

苓桂剂调节固有免疫治疗青春期寻常型痤疮

袁玉亮¹ 朱瑞丽¹ 孙士鹏¹ 魏华民²

(1 中国中医科学院广安门医院南区,北京,102618; 2 首都医科大学附属北京友谊医院,北京,100050)

摘要 目的:观察苓桂剂治疗青春期寻常型痤疮的临床疗效,并从免疫调节方面探讨其可能的机制。方法:选取 2016 年 3 月至 2017 年 11 月中国中医科学院广安门医院南区收治的青年期寻常型痤疮患者 62 例作为观察组以及同时期健康志愿者 20 例作为对照组,苓桂剂治疗 10 d 后评估临床有效率并用流式细胞仪分析治疗前后患者外周血的 CD14⁺TLR2⁺ 及 ELISA 法检测 IL-4、IL-8、TNF- α 和 COX2 水平。结果:所有患者均不同程度缓解,CD14⁺TLR2⁺ 在正常组、治疗前、治疗后分别为(78 $\pm$ 5)%、(92.3 $\pm$ 6.7)%、(81.2 $\pm$ 4.6)%,治疗后较治疗前下降明显($P=0.044$),IL-4、IL-8、TNF- α 和 COX2 水平治疗后亦显著下降($P<0.05$)。结论:苓桂剂可能通过调节固有免疫途径改善青春期寻常型痤疮。

关键词 青年期寻常型痤疮;苓桂剂;Toll 样受体;固有免疫调节

Effects of Lingui Prescription on Adolescent Acne Vulgaris Through Innate Immunity Regulation

Yuan Yuliang¹, Zhu Ruili¹, Sun Shipeng¹, Wei Huamin²

(1 Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102618, China;

2 Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To observe the clinical effects of Lingui prescription on adolescent acne vulgaris, and investigate the possible mechanism of it on immune regulation. **Methods:** Sixty-two cases of adolescent acne vulgaris and 20 healthy cases were involved in the study. After 10 days of Chinese herbal treatment, clinical efficient was evaluated, and also rate of CD14 + TLR2 + and level of IL-4, IL-8, TNF- α and COX2 were detected in peripheral blood by Flow Cytometer and ELISA. **Results:** All cases had a clinical remission in different degree, rate of CD14 + TLR + in healthy control, pre-treatment and after-treatment group were (78 $\pm$ 5)%, (92.3 $\pm$ 6.7)%, (81.2 $\pm$ 4.6)%. The rate had a significant decrease in after-treatment v. s. pre-treatment ($P=0.044$), level of IL-4, IL-8, TNF- α and COX2 were also markedly decreased after treatment ($P<0.05$). **Conclusion:** Lingui prescription might improve adolescent acne vulgaris through innate immunity regulation.

Key Words Adolescent acne vulgaris; Lingui Prescription; Toll-like receptor; Innate immunity regulation

中图分类号:R275.9 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.07.012

寻常型痤疮是青少年多发的一种皮肤病,也是中医治疗的优势病种之一。既往中医前辈根据时代特点,多用调和营卫、祛风利湿止痒、排脓解毒消痈的药物^[1-3],但根据中医辨证思想,不同时代的人体质差异有统计学意义,导致相应的治疗方法不断发生演变。根据笔者观察,现代的青年人,具有类似的生活习惯,如运动少,喜冷食、辣食,多吹冷空调,饮料喝的较多等,这些共同的不良习惯导致了该群体的青年人存在一个共同的体质倾向即:营卫失调、痰湿内盛,具体表现为容易感冒或反复发生鼻炎、咽炎,舌体胖大多有齿痕,手足易冷,面色多青暗,痤疮多表现为色暗、灰滞等,这些不仅反映了荣卫郁滞、

寒邪伤阳的病机,也对治疗提出了新的要求,应用既往的凉血解毒药为主的治疗方法可能不能满足此类人群的需要^[4-6]。针对新的辨证变化,结合既往中医研究的成果,我们提出应用苓桂剂为主的方药治疗此类痤疮,临床效果满意,为明确其可能的机制,本研究结合现代医学的检验方法,对苓桂剂治疗青春期寻常型痤疮进行了新的机制探索。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 3 月至 2017 年 11 月中国中医科学院广安门医院南区收治的青年期寻常型痤疮患者 62 例作为观察组以及同时期健康志愿

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81704092)——从角质形成细胞 K17/抗凋亡基因表达探讨银屑病血热证/血瘀证型特点的分子机制;大兴区公共服务领域人才培养资金支持;大兴区优秀中青年医务工作者资助

作者简介:袁玉亮(1974.12—),男,本科,副主任检验技师,研究方向:医学检验在中医诊疗中的价值,E-mail:13522170736@139.com

通信作者:魏华民(1984.09—),男,博士,主治医师,研究方向:中医肿瘤预防,E-mail:weihuamin6255@126.com

者 20 例作为对照组,均签署知情同意书,本研究采用前后对照的方法,分别于患者入组前后收集患者的临床资料:包括患者一般资料(性别、年龄等)、皮损程度、不良反应等;另外于患者前后清晨采集肘静脉血 5 mL,低温(4 ℃)离心 15 min(2 500 r/min),吸取上清液,置于-20 ℃冰箱保存备用。本研究经中国中医科学院广安门医院伦理委员会审查批准(审批号:2015EC056-03)。

表 1 2 组一般资料比较

项目	对照组(n = 20)	观察组(n = 62)
男/女(例)	11/9	30/32
年龄(岁)	12 ± 3.4	13 ± 4.3
病史(d)	—	<7 d(92%)
病情分级占比(%)		
I 级	—	32%
II 级	—	54%
III 级	—	10%
IV 级	—	4%

1.2 诊断标准 参照《中国临床皮肤病学》(赵辨,江苏凤凰科学技术出版社,2009 年 12 月第 1 版)中诊断标准:以毛囊性丘疹、黑头粉刺、脓疱、结节、囊肿和瘢痕为主要皮损表现,伴有皮脂溢出,好发于面部、上胸及背部,呈对称分布、慢性经过。参照 Pillsbury 及国际改良痤疮分级法进行临床分级:I 级:主要皮损为散发至多发黑头粉刺,可伴发炎性丘疹,总病灶数 10~30 个;II 级:主要皮损为粉刺,并有中等数量的丘疹和潜在性脓疱,局限在面部,总病灶数 31~50 个;III 级:主要皮损为炎性丘疹和脓疱,可见深在性脓疱和大的炎性皮损,发生与颜面、颈部、胸背部,总病灶数 50~100 个,结节/囊肿 <3 个。IV 级:大量的丘疹和脓疱,结节、囊肿,伴瘢痕形成,发生于上半身总病灶数 >100 个,结节/囊肿 >3 个。

1.3 纳入标准 1)符合上述诊断标准;2)年龄处于青春期即 10~20 岁。3)主要症状除痤疮外多有容易感冒或反复发生鼻炎、咽炎,舌体胖大多有齿痕,手足易冷,面色多青暗,痤疮多表现为色暗、灰滞等。

1.4 排除标准 1)舌苔黄或黄腻者;2)面部油腻光亮,口臭,尿赤,便秘者;3)伴有明显的心烦易怒、胸胁胀痛者;4)伴有口干、五心烦热、失眠多梦、舌红少苔、脉细者。5)伴有严重的先天性疾病和慢性病者。6)对中药有过敏史者。

1.5 脱落与剔除标准 1)患者失访;2)患者主动撤回知情同意书;3)患者未按规定用药致使疗效评估受影响者。

1.6 治疗方法 对所有患者进行告知,主要包括以

下内容:1)避免受风寒,尤其是以汗后为主;2)避免辛辣、生冷、油腻食物及大量饮水;3)避免作息不规律,尤其是熬夜,长期面对电脑、手机等电子产品。除满足以上条件外,每名入组患者均需每日煎服苓桂剂:桂枝 9 g、白芍 9 g、生姜 9 g、大枣 12 g、炙甘草 6 g、茯苓 12 g、白术 12 g。热重加黄芩 10 g,1 剂/d,水煎服,10 剂为 1 个疗程。

1.7 观察指标

1.7.1 外周血 CD14⁺ 细胞染色及检测 CD14-FITC 抗体、IgG1-FITC 抗体、IgG2a-PE 抗体、TLR2-PE 抗体购自于美国 BD 公司(产品批号分别为 557153,550616,562302,565349),分别于流式管底部加入相应抗体 2 μL,加入抗凝血 100 μL,震荡混匀,室温避光孵育 20 min;加入 2 mL 溶血素(美国 BD 公司)震荡混匀,室温避光 5 min 后 1 300 r/min 离心 10 min;弃上清,加入 2 mL PBS 震荡混匀后 1 300 r/min 离心 10 min;重复以上过程;用 BECKMAN COULTER 流式细胞检测仪检测外周血中 CD14⁺TLR2⁺ 细胞的阳性率。

1.7.2 外周血中炎症反应因子的水平 采用双抗夹心 ELISA 法测定患者治疗前后血清白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和环氧合酶 2(COX2)的变化(试剂盒购于美国 Abcam 公司),按照说明书进行检测。简述步骤如下:1)按说明进行标准品的稀释;2)加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步骤操作相同)、待测样品孔;3)温育:用封板膜封板后置 37 ℃温育 30 min;4)配液:将 30(48T 的 20 倍)倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30(48T 的 20 倍)倍稀释后备用。5)洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤,静置 30 秒后弃去,如此重复 5 次,拍干。6)加酶:每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外。7)温育:操作同 3);8)洗涤:操作同 5);9)显色:每孔先加入显色剂 A 50 μL,再加入显色剂 B 50 μL,轻轻振荡混匀,37 ℃避光显色 15 min。10)终止及测定:每孔加终止液 50 μL,终止反应(此时蓝色立转黄色)。测定:以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。测定应加在终止液后 15 min 以内进行。

1.8 疗效判定标准 根据患者皮损情况予以评分 分级 I 级皮损评分为 1~3 分,II 级皮损评分为 4~6 分,III 级皮损评分为 7~9 分,IV 级皮损评分为 10~12 分,由 3 位医师共同评分,取平均值作为患者评分等级。按照评分情况进行疗效评估:疗效指数 =

(治疗前评分 - 治疗后评分)/治疗前评分 × 100% ,
无效:疗效指数 < 20% ;有效:疗效指数 21% ~ 60% ;
显效:疗效指数 61% ~ 95% ;治愈:疗效指数 > 96% 。
1.9 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行
统计分析,资料描述数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)
的形式表示,治疗前后数据采用组内 t 检验,以 $P <$
0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床疗效比较 观察组患者治疗前后皮
损分数分别为 (6.7 ± 2.1) 分和 (1.6 ± 0.4) 分,差异
有统计学意义 ($P = 0.023$)。经过治疗后无效 0 例,
有效 14 例,显效 25 例,治愈 23 例。

2.2 对照组及观察组患者外周血 CD14⁺ 单核细胞
TLR2 分析 见图 1。

表 2 对照组与观察组治疗前后患者外周血
CD14⁺ TLR2⁺ 细胞比例 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD14 ⁺ TLR2 ⁺ (%)	P
对照组 (n = 20)	78 ± 5.1	
观察组 (n = 62)		
治疗前	92.3 ± 6.7 *	0.038
治疗后	81.2 ± 4.6 [△]	0.044

注:治疗前与对照组比较, * $P < 0.05$; 观察组组内治疗前后比
较, [△] $P < 0.05$

2.3 对照组及观察组外周血血清 IL-4、IL-8、TNF- α
和 COX2 水平 将 2 组人群外周血同时检测,结果
如下,观察组较对照组 IL-8 及 COX-2 均明显升
高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),经治疗后较治疗
前水平显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

目前公认的痤疮病因是丙酸杆菌感染,由其激
活的炎性反应是痤疮的起始和加重环节。目前的研
究认为在该病原体入侵机体后,与固有免疫细胞表
面的识别受体相结合,激活效应细胞,启动一系列免
疫反应是痤疮发展的根本原因。Toll 样受体是一类
重要的模式识别受体,在生物界中广泛存在,是固有
免疫系统的重要组成部分之一,在机体固有免疫中发挥
重要的抗感染作用,主要通过 TLR-2 和 TLR-4 识别
许多病原微生物及分枝杆菌产物,激活核因子而促
进多种炎性因子、黏附分子及抗微生物肽的转录表
达。和痤疮相关的主要受体为 TLR-2^[7-9]。TLR-2 是
一种参与免疫应答的跨膜非催化性蛋白质分子,在
机体皮肤、黏膜等物理屏障受损是激活免疫调节系
统的重要分子^[10],通过细胞内信号通路诱导 IL-8、
IL-4 及 TNF- α 聚集并使 COX-2 表达增加,促进炎性
反应^[11-13]。近期的研究证实,上述炎性反应因子和
痤疮的严重程度密切相关,可作为痤疮治疗评估的
客观标准^[14]。

通过中药调节痤疮患者的固有免疫减缓炎性反
应是本研究的主要内容。通过补法治疗痤疮文献少
有报道,这也是本研究重要的创新点之一,我们前期
通过临床观察发现青春期痤疮患者的体质多数属于
湿盛阳伤、营卫失调类型,基于该类患者的体质类
型,我们试用桂枝汤联合苓桂术甘汤,并在本实验中
证实:以调补为主的该方法治疗青春期寻常型痤疮
不仅可有效改善患者的皮损状态,而且降低患者外

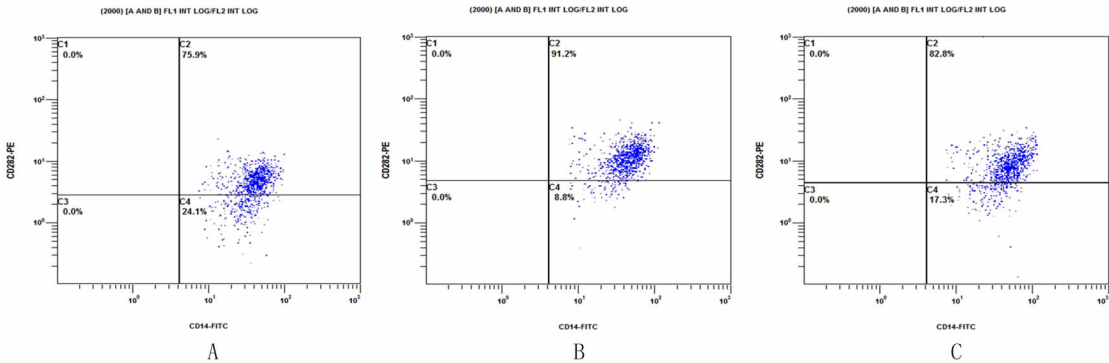


图 1 图 A、B、C 分别为具有代表性的对照组、观察组治疗前、治疗后患者外周血中 CD14⁺ 单核细胞 TLR2 表达量

表 3 青春期寻常型痤疮患者外周血 IL-8 及 COX-2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-4 (ng/L)	P	IL-8 (ng/L)	P	TNF- α (ng/L)	P	COX-2 (ng/mL)	P
对照组 (n = 20)	45.21 ± 16.2		423 ± 85		24.89 ± 5.3		6.3 ± 2.1	
观察组 (n = 62)								
治疗前	60.02 ± 18.6 *	0.026	982 ± 96 *	0.023	62.33 ± 8.7 *	0.021	11.3 ± 3.5 *	0.029
治疗后	48.61 ± 13.3 [△]	0.036	486 ± 77 [△]	0.031	26.57 ± 4.2 [△]	0.028	7.2 ± 2.6 [△]	0.040

注:治疗前与对照组比较, * $P < 0.05$; 观察组组内治疗前后比较, [△] $P < 0.05$

周血中单核细胞表面 TLR-2 的表达,同时降低血清 IL-4、IL-8、TNF- α 和 COX2 水平。

首先,和健康人群比较,痤疮患者 TLR-2 水平表达显著上调,和林玲等人的研究结果一致^[15],提示固有免疫失调是此类患者的主要特点之一,从固有免疫调节方面来治疗皮肤病包括痤疮已成为重要的研究方向之一^[16-21]。本研究发现经过中药治疗后患者外周血单核细胞 TLR-2 表达显著降低,提示调节固有免疫可能是该方法治疗痤疮的主要机制之一。其次,作为 TLR-2 下游信号通路中的关键促炎性反应因子 IL-4、IL-8、TNF- α 和 COX2 均在痤疮患者中有较高表达,水平痤疮丙酸杆菌引起的机体免疫失衡伴有明显的炎性反应参与,经过中药治疗后,患者体内的炎性反应标记物下降,说明中药改善了患者炎性反应-免疫之间的平衡,在提高免疫降低炎性反应方面有重要作用。总之,苓桂剂的应用可能通过下调 CD14⁺ 单核细胞 TLR-2 表达及分泌相关炎性因子改善体内的炎性反应,从而使固有免疫“正常化”而减轻痤疮。

本研究的局限性: 1) 本研究只纳入了部分特定的痤疮人群,由于不同年龄及发作时间有别,患者体质各异,此种方法可能只适用于部分痤疮患者,应该在中医辨证下合理应用。2) 本实验未能揭示苓桂剂激活固有免疫的具体信号通路及靶点,下一步细胞实验更能证实苓桂剂的主要靶点及内在机制。

参考文献

- [1] 刘婧. 基于数据挖掘的北京地区部分中医皮肤科流派治疗痤疮经验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [2] 蓝永豪. 基于数据挖掘技术分析当代中医名家痤疮验方经验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2016.
- [3] 崔力,王伟明. 清热消痤疮颗粒对炎症性痤疮患者炎症细胞因子水平的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2017,37(12):1404-1407.
- [4] 郭明杰,曹树志. 从温阳论证湿热型痤疮[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(99):234+236.
- [5] 沈新龙,陈力. 从男女性别角度论治中重度痤疮[J]. 中国美容医学,2017,26(10):109-112.
- [6] 李菲. 温经燥湿汤联合火针治疗寻常性痤疮(寒湿症)的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2017.
- [7] Dispenza M C, Wolpert E B, Gilliland K L, et al. Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2012,132(9):2198-2205.
- [8] Stein GL, Weiss J, Rueda MJ, et al. Moderate and Severe Inflammatory Acne Vulgaris Effectively Treated with Single-Agent Therapy by a

New Fixed-Dose Combination Adapalene 0.3 %/Benzoyl Peroxide 2.5 % Gel: A Randomized, Double-Blind, Parallel-Group, Controlled Study[J]. Am J Clin Dermatol,2016,17(3):293-303.

- [9] Totté JE, van der Feltz WT, Bode LG, et al. A systematic review and meta-analysis on Staphylococcus aureus carriage in psoriasis, acne and rosacea[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(7):1069-1077.
- [10] 陈文辉, 李晓鹏, 刘元林. 半导体激光联合异维 A 酸胶丸治疗寻常型痤疮的疗效观察[J]. 中国医疗设备, 2012, 27(3):30-32.
- [11] Barua R S, Sharma M, Dileepan K N. Cigarette Smoke Amplifies Inflammatory Response and Atherosclerosis Progression Through Activation of the H1R-TLR2/4-COX2 Axis[J]. Front Immunol, 2015, 6(572):572.
- [12] Carpenter S, Aiello D, Atianand MK, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. Science, 2013, 341(6147):789-792.
- [13] Kumar PS, Brandt S, Madassery J, et al. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by Helicobacter pylori switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF- α [J]. PLoS One, 2011, 6(5):e19614.
- [14] 刘波, 胡友红. 痤疮患者外周血 TLR-2、IL-4、IL-8、TNF- α 表达水平与痤疮严重程度相关性研究[J]. 中国美容医学, 2018, 27(3):111-113.
- [15] 林玲, 孙乐栋, 罗权, 等. 痤疮患者外周血 CD14⁺ 单核细胞 TLR2 的表达及其与 IL-8 和 TNF- α 的相关性[J]. 中国美容医学, 2010, 19(11):1638-1640.
- [16] Dispenza MC, Wolpert EB, Gilliland KL, et al. Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(9):2198-2205.
- [17] Qin M, Landriscina A, Rosen JM, et al. Nitric Oxide-Releasing Nanoparticles Prevent Propionibacterium acnes-Induced Inflammation by Both Clearing the Organism and Inhibiting Microbial Stimulation of the Innate Immune Response[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(11):2723-2731.
- [18] Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(10):1974-1980.
- [19] Abdallah F, Mijouin L, Pichon C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017:5095293.
- [20] Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, et al. Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(4):985-994.
- [21] 费裕茹, 肖昇珠. 表皮抗菌肽与皮肤病[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2015, 29(12):1295-1297.

(2018-02-26 收稿 责任编辑:张雄杰)