

活血解毒方含药血清对银屑病角质形成细胞增殖及细胞周期的影响

王君伟 李 敏 翟瑞洁 闫雨荷 刘瓦利

(中国中医科学院广安门医院皮肤科, 分子生物学实验室, 北京市宣武区北线阁5号, 100053)

[摘要] **目的** 观察活血解毒方对体外培养的银屑病角质形成细胞增殖及细胞周期的影响。**方法** 根据血清药理学方法, 用清洁级SD大鼠制备大、中、小剂量活血解毒方含药血清、地塞米松含药血清及空白血清, 分别加入角质形成细胞培养体系中。培养48h后, 用MTT法观察COLO-16细胞增殖情况; 用流式细胞仪检测细胞周期分布。**结果** 不同浓度活血解毒方明显抑制COLO-16角质形成细胞株的增殖, 同时可改变细胞分裂周期各时相分布比例。**结论** 中药活血解毒方通过抑制角质形成细胞的异常增殖对银屑病有治疗作用。

[关键词] 活血解毒方; 银屑病; 角质形成细胞; 细胞增殖; 细胞周期

Effect of Huoxue Jiedu Recipe Medicated Serum on Proliferation and Cell Cycle Status of Keratinocytes of Psoriasis

WANG Junwei, LI Min, ZHAI Ruijie, YAN Yuhe, LIU Wali

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Huoxue Jiedu Recipe (Herbal recipe for activating blood and removing toxins) on proliferation and cell cycle status of keratinocytes cultured in vitro in psoriasis. **Methods** Using the serum pharmacologic technique, the clean SD rats were adopted to make the Huoxue Jiedu Recipe medicated serum (high, moderate, low dose), Dexamethasone medicated serum, and blank serum, which were added into the keratinocytes culture system respectively. After incubated for 48 hours, the cell proliferation of keratinocytes was measured by MTT assay, and the cell cycle distribution estimated with flow cytometer (FCM). **Results** The different density of Huoxue Jiedu Recipe could all inhibit significantly the generation of COLO-16 keratinocyte line and change the distribution proportion of each phase in the cell division cycle. **Conclusion** Huoxue Jiedu Recipe treats psoriasis through inhibiting the proliferation of keratinocytes.

Key Words Huoxue Jiedu Recipe (Herbal recipe for activating blood and removing toxins); Psoriasis; Keratinocytes; Cell proliferation; Cell cycle

银屑病为一种常见的反复发作的炎症性皮肤病, 以青壮年多见, 临床表现为红色丘疹或斑块, 边界清楚, 周围有炎性红晕, 基底浸润明显, 表面覆盖多层干燥的银白色鳞屑。活血解毒方为我们临床经验方, 该方以活血解毒为主, 佐以滋阴养血, 并具有显著的疗效。临床观察发现, 活血解毒方可以促进银屑病顽固皮损的消退, 延长疾病缓解期, 减少银屑病的复发^[1-2]。本研究结合中药血清药理学与细胞分子生物学的方法, 对活血解毒方含药血清处理后的角质形成细胞增殖率及细胞周期的时相进行比较, 从分子水平探讨活血解毒方对体外培养角质形成细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

健康清洁级SD大鼠, 60只, 雌雄各半, 体重230~300g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2007-0001, 在中国中医科学院广安门

医院动物实验中心实验室屏蔽使用环境中进行实验, 角质形成细胞株COLO-16由北京中医药大学东直门医院细胞培养室提供。

1.2 药物

活血解毒方组成: 丹参20g, 土茯苓30g, 山豆根5g, 当归10g, 大青叶15g, 莪术10g, 生地黄20g, 紫草10g, 玄参10g, 苦参10g, 重楼10g, 黄芩10g, 红花6g。药物均来自中国中医科学院广安门医院药剂科免煎药房, 由北京华邈中药工程技术开发中心生产(各药品生产批号: 丹参0804171, 土茯苓0801247, 山豆根0802079, 当归0804233, 大青叶0803200, 莪术0803026, 生地黄0804034, 紫草0712106, 玄参0803121, 苦参0803081, 重楼0712148, 黄芩0814101, 红花0803041), 依实验所用浓度, 由动物饮用水配制成水溶液。地塞米松磷酸钠注射液由天津金耀氨基酸有限公司生产, 批号: 0711141。

1.3 试剂及仪器

MTT试剂盒(鼠KGA-312)、细胞周期试剂盒(鼠KAG-512)均购自凯基生物制品有限公司; 特级胎牛血清(REF: 1600-044, LOT: 348555)、胰蛋白酶、DMEM

(高糖)培养基(鼠 No. 12100-046)均购自美国 Gibco 公司。超净工作台、CO₂培养箱(日本三洋公司);全自动酶标仪、低速离心机(美国 Sigma 公司);倒置显微镜(日本尼康公司);Fascalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 大鼠含药血清与正常血清制备

取50只清洁级 SD 大鼠,体重在230~300g 之间,依照随机数字表法分为5组,每组10只,雌雄各半。空白对照组大鼠每天灌服蒸馏水2ml/次,每日2次,连续7天;中药组大鼠按大、中、小剂量每天分别灌服活血解毒方,中药浓度分别对应标准人(60kg)所需药物剂量的15倍、10倍、5倍,每次2ml,每天分2次给药,连续7天;阳性对照组给予地塞米松溶液灌服,浓度为1mg/kg 体重,每次2ml,每日2次,连续7天;在最后一次给药1h 后,采用大鼠腹主动脉采血(无菌操作),将所取动脉血静置1h 后,以1500r/min 速度离心10min,取血清,56℃ 30min 灭活,以0.22 μm 滤器过滤分装后,-80℃冰冻储存备用。

1.5 细胞培养

角质形成细胞株 COLO-16采用含10%胎牛血清,100U/ml 青霉素、链霉素混合的 DMEM 高糖培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养,隔日更换1次培养基。用不同浓度的含药血清及空白血清分别处理细胞。

1.6 活血解毒方中药抑制细胞增殖

采用 MTT 法检测细胞增殖率,待培养瓶中细胞覆盖瓶底至70%~80%时,将细胞消化后接种于96孔板中,待细胞铺满约50%后,更换不含胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养24h,以达到同步增殖,生长达60%融合时,加入不同浓度的含药血清。每种含药血清分为5%、10%、15% 3种不同浓度,共15组,每组4个孔,培养48h 后取出,各孔中加入1×MTT 50 μl,继续在37℃、5% CO₂培养箱培养中培养4h 后,吸出各孔中培养液,每孔加入150 μl DMSO,平板摇床震荡10min,待结晶物充分溶解后置于酶标仪492nm 处检测吸光度值(OD 值),每组试验重复2次。

细胞存活率:将各测试孔的 OD 值减去本底 OD 值(完全培养基加 MTT)或空白药物孔 OD 值(完全培养基加受试药物的不同稀释度加 MTT,无细胞),各重复孔的 OD 值取均值±标准差。细胞存活率=T(加药细胞的 OD 值)/C(对照细胞的 OD 值)×100%

1.7 细胞周期检测

将角质形成细胞株 COLO-16接种于6孔板中,待细胞生长达80%融合时加入已制备的5种血清浓度为20%含药血清的培养基,每组3个孔,每孔2ml,培养48h 后取出,用0.25%胰酶消化细胞,PBS 洗去胰酶及培养

基,用70%冰乙醇固定细胞,4℃保存,每组重复4次。染色前用 PBS 缓冲液洗去固定液,加入100 μl RNase A,于37℃温水中水浴30min 后加入 PI 进行染色,4℃避光30min 后上流式细胞仪检测细胞周期。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0统计软件,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同药物含药血清对体外培养角质形成细胞 COLO-16增殖的影响

用含药物血清与单纯动物血清组进行比较,观察含药血清对体外培养角质形成细胞 COLO-16生长的影响。用细胞存活率来表示,结果见表1。

表1 含药物血清对体外培养角质形成细胞 COLO-16存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	细胞数	OD 值	细胞存活率(%)
中药组	大剂量5%	8	0.54±0.05	0.57±0.06▲
	大剂量10%	8	0.48±0.18	0.51±0.20
	大剂量20%	8	0.39±0.10	0.41±0.11*▼▲○
	中剂量5%	8	0.60±0.08	0.64±0.09
	中剂量10%	8	0.63±0.16	0.68±0.17
	中剂量20%	8	0.64±0.08	0.68±0.09▲●
	小剂量5%	8	0.63±0.16	0.68±0.17
	小剂量10%	8	0.73±0.10	0.78±0.10▽▲●
	小剂量20%	8	0.62±0.06	0.67±0.06▲●
地塞米松组	5%	8	0.65±0.10	0.69±0.11
	10%	8	0.53±0.04	0.57±0.05
	20%	8	0.46±0.05	0.48±0.06
空白血清组	5%	8	0.67±0.07	0.71±0.08
	10%	8	0.69±0.07	0.74±0.07
	20%	8	0.66±0.09	0.70±0.09

注:与5%地塞米松组比较,*P<0.05;与10%地塞米松组比较,▽P<0.05;与20%地塞米松组比较,△P<0.05;与5%空白血清组比较,▼P<0.05;与10%空白血清组比较,▲P<0.05;与20%空白血清组比较,○P<0.05;与20%中药大剂量组比较,●P<0.05

2.2 不同药物含药血清对体外培养角质形成细胞 COLO-16细胞周期的影响

表2 含药血清作用48h 后 COLO-16细胞周期的分布(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
中药大剂量组	4	68.95±6.65*	26.83±5.91*	4.22±1.54
中药中剂量组	4	71.25±2.45*	24.41±4.13	4.33±1.70
中药小剂量组	4	70.99±2.81*	24.85±4.94	4.17±3.90
地塞米松组	4	72.16±3.20*	25.76±4.84	2.01±2.66
空白血清组	4	83.54±4.38	15.06±3.86	1.39±1.05

注:与空白血清组比较,*P<0.05

表2示,不同浓度的含药血清作用于 COLO-16细胞48h 后,中药大剂量组 S 期细胞百分比较地塞米松组明显增加,G₀/G₁期比例降低,可见药物将细胞阻滞于 S 期。细胞周期时相分布的分析结果表明,药物作用

于细胞48h后,细胞周期中G⁰/G¹期比例降低($P<0.05$),S期比例升高($P<0.05$)。

3 讨论

银屑病的主要病理表现为角质形成细胞的异常增殖、分化不全以及局部炎细胞浸润等炎症表现。正常人表皮中,位于基底层角质形成细胞每隔13天分裂一次,成熟的角质形成细胞进一步分化并从表皮脱落下来共需26天。银屑病患者角质形成细胞的增殖循环周期缩短为1.5天,成熟后至完全脱落大约为4天左右,过度增殖和低分化的角质形成细胞为本病的主要病理改变细胞。因此,本研究选用人角质形成细胞株COLO-16,来源于人表皮鳞状细胞癌的肿瘤细胞^[3-5],其异常增殖的能力可以在一定程度上模拟银屑病表皮角质形成细胞的生物学特性。

本研究将含5%、10%、20%正常大鼠血清、活血解毒方3个不同浓度血清及地塞米松血清的细胞培养液分别与角质形成细胞孵育48h,发现不同浓度的含药血清对于细胞增殖的抑制程度不同。实验结果显示,高浓度的中药对于细胞的抑制作用优于地塞米松,证实活血解毒方能够抑制角质形成细胞的异常增殖,但其抑制强度与药物浓度存在一定的相关性。

细胞周期是指细胞从上一次分裂结束开始生长到下一次分裂终止所经历的过程,所需的时间则称细胞周期时间。细胞周期是定量的,其运行有顺序性。增殖性细胞的细胞周期分为4期,其中关键的两期为DNA合成期(S期)和细胞分裂期(M期),另外,G¹和G²期分别为S期和M期积蓄所需要的物质,进入细胞周期^[6]。对于细胞周期时相的研究结果表明,不同浓度的活血解毒方血清及地塞米松血清均能降低细胞G¹期

时相的比例,而将细胞阻滞于S期,使S期时相的比例上升,抑制细胞的有丝分裂。说明活血解毒方对细胞周期各时相的分布有一定的干扰作用,从而影响细胞抑制细胞增殖。提示活血解毒方抑制细胞增殖的机制可能与影响细胞周期有关。

本实验证实,活血解毒方能够抑制角质形成细胞的增殖,并影响细胞周期各时相的分布,可能是治疗寻常型银屑病的作用机制之一,但其作用的具体靶点及作用途径目前尚不清楚,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1]刘瓦利,方平.解毒活血汤治疗银屑病51例[J].中医杂志,1993,34(9):549-505.
- [2]高炳爱,许锐.复方参地汤和迪银片联合治疗慢性银屑病的疗效评价[J].中国中西医结合杂志,2001,21(1):15-18.
- [3]徐丽敏,陈学荣,毛舒和,等.大黄素和大黄酸对COLO-16细胞株的影响[J].中华皮肤科杂志,2000,33(1):47-48.
- [4]Serewko MM, Popa C, Dahler AL, et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development[J]. Cancer Res, 2002, 62(13):3759-3765.
- [5]Boterberg T, Vennekens KM, Thienpont M, et al. Internalization of the E-cadherin/catenin complex and scattering of human mammary carcinoma cells MCF-7/AZ after treatment with conditioned medium from human skin squamous carcinoma cells COLO 16[J]. Cell adhes commun, 2000, 7(4):299-310.
- [6]周明华,陈思颖,李美芳,等.细胞周期与细胞凋亡[J].生理科学进展,1996,27(4):319-324.

(收稿日期:2009-06-15;修回日期:2009-10-20)

[编辑:行之]

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有0号、1号、2号等多种型号、多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒135元(含邮资)。地址:浙江新昌县一诺胶囊有限公司,邮政编码:312560,电话:(0575)86061888,013706852676,联系人:潘炎锋

寻求疑难杂症验方合作

您有效果神奇、应用已久、无毒副作用且功效显著的民间验方吗?您希望它产业化吗?您期盼它为更多人解除病痛吗?这样的事情您自己完成有困难吗?我们来合作好吗?全国高科技健康产业自然医学委员会所属的权健国际自然医学集团集科研、生产、销售为一体,服务网点遍及全国,旗下的天津权健自然医学科技发展有限公司致力于民间神奇验方的收集整理使之产业化服务人民大众。

期待与您的真诚合作!共同造福人类!

公司:天津市权健自然医学科技发展有限公司,地址:天津市武清区豆张庄乡权健道1号,邮编:301707,电话:022-22160850,022-22160816,传真:022-22160816,联系人:高小姐、常小姐,公司网址:www.ziranyixue.com。

合作流程:来电咨询确认→提供临床试用样品10份→试验治愈率70%为成功→洽谈合作事宜(一般为购买验方)。

第三届中医药现代化国际科技大会征文通知

“第三届中医药现代化国际科技大会”将于2010年11月25~26日在四川成都召开。现将有关征文等事项通知如下。

1. 征文内容:分会一(中医药创新与发展政府论坛):围绕中医药多边国际合作、标准化建设等征文。投稿邮箱:icetcm-1@163.com。分会二(中医药学的现代理念与基础理论研究):围绕中医药现代理念、基础理论及作用机理等征文。投稿邮箱:icetcm-3rd@163.com。分会三(中医药防治慢性疾病与疗效评价研究):围绕慢性疾病中医药诊疗方案、疗效评价等征文。投稿邮箱:icetcm2010clinic@126.com。分会四(中医药防治重大传染病的研究):围绕重大传染病中医药诊疗方案、疗效评价等征文。投稿邮箱:hui931222@sina.com。分会五(中药资源的可持续开发和保护):围绕中药资源保护、中药材规范化种植、质量标准等征文。投稿邮箱:liu_xianwu@yahoo.com.cn。分会六(中药创新与产业发展):围绕中药新药研究开发、关键共性技术及产业发展等征文。投稿邮箱:tcm028@126.com。分会七(民族医药发展与创新):围绕民族医药的保护、传承与发展等征文。投稿邮箱:gujianed@163.com。2. 联系人:学术委员会办公室(成都中医药大学科技处)彭腾,电话:86-28-61800001,08880376673;E-mail:scjy@163.com。http://www.icetcm.org。及更多会议信息请关注大会网站:http://www.icetcm.org。