

健脾方对皮肤屏障功能障碍模型小鼠影响的实验研究*

孙晓菲, 杨皓然, 方 凯, 解宇环[△]

(云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 研究健脾方参苓白术散和六君子汤对皮肤屏障功能障碍模型小鼠的影响。**方法** 采用胶带法复制皮肤屏障功能障碍小鼠模型, 观察正常组、模型组、参苓白术散和六君子汤给药组小鼠皮肤屏障关键指标经皮水分丢失量 (TEWL)、神经酰胺含量和表皮厚度的差异。**结果** 模型组小鼠 TEWL 增加 ($P<0.01$)、表皮厚度增加 ($P<0.05$)、表皮神经酰胺含量下降 ($P<0.05$)。参苓白术散和六君子汤组能减少 TEWL、降低小鼠表皮厚度和升高神经酰胺含量, 且参苓白术散组作用优于六君子汤组。**结论** 健脾方可改善皮肤屏障功能障碍小鼠的皮肤屏障功能, 机制与提高表皮神经酰胺含量有关, 且健脾利湿法优于健脾益气法。

关键词: 健脾方; 皮肤屏障功能障碍; 经皮水分丢失量; 神经酰胺; 表皮厚度

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)06-0004-04

人体皮肤是直接与外界接触的器官, 为人体免疫系统的第一道屏障。皮肤屏障异常是导致皮肤疾病的重要因素, 特应性皮炎、银屑病、接触性皮炎等多种皮肤病的发生都与皮肤屏障功能的异常有关^[1]。中医药治疗上述疾病在缓解病情、防止复发、提高患者的生存质量等方面具有一定优势。明申斗垣在《外科启玄》中说过:“言疮虽生于肌肤之外, 而其根本原集于脏腑之内”^[2], 现代医家也多认为皮肤疾病往往由内外因合而发病, 因而辨治也应将局部皮肤辨证与整体脏腑辨证有机地结合起来内外兼治, 才能真正获得满意疗效^[3-5]。健脾法是中医治疗皮肤屏障障碍性疾病的重要治法, 但对于该治法的研究, 现多局限于方药对患者机体免疫调节的影响而较少关注对皮肤机械屏障的作用。因而本文选用健脾方中的代表方参苓白术散和六君子汤为研究对象, 观察两方对小鼠皮肤屏障障碍模型的影响, 揭示健脾法治疗上述皮肤屏障功能障碍疾病的机制, 并通过比较两方对皮肤屏障的作用的差异, 初步探讨健脾渗湿法和益气健脾法对皮肤屏障功能影响的异同。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 ICR 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。合格证号: SCXK(京)2014-0004。

1.2 药品与试剂

参苓白术散: 人参 60g, 茯苓 60g, 炒白术 60g, 山药 60g, 炒白扁豆 45g, 莲子肉 30g, 炒薏苡仁 30g, 砂仁 30g, 炒桔梗 30g, 炙甘草 60g; 六君子汤: 人参 36g, 茯苓 36g, 炒白术 36g, 炙甘草 24g, 陈皮 12g, 半夏 18g, 所有药材均购自昆明市“一心堂”连锁药店, 经中药鉴定教研室张洁老师鉴定为正品。按方中比例水煎、过滤、浓缩制成浸膏, 4℃保存。神经酰胺标准品 (美国 sigma aldrich 公司), 胰酶 (Lot no: MR28175, 法国); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

YLS-Q4 耳肿打耳器, 购自山东省医学科学院设备站; HX086146 薄层色谱硅胶板, 购自德国 Merck 公司; Vapo Meter 测量仪, 购自芬兰 Delfin Technologies 公司; ECLIPSE 50i 生物显微镜, 购自

* 基金项目: 云南省应用基础研究面上项目 (2011FZ155, 2013FB056); 云南省教育厅科学研究基金重点项目 (2013Z004)

收稿日期: 2015-10-09

作者简介: 孙晓菲 (1979-), 女, 陕西韩城人, 讲师, 主要研究方向: 药理与中药药理学。

[△]通信作者: 解宇环, E-mail: kmkamma@163.com

日本 Nikon 公司。

2 方法

2.1 动物分组及处理

将健康 ICR 小鼠，根据体质量分层随机分为 8 组。即正常对照组、模型组、参苓白术散和六君子汤组。除参苓白术散和六君子汤各组分别灌胃给予不同浓度的水煎液外，其余各组灌胃给予等体积蒸馏水，每天 1 次，连续 13d。除正常对照组外，其余各组从给药第 9 天起，以胶带法复制皮肤机械屏障障碍模型，剃去小鼠颈背部被毛后，用强力胶带粘贴该处皮肤 4~5 次，每日 2 次，中间间隔 8h，连续 5d。造模第 5 天，检测完 TEWL 值后将小鼠处死，取下造模处皮肤，用打耳器将取下的皮肤打成圆片供表皮厚度测量和神经酰胺检测。

2.2 表皮经皮水分丢失量(TEWL)测定

用 Vapo Meter 测量仪测定小鼠颈背部皮肤 TEWL，室温 20~25℃，空气相对湿度 50%~60%。测量仪器与测量部位皮肤表面垂直接触，每一测试部位测量 3 次，读出数值并记录，取其平均值。

2.3 表皮厚度测量

10%中性甲醛中固定小鼠表皮 48h 后，脱水、包埋、HE 染色。于 40 倍镜下从视野观察到的皮肤最上端开始拍第一张图片，之后显微镜标尺每移动 2mm 拍一张图片，每张图片取 5 图，图片拍完后用 Image-Pro plus 6.0 形态学分析软件在每张图片上任选 5 个点，一张皮肤共选 25 个点测量小鼠的表皮厚度，再将 25 点的厚度值取平均值即为每只小鼠表皮厚度值。

2.4 表皮神经酰胺含量的测定

参照参考文献[6]报道方法。

2.4.1 表皮脂质的提取

用打耳器打成面积约为 50mm² 大小的皮肤圆片共 6 片。将所取皮片浸泡于胰酶中，37℃水浴 1h，4℃冰箱放置过夜后取出，分离表皮，以 Bligh&Dyer 法^[7]抽提表皮脂质，氮气吹干，-80℃冰箱保存。

2.4.2 对照品的制备和标准曲线绘制

称取神经酰胺对照品 5.0mg，加氯仿定容，得 0.2mg·mL⁻¹ 对照品溶液。精密吸取 2,4,6,8,10,12,14μL 神经酰胺对照品溶液点于薄层板上展开，晾干后再于氯仿:甲醇:氨水=90:10:0.5 中展开；喷洒

显色剂于 140℃下烘干显色。显色后采集图片并用 Image J 软件分析，测定灰度值。经计算得到回归方程： $y=5346.3x+4222.2$ ， $R^2=0.9973$ ，线性关系良好，线性范围为 0.4~2.8μg。

2.4.3 小鼠皮肤神经酰胺含量测定

吸取对照品溶液、供试品溶液，按上述条件测定灰度值，最终换算出神经酰胺含量。

2.5 统计方法

实验数据用($\bar{x}\pm s$)表示，多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，方差齐，组间两两比较采用 LSD 法；方差不齐的采用秩和检验。取 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾方对皮肤屏障障碍小鼠皮肤 TEWL 的影响

与正常对照组比较，皮肤屏障障碍模型小鼠 TEWL 增加($P<0.01$)；与模型对照组比较，参苓白术散和六君子汤组均能减少 TEWL($P<0.01$)，其中参苓白术散组较六君子汤组 TEWL 明显降低 ($P<0.05$)，见表 1。

表 1 健脾方对皮肤屏障障碍小鼠皮肤 TEWL 值的影响

组别	动物数 (n)	剂量 /(g·kg ⁻¹)	TEWL /[g·(m ² ·h) ⁻¹]
正常对照组	20	—	12.10±3.12
模型对照组	20	—	31.01±7.35 ^{△△}
参苓白术散组	20	20	18.55±4.21 ^{**}
六君子汤组	19	6.08	22.92±7.54 ^{**▲}

注：与正常对照组比较，^{△△} $P<0.01$ ；与模型对照组比较，^{**} $P<0.01$ ；与参苓白术散组比较，[▲] $P<0.01$

3.2 健脾方对皮肤屏障障碍小鼠表皮厚度的影响

与正常对照组比较，皮肤屏障障碍小鼠表皮厚度增加($P<0.05$)；与模型对照组比较，参苓白术散组和六君子汤组能降低小鼠表皮厚度($P<0.05$)，而两给药组之间差异无统计学意义。见表 2。

表 2 健脾方对皮肤屏障障碍小鼠表皮厚度的影响

组别	动物数 (n)	剂量 /(g·kg ⁻¹)	表皮厚度 /μm
正常对照组	10	—	6.49±1.35
模型对照组	10	—	15.62±1.13 [△]
参苓白术散组	10	20	6.10±0.64 [*]
六君子汤组	10	6.08	6.69±1.09 [*]

注：与正常对照组比较，[△] $P<0.05$ ；与模型对照组比较，^{*} $P<0.05$

3.3 健脾方对皮肤屏障障碍小鼠皮肤神经酰胺含量的影响

与正常对照组比较,皮肤屏障障碍小鼠神经酰胺含量降低($P<0.05$);与模型对照组比较,参苓白术散组和六君子汤组能升高小鼠皮肤中神经酰胺含量($P<0.01, P<0.05$),而两给药组之间差异无统计学意义。见表 3。

表 3 健脾方对皮肤屏障障碍小鼠皮肤神经含量的影响

组别	动物数 (n)	剂量 /(g·kg ⁻¹)	神经酰胺含量 /[μg·(cm ²) ⁻¹]
正常对照组	10	—	17.24±5.61
模型对照组	10	—	11.20±4.38 [△]
参苓白术散组	10	20	18.55±4.21 ^{**}
六君子汤组	10	6.08	16.65±5.10 [*]

注:与正常对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型对照组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

4 讨论

皮肤屏障有广义和狭义之分,广义的皮肤屏障主要涉及与皮肤各层结构相关的屏障;狭义的皮肤屏障主要包括皮肤角质层(SC)结构相关的屏障^[8]。皮肤屏障功能通常指表皮尤其是角质层的物理性或机械性屏障结构,主要结构基础是表面角质形成细胞形成的角质层、角质细胞间的脂类、天然保护因子(Natural moisturizing factor, NMF)等^[9]。角质形成细胞间隔地“堆砌”于连续的富含特定脂类的细胞间基质中而形成了经典的“砖-墙”结构体系^[10]。角质层细胞间脂质由大约 50%神经酰胺、25%胆固醇、15%游离脂肪酸和一些次要的脂质组成^[11]。神经酰胺在调节皮肤的生物活性及表皮的生理功能中起重要作用,其减少可引起皮肤屏障功能异常和修复的延迟^[12-13]。阻止水分经皮扩散和电解质流失,这是皮肤角质层最重要的屏障功能之一^[14]。TEWL 并不直接表示角质层的水分含量,而是表明水分经角质层散失的情况,TEWL 值越高,表明经皮肤散失的水分越多,角质层的屏障功能越差^[15]。实验表明,小鼠表皮经过胶带反复粘贴后,TEWL 值升高,小鼠皮肤屏障功能下降。形态学观察发现皮肤角质层剥脱或过度增生、细胞层次增多,进一步研究发现表皮中神经酰胺含量降低,说明该模型是通过破坏皮肤角质层的结构、减少脂质含量而造成皮肤屏障的功能障碍。

中医理论认为,脾主湿而恶湿,凡禀赋素弱、劳倦过度、饮食失宜,均能使脾失健运、水湿内停、酿成内湿、浸淫肌肤、走窜四肢而外发皮肤病。治以健脾助运、兼理湿邪。健运中土,则脾气转强,水谷得化;内湿消除,则输津于肤,外燥自解^[16]。给予健脾方参苓白术散和六君子汤后,二者均能降低模型小鼠的 TEWL 值,减少表皮厚度,提高表皮神经酰胺的含量,说明即便没有脾虚见证,健脾方药对皮肤屏障功能障碍也有修复作用。参苓白术散是临床上常用的健脾渗湿代表方药,具有益气健脾,渗湿止泻之功效。本研究发现参苓白术散对皮肤功能障碍的改善作用优于六君子汤,尤以降低 TEWL 值为明显,而对神经酰胺含量的影响二者差异也表现出一定趋势。这也初步证实了中医临床常以健脾与利湿治法相结合治疗皮肤疾病的科学合理性。

参考文献:

[1] 胡珍,于春水. 皮肤屏障功能的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,7(7):3101-3103.

[2] 何丹,林青,王妍. 特应性皮炎的中医辨证及用药规律[J]. 云南中医学院学报,2009,32(4):67-70.

[3] 刘朝霞,韩晓冰,张成会,等. 运用健脾祛湿法治疗银屑病思路[J]. 中医杂志,2012,53(23):2005-2006.

[4] 李芳梅. 中医药在某些皮肤病皮肤屏障功能修复中的研究进展[J]. 中国美容医学,2014,23(8):684-686.

[5] 杨雪松,叶建州,李钦. 健脾养血祛风法治疗特应性皮炎临床疗效及对皮肤屏障功能的影响 [J]. 云南中医学院学报,2009,32(3):5-7.

[6] 王妍,林青,谢金梅,等. 薄层色谱结合凝胶成像系统测定小鼠表皮神经酰胺含量 [J]. 中药新药与临床药理,2008,19(4):281-282.

[7] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. Can J Biochem Physiol, 1959,37(8):911-917.

[8] 杨扬,马慧军,胡蓉. 皮肤角质层的相关屏障结构和功能的研究进展[J]. 中国美容医学,2012,21(1):158-161.

[9] 田燕,刘玮. 皮肤屏障[J]. 实用皮肤病学杂志,2013,6(6):346-348.

[10] Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease[J]. Dermatol Ther,2004,17(S1):6-15.

[11] Jungersted JM, Hellgren LI, Jemec GB, et al. Lipids and skin barrier function - a clinical perspective [J]. Contact Dermatitis, 2008, 58(5):255-262.

- [12] Meckfessel MH, Brandt S. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products [J]. J Am Acad Dermatol, 2014, 71(1): 177-184.
- [13] 吴金燕, 蒋献. 神经酰胺与皮肤屏障[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(1): 64-65.
- [14] Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, et al. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 72(2): 295-303.
- [15] 赵鑫. TEWL在评价皮肤屏障功能研究中的应用 [J]. 广东化工, 2014, 41(14): 133-134.
- [16] 李博鑑. 皮肤科证治概要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 626.
- (编辑: 杨阳)

Study on the Effects of Jianpi Decoctions on Skin Barrier of Disturbance Model in Mice

SUN Xiaofei, YANG Haoran, FANG Kai, XIE Yuhuan
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of Jianpi decoctions—ShenLingBaiZhu powder and LiuJunZiTang on skin barrier by using a mice skin barrier dysfunction model. **Methods** The mouse model of skin barrier dysfunction was made by repeated tape stripping. The Transepidermal Water Loss (TEWL), epidermis thickness and content of epidermal ceramides were tested among normal group, model group and Jianpi decoction groups. **Results** The TEWL and epidermis thickness of models were increased and content of epidermal ceramides was decreased than normal group. The TEWL and epidermis thickness in each group of Jianpi decoction groups were significantly lower than that of model group. Content of epidermal ceramides in Jianpi decoction groups were higher than model group. **Conclusion** Jianpi decoctions could improve the function of skin mechanical barrier, the mechanism of which was related to increase of the content of epidermal ceramides. The effects of strengthening the spleen and removing dampness was better than strengthening the spleen and replenishing qi.

KEY WORDS: Jianpi decoctions; disturbance of skin barrier; TEWL; ceramide; epidermal thickness

(原文见第1页)

Effects of Serum Containing Lingui Zhugan Decoction on TNF- α , IL-6 and IL-1 β of Myocardial H9c2 Cells Injury Induced by TGF- β_1

XU Shan¹, HUANG Jinling^{1,2}, WANG Liang^{1,2}, SHI Hui¹, SHAO Jing^{1,2},
HONG Xinghui¹, GAN Xianbing^{1,2}, LIU Lei¹

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. Research Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the protective effect of serum containing LGZGD on myocardial H9c2 cells injury induced by TGF- β_1 in vitro. **Methods** The myocardial H9c2 cells were incubated with serum containing LGZGD respectively (100 μ L, 10%). After 12 hours, myocardial H9c2 cells in each group were treated with TGF- β_1 (20 ng $\cdot$ mL⁻¹) except normal control group. The method of ELISA was used to detect the contents of TNF- α , IL-6 and IL-1 β . **Results** Compared with the normal control group, the contents of TNF- α , IL-6 and IL-1 β increased markedly ($P < 0.01$). Compared with TGF- β_1 group, the content of TNF- α in LGZGD 4.2, 8.4 g $\cdot$ kg⁻¹ pretreatment groups declined from (323.839 $\pm$ 35.614) to (191.399 $\pm$ 43.203) and (175.030 $\pm$ 19.589) ng $\cdot$ L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the IL-6 content declined from (67.171 $\pm$ 13.506) to (40.490 $\pm$ 7.899) and (30.548 $\pm$ 2.226) ng $\cdot$ L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the content of IL-1 β decreased to (14.793 $\pm$ 4.244), (14.600 $\pm$ 3.517) and (9.253 $\pm$ 2.720) ng $\cdot$ L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in LGZGD 2.1, 4.2, 8.4 g $\cdot$ kg⁻¹ groups. **Conclusion** Serum containing LGZGD has significant protective effects on myocardial H9c2 cells injured by TGF- β_1 .

KEY WORDS: Lingui Zhugan decoction; TGF- β_1 ; myocardial H9c2 cells; TNF- α ; IL-6; IL-1 β