

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.13.016

补益营卫方对衰老小鼠皮肤表皮角蛋白 K5、K16 表达的影响

司晓伟, 周小平*

(宁夏医科大学中医学院, 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利街 1160 号, 750004)

摘要 目的 探讨补益营卫方延缓皮肤衰老的可能作用机制。方法 C57BL/6 种雌性小鼠 3 月龄 10 只设为年轻组, 14 月龄 40 只随机分为老龄组和补益营卫方高、中、低剂量组, 每组 10 只。补益营卫方高、中、低剂量组每天分别按 6、3、1.5 g/(kg·d) 灌胃给药, 连续 6 周。采用免疫荧光法检测各组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K5 及 K16 的表达。结果 与年轻组比较, 老龄组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K16 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与老龄组比较, 补益营卫方高、中、低剂量组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K16 表达明显降低 ($P < 0.01$)。补益营卫方中剂量组对 K16 的表达抑制作用最大, 与补益营卫方低剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 与补益营卫方高剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K5 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 补益营卫方可能通过抑制衰老皮肤表皮角蛋白 K16 的表达而起到延缓皮肤衰老的作用。

关键词 皮肤衰老; 补益营卫方; 角蛋白 K5; 角蛋白 K16

中医理论认为, “营卫”具有“熏肤、充身、泽毛、温分肉、充皮肤、肥腠理、司开合”的作用, 其与皮肤的生理和病理有密切关系。随着年龄的增加, 人体气血渐衰, 营卫亦显不足, 皮肤显现衰老的表象^[1]。近年来随着对皮肤衰老认识的逐步深入, 发现角质形成细胞在皮肤衰老中发挥重要作用, 而角蛋白作为中间丝家族的成员之一, 是表皮组织的主要分化产物, 具有维持细胞分化、参与细胞定位等功能^[2]。我们从营气不足导致身痛为病机的桂枝新加汤证中选取益营气的人参, 从治虚劳的黄芪建中汤中选取益卫气的黄芪, 再加益气调和药性的炙甘草组成补益营卫方, 并观察其对衰老小鼠皮肤表皮角蛋白 K5 及 K16 的影响, 探讨补益营卫方延缓皮肤衰老的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 C57BL/6 种雌性小鼠 50 只, 3 月龄 10 只, 体重 (20 ± 2) g, 14 月龄 40 只, 体重 (28 ± 3) g, 实验动物许可证号: SYXK (苏)

2011-0035, 由常州卡文斯实验动物有限公司提供, 饲养于宁夏医科大学动物实验中心。

1.2 实验药物

补益营卫方由黄芪 15 g、人参 5 g、炙甘草 7 g 组成, 常规水煎 2 次, 合并滤液浓缩至生药含量 1 g/ml, 4℃ 冷藏保存。

1.3 主要仪器与试剂

K5 抗体 (Abcam 公司, 批号 GR91476-1), K16 抗体 (Santa Cruz 公司, 批号 GR153728-1), 荧光二抗 (Abcam 公司, 批号 GR118493-1)。CM1510S 冰冻切片机, EG1150C 组织包埋机 (德国徕卡公司), 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), Image-Pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司)。

1.4 动物分组及给药方法

3 月龄小鼠 10 只设为年轻组, 14 月龄 40 只小鼠按随机数字表法分为老龄组和补益营卫方高、中、低剂量组, 每组 10 只。补益营卫方高、中、低剂量组每天分别按 6、3、1.5 g/(kg·d) 灌胃给药, 连续 6 周。

1.5 观察指标及方法

脱臼处死小鼠, 剪下背部皮肤, 尽可能剪去背

基金项目: 国家自然科学基金 (81460729)

* 通讯作者: zhxp1999@sohu.com, 13895653103

毛, 取 1.0 cm × 1.0 cm 皮肤分成数份, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 将固定标本取出, 包埋, 切片, 切片厚度为 5 μm。1) 5 μm 冰冻切片经 PBS 洗 5 min; 2) 枸橼酸缓冲液加热至 90℃, 微波修复 1 min 后冷却; 3) 0.25% Triton X100 室温透化 5 min, PBS 洗 3 次; 4) 加 20% 正常牛血清, 室温结合 30 min; 5) 加入 K5 和 K16 一抗, 4℃ 孵育过夜; 6) PBS 漂洗 5 min × 3 次; 7) 加结合荧光素的二抗, 室温孵育 1 h; 8) PBS 漂洗 5 min × 3 次; 9) 封片, 荧光显微镜观察并拍照。结合 Image-Pro Plus 6.0 软件分析细胞骨架蛋白免疫荧光图像。通过胞核 DAPI 蓝色荧光精确定位胞核位置, 细胞质中可见不同强度的绿色荧光, 对图片中细胞个数、面积、荧光强度等参数独立提取并计算各个细胞和细胞核的面积及荧光强度, 细胞的荧光强度等于对应标号的像素点灰度总值除以细胞面积总值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在荧光显微镜下, 绿色为胞浆中角蛋白荧光染色, 蓝色为细胞核。角蛋白 K5 的荧光强度表达呈阳性, 年轻组与老龄组之间无明显差异, 补益营卫方高、中、低剂量组与老龄组相比亦无明显差异。老龄组角蛋白 K16 的荧光强度表达呈阳性, K16 的表达明显上调, 与其他各组相比具有显著差异。

表 1 示, 与年轻组比较, 老龄组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K16 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与老龄组比较, 补益营卫方高、中、低剂量组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K16 表达明显降低 ($P < 0.01$)。补益营卫方各剂量组之间, 补益营卫方中剂量组对 K16 的表达抑制作用最大, 与补益营卫方低剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 与补益营卫方高

剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K5 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

随着人类社会的发展和进步, 人们生活质量逐步提高, 对延缓皮肤衰老的要求越来越迫切。中医药在数千年的发展中积累了丰富的抗衰老理论和经验, 《黄帝内经》指出, 营卫具有“熏肤、充身、泽毛、温分肉、充皮肤、肥腠理、司开合”的作用。《伤寒论·平脉法》第 69 条曰“寸口脉微而涩, 微者卫气衰, 涩者荣气不足, 卫气衰, 面色黄, 荣气不足, 面色青”, 指出营卫充盛, 则肌肉健壮, 容光焕发, 无衰老之象; 反之, 营卫不足, 则面色青黄, 衰象显露。因此, 营卫和皮肤的衰老密切相关。

角蛋白为角质形成细胞的结构蛋白, 其为中间纤维基因家族的产物^[3], 根据基础的基因序列特征分为 6 种类型或亚型, 其中最主要的是角蛋白 I 型 (K9 至 K20) 和 II 型 (K1 至 K8)^[4]。角蛋白对细胞的分化有特定的程序, 这有助于细胞保持特定的 I 型和 II 型蛋白之间的平衡, 这种分化特异的角蛋白在皮肤和相关结构中可以看到不同的表达, 它的表达随表皮向终末分化过程而改变^[5-6]。角蛋白 K5 属 II 型角蛋白, 正常情况下与角蛋白 K14 成对表达, 是角质形成细胞分化的标志物之一, 经过有丝分裂的表皮细胞早期表达角蛋白 K5; 角蛋白 K16 在正常皮肤中不表达或者少量表达, 毛囊、汗腺等附属器上皮中可有少量分布, 当某些情况下如伤口愈合或者炎症状态, 表皮过度修复增生, 应激反应造成角蛋白 K16 的大量表达, 替代角质形成细胞分化角蛋白的表达, 故其为表皮角质形成细胞增殖标志之一^[7]。

本研究结果显示, 衰老的皮肤中角蛋白 K16 的表达比年轻的皮肤中表达水平高, 而补益营卫方对 K16 的异常表达有抑制作用, 且各剂量组与老龄组之间差异均有统计学意义, 而 3 个剂量组之间以中剂量对 K16 的表达抑制作用最大。另外, 角蛋白 K5 在衰老皮肤中的表达情况与年轻组相比差异无统计学意义, 经补益营卫方高、中、低剂量组干预亦无明显差异。因此, 可以看出补益营卫方可能通过有效抑制衰老皮肤表皮中角蛋白 K16 的异常表达而延缓皮肤衰老。

表 1 各组小鼠皮肤表皮中角蛋白 K5、K16 表达
荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	K5	K16
年轻组	10	0.078 ± 0.03	0.017 ± 0.003
老龄组	10	0.080 ± 0.02	0.028 ± 0.004*
补益营卫方高剂量组	10	0.081 ± 0.04	0.021 ± 0.003 [△]
补益营卫方中剂量组	10	0.081 ± 0.01	0.019 ± 0.003 [△]
补益营卫方低剂量组	10	0.081 ± 0.07	0.023 ± 0.004 ^{△▲}

注: 与年轻组比较, * $P < 0.01$; 与老龄组比较, $\Delta P < 0.01$; 与补益营卫方中剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

参考文献

- [1] 周小平,傅延龄. 营卫与皮肤及皮肤衰老的关系探讨 [J]. 四川中医, 2008, 26(4): 22-23.
- [2] 张学军,刘维达,何春涤. 现代皮肤性病学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 320-321
- [3] QUINLAN R, HUTCHISON C, LANE B. Intermediate filament proteins [J]. Protein Profile, 1995, 2(8): 795-952.
- [4] MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells [J]. Cell, 1982, 31(1): 11-24.
- [5] PORTER RM, LUNNY DP, OGDEN PH, et al. K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells [J]. Lab Invest, 2000, 80(11): 1701-1710.
- [6] WASEEM A, DOGAN B, TIDMAN N, et al. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes [J]. J Invest Dermatol, 1999, 112(3): 362-369.
- [7] 张敏. 瘦素对角质形成细胞增殖分化角蛋白的影响及其分子信号通路的研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.

The Effect of *Buyi Yingwei Fang*(补益营卫方) on the Expression of Epidermal Keratin K5 and K6 in Skin of Aging Mice

SI Xiaowei, ZHOU Xiaoping

(College of Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004)

ABSTRACT Objective To explore possible functional mechanism of *Buyi Yingwei Fang*(补益营卫方) in preventing skin aging. **Methods** Ten 3-month old C57BL/6 female mice were set as the young group. Forty mice of 14 months old were randomly divided into the aging group and the *Buyi Yingwei Fang* high, middle and low dose groups, with 10 in each group. The *Buyi Yingwei Fang* high, middle and low dose groups were respectively gavaged with 6, 3, and 1.5 g/(kg·d), last for 6 weeks. Using immunofluorescence method to examine the expression of epidermal keratin K5 and K6 in skin of aging mice in each group. **Results** Compared with the young group, the expression of epidermal keratin K16 in mice in the aging group remarkably increased ($P < 0.01$); Compared with the aging group, the expression of epidermal keratin K16 in skin of mice in the *Buyi Yingwei Fang* high, middle and low dose groups remarkably decreased ($P < 0.01$). The *Buyi Yingwei Fang* middle dose group had the largest effect in inhibiting the expression of K16. The difference had statistical significance compared with that of the *Buyi Yingwei Fang* low dose group ($P < 0.01$). The difference had no statistical significance compared with that of the *Buyi Yingwei Fang* high dose group ($P > 0.05$). The difference had no statistic significance while comparing the expression of epidermal keratin K5 in skin of mice in each group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Buyi Yingwei Fang* may function to staving the skin aging by inhibiting the expression of epidermal keratin K16 of aging skin.

Keywords aging; *Buyi Yingwei Fang* (补益营卫方); keratin K5; keratin K16

(收稿日期: 2015-10-29; 修回日期: 2016-01-26)

编辑: 邓 媛