

# 养血解毒方对银屑病角质形成细胞紧密连接的调节作用

刘宇<sup>1,2</sup>, 赵京霞<sup>2</sup>, 王燕<sup>2</sup>, 底婷婷<sup>2</sup>, 蒙玉娇<sup>1,2</sup>, 郭昕炜<sup>2</sup>, 郭简宁<sup>1,2</sup>,  
郭肖瑶<sup>2</sup>, 齐聪<sup>2</sup>, 张璐<sup>2</sup>, 张蕾<sup>2</sup>, 李萍<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院,  
北京市中医研究所, 银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室, 北京 100010)

**[摘要]** **目的:** 观察银屑病样小鼠皮损紧密连接蛋白中水闸蛋白(claudin-1, claudin-7), 闭锁蛋白(occludin)的表达, 明确养血解毒方对银屑病表皮通透屏障的修复作用, 为养血解毒方治疗银屑病提供科学依据。**方法:** 将C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、甲氨嘌呤组、养血解毒方组, 制备甲氨嘌呤溶液、养血解毒方水煎剂对应灌胃干预, 同时小鼠背部剃毛后给予咪喹莫特涂抹诱导银屑病样皮损模型。每日拍照记录皮损形态并对严重程度指数(PASI)评分; 水油测试笔检测皮损表皮含水量; 苏木素-伊红(HE)染色观察其病理改变、测量表皮厚度; 免疫荧光法检测增殖相关的核抗原(Ki67); 免疫组化法检测表皮兜甲蛋白(loricrin), 真皮中CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润和紧密连接蛋白 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测皮损中 claudin-7, occludin 的表达。模拟银屑病皮损微环境, 建立白细胞介素-17(IL-17, 1 mg·L<sup>-1</sup>)刺激的角质形成细胞(Hacat)模型, 制作养血组分、解毒组分、养血解毒方喷干粉进行干预。采用细胞增殖毒性检测试剂盒-8(CCK-8)法检测药物对Hacat细胞的毒性; 细胞免疫荧光法检测药物对角质形成细胞 claudin-1, claudin-7, occludin 表达的干预作用。**结果:** 与模型组比较, 养血解毒方可显著减轻小鼠银屑病样皮损表现, 降低PASI评分及皮损表皮厚度( $P < 0.01$ ), 增加皮损区表皮水分含量( $P < 0.01$ ), 减少表皮ki67, loricrin的异常表达和真皮CD3<sup>+</sup>T细胞浸润( $P < 0.01$ ), 并增加紧密连接蛋白 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达( $P < 0.05$ ), 增加紧密连接结构的完整性; 体外研究发现, 与模型组比较, 养血解毒方组和养血组分明显升高紧密连接蛋白 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 解毒组分蛋白表达水平无统计学差异。**结论:** 养血解毒方通过调节角质形成细胞间紧密连接的表达抑制其异常的增殖分化过程, 进一步恢复破坏的表皮通透屏障, 可能是其治疗银屑病的作用机制之一。其中养血解毒方的养血组分对调节紧密连接的修复起主要作用。

**[关键词]** 养血解毒方; 银屑病; 咪喹莫特; 紧密连接; 表皮通透屏障; 角质形成细胞

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0062-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200301

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191018.1459.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-10-18 15:20

## Regulatory Effect of Yangxue Jiedu Decoction on Tight Junction of Keratinocytes in Psoriasis

LIU Yu<sup>1,2</sup>, ZHAO Jing-xia<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>, DI Ting-ting<sup>2</sup>, MENG Yu-jiao<sup>1,2</sup>, GUO Xin-wei<sup>2</sup>,  
GUO Jian-ning<sup>1,2</sup>, GUO Xiao-yao<sup>2</sup>, QI Cong<sup>2</sup>, ZHANG Lu<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>, LI Ping<sup>1,2\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Capital Medical University, Beijing Institute of TCM  
Beijing Key Laboratory of Clinical Basic Research on Psoriasis, Beijing 100010, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the expressions of tight junction proteins (claudin-1, claudin-7, occludin) of psoriasis-like lesions in mice, and clarify the effect of Yangxue Jiedu decoction on the epidermal

**[收稿日期]** 20190605(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673989);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2015-3-116)

**[第一作者]** 刘宇,在读硕士,从事中医药防治银屑病研究,E-mail:1010022635@qq.com

**[通信作者]** \*李萍,博士生导师,研究员,教授,从事中医药防治银屑病研究,E-mail:liping411@126.com

barrier of psoriasis, so as to provide scientific basis for the treatment of psoriasis with Yangxue Jiedu decoction.

**Method:** C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, methotrexate group and Yangxue Jiedu decoction. Methotrexate solution and water decoction of Yangxue Jiedu decoction were prepared, and the mice were given imiquimod to induce psoriasis-skin lesions after the hair was shaved. Daily photos were taken to record the forms of skin lesions and psoriasis area and severity index (PASI) scores. Water and oil test pens were used to detect skin moisture content. The pathological changes were observed by htoxylin eosin (HE) staining, and the epidermal thickness was measured. Ki67 was detected by immunofluorescence. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of loricrin, CD3<sup>+</sup> T lymphocyte infiltration and claudin-1, claudin-7, occludin. In addition, the expressions of claudin-7 and occludin in skin lesions were detected by Western blot. Meanwhile, interleukin-17 (IL-17) (1 mg · L<sup>-1</sup>) was used to simulate the microenvironment of psoriasis skin lesions, and the intervention was conducted by making Yangxue component, Jiedu component and Yangxue Jiedu dry powder. The toxicity of the drug on Hacat cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The effect of the drugs on the expressions of claudin-1, claudin-7, occludin in Hacat was detected by immunofluorescence assay.

**Result:** Yangxue Jiedu decoction could significantly reduce the psoriasis skin lesions in mice, and reduce the PASI score and skin thickness ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the skin moisture content in the lesion was increased ( $P < 0.01$ ). Abnormal expressions of ki67 and loricrin in epidermis and infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells were reduced ( $P < 0.01$ ). In addition, the expressions of claudin-1, claudin-7, occludin proteins ( $P < 0.05$ ), and the integrity of the tight junction structure were increased. *In vitro* studies, compared with the model group, the expressions of claudin-1, claudin-7, and occludin in the Yangxue Jiedu group and Yangxue group were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, there was no statistically significant difference in protein expression in the Jiedu group. **Conclusion:** By regulating the expressions of tight junction proteins between keratinocytes, Yangxue Jiedu decoction can inhibit the abnormal proliferation and differentiation, and further restore the broken epidermal barrier. Yangxue Jiedu decoction plays a role in regulating tight junction mainly through Yangxue component.

[ **Key words** ] Yangxue Jiedu decoction; psoriasis; imiquimod; tight junction; epidermal barrier; Hacat cell

银屑病是以红斑、鳞屑、浸润为主要表现的自身免疫性疾病,除了 T 细胞活化在发病中扮演着重要角色,表皮通透屏障也被证实与银屑病的发生发展密切相关。研究表明,银屑病患者皮肤经皮水分流失增加、角质层含水量减少,表皮通透屏障受损,且外用润肤保湿乳膏的患者皮损严重程度指数 (PASI) 评分较治疗前明显降低,其中以鳞屑最为显著,表明表皮通透屏障的修复是临床治疗的重要手段之一<sup>[1-2]</sup>。紧密连接 (TJ) 作为表皮通透屏障的主要控制分子,被证实存在银屑病患者皮损中存在异常表达。TJ 的异常可引起水分的异常丢失、角质细胞的异常增殖分化,炎症细胞的迁移浸润,从而表现为皮肤干燥脱屑,浸润增厚<sup>[3]</sup>,但是中药对紧密连接的调节作用却不甚明确。

血燥证是银屑病慢性病程的主要证候,多是风邪燥热之邪久羁,阴血内耗,夺津灼液则血枯槁而难荣于外。表现为皮损淡红,鳞屑减少,干燥皲裂,自

觉瘙痒,伴有口咽干燥,难治反复,迁延不愈。首都医科大学附属北京中医医院皮肤科联合多家医院对血燥证的治疗进行了深入研究,形成治疗银屑病血燥证的优化方案——养血解毒方。临床研究发现银屑病血燥证患者经养血解毒方治疗后优于安慰剂对照组 8 周总有效率 67.09%, PASI 评分优于安慰剂组,瘙痒症状较前明显缓解<sup>[4]</sup>。有研究观察到养血解毒方可减少银屑病患者经皮水分丢失<sup>[5]</sup>,但具体机制未明。本研究在以上基础上,从具有调节表皮屏障作用的细胞间连接-紧密连接功能入手,通过体内外研究,阐明养血解毒方治疗银屑病血燥证的作用机制,为养血解毒方治疗银屑病的临床应用提供生物学证据。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞** C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20 ~ 22 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格证号 SCXK (京) 2014-0004,饲养于

北京市中医研究所 SPF 级动物饲养间, 恒温 (25 ℃), 恒湿 (75%), 饮水、饲料不限。永生生化角质形成细胞株 (Hacat 细胞系购自中国医学科学院协和细胞中心)。文章中动物实验已得到北京市中医研究所实验动物管理委员会批准, 伦理号为 2018100202。

**1.2 药物与试剂** 咪喹莫特乳膏 (四川明欣药业有限责任公司, 批号 16110239); 甲氨喋呤片 (上海信谊药厂有限公司, 批号 036160702); 养血解毒方 (当归 15 g, 生地黄 15 g, 丹参 15 g, 鸡血藤 15 g, 麦冬 10 g, 玄参 15 g, 土茯苓 30 g, 七叶一枝花 9 g, 天花粉 15 g, 白花蛇舌草 30 g, 苍术 10 g, 白蒺藜 10 g); 养血组分 (当归 15 g, 生地黄 15 g, 丹参 15 g, 鸡血藤 15 g, 麦冬 10 g, 天花粉 15 g, 苍术 10 g, 白蒺藜 10 g); 解毒组分 (玄参 15 g, 土茯苓 30 g, 七叶一枝花 9 g, 白花蛇舌草 30 g); 将养血解毒方按成人 (60 kg) 剂量根据人与动物间换算比例计算小鼠用量, 中药材统一由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供并制成煎剂, 质量浓度  $1\ 948\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。养血组分、解毒组分、养血解毒方喷干粉用喷雾干燥法制备, 药材、水煎剂、喷干粉均由北京市中医研究所制剂室韩旭阳主管药师进行质控。细胞增殖毒性检测试剂盒-8 (CCK-8, 日本 Dojindo 公司, 批号 NM658); 白细胞介素-17A (IL-17A, 美国 Peprotech 公司, 批号 1206392B1612); 过氧化物酶封闭液, DAB 显色液, 荧光封片剂 (中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 K183316B, K187721A, K186616J); MEM 培养基, 胎牛血清, ki67 兔抗鼠多克隆抗体, CD3 兔抗鼠单克隆抗体, 表皮兜甲蛋白 (loricrin) 兔抗鼠多克隆抗体, 水闸蛋白 (claudin)-1 兔抗鼠多克隆抗体, claudin-7 兔抗鼠多克隆抗体 (德国 Abcam 公司, 批号分别为 1967783, 42Q3182K, GR3196370, GR3254868, GR3213869-2, GR3196024-1, GR3257288-2); 闭锁蛋白 (occludin),  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 兔抗鼠多克隆抗体 (美国 Proteintech 公司, 批号分别为 00050249, 00054323); 山羊抗兔 488 荧光二抗 (北京冠星宇公司, 批号 #1712); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号 TL276913)。

**1.3 仪器** TP1020 型组织脱水机, EG1140H 型包埋机, AUTOSTAINERXL 型苏木素-伊红 (HE) 半自动染色仪 (德国 Leica 公司); IMAGER Z2 型正置荧光显微镜及图像分析系统 (德国 Zeiss 公司); Axio Imager A2 型蔡司光学显微镜 (德国卡尔蔡司公

司); MCo-15AC 型二氧化碳培养箱, MultiSkan3 型酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); XDS-2B 型倒置显微镜 (重庆光电仪器有限公司); 细胞培养板, 培养瓶 (美国 Corning 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组、造模及给药** 用咪喹莫特诱导银屑病样皮损的经典模型<sup>[6]</sup>, 给药组药物剂量参考课题组前期实验结果选用效果最优剂量<sup>[7]</sup>。实验前 C57BL/6J 雄性小鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉 ( $80\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 背部去毛约  $2\ \text{cm}\times 2\ \text{cm}$  大小。随机分为空白组、模型组、甲氨喋呤组、养血解毒方组, 备皮后单笼饲养。除空白组外, 其余 3 组小鼠予每日背部涂抹 5% 咪喹莫特乳膏  $62.5\ \text{mg}$ , 空白组小鼠每日背部涂抹等量凡士林。造模同时灌胃给药, 阳性药组予甲氨喋呤 ( $1\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 9% 生理盐水溶解), 养血解毒方组予养血解毒方水煎剂 ( $38.96\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 空白组和模型组予生理盐水, 每天 1 次, 每次  $0.2\ \text{mL}$ 。造模给药共 6 d, 于第 7 天取材。

体外实验选用 Hacat 细胞系, 状态良好消化重悬后接种于细胞板, 饥饿同步后, 予相应药物和刺激剂。模型采用  $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IL-17 进行诱导<sup>[8]</sup>。实验共分为空白组, 模型组, 养血组分组 ( $0.25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 解毒组分组 ( $0.125\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 养血解毒方组 ( $0.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

## 2.2 检测指标及方法

**2.2.1 小鼠银屑病样皮损表现及严重程度评分** 相机记录每日皮损变化, 并依据银屑病皮损面积和疾病严重程度标准从鳞屑、浸润、红斑 3 个方面评价给分, 得分相加为总积分, PASI 评分标准为 0 分 (无): 表面无红斑鳞屑可见、皮损与正常皮肤齐平; 1 分 (轻度): 部分皮损表面上覆有鳞屑, 以细碎鳞屑为主、皮损轻微高于正常皮肤表面、呈淡红色; 2 分 (中等度): 大多数皮损表面完全或不完全覆有鳞屑, 鳞屑呈片状、中等度隆起, 斑块边缘为圆或斜坡状、红色; 3 分 (重度): 几乎全部皮损表面覆有鳞屑, 鳞屑较厚呈层、皮损肥厚, 隆起明显、深红色; 4 分 (极重度): 全部皮损。对各组小鼠的各项评分取平均值以时间为横坐标绘制趋势线, 观察各组小鼠皮损的动态变化情况。

**2.2.2 小鼠皮肤表皮水分含量检测** 使用水油测试笔在第 7 天造模结束后, 对各组小鼠背部皮损处进行表皮水分含量检测。每只小鼠取同样部位进行检测, 每只小鼠检测 3 次后取平均数, 以观察各组小鼠角质层含水量的情况。

**2.2.3 苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠皮损组织**

形态学改变 小鼠处死后,剪取皮损处皮肤,用 10% 甲醛进行固定,脱水包埋、切片及 HE 染色。每个标本选 4 张染色切片观察组织病理学改变,并在 20 倍及 40 倍物镜下拍照,对 40 倍物镜下图片采用 ZEN 图像分析系统测量表皮厚度。

**2.2.4** 小鼠皮损的表皮细胞增殖 (ki67) 和分化 (loricrin) 分别采用免疫荧光法和免疫组化法检测小鼠皮损 ki67 和 loricrin 标记的表达。石蜡切片经脱蜡及抗原修复后,过氧化物酶封闭液室温封闭 10 min,山羊血清工作液 37 °C 孵育 30 min 后,ki67 (1:400),loricrin(1:200)一抗过夜孵育;ki67 用 488 标记荧光二抗(1:800)37 °C 孵育 1 h 后,用含 DAPI 的封片剂封片;loricrin 用羊抗兔增强酶标免疫球蛋白 G(IgG)抗体 37 °C 孵育 1 h 后显色封片。显微镜下观察各组表达情况。

**2.2.5** 免疫组化检测小鼠皮损的 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润情况 检测步骤同 2.2.4 项。一抗浓度为 1:50。显微镜下观察各组中 CD3<sup>+</sup>T 细胞的浸润情况。

**2.2.6** 免疫组化检测小鼠皮损的紧密连接蛋白 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达 采用免疫组化法检测小鼠皮损中的 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达定位。检测步骤同 2.2.4 项,一抗浓度均为 1:200,显微镜下观察各组蛋白的定位及表达情况。

**2.2.7** 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠皮损的紧密连接蛋白 claudin-7, occludin 蛋白的表达 研磨提取皮肤组织蛋白,BCA 试剂盒进行定量,加 5 倍 loading buffer 高温变性后,经电泳、快速电转,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,磷酸盐聚山梨酯缓冲液 (PBST) 稀释一抗, claudin-7 (1:100), occludin(1:1 000),4 °C 摇床过夜,二抗 PBST 稀释 (1:1 万),室温摇床避光孵育 1 h 后,扫膜获得图像。软件 Image J 对条带进行灰度值分析。

**2.2.8** CCK-8 法检测各组喷干粉对 HacaT 细胞的毒性 HacaT 细胞 1 万/孔接种于 96 孔板,贴壁 24 h 后洗去血清,饥饿 24 h 后,加入各浓度药物,干预 6 h 后,洗去药物,加入 10% CCK-8 检测液,孵育 2 h 后酶标仪 450 nm 波长检测吸光度 A,应用 Graph Pad Prism 6 对数据进行分析。

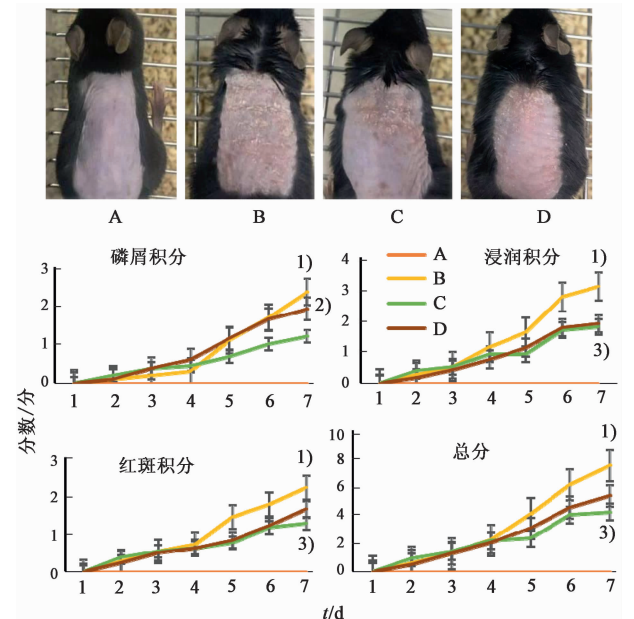
**2.2.9** 细胞免疫荧光检测 HacaT 细胞中 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达 HacaT 细胞 3 万/孔接种于 24 孔板,贴壁 24 h 后,洗去血清,饥饿 24 h 后,除空白模型组外加入各组药物干预 6 h 后,洗去药物,除空白组外,每组加入 1 mg·L<sup>-1</sup> 的 IL-17 干预

3 h 后。经固定、通透、封闭后,一抗孵育过夜, claudin-1 (1:50), claudin-7 (1:50), occludin (1:100);二抗用 488 标记荧光二抗(1:800)37 °C 孵育 1 h 后,含 DAPI 的封片剂封片。正置荧光光学显微镜下观察各组细胞的蛋白表达情况。

**2.3** 统计学方法 采用 Graph Pad Prism 6 分析软件进行单因素方差分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 LSD 法检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 养血解毒方对银屑病样小鼠皮损表现及严重程度评分的影响 空白组小鼠背部皮肤光滑,无红斑、鳞屑,颜色为肉红色。随着药物的涂抹,模型组皮损日益加重,与空白组比较,皮肤颜色逐渐变深,聚为红斑、鳞屑增多、皮肤浸润增厚明显,出现类似银屑病样皮损;与模型组比较,甲氨嘌呤组皮损明显改善,鳞屑覆盖明显减少,红斑减少,浸润明显减轻;养血解毒方组皮损明显减轻,鳞屑、红斑减少,皮肤明显变薄。PASI 评分趋势图提示,见图 1,各组小鼠在用药的第 2 天,出现了红斑、鳞屑、浸润等表现;各组用药 3 d 后在以上方面出现了较为明显的差异;在总积分图中,可看出模型组最为严重;与模型组比较,养血解毒方组严重程度明显降低,疾病发展趋势缓慢,甲氨嘌呤组皮损严重程度最轻。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 甲氨嘌呤组;D. 养血解毒方组(图 2~6 同);与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与甲氨嘌呤组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ (表 1~7,图 7 同)

图 1 养血解毒方对银屑病样皮损的干预作用

Fig. 1 Effect of Yangxue Jiedu decoction on psoriasis-like skin lesions

**3.2 养血解毒方对银屑病样小鼠表皮水分含量的影响** 水油笔检测结果,与空白组比较,模型组小鼠第 7 天表皮含水量显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,甲氨喋呤组和养血解毒方组小鼠表皮含水量显著升高 ( $P < 0.01$ );与甲氨喋呤组比较,养血解毒方组小鼠皮损表皮含水量明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 养血解毒方对银屑病样小鼠表皮含水量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 1 Effect of Yangxue Jiedu decoction on skin moisture content in psoriasis-like mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	含水量/%
空白	-	33.67 ± 1.05
模型	-	17.20 ± 0.52 <sup>1)</sup>
甲氨喋呤	0.001	24.18 ± 0.62 <sup>3)</sup>
养血解毒方	38.96	27.42 ± 0.83 <sup>3,4)</sup>

**3.3 养血解毒方对银屑病样小鼠表皮病理学变化的影响** 造模给药 6 d 后,空白组皮肤表皮薄,仅 2 ~ 3 层,皮下淋巴细胞浸润较少。模型组小鼠皮肤表皮层显著增厚,真皮大量淋巴细胞浸润,表皮突延长,角化不全,角质层细胞遗留细胞核,表皮棘层肥厚,基底细胞核分裂较多,类似银屑病样皮损改变。与模型组比较,给药组表皮厚度不同程度变薄,且角化不全细胞明显减少,淋巴细胞浸润也有不同程度减少。与空白组比较,模型组表皮显著增厚 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,甲氨喋呤组和养血解毒方组表皮厚度显著减少 ( $P < 0.01$ );养血解毒方组和甲氨喋呤组相比无明显差异。见图 2,表 2。

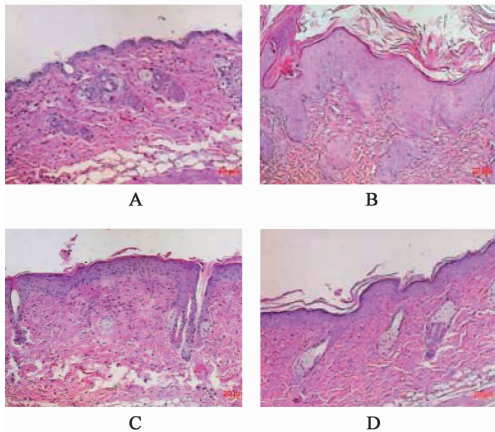


图 2 养血解毒方对银屑病样皮损病理学变化的影响 (HE,  $\times 200$ )  
Fig. 2 Effect of Yangxue Jiedu decoction on pathological changes of psoriasis-like skin lesions (HE,  $\times 200$ )

**3.4 养血解毒方对银屑病样小鼠表皮 ki67,loricrin 表达的影响** 绿色标记为阳性,空白组有极少量的

表 2 养血解毒方对银屑病样皮损表皮厚度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Yangxue Jiedu decoction on skin thickness of psoriasis-like skin lesions ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	表皮厚度/ $\mu m$
空白	-	12.23 ± 0.37
模型	-	89.35 ± 6.60 <sup>1)</sup>
甲氨喋呤	0.001	43.43 ± 2.33 <sup>3)</sup>
养血解毒方	38.96	42.79 ± 2.45 <sup>3)</sup>

阳性点分布在表皮基底层;与空白组比较,模型组中阳性点分布层数显著增多 ( $P < 0.01$ ),约 3 ~ 4 层;与模型组比较,甲氨喋呤组中阳性点分布显著减少 ( $P < 0.01$ ),基本呈单层线状分布。与模型组比较,养血解毒方组中阳性点显著减少 ( $P < 0.01$ ),分布占据 1 ~ 2 层。见表 3。免疫组化法检测各组小鼠皮损组织 loricrin 的表达情况,在空白组中,loricrin 主要表达在表皮的角质层,呈连续线性分布。与空白组比较,模型组中 loricrin 表达量明显减少,且染色渐至颗粒层;与模型组比较,甲氨喋呤组和养血解毒方组增加了 loricrin 的表达,且与甲氨喋呤组相比,养血解毒方组还可将 loricrin 浓缩至角质层,促进形成角质层屏障。见图 3。

表 3 养血解毒方对银屑病样皮损 ki67 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Yangxue Jiedu decoction on ki67 expression in psoriasis-like skin lesions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ki67 阳性细胞数/个	loricrin
空白	-	5.20 ± 0.73	16.40 ± 0.76
模型	-	85.00 ± 3.72 <sup>1)</sup>	6.50 ± 0.78 <sup>1)</sup>
甲氨喋呤	0.001	30.00 ± 2.07 <sup>3)</sup>	12.47 ± 0.44 <sup>3)</sup>
养血解毒方	38.96	35.20 ± 3.06 <sup>3)</sup>	14.60 ± 0.81 <sup>3)</sup>

**3.5 养血解毒方对银屑病样小鼠真皮 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润的影响** CD3 标记真皮中的 T 淋巴细胞。免疫组化法检测各组小鼠皮损中 CD3 表达,棕色颗粒沉淀为阳性点。在空白组中,真皮中少量棕色阳性颗粒,表皮未见棕色阳性颗粒。与空白组比较,模型组中真皮棕色阳性颗粒显著增多,表皮也出现棕色沉淀 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,甲氨喋呤组和养血解毒方组 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润显著减少 ( $P < 0.01$ )。见图 4,表 4。

**3.6 养血解毒方对银屑病样小鼠表皮紧密连接蛋白 claudin-1, claudin-7, occludin 表达的影响** 在空白组中,claudin-1, claudin-7 均标记表皮细胞胞膜,表达连续,呈完整网状。occludin 主要标记表皮细

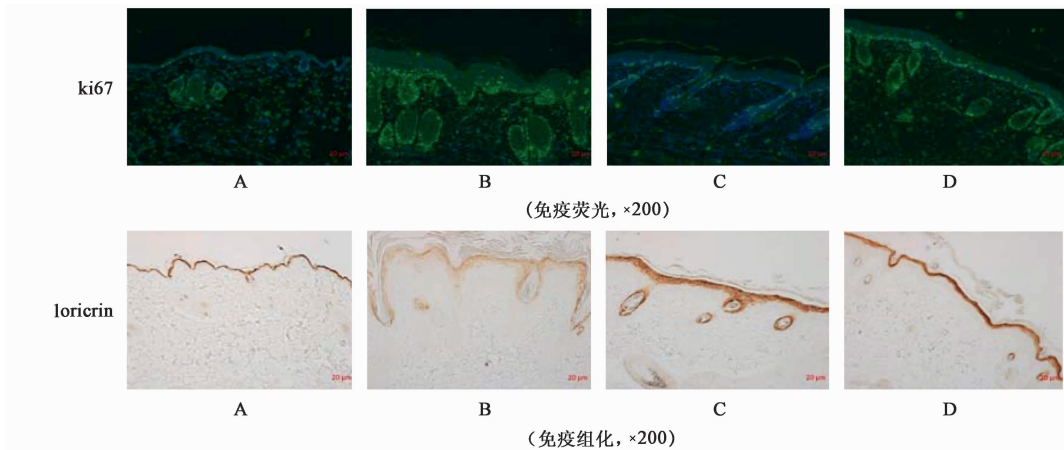


图 3 养血解毒方对银屑病样皮损 ki67 和 loricrin 表达的影响

Fig. 3 Effect of Yangxue Jiedu decoction on expression of ki67 and loricrin in psoriasis-like skin lesions

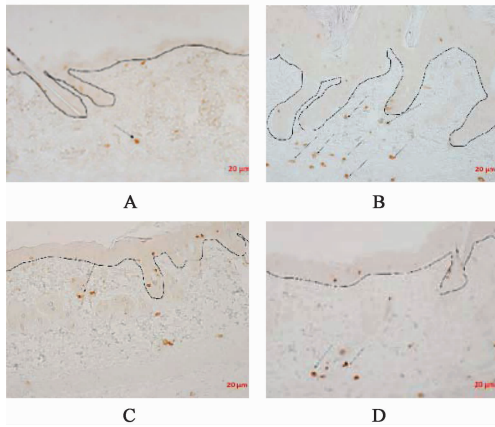


图 4 养血解毒方对银屑病样皮损 CD3 表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of Yangxue Jiedu decoction on CD3 expression in psoriasis-like skin lesions (IHC, ×200)

表 4 养血解毒方对银屑病样皮损 CD3 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Yangxue Jiedu decoction on CD3 expression in psoriasis-like skin lesions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CD3 阳性细胞数/个
空白	-	$1.40 \pm 0.25$
模型	-	$12.20 \pm 1.93^{1)}$
甲氨喋呤	0.001	$4.00 \pm 0.55^{3)}$
养血解毒方	38.96	$4.80 \pm 0.80^{3)}$

胞膜,胞浆也有少量表达,表达连续;与空白组比较,模型组中 3 种蛋白的表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ),且表达完整性严重破坏,其中 occludin 标记表皮全层出现异常定位。与模型组比较,甲氨喋呤组和养血解毒方组可不同程度增加 3 种蛋白的表达量 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且一定程度恢复表达的完整连续性。与甲氨喋呤组相比,养血解毒方组在

claudin-1, occludin 的表达增加上作用更好 ( $P < 0.05$ )。见图 5,表 5。

与空白组比较,模型组的 claudin-7, occludin 的表达量均显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,甲氨喋呤组的 claudin-7, occludin 的表达量均升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,养血解毒方组的 claudin-7 和 occludin 明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。在 occludin 的表达上,养血解毒方组较甲氨喋呤组有升高趋势,但无统计学差异。见图 6,表 6。

**3.7 养血组分、解毒组分、养血解毒方对 Haca 细胞活性的影响** 养血组分在  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,解毒组分在  $0.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,养血解毒方组在  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处显示出对 Haca 细胞无毒性,因此分别选用  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的养血组分,  $0.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的解毒组分,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的养血解毒方药物继续实验。见图 7。

**3.8 养血组分、解毒组分、养血解毒方对 IL-17 诱导的 Haca 表达 claudin-1, claudin-7, occludin 的影响** 与空白组比较,模型组的 3 种蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,解毒组分在 3 种蛋白的表达上均无明显变化;养血组分显著增高 claudin-1, claudin-7 表达 ( $P < 0.01$ ),也升高 occludin 的表达 ( $P < 0.05$ );养血解毒方组显著升高 claudin-7, occludin 表达 ( $P < 0.01$ ),明显升高 claudin-1 的表达 ( $P < 0.05$ )。见图 8,表 7。

#### 4 讨论

皮肤是人体免疫系统的第一道生理屏障,表皮通透屏障功能一直以来都是皮肤科临床工作中十分关注的热点。紧密连接是形成表皮通透屏障的重要部分,主要在表皮颗粒层发挥作用,形成有效的渗透性阻隔,维持内环境的稳态<sup>[8]</sup>。紧密连接蛋白可分为跨膜蛋白和胞浆蛋白。常见的跨膜蛋白有

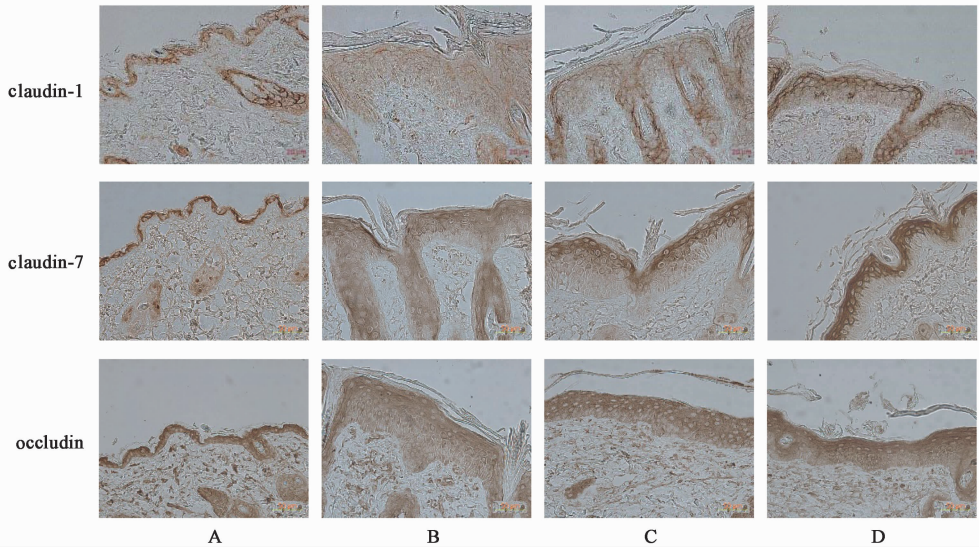


图 5 养血解毒方对银屑病样皮损 claudin-1, claudin-7, occludin 表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 5 Effect of Yangxue Jiedu decoction on expression of claudin-1, claudin-7, occludin in psoriasis-like skin lesions(IHC, ×200)

表 5 养血解毒方对银屑病样皮损 claudin-1, claudin-7, occludin 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Yangxue Jiedu decoction on expression of claudin-1, claudin-7, occludin in psoriasis-like skin lesions( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	claudin-1	claudin-7	occludin
空白	-	0.128 ± 0.014	0.257 ± 0.008	0.239 ± 0.012
模型	-	0.049 ± 0.006 <sup>1)</sup>	0.165 ± 0.003 <sup>1)</sup>	0.154 ± 0.009 <sup>1)</sup>
甲氨喋呤	0.001	0.078 ± 0.003 <sup>2)</sup>	0.203 ± 0.007 <sup>3)</sup>	0.187 ± 0.001 <sup>2)</sup>
养血解毒方	38.96	0.119 ± 0.007 <sup>3,4)</sup>	0.265 ± 0.025 <sup>2)</sup>	0.224 ± 0.009 <sup>3,4)</sup>

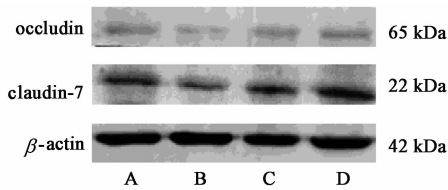


图 6 银屑病样皮损 claudin-7, occludin 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of expression of claudin-7, occludin in psoriasis-like skin lesions

表 6 养血解毒方对银屑病样皮损 claudin-7, occludin 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

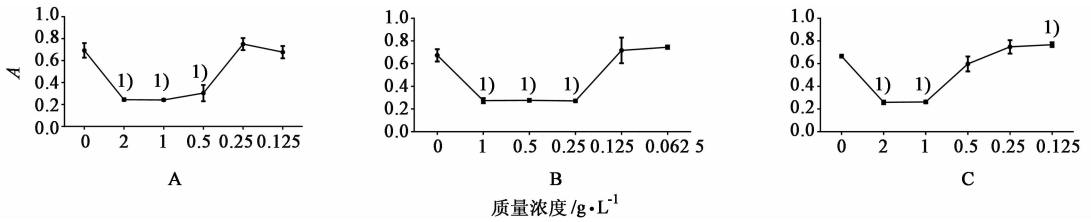
Table 6 Effect of Yangxue Jiedu decoction on expression of claudin-7, occludin in psoriasis-like skin lesions( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	occludin/ $\beta$ -actin	claudin-7/ $\beta$ -actin
空白	-	0.650 ± 0.013	0.466 ± 0.012
模型	-	0.455 ± 0.015 <sup>1)</sup>	0.233 ± 0.027 <sup>1)</sup>
甲氨喋呤	0.001	0.602 ± 0.01 <sup>3)</sup>	0.395 ± 0.041 <sup>2)</sup>
养血解毒方	38.96	0.637 ± 0.035 <sup>3)</sup>	0.386 ± 0.035 <sup>2)</sup>

occludin 和 claudins, 跨膜蛋白在细胞外与相邻细胞的跨膜蛋白相互作用, 形成“拉链样”吻合结构从而封闭细胞间隙; 跨膜蛋白的胞内域与胞浆蛋白(ZO

蛋白家族)等胞内蛋白相互连接, 后者作为桥梁连接跨膜蛋白和细胞骨架蛋白, 使细胞间紧密连接形成网状结构<sup>[9-10]</sup>。新近研究表明, 表皮细胞紧密连接功能障碍参与银屑病的发病<sup>[11-12]</sup>, 表皮紧密连接的异常可引起表皮细胞异常的增殖分化<sup>[12]</sup>, 进而破坏角质层屏障, 增加经皮水分丢失; 而皮肤屏障功能障碍时, 皮肤保水功能减弱, 水分流失增加, pH 升高, 皮肤增厚明显<sup>[13]</sup>; 另外, 破坏的紧密连接为免疫细胞的迁移提供便利, 加重免疫反应<sup>[11]</sup>; 几个方面者相互作用, 维持着皮损的慢性炎症反应, 最终表现为皮肤增厚、干燥, 疾病迁延难愈。因此, 银屑病治疗时, 除了针对免疫细胞异常活化外, 打破“紧密连接失调—表皮细胞异常增殖分化—皮肤屏障功能受损—加重炎症—紧密连接进一步破坏”的环路, 修复表皮屏障功能是防治银屑病的重要手段。

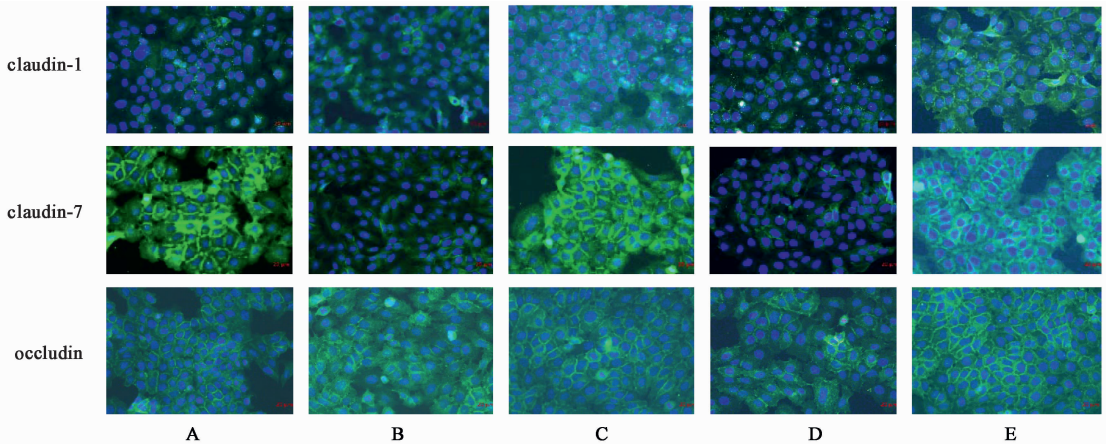
中医药治疗银屑病有着独特的优势, “从血论治”的血分辨证体系已得到行业的普遍认可。北京多家医院大样本流行病学研究发现血热证、血燥证、血瘀证为银屑病基本证候, 血燥证占 27.4%<sup>[14]</sup>。虽然血燥证比例不是最多, 但与血热证易缓解、病程短



A. 养血组分; B. 解毒组分; C. 养血解毒方组

图 7 养血组分、解毒组分、养血解毒方对 Hacat 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of Yangxue, Jiedu and Yangxue Jiedu decoction on Hacat cell activity ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



A. 空白组; B. 模型组; C. 养血组分; D. 解毒组分; E. 养血解毒方组

图 8 养血组分、解毒组分、养血解毒方对 Hacat 表达 claudin-1, claudin-7, occludin 的影响 (免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 8 Effect of Yangxue, Jiedu and Yangxue Jiedu decoction on expression of claudin-1, claudin-7, occludin in Hacat (IF,  $\times 200$ )

表 7 养血组分、解毒组分、养血解毒方对 Hacat 表达 claudin-1, claudin-7, occludin 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of Yangxue, Jiedu and Yangxue Jiedu decoction on expression of claudin-1, claudin-7, occludin in Hacat ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·L <sup>-1</sup>	claudin-1	claudin-7	occludin
空白	-	0.109 ± 0.009	0.152 ± 0.007	0.201 ± 0.002
模型	-	0.062 ± 0.007 <sup>1)</sup>	0.081 ± 0.007 <sup>1)</sup>	0.129 ± 0.015 <sup>1)</sup>
养血组分	0.25	0.131 ± 0.003 <sup>3)</sup>	0.133 ± 0.003 <sup>3)</sup>	0.180 ± 0.011 <sup>2)</sup>
解毒组分	0.125	0.064 ± 0.004	0.078 ± 0.008	0.143 ± 0.008
养血解毒方	0.5	0.127 ± 0.006 <sup>3)</sup>	0.148 ± 0.014 <sup>2)</sup>	0.179 ± 0.008 <sup>2)</sup>

及自愈倾向相比,其病程绵长,皮损持续存在,难以消退,是银屑病治疗的难点与重点之一。首都医科大学附属北京中医医院皮肤科经过多年研究提出血燥证病性为虚和毒<sup>[15]</sup>,血燥证患者热毒羁留体内,病久耗气伤血伤津,致阴血津液亏虚,肌肤失养,虚、毒共存,致皮损干燥,经久不消。正所谓“有诸内必形于外”。临床治疗以养血滋阴、润燥解毒为法,养血解毒方就是在此治法指导下形成的临床有效方剂。有研究发现,中药尤其补益药可通过恢复表皮

屏障治疗疾病,因此,本研究旨在基于表皮屏障的调控分子紧密连接,阐释养血解毒方的组方科学性<sup>[16]</sup>。

课题组前期初步证实了养血解毒方对 BALB/c 小鼠银屑病样模型的干预作用<sup>[17]</sup>,因此本实验在前期研究的基础上,选取最佳药物剂量进行研究。与前期实验不同的是,本实验选用 C57BL/6J 小鼠予咪喹莫特进行模型构建。咪喹莫特可通过激活 TLR 受体通路出现类似临床银屑病的表现,普遍认为较符合银屑病血热证表现<sup>[18]</sup>,而咪喹莫特作用于 C57BL/6J 小鼠,相较作用于 BALB/c 小鼠品系,其炎症反应严重程度轻,疾病进展更为缓慢<sup>[19]</sup>,类似慢性炎症期反应。此外, C57BL/6J 相较其他包括 BALB/c 在内的小鼠品系的给药表现与人类银屑病表现更为相近<sup>[20]</sup>。IL-17 是银屑病皮损区的主要致炎因子,研究发现,IL-17 可对紧密连接进行攻击,通过降低 claudin-1, claudin-7, occludin 蛋白的表达,破坏紧密连接的完整性<sup>[21]</sup>。因此,为了模拟银屑病发病的微环境,选用 IL-17 刺激角质形成细胞 (Hacat 细胞) 作为模型进行研究,观察养血解毒方及其拆方组分直接对角质形成细胞紧密连接表达的影响。



本研究动物实验显示,养血解毒方可明显改善咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠皮损症状,降低 PASI 评分,增加小鼠表皮含水量,证实了其对受损表皮通透屏障的修复功能。病理结果提示,养血解毒方可显著降低表皮细胞的过度增殖及角化不全,并减少皮肤 T 淋巴细胞的激活浸润。进一步研究发现,养血解毒方可增加皮损区紧密连接蛋白 claudin-1, claudin-7, occludin 的表达并恢复其定位连续性,明确了养血解毒方对紧密连接的调节作用,并提示养血解毒方可能是通过调节紧密连接打破恶性循环,纠正异常的表皮细胞分化增殖过程,促进表皮通透屏障的恢复,从而缓解银屑病样皮损。结合体外实验直接观察养血解毒方不同组分对紧密连接的修复作用,研究发现,养血组分、解毒组分、养血解毒方全方对于 IL-17 诱导的角质形成细胞间紧密连接的破坏均有一定的恢复作用,但是养血组分在增加蛋白表达量、尤其是形成紧密连接的完整性上明显优于解毒组,养血组分和养血解毒方全方对紧密连接的修复无明显差异,提示养血解毒方中养血组分可直接作用于表皮细胞紧密连接,并对其进行调节。

综合以上研究结果,养血解毒方可通过调节银屑病皮损区表皮细胞紧密连接的表达恢复受损的皮肤屏障功能,打破“紧密连接失调—表皮细胞异常增殖分化—皮肤屏障功能受损—加重炎症—紧密连接进一步破坏”的恶性循环,改善表皮的修复环境,从而达到滋阴润燥、养血解毒的目的,实现银屑病的治疗效果。并且,修复被炎症因子破坏的表皮细胞间的紧密连接是该方养血组分的主要靶点。这可能是中医“养血润燥法”治疗银屑病的科学依据之一。

#### [参考文献]

[1] 叶理,宋军,林杰,等. 自制保湿剂对银屑病复发的预防作用[J]. 皮肤科学通报,2017,34(4):478-482.

[2] 朱传美,汪海珍,杨志波,等. 润肤保湿乳膏治疗血虚风燥型银屑病[J]. 吉林中医药,2015,35(3):268-271.

[3] 赵京霞,王燕,底婷婷,等. 表皮细胞紧密连接在银屑病发病机制中的作用[J]. 中国皮肤性病杂志,2019,33(4):473-476.

[4] 陈维文,周冬梅,王萍,等. “辨血为主,从血论治”规范化方药辨证治疗寻常型银屑病研究[J]. 中华中医药杂志,2015,30(10):3614-3618.

[5] 李双庚,王红霞,周珍萍. 养血解毒方对寻常型银屑病患者皮肤屏障功能的影响[J]. 环球中医药,2016,9(9):1130-1132.

[6] vander Fits L, Mourits S, Voerman J S, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in

mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis [J]. J Immunol, 2009, 182(9): 5836-5845.

[7] 阮智通,底婷婷,王燕,等. 养血解毒汤对咪喹莫特诱导的 STAT3 转基因小鼠银屑病样皮损的干预作用[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(6):1091-1098.

[8] Ishida-Yamamoto A, Kishibe M, Murakami M, et al. Lamellar granule secretion starts before the establishment of tight junction barrier for paracellular tracers in mammalian epidermis [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31641.

[9] 刘求明,朱杰,郭晓红. 紧密连接的构成、装配及其调控研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2018,48(3):287-296.

[10] Svoboda M, Bilkova Z, Muthny T. Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? [J]. J Dermatol Sci, 2016, 81(3): 147-152.

[11] Brandner J M, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, et al. Epidermal tight junctions in health and disease [J]. Tissue Barriers, 2015, 3(1/2): e974451.

[12] Kirschner N, Brandner J M. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1257: 158-166.

[13] 刘媛,王葳,王妍,等. 参苓白术散对皮肤机械屏障功能障碍小鼠神经酰胺再利用途径相关酶  $\beta$ -GCase 及 ASM 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):112-119.

[14] ZHANG G Z, WANG J S, WANG P, et al. Distribution and development of the TCM syndromes in psoriasis vulgaris [J]. J Tradit Chin Med, 2009, 29(3): 195-200.

[15] 张广中,王萍,王莒生,等. 2 651 例寻常型银屑病中医证候分布和演变规律研究[J]. 中医杂志,2008,49(10): 894-896.

[16] 王丽芬,叶建州,杨雪松. 健脾养血祛风汤治疗血虚风燥型特应性皮炎患者临床疗效及对患者皮肤屏障功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13): 178-182.

[17] 底婷婷,赵京霞,阮智通,等. 基于“血分蕴毒”理论的银屑病优化组方对咪喹莫特诱导小鼠皮损的干预作用[J]. 中华中医药杂志,2015,30(5): 1733-1737.

[18] 张瑞,白明,苗明三. 基于中西医临床病证特点的银屑病动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13): 170-175.

[19] 吴剑平,谢倩,陈林,等. 咪喹莫特对 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较[J]. 中国比较医学杂志,2018,28(9):1-6.

[20] Swindell W R, Michaels K A, Sutter A J, et al. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis [J]. Genome Med, 2017, 9(1): 24.

[21] Yuki T, Tobiishi M, Kusaka-Kikushima A, et al. Impaired tight junctions in atopic dermatitis skin and in a skin-equivalent model treated with interleukin-17 [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e161759.

[责任编辑 周冰冰]