

· 论 著 ·

白细胞介素-6 在 ALD-DNA 诱导的 SLE 模型小鼠 SLE 中的作用机制研究

张小蓉, 陈于思[△], 王君哲

(重庆三峡中心医院检验科 404000)

摘要:目的 探讨白细胞介素(IL)-6 对 ALD-DNA 诱导的系统性红斑狼疮(SLE)模型小鼠 SLE 中的作用机制。方法 在健康的雌性 C57BL/6 小鼠体内用活化淋巴细胞来源的 DNA(ALD-DNA)免疫,从而诱导小鼠的 SLE,未免疫的小鼠被用作对照。检测了疾病相关的一些发病指标,包括抗双链 DNA 抗体,尿蛋白和肾脏的病理学改变。结果 IL-6 KO 基因敲除的小鼠能抵抗 ALD-DNA 诱导的小鼠 SLE 模型。在 IL-6 KO 免疫的小鼠中,CD4⁺T 细胞的活化状态低于野生型的免疫小鼠。胞内细胞因子染色结果表明,IL-6 KO 免疫的小鼠体内 Foxp3 的表达高于野生型免疫的小鼠。结论 在 ALD-DNA 诱导的 SLE 模型中,IL-6 可以抑制 Treg 细胞的分化,从而促进疾病的发展。

关键词: 系统性红斑狼疮; 白细胞介素-6; 调节性 T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.029 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)19-2775-04

The mechanism of interleukin-6 on SLE in systemic lupus erythematosus mouse model induced by ALD-DNA

ZHANG Xiaorong, CHEN Yusi[△], WANG Junzhe

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of interleukin(IL)-6 on the systemic lupus erythematosus mouse model of systemic lupus erythematosus in ALD-DNA induced. **Methods** The source of activated lymphocytes in mice with normal female C57BL/6 DNA(ALD-DNA)immunity, systemic lupus erythematosus and induced mice, non immune mice were used as controls. Detection of some indexes related to the disease onset, including anti double stranded DNA antibody, changes of urinary protein and kidney pathology. **Results** IL-6 knockout mice were able to resist the model of ALD-DNA induced systemic lupus erythematosus. In IL-6 KO immunized mice, the activation state of CD4⁺T cells was lower than that of wild type mice. Intracellular cytokine staining indicated that the expression of IL-6 KO immune mice Foxp3 was higher than that of wild type mice immunized. **Conclusion** The systemic lupus erythematosus model induced by ALD-DNA in differentiation of IL-6 could inhibit Treg, so as to promote the development of the disease.

Key words: systemic lupus erythematosus; interleukin-6; regulatory cell

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累积全身的自身免疫性疾病,该病的主要特点是体内自身免疫复合物的异常沉积,自身抗体的产生和多器官的损伤。免疫系统对自身的细胞和组织进行攻击,进而导致炎性反应及组织的损伤,该病受累部位是肾脏、皮肤、关节、脑、心脏、肺和其他的器官,但是主要的病变在肾脏^[1-3]。该病最主要的特点是产生抗 ds-DNA 抗体。抗 ds-DNA 抗体不仅能在患者血清中找到,在肾脏中同样也有。该病预后很差,且近年来发病率和病死率一直都在增加。在任何年龄阶段均可发病,但通常好发于年轻的女性,大约占 90%。该病的临床症状通过药物的治疗能得到一定的缓解,常用药物包括类固醇和免疫抑制剂等。但是该病是不能治愈的。本病的发病原因很复杂,主要包括致病性自身抗体及免疫复合物的产生,T 细胞和自然杀伤(NK)细胞的功能失调,遗传和环境等因素^[4-5]。在不同的人种中本病具有遗传特异性,细胞的周期性调节作用,吞噬作用及甲基化等在发病过程中都起到了一定的作用。该病多数为隐匿起病,开始仅累积一至两个系统,临床表现较轻,之后逐渐出现多系统损伤,严重的甚至发展为狼疮危象,危及生命^[6]。由于本病的发病机制不甚明确,为了进一步探讨其发病机制,本研究在小鼠体内做了一系列的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 白细胞介素(IL)-6 KO 基因敲除小鼠,6~8 周龄,购自美国 Jackson 实验室。Foxp3-RFP 小鼠,C57BL/6 背景,雌性,6~8 周龄,购自美国 Jackson 实验室。C57BL/6 野生型(wild-type, Wt)小鼠购自北京军事医学科学院。所有动物在无特定病原体(SPF)的条件下进行饲养(恒温 24~26℃,恒湿,置于鼠架上,光照和黑暗交替进行,自由进食、进水)。所有动物的饲养均按照原卫生部《医学实验室动物护理和使用规范》和南开大学生命科学学院《机构动物护理和使用委员会条例》执行。

1.2 仪器与试剂 IgG-HRP 购自 Southern Biotech 公司。0.22 mm 滤膜购自 Life Sciences 公司。无水乙醇购自天津市天江化学有限公司。APC conjugated anti-mouse CD4、APC conjugated anti-mouse IL-17、anti-mouse CD3、anti-mouse CD28、FITC-CD11b、APC-CD11c 购自天津 Sungene 公司。PE conjugated anti-mouse IFN-α、PE conjugated anti-mouse Foxp3、Percep conjugated anti-mouse CD44、FITC conjugated anti-mouse CD62L、anti-mouse IL-6、ELISA 试剂盒购自 Biolegend 公司。Foxp3 染色试剂盒购自 eBioscience。抗核抗体(ANA)检测试剂盒购自欧蒙医学实验诊断有限公司。引物由

上海生工合成。RPMI-1640 培养基,胎牛血清,双抗购自 Gibco 公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠的饲养及配对 C57BL/6 野生型及 IL-6 KO 基因敲除的小鼠放置于南开大学生命科学学院 SPF 级的鼠房中,每笼 5 只,共 4 笼。定期更换垫料、鼠粮、鼠笼及小鼠的饮用水。实验动物中心维持恒温及光照黑暗交替的环境确保小鼠正常的休息。用于正式实验前,实验小鼠应尽量避免刺激,保证充足的睡眠。将杂和的 IL-6 基因敲除的小鼠与野生型小鼠进行配对。约 3 周后可产下子代小鼠。3~4 周的小鼠可以分笼,鉴定基因型。鉴定为阳性的小鼠可用于后续实验。

1.3.2 SLE 模型的建立 本模型建立用的都是雌性小鼠,6~8 周龄将小鼠进行随机分组,每组 4~6 只,分为 3 组,注射的部位为背部,皮下注射,每两周免疫一次,共计 3 次。每次免疫前小鼠应剃毛,保证注射的位点是在皮下,而不是皮内或者肌肉内。根据实验要求,将小鼠分为野生型免疫组、野生型未免疫组和 IL-6 KO 免疫组。初次免疫时用弗氏完全佐剂(CFA)与 2 mg/mL 的 DNA 等体积混合,每只小鼠注射的量为 200 μ L,再次免疫时用弗氏不完全佐剂(IFA),与浓度为 2 mg/mL 的 DNA 等体积混合,每只小鼠注射量为 150 μ L,第 3 次免疫与第 2 次剂量及方法相同。野生型未免疫组为未免疫过的小鼠。

1.3.3 血清中抗 ds-DNA 抗体的检测 酶标板事先用 0.5% 鱼精蛋白包板,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 摇床中孵育 1 h,用 300 μ L 磷酸盐缓冲液(PBST)洗板一次,拍板。SI 核酸酶处理后的 CT-DNA 以 50 μ g/mL 包板,每孔 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床 2 h,再置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。第 2 天从冰箱中取出板,PBST 洗涤 3 次。每孔加入 100 μ L 的封闭液(由 5%山羊血清和 PBST 配制而成),37 $^{\circ}$ C 摇床中孵育 1 h,加入 PBST 洗涤。稀释液以 1:50 的比例来稀释待测的血清标本,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次。加 1:2 000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBST 洗涤 4 次。加显色液,每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 摇床中孵育 30 min,显色时应避光,可见孔变蓝,发生显色反应。每孔加入 2 mol/L 的 H₂SO₄ 50 μ L 用来终止显色反应,此时可见每孔的颜色转为黄色。在自动酶标仪 490、560 nm 处的波长读取吸光度(OD)值。

1.3.4 尿蛋白的测量 分别在 96 孔板中加入 25 μ L 稀释后的标准品和待测样品。每孔中加入 200 μ L 工作液,混合混匀。37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,冷却至室温或者室温放置 2 h。立即用酶标仪测量 562 nm 处的吸光度。算出样品中蛋白质的浓度。

1.3.5 病理切片的制作 处死小鼠后,立即取出其中的一侧肾脏,切取中间组织,既包括皮质也包括髓质。组织保持新鲜,处死小鼠后 30 min 内完成取材。刀锋应保持锋利,避免来回钝性切割,损坏组织。组织的大小应适宜,厚度约 5 mm,大小不超过 15 mm $\times$ 15 mm。取下的小块组织应立即放于 10%甲醛溶液中固定过夜,使固定液迅速渗透至组织内。固定可维持组织细胞内的蛋白质、糖、脂类等原有的形态;防止组织的自溶和细菌的腐蚀,保持细胞原有的组织结构。在透明的切片上滴加中性树胶进行封片,盖上盖玻片,即可进行观察。

1.3.6 Treg 细胞的体外分化 采用 Foxp3 染色试剂盒,具体的染色方法为:离心后,在细胞沉淀中加入 1 mL 新鲜配的 Fixation/Permeabilization 溶液,与细胞充分混匀后放置 30 min。Fixation 与 Permeabilization 的比例为 1:3。

1.3.7 Th1 细胞的体外分化 在大约 50 μ L 的细胞悬液中加入 0.25 μ L APC 标记的 CD4 抗体和 0.25 μ L 异硫氰酸荧光素

(FITC)标记的干扰素(IFN)- γ 抗体,另准备一支空白管,一支单染管只加 APC 标记的 CD4 的抗体,一支单染管只加 FITC 标记的 IFN- γ 抗体。避光 4 $^{\circ}$ C 染色 30 min。Saponin 溶液洗涤(染色可直接在 Saponin 溶液中进行):加入用磷酸缓冲盐溶液(PBS)配制的 0.5% 的 Saponin 溶液重悬,2 mL 每管,离心(4 $^{\circ}$ C,1 400 r/min,7min),弃上清液。PBS 溶液洗涤一次。样品管用 200 μ L PBS 重悬,空白管和单染管用 300 μ L PBS 重悬后检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计分析。多组均数比较采用方差分析,组间比较采用 Tukey 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

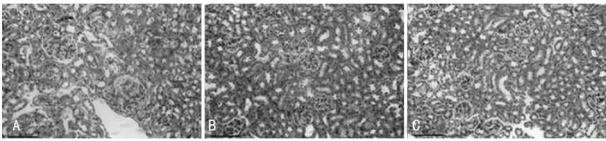
2 结果

2.1 抗 ds-DNA 抗体、尿蛋白的浓度对比 IL-6 KO 免疫组的小鼠产生的抗 ds-DNA 抗体及尿蛋白的浓度要比野生型免疫组的小鼠低很多,同样,肾脏的病变也要轻很多($P<0.05$)。IL-6 KO 免疫组小鼠肾小球免疫细胞浸润明显少于野生型免疫组小鼠,肾小球腔也较为清晰饱满,见图 1。值得注意的是,IL-6 KO 免疫组的小鼠与野生型未免疫组小鼠相比,抗 ds-DNA 抗体的浓度几乎是一样的,都比较低。但是,野生型未免疫组小鼠的尿蛋白浓度则比 IL-6 KO 免疫组的小鼠要低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。由此可见,IL-6 KO 免疫的小鼠并不是完全不产生 SLE 的症状,只是由于 IL-6 的缺失而在一定程度上使疾病受到了抑制。

表 1 3 组抗 ds-DNA 抗体、尿蛋白的浓度比较
($\bar{x}\pm s,n=12$)

组别	抗 ds-DNA 抗体(μ /mL)	尿蛋白(mg/mL)
IL-6 KO 免疫组	0.11 $\pm$ 0.02*	79.85 $\pm$ 6.24* [#]
野生型免疫组	0.19 $\pm$ 0.08	135.61 $\pm$ 4.48
野生型未免疫组	0.12 $\pm$ 0.04	52.94 $\pm$ 2.97

注:与野生型未免疫组比较,* $P<0.05$;与野生型免疫组比较,[#] $P<0.05$ 。



注:A 为野生型免疫组;B 为 IL-6 KO 免疫组;C 为野生型未免疫组。

图 1 肾脏的 HE 染色($\times 200$)

2.2 IL-6 KO 免疫组小鼠体内 CD4⁺T 细胞的活化状态 IL-6 KO 免疫的小鼠脾脏和淋巴结中细胞的活化状态与野生型未免疫组没有区别,而比野生型免疫组的小鼠低。见表 2。与 IL-6 KO 免疫的小鼠较低的发病率相符合,因此 IL-6 KO 免疫的小鼠发病较轻的原因可能与细胞的活化状态相关。

表 2 IL-6 KO 免疫的小鼠体内 CD4⁺T 细胞的状态
($n=12,\bar{x}\pm s,\%$)

组别	脾脏	淋巴结
IL-6 KO 免疫组	13.45 $\pm$ 1.12*	2.85 $\pm$ 0.24*
野生型免疫组	24.19 $\pm$ 0.08	11.61 $\pm$ 1.48
野生型未免疫组	16.12 $\pm$ 0.04	2.94 $\pm$ 0.17

注:与野生型免疫组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 ALD-DNA 免疫的 IL-6 KO 的小鼠 Foxp3 的表达 脾脏和淋巴结中,IL-6 KO 免疫的小鼠 Foxp3 的表达比野生型小鼠高。同时发现,野生型未免疫组老鼠体内,Foxp3 的表达与 IL-6 KO 免疫小鼠类似,都较高。在 IL-6 KO 免疫的小鼠中 Foxp3 的表达明显升高,在野生型未免疫组的小鼠中,Treg 细胞的表达也比较高。因此,Foxp3 的高表达也与 IL-6 KO 小鼠免疫后低发病率相关。本研究同时用这些小鼠的脾脏细胞做了 Th1 细胞的分化培养,结果显示,这两种小鼠体内产生的 IFN- α 无明显差异。见表 3、4。

表 3 IL-6 KO 及野生型小鼠免疫后脾脏中 Foxp3 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	脾脏	淋巴结
IL-6 KO 免疫组	22.55 $\pm$ 2.22 *	25.85 $\pm$ 4.24 *
野生型免疫组	15.19 $\pm$ 4.18	12.61 $\pm$ 2.38
野生型未免疫组	22.12 $\pm$ 2.24	24.94 $\pm$ 4.17

注:与野生型免疫组比较,* $P < 0.05$ 。

表 4 IL-6 KO 及野生型小鼠免疫后脾脏细胞 Treg、Th1 细胞的体外分化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	Treg 细胞	Th1 细胞
IL-6 KO 免疫组	42.45 $\pm$ 5.22 *	40.05 $\pm$ 2.15
野生型免疫组	19.17 $\pm$ 3.14	41.61 $\pm$ 2.38
野生型未免疫组	42.12 $\pm$ 5.24	43.94 $\pm$ 2.17

注:与野生型免疫组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

SLE 是一种慢性疾病,对核抗原的耐受失调,组织内免疫复合物的沉积能导致炎症及全身几乎所有器官和系统的损伤。已知许多基因、体液及环境等因素影响该病的发展,如感染源,后天修饰均能导致抗原递呈的变化,淋巴细胞信号、凋亡和抗原/免疫复合物的清除等均影响其发病。SLE 好发于女性,揭示了激素在该病中的作用,在许多狼疮的动物模型中,雌性的患病结局更差,给予雌激素能加重该病,而雄激素能减轻病情^[7-8]。故本研究所选用的均为雌性 C57 BL/6 小鼠。该病的发病机制还不是很明确,与其他自身免疫病相同,几乎所有炎症因子和免疫细胞均参与疾病的发生,只是程度和表现不同。若经过有效的治疗,慢性炎症和严重器官的损伤可能会导致患者的死亡。很多遗传因素,如内在的免疫失调,性激素和感染源等环境因素均能导致人类 SLE 的发展,这些因素的相互作用对疾病的进程也是相当重要的。抗细胞因子治疗目前已经在抑制自身免疫中应用得越来越多,靶向 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12p40 和 IL-6 的药物已经在研制中^[9]。

抗 ds-DNA 抗体是疾病诊断时最常用的一项指标,本文采用的是原理与 ELISA 类似的检测方法,用 OD 值的大小来表示产生抗 ds-DNA 的多少。OD 值与抗 ds-DNA 抗体的水平呈正相关。OD 值一般为 1.5 左右,但是在本实验中,却没有那么高。这可能和 C57 BL/6 小鼠的基因背景有关,与 BALB-c 背景的小白鼠相比,SLE 的症状在 C57 BL/6 背景的小鼠中更难诱导出来^[10-11]。

实验证实,ALD-DNA 在体外也能刺激脾脏细胞诱导大量 IL-6 的表达,提示 IL-6 可能的致病作用。本研究发现 IL-6 KO 的小鼠对该病具有抵抗作用,预示着 IL-6 对该病的促进作用。在野生型免疫的小鼠体内,IL-6 的浓度是升高的,更进一

步确定了 IL-6 在该病中的作用。那么,IL-6 作用的靶细胞是什么呢?作为最强大的抗原递呈细胞,树突状细胞(DC)与该病的关系也很密切的。T 细胞,尤其是 $\alpha\beta$ CD4⁺T 细胞,对该病的发生、发展也是不可或缺的,抗 CD4⁺T 细胞的治疗方法可用来治疗该病,进一步支持了这群细胞的作用。这种作用可能是通过细胞因子的产生增加所导致的,有人提出 CD4⁺T 细胞能直接靶向肾脏,导致肾脏受损,但是在患者和小鼠的肾脏中均没有发现 CD4⁺T 细胞。自身抗体的产生和多克隆 T、B 细胞的活化相关,为了验证在 ALD-DNA 诱导的 SLE 模型中细胞的活化状态有无改变,本文分析了细胞的活化状态,结果显示在 ALD-DNA 诱导的动物模型中,CD4⁺T 细胞的活化状态明显升高,这种细胞的高度活化也和发病相关。

Treg 细胞在维持内环境稳态的过程中起到了重要的作用。为了验证 Treg 细胞在这个模型中的作用,本文分析了不同小鼠体内 Foxp3 的表达,发现 IL-6 KO 免疫的小鼠体内 Foxp3 的表达明显升高,这也是 IL-6 KO 免疫小鼠不发病的重要原因之一。体内自然调节性 T 细胞(nTreg)和适应性调节性 T 细胞(iTreg)的趋势是一致的,在不发病小鼠体内,Treg 细胞的量是增加的。笔者推测在 SLE 中,DC 能产生大量的 IL-6,抑制了 Treg 细胞的产生,加重了疾病。同时,细胞的激活也导致了该病的发生。

本研究证实了 SLE 模型中 Treg 细胞数量的变化,为了验证 Treg 细胞在该病中是否具有作用,有学者做了 Treg 细胞的过继传输和 CD25⁺细胞的清除^[12-13]。在正常免疫的野生型小鼠中,选取了不同的时间点过继传输 Treg 细胞,有研究发现 Treg 细胞的过继传输的确能缓解疾病症状^[14]。但是,这个实验本文没有继续往下探讨具体的作用机制,例如 Treg 细胞过继传输的时间点选择,以及每次过继传输的细胞数,过继传输的细胞在体内发挥作用的时间,都不是很明显。在未发病的小鼠体内清除 CD25⁺细胞后,能导致体内抗 ds-DNA 的增加及疾病的加重,更进一步验证了 Treg 细胞在该病中不仅数量发生了变化,功能上也有改变。但是,关于 CD25⁺细胞清除的效率及清除维持的时间,清除时间点及剂量的选择都需要更进一步优化。

综上所述,本研究结果显示 IL-6 可能在 ALD-DNA 诱导的 SLE 中作为一项重要的生物标志物。IL-6 是狼疮性肾炎一个强有效的启动因素,对于该病的治疗是个新的靶标。本研究探讨了 IL-6 的表达与疾病发病机制的关系,提示控制 IL-6 的表达是一种潜在、有希望的治疗方法。本研究揭示了 IL-6 在 SLE 中的作用可能和抑制 Treg 细胞的作用相关,但到底 IL-6 是怎样影响 Treg 细胞的还不是很清楚,需要进一步研究。

参考文献

[1] 李志,杨婷婷,李文哲,等. 系统性红斑狼疮患者外周血 Th17 与 Treg 细胞及相关细胞因子表达的研究[J]. 中国实验诊断学,2015,19(2):253-255.

[2] 关艳春,于丹丹,孙祥国,等. 糖皮质激素受体亚型在系统性红斑狼疮和类风湿关节炎中表达差异及与疾病活动相关性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2014,34(11):868-873.

[3] 胡银娥,代淑芳,王斌,等. 丹皮提取物对系统性红斑狼疮患者 Th17 细胞的影响[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(3):119-121.

[4] 陈明,巩路. 系统性红斑狼疮外周血 Th1、Th2 类细胞因子与血液系统损伤的关系[J]. 山东医(下转第 2780 页)

机制复杂,临床表现多样,其中以气阴两虚、瘀血阻络同时存在的组合证型最多。中医认为 DR 多发生于患糖尿病多年的患者,其机制主要以肝肾阴亏和肺脾两虚为本,以瘀血阻滞目之脉络为标。因此常用补肝肾脾虚,活血化瘀为主要治疗方法,以清肝明目为目的。滋阴活血方具有滋阴降火,补肾活血,化瘀通络等功效。鲁琼等^[3]已经证实滋阴活血方具有改善 DR 作用,方中的黄芪、枸杞具有益气滋阴的疗效。药理研究表明,方中黄芪能够有效降低血小板的功能,改善患者的代谢水平,抵抗氧化作用,同时还有改善患者的肾小球滤过屏障,以及抑制转化因子的作用^[12]。丹参活血化瘀、通络,同时可降低细胞胆固醇的合成,保护血管屏障,发挥抗血栓和抗凝作用。本研究结果表明滋阴活血方联合羟苯磺酸钙胶囊治疗单纯性 DR 可明显改善 DR 患者的视力,研究组患者的眼底分级有明显改善,症状改善情况明显优于对照组($P<0.05$)。

随着糖尿病患者视网膜病变的不断发展,患者视网膜缺氧、缺血加重,视网膜屏障受到破坏,眼底毛细血管内皮细胞通透性增大,VEGF 大量产生,继而形成新生血管^[13]。VEGF 是功能较强的内皮细胞有丝分裂原和诱导血管生成的细胞因子。IGF-1 是多功能细胞增生调控因子,与视网膜细胞生长、繁殖有关。研究发现 VEGF 和 IGF-1 水平可作为了解 DR 严重程度的参考指标之一^[14]。在本研究中发现治疗后血清 VEGF 和 IGF-1 均有所下降,研究组下降程度明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),滋阴活血方联合西药可有效地降低 VEGF 和 IGF-1 水平,改善患者 DR 的继续发展。

综上所述,采用滋阴活血方联合羟苯磺酸钙胶囊治疗单纯性 DR 患者临床效果明显,减少患者出现眼底出血、渗出和视网膜水肿症状,改善患者视物昏花、眼睛干涩、口干咽燥和面色晦暗的临床症状,同时有效地降低患者 VEGF 和 IGF-1 水平,值得临床推广。

参考文献

[1] 易茜璐,于明香.糖尿病视网膜病变的发病机制[J].复旦学报(医学版),2010,37(5):604-607.

(上接第 2777 页)

药,2013,53(48):70-71.

[5] 饶慧,肖嫦娟,曾清华,等.来氟米特联合糖皮质激素治疗系统性红斑狼疮的临床疗效及对血清 IL-8 和 IL-10 浓度的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(23):6874-6876.

[6] 张少然,张艳华,茹晋丽,等. Th17 细胞和调节性 T 细胞在系统性红斑狼疮患者中的研究[J].中华风湿病学杂志,2011,15(6):381-384.

[7] 虞艳红,卢金金,马特安,等.系统性红斑狼疮患者尿液相关细胞因子的检测及临床意义探讨[J].医学研究杂志,2014,43(5):152-155.

[8] 欧阳涵,石永兵,苏楠,等.系统性红斑狼疮患者外周血白细胞介素 9 及 CD4⁺ 白细胞介素 9⁺ T 细胞的变化及其意义[J].中华医学杂志,2013,93(2):99-103.

[9] 赵宏丽,赵俊芳,李孟娟,等.系统性红斑狼疮患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞及其细胞因子的改变[J].中国皮肤性病学杂志,2012,26(7):581-583.

[2] 俞峰.羟苯磺酸钙分散片治疗糖尿病视网膜病变的效果观察[J].中国现代药物应用,2013,7(16):91-92.

[3] 鲁琼,周艳钢.糖尿病治疗药物的合理选用[J].中南药学,2013,15(10):781-783.

[4] 徐纛,史奎钧,张亚琴.滋阴活血方治疗糖尿病视网膜病变 31 例[J].浙江中医杂志,2013,48(3):186-188.

[5] 吕仁和,赵进喜.糖尿病及其并发症中西医结合诊治学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2009:632-633.

[6] 李娟,孙源博,王德平,等.羟苯磺酸钙胶囊治疗单纯性糖尿病视网膜病变疗效观察[J].中国医院用药评价与分析,2015,15(4):469-471.

[7] 郑筱蓓.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2002:312-315.

[8] 刘永瑞,吕洪,李丰,等.中西医结合治疗糖尿病视网膜病变临床观察[J].中国中医急症,2014,23(12):2320-2322.

[9] 张承芬.眼底病学[M].北京:人民卫生出版社,1998:260.

[10] 李琦文.糖尿病性视网膜病变的研究进展[J].航空航天医学杂志,2014,25(12):1708-1708.

[11] 李立定,周华丽,王鹏.羟苯磺酸钙联合川芎嗪对糖尿病视网膜病变患者脂质过氧化物及超氧化物歧化酶的影响[J].医学综述,2014,20(4):747-749.

[12] 王黎敏,陈传琦,张宏美,等.黄芪对糖尿病肾病患者肝细胞生长因子的影响及其意义[J].实用临床医药杂志,2009,13(9):37-39.

[13] Kurihara T, Westenskow PD, Friedlander M. Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina [J]. Adv Exp Med Biol, 2014,801:275-281.

[14] 林海.细胞因子 VEGF, IGF-1 与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性研究[D].长春:吉林大学,2011.

(收稿日期:2016-03-15 修回日期:2016-05-26)

[10] 朱静,龙武彬,程佳,等.系统性红斑狼疮患者外周血 IL-6 与疾病活动性的关系研究[J].四川医学,2013,34(5):592-593.

[11] 周晶晶,汪国生,李向培,等.系统性红斑狼疮患者外周血干扰素 α 、白介素 6 和肿瘤坏死因子 α 浓度[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2013,7(2):109-114.

[12] 陈莎莎,王丽馨,邓少丽,等.系统性红斑狼疮患者免疫功能变化的初步研究[J].现代医药卫生,2014,30(21):3201-3202.

[13] 蔡艳桃,彭学标.泌乳素对系统性红斑狼疮患者外周血单个核细胞分泌 IL-6 的影响[J].南方医科大学学报,2011,31(9):1611-1613.

[14] 张力奋,夏成云,权志慧,等.血清瘦素和白细胞介素-6 及肿瘤坏死因子- α 浓度与狼疮性肾炎的相关性研究[J].国际泌尿系统杂志,2015,35(6):915-919.

(收稿日期:2016-03-25 修回日期:2016-06-03)