银屑平丸对BALB/c小鼠银屑病样模型血清中IL-17、IL-23表达的影响

谢汶芳[1],席建元[1]*,李小鹏[1],彭 丹[1],温 柔[2]
(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南省浏阳市人民医院,湖南 浏阳 410300)

〔摘要〕**目的** 建造BALB/c小鼠背部银屑病样模型,探讨中成药银屑平丸治疗银屑病的可能作用机制。**方法** 选取48只BALB/c小鼠,随机分为空白组、模型对照组、雷公藤组、银屑平丸高、中、低剂量组,8只/组。给予除空白组外其余小鼠背部皮肤外涂咪喹莫特软膏连续8 d,1次/d, 建立模型小鼠。末次给药后, 观察小鼠背部皮肤进行皮损面积和严重程度指数(psoriasis area and serenty index, PASI)评分;检测血清中IL-17、IL-23水平;取背部皮肤组织进行组织病理比较。**结果** (1)银屑平丸各组和雷公藤组对银屑病样小鼠背部皮肤PASI评分比较无明显的差异(P>0.05),而较模型对照组和空白组评分均有明显的差异(P<0.05)。(2)各组银屑病样小鼠外周血IL-17和IL-23含量明显高于空白组(P>0.05)。而银屑平丸各组和雷公藤组均与模型对照组外周血中含量有明显的差异(P<0.05)。(3)银屑平丸各组和雷公藤组对银屑病样小鼠背部皮肤组织病理变化较模型对照组和空白组有明显差异(P<0.05)。**结论** 银屑平丸改善银屑病模型小鼠的作用机制可能通过抑制IL-17、IL-23,起到减轻小鼠银屑病样皮损的发生、发展的作用。

〔关键词〕银屑病;银屑平丸;IL-17;IL-23;PASI评分
〔中图分类号〕R285.5;R758.63 〔文献标识码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.05.007

Effects of Yinxieping Pills on IL-17, IL-23 Expression of in Serum of Psoriasis-like BALB/c Mice Models

XIE Wenfang[1], XI Jianyuan[1], LI Xiaopeng[1], PENG Dan[1], WEN Rou[2]*
(1.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2.The People's Hospital of Liuyang City, Liuyang, Hunan 410300, China)

〔**Abstract**〕**Objective** The construction of the back psoriasis-like BALB/c mice models discussing Yinxieping pills in the treatment of psoriasis may mechanism. **Methods** A total of 48 male BALB/c mice were randomly divided into blank control group, model control group, tripterygium wilfordii group, Yinxieping pills of high, medium and low dose groups, eight mice in each group. Except for blank group, the mice in other groups were given back skin of mice with imiquimod cream for 8 days, 1 times /d, the rat models were established. After the last administration, the psoriasis area and severity index (PASI) score of the skin in the back of mice was observed; the levels of IL-23 and IL-17 in serum were detected; the tissue pathology in back skin tissue was compared. **Results** (1) The PASI score of the skin in the back of psoriasis-like BALB/c mice of Yinxieping pill groups and tripterygium wilfordii group has no significant difference (P>0.05), and compared with the model control group and blank group, scores had significant differences (P<0.05). (2) The contents of IL-17 and IL-23 in the peripheral blood of mice were significantly higher than those in the blank group (P>0.05). Compared with model control group, the contents in peripheral blood of the patients in Yinxieping pill groups and triptolide group had significant diffrences (P<0.05). (3) The pathological changes of Yinxieping pill group and tripterygium wilfordii group on psoriasis-like mice back skin tissue had obvious changes compared with the model control group and blank control group (P<0.05). **Conclusion** The mechanism of Yinxieping pills improving psoriasis model mice may be by inhibiting IL-17, IL-23, to alleviate the occurrence and development.of psoriasis-like lesions in mice.

〔**Keywords**〕psoriasis; Yinxieping pills; IL-17; IL-23; PASI score

〔收稿日期〕2015-10-20
〔作者简介〕谢汶芳,女,硕士,医师,从事中医皮肤病临床工作。
〔通讯作者〕*席建元,男,主任医师,E-mail:xijianyuan2010@126.com。

寻常型银屑病是一种以 T 细胞异常活化和浸润为主要特征的慢性炎症性皮肤病。银屑病的病因复杂、机制尚未完全明确,给患者带来了极大的痛苦。银屑病研究中,初始 T 淋巴细胞被活化后 $CD4^+$ 细胞经典的可分为辅助性 T 细胞 1(Th1),辅助性 T 细胞 2(Th2)以及 T 调节细胞(Treg)三个亚群[1]。近年来新的 T 细胞亚群 Th17 也参与银屑病发病,越来越多的研究支持 Th17 是银屑病发病中的关键性效应细胞。Th17 具有独立的分化和发育调节机制,在自身免疫性疾病和感染性疾病中发挥重要的调节作用[2]。新的 T 细胞亚群 Th17 细胞,可通过 IL-23/IL-17 炎性轴发挥作用。本研究主要通过观察银屑病样模型小鼠血清中 IL-17、IL-23 表达水平,探讨银屑平丸改善小鼠银屑病模型小鼠的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

选取 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 48 只,体质量 18~20 g,均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证:SCXK (湘)2011-0003。温度 18-28 ℃、湿度 40%~70%,噪音在 60 dB,小鼠采用普通饲料喂养。

1.2 药物

银屑平丸(组成:生地黄、牡丹皮、紫草、丹参、白花蛇舌草、半枝莲、大青叶、山药、女贞子、旱莲草、白鲜皮、甘草),湖南中医药大学第一附属医院医院制剂,批号 20140311。将银屑平丸及雷公藤片用粉碎机全部粉碎成粉末状,分装好。同时用蒸馏水溶散。雷公藤多苷 10 mg/片(由湖南千金协力药业有限公司规格);5%咪喹莫特乳膏(湖北科益药业股份有限公司生产,规格 5 g/支)。

1.3 实验试剂与仪器

IL-17、IL-23 的 ELISA 试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号 201312);10%多聚甲醛(武汉博士德生物有限公司,中国);酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS);Shandon325 型石蜡切片机(Shandon 公司);LEICA DM LB2 型双目显微镜 (LEICA 公司产);MIAS 医学图像分析系统(北航公司产)。

2 方法

2.1 模型制备[3]

BALB/c 雌性小鼠局部皮肤外涂 5%咪喹莫特乳膏,诱导银屑病样小鼠模型。

2.2 模型评价

观察小鼠背部皮损,用校正 PASI 评分法及小鼠皮损处皮肤 HE 染色光镜病理表现评价。

2.3 实验分组与给药

将 48 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为 6 组,即空白组、模型对照组、雷公藤组、银屑平丸低、中、高剂量组,每组 8 只小鼠。银屑平丸人临床日用量为 45g 生药,按 60 kg 体质量计算,用药量为 0.75 g/kg,小鼠的用量按低、中、高剂量组,分别为 3.25、6.49、12.98 g/kg。雷公藤多苷片,小鼠用量 10 mg/kg 为临床等效剂量。除空白组外涂凡士林乳膏,其他各组均外涂 5%咪喹莫特乳膏统一予以 62.5 mg,1 次/d。同时,空白组、模型对照组:予以生理盐水灌胃;雷公藤组:灌服浓度为 10 mg/kg 的雷公藤多苷溶液;银屑平丸高、中、低剂量组分别灌服浓度低、中、高的银屑平丸溶液,连续 8 d。

2.4 标本与取材

末次给药 24 h 后,各组采取摘眼球取血,每只收集 0.8~1 mL 血液,取血后立即 2 000 r/min 离心,10 min,吸取上层血清,-20 ℃保存,用于细胞因子检测。并断颈处死小鼠,取背部皮肤 1 cm×1.5 cm 大小的皮肤组织,置 10%多聚甲醛固定,石蜡包埋,用作病理切片。

2.5 观测指标

2.5.1 小鼠一般情况 包括小鼠神态、活动度、存活率等。

2.5.2 组织病理观察 各组小鼠皮损病理改变,经 HE 染色观察皮肤组织病理学改变。银屑病组织病理改变,表皮突延长,角化不全,表皮棘细胞层增厚,基底细胞核分裂像较多,可见 Munro 微脓肿,类似银屑病样的皮损形成提示造模成功。

2.5.3 皮损评分情况 观察各组小鼠给药 8 d 后小鼠皮损情况,记录皮损面积和严重程度指数(psoriasis area and severity index, PASI) 评分结果。此 PASI 评分是校正评分,因其皮损面积固定,按红斑、鳞屑、肥厚程度三者相加总和评分,分为 1~5 级,对应 0~4 分。

2.5.4 各组小鼠血清中细胞因子 IL-17、IL-23 的检测 用 ELISA 法,操作步骤严格按照说明书进行,酶标仪检测。具体步骤:标准品的稀释与加样:标准品稀释五个梯度,每个梯度加样 50 μL。加样:分别

设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,再加待测样品 10 μL。温育：封板膜封板后置 37 ℃温育 30 min。配液洗涤:将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释后备用;小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,重复 5 次,拍干。加酶:每孔加酶标试剂 50 μL,空白孔除外。显色:每孔先加显色剂 A50 μL, 再加显色剂 B50 μL,37 ℃避光显色 15 min。终止:每孔加终止液 50 μL。测定各孔吸光度(OD 值)。计算:用标准物浓度与 OD 值计算标准曲线的直线回归方程式,计算出样品浓度,再乘稀释倍数,即样品的实际浓度。

2.6　统计学方法

实验数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计。符合正态分布和方差齐性采用多样本单因素方差分析,不符合正态分布运用多组连续性资料的秩和检验 Kruskal - Wallis H 检验进行统计。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1　小鼠一般情况

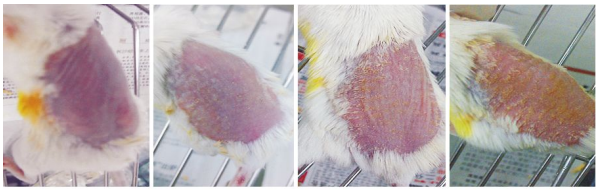
在实验过程中各组小鼠均有小鼠死亡,解剖发现多由于操作不慎,导致小鼠胃破裂、食管出血、小鼠窒息等。各组小鼠存活率比较 $\chi^2=2.474$,近似 $P=0.780$,$P>0.05$,差别无统计学意义。见表 1。

表 1　各实验组小鼠存活情况　　(只)

组别	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组	6 组
起始样本数	8	8	8	8	8	8
存活例数	7	7	6	6	7	5
存活率(%)	87.5	87.5	75	75	87.5	62.5

3.2　模型组 BALB/c 小鼠皮损随时间变化情况

实验过程中, 连续外涂 5%咪喹莫特乳膏的模型组小鼠,观察第 1、3、5、8 天小鼠皮肤变化并记录,第 8 天皮损处皮肤出现明显,红斑、鳞屑,皮肤肥厚银屑病样改变。见图 1。



第 1 天　　第 3 天　　第 5 天　　第 8 天

图 1　模型组 BALB/c 小鼠外涂 5%咪喹莫特后皮肤形态变化图

3.3　组织病理观察

空白组小鼠皮损表皮平坦,角质层较薄,颗粒层 2~4 层,棘层为 3~5 层多角细胞,基底层为单层柱状细胞。模型组表皮规则性向下延伸,其下部增厚,整体呈棒状,并伴有不同程度角化过度、角化不全,或角质层中出现 Munro 氏小脓肿, 颗粒层减少或消失, 棘层增厚, 真皮中有轻度至中度的淋巴细胞浸润。见图 2。

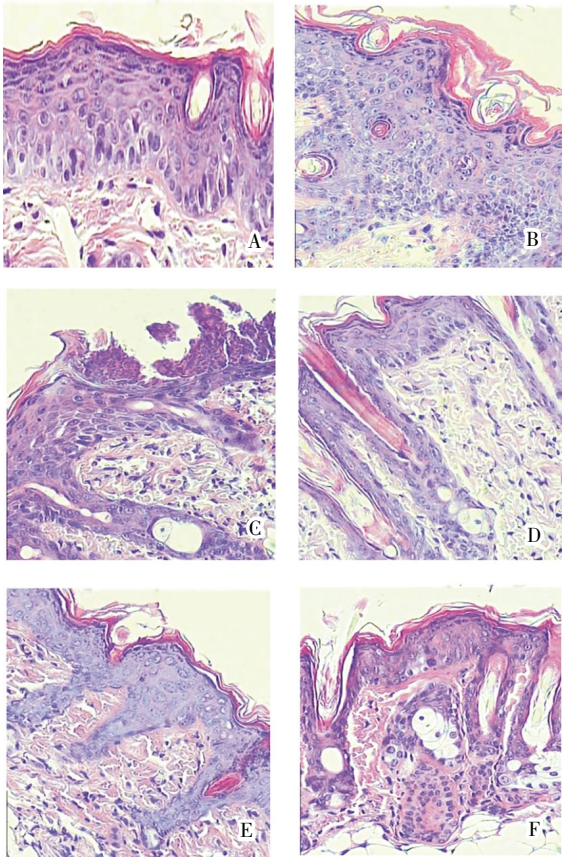


图 A-F 分别为空白组、对照组、雷公藤组、银屑平丸低、中、高剂量组

图 2　各组小鼠皮肤病理光镜图(HE 染色 ×200)

3.4　BALB/c 小鼠模型组实验校正 PASI 评分的对比

雷公藤组、银屑平丸各组分别与模型对照组比较校正 PASI 评分,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示外涂咪喹莫特的银屑病样各组小鼠的 PASI 评分明显高于未涂咪喹莫特的空白组 PASI 评分。而雷公藤组、银屑平丸组比较校正 PASI 评分,差异无统计学意义($P>0.05$),提示雷公藤组与银屑平丸各组的 PASI 评分相比较未见明显差异。见表 2。

3.5　各组小鼠血清中细胞因子 IL-17、IL-23 的检测

给药 8 d 后 BALB/c 小鼠血清中 IL-17 各组进

表 2 给药 8 天后小鼠 PASI 变化情况 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PASI 评分
空白组	7	0
模型对照组	7	5.71±1.13
雷公藤组	6	3.33±1.21▲
银屑平丸低剂量组	7	3.17±1.38▲●
银屑平丸中剂量组	6	3.71±0.98▲●
银屑平丸高剂量组	5	4.20±1.31▲●

注:与模型对照组比较,雷公藤组、银屑平丸低、中、高剂量组 Median Test 中位数=4,χ^2=12.13,近似▲P=0.016,P<0.05。银屑平丸低、中、高剂量组比较 Median Test 中位数=3.5,χ^2=0.343,近似●P=0.992,P>0.05。

行组间比较,各组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。BALB/c 小鼠血清中 IL-23 各组比较,各组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。空白组、模型对照组与其他各组血清中 IL-17、IL-23 浓度比较差异有统计学意义(P<0.05)。雷公藤组与银屑平丸低剂量组血清中 IL-17、IL-23 浓度比较差异有统计学意义(P<0.05)。雷公藤组与银屑平丸中剂量组、高剂量组血清中 IL-17、IL-23 浓度比较差异均无统计学意义(P>0.05)。银屑平丸低剂量与高剂量、中剂量组血清中 IL-17、IL-23 浓度比较差异均有统计学意义(P<0.05)。见表 3。

表 3 各组间 IL-17、IL-23 含量的变化情况 ($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	n	IL-17	IL-23
空白组	7	151.0±23.31	173.9±22.13
模型对照组	7	267.7±21.34△	304.8±18.96△
雷公藤组	6	201.0±13.40*	204.9±18.78*
银屑平丸低剂量组	6	229.9±18.92*■□◆	237.8±20.68*■□◆
银屑平丸中剂量组	7	186.4±12.00*	203.3±19.82*
银屑平丸高剂量组	5	182.0±14.67*	210.1±16.69*
F 值		34.39	38.26
P 值		P<0.05	P<0.05

注:与空白组比较△P<0.05,与模型对照组比较 *P<0.05,与雷公藤组比较■P<0.05。与银屑平丸中剂量组比较□P<0.05,与银屑平丸高剂量组比较◆P<0.05。

4 讨论

银屑病中医称之为“白疕”、俗称“牛皮癣”。本病呈周期性反复发作,严重影响人们的身心健康,席建元主任医师认为寻常型银屑病的发病与“血热”、“热毒”、“血瘀”、“阴虚”等有关,血热为其基本病机,血热易伤阴化燥,肌肤失养,因此,把“凉血养阴,活血解毒”法作为寻常型银屑病的治疗原则,研制成银屑平丸。该方由生地黄、牡丹皮、紫草、丹参、白花蛇舌草、半枝莲、大青叶、山药、女贞子、旱莲草、白鲜皮、甘草。银屑平丸重用生地黄甘、苦、寒为君药,以清热凉血解毒,养阴生津;以白花蛇舌草、半枝莲清热解毒,而赤芍、牡丹皮凉血活血养阴,紫草解毒透疹,丹参、大青叶清热活血化斑,与君药同用,清热凉血活血消斑,共为臣药;女贞子、旱莲草、麦冬养阴生津润燥与山药健脾润燥合用共为佐药;白鲜皮清热祛风止痒引经达表,甘草清热解毒兼调和诸药,为使药。本方药性偏凉,以清热凉血解毒为主,兼以活血、养阴。使全方表里兼顾,凉血而不留瘀。在前期研究中已证明银屑平丸能降低银屑病患者血清 IL-8 水平,改善临床症状[4];并能够降低 TNF-a 和 VEGF 表达水平,对免疫机制进行调节[5],本文将进一步探讨其作用机制。

西医学对本病的病因和发病机制进行了大量的研究,发现其发病与角质细胞角化过度、角化不全、真皮浅层血管扩张、迂曲,通透性增加,新生血管形成有关。近年来发现银屑病发病过程中,T 细胞活化起关键性作用,活化 T 细胞产生的细胞因子刺激表皮增殖的同时增殖角质形成细胞释放其他细胞因子增强活化 T 细胞的作用[6]。活化 T 细胞产生细胞因子放大这种作用,使银屑病慢性、反复迁延。Th17 是新发现的 T 细胞亚群,它参与银屑病发病 ,并且可以产生特殊 IL-17,还能分泌 IL-22、IL-21、IL-6、肿瘤坏死因子等细胞因子,而细胞因子涉及免疫和炎症的每一个环节。树突状细胞在外界刺激下分泌 IL-23 分子,它可诱导 Th17 细胞增殖、活化并分泌 IL-17、IL-22 等多种细胞因子[7],这些细胞因子募集中性粒细胞[8],诱发银屑病样炎性损伤,称为 IL-23/IL-17 炎性轴。它在银屑病发病机制中的作用是近年研究的热点。

IL-17 最主要来源于活化 T 淋巴细胞,并且是活化 T 细胞的前炎性细胞因子,是 T 细胞诱导炎症反应的早期启动因素,也是 Th17 的标志性细胞因子。IL-17 具有强大的致炎性,它可以诱导上皮细胞、内皮细胞、纤维原细胞和巨噬细胞产生炎症细胞因子 IL-6、急性反应蛋白、粒-巨细胞刺激因子(G-CSF)和前列腺素 E2 等;还可以协同 IFN-γ 通过人类角质形成细胞增加前炎症细胞因子的产生,因此增加 T 细胞向表皮的聚集。因为其强大的致炎性,

有可能参与中性粒细胞在银屑病皮损中浸润(血管周围中性粒细胞的侵润和表皮中性粒细胞微溃疡的形成)。

IL-23 是 IL-12 分子家族中的一员。大部分学者认为 IL-23 源自于单核/巨噬细胞和 B 细胞,树突细胞也可合成。研究表明 IL-23 是新发现的促炎性细胞因子,对 T 细胞有密切作用,它能诱导 $CD4^+$记忆 T 细胞产生 IFN-γ。IL-23 还能促进 T 细胞亚群应答产生 IL-17 或 IL-17 相关的细胞因子如 IL-17A 及 IL-17F。IL-23 也能通过 DC 来活化和调节 T 细胞依赖的免疫应答。IL-23 本身有抗肿瘤、抗感染的作用。

IL-17 和 IL-23 与银屑病发病有密切关系。IL-23 可以促进 Th17 的应答, 产生 IL-17 或 IL-17 相关因子,也是 Th17 的调节因子。IL-23 不参与 Th17 细胞的早期分化,但在 Th17 表型稳定、存活及增殖等方便起重要作用[9],产生从而形成了 IL-23/IL-17 免疫应答途径。Antonella 等[10]提出 IL-23/IL-17 轴在银屑病的发病机制中发挥重要作用。有研究表明银屑病患者皮损区 IL-17 表达水平明显高于非皮损区,外周血中 IL-17 水平明显高于健康对照组,且与 IL-17 的水平与疾病严重程度相关[11]。银屑病与 IL-23 的相关性研究表明,银屑病患者皮损区角质形成细胞核真皮中 IL-23 mRNA 的表达高于非皮损区及正常人[12]。

本实验通过对银屑病样小鼠模型外周血中 IL-17 和 IL-23 这两个白介素因子的研究发现,这两个细胞因子在银屑病样小鼠模型的血清中存在明显的异常升高,而银屑平丸可以明显降低银屑病样小鼠模型血液中这两个因子的含量, 且 IL-17、IL-23 与银屑病样小鼠模型的 PASI 评分呈正相关, 此结果提示, 银屑平丸可能是通过抑制 IL-23、IL-17 细胞因子,影响 IL-17/IL-23 炎性轴而达到治疗银屑病。且可能还有其它影响因素发挥作用。对于银屑病的具体的作用机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Murphy K M, Reiner S L. The lineage decisions of helper T cells[J]. Nat Rev Immunol,2002,2:933-944.

[2] Tesmer LA , Lundy SK, Sarkar S, eta1. Thl7 cells in human disease. Immunol Rev[J]. 2008,223(l):87-113.

[3] 胡　坚,杨闰平,汶春苗等.NLRP3 炎症小体在咪喹莫特诱导小鼠银屑病样模型中的表达及芥菜籽对其的影响 [J]. 南方医科大学学报,2013,33(9):1 394-1 398.

[4] 席建元,陶　璇,李小鹏等. 银屑平丸治疗寻常型银屑病血热证的临床观察及对血清 IL-8 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报,2012,32(1):51-53.

[5] 李小鹏, 席建元, 谢汶芳, 等. 银屑平丸对豚鼠银屑病样模型 VEGF 和 TNF-α 表达的影响 [J], 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2014,13(5):294-297.

[6] Griffles CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis[J]. Lancet,2007,370:263-271.

[7] Murphy K M, Reiner S L. The lineage decisions of helper T cells[J]. Nat Rev Immunol,2002,2:933-944.

[8] Murphy K M, Reiner S L. The lineage decisions of helper T cells[J]. Nat Rev Immunol, 2002,2:933-44.

[9] Thakker P, Leach M W, Kuang W. et al. IL-23 receptor is critical in the Induction But not in the effector phascof experiental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol,2007,178:289-298.

[10] Antonella DC, Paola DM, Frank ON. The IL-23/Th17 axis in the immuno pathogenesis of psoriasis [J]. J Invest Dermatol, 2009,129:1 339-1 350.

[11] Arican O, Aral M, Sasmaz S, et al. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 and IL-18 in patients with active psor iasis and correlation with disease severity[J]. Mediators Inflamm, 2005, 5:273-279.

[12] Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, et al. In vitro and in situ expre ssion of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesi ons;enhanced expression in psoriatic skin [J]. J Immunol,2006,176:1 908-1 915.

(本文编辑　杨　瑛)