

# 芪黄健脾滋肾颗粒通过 AIM2/Blimp-1/Bcl-6 轴抑制 B 细胞分化改善 MRL/lpr 小鼠肾损害

程丽丽<sup>1</sup>, 汤忠富<sup>1</sup>, 李明<sup>1,2</sup>, 陈君洁<sup>3</sup>, 尚双双<sup>1</sup>, 刘思娣<sup>1</sup>, 黄传兵<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>安徽中医药大学第一附属医院风湿科, 安徽 合肥 230012; <sup>2</sup>新安医学与中医药现代化研究所, 安徽 合肥 230031; <sup>3</sup>安徽中医药大学中医学院, 安徽 合肥 230031

**摘要:**目的 分析芪黄健脾滋肾颗粒(QJZ)抑制 MRL/lpr 小鼠肾 B 细胞分化的疗效并探讨其潜在机制。方法 30 只 8 周龄雌性 MRL/lpr 小鼠随机分为 5 组:模型组、QJZ 组、泼尼松(Pred)组、QJZ+Pred 组、黑素瘤缺乏因子 2(AIM2)抑制剂组,6 只/组,8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠为正常组,各组按相应方法连续处理 8 周。采用生化仪检测尿液尿总蛋白/尿肌酐(TPCR)、尿白蛋白/尿肌酐(ACR)及血清中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平;组织病理学染色(HE、Masson、过碘酸-雪夫)观察小鼠肾脏病理结构的变化;电镜观察肾脏超微结构变化;酶联免疫吸附测定抗 dsDNA、细胞因子、趋化因子的变化;免疫组化观察肾脏中补体 C3、C4 沉积情况;免疫荧光观察肾脏中 AIM2、CD19、CD27、CD138 表达情况;流式细胞术分析脾脏 B 淋巴细胞亚群的变化,Western blotting 检测 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1(Blimp-1)/B 细胞淋巴瘤 6 蛋白(Bcl-6)信号轴的影响。结果 QJZ 改善了 MRL/lpr 小鼠的 Cr、BUN、TPCR、ACR 水平( $P<0.05$ ),并改善肾脏的病理变化,降低抗双链 DNA 抗体(ds-DNA)、B 细胞活化因子(BAFF)、白细胞介素(IL)-21、CXC 趋化因子受体(CXCR)-12、CXCR-19、C3、C4 表达,提高 IL-10 水平( $P<0.05$ );Western blotting 结果显示 QJZ 降低 B 细胞关键转录蛋白 Blimp-1、X-box 结合蛋白 1(XBP-1)的表达,升高 Bcl-6、配对盒 5(PAX5)的表达( $P<0.05$ );流式细胞术结果显示 QJZ 影响 B 细胞的分化,免疫荧光结果显示 QJZ 可降低 AIM2、CD27、CD138、CD69 的表达。AIM2 抑制可降低 B 细胞关键转录蛋白 Blimp-1、XBP-1 的表达,升高 Bcl-6、PAX5 的表达( $P<0.05$ ),抑制 B 细胞的分化,减少 IgG 生成,减少 C3、C4 的沉积,改善肾脏的病理变化。结论 QJZ 可能通过抑制 AIM2/Blimp-1/Bcl-6 信号通路影响 B 细胞分化抑制系统性红斑狼疮肾损害。

**关键词:**芪黄健脾滋肾颗粒;系统性红斑狼疮;肾损害;B 细胞;AIM2/Blimp-1/Bcl-6

## Qihuang Jianpi Zishen Granules improves renal damage in MRL/lpr mice by inhibiting B cell differentiation via the AIM2/Blimp-1/Bcl-6 axis

CHENG Lili<sup>1</sup>, TANG Zhongfu<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1,2</sup>, CHEN Junjie<sup>3</sup>, SHANG Shuangshuang<sup>1</sup>, LIU Sidi<sup>1</sup>, HUANG Chuanbing<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; <sup>2</sup>Institute of Xin'an Medicine and Modernization of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; <sup>3</sup>School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

**Abstract: Objective** To investigate the efficacy of Qihuang Jianpi Zishen Granules (QJZ) for inhibiting renal B cell differentiation in MRL/lpr mice and explore its underlying mechanism. **Methods** Thirty 8-week-old female MRL/lpr mice were randomly divided into model group, QJZ group, prednisone (Pred) group, QJZ+Pred group, and AIM2 inhibitor group ( $n=6$ ), with 6 8-week-old female C57BL/6 mice as the normal control group. After treatments with normal saline, QJZ, Pred, or AIM2 inhibitor for 8 weeks, the mice were examined for urinary total protein-to-creatinine ratio (TPCR) and albumin-to-creatinine ratio (ACR), serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) levels, and renal histopathology (with HE, Masson, and PAS staining) and ultrastructural changes (with electron microscopy). ELISA, immunohistochemistry, immunofluorescence staining and flow cytometry were used to detect blood levels of anti-dsDNA antibodies, cytokines and chemokines, renal deposition of complement components C3 and C4, renal expressions of AIM2, CD19, CD27 and CD138, and changes in splenic B lymphocyte subsets. The effect of QJZ on the AIM2/Blimp-1/Bcl-6 signaling axis was examined using Western blotting. **Results** QJZ treatment significantly improved Cr, BUN, TPCR and ACR in MRL/lpr mice, ameliorated renal pathologies, reduced the expressions of ds-DNA, BAFF, IL-21, CXCL12, CXCL13, C3 and C4, and increased IL-10 levels. QJZ significantly downregulated renal expressions of the key B-cell transcription factors Blimp-1 and XBP-1, upregulated Bcl-6 and PAX5

expressions, inhibited B-cell differentiation, and lowered the expressions of AIM2, CD27, CD138 and CD69. Inhibition of AIM2 similarly reduced renal Blimp-1 and XBP-1 expressions, increased Bcl-6 and PAX5 levels, suppressed B-cell differentiation, decreased IgG production, reduced C3 and C4 deposition, and alleviated renal pathology in MRL/lpr mice. **Conclusion** QJZ inhibits B cell differentiation and alleviates renal damage in systemic lupus erythematosus possibly by suppressing the AIM2/Blimp-1/Bcl-6 signaling pathway.

**Keywords:** Qihuang Jianpi Zishen Granules; systemic lupus erythematosus; renal damage; B cells; AIM2/Blimp-1/Bcl-6

收稿日期:2025-06-13

基金项目:国家自然科学基金(82574970);安徽省临床医学研究转化专项项目(202304295107020114、202304295107020115);大健康研究院新安医学与中医药现代化研究所专项(2023CXMMTCM015、2023CXMMTCM004);安徽省研究生质量工程研究生创新创业实践项目(2024xcycysj121);安徽省高等学校科学重点研究项目(2024AH050957)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82574970).

作者简介:程丽丽,在读博士研究生,医师,E-mail: 3265544980@qq.com

通信作者:黄传兵,博士,主任医师,E-mail: chuanbinh@163.com

系统性红斑狼疮(SLE)是自身免疫介导的以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病,常累及肾脏,继而发展为狼疮肾炎(LN)<sup>[1,2]</sup>。B细胞过度分化导致自身抗体产生和免疫复合物在肾脏沉积,激活补体导致肾脏损害是最为直接的原因<sup>[3-5]</sup>。黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)是一种模式识别受体,参与炎性小体组装和激活,并调节先天性和适应性免疫反应<sup>[6,7]</sup>。B细胞分化过程主要受B淋巴细胞诱导的成熟蛋白1(Blimp-1)-B细胞淋巴瘤6蛋白(Bcl-6)轴的调节<sup>[8]</sup>。研究报道,SLE患者中AIM2异常增加,通过Blimp-1/Bcl-6轴介导B细胞分化,对SLE肾脏产生致病作用<sup>[9]</sup>,表明AIM2/Blimp-1/Bcl-6信号通路是SLE免疫的潜在调节机制,这可能为SLE的治疗提供新的思路。目前SLE肾脏损害病因及发病机制尚未明确,现有的治疗方案尚不能有效控制病情发展,临床缺乏特效药物干预疾病进展。因此对SLE肾脏损害进行深入研究意义重大。

芪黄健脾滋肾颗粒(QJZ)由经方“六味地黄丸”临床应用加减而成,由黄芪、菟丝子、熟地、山药、麸炒白术、茯苓、覆盆子、金樱子肉组成。脾肾亏虚是SLE的基本发病机制,QJZ(专利号:ZL202011227827.8)为我院特色医院制剂,具有“健脾滋肾”之功效,临床广泛应用。既往研究表明,可以有效治疗SLE肾损害并调节免疫,改善肾脏系膜细胞增殖等作用<sup>[10-14]</sup>。然而,QJZ影响B细胞分化的具体机制尚未得到充分阐述。基于此,本研究旨在评估QJZ是否通过介导AIM2/Blimp-1/Bcl-6信号通路抑制B细胞分化以改善MRL/lpr小鼠肾损害的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和实验设计

30只8周龄雌性MRL/lpr小鼠,体质量 $20\pm 2$ g;6只8周龄雌性C57BL/6小鼠,体质量 $21\pm 2$ g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号码:SCXK(沪)2022-0004]。所有小鼠均饲养于合肥综合性国家科学中心人工智能研究院SPF级别动物房。

8周龄雌性C57BL/6小鼠作为正常组(Control);将30只MRL/lpr小鼠采用随机数字表法随机分成5组:模型组(Model)、芪黄健脾滋肾颗粒组(QJZ组,7.8g/kg)、泼尼松组(Pred组,4.55mg/kg)、芪黄健脾滋肾颗粒加泼尼松组(QJZ+Pred组)、AIM2抑制剂组(AIM2 Inhibitor),6只组。适应性饲养1周。动物实验中的剂量根据小鼠和成人临床等效剂量的转换因子9.1计算。对照组及模型组小鼠均予以等量生理盐水灌胃,小鼠灌胃量按0.1mL/10g体质量计算。Pred组予以 $4.55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的泼尼松溶液灌胃,QJZ组的灌胃量根据前期课题组实验获得的最佳剂量<sup>[15]</sup>,予以 $7.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的QJZ灌胃;JZ+Pred组予

以 $4.55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的Pred溶液 $7.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的QJZ灌胃;AIM2抑制剂组予以ODN TTAGGG Sodium溶液 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{只}$ ,连续腹腔注射7d。连续给药8周。

### 1.2 实验药品

芪黄健脾滋肾颗粒(黄芪、菟丝子、熟地黄、山药、白术、茯苓、覆盆子、金樱子组成,配比为2:1:1:1.5:1:1:1:1)由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供(皖药制备字Z20220041000,批号:20231124),规格10g/包,30g/袋。醋酸泼尼松片(天津天药药业有限公司,批号:H12020689),5mg/片,100片/瓶。ODN TTAGGG Sodium(MCE,货号HY-150751C),剂量 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{只}$ ,连续腹腔注射7d。

### 1.3 实验取材

治疗8周后,将小鼠放入代谢笼中采集小鼠尿液。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2000r/min,离心5min,吸取上清于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。称取小鼠体质量,腹腔注射3%戊巴比妥钠( $20\text{ }\mu\text{L}/10\text{ g}$ )麻醉小鼠,通过眼底静脉取血收集小鼠血液,室温静置2h。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3000r/min,离心15min,吸取血清并分装, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。剪开小鼠腹部皮肤充分暴露腹腔,用镊子分离小鼠脾脏及肾脏,剥除周围脂肪及结缔组织。脾脏称重、计算脾脏指数(脾脏指数=脾脏质量/小鼠体质量)并拍照后,放入含10%FBS的RPMI 1640培养基中备用。留取肾脏标本,右肾液氮冻存后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用,左肾福尔马林固定保存,同时留取3~4块芝麻大小的同侧同方向肾组织戊二醛固定,用于后续实验。本研究获得安徽中医药大学实验动物伦理委员会审查与批准(伦理批号:AHUCM-mouse-2024200)。

### 1.4 生化指标检测

采用日立3100全自动生化分析仪检测小鼠尿液中尿白蛋白(南京建成生物工程研究院,C035-2-1 & 20240522)、尿总蛋白(南京建成生物工程研究院,A045-4 & 20240522)、尿肌酐含量,对尿白蛋白/尿肌酐(ACR)、尿总蛋白/尿肌酐(TPCR)进行测定;对小鼠血清中肌酐(Scr)和血尿素氮(BUN)水平检测。

### 1.5 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测自身抗体、细胞因子

使用ELISA试剂盒测定抗双链DNA抗体(dsDNA)、白细胞介素(IL)-10、IL-21、B细胞激活因子(BAFF,武汉基因美)水平;CXC趋化因子受体(CXCR)-12、CXCR19(上海酶联生物科技有限公司)水平。

### 1.6 苏木精-伊红(HE)、过碘酸-雪夫(PAS)、Masson染色观察肾脏病理情况

取小鼠新鲜肾皮质组织,将肾脏组织放入4%多聚甲醛溶液冰箱固定3d,依次脱水、包埋、组织切片(切片厚度约 $3\text{ }\mu\text{m}$ )、脱蜡、脱水后,分别进行HE、PAS和Masson染色,常规酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片后,显微镜下观察结果。在400倍数的光学显微镜下

随机计数带有尿极或血管极的20个肾小球横切面细胞数目,并取其平均值;用Austin法计算狼疮鼠肾组织活动性指数(AI)评分及肾组织慢性化指数(CI)评分。AI根据Austin评分标准,观察肾小球内皮细胞增殖、细胞新月体、炎症细胞浸润、核碎裂坏死、清晰血栓或白金耳改变、间质炎症细胞浸润6项指标。各指标按病变程度(-)~(+++)分为0、1、2、3分。新月体形成、纤维样坏死评分可双分,AI总分为24分。CI主要包括肾小球硬化、纤维新月形形成、间质纤维化和肾小管萎缩4个指标。按病变程度轻、中、重度分为0、1、2、3分,总分为12分。

### 1.7 透射电镜下观察肾脏超微结构情况

将若干块1 mm<sup>3</sup>组织立刻固定到2.5%戊二醛中24 h,把固定液倒入PBS缓冲液6 h,放入1%锇酸后固定2 h。用30%、50%乙醇及70%乙醇醋酸铀(包埋前染色)3 h,80%、89.5%、100%乙醇2次、环氧丙烷脱水处理。纯环氧树脂包埋后入烤箱,后进行切片,铜网捞片。电子染色后(铅染色)采用透射电镜(日本电子,JEM1400)拍照。

### 1.8 流式细胞术检测脾脏B细胞各亚群水平

首先制备脾细胞悬液,进行流式细胞术操作,剩余脾细胞悬液分装、离心后-80℃冻存备用。每个样本均吸取100 μL细胞悬液至5 mL圆底流式管用于制备样本管。从各组样本取出适量的细胞悬液混匀,吸取100 μL用于制备空白管、抗体单染管。按各抗体说明书要求于细胞悬液中加入1.25 μL的PerCP抗小鼠CD19抗体(BioLegend, B401260)、1.25 μL的PerCP抗小鼠CD27抗体(BioLegend, B310542),1.25 μL的PE抗小鼠CD138(BioLegend, B351080)、CD69(BioLegend, B341205)抗体,轻柔涡旋混匀;于4℃避光孵育30 min。洗涤后过膜及上机,使用CytoFLEXS流式细胞仪进行检测,利用CD19<sup>+</sup>和CD27<sup>+</sup>圈出初始B细胞,再根据CD19<sup>+</sup>和CD27<sup>+</sup>表示记忆B细胞,进行圈门;利用CD19<sup>+</sup>和CD69<sup>+</sup>圈出活化B细胞,CD19<sup>+</sup>和CD138<sup>+</sup>表示浆细胞,进行圈门。

### 1.9 Western blotting测定相关转录因子的相对表达情况

取肾脏组织,加入RIPA裂解液进行裂解,提取总蛋白后,依次经过样品处理以充分变性蛋白、上样与电泳、转膜后加入5%脱脂奶粉室温封闭2 min;加入Blimp1一抗(Bioss, bsm-60268M, 1:1000)、Bcl-6一抗(Abcam, ab33901, 1:2000)、Pax5一抗(Bioss, bsm-60221R, 1:1000)、XBP-1一抗(Bioss, bs-23973R, 1:2000)、GAPDH抗体(Zsbio, TA-08, 1:1000),4℃缓慢摇动孵育过夜;按照1:20 000用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育1.2 h;PBST洗膜3次,HRP化学发光底物曝光,使用ECL发光试剂盒来检测蛋白,全自动化学发光成像分析系统显影成像,拍照,保

存图像。采用ImageJ图像分析软件统计分析条带蛋白灰度值。

### 1.10 免疫荧光染色观察肾脏IgG、AIM2、CD19、CD138水平

取肾组织切片,依次进行二甲苯和乙醇的处理,清洗,使用柠檬酸盐修复液进行抗原修复,用阻水笔在每张样本上画疏水圈,然后滴加3%过氧化氢溶液,室温避光孵育10 min,去除内源性过氧化物酶,滴加山羊血清封闭液进行非特异性靶标封闭,分别滴加稀释后的兔属AIM2(Bioss, bs-5986R, 1:300)、CD19(武汉三鹰, 27949-1-AP, 1:2000)、CD138(武汉三鹰, 10593-1-AP, 1:2000)、IgG(武汉三鹰, 30000-0-AP, 1:500)孵育60 min, PBST溶液冲洗后,滴加二抗(HRP标记的山羊抗兔/鼠IgG, 1:400),孵育30 min,滴加TSA荧光染料反应液反应以及适量Dapi染液复染切片,用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并采集IgG、AIM2、CD19、CD138免疫荧光图像。

### 1.11 免疫组化测定肾脏C3、C4表达

取肾组织切片,依次进行二甲苯和乙醇的处理,清洗,使用柠檬酸盐修复液进行抗原修复,切片放入3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中室温孵育10 min,滴加兔源C3(Affinity, DF13224, 1:200)、C4(武汉三鹰, 22233-1-AP, 1:200)一抗孵育60 min, PBST溶液冲洗后,滴加HRP标记的山羊抗兔/鼠二抗(福州迈新, KIT-5220, 即用型试剂)试剂孵育30 min,滴加DAB显色剂后,苏木素衬染2 min,水洗干净后分别1%盐酸酒精分化10 s以及碳酸锂溶液蓝化30 s,水洗干净。常规脱水,二甲苯透明后中性树脂胶封片,显微镜观察C3、C4表达情况。

### 1.12 统计学分析

采用SPSS26.0和GraphPadPrism10.1.2软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示,多组间数据比较采用单因素方差分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠SCr、BUN、TPCR、ACR水平的影响

与Control组相比,Model组MRL/lpr狼疮鼠尿液中TPCR、ACR水平,血清中SCr、BUN水平均升高(P<0.05);与Model组相比,QJZ组小鼠血清中TPCR、ACR、SCr、BUN水平降低(P<0.05)。与Pred组相比,QJZ在降低ACR、TPCR更有优势(P<0.05)。与Pred组相比,QJZ+Pred组在降低TPCR、ACR、SCr、BUN水平更明显(P<0.05)。

### 2.2 QJZ对抗双链DNA抗体、细胞因子、趋化因子水平的影响

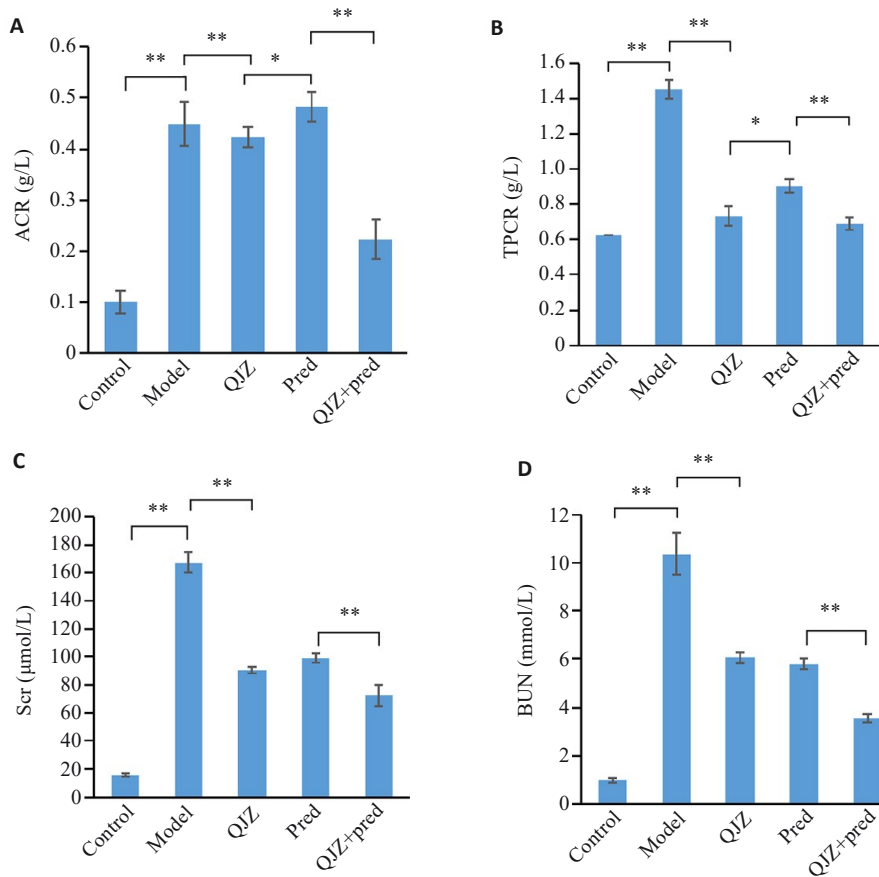


图1 各组MRL/lpr小鼠肾功能的比较

Fig. 1 Comparison of renal function among different groups of MRL/lpr mice. **A:** Expression levels of ACR in MRL/lpr mice in each group. **B:** Expression levels of TPCR in each group. **C:** Expression levels of Scr in each group. **D:** Expression levels of BUN in each group. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

与Control组相比,Model组小鼠血清中ds-DNA、BAFF、IL-21、CXCR-12、CXCR-19水平升高( $P<0.05$ ),IL-10水平降低( $P<0.05$ );与Model组比较,QJZ组小鼠血清中ds-DNA、BAFF、IL-21、CXCR-12、CXCR-19水平降低( $P<0.05$ ),IL-10水平升高( $P<0.05$ );与Pred组、QJZ组比较,QJZ+Pred组ds-DNA、BAFF、IL-21、CXCR-12、CXCR-19水平降低( $P<0.01$ ),IL-10水平升高( $P<0.05$ ,图2)。

### 2.3 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠肾脏病理的影响

小鼠肾脏HE、PAS和Masson染色结果及病理学评分结果显示,LN是免疫复合物沉积导致的肾疾病,侵犯部位主要为肾小球。正常组小鼠肾小球大小正常、轮廓清晰,基底膜呈细线状,周围肾间质炎性细胞浸润较少;PAS染色可见肾小球结构清晰,基底膜和肾小管等部位糖原沉积不明显;Masson染色下见肾小球及周围无明显胶原沉积。Model组狼疮小鼠肾脏中见肾小球大小及形态不规则,肾小囊扩张,系膜细胞和基底膜增生,肾间质炎性细胞浸润明显增加;PAS染色可见明显增厚的基底膜及增生的系膜基质;Masson染色可见肾小球毛

细血管内皮下广泛的条带状胶原沉积,肾小球出现局灶性硬化及纤维性新月体形成;AI及CI评分较Control组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与Model组相比,QJZ组及Pred组以及芪黄健脾滋肾颗粒加泼尼松组肾小球大小、形态恢复,系膜细胞增生情况好转,基底膜厚度降低,炎性细胞浸润减少;糖原及胶原沉积情况好转,AI评分及CI评分均下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图3)。

### 2.4 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠肾小球超微结构的影响

透射电镜示Model组小鼠肾小球系膜细胞、基底膜厚度正常,细胞质内常见发达的高尔基体与丰富的核糖体,内质网较丰富;Model组可见系膜区散在或团块状高电子密度物质、系膜基质增厚、细胞外基质增多、细胞核染色质浓缩、边集,胞质空泡化,胞膜完整性破坏;与Model组小鼠相比较,Pred组、QJZ组,基底膜异常增厚有所减轻,团块状高电子密度物质减少,胞质空泡化现象改善,细胞核形态改善,胞膜较完整(图4)。

### 2.5 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠肾脏中C3、C4沉积的影响

与Control组相比,Model组小鼠肾脏组织中C3、

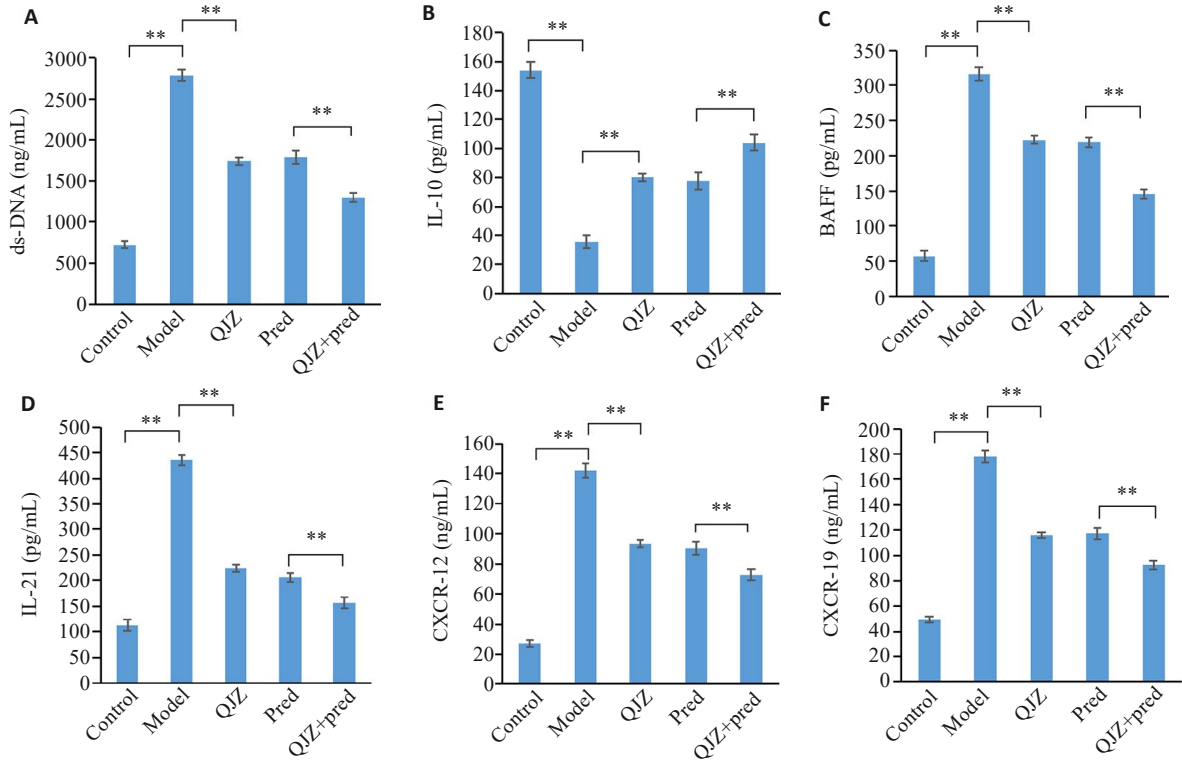


图2 各组MRL/lpr小鼠ds-DNA抗体、细胞因子、趋化因子水平的比较

Fig.2 Comparison of ds-DNA antibody, cytokine and chemokine levels in MRL/lpr mice in each group. A: Levels of ds-DNA in each group. B: Levels of IL-10 in each group. C: Levels of BAFF in each group. D: Levels of IL-21 in each group. E: Levels of CXCR-12 in each group. F: Levels of CXCR-19 in each group. \*\* $P<0.01$ .

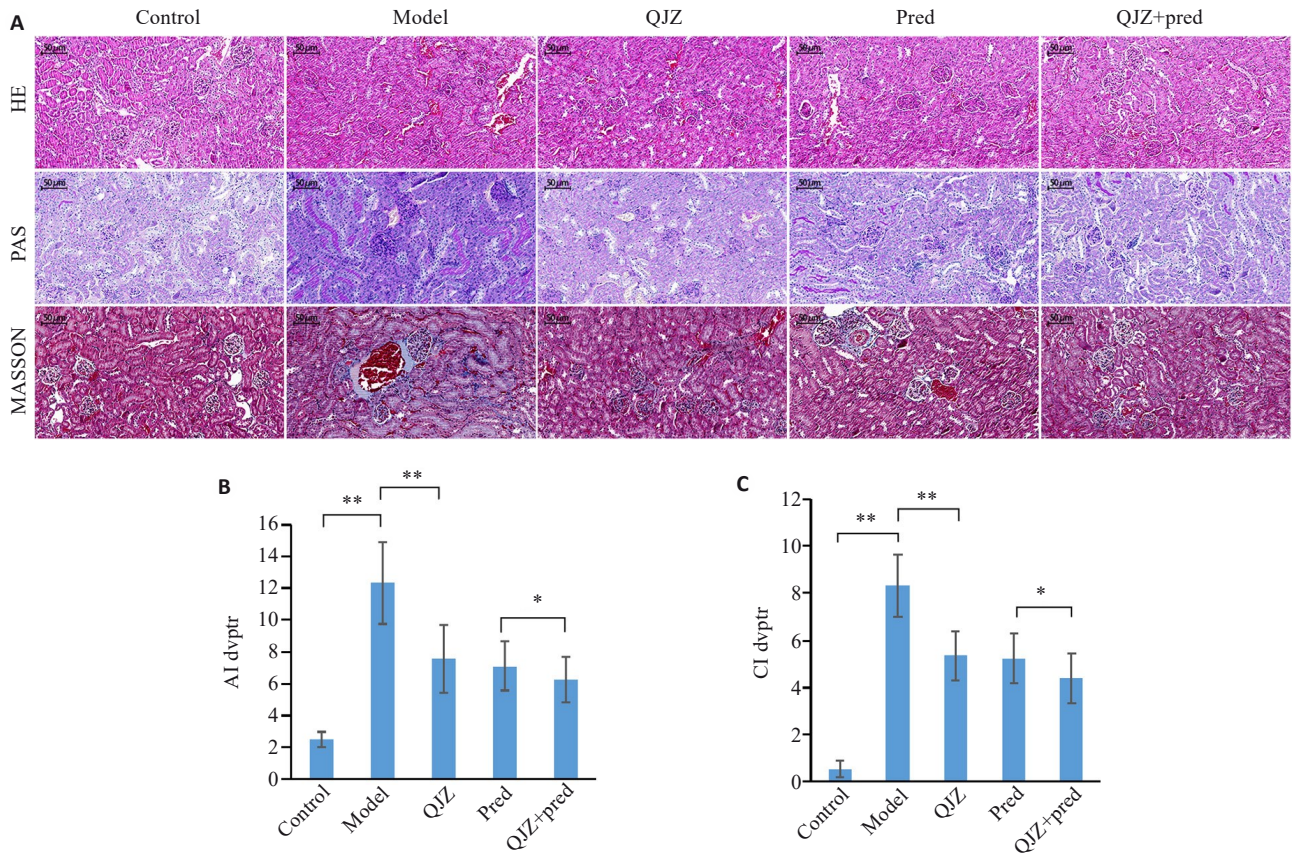


图3 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠肾脏病理的影响

Fig.3 Effect of QJZ on renal pathology in MRL/lpr lupus mice. A: Results of HE, PAS and Masson staining of the kidneys in each group (Scale bar=50  $\mu$ m). B: Comparison of pathological AI scores of the kidneys in each group. C: Comparison of pathological CI scores of the kidneys in each group. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

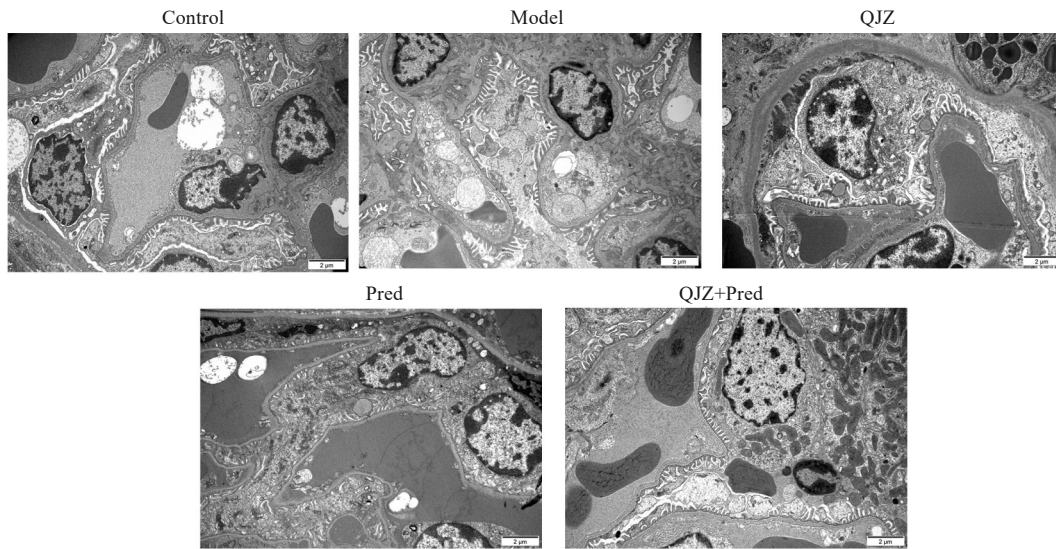


图4 各组小鼠肾小球透射电镜下超微结构的比较

Fig. 4 Comparison of ultrastructural changes in renal glomeruli in each group under transmission electron microscopy (Scale bar=2 μm).

C4 沉积增多;与 Model 组比较, QJZ 组、Pred 组、QJZ+Pred 组小鼠肾脏中 C3、C4 水平均降低 ( $P < 0.05$ )。

QJZ+Pred 组与 Pred 组及 QJZ 组相比, C3、C4 表达降低 ( $P < 0.05$ , 图5)。

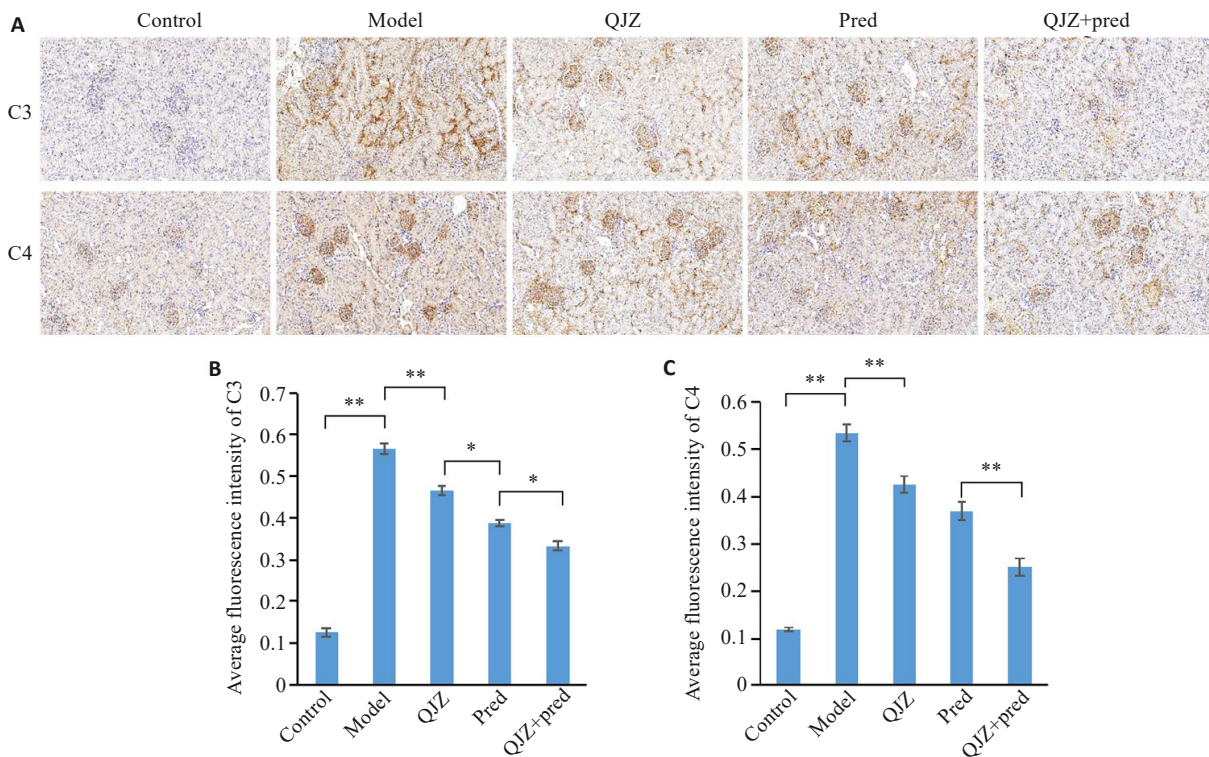


图5 各组MRL/lpr小鼠肾脏中C3、C4沉积水平的比较

Fig. 5 Comparison of C3 and C4 deposition levels in the kidneys of MRL/lpr mice among the groups. A: Immunohistochemistry for detecting expressions of C3 and C4 in the kidneys in each group (×100). B: Average fluorescence intensity of C3 in the kidneys in each group. C: Average fluorescence intensity of C4 in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 2.6 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠B细胞分化关键转录蛋白的影响

与Control组相比, Model组Blimp-1、XBP-1的表达升高、Bcl-6、PAX5的表达下降 ( $P < 0.05$ )。与Model组比较, QJZ组小鼠Blimp-1、XBP-1的表达下降, Bcl-6、

PAX5表达上升 ( $P < 0.05$ )。与Pred组相比, QJZ在升高Bcl-6方面表达更显著 ( $P < 0.05$ )。与QJZ组及Pred组比较, QJZ+Pred组Blimp-1、XBP-1表达降低, Bcl-6、PAX5表达升高 ( $P < 0.05$ , 图6)。

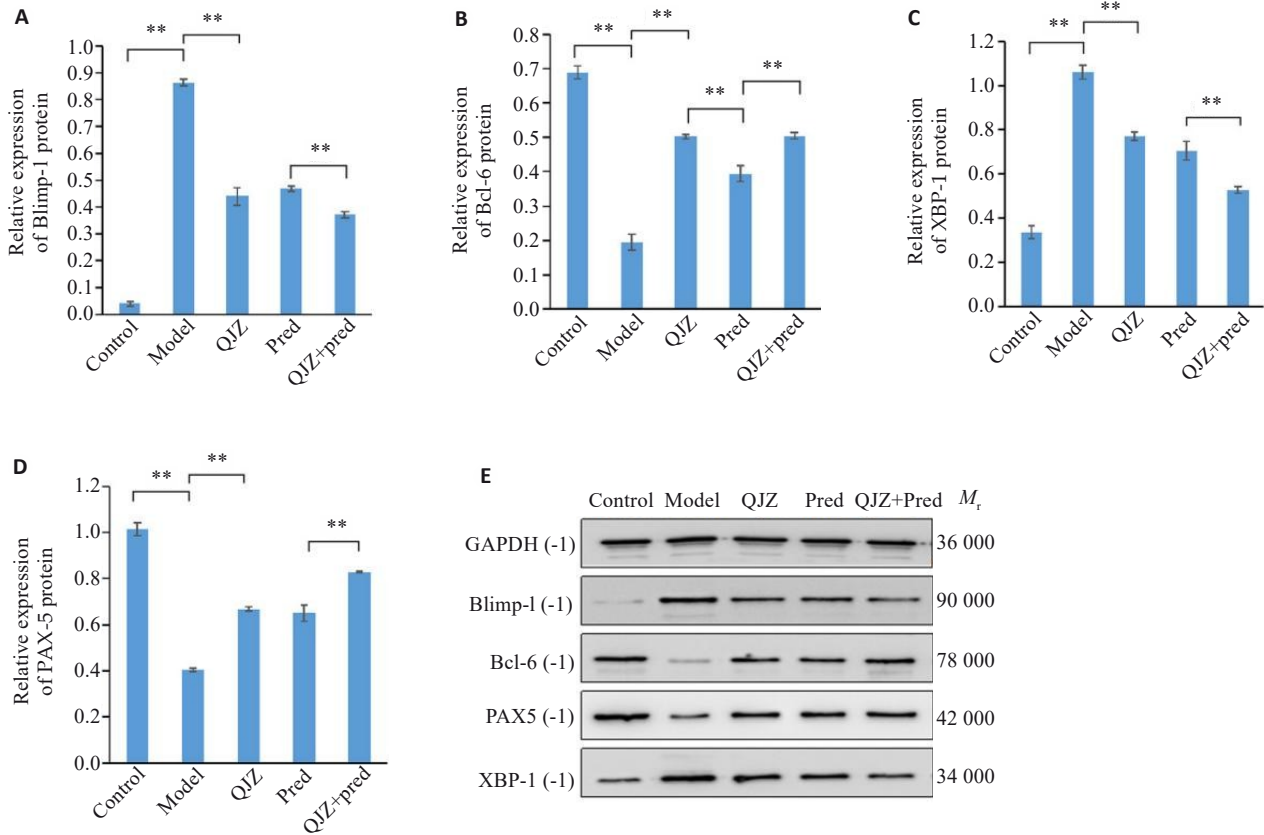


图6 各组B细胞分化关键转录蛋白表达水平比较

Fig.6 Comparison of expression levels of key transcriptional proteins involved in B-cell differentiation in each group. A: Relative protein expression levels of Blimp-1 in each group. B: Relative protein expression levels of Bcl-6 in each group. C: Relative protein expression levels of XBP-1 in each group. D: Relative protein expression levels of PAX-5 in each group. E: Protein bands in Western blotting in each group. \*\* $P < 0.01$ .

### 2.7 QJZ影响MRL/lpr小鼠的B细胞活化

与Control组相比,Model组脾脏指数升高;与Model组比较,QJZ组、Pred组、QJZ+Pred组小鼠脾脏指数的表达均下降( $P < 0.05$ )。QJZ+Pred组与Pred组比较小鼠脾脏指数的表达均下降义( $P < 0.05$ ,图7)。各组小鼠脾脏主要B细胞亚群比例方面,与Control组相比,未经治疗的模型组小鼠脾脏中活化B细胞、记忆B细胞、浆细胞比例升高( $P < 0.05$ );与Model组相比,QJZ组、Pred组以及QJZ+Pred组小鼠脾脏活化B细胞、记忆B细胞、浆细胞比例降低( $P < 0.01$ ,图8)。

### 2.8 QJZ对MRL/lpr狼疮鼠肾组织IgG、AIM2、CD19、CD138水平的影响

与Control组相比,Model组小鼠肾组织IgG、AIM2、CD19、CD138荧光强度增加;与Model组相比,QJZ、Pred、QJZ+Pred组小鼠肾组织中IgG、AIM2、CD19、CD138表达降低。且QJZ组相较于Pred组,降低IgG、AIM2光密度更显著(图9)。

### 2.9 QJZ调节AIM2/Blimp-1/Bcl-6抑制B细胞分化

Western blotting结果显示,与模型组相比,AIM2抑制剂组Blimp-1、XBP-1蛋白相对表达量降低,Bcl-6蛋白相对表达量升高( $P < 0.01$ ,图10A~E)。病理结果显

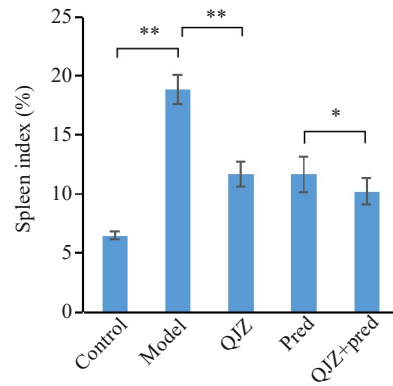


图7 各组MRL/lpr小鼠脾脏组织脾脏指数的比较

Fig.7 Spleen index of the spleen tissues in each group of MRL/lpr mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

示,与模型组相比,AIM2抑制剂组肾小球大小、形态恢复,系膜细胞增生情况好转,基底膜厚度降低,炎性细胞浸润减少;糖原及胶原沉积情况好转(图10F)。流式细胞术结果显示,AIM2抑制剂组活化B细胞比例、浆细胞比例降低(图10H)。IF结果显示,AIM2抑制剂组IgG表达相对模型组降低(图10G)。免疫组化结果显示,AIM2抑制剂组C3、C4沉积减少(图10I)。

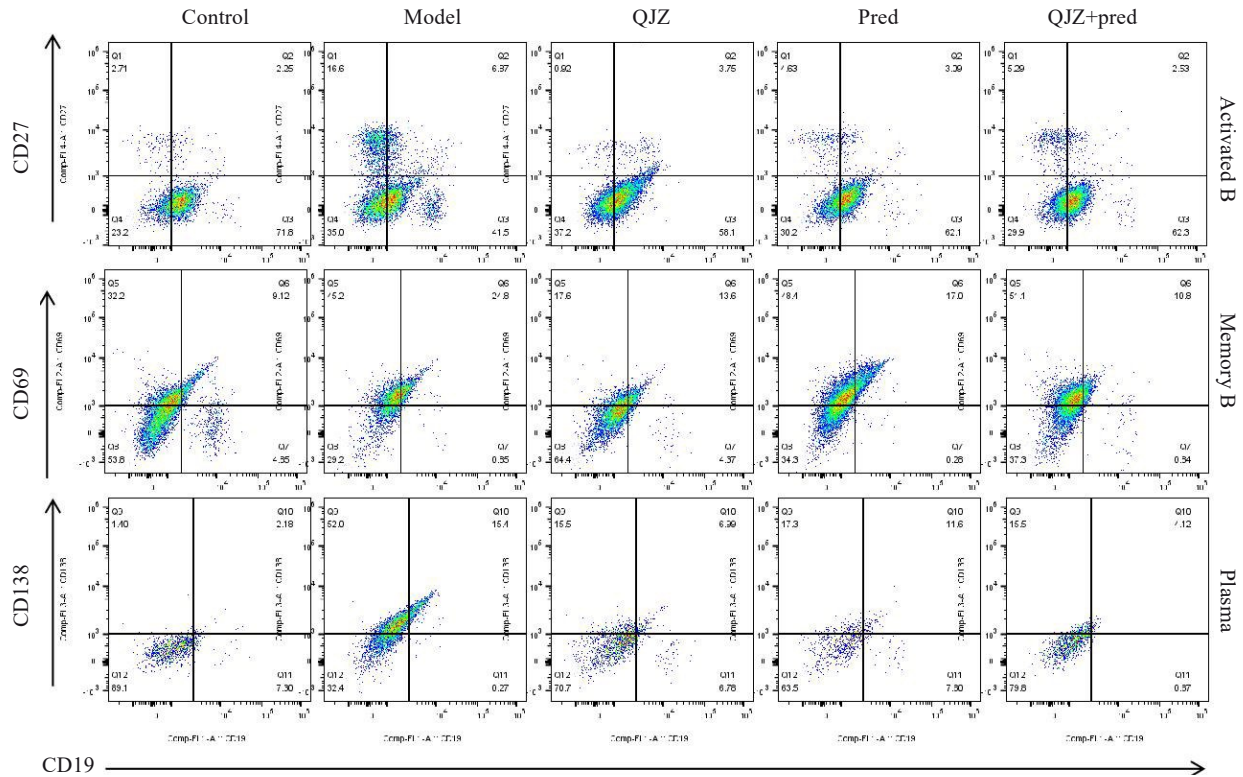


图8 各组MRL/lpr小鼠B细胞的比较  
Fig.8 Percentages of B cells in each group of MRL/lpr mice.

### 3 讨论

肾损害是SLE最常见的系统损害,是SLE总体发病率和死亡率的主要危险因素,尽管有有效的抗炎和免疫抑制疗法,但仍有太多患者以慢性肾脏病或终末期肾病(5%~20%)告终,早期干预和改善SLE的预后具有重要意义<sup>[16]</sup>。在中医认识中,SLE归属于“阴阳毒”、“红蝴蝶疮”等范畴,出现肾损害表现又称为“肾痹”,总体核心病机呈现“脾肾亏虚为本”的特点。芪黄健脾滋肾颗粒具有健脾滋肾、益气固元的功效,在临床应用中疗效明显。有研究对QJZ进行质谱分析以及药物代谢学检测发现<sup>[17]</sup>,QJZ含有如槲皮素、金丝桃苷、山柰素(山柰酚)、芍药苷、毛蕊异黄酮苷、紫云英苷、鞣花酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷等多种成分。有研究表明,槲皮素治疗可降低BUN、Scr、24 h UP、肾脏肥大指数、肾小球评分、肾小管间质评分以及肾小管评分,有效保护系统性红斑狼疮肾脏功能,改善其免疫功能,且可能通过下调AKT/mTOR通路来抑制初始T细胞向Tfh细胞分化,并减少衰老的Tfh细胞的比例,进而改善MRL/Lpr鼠的狼疮样表型,可能作为SLE治疗的潜在药物<sup>[18-20]</sup>。金丝桃苷<sup>[21]</sup>可通过抑制Yes相关蛋白(YAP)发挥缓解肾小管间质纤维化作用,保护肾组织。山柰素(山柰酚)<sup>[22]</sup>可以减轻肾小管上皮细胞炎症因子的分泌,增加相关氧化还原酶的表达,进而减轻肾损伤,保护肾功能。芍药苷<sup>[23]</sup>具有

广泛的抗炎和免疫调节作用,抑制淋巴细胞增殖和活化,广泛用于SLE的治疗。本研究发现,QJZ降低了MRL/lpr小鼠的抗dsDNA、IgG、CREA、BUN、TPCR、ACR的水平,降低了肾脏组织中C3和C4的沉积,HE染色及电镜下结果均表明,QJZ对SLE肾损害明显的保护作用。

课题组前期研究主要围绕在其对肾小球系膜细胞增殖、炎症、足细胞凋亡、自噬等方面<sup>[12-15]</sup>,尚未对B细胞分化展开研究。但B细胞过度分化在LN的发病机制中起关键作用<sup>[24]</sup>。B细胞分化水平与LN疾病活动呈正相关,靶向B细胞的治疗具有重要意义<sup>[25]</sup>。因此本研究主要观察QJZ对B细胞分化的影响及作用机制,首先评价了脾脏指数以评估淋巴细胞增殖程度,结果显示模型组明显升高,但QJZ给药后脾脏指数降低;流式细胞术分析显示,QJZ可抑制B细胞分化,减少了浆细胞的形成,说明QJZ可以通过抑制B细胞过度分化,改善狼疮肾损害。

AIM2是干扰素诱导型PYHIN蛋白家族的成员<sup>[26]</sup>,在免疫细胞中,AIM2主要存在于先天免疫细胞中,其功能是感知病原体相关或宿主衍生的胞质dsDNA,募集其他炎性小体成分,并诱导caspase依赖性炎性小体形成<sup>[27-29]</sup>。成人中,AIM2主要在B细胞中表达<sup>[30,31]</sup>,在SLE B细胞中高表达<sup>[32-34]</sup>。Blimp-1、Bcl-6均是控制B

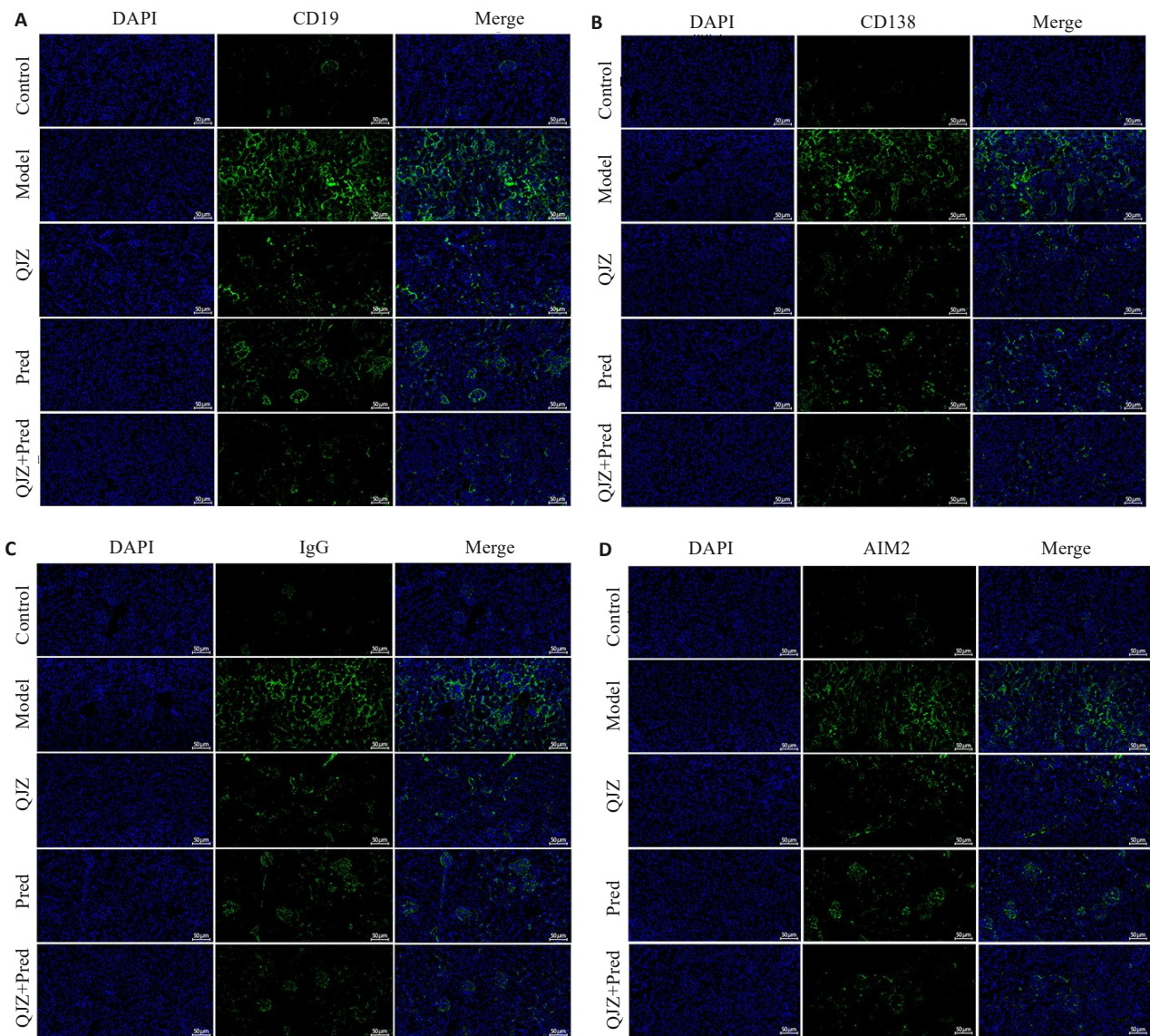


图9 各组MRL/lpr小鼠肾组织CD19、CD138、IgG、AIM2表达的比较

Fig.9 Expression levels of CD19, CD138, IgG and AIM2 in the renal tissues of MRL/lpr mice in each group (Immunofluorescence staining; Scale bar=50 μm). A: CD19 expression levels in each group. B: CD138 expression levels in each group. C: IgG expression levels in each group. D: AIM2 expression levels in each group.

细胞分化的关键转录因子<sup>[35,36]</sup>, Blimp-1 抑制 Bcl-6、Pax5 的基因转录, 进而抑制浆细胞分化<sup>[37]</sup>。既往有研究显示, 活动性 SLE B 细胞中发现 AIM2 的表达升高, IL-10 的刺激增加了 AIM2 的蛋白表达。CD19<sup>+</sup>B 细胞中 AIM2 的沉默导致 Bcl-6、Pax5 的 mRNA 表达降低, Blimp-1、Xbp1 的表达增加, 结果表明, AIM2 可能通过直接相互作用负向调节 Blimp-1 表达, 正向调节 Bcl-6 表达<sup>[15]</sup>。本研究发现, AIM2 在 SLE 模型组中表达增加, 而 QJZ 干预后可减少 AIM2 的表达, 抑制 B 淋巴细胞分化关键转录蛋白 Blimp-1、XBP-1 的表达, 增加 Bcl-6、Pax-5 的表达。因此, 本研究进一步分析了 QJZ 改变 B 细胞群可以缓解 SLE 疾病的机制。本研究显示, 使用 AIM2 抑制剂后, B 细胞分化关键转录因子 blimp-1 水平

降低, Bcl-6 水平升高, 浆细胞比例减少, IgG 生成减少, 有效改善了肾损害水平, 减少了 C3、C4 的沉积。

B 淋巴细胞的存活、成熟和分化也受到各种 B 细胞相关细胞因子的影响, 例如 B 细胞活化因子 (BAFF)、IL-21<sup>[38]</sup>。IL-21 是浆细胞分化和增殖的关键驱动因素。从 SLE 患者中分离的 B 淋巴细胞在用自体 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 IL-21 刺激时, IgG 产生显著增加, 而用针对 IL-21 受体的 Fc 融合蛋白治疗会抑制 B 淋巴细胞分化为浆细胞<sup>[39]</sup>, 本研究显示, QJZ 干预后降低了 IL-21、BAFF、CXCR-12、CXCR-19 的表达, 提高了 IL-10 水平。

综上所述, 芪黄健脾滋肾颗粒可下调 MRL/lpr 小鼠 AIM2、Blimp-1、Bcl-6、免疫学和肾损害指标, 改善 C3、C4 沉积水平, 改善 MRL/lpr 小鼠免疫稳态及肾损

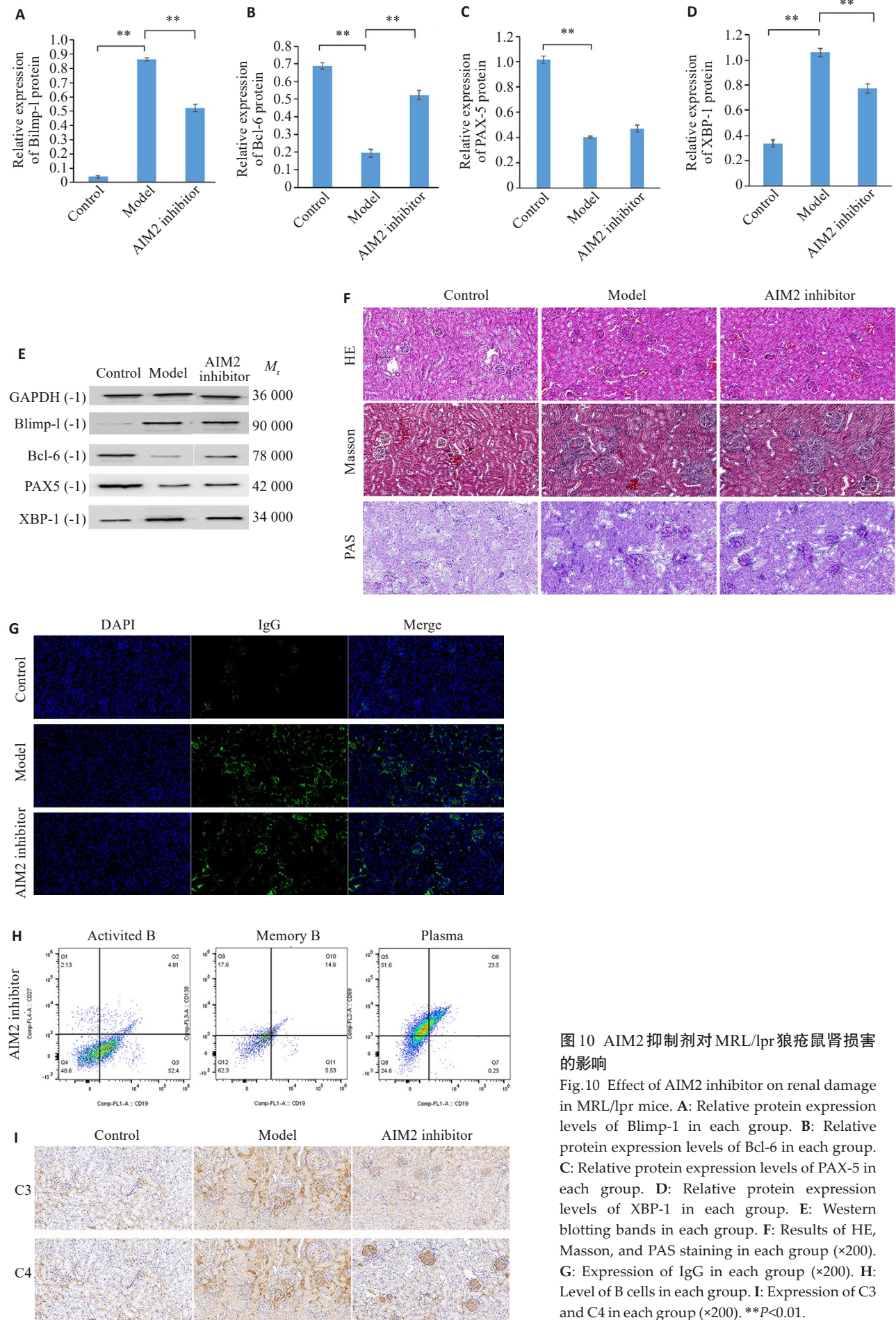


图 10 AIM2 抑制剂对 MRL/lpr 狼疮鼠肾损害的影响

Fig.10 Effect of AIM2 inhibitor on renal damage in MRL/lpr mice. **A**: Relative protein expression levels of Blimp-1 in each group. **B**: Relative protein expression levels of Bcl-6 in each group. **C**: Relative protein expression levels of PAX-5 in each group. **D**: Relative protein expression levels of XBP-1 in each group. **E**: Western blotting bands in each group. **F**: Results of HE, Masson, and PAS staining in each group ( $\times 200$ ). **G**: Expression of IgG in each group ( $\times 200$ ). **H**: Level of B cells in each group. **I**: Expression of C3 and C4 in each group ( $\times 200$ ).  $**P < 0.01$ .

害,其机制可能是通过AIM2/Blimp-1/Bcl-6轴抑制B细胞分化从而改善SLE的肾损害。本研究为中医药干预SLE提供一定的科学依据,但也存在不足,由于中药组方存在多成分、多靶点的特点,在机制研究上需要更多的实验验证。课题组后续将补充细胞功能验证,为今后临床广泛应用奠定理论基础。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

### 参考文献:

- [1] Lou HT, Ling GS, Cao XT. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: From immunopathology to therapeutic target[J]. *J Autoimmun*, 2022, 132: 102861.
- [2] Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(9): 929-39.
- [3] Canny SP, Jackson SW. B cells in systemic lupus erythematosus: from disease mechanisms to targeted therapies[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2021, 47(3): 395-413.
- [4] Arbitman L, Furie R, Vashistha H. B cell-targeted therapies in systemic lupus erythematosus[J]. *J Autoimmun*, 2022, 132: 102873.
- [5] Ma KY, Du WH, Wang XH, et al. Multiple functions of B cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6021.
- [6] Choubey D, Panchanathan R. Absent in melanoma 2 proteins in SLE[J]. *Clin Immunol*, 2017, 176: 42-8.
- [7] Zhu H, Zhao M, Chang C, et al. The complex role of AIM2 in autoimmune diseases and cancers[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2021, 9(3): 649-65.
- [8] Yi P, Cao PP, Yang M, et al. Overexpressed CD44 is associated with B-cell activation *via* the HA-CD44-AIM2 pathway in lupus B cells[J]. *Clin Immunol*, 2023, 255: 109710.
- [9] Yang M, Long D, Hu LY, et al. AIM2 deficiency in B cells ameliorates systemic lupus erythematosus by regulating Blimp-1-Bcl-6 axis-mediated B-cell differentiation[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 341.
- [10] Shang SS, Li M, Jiang H, et al. The protective effects of qihuang Jianpi zishen decoction on mrl/lpr mice and its mechanism[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2022, 35(6): 1627-35.
- [11] 李云飞, 庞利君, 束龙武, 等. 芪黄健脾滋肾颗粒可改善小鼠系统性红斑狼疮血小板减少: 基于Ca<sup>2+</sup>/CaMKK2/AMPK/mTOR信号通路介导的自噬[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(12): 2327-34.
- [12] 陈君洁, 黄传兵, 程丽丽, 等. 芪黄健脾滋肾颗粒调控JAK1/STAT1信号通路对MRL/lpr狼疮小鼠足细胞凋亡的影响[J]. *中成药*, 2024, 46(12): 4145-50.
- [13] 尚双双, 李明, 黄传兵. 芪黄健脾滋肾颗粒改善MRL/lpr小鼠肾脏损害机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2025, 45(3): 321-9.
- [14] 陈君洁, 黄传兵, 李明. 健脾滋肾方抑制系统性红斑狼疮患者的足细胞自噬: 基于网络药理学和临床研究[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(3): 465-73.
- [15] 汤忠富, 黄传兵, 李明, 等. 芪黄健脾滋肾颗粒通过抑制MyD88/NF- $\kappa$ B通路减轻MRL/lpr小鼠肾损害[J/OL]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(8): 1625-32.
- [16] Dobrowolski C, Lao SM, Kharouf F, et al. Lupus nephritis: biomarkers[J]. *Adv Clin Chem*, 2025, 124: 87-122.
- [17] 庞利君, 黄传兵, 李明, 等. 应用LC-MS/MS技术研究健脾滋肾方对系统性红斑狼疮鼠血清代谢物及代谢通路的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2025, 45(4): 368-77.
- [18] 熊峰. 槲皮素治疗系统性红斑狼疮模型MRL/Lpr鼠的疗效观察及机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2023.
- [19] 燕红梅. 中药狼疮方及其活性成分槲皮素对系统性红斑狼疮的治疗作用及可能机制的探索[D]. 广州: 华南理工大学, 2023.
- [20] 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): 2252-6.
- [21] 王俊青, 余惠凡, 黄林生, 等. 金丝桃苷通过抑制YAP改善肾小管间质纤维化[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2025, 54(2): 190-7.
- [22] 王超, 魏翠婷, 李润, 等. 山柰酚通过改善肾小管上皮细胞的氧化应激与炎症反应减轻1型糖尿病小鼠肾损伤[J]. *解放军医学院学报*, 2024, 45(3): 261-9.
- [23] 杨亿. 芍药苷调控肠道菌群和Th17/Treg免疫平衡治疗系统性红斑狼疮[D]. 南昌: 南昌大学, 2024.
- [24] Dörner T, Szelinski F, Lino AC, et al. Therapeutic implications of the anergic/postactivated status of B cells in systemic lupus erythematosus[J]. *RMD Open*, 2020, 6(2): e001258.
- [25] Gao YN, Zhou JW, Huang Y, et al. Jiedu-Quyu-Ziyin Fang (JQZF) inhibits the proliferation and activation of B cells in MRL/lpr mice *via* modulating the AKT/mTOR/c-Myc signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 315: 116625.
- [26] Choubey D, Panchanathan R. Interferon (IFN)-inducible Absent in Melanoma 2 proteins in the negative regulation of the type I IFN response: Implications for lupus nephritis[J]. *Cytokine*, 2020, 132: 154682.
- [27] Wortmann M, Xiao XH, Wabnitz G, et al. AIM2 levels and DNA-triggered inflammasome response are increased in peripheral leukocytes of patients with abdominal aortic aneurysm[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(4): 337-45.
- [28] Ke PF, Zhu YT, Cao SL, et al. Identification of pattern recognition receptor genes in peripheral blood mononuclear cells and monocytes as biomarkers for the diagnosis of lupus nephritis[J]. *Clin Chim Acta*, 2024, 554: 117785.
- [29] Sharma BR, Karki R, Kanneganti TD. Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection[J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(11): 1998-2011.
- [30] Svensson A, Patzi Churqui M, Schlüter K, et al. Maturation-dependent expression of AIM2 in human B-cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183268.
- [31] Uresti-Rivera EE, García-Hernández MH. AIM2-inflammasome role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmunity*, 2022, 55(7): 443-54.
- [32] Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus[J]. *Genome Res*, 2010, 20(2): 170-9.
- [33] Leite JA, Menezes L, Martins E, et al. AIM2 promotes T<sub>H</sub>17 cells differentiation by regulating ROR $\gamma$ t transcription activity[J]. *iScience*, 2023, 26(11): 108134.
- [34] Zhao JJ, Miller-Little W, Li XX. Inflammasome-independent

- functions of AIM2[J]. J Exp Med, 2021, 218(5): e20210273.
- [35] Luu M, Krause FF, Monning H, et al. Dissecting the metabolic signaling pathways by which microbial molecules drive the differentiation of regulatory B cells[J]. Mucosal Immunol, 2025, 18(1): 66-75.
- [36] Faliti CE, Mesina M, Choi J, et al. Interleukin-2-secreting T helper cells promote extra-follicular B cell maturation *via* intrinsic regulation of a B cell mTOR-AKT-Blimp-1 axis[J]. Immunity, 2024, 57(12): 2772-89.e8.
- [37] Qian GJ, Jiang WX, Sun DL, et al. B-cell-derived IL-10 promotes allergic sensitization in asthma regulated by Bcl-3[J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(11): 1313-27.
- [38] Caneparo V, Landolfo S, Gariglio M, et al. The absent in melanoma 2-like receptor IFN-inducible protein 16 as an inflammasome regulator in systemic lupus erythematosus: the dark side of sensing microbes[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1180.
- [39] Nakou M, Papadimitraki ED, Fanouriakis A, et al. Interleukin-21 is increased in active systemic lupus erythematosus patients and contributes to the generation of plasma B cells[J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31(2): 172-9.

(编辑:郎 朗)