

加味凉血消风散对豚鼠银屑病样皮损病理 及 PCNA 表达的影响

郝平生*, 张婧, 朱梅, 艾儒棣

(成都中医药大学附属医院皮肤科, 成都 610072)

[摘要] 目的:探讨加味凉血消风散对银屑病样动物模型皮损中增殖细胞核抗原(PCNA)以及病理组织改变的影响。方法:健康豚鼠 72 只,随机分为空白组、模型组、甲氨蝶呤(MTX, $5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、加味凉血消风散高、中、低剂量组(5, 2.5, 1.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。5% 心得安诱导法建立豚鼠银屑病样模型,连续造模 2 周后各组开始按剂量 ig 空白组、模型组 ig 蒸馏水,连续 2 周。检测鼠耳组织形态学病理积分、鼠耳皮损组织中 PCNA 蛋白表达的影响。结果:模型组与正常组比较,鼠耳组织形态学肉眼病理积分、PCNA 蛋白含量均升高,具有统计学意义($P < 0.05$);MTX 组及加味凉血消风散高、中剂量组病理积分[分别为(5.12 ± 1.69)(4.65 ± 2.15), (6.06 ± 2.23)分]均明显低于模型组[(8.20 ± 1.62)分]($P < 0.05$);MTX 组、加味凉血消风散高剂量组 PCNA 蛋白含量[(9.00 ± 1.07)%, (10.01 ± 1.97)%]均明显低于模型组[(3.00 ± 0.71)%]($P < 0.05$)。结论:加味凉血消风散可通过抑制角质形成细胞的角化、抗炎及抑制 PCNA 表达发挥良好的治疗银屑病的作用。

[关键词] 寻常型银屑病;加味凉血消风散;增殖细胞核抗原;皮损病理

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0238-02

银屑病(psoriasis)是一种较常见的、具有遗传倾向的慢性炎症性皮肤病,目前认为是一种多基因控制、与环境因素密切相关的免疫性炎症疾病。加味凉血消风散为我院中医外科名家艾儒棣教授治疗寻常型银屑病血热证之经验方。本实验通过 5% 心得安诱导型银屑病动物模型,观察加味凉血消风散对银屑病样皮损病理改变、PCNA 的影响。对其治疗寻常型银屑病的机制进行了探讨。

1 材料

1.1 药物与试剂 加味凉血消风散;甲氨蝶呤(MTX, 上海医药,批号 H31020644);心得安粉剂(湖北华中药业 H42022488);PCNA 染色试剂盒购自晶美生物有限公司;DAB(DAB-0031,福州迈新生物技术有限公司);II 抗/III 抗 SP9000(通用型)(Plus kits 北京中山金桥有限公司)。

1.2 动物 普通级豚鼠,体重 200 ~ 240 g,雌雄各半,购自成都中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(川)2010-03。

1.3 仪器 切片机(徕卡-1015,德国),TSJ-Q 型全自动封闭式组织脱水机, BMJ-III 型包埋机, PHY-III

型病理组织漂烘仪(常州市中威医疗仪器有限公司),PAS8000 病理摄像系统,显微镜(日本尼康)。

2 方法

2.1 造模与给药 将 72 只豚鼠随机分成 6 组:加味凉血清风散低、中、高剂量组、甲氨蝶呤(MTX)对照组、模型组、空白对照组,每组 12 只。用新鲜配制的 10% Na_2S 溶液脱去豚鼠耳背毛发,次日按文献[1]将配制好的 5% 心得安乳剂均匀外涂造模豚鼠耳背皮肤(1 cm^2),厚 1.0 mm,3 次/d,连续 2 周,使其产生银屑病样病理改变。造模 2 周后开始治疗:空白组、模型组蒸馏水 ig,加味凉血消风散高、中、低剂量组(5, 2.5, 1.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)ig,每次容量 10 mL $\cdot \text{kg}^{-1}$,均 3 次/d。MTX 组($5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)ig,1 次/d。均连续 2 周。

2.2 检测指标与观察方法

2.2.1 豚鼠耳银屑病样皮损组织病理评估 用药 2 周后,手术切取各组豚鼠左侧耳部,常规修剪制片,最后镜检。光镜下观察耳部皮肤病理变化,判断标准参考 Baker 法^[2]制定组织学评分标准。角质层中发现 Munro 小脓肿计 2.0 分;过度角化计 0.5 分;角化不全计 1.0 分。表皮层中发现颗粒层变薄或消失计 1.0 分;棘层肥厚计 1.0 分;皮突延长、起伏,根据轻、中、重程度分别计 0.5, 1.0, 1.5 分。真皮层炎细胞浸润,根据轻、中、重程度分别计 0.5, 1.0, 2.0 分;乳突上顶计 0.5 分;毛细血管扩张计 0.5 分。

2.2.2 豚鼠耳银屑病样皮损组织 PCNA 测定及结

[收稿日期] 20120105(106)

[基金项目] 成都中医药大学校基金课题(ZRYB200911)

[通讯作者] * 郝平生,博士,副教授,从事红斑鳞屑性皮肤病的临床与研究, Tel: 13881965024, E-mail: hpswl@126.com

果判定 测定采用免疫组化染色 SP 法,按试剂盒说明操作。PCNA 以细胞核着色为主,镜下示有棕黄色颗粒物质沉积为阳性。选择 5 个染色均匀的高倍视野,每视野计数 200 个细胞的阳性细胞数,以阳性细胞百分率表示 PCNA 的表达。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件,所有实验数据经正态分布检验后采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对豚鼠耳银屑病样皮损组织病理的影响 模型组病理切片均见角化过度及灶状角化不全,角层内可见小脓疱,棘层肥厚,表皮突延伸呈棒状,真皮乳头上伸呈杵状变,真皮毛细血管增生、扩张,真皮浅层血管周围可见单核细胞浸润;治疗后各治疗组及对照组角化过度均减轻,角化不全消失,棘层变薄,表皮突延伸,乳突上伸、毛细血管扩展及炎症细胞浸润均明显减轻。模型组与空白组相比较, $P < 0.05$,与模型组比较,MTX 组及加味凉血消风散高、中剂量组病理积分均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 加味凉血消风散对银屑病样皮损病理的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	病理积分
空白	-	9	$0.06 \pm 0.17^{(1)}$
模型	-	10	8.20 ± 1.62
MTX	5×10^{-4}	10	$5.12 \pm 1.69^{(1)}$
加味凉血消风散	5.0	8	$4.65 \pm 2.15^{(1)}$
	2.5	9	$6.06 \pm 2.23^{(1)}$
	1.25	9	7.17 ± 2.24

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对豚鼠耳银屑病样皮损 PCNA 的影响 模型组与空白组比较, $P < 0.05$,与模型组比较 MTX 组、加味凉血消风散高剂量组 PCNA 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味凉血消风散对银屑病样皮损 PCNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	PCNA/%
空白	-	9	$3.00 \pm 0.71^{(1)}$
模型	-	10	15.10 ± 4.56
MTX	5×10^{-4}	10	$9.00 \pm 1.07^{(1)}$
加味凉血消风散	5.0	8	$10.01 \pm 1.97^{(1)}$
	2.5	9	13.11 ± 2.47
	1.25	9	14.56 ± 2.51

4 讨论

银屑病是临床上常见的反复发作慢性炎症性皮肤病,其病因和发病机制至今仍不十分清楚。银屑病的组织病理学主要表现为角质形成细胞的过度增

生、炎症细胞聚集和真皮乳头血管增生扩张 3 大特征。本试验应用心得安成功诱导了银屑病动物模型。结果显示加味凉血消风散尤其高剂量组能明显抑制角质形成细胞的角化并具有明显的抗炎作用。

由于银屑病病理特点包括角质形成细胞增生过快和分化不全两方面。近年来研究者将此病的研究重心集中到与细胞分化相关的核细胞增殖抗原(PCNA)。PCNA 是一种仅在增殖细胞中合成或表达的相对分子质量为 36×10^3 的酸性非组胺核蛋白。1978 年 Miyachi 等^[3]首先在 1 例系统性红斑狼疮患者的血清中发现并命名,PCNA 参与 DNA 的合成,在细胞周期 G₁ 期开始升高,S 期合成达到高峰,M 期降至最低,其变化与 DNA 的合成相一致。含有增殖细胞的组织可检出 PCNA 的阳性表达,而处于静止状态的细胞 PCNA 表达则为阴性,因此 PCNA 的检测可间接反映局部细胞的增殖状态^[4]。PCNA 是目前公认的评价细胞增殖状态的指标,有资料证实银屑病患者的皮肤损伤组织中 PCNA 表达明显增强,并提示其与银屑病的表皮细胞过度增殖、分化异常有关,经过有效治疗后皮肤损伤组织中 PCNA 表达减弱^[5]。本实验证实豚鼠诱导型银屑病皮损中存在 PCNA 的高表达,证明了该模型与银屑病皮损的相似性,为实验模型的可行性提供了实验证据。

综上,加味凉血消风散可通过抑制角质形成细胞的角化、抗炎及抑制 PCNA 表达发挥良好的治疗银屑病的作用。为其治疗银屑病提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 黄畋,张淑芝,孙令.心得安涂药造成豚鼠耳部银屑病样病理变化[J].中华皮肤科杂志,1991,24(2):96.
- [2] Baker B S, Swain A F, Fry L, et al. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis[J]. Br J Dermatol,1984,110(5):555.
- [3] Miyachi K, Fritzler M J, Tan E M, et al. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells [J]. J Immunol, 1978, 121: 2228.
- [4] Miracco C, Pellegrino M, Flori M L, et al. Cyclin D1, B and A expression and cell turnover in psoriatic skin lesions before and after cyclosporin treatment [J]. Br J Dermatol, 2000, 143:950.
- [5] 张敏,张谊之,李俸媛.银屑病皮损区 c-myc、c. iun、Ki. 67、PCNA、VEGF 的表达 [J]. 华西医科大学学报, 2002,33(3):427.

[责任编辑 何伟]