

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.014

黄芪注射液联合阿维 A 对小鼠银屑病模型的影响

闫铁夫

(辽宁医学院附属第一医院皮肤科, 锦州 121000)

【摘要】目的:观察黄芪注射液联合阿维 A 对小鼠银屑病模型的影响。**方法:**研究黄芪注射液联合阿维 A 对小鼠阴道上皮有丝分裂、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、尾部鳞片表皮颗粒层形成及血浆内皮素-1(endothelin-1, ET-1)的影响。**结果:**黄芪注射液联合阿维 A 对上述 4 个指标均有作用,与对照组比较,差异有统计学意义(P 均 <0.001),其中对小鼠阴道上皮有丝分裂和 PCNA 有明显的抑制作用,对小鼠尾部表皮增厚和颗粒形成具有明显的促进作用,对 ET-1 具有明显的抑制作用。**结论:**黄芪注射液联合阿维 A 具有改善和逆转小鼠银屑病病理模型的作用,其机理可能与抑制表皮细胞过度增生和促进颗粒层形成有关,其作用可能是阻断多个发病环节。

【关键词】黄芪;阿维 A;银屑病;模型**【中国图书分类法分类号】**R758.63**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-02-20

Effects of Radix Astragali injection combined with Acitretin on psoriasis mice model

YAN Tiefu

(Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the therapeutic effects of Radix Astragali injection combined with Acitretin on psoriasis mice model. **Methods:** Effects of Radix Astragali injection combined with Acitretin on proliferation of vaginal epithelium, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression, differentiation of tail scale epidermis and plasma endothelin-1(ET-1) were assessed in mice model. **Results:** Radix Astragali injection combined with Acitretin had effects on all 4 indices mentioned above. Radix Astragali injection combined with Acitretin can significant inhibit vaginal epithelium proliferation, PCNA expression and plasma ET-1 as well as promote the differentiation of tail scale epidermis with statistical differences compared with those in control group ($P<0.001$). **Conclusions:** Radix Astragali injection combined with Acitretin can improve and reverse psoriatic pathology model in mice, the mechanism of which may relate with the inhibition of epidermal cell over-proliferation and the promotion of granular layer formation. Its therapeutic effects may be explained by blocking multiple pathogenetic linkages.

【Key words】Radix Astragali; Acitretin; psoriasis; model

银屑病是一种常见的红斑鳞屑性慢性皮肤病,其病因和发病机制复杂,治疗方法虽多,但疗效欠佳。银屑病的基本病理特点为皮损部位表皮细胞过度增殖和角化不全。近年来临床多采用维 A 酸类药物治疗银屑病类疾病。维生素 A 是人体的必需物质,在维持人体某些生理功能上具有重要作用。阿维 A 是第 2 代维 A 酸衍生物,属非脂溶性,体内半衰期短,可以迅速从机体内清除,其口服生物利用度为 35%~95%。阿维 A 治疗银屑病的作用机制是影响细胞增殖、分化,降低细胞粘聚力,调节表皮角质形成细胞,同时也抑制角质形成细胞增殖。阿维 A 还具有抗炎和免疫调节作用,抑制中性粒细胞产生炎性介质,对中性粒细胞游走起到抑制作用。黄

芪注射液是中药黄芪的提取液(每 1 ml 相当于黄芪 2 g)。在临床工作中,试用黄芪注射液治疗银屑病患者收到一定疗效,同时对黄芪注射液联合阿维 A 进行了动物实验的对比研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

黄芪注射液(生产厂家:成都地奥玖泓制药厂,批号:Z51021775),口服阿维 A 胶囊(商品名:方希,生产厂家:重庆华邦制药有限公司生产,批号:H20010126)。RPMI1640 培养基和二甲基亚砜(生产厂家:GIBCO),刀豆蛋白 A(ConA)(生产厂家:Sigma 公司)。

1.2 实验动物

采用昆明种远交系小鼠,中科院上海动物实验中心提供,合格证号:SCXK-2010-0001。实验用药剂量为《中华人民共

作者简介:闫铁夫, Email: yantiefu1111@163.com,

研究方向:皮肤医学。

和国药典》临床用量的 10 倍。黄芪注射液的用量为 1 ml/kg;阿维 A 灌胃给药,剂量为 0.5 g/kg;黄芪注射液和生理盐水均以腹腔注射给药。

1.3 实验方法

1.3.1 对小鼠雌激素期阴道上皮有丝分裂及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的影响 取体质量(22±2) g 雌性健康小白鼠 60 只,均腹腔注射乙烯雌酚 0.2 mg/只,每日 1 次,连续 3 d,使其处于雌激素期,然后将其随机分 4 组,每组 15 只,分别为正常对照组、单纯黄芪注射液组、单纯阿维 A 灌胃组、黄芪注射液联合阿维 A 组。每日注射及灌胃给药 1 次,连续 14 d,末次给药后 2 h 腹腔注射秋水仙碱 2 mg/kg,6 h 后处死小鼠。取其阴道组织,用 10%福尔马林固定,HE 染色,光镜下计数 300 个阴道上皮基底细胞的有丝分裂数,其百分率为有丝分裂指数。

PCNA 表达所用模型和给药方法参考文献[1],PCNA 染色采用南京建成生物公司的 SABC 染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒,结果判定:观察 50 个高倍镜视野,记录细胞核棕黄色染色为阳性。每个视野观察 2 个指标:以标准<20%为 1;20%~50%为 2;>50%为 3,反应阳性反应细胞的比例;以在阳性反应细胞中多数细胞核浅着色为 1;多数深着色边界清楚为 2。以上两项相加等于 2 为(+);等于 3 为(++);≥4 为(+++),阳性反应着色深度。

1.3.2 药物对小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成及血浆内皮素-1(endothelin-1,ET-1)的影响^[2] 取 60 只雄性小鼠随机分为 4 组,每组 15 只。第 1 组正常对照组腹腔注射生理盐水,第 2 组腹腔注射黄芪注射液,第 3 组单纯阿维 A 灌胃组,第 4 组黄芪注射液联合阿维 A,均每日 2 次,共 14 d,然后处死小鼠,去眼球取血 2 ml,注入含 EDTA_{Na} 30 μl 和抑肽酶 40 μl 的试管中,混匀,4 ℃,3 000 r/min,离心 10 min,分离血浆。内皮素由南京建成生物研究所提供试剂盒采用放射免疫法测定,操作步骤按试剂盒说明。另外切取小鼠尾部距尾根约 1.5 cm 处背部皮肤一段,用 10%福尔马林固定,石蜡包埋,HE 染色,光镜观察。检测每个标本的鳞片表皮有无颗粒层的形成。以鳞片有无连接成行的颗粒层细胞认定为是否为有颗粒层的鳞片。每 100 个鳞片中有颗粒层的鳞片数计数统计,与正常对照组作比较^[3-4]。

1.4 统计学处理

采用统计软件 SPSS 16.0 进行统计学处理,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。多组间计量资料的比较采用方差分析,如数据方差不齐,数据进行对数转换后进行方差分析,若参数有意义,进一步行两两比较(*SNK-q* 检验);有序多分类资料采用 *Kruskal-Wallis H* 秩和检验(*H* 检验)。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

黄芪注射液、阿维 A、黄芪注射液联合阿维 A 均显著抑制小鼠阴道上皮细胞有丝分裂,方差分析显示,各组间差异具有统计学意义($F=16.646, P<0.001$),经 *SNK-q* 检验,各实验组与正常对照组间差异有统计学意义($P<0.05$)。黄芪注射液、阿维 A、黄芪注射液联合阿维 A 均显著抑制小鼠阴道上

皮细胞 PCNA 的表达,经有序变量多组样本的 *Kruskal-Wallis H* 秩和检验,4 个组别间差异有统计学意义(基底层和棘层 χ^2 分别为 20.261 和 26.373, P 值均<0.001。黄芪注射液、阿维 A、黄芪注射液联合阿维 A 均可促进鼠尾鳞片表皮颗粒层的形成,经方差分析,4 个组别间差异有统计学意义($F=36.387, P<0.001$),黄芪注射液和甲氨蝶呤均可显著降低小鼠血浆 ET-1 水平,经方差分析,4 个组别间差异有统计学意义($F=66.843, P<0.001$),经 *SNK-q* 检验,与正常对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1~3。

表 1 黄芪注射液联合阿维 A 对小鼠雌激素期阴道上皮有丝分裂的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of Radix Astragali injection combined with Acitretin on proliferation of vaginal epithelium ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (<i>n</i>)	剂量	有丝分裂指数
正常对照组	15	0	23.01 ± 3.33
黄芪注射液组	15	1 ml	16.88 ± 5.92 ^a
阿维 A 组	15	0.5 g	15.72 ± 4.31 ^a
黄芪注射液联合阿维 A 组	15	1 ml ± 0.5 g	11.13 ± 4.64 ^a

注:与对照组相比,a, $P<0.05$

表 2 黄芪注射液联合阿维 A 对小鼠雌激素期阴道上皮 PCNA 阳性表达的影响

Tab.2 Effects of Radix Astragali injection combined with Acitretin on PCNA expression

组别	例数 (<i>n</i>)	视野 例数	基底层(视野例数)			棘层(视野例数)		
			+	++	+++	+	++	+++
正常对照组	15	50	2	6	42	15	17	18
黄芪注射液组	15	50	6	15	29	33	5	12
阿维 A 组	15	50	5	18	27	34	6	10
黄芪注射液联合阿维 A 组	15	50	9	21	20	40	6	4

表 3 黄芪注射液联合阿维 A 对小鼠尾部鳞片表皮颗粒层形成及血浆 ET-1 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effects of Radix Astragali injection combined with Acitretin on tail scale epidermis and plasma ET-1 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	例数 (<i>n</i>)	SG/100 [#]	ET-1
正常对照组	0	15	6.43 ± 1.33	36.62 ± 4.52
黄芪注射液组	1 ml	15	14.31 ± 2.92 ^a	23.12 ± 3.81 ^a
阿维 A 组	0.5 g	15	13.18 ± 2.65 ^a	21.71 ± 4.60 ^a
黄芪注射液联合阿维 A 组	1 ml ± 0.5 g	15	16.03 ± 3.47 ^a	15.67 ± 3.72 ^a

注: #, 100 个鳞片中有颗粒层的鳞片数;与正常对照组相比,a, $P<0.05$

3 讨 论

银屑病是人类所特有的常见且易反复发作的顽固性皮肤病。银屑病的基本病理变化兼有表皮增生和角化不全两个特点。目前一些新药治疗银屑病的临床效果如何,还是一个未知数,因此以银屑病

小鼠为模型,给予其抗银屑病治疗,以得出数据,为临床治疗银屑病提供依据。由于处于雌激素期小鼠的阴道上皮细胞增殖活跃,上皮细胞转换加快,小鼠尾部表皮结构和银屑病患者相似^[5-6],因此以处于雌激素期的小鼠阴道上皮和尾部表皮为模型作为研究对象。

血浆血管内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 作为银屑病病理过程中重要的血管活性因子,具有促进血管增殖、形成及趋化中性粒细胞的作用^[7-8],本研究以血浆 ET-1 水平反映中性粒细胞趋化程度、真皮微血管形成;以小鼠阴道上皮模型和小鼠阴道上皮 PCNA 表达模拟银屑病的表皮增殖过快;以小鼠尾部鳞片缺乏颗粒层模拟银屑病表皮分化不全。本研究发现银屑病患者血浆及皮损内 ET-1 水平增高,且与银屑病面积与严重指数 I 评分显著相关,据此可以推测通过药物抑制血浆 ET-1 水平,能够减少银屑病皮损内新血管的形成数目,抑制角质形成细胞增殖,减轻炎症反应,达到治疗银屑病的目的。将上述 4 个指标结合可更充分地反应药物对银屑病的治疗作用。

中医学认为,血瘀是寻常型银屑病发生及发展的病理基础。研究证实,通过改善银屑病患者微循环及血液流变学状况对银屑病具有治疗作用。其病理机制中存在微循环功能障碍,可能与银屑病角质形成细胞增殖过快、炎症反应和代谢紊乱相关。银屑病中医症状为血行不畅,瘀血内生,从而皮肤出现红斑、鳞屑和丘疹;其病理过程虽有热、燥、湿、毒等症状,但关键是“瘀”。中医以活血化瘀可使瘀血得去,气血经络调达,去除疾病^[7]。同时近年来,从银屑病的中医发病机制出发,研究认为银屑病以血为本,血热为先,血燥、血虚在后,血毒是疾病的恶性发展,血瘀贯穿疾病的全过程^[8]。因此,活血可作为治疗银屑病的基本原则,用于治疗各种证型的银屑病。黄芪应用于银屑病的凉血活血复方继承了中国中医理论及中医验方,具有凉血、理湿、活血等功效,现代大量动物实验和临床研究也证实其对银屑病有较好疗效。黄芪注射液含有黄芪的主要有效成分,现代药理学实验证实其具有增强免疫和调节免疫功能。以往实验及临床验证证明黄芪注射液能有效治疗银屑病,但其抗病机制鲜有报道。而同样阿维 A 是目前治疗银屑病的主要用药之一,它通过调节表皮细胞的终末分化阶段,抑制角质形成细胞增生,同时能抑制中性粒细胞趋化,从而抑制银屑病皮损部位角质形成细胞的异常增殖和分化,国内已有较多的临床验证,但其抗病机制也尚不完全明了。

实验表明黄芪注射液、阿维 A、黄芪注射液联合阿维 A 均显著抑制小鼠阴道上皮细胞有丝分裂和

PCNA 表达,与正常对照组比较差异有统计学意义。黄芪注射液、阿维 A、黄芪注射液联合阿维 A 均可促进鼠尾鳞片表皮颗粒层的形成,与正常对照组比较差异有统计学意义。黄芪注射液联合阿维 A 对上述 4 个指标均有明显调节作用,与单用阿维 A 胶囊治疗或者单用黄芪注射液比较,黄芪注射液联合阿维 A 能够有效的提高治疗的有效率,这对临床疗效是一种佐证。提示黄芪注射液联合阿维 A 具有明显的高效改善和逆转银屑病病理模型的作用,临床治疗可以采用,其机理可能是在银屑病发病机制中,通过阻断多个发病环节而起到对银屑病的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] 黄 畋,林熙然.利用实验动物模型研究中草药内用治疗银屑病的作用[J].中西医结合杂志,1984,4(7):428-429.
Huang T, Lin X R. Animal models used to study the therapeutic effect and mechanism of Chinese herbal drugs in the treatment of psoriasis [J]. Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1984, 4 (7): 428-429.
- [2] Bonifati C, Mussi A, Carducci M, et al. Endothelin-1 levels are increased in sera and lesional skin extracts of psoriatic patients and correlate with disease severity[J]. Acta Derm Venereol, 1998, 78(1): 22-26.
- [3] 苗明三.实验动物和动物实验技术[M].北京:中国中医药出版社,1997:266.
Miao M S. Experimental animal and animal experimental technology[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 1997: 266.
- [4] Odom R B. 安德鲁斯皮肤病学[M]. 9 版. 北京:科学出版社,2008: 221.
Odom R B. Andrews' diseases of the skin[M]. 9th ed. Beijing: Science Press, 2008: 221.
- [5] 侯素春,刘晓明.六种中药方剂灌胃对小鼠上皮细胞增殖和表皮细胞分化及血浆内皮素 1 的影响[J].中华皮肤科杂志,2003,36(3): 167-168.
Hou S C, Liu X M. Effect of six Chinese medicinal formulae on proliferation of epithelium and differentiation of epidermic cells and plasma endothelin 1 via intragastric administration for mice[J]. Chinese Journal of Dermatology, 2003, 36(3): 167-168.
- [6] 刘海杰,史新明,欧阳恒,等.仙方消银片对银屑病模型小鼠尾部鳞片颗粒层细胞形成的影响[J].岭南皮肤性病杂志,2006,13(2): 81-83.
Liu H J, Shi X M, Ouyang H, et al. Study on the efficacy of Xianfangxi-aoyin pian on the granular cell proliferation in flake of the mouse tail[J]. Southern China Journal of Dermato-Venereology, 2006, 13(2): 81-83.
- [7] 刘晓明,齐 欣,宋智琦,等.黄芪注射液治疗银屑病患者的临床观察和实验研究[J].中华皮肤科杂志,2001,34(2):113-115.
Liu X M, Qi X, Song Z Q, et al. Clinical and experimental observation on treatment of psoriasis with radix astragali injectio[J]. Chinese Journal of Dermatology, 2001, 34(2): 113-115.
- [8] 李勤劳,程 月,刘继平,等.银屑颗粒对小鼠尾部皮肤鳞片颗粒层形成的影响[J].陕西中医学院学报,2006,29(4):48-50.
Li Q L, Cheng Y, Liu J P, et al. Effect of Yinxie granule on formation of scaly skin granular layer in mice's tail[J]. Journal of Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, 2006, 29(4): 48-50.

(责任编辑:冉明会)