

祛银汤体外对银屑病抗体依赖细胞介导生长刺激模型影响的研究

姜一化, 郑 义, 高 进, 胡长发 (武汉市第一医院, 武汉 430022)

摘要:目的: 探讨祛银汤治疗银屑病的机制。方法: 提取银屑病患者血清中的 IgG, 建立抗体依赖细胞介导生长刺激(ADCCS)模型, 用不同浓度祛银汤煎液加到培养物中, 用 MTT 法观测角朊细胞的增殖并用 ELISA 法检测上清液中的 IL-2, IL-6 水平, 选择相同浓度的雷公藤作阳性对照。结果: 不同浓度的祛银汤及雷公藤煎液对角朊细胞的增殖均有显著抑制, 其抑制指数也随浓度的增加而增高, 较高浓度的祛银汤及雷公藤煎液对 IL-2, IL-6 的水平有抑制作用。结论: 祛银汤对银屑病 ADCCS 模型中角朊细胞的增殖有抑制作用, 可能与其能够调节炎性介质和细胞因子的分泌有关。

关键词: 中药; ADCCS; 银屑病

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)06-0045-03

银屑病的主要病理变化表现为角朊细胞(KC)的过度增生和异常分化以及炎性细胞的浸润。其中角朊细胞的增生与炎性细胞及一些细胞因子有着密切的关系。抗体依赖细胞介导生长刺激(antibody dependent cell-mediated growth stimulation, ADCCS)作为一种更接近于机体可能存在的体外实验现象, 为研究角朊细胞与单个核白细胞(ML)的关系提供了新的思路和方法^[1-2]。我们基于 ADCCS 模型, 用 MTT^[3]法, 观察了祛银汤(丹参、红花、大黄、苦参、黄柏、板兰根、乌梢蛇、蝉衣、地鳖虫、甘草等)对角朊细胞增生的抑制作用, 并用临床上治疗银屑病有效的雷公藤单味药煎剂做为对照。试图说明中草药治疗银屑病的病理机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂: RPMI1640(GIBCO), 小牛血清(华美生物工程公司), MTT(BIB分装), DFM(Farco 原装), SDS(BIB分装)。抗小鼠 IL-2 和 IL-6 抗体购自晶美生物有限公司。中药饮片购自武汉市中西医结合医院中药房。

1.2 标本来源: 角朊细胞取自昆明种新生小鼠(同济医科大学实验动物中心提供), 单个核白细胞取自同系小鼠脾脏, 银屑病患者 IgG 来自进行期寻常型银屑病病人血清。

1.3 方 法:

1.3.1 IgG 的提取: 进行期寻常型银屑病患者血清, 经饱和硫酸铵沉析, 以 0.02%/mol/L PH7.4PBS 溶解

并充分透析, 换液 3 次, 至茚氏试剂测透析液无黄色, 即无 NH_4^+ 为止。取透析袋内样品组作适当倍数稀释后定量分析, 调节 IgG 浓度至 0.5mg/ml, 0.22 μm 微孔膜过滤灭菌, 分装安瓿, -20℃保存备用。

1.3.2 中药的制备 祛银汤方: 丹参 20g、红花 10g、大黄 10g、苦参 10g、黄柏 20g、板兰根 20g、乌梢蛇 10g、蝉衣 10g、地鳖虫 20g、甘草 5g。地产雷公藤(Tripterygium)根部饮片由武汉市中西医结合医院中药房提供。取中药饮片置煎煮容器内, 加相当于药材量 5 倍的冷水浸泡 2h, 煮沸 30min 过滤, 药渣加 4 倍的水继续煎煮, 煮沸 20min 过滤, 合并两次滤液, 加等体积无水乙醇过夜, 在低温超速离心机中离心 10min(10000rpm), 浓缩成每毫升相当于原药材 1 克的药液, 0.22 μm 微孔膜过滤。分装安瓿, -20℃保存备用。

1.3.3 角朊细胞及单个核白细胞的制备 新生小鼠皮肤于 0.25% 胰蛋白酶中 4℃冷消化过夜, 完整分离表皮、真皮。分离的表皮在 200 目不锈钢网上碾碎, 用 RPMI1640(含 10% 胎牛血清)冲洗, 制备表皮角朊细胞悬液, 调节细胞浓度为 10^6 个/ml。取同系小鼠脾脏, 200 目不锈钢网上碾碎悬于 Hank's 液中, 经 Ficoll-Hypaque 密度离心, 2000rpm, 10min。取分层液上梯度液面细胞, 经 Hank's 液洗三次, 5min3000rpm 离心, 悬于无血清 RPMI1640 中, 调节细胞浓度为 10^6 /ml。

1.3.4 生长刺激实验 角朊细胞接种于 96 孔板中, 每孔 0.1ml(10^5 个), 孵育于 5% CO_2 湿化空气中,

36.5℃培养24h后,换用无血清1640培养基,每二天换一次,持续4d,使细胞停止在G₀/G₁期。将银屑病患者IgG(0.05mg/孔)加在已经血清饥饿处理的角朊细胞单层上,4℃孵育1h,用无血清1640温和洗去未结合的IgG,将ML悬液加在KC单层上,每孔0.1ml(10⁶个/ml),36.5℃孵育1h后,洗去未结合的ML,然后加入用无血清RPMI1640配制的中药,继续培养16h,每种中药设10⁻⁴,10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷(g/ml)浓度,每个浓度设5个孔,每孔100μl。

1.3.5 以ELISA方法检测上清液IL-2,IL-6水平(严格按试剂盒操作说明进行),anthos2010酶标仪读取OD值(测定波长为450nm)。

1.3.6 MTT检测:角朊细胞培养及加药同1.3.4。用无血清1640洗去未结合药物,每孔加入20μlMTT溶液(5mg/ml),36.5℃,5%CO₂湿化空气中孵育4h,然后每孔滴加100μl20%SDS~50%DMF,微型混合器振荡15min,36.5℃孵育4h,酶标仪读取OD值(测定波长为570nm)。

1.3.7 统计学处理,用t检验。

2 结果

空白对照组、雷公藤煎液组及祛银汤组读取OD值后,各药物组与空白组进行组间的t检验。角朊细胞的抑制指数按以下公式计算:

$$\text{抑制指数} = \frac{\text{空白组 OD 值} - \text{药物组 OD 值}}{\text{空白组 OD 值}}$$

2.1 祛银汤煎剂及雷公藤煎剂组与空白组均有显著差异,其中浓度为10⁻⁷g/ml组t值小于0.05,其他各组t值均小于0.01。(表1)

2.2 各药物组抑制指数随药物浓度的增高有逐渐增大的趋势,祛银汤组与雷公藤组的角朊细胞抑制指数无明显差异,P值均大于0.05。(表2)

2.3 不同浓度的祛银汤及雷公藤煎液对IL-2和IL-6水平的影响不同。在IL-2的检测中,其10⁻⁶、10⁻⁷g/ml组与空白组差异不明显,10⁻⁴、10⁻⁵g/ml组则有明显降低,P<0.05(表3)。在IL-6的检测中10⁻⁶g/ml与空白组就有明显差异,10⁻⁴、10⁻⁵g/ml组差异非常明显。祛银汤与雷公藤相同浓度之间无明显差异(表4)。

表1 祛银汤对ADCCS模型角朊细胞增殖的影响(OD值 $\bar{x} \pm s$; n=5)

浓度(g/ml)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
空白	0.266 ± 0.0207			
祛银汤	0.241 ± 0.0129*	0.2250 ± 0.0186**	0.215 ± 0.0217**	0.209 ± 0.0226**
雷公藤煎液	0.232 ± 0.0228*	0.214 ± 0.0230**	0.216 ± 0.0207**	0.212 ± 0.0148**

注:与空白组相比* P<0.05,** P<0.01(以下同)。

表2 不同浓度的祛银汤对角朊细胞的抑制指数(抑制指数 $\bar{x} \pm s$; n=5)

浓度(g/ml)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
祛银汤	13.32 ± 3.56	17.45 ± 6.83	18.14 ± 4.15	19.26 ± 4.37
雷公藤煎液	12.86 ± 4.04	19.44 ± 7.13	18.86 ± 2.54	20.20 ± 3.02

表3 IL-2的相对水平($\bar{x} \pm s$; n=5)

浓度(g/ml)	空白	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
祛银汤煎液		1.032 ± 0.391	0.821 ± 0.331	0.693 ± 0.312*	0.627 ± 0.365*
雷公藤煎液		1.097 ± 0.382	0.982 ± 0.401	0.715 ± 0.372*	0.621 ± 0.357*
空白	1.103 ± 0.390				

表4 IL-6的相对水平($\bar{x} \pm s$; n=5)

浓度(g/ml)	空白	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
祛银汤煎液		1.001 ± 0.171	0.843 ± 0.201*	0.592 ± 0.221**	0.445 ± 0.173**
雷公藤煎液		0.970 ± 0.182	0.873 ± 0.197*	0.647 ± 0.125**	0.428 ± 0.142**
空白	1.003 ± 0.211				

3 讨论

祛银汤中大黄、苦参、黄柏、板蓝根均有较强的抑制各种细菌、病毒的作用,同时能调节各种炎性介质及细胞因子的分泌,从而改善人体的免疫环境和调节机体的免疫功能。方中的丹参、红花、地鳖虫、大黄等药是传统的活血化瘀中药,不仅能改善机体的微循环状况,还能改变外周血管的通透性,调节多种细胞因子和炎症介质,从而影响炎性细胞的渗出、移行、趋化。

雷公藤的单方、复方和外用制剂治疗银屑病疗效肯定。作为传统的中药制剂,雷公藤被认为是一种免疫抑制剂,可以肯定雷公藤对 ConA 诱导的 T 细胞增殖反应有明显的抑制作用,可强烈地抑制 T 细胞产生 IL2,而对 T 细胞表达 IL2R 无影响^[4]。也有实验表明,雷公藤能显著降低 IL1。诱导的人外周血单核细胞 IL6 和 IL8mRNA 水平,显然亦降低了 IL6 和 IL8 蛋白表达水平及其生物学效应^[5]。在实验中,用 MTT 法显示不同浓度的祛银汤及雷公藤煎液对 ADCCS 模型中角朊细胞增殖有不同的抑制作用,也印证了祛银汤及雷公藤在临床上对银屑病的治疗作用。

已知银屑病的发病与机体的细胞免疫异常明显相关,特别是局部的 CD4⁺ T 细胞介质的细胞免疫功能亢进,其中细胞因子的异常对角朊细胞的异常增生起着关键的作用。这些异常的细胞因子一部分来自淋巴细胞,相当一部分也来自于角朊细胞,它们是 T 细胞和角朊细胞双向作用的结果。ADCCS 模型体外模拟了角朊细胞与免疫活性细胞的紧密粘连,提供了它们之间通过各种细胞因子相互影响的更有利

的条件,这种抗体依赖细胞介导的环境,可以产生明显的角朊细胞生长刺激作用。进一步的实验证明,在 ADCCS 条件下,IL2 和 IL6 的相对水平明显增高,而粘连的 ML 细胞表面的 IL2R_α 的表达亦明显增高^[6]。

在本实验中,我们发现不同浓度的祛银汤及雷公藤煎液对培养上清中 IL-2 和 IL-6 的水平有不同程度的抑制作用,而没有观察到祛银汤组的角朊细胞有明显的碎裂及细胞核的分化异常,因此,祛银汤及对角朊细胞增殖的影响最有可能是阻断了抗体搭桥角朊细胞/单一核白细胞粘连(ABKMA)激活的旁分泌网,抑制了细胞因子的产生及其活性,从而降低了对角朊细胞的生长刺激反应。

参考文献:

- [1] 胡长发,孙曾拯,甘霖,等 银屑病的抗体搭桥角朊细胞/单一核白细胞粘连[J]. 中华皮肤科杂志, 1989, 22: 363-365.
- [2] 胡长发,孙曾拯,甘霖,等 银屑病的抗体依赖细胞介导生长刺激[J]. 中华皮肤科杂志, 1990, 23: 87-89.
- [3] Denizot, F. and Lang, R Rapid colorimetric assay for cell growth and survival[J]. J. Immunol. Methods 1986, 89: 271-277.
- [4] 李瑞琳,舒达夫. 雷公藤的研究与临床应用[M]. 中国科学技术出版社 1989, 319-324.
- [5] 李新宇,郑家润,高纪伟,等 环孢霉素 A 与雷公藤对 IL-1_α 诱导的人外周血单核细胞 IL-6 和 IL-8mRNA 表达的影响[J]. 临床皮肤科杂志, 1999, 28: 77-79.
- [6] 胡长发,管晓春,闫鸣,等 银屑病的抗体搭桥角朊细胞/单一核白细胞粘连:白介素 2 及白介素 6 和白介素 2 受体 α 链的检测[J]. 中华皮肤科杂志, 1996, 29: 96-98.