

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.17.014

银屑 1 号对 Trappin-2 刺激下肿瘤坏死因子 α 干预造模的 HaCaT 细胞分泌 NE、Trappin-2 的影响刘靖^{1,2}, 涂绍忠³, 何亚男¹, 陈智斌¹, 陈梦雅¹, 查旭山^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广东省广州市机场路 12 号, 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院; 3. 深圳市龙岗区中医院/北京中医药大学深圳医院)

摘要 目的 探讨银屑 1 号治疗银屑病的可能作用机制。方法 24 只大鼠随机分为银屑 1 号组、雷公藤组、空白组, 每组 8 只。银屑 1 号组大鼠给予银屑 1 号煎煮浓缩液 196 g/(kg·d) 灌胃, 雷公藤组给予雷公藤多甙片混悬液 6 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组给予生理盐水灌胃, 均每日 2 次, 每次 5 ml, 连续 5 天, 制备含药血清。体外培养 HaCaT 细胞, 以肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 刺激 HaCaT 细胞建立银屑病细胞模型。实验设置空白组、雷公藤组、抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组。空白组、雷公藤组、银屑 1 号组分别加入基础培养基 3.8 ml 与相应含药血清, 抑制剂组、抑制剂 + 银屑 1 号组分别加入空白含药血清和银屑 1 号含药血清, 同时均加入 Trappin-2 (0.3 μ g/ml) 培养基 3.8 ml。体外培养 48 h, 检测 HaCaT 细胞中中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、Trappin-2 含量及 NE、Trappin-2 mRNA 表达。结果 与空白组比较, 雷公藤组、抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量及 mRNA 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与雷公藤组比较, 抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量及 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$)。与抑制剂组比较, 银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 银屑 1 号组 NE mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 抑制剂 + 银屑 1 号组 Trappin-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。与银屑 1 号组比较, 抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量及 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 银屑 1 号可降低 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 含量及基因表达水平, 从而减轻炎症反应, 可能是其治疗银屑病的作用机制之一。

关键词 银屑病; 银屑 1 号; 中性粒细胞弹性蛋白酶; Trappin-2

银屑病是一种常见的易于复发的慢性炎症性皮肤病。成年人不同群体的患病率从 0.91% 到 8.5% 不等^[1]。银屑病确切的发病机制尚不清楚, 目前比较一致的观点认为银屑病是在遗传、免疫、代谢等多因素相互作用下, 以 T 细胞为中心, 中性粒细胞、角质形成细胞等相互作用诱导的自身免疫紊乱^[2]。其中中性粒细胞作为任何类型的免疫攻击的第一道防线起着重要作用^[3]。中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE) 是活化的中性粒细胞释放的主要蛋白酶^[4]。Trappin-2 是一种内源性 NE 抑制剂, 通过降解 NE 有效地抑制其活性^[5]。NE、Trappin-2 蛋白的平衡失调及其导致的细胞因子网络变化可能对

银屑病的发生发展具有重要作用^[6]。银屑病易控制、难根治, 病情缠绵难愈, 目前尚无特效疗法。我们提出了“从毒论治”, 采用凉血解毒、活血化瘀法组成银屑 1 号方, 临床研究证实, 其对银屑病治疗效果良好^[7]。HaCaT 细胞为人永生化的角质形成细胞株, 主要来源于人的表皮细胞, 与角质形成细胞的基本特性极其相似, 易于培养^[8], 目前已被作为银屑病体外培养的模式细胞广泛用于研究中^[9]。本研究基于前期研究^[8], 采用 HaCaT 细胞作为靶细胞, 以肿瘤坏死因子 (TNF- α) 刺激 HaCaT 细胞的方法建立银屑病细胞模型, 研究银屑 1 号对 Trappin-2 刺激后 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 表达水平的调控, 进一步探讨银屑 1 号方治疗银屑病的可能作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金 (81202699, 81573980)

* 通讯作者: yxm2009@126.com, 13926439380

1 资料和方法

1.1 动物和细胞

SPF 级健康 SD 雌性大鼠 24 只, 8 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 购自广州中医药大学大学城实验中心, 实验动物许可证号: SYXY 粤 2013-0092。人永生角质形成细胞 HaCaT 细胞株, 由广州中医药大学中医临床基础重点学科实验室提供。

1.2 药品

银屑 1 号处方组成: 土茯苓 30 g, 板蓝根 15 g, 大青叶 15 g, 白花蛇舌草 30 g, 半边莲 15 g, 蜂房 10 g, 川芎 10 g, 泽泻 10 g, 车前草 10 g, 地肤子 15 g, 白鲜皮 15 g, 生地黄 15 g, 牡丹皮 10 g, 甘草 6 g。将 3 剂中药 (627 g) 加 6000 ml 蒸馏水, 浸泡 30 min 后大火煎开改中小火, 煎 1 h; 第 2 次加 4800 ml 蒸馏水, 煎煮 30 min。合并两次水煎液, 药液过滤, 蒸馏, 浓缩至含生药浓度为 3.76 g/ml 的药液备用。雷公藤多苷片 (每片 10 mg, 韩阳德远药业有限公司, 批号: Z20120993), 用生理盐水配制成浓度为 0.108 g/ml 的药液备用。

1.3 主要试剂和仪器

含 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基 (美国 Hyclone 公司, 货号: SH30021.01B); TNF- α (北京四正柏生物科技有限公司, 货号: CHE0019-096); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京普利来基因技术有限公司, 货号: P1511); Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 货号: DP422-02); 人 NE ELISA 试剂盒 (美国 eBioscience 公司, 货号: BMS269); 人 Trappin-2 ELISA 试剂盒 (美国 RayBiotech 公司, 货号: ELH-Trappin-2-001)。

酶联免疫检测仪 (美国 Thermo 公司, 型号 MK3); 台式低温高速离心机 (德国 HERMLE 公司, 型号 Z323K); CO₂ 培养箱 (德国 Memmer 公司, 型号 INC108); 电泳仪 (型号: JS-360)、全自动凝胶成像分析仪 (型号: JS-360), 均为上海培清科技有限公司产品; 基因扩增仪 (珠海黑马医学仪器有限公司, 型号: Hema9600); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus 日本 TAKARA 公司, 型号 RR420A)。

1.4 含药血清的制备

24 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为银屑 1 号组、雷公藤组、空白组, 每组 8 只。银屑 1 号组大鼠给予银屑 1 号 196 g/(kg · d) 灌胃, 雷公藤组给予雷公藤多苷片混悬液 6 mg/

(kg · d) 灌胃, 空白组给予生理盐水灌胃, 均每日 2 次, 每次 5 ml, 连续 5 天。灌胃剂量参照人和动物间体表面积换算的等效剂量比值表换算^[8]。末次灌胃结束 1 h 后, 经腹主动脉采血, 室温放置 2 h, 4000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μ m 滤器过滤除菌分装, -80℃ 保存。使用时银屑 1 号组等比稀释为 1/3 浓度。

1.5 细胞培养及给药

复苏冷冻的 HaCaT 细胞, 离心后去上清液, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基, 并放至 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱内培养; 当细胞融合率达至 80% ~ 90% 时, 进行传代消化, 调节细胞浓度至 10⁴ ~ 10⁵ 个/ml。将细胞平均分至 5 个离心管中, 分为空白组、雷公藤组、抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组。空白组加入基础培养基 (3.8 ml) + 空白含药血清 (0.2 ml); 雷公藤组加入基础培养基 (3.8 ml) + 雷公藤含药血清 (0.2 ml); 抑制剂组加入 Trappin-2 (0.3 μ g/ml) 培养基 (3.8 ml) + 空白含药血清 (0.2 ml); 银屑 1 号组加入基础培养基 (3.8 ml) + 1/3 中药含药血清 (0.2 ml); 抑制剂 + 银屑 1 号组加入 Trappin-2 (0.3 μ g/ml) 培养基 (3.8 ml) + 1/3 中药含药血清 (0.2 ml)。各组分别吹打均匀, 移入 96 孔板中, 加入含 TNF- α (10 ng/ml) 的无血清 DMEM 培养基 100 μ l, 每组 3 个复孔, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 继续孵育。收集 48 h 细胞培养液, -20℃ 储存, 备用。

1.6 观察指标和方法

1.6.1 ELISA 法检测 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 含量 按 ELISA 试剂盒说明书进行操作。按标准品的浓度稀释、洗板、加样、温育、洗板、加酶、温育、显色、终止、测定等步骤进行, 以标准浓度为横坐标 (X 轴), OD 值为纵坐标 (Y 轴), 绘制标准曲线, 由标准曲线计算出 NE、Trappin-2 值。

1.6.2 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 mRNA 表达

将上述细胞加入 1 ml Trizol 抽打匀浆, 按照标准抽提步骤进行 RNA 抽提。将样品逆转录为 cDNA, 建立 RT-qPCR 反应体系; 反应条件为: 使用 ViiA7 software, 95℃ 3 s, 60℃ 34 s (收集荧光信号); 40 个循环。溶解曲线分析: 温度 60 ~ 95℃, 每分钟读 1 次; 验证基因扩增特异性。引物由北京奥克公司合成。NE: F: 5'-CGTGGCGAATGTA-AACGTCC-3', R: 5'-TTTTCGAAGATGCGCTGCAC-3'; Trappin-2: F: 5'-CTTCTGACACCATGAGGGC-

3', R: 5'-TAACAGGAAGTCCCGTGACAG-3'; β -actin: F: 5'-ATCGTGGTGCATTAAGGAGAAG-3', R: 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGACTG-3'。应用 SYBR® Premix Ex Taq™ 荧光染料技术进行实时定量 PCR 反应, 计算机分析 Ct 值, 用以评定各因子 mRNA 的表达水平, 结果用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时各组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时则采用 Tamhane's T2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 含量比较

表 1 示, 与空白组比较, 雷公藤组、抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量明显降低 ($P < 0.01$)。与雷公藤组比较, 抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量明显升高 ($P < 0.01$)。与 Trappin-2 组比较, 银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与银屑 1 号组比较, 抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	NE (ng/ml)	Trappin-2 (pg/ml)
空白组	3	7.39 $\pm$ 0.23	1455.25 $\pm$ 63.15
雷公藤组	3	1.05 $\pm$ 0.02*	435.46 $\pm$ 32.03*
抑制剂组	3	4.04 $\pm$ 0.15* Δ	1003.20 $\pm$ 21.12* Δ
银屑 1 号组	3	2.22 $\pm$ 0.05* $\Delta\Delta$	628.51 $\pm$ 11.96* $\Delta\Delta$
抑制剂 + 银屑 1 号组	3	1.44 $\pm$ 0.08* $\Delta\Delta\Delta$	557.49 $\pm$ 27.74* $\Delta\Delta\Delta$

注: NE, 中性粒细胞弹性蛋白酶; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与雷公藤组比较, $\Delta P < 0.01$; 与抑制剂组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$; 与银屑 1 号组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#\#P < 0.01$

2.2 各组 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 mRNA 表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 雷公藤组、抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与雷公藤组比较, 抑制剂组、银屑 1 号组、抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$)。与抑制剂组比较, 银屑 1 号组 NE mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 抑制剂 + 银屑 1 号组 Trappin-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。与银屑 1 号组比较, 抑制剂 + 银屑 1 号组 NE、Trappin-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$)。

pin-2 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	NE	Trappin-2
空白组	3	1	1
雷公藤组	3	0.23 $\pm$ 0.02**	0.20 $\pm$ 0.02**
抑制剂组	3	0.52 $\pm$ 0.09** Δ	0.61 $\pm$ 0.10** Δ
银屑 1 号组	3	0.77 $\pm$ 0.14* $\Delta\Delta$	0.72 $\pm$ 0.12** Δ
抑制剂 + 银屑 1 号组	3	0.48 $\pm$ 0.03** $\Delta\Delta\Delta$	0.42 $\pm$ 0.06** $\Delta\Delta\Delta$

注: NE, 中性粒细胞弹性蛋白酶; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与雷公藤组比较, $\Delta P < 0.01$; 与抑制剂组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与银屑 1 号组比较, $\#P < 0.01$

3 讨论

银屑病属中医学“白疔”“松皮癣”“干癣”的范畴。中医学认为, 血热内蕴、化燥生风是其关键病机。我们认为, 引发银屑病的毒邪不是一般的邪气, 而是各种内外邪气蕴积体内, 酝酿所形成的对机体具有强烈损伤作用的致病因素。我们在长期临床实践中, 结合岭南的独特地理位置, 提出“从毒论治”银屑病。针对慢性复杂性疾病, 我们提出从“诸邪蕴积, 迁延不愈, 皆属于毒”总的病机着眼, 认为银屑病病机特点是邪化为毒, 热毒互结; 热毒入血, 血分蕴毒; 邪毒久蕴, 伤阴耗气; 毒能致瘀, 久病入络^[4]。治疗应解毒排毒, 凉血化瘀, 并在此中医理论指导下组成银屑 1 号方。方中土茯苓、板蓝根、大青叶、白花蛇舌草、半边莲清热解毒, 生地黄、牡丹皮凉血解毒, 川芎化瘀排毒, 泽泻、车前草、地肤子利湿解毒, 白鲜皮祛风解毒止痒, 蜂房祛风攻毒, 甘草解毒调和诸药。

银屑病是一种由先天免疫和适应性免疫系统的细胞和分子介导的炎症性皮肤病。中性粒细胞炎症浸润、角质形成细胞的异常增殖分化是银屑病特征性病理表现^[1]。NE 是活化的中性粒细胞分泌的重要的蛋白酶, 属于丝氨酸蛋白酶的糜蛋白酶超家族成员, 能够分解几乎所有细胞外基质蛋白和许多重要的血浆蛋白, 被认为是最具破坏力的酶类之一^[2]。正常情况下, NE 受其内源性抑制剂的控制不会导致机体损伤, 而在一些感染、创伤等疾病发生时激活和募集大量的白细胞, 导致炎症反应^[3]。NE 具有防御、组织损伤、促分泌、炎症放大等作用, 与多种疾病发病相关, 如肺部炎症、肿瘤及自身免疫性疾病、银屑病等^[3-10]。Trappin-2 蛋白是皮肤局部关键的弹性蛋白酶抑制剂, 不表达于正常皮肤中, 仅在炎症性皮肤病、创伤及皮肤肿

瘤中表达^[7]。NE 与 Trappin-2 蛋白间的平衡失调的致病学说已得到广泛认同,且这种失衡会导致银屑病的恶化^[8]。文献研究^[9]表明,Trappin-2 作为分泌蛋白进入血液循环,银屑病皮损越多越重其分泌量越多,外周血水平亦越高。Trappin-2 水平的降低更早于临床症状的改善,是较银屑病皮损面积和严重度指数 (PASI) 评分更为敏感的指标^[10]。Trappin-2 不仅可通过降解 NE 有效抑制其活性,尚可对包括细胞因子的分泌、核因子 κ B (NF- κ B) 途径、细胞招募等对炎症调节至关重要的参数有调控作用,可防止炎症状态下的过度损伤^[11]。其发挥抗炎作用的物质基础是通过抑制 κ B 的降解而抑制 NF- κ B 活性,使得细胞黏附因子 1 (ICAM-1)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 等重要细胞因子的表达水平降低,间接影响到中性粒细胞的聚集及迁移,缩小炎症波及范围,减少炎症损伤的程度^[12]。此外,Trappin-2 作为角质形成细胞分化的标志性蛋白,具有调控角质形成细胞的增殖与分化的作用^[13],恰恰角质形成细胞的异常增殖分化是银屑病主要的特征性病理表现之一。

前期研究^[8]发现,银屑 1 号可以降低 HaCaT 细胞 NE、Trappin-2 表达水平。本研究在前期研究基础上进一步探讨 Trappin-2 与银屑病发病机制的关系以及中药复方的干预机制。本研究结果表明,Trappin-2 干预后的 HaCaT 细胞中 NE、Trappin-2 的含量及 mRNA 表达水平均低于空白组,说明 Trappin-2 可以作为炎症抑制因子,降低 HaCaT 细胞 NE、Trappin-2 的分泌。银屑 1 号组 NE、Trappin-2 表达低于空白组,抑制剂 + 银屑 1 号组表达低于抑制剂组,表明银屑 1 号可以降低 Trappin-2 刺激的 HaCaT 细胞 NE、Trappin-2 炎症因子的表达。后续我们将围绕中药复方调节 NE、Trappin-2 平衡的信号通路和相关靶点的药理药效学机制进一步展开研究,以便更好地探索中药治疗银屑病的药理机制。

参考文献

- [1] GRIFFITHS CEM, VAN DER WALT JM, ASHCROFT DM, et al. The global state of psoriasis disease epidemiology: a workshop report [J]. Br J Dermatol, 2017, 177 (1): e4-e7.
- [2] CHIRICOZZI A, ROMANELLI P, VOLPE E, et al. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (1). pii: E179. doi: 10.3390/ijms19010179.
- [3] CLANCY DM, HENRY CM, SULLIVAN GP, et al. Neu-

- trophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of IL-1 family cytokines [J]. FEBS J, 2017, 284 (11): 1712-1725.
- [4] MUTO J, FUJIMOTO N, ONO K, et al. Deposition of elafin in the involved vascular wall of neutrophil-mediated cutaneous vasculitis [J]. J Eur Acad Dermatol, 2016, 30 (9): 1544-1549.
- [5] 魏琼玲,刘靖,杨丽红,等. 银屑 I 号治疗银屑病的疗效及对外周血中 NE、Trappin-2 表达的影响 [J]. 中医药导报, 2017, 23 (18): 63-65.
- [6] WILSON VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1195: 33-41. doi: 10.1007/7651_2013_42.
- [7] SMOLINSKA E, MOSKOT M, JAKÓBKIEWICZ-BANEC-KA J, et al. Molecular action of isoflavone genistein in the human epithelial cell line HaCaT [J]. PLoS One, 2018, 13 (2): e0192297. doi: 10.1371/journal.pone.0192297.
- [8] 杨丽红. 中药复方银屑 1 号对 HaCaT 细胞的炎症调控及对 NE、trappin-2 的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015: 13-26.
- [9] 李仪奎,金若敏,王钦茂. 中药药理实验方法学 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1063.
- [10] 张三梅. “从毒论治”古今中医文献研究及其在银屑病领域的应用探讨 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013: 31-32.
- [11] LOWES MA, SUÁREZFARIÑAS M, KRUEGER JG. Immunology of psoriasis [J]. Annu Rev of Immunol, 2014, 32 (1): 227-255.
- [12] TAMAKUMA S, OGAWA M, AIKAWA N, et al. Relationship between neutrophil elastase and acute lung injury in humans [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2004, 17 (5): 271-279.
- [13] KARANDASHOVA S, KUMMARAPURUGU AB, ZHENG S, et al. Neutrophil elastase increases airway ceramide levels via upregulation of serine palmitoyltransferase [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 314 (1): L206-L214.
- [14] MOIDEEN K, KUMAR NP, NAIR D, et al. Heightened systemic levels of neutrophil and eosinophil granular proteins in pulmonary tuberculosis and reversal following treatment [J]. Infect Immun, 2018. pii: IAI.00008-18. doi: 10.1128/IAI.00008-18.
- [15] GLENNON-ALTY L, HACKETT AP, CHAPMAN EA, et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease [J]. Free Radic Biol Med, 2018. pii: S0891-5849 (18) 30159-X. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.049.
- [16] YANG X, YAN H, ZHAI Z, et al. Neutrophil elastase promotes proliferation of HaCaT cell line and transwell

- psoriasis organ culture model [1]. Int J Dermatol, 2010, 9(9): 1068–1074.
- [7] LIU H, MOROI Y, YASUMOTO S, et al. Expression of elafin in extramammary Paget's disease [J]. Brit J Dermatol, 2005, 152(3): 578–579.
- [8] ROCHA-PEREIRA P, SANTOS-SILVA A, REBELOI, et al. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis [J]. Br J Dermatol, 2004, 150(5): 917–928.
- [9] 阎衡, 郝飞, 周村建, 等. Trappin-2 在银屑病患者血清及皮损中的检测及临床意义 [J], 临床皮肤科杂志, 2007, 36(10): 614–616.
- [20] VERRIER T, SOLHONNE B, SALLENAVE JM, et al. The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(8): 1377–1380.
- [21] HENRIKSEN PA, HITT M, XING Z, et al. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF- κ B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli [J]. J Immunol, 2004, 172(7): 4535–4544.

Effects of *Yinxie Yihao Prescription* (银屑 1 号) on Neutrophil Elastase and Trappin-2 Secreted by HaCaT Cells Interfered and Modeled by Tumor Necrosis Factor α Stimulated by Trappin-2

LIU Jing^{1,2}, TU Shaozhong³, HE Ya'nan¹, CHEN Zhibin¹, CHEN Mengya¹, ZHA Xushan²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510405; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine; 3. Shenzhen Longgang District Hospital of Traditional Chinese Medicine/Shenzhen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yinxie Yihao Prescription* (YXYHP) (银屑 1 号) on psoriasis. **Methods** A total of 24 rats were randomly divided into XYHP group, Leigongteng group and blank group, with 8 rats in each group. The rats in XYHP group were given concentrate decoction of XYHP 196 g/(kg · d) in gavage. Rats in Leigongteng group were given suspension liquid of Triperygium wilfordii multiglucoside tablet 6 mg/(kg · d) in gavage. Rats in the blank group were given normal saline in gavage, twice a day, 5 ml each time for continuous 5 days. The serum containing medicine from each group was prepared. The psoriatic cell model was established stimulating HaCaT cell cultivated in vitro with tumor necrosis factor α (TNF- α). The experiment set blank group, Leigongteng group, inhibitor group, Chinese medicine group, and inhibitor + Chinese medicine group. The blank group, Leigongteng group, and Chinese medicine group were added basal culture medium 3.8 ml, Trappin-2 culture medium and serum containing Chinese medicine respectively. The inhibitor group, and inhibitor + Chinese medicine group were added Trappin-2 (0.3 μ g/ml) culture medium 3.8 ml and Trappin-2 culture medium serum containing related medicine. After culturing in vitro for 48h, the neutrophil elastase (NE), Trapinin-2 and expression of NE, Trappin-2 mRNA in HaCaT cells were detected. **Results** Compared with the control group, the contents of NE, Trappin-2 and mRNA expression in Leigongteng group, inhibitor group, Chinese medicine group, and inhibitor + Chinese medicine group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with Leigongteng group, the contents of NE, Trappin-2 and mRNA expression in inhibitor group, Chinese medicine group, and inhibitor + Chinese medicine group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the inhibitor group, the expression of NE and Trappin-2 in the Chinese medicine group, inhibitor + Chinese medicine group was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The NE and mRNA expression in the Chinese medicine group was significantly increased ($P < 0.01$). The expression of Trappin-2 mRNA was decreased in inhibitor + Chinese medicine group ($P < 0.05$). Compared with the Chinese medicine group, NE and Trappin-2 contents and mRNA expression in the inhibitor + Chinese medicine group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** XYHP can reduce the contents of NE, Trappin-2 and the gene expression level in HaCaT cells, thus reducing inflammatory response, which may be one of the action mechanisms in treating psoriasis.

Keywords psoriasis; *Yinxie Yihao Prescription*; neutrophil elastase; Trappin-2

(收稿日期: 2017-11-13; 修回日期: 2018-05-15)

编辑: 王利芬