

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.17.018

活血除痹汤对硬皮病模型小鼠皮损组织活性氧的影响

陈曦, 张润田, 潘厚儒, 瞿幸, 夏梦, 段行武*

(北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700)

摘要 目的 研究活血除痹汤治疗硬皮病的可能作用机制。方法 30 只小鼠分为空白组、模型组和中药高、中、低剂量组, 每组 6 只。除空白组外其余各组小鼠皮内注射盐酸博来霉素 400 μg 连续 3 周建立硬皮病小鼠模型。第 4~7 周, 空白组、模型组予等量蒸馏水灌胃, 中药高、中、低剂量组分别给予活血除痹汤 44.8、22.4、11.2 $\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 每日 1 次。观察各组小鼠皮肤、肺组织病理学改变, 比较皮肤厚度、胶原指数及皮损组织活性氧 (ROS) 水平。结果 模型组小鼠真皮明显增厚, 胶原纤维明显增粗, 伴有炎性细胞浸润; 肺组织出现肺泡间隔增厚伴大量单核细胞浸润, 间隙有成纤维细胞增生。与模型组小鼠相比, 中药各剂量组真皮胶原纤维增粗膨大程度及肺泡间隔增厚程度均有所减轻。模型组皮肤厚度、胶原指数、皮损 ROS 含量较空白组明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药高、中、低剂量组皮肤厚度、胶原指数均明显降低, 中药高、中剂量组皮损 ROS 含量亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 活血除痹汤可明显降低硬皮病模型小鼠皮肤厚度、胶原指数, 其机制可能与降低皮损中 ROS 水平有关。

关键词 硬皮病; 活血除痹汤; 组织活性氧; 胶原指数

硬皮病是一种以局限性或弥漫性皮肤及内脏器官的纤维化、硬化、萎缩为特点的结缔组织疾病。成纤维细胞活化促使胶原合成增加, 被认为是硬皮病发病机制的中心环节, 而该环节中常伴有活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的异常升高^[1]。活血除痹汤是由张仲景《伤寒论》当归四逆汤化裁而来, 适用于硬皮病硬化期, 临床疗效确切^[2]。本实验我们通过比较不同剂量活血除痹汤对硬皮病小鼠皮肤胶原含量和组织 ROS 的情况, 来探讨其可能的作用机理。

1 材料

1.1 动物

30 只清洁级 Balb/c 小鼠, 雌性, 6 周龄, 体重 17~20 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 药物与试剂

活血除痹汤: 当归 10 g, 白芍 10 g, 丹参 15 g, 川芎 10 g, 鸡血藤 30 g, 桂枝 10 g, 杜仲 10 g, 黄芪 15 g, 秦艽 15 g, 防风 10 g, 拳参 15 g, 豨莶草 10 g, 制成药物水煎提取液浓度为 4.48 g/ml ; 注射

用盐酸博来霉素 (日本化药株式会社, 批号: 730342)。细胞培养级磷酸盐缓冲液 (PBS, 北京迈晨科技有限公司, 批号: C087130), ROS 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20140604), 抗过敏脱毛剂 (广州市有喜化妆品有限公司, 批号: A/13003)。

1.3 主要仪器

96 孔黑色酶标板 (美国 Corning 公司); 电热恒温孵育箱 (上海福玛实验设备有限公司, 型号 GHX9160 B-2); 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司, 型号 3K15); 荧光酶标仪 (美国 BioTek 公司, 型号 SynergyTM HT); 显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 BX41)。

1.4 动物分组及处理方法

采用随机数表法将 30 只小鼠分为空白组、模型组和中药高、中、低剂量组, 每组 6 只。实验前适应性喂养 3 天, 实验前 1 天以抗过敏脱毛剂去除所有小鼠背部中央区被毛, 面积约 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 。参照文献 [3-4] 及预实验结果, 在小鼠背部脱毛区中央, 空白组皮内注射 10 mmol/L PBS 0.1 ml, 其余各组皮内注射盐酸博来霉素 400 μg , 均每日 1 次, 连续 3 周。第 4~7 周, 空白组、模型组予等量蒸馏水灌胃, 每日 1 次; 中药高、中、低剂量组

基金项目: 北京中医药大学自主选题项目 (2013-JYBZZ-XS-189)

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

分别给予活血除痹汤 44.8、22.4、11.2g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次。

1.5 观察指标及方法

末次给药后 24 h 颈椎离断处死小鼠, 开胸切取模型组肺叶, 并取注射部位皮肤约 100 mg, 一半冰上保存, 一半以 10% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋。

1.5.1 皮肤和肺组织病理学观察 常规制作皮肤和肺组织切片, HE 染色, 镜下观察皮肤和肺组织学改变, 观察胶原纤维增生情况及血管的变化。

1.5.2 皮肤厚度 以 Anymicro DSS 显微数码图像拍摄系统 V5.1 (北京裕天世纪伟业科技发展有限公司) 4 倍物镜下采集图像, 以 Image-proplus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 测定皮肤厚度 (表皮 + 真皮), 每只小鼠的 HE 切片随机取 5 处测皮肤厚度后求得该小鼠皮肤厚度的均值。

1.5.3 胶原指数 Masson 三色染色, 40 倍物镜下采集图像, 每只小鼠的切片随机取 10 个视野, 每个视野 600 万像素。染色结果判定: 胶原纤维呈亮绿色, 肌纤维呈红色, 细胞核呈黑色。以 Image-pro-plus 6.0 软件分析阳性的亮绿色胶原纤维, 分别求得阳性面积与阳性强度, 将两者相乘得到胶原指数。

1.5.4 皮损 ROS 检测 将 50 mg 皮肤组织置于 1 ml 100 mmol/L PBS 中冰浴条件下手动匀浆, 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。以 BCA 法测定每个样本的蛋白含量, 严格按照试剂盒说明书操作, 荧光酶标仪检测 (参数设置: 激发波长 485 nm, 发射波长 525 nm)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *LSD* 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠皮肤和肺组织病理改变

镜下可见, 与空白组相比, 模型组真皮明显增

厚, 胶原纤维明显增粗、膨大, 数量增多, 纤维间隙变窄, 毛囊萎缩, 血管壁增厚, 管腔内狭窄, 伴有炎性细胞浸润; 肺组织出现肺泡间隔增厚伴大量单核细胞浸润, 间隙有成纤维细胞增生, 小血管壁增厚。与模型组相比, 中药各剂量组真皮胶原纤维增粗膨大程度及肺泡间隔增厚程度均有所减轻, 胶原纤维束间隙变宽, 毛囊萎缩也有所改善, 炎症细胞浸润略有缓解, 各剂量组之间差异不明显。

2.2 各组小鼠皮肤厚度、胶原指数、皮损 ROS 含量比较

表 1 示, 模型组皮肤厚度、胶原指数、皮损 ROS 含量较空白组明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药高、中、低剂量组皮肤厚度、胶原指数较均明显降低, 中药高、中剂量组皮损 ROS 含量亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。中药各剂量组间比较, 中药高剂量组皮肤厚度低于中药中、低剂量组, 中药中剂量组低于中药低剂量组 ($P < 0.01$); 中药高、中剂量组胶原指数明显低于中药低剂量组 ($P < 0.01$), 而中药高、中剂量组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 中药高剂量组皮损 ROS 含量低于中药中、低剂量组 ($P < 0.05$), 而中药中、低剂量组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

硬皮病作为一种发病率较高的结缔组织病, 病因不明, 发病机制主要涉及体液免疫紊乱、胶原合成异常、微血管损伤等方面。西医针对硬皮病纤维化的治疗主要运用青霉胺等药物, 但副作用较大, 效果不甚理想^[5]。中医学认为, 硬皮病属于“皮痹”“脏腑痹”范畴, 总由素体阳虚, 卫外不固, 风寒湿邪乘隙外侵, 以致经络阻隔, 气血凝滞, 营卫失和肌肤失荣所致^[6]。活血除痹汤是由张仲景《伤寒论》当归四逆汤化裁而来, 方中当归、白芍、丹参、川芎、鸡血藤养血活血, 桂枝、杜仲、黄芪通阳散寒, 秦艽、防风、拳参、豨莶草祛风除

表 1 各组小鼠皮肤厚度、胶原指数、皮损 ROS 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	皮肤厚度 (μm)	胶原指数	ROS (10^6 a. u. /mg)
空白组	6	32.027 ± 2.678	13871.857 ± 858.425	0.039 ± 0.002
模型组	6	110.435 ± 13.203*	32563.350 ± 3207.565*	19.137 ± 4.725*
中药高剂量组	6	41.516 ± 1.524 $\Delta\Delta$	16082.704 ± 1042.809 $\Delta\Delta$	7.797 ± 1.836 $\Delta\Delta$
中药中剂量组	6	54.677 ± 2.726 $\Delta\Delta\Delta$	17131.503 ± 750.055 $\Delta\Delta$	14.286 ± 4.104 $\Delta\Delta$
中药低剂量组	6	75.471 ± 3.816 $\Delta\Delta\Delta\#$	27195.084 ± 1518.740 $\Delta\Delta\Delta\#$	14.435 ± 3.679 Δ

注: ROS, 活性氧; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与中药中剂量组比较, $\#P < 0.01$

湿, 诸药相合, 共奏除痹通阳、活血通脉之效。

研究证实, 在硬皮病发病过程中存在异常的氧化还原状态, 即 ROS 的产生与清除间的平衡被破坏而形成的氧化应激反应, 此反应被证明与胶原合成增加密切相关^[4]。硬皮病患者体内 ROS 异常增高激活多条通路, 直接刺激成纤维细胞活化增殖^[5]。可见, ROS 异常增高在硬皮病的胶原纤维合成增加这一病理过程的发生发展中起到重要作用, 是硬皮病进展的重要标志。本研究结果显示, 经活血除痹汤干预后, 硬皮病小鼠的皮肤厚度、胶原指数、皮损 ROS 水平均明显降低, 这表明活血除痹汤对抗氧化应激反应确有疗效, 其发挥治疗作用可能是通过降低皮损中 ROS 水平, 来减轻硬皮病模型小鼠的皮肤厚度, 降低硬皮病小鼠皮肤纤维化指数。

参考文献

- [1] Leask A. Towards an anti-fibrotic therapy for scleroderma: targeting myofibroblast differentiation and recruitment [J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010, 3: 8. doi: 10.1186/1755-4536-3-8.
- [2] 李兴. 当归四逆汤加味治疗寒湿阳虚型硬皮病临床观察 [J]. 光明中医, 2013, 28 (3): 488-490.
- [3] Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al. Animal model of sclerotic skin mimicking scleroderma [J]. J Invest Dermatol, 1999, 112 (4): 456-462.
- [4] 屠文震, 赵凯, 陆磊, 等. 建立硬皮病小鼠模型的实验研究 [J]. 中华风湿病杂志, 2003, 7 (8): 478.
- [5] 中华医学会风湿病学分会. 系统性硬化病诊疗指南 [J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 15 (4): 256-259.
- [6] 陈曦, 张润田, 段行武. 中医治疗硬皮病研究进展 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2013, 29 (5): 331-333.
- [7] Ogawa F, Shimizu K, Hara T, et al. Autoantibody against one of the antioxidant repair enzymes, methionine sulfoxide reductase a, in systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis and vascular damage [J]. Arch Dermatol Res, 2010, 302 (1): 27-35.
- [8] Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis [J]. N Engl J Med, 2006, 354 (25): 2667-2676.

Effect of *Huoxue Chubi Decoction* (活血除痹汤) on the Active Oxygen of Lesion Tissue of Scleroderma Model Mice

CHEN Xi, ZHANG Runtian, PAN Houru, QU Xing, XIA Meng, DUAN Hangwu

(Dongzhimen hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100107)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Huoxue Chubi Decoction* in the treatment of scleroderma.

Methods Thirty mice were divided into blank group, model group and traditional Chinese medicine group with high, medium and low dose, 6 rats in each group. Except the blank group, the mice were intradermal injected with bleomycin hydrochloride 400 μg for 3 weeks to establish scleroderma mouse model. From the forth week till the seventh week, the rats in blank group and the model group were gavaged with the same amount of distilled water, the rats in traditional Chinese medicine group with high, medium and low dose were unitedly gavaged with *Huoxue Chubi Decoction* 44. 8, 22. 4, 11. 2 g/ (kg · d), once a day. Pathological changes of skin and lung of mice in each group would be observed, skin thickness, collagen index and levels of tissue reactive oxygen species (ROS) would be compared.

Results In the model group, the dermis was significantly thickened, and the collagen fibers were increased obviously, and the infiltration of inflammatory cells was accompanied; In the lung tissue, the alveolar septal thickening accompanied with a large amount of monocyte infiltration, and there is fibroblast proliferation. in the gap between the thickening alveolar septal and monocytes. Compared with the model group, the degree of thickening of dermal collagen fibers and alveolar septal were reduced in traditional Chinese medicine group with different dosage. Skin thickness, collagen index and lesion ROS content in the model group were significantly increased than those in the model group ($P < 0.01$); Compared with the model group, the skin thickness and collagen index were significantly lower in the high, medium and low dose groups of traditional Chinese medicine, the lesion ROS content of the traditional Chinese medicine group was higher and the middle dose was lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Huoxue Chubi Decoction* can significantly reduce the skin thickness and collagen index in scleroderma mouse model, the mechanism may be related to decreasing the level of ROS in the lesions.

Keywords scleroderma; *Huoxue Chubi Decoction*; active oxygen of tissue; collagen index

(收稿日期: 2015 - 03 - 16; 修回日期: 2015 - 05 - 18)

编辑: 邓 媛