

秦艽丸对小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成及血清 IL-2 影响的实验研究

闫景东¹ 王姗姗¹ 周兢兢² 安月鹏¹

(1.黑龙江中医药大学附属第一医院,黑龙江哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 目的:观察中药秦艽丸对小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成及血清 IL-2 水平的影响,初步探讨经方秦艽丸治疗银屑病的作用机理。方法:取 ICR 雄性小鼠 60 只,随机分为秦艽丸低、中、高剂量组和中药对照组、西药对照组、生理盐水组 6 组。秦艽丸低、中、高剂量组分别给予低、中、高浓度秦艽丸灌胃,中药对照组、西药对照组分别给予复方青黛丸悬浊液、甲氨蝶呤悬浊液灌胃,生理盐水组给予生理盐水灌胃。观察并比较各组小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成情况,以及血清 IL-2 含量。结果:与生理盐水组比较,各给药组小鼠尾部表皮颗粒层细胞均明显增加($P<0.01$);与中药对照组和秦艽丸低、中剂量组比较,秦艽丸高剂量组颗粒层细胞增多更为明显($P<0.05, P<0.01$)。与生理盐水组比较,各给药组小鼠血清 IL-2 的水平均明显降低($P<0.01$);与中药对照组和秦艽丸低、中剂量组比较,秦艽丸高剂量组小鼠血清 IL-2 降低更为明显($P<0.05, P<0.01$)。结论:秦艽丸治疗银屑病的作用机理与改善银屑病表皮细胞角化不全及降低血清 IL-2 含量有关。

关键词 秦艽丸 IL-2 小鼠 鼠尾 鳞片表皮 颗粒层 实验研究

中图分类号 R282.710.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2017)08-0072-04

银屑病是一种由多基因遗传决定的、多环境因素刺激诱导的免疫异常慢性增生性皮肤病^[1],临床表现以红斑、丘疹、鳞屑为主,病程长且迁延难愈,对患者的身心健康及生活质量造成了巨大影响。现代医学认为,本病病因可能涉及遗传、免疫、感染、环境等诸多方面^[2],但发病机制不完全清楚,目前尚无根治方法。中医药在治疗银屑病方面有着疗效持久、毒副作用少等优势,笔者以中医“毒”“瘀”为理论基础,选用《太平圣惠方》中“秦艽丸”治疗银屑病临床取得显著疗效。因小鼠尾部鳞片表皮角化缺少颗粒层形成的过程与银屑病表皮分化不全相类似,常在实验中模拟银屑病表皮分化的病变。本研究旨在通过观察中药秦艽丸对小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成及血清 IL-2 水平的影响,探索秦艽丸治疗银屑病的作用机理,为防治银屑病中药经典方剂的开发奠定基础,也为中医“毒”“瘀”理论在临床皮肤病治疗中的进一步深化提供佐证。

1 实验材料

1.1 动物 ICR 小鼠 60 只,雄性,体重 18~22g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(黑)2013-004。

1.2 药物与试剂 秦艽丸,由黑龙江中医药大学附属第一医院中药局提供;复方青黛丸,陕西医药控股集团天宁制药有限责任公司,国药准字:Z61020964;生理盐水,哈尔滨三精艾富西药业有限公司,批号:20023690;甲氨蝶呤,上海信谊药厂有限公司,国药准字:H31020644;IL-2 试剂盒,北京诚林生物科技有限公司,货号:E-20010。

1.3 主要仪器 酶标仪(MK3,德国 thermo);移液器(ClipTip1000,德国 Thermo);组织包埋机(Histostar,德国 Thermo);石蜡切片机(HM340E,德国 Thermo);研究型显微镜(BX60,日本 OLYMPUS);显微摄像系统(DP72,日本 OLYMPUS);数码医学图像分析系统(Med6.0,中国 Motic);电垫鼓风干燥箱(101-YE,出厂编号:10095,北京市光明医疗仪器厂);格兰仕微波炉(MP-70209FW,广东格兰仕集团有限公司);实验器械(上海浦伦医疗器械有限公司,批号:1010264)。

2 实验方法

2.1 药物制备

2.1.1 秦艽丸的制备 秦艽丸处方由乌蛇 120g、秦艽 60g、炒大黄 60g、苦参 60g、黄芪 60g、漏芦 45g、黄

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(H201461);黑龙江省中医药科研项目(ZHY12-2088)

连 45g、防风 45g 组成。药材加 8 倍量水浸泡 4h,加热煎煮 1h,药渣再加 6 倍水,煎煮 1h,过滤,两次滤液合并,最后浓缩成生药浓度分别为 0.53g/mL(低剂量)、1.07g/mL(中剂量)、2.13g/mL(高剂量)的药液。

2.1.2 复方青黛丸悬浊液的制备 复方青黛丸溶于生理盐水中,配成药物浓度为 234mg/mL 的混悬液,4℃保存备用。

2.1.3 甲胺蝶呤悬浊液的制备 甲胺蝶呤溶于生理盐水中,配成药物浓度为 234mg/mL 的混悬液,4℃保存备用。

2.2 分组与给药 将 50 只小鼠随机分为秦艽丸低剂量组、秦艽丸中剂量组、秦艽丸高剂量组、中药对照组、西药对照组和生理盐水组,分别给予 0.99、1.98、3.96g/(kg·d)剂量秦艽丸药液和 2.34g/(kg·d)复方青黛丸混悬液、234mg/mL 甲胺蝶呤混悬液、10mL/(kg·d)生理盐水灌胃,每日 1 次,共灌胃 15d。

2.3 标本采集 连续灌胃 15d 后各组小鼠摘眼球取血,离心取上清备用。取血后脱颈椎处死小鼠,取距鼠尾根部约 1.5cm 处的背面皮肤一长条,4%多聚甲醛溶液固定 12h,脱水(室温梯度酒精 70%—80%—95%—100%),二甲苯透明,石蜡包埋,常规切片。

2.4 指标检测

2.4.1 小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成情况 石蜡切片二甲苯脱蜡水化后,苏木素染色(10min),盐酸酒精分化,置于伊红染色液中(1min),梯度酒精脱水,二甲苯透明,树脂封片,显微镜下观察。光镜下,凡是两个相邻的毛囊间表皮(即鳞状表皮)具有连续成行之颗粒细胞者,称为有颗粒层形成之鳞片,统计 100 个鳞片中有颗粒层形成的鳞片片数。

2.4.2 小鼠血清 IL-2 检测 IL-2 检测严格按照试剂盒说明书操作,室温使血液自然凝固 20min,3000r/min 离心 20min,收集上清。根据预先确定的实验样本稀释倍数及标准曲线所使用的浓度对标准品进行稀释,每个样本做双复孔,分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40μL,再加血清 10μL,封板膜封板后 37℃温育 30min,洗板 6 次。浓缩洗涤液用蒸馏水稀释备用。除空白组外,每组加入酶标试剂 50μL,封板膜封板后 37℃温育 30min,洗板 6 次。每孔先加入显色剂 A 50μL,再加入显色剂 B 50μL,轻轻震荡混匀,37℃避光显色 15min,每孔加入终止液 50μL 终止反应。空白管调零,450nm 波长依序测量各孔

的吸光度(OD)值。

2.5 统计学方法 使用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成情况比较 结果见表 1、图 1。如图 1 所示,生理盐水组颗粒层细胞较少,而各给药组颗粒层细胞相对较多,且比较完整,其中秦艽丸高剂量组颗粒层细胞最多,其次为西药对照组,再次为中药对照组、中药中剂量组、中药低剂量组,说明高剂量的秦艽丸可显著促进小鼠尾部鳞片中颗粒层细胞的形成,使其数量增多,光镜下显示细胞体积变大、呈菱形,颗粒层细胞深染,界限清晰。

表 1 各组小鼠尾部鳞片 100 个鳞片中有颗粒层形成的鳞片片数比较

组别	动物数(只)	颗粒层鳞片片数/100 鳞片
生理盐水组	10	8.4±1.35
中药对照组	10	16.9±3.48**
西药对照组	10	21.5±3.57**
秦艽丸低剂量组	10	15.00±1.89**▲▲
秦艽丸中剂量组	10	16.4±1.78**▲▲#
秦艽丸高剂量组	10	24.4±3.5**△△#&

注:**与生理盐水组比较, $P < 0.01$;△△与中药对照组比较, $P < 0.01$;▲▲与西药对照组比较, $P < 0.01$;#与秦艽丸低剂量组比较, $P < 0.05$;&与秦艽丸中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

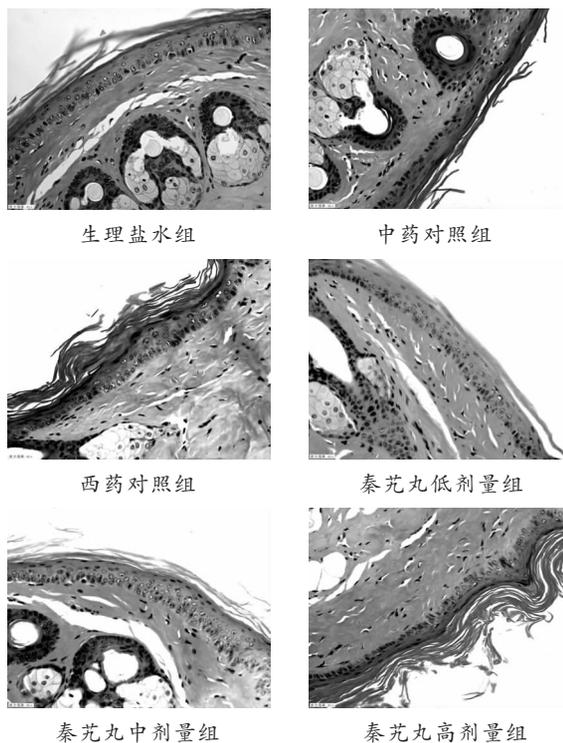


图 1 各组小鼠尾部鳞片中颗粒层细胞(40×)

3.2 各组小鼠血清 IL-2 含量比较 见表 2。

表 2 各组小鼠血清 IL-2 含量比较

组别	动物数(只)	血清 IL-2(pg/mL)
生理盐水组	10	4.10±0.72
中药对照组	10	3.20±0.77**
西药对照组	10	2.31±0.22**△△
秦艽丸低剂量组	10	2.83±0.35**▲
秦艽丸中剂量组	10	2.50±0.28**△△#
秦艽丸高剂量组	10	2.37±0.27**△△#&

注:**与生理盐水组比较, $P<0.01$;△△与中药对照组比较, $P<0.01$;▲与西药对照组比较, $P<0.05$;#与秦艽丸低剂量组比较, $P<0.05$;&与秦艽丸中剂量组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

银屑病发病急骤,常迁延不愈,与中医“毒”“瘀”理论相符,“毒邪”是其重要的致病因素,“瘀”邪是其发病的一个重要原因。银屑病患者多由扁桃体肿大而诱发全身皮损,发展迅速,进而成为风毒、热毒,而银屑病病程长,日久致瘀。现代医学对银屑病的常规组织学和超微结构研究发现,银屑病中存在毛细血管异常、血黏度增加等高聚、高黏、高凝的病理状态^[3],符合中医血瘀证候。“秦艽丸”出自《太平圣惠方》,由秦艽、苦参、炒大黄、防风、漏芦、酒乌蛇、黄连、黄芪八味药组成,炼蜜成丸,并以温酒送服。该方虽以秦艽命名,但方中乌蛇用量最大,用至四两,具有搜风祛瘀、通经络解毒止痒之功,故应为君药。秦艽祛风除湿止痒,为“风药中之润剂,散药中之补剂”,苦参清热燥湿祛风止痒,药理研究表明秦艽提取物具有抗炎镇痛活性^[4],苦参中黄酮类具有抗炎抗菌的作用^[5]。炒大黄、黄芪共为臣药,其中炒大黄祛瘀生新止痒,黄芪补气升阳、祛瘀生肌。漏芦、黄连亦共为臣药,二者合用,共奏清热解毒之效。防风为佐药,佐助乌蛇以达疏外风、祛内风之效,使得风邪有所出路。蜂蜜甘缓,并以温酒送服,可防止方中药物寒凉峻猛之性伤及脾胃。秦艽丸为丸剂,丸者“缓”也,对于进行期后静止期的患者最为适合,笔者临床将本方用于进行期过后,皮损稳定及时间较长的斑块型银屑病患者,效果满意,复发率低。

复方青黛丸主要作用为活血化瘀、清热解毒、祛风止痒等,其中青黛具有清热解毒凉血的作用,其所含靛玉红已证实可抑制多种细胞 DNA 合成,组织学上观察发现青黛对增生的上皮细胞有抑制作用^[6]。目前,复方青黛丸广泛应用于临床治疗银屑病,故作为本实验的中药对照组。

国内外对本病的发病机制进行了不少研究,虽

取得一些成绩,但至今尚未完全清楚。多数学者认为银屑病是免疫或炎症介导的疾病,是辅助性 T 细胞 1(Th1)过度活化失常而引起的一种自身免疫性疾病,主要病理表现是上皮角质形成细胞的过度增殖和分化角化不全两个方面。在正常情况下,小鼠尾部鳞片表皮天然缺少颗粒层,而毛囊处有少量的颗粒细胞,且表皮较薄,因此可以模拟银屑病表皮角化不全的病变,是目前公认的实验性银屑病病理模型之一^[7]。本研究结果表明,秦艽丸可促进小鼠尾部鳞片中颗粒层细胞形成,其中高剂量疗效优于复方青黛丸与甲氨蝶呤,中药各剂量组之间比较亦具有统计学差异($P<0.05$),且随着中药浓度的增加对颗粒层细胞的促进作用亦增强。由此推断,秦艽丸对银屑病患者有治疗效果,其作用机理或与促进颗粒层细胞形成和改善银屑病表皮细胞角化不全有关。IL-2 由辅助性 T 淋巴细胞产生,是一种免疫调节因子,能够刺激 B 淋巴细胞产生抗体及促进自然杀伤细胞的活性,提高机体免疫力^[8]。在银屑病的发病过程中,T 细胞、角质形成细胞、树突状细胞等分泌大量细胞因子,如 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-8 等,共同构成 TH1 型细胞因子网络,该网络中各细胞因子相互作用,促进炎症级联反应的发生,最终导致细胞因子网络失衡^[9]。本研究结果显示,秦艽丸各剂量均能显著降低小鼠血清 IL-2 含量,各剂量组间比较具有统计学差异($P<0.05$),浓度越高对小鼠血清 IL-2 含量的降低作用越强,秦艽丸高剂量的效果与甲氨蝶呤相当,而明显优于复方青黛丸($P<0.05$)。说明秦艽丸高剂量在临床疗效上与甲氨蝶呤相当,但因甲氨蝶呤对胃肠道和骨髓有毒性反应,同时可导致口腔溃疡、白细胞减少、恶心、腹痛等不良反应^[10],因此对于需长期服药的慢性银屑病患者,宜选用毒副作用小的中药制剂。通过本实验结果推测,秦艽丸治疗银屑病的作用机理可能与降低血清 IL-2 含量有关,血清 IL-2 含量降低可改善免疫功能状态,从而发挥对银屑病的治疗作用。在后续的研究中我们将运用小鼠尾部鳞片细胞、转基因小鼠动物模型等来验证秦艽丸各剂量对银屑病动物模型 IL-8、TNF- α 、ET-1 等免疫因子的影响,继续探索秦艽丸治疗银屑病的作用机理,为临床应用提供理论依据。

参考文献

- [1] SABAT R, PHILIPP S, HÖFLICH C, et al. Immunopathogenesis of psoriasis[J]. Exp Dermatol, 2007, 16(10): 779.
- [2] 黄桂新. 银屑病病因与发病机制的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(13): 73.

(下转第 78 页)

定程度上改善高血压症状^[12]。本研究发现,与葛根水煎剂比较,牡蛎配伍葛根能更加抑制 SHR 大鼠的 RAAS 系统,降低血浆 Renin、Ang II、ALD、ET-1 含量,更能改善 SHR 大鼠的血液流变学和左心室肥厚程度。另外,血管平滑肌细胞紧张度增高是高血压病最重要的病理生理学改变,Ca²⁺作为细胞内第二信使物质及细胞兴奋-收缩耦联剂,对血压调节起关键作用^[13]。与葛根水煎剂比较,牡蛎配伍葛根降低 SHR 大鼠 AVSMC 胞内的 Ca²⁺浓度作用更加明显,尤以高剂量效果更好。以上研究结果表明,牡蛎对葛根降血压具有协同增效作用,其机制与抑制 RAAS、改善血管内皮功能、阻滞 AVSMC 胞内 Ca²⁺引发的多种信号转导途径等作用相关。

目前中医药防治高血压的实验一般是对降压疗效的简单观察,缺乏对包括改善并发症和靶器官损伤等的作用机制研究,未来需进一步从分子、基因水平开展实验和临床研究,基于经典方药开发更好的现代化抗高血压中药。

参考文献

- [1] 杨丽,刘友平,韦正,等.贝壳类药材牡蛎石决明珍珠母的研究进展[J].时珍国医国药,2013,24(12):2990.
- [2] 张晓娟,周海纯.葛根化学成分,现代药理及临床应用研究进展[J].中医药信息,2017,34(1):124.
- [3] 钟伟,王永刚,于远望,等.中医药防治高血压的作用机制研究进展[J].时珍国医国药,2013,24(5):1224.
- [4] 陈善,周晓秋,叶梁,等.辛伐他汀对轻中度高血压合并高血脂症患者血清炎症介质、血小板活化功能和血液流变学的影响[J].中华高血压杂志,2015,23(5):477.
- [5] 聂亚红,张蓉,张磊,等.NT-proBNP 和 HCY 对原发性高血压患者合并左心室肥厚的预测价值[J].国际检验医学杂志,2017,38(9):1160.
- [6] AHN Y M,CHO K W,KANG D G,et al.Oryeongsan

- (Wulingsan), a traditional Chinese herbal medicine, induces natriuresis and diuresis along with an inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system in rats[J].J Ethnopharmacol,2012,141(3):780.
- [7] HUANG C Y,KUO W W,KUO C H,et al.Protective effect of Danggui (Radix Angelicae Sinensis) on angiotensin II-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells[J].BMC Complement Altern Med,2014,14:358.
- [8] LI Y,YANG W,ZHU Q,et al.Protective effects on vascular endothelial cell in N^o-nitro-L-arginine (L-NNA)-induced hypertensive rats from the combination of effective components of Uncaria rhynchophylla and Semen Raphani[J].Biosci Trends,2015,9(4):237.
- [9] ZHENG C Y,SONG L L,WEN J K,et al.Tongxinluo (TXL), a Traditional Chinese Medicinal Compound, Improves Endothelial Function After Chronic Hypoxia Both In Vivo and In Vitro[J].J Cardiovasc Pharmacol,2015,65(6):579.
- [10] 李运伦,朱梅,程德斌,等.藤蓊降压片抗高血压的实验效应[J].中成药,2013,35(12):2581.
- [11] 黄丹娥,黄琳,曾巧煌,等.复方芪麻胶囊对自发性高血压大鼠血压及血清 NO、ET、Ang II 的影响[J].广东药学院学报,2015,31(6):791.
- [12] VANHOUTTE P M.Endothelial dysfunction:the first step toward coronary arteriosclerosis[J].Circ J,2009,73(4):595.
- [13] 李卫丽,陈孝银,吴先林.天麻钩藤饮对 SHR 血管平滑肌细胞 CaL-α1C 及 PMCA1mRNA 表达的影响[J].中成药,2009,31(8):1175.

第一作者:邵江娟(1976—),女,博士,副教授,研究方向为中药资源化学及作用机制。

通讯作者:付金柏,本科学历,副主任中药师。1918598016@qq.com

收稿日期:2017-03-28

编辑:吴宁

(上接第 74 页)

- [3] 周萌.银屑病血瘀证的思考[J].中国医学文摘(皮肤科学),2006,23(5):337.
- [4] 姚佳,曹晓燕,王喆之.6种秦艽镇痛和抗炎活性的比较[J].现代生物医学进展,2010,10(24):4642.
- [5] 姚梅芬,张思巨,李琳,等.苦参中黄酮类成分及其药理作用研究现状[J].中国中医药信息杂志,2013,20(3):110.
- [6] 韩福海,黎淑华,李良弟.复方青黛丸联合复方氨肽素治疗银屑病的临床研究[J].中国医学创新,2014,11(29):99.
- [7] 赵香花,黄矛.银屑病的动物模型研究进展[J].药学服务与研究,2009,9(3):213.
- [8] 解春桃.银屑病患者与相关细胞因子水平变化的研究[J].放射免疫学杂志,2007,20(5):415.

- [9] 杨京慧.银屑病病因及发病机理研究概述[J].中外医疗,2008,27(20):25.

- [10] 周晓琳,张学文.减少甲氨蝶呤副作用的措施及效果分析[J].医学理论与实践,2013,26(17):2351.

第一作者:闫景东(1977—),男,博士研究生,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为中医药防治疑难性皮肤病。

通讯作者:安月鹏,医学硕士,主治医师。522176709@qq.com

收稿日期:2017-04-20

编辑:吴宁