

中药研究

紫草素对银屑病 T 淋巴细胞增殖、活化的影响

刘欣 赵京霞 王燕 李萍

(首都医科大学附属北京中医医院/北京市中医研究所,北京,100010)

摘要 目的:研究具有凉血、解毒作用的中药单体紫草素对银屑病病理状态下异常活化的 T 淋巴细胞功能及相关信号转导通路的影响。方法:选取 Jurkat E6-1 T 淋巴细胞,以佛波醇酯和离子霉素活化 Jurkat E6-1 T 淋巴细胞,同时将 0.5~2 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的紫草素作用于细胞,采用 CCK-8 法检测 T 淋巴细胞增殖能力;流式细胞术检测细胞膜 CD69 的表达及细胞内游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的变化;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 T 淋巴细胞释放白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平;用 Realtime-PCR 和 Western blotting 法分别观察核转录因子 mRNA 及蛋白的表达影响。结果:不同浓度的紫草素均可明显抑制细胞增殖、CD69 表达及 Th1 类细胞因子分泌;均可有效降低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和蛋白激酶 C(PKC)磷酸化蛋白的水平;显著降低核转录因子 NF-AT mRNA 的表达,下调 c-Jun 的 mRNA 及蛋白表达并可抑制核因子- κB 蛋白的表达。以上各项指标均有一定量效关系。结论:紫草素可以通过抑制过度活化的 T 淋巴细胞功能从而发挥免疫调控作用,为紫草素治疗银屑病的作用机制及应用前景提供实验依据。

关键词 紫草素;T 淋巴细胞活化;信号转导通路;银屑病;凉血解毒

Effects of Shikonin on Proliferation and Activation of T Lymphocytes in Psoriasis

Liu Xin, Zhao Jingxia, Wang Yan, Li Ping

(1 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University/Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To study the effects of shikonin, which is a kind of monomer of Chinese traditional herbs with cooling blood and detoxification, on the function of abnormally activated T lymphocytes and related signal transduction pathways in the pathological state of psoriasis in vitro cell model. **Methods:** Jurkat E6-1 T lymphocytes were activated with phorbol ester and ionomycin, and shikonin at a concentration of 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$ was applied to the cells. T lymphocyte proliferation ability was detected by CCK-8 method. The flow cytometry was used to detect the expression of CD69 and the change of intracellular free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the release of interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α); q-PCR and Western blot were used to observe the effects of nuclear transcription factor mRNA and protein expression. **Results:** Different concentrations of shikonin can significantly inhibit cell proliferation, CD69 expression and Th1 cytokine secretion; both can effectively reduce the content of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and protein kinase C (PKC) phosphorylated protein, significantly reduce nuclear transcription factor NF-The expression of AT mRNA down-regulates the mRNA and protein expression of c-Jun and inhibit the expression of NF- κB protein. All the above indicators had a certain dose-effect relationship. **Conclusion:** Shikonin can exert immunoregulatory effects by inhibiting the function of over-activated T lymphocytes, and provide experimental evidence for the mechanism and application prospect of shikonin in the treatment of psoriasis.

Key Words Shikonin; T lymphocyte activation; Signal transduction pathway; Psoriasis; Treatment principle of cooling blood and detoxification

中图分类号:R284;R751

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.11.049

银屑病中医称之为“白疔”,是一种临床常见的难治性疾病,该病属于具有一定遗传背景的自身免疫性疾病,异常活化的 T 淋巴细胞及其释放的细胞因子是银屑病发病的核心环节。中医认为,“血分蕴

毒、热毒入血伤络”是银屑病发病的主要病机^[1],治疗上多以凉血解毒为法,凉血活血胶囊就是在该思想指导下由首都医科大学附属北京中医医院创制的治疗银屑病血热证的院内制剂。前期工作证明,凉

基金项目:国家自然科学基金项目(81573974,81673974);北京市自然科学基金项目(7172097)

作者简介:刘欣(1980.01—),女,硕士,助理研究员,研究方向:中医药治疗银屑病基础研究,E-mail:lolitaleeya@163.com

通信作者:李萍(1965.04—),女,博士,研究员,研究方向:中医药治疗银屑病临床与基础研究,E-mail:liping411@126.com

血活血胶囊不仅能够显著改善患者的红斑、浸润及瘙痒等症状、降低外周血炎性反应递质水平,其全方及拆方组分还可显著抑制体外 T 淋巴细胞的过度增殖、活化,体现出明显的免疫抑制及抗炎作用。紫草为凉血活血胶囊中的君药,具有凉血活血解毒的多重作用。为进一步研究凉血解毒类药物对银屑病的治疗作用机制,本研究选择紫草的主要活性成分紫草素作为研究对象,试图观察其对活化 T 淋巴细胞增殖、活化、释放细胞因子的影响,并利用中药单体对相关信号转导通路做初步研究。

1 材料

1.1 细胞 Jurkat E6-1 T 淋巴细胞株:中国医学科学院协和细胞资源中心,37 ℃、5% CO₂ 常规培养条件下用含 10% 的胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的 PRIM 1640 培养基培养,连续培养 3 d 进行传代。

1.2 试剂 紫草素 (shikonin) 标准品 (中国药品生物制品鉴定所);佛波醇酯 (phorbol 12, 13-dibutyrate, PDB) (美国 Sigma 公司,货号 P8139);离子霉素 (Ionomycin, IM) (美国 Sigma 公司,货号 I9657);CCK-8 检测试剂盒 (日本同仁化学研究所,货号 JG659);CD69 抗体 (美国 BD 公司,货号 341652);白细胞介素-2 (IL-2)、干扰素-γ (IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) Instant ELISA 检测试剂盒 (美国 Bender 公司,货号分别为: BMS221HS, BMS228HS, BMS223HS);BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司,货号:23227);山羊抗兔 IgG (H + L)、山羊抗小鼠 IgG (H + L) 远红外标记二抗 (美国 KPL 公司,货号分别为: 072-07-15-06, 072-07-18-06);p-c-Jun (Ser 63)、p-核因子-κB p65 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司,货号分别为:9261P, 3033)。

1.3 PCR 引物 引物均由上海生工合成。见表 1。

1.4 仪器 超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司), CO₂ 培养箱 (MCO-20AIC 型 SANYO 日本),流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司),荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI7500 应用生物系统公司),电泳仪、电转仪 (美国 Bio-Rad 公司),细胞破碎仪 (HD3100 型,德国 Bandlin 公司),酶标仪 (美国 Mul-

tiskanspectrum Thermo 公司),Odyssey 双色红外扫描仪 (美国 Gene Company Limited)。

2 方法

2.1 药品制备 紫草素先用二甲基亚砜 (Dimethylsulphoxide, DMSO) 溶解,然后用乙醇进行稀释,临用前以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 将溶液中 DMSO 含量稀释至 1‰ 以下,乙醇含量稀释至 10% 以下,如在稀释过程中出现紫草素析出,采用超声使其完全溶解。

2.2 紫草素浓度筛选 CCK-8 法检测。将细胞浓度调至 1 × 10⁵/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL;以终浓度分别为 2 × 10⁻⁷ mol/L 的 PDB 和 5 × 10⁻⁷ mol/L 的 IM 刺激活化细胞,同时加入终浓度分别为 0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL 和 4 μg/mL 的紫草素置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中 48 h;检测前 4 h,每孔加入 10 μL CCK-8,酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度值。选择对正常细胞无毒性且具有一定药效学作用的浓度范围作为后续实验的应用剂量。

2.3 紫草素对活化的 T 淋巴细胞活性的影响 CCK-8 法检测。将细胞浓度调至 1 × 10⁵/mL 接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL;加入终浓度分别为 2 × 10⁻⁷ mol/L 的 PDB 和 5 × 10⁻⁷ mol/L 的 IM 刺激活化细胞,同时加入由 2.2 确定剂量的紫草素。37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h,检测前 4 h,每孔加入 10 μL CCK-8,酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度值。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。

2.4 紫草素对活化的 T 淋巴细胞表达 CD69 的影响 流式细胞术检测。将细胞浓度调至 2 × 10⁵/mL 接种于 12 孔板中,每孔 1.5 mL;加入终浓度分别为 2 × 10⁻⁷ mol/L 的 PDB 和 5 × 10⁻⁷ mol/L 的 IM,同时加入由 2.2 确定剂量的紫草素,37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h。收集细胞并每组加入 10 μL anti-CD69-PE,4 ℃ 冰箱避光孵育 30 ~ 40 min。流式细胞仪检测 CD69 阳性细胞表达率。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

2.5 紫草素对活化的 T 淋巴细胞分泌白细胞介素-2 (IL-2)、γ-干扰素 (IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的影响 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测。将

表 1 引物序列及产物大小

基因	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
NF-ATc1	5'-CCA CCG AGC CCA CTA CGA GA	5'-CAG GAT TCC GGC ACA GTC AT
c-Jun	5'-CTC AGA CAG TGC CCG AGA TG	5'-GCT CGG TTA GCA TGA GTT GG
β-actin	5'-CTA GAA GCA TTT CGG GTG GAC GAT GGA GGG	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA

细胞浓度调至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 加入 12 孔板中,每孔 1 mL;加入终浓度分别为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 PDB 和 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 IM,同时加入由 2.2 确定剂量的紫草素,37 ℃、5% CO_2 条件下培养至 48 h;离心收集细胞上清液,严格按 ELISA 试剂盒说明书步骤操作。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

2.6 紫草素对活化的 T 淋巴细胞内游离 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 流式细胞术检测。将细胞浓度调至 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔 1.5 mL;加入终浓度分别为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ PDB 和 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 IM,同时加入由 2.2 确定剂量的紫草素,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 16 h;收集细胞并加入浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3AM 100 μL ,37 ℃ 避光孵育 30 min;洗去未结合染料,流式细胞仪检测细胞内游离 Ca^{2+} 的荧光强度。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

2.7 紫草素对活化的 T 淋巴细胞内蛋白激酶 C (PKC)磷酸化蛋白水平的影响 ELISA 检测。将细胞浓度调至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中,每孔 3 mL;加入终浓度分别为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 PDB 和 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 IM 刺激活化细胞,同时加入由 2.2 确定剂量的紫草素,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h,裂解细胞提取蛋白。ELISA 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

2.8 紫草素对核转录因子 NF-AT 和 AP-1 组分 c-Jun mRNA 表达的影响 q-PCR 法检测。将细胞浓度调至 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 3 mL;加入终浓度分别为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 PDB 和 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 IM 及确定剂量的紫草素,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h。收获细胞,提取细胞总 mRNA 并进行逆转录,实验操作按产品说明书进行。采用 SYBR Green 标记,ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪检测 40 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行目的基因的相对定量分析。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

2.9 紫草素对核转录因子 AP-1 组分 c-Jun 及核因子- κB 蛋白表达的影响 Western blotting 法检测。将细胞浓度调至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于细胞培养瓶中,每瓶 7 mL;加入终浓度分别为 $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 PDB 和 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 IM,及由 2.2 确定剂量的紫草素,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h。离心收集细胞,裂解、提取总蛋白,BCA 法蛋白定量。将聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质电泳转移到聚偏氟乙烯 (PVDF)膜上,分别与 p-c-Jun (1:500)/p-核因子- κB -p65 (1:2000)/ β -actin (1:2000)一抗 4 ℃ 孵育过

夜。再与羊抗兔或羊抗鼠远红外标记的二抗 (1:10000 稀释)室温孵育 1.5 h。Odyssey 双色红外扫描仪进行条带扫描。实验重复 3 次。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较。计数资料用率表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 紫草素对活化的 T 淋巴细胞活性的影响 实验结果显示,4 $\mu\text{g/mL}$ 的紫草素将 T 淋巴细胞的活性降低至正常水平以下,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表现出对细胞具有杀伤毒性;2 ~ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的紫草素均可显著抑制经 PDB + IM 刺激活化的 T 淋巴细胞的活性,降低细胞增殖率,抑制率分别达到 31.51%、26.45% 和 26.45%,与模型组比较,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$);而浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的紫草素对活化的 T 淋巴细胞未表现出抑制作用,与模型组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),显示不出药效。见表 2。

因此,后续实验选择 2 ~ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 作为紫草素的应用浓度。

表 2 紫草素对活化 T 淋巴细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A 值
对照组	1.454 ± 0.172 *
模型组	2.136 ± 0.137 Δ
紫草素组 ($\mu\text{g/mL}$)	2.051 ± 0.495 Δ
0.25	1.571 ± 0.370 *
0.50	1.517 ± 0.411 *
1.00	1.463 ± 0.454 *
2.00	1.086 ± 0.287 Δ *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 紫草素对 T 细胞活化标志 CD69 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	CD69 表达率 (%)	抑制率 (%)
对照组	15.60 ± 0.06 *	
模型组	90.08 ± 1.19 Δ	
紫草素组 ($\mu\text{g/mL}$)		
0.50	55.45 ± 0.43 * Δ	38.44
1.00	34.97 ± 1.43 * Δ	61.18
2.00	31.36 ± 1.24 * Δ	65.17

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

3.2 紫草素对 T 细胞活化 CD69 表达的影响 本实验用 0.5 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 的紫草素作用于经 PDB 和 IM 活化的 T 淋巴细胞,结果显示各浓度紫草素均可显著降低 T 淋巴细胞表面 CD69 的表达率,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其抑制率分

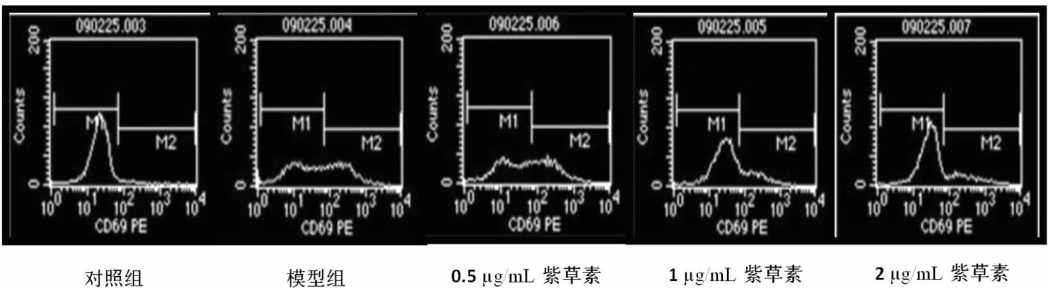


图 1 紫草素对 T 细胞活化标志 CD69 表达的影响

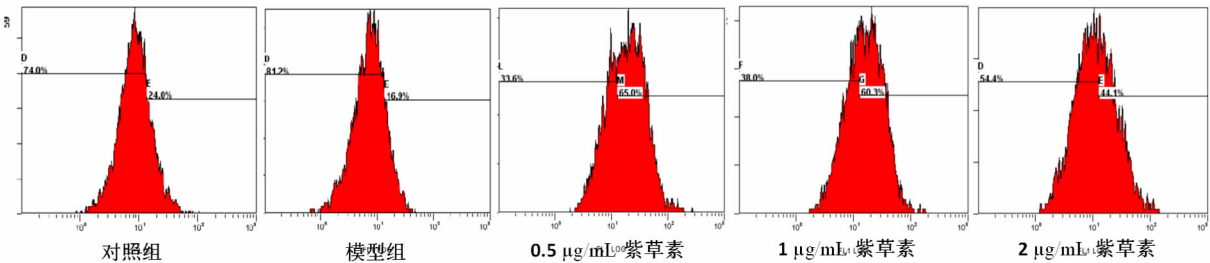


图 2 紫草素对活化的淋巴细胞中[Ca²⁺]_i的影响

别为 38.44%、61.18% 和 65.7%，平均降幅达 55%。其中，以 2 μg/mL 的抑制作用最为明显，其次为 1 μg/mL，0.5 μg/mL 的紫草素抑制率最低，呈现一定的量效关系。见图 1、表 3。

3.3 紫草素对活化 T 细胞分泌 INF-γ 的影响 以 0.5~2 μg/mL 的紫草素作用于活化的 T 淋巴细胞，均可显著降低其 INF-γ 的分泌，分别为 41.88%、61.51%、68.63%，与模型组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，表现出一定的量效关系；其中以 2 μg/mL 紫草素的下调作用最为显著，但其水平仍高于未活化细胞，与对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.4 紫草素对活化 T 细胞分泌 IL-2 的影响 本实验中，0.5 μg/mL、1 μg/mL 和 2 μg/mL 的紫草素均可显著降低活化 T 淋巴细胞分泌 IL-2 的能力，与模型组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；以 2 μg/mL 的下调作用最为明显，其抑制率可达 74.74%，有效地抑制了细胞因子的过度释放；0.5 μg/mL 和 1 μg/mL 的紫草素对 IL-2 的抑制率分别为 40.82% 和 50.83%，均不及 2 μg/mL 的作用，可见药物浓度越高抑制作用越强。见表 4。

3.5 紫草素对活化 T 细胞分泌 TNF-α 的影响 本实验所用 0.5 μg/mL、1 μg/mL 和 2 μg/mL 的紫草素均可显著抑制活化的 T 淋巴细胞分泌 TNF-α，其抑制率分别为 19.63%、23.55%、49.34%，与模型组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，药物浓度越高则抑制率越高。其中 2 μg/mL 紫草素的抑制作用最为明显，该组 TNF-α 的水平与对照组水平相

当，与对照组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，说明该浓度药物具有很好地抑制 TNF-α 分泌的功效，可将细胞调节至活化前水平；0.5 μg/mL 和 1 μg/mL 的紫草素虽也可有效降低 T 淋巴细胞分泌 TNF-α 的水平，但与对照组比较其水平仍过高，与对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 紫草素对活化 T 细胞分泌 TNF-α 和 IL-2、INF-γ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

组别	INF-γ	IL-2	TNF-α
对照组	4.17 ± 0.56 *	15.28 ± 0.80 *	17.29 ± 0.19 *
模型组	37.39 ± 1.35 *△	81.03 ± 1.65 △	35.41 ± 0.26 △
紫草素组 (μg/mL)			
0.50	21.73 ± 2.60 *△	47.95 ± 1.05 *△	28.46 ± 0.45 *△
1.00	14.39 ± 1.30 *△	39.84 ± 0.12 *△	27.07 ± 0.49 *△
2.00	8.73 ± 0.06 *△	20.47 ± 0.03 *△	17.94 ± 1.16 *

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与对照组比较，△ $P < 0.05$

3.6 紫草素对活化 T 淋巴细胞内游离 [Ca²⁺]_i 变化的影响 结果显示，活化后的 T 淋巴细胞内 Ca²⁺ 荧光强度明显升高，Ca²⁺ 峰明显右移，活化后胞内游离 Ca²⁺ 浓度较静息状态提高近 300%，与对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。0.5 μg/mL、1 μg/mL 和 2 μg/mL 紫草素组细胞的 Ca²⁺ 浓度较模型组均有所降低，其抑制率分别为 18.18%、31.11% 和 64.84%，与模型组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，降幅与药物浓度正相关。见图 2、表 5。

3.7 紫草素对胞质 PKC 磷酸化蛋白水平的影响 实验结果表明，经活化后 T 淋巴细胞内的 PKC 磷酸化蛋白水平明显上升，比对照组提高 62.28%，

与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。1 $\mu\text{g/mL}$ 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 的紫草素作用于细胞后,均可明显降低其 PKC 磷酸化蛋白的水平,降幅分别为 16.82% 和 21.4%,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素组的磷酸化蛋白的水平仅比模型组降低 9.65%,与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2、表 5。

表 5 草素对活化 T 淋巴细胞中[Ca ²⁺] _i 及 PKC 磷酸化蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别	[Ca ²⁺] _i (%)	phospho-PKC(pg/mL)
对照组	7.01 ± 0.32 *	35.34 ± 0.59 *
模型组	26.68 ± 1.34 [△]	57.35 ± 1.05 [△]
紫草素组($\mu\text{g/mL}$)		
0.50	21.83 ± 0.57 * [△]	51.81 ± 1.45 [△]
1.00	18.38 ± 0.92 * [△]	47.70 ± 0.58 * [△]
2.00	9.38 ± 0.49 * [△]	45.07 ± 0.36 * [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$

3.8 紫草素对 T 淋巴细胞核转录因子 NF-AT mRNA 表达的影响 本实验中模型组核转录因子 NF-AT 的 mRNA 大量表达,比对照组表达量提高 2 倍多($P < 0.05$)。经不同浓度紫草素作用后的细胞, mRNA 表达量均显著下降,其降幅分别为 31.71%、32.40% 和 47.74%,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的作用相近;2 $\mu\text{g/mL}$ 组的抑制作用最为明显,表现出高浓度药物作用明显的趋势。见表 6。

3.9 紫草素对 T 淋巴细胞核转录因子 c-Jun mRNA 表达的影响 实验表明,模型组细胞 c-Jun mRNA 表达量明显高于对照组,比对照组提高 52.05% ($P < 0.05$)。经 0.5 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素处理后的细胞 c-Jun mRNA 表达均有所下降,降幅分别为 12.28%、18.13%、25.73%,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且与药物浓度相关。见表 6。

表 6 草素对活化 T 淋巴细胞核转录因子 NF-AT 和 c-Jun mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别	NF-A/ β -actin	c-Jun/ β -actin
对照组	0.092 ± 0.010 *	0.082 ± 0.004 *
模型组	0.287 ± 0.011 [△]	0.171 ± 0.020 [△]
紫草素组($\mu\text{g/mL}$)		
0.50	0.196 ± 0.010 * [△]	0.150 ± 0.005 * [△]
1.00	0.194 ± 0.006 * [△]	0.140 ± 0.004 * [△]
2.00	0.150 ± 0.018 * [△]	0.127 ± 0.015 * [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$

3.10 紫草素对 T 淋巴细胞核转录因子 c-Jun 蛋白表达的影响 结果显示,模型组蛋白表达水平明显

高于对照组,0.5 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素组的蛋白与模型组比较均有不同程度的降低。见图 3。

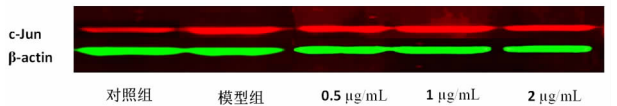


图 3 紫草素对活化的 T 淋巴细胞 c-Jun 蛋白表达的影响

3.11 紫草素对 T 淋巴细胞核因子- κ B 蛋白表达的影响 结果显示,模型组核因子- κ B 蛋白表达水平明显高于对照组;经 0.5 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素处理后的细胞,其核因子- κ B 蛋白表达量均受到抑制,以 1 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素的作用最明显。见图 4。

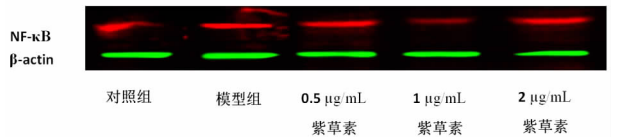


图 4 紫草素对活化的 T 淋巴细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

4 讨论

凉血活血胶囊是首都医科大学附属北京中医医院的院内制剂,该方是在赵炳南、张志礼等皮外科名家治疗银屑病常用有效方剂凉血解毒汤的基础上经过改进工艺研制而成,充分体现中医对于银屑病血热证治疗以“清热凉血、活血解毒”为法的辨证思想,是“凉血、解毒”治则指导下治疗银屑病的有效方剂。本课题组对凉血活血胶囊治疗银屑病的临床疗效做了长期且深入的验证和研究,证明该药治疗寻常型银屑病血热证安全有效,且凉血活血不留瘀,解毒养阴不伤正^[2]。临床研究证实,凉血解毒汤可明显改善患者皮损处红斑、浸润面积、瘙痒等症状,总有效率达 69.23%^[3];并且可明显下调银屑病血热证患者外周血中 IL-17、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6、TNF- α 和血管内皮生长因子(VEGF)的水平^[4,6],表现出一定的免疫抑制和调控作用。前期基础研究表明,高、中、低剂量的凉血活血胶囊均可显著抑制 T 淋巴细胞的异常活化,从而调控炎症反应进程,具有一定的免疫抑制功效^[7];其凉血、解毒拆方组分虽然在一定程度上也可抑制炎症反应,但总体作用不如全方^[8]。

本课题组在对凉血活血胶囊的拆方研究中发现,组方中的凉血类与解毒类药物在划分时存在一个交叉点,即单味中药紫草。紫草是凉血活血胶囊中的君药,始载于《神农本草经》,列为中品。味苦,性寒。有凉血、活血、解毒、透疹之功^[9]。可见,一味紫草身集凉血、解毒双重功效,是凉血解毒中医治则的典型代表。临床研究表明,以紫草为君药的紫

草汤治疗寻常型银屑病总有效率达 85.71%^[9-10]。外用紫草乳膏可有效改善银屑病皮损处的干燥、脱屑、瘙痒等症状,总有效率达 75.86%^[9,11]。实验研究表明,紫草素可降低咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠皮损的表皮层厚度,并可降低血清中 IL-17、IL-6、TNF- α 、IL-22 的水平^[12];可抑制角质细胞的过度增殖、诱导凋亡^[13-14];并可抑制树突细胞成熟、分化,从而抑制其促淋巴细胞增殖的能力,从而改善银屑病样小鼠的皮损程度^[15-16]。

本研究继续观察紫草素对 T 淋巴细胞活化及相关信号转导通路的影响。结果显示 0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 不同剂量的紫草素均可明显降低 T 淋巴细胞的增殖、显著抑制细胞表面活化分子 CD69 的表达和 T 细胞分泌 Th1 类细胞因子的功能,且有剂量依赖性,表现出一定的免疫抑制作用。

T 淋巴细胞的活化是受到严格调控的。其中,PKC 的激活和细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高是活化的早期事件,也是调控 T 细胞活化的中心步骤。PKC 活化后一方面可通过经典的 DAG、Ras、Raf 和 MAP-KKK 途径激活 Fos 和 Jun 蛋白结合形成的异源二聚体 AP-1,另一方面通过 BCL-10、Carmal、MALT1 等信号分子直接激活核因子- κB ^[17]。胞内持续的 Ca^{2+} 脉冲信号可诱导 CaN 磷酸化,导致核转录因子 NF-AT 脱磷酸而被活化,并移位入核^[18]。活化的核转录因子 NF-AT 与由 PKC 途径生成的 AP-1 结合形成转录复合物,与靶基因的调控元件结合,共同对靶基因的表达进行调控。而活化的核因子- κB 与其抑制蛋白 I $\kappa\text{B}\alpha$ 解离后转位入核,其序列上有 IL-2、INF- γ 、TNF- α 等多种基因的结合位点,可直接调控多种细胞因子的表达。

紫草素对 T 细胞活化信号转导通路的研究结果显示,0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素均可显著降低细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度和 PKC 磷酸化蛋白的水平,说明紫草素可对信号转导通路上游的第二信使及关键节点激酶发挥抑制作用。由此提示,紫草素可能对信号转导通路的下游同样具有调节作用,从而调控炎症反应的进程。实验对信号通路下游的核转录因子 NF-AT、AP-1、核因子- κB mRNA 和蛋白表达的研究结果证实:1) 不同剂量的紫草素均对核转录因子 NF-AT mRNA 的表达产生明显的抑制作用,浓度越高抑制作用越明显。2) 各剂量紫草素均可有效降低 AP-1 主要组分 c-Jun 的 mRNA 表达,并对其蛋白表达也均有明显的抑制趋势。对 c-Jun 蛋白表达的抑制可有效抑制 AP-1 异源二聚体的形成,从而抑制

AP-1 的生物活性,使其无法与核转录因子 NF-AT 在细胞核内结合,进而遏制需二者共同启动的靶基因的表达。3) 各组紫草素均可抑制核因子- κB 蛋白的表达,其中以 1 $\mu\text{g/mL}$ 紫草素的作用最明显。

综上所述,本研究证明紫草素可以显著抑制 T 淋巴细胞增殖、活化及细胞因子的释放,具有一定的免疫抑制作用;同时还证明,紫草素可以通过下调信号转导通路中的第二信使 Ca^{2+} 浓度和关键节点激酶 PKC 的水平,抑制核转录因子 NF-AT、AP-1 和核因子- κB 等核转录因子的 mRNA 及蛋白表达,从而对 T 淋巴细胞活化的信号转导通路进行调控。本研究为紫草素作为免疫抑制剂用于银屑病的治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1]李萍,王莒生,赵京霞,等.银屑病“血分蕴毒”病机解析[J].首都医科大学学报,2009,30(4):413-417.
- [2]邓丙戌,王萍,孙丽蕴,等.赵炳南教授凉血活血法治疗银屑病(白疕)血热证的临床与基础研究[C].北京:中华中医药学会皮肤科分会第六次学术年会、赵炳南学术思想研讨会、全国皮肤科中医外治高级研修班,2009:7.
- [3]张雪.“辨血为主,从血论治”规范化方药辨证治疗寻常型银屑病研究[J].中国卫生标准管理,2018,9(2):108-110.
- [4]徐文俊,毛常亮,冯仁洋,等.凉血活血汤对寻常型银屑病进展期患者外周血 Th17 相关因子的干预作用[J].中国麻风皮肤病杂志,2018,34(1):45-47.
- [5]张蕾,刘欣,王丽华,等.理血方剂对不同证型银屑病患者血清 γ 干扰素、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的影响[J].中医杂志,2010,51(12):1083-1085,1092.
- [6]赵京霞,李萍,刘欣,等.理血解毒类方对寻常型银屑病患者外周血管内皮生长因子水平的影响[J].首都医科大学学报,2009,30(4):423-425.
- [7]刘欣,李萍,赵京霞,等.凉血解毒方对 Jurkat T 淋巴细胞增殖、活化及细胞因子分泌的影响[J].首都医科大学学报,2009,30(4):418-422.
- [8]刘欣,李萍,赵京霞,等.凉血活血胶囊全方及拆方对 Jurkat T 淋巴细胞增殖、活化及释放细胞因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(22):198-202.
- [9]王明星,王燕,赵京霞,等.理血类中药在治疗寻常型银屑病中的应用[J].世界中医药,2017,12(9):2263-2268.
- [10]曾祖平,李萍.中药紫草在银屑病内治外治中的应用[C].郑州:2013 第六次临床中药学学术年会暨临床中药学学科建设经验交流论文集,2013.
- [11]苏婕.紫草乳膏外用治疗寻常型银屑病血燥证的临床及实验研究[D].北京:北京中医药大学,2016.
- [12]赵莎,潘敏,陈菲菲,等.紫草素对银屑病样动物模型 Th17 细胞相关因子的影响[J].临床皮肤科杂志,2016,45(5):323-327.
- [13]解欣然,张蕾,刘欣,等.紫草素对 IL-17 诱导角质形成细胞增殖及趋化因子表达的影响[J].中国中药杂志,2015,40(5):946-949.

究黄连-吴茱萸药对是通过相须、相使的作用以增强疗效;亦或是通过相畏相杀而起到相互制约而降低药物的不良反应。本质谱研究中质荷比选择了 100 ~ 1000 和 200 ~ 800 2 个条件进行优化,结果显示 100 ~ 1000 范围内的质荷比能获得相对较多色谱峰数,以 S1 黄连、吴茱萸配伍药对为样品采用 UPLC-MS 技术进行检测,鉴定 16 个特征色谱峰中主要成分和化合物,通过分析 UPLC-MS 与 MS 系统分析,同时结合色谱峰参考文献^[21-25],结果显示除了 9、15 和 16 号特征色谱峰外,来源于黄连的成分和化合物有分别归属其来源,其中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄连碱和表小檗碱;来源于吴茱萸的成分和化合物有吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱;结合化合物质谱裂解规律,推测出 3 种化合物,分别为木兰花碱、格陵兰黄连碱和 1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹诺酮。

参考文献

- [1] 李伟霞,唐于平,史旭芹,等. 药对研究(Ⅳ)—药对的配伍效应[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4203-4207.
- [2] 李伟霞,唐于平,刘立,等. 药对研究(Ⅲ)—药对的功效物质基础[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4196-4202.
- [3] 尚尔鑫,李文林,叶亮,等. 药对研究(Ⅱ)—药对的数据挖掘[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4191-4195.
- [4] 唐于平,束晓云,李伟霞,等. 药对研究(Ⅰ)—药对的形成与发展[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4185-4190.
- [5] 王林艳,唐于平,刘欣,等. 药对研究(Ⅵ)—黄连-吴茱萸药对[J]. 中国中药杂志,2013,38(24):4214-4219.
- [6] 崔红梅,杨军,黎万寿. 不同溶剂和提取方式对黄连-甘草药对中有有效成分提取率的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,7(12):43-46.
- [7] 席国萍,宋国斌. 不同方法及溶剂对黄连小檗碱的提取效果比较[J]. 化学工程师,2011,3(7):59-60.
- [8] 赵恒强,陈军辉,郭秀春,等. 加速溶剂萃取法快速提取黄连中的生物碱[J]. 分析试验室,2008,27(11):5-9.

- [9] 邢美莲,贾鹏燕,冯冬艳,等. 吴茱萸不同溶剂提取物抗氧化和抑菌性研究[J]. 作物杂志,2013,8(6):76-78.
- [10] 刘珊珊,周兴清,梁彩霞,等. 吴茱萸水提取物化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,4(8):58-64.
- [11] 杨文婷,黄士栩,徐文广,等. 超声波辅助提取吴茱萸生物碱的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(8):54-57.
- [12] 涂瑶生,江志强,孙冬梅,等. 黄连生物碱提取及纯化工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(2):208-212.
- [13] 林滔,黄丽萍,万东华. 超声法提取黄连中紫外吸收剂的试验研究[J]. 中国药师,2008,11(11):1335-1336.
- [14] 朱彭龄. 梯度洗脱[J]. 分析测试技术与仪器,2010,16(1):56-59.
- [15] 袁清照,张水寒,李顺祥,等. 吴茱萸道地药材的高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药,2010,41(9):1534-1538.
- [16] 霍志鹏,王玉,周水平,等. 黄连生物碱成分的 HPLC-DAD-MS 分析[J]. 天津药学,2016,28(2):8-12.
- [17] 高青,刘颖,宋彬彬,等. 超高效液相色谱与高效液相色谱方法转换及验证[J]. 药物分析杂志,2016,9(7):1279-1286.
- [18] 潘浪胜,徐晓梅,吕秀阳,等. 黄连与吴茱萸分煎后配伍时主要组分含量变化规律研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(4):258-261.
- [19] 彭明兴,吴永江,程翼宇. 黄连与吴茱萸配伍时黄连中主要化学组分溶出率变化规律研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(7):629-632.
- [20] 周晟,陈澈,孟庆刚. 黄连-吴茱萸药对配伍结构及应用规律[J]. 中医杂志,2017,58(19):1646-1649.
- [21] 马岩,张万军,卫军营,等. 反相高效液相色谱双梯度洗脱分离肽混合物及质谱分析[J]. 色谱,2011,29(3):205-211.
- [22] 陈军辉,赵恒强,李文龙,等. 高效毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱联用分析黄连中的生物碱[J]. 化学学报,2007,65(23):2743-2749.
- [23] 王道武,刘志强,郭明全,等. 黄连中小檗碱及其同分异构体的电喷雾质谱研究[J]. 分析化学,2003,31(9):1101-1104.
- [24] 陈焕文,郑健,王伟萍,等. 电喷雾解吸电离质谱快速测定吴茱萸中生物碱[J]. 分析化学,2009,37(2):237-241.
- [25] 廖琼峰,谢智勇,张蕾,等. 液相色谱-电喷雾质谱联用研究吴茱萸化学成分溶出规律[J]. 中成药,2009,31(2):259-263.

(2018-03-22 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 2867 页)

- [14] 孙丽蕴,邓丙戌,陈凯,等. 靛玉红紫草素对角质形成细胞株凋亡的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志,2004,18(6):336-338.
- [15] 王燕,赵京霞,林燕,等. 紫草素对人外周血单核细胞来源的树突状细胞表型及功能的影响[J]. 免疫学杂志,2014,30(8):667-670,676.
- [16] Wang Y, Zhao J, Zhang L, et al. Suppressive effect of β , β -dimethylacryloyl alkannin on activated dendritic cells in an imiquimod-in-

duced psoriasis mouse model[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6):6665-6673.

- [17] 李迎秋,王旭东,龚宇,等. SUMO 化修饰调控 T 细胞免疫突触形成和 T 细胞活化[J]. 中国科学基金,2016(4):315-319.
- [18] 赵海慧,赵阴环. T 细胞异常活化在系统性红斑狼疮中的分子免疫机制[J]. 中国临床药理学与治疗学,2012,17(4):452-457.

(2018-05-24 收稿 责任编辑:杨觉雄)