

温阳化浊通络方含药血清对硬皮病成纤维细胞 胶原分泌和 TGF- β_1 表达的影响

吕芹¹, 卞华^{2*}, 陈志国², 叶松山², 韩迪¹

(1. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473061; 2. 南阳理工学院张仲景国医学院, 河南 南阳 473004)

【摘要】 目的: 运用血清药理学方法, 探讨温阳化浊通络方对系统性硬皮病 (SSc) 皮肤成纤维细胞胶原分泌和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 的影响。**方法:** 对 SSc 患者分别采用强的松 (每日 20 mg) 和青霉胺 (每日 0.25 g) (西药组), 温阳化浊通络方每日 1 剂, 分早晚 2 次服用 (中药组), 西药加中药 (中西药结合组) 治疗 1 个月后, 制备含药血清, 加入皮肤成纤维细胞培养体系中。培养 72 h 后, 采用比色法和 ELISA 法分别测定成纤维细胞培养基中羟脯氨酸 (Hyp) 和 TGF- β_1 含量。**结果:** 与对照组相比, 浓度为 5%, 10%, 20% 的西药组、中药组、中西药结合组含药血清均能明显抑制正常人和 SSc 皮肤成纤维细胞胶原分泌 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与西药组相比, 中西药结合组抑制作用更加明显 ($P < 0.01$)。浓度为 5%, 10%, 20% 的西药组、中药组、中西药结合组含药血清能显著抑制 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF- β_1 的表达 ($P < 0.01$), 且中西药结合组比西药组的抑制作用更强 ($P < 0.01$)。同时, 对照组 SSc 皮肤成纤维细胞培养基中胶原含量与 TGF- β_1 呈直线正相关性 ($r = 0.895, P < 0.05$)。**结论:** 温阳化浊通络方能有效减少体外培养的 SSc 皮肤成纤维细胞胶原和 TGF- β_1 的分泌, 可能是其治疗 SSc 的药理作用机制之一。

【关键词】 系统性硬皮病; 温阳化浊通络方; 成纤维细胞; 胶原蛋白; 转化生长因子 β_1

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903 (2011) 16-0184-04

Effects of Wenyang Huazhuo Tongluo Recipe Contained Serum on Collagen Protein and TGF- β_1 of Systemic Sclerosis Skin Fibroblasts

LV Qin¹, BIAN Hua^{2*}, CHEN Zhi-guo², YE Song-shan², HAN Di¹

(1. Nanyang Medical College, Nanyang 473061, China; 2. Zhang Zhongjing College of Traditional Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of Wenyang Huazhuo Tongluo recipe (WYHZTLR) on the collagen production and transforming growth factor-beta₁ (TGF- β_1) secretion of systemic sclerosis (SSc) skin fibroblasts *in vitro* by serum pharmacologic technique. **Method:** Patients with SSc were treated with prednisone at the dosage of 20 mg · d⁻¹ and D-penicillamine at the dosage of 0.25 g · d⁻¹ or WYHZTLR for one month. Prednisone, D-penicillamine and WYHZTLR contained serum from patients with SSc were respectively added into cultured normal dermal fibroblast cell-line and SSc lesional dermal fibroblast cell-line. Then the cells were incubated for 72 hours. Hydroxyproline and TGF- β_1 were examined by colorimetric analysis and ELISA respectively. **Result:** Different concentrations of drug-contained serum (5%, 10% and 20%) of western medicine, Chinese medicine and integrated Chinese and western medicine could markedly decrease collagen production of normal dermal fibroblasts and SSc lesional dermal fibroblasts *in vitro* compared with control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). But integrated Chinese and western medicine group could markedly decrease collagen production of fibroblasts

【收稿日期】 20110130(002)

【基金项目】 南阳理工学院科研基金项目(200709)

【通讯作者】 * 卞华, 博士, 副教授, 从事中西医结合治疗风湿病的研究, Tel: 0377-62071311, E-mail: biancrown@163.com。

compared with western medicine group ($P < 0.01$). Different concentrations of drug-contained serum (5% ,10% and 20%) of western medicine, Chinese medicine and integrated Chinese and western medicine could markedly decrease the secretion of TGF- β_1 compared with control group ($P < 0.01$). But integrated Chinese and western medicine group could significantly decrease the secretion of TGF- β_1 compared with western medicine group ($P < 0.01$). There was a positive linear correlation between the hydroxyproline content and the expression of TGF- β_1 protein in SSc lesional dermal fibroblasts of the control group ($r = 0.895$, $P < 0.01$). **Conclusion:** WYHZTLR can significantly inhibit the secretion of collagen and TGF- β_1 of SSc skin fibroblasts, and this maybe one of its pharmacologic mechanism in the treatment of SSc.

[**Key words**] systemic sclerosis; Wenyang Huazhuo Tongluo recipe; fibroblast; collagen protein; transforming growth factor-beta₁

温阳化浊通络方治疗系统性硬皮病 (systemic sclerosis, SSc)取得了较好的疗效^[1]。研究表明,温阳化浊通络方能通过抑制 SSc 皮肤成纤维细胞进入细胞分裂周期,进而抑制其增殖^[2]。本实验旨在观察温阳化浊通络方含药血清对 SSc 患者皮肤成纤维细胞胶原及 TGF- β_1 表达的影响,进一步探讨温阳化浊通络方治疗 SSc 的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 温阳化浊通络方:由黄芪 30 g,党参 15 g,山药 12 g,熟地黄 15 g,仙灵脾 12 g,桂枝 10 g,丹参 15 g,积雪草 12 g,白芥子 9 g,全蝎 3 g 组成,南阳理工学院附属第一医院制剂室提供,并制成煎剂。青霉胺片:上海信谊药厂有限公司生产 (批号 081208)。强的松片:河北赛克药业有限公司生产 (批号 090302)。DMEM 培养基、胰酶:美国 Sigma 公司;羟脯氨酸 (Hyp)测试盒:南京建成生物工程研究所;小牛血清:杭州四季青生物工程公司产品;人 TGF- β_1 ELISA 检测试剂盒:上海瑞齐生物科技有限公司。

1.2 主要仪器 IX70 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);CO₂ 培养箱 (美国 napco 公司);紫外分光光度计 (日本岛津公司);MR4100 型酶联免疫分析仪 (美国 Dynatech 公司产品)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 以南阳医学高等专科学校附属第一医院、南阳理工学院附属第一医院 2009 年 6 月 ~2010 年 3 月门诊患者为观察对象,选择符合美国风湿病协会 (ARA)1980 年制定的 SSc 诊断标准^[3],并且符合中医辨证属“阳气亏虚,浊邪阻络证”^[4]。排除其他风湿病及合并心血管、肺、肾、脑、造血系统等严重原发性疾病、精神病患者。根据随

机数字表,16 例 SSc 患者随机分成 3 组:西药组 (5 例),中药组 (5 例),中西药结合组 (6 例)。另取 4 例初诊未治疗 SSc 患者作对照组。20 例患者中,男性 5 例,女性 15 例,年龄 26 ~61 岁,平均年龄 38.15 岁。病程最长者 46 个月,最短者为 2 周。西药组口服青霉胺 0.25 g,每日 1 次;同时口服强的松 20 mg,每日 1 次。中药组给予温阳化浊通络煎剂,每日 1 剂,分早晚 2 次服用。中西药结合组既服西药又服中药,药物用法同前。对照组在治疗前先予空腹抽取上肢静脉血,经 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 ~15 min,分离血清,0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。西药组、中药组、中西药结合组经治疗 1 个月后,亦空腹抽取上肢静脉血,处理同上。

2.2 皮肤成纤维细胞培养 在局麻无菌条件下,分别切取一例 36 岁 SSc 患者上臂外侧活动性硬化皮损组织和 1 例 32 岁女性整形外科患者上臂外侧正常皮肤组织,修剪去皮下组织后,将皮肤剪成 1 mm³ 以下碎块,参考文献[5]方法分别进行 SSc 皮肤和正常皮肤成纤维细胞原代培养并传代增殖,实验选用第 3 ~6 代细胞,多余细胞液氮中冻存备用。

2.3 培养上清液中 Hyp 含量的测定 将处于对数生长期的正常皮肤成纤维细胞和 SSc 皮肤成纤维细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板,24 h 待细胞贴壁后,吸出上清液,换入无血清 DMEM 培养基,继续培养 24 h 使细胞同步化。然后分别加入不同体积的对照组血清和处理组含药血清 (注:血清分别是相应各组患者的混合血清),使终浓度分别为 5% ,10% ,20%。每组设 6 个复孔。37 $^{\circ}$ C ,5% CO₂ 孵箱培养 72 h。按细胞培养上清液 Hyp 测试盒的检测步骤处理,用分光光度计在 560 nm 波长处测各管吸光度 (A)值。

Hyp 质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) = (测定管 A - 空白管 A) / (标准管 A - 空白管 A) $\times$ 标准管浓度 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $\times$ 稀释倍数

胶原质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) = Hyp $\times 7.46 \times$ 稀释倍数 (7.46 是 Hyp 换算为胶原时的计算常数)^[6]

2.4 SSc 皮肤成纤维细胞培养上清液中 TGF- β_1 的测定 将 SSc 皮肤成纤维细胞按照上述 2.3 方法进行处理。采用 ELISA 方法测定培养基上清液中 TGF- β_1 的含量,具体步骤按试剂盒说明书进行,在酶标仪 450 nm 处读数。

2.5 统计学方法 用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较用方差分析;指标间相关性确定用直线相关分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 温阳化浊通络方对 SSc 皮肤成纤维细胞胶原分泌的影响 与相同浓度的对照组相比,5%,10%,20% 中药组、西药组和中西药结合组均明显抑制 SSc 皮肤成纤维细胞胶原分泌 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时与西药组比较,中西药结合组含药血清对 SSc 皮肤成纤维细胞胶原分泌的抑制作用更明显 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同浓度含药血清对 SSc 患者皮肤成纤维细胞胶原分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胶原/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	5%	10%	20%
对照	3.338 $\pm$ 0.028	3.371 $\pm$ 0.044	3.409 $\pm$ 0.043
西药	3.290 $\pm$ 0.038 ¹⁾	3.254 $\pm$ 0.020 ²⁾	3.224 $\pm$ 0.019 ²⁾
中药	3.287 $\pm$ 0.037 ¹⁾	3.244 $\pm$ 0.042 ²⁾	3.234 $\pm$ 0.039 ²⁾
中西药结合	3.216 $\pm$ 0.015 ^{2, 4)}	3.193 $\pm$ 0.022 ^{2, 4)}	3.155 $\pm$ 0.044 ^{2, 4)}

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与西药组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 温阳化浊通络方对正常皮肤成纤维细胞胶原分泌的影响 3 种不同浓度的西药组、中药组和中西药结合组含药血清均明显抑制正常人皮肤成纤维细胞的胶原分泌,与相同浓度的对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.01$)。同时,中西药结合组对正常人皮肤成纤维细胞增殖的抑制作用明显优于西药组 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 温阳化浊通络方对 SSc 患者皮肤成纤维细胞 TGF- β_1 表达的影响 与相同浓度的对照组相比,不同浓度的西药组、中药组、中西药结合组含药血清能显著抑制 SSc 皮肤成纤维细胞 TGF- β_1 的表达 ($P <$

0.01),且中西药结合组比西药组的抑制作用更明显 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 不同浓度含药血清对正常人皮肤成纤维细胞胶原分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胶原/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	5%	10%	20%
对照	3.584 $\pm$ 0.015	3.611 $\pm$ 0.016	3.673 $\pm$ 0.028
西药	3.528 $\pm$ 0.023 ²⁾	3.510 $\pm$ 0.040 ²⁾	3.478 $\pm$ 0.036 ²⁾
中药	3.520 $\pm$ 0.034 ²⁾	3.509 $\pm$ 0.035 ²⁾	3.442 $\pm$ 0.031 ²⁾
中西药结合	3.434 $\pm$ 0.026 ^{2, 4)}	3.391 $\pm$ 0.053 ^{2, 4)}	3.307 $\pm$ 0.068 ^{2, 4)}

表 3 不同浓度含药血清对 SSc 患者皮肤成纤维细胞 TGF- β_1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TGF- β_1 / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$		
	5%	10%	20%
对照	159.10 $\pm$ 1.25	165.45 $\pm$ 2.37	172.95 $\pm$ 1.61
西药	151.28 $\pm$ 1.11 ²⁾	147.39 $\pm$ 1.60 ²⁾	142.58 $\pm$ 1.28 ²⁾
中药	150.64 $\pm$ 1.27 ²⁾	144.29 $\pm$ 1.90 ^{2, 3)}	140.32 $\pm$ 1.93 ^{2, 3)}
中西药结合	146.02 $\pm$ 2.83 ^{2, 4)}	140.17 $\pm$ 2.81 ^{2, 4)}	136.89 $\pm$ 2.14 ^{2, 4)}

3.4 SSc 成纤维细胞胶原分泌量与 TGF- β_1 表达量的相关回归分析 以对照组胶原分泌量为应变量 Y, TGF- β_1 表达量为自变量 X,求得 $r = 0.895$, $Y = 0.512 + 0.017X$, $P < 0.05$ 。

4 讨论

SSc 是一种以皮肤增厚和纤维化为主要临床特征、可导致微血管损伤以及肺、心、肾、胃肠道病变的自身免疫性疾病。胶原合成过多,降解减少,大量胶原纤维在皮肤、肺、消化道等组织器官的沉积是 SSc 的主要病理过程之一。成纤维细胞是合成胶原蛋白等细胞外基质的主要细胞。国内外研究显示,体外培养的 SSc 患者皮肤成纤维细胞合成胶原蛋白的量明显增加,与 SSc 发病密切相关^[7-8]。Hyp 是胶原蛋白中一种重要且含量稳定的氨基酸,在其它组织中含量甚微,因此,测定 Hyp 的含量是检测胶原含量的可靠方法。本研究采用临床血清药理学方法,发现温阳化浊通络方含药血清对 SSc 患者皮肤成纤维细胞和正常人皮肤成纤维细胞胶原分泌均具有抑制作用,随着药物浓度增加,抑制作用逐渐增强。同时提示在体外温阳化浊通络方不是选择性地作用于 SSc 患者皮肤成纤维细胞,但在体内对正常皮肤成纤维的作用需要我们进一步探索。

TGF- β 作为重要的促纤维化细胞因子,可直接促进成纤维细胞增殖、胶原基因的转录及表达。目前在哺乳动物中已发现 3 种不同形式的 TGF- β ,即

TGF- $\beta_{1,3}$,其中 TGF- β_1 在体细胞系中所占比例最高,活性最强。研究发现,TGF- β_1 可诱导来自皮肤成纤维细胞 I,III 型胶原、纤维粘连蛋白等细胞外基质的基因转录及蛋白合成,抑制细胞外基质分解酶的活性,抑制血浆酶原活化因子及胶原酶,并直接促进成纤维细胞的增生^[9-10]。McGaha T 等^[11]将硬皮鼠 TGF- β 的一个等位基因定点突变,使 TGF- β 表达减少,此鼠皮肤增厚程度较未突变鼠减轻,皮肤羟脯氨酸含量下降。因此,TGF- β 拮抗剂可通过抗纤维化而在硬皮病治疗中发挥作用。本实验证实温阳化浊通络方对 SSc 的皮肤成纤维细胞分泌 TGF- β_1 有抑制作用,随着药物浓度增加抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖关系。同时本研究显示,对照组 SSc 皮肤成纤维细胞上清液中胶原与 TGF- β_1 含量呈显著正相关,说明温阳化浊通络方可通过抑制成纤维细胞自分泌 TGF- β_1 这一间接途径,抑制胶原合成,发挥其抗纤维化作用。本研究为该方用于治疗 SSc 提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 卞华,吕芹. 温阳化浊通络汤治疗早期系统性硬化病临床观察[J]. 四川中医,2009,27(6): 66.

[2] 卞华,范永升,楼兰花,等. 温阳化浊通络方对系统性硬皮病成纤维细胞周期和增殖的影响[J]. 中药材,2009,32(6):936.

[3] Subcommittee for scleroderma criteria of the American

Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma) [J]. Arthritis Rheum,1980,23(5):581.

[4] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(第二辑)[S]. 1995:196.

[5] 鄂征. 组织培养和分子生物学技术[M]. 2 版. 北京:北京出版社,1997:95.

[6] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:217.

[7] 吕小岩,李明,翁孟武. 系统性硬皮病患者成纤维细胞转化生长因子 β_1 与 I 型胶原 mRNA 表达的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2003,36(9):490.

[8] Varga J A,Trojanowska M. Fibrosis in systemic sclerosis [J]. Rheum Dis Clin North Am,2008,34(1):115.

[9] Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis[J]. J Dermatol,2010, 37(1):11.

[10] Ihn H. Autocrine TGF-beta signaling in the pathogenesis of systemic sclerosis [J]. J Dermatol Sci, 2008, 49(2):103.

[11] McGahla T, Saito S, Phelps R G, et al. Lack of skin fibrosis in tight skin (TSK) mice with targeted mutation in the interleukin-4R alpha and transforming growth factor-beta genes [J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(1):136.

[责任编辑 聂淑琴]