

消银解毒颗粒对 Jurkat 细胞异常增殖模型的影响

张润田¹, 陈曦², 霍春波¹, 段行武¹, 陈兵¹, 李玲玲^{*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700; 2. 北京中医药大学东直门医院东区)

摘要 目的 探讨消银解毒颗粒治疗银屑病的可能作用机制。方法 以植物血凝素 (PHA) 和白细胞介素 6 (IL-6) 共同诱导 Jurkat 细胞模拟银屑病 T 细胞异常增殖的病理模型, 制备择取最优效药理血清浓度作用于该细胞模型, 采用细胞活性试剂盒 (CCK-8) 法检测细胞活力, 用流式细胞术检测细胞凋亡。结果 当药理血清浓度为 20% 时, 消银解毒颗粒组、凉血方组细胞抑制率显著高于解毒方组、阿维 A 组、蒸馏水组 ($P < 0.01$); 消银解毒颗粒组细胞早期凋亡率最高, 高于凉血方组、解毒方组、阿维 A 组、蒸馏水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 消银解毒颗粒及其拆方凉血方、解毒方对银屑病 T 细胞异常增殖的炎症病理模型均有抑制作用, 且消银解毒颗粒和凉血方的抑制效果明显优于阿维 A。

关键词 银屑病; 消银解毒颗粒; T 细胞; 异常增殖

银屑病是一种以红斑鳞屑为主要临床表现的慢性炎症性疾病, 目前已经能够明确银屑病的发生是角质形成细胞和免疫细胞功能失调共同作用的结果^[1]。从免疫学角度看银屑病发病的重要因素是 T 细胞介导的免疫功能异常, 在有该病各项临床表现出现之前, T 细胞已经处于活化状态。在银屑病的发病过程中, 异常增殖的 T 细胞能释放多种炎症因子发挥致病作用^[2]。消银解毒颗粒是北京中医药大学东直门医院名老中医金起凤创制, 治疗血热证银屑病临床疗效确切^[3]。本研究拟以植物血凝素 (PHA) 和白细胞介素 6 (IL-6) 共同诱导建立人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 (Jurkat T) 细胞异常增生病理模型, 并采用消银解毒颗粒药物血清进行干预, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 从细胞水平的免疫学角度探讨消银解毒颗粒的可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞和动物

Jurkat T 淋巴细胞来自国家实验细胞共享资源平台, 该细胞株是 Jurkat-FHCRC 细胞株衍生的一个克隆, 源自一个 14 岁男孩的外周血, 其表面表

达 T 细胞表面受体及 CD3。

清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 8~10 周龄, 体重 250~300 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

消银解毒颗粒组成: 水牛角 30 g, 生地黄 15 g, 牡丹皮 15 g, 赤芍 12 g, 忍冬藤 30 g, 大青叶 15 g, 白花蛇舌草 12 g, 白鲜皮 12 g, 全蝎 6 g; 凉血方, 组成: 水牛角 30 g, 生地黄 15 g, 牡丹皮 15 g, 赤芍 12 g; 解毒方, 组成: 忍冬藤 30 g, 大青叶 15 g, 白花蛇舌草 12 g, 白鲜皮 12 g, 全蝎 6 g。药物均为北京康仁堂药业有限公司生产的免煎颗粒。阿维 A 胶囊 (重庆华邦制药有限公司生产, 批号 2011010)。上述各组颗粒药物均加入相应剂量 80℃ 蒸馏水充分溶解, 各溶液浓度消银解毒颗粒为 463.1 g/L、凉血方颗粒为 226.8 g/L、解毒方颗粒为 236.3 g/L、阿维 A 胶囊 0.6 g/L。

1.3 仪器和试剂

CO₂ 细胞培养箱 (Sanyo 公司, 型号 MCO-20AIC); 倒置显微镜 (德国 Leica 公司, 型号 4000B); 全自动酶标仪 (奥地利 CliniBio 公司, 型号 128C); 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司, 型号 3K15); 流式细胞仪 (美国 BECKMAN 公司, 型号 EPICS XL/FC500/Altra)。重组人 IL-6 试剂盒

基金项目: 国家自然科学基金 (81273755, 81403403, 81403404); 2016 年东直门医院青苗人才培养计划 (DZMYS-201603); 北京中医药大学杰出青年人才项目 (2016-JYB-XJQ005)

* 通讯作者: abcling3283@sina.com, (010) 84013167

(美国 PeProTech 公司, 批号 200-06); CCK-8 细胞增殖和毒性检测试剂盒 (东仁化学科技有限公司, 批号 JG659); PHA (索莱宝公司, 批号 P8090); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司, 批号 1508R15)。

2 方法

2.1 药物血清的制备

50 只 SD 大鼠, 用 SPSS 17.0 软件生成随机序列, 按随机区组的分组方法设为 5 组, 蒸馏水组、阿维 A 组、凉血方组、解毒方组及消银解毒颗粒组, 每组 10 只。每组灌胃药量按 60 kg 体重成年人用药量计算, 分别为: 消银解毒颗粒组 43.6 g/(kg·d), 凉血方组 20.4 g/(kg·d), 解毒方组 16.2 g/(kg·d), 阿维 A 组 6 mg/(kg·d), 蒸馏水组予等量蒸馏水灌胃。各组每日灌胃 1 次, 每次 2.0 ml, 连续灌胃 7 天。最后 1 次给药后 24h 禁食不禁水, 腹主动脉取血, 分离血清, 灭活分装备用。

2.2 细胞分组及干预方法

取对数生长期的 Jurkat T 细胞, 用 RPMI 1640 培养基重悬, 将细胞数调整为 1×10^5 /ml, 接种于 96 孔培养板中。按预实验摸索的条件, 每孔加入终浓度为 10 μ g/ml 的 PHA 和 10 ng/ml 的 IL-6 孵育 3h, 以构建银屑病 T 细胞异常增殖模型^[4-5]。在上述 96 孔板中另设只加 RPMI 1640 培养基的对照组和未加 PHA、IL-6 的空白细胞组, 每组 6 个复孔。将模型细胞分为模型组、蒸馏水组、阿维 A 组、凉血方组、解毒方组、消银解毒颗粒组, 模型组加入 RPMI1640 培养基, 其他各组细胞中加入相应的药物血清, 每个药物血清干预组设 6 个复孔。以上各孔内最终保证液体总体积为 100 μ l。同时, 将干预细胞模型的药物血清设置为 10%、15%、20% 三个浓度梯度进行, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

2.3 不同浓度药物血清对银屑病 T 细胞异常增殖的影响

收集各组细胞, 用 CCK-8 法检测细胞活力,

酶标仪检测各孔 OD 值。计算细胞增殖率 (%) = (药理血清干预孔 - 培养基对照孔) / (空白细胞孔 - 培养基对照孔) $\times 100\%$ 。细胞增殖率最低的药物血清浓度作为最佳浓度药物血清。

2.4 最佳浓度药物血清对银屑病 T 细胞异常增殖凋亡的影响

收集各最佳浓度药物血清组细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 再用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒中的 1 $\times$ Binding Buffer 缓冲液将待测细胞制成 1×10^6 /ml 的细胞悬液, 以 1 $\times$ Binding Buffer 缓冲液 100 μ l 溶解 Annexin V-FITC 试剂 0.5 μ g, 加入待测细胞中, 再加入 5 μ l 碘化丙啶 (PI) 混匀, 室温避光孵育 15 min, 各组分别加入 1 $\times$ Binding Buffer 缓冲液 400 μ l, 用流式细胞仪检测各组细胞凋亡。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件, 数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若方差齐性采用单因素方差分析; 若方差不齐采用 Welch 修正。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

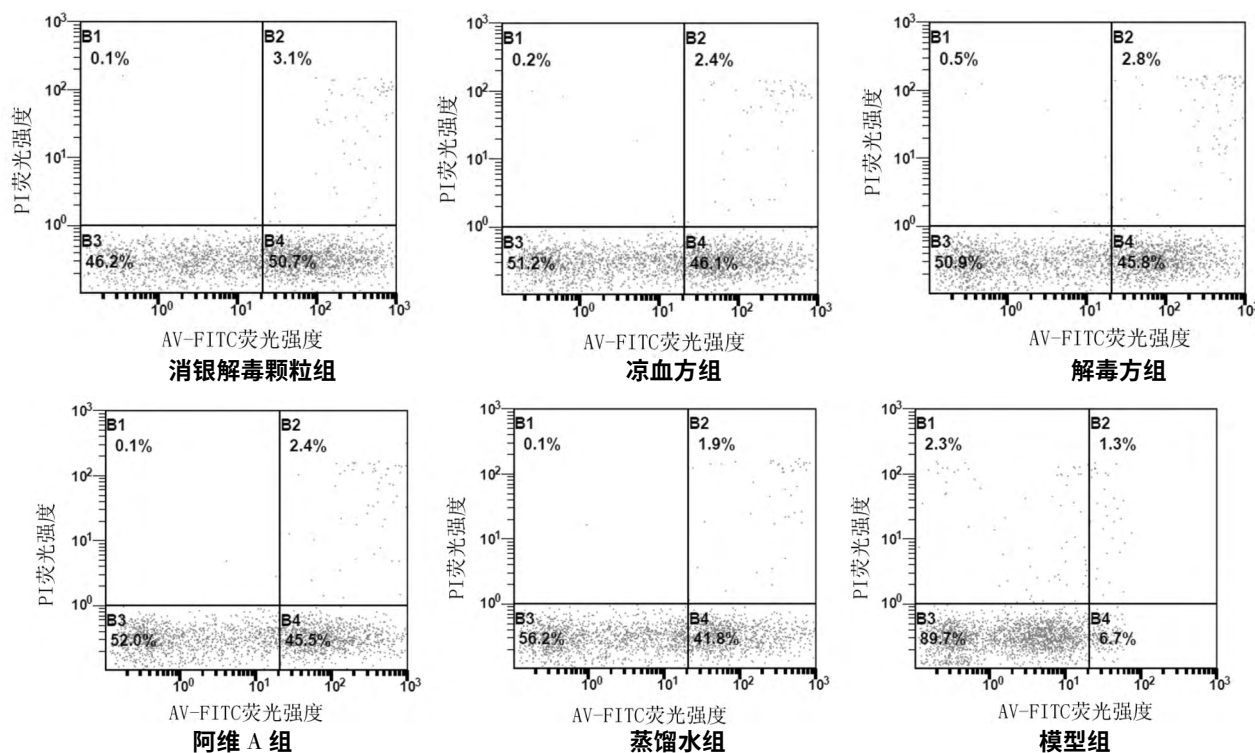
3.1 各组细胞增殖率比较

表 1 示, 在 10%、15%、20% 三种不同浓度药物血清作用下, 各干预药物血清组细胞模型的增殖率均明显低于蒸馏水组和模型组 ($P < 0.01$), 蒸馏水组与模型组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各浓度药物血清细胞模型的增殖率比较, 20% 药物血清最低, 故用其作为细胞凋亡实验的药物血清。血清浓度为 10% 时, 各药物干预药理血清组细胞增殖率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血清浓度为 15% 时, 消银解毒颗粒组、阿维 A 组细胞模型增殖率低于凉血方组、解毒方组 ($P < 0.05$), 消银解毒颗粒组与阿维 A 组间无统计学意义 ($P > 0.05$), 凉血方组与解毒方组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。当血清浓度为 20% 时, 消银解毒颗粒组、凉血方组细胞模型增殖率低于解

表 1 各组细胞在不同浓度药物血清干预下细胞增殖率比较 (%) , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	10% 浓度药物血清	15% 浓度药物血清	20% 浓度药物血清
模型组	6	50.05 $\pm$ 2.67	49.28 $\pm$ 1.59	48.49 $\pm$ 1.85
蒸馏水组	6	48.07 $\pm$ 2.56	47.70 $\pm$ 2.89	44.38 $\pm$ 4.46
阿维 A 组	6	40.26 $\pm$ 2.25* #	39.31 $\pm$ 2.95* #	38.27 $\pm$ 2.41* #
凉血方组	6	43.19 $\pm$ 2.61* #	42.29 $\pm$ 2.85* #	33.49 $\pm$ 1.75* # Δ ∇ ∇
解毒方组	6	43.20 $\pm$ 2.23* #	42.51 $\pm$ 2.46* # ∇	37.07 $\pm$ 2.28* # Δ
消银解毒颗粒组	6	41.15 $\pm$ 2.75* #	38.88 $\pm$ 1.31* # ∇ Δ Δ	33.10 $\pm$ 2.06* # ∇ ∇ Δ

注: 模型组加入 RPMI1640 培养基; 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与蒸馏水组比较, # $P < 0.01$; 与阿维 A 组比较, $\nabla P < 0.05$, $\nabla \nabla P < 0.01$; 与凉血方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与解毒方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$



注: B1, 晚期凋亡细胞; B2, 坏死细胞; B3, 正常细胞; B4, 早期凋亡细胞

图 1 各组银屑病 T 细胞异常增殖模型的凋亡率

毒方组和阿维 A 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 消银解毒颗粒与凉血方组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 解毒方组与阿维 A 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 各组细胞凋亡比较

消银解毒颗粒组凋亡率为 (50.86 ± 0.27)%、凉血方组为 (46.81 ± 0.63)%、解毒方组为 (45.17 ± 0.55)%、阿维 A 组为 (44.90 ± 0.34)%、蒸馏水组为 (40.75 ± 0.33)%、模型组为 (6.65 ± 0.81)%, 见图 1。四象限中, 除模型组外, 各组不同凋亡时期以早期凋亡细胞分布比例最高, 可见凋亡细胞以早期凋亡为主。其中, 消银解毒颗粒组早期凋亡率最高, 高于凉血方组、解毒方组、阿维 A 组及蒸馏水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 凉血方组、解毒方组、阿维 A 组早期凋亡率高于蒸馏水组 ($P < 0.01$); 解毒方组、蒸馏水、阿维 A 组早期凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

多数学者认为, 银屑病的发生多因患者素体阳盛内热, 又复感六淫邪气, 外邪入里化热蕴毒, 或情志内伤, 气郁化火, 或大量进食辛辣发物, 导致体内热毒炽盛, 随气血流窜, 外发肌肤而为病^[5-8]。本研究所用药物消银解毒颗粒在犀角地黄汤基础上加减而成, 方中以水牛角为君药, 清热解

毒, 凉血化斑; 辅以忍冬藤、大青叶、白花蛇舌草清热解毒, 赤芍、牡丹皮凉血散瘀, 共为臣药; 佐以全蝎、白鲜皮解毒熄风止痒。方中诸药相合, 共奏清热凉血、解毒散瘀、熄风止痒之功效, 针对银屑病血热毒盛之病机, 药证相符。

银屑病的发病病因目前尚未明确, 目前已知 T 细胞介导的免疫功能异常是本病发生的重要环节, 疾病发生前 T 细胞已经异常增殖, 在银屑病患者皮损的真皮及表皮中均能检测到有活化的 T 细胞存在, 它的浸润与消退均分别先于皮损的出现或消退^[9]。有研究^[10]表明, 以多克隆刺激剂佛波醇酯和离子霉素刺激活化 Jurkat 细胞能够体外模拟银屑病的 T 细胞异常增殖的关键病理环节。本实验中, 我们选择以 PHA 和 IL-6 共同诱导 Jurkat 细胞异常增生, 来模拟银屑病 T 细胞异常增殖的炎症病理特性。PHA 作为一种从植物中发现的有丝分裂原, 它能刺激 T 细胞增殖和分化, 产生大量效应及细胞毒性 T 细胞, 引发一系列的 T 细胞早期活化事件^[11]。IL-6 作为重要的炎症因子, 能通过膜与受体结合形成复合体, 经多种途径, 诱导 T 细胞活化和分化^[11]。此外, 我们选用 Jurkat 细胞株, 还与该细胞内高度开放的 JAK/STAT3 信号通路有关^[12]。研究显示, 银屑病患者皮损中的信号传导及转录激活因子 (STAT) 3 几乎均呈激活状态,

而介导 JAK/STAT3 信号通路的活化, 主要与 IL-6 等炎症因子相关^[12]。

本研究中我们运用消银解毒颗粒及其凉血、解毒组分的中药药物血清作用于异常增殖的 T 细胞模型, 结果显示, 10%、15%、20% 浓度的药物血清均能抑制 Jurkat T 细胞增殖, 且增殖率随血清浓度增加而降低。当药物血清浓度为 20% 时, 各干预药物组药物血清对于细胞增殖模型的抑制程度最强, 基本呈消银解毒颗粒组、凉血方组强于解毒方组、阿维 A 组强于蒸馏水组的趋势。在细胞凋亡检测中, 我们也进一步验证了该趋势。上述实验结果均说明, 消银解毒颗粒及其凉血、解毒组分对银屑病 T 细胞异常增殖病理模型确有明显抑制作用, 其作用强度凉血方组等同于消银解毒颗粒组, 优于阿维 A 组。在既往的实验研究中, 我们发现消银解毒颗粒能通过调控活化 T 细胞产生炎症因子抑制表皮增殖, 进而发挥对银屑病的治疗作用^[13]。有研究运用不同剂量凉血解毒药物干预该细胞模型, 使活化的 T 细胞数量明显下降并抑制细胞因子 TNF- α 的分泌^[14], 证实与消银解毒颗粒组成分相类似的中药方确实能够对活化的 T 细胞的增殖及分泌的相关因子产生影响。

参考文献

- [1] NOQRALES KE, DAVIDOVICI B, KRUEGER JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis [J]. Semin Cutan Med Surg, 2010, 29(1): 3-9.
- [2] BOEHNCKE WH, SCHÖN MP. Psoriasis [J]. Lancet, 2015, 386(9997): 983-994.
- [3] 李玲玲, 孙少馨, 徐杰, 等. 消银解毒免煎颗粒治疗寻常型银屑病 40 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2014, 55(10): 850-853.
- [4] 霍春波. 消银解毒颗粒对 Jurkat T 细胞 JAK/STAT 信号转导通路的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016: 24-30.
- [5] 杨继乐, 张莉, 茹晓荣. T 细胞体外活化模型的建立 [J]. 医学分子生物学杂志, 2014, 11(5): 257-266.
- [6] 北京中医医院. 赵炳南临床经验集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 211-229.
- [7] 中医研究院广安门医院. 朱仁康临床经验集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 153-158.
- [8] 金起凤. 牛皮癣的中医治疗 [J]. 中国农村医学, 1989(6): 31-33.
- [9] 刘欣, 李萍, 赵京霞, 等. 凉血活血胶囊全方及拆方对 Jurkat T 淋巴细胞增殖、活化及释放细胞因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 198-202.
- [10] 周婷君, 马江敏, 张世玉, 等. T 淋巴细胞表面活化分子表达及其活化相关影响因子 [J]. 口腔生物医学, 2014, 5(2): 103-106.
- [11] GOODMAN WA, LEVINE AD, MASSARI JV, et al. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells [J]. J Immunol, 2009, 183(5): 3170-3176.
- [12] 王恒, 王勇, 江晓霁, 等. 莪术醇通过 JAK3/STAT 信号途径抑制 Jurkat 细胞增殖 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 408-411.
- [13] 夏梦, 段行武, 瞿幸, 等. 消银解毒饮对银屑病血热证外周血淋巴细胞中 IL-4、IFN- γ 的调控作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(12): 837-840.
- [14] 刘欣, 李萍, 赵京霞, 等. 凉血解毒方对 Jurkat T 淋巴细胞增殖、活化及细胞因子分泌的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(4): 418-422.

Effect of Xiaoyin Jiedu Granules (消银解毒颗粒) on Model of Jurkat Cell Abnormal Proliferation

ZHANG Runtian¹, CHEN Xi², HUO Chunbo¹, DUAN Xingwu¹, CHEN Bing¹, LI Lingling¹

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700; 2. East Campus of Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xiaoyin Jiedu Granules* (消银解毒颗粒) in the treatment of psoriasis. **Methods** The Jurkat cell was administered by both phytohemagglutinin (PHA) and interleukin 6 (IL-6) to induce the model of psoriasis T cell abnormal proliferation. The optimal pharmaceutical serum concentration was made and selected to be applied to the cell model. The cell viability was measured with cell viability kit (CCK-8), and the apoptosis was detected with flow cytometry. **Results** When the pharmaceutical serum concentration was 20%, the inhibition rates in the *Xiaoyin Jiedu Granules* group and Liangxuefang group were significantly higher than that in the Jiedufang group, Acitretin group and distilled water group ($P < 0.01$); the *Xiaoyin Jiedu Granules* group had the highest early apoptosis rate, which was significantly higher than that in Liangxuefang group, Jiedufang group, Acitretin group and distilled water group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Xiaoyin Jiedu Granules* and its decomposed recipes could inhibit the inflammatory pathological model of psoriasis T cell abnormal proliferation, and the inhibitory effects of *Xiaoyin Jiedu Granules* and Liangxuefang seem better than Acitretin.

Keywords psoriasis; *Xiaoyin Jiedu Granules* (消银解毒颗粒); T cell; abnormal proliferation

(收稿日期: 2016-12-28; 修回日期: 2017-03-11)

编辑: 王利芬