

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.23.013

凉血解毒利湿方对小鼠银屑病样皮损中过氧化物酶体增殖激活受体的影响

李雪¹, 解欣然², 李宁飞³, 蒙玉娇³, 王明星², 任攀², 张璐², 张蕾², 李萍[✉]

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所; 3. 北京中医药大学)

摘要 目的 探讨凉血解毒利湿方治疗银屑病的可能作用机制。方法 50 只 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组、模型组、甲氨蝶呤组及中药高、低剂量组。除空白对照组外, 其余各组连续 6 日外涂 5% 咪喹莫特乳膏建立银屑病模型, 除模型组外, 中药高、低剂量组分别给予凉血解毒利湿方 42、21 g/(kg·d) 灌胃, 甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤片 1 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组和空白对照组给予 0.4 ml 蒸馏水, 每日 1 次, 共 6 天。第 7 天观察小鼠皮损变化情况; HE 染色观察皮损组织形态学变化, 光镜下测量表皮厚度; 免疫荧光法检测小鼠皮损中增殖细胞核抗原 (PCNA) 有丝分裂细胞核数、有丝分裂细胞率、外皮蛋白、过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR- α)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR- γ)、过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ (PPAR- β/δ) 表达情况; Real-Time PCR、Western blot 法分别检测小鼠皮肤中 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- β/δ mRNA、蛋白表达。结果 模型组小鼠皮损鳞屑叠起、红斑色深、浸润较厚; 与模型组相比, 各给药组皮损症状均有明显改善。与空白对照组比较, 模型组小鼠表皮细胞层增厚, 有丝分裂细胞核数量均明显增多, 有丝分裂细胞率显著升高。与模型组比较, 甲氨蝶呤组及中药高、低剂量组 PPAR- α 、PPAR- γ 蛋白表达升高, PPAR- β/δ 蛋白表达降低, 甲氨蝶呤组 PPAR- γ 、PPAR- β/δ mRNA 及中药高、低剂量组 PPAR- β/δ mRNA 均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与中药高剂量组比较, 中药低剂量组 PPAR- β/δ mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。结论 凉血解毒利湿方可调控银屑病小鼠皮损中 PPARs 表达, 从而抑制表皮细胞过度增殖和分化, 可能是其治疗银屑病的作用机制之一。

关键词 银屑病; 凉血解毒利湿方; 咪喹莫特乳膏; 过氧化物酶体增殖激活受体

银屑病是一种常见的与免疫激活和系统机能受损有关的炎症性、进展性疾病。研究发现, 患者的皮损和血液中存在脂代谢紊乱现象, 具有反复发作、迁延难愈的特点^[1-3]。凉血解毒利湿方是在北京中医医院赵炳南、张志礼老中医创制的凉血解毒方的基础上加减配伍利湿中药, 以清热凉血、解毒利湿作为主要治则的优化组方。前期研究显示, 凉血解毒方临床效果显著^[4-5], 在临床运用中, 针对一些皮肤干燥、肥厚增生而明显瘙痒的患者, 辅以祛湿药发现疗效更加明显。过氧化物酶体增殖激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor,

PPARs) 是 II 型核受体超家族成员, 在人体代谢中起着重要的调节作用^[6]。本研究将凉血解毒利湿方运用于咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮损模型中观察其对 PPARs 的影响, 旨在探讨凉血解毒利湿方对银屑病皮损中脂代谢紊乱的影响, 从而探寻其治疗银屑病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 雄性小鼠 50 只, SPF 级, 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 动物许可证编号 SCXK (京) 2012-0001, 饲养于 SPF 级动物室。动物实验处理均严格遵循动物福利原则及首都医科大学附属北京中医医院实验动物伦理委员会的要求。

基金项目: 国家自然科学基金 (81573974, 81603630); 银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室

* 通讯作者: liping411@163.com; (010) 52176679

1.2 实验药品

凉血解毒利湿方由青黛、紫草、赤芍、牡丹皮、槐花、蒲黄、陈皮、山楂、土茯苓、茵陈、生地黄、金银花、白花蛇舌草组成，剂量比例为 0.6 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1.5 : 1.5 : 1.5 : 1.5 : 3。由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供，制剂室负责质量控制，按成人临床等效剂量换算为小鼠用量 (1 : 9) 制备水煎剂。

1.3 主要试剂与仪器

咪喹莫特乳膏 (四川明欣药业有限责任公司, 批号: 16110239); 凡士林 (包头昆仑石化有限公司, 批号: 110124); 甲氨蝶呤片 (上海医药集团有限责任公司信谊制药厂, 批号: 036150801); 戊巴比妥钠 (Sigma 公司, 批号: 01840754); 苏木精-伊红 (HE) 染色剂试剂盒 (Leica 公司, 批号: 042415); 增殖细胞核抗原 (PCNA) 小鼠单克隆抗体 (货号: ab184660)、外皮蛋白兔多克隆抗体 (货号: ab53112)、过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR- α) 兔多克隆抗体 (货号: ab8934)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR- γ) 兔多克隆抗体 (货号: ab45036)、过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ (PPAR- β/δ) 兔多克隆抗体 (货号: ab23673) 均为 Abcam 公司产品; Trizol 总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 货号: DP405-02], PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (批号: RR047B)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) ROX plus (批号: RR82LR)、DL2000 DNA Marker (批号: 3427Q), TaKaRa 公司产品; BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce 公司, 货号: 23235)。

EOS M3 型数码相机 (日本佳能公司), ASP300S 型全自动脱水机、EG1150 型石蜡包埋机、RM2255 型全自动轮转切片机、Autostainer XL ST5010 型全自动染色机均为 Leica 公司产品; IM-AGER Z2 型正置荧光显微镜 (Zeiss 公司); ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); Tanon1600 型凝胶成像系统 1.100 (上海天能科技有限公司)。

1.4 动物模型的制备、分组及给药

将 50 只 BALB/c 小鼠用戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 背部刮毛, 形成约 2 cm × 4 cm 大小区域。利用随机数字表法分为空白对照组, 模型组及中药高、低剂量组, 甲氨蝶呤组, 每组各 10 只。除空白对照组外, 其余各组参照大鼠

背部均涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 62.5 mg, 空白对照组背部涂抹等量凡士林。造模同时每日定时灌服相应药液, 每次 0.4 ml, 每日 1 次, 剂量如下: 中药高、低剂量组分别给予凉血解毒利湿方水煎剂 42、21 g/(kg · d)、甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤 1 mg/(kg · d), 模型组和空白对照组给予 0.4 ml 蒸馏水。中药低剂量组为成人临床等效剂量, 连续给药 6 天后。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 银屑病样皮损情况 各组小鼠采用数码照相的方法记录皮损形态学变化, 观察各组小鼠皮损处红斑、鳞屑及浸润增厚程度。

1.5.2 皮损组织形态学观察 于实验第 7 天小鼠经麻醉后脱颈处死, 各组剪取相对应皮损处组织, 一部分固定于 10% 甲醛溶液中用于制备石蜡切片; 另一部分置于 -80℃ 冰箱中待用。小鼠皮损组织经常规脱水、包埋、切片、HE 染色后, 光镜下观察小鼠皮损的病理学变化。使用 IPP 6.0 图像分析软件, 每个标本选 3 张切片进行照相, 并在每张切片中测量 5 处表皮厚度。

1.5.3 皮损表皮增殖和分化 采用免疫荧光法检测, 石蜡切片经脱蜡、水化后, 水浴加热抗原修复 15min, PCNA、外皮蛋白一抗 (1 : 800) 4℃ 孵育过夜, 二抗 (1 : 500) 37℃ 孵育 30min, 用含 DAPI 封片剂封片。使用 IPP 6.0 图像分析软件计算有丝分裂细胞核数和总细胞核数及两者比值; 半定量分析外皮蛋白表达情况, 以积分光密度 (IOD) 表示。

1.5.4 皮损组织中 PPARs mRNA 表达 采用实时荧光定量 PCR 法检测, 各组取 3 只小鼠, 提取组织样本中总 RNA。cDNA 反转录, 实验操作按产品说明书进行。采用实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应, 扩增条件为: 95℃, 30s; 95℃, 5s; 60℃, 40s, 40 个循环。引物由北京 Invitrogen 公司合成; 引物序列如下: PPAR- α , 上游: 5'-TTTTCACAAGTGCCTGTCTGTCGG-3', 下游: 5'-AGTTCTTCAGGTAGGCTTCGTGGAT-3'; PPAR- β/δ , 上游: 5'-ATGACCAGGTGACCCTCCTCAAGTA-3', 下游: 5'-GAGACTTCGCAAGAACTCGTGGGT-3'; PPAR- γ , 上游: 5'-CTTGCTGTGGGGATGTCTCA-3', 下游: 5'-GTCAGCGGGAAGGACTTTATG-3'; actin, 上游: 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3', 下游: 5'-ACAGACTACTTGGCCTCAGGAG-3'。每个样本检测 3 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.5.5 免疫荧光法检测皮损组织中 PPARs 蛋白表达 石蜡切片经脱蜡、水化后,水浴加热抗原修复 15 min, PPARs 一抗 (PPAR- α : 1:1000、PPAR- γ : 1:500、PPAR- β/δ : 1:200) 4℃ 孵育过夜,二抗 (1:500) 37℃ 孵育 30min,封片剂封片。采用 IPP 6.0 图像分析软件半定量分析 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- β/δ 表达情况,以积分光密度 (IOD) 表示。

1.5.6 Western blot 法检测皮损组织中 PPARs 蛋白表达 各组选取 3 只小鼠,提取皮损组织蛋白,并进行定量。各组取 20 μ g/孔样品蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿转法转移到 PVDF 膜上,封闭液室温摇床摇 2h。加入特异性识别抗体 (PPAR- α : 1:4000、PPAR- γ : 1:2000、PPAR- β/δ : 1:2000), 4℃ 封闭过夜。TBS 震荡洗膜后,加入荧光二抗 (1:10000), 室温避光孵育 1h,洗膜后加 ECL 发光液反应 3~5 min,调整胶片曝光时间 (10s~5min),加入显影液、定影液,清水浸泡后晾干。采用凝胶成像仪采集图像并进行分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间符合正态分布且方差齐采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD (*L*) 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠皮损情况

与空白对照组相比,模型组小鼠涂抹咪喹莫特乳膏 1 天后皮损浸润即有明显增厚,并开始出现鳞屑和红斑,此后,随着时间推移,皮损日益严重,浸润持续增厚,红斑由淡粉色斑点变为大面积深红色斑块,鳞屑厚密且分布广泛;6~7 天时红斑、皮损达到峰值,类似银屑病样皮损形成。中药高剂量组灌胃第 4 天可观察到其对浸润增厚的改善作

用,中药低剂量组第 3 天起,明显抑制了小鼠皮损中浸润增厚、鳞屑增长现象,红斑颜色也开始变浅。造模第 7 天,空白对照组小鼠皮肤光滑,平整,菲薄;模型组小鼠皮损鳞屑叠起、红斑色深、浸润较厚;与模型组相比,各给药组皮损症状均有明显改善。中药高、低剂量组皮肤较光滑,鳞屑稀少,红斑色浅,浸润增厚减轻,与甲氨蝶呤组皮损形态相仿。

2.2 各组小鼠皮损组织形态学情况比较

图 1、表 1 示,空白对照组皮肤表皮层厚度薄,由两层细胞组成,真皮结构紧密。模型组表皮棘细胞层增厚,角质层出现角化不全,真皮层炎性细胞浸润明显,类似银屑病样皮损组织学表现,表皮层厚度明显高于空白对照组 ($P<0.01$)。与模型组比较,甲氨蝶呤组和中药高、低剂量组小鼠皮损表皮层均较平整,角化不全的细胞明显减少,真皮层变薄,血管增生扩张不明显,且表皮层厚度明显降低 ($P<0.01$)。中药高、低剂量组表皮层厚度均低于甲氨蝶呤组,且中药低剂量组低于中药高剂量组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 各组小鼠皮损表皮层垂直厚度比较 (μ m, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	表皮层厚度
空白对照组	10	9.81 $\pm$ 2.89*
模型组	10	92.46 $\pm$ 13.84
甲氨蝶呤组	10	45.05 $\pm$ 8.01*
中药高剂量组	10	41.83 $\pm$ 9.59* Δ
中药低剂量组	10	40.51 $\pm$ 8.19* Δ $\blacktriangle$

注:与模型组比较,* $P<0.01$;与甲氨蝶呤组比较, $\Delta P<0.01$;与中药高剂量组比较, $\blacktriangle P<0.05$

2.3 各组小鼠皮损中有丝分裂细胞核数、总细胞核数、有丝分裂细胞率及外皮蛋白表达比较

有丝分裂细胞呈绿色荧光。图 2 (见前插一)、表 2 示,空白对照组小鼠皮肤表皮层较薄,仅数层细胞组成,有丝分裂细胞核在表皮基层层呈线状分布,处于有丝分裂的细胞数较少。模型组小鼠与空

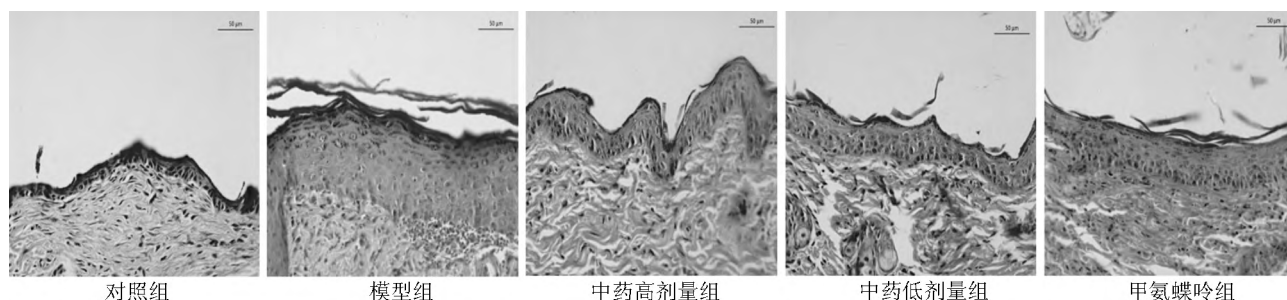


图 1 各组小鼠皮损组织学 HE 染色图 ($\times 400$)

表 2 各组小鼠皮损中有丝分裂细胞核数、总细胞核数、有丝分裂细胞率及外皮蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	有丝分裂细胞核数 (个)	总细胞核数 (个)	有丝分裂细胞核数/ 总细胞核数	外皮蛋白 (IOD)
空白对照组	3	16.56 ± 11.46*	78.22 ± 34.07*	0.19 ± 0.09*	1123.56 ± 202.16*
模型组	3	433.33 ± 45.93	638.44 ± 62.11	0.68 ± 0.04	6635.89 ± 217.68
甲氨蝶呤组	3	152.45 ± 34.07*	375.11 ± 64.45*	0.40 ± 0.13*	3390.78 ± 278.96*
中药高剂量组	3	161.89 ± 22.56*	430.67 ± 40.34* Δ	0.38 ± 0.05*	2402.00 ± 334.13* $\Delta\Delta$
中药低剂量组	3	84.67 ± 26.05* $\Delta\Delta\Delta$	353.67 ± 45.10* Δ	0.24 ± 0.04* $\Delta\Delta\Delta$	1701.22 ± 256.14* $\Delta\Delta\Delta$

注: PCNA, 有丝分裂细胞核数; DAPI, 总细胞核数; 与模型组比较, * $P < 0.01$; 与甲氨蝶呤组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与中药高剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

白对照组相比,表皮细胞层增厚,有丝分裂细胞核数量均明显增多,有丝分裂细胞率显著升高。中药高、低剂量组小鼠表皮细胞层数较模型组均有减少,集中于基底层,与甲氨蝶呤组类似。外皮蛋白在细胞胞浆中呈绿色荧光,是角质细胞分化的标志性蛋白。图 3 (见前插一)、表 2 示,空白对照组外皮蛋白分布于表皮角质层和棘层的上层,模型组中阳性细胞广泛分布于表皮的全层且呈高表达。中药高、低剂量组小鼠阳性细胞多趋于在表皮角质层和棘层的上层,表达量均明显降低,与甲氨蝶呤组相似。中药低剂量组 PCNA/DAPI 及外皮蛋白表达较模型组下降最为明显,抑制表皮细胞异常分化的效果更显著,与中药高剂量组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 各组小鼠皮损中 PPARs mRNA 表达比较

表 3 示,与空白对照组比较,模型组小鼠皮损

表 3 各组小鼠皮损中 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- β/δ mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PPAR- α	PPAR- γ	PPAR- β/δ
空白对照组	3	1.64 ± 0.53	1.74 ± 0.46	0.32 ± 0.10**
模型组	3	1.13 ± 0.32	1.36 ± 0.22	1.27 ± 0.51
甲氨蝶呤组	3	1.85 ± 0.88	0.91 ± 0.44*	0.45 ± 0.30**
中药高剂量组	3	2.02 ± 0.52	1.26 ± 0.78	0.71 ± 0.37*
中药低剂量组	3	2.77 ± 1.57*	1.59 ± 0.45 Δ	0.16 ± 0.14** $\Delta\Delta\Delta$

注: PPAR- α , 过氧化物酶体增殖激活受体 α ; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖激活受体 γ ; PPAR- β/δ , 过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ ; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与甲氨蝶呤组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药高剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 各组小鼠表皮中 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- β/δ 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PPAR- α	PPAR- γ	PPAR- β/δ
空白对照组	3	15432.91 ± 1779.92**	5713.55 ± 253.58**	1037.95 ± 57.74**
模型组	3	4970.48 ± 1873.00	3398.19 ± 230.65	5662.06 ± 322.89
甲氨蝶呤组	3	9664.56 ± 658.49**	3807.44 ± 299.58*	970.78 ± 57.63**
中药高剂量组	3	6540.94 ± 347.42* Δ	4429.56 ± 348.70** Δ	1005.28 ± 58.45**
中药低剂量组	3	10340.33 ± 1026.48** Δ	4518.00 ± 319.07** Δ	985.67 ± 49.91**

注: PPAR- α , 过氧化物酶体增殖激活受体 α ; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖激活受体 γ ; PPAR- β/δ , 过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ ; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与甲氨蝶呤组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药高剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

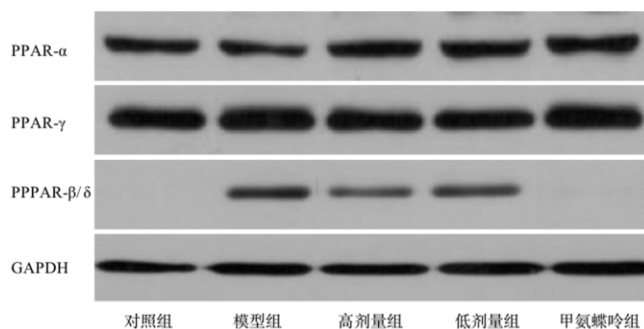
中 PPAR- β mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,甲氨蝶呤组 PPAR- γ 、PPAR- β/δ mRNA 及中药高、低剂量组 PPAR- β/δ mRNA 均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与甲氨蝶呤组比较,中药低剂量组 PPAR- γ mRNA 表达升高、PPAR- β/δ mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。与中药高剂量组比较,中药低剂量组 PPAR- β/δ mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。

2.5 免疫荧光法检测各组小鼠皮损中 PPARs 蛋白表达比较

图 4 (见前插一)、表 4 示,与空白对照组比较,模型组小鼠表皮中 PPAR- α 、PPAR- γ 荧光强度均有降低,PPAR- β/δ 荧光强度升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,甲氨蝶呤组及中药高、低剂量组 PPAR- α 、PPAR- γ 荧光强度升高,PPAR- β/δ 荧光强度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.6 Western blot 法检测各组小鼠皮损中 PPARs 蛋白表达比较

表 5 示,与空白对照组比较,模型组小鼠皮损中 PPAR- β/δ 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,甲氨蝶呤组和中药各剂量组 PPAR- β/δ 蛋白表达均降低,甲氨蝶呤组 PPAR- α 、PPAR- γ 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与甲氨蝶呤组比较,中药低剂量组 PPAR- α 、PPAR- γ 蛋白表达降低,中药高、低剂量组 PPAR- β/δ 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠皮损中 PPAR- α 、PPAR- γ 、及 PPAR- β/δ 蛋白电泳图见图 5。



注: PPAR- α , 过氧化物酶体增殖激活受体 α ; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖激活受体 γ ; PPAR- β/δ , 过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ

图 5 各组小鼠 PPARs Western bolt 条带图

表 5 各组小鼠皮损中 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- β/δ 蛋白相对表达量比较 (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PPAR- α	PPAR- γ	PPAR- β/δ
空白对照组	3	0.43 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.05	0.00 $\pm$ 0.00**
模型组	3	0.36 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.29	0.86 $\pm$ 0.11
甲氨蝶呤组	3	0.60 $\pm$ 0.04**	0.89 $\pm$ 0.02*	0.00 $\pm$ 0.00**
中药高剂量组	3	0.50 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.12	0.59 $\pm$ 0.09* $\Delta\Delta$
中药低剂量组	3	0.39 $\pm$ 0.07 Δ	0.73 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.55 $\pm$ 0.01** $\Delta\Delta$

注: PPAR- α , 过氧化物酶体增殖激活受体 α ; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖激活受体 γ ; PPAR- β/δ , 过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ ; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与甲氨蝶呤组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

银屑病, 中医称之为“白疔”。历代医家在治疗银屑病时, 多从血分论治, 治以清热解毒、凉血润燥、养血祛瘀等, 对其发病机制的诠释也多责之于“燥”, 而银屑病临床表现出的干燥不泽、鳞屑红斑等燥邪的征象是由于津液敷布异常而不能濡润肌肤造成的。门纯德认为, “内湿外燥”是银屑病的发病机理^[9]。赵炳南^[8]指出, 皮损浸润肥厚、经久不退、瘙痒是内湿的外在表现。银屑病的发病可以总结为邪气引起皮之络脉气机郁滞, 气不行则津聚湿阻, 水湿内聚, 不能润养肌肤腠理, 燥邪内生, 二者相互转化从而致病。因此, 燥湿互化贯穿银屑病的整个发展过程, 是银屑病持续发展的重要基础^[9]。银屑病的治疗原则为利湿解毒。

凉血解毒利湿方是在凉血解毒方的基础上加配伍了金银花、蒲黄、青黛、茵陈、陈皮、山楂, 在治疗银屑病方面既加强了消除热毒功效, 又突出了其祛湿作用, 达到凉血解毒、行气利湿、活血化瘀的效果。金银花具有清热解毒、疏散风热的作用; 蒲黄能够入血分, 生用性凉行血消瘀; 青黛性

寒能清热, 咸以入血, 故有清热解毒、凉血、止血、消斑之效; 此三味同用进一步加强了凉血解毒汤清热凉血、活血解毒的作用。茵陈清利湿热, 特别善清气分及脾胃湿热, 与土茯苓、槐花同用, 共同发挥除湿解毒的功效。山楂消食化积, 行气散瘀, 不但为消化油腻肉食积滞之要药, 还因性温兼入肝经血分, 通行气血, 活血祛瘀, 散结止痛。陈皮辛香而行, 善疏理气机、条畅中焦而使之升降有序, 二味配伍, 加强健脾和中、燥湿散瘀之功。

PPARs 是依赖配体的核受体转录因子, 在基因表达调控过程中发挥重要作用, 是连接先天免疫和代谢紊乱之间的桥梁^[10]。PPARs 包括 3 个亚型分别为 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- β/δ 。PPAR- α 在角质细胞中表达, 参与关键细胞的适应性免疫应答^[11]; 在银屑病皮损组织中 PPAR- α 的表达显著降低, 其活化后的蛋白产物 Apo-A1 在银屑病患者皮损中亦显著降低^[12]。PPAR- γ 是银屑病及代谢综合征共同缺失的部分, 可能是二者伴发的共同因素^[12]; 将高特异性 PPAR- γ 激动剂局部外用, 在白介素 21 (IL-21) 诱导的小鼠银屑病样皮损上, 可以减少表皮细胞增生、促进表皮细胞分化^[13]。PPAR- β/δ 在代谢及皮肤稳态中都充当重要角色, 不但是脂肪形成和糖代谢中的关键调节器, 而且还能够调节角质形成细胞的分化。在银屑病患者皮损中 PPAR- β/δ mRNA、蛋白表达水平均有上调, PPAR- β/δ 激动剂促进银屑病的发生^[14-15], PPAR- β/δ 拮抗剂 (GSK3787) 能够抑制 PPAR- β/δ 高表达引起的银屑病样皮损^[16-17], PPAR- β/δ 活化还可促进角质形成细胞增殖与分化^[18-19]。因此, 我们认为, PPARs 可以作为银屑病中的代谢紊乱发生发展的病理环节。

本研究结果显示, 模型组有丝分裂细胞核数显著增多, PPAR- β/δ mRNA、蛋白的表达水平显著升高, PPAR- α 、PPAR- γ mRNA、蛋白表达水平均呈降低趋势; 而凉血解毒利湿方除能够明显的改善小鼠皮损中出现的红斑、鳞屑增多及浸润增厚等银屑病样症状, 抑制表皮细胞的增殖, 使其局限在表皮基层层同时调节表皮细胞的分化, 降低有丝分裂细胞核数, 还显著上调 PPAR- α 、PPAR- γ 和下调 PPAR- β/δ 水平; 进一步检测皮损中 PPARs mRNA 和蛋白的表达可以发现, 该方临床等效剂量在下调 PPAR- β/δ 方面效果最为明显, 同时也可以上调 PPAR- α mRNA 表达, 虽然对 PPAR- γ 的作用无统计学差异, 但是也可以看到上调趋势。

综上所述,凉血解毒利湿方干预银屑病小鼠模型后,可明显改善皮损、组织形态病理学变化,根据以上实验结果,推测该方可能通过调节 PPARs 水平,抑制表皮细胞增殖及过度分化;在 PPARs 的 3 个亚型中,凉血解毒利湿方在调控 PPAR- β/δ 水平方面最为显著。因此,凉血解毒利湿方能够在调节银屑病患者皮损中的代谢紊乱情况,可为药物治疗银屑病提供理论基础和科学依据。

参考文献

- [1] MEHTA NN, LI K, SZAPARY P, et al. Modulation of cardiometabolic pathways in skin and serum from patients with psoriasis [J]. J Transl Med, 2013, 11: 194. doi: 10.1186/1479-5876-11-194.
- [2] GISONDI P, DEL GIGLIO M, GIROLOMONI G. Considerations for systemic treatment of psoriasis in obese patients [J]. Am J Clin Dermatol, 2016, 17(6): 609-615.
- [3] QIN S, WEN J, BAI XC, et al. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids protect against imiquimod-induced psoriasis-like inflammation via the IL-17/IL-23 axis [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(6): 2097-2104.
- [4] 刘志勇, 王莒生, 王萍, 等. 凉血解毒汤治疗白疙(寻常型银屑病)血热证的临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(4): 317-320.
- [5] 王丽华, 张蕾, 刘志勇, 等. 凉血解毒汤对血热型银屑病患者血清 TNF- α 、IL-6 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12): 2583-2585.
- [6] LAGANÀ AS, VITALE SG, NIGRO A, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in dysregulated metabolic homeostasis, inflammation and cancer: current evidence and future perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): E999. doi: 10.3390/ijms17070999.
- [7] 苏润泽, 门九章. 门纯德治疗银屑病经验 [J]. 中医杂志, 2013, 54(22): 1962-1963.
- [8] 赵炳南. 赵炳南临床经验集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 211-229.
- [9] 阮智通, 底婷婷, 王燕, 等. 论银屑病病机中的燥湿互化 [J]. 国际中医中药杂志, 2016, 38(9): 846-848.
- [10] TAIN YL, HSU CN, CHAN JY. PPARs link early life nutritional insults to later programmed hypertension and Metabolic Syndrome [J]. Int J Mol Sci, 2015, 17(1): E20. doi: 10.3390/ijms17010020.
- [11] KIM B, KIM JE, KIM H, et al. Co-treatment with retinyl retinoate and a PPAR- α agonist reduces retinoid dermatitis [J]. Int J Dermatol, 2012, 51(6): 733-741.
- [12] HEGAZY RA, ABDEL HAY RM, SHAKER O, et al. Psoriasis and metabolic syndrome: is peroxisome proliferator-activated receptor- γ part of the missing link? [J]. Eur J Dermatol, 2012, 22(5): 622-628.
- [13] MASTROFRANCESCO A, KOVACS D, SARRA M, et al. Preclinical of a specific PPAR- γ modulator in the control of skin inflammation [J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(4): 1001-1011.
- [14] ROMANOWSKA M, AL YACIOUB N, SEIDEL H, et al. PPARdelta enhances keratinocyte proliferation in psoriasis and induces heparin-binding EGF-like growth factor [J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(1): 110-124.
- [15] ROMANOWSKA M, REILLY L, PALMER CN, et al. Activation of PPARbeta/delta causes a psoriasis-like skin disease in vivo [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9701. doi: 10.1371/journal.pone.0009701.
- [16] HACK K, REILLY L, PALMER C, et al. Skin targeted inhibition of PPAR beta/delta by selective antagonists to treat PPAR beta/ delta-mediated psoriasis-like skin disease in vivo [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37097. doi: 10.1371/journal.pone.0037097.
- [17] WANG X, HAO Y, WANG X, et al. A PPAR δ -selective antagonist ameliorates IMQ-induced psoriasis-like inflammation in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 40: 73-78. doi: 10.1016/j.intimp.2016.08.027.
- [18] KHOZOIE C, BORLAND MG, ZHU B, et al. Analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) cisome reveals novel co-regulatory role of ATF4 [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 665. doi: 10.1186/1471-2164-13-665.
- [19] CHONG HC, TAN MJ, PHILIPPE V, et al. Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARbeta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing [J]. J Cell Biol, 2009, 184(6): 817-831.

Effects of *Liangxue Jiedu Lishi Fang* (凉血解毒利湿方) on Peroxisome Proliferator-activated Receptors in Psoriatic Lesions of Mice

LI Xue¹, XIE Xinran², LI Ningfei³, MENG Yujiao³, WANG Mingxing², REN Pan², ZHANG Lu², ZHANG Lei², LI Ping¹

(1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing Hospital of Chinese Medicine, Capital Medical University; 3. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Liangxue Jiedu Lishi Fang* (凉血解毒利湿方, LJLF) in treating psoriasis. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomized into control group, model group, methotrexate group as well as Chinese medicine high and low dose groups. Group except for the control group was coated with 5% imiquimod cream for 6 days to establish a psoriasis model. Chinese medicine high and low dose groups

were respectively given oral LJLF 42 and 21 g/(kg · d), methotrexate group was given methotrexate tablets 1 mg/(kg · d) by gavage and the model group and the control group were given 0. 4ml distilled water once a day for 6 days. On the 7th day, the changes of the skin lesions were observed; the morphological changes of the lesions were observed by HE staining and the thickness of the epidermis was measured under light microscope; immunofluorescence method was used to detect the number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mitotic cell nucleus, mitotic cell ratio, and the expressions of cortical protein, peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR- α), peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR- γ) and peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR- β/δ) in skin lesions. The mRNA and protein expressions of PPAR- α , PPAR- γ and PPAR- β/δ in mouse skin were detected by real-time PCR and western blot respectively. **Results** The mice in the model group had squamous skin scales, deep erythema and thick infiltration. Compared with those of the model group, the lesions of each treatment group significantly improved. Compared with those in the control group, the epidermal cell layer in the model group was thicker, the number of mitotic nuclei and the mitotic cell ratio significantly increased. Compared with those in the model group, the expressions of PPAR- α and PPAR- γ protein increased in methotrexate group and Chinese medicine high and low dose groups, while the expression of PPAR- β/δ decreased, and the mRNA levels of PPAR- γ and PPAR- β/δ in methotrexate group significantly decreased, so as the PPAR- β/δ mRNA in high and low dose Chinese medicine groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the high dose Chinese medicine group, the expression of PPAR- β/δ mRNA in the low dose Chinese medicine group significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** LJLF could regulate the expression of PPARs in the skin lesions of psoriatic mice and thus inhibits the excessive proliferation and differentiation of epidermal cells, which may be one of its mechanisms in the treatment of psoriasis.

Keywords psoriasis; *Liangxue Jiedu Lishi Fang* (凉血解毒利湿方); imiquimod cream; peroxisome proliferator activated receptor

(收稿日期: 2017-05-31; 修回日期: 2017-09-12)

编辑: 王利菊

(上接第 2027 页)

Analysis on Chinese Medicine Syndrome and Treatment of 9 Severe cases of Human Infected Avian Influenza H7N9

LIU Yong, LI Jike, YE Qing, CHEN Hong, WANG Yuelian, LI Yuelin

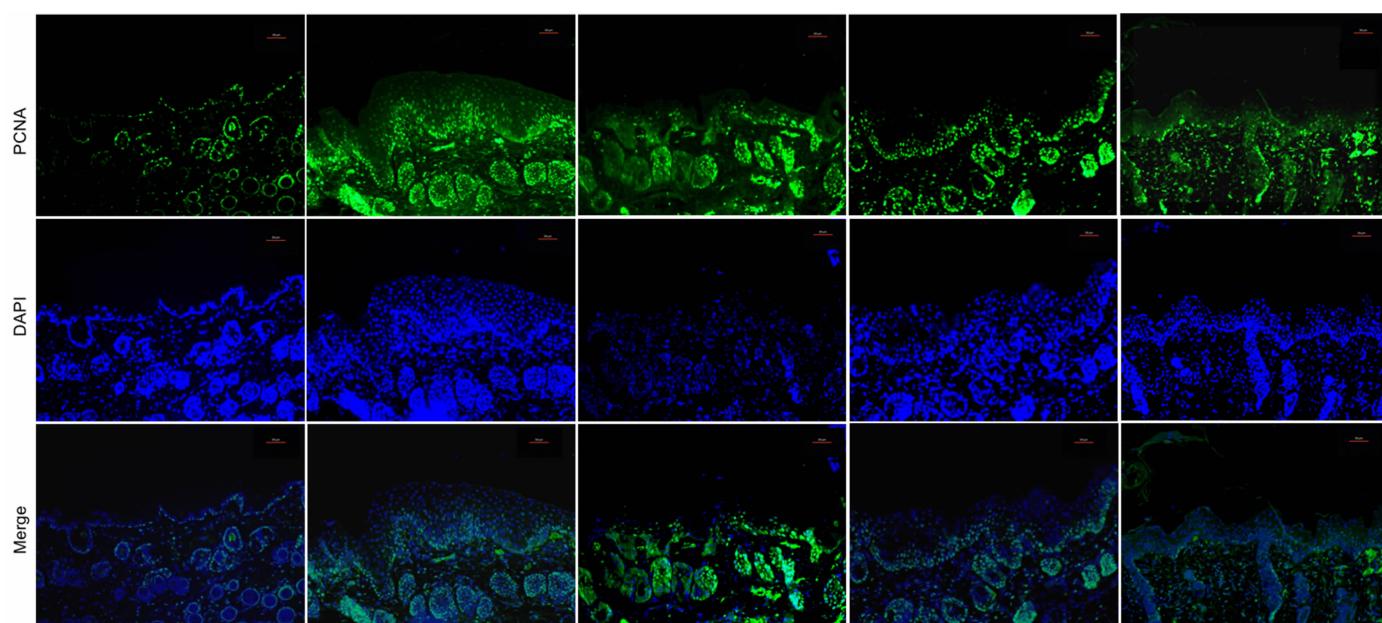
(Chengdu Public Health Clinical Medicine Centre, Chengdu, 610066)

ABSTRACT **Objective** To explore the Chinese medicine syndrome of patients with severe human infected avian influenza H7N9 and to examine the effect of Chinese medicine syndrome differentiation and treatment. **Methods** Clinical data of 9 patients including clinical symptoms and characteristics of tongue and pulse with severe human infected avian influenza H7N9 were collected from April 1st to May 7th om 2017 in Chengdu. The Chinese medicine syndrome features were explored. The uses of prescriptions and herbs in Chinese medicine syndrome differentiation and treatment were calculated. At the same time, the clinical effect was examined. **Results** Dampness and phlegm were the main pathogenesis in 9 patients, some patients with deficiency and blood stasis. As for treatment, dissipating dampness and expelling phlegm methods were commonly used. *Huopo Xialing Decoction* (藿朴夏苓汤) and *Dayuan Yin* (达原饮) were the basic prescriptions to modify. Patients with Qi and Yin deficiency should be treated by benefiting Qi and nourishing Yin methods at the same time. Patients with blood stasis should be treated by dissipating phlegm and dredging collaterals. The use frequency of *Fabanxia* [*Rhizoma Pinelliae Preparatum*], *Fuling* [*Poria*], *Gancao* [*Radix Glycyrrhizae*], *Houpo* [*Cortex Magnoliae Officinalis*], *Chenpi* [*Pericarpium Citri Reticulatae*], *Kuxingren* [*emen armeniacae amarae*], *Huoxiang* [*Agastache rugosus*], *Zhebeimu* [*Bulbus Fritillariae Thunbergii*] and *Chishao* [*Radix Paeoniae Rubra*] was high in the prescriptions. In 9 cases, 6 patients were cured with virus nucleic acid turning negative, and the other 3 patients died. **Conclusion** In patients with severe human infected avian influenza H7N9, dampness and phlegm were the main pathogenesis, with deficiency and blood stasis. The methods of expelling dampness, dissipating phlegm, benefiting Qi, resolving stasis and dredging collaterals were mainly used, which might be effective.

Keywords avian influenza; H7N9; Chinese medicine syndrome; syndrome differentiation and treatment

(收稿日期: 2017-06-14; 修回日期: 2017-08-08)

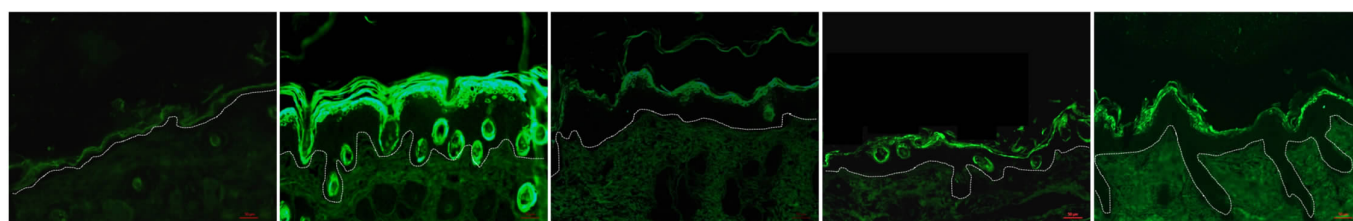
编辑: 邓 媛



空白对照组 模型组 中药高剂量组 中药低剂量组 甲氨蝶呤组

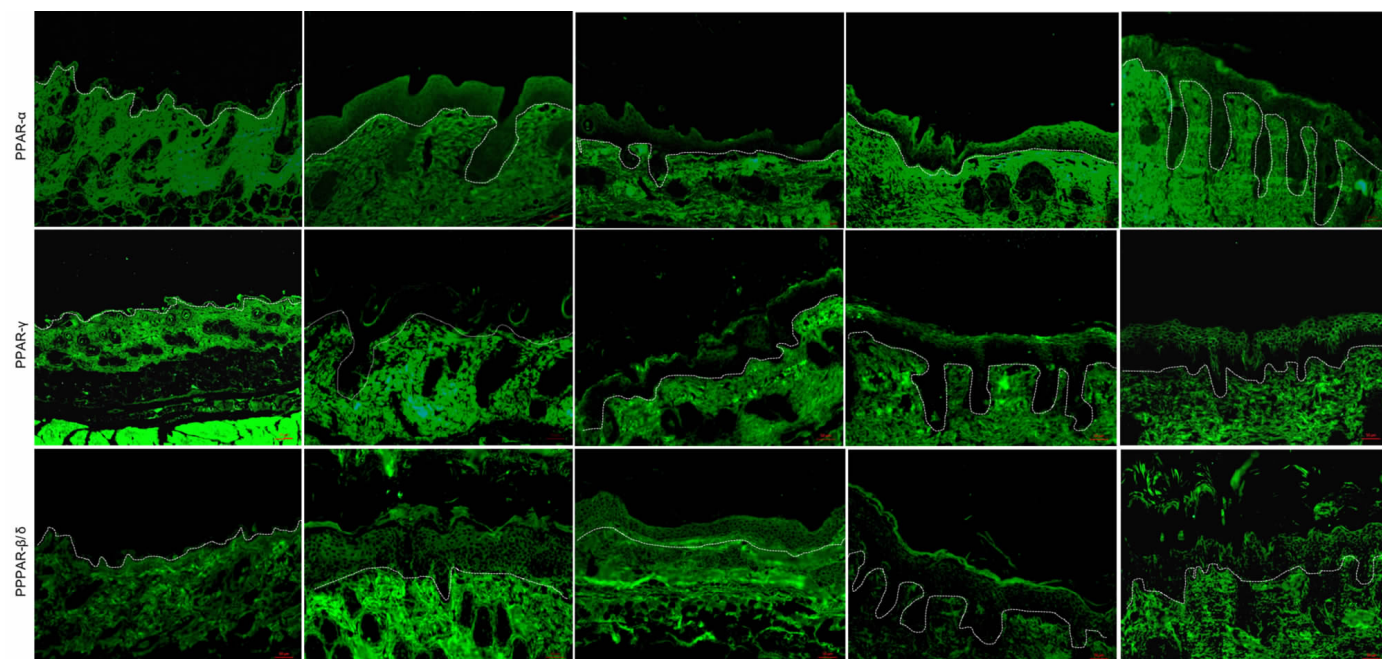
注: PCNA, 有丝分裂细胞核数; DAPI, 总细胞核数

图2 各组小鼠皮损中有丝分裂细胞核、总细胞核表达图(IF, $\times 200$)



空白对照组 模型组 中药高剂量组 中药低剂量组 甲氨蝶呤组

图3 各组小鼠皮损中外皮蛋白表达情况(IF, $\times 200$)



空白对照组 模型组 中药高剂量组 中药低剂量组 甲氨蝶呤组

注: PPAR- α , 过氧化物酶体增殖激活受体 α ; PPAR- γ , 过氧化物酶体增殖激活受体 γ ; PPAR- β/δ , 过氧化物酶体增殖激活受体 β/δ

图4 各组小鼠皮损中PPARs表达图(IF, $\times 200$)

文字见第 2034、2035 页