

# 寻常型银屑病中医三证型形成与皮肤组织中 JAK1/STAT3 信号通路关系的研究

张润田<sup>1</sup> 陈曦<sup>2</sup> 李玲玲<sup>1</sup> 杭海燕<sup>1</sup> 段行武<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学东直门医院,北京,100107; 2 北京中医药大学东直门医院东区,北京,101100)

**摘要** 目的:探讨寻常型银屑病血热、血瘀、血燥证形成与皮肤组织中 JAK1/STAT3 信号通路的关系。方法:选取 2013 年 10 月至 2014 年 10 月东直门医院皮肤科门诊和病房收治的寻常型银屑病患者 18 例(严格中医辨证分为血热证、血瘀证、血燥证三型),正常人受试者 6 例,记录患者一般情况,用 RT-PCR 法检测各组受试者皮肤组织中 IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc、VEGF 的 mRNA 表达差异。结果:检测 24 例受试者皮肤组织,IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc 的 mRNA 表达相互间均呈正相关,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );血热证患者皮损中,IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc 的 mRNA 表达均明显高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),血燥证 IL-22R1、JAK1、STAT3 的 mRNA 表达高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:JAK1/STAT3 信号通路的异常活跃,可能是银屑病血热证临床表现形成的重要因素;且 JAK/STAT 信号通路活化差异可能与血热证向血瘀、血燥证转变的过程相关。

**关键词** 银屑病;中医证型;JAK1/STAT3 信号通路

## Relationship Between Three TCM Syndromes of Psoriasis and JAK/STAT Signaling Pathway

Zhang Runtian<sup>1</sup>, Chen Xi<sup>2</sup>, Li Lingling<sup>1</sup>, Hang Haiyan<sup>1</sup>, Duan Xingwu<sup>1</sup>

(Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China)

**Abstract Objective:** To observe the differences between blood heat syndrome, blood dryness syndrome and blood stasis syndrome of psoriasis in JAK/STAT signaling pathways. **Methods:** A total of 18 psoriasis cases in our hospital were divided into 3 groups based on TCM syndrome differentiation. The three groups were blood heat syndrome group, blood dryness syndrome group and blood stasis syndrome group. And 6 healthy participants also participated in the trail. Their general information was recorded. RT-PCR was employed to test the difference of IL-22R1, JAK1, STAT3 and c-myc in participants' skin tissue samples. **Results:** The gene transcription correlation test among 24 psoriasis patients show that IL-22R1, JAK1, STAT3 and c-myc were all positively correlated to each other ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The gene transcriptions of IL-22R1, JAK1, STAT3 and c-myc in blood heat group were significantly higher than healthy case group ( $P < 0.01$ ). In blood dryness group, gene transcription of IL-22R1, JAK1 and STAT3 were higher than healthy group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The active status of JAK/STAT signaling pathway could be an important factor in the formation of psoriasis blood heat syndrome. While the JAK/STAT signaling pathway may result in blood heat syndrome turning into blood dryness syndrome and blood stasis syndrome.

**Key Words** Psoriasis, Chinese medicine syndromes, JAK/STAT signaling pathway

中图分类号:R285.6;R758.63 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.07.055

银屑病是临床常见的慢性炎性反应性皮肤病,固有免疫系统中各种炎性反应因子和粘附分子刺激导致 T 细胞发生活化 and 分化,进而介导角质形成细胞(Keratocyte, KC)异常增殖凋亡是本病重要的病理学改变<sup>[1]</sup>。在这一病理过程中 Janus 激酶(Janus Kinase, JAK)/信号转导和转录激活因子(Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT)通路发挥重要作用<sup>[2]</sup>。JAK1/STAT3 信号通路是 KC 内信息传递的一条通道<sup>[3]</sup>, IL-22 通过与 KC 表面的特异性受体 IL-22R1 结合,活化 KC 内的 JAK1/STAT3 信号传导通路,进而诱导其下游的细胞周期调控因子原

癌基因(C-myc)表达,从而改变 KC 增殖、凋亡周期,形成银屑病表皮增殖凋亡异常的病理改变<sup>[4]</sup>。本研究拟采用 RT-PCR 技术检测寻常型银屑病患者皮损中通路特异性受体 IL-22R1,通路关键因子 JAK1、STAT3,以及通路下游细胞周期调控基因 C-myc 的 mRNA 表达,以探究 JAK1/STAT3 信号通路介导的 KC 异常增殖,在寻常型银屑病血热、血瘀、血燥 3 大基本中医证型形成中发挥的作用。

## 1 材料与方法

1.1 材料 本研究经北京中医药大学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。寻常型银屑病患者

皮损组织包括:血热证、血瘀证、血燥证各6例,均为2013年10月至2014年10月东直门医院皮肤科门诊和病房收治患者。正常对照组健康人皮肤组织6例取自东直门医院手术室捐献者健康皮肤。所有受试者近2周内未接受外用药物治疗,且无心、脑血管,肝、肾及造血系统等严重原发性疾病。所有皮肤组织样本收集后立即放入液氮,冻存备用。

1.2 试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒(批号: CW0581),反转录 cDNA 合成试剂盒(批号: CW0744),PCR 扩增试剂盒(批号: CW0716A)均购自北京康为世纪公司。

### 1.3 方法

1.3.1 引物合成 内参基因  $\beta$ -actin 以及 IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc 的引物由上海生工公司合成,引物序列如下: $\beta$ -actin 上游引物 5'-TGACGTGGA-CATCCGCAAAG-3',下游引物 5'-CTGGAAGGTGGA-CAGCGAGG-3';IL-22R1 上游引物 5'-TTTCAGCTTT-GCTCTGGTCA-3',下游引物 5'-GGTGGCTTGAGGG-TAGTGTG-3';JAK1 上游引物 5'-AGTGCCCTGAGC-TACTTGGA-3',下游引物 5'-AGGTCAGCCAGCTCCT-TACA-3';STAT3 上游引物 5'-GGAGGAGGCATTCG-GAAG-3',下游引物 5'-ATCTGTGTGACACCAACGA-3';C-myc 上游引物 5'-CGTCTCGGATTCTCTGCTC-3',下游引物 5'-GCTGGTGCATTTTCGGTTGT-3'。

1.3.2 样本 RNA 提取及浓度纯度测定 加入 1 mL Trizol,在液氮下研磨 50 mg 皮肤组织样本,提取步骤按试剂说明书进行,提取物即总 RNA 稀释 50 倍测定其纯度为  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值(1.8~2.0),测定总 RNA 浓度为  $2 \times OD_{260}$ 。然后以 2  $\mu$ L loading buffer 加入 8  $\mu$ L 提取物中,进行琼脂糖凝胶进行电泳,以检测样本是否降解。

1.3.3 cDNA 合成 将无 RNA 酶水 11  $\mu$ L、模板 2  $\mu$ L,oligo dT 2  $\mu$ L 加入反应管中,掌上离心机离心后在 65  $^{\circ}$ C 下孵育 5 min,在 4  $^{\circ}$ C 下 10 min。在向上述反应管中加入  $5 \times$  RT mix 4  $\mu$ L,Enzyme Mix 1  $\mu$ L,掌上离心机离心后在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 40 min,70  $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后在 -20  $^{\circ}$ C 中长期保存备用。

1.3.4 PCR 反应 在反应管中加入 10  $\mu$ L  $2 \times$  PCR Mixture、10  $\mu$ M 上下游引物各 1  $\mu$ L、cDNA 模板 2  $\mu$ L、无 RNA 酶水 6  $\mu$ L,配成 20  $\mu$ L 反应体系。上机后设置 PCR 扩增条件为预变性 95  $^{\circ}$ C 10 min,(95  $^{\circ}$ C 15 s,59  $^{\circ}$ C 60 s)  $\times$  30 个循环。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察结果并拍照。

1.3.5 图像分析和数据处理 用 GelPro3.2 图像分

析系统对  $\beta$ -actin、IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc 的扩增产物进行灰度值分析,计算 IL-22R1/ $\beta$ -actin、JAK1/ $\beta$ -actin、STAT3/ $\beta$ -actin、C-myc/ $\beta$ -actin 的比值,以此代表 IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc 的 mRNA 相对水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,计数资料进行卡方检验,计量资料数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,单因素方差分析采用 One Way ANOVA 检验。同时进行数据相关性分析,正态分布数据运用 Pearson 相关,非正态分布数据运用 Spearman 相关。

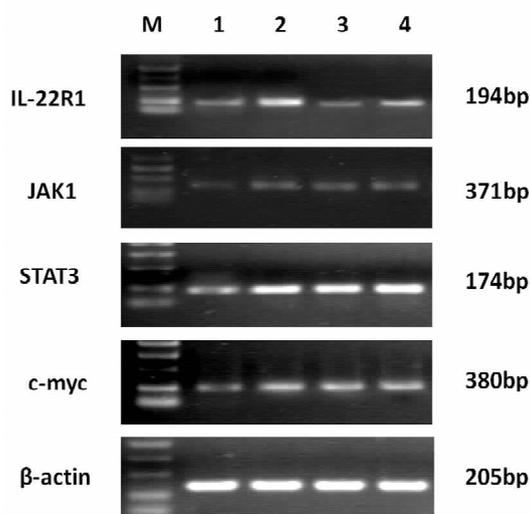


图1 各组指标 RT-PCR 结果

注: M. DNA 分子量标准;1. 正常人组;2. 血热证组;3. 血瘀证组;4. 血燥证组。

## 2 结果

2.1 受试者一般情况 入组银屑病患者中男 13 例(占 72.2%),女 5 例(占 27.8%),正常人组男 3 例(占 50%),女 3 例(占 50%),性别分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。入组银屑病患者最大年龄 65 岁,最小 30 岁;正常人年龄最大 49 岁,最小 33 岁。其中,血热证组平均年龄( $48.50 \pm 8.55$ )岁,血瘀证组平均年龄( $48.67 \pm 10.73$ )岁,血燥证组平均年龄( $52.00 \pm 12.36$ )岁,正常人组平均年龄( $44.50 \pm 8.87$ )岁,各组年龄分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。入组银屑病患者病程,血热证组平均值为( $12.67 \pm 8.02$ )年,血瘀证组平均值为( $10.67 \pm 7.74$ )年,血燥证组平均值为( $16.33 \pm 11.57$ )年,各组间病程长短差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。入组银屑病患者 PASI 评分,血热证组平均值为( $12.30 \pm 8.96$ ),血瘀证组平均值为( $11.26 \pm 5.09$ ),血燥证组平均值为( $13.23 \pm 9.79$ ),各组间 PASI 评分差异无

统计学意义( $P > 0.05$ )。受试者一般情况均差异无统计学意义,组间存在可比性。

2.2 PCR产物鉴定 对PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,以DNA标记Marker作为参照,IL-22R1的mRNA扩增片段大小为194bp,JAK1为371bp,STAT3为174bp,C-myc为380bp, $\beta$ -actin为205bp,与设计相符。见图1。

2.3 IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc的mRNA表达相关性分析 全体受试者IL-22R1与通路因子JAK1( $r = 0.42, P < 0.05$ )、STAT3( $r = 0.59, P < 0.01$ )呈正相关,与通路下游因子C-myc( $r = 0.60, P < 0.01$ )呈正相关。JAK1与通路因子STAT3( $r = 0.48, P < 0.05$ )呈正相关。STAT3与通路下游因子C-myc( $r = 0.56, P < 0.01$ )呈正相关。

2.4 RT-PCR检测结果 通路特异性受体IL-22R1的mRNA表达,血热证、血燥证均明显高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );血瘀证与正常人差异无统计学意义( $P > 0.05$ );3证型之间比较,血热证明显高于血瘀证,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );血燥证高于血瘀证,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );通路因子JAK1的mRNA表达,血热证明显高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );血燥证高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );血瘀证与正常人,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );3证型之间,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。通路因子STAT3的mRNA表达,血热证、血燥证均明显高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );血瘀证高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );3证型之间比较,血热证高于血瘀证,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。通路下游因子C-myc的mRNA表达,血热证明显高于正常人,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );血瘀证、血燥证与正常人差异无统计学意义( $P > 0.05$ );3证型之间比较,血热证明显高于血瘀证,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表1。

### 3 讨论

JAK/STAT是由膜至核的信号通路,激活本通路关键因子STAT3影响细胞的生长增殖<sup>[5]</sup>。STAT3

的活化是通过SATA3分子酪氨酸残基的磷酸化而实现的,磷酸化的STAT3形成二聚体进入细胞核内,通过信号识别与下游靶基因启动子的特异性位点结合,调节相应基因的表达<sup>[6]</sup>。IL-22R1是IL-22特异性结合位点,在皮肤中主要表达于KC<sup>[7-8]</sup>。IL-22能通过活化银屑病患者KC中的STAT3信号传导通路,诱导其下游的细胞周期调控因子C-myc表达。C-myc是非常重要的细胞生长周期调控因子,能参与细胞的生长、分化过程,其表达高低对于细胞从分裂前(G1)期进入分裂(S)期极为重要。高水平的C-myc表达使细胞大量增殖,而分化受到抑制<sup>[9]</sup>。在银屑病患者体内,C-myc表达明显增多<sup>[4]</sup>,使KC大量增殖、分化抑制,进而出现表皮角化过度伴角化不全的病理改变。在本研究中,我们通过检测银屑病患者皮肤组织中IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc的mRNA表达水平的相关性发现,各因子之间均呈正先关,证明随着配体与通路特异性受体IL-22R1结合,JAK1/STAT3通路活化开放,下游因子C-myc的mRNA表达水平也同时上调。而C-myc表达增加主要改变KC增殖、凋于周期,使表皮增殖凋亡异常,出现表皮角化不全的表现。

“辨血为主,从血论治”是银屑病的基本辨证思路<sup>[10]</sup>,历代医家通过大量临床实践,总结出血热证、血燥证、血瘀证3大银屑病基本证型<sup>[11]</sup>。其中,血热证可以说是银屑病发生的核心环节,也是向血瘀、血燥证转变的枢机<sup>[12]</sup>。银屑病初起或复发加重时皮疹特点为皮疹鲜红、新疹出现或原疹扩大,这些都属于血热证的典型表现。血热证的形成是由于外感淫邪或内伤情志或饮食不节导致的血热毒盛,热毒壅于皮肤而发红斑、鳞屑;然热毒内盛,煎灼阴液,血行失畅,瘀阻脉络,肌肤失养,皮损肥厚、顽固难消,而成血瘀证;热毒蕴结日久,耗伤阴血,生风化燥,肌肤失养,皮损干燥皲裂、反复不愈,而呈血燥证<sup>[13]</sup>。本研究中,我们比较了血热证、血瘀证、血燥证银屑病患者皮损中IL-22R1、JAK1、STAT3、C-myc的mRNA表达,结果显示JAK1/STAT3信号通路相关因子的表达呈现血热证 > 血燥证 > 血瘀证的特点,血瘀

表1 银屑病3大基本证型与正常人通路相关因子的mRNA表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

	血热证	血瘀证	血燥证	正常人	$F(\chi^2)$	$P$
IL-22R1	0.38 ± 0.06**▲▲	0.23 ± 0.05	0.31 ± 0.09**▲	0.17 ± 0.06	11.83	0.00
JAK1	0.30 ± 0.06**	0.24 ± 0.04	0.27 ± 0.07*	0.19 ± 0.05	4.80	0.01
STAT3	0.35 ± 0.08**▲	0.26 ± 0.06*	0.30 ± 0.05**	0.18 ± 0.08	6.89	0.00
C-myc	0.34 ± 0.11**	0.20 ± 0.06△△	0.25 ± 0.07	0.16 ± 0.09	5.00	0.01

注:与正常人比较,\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ ;与血热证比较,△△表示 $P < 0.01$ ;与血瘀证比较,▲表示 $P < 0.05$ ,▲▲表示 $P < 0.01$ 。

证表达与正常人差异无统计学意义。而我们前期研究<sup>[14]</sup>发现 JAK1/STAT3 通路的启动因子 IL-22 在银屑病患者外周血中的水平也呈现血热证 > 血燥证 > 血瘀证的趋势,这与我们皮损中通路相关因子的表达趋势一致。由此可见,在 KC 异常增殖的病理过程中,血热证银屑病患者的 JAK1/STAT3 信号通路异常活跃。而正是这种活跃的表达促使 C-myc 表达增加,使 KC 增殖凋亡异常,形成了血热证银屑病大量脱屑的临床表现。同时,JAK1/STAT3 通路活化程度的差异,也可能与血热证向血瘀、血燥证转变的过程相关。

#### 参考文献

- [1] Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis [J]. Lancet, 386 (9997): 983-994.
- [2] Liu H, Moroi Y, Yasumoto S, et al. Immunohistochemical localization of activated Stat3 and hTERT protein in psoriasis vulgaris [J]. Eur J Dermatol, 2006, 16 (2): 205-207.
- [3] Juncheng W, Yanzhi Y, Chaozhi J. The Ubiquitin Ligase TRAF6 Negatively Regulates the JAK-STAT Signaling Pathway by Binding to STAT3 and Mediating Its Ubiquitination [J]. PLOS ONE, 2012, 7 (11): 1-7.
- [4] 倪晓, 孙建方, 曾学思, 等. C-myc, p53 和 bcl-2 与银屑病角质形成细胞凋亡异常关系的研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33 (4): 240-242.
- [5] Frank DA. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation [J]. Cancer Lett, 2007, 251 (2): 199-210.
- [6] Ma XT, Wang S, Ye YJ, et al. [Relationship of Stat3 and its target gene products with malignancy in human colorectal carcinoma] [J]. Ai Zheng, 2003, 22 (11): 1135-1139.
- [7] Wolk K, Sabat R. Interleukin-22; a novel T-and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17 (5): 367-380.
- [8] Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues [J]. Immunity, 2004, 21 (2): 241-254.
- [9] 张虹, 王敏, 刘伟, 等. 肝癌细胞中 STAT3 及 C-myc 的表达及其意义 [J]. 肿瘤, 2008, 28 (5): 394-397.
- [10] 北京中医医院. 赵炳南临床经验集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 211-229.
- [11] 中华中医药学会皮肤科分会, 北京中医药学会皮肤病专业委员会, 北京中西医结合学会皮肤病专业委员会. 寻常型银屑病 (白疕) 中医药循证临床实践指南 (2013 版) [J]. 中医杂志, 2014, 55 (1): 76-82.
- [12] 陈曦. JAK/STAT 信号通路与银屑病辨证分型的关联机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [13] 瞿幸, 屈双擎. 寻常型银屑病的中医辨证治疗 [J]. 中国临床医生, 2009, 37 (8): 10-12.
- [14] 李玲玲. 从 T 辅助细胞的分化探讨银屑病辨证分型的关联机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

(2016-12-08 收稿 责任编辑: 张文婷)

#### (上接第 1701 页)

- [25] 潘爱美, 杨瑞东. 针刺治疗慢性鼻窦炎 42 例体会 [J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10 (19): 1884.
- [26] 邱有法. 针刺治疗慢性鼻窦炎 50 例 [J]. 实用中医药杂志, 2014, 30 (9): 865.
- [27] 黄琼. 针刺治疗慢性鼻窦炎 50 例疗效观察 [J]. 针灸临床杂志, 2006, 22 (11): 8-9.
- [28] 尚军. 针刺治疗慢性鼻窦炎 60 例 [J]. 世界中医药, 2011, 6 (1): 55.
- [29] 潘瑞芳, 刘明有. 针刺治疗慢性鼻窦炎 308 例疗效观察 [J]. 大同医学院报, 2004, 24 (3): 20.
- [30] 潘但铨. 针刺治疗慢性鼻炎、副鼻窦炎 50 例 [J]. 贵州医药, 1987, 11 (3): 20.
- [31] 别红宝, 宫国俊. 针灸结合药物治疗慢性鼻窦炎 79 例 [J]. 吉林中医药, 2005, 25 (6): 44.
- [32] 黄建辉. 针灸推拿加 TDP 治疗慢性鼻窦炎 22 例 [J]. 海军医学杂志, 2005, 26 (2): 137.
- [33] 郭荫楠. 针灸治疗 61 例慢性鼻炎及慢性副鼻窦炎的初步介绍 [J]. 中医杂志, 1959, 8 (12): 51-53.
- [34] 姜媛媛. 针灸治疗鼻渊 30 例 [J]. 针灸临床杂志, 2008, 24 (10): 21.
- [35] 刘广霞, 邢春光. 针灸治疗鼻渊临床研究 [J]. 针刺研究, 2000, 25 (2): 141-143.
- [36] 张宏图. 针灸治疗慢性鼻窦炎 80 例 [J]. 中国民间疗法, 2000, 8 (4): 20.
- [37] 成春桂. 针灸治疗慢性鼻炎及慢性鼻窦炎 43 例疗效观察 [J]. 湘潭师范学院学报, 1993, 14 (3): 97-100.
- [38] 蔡露凤, 刘文彦, 黄亚雄. 针灸治疗慢性化脓性鼻窦炎 6 例 [J]. 实用中医药杂志, 2004, 20 (5): 257.
- [39] 王英, 郭喜军. 针药并用治疗急性鼻窦炎 48 例 [J]. 陕西中医, 2002, 23 (6): 539.
- [40] 王静之. 中药针刺并用治疗慢性副鼻窦炎 120 例 [J]. 安徽中医临床杂志, 1995, 8 (4): 191.
- [41] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会发布. 腧穴名称与定位 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [42] 卢朋, 李健, 唐仕欢, 等. 中医传承辅助系统软件开发与应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (9): 1-4.

(2015-09-18 收稿 责任编辑: 杨觉雄)