

当归四逆汤对 BALB/c 硬皮病小鼠皮肤组织中 CTGF, TGF- β 含量的影响

王振亮*, 宋建平, 张晓艳, 贾丽丽, 崔庆安
(河南中医学院仲景医药研究所, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察当归四逆汤对 BALB/c 硬皮病小鼠皮肤组织及其结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 含量的影响。方法: 选 8 周龄近交系 BALB/c 小鼠 60 只, 剃去背部中央区被毛, 随机分为 5 组, 每组 12 只。模型组和观察组小鼠背部皮内注射 100 μ L (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 博来霉素(BLM) 溶液, 每天 1 次, 连续 3 周。正常组小鼠用磷酸盐缓冲液(PBS) 0.1 mL 做背部皮内注射。造模成功后, 各组按 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 容量灌胃, 连续 3 周。当归四逆汤高、中、低剂量组(39, 23.4, 7.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。正常组和模型组给等容量生理盐水。实验结束处死动物, 切取小鼠背部注射区皮组织, 部分剪碎后与生理盐水研磨成 2% 组织浆, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取部分上清液, 用 ELISA 法测定 CTGF, TGF- β 的含量。部分组织固定于 10% 甲醛液, 石蜡包埋, 苏木素 2 伊红(HE) 染色和 Masson 三色染色, 分别用彩色病理图像分析系统和细胞免疫组织化学定量分析系统测定皮肤厚度和纤维化指数。结果: 当归四逆汤高、中、低剂量均能减轻 BLM 致硬皮病小鼠的真皮厚度, 高、中剂量组分别为(25.22 \pm 2.35), (29.13 \pm 2.03) μm , $P < 0.01$; 低剂量组为(29.95 \pm 2.85) μm , $P < 0.05$); 高、中剂量组能降低硬皮病小鼠皮肤纤维化指数, 分别为(86.615 \pm 8.403), (103.174 \pm 18.439), $P < 0.01$; 皮肤组织中 CTGF 分别为(160.2 \pm 35.7), (109.5 \pm 28.6) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $P < 0.01$, TGF- β 的含量分别为(48.48 \pm 4.95), (63.30 \pm 7.32) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $P < 0.01$), 而且存在明显的量效关系。结论: 当归四逆汤能使模型小鼠的皮肤硬化得到改善, 对其皮肤组织中的 CTGF, TGF- β 含量有降低作用。

[关键词] 硬皮病模型; 当归四逆汤; 小鼠; 结缔组织生长因子、转化生长因子- β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0179-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0934.018.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 9:34

[收稿日期] 20120322(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072716)

[通讯作者] * 王振亮, 医学博士, 博士后, 教授, 主任医师, 从事中西医结合风湿免疫病的研究, Tel: 15936286885, E-mail: wazhli@sohu.com

[参考文献]

[1] 康鲁东, 蔡景龙, 胡国强, 等. 肿瘤患者血清超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化物含量的测定[J]. 山东医科大学学报, 1994, 32(4): 293.

[2] 莫简, 吕问, 孙淑芬, 等. 医用自由基生物学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.

[3] 张群豪, 林志彬. 灵芝多糖 GL-B 的抑瘤作用和机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(9): 544.

[4] 李建恒, 张杏红. 抗肿瘤中药多糖研究进展[J]. 中医药学报, 1998, 26(4): 46.

[5] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 1595.

[6] 韩淑英, 刘淑梅, 朱丽莎, 等. 荞麦花总黄酮对高脂血症大鼠血管活性物质和血液流变学的影响[J]. 西北药理学杂志, 2003, 18(2): 64.

[7] 韩淑英, 朱丽莎, 刘淑梅, 等. 荞麦叶总黄酮调血脂及抗脂质过氧化作用[J]. 中国煤炭医学杂志, 2002, 5(7): 711.

[8] 韩淑英, 吕华, 朱丽莎, 等. 荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(6): 694.

[9] Bohle A, Jurczok A, Ardel P, et al. Inhibition of bladder carcinoma cell adhesion by oligopeptide combinations *in vitro* and *in vivo*[J]. J Urol, 2002, 167(1): 357.

[10] Xiao Z, McCallum T J, Brown K M, et al. Characterization of a novel transplantable or thotopic rat bladder transitional cell tumour model[J]. Br J Cancer, 1999, 81(4): 638.

[11] 陈云. 中药药理学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 1103.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Danggui Sini Decoction on CTGF and TGF- β in Skin Tissue of BALB/c Mice with the Systemic Sclerosis

WANG Zhen-liang^{*}, SONG Jian-ping, ZHANG Xiao-yan, JIA Li-li, CUI Qing-an
(Preclinical Medicine Institute, Henan College of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Danggui Sini decoction on connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor- β (TGF- β) in skin tissue of the systemic sclerosis (SSc) mice of BALB/c. **Method:** BALB/c mice 60 with eight weeks old inbred strain were selected and the back fur of the central district was shaved off, and randomly divided into 5 groups ($n = 12$ each group). The back skin of mouse in the model group and observation group was injected with 100 μL ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), bleomycin (BLM) solution once each day for 3 weeks. The back skin of mouse in normal group was injected with phosphate buffered saline (PBS) 0.1 mL. After the modeling, mice in each group was given 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ by gavage daily for 3 weeks, the dosage of Danggui Sini decoction was 39, 23.4, 7.8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Normal and model groups were given equal volume of saline, After the end of the experiment, the animals were killed, injected central skin was collected, and tissue homogenate was made with 2% saline and 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ centrifugation for 10 min, and then the supernatant was extracted and the content of CTGF and TGF- β were determined using ELISA method. Some of the skin was fixed in 10% formaldehyde solution, and then embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining, skin thickness and fibrosis index were determined, respectively, with color pathology images and Immunohistochemistry quantitative analysis system. **Result:** Danggui Sini decoction could reduce the BLM induced scleroderma mouse dermal thickness (in high and middle dosage, which was 25.22 ± 2.35 , 29.13 ± 2.03 respectively, $P < 0.01$ while in the low dosage, 29.95 ± 2.85 , $P < 0.05$). In high-dose group and the medium dose group skin fibrosis index was reduced ($86\ 615 \pm 8\ 403$, $103\ 174 \pm 18\ 439$, respectively, $P < 0.01$) and skin tissue levels of CTGF (160.22 ± 35.73), (109.51 ± 28.64) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, $P < 0.01$) and TGF- β (48.48 ± 4.95), (63.30 ± 7.32) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively $P < 0.01$) were also reduced, and there was a significant dose-effect relationship. **Conclusion:** Danggui Sini decoction can reduce the degree of hardening of the skin in mouse model, and can reduce the the CTGF and TGF- β content.

[Key words] model of scleroderma; Danggui Sini decoction; mice; CTGF; TGF- β

系统性硬化症 (systemic sclerosis, SSc) 是一种多系统的慢性疾病,以小血管功能和结构异常,皮肤和内脏纤维化为特征,迄今病因不明,治疗困难,是临床上的疑难性疾病。中医学认为,本病多由寒凝血瘀,痰瘀痹阻于皮肤肌肉,皮肉失养所致^[1]。当归四逆汤具有温经散寒,养血通脉的作用,我们临床应用其治疗 SSc 效果理想。已知结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)^[2-3]、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) β ^[4] 与 SSc 发病密切相关。为此我们建立动物模型,以观察该方对 SSc 小鼠皮肤 CTGF, TGF- β 含量的影响。

1 材料

1.1 动物 8 周龄近交系 BALB/c 小鼠 60 只,体重

18 ~ 22 g, 雌性,由河北省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(冀)2008-1-003,合格证编号 1104102。

1.2 药物及试剂 当归四逆汤(由当归 9 g, 桂枝 9 g, 白芍 9 g, 细辛 9 g, 甘草 6 g, 通草 6 g, 大枣 4 枚等组成)药物购于仲景大药房,经我校药学院检验为合格产品。用凉水 1 000 mL 浸泡半小时,大火煎开后改为小火,再煎煮半小时后过滤,而后加水再煎如上法,浓缩至用量。博来霉素 (BLM, 日本化药株式会社,批号 740130)。CTGF, TGF- β 等试剂盒(均购于美国奥迪生物公司,批号 201106)。

1.3 仪器 标准规格酶标仪(北京中世远达商贸有限公司),多功能彩色病理图像分析系统(北京麦克奥迪图像技术有限公司),细胞免疫组织化学定

量分析系统(上海申腾信息技术有限公司医疗软件分公司)。

2 方法

2.1 模型制备及给药 按照文献方法^[5-6],模型组和观察组小鼠背部皮内注射 100 μL (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 BLM 溶液,每天 1 次,连续 3 周。正常组小鼠用磷酸盐缓冲液(PBS)0.1 mL 做背部皮内注射。

2.2 分组与给药 置于清洁级动物饲养室,20 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$,SPF 饲料和水饲养,并用玉米芯垫料。实验前剃去小鼠背部中央区被毛,并随机分为 6 组,每组 12 只,分别为正常对照组(正常组)、模型对照组(模型组)、当归四逆汤高剂量组(以下简称高剂量组)、当归四逆汤中剂量组(以下简称中剂量组)、当归四逆汤低剂量组(以下简称低剂量组)。造模成功(21 d)后 ig 给药,容量 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。正常组和模型组给与等容量生理盐水,每天 1 次,连续 3 周。给药量以 20 g 小鼠和 70 kg 成人按照体表面积折算(系数 0.002 6),其中高、中、低剂量组分别是成人用量的 5,3,1 倍,即 39, 23.4, 7.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。各组均饮用自来水,食用 SPF 饲料。

2.3 指标检测

2.3.1 病理学观察 对模型小鼠皮损处皮肤进行 HE 染色,肉眼和显微镜观察小鼠皮肤的变化。

2.3.2 皮肤厚度 切取小鼠背部注射区皮肤,固定于 10% 甲醛液,石蜡包埋,制片(4 μm),HE 染色。并用彩色病理图像分析系统测定皮肤厚度(表皮 + 真皮),每只小鼠的切片随机取 5 处测皮肤厚度后,求得该小鼠皮肤厚度的均值(\bar{x})。

2.3.3 纤维化指数 用 Masson 三色染色,计算纤维化指数。染色的结果判定:胶原纤维呈亮绿色,肌纤维呈红色,细胞核呈黑色。用细胞免疫组织化学定量分析系统将 Masson 染色皮肤组织切片的图像在 40 倍物镜下采集至计算机中,每只小鼠的切片随即取 10 个视野,每个视野 26 万像素,以亮绿色(胶原纤维)为阳性,求得阳性面积,阳性强度均值,将两者相乘得胶原纤维组织化学指数,计算出每只小

鼠指数的均值(\bar{x})。

2.3.4 皮肤中 CTGF, TGF- β 含量测定 实验结束后处死动物,切取小鼠背部注射区 6 mm \times 6 mm 大小皮组织,剪碎后与生理盐水研磨成 2% 组织浆,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,取部分上清液,严格按照试剂盒要求的操作步骤进行,用 ELISA 法分别测定皮肤中 CTGF, TGF- β 的含量。

2.4 统计学处理 所有数据统计使用 SPSS 18.0 软件完成,所得结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间均数比较采用单因素方差分析。方差分析前进行齐性检验,采用 LSD 进行统计。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

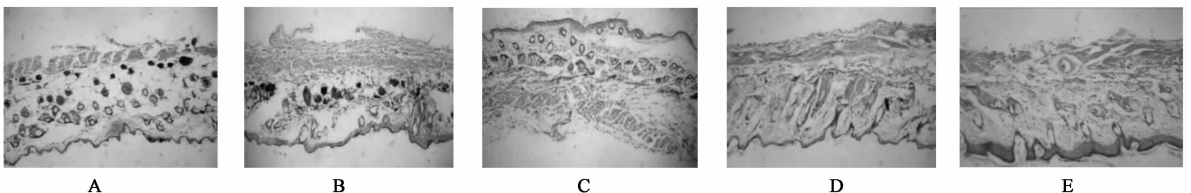
3.1 各组小鼠病理学观察 BLM 注射后,模型组小鼠注射部位皮肤增厚变硬,弹性差,皮毛未见生长;组织病理可见表皮棘层肥厚,皮下出现大量无定形物质,真皮层明显增厚,胶原纤维明显增粗、膨大,数量增多,排列紧密,均质化等改变;真皮下层血管增粗,血管壁明显增厚,甚至血管闭塞,毛囊显著减少;脂肪层变薄、消失,伴有炎症细胞浸润。正常组未出现上述改变。当归四逆汤各组的改变较模型组为轻,胶原纤维排列较疏松,真皮层变薄,血管壁较薄,毛囊增加,脂肪层出现,炎症细胞明显减少,且呈一定的剂量依赖性。见图 1。

3.2 各组小鼠皮肤厚度及纤维化指数变化 模型组的皮肤厚度和纤维化指数均明显高于正常组($P < 0.01$),当归四逆汤高、中、低剂量组皮肤厚度和纤维化指数均显著低于模型组, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 。见表 1。

3.3 各组小鼠皮肤组织中 CTGF, TGF- β 的含量 模型组皮肤的 CTGF, TGF- β 含量明显高于正常组;当归四逆汤高、中剂量组与模型组相比 CTGF, TGF- β 含量显著降低($P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

中医学认为,硬皮病属于“皮痹”范畴,虚寒和血瘀是硬皮病过程中不可分割的两大因素,互为因果,交织出现;“虚寒”是致病的始因,“血瘀”是继发



A. 正常组;B. 模型组;C. 当归四逆汤 39 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 当归四逆汤 23.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 当归四逆汤 7.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 当归四逆汤对小鼠皮肤组织病理改变的影响(光镜 $\times 100$)

表 1 各组小鼠皮肤厚度及纤维化指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	皮肤厚度/ μm	皮肤纤维化指数
正常	-	18.49 ± 2.66	28 761 ± 2 677
模型	-	32.69 ± 3.18 ¹⁾	207 634 ± 17 731 ¹⁾
当归四逆汤	39.0	25.22 ± 2.35 ²⁾	86 615 ± 8 403 ²⁾
	23.4	29.13 ± 2.03 ²⁾	103 174 ± 18 439 ²⁾
	7.8	29.95 ± 2.85 ³⁾	134 995 ± 18 059 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 各组小鼠皮肤组织中 CTGF, TGF- β 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CTGF	TGF- β
正常	-	39.65 ± 4.35	20.28 ± 2.49
模型	-	212.61 ± 7.46 ¹⁾	92.86 ± 4.30 ¹⁾
当归四逆汤	39.0	109.51 ± 28.64 ²⁾	48.48 ± 4.95 ²⁾
	23.4	160.22 ± 35.73 ²⁾	56.26 ± 10.57 ²⁾
	7.8	200.21 ± 24.97	63.30 ± 7.32 ²⁾

病理改变;临床上的不同证型只是“虚寒”、“血瘀”二者侧重点不同而已^[10]。因阳气虚衰,失于温煦,血流涩滞不畅,气血不能温养肌肤,以致寒凝于肌肤,血阻于经络,营卫周流失常而发皮痹,出现肤色黯褐,指(趾)端青紫,皮肤肿胀、硬化等现象。其本在于虚寒,其标则为血瘀留滞。所以“温经散寒,通行血脉”应该是 SSc 主要的治疗方法。当归四逆汤出自《伤寒论》,具有养血散寒、温经通脉的作用。其中当归、白芍、大枣养血和营;桂枝、细辛温经通阳散寒;通草通利血脉。诸药合用则可使阳气复,寒邪除,凝滞去,经络通畅,非常切合硬皮病之上述病机。而且有报道当归四逆汤对硬皮病有效率可达 90%^[11],表明本方对 SSc 有确切的临床疗效。

现代医学认为,SSc 典型的临床表现是皮肤的增厚和纤维化。在 SSc 纤维化皮损中 CTGF mRNA 表达显著增高^[8]。TGF- β 作为重要的促纤维化细胞因子,可直接促进成纤维细胞增殖、胶原基因的转录及表达^[9]。有学者也发现,SSc 患者的成纤维细胞处于一种永久激活状态,部分是受自分泌和旁分泌的 CTGF 和 TGF- β 的影响^[10]。因此,拮抗 CTGF 和 TGF- β 可以防治纤维化而对 SSc 发挥治疗作用。我们的实验表明,当归四逆汤可以降低 BALB/C 硬皮

病小鼠皮肤组织中 CTGF 与 TGF- β 的含量,从而发挥防治皮肤纤维化的作用。实验还显示,本方能减轻硬皮病模型小鼠的真皮厚度,降低硬皮病小鼠皮肤纤维化指数,提示本方对硬皮病模型小鼠皮肤有软化作用。这可能与能降低皮肤组织中 CTGF 与 TGF- β 的含量有关。至于本方具体的药理作用,以及温经通脉与相应指标间的关系,有待进一步观察研究。

[参考文献]

[1] 胡荫奇,唐先平. 简明中西医结合风湿病学[M]. 北京:科学技术文献出版社,2009:142.

[2] Sato M, Shegogue D, Gore E A, et al. Role of p38MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 2002, 118: 704.

[3] Leask A, Holmes A, Abraham D J. Connective tissue growth factor a new and important player in the pathogenesis of fibrosis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2002, 4: 136.

[4] Susol E, Rands A L, Herrick A, et al. Association of markers for TGF-beta 3, TGF-beta 2 and TIMP1 with systemic sclerosis[J]. Rheumatology (Oxford), 2000, 39: 1332.

[5] 屠文震,赵凯,陆磊. 建立硬皮病小鼠模型的实验研究[J]. 中华风湿病杂志, 2003,7(8):478.

[6] 朱鹭冰,李明. 博来霉素诱导硬皮病小鼠模型及其抗体测定的初步研究[J]. 中华皮肤科杂志,2003,36(9):496.

[7] Sato M, Shegogue D, Gore E A, et al. Role of p38MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 2002, 118: 704.

[8] 吕芹,卞华,陈志国,等. 温阳化浊通络方含药血清对硬皮病成纤维细胞胶原分泌和 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):184.

[9] Fauci A S. 哈里森风湿病学[M]. 田新平,曾小峰,译. 北京:人民卫生出版社,2009,94.

[10] 张秉正. 从中医“证”探讨硬皮病病理与治疗的体会[J]. 中国皮肤性病杂志,1992,6(3):182.

[11] 冯大鹏,朴勇洙. 当归四逆汤治疗硬皮病 20 例[J]. 国际中医中药杂志,2009,31(2):190.

[责任编辑 聂淑琴]