

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.16.016

养血活血解毒方及其拆方药物血清对佛波酯诱导的血管内皮细胞 ERK/NF- κ B 通路的影响

刘欣, 李萍, 张蕾, 解欣然, 底婷婷, 吕宏蓬, 肖士菊, 张广中*

(首都医科大学附属北京中医医院/北京市中医研究所, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010)

摘要 目的 探讨养血活血解毒方治疗银屑病的可能作用机制。方法 将养血活血解毒方拆分为养血活血类药物和解毒类药物。80 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、全方组、养血活血方组、解毒方组, 每组 20 只。全方组、养血活血方组、解毒方组分别给予相应药物 10.18、6.17、4.01 g/(kg·d) 剂量灌胃, 空白组予 4 ml 的蒸馏水灌胃, 连续 4 天, 制备含药血清。人真皮微血管内皮细胞 (HDMEC) 分为空白组、模型组、全方组、养血活血组、解毒组。除空白组外, 其余各组采用佛波酯诱导细胞活化。同时加入相应药物的 10% 含药血清作用 24 h。检测各组内皮细胞增殖情况、迁移情况、管腔形成情况, 以及血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR)、细胞外调节蛋白激酶 1 (ERK1)、细胞外调节蛋白激酶 2 (ERK2) mRNA 表达, 检测 VEGF/VEGFR 通路及细胞外调节蛋白激酶/核因子 κ B (ERK/NF- κ B) 通路蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组细胞增殖, 迁移细胞数量, 管腔形成数量, VEGF、VEGFR、ERK2 mRNA 及 VEGF/VEGFR 通路、ERK/NF- κ B 通路相关蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 全方组和解毒组细胞增殖, 迁移细胞数量, VEGF、VEGFR mRNA 表达和 p-ERK1、p-ERK2、p-NF- κ B p65 蛋白表达水平均降低, 全方组 VEGF、p-VEGFR 蛋白表达降低, 且全方组细胞增殖、ERK2 mRNA 表达低于解毒组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 养血活血解毒方可通过干预 ERK/NF- κ B 通路, 调控促血管新生因子 VEGF 及其受体的表达, 从而对银屑病血管新生的病理环节发挥治疗作用, 且全方药效最佳, 其养血活血组分未对内皮细胞增生环节有影响。

关键词 银屑病; 养血活血解毒方; 血管新生; 血管内皮细胞生长因子; 细胞外调节蛋白激酶; 核因子 κ B

银屑病是一种在遗传易感性和环境因素共同作用下, 主要由 T 细胞介导的自身免疫性皮肤病^[1]。真皮乳头微血管新生是银屑病的重要病理环节, 与银屑病的发生、持续存在及复发密切相关^[2]。养血活血解毒方是首都医科大学附属北京中医医院治疗银屑病血燥证的临床优化方, 治疗血燥证安全且疗效稳定^[3]。研究发现, 抑制血管内皮细胞生长因子 (VEGF)/血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR) 介导的血管新生可能是银屑病治疗的新靶点^[4]。本课题组前期研究显示, 银屑病血燥证患者经养血活血解毒方治疗后血清中的 VEGF 水平明显降低^[5], 提示该方可调控血管新生过程。本

研究以银屑病血管新生这一病理环节为切入点, 按养血解毒治则对组方进行拆分, 比较养血活血解毒方及其拆方对内皮细胞增殖、迁移、管腔形成及血管新生相关的细胞外调节蛋白激酶/核因子 κ B (ERK/NF- κ B) 信号通路的影响, 探讨养血活血解毒方治疗银屑病的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

Wistar 雄性大鼠 80 只, 4~6 周龄, 体重 (200±10) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物合格证号 SCXK (京) 2012-0001。SPF 级屏障饲养环境, 恒温 22℃, 恒湿 40%~60%, 自由饮水饮食, 通风换气 20 次/h, 适应性饲养 3 天进行实验。

人真皮微血管内皮细胞 (HDMEC), 购自美国 ScienCell 公司 (货号: 2000)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81573974, 81273766, 81673974); 北京市自然科学基金 (7172097); 银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室

* 通讯作者: zhgz62000@126.com, (010) 52176097

1.2 药物

养血活血解毒方, 组成: 丹参 (批号: 11052301, 产地: 河北)、当归 (批号: 10082601, 产地: 甘肃)、玄参 (批号: 11052401, 产地: 浙江)、鸡血藤 (批号: 11012902, 产地: 云南)、土茯苓 (批号: 103811101, 产地: 广东)、拳参 (批号: 1505070, 产地: 河北), 剂量比例为 1 : 1 : 1 : 1 : 2 : 0.6。以上饮片均购自北京杏林药业有限责任公司。将药材置于中药煎煮机中加入 10 倍量纯净水煎煮 1.5 h (沸腾后计时), 过 120 目筛, 滤液静置; 药渣加入 8 倍量水同法煎煮 1 h, 过筛得滤液。合并两次滤液冷藏过夜, 次日取上清液分别浓缩至 150 ml, 浓度为 509 mg/ml。

将养血活血解毒方拆分为: 养血活血类药物 (丹参、当归、玄参、鸡血藤), 占全方药量的 60%, 制备成浓度为 308.5 mg/ml 溶液; 解毒类药物 (土茯苓、拳参), 占全方药量的 40%, 制备成浓度为 200.5 mg/ml 溶液。药物比例及制备方法同上。

1.3 主要试剂和仪器

内皮细胞培养基 (ECM, 货号: 1001)、胎牛血清 (货号: 0025)、内皮细胞生长补充因子 (ECGS, 货号: 1052)、人纤维黏连蛋白 (HFN, 货号: 2493939), 均为美国 Scien Cell 公司产品; 佛波酯 (PMA, 货号: P1585), 美国 Sigma 公司; CCK-8 检测试剂盒 (货号: JG659), 日本同仁化学研究所; 吉姆萨染液 (批号: 412112), 中国珠海贝索生物技术有限公司; BD Matrigel™ 基质基底膜 (货号: 356234), 美国 BD 公司; VEGF 多克隆抗体 (货号: ab46154), 美国 Abcam 公司; VEGFR (货号: 2479)、磷酸化血管内皮生长因子受体 (p-VEGFR, 货号: 2474)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2, 货号: 4695)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (p-ERK1/2, 货号: 4370)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65, 货号: 8242)、磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65, 货号: 3033) 单克隆抗体均为美国 Cell Signaling Technology 公司产品; RNeasy Mini Kit RNA 提取试剂盒 (货号: 74106), 美国 Qiagen 公司; HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒 (货号: CW0744), 北京康为世纪公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: 23227), 美国 Thermo Fisher 公司; ECL (货号: WBKLS0500), Millipore 公司。

超净工作台 (APPARATUB 型, 北京东联哈尔仪器制造有限公司), CO₂ 培养箱 (MCO-20AIC 型, 日本 SANYO 公司), 倒置显微镜 (Primo Vert

型, 德国 Zeiss 公司), 电泳仪 (PowerPac Basic 型, 美国 Bio-Rad 公司), 细胞破碎仪 (HD3100 型, 德国 Bandlin 公司), 酶标仪 (Multiskan Spectrum 型, 美国 Thermo 公司), 荧光定量 PCR 仪 (ABI7500 型, 美国应用生物系统公司), 离心机 (3-48K 型, 美国 Sigma 公司)。

1.4 HDMEC 细胞培养

HDMEC 细胞株培养于含 5% 胎牛血清、1% ECGS 的 ECM 培养基中, 在含 5% CO₂、饱和湿度的 37℃ 孵箱中培养至对数生长期, 使用 2~5 代细胞进行实验。

1.5 药物血清制备

Wistar 大鼠 80 只按随机数字表法分为空白组、全方组、养血活血方组、解毒方组, 每组 20 只。将养血活血解毒方的成人常规服用剂量按“标准体重动物由人到大鼠剂量折算表”^[8]折算成大鼠用量 10.18 g/(kg·d), 拆方组按占全方的比例折算, 养血活血组为 6.17 g/(kg·d), 解毒组为 4.01 g/(kg·d)。各给药组每天灌胃 2 次, 每次 2 ml, 空白组每天给予蒸馏水, 每次 2 ml, 每日 2 次, 给药 4 天。第 5 天早上给药后 1~2 h (灌药前禁食不禁水 12 h) 腹主动脉取血, 静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min, 无菌分离血清。将各组大鼠血清混合, 56℃、30 min 灭活, -20℃ 冰箱保存备用。

1.6 分组及干预方法

HDMEC 细胞分为空白组、模型组、全方组、养血活血组、解毒组。除空白组外, 其余各组采用 PMA 诱导 HDMEC 细胞活化, 模拟银屑病病理状态下异常活化的血管内皮细胞。空白组: HDMCE + 10% 空白组血清; 模型组: HDMCE + 2×10^{-7} mol/L PMA + 10% 空白组血清; 全方组: HDMCE + 2×10^{-7} mol/L PMA + 10% 全方组血清; 养血活血组: HDMCE + 2×10^{-7} mol/L PMA + 10% 养血活血组血清; 解毒组: HDMCE + 2×10^{-7} mol/L PMA + 10% 解毒组血清。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 内皮细胞增殖 采用 CCK-8 比色法。HDMEC 按 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔培养板中常规培养 24 h, 0.5% 血清饥饿 16 h, 再加入 PMA 和药物血清常规培养 24 h, 检测前 4 h 每孔加入 10 μ l CCK-8, 在酶标仪 450 nm 处检测吸光度值 (A) 以反映细胞的增殖能力。实验重复 3 次, 每次设 6 个复孔。

1.7.2 内皮细胞迁移 采用 Transwell 迁移实验法。将 0.1% 明胶 50 μ l/孔包被 Transwell 上室,

37℃ 固化 1 h。在下室各孔中加入 PMA 及药物或空白血清和不完全 1640 培养基至总体积 600 μ l。各组将 5×10^4 个/孔 HDMEC 加入 Transwell 的上室, 常规培养 24 h。用细棉签擦净上室明胶, 上室底膜用甲醇: 丙酮 = 1 : 1 固定液固定 10 min。吉姆萨染液染色 10 min。PBS 轻洗 3 次, 小心取底膜置于载玻片上, 在显微镜下, 按随机数字表法选择 7 个 200 倍视野计数, 按每个视野中细胞数取平均值计算迁移细胞数。实验重复 3 次, 每次设 4 个复孔。

1.7.3 内皮细胞管腔形成 采用 Matrigel 法。取对数生长期细胞以 1.5×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板内, 常规培养 24 h, 0.5% 血清饥饿 16 h, 再加入 PMA 及药物或空白血清作用 24 h 后。将细胞消化并接种于包被人工细胞外基质胶(1 g/L, 75 μ l/孔) 1 h 的 96 孔板中, 37℃ 培养 6 h。倒置相差显微镜下按随机数字表法选择 7 个 200 倍视野计数, 以其均值计算 HDMEC 的管腔形成能力。实验重复 3 次, 每次设 4 个复孔。

1.7.4 内皮细胞 VEGF、VEGFR2、ERK1、ERK2 mRNA 表达 采用 q-PCR 法。取对数生长期细胞以 2.5×10^5 个/瓶接种于 25 cm^2 培养瓶中, 常规培养 24 h, 0.5% 血清饥饿 16 h, 加入 PMA 和药物血清作用 24 h, 提取细胞总 mRNA 并进行逆转录, 实验操作按产品说明书进行。采用 SYBR Green 标记, 荧光定量 PCR 仪检测 40 个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行目的基因的相对定量分析。引物均由 Invitrogen 公司合成。引物序列: VEGF: 上游 CCACTGAG-GAGTCCAACATCACCAT, 下游 CGGGATTTCCTT-GCGCTTTCGT; VEGFR: 上游 ACGGACAGTGG-TATGGTTCTTGCC, 下游 GGTAGCCGCTTGTCTG-GTTTGAG; ERK1, 上游 AACCTGCTCATCAACAC-CAC, 下游 CGTAGCCACATACTCCGTCA; ERK2, 上游 TGCTGCTCAACACCACCT, 下游 AATGCAGC-CTACAGACCAA; β -actin, 上游 ACTTAGTTGCGT-TACACCCTT, 下游 GTCACCTTACCGTTCCA。实验重复 3 次, 每次设 3 个样本。

1.7.5 内皮细胞 VEGF/VEGFR 及 ERK/NF- κ B 通路蛋白 采用 Western blot 法。取对数生长期细胞以 5×10^5 个/瓶接种于 75 cm^2 培养瓶中, 常规培养 24 h, 0.5% 血清饥饿 16 h, 加入 PMA 和药物血清作用 24 h, 细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白, BCA 法蛋白定量。将聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质电泳转移到 PVDF 膜上, 分别与 VEGF (1 : 2000)、VEGFR (1 : 10000)、p-VEGFR (1 : 500)、

ERK1/2 (1 : 50000)、p-ERK1/2 (1 : 1000)、NF- κ B p65 (1 : 10000)、p-NF- κ B p65 (1 : 10000) 一抗 4℃ 孵育过夜, 在与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 显影, 胶片曝光, 条带扫描。Total Lab Quant v11.5 软件进行条带灰度值的分析。目标蛋白的表达量以目标蛋白与 β -actin 内参照蛋白灰度值的相对比值表示。实验重复 3 次, 每次设 3 个样本。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 HDMEC 细胞增殖比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组吸光度值升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 全方组和解毒组吸光度值均降低 ($P < 0.01$), 且全方组低于解毒组 ($P < 0.05$)。与全方组比较, 养血活血组吸光度值升高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组 HDMEC 细胞增殖比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	吸光度值
空白组	6	1.66 $\pm$ 0.10
模型组	6	2.54 $\pm$ 0.16*
养血活血组	6	2.38 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$
解毒组	6	2.26 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta$
全方组	6	2.03 $\pm$ 0.22 Δ

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组 HDMEC 细胞迁移、管腔形成数量比较

表 2 示, 与空白组比较, 其余各组细胞迁移数量、管腔形成数量升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 全方组、养血活血组、解毒组细胞迁移数量及全方组管腔形成数量均降低, 且全方组和解毒组细胞迁移数量低于养血活血组 ($P < 0.01$), 全方组与解毒组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组 HDMEC 细胞迁移及管腔形成数量比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	迁移细胞数量	管腔形成数量
空白组	4	22.00 $\pm$ 8.06	16.17 $\pm$ 2.54
模型组	4	298.50 $\pm$ 29.95*	65.17 $\pm$ 10.45*
养血活血组	4	232.60 $\pm$ 30.78* $\Delta\Delta$	59.67 $\pm$ 3.99* Δ
解毒组	4	143.67 $\pm$ 28.12* Δ	57.40 $\pm$ 5.20* Δ
全方组	4	126.25 $\pm$ 18.97* Δ	27.33 $\pm$ 4.68* Δ

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与养血活血组比较, $\# P < 0.01$

表 3 各组 HDMEC 细胞 VEGF、VEGFR、ERK1、ERK2 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VEGF	VEGFR	ERK1	ERK2
空白组	3	1.02 ± 0.24	1.02 ± 0.24	1.10 ± 0.62	1.00 ± 0.06
模型组	3	2.23 ± 0.29*	2.96 ± 0.74*	1.48 ± 0.04	2.13 ± 0.42*
养血活血组	3	1.48 ± 0.58 [▲]	2.53 ± 0.59* [▲]	1.49 ± 0.18	1.83 ± 0.12 ^{▲▲}
解毒组	3	1.07 ± 0.23 [△]	1.97 ± 0.64 [△]	1.39 ± 0.24	1.61 ± 0.26 [▲]
全方组	3	0.72 ± 0.12 [△]	1.29 ± 0.07 [△]	1.09 ± 0.14	0.79 ± 0.12 [△]

注: VEGF, 血管内皮生长因子; VEGFR, 血管内皮生长因子受体; ERK1, 细胞外调节蛋白激酶 1; ERK2, 细胞外调节蛋白激酶 2; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组 HDMEC 细胞 VEGF、VEGFR、ERK1、ERK2 mRNA 表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组 VEGF、VEGFR、ERK2 mRNA 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 解毒组 VEGF、VEGFR, 全方组 VEGF、VEGFR、ERK2 mRNA 水平降低 ($P < 0.01$); 且全方组 VEGF、VEGFR、ERK2 mRNA 水平明显低于养血活血组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 仅 ERK2 mRNA 水平低于解毒组 ($P < 0.05$); ERK1 mRNA 水平各组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组 HDMEC 细胞 VEGF/VEGFR 通路蛋白表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组和养血活血组、解毒组 VEGF、p-VEGFR 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 全方组 VEGF、p-VEGFR 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 且低于养血活血方组

及解毒组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。VEGFR 蛋白表达各组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组 HDMEC 细胞 ERK/NF- κ B 通路蛋白表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组 ERK1、p-ERK1、ERK2、p-EKR2、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 全方组各指标及解毒组 p-ERK1、p-EKR2、p-NF- κ B p65 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 全方组各指标与解毒组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。养血活血组 p-EKR2、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 蛋白表达均高于全方组, p-NF- κ B p65 蛋白表达高于解毒组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

目前多将银屑病分为血热证、血燥证、血瘀证三个基本证型^[4]。流行病学调查显示, 血燥证占总病例的 27.4%, 是银屑病的常见难治证候^[5]。血燥证由血热证迁延而致, 热灼营血, 病久则营血被耗, 以致津亏血少, 血脉失于濡养, 气血失和, 化燥生风, 余毒羁留, 阻滞经脉、肌肤, 发为鳞屑, 并且病情顽固久不消退, 血燥与毒邪贯穿疾病始终, 为血燥证主要病机。因此治疗应以养血润燥解毒为法, 在养血的基础上加入活血、润燥、解毒中药以鼓动气血, 濡润血脉, 营养肌肤, 养血以润燥熄风, 解毒以澄源复本。养血活血解毒方正是在深入总结前人经验及长期临床验证、反复筛选的基

表 4 各组 HDMEC 细胞 VEGF、VEGFR、p-VEGFR 蛋白表达比较 ($1/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VEGF	VEGFR	p-VEGFR
空白组	3	1.00 ± 0.19	1.20 ± 0.11	1.00 ± 0.34
模型组	3	3.13 ± 0.24*	1.54 ± 0.60	3.75 ± 0.33*
养血活血组	3	2.76 ± 0.33* [▲]	1.56 ± 0.55	3.49 ± 0.22* ^{▲▲}
解毒组	3	2.55 ± 0.38* [▲]	1.28 ± 0.18	3.00 ± 0.47* ^{▲▲}
全方组	3	1.16 ± 0.12 [△]	0.90 ± 0.30	1.16 ± 0.39 [△]

注: VEGF, 血管内皮生长因子; VEGFR, 血管内皮生长因子受体; p-VEGFR, 磷酸化血管内皮生长因子受体; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 5 各组 HDMEC 细胞 ERK/NF- κ B 通路蛋白表达比较 ($1/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	ERK1	p-ERK1	ERK2	p-EKR2	NF- κ B p65	p-NF- κ B p65
空白组	3	2.15 ± 0.59	1.21 ± 0.38	4.22 ± 0.97	2.86 ± 0.40	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.20
模型组	3	5.05 ± 0.33*	6.66 ± 1.78*	7.89 ± 0.56*	10.34 ± 1.40*	1.43 ± 0.13*	1.84 ± 0.33*
养血活血组	3	3.76 ± 1.06	4.86 ± 1.26	6.16 ± 1.90	8.31 ± 1.60 [▲]	1.41 ± 0.09 [▲]	1.57 ± 0.35* ^{▲▲}
解毒组	3	3.77 ± 0.63	1.51 ± 0.47 [△]	5.05 ± 1.77	3.73 ± 0.90 ^{△△}	1.39 ± 0.02	1.20 ± 0.05 ^{△△#}
全方组	3	2.62 ± 0.96 [△]	1.43 ± 0.31 [△]	4.71 ± 1.18 ^{△△}	3.11 ± 0.54 ^{△△}	0.98 ± 0.12 [△]	1.01 ± 0.09 ^{△△}

注: ERK1, 细胞外调节蛋白激酶 1; p-ERK1, 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1; ERK2, 细胞外调节蛋白激酶 2; p-EKR2, 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 2; NF- κ B p65, 核因子 κ B p65; p-NF- κ B p65, 磷酸化核因子 κ B p65; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与养血活血组比较, $\#P < 0.05$

础上形成的治疗银屑病的中药复方。方中丹参、当归、玄参、鸡血藤以养血为先辅以活血，再配用土茯苓、拳参凉血解毒，共奏养血活血解毒之功，使枯滞之津血得养，郁于经脉皮肤之毒邪得解。

微血管新生是银屑病的重要病理环节，贯穿病程始终^[1]。VEGF 是目前所知最重要的生理和病理状态下血管新生的调节因素^[2]。临床研究发现，银屑病患者皮损区 VEGF 水平较非皮损区及正常皮肤明显增高^[3]，且与病情严重程度相关，血清中 VEGF 也明显增加^[4]。VEGF 的生物学活性通过其酪氨酸受体 VEGFR 来介导，VEGF 与 VEGFR 结合后可经由 PLC γ 1 通过激活激动激酶 C 和 Raf-MAPK 通路，最终激活 ERK1/2，并通过激活 NF- κ B 转位入核促进内皮细胞的增殖^[5]。

本研究将养血活血解毒方按中医治则拆分成养血活血和解毒两部分，采用血清药理学方法将含药血清作用于 PMA 诱导的 HDMEC。结果显示，全方组和解毒组均可抑制细胞的异常增殖和迁移功能，且全方组的抑制作用强于养血活血组。在促进管腔形成能力上仅全方组显现抑制作用，拆方组均无明显作用。全方组具有下调促血管生成因子 VEGF 及其受体 VEGFR 基因及蛋白表达的作用，拆方仅解毒组下调 VEGF 和 VEGFR mRNA。全方组可降低关键节点蛋白 ERK1、ERK2 mRNA 和蛋白（除 ERK1 外）的表达水平，并可下调 NF- κ B 的蛋白表达水平，解毒组仅可下调 p-ERK1、p-ERK2 及 p-NF- κ B p65 蛋白表达，而养血活血组并未表现出对经 ERK/NF- κ B 通路及 VEGF/VEGFR 通路具有调控作用。

综上所述，养血活血解毒方中的解毒组分（土茯苓、拳参）可通过抑制 EKR/NF- κ B 通路从而抑制促血管生成因子 VEGF 及其受体 VEGFR 的生成，进而抑制过度增殖及活化的内皮细胞功能，从而发挥治疗作用。而养血活血组分（丹参、当归、玄参、鸡血藤）对病理状态下的内皮细胞功能基本没有调控作用，对 EKR/NF- κ B 通路蛋白及 VEGF/VEGFR 因子表达亦无影响，提示该组分的作用靶点可能不是针对内皮细胞的增生。但养血活血解毒全方对上述各指标均具有显著调节作用，其药效显著优于各个拆方组分，表现出明显的增益效

应，同时提示养血活血组分虽未直接发挥抑制内皮细胞增生环节，但其可能在其他环节或靶点发挥了辅助作用，从而提高了全方的疗效。

参考文献

- [1] LOWES MA, BOWCOCK AM, KRUEGER JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis [J]. Nature, 2007, 445 (7130): 866-873.
- [2] HEIDENREICH R, RÖCKEN M, GHORESCHI K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis [J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(3): 232-248.
- [3] 陈维文, 周冬梅, 王萍, 等. 寻常银屑病中医诊疗方案的多中心临床研究 [J]. 中医杂志, 2012, 53(18): 1557-1561.
- [4] AKMAN A, YILMAZ E, MUTLU H, et al. Complete remission of psoriasis following bevacizumab therapy for colon cancer [J]. Clin Exp Dermatol, 2008, 34(5): 202-204.
- [5] 赵京霞, 李萍, 刘欣, 等. 理血解毒类方对寻常型银屑病患者外周血管内皮生长因子水平的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(4): 423-425.
- [6] 陈琦. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1169.
- [7] 陈维文, 周冬梅, 王萍, 等. “辨血为主, 从血论治”规范化方药辩证治疗寻常型银屑病研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3614-3618.
- [8] ZHANG GZ, WANG JS, WANG P, et al. Distribution and development of the TCM syndromes in psoriasis vulgaris [J]. J Tradit Chin Med, 2009, 29(3): 195-200.
- [9] NALECIC N, YOUNG HS. Novel investigational vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor antagonists for psoriasis [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2016, 25(4): 455-462.
- [10] XIA YP, LI B, HYLTON D, et al. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis [J]. Blood, 2003, 102(1): 161-168.
- [11] HENNO A, BLACHER S, LAMBERT C, et al. Altered expression of angiogenesis and lymphoangiogenesis markers in the uninvolved skin of plaque-type psoriasis [J]. Br J Dermatol, 2009, 160(3): 581-590.
- [12] 向本旭, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 82-85.

Effects of *Yangxue Huoxue Jiedu Fang* (养血活血解毒方) and Its Separated Formula Containing Serum on ERK/NF- κ B Pathway of Phorbol Ester Induced in Vascular Endothelial Cells

LIU Xin, LI Ping, ZHANG Lei, XIE Xinran, DI Tingting, LYU Hongpeng, XIAO Shiju, ZHANG Guangzhong

(Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010)

ABSTRACT Objective To investigate the possible action mechanism of *Yangxue Huoxue Jiedu Fang* (养血活血解毒方, YXHXJDF) in the treatment of psoriasis. **Methods** YXHXJDF was divided into herbs of nourishing blood and activating blood (YXH XF), and herbs of detoxification (JDF). Eighty Wistar rats were randomly divided into the blank group, YXHXJDF group, YXH XF group, and JDF group, with 20 rats in each group. The YXHXJDF group, YXH XF group, and JDF group were given the corresponding drugs 10.18, 6.17, 4.01 g/(kg · d) for intra-gastric administration, and the blank group was given 4ml distilled water for 4 days. The drug-containing serum was prepared. Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were divided into blank group, model group, YXHXJDF group, YXH XF group, and JDF group. Except the blank group, the other groups used phorbol ester to induce cell activation. At the same time, 10% drug-containing serum of the corresponding drug was added for 24 hours. The endothelial cell proliferation, migration, lumen formation, and the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), extracellular regulated protein kinase 1 (ERK1), extracellular regulation protein kinase 2 (ERK2) mRNA expression were detected. The expression of VEGF / VEGFR pathway and extracellular regulated protein kinases/ nuclear factor- κ B (ERK / NF- κ B) pathway protein were detected. **Results** Compared with the blank group, the cell proliferation, migration cell number, lumen formation number, VEGF, VEGFR, ERK2 mRNA and VEGF/p-VEGFR pathway, ERK/NF- κ B pathway related protein expressions in the model group were increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, cell proliferation, migration cell number, VEGF, VEGFR mRNA expression and p-ERK1, p-ERK2, p-NF- κ B p65 protein expressions in the YXHXJDF group and JDF group were decreased, and the expression of VEGF and p-VEGFR protein in the YXHXJDF group was decreased. The cell proliferation and ERK2 mRNA expression in the YXHXJDF group were lower than those in the JDF group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** YXHXJDF can regulate the expression of angiogenic factor VEGF and its receptor by interfering with ERK/NF- κ B pathway, so as to play a therapeutic role in the pathological process of angiogenesis of psoriasis, and the YXHXJDF has the best effects. Its YXH XF components have no effect on the proliferation of endothelial cells.

Keywords psoriasis; *Yangxue Huoxue Jiedu Fang*; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; extracellular regulated protein kinase; nuclear factor- κ B

(收稿日期: 2018-04-11; 修回日期: 2018-06-21)

编辑: 王利芬

欢迎邮购 《中医杂志》 过刊

1985、1987、1988、1989、1990、1992、1993、1994、1995、1996、1998、1999、2000、2001 年合订本, 每本 100 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期) 每册 15 元, 2018 年每册 20 元(缺 5、7 期)。2011—2013 年合订本(每年 4 本), 每年 280 元, 2014、2015、2016、2017 年合订本(每年 4 本), 每年 400 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社, 或关注《中医杂志》官方微信 (zyzzgzh) 购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。