

## 消银 2 号对豚鼠银屑病样皮损组织病理学及 PCNA 含量的影响\*

刘海刚<sup>1</sup>, 李 钦<sup>1</sup>, 文晓燕<sup>2</sup>, 叶建州<sup>2Δ</sup>

(1. 云南中医学院临床医学院, 云南 昆明 650011; 2. 云南省中医医院, 云南 昆明 650021)

**摘要:** 目的 探讨消银 2 号对豚鼠耳部银屑病样皮损组织病理学及增殖细胞核抗原(PCNA)的影响。方法 健康豚鼠 48 只,随机分为空白组、模型组、当归饮子组(9.88 g·kg<sup>-1</sup>)、消银 2 号高、中、低剂量组(26.7g·kg<sup>-1</sup>、13.4g·kg<sup>-1</sup>、6.68g·kg<sup>-1</sup>)。采用 5%心得安诱导法建立豚鼠银屑病样模型,连续造模 3 周后各组开始按剂量灌胃,空白组、模型组给予生理盐水,连续 2 周。检测豚鼠耳组织 Baker 评分、皮损 PCNA 的含量。结果 消银号高、中、低剂量组及当归饮子组组织病理学 Baker 评分 [分别为 (3.200±0.570)、(2.600±0.418)、(2.750±0.524)、(3.000±0.447)] 均低于模型组 (4.643±0.476)(*P*<0.05);消银 2 号高、中、低剂量组皮损中 PCNA 含量[(14.645±0.751)、(14.153±0.899)、(14.918±0.652)]均低于模型组(16.889±0.883)(*P*<0.05)。结论 消银 2 号可通过改善组织学病理评分、抑制 PCNA 的表达发挥治疗银屑病的作用。

**关键词:** 寻常型银屑病; 豚鼠银屑病; Baker 评分; PCNA

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-2723(2015)06-0013-04

银屑病(Psoriasis)是一种常见的、易复发的慢性炎症性红斑鳞屑性皮肤病<sup>[1]</sup>。银屑病受种族、地理、环境等因素的影响,各地的患病率从 0 到 11.8% 不等<sup>[2-3]</sup>。我国银屑病患病率约为 0.47%,男女患病率接近<sup>[4]</sup>。根据银屑病的临床特征,通常可分为寻常型、脓疱型、关节型和红皮病型,以寻常型最为多见,约占 97.06%;其它类型占比较少<sup>[5]</sup>。消银 2 号为云南省中医医院皮肤科叶建州主任医师治疗寻常型银屑病血燥证之经验方。本实验通过 5%心得安诱导银屑病豚鼠模型,观察消银 2 号对豚鼠银屑病样皮损组织学病理学评分(Baker 评分)、PCNA 含量的影响。探讨其治疗寻常型银屑病的机制。

### 1 材料

#### 1.1 实验动物

普通级豚鼠,体质量 300~400g,雌雄各半,四川简阳达硕实验动物有限公司提供,生产许可证号:Scxk(川)2008\_24,合格证号:0002861。

#### 1.2 药物与试剂

“消银 2 号”流浸膏,当归饮子流浸膏,0.9% 氯化钠注射液(贵州天地药业 H52020069),盐酸普萘洛尔

原料药(纯度≥99%)(湖北兴银河化工有限公司 20140211),PCNA ELISA 试剂盒(R&B 公司 201406)。

#### 1.3 主要仪器

Thermo 高速离心机(赛默飞世尔科技),Thermo 全自动酶标仪洗板机(赛默飞世尔科技),石蜡切片机(Leica RM2235 型)、LEICA-DM2500 正置显微镜及图文系统(德国徕卡)。

### 2 方法

#### 2.1 分组及造模

适应性饲养 1 周,第 2 周开始实验,将豚鼠双耳绒毛剃去,将豚鼠随机分为 6 组:空白组、模型组、对照组(当归饮子)和消银 2 号低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 8 只,参照文献[6]除空白组豚鼠外,剩余 5 组均用 5%盐酸普萘洛尔乳膏均匀涂抹豚鼠双侧耳背,面积约 1cm<sup>2</sup>,厚度约 1mm,4 次/d,共 3 周。

#### 2.2 给药

造模 3 周后开始给药:消银 2 号高、中、低剂量组(26.7 g·kg<sup>-1</sup>、13.4 g·kg<sup>-1</sup>、6.68 g·kg<sup>-1</sup>)ig、当归饮子组(9.88 g·kg<sup>-1</sup>)ig、模型组和空白组生理盐水 ig,每日 1 次,共 2 周。每 2d 测量 1 次体质量,调整给药量。

\* 基金项目: 国家中医药管理局刘复兴传承工作室建设项目

收稿日期: 2015-06-17

作者简介: 刘海刚(1987-),男,山东潍坊人,在读硕士研究生,主要研究方向:中医外科学(皮肤病的防治研究)。

Δ通信作者:叶建州,E-mail:kmyjz63@sina.com

2.3 检测指标与方法

2.3.1 豚鼠耳部银屑病样皮损组织病理学评分

用药 2 周后,10%水合氯醛麻醉,颈动脉采血后处死,随即剪取双侧耳组织。耳组织分 3 份,其中 1 份液氮冷冻后-80℃冰箱保存(待组织匀浆用),其余 2 份常规修剪制片,最后在光学显微镜下观察病理改变。参照 Baker 法<sup>[7]</sup>制定病理组织学评分标准。Baker 法积分评估的标准如下:角质层中见有 Munro 小脓疡计 2.0 分;角化过度计 0.5 分;角化不全计 1.0 分;表皮层中见有颗粒层变薄或消失计 1.0 分;棘层肥厚计 1.0 分;皮突延长、基底层迂曲起伏,根据轻、中、重程度分别计 0.5 分、1.0 分、1.5 分;真皮层见有单一核及多形核细胞浸润,根据轻、中、重程度分别计 0.5 分、1.0 分、2.0 分;乳头突出明显计 0.5 分;真皮浅层毛细血管扩张计 0.5 分。

2.3.2 豚鼠银屑病样皮损 PCNA 含量测定

采用酶联免疫吸附法(ELISA),按照试剂盒操作说明操作,经酶标仪分析得出各组豚鼠耳部皮损中 PCNA 含量。

2.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行计算,各组计量资料均使用( $\bar{x}\pm s$ )表示。符合正态分布、方差齐用方差分析,方差不齐采用非参数秩和检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 造模过程中豚鼠耳部皮损变化

见图 1-3。

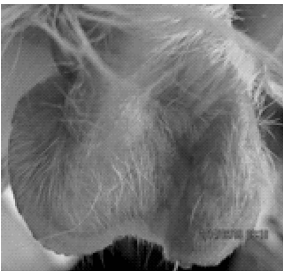


图 1 造模前



图 2 造模 1 周



图 3 造模结束

3.2 病理片

皮损组织病理片显示:模型组豚鼠耳组织出现角化不全或角化过度、Munro 微脓疡、颗粒层变薄或消失、炎细胞浸润,真皮浅层血管扩张,真皮乳头突出,提示造模成功(见图 5)。

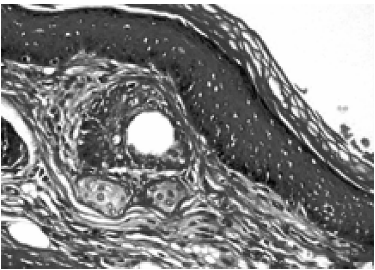


图 4 空白组 10×20 倍

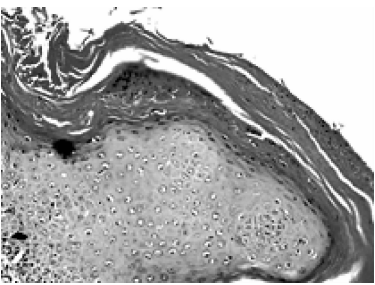


图 5 模型组 10×20 倍

3.3 组织病理学 Baker 评分

见表 1-表 2。

表 1 空白对照组与模型组 Baker 评分值的比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | 例数 | Baker 评分值   |
|-----|----|-------------|
| 空白组 | 8  | 0.188±0.259 |
| 模型组 | 7  | 4.643±0.476 |

注:经  $t'$  检验,2 组比较,  $P=0.000$ , 差异显著,有统计学意义。

表 2 豚鼠银屑病病理 Baker 分值( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别         | 例数 | 给药剂量/<br>( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | 给药<br>途径 | Baker 评分     |
|------------|----|--------------------------------------------|----------|--------------|
| 模型组        | 7  |                                            |          | 4.643±0.476  |
| 当归饮子对照组    | 6  | 9.88                                       | ig       | 3.000±0.447* |
| 消银 2 号低剂量组 | 7  | 6.68                                       | ig       | 2.750±0.524* |
| 消银 2 号中剂量组 | 5  | 13.4                                       | ig       | 2.600±0.418* |
| 消银 2 号高剂量组 | 5  | 26.7                                       | ig       | 3.200±0.570* |

注:经单因素方差 ANOVA 分析:5 组间比较,  $P=0.00$ , 5 组间存在显著性差异;经 LSD 法比较:各组与模型组比较,  $*P<0.05$ , 均具有统计学意义;消银 2 号低剂量、中剂量、高剂量组与当归饮子对照组相比较,  $P$  值分别为:  $P=0.340$ 、 $P=0.150$ 、 $P=0.466$ , 无统计学意义。

3.4 豚鼠耳部皮损部位 PCNA 含量  
见表 3。

表 3 各组豚鼠皮损部位 PCNA 含量测定

| 组别         | 例数 | PCNA 含量均值/(ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|------------|----|----------------------------------|
| 空白组        | 7  | 14.879±1.631                     |
| 模型组        | 7  | 16.889±0.883                     |
| 当归饮子对照组    | 6  | 15.775±0.778*                    |
| 消银 2 号低剂量组 | 7  | 14.918±0.652**                   |
| 消银 2 号中剂量组 | 5  | 14.153±0.899**                   |
| 消银 2 号高剂量组 | 5  | 14.645±0.751**                   |

注:经单因素方差 ANOVA 分析:5 组间比较, $P=0.001$ ,具有显著性差异;再经 LSD 法比较:模型组与空白组比较, $P=0.001$ ,有显著性差异;消银 2 号高、中、低剂量组与模型组比较,\*\* $P<0.05$ ,有显著性差异;当归饮子组与模型组比较,\* $P=0.062$ ,无统计学意义。

4 讨论

银屑病的发病机制尚未明确,目前认为与多基因遗传因素、多环境因素、免疫及炎症刺激有关,其中细胞及体液免疫功能异常均参与了银屑病的发生和发展<sup>[8]</sup>。寻常型银屑病根据临床表现,多分为三型<sup>[9]</sup>,血热内蕴证、血虚风燥证、瘀滞肌肤证。银屑病皮损主要表现为角化不全、细胞更替时间缩短、乳头上表皮变薄、血管扩张和炎性浸润。本次实验诱导豚鼠银屑病模型,结果显示消银 2 号各组均能明显改善皮损组织病理学评分。目前在银屑病的治疗方面,西医传统采用抗肿瘤药物、维 A 酸类、角质促成剂、复方甘草酸苷、维生素 D<sub>3</sub> 衍生物等药物及物理疗法<sup>[10-15]</sup>;近年来生物制剂也开始逐步运用于银屑病的治疗<sup>[16]</sup>,但高昂的费用限制了其广泛推广使用。银屑病严重影响患者质量,目前的治疗措施虽然有效,但不能达到长期的缓解<sup>[17]</sup>,中医中药在治疗银屑病方面疗效好、副作用少,长期以来被患者广为接受。

消银 2 号为叶建州主任医师结合云南本地特色中药,在云南省中医医院皮肤科经过多年的临床运用总结而成。本方由生地黄、熟地黄、丹参、露蜂房、金银花、重楼、白鲜皮、玄参、麦冬、当归、天花粉、乌梢蛇、昆明山海棠组成。临床诊治辨证为血燥证银屑病患者时临症加减,可改善皮损鳞屑增多、干燥等症状,延缓复发。

增殖细胞核抗原(PCNA)与细胞的增殖和分化有关,有文献报道其在银屑病发病中占重要地位,

Kawahira<sup>[18]</sup>研究发现 PCNA 在银屑病皮损中高度表达,而经治疗皮损消退后其表达降低,这与本次实验结果相符合。但本次实验阳性对照药当归饮子在降低 PCNA 含量方面,与模型组比较( $P=0.062$ ),无统计学意义,分析可能与用药时间短、取材及操作误差有关。该方在改善豚鼠银屑病皮损组织病理学 Baker 评分方面,与公认的寻常型银屑病血燥证方药当归饮子比较,效果相当( $P>0.05$ );在降低皮损 PCNA 含量方面,消银 2 号优于当归饮子,可降低 PCNA 含量,抑制其表达,改善银屑病的发病。综合分析,本实验为寻常型银屑病血燥证的中医辨证组方用药提供了新的思路,同时为消银 2 号治疗寻常型银屑病血燥证提供理论基础。

参考文献:

[1] 黄英举,郑小帆,刘卉,等. 银屑病治疗研究新进展[J]. 中国医学创新,2011,8(4):180-181.

[2] Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world [J]. Eur Acad Dermatol Venereol, 2001, 15(1): 16-17.

[3] Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoe pidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis [J]. J Autoimmun, 2010, 34(3): J314-321.

[4] 丁晓岚,王婷林,沈佚藏,等. 中国六省市银屑病流行病学调查[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(7): 598-601.

[5] 赵辨. 临床皮肤病学[M]. 3 版. 南京:江苏科学技术出版社, 2001: 759-766.

[6] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1203.

[7] Baker BS, Brent L, Valdimarsson H, et al. Is epidermal cell proliferation in psoriatic skin grafts on nude mice driven by T-cell derived cytokines? [J]. Br J Dermatol, 1992, 126(2): 105-110.

[8] 黄桂新. 银屑病病因与发病机制的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(13): 73-74.

[9] 中华中医药学会. 中医皮肤科常见病诊疗指南 [S]. 北京:中国中医药出版社, 2012: T342.

[10] 李双凤. 甲氨蝶呤治疗中重度寻常型银屑病的临床疗效观察[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2012, 19(4): 228-229.

[11] 张付菊, 梁亮. 维胺脂胶囊联合消银汤治疗寻常型银屑病 52 例[J]. 天津药学, 2008, 20(2): 39-40.

[12] 张贯高, 赵丽. 中西医结合治疗银屑病 38 例疗效观察 [J]. 河南中医, 2005, 25(12): 78.

[13] 姚舒, 都日亮, 徐世新. 复方甘草酸苷片联合复方氟米松治疗寻常型银屑病临床观察[J]. 中国医药导报, 2010, 7(34): 152-153.

- [14] 曹萍, 王晓川, 吴颖. 阿维 A 治疗寻常性银屑病的临床疗效观察[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(1): 61-62.
- [15] 王月梅. 复方甘草酸苷联合卡泊三醇治疗寻常型银屑病的临床观察[J]. 中国实用医药, 2011, 6(30): 143-144.
- [16] 张学军. 皮肤性病学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 139.
- [17] 马晓蕾, 周城, 蔡林, 等. 生物制剂治疗银屑病的研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2012, 41(9): 577-579.
- [18] Kawahira K. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin disease[J]. Arch Dermatol Res, 1999, 291(7-8): 413-418.

(编辑: 杨阳)

## Xiaoyin No. 2' Effect of Content on the Histopathology and the Content of PCNA in Psoriatic Lesions of Guinea Pig

LIU Haigang<sup>1</sup>, LI Qin<sup>1</sup>, WEN Xiaoyan<sup>2</sup>, YE Jianzhou<sup>2</sup>

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine. Kunming 650000, China;

2. Yunnan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine. Kunming 650000, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To study the Xiaoyin No.2' effect of content on the ear skin histopathological and proliferating cell nucleus antigen (PCNA) in psoriatic lesions of guinea pig. **Methods** 48 healthy guinea pigs were randomly divided into blank group, model group, angelica Yinzi (9.88 g·kg<sup>-1</sup>), Xiaoyin No.2 high, medium and low dose group (26.7 g·kg<sup>-1</sup>, 13.4 g·kg<sup>-1</sup>, 6.68 g·kg<sup>-1</sup>). 5% propranolol induction method was adopted to establish the guinea pig model psoriasis samples, for building 3 weeks after each group started by ig, the blank group and model group were given saline ig, for 2 weeks. Detection of guinea pig ear tissue Baker score, lesion of PCNA content. **Results** Xiaoyin No.2 high, medium and low dose group and angelica Yinzi histopathological grading Baker [respectively (3.200±0.570), (2.600±0.418), (2.750±0.524), (3.000±0.447)] were lower than that of model group [(4.643±0.476)] ( $P<0.05$ ); Xiaoyin No.2' high, medium and low dose group of PCNA content [(14.645±0.751), (14.153±0.899), (14.918±0.652)] were lower than that of model group (16.889±0.883) ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Xiaoyin No.2 can play a role for the treatment of psoriasis by improving the histological pathology score and inhibit the expression of PCNA.

**KEY WORDS:** Psoriasis vulgaris; guinea pigs psoriasis; Baker score; PCNA

(上接第 12 页)

- [29] 邓洪波.  $\alpha$ -酮酸对 5/6 肾切除大鼠贫血的影响及可能机制的探讨[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [30] 杨保华. 利用基因组学和蛋白质组学技术研究纳米铜的肝、肾毒性及作用机制[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- [31] 鲁莹. 昆仙胶囊对 MRL/lpr 小鼠狼疮性肾炎代谢组学影响的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.

(编辑: 杨阳)

## NMR Based Metabonomic Research on the Treatment Mechanism of Gandouling on Kidney Injury of Copper-laden Rats

JIANG Huaizhou<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>2</sup>, XU Jingjing<sup>2</sup>, DONG Jiyang<sup>2</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

2. Department of Electronic Science, Fujian Provincial Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To explore the influences of Gandouling on liver injury of copper-laden rats. **Methods** The tested rats were randomly divided into the control group, model group and Gandouling group. After modeling, TUNEL method was applied to test the apoptosis cells index and NMR-based metabonomics was applied to analyze the metabolic changes of rat kidney tissue. **Results** Compared with the control group, the apoptosis cells index in kidney of the model group was significantly increased ( $P<0.01$ ); the content of phenylalanine, alanine, tyrosine, glutamate, lysine, valine, leucine, inosine and aspartate was decreased. Compared with the model group, the apoptosis cells index in kidney of the Gandouling group was significantly decreased ( $P<0.01$ ); the content of the above metabonolates was increased. **Conclusion** There is certain intervention influence of Gandouling on copper-laden rats. The related mechanism may involve regulating aromatic amino acid (phenylalanine, alanine) and branched chain amino acid (valine, leucine) metabolism, inhibiting apoptosis of renal tubule epithelia and regulating ammonia metabolism.

**KEY WORDS:** metabonomics; copper-laden; kidney injury; Gandouling