

· 基础研究 ·

银屑 I 号对咪喹莫特诱导 BALB/c 小鼠
银屑病模型的干预作用杭怡宁¹ 黎锦添¹ 王金华¹ 谢玉彬¹ 李秋恽¹ 钟欣欣¹ 查旭山²

摘要 **目的** 观察银屑 I 号对咪喹莫特(IMQ)诱导的 BALB/c 小鼠银屑病模型局部皮损及外周血的干预作用。**方法** SPF 级 BALB/c 小鼠 30 只,随机分为对照组、模型组、银屑 I 号高、中、低剂量组,每组 6 只,除对照组外,其余各组每日外涂 62.5 mg 5% IMQ 诱导银屑病样动物模型,银屑 I 号高、中、低剂量组小鼠造模期间同时灌胃相应剂量银屑 I 号,共 7 日。分别观察小鼠背部皮损厚度变化、皮损面积和疾病严重程度指数(PASI),光镜下观察局部皮损组织病理变化,对局部皮损组织依次使用反转录聚合酶链式反应(qPCR)、免疫印迹(Western Blot)法检测维生素 D 受体(VDR)、血管内皮生长因子(VEGF)在 mRNA 及蛋白水平表达,采用 ELISA 法检测外周血白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)含量。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠背部皮损皮肤显著增厚,并出现典型银屑病表现,PASI 评分随时间推移显著上升;与模型组比较,银屑 I 号各组小鼠背部皮损红斑及鳞屑相对较少、浸润程度较轻,造模区域皮肤厚度及 PASI 评分与剂量梯度成反比。光镜下模型组小鼠背部皮损表皮全层增厚,呈典型银屑病病理改变;与模型组比较,银屑 I 号高剂量组病理改变最轻,中剂量组次之,低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,模型组 VDR mRNA 及蛋白表达降低($P<0.01$, $P<0.05$),VEGF mRNA 及蛋白表达及外周血中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,银屑 I 号中、高剂量组 VDR mRNA 及蛋白表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),VEGF mRNA、蛋白表达及外周血 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量均显著降低($P<0.01$),低剂量组 VEGF mRNA 及蛋白表达均显著降低($P<0.01$),外周血中 IL-6 含量有所降低($P<0.05$),VDR mRNA 及蛋白表达、TNF- α 、IFN- γ 含量差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 一定剂量的银屑 I 号可通过抑制异常新生血管形成及炎症环境改善 IMQ 诱导银屑病小鼠模型的银屑病表现,这可能与调控 VDR/VEGF 信号网络有关。

关键词 银屑 I 号; 维生素 D 受体; 银屑病动物模型; 新生血管; 炎症因子

Antipsoriatic Effects of Psoriasis I on Imiquimod-induced Psoriasis-like Dermatitis in BALB/c Mice

HANG Yi-ning¹, LAI KAM Tim¹, WANG Jin-hua¹, XIE Yu-bin¹, LI Qiu-yi¹, ZHONG Xin-xin¹, CHA Xu-shan² 1 First Clinical Medicine College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Department of Dermatology, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

ABSTRACT **Objective** To observe the anti-psoriatic effects of Psoriasis I (P I) on imiquimod (IMO)-induced psoriasis-like dermatitis in BALB/c mice. **Methods** Thirty SPF grade BALB/c mice were randomly divided into 5 groups: control group, model group, high, middle, and low dose P I groups, 6 in each group. Psoriasis-like dermatitis was induced on the shaved dorsal skin of BALB/c mice (except the control group) by external application of 62.5 mg 5% IMQ. Corresponding doses P I were administrated to mice in the three P I groups by gastrogavage for 7 successive days. The changes of back skin lesion thickness, lesion area, Psoriasis Area and Severity Index (PASI) were respectively evaluated. Histopathological changes were observed under light microscope. The levels of mRNA and protein expressions of vi-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81573980); 广东省科技厅项目(No. 2017A020215058)

作者单位: 1. 广州中医药大学第一临床医学院(广州 510405); 2. 广州中医药大学第一附属医院皮肤科(广州 510405)

通讯作者: 查旭山, Tel: 020-36591826, E-mail: chaxushan@sina.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20191118. 451

tamin D receptor (VDR) and vascular endothelin growth factor (VEGF) were detected by qPCR and Western Blot. Contents of IL-6, tumor necrosis factor α (TNF- α), and IFN- γ were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the skin of the back skin of the model group was significantly thickened with typical manifestations of psoriasis. The PASI score increased significantly as time went by. Compared with the model group, the erythema and scales were relatively less, and the degree of infiltration was milder in each P I group. The skin thickness and PASI score of the model area were inversely proportional to the dose gradient. Results of light microscope showed that the epidermis of the model group was thickened in line with typical pathological changes of psoriasis. Compared with the model group, the pathological changes of high dose P I group were the lightest, followed by middle dose P I group. There were no significant differences between the low dose P I group and the model group ($P>0.05$). Compared with the control group, mRNA and protein expressions of VDR decreased ($P<0.01$, $P<0.05$), the VEGF mRNA and protein of expression, contents of IL-6, TNF- α , and IFN- γ in the peripheral blood significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the mRNA and protein expressions of VDR increased ($P<0.05$, $P<0.01$), mRNA and protein expressions of VEGF and contents of IL-6, TNF- α , IFN- γ in peripheral blood significantly decreased in middle and high dose P I groups ($P<0.01$). mRNA and protein expressions of VEGF significantly decreased ($P<0.01$), IL-6 content in peripheral blood decreased ($P<0.05$) in low dose P I group. There was no significant differences in mRNA and protein expressions of VDR, contents of TNF- α or IFN- γ in low dose P I group ($P>0.05$). **Conclusion** Certain dose P I improved the performance of IMQ-induced psoriasis model mice possibly by inhibiting abnormal neovascularization and inflammatory environment, which might be related to regulating VDR/VEGF signaling network.

KEYWORDS Psoriasis I; vitamin D receptor; psoriasis-like dermatitis animal model; angiogenesis; inflammatory factor

银屑病是皮肤科临床的常见病、多发病,目前发病原因尚缺乏定论,其病理表现主要包括表皮角化过度伴角化不全、炎症细胞浸润及新生毛细血管迂曲扩张^[1]。因其具有一定损容性,且普遍病程较长、迁延难愈,常常给患者身心带来一定影响^[2]。作为一种免疫相关的复杂性疾病,国内外围绕银屑病的研究仍在不断深入,近年来认识到维生素 D 除了调节钙磷代谢外,还具有调控免疫系统、调节角质形成细胞增殖、分化的功能^[3],由此卡泊三醇、骨化三醇、他卡西醇等维生素 D 类似物类药物成为了西医治疗银屑病的一线用药之一。中医学在长期临床实践中积累了大量治疗银屑病的经验,银屑 I 号是国医大师禚国维教授治疗银屑病的经验方,在临床中笔者发现本方不仅可以改善银屑病患者炎症状态,还可显著减轻局部皮损鲜红和浸润表现^[4],但对其作用靶点尚不明确。前期本课题组通过网络药理学方法发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路可能是银屑 I 号发挥银屑病治疗作用的重要环节之一^[5]。本实验拟采用咪喹莫特(imiquimod, IMQ)诱导 BALB/c 银屑病小鼠模型,从维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)/VEGF 信号角度初步探讨

银屑 I 号治疗银屑病可能的作用机制。

材料与方法

1 动物及分组 SPF 级 BALB/c 小鼠 30 只,雌雄各半,4~6 周龄,体质量 18~22 g,购于广州中医药大学实验动物中心(实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2018-0034),饲养于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室(实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2018-0001),室温(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50%~70%,每日光照 10 h。本实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(No. 20191022004)后展开。所有小鼠适应性喂养 1 周后称重,采用随机数字表法^[6]分为对照组,模型组,银屑 I 号低剂量(P I-L)组,银屑 I 号中剂量(P I-M)组,银屑 I 号高剂量(P I-H)组,每组 6 只。

2 药物 咪喹莫特乳膏(3 g:0.15 g,四川明欣药业有限责任公司,批号:18090240)。银屑 I 号为广州中医药大学第一附属医院皮肤科协定处方,组成为土茯苓 30 g 板蓝根 30 g 大青叶 15 g 当归 15 g 白花蛇舌草 15 g 川芎 15 g 车前草 15 g 地肤子 12 g 半边莲 12 g 蜂房 12 g 泽泻 12 g 白鲜皮 12 g 甘草

6 g, 生药均购于广州中医药大学第一附属医院中药房, 中药组按成人(60 kg)临床所用剂量作为中剂量, 据文献[7]确定不同浓度梯度并由医院制剂中心制成低、中、高剂量药液, 浓度依次为 1.02、2.03、4.06 g/mL, 冷却后保存于 4℃ 冰箱备用。

3 主要试剂及仪器 RNA 提取试剂盒(日本 Takara 公司)、扩增及逆转录试剂盒(德国 DBI 公司)、蛋白抽提试剂及 BCA 试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)、山羊抗兔小鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司)、GAPDH 鼠单抗(英国 Abcam 公司)、VDR 多克隆抗体、VEGFA 单克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司)、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 小鼠 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。显微镜及照相系统(PM-10AD, 日本 Olympus 公司)、ABI Real time PCR 仪(7500 型, 美国 ABI 公司)、Stratagene Real time PCR 仪(Mx3000P, 美国 Agilent 公司)、SDS-PAGE 垂直电泳槽(MP-8001, 北京凯元伯乐生物科技有限公司)、Thermo 酶标仪(MULTISKAN MK3, 美国 Thermo Scientific 公司)。

4 方法

4.1 造模方法 依次使用动物剃毛器及温和型脱毛膏对各组小鼠背部进行彻底脱毛, 脱毛后观察 1 日有无局部破损及皮肤异常反应。参照参考文献[8]方法自第 2 日起对照组背部均匀涂抹凡士林软膏 62.5 mg, 其余各组背部均匀涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 62.5 mg, 连续造模 7 日。造模成功的银屑病小鼠模型应具有与人类银屑病相似的特征^[8], 如肉眼观察可见的暗红斑块、基底浸润, 表面覆干燥鳞屑, 病理组织切片显示角质增厚, 主要为角化不全, 角化不全细胞间夹杂空气间隙, 角层内或下可见 Munro 小脓肿, 颗粒层变薄或消失, 棘层增厚, 乳头状水肿呈杵状等^[1]特征。

4.2 给药方法 根据参考文献[9, 10]于造模当天同时给药, 每日上午 9:00 对 P I-L、P I-M、P I-H 组小鼠分别灌胃药液 0.4 mL, 对照组和模型组小鼠分别灌胃 0.9% 生理盐水 0.4 mL, 连续灌胃 7 日。

4.3 观察项目及检测方法

4.3.1 各组一般情况、皮肤厚度测定及 PASI 评分 干预期间观察各组小鼠精神、饮食、饮水、大小便及自主活动情况。每日灌胃前对各组小鼠背部拍照记录, 并由两名实验员参照参考文献[9]的方法独立对各组小鼠背部皮损红斑、鳞屑、浸润进行银屑病皮损面积和严重性指数(psoriasis area and severity index, PASI)评分, 评分标准参照参考文献[11, 12]制定。具体: 0 分(无)、1 分(轻微)、2 分(较明显)、3 分(显著)、4 分(非常

显著), 3 项得分之和计为总分(0~12), 反映局部皮损严重程度。计分后使用游标卡尺折叠测量各组小鼠背部中线前、中、后 3 点皮肤厚度, 并取测量平均值。

4.3.2 组织病理学检测 药物干预 7 日后眼球取血处死, 迅速剪取小鼠背部造模区域皮肤分为 3 份, 其中 2 份置入液氮中备用。将进行组织病理学检测的组织置入 4% 多聚甲醛中固定, 后经脱水、包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色后在光镜下观察皮肤组织各层结构变化。

4.3.3 皮损组织 VDR、VEGF mRNA 表达 将待用样本置于盛有液氮的灭菌研钵中充分研磨, 边研磨边补充液氮, 直至组织呈粉末状, 柱子法提取 RNA 样液 2 μ L, 使用逆转录试剂盒进行反转录, 总反应体系为 10 μ L, VDR、VEGF 及内参 β -actin 基因的上下游引物由广州维伯鑫生物科技股份有限公司合成, M- β -actin 引物正义 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGA-3', 反义 5'-CTGCTGGAAGGTGGACAGTGA-3', 引物长度 139 bp; VDR 引物正义 5'-GCTCATGGCCATCTGCATTG-3', 反义 5'-GGATAGGCGGTCCTGAATGG-3', 引物长度 85 bp; VEGF 引物正义 5'-CGGAACTTTTCGTCCAAC-3', 反义 5'-CAGCTCCGATCGGTTTGTC-3', 引物长度 85 bp。用 DBI Bestar SybrGreen 嵌合荧光法进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95℃ 2 min, 94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 20 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据的相对定量分析。

4.3.4 皮损组织 VDR、VEGF 蛋白水平 收集各组皮损组织 40 mg, 采用蛋白抽提试剂盒提取皮损组织蛋白, 使用 BCA 法定量, 经电泳、电转、封闭, 分别加入 VDR、VEGF 及内参 GAPDH 一抗, 二抗为山羊抗兔小鼠 IgG, 最后采用碱性磷酸酶法进行显色剂曝光并统计灰度值。

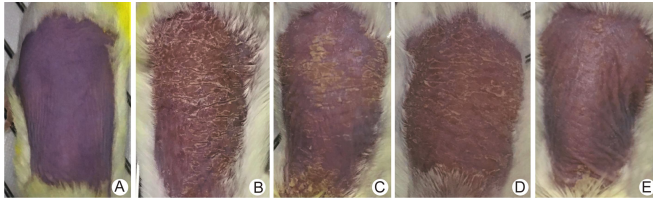
4.3.5 血清 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量测定 小鼠眼球取血后装入 EP 管, 4℃ 5 000 r/min 离心 15 min 分离上层血清, 按照上海酶联 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 小鼠 ELISA 试剂盒说明步骤严格操作。

4.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 重复测量资料采用 Greenhouse-Geisser 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠背部皮损肉眼观察结果比较(图 1) 与对照组比较, 模型组小鼠背部皮损皮肤显著增厚, 并

出现典型红斑、浸润及鳞屑;与模型组比较,银屑 I 号各组小鼠背部皮损红斑及鳞屑相对较少、浸润程度较轻,其中 PI-H 组皮损较其余各组最轻,PI-M 组次之。



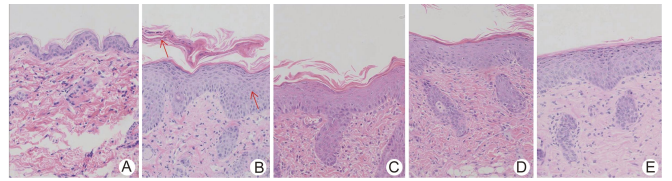
注:A 为对照组;B 为模型组;C 为 PI-L 组;D 为 PI-M 组;E 为 PI-H 组;下同

图 1 各组小鼠皮损肉眼观察表现

2 各组小鼠背部皮损第 0、3、5、7 日厚度及 PASI 评分比较(表 1) 对照组、模型组、PI-L、PI-M、PI-H 组小鼠背部皮损厚度在第 0、3、5、7 日重复测量变化差异均有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,模型组小鼠背部皮损随时间推移显著增厚($P<0.01$),PASI 评分显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,第 3 日时 PI-L、PI-M、PI-H 组背部皮损增厚程度及 PASI 评分差异无统计学意义($P>0.05$),第 5~7 日时,PI-L、PI-M、PI-H 组小鼠背部皮损均显著下降($P<0.01$),其中 PI-H 组皮损较其余各组最轻,PI-M 组次之;PI-L、PI-M、PI-H 组 PASI 评分均显著增高($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 各组小鼠背部皮损组织病理变化比较(图 2) 与对照组比较,模型组小鼠背部皮损表皮全层增厚,角质层可见大量角化不全细胞及空气间隔,棘层显著增厚,颗粒层菲薄,真皮乳头层轻微上延;与模型组比较,PI-H 组角质层未见明显角化不全,棘层/颗粒层趋向

正常,血管周围未见显著炎症细胞浸润,PI-M 组次之,PI-L 组与模型组比较,病理形态未见显著差异。



注:图中红色箭头示银屑病典型病理表现:角层空气间隔、角化不全、颗粒层菲薄及棘层肥厚

图 2 各组小鼠皮肤病理结果 (HE, $\times 200$)

4 各组小鼠皮损组织 VDR、VEGF mRNA 表达比较(表 2) 与对照组比较,模型组小鼠皮损中 VDR mRNA 表达明显降低($P<0.01$),VEGF mRNA 表达明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,PI-H、PI-M 组 VDR mRNA 表达升高($P<0.01$, $P<0.05$),PI-L、PI-M、PI-H 组 VEGF mRNA 表达均明显下降($P<0.01$)。

5 各组小鼠皮损组织 VDR、VEGF 蛋白水平比较(表 2,图 3) 与对照组比较,模型组小鼠皮损中 VDR 蛋白表达有所降低($P<0.05$),VEGF 蛋白表达明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,PI-M、PI-H 组 VDR 蛋白表达明显升高($P<0.01$),PI-M、PI-H 组 VEGF 蛋白表达明显降低($P<0.01$)。

6 各组小鼠外周血中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量比较(表 3) 与对照组比较,模型组小鼠外周血中 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,PI-M、PI-H 组 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 含量显著下降($P<0.01$),PI-L 组 IL-6 含量有所下降($P<0.05$),但 TNF- α 、IFN- γ 含量未见明显改善,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠背部皮损第 0、3、7 日厚度及 PASI 评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	背部皮损厚度(mm)				PASI 评分(分)			
		D0	D3	D5	D7	D0	D3	D5	D7
对照	6	0.480 $\pm$ 0.078	0.502 $\pm$ 0.064	0.520 $\pm$ 0.068	0.545 $\pm$ 0.069	0	0	0	0
模型	6	0.487 $\pm$ 0.087	0.787 $\pm$ 0.127**	1.183 $\pm$ 0.112**	1.475 $\pm$ 0.044**	0	1.333 $\pm$ 0.516**	5.167 $\pm$ 0.753**	8.167 $\pm$ 0.753**
PI-L	6	0.448 $\pm$ 0.043	0.758 $\pm$ 0.117	1.048 $\pm$ 0.100 Δ	1.198 $\pm$ 0.077 $\Delta\Delta$	0	1.167 $\pm$ 0.408	5.000 $\pm$ 0.894	7.333 $\pm$ 0.817 Δ
PI-M	6	0.480 $\pm$ 0.055	0.720 $\pm$ 0.161	0.922 $\pm$ 0.117 $\Delta\Delta$	1.058 $\pm$ 0.071 $\Delta\Delta$	0	1.000 $\pm$ 0.632	4.333 $\pm$ 0.516 Δ	6.833 $\pm$ 0.753 $\Delta\Delta$
PI-H	6	0.468 $\pm$ 0.066	0.730 $\pm$ 0.067	0.860 $\pm$ 0.064 $\Delta\Delta$	0.993 $\pm$ 0.032 $\Delta\Delta$	0	1	3.667 $\pm$ 0.516 $\Delta\Delta$	6.167 $\pm$ 0.408 $\Delta\Delta$

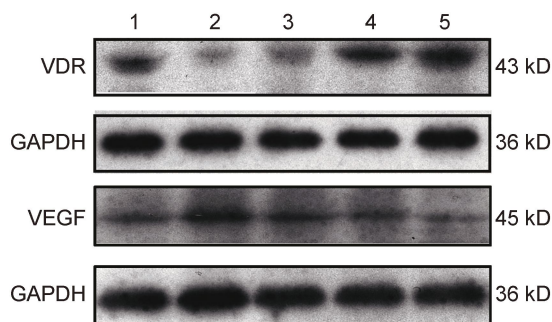
注:与对照组同期比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;下表同

表 2 各组小鼠皮损组织 VDR、VEGF mRNA 及蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	VDR mRNA	VDR/GAPDH	VEGF mRNA	VEGF/GAPDH
对照	6	2.305 $\pm$ 0.599	0.451 $\pm$ 0.143	0.291 $\pm$ 0.110	0.272 $\pm$ 0.092
模型	6	0.295 $\pm$ 0.064**	0.150 $\pm$ 0.039*	2.965 $\pm$ 0.383**	1.018 $\pm$ 0.208**
PI-L	6	0.345 $\pm$ 0.036	0.246 $\pm$ 0.028	1.831 $\pm$ 0.458 Δ	0.663 $\pm$ 0.244 $\Delta\Delta$
PI-M	6	0.721 $\pm$ 0.130 Δ	0.594 $\pm$ 0.149 $\Delta\Delta$	0.595 $\pm$ 0.115 $\Delta\Delta$	0.379 $\pm$ 0.128 $\Delta\Delta$
PI-H	6	1.028 $\pm$ 0.080 $\Delta\Delta$	0.891 $\pm$ 0.299 $\Delta\Delta$	0.267 $\pm$ 0.064 $\Delta\Delta$	0.364 $\pm$ 0.085 $\Delta\Delta$

表 3 各组小鼠外周血 IL-6、TNF- α 及 IFN- γ 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6	TNF- α	IFN- γ
对照	6	40.471 $\pm$ 3.787	107.736 $\pm$ 23.495	179.702 $\pm$ 10.712
模型	6	66.446 $\pm$ 6.852**	213.032 $\pm$ 31.619**	305.689 $\pm$ 33.596**
PI-L	6	58.802 $\pm$ 5.676 Δ	212.937 $\pm$ 19.101	285.767 $\pm$ 31.076
PI-M	6	54.973 $\pm$ 4.194 $\Delta\Delta$	152.526 $\pm$ 20.231 $\Delta\Delta$	249.922 $\pm$ 14.168 $\Delta\Delta$
PI-H	6	50.196 $\pm$ 3.841 $\Delta\Delta$	123.432 $\pm$ 13.632 $\Delta\Delta$	204.764 $\pm$ 15.272 $\Delta\Delta$



注: 1 为对照组; 2 为模型组; 3 为 PI-L 组;
4 为 PI-M 组; 5 为 PI-H 组

图 3 各组小鼠皮损组织 VDR、VEGF
蛋白表达电泳图

讨 论

银屑 I 号是国医大师禚国维教授治疗寻常型银屑病的经验方,方中土茯苓、板蓝根、大青叶、白花蛇舌草、半边莲清热凉血解毒,当归活血祛瘀,蜂房、川芎行气祛风止痛,泽泻、车前草利湿,地肤子、白鲜皮祛风止痒,甘草解毒调和诸药,治风治血,血行风灭。

IMQ 作为 Toll 样受体 7/8 的强效激动剂,可激活小鼠体内的 Toll 样受体,启动机体的炎症免疫应答^[13,14],大量实验已证实 IMQ 诱发的银屑病皮损无论在组织病理学特征还是病变发展进程上都与人类银屑病非常相似^[15]。本课题组在前期预实验中发现,相较于对照组,模型组小鼠背部皮肤在第 2~3 日开始出现红斑,5~7 日时可见典型浸润及大量鳞屑,PASI 评分显著上升,在组织病理学层面可见皮肤全层增厚显著、角化过度伴角化不全、棘层肥厚、颗粒层变薄或消失,但从第 8 日开始症状逐渐改善,提示该模型具有一定可逆性,这也与文献报道特点一致^[16],故我们选择第 8 日作为取材的节点进行实验。

维生素 D 是脂溶性维生素,研究发现银屑病患者血清中维生素 D 及 1,25-二羟维生素 D₃ 水平均较健康人偏低^[17,18]。VDR 的结构和糖皮质激素受体、雌激素受体、甲状腺受体和维 A 酸受体具有同源性^[19],在多种细胞中表达,如角质细胞、朗格汉斯细胞、单核/巨噬细胞、T、B 淋巴细胞、树突状细胞等,介导维生素

D 的多种生物学功能^[20]。文献表明,VDR 可抑制异常新生血管的生成,减弱异常角质细胞的增殖、浸润及转移^[21,22]。本研究结果显示,中、高剂量银屑 I 号可提高病变组织中 VDR 表达量,3 种剂量银屑 I 号均能显著抑制局部皮损 VEGF 表达。

炎症浸润是银屑病发病的另一病理改变,本课题组前期已通过银屑病细胞模型证实沉默 VDR 基因后可导致炎症反应加剧^[23]。研究表明,维生素 D 与其受体结合后可通过减少 Th1 型细胞因子 INF- γ 的产生,抑制角质细胞异常增殖,促进分化凋亡^[24,25],发挥抗炎和免疫调节效应。TNF- α 作为经典炎症因子亦可客观反映炎症程度。IL-6 不仅可在转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) 协同下诱导 Th17 早期分化而分泌多种炎症因子^[26,27],还可通过增加 T 细胞在表皮内的聚积,诱导和促进角质形成细胞增生,从而促进银屑病皮损的形成^[28]。本研究中,与模型组比较,中、高剂量银屑 I 号可显著下调 TNF- α 、IFN- γ 及 IL-6 表达水平,提示银屑 I 号可通过抑制银屑病动物模型炎症反应起到治疗作用。

通过本次实验发现,此次设置的银屑 I 号低剂量组在局部皮损 VDR 基因、蛋白水平,外周血 TNF- α 、IFN- γ 表达中与模型组比较差异均无统计学意义,提示剂量是影响银屑 I 号发挥治疗作用的关键因素之一,这也提示在实际临床中应提醒患者对中药煎服方式的重视。银屑 I 号治疗银屑病可能是通过调控 VDR/VEGF 信号网络对银屑病炎症环境及异常新生血管生成发挥了综合抑制作用。下一步将通过基因敲除、沉默等方式验证 VDR/VEGF 信号网络中的核心靶点,进一步明确银屑 I 号治疗银屑病的作用机制,为其临床推广应用提供理论及数据支持。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- 赵辨主编. 中国临床皮肤病学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010: 1016-1017.
- 王聪敏, 李海涛, 余明莲, 等. 心理护理对银屑病患者心理状态的影响[J]. 实用皮肤病学杂志, 2014, 7

- (2): 138-139.
- [3] Consiglio M, Viano M, Casarin S, et al. Mitochondrial and lipogenic effects of vitamin D on differentiating and proliferating human keratinocytes [J]. *Exp Dermatol*, 2015, 24(10): 748-753.
 - [4] 查旭山, 曲善忠, 齐庆, 等. 中药银屑 1 号方治疗寻常型银屑病临床观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2012(5): 10-12.
 - [5] 杭怡宁, 钟欣欣, 黎锦添, 等. 基于网络药理学探讨银屑 I 号治疗银屑病的作用机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(10): 1193-1198.
 - [6] 师长宏, 冯秀亮, 张海主编. 基础动物实验技术与方法 [M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2011: 24-28.
 - [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
 - [8] Bocheńska K, Smolińska E, Moskot M, et al. Models in the research process of psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): E2514.
 - [9] 牛非, 金晶, 周秦, 等. 雷公藤甲素衍生物 LB-1 对咪喹莫特诱导的银屑病小鼠炎症的影响 [J]. *药学学报*, 2017, (11): 58-63.
 - [10] 李宁飞, 王燕, 赵京霞, 等. 活血解毒方对银屑病小鼠血管增殖以及炎症因子的干预作用 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(4): 34-41.
 - [11] Mingkwan NT, Ariyaphong W, Ampai P, et al. Antipsoriatic effects of Wannachawee Recipe on imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in BALB/c mice [J]. *Evid -Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 1-13.
 - [12] Rather IA, Bajpai VK, Huh YS, et al. Probiotic *Lactobacillus sakei* proBio-65 extract ameliorates the severity of imiquimod induced psoriasis-like skin inflammation in a mouse model [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1021.
 - [13] Valins W, Amini S, Berman B. The expression of Toll-like receptors in dermatological diseases and the therapeutic effect of current and newer topical Toll-like receptor modulators [J]. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2010, 3(9): 20-29.
 - [14] Rajan N, Langtry JAA. Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2010, 31(1): 140-141.
 - [15] van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis [J]. *J Immunol*, 2009, 182(9): 5836-5845.
 - [16] 杨素清, 李东东, 闫景东. 银屑病动物模型的研究进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(6): 1029-1032.
 - [17] Orgaz-Molina J, Buendia-Eisman A, Arrabal-Polo MA, et al. Deficiency of serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in psoriatic patients: a case-control study [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2012, 67(5): 931-938.
 - [18] Gisondi P, Rossini M, Cesare AD. Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis [J]. *Br J Dermatol*, 2012, 166(3): 505-510.
 - [19] 毕新岭, 顾军. 维生素 D 类似物在银屑病治疗中的应用 [J]. *皮肤科学通报*, 2018, 35(1): 30-42.
 - [20] Norman AW, Ishizuka S, Okamura WH. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein [J]. *J Steroid Biochemistry Mol Biol*, 2001, 76(1): 49-59.
 - [21] Zhi HY, Hou SW, Li RS, et al. PTPH1 cooperates with vitamin D receptor to stimulate breast cancer growth through their mutual stabilization [J]. *Oncogene*, 2011, 30(14): 1706-1715.
 - [22] So JY, Lee HJ, Smolarek AK, et al. A novel gemini vitamin D analog represses the expression of a stem cell marker CD44 in breast cancer [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(3): 360.
 - [23] Sun W, Gao Y, Yu X, et al. 'Psoriasis 1' reduces psoriasis-like skin inflammation by inhibiting the VDR mediated nuclear NF- κ B and STAT signaling pathways [J]. *Mol Med Reports*, 2018, 18(3): 1-11.
 - [24] Bikle DD. Vitamin D receptor, a tumor suppressor in skin [J]. *Canad J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(5): 349-354.
 - [25] Yuan FN, Valiyaparambil J, Woods MC, et al. Vitamin D signaling regulates oral keratinocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5): 1625-1633.
 - [26] 叶萍, 黄伟林, 郑力. Th17 细胞相关因子与寻常型银屑病的相关性研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(15): 1706-1707.
 - [27] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1849-1861.
 - [28] 范斌, 李峰, 李欣, 等. 血热证银屑病患者 Th17 细胞与相关转录因子的表达 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(10): 2612-2614.

(收稿: 2019-04-28 在线: 2019-12-20)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶