

银屑平颗粒对豚鼠银屑病动物模型的影响

李涛^{1,2}, 李洪梅¹, 李小芹¹, 孙建辉¹, 邱翔燕¹, 周爱香^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 研究银屑平颗粒对豚鼠银屑病模型的影响。方法: 采用心得安乳剂涂抹耳造豚鼠银屑病样模型, 银屑平高、中、低剂量 ig 2 周, 处死豚鼠, 采用 ELISA 试剂盒检测豚鼠耳匀浆液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及细胞间黏附因子 (ICAM-1) 的含量, 并观察其对病理形态学的影响。结果: 与正常组比较, 模型组豚鼠 TNF- α 及 ICAM-1 显著升高 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 银屑平颗粒高、中剂量组、甲氨 呤组 TNF- α 及 ICAM-1 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 银屑平高、中、低剂量组对心得安所致的表皮皮损、红肿, 皮肤糜烂, 角化不全, 毛细血管增生扩张等形态学改变有不同程度的改善。结论: 银屑平颗粒对银屑病有良好的治疗作用。

[关键词] 银屑病; 豚鼠; 银屑平颗粒; 心得安

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0137-03

Effect of Yinxieping Granules on Guinea Pig Model of Psoriasis

LI Tao^{1,2}, LI Hong-mei¹, LI Xiao-qin¹, SUN Jian-hui¹, QIU Xiang-yan¹, ZHOU Ai-xiang^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica; China Academy of Chinese Medical Sciences; Beijing 100700, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yinxieping Granules on guinea pig model of psoriasis. **Method:** All guinea pigs were coated propranolol emulsion on the ear twice a day for 2 weeks to establish the model of psoriasis. Then the granules was given daily by oral gavage for 2 weeks. Guinea pigs were sacrificed when the experiment was done. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and cell adhesion molecule (ICAM-1) were determined in the ear homogenates by ELISA kit. **Result:** Compared with the normal group, TNF- α and ICAM-1 were significantly higher in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, TNF- α and ICAM-1 were significantly lower in each of the treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Yinxieping granules is a effective treatment for psoriasis. **[Key words]** psoriasis; guinea pig Yinxieping Granules; propranolol

银屑平颗粒是使用多年的临床经验方, 具有清热凉血、祛风止痒的功效, 临床用于治疗血热风燥型银屑病取得了较好疗效。本试验采用心得安诱导豚鼠银屑病模型, 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及细胞间黏附因子 (ICAM-1), 观察了该药对银屑病样豚

鼠耳部炎症细胞因子及病理形态学的影响, 探讨银屑平颗粒对银屑病治疗作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 普通级豚鼠, 体重 220 ~320 g, 雄性, 由北京市海淀区兴旺动物养殖场提供, 合格证号 SCXK (京) 2006-0008。

1.2 药物 银屑平颗粒, 由生地黄、赤芍、人工牛黄、荆芥穗等多味中药组成, 由中日友好医院提供, 含生药 5.92 g·g⁻¹ 药粉, 批号 091021, 人临床日用量为生药 23.3 g, 按 60 kg 体重计算, 用药量为生药 0.388 g·kg⁻¹; 豚鼠用药剂量为生药 3.34, 1.67, 0.84 g·kg⁻¹ 3 个剂量, 其中剂量相当于临床等效剂

[收稿日期] 2010-07-12
[基金项目] 科技部科研院所技术开发专项基金 (2009EG152294)
[第一作者] 李涛, 2008 级研究生, 中药学专业, Tel: 15810274543
[通讯作者] * 周爱香, 研究员, 研究方向: 中药复方药理研究, Tel: 010-64285181, E-mail: sinomd@sina.com

量;甲氨 呤片,上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂,2.5 mg/片,批号 080911,临床日用量为 10 mg,豚鼠用量为 0.73 mg·kg⁻¹,为临床等效剂量。

1.3 仪器 RT-6000 酶标仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司;6K15 离心机,美国 Sigma 公司。

1.4 试剂及配制 盐酸普萘洛尔,石药集团中诺药业(石家庄)有限公司,10 mg/片,批号 09075093;5% 心得安乳剂:取盐酸普萘洛尔 5 g,用 50% 乙醇溶解,加入月桂氮卓酮 5 mL(占总溶液的 5%)作为透皮吸收促进剂,加入聚乙烯吡咯烷酮(PVPK30) 5 g 为成膜材料,加 50% 乙醇至 100 mL,制备盐酸普萘洛尔乳剂^[1-2];无钙镁 PBS 缓冲液:分别称 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, KH₂PO₄ 0.2 g,按其顺序在去离子水中溶解至 1 000 mL,分装,高压灭菌,室温或 4℃ 保存;TNF-α, ICAM-1 ELISA 试剂盒, R&D 公司,批号均为 200912。

1.5 分组及造模 取豚鼠,雄性,体重 220 g ~320 g 适应观察 2 d 后,按体重随机分为正常组、模型组、银屑平颗粒高、中、低剂量组、阳性对照药甲氨 呤组,每组 10 只。除空白对照组外,其余各组用 5% 心得安乳剂,均匀涂抹豚鼠双耳背部皮肤,每耳涂抹 0.1 mL,用玻璃棒涂匀,早晚各 1 次,连续涂 2 周,以豚鼠耳部角质形成细胞过度增生从而出现角化过度、角化不全等症状为造模成功。

1.6 给药 各治疗组从造模 2 周后开始 ig 给药,1 次/d,连续 2 周,剂量分别是银屑平颗粒高、中、低(生药 3.34,1.67,0.84 g·kg⁻¹)剂量组,甲氨 呤组(7.3 ×10⁻⁴ g·kg⁻¹),模型组及空白对照组 ig 相同体积的蒸馏水(2 mL·kg⁻¹)。

1.7 检测指标及方法 末次给药 1 h 后,用 20% 乌拉坦(5 mL·kg⁻¹) ip 麻醉,放血处死豚鼠,取左耳,称取约 0.4 g,加 2 mL 无钙镁 PBS 缓冲液,匀浆,2 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,采用 ELISA 试剂盒,按说明书操作,检测耳组织中 TNF-α, ICAM-1 的含量,右耳留作病理组织学检查。

1.8 病理切片及观察方法 取右耳置 10% 甲醛溶液中固定,常规制片,HE 染色,行病理组织学检查。镜下观察豚鼠耳部皮肤组织病理改变,见表 1。

1.9 统计学方法 病理观察结果采用秩和检验;计量数据检验用 *t* 检验,用 SPSS 13.0 软件,*P* < 0.05 为有显著性差异。

表 1 豚鼠耳部皮肤组织病理改变程度分级标准

分 级	表 现
-	正常皮肤,角化不过度,有少量颗粒层,真皮下无炎症浸润
±	皮肤有轻度角化,表皮有少量颗粒层,棘细胞层不肥厚
+	皮肤轻度角化,表皮有颗粒层,皮层增厚,真皮下有炎症,不明显
++	皮肤角化过度,表皮有少量颗粒层,表皮层增厚明显,真皮下有炎症,较轻
+++	皮肤过度角化,部分表皮颗粒层消失,上皮层明显增生,钉突形成;真皮下有毛细血管扩张,并有炎症浸润,以淋巴为主

2 结果

2.1 银屑平颗粒对豚鼠耳部(大体)形态学的影响 与空白对照组相比,模型组在涂抹心得安乳剂 2 周后,豚鼠的耳部表皮可见红肿糜烂,广泛灶状角化不全,毛细血管增生扩张,银屑平颗粒高、中、低 3 个剂量组不同程度地改善了表皮皮损、红肿,皮肤糜烂,角化不全,毛细血管增生扩张等皮肤病变。

2.2 银屑平颗粒对豚鼠耳部(镜下)形态学的影响 正常对照组豚鼠耳部皮肤可见菲薄的角质层、颗粒层、棘细胞层;基底层为单层柱状细胞,真表皮交界呈波浪形,真皮内有散在少量单一核细胞浸润,毛细血管无充血,结构正常;模型对照组皮肤过度角化,表皮颗粒层变薄或消失,棘层肥厚,表皮突延伸呈棒状,真皮乳头上伸杆状变,毛细血管充血,炎症细胞浸润;药物治疗后角化过度减轻,颗粒层恢复,棘层变薄,表皮突延伸、乳突上伸、毛细血管充血及炎症细胞浸润均不同程度减轻,病理变化程度与模型对照组相比有明显的差异,见表 2,图 1。

表 2 银屑平颗粒对豚鼠银屑病模型耳部组织病理观察的影响(*n* = 10)

组 别	剂量 /g·kg ⁻¹	炎症程度
模型对照	-	-
银屑平颗粒	3.34	76.5 ¹⁾
	1.67	75.5 ²⁾
	0.84	80.5
甲氨 呤	7.3 ×10 ⁻⁴	75.0 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 3 同)。

2.3 银屑平颗粒对豚鼠银屑病模型 TNF-α 及 ICAM-1 影响 模型组耳组织中 TNF-α 含量明显高

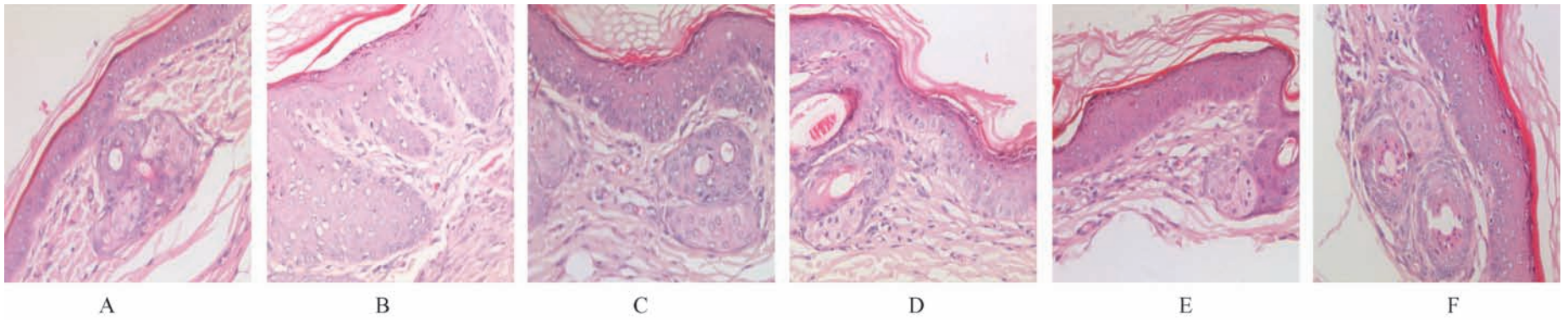


图 1 银屑平颗粒对豚鼠耳部(镜下)形态学的影响病理切片 CHE

A. 正常对照组, 上皮层及下皮层组织结构正常; B. 模型对照组, 上皮明显增厚, 表皮突延伸呈棒状, 真皮乳头上伸杆状变;
C. 甲氨蝶呤组, 上皮增生减轻, 有轻度角化; D. 银屑平 3.34 g·kg⁻¹组, 上皮增生及皮下炎症明显减轻;
E. 银屑平 1.67 g·kg⁻¹组, 上皮增生及皮下炎症减轻; F. 银屑平 0.84 g·kg⁻¹组, 上皮增生及皮下炎症减轻

于空白对照组, 银屑平颗粒高、中剂量组的豚鼠 TNF-α明显低于模型组(*P* < 0.01 或 0.05), 模型组耳组织中 ICAM-1 含量明显高于空白对照组, 银屑平颗粒高剂量组 ICAM-1 含量明显低于模型组(*P* < 0.01), 见表 3。

表 3 银屑平颗粒对银屑病模型豚鼠耳组织 TNF-α及 ICAM-1 含量的影响(珉±s, n = 10)					
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹	TNF-α抑制率 /%	ICAM1 /ng·L ⁻¹	ICAM1 抑制率/%
模型对照	-	204.2 ±17.0	-	51.5 ±6.02	-
正常对照	-	159.3 ±15.5 ²⁾	-	35.2 ±4.5 ²⁾	-
银屑平颗粒	3.34	178.8 ±9.7 ²⁾	12.47	44.4 ±4.4 ²⁾	13.83
	1.67	184.0 ±14.5 ¹⁾	9.92	46.8 ±4.8	9.07
	0.84	195.0 ±31.4	4.50	47.7 ±5.9	7.43
甲氨 呤	7.3 ×10 ⁻⁴	180.3 ±24.0 ¹⁾	11.72	46.1 ±5.4 ¹⁾	10.50

3 讨论

银屑病, 俗称牛皮癣, 是一种慢性、复发性、顽固性红斑鳞屑性皮肤病。银屑病顽固难治, 容易复发, 且病因与发病机制非常复杂, 一般认为与遗传、感染、免疫、神经精神等诸多因素有关, 目前比较一致的观点是银屑病的发病机制与细胞免疫, 尤其与 T 细胞密切相关^[3]。大部分研究^[4]报道银屑病 TNF-α水平明显增高, 其可能的发生机制为 TNF-α刺激内皮细胞表达多种黏附分子, 促进对中性粒细胞的黏附作用, 同时促进 IL-1, IL-6, IL-8, IFN-γ等细胞因子的产生, IFN-γ又可以促进角质细胞产生多种细胞因子如 IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α等, 这些因子促进了角质细胞增生和局部淋巴细胞浸润, 促进白细胞黏附于血管内皮细胞, 使白细胞向炎症部位渗出^[5]。

普萘洛尔可通过阻滞 β肾上腺素能受体, 降低细胞内 cAMP 水平, 从而使角质形成细胞增殖加速而诱发或加重银屑病。国内外学者将 5% 的心得安

乳剂(普萘洛尔配制而成) 涂于豚鼠皮肤造成角化过度、角化不全、棘层肥厚等类似人类银屑病的组织学改变, 这种方法可在短时间内复制出某些方面与银屑病患者表皮增殖状况相似的特征, 所以本试验选择这种造模方法。

本试验通过检测豚鼠银屑病模型耳组织中 TNF-α和 ICAM-1 含量, 探讨银屑平颗粒对银屑病免疫相关因子的影响, 结果显示, 银屑平颗粒高、中剂量可明显地降低 TNF-α和 ICAM-1 的含量, 与模型组相比有显著性差异。本试验结果提示银屑平颗粒可能通过对免疫机制的调节发挥其治疗作用, 为课题的下一步深入研究提供了良好的工作基础。

[参考文献]

[1] 王学军, 王伟明, 李继昌, 等. 消屑灵软膏对实验性银屑病病理模型影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2005, 12(2) : 83.
[2] 孙群. 促透剂对盐酸普萘洛尔透皮吸收的影响[D]. 大学硕士学位论文, 2004: 14.
[3] 郑敏. 银屑病是细胞免疫介导性疾病[J]. 中华皮肤科杂志, 2002, 35(2) : 85.
[4] Bonifati C, carducci M, Cordiali-Fei P, et al. Correlated increases of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and granulocyte-monocyte-colony stimulating factor levels in suction blister fluids and sera of psoriatic patients: relationship with disease severity[J]. Clin Exp Dermatol, 1994, 19(5) : 383.
[5] 张敏, 张谊之, 汪盛, 等. 树突状细胞、自然杀伤细胞和黏附分子在银屑病发病中的作用[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(5) : 626.

[责任编辑 何伟]