

· 论著 ·

玉屏风多糖组分对皮肤角质形成细胞的作用研究

黄瑾^{1,2}, 刘景雪¹, 曾颖² (1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药学部, 上海 200437; 2. 上海市浦东新区人民医院药剂科, 上海 201299)

[摘要] 目的 研究中药方剂玉屏风的多糖组分在体外对角质形成细胞的免疫调节作用。方法 利用 Real-time PCR 法检测玉屏风多糖组分对激活的皮肤角质形成细胞中各炎症因子表达的调控作用; 分别用 Real-time PCR 法和 Elisa 法对聚角蛋白微丝蛋白(Filaggrin)在 mRNA 和蛋白水平的表达进行检测; 用 Western bolt 法检测多糖组分对 NF- κ B 信号通路的调节作用。结果 玉屏风多糖组分明显抑制激活的皮肤角质形成细胞分泌炎症因子, 促进 Filaggrin 的表达, 并对 NF- κ B 信号通路有明显的抑制作用, 该信号通路对炎症和免疫细胞的活化有重要作用。结论 玉屏风多糖组分在体外对皮肤角质形成细胞有免疫调节作用, 能够减缓皮肤局部炎症的发展, 为玉屏风方剂的进一步开发应用奠定理论基础。

[关键词] 玉屏风; 多糖; 皮肤角质形成细胞; 炎症因子

[中图分类号] R275.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2019)01-0051-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.012

Study of the effect of polysaccharides from Yupingfeng on keratinocytes

HUANG Jin^{1,2}, LIU Jingxue¹, ZENG Ying² (1. Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Department of Pharmacy, Pudong New Area People's Hospital, Shanghai 201299, China)

[Abstract] **Objective** To study the immunomodulatory effect of Yupingfeng polysaccharides on keratinocytes *in vitro*. **Methods** The effects of Yupingfeng polysaccharides on the expression of various inflammatory factors in the activated keratinocytes were detected by the Real-time PCR method. The mRNA and protein expression levels of Filaggrin were detected by Real-time PCR and Elisa respectively. The western bolt assay was used to detect the regulation of NF- κ B signaling pathway by polysaccharides. **Results** Yupingfeng polysaccharides inhibited the secretion of inflammatory factors in the activated keratinocytes, promoted the expression of Filaggrin and exhibited significant inhibitory effect on the NF- κ B signaling pathway, which plays an important role in the inflammation and immune response. **Conclusion** Yupingfeng polysaccharides had an immune regulation effect on skin keratinocytes *in vitro* and alleviated the development of local inflammation. These results lay a theoretical foundation for the clinical application of Yupingfeng prescription.

[Key words] Yupingfeng; polysaccharide; keratinocytes; inflammatory factors

皮炎(dermatitis)是指由各种内、外部感染或非感染性因素导致的皮肤炎症,其病因和临床表现复杂多样,且反复发作,临床治疗较为困难。以最常见的特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)为例,它是一种慢性的、反复发作的炎症性皮肤病,常伴有剧烈瘙痒,严重影响患者的生活质量^[1-3]。随着对 AD 免疫病理机制研究的不断深入,治疗 AD 的疗法或药物主要包括:免疫抑制剂环孢素 A、霉酚酸酯、白三烯

拮抗剂孟鲁司特,针对 CD11a、CD20、TNF- α 或 IgE 的单克隆抗体, γ -干扰素以及静脉注射免疫球蛋白等。上述药物在临床试用中均已显示对 AD 具有一定疗效,但由于副作用大或价格昂贵等原因使应用受到限制。

近年来有文献报道,中医经典方剂玉屏风散对治疗包括 AD 在内的多种皮炎有确切效果^[4-7]。玉屏风散出自我国元代医学家危亦林的中医名著《世医得效方》,由黄芪、白术、防风三味中药组成,临床上将玉屏风散作为中药免疫调节剂加以使用。多糖组分是玉屏风散发挥免疫干预作用的主要有效部位,能够增强机体非特异性免疫和黏膜免疫功能。但多糖组分是否在玉屏风散治疗皮肤疾病中发挥主要作用,对在皮炎形成发展过程中有重要作用的皮

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题资助项目(201440461);浦东新区卫生系统学科带头人培养计划(PWRd-2014-11);浦东新区卫生(计生)科技项目(PW2013A-12)

[作者简介] 黄瑾,副主任药师,研究方向:中药活性成分的作用机理研究,Email:john70550@163.com

角质形成细胞是否有免疫调节作用,目前尚未见报道。本研究分离提取了玉屏风的多糖组分,探讨其在体外对皮肤角质形成细胞的免疫调节作用,阐明玉屏风多糖组分的活性作用,为其进一步用于皮炎的临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与载体

人皮肤角质形成细胞(keratinocytes, KCs)株 HaCaT 细胞(中科院上海细胞所),用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基常规传代培养。

1.2 试剂与仪器

DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司)。LPS (E. coli, O111 : B4)、辣椒素(capsaicin, CAP, Sigma-Aldrich 公司);TNF- α (美国 PeproTech 公司);聚角蛋白微丝蛋白(Filaggrin)的 Elisa 检测试剂盒(武汉伊艾博科技有限公司);I κ B α 、P65 抗体及磷酸化抗体(Cell Signaling Technology, CST)。玉屏风散由黄芪、白术、防风三味中药按 3 : 1 : 1 组成。实验中将玉屏风组分进行拆方研究,获取黄芪多糖(APS)、白术多糖(PAM)、防风多糖(SPS)、玉屏风总水煎物(YPF)和玉屏风总多糖(TP),均由江苏永健医药有限公司提供。

1.3 玉屏风各组分对皮肤角质形成细胞表达炎症因子的影响

HaCaT 细胞按常规培养并分入 6 孔板,培养过夜。加入 YPF、APS、PAM、SPS 及 TP,终浓度均为 200 μ g/ml。处理 30 min 后,再加入终浓度为 10 μ g/ml 的 LPS 培养 24 h,收集细胞,提取 RNA,用 Real-time PCR 法检测相关趋化分子和细胞炎症因子 mRNA 表达水平,合成的引物序列见表 1。

Real-time PCR 实验条件设置如下,50 $^{\circ}$ C : 2 min,95 $^{\circ}$ C : 10 min;95 $^{\circ}$ C : 15 s,60 $^{\circ}$ C : 1 min,40 个循环。样品的半定量比较按以下公式计算:

$$\Delta Ct = \text{目的基因 Ct} - \text{GAPDH Ct}$$

表 1 用于 Real-time PCR 的各引物序列

基因	正向引物	反向引物
IL-1 β	tcctgcgtgttgaaagatgataa	caaatcgcttttccatcttcttc
IL-8	caaacccttccaccccaaat	accctctgcaccagtttctc
MCP-1	ccagcatgaaagtctctgcc	ataacagcaggtgactgggg
GAPDH	tgaccacagtcctgcccac	gacggacacattgggggtag
Filaggrin	tttcgtgtttgtctgcttgc	ctggacactcaggttcccat

1.4 玉屏风各组分对 Filaggrin 表达的影响

HaCaT 细胞按常规培养并分入 6 孔板,加入各中药组分处理 30 min,再加入刺激剂辣椒素(capsaicin, CAP)10 μ mol/L 培养 24 h,收集细胞和培养上清液,提取 RNA,分别采用 Real-time PCR 法检测 Filaggrin 的 mRNA(引物序列见表 1)表达水平,用 Elisa 法检测细胞培养上清液中的蛋白表达水平。

1.5 玉屏风各组分对炎症相关信号通路 NF- κ B 的影响

HaCaT 细胞分别与 YPF、APS 及 TP(200 μ g/ml)预孵育 2 h,用 10 ng/ml 的 TNF- α 刺激 20 min,收集细胞,裂解蛋白。用 Western blot 检测 NF- κ B 通路中 I κ B 的磷酸化及降解,以及 P65 的磷酸化水平,来表示这些组分对 TNF- α 诱导的 NF- κ B 通路活化的影响。

1.6 统计学处理

用软件 SPSS 18 进行独立样本 *t* 检验统计分析,当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 玉屏风各组分的作用结果

2.1 抑制 HaCaT 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平

玉屏风散多个组分均对 LPS 刺激的 HaCaT 细胞中炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-8 和趋化分子 MCP-1 的表达有抑制作用(图 1)。其中 APS、YPF 和 TP 对炎症细胞因子白介素(IL)-1 β 抑制率分别为 36.2%、47.7%和 49.3%;TP 对 IL-8 和趋化分子 MCP-1 的抑制率最高,分别为 105.5%和 61.7%,具有显著的统计学差异($P < 0.05$)。

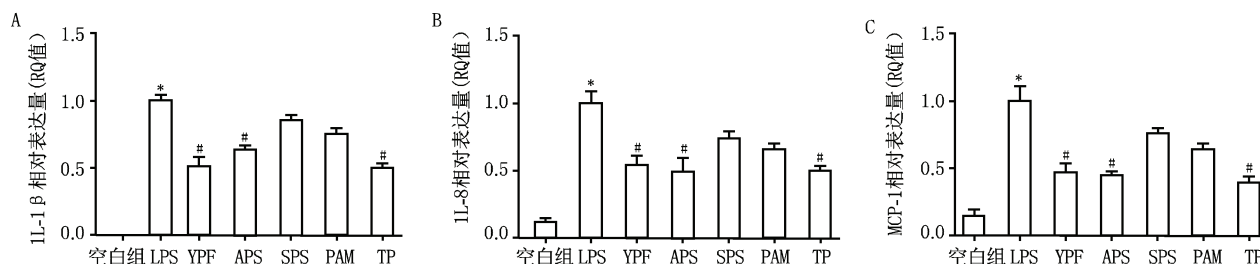


图 1 玉屏风各组分对 LPS 刺激的 HaCaT 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平的影响 ($n=3$)

A. IL-1 β 相对表达量; B. IL-8 相对表达量; C. MCP-1 相对表达量

* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与 LPS 组比较

2.2 对 Filaggrin 表达的影响

Real-time PCR 实验结果表明(图 2A),与 CAP 组比较,YPF、APS、PAM 和 TP 对 Filaggrin 的 mRNA 表达均有促进作用,可分别增加 84.5%、33.1%、47.9%和

67.6%。同时,Elisa 实验结果(图 2B)表明,与 CAP 组比较,YPF、APS 和 TP 对 Filaggrin 的蛋白表达均有促进作用($P < 0.05$),提示其对皮肤有较好的保护作用,而 PAM 组未表现出明显差异。

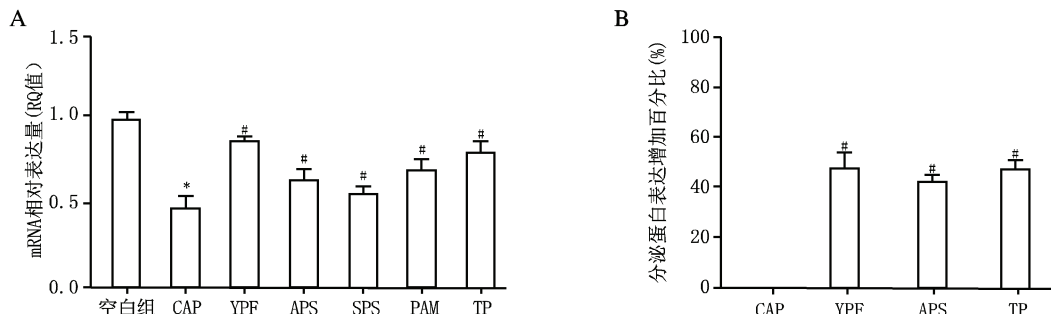


图 2 玉屏风各组分对 KCs 株 HaCaT 细胞中 Filaggrin 表达的影响($n=3$)

A. Real-time PCR 实验结果; B. Elisa 实验结果

* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与 CAP 组比较

2.3 对 NF- κ B 信号通路的影响

NF- κ B 信号通路是炎症和免疫细胞的共同活化通路。在前期工作的基础上,选择 YPF、APS 和 TP(200 μ g/ml),检测其对 TNF- α 诱导的 NF- κ B 通路的影响。NF- κ B 常见的形式是由 p50 和 p65 蛋白亚基组成异源二聚体,在静息状态时与其抑制物 I κ B 结合以无活性的复合物形式存在于细胞浆,当细胞受到外来刺激时,通过一系列信号转导途径,激活系列激酶使 I κ B 降解从而释放 NF- κ B,使其从细胞浆移位到细胞核,并在胞核内与相应基因上的结合位点发生特异性的结合,调控炎症细胞因子、趋化因子、黏附分子等相关基因的表达,参与调控机体的免疫反应和炎症反应。Western blot 结果表明(图 3),YPF、APS 和 TP 3 种组分均具有显著抑制 HaCaT 细胞中 NF- κ B 通路活化的作用,其中以 TP 作用最强。

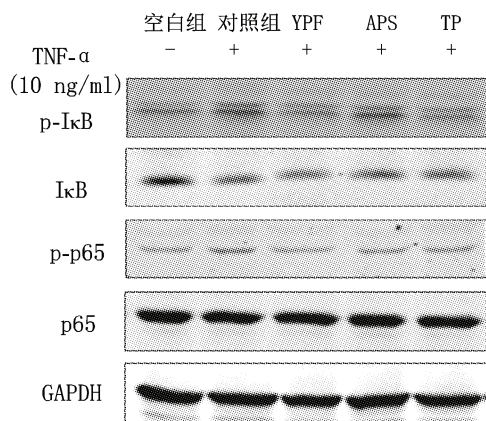


图 3 玉屏风各组分对 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞中 NF- κ B 通路活化的影响

3 讨论

AD 表现为明显的湿疹样变和皮肤干燥,病程迁延难愈,易反复发作,瘙痒难忍,常影响情绪和睡眠,被医学界视为“湿疹中最难治的一种”。AD 是一种双相型 T 细胞介导的疾病,而 KCs、朗格罕氏细胞(Langerhans cells, LCs)和炎症性表皮树突状细胞(inflammatory dendritic epidermal cells, IDECs)在炎症因子分泌和抗原递呈激活 T 细胞的过程中发挥重要作用。KCs 既是皮肤屏障功能的重要执行者,也是免疫应答的积极参与者,其生物学功能以往被大大低估。KCs 还是各种趋化因子和细胞因子的重要分泌细胞,进一步研究其免疫功能将有助于对 AD 发病机制的理解和开发新的治疗策略。

AD 的药物研发一直受到广泛关注。传统治疗方法(使用激素、抗组胺药、抗炎药等)可以暂时缓解症状,但停药后往往复发,且病情加重,甚至转为慢性。外用糖皮质激素由于作用迅速且疗效显著,常用于 AD 治疗。然而这类药物长期外用可能引起皮肤萎缩、毛细血管扩张、色素沉着、口周皮炎以及继发感染等不良反应。玉屏风散方中黄芪益气固表止汗为君;白术补气健脾为臣;佐以防风走表而散风邪,合黄芪、白术以益气祛邪。且黄芪得防风,固表而不致留邪;防风得黄芪,祛邪而不伤正,有补中寓疏,散中寓补之意。黄芪中含有多糖、蛋白质、生物碱、氨基酸、黄酮类、微量元素等活性物质,其中多糖成分的免疫活性最为突出^[8]。APS 从黄芪中提炼得到,是黄芪的主要生物活性成分。早在 20 世纪

90 年代,有日本学者研究发现,黄芪多糖具有增强老龄鼠产生抗体的作用^[9]。PAM 作为白术的一个重要组成成分,具有毒性小、生物利用度高、药理作用明确等特点^[10],已经用于食品添加剂,并作为临床药物用于恢复期肿瘤患者或在化疗时辅助应用,目前已经证明其有明显的增强免疫作用。防风亦具有增强免疫作用,其有效部位为多糖,SPS 具有增强免疫活性,能明显增加体外培养的巨噬细胞释放 IL-1 和 IL-8,提高 NK 细胞和脾淋巴细胞的杀伤活性,促进 IL-2 对 NK 细胞的激活^[11];还有研究表明 SPS 呈剂量依赖性地提高小鼠特异性免疫和细胞免疫功能,还能促进小鼠脾淋巴细胞的增殖。

由 KCs 分泌的一种被称为 Filaggrin 的分子是构成皮肤屏障功能的重要成分^[12]。AD 患者皮肤 Filaggrin 表达减少是导致皮肤屏障功能缺陷的重要原因,而皮肤屏障功能缺陷则使环境中的蛋白抗原、微生物和其他刺激原易于通过表皮层,进而刺激局部免疫细胞,触发 I 型和 IV 型变态反应,这是启动皮肤炎症的主要环节。为了进一步考察玉屏风各组分对皮肤的保护作用,笔者验证了其对于 Filaggrin 表达的影响(该蛋白表达上调可能促进真皮屏障功能的恢复)。

笔者对玉屏风散的多糖组分对皮肤角质形成细胞的免疫调节功能进行了研究,发现 APS 和 TP 都有明显的免疫调节作用,以后者的作用更为显著。TP 可以抑制激活的皮肤角质形成细胞分泌炎症介质,促进 Filaggrin 的表达,并对炎症和免疫细胞的活化具有重要作用的 NF- κ B 信号通路有明显的抑制作用。这些基础研究为进一步开发利用中药方剂玉屏风用于 AD 的治疗阐明了作用机制,打下了良

好的基础。

【参考文献】

- [1] LEUNG D Y, BIEBER T. Atopic dermatitis [J]. *Lancet*, 2003, 361(9352): 151-160.
- [2] LEUNG D Y, BOGUNIEWICZ M, HOWELL M D, et al. New insights into atopic dermatitis [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(5): 651-657.
- [3] GITTLER J K, KRUEGER J G, GUTTMAN-YASSKY E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2): 300-313.
- [4] 葛延全. 玉屏风散应用于皮肤疾病经验[J]. *内蒙古中医药*, 2001, 20(2): 20.
- [5] 李雪娇. 特异性免疫治疗联合玉屏风颗粒治疗特应性皮炎的疗效观察[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49(7): 144-146.
- [6] 韩莉. 玉屏风散配合西药治疗慢性湿疹 60 例[J]. *陕西中医*, 2015, 36(3): 322-324.
- [7] 胡建农. 玉屏风胶囊合复方甘草酸苷片治疗慢性荨麻疹 48 例[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(3): 268-269.
- [8] 陈静, 袁明勇, 郑玲利, 等. 黄芪的化学成分和药理作用研究[J]. *临床医药实践*, 2009, 18(11): 2217-2219.
- [9] KAJIMURA K, TAKAGI Y, MIYANO K, et al. Polysaccharide of Astragali radix enhances IgM antibody production in aged mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(11): 1178-1182.
- [10] 曹岗, 张晓炎, 丛晓东, 等. 白术多糖的研究进展[J]. *北京联合大学学报(自然科学版)*, 2009, 23(3): 14-18.
- [11] 杨淳, 田维毅. 防风多糖对巨噬细胞分泌细胞因子的影响[J]. *贵阳中医学院学报*, 2011, 33(4): 31-33.
- [12] WEIDINGER S, ILLIG T, BAURECHT H, et al. Loss-of-function variations within the Filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(1): 214-219.

【收稿日期】 2018-06-26 【修回日期】 2018-11-29

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 45 页)

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [3] HEYERICK A, VERVARCKE S, DEYPERE H, et al. A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts [J]. *Maturitas*, 2006, 54, (2): 164-175.

- [4] MILLIGAN S R, KALITA J C, POCOCK V, et al. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(12): 4912-4915.
- [5] GERHAUSER C, ALT A, HEISS E, et al. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(11): 959-969.

【收稿日期】 2018-05-21 【修回日期】 2018-10-08

【本文编辑】 李睿旻