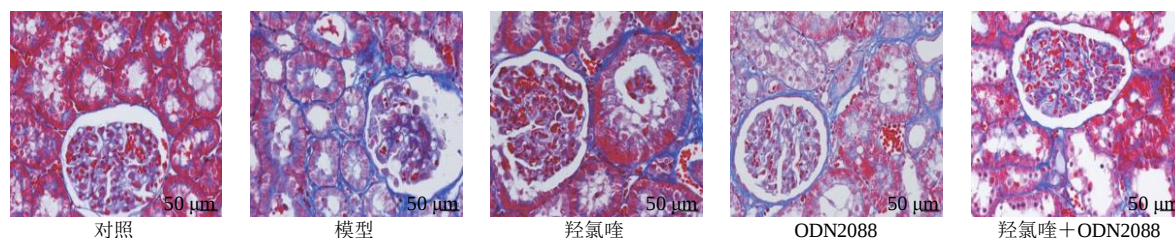
与对照组比较, 模型组肾组织 CVF 显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组 CVF 显著降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹和 ODN2088 组比较, 羟氯喹+ODN2088 组 CVF 显著降低 ($P < 0.05$), 见图 5、6。

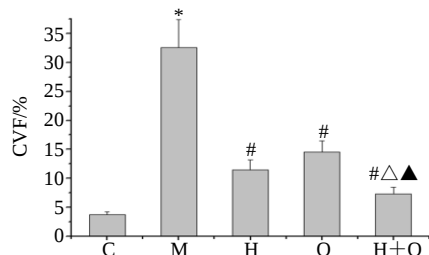
2.5 羟氯喹对小鼠肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4 水平的影响

与对照组比较, 模型组肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 水平显著升高, IL-2 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 水平显著降低, IL-2 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组和 ODN2088 组比较, 羟氯喹+ODN2088 组肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 水平显著降低, IL-2 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见图 7。

2.6 羟氯喹对小鼠肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达的影响

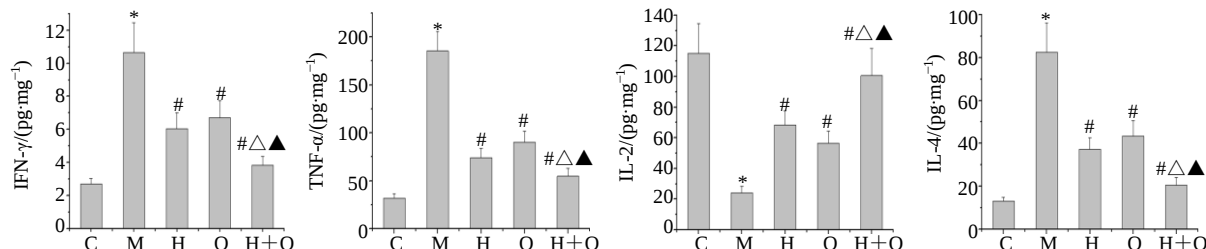
与对照组比较, 模型组肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组或 ODN2088 组比较, 羟氯喹+ODN2088 组肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 8。

图5 羟氯喹对小鼠肾组织纤维化的影响 (Masson 染色, $\times 400$)Fig.5 Effects of hydroxychloroquine on renal fibrosis in mice (Masson staining, $\times 400$)



C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+DN2088 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与羟氯喹组比较: △ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

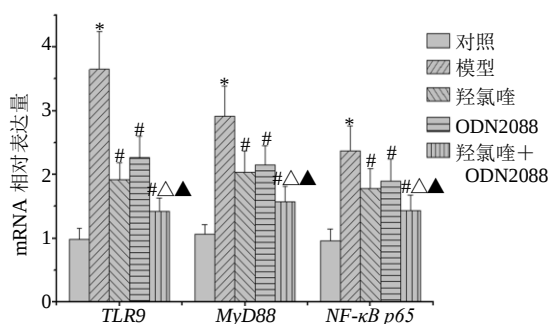
图 6 羟氯喹对小鼠肾组织 CVF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 6 Effects of hydroxychloroquine on renal CVF in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+DN2088 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与羟氯喹组比较: △ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

图 7 羟氯喹对小鼠肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effects of hydroxychloroquine on the level of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 in renal tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与羟氯喹组比较: △ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

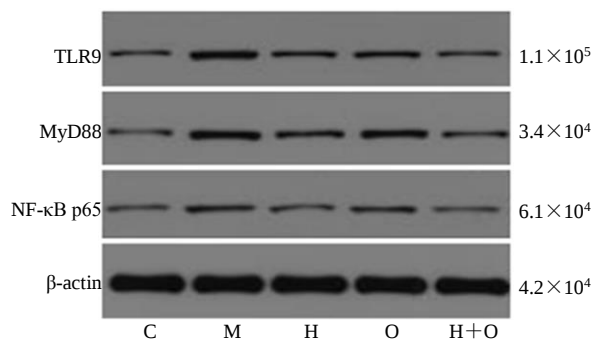
图 8 羟氯喹对小鼠肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 8 Effect of hydroxychloroquine on the relative expression of TLR9, MyD88, NF- κ B p65 mRNA in renal tissue in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.7 羟氯喹对小鼠肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,羟氯喹组、ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与羟氯喹组和 ODN2088 组比较,羟氯喹+ODN2088 组肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$),见图 9、10。

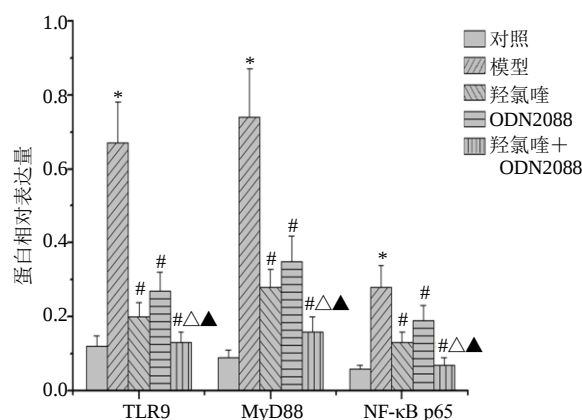
3 讨论

系统性红斑狼疮动物模型主要有自发型、诱发型、基因调控型 3 类,其中诱发型具有操作简单易行、成模周期短、经济适用且与人类系统性红斑狼疮病理特征接近的优势,是系统性红斑狼疮相关动



C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+DN2088
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088

图 9 羟氯喹对小鼠肾组织 TLR9、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达的影响
Fig. 9 Effects of hydroxychloroquine on the expression of TLR9, MyD88, NF- κ B p65 proteins in renal tissue in mice



C-对照 M-模型 H-羟氯喹 O-ODN2088 H+O-羟氯喹+ODN2088
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$;
与羟氯喹组比较: △ $P < 0.05$; 与 ODN2088 组比较: ▲ $P < 0.05$
C-control M-model H-hydroxychloroquine O-ODN2088 H+O-hydroxychloroquine+ODN2088 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; △ $P < 0.05$ vs hydroxychloroquine group; ▲ $P < 0.05$ vs ODN2088 group

图 10 羟氯喹对小鼠肾组织 TLR9、MyD88、NF-κB p65 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 10 Effect of hydroxychloroquine on the relative expression of TLR9, MyD88, NF-κB p65 proteins in renal tissue in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

物实验研究常用且普遍认可的造模方法, 降植烷是最常用的诱发剂^[15]。本研究结果显示, 系统性红斑狼疮模型小鼠体重降低, RI、24 h-UTP、血清 Scr、BUN 水平升高, 肾组织呈现肾小球系膜和内皮细胞增生、新月体样变、炎性细胞浸润, 肾小管上皮细胞空泡样变、坏死呈颗粒状, 肾间质炎性细胞浸润、胶原纤维沉积, 与马松鹤等^[12]和谈欣怡等^[16]报道一致。经羟氯喹治疗可显著提高系统性红斑狼疮小鼠体重, 降低 RI、24 h-UTP 和血清 Scr、BUN 水平, 明显改善系统性红斑狼疮小鼠肾组织病变和纤维化状况, 降低肾小球、肾小管病理评分和 CVF, 该结果与王蕊等^[17]研究结果相似。表明羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤具有保护作用, 对肾功能具有改善作用。

系统性红斑狼疮是与环境、遗传、免疫、激素等多因素相关的一种自身免疫性疾病, 研究证实, T 细胞和 B 淋巴细胞异常活化导致免疫功能紊乱及免疫复合物沉淀, 进而引发 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 等炎症因子大量分泌是系统性红斑狼疮及其并发症进行性加重的重要机制^[18]。TNF- α 具有炎症趋化属性, 可诱导炎症因子进一步释放而加重炎症反应, 并促进炎性浸润。此外, IFN- γ 被视为系统性红

斑狼疮病理机制的中枢介质, De Ceuninck 等^[19]报道靶向抑制 IFN- γ 对自身免疫性疾病具有一定的治疗作用; IL-4 可促进 B 细胞活化, Gao 等^[20]报道系统性红斑狼疮活动性与 IL-4 水平升高相关; IL-2 对系统性红斑狼疮进展表现为逆向调控作用, Miao 等^[21]报道给予少量 IL-2 对系统性红斑狼疮患者具有一定的治疗作用。本研究发现, 经羟氯喹治疗可显著降低系统性红斑狼疮小鼠肾组织 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 水平, 并提高 IL-2 水平, 这可能是羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤起到保护作用的重要机制。

Toll 样受体 (TLRs) 是一类跨膜识别受体, 其中 TLR9 在系统性红斑狼疮患者 B 淋巴细胞中高表达, 有文献报道 TLR9 高表达为系统性红斑狼疮疾病进展的危险因素^[22]。NF-κB 为 TLRs 下游靶蛋白, TLR9 可通过做为信号传导介质的 MyD88 诱导 NF-κB 表达与活化, 活化型 NF-κB 核转位后 NF-κB p65 亚基通过与 DNA 特定位点结合而诱导 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 等因子转录表达, 进而诱导炎症反应^[23]。本研究发现, 经羟氯喹治疗可显著降低系统性红斑狼疮小鼠肾组织 TLR9、MyD88、NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达量, 提示羟氯喹抑制系统性红斑狼疮小鼠肾脏炎症反应可能与抑制 TLR9/MyD88/NF-κB 信号通路有关。该结果与吴琼等^[6, 24]研究结果相似。为了证实上述推论, 本研究设置了 TLR9 抑制剂 ODN2088 组和羟氯喹+ODN2088 组, 结果显示, ODN2088 组对系统性红斑狼疮小鼠肾功能、肾组织病变、炎症反应相关指标以及 TLR9/MyD88/NF-κB 信号通路的调控方向与羟氯喹组相同, 且羟氯喹+ODN2088 组对系统性红斑狼疮小鼠各检测指标的调控作用显著优于羟氯喹组和 ODN2088 组, 从而进一步证实羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤的保护作用与抑制 TLR9/MyD88/NF-κB 信号通路有关。

综上所述, 羟氯喹对系统性红斑狼疮小鼠肾损伤具有保护作用, 对其肾功能具有改善作用, 其机制可能与抑制 TLR9/MyD88/NF-κB 信号通路, 减轻炎症反应有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Barber M R W, Drenkard C, Falasinnu T, et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(9): 515-532.

- [2] Mahajan A, Amelio J, Gairy K, *et al.* Systemic lupus erythematosus, lupus nephritis and end-stage renal disease: A pragmatic review mapping disease severity and progression [J]. *Lupus*, 2020, 29(9): 1011-1020.
- [3] Hsieh T Y, Lin Y C, Hung W T, *et al.* Change of renal gallium uptake correlated with change of inflammation activity in renal pathology in lupus nephritis patients [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(20): 4654.
- [4] Chen F F, Liu X T, Tao J, *et al.* Renal NLRP3 inflammasome activation is associated with disease activity in lupus nephritis [J]. *Clin Immunol*, 2023, 247: 109221.
- [5] Wang H, Guo F, Wang M, *et al.* The effect of TLR9, MyD88, and NF- κ B p65 in systemic lupus erythematosus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 6830366.
- [6] 吴琼, 于红红, 罗瑞熙, 等. 白芍总苷调节 TLR9/MyD88/NF- κ B 通路改善系统性红斑狼疮小鼠肾脏损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(12): 103-110.
- [7] 李俏, 郭霞, 蒋盛芝, 等. 干扰素- γ 水平影响系统性红斑狼疮小鼠体 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的初步研究 [J]. 解剖学研究, 2021, 43(3): 247-250.
- [8] 吴苏名, 王贺, 陈基黎, 等. 应用 OCTA 检测羟氯喹对系统性红斑狼疮患者黄斑区视网膜微血管形态的影响 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(9): 871-874.
- [9] Floris A, Piga M, Mangoni A A, *et al.* Protective effects of hydroxychloroquine against accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 3424136.
- [10] 孙岩, 张家林, 李杏, 等. 羟氯喹减轻氟尿嘧啶诱导的小鼠肠炎及机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(1): 1-8.
- [11] Zhang S, Zhang Q, Wang F, *et al.* Hydroxychloroquine inhibiting neutrophil extracellular trap formation alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by blocking TLR9 in mice [J]. *Clin Immunol*, 2020, 216: 108461.
- [12] 马松鹤, 夏令杰, 陶熔, 等. 环孢素对系统性红斑狼疮模型小鼠的肾保护作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2018, 29(24): 3381-3386.
- [13] Zhang L, Deng S, Zhao S, *et al.* Intra-peritoneal administration of mitochondrial DNA provokes acute lung injury and systemic inflammation via Toll-like receptor 9 [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1425.
- [14] 王双. JAK/STAT 信号通路在小鼠狼疮肾炎中的作用研究 [D]. 广州: 中山大学, 2009.
- [15] 李荣达, 董莉, 林玲. 诱发性系统性红斑狼疮小鼠模型研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(6): 669-671.
- [16] 谈欣怡, 谭奚扬, 曹左媛, 等. “自身清”双向调节 JAK2/STATs 信号通路抑制系统性红斑狼疮小鼠肺间质病变的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(2): 213-217.
- [17] 王蕊, 刘茜, 李丽. 槲皮素对系统性红斑狼疮模型小鼠肾脏的保护作用及对其免疫功能的影响研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(21): 2252-2256.
- [18] Salazar-Camarena D C, Ortíz-Lazareno P, Marín-Rosales M, *et al.* BAFF-R and TACI expression on CD $^{3+}$ T cells: Interplay among BAFF, APRIL and T helper cytokines profile in systemic lupus erythematosus [J]. *Cytokine*, 2019, 114: 115-127.
- [19] De Ceuninck F, Duguet F, Aussy A, *et al.* IFN- α : A key therapeutic target for multiple autoimmune rheumatic diseases [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2465-2473.
- [20] Gao M, Liu S, Chatham W W, *et al.* IL-4-induced quiescence of resting naive B cells is disrupted in systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol*, 2022, 209(8): 1513-1522.
- [21] Miao M, Li Y, Xu D, *et al.* Therapeutic responses and predictors of low-dose interleukin-2 in systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(5): 867-871.
- [22] 刘志明, 郜苗苗, 邵丽丽, 等. TLR9 mRNA 表达水平与 SLE 患者病情及疾病进展的相关性 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(6): 989-993.
- [23] 贺俊成, 江峥, 陈林. 齐墩果酸对牙髓炎大鼠 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响 [J]. 免疫学杂志, 2022, 38(10): 869-875.
- [24] 李俏, 郭霞, 蒋盛芝, 等. 干扰素- γ 水平影响系统性红斑狼疮小鼠体 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的初步研究 [J]. 解剖学研究, 2021, 43(3): 247-250.

[责任编辑 高源]