

芍苓汤对豚鼠心得安模型及 HaCaT 细胞炎症因子 IL-6、IL-17A 和 IL-22 mRNA 表达的影响

余靖宏¹, 赵瑞芝², 卢传坚²(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 研究芍苓汤对心得安豚鼠模型的影响及对脂多糖(LPS)诱导人永久分化表皮角质细胞(HaCaT 细胞)产生炎症因子 IL-6、IL-17A 和 IL-22 mRNA 表达的调控作用。 **方法** 以 Baker 评分法观测芍苓汤对豚鼠心得安模型的作用, 实时荧光定量 PCR (RT-Q-PCR) 检测芍苓汤对 LPS 诱导 HaCaT 细胞 IL-6、IL-17 和 IL-22 mRNA 表达水平。 **结果** 芍苓汤能够显著改善心得安诱发豚鼠的银屑病样病变, 并显著下调 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达。 **结论** 芍苓汤具有治疗银屑病的药效, 其作用机制与下调 IL-6 mRNA 表达水平有关。

关键词: 银屑病; 芍苓汤; 心得安豚鼠模型; HaCaT 细胞; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0552-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.008

Effect of *Shaoling* Decoction on Propranolol-induced Psoriasis-like Model of Guinea Pigs and mRNA Expression of IL-6, IL-17A and IL-22 in HaCaT Keratinocyte Cell Line Stimulated by Lipopolysaccharide

YU Jinghong¹, ZHAO Ruizhi², LU Chuanjian²(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of *Shaoling* Decoction (SLD) on guinea pigs propranolol-induced psoriasis-like model and to investigate its regulatory effect on mRNA expression of IL-6, IL-17A and IL-22 in HaCaT keratinocyte cell line stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Baker scoring method was used for the evaluation of *Shaoling* Decoction on the guinea pigs propranolol-induced psoriasis-like model, and real time fluorescence quantitative PCR (RT-Q-PCR) was applied for the detection of mRNA expression of IL-6, IL-17A and IL-22 in HaCaT line stimulated by LPS. **Results** *Shaoling* Decoction had an obvious effect on ameliorating the psoriasis-like pathological changes in guinea pigs, and on down-regulating IL-6 mRNA expression in LPS-activated HaCaT cell line. **Conclusion** *Shaoling* Decoction has certain therapeutic effect for psoriasis, and its mechanism may be related with down-regulation of IL-6 mRNA expression.

Keywords: Psoriasis; *Shaoling* Decoction; Propranolol-induced model of guinea pigs; HaCaT cell line; Inflammatory factors

银屑病是一种慢性免疫性疾病, 以表皮过度增殖, 炎症浸润和真皮血管增生为主要病理特征。研究^[1]发现银屑病患者的血清和皮损中细胞因子如TNF- α 、

IL-6、IL-8、IL-17、IL-22 等表达显著增高, 并且与皮损面积和严重性指娄(PASI)指标呈正相关, 很可能是银屑病发病、持续以及复发的重要诱因。

收稿日期: 2013-12-19

作者简介: 余靖宏, 女, 博士研究生, 研究方向: 中药复方物质基础。Email: yiyihannan19@163.com。通讯作者: 赵瑞芝, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药制剂。Email: 13610241754@163.com; 卢传坚, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医外科。Email: luchuanjian888@vip.sina.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(10251040701000001); 广东省科技厅项目(2010A03010008, 2011B032200009, 2011A08030004); 广州市科技局项目(2010J-E031)。

银屑灵由全国名老中医、皮肤科专家禚国维教授创制,临床应用超过 10 年,疗效显著。前期研究根据鼠尾鳞片模型将银屑灵优化为芍苓汤。芍苓汤主要由赤芍、莪术等 4 味中药组成,相比原方,组成减少了近一半,通过小鼠鼠尾鳞片实验、雌鼠阴道上皮细胞增殖实验、二甲苯致小鼠耳肿胀实验证明了芍苓汤药效显著,与原方无显著性差异,而其给药量明显降低,受试对象依从性提高^[1]。为进一步验证芍苓汤药效,并初步探索其作用机制,拟用心得安致豚鼠银屑病模型观察芍苓汤(SLD)的药效作用,并在 HaCaT 细胞上检测芍苓汤对 LPS 诱导相关炎症因子 IL-6、IL-17A 和 IL-22 mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞 白化豚鼠,雄性,普通级,体质量(375 ± 25)g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号:0109198。人永久分化表皮角质细胞(HaCaT 细胞),购于中国武汉典型培养物保藏中心。

1.2 药品及试剂 芍苓汤(SLD),广东省中医院中药制剂实验室提取,用 70 %乙醇回流提取 2 遍,提取液回收乙醇溶剂后用纯水配制为混悬药液,4℃冰箱保存,用前恢复到室温;药材购自康美药业股份有限公司,批号:120209391,121201091,121104621,121102711。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS)、青霉素和链霉素溶液、0.25 %胰酶-EDTA,美国 Hyclone 公司;脂多糖(LPS),美国 Sigma 公司,批号:102M401;甲氨蝶呤(MTX),上海信谊药厂有限公司,批号:120306;心得安原料药,湖北迈源化工有限公司,批号:20120722;Trizol,美国 Life Technologies 公司,批号:128221;RT-PCR 逆转录试剂盒、扩增试剂盒,美国 Thermo Fisher 公司,批号:00113315,00138041; β -actin、IL-6、IL-17A 和 IL-22 引物由美国 Life Technologies 上海分公司合成。

1.3 仪器 HF-90 型 CO₂ 培养箱,美国 Heal force 公司;Allegra X-22R 低温高速离心机,美国 Beckman Coulter 公司;9700 型基因扩增仪,美国 Applied Biosystems 公司;7500 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司。

1.4 芍苓汤对心得安豚鼠模型的药效实验

1.4.1 模型制备及实验动物分组 豚鼠 54 只,适应性饲养 1 周后开始实验,将豚鼠双耳去毛,随机分为空白组和实验组。空白组 12 只,实验组 42 只。实验组用 5 %心得安乳剂(自制),均匀涂于双侧耳

背,空白组涂抹空白基质^[2],每次 300 μ L,每天 4 次,共 5 d。5 d 后,空白组和实验组各取 2 只用于病理检测,结果显示实验组模型复制成功。将实验组剩余 40 只豚鼠根据体质量和模型情况用随机数字表法分为 4 个组,分别是模型组,MTX 对照组,芍苓汤低、高剂量组,每组 10 只。

1.4.2 给药方法 空白组和模型组给予生理盐水,MTX 对照组给予 MTX 0.07 g·kg⁻¹,芍苓汤低剂量组给予芍苓汤药液 3.68 g·kg⁻¹,芍苓汤高剂量组给予芍苓汤 7.36 g·kg⁻¹,灌胃量 10 mL·kg⁻¹,每天 2 次,持续 10 d,芍苓汤低剂量每天的给药剂量相当于人临床给药剂量的 2 倍,高剂量相当于人临床给药剂量的 4 倍,在前期小鼠鼠尾鳞片和雌鼠阴道上皮细胞模型预实验中,考察了芍苓汤相当于人临床给药剂量的 2, 4, 8 倍剂量的药效(数据未发表),发现 2, 4 倍剂量的芍苓汤对两种动物模型具有明显的改善效果,因此将芍苓汤在银屑病动物模型上的用药剂量设定为临床 2 倍和 4 倍。

1.4.3 取材及处理 末次给药 1 h 后,腹腔注射含 12 %水合氯醛的生理盐水溶液 3.5 mL·kg⁻¹麻醉,腹主动脉取血处死,剪取豚鼠双耳组织,固定于 10 %甲醛溶液中。取豚鼠耳组织,石蜡包埋,切片,HE 染色,中性树胶封片。光学显微镜下观察病理改变,在 10×20 视野下观察并拍照。随机取 5 个视野,进行 Baker 法评分。Baker 法积分评估的标准如下:角质层中见有 Munro 小脓疡计 2.0 分;过度角化计 0.5 分;角化不全计 1.0 分。表皮层中见有颗粒层变薄或消失计 1.0 分;棘层肥厚计 1.0 分;皮突延长、基底层迂曲起伏,根据轻、中、重程度分别计 0.5、1.0、1.5 分;真皮层见有单一核及多形核细胞浸润,根据轻、中、重程度分别计 0.5、1.0、2.0 分;乳突突出明显计 0.5 分;真皮浅层毛细血管扩张计 0.5 分^[4]。

1.5 芍苓汤对 LPS 诱导 HaCaT 细胞表达 IL-6、IL-17A、IL-22mRNA 的影响

1.5.1 细胞培养 HaCaT 细胞用含 5 %胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、100 μ g·mL⁻¹链霉素的 RPMI-1640 培养基培养,置于 37℃、5 % CO₂ 孵育箱中。取对数生长期细胞用于实验。

1.5.2 芍苓汤对 HaCaT 细胞活力的影响 HaCaT 细胞接种于 96 孔板,每孔 2000 个,贴壁 24 h 后,分别加入含芍苓汤浓度分别为 1000, 500, 250, 125, 50, 10 μ g·mL⁻¹ 的完全培养液。每个浓度平行 3 个复孔,实验重复 3 次。24 h 后每孔加入 5 mg·mL⁻¹

噻唑蓝(MTT)20 μL , 培养箱中反应 4 h 后, 弃上清, 再加入二甲基亚砷(DMSO), 每孔 150 μL , 震荡摇匀 10 min, 在 570 nm 波长下用酶标仪检测细胞增殖抑制率, 用 OD 值表示细胞活力, OD 值越大, 说明细胞活力越大。

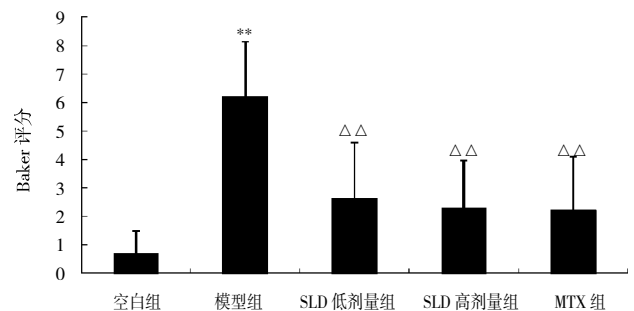
1.5.3 实时荧光定量 PCR(RT-Q-PCR)测定 HaCaT 细胞接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 密度 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分为空白组, LPS 组, 芍苓汤高、中、低剂量组。贴壁 24h 后, 空白组、LPS 组换新鲜的完全培养液, 芍苓汤高、中、低剂量组分别将培养基换为含芍苓汤浓度为 200, 100, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的完全培养液, 培养 24 h, 除空白组外均加入 LPS, 终浓度为 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 继续培养 2 h 后, 倒去培养液, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤 2 遍, 用 Trizol 提取总 RNA, 按照 RT-PCR 试剂盒逆转录合成 cDNA, 以 β -actin 为内参, IL-6、IL-17A、IL-22 为引物扩增 cDNA, β -actin, 上游引物: 5'-CGGG AAATCGTGCGTGACAT-3', 下游引物: 5'-CAGGA AGCAAGGCTGGAAGA-3'; IL-6, 上游引物: 5'-CTGAGGGCTCTTCGGCAAAT-3', 下游引物: 5'-GCCCAGTGGACAGGTTTCTG-3'; IL-17A 上游引物: 5'-GCCTTCAAGACTGAACACCG-3', 下游引物: 5'-TGACATGCCATTCCTCAGGG-3'; IL-22 上游引物: 5'-AACTAACCCCTTTCCCTGC-3', 下游引物: 5'-AACGCAGGGGTTTCATTTGGA-3'。扩增条件为: 第一步, 95 $^{\circ}\text{C}$, 7 min; 第二步, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。循环数 45。得到 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ($\Delta\text{Ct}=\text{Ct}$ 给药组 -Ct 内参) 分别计算 IL-6、IL-17A、IL-22 mRNA 的表达量。

1.6 统计学处理方法 所有数据均用 SPSS13.0 统计

软件处理, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。多样本均数比较采用单因素方差分析, 并做组间 LSD- t 检验。

2 结果

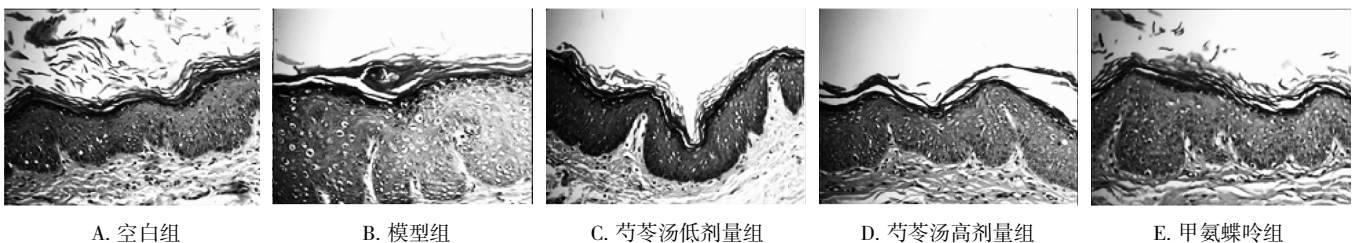
2.1 芍苓汤对心得安豚鼠模型病理改变观察结果 光镜观察结果显示, 空白组角质层薄, 呈网状交织, 颗粒层清晰, 约 1~2 层; 棘层细胞 3~5 层; 基底层为单层柱状细胞, 表皮突平坦; 真皮层未见浅层毛细管扩张, 少量分布淋巴细胞。模型组可见角化过度, 角化不全, 颗粒层变薄或消失, 棘层肥厚, 真皮毛细血管扩张等现象, 还可见真皮层有轻中度炎细胞浸润。与模型组比较, 芍苓汤高、低剂量组, 表皮角化过度现象得到缓解, 棘层明显变薄, 颗粒层增加, 炎细胞减少, 低剂量组局部尚有真皮乳头突出现象, 而高剂量组基底层已基本接近空白组水平。MTX 对照组表皮基本呈正常化, 只是棘层增厚现象尚未显著缓解。各组豚鼠耳部银屑病样病理改变 Baker 评分见图 1, 豚鼠耳部的病理切片见图 2。



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 各组 Baker 评分

Figure 1 Baker scores of different experimental groups



A. 空白组

B. 模型组

C. 芍苓汤低剂量组

D. 芍苓汤高剂量组

E. 甲氨蝶呤组

图 2 各组病理组织切片($\times 200$)

Figure 2 Histological specimens of different experimental groups

2.2 芍苓汤对 HaCaT 细胞活性影响的结果 见图 3, 芍苓汤给药 24 h 后, 与空白组比较, 对 HaCaT 细胞的活力无显著影响, 说明芍苓汤在浓度 10~1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内不影响 HaCaT 细胞的正常生长。

2.3 芍苓汤对 LPS 诱导 HaCaT 细胞表达 IL-6、IL-

17A 和 IL-22 mRNA 的影响 见图 4, LPS 与 HaCaT 细胞共培养 2 h 可以显著提高 IL-6, IL-17A 和 IL-22 mRNA 的表达水平, 增加率分别为 1818.8 %、172.6 %、58.1 %。芍苓汤低、中、高剂量组以剂量依赖方式抑制 LPS 诱导的 IL-6 mRNA 表达, 抑制率

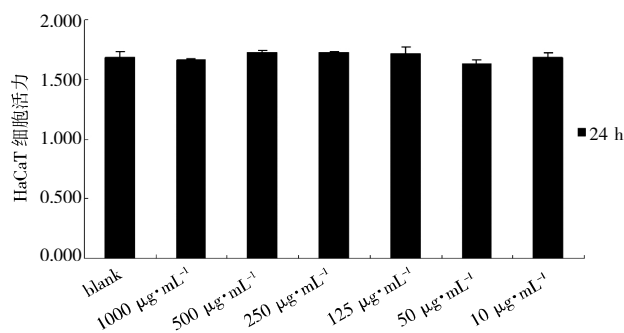
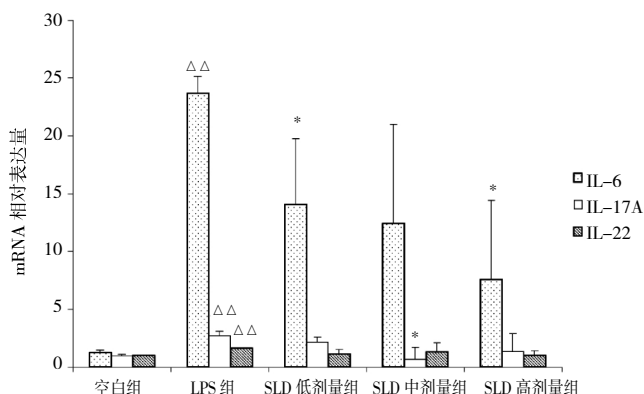


图 3 芍苓汤对 HaCaT 细胞活性影响的结果

Figure 3 Effect of SLD on vitality of HaCaT line

分别为 40.6 %、47.7 %、68.1 %，浓度越高抑制作用越强。其中低、高浓度的 IL-6 mRNA 表达水平相对于 LPS 组差异有显著性意义($P < 0.01$)。芍苓汤对 IL-17A 和 IL-22 表达有抑制的趋势，低、中、高剂量对 IL-17A 的抑制率分别为 20.2 %、75.6 %、49.9 %；对 IL-22 的抑制率为 30.5 %、17.5 %、36.9 %。其中中剂量组 IL-17A mRNA 的表达相对于 LPS 组差异有显著性意义($P < 0.01$)。芍苓汤对 LPS 诱导 HaCaT 细胞表达 IL-6、IL-17 和 IL-22 mRNA 的影响，见图 4。



注：与空白组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与 LPS 组比较， $*P < 0.05$ 。

图 4 芍苓汤对 LPS 诱导 HaCaT 细胞 IL-6、IL-17A 和 IL-22 mRNA 表达量的影响

Figure 4 Effect of SLD on HaCaT cell line for expression of IL-6, IL-17A and IL-22

3 讨论

心得安豚鼠模型是目前应用广泛，较为经典的银屑病动物模型，白化豚鼠本身存在一定免疫缺陷，应用 β -受体阻断剂能够形成皮肤角化不全、角化过度、棘层增厚、真皮血管扩张，炎症细胞浸润等银屑病的主要病理改变，因此模型具有可行性。

结果显示，芍苓汤高、低剂量均能显著改善模

型的银屑病样病变，降低 baker 评分，分值与模型组比较差异有显著性意义，与临床治疗银屑病的常用药物甲氨蝶呤相比较差异无显著性意义，说明芍苓汤能够缓解银屑病，药效明确，具有开发价值。

银屑病是一种多因素调控下的免疫介导的炎症性疾病，在其发病过程中，表皮角质细胞能募集并激活 T 细胞，而 T 细胞主要分化为 Th1、Th17 等亚型，可分泌多种细胞因子激化表皮炎症。IL-6 是 Th1 型细胞因子，也是促使幼稚 T 细胞向 Th17 细胞分化的关键因子。IL-17、IL-22 由 Th17 细胞分泌。这 3 种炎症因子促使炎细胞浸润表皮并诱导表皮异常增殖，对银屑病发病及维持都起到重要作用，临床检验发现 3 种细胞因子在银屑病患者外周血和皮损部位均有高表达，其表达水平与疾病严重程度呈正相关^[1,5-6]，因此，本实验选择这 3 种因子考察芍苓汤机制。结果显示药物对 IL-6 mRNA 有下调作用，并且有剂量依赖性，中剂量药物对 IL-17mRNA 的表达也有抑制作用，说明调控 IL-6 和 IL-17A 可能是芍苓汤治疗银屑病的 1 个作用机制。

IL-6 与银屑病表皮过度增殖的病理机制关系密切，并能诱导多种下游炎症因子形成炎症级联反应。结合芍苓汤对心得安豚鼠模型的药效来看，芍苓汤很可能通过拮抗 IL-6，缓解其下游的炎症因子表达，减轻炎症，调节表皮的异常增殖来治疗银屑病。这为芍苓汤药理机制的进一步研究提供了有益信息。

参考文献:

- [1] Brian J, nickoloff, Qin JZH. Immunopathogenesis of psoriasis[J]. Clin. Rev Allerg Immunol, 2007, (33): 45-56.
- [2] 卢传坚. 一种治疗皮肤病的中药组合物及其制备方法和应用: 中国 CN200910091066.5[P]. 2010-01-27.
- [3] 黄畋, 张淑芝, 孙令. 心得安涂药造成豚鼠耳部银屑病样病理变化[J]. 中华皮肤科杂志, 1991, 24(2): 96-97.
- [4] Baker BW, Swain AF, Fry L, et al. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis[J]. Br J Dermatol, 1984, 110(5): 555-564.
- [5] Kirkham BW, Kavanaugh A, Reich K. IL-17A: A unique Pathway in Immune-Mediated Diseases: Psoriasis, Psoriatic Arthritis, and Rheumatoid Arthritis[J]. doi: 10.1111/imm.12142.
- [6] Jitlada M, Kriangsak R, Wannasri S, et al. Effect of methotrexate on serum levels of IL-22 in patients with Psoriasis[J]. Eur J Dermatol, 2011, 21(4): 501-504.

(编辑: 修春)