

· 药理 ·

清热活血解毒复方(QHJD)对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞增殖和凋亡的影响

郭健, 刘瓦利*

(中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 研究中药清热活血解毒复方(QHJD)对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导的人永生角质形成细胞株(HaCat)增殖和凋亡的影响, 为治疗银屑病的可能作用机制提供依据。方法: 体外培养 HaCat 细胞, 将高、中、低(30, 25, 20 g·L⁻¹)质量浓度的 QHJD 水提物分别作用于 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 24 h, 采用倒置显微镜观察 QHJD 水提物处理后的 HaCat 细胞形态学改变; 采用 CCK-8 技术检测 QHJD 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞增殖的影响; 采用流式细胞术检测 QHJD 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞凋亡的影响; 采用 Western blot 技术检测 QHJD 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病-x1(Bcl-x1), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达的影响; 采用 Real-Time PCR 技术检测清热活血解毒复方对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 Bcl-x1, Bax mRNA 表达的影响。结果: 与空白组比较, QHJD 各组细胞镜下单位面积的细胞均呈现数量减少, 细胞体积缩小, 细胞间连接变少或是消失, 细胞间隙变大; QHJD 各组均可抑制 HaCat 细胞的增殖, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中 QHJD 中、高剂量组极显著($P < 0.01$); QHJD 中、高剂量组可以促进 HaCat 细胞的凋亡, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中高剂量组促进 HaCat 细胞凋亡更明显($P < 0.01$); QHJD 各组 Bax 蛋白表达均有上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$); QHJD 各组 Bax mRNA 表达均有上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: QHJD 可能通过上调 Bax 蛋白和 mRNA 的表达, 来诱导角质形成细胞的凋亡, 进而抑制 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞的增殖, 以发挥治疗银屑病的作用。

[关键词] 清热活血解毒复方; 银屑病; HaCat; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞增殖; 凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-x1; Bcl-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0083-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040083

Effects of Qingre Huoxue Jiedu Complex Prescription on Apoptosis and Proliferation of TNF- α -induced HaCat Cells *in Vitro*

GUO Jian, LIU Wa-li*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription (QHJD) on the apoptosis and proliferation of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) induced HaCat cell *in vitro*, in order to provide basis for revealing potential mechanism for treating psoriasis. **Method:** TNF- α -induced HaCat cells *in vitro* were cultured and exposed to the crude extract of QHJD with low, middle and high concentrations. Morphological changes were observed under inverted microscope. Cell proliferation was detected by CCK-8 method. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. Expression levels of Bcl-x1 and Bax protein of HaCat cell was detected by Western blot method. Expression levels of Bcl-x1 and Bax mRNA expressions of HaCat cell was detected by Real-Time PCR. **Result:** Compared to the blank group, the QHJD groups showed a reduction in the number of cells per unit

[收稿日期] 20150507(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273762)

[第一作者] 郭健, 博士, 从事中西医结合治疗银屑病的临床与科研, Tel: 18515025282, E-mail: 2629211941@qq.com

[通讯作者] * 刘瓦利, 博士生导师, 主任医师, 从事中药治疗银屑病的机制研究, Tel: 010-88001332, E-mail: yawlsw@yahoo.com.cn

area under the microscope and cells volume, decrease or disappearance of connections between cells, and enlargement in intercellular space; all the QHJD groups can inhibit the HaCat cells proliferation ($P < 0.05$), with statistically significant difference ($P < 0.05$). Specifically, and the high-dose group can inhibit the HaCat cells proliferation obviously ($P < 0.01$); the QHJD groups can increase the expression level of Bax protein, with statistically significant difference ($P < 0.05$); the QHJD groups can increase the expression level of Bax mRNA, with statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** QHJD might inhibit the TNF- α -induced HaCat cells proliferation and treat psoriasis by up-regulating the expression of Bax protein and mRNA and inducing apoptosis.

[**Key words**] Qingre Huoxue Jiedu complex prescription; psoriasis; HaCat; tumor necrosis factor- α ; proliferation; apoptosis; Bcl-xl; Bax

银屑病是一种临床常见的以角质形成细胞异常分化增殖为基本特征的慢性炎症性皮肤病,皮损为特征性红斑、丘疹、鳞屑。西医学认为,其发病与诸多方面因素有关,但具体发病机制尚不明确^[1-2]。中医学目前多认为“血分有热”是银屑病的主要病因^[3-5]。其证候分布、规律演变和辨证分型大样本临床研究结果表明血热证为寻常型银屑病主要证型,占到了 53.8%^[6]。而且多项随机对照临床试验表明,清热凉血解毒疗法对于寻常型银屑病血热证疗效确切^[7-12]。清热活血解毒复方(QHJD)是本科治疗“血热证”寻常型银屑病的经验用方,临床疗效显著。本实验以体外培养经肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的 HaCat 细胞为研究对象,观察清热活血解毒复方提取物对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞增殖,凋亡和凋亡基因 Bcl-xl, Bax 蛋白, mRNA 表达的影响,对其治疗银屑病的作用机制进行探讨。

1 材料

1.1 细胞株 HaCat 细胞(上海瑞齐生物科技有限公司)。

1.2 药物及试剂 清热活血解毒复方:由生槐花、赤芍、地黄、紫草、牡丹皮、土茯苓、草河车、当归等组成(广安门中医院药剂科提供)。新型细胞增殖及毒性检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司),ecombinant Murine TNF- α (美国 Peprotech 公司),PVDF 膜(美国 Milipore 公司),Bax 抗体和 Bcl-xl 抗体(博士德生物公司,批号分别为 BA0315-2, BA0413);多功能 DNA 纯化回收试剂盒, BM2000 DNA Marker(美国 Bio-Med 公司);超纯 RNA 提取试剂盒, HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒和 SYBR Green PCR Mixture(康为世纪生物公司)。

1.3 仪器 IX72 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon

公司), ELX-800 型全自动酶标仪(美国 Biotek 公司), Fas caliber 流式细胞仪(美国 BD 公司), Multiskan Mirco-plate reader(美国 Thermo 公司), VE180 Mini-protean 3 Dodeca(中国天能公司), DYCP-31DN 型多功能水平电泳设备(中国北京六一仪器厂), ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), Tanon-6600 型凝胶成像仪(中国天能公司), UV-2000 型分光光度计(中国上海尤尼柯公司)。

2 方法

2.1 分组和造模 选择对数生长期生长状态良好的 HaCat, 以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TNF- α 诱导 24 h, 再以高 ($30 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 中 ($25 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 低 ($20 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 质量浓度的清热活血解毒复方水提物作用 HaCat 细胞 24 h, 同时以 DMEM 培养基组为空白。

2.2 清热活血解毒复方的制备 将药材煎煮 2 次, 过滤, 取滤液, 合并 2 次滤液, 减压浓缩, 真空干燥, 收集药粉, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。细胞培养时取药粉 1 g(相当于原生药 3.32 g), 用 DMEM 高糖培养液稀释到相应终质量浓度, 分别为 $20, 25, 30 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 调节 pH 7.0, 即可。

2.3 细胞培养 将 HaCat 细胞接种于含 10% 胎牛血清, $100 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、链霉素的 DMEM 培养液的培养瓶中, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养。隔天换液 1 次, 实验选用细胞为换液 24 h 后对数生长期的细胞。

2.4 荧光倒置显微镜下观察细胞形态学变化 镜下观察清热活血解毒复方作用 24 h 的 HaCat 细胞形态学的变化, 拍照备用。

2.5 CCK-8 法检测清热活血解毒复方对细胞增殖的抑制率 制备单细胞悬液, 细胞密度 1×10^5 个/mL; 96 孔板接种, 贴壁培养; 当细胞融合度约 80%, 先以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TNF- α 诱导 24 h, 换入高、中、低质量浓度的清热活血解毒复方干预剂(实验孔), 同时

以 DMEM 培养基孔为对照;达到作用时间后,添加新型细胞增殖及毒性检测溶液;培养箱孵育 2 h;酶标仪在 450 nm 处检测各孔的吸光度 A 。重复 3 次。计算生长抑制率及半数抑制浓度 (IC_{50})。细胞增殖抑制率的计算公式如下:

$$\text{细胞抑制率} = \frac{(A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{对照组}})}{\times 100\%}$$

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 以 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TNF- α 诱导细胞 24 h;添加高、中、低质量浓度的清热活血解毒复方干预剂作用细胞 24 h,同时以 DMEM 培养基组为对照;达到作用时间后,0.25% 胰酶消化,常规离心收集细胞,调整细胞为密度 1×10^5 个/mL;按试剂盒说明书对细胞进行染色,并用流式细胞仪检测。重复 3 次。

2.7 Western blot 检测 Bcl-xl, Bax 蛋白的表达

2.7.1 蛋白提取 预 RIPA 蛋白抽提试剂,加入蛋白酶抑制剂 Protease inhibitor cocktail;加入 RIPA 裂解液于细胞沉淀中;冰上孵育 20 min,离心取上清,分装, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 度保存,待测。

2.7.2 BCA 法蛋白定量 配制 BCA 工作液,稀释并调制质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;滴加待测样品于样品孔中,补足至 $20 \mu\text{L}$;加入 $200 \mu\text{L}$ BCA 工作液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 30 min;测定 $A_{570 \text{ nm}}$,绘制标准曲线图并计算蛋白浓度。

2.7.3 蛋白浓度调整 样品终质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,加入 $5 \times$ 蛋白样品缓冲液, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 5 min。

2.7.4 WB 实验 配制分离胶,浓缩胶;上待检测蛋白样品;电泳;转法,转膜;封闭;一抗孵育;次日,洗膜;二抗孵育;洗膜;ECL 滴加到膜的蛋白面,反应 3 ~ 5 min;胶片曝光,显影 2 min,定影。每组重复 3 次。

2.8 Real-Time PCR 检测 Bcl-xl, Bax mRNA 的表达

2.8.1 引物设计和合成 Bcl-xl 和 Bax 的 cDNA 序列参照 NCBI primer-blast 和 primer 3.0 进行设计,由优科卓业生物医学技术有限公司合成。见表 1。

2.8.2 样本总 RNA 提取 Trizol 细胞悬液中,剧烈震荡,冰上孵育;添加入三氯甲烷,振荡,静置,离心;添加 70% 乙醇,混匀;DNase 1 消化;将 Spin Column RM 放回 Collection Tube 中,离心;转入新 RNase-free Collection Tube 中,加 $30 \mu\text{L}$ RNase-free Water,静置,离心。

2.8.3 电泳 取 $8 \mu\text{L}$ RNA,1% 琼脂糖凝胶进行电泳。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物名称	引物序列	片段长度 /bp
Bcl-xl	上游 5'-GTGGGCTAGGGCTGACTAGA-3'	133
	下游 5'-AGAGAGGGAGGCCTGAAGAG-3'	
Bax	上游 5'-CATGGGCTGGACATTGGACT-3'	137
	下游 5'-AAAGTAGGAGAGGAGGCCGT-3'	
β -actin	上游 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'	205
	下游 5'-CTGGAAGGTGGACAGCCAGG-3'	

2.8.4 反转录 用 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒 (CWbio. Co. Ltd, Cat#CW0744) 进行反转录,实验操作按产品说明书进行。

2.8.5 RT-PCR 检测 用 7500 荧光定量 PCR 仪,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据的相对定量分析,反应体系用 SYBR PCR Mixture 进行扩增,实验操作按产品说明书进行。每组重复 3 次。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行分析处理,采用单因素方差分析,应用 t 检验分析评价组间数据,数据资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

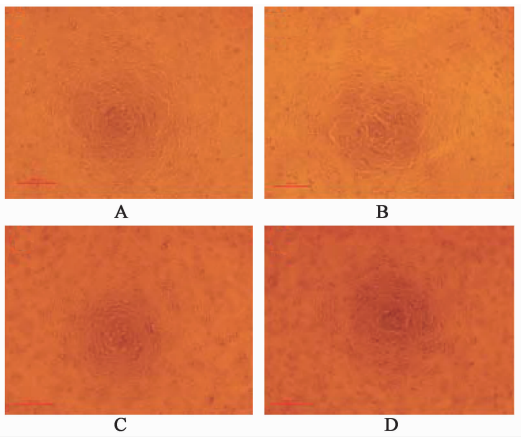
3.1 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞细胞形态学变化的影响 与 DMEM 组比较,QHJD 各组细胞镜下单位面积的细胞均呈现数量减少,细胞体积缩小,细胞间连接变少或是消失,细胞间隙变大;而 DMEM 组细胞生长状态良好,已铺满 80% 左右,仅有少量细胞漂浮。见图 1。

3.2 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞增殖的影响 与空白组比较,QHJD 各组对 HaCat 细胞的增殖抑制均有统计学差异 ($P < 0.05$)。其中,QHJD 中、高剂量组,与空白组比较,有显著差异 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 清热活血解毒复方对 HaCat 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on proliferation in HaCat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白	-	0.00 ± 4.71
QHJD	20	$8.6 \pm 13.99^{1)}$
	25	$67.76 \pm 5.28^{2)}$
	30	$78.50 \pm 1.57^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。



A. 空白组; B. QHJD 20 g·L⁻¹ 组; C. QHJD 25 g·L⁻¹ 组; D. QHJD 30 g·L⁻¹ 组(图 2~3 同)

图 1 清热活血解毒复方对 HaCat 细胞形态学变化的影响
Fig. 1 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on cell morphology in HaCat cells

3.3 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞凋亡的影响 与空白组比较, QHJD 中、高剂量组可促进 HaCat 细胞的凋亡, 差异有统计学差异 ($P < 0.05$), 其中, QHJD 高剂量组与空白组比较, 有显著差异 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 3。

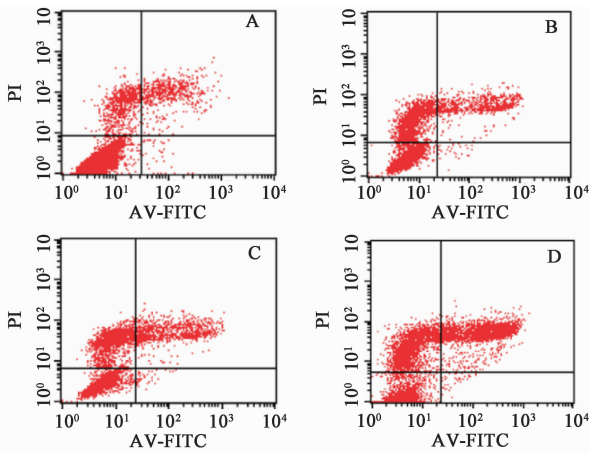


图 2 清热活血解毒复方对 HaCat 细胞凋亡的影响
Fig. 2 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on apoptosis in HaCat cells

表 3 清热活血解毒复方对 HaCat 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on apoptosis in HaCat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	凋亡率/%
空白	-	6.64 ± 1.02
QHJD	20	8.76 ± 1.48
	25	12.92 ± 2.50 ¹⁾
	30	31.77 ± 2.11 ²⁾

3.4 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 Bcl-xl, Bax 蛋白表达的影响 与空白组比较, QHJD 各组 Bax 蛋白的表达均有上升, 差异有统计学差异 ($P < 0.05$)。与空白组比较, QHJD 各组 Bcl-xl 蛋白的表达均有所上升, 但无统计学差异。见图 3, 表 4。

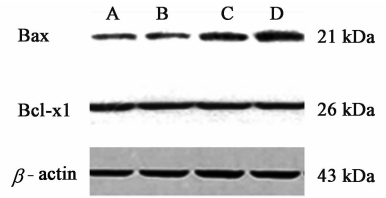


图 3 清热活血解毒复方对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 Bcl-xl, Bax 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on Bcl-xl, Bax protein in HaCat cells

表 4 清热活血解毒复方对 HaCat 细胞 Bcl-xl, Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on Bcl-xl, Bax protein in HaCat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	Bax	Bcl-xl
空白	-	0.29 ± 0.08	0.35 ± 0.07
QHJD	20	0.51 ± 0.10 ¹⁾	0.40 ± 0.09
	25	0.56 ± 0.12 ¹⁾	0.42 ± 0.09
	30	0.63 ± 0.14 ¹⁾	0.43 ± 0.15

3.5 对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 Bcl-xl, Bax mRNA 表达的影响 与空白组比较, QHJD 各组 Bax mRNA 的表达均有上升, 有统计学差 ($P < 0.05$); 与空白组比较, QHJD 各组 Bcl-xl mRNA 的表达均有上升, 但无统计学差异。见表 5。

表 5 清热活血解毒复方对 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞 Bcl-xl, Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of Qingre Huoxue Jiedu complex prescription on Bcl-xl, Bax mRNA in HaCat cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	Bax	Bcl-xl
空白	-	1.05 ± 0.17	0.80 ± 0.12
QHJD	20	1.84 ± 0.39 ¹⁾	0.87 ± 0.12
	25	1.93 ± 0.43 ¹⁾	0.97 ± 0.08
	30	2.05 ± 0.54 ¹⁾	1.00 ± 0.14

4 讨论

银屑病的特点之一是: 高增殖同时伴随着高凋亡。有研究认为, 细胞凋亡可能是皮损初期的病理改变, 而细胞过度增殖则是其继发的表现^[13], 二者在高水平上保持着相对平衡^[14]。

细胞凋亡具有复杂的分子调控机制, 凋亡的发

生在多种基因参与下发生的。有研究认为 Bcl-2 家族蛋白事通过操纵线粒体膜间隙蛋白的释放来对细胞凋亡实行调控的^[15]。Bax 为 Bcl-2 家族的促凋亡基因之一,与 Bcl-2 家族中的 Bcl-xl 等抑制凋亡基因存在着相互拮抗的作用,共同调控细胞凋亡。研究表明 Bax 基因在银屑病皮损中的高表达,明显高于在非皮损区和正常皮肤区域的表达^[16-17]。另有研究表明这种高表达,可能是继发于银屑病角质形成细胞过度增殖后的,原因是细胞的过度增殖在某种程度上,是可以促进凋亡的^[18]。有研究表明,Bcl-xl 较 Bcl-2,与银屑病发病更具有相关性,该基因可以通过改变银屑病角质形成细胞的正常分化,来引起角质形成细胞的过度增殖^[19]。另有研究提示 Bcl-xl 的抗凋亡效应,可能与抗凋亡信号激酶 PKB 及细胞信号传导因子核因子- κ B (NF- κ B) 之间存在协同作用,共同参与了银屑病的凋亡紊乱的形成^[20]。由此可见,银屑病角质形成细胞的凋亡,是在促凋亡基因与抑凋亡基因共同作用下发生的,而 Bax, Bcl-xl 均参与这一发病过程,其二者之间的制约失衡,可能是银屑病皮损发生的关键因素之一。

TNF- α 在银屑病的发病中扮演着重要的角色,主要体现在:①TNF- α 作为一种重要的促炎症性细胞因子,可以调节免疫反应的信号网络,促进细胞因子的产生,进而引起机体强烈的炎症反应^[21]。②可以促进角质形成细胞的增生^[22]。③诱导 T 细胞表达 VEGF mRNA,而 VEGF 在银屑病斑块形成、真皮乳头层毛细血管扩张、扭曲中发挥着重要作用^[23]。

清热活血解毒复方是根据本科室前辈朱仁康、张作舟等名老中医的临床经验总结而成,主要药物为土茯苓、白花蛇舌草、北豆根、紫草、牡丹皮、当归、地黄、玄参等。其中土茯苓、白花蛇舌草、北豆根、大青叶能清热解毒,地黄、紫草、牡丹皮、当归等凉血活血。30 多年来,一直是本科室临床治疗“血热证”寻常型银屑病的常用方药,其可以有效促进皮损的消退,延长缓解期,减少复发。课题组前期工作表明:清热活血解毒复方可以抑制 HaCat 的增殖、诱导其凋亡、影响细胞周期。这些可能是其治疗银屑病的作用机制。但其治疗银屑病的作用机制仍不清楚。

关于清热活血解毒复方粗提液干预剂浓度选定,预实验结果显示,作用 24 h,清热活血解毒复方对 HaCat 细胞最小抑制质量浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, IC_{50} 为 $23.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,相关系数 0.946;作用 48 h, IC_{50} 为 $20.24 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,相关系数 0.887,但作用 48 h 后,已经

无明显细胞周期;且在各时间点,30,40,50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 HaCat 细胞抑制率没有显著性差异,可能与该浓度复方作用之细胞的结合靶点饱和程度有关系。因此,最终确定清热活血解毒复方粗提液干预剂低、中、高质量浓度分别为 20,25,30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,作用时间 24 h。

在本研究中,以 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞为研究对象。HaCat 细胞是成人皮肤中分离得到的 1 种永生化的角质形成细胞株,与正常人角质形成细胞增殖、分化特性相似,遗传特性稳定,现常用来替代人表皮角质形成细胞进行实验研究。本研究以 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞,使其更好的模拟银屑病表皮角质细胞的过快增殖。从细胞增殖、凋亡和 Bcl-xl, Bax 蛋白及 mRNA 表达方面,对清热活血解毒复方治疗银屑病的机理进行了进一步探讨。实验结果显示,与空白组比较,QHJD 各组可以抑制 HaCat 细胞的增殖,差异有统计学差异。其中,QHJD 中、高剂量组,可以显著抑制 HaCat 细胞的增殖;QHJD 中、高剂量组可促进 HaCat 细胞的凋亡,差异有统计学差异,其中,QHJD 高剂量组可以显著促进 HaCat 细胞的凋亡;QHJD 各组 Bax 蛋白的表达均有上升,差异有统计学差异;QHJD 各组 Bcl-xl 蛋白的表达亦均有所上升,但无统计学差异;QHJD 各组 Bax mRNA 的表达均有上升,差异有统计学差;QHJD 各组 Bcl-xl mRNA 的表达亦均有上升,但无统计学差异。表明清热活血解毒复方可以抑制 TNF- α 诱导的 HaCat 细胞的增殖,促进其凋亡,并可上调 Bax 蛋白和 mRNA 的表达。

Bax 与 Bcl-xl 存在着相互拮抗的作用,但亦有研究报道 Bcl-xl 在银屑病患者皮损区及非皮损区均可高度表达,并且这种高表达发生在银屑病皮损形成前^[24]。而在治疗后,该基因的表达并不能完全恢复正常,提示银屑病的发生可能受到其他基因的调控^[25]。结合研究结果,笔者推测清热活血解毒复方可能通过上调促凋亡基因 Bax 的表达,进而诱导角质形成细胞的凋亡,抑制 HaCat 细胞的增殖,从而发挥治疗银屑病的作用。同时可能是通过其他基因相互拮抗,而不是 Bcl-xl 基因,实现这种促凋亡调控作用的。但是由于体内体外实验的差异,其临床治疗银屑病的具体作用机制目前尚不清楚,有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Coates L C, Anderson R R, Fitzgerald O, et al. Clues to the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis from

- imaging; a literature review [J]. *J Rheumatol*, 2008, 35 (7):1438-1442.
- [2] Lowes M A, Bowcock A M, Krueger J G. Pathogenesis and therapy of psoriasis [J]. *Nature*, 2007, 445 (7130): 866-873.
- [3] 中医研究院广安门医院. 朱仁康临床经验集 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1978:156-158.
- [4] 北京中医医院. 赵炳南临床经验集 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:270.
- [5] 张志礼. 中西医结合皮肤性病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:216.
- [6] 张广中, 王萍, 王莒生, 等. 2651 例寻常型银屑病中医症候分布和演变规律研究 [J]. *中医杂志*, 2008, 47 (10):894-896.
- [7] 余冰. 解毒消银饮治疗寻常型银屑病 [J]. *医药论坛杂志*, 2008, 29 (19):87-88.
- [8] 李福伦, 李斌, 徐荣, 等. 芩珠凉血合剂治疗血热证银屑病的随机对照临床研究 [J]. *中西医结合学报*, 2008, 6 (6):586-589.
- [9] 谢昭琼, 易雪梅, 杨连娟, 等. 抗银 1 号方治疗寻常型银屑病 41 例疗效观察 [J]. *河北中医*, 2009, 31 (2): 173-175.
- [10] 侯立军. 活血凉血汤加减治疗寻常型银屑病进行期临床观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009, 11 (3): 132-133.
- [11] 谢昭琼, 易雪梅, 杨连娟, 等. 抗银 1 号方治疗寻常型银屑病 41 例疗效观察 [J]. *河北中医*, 2009, 31 (2): 173-175.
- [12] 唐定书, 徐俊涛. 凉血解毒汤治疗进行期寻常型银屑病 32 例 [J]. *新中医*, 2009, 41 (5):77-78.
- [13] 徐丽敏, 陈学. 流式细胞仪分析银屑病表皮角朊细胞凋亡及细胞周期变化 [J]. *临床皮肤科杂志*, 1997 (3):152-154.
- [14] 孙丽蕴, 邓丙戌, 王禾, 等. 凉血活血胶囊对皮肤角质形成细胞凋亡的研究 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2003, 36 (10):583-585.
- [15] Kuwana, Newmeyer. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis [J]. *Current Opinion Cell Biology*, 2003, 15 (4):1-9.
- [16] Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, et al. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis [J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 28 (3): 187-197.
- [17] Kocak M, Bozdogan O, Erkek E, et al. Examination of Bcl-2, Bcl-X and Bax protein expression in psoriasis [J]. *Int J Dermatol*, 2003, 42 (10):789-793.
- [18] Einspahr J G, Alberts D S, Warneke J A, et al. Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis [J]. *Neoplasia*, 1999, 1 (5):468-475.
- [19] 茅晓红. 银屑病皮损中原癌基因 Bcl-x 的表达及意义 [J]. *国外医学皮肤病学分册*, 1998, 24 (4):200-204.
- [20] 杨艳, 黄振明, 张三泉. 银屑病皮损中 PKB、NF- κ B、p65、Bcl-xL 的表达及相关性研究 [J]. *中国医药指南*, 2010, 8 (25):14-16.
- [21] Peters B P, Weissman F G, Gill M A. Pathophysiology and treatment of psoriasis [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2000, 57 (7):645-659.
- [22] 郑淑云, 张岩, 罗文涛, 等. 银屑病患者血中 TNF- α 水平检测 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 1997, 11 (1): 17-19.
- [23] Wetzler C, Kampfer H, Pfeilschifter J, et al. Keratinocyte-derived chemotactic cytokines; expressional modulation by nitric oxide *in vitro* and during cutaneous wound repair *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274 (3):689-696.
- [24] Batinac T, Zamolo G, Hadzisejdi I, et al. Expression of Bcl-2 family proteins in psoriasis [J]. *Croat Med J*, 2007, 48 (3):319-326.
- [25] Wang E T, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. *Nature*, 2008, 456 (7221):470-476.

[责任编辑 周冰冰]