

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.03.006

土大黄对银屑病小鼠皮肤组织转化生长因子- β_1 及神经纤维蛋白-1表达的影响*

热比姑丽·伊斯拉木,艾西木江·热甫卡提,阿布都吉力力·阿布都艾尼,阿布都帕塔尔·阿布迪热扎克,祖力皮卡尔·买买提,玉素甫江·艾力[△]

(新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所,新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 探讨土大黄提取物对咪喹莫特(IMQ)诱导实验性银屑病模型小鼠皮肤组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、神经纤维蛋白-1(NRP-1)表达的影响。方法 将IMQ乳膏涂抹BALB/c小鼠背部皮肤建立银屑病动物模型,观察土大黄提取物不同剂量(1,2,4 g/kg)对小鼠背部皮肤TGF- β_1 和NRP-1表达的影响。结果 与IMQ诱导银屑病小鼠模型组比较,土大黄提取物低剂量组(1 g/kg)小鼠背部皮肤TGF- β_1 和NRP-1表达升高或增强($P > 0.05$);中剂量组(2 g/kg)TGF- β_1 和NRP-1表达升高或增强($P < 0.05$);高剂量组(4 g/kg)TGF- β_1 表达升高或增强($P > 0.05$),NRP-1表达升高或增强($P < 0.05$)。结论 土大黄提取物能使TGF- β_1 和NRP-1表达升高或增强,从而可能促进或增强Treg细胞功能,恢复Th17/Treg细胞失衡,调节咪喹莫特诱导银屑病小鼠模型白细胞介素23(IL-23)/白细胞介素17(IL-17)轴,从而改善银屑病表皮免疫功能紊乱。

关键词:土大黄;银屑病小鼠;转化生长因子- β_1 ;神经纤维蛋白-1;皮肤组织

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)03-0020-05

Effect of *Rumex L.* on the Expression of Transforming Growth Factor- β_1 and Neuropilin-1 in the Skin Tissue of Mice with Psoriasis

ISLAM Rabigul, RAPKAT Haximjan, ABDUGHENY Abdujilil, ABDURAZAK Abdupattar, MAMAT Zulpikar, ALI Yusupjan

(Institute of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi, Xinjiang, China 830011)

Abstract: Objective To explore the effects of *Rumex L.* extract (RE) on the expression of Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1) and Neuropilin-1 (NRP-1) in the skin tissue of mice with imiquimod (IMQ) induced experimental psoriasis. **Methods** Experimental psoriasis model was established in BALB/c mice by applying IMQ cream onto the back skin of the mice, then the effects of different dosages of RE (1, 2, 4 g/kg) on the TGF- β_1 , NRP-1 expression of the mice's back skin tissue were observed. **Results** Compared with IMQ model group, in the RE low dosage group (1 g/kg), there was an increase or enhancement of the TGF- β_1 , NRP-1 expression in the back skin of the mice ($P > 0.05$); in the RE middle dosage group (2 g/kg), there was an increase or enhancement of the TGF- β_1 , NRP-1 expression in the back skin of the mice ($P < 0.05$); in the RE high dosage group (4 g/kg), there was an increase or enhancement of the TGF- β_1 expression ($P > 0.05$), and an increase or enhancement of the NRP-1 expression in the back skin of the mice ($P < 0.05$). **Conclusion** *Rumex L.* extract can cause increase of TGF- β_1 and NRP-1 expression in the back skin of the mice, thus may promote or strengthen Treg cell function by recovering Th17/Treg cells imbalances, regulate the IL-23/IL-17 axis in the IMQ-induced psoriasis mouse model, so as to improve the disorder of epidermal immune function in psoriasis.

Key words: *Rumex L.*; mice with psoriasis; transforming growth factor- β_1 ; neuropilin-1; skin tissue

土大黄 *Rumex L.* 是蓼科 *Polygonaceae* 酸模属 *Rumex* 植物,多年生草本,新疆维吾尔自治区南部区域农村民间调查发现,维吾尔族常用土大黄植物不同部位(根、茎、叶及全草)水煎液治疗银屑病等各种皮肤病,且疗效较好。2013年至今,本课题组对该药材进行了显微鉴别,以及抗炎免疫、治疗银屑病等一系列药效学试验研究^[1-4],也通过动物实验验证了土大黄民间用药的科学内涵。本研究中采用咪喹莫特(IMQ)诱导银屑病小

鼠模型,通过土大黄干预,检测小鼠皮肤组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、神经纤维蛋白-1(NRP-1)表达,旨在探讨土大黄对调节性T细胞(Treg)免疫抑制功能的影响,为进一步开发利用民间药材提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

1.1.1 仪器

LEICA TP1020型生物组织脱水机、LEICA RM2235

*基金项目:新疆维吾尔自治区卫生计生委青年科技人才专项科研项目[2015Y40]。

第一作者:热比姑丽·伊斯拉木,女,维吾尔族,博士研究生,副研究员,研究方向为维药药理毒理学,(电子信箱)rabiya272@126.com。

[△]通信作者:玉素甫江·艾力,男,维吾尔族,硕士研究生,副研究员,研究方向为天然产物有效成分分析鉴定及活性筛选,(电子信箱)yusufuali@foxmail.com。

型切片机、LEICA DM4000 型生物显微镜、LEICA LAS V4.5 型显微成像系统(德国莱卡公司);KD-BMIII 型生物组织包埋机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);KZPG-1A 型摊片烤片机(天津天利航空机电有限公司);LOCUS 型烤箱(广东省中山市诺洁仕电气有限公司)。

1.1.2 试药

咪喹莫特乳膏(四川明欣药业有限责任公司,国药准字 H20030128,批号为 141201);Silkee 脱毛霜(美国 Stella Jone's Inc. 公司授权生产,巴基斯坦制造);醋酸地塞米松片(DXM, Dexametasone Acetate Tablet, 浙江仙琚制药股份有限公司,国药准字 H33020822,批号为 140670,规格为每片 0.75 mg)。TGF- β_1 (货号为 bs-0693R,批号为 AE010840),NRP-1(货号为 bs-0086R,批号为 909086),均购自北京博奥森生物技术有限公司;Tris/EDTA 修复液(货号为 ZLI-9066,批号为 WP143310),通用 SP 试剂盒(货号为 SP-9000,批号为 WP142714),DAB kit 20(货号为 ZLI-9018,批号为 K146909E),磷酸盐缓冲液(PBS,货号为 ZLI-9062,批号为 150511),均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;二甲苯(批号为 20150302),无水乙醇(批号为 20150305),均购自天津永晟精细化工有限公司。土大黄(批号为 12110)由新疆华安中药饮片有限责任公司提供,由新疆大学资源与环境科学学院努尔巴依·阿不都沙力克教授通过显微鉴别鉴定为正品。

1.1.3 动物

BALB/c 小鼠,84 只,雌性,SPF 级,日龄 42~70 d,由新疆医科大学医学实验动物中心提供,动物许可证号为 SCXK(新)2011-0004。动物实验经新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所药物安全性评价中心[GLP 中心,SYXK<新>2011-0005]审核,符合新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所动物伦理委员会管理准则。实验开始前检疫,经一般行为观察,选用符合要求的 80 只小鼠进行实验。

1.2 方法

1.2.1 土大黄提取物制备

取适量土大黄根,用 8 倍量的 70% 乙醇室温密闭浸泡 1 h 后回流提取 3 次,第 1 次回流 2 h,第 2 次和第 3 次回流 1.5 h,过滤,合并滤液减压浓缩至浸膏状,真空干燥,得干膏粉。

1.2.2 IMQ 诱导银屑病小鼠模型建立^[3-9]

将 80 只 BALB/c 小鼠分为 2 组,对照组 12 只,咪喹莫特诱导模型组 68 只。背部使用 Silkee 脱毛霜脱毛,背部涂抹面积约为 2.0 cm × 1.5 cm。对照组小鼠背部无毛区域每日涂抹凡士林,模型组小鼠涂抹以 5% IMQ 乳膏 60 mg/d(有效药物为 3 mg/d),连续 6 d。

1.2.3 动物分组及给药

造模成功后,选用符合要求的 60 只造模小鼠随机分为模型组(给予 IMQ),DXM(给予 DXM 1.02 mg/kg),土大黄根提取物低、中、高剂量组[RE-L 组(1 g/kg),RE-M 组(2 g/kg),RE-H 组(4 g/kg)],各 12 只。各给药组灌胃给予相应药物,灌胃容积均为每 10 g 体质量 0.2 mL,1 次/日,对照组、模型组灌胃给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠(0.5% CMC-Na),连续 14 d。小鼠每周测 1 次体质量,根据体质量变化随时调整给药剂量。

1.2.4 指标检测

1) 试剂配制(临用前配制)

PBS:取 1 000 mL(1 袋)溶于 1 000 mL 蒸馏水(1:1)中,即得。Tris/EDTA 修复液:取 10 mL 溶于 500 mL 蒸馏水中(1:50),即得。DAB 显色剂:将 1 滴 A 液(约 50 μ L)溶于 1 000 μ L B 液中(1:200)。抗体(TGF- β_1):取抗体加 PBS,抗体:PBS 为 1:500。抗体(NRP-1):取抗体加 PBS,抗体:PBS 为 1:500。

2) 石蜡切片制作

固定:在研究 1 中 BALB/c 小鼠,取背部皮肤组织固定于 15% 中性福尔马林;取材:1.5 cm × 1.5 cm,厚度不超过 0.5 cm;脱水、浸蜡:分别经 80% 乙醇,95% 乙醇,95% 乙醇、无水乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明 2 次,浸蜡 3 次,均 1 h;包埋:用液体石蜡;切片:0.3 μ m 厚度切片。

3) 免疫组织化学 SP 法

检测皮肤 TGF- β_1 和 NRP-1 表达。取上述石蜡切片放入 60 $^{\circ}$ C 烤箱内 30 min,融化石蜡。从烤箱中取出后依次放入 3 份 100% 二甲苯中脱蜡,每份放置 10 min。将脱蜡完毕的切片依次放入 100%,95%,85%,75% 乙醇中,每次 3 min,最后用蒸馏水冲洗干净,完成水化。将切片置入已配好的 EDTA 中,微波炉预热 1 min,调微波炉加热档中高 10 min、高 5 min 进行抗原修复。室温冷却 20 min 后,PBS 清洗 3 遍,每次 3 min。每张切片上滴 1 滴(约 50 μ L)过氧化物酶阻断剂,阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。除去 PBS,每张切片上滴 1 滴(约 50 μ L)正常非免疫动物血清,室温下孵育 10 min。除去血清,每张切片上滴 1 滴(约 50 μ L)一抗(TGF- β_1),4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,NRP-1 和 TGF- β_1 同法。除去 PBS,每张切片上滴 1 滴(约 50 μ L)生物素标记的二抗,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。除去 PBS,每张切片上滴 1 滴辣根过氧化物酶标记物,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。除去 PBS,每张切片上滴 2 滴(约 100 μ L)新鲜配制的 DAB 显色剂,显微镜下观察 3~10 min。自来水冲洗终止显色,苏木

素复染, PBS 冲洗反蓝。切片依次放入 75% , 85% , 95% , 100% 乙醇中, 每次 3 min, 脱水干燥, 二甲苯透明, 干性树脂封片。

1.2.5 结果判定标准^[10-11]

以胞外或胞膜有棕黄色颗粒状沉积为阳性。采用积分法判断阳性表达结果, 对阳性细胞进行计分, 将染色强度为无、弱、中、强分别计分为 0~3 分, 再将阳性细胞比例以 $\leq 5\%$, $16\% \sim 25\%$, $26\% \sim 50\%$, $51\% \sim 75\%$, $> 75\%$ 分别计分为 0~4 分, 最后综合评分。

1.2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件处理。计数资料采用 Kruskal - walls H, Mann - whitney *U* 非参数检验进行多组样品比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 IMQ 诱导银屑病模型 TGF - β_1 表达的影响

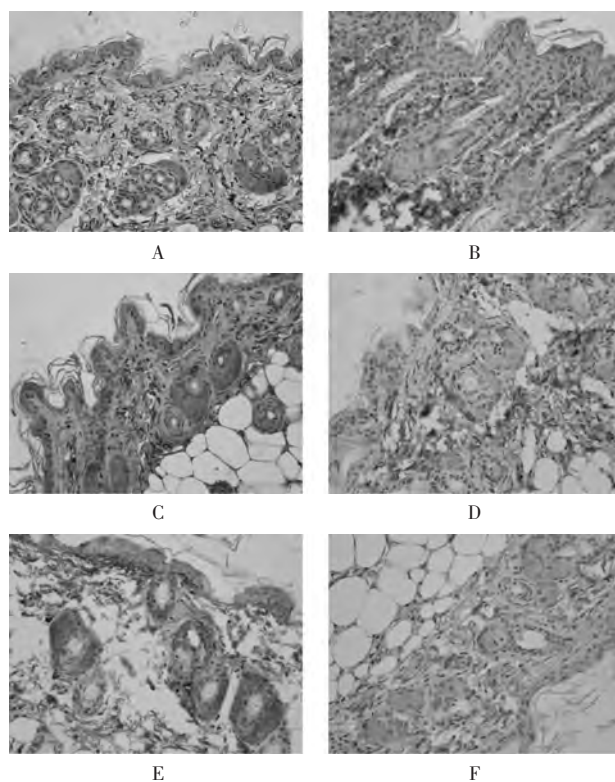
TGF - β_1 细胞定位细胞外基质, 以胞外棕黄色颗粒状沉积为阳性。与对照组小鼠背部皮肤比较, IMQ 诱导银屑病小鼠模型组小鼠背部皮肤 TGF - β_1 表达弱或低表达 ($Z = -2.673, P < 0.01$)。与 IMQ 诱导银屑病小鼠模型组比较, RE - M 组小鼠背部皮肤 TGF - β_1 表达升高或增强 ($Z = -2.673, P < 0.01$)。虽 DXM 组、RE - L 组、RE - H 组表达升高或增强, 但差异无统计学意义 ($Z = -1.263, -1.114, -0.191, P > 0.05$)。结果见图 1。

2.2 对 IMQ 诱导银屑病模型 NRP - 1 表达的影响

NRP - 1 细胞定位细胞膜, 以胞膜有棕黄色颗粒状沉积为阳性。与对照组小鼠背部皮肤比较, 模型组小鼠背部皮肤 NRP - 1 表达弱或低表达 ($Z = -2.309, P < 0.05$) ; 与模型组比较, DXM 组小鼠背部皮肤 NRP - 1 表达升高或增强 ($Z = -2.018, P < 0.05$) , RE - M 组和 RE - H 组表达升高或增强 ($Z = -2.439, -2.309, P < 0.05$) ; 虽 RE - L 组表达升高或增强, 但差异无统计学意义 ($Z = -1.300, P > 0.05$)。结果见图 2。

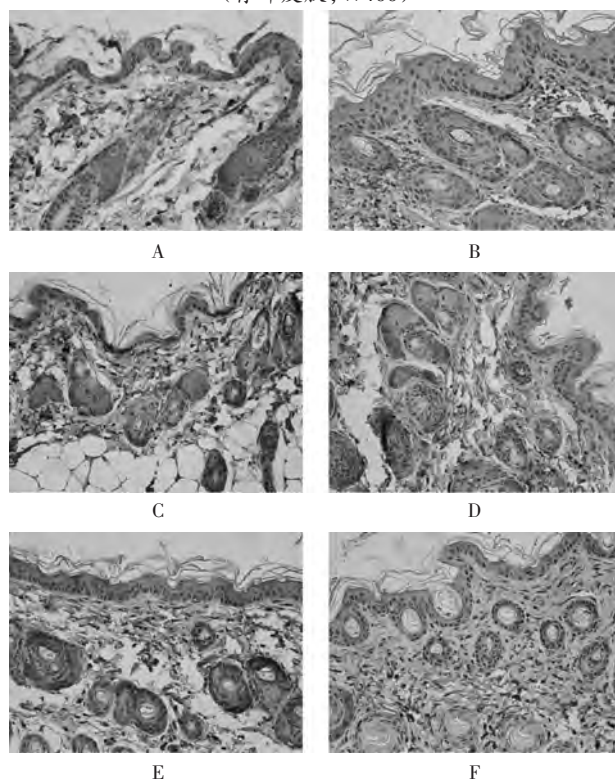
3 讨论

银屑病的触发因素和发病机制尚未完全明确, 目前认为其是一种多基因遗传背景下的免疫性疾病, 其中 T 淋巴细胞免疫功能的紊乱是发病的关键环节, 且与皮损的发生、发展和持续存在密切相关。Treg 细胞是维持机体免疫耐受的主要调节细胞, 能选择性地抑制一些效应性 T 细胞 (Th_{17} 细胞) 和自身反应性 T 细胞活化, 主要通过细胞接触机制或抑制性细胞因子 TGF - β_1 发挥主动免疫抑制作用^[12-14]。寻常型银屑病患者局部皮损组织中 Th_{17} 细胞反应增强, Treg 细胞的免疫抑制功能减弱, 证实了在寻常型银屑病局部皮损组织中存在 Th_{17} /Treg 细胞的失衡^[15-17]。表明银屑病的发病与效应性 T 细胞



A. 对照组 B. 模型组 C. DXM 组 D. RE - L 组
E. RE - M 组 F. RE - H 组

图 1 土大黄提取物对 IMQ 诱导银屑病模型 TGF - β_1 表达的影响 (背部皮肤, $\times 400$)



A. 对照组 B. 模型组 C. DXM 组 D. RE - L 组
E. RE - M 组 F. RE - H 组

图 2 土大黄提取物对 IMQ 诱导银屑病模型 NRP - 1 表达的影响 (背部皮肤, $\times 400$)

和自身反应性 T 细胞的持续激活,缺乏有效的免疫抑制机制有关,提示银屑病患者机体可能存在 Treg 细胞数量减少或功能障碍。通过抑制 Th₁₇ 细胞的活化及其细胞因子的表达,适当上调 Treg 细胞免疫功能,有助于银屑病的转归。

CD₄⁺CD₂₅⁺ Treg 是目前研究得较多的一种亚型,其数量和功能异常是人类和动物自身免疫性疾病和其他炎性疾病的重要原因,其分子表面表达 TGF-β₁、白细胞介素 10(IL-10)、NRP-1 等膜分子,具有免疫抑制和免疫无能作用。研究表明,CD₄⁺CD₂₅⁺ Treg 通过膜相关 TGF-β₁ 发挥免疫抑制功能,Nrp-1 能增强其共同表达的 TGF-β₁,从而起到免疫抑制作用^[12-17]。银屑病外周血和从皮损分离的 CD₄⁺CD₂₅⁺ Treg 的抑制能力均减弱,而反应性 T 细胞的增殖活性过强^[18-23],提示 Treg 的抑制作用减弱使致病的 T 细胞增生,可能导致自身免疫反应。

本研究中 TGF-β₁ 检测结果表明,小鼠局部皮损组织 Treg 细胞免疫调节功能降低,导致局部皮肤组织 Th₁₇/Treg 细胞失衡,导致引起银屑病表皮免疫功能紊乱。与模型组比较,RE-M 组 TGF-β₁ 表达升高或增强,表明 RE-M 能使局部皮肤组织 Treg 细胞免疫向上调节,使得恢复局部皮肤组织 Th₁₇/Treg 细胞失衡,改善银屑病表皮免疫功能紊乱。虽然 DXM 组、RE-L 组、RE-H 组能使 TGF-β₁ 表达升高或增强,但差异无统计学意义($P > 0.05$),提示上述药物对小鼠局部皮损组织 Treg 细胞功能调节无明显影响。NRP-1 检测结果表明,小鼠局部皮损组织 Treg 细胞免疫调节功能降低,导致局部皮肤组织 Th₁₇/Treg 细胞失衡,以引起银屑病表皮免疫功能紊乱。与模型组比较,DXM 组、RE-M 组、RE-H 组均能使 NRP-1 表达升高或增强($P < 0.05$),提示上述药物均能使局部皮肤组织 Treg 细胞免疫向上调节,使得恢复局部皮肤组织 Th₁₇/Treg 细胞失衡,能改善银屑病表皮免疫功能紊乱。RE-L 组 NRP-1 差异无统计学意义($P > 0.05$),提示上述药物对小鼠局部皮损组织 Treg 细胞功能调节无明显影响。

综上所述,IMQ 诱导银屑病小鼠模型皮损中存在 Th₁₇/Treg 细胞失衡,引起 IL-23/IL-17 轴失衡,效应性 T 细胞功能活跃,Treg 细胞免疫抑制功能减弱,最终导致免疫功能紊乱而引起疾病。通过土大黄干预能使小鼠背部皮肤组织 TGF-β₁ 和 NRP-1 表达升高,表明土大黄提取物能促进或增强 Treg 细胞功能,抑制效应性 T 细胞和自身反应性 T 细胞引起的免疫反应,恢复 Th₁₇/Treg 细胞失衡,调节 IMQ 诱导银屑病小鼠模型 IL-23/IL-17 轴,从而改善银屑病表皮免疫功能紊乱,具有抗银屑病作用^[12-23]。

参考文献:

- [1] 热比姑丽·伊斯拉木,曼尔旦·尼亚孜,尤力都孜·买买提,斯拉甫·艾白. 土大黄不同提取物对银屑病小鼠模型的作用[J]. 西北药学杂志,2015,30(1):47-51.
- [2] 尤力都孜·买买提,阿布都吉力力·阿布都艾尼,热比姑丽·伊斯拉木. 土大黄根提取物对小鼠非特异性免疫功能的影响[J]. 中国药业,2016,25(10):18-20.
- [3] 艾西木江·热甫开提,尤力都孜·买买提,热比姑丽·伊斯拉木,等. 土大黄根提取物对实验性银屑病小鼠组织器官形态学的影响[J]. 中国比较医学杂志,2017,27(9):41-47.
- [4] 艾西木江·热甫开提,麦合素提·卡迪尔,热比姑丽·伊斯拉木,等. 土大黄根提取物对实验性银屑病小鼠支配器官形态学的影响[J]. 中国药业,2017,26(11):4-8.
- [5] 吴剑平,谢倩,陈林,等. 咪喹莫特对 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较[J]. 中国比较医学杂志,2018,28(9):1-6.
- [6] 热比姑丽·伊斯拉木,斯拉甫·艾白. 银屑病动物模型研究概况[J]. 中国药房,2015,26(19):2726-2729.
- [7] VANDER 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]. Journal of Immunology, 2009,182(9):5836-5845.
- [8] 朱震宇,周逸颖,陈露如,等. 雷公藤内酯醇改善 IMQ 诱导的银屑病样小鼠模型症状的初步探究[J]. 南京大学学报(自然科学),2018,54(5):992-1000.
- [9] 徐玉婷. 光甘草定提取纯化及抗银屑病作用和机理研究[D]. 广州:广东工业大学,2017.
- [10] KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, EPSTEIN JI, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers[J]. American Journal of Pathology, 1996,148(5):1567-1576.
- [11] 钟淇滨,祝曙光,陆少君,等. 和厚朴酚对咪喹莫特诱导小鼠银屑病的干预作用[J]. 中国药理学通报,2018,34(5):626-631.
- [12] 张连云,谭晓慧,赵敏,等. 燥湿苦参汤联合 NB-UVB 治疗寻常性银屑病及对 Th17 和 Treg 及其相关因子表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(31):25-31.
- [13] 王惠琳,孟继龙,李东晓,等. 高原环境下寻常性银屑病患者 Th17 和 Treg 细胞及其相关因子的表达[J]. 皮肤与性病,2018,40(5):627-630.
- [14] MA L, XUE H, GAO T, et al. Notch1 Signaling Regulates the Th17/Treg Immune Imbalance in Patients with Psoriasis Vulgaris[J]. Mediators Inflammation, 2018,4:1-10.
- [15] 匡叶红,张衡,朱武,等. 氨甲蝶呤调控调节性 T 细胞数量及 Foxp3 表达在银屑病治疗中的作用[J]. 中南大学学报(医学版),2018,48(3):835-842.
- [16] CHANDRAKUMAR SF, YEUNG J. Interleukin-17 antagonists in the treatment of psoriasis[J]. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery, 2015,19(2):109-114.
- [17] LIN X, HUANG T. Co-signaling molecules in psoriasis pathogenesis: implications for targeted therapy [J]. Human