

复方龙胆合剂对小鼠激光损伤后皮肤屏障功能修复的研究

罗光云¹, 赵丽娟², 秦雪琴¹, 王丽芬^{2*} (1. 云南中医药大学, 昆明 650500; 2. 云南省中医医院, 昆明 650021)

摘要: 目的 研究复方龙胆合剂对于小鼠皮肤激光损伤后屏障修复的作用。方法 选择 40 只 BALB/c 小鼠, 将小鼠背部脱毛后随机选取 10 只为正常组, 其他 30 只使用 Q 开关 1064 激光机, 以 5 Hz 频率、3 mm 光斑、6 J 能量照射脱毛区, 构建激光损伤皮肤模型。将激光损伤模型小鼠随机分为模型组、对照组、实验组。模型组小鼠不做处理, 对照组小鼠单一使用基质涂抹, 实验组小鼠在基质涂抹的基础上每日灌胃给药复方龙胆合剂。分别在干预后 6, 24, 48 h, 7, 14 d 测试小鼠皮肤含水量、经皮失水量、小鼠皮肤中增殖细胞核抗原染色, ELISA 法检测皮肤组织中髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)的蛋白表达, RT-QPCR 检测皮肤中表皮抗菌肽 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 水平。结果 模型组和对照组在皮肤含水量和经皮失水量的比较中无显著统计学意义, 而实验组皮肤含水量显著高于模型组、经皮失水量显著低于模型组($P < 0.05$)。实验组增殖细胞核抗原表达较强。模型组和对照组皮肤中 MyD88、IL-6 的蛋白水平以及 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 水平无统计学意义, 但是显著高于正常组($P < 0.05$), 而实验组皮肤中 MyD88、IL-6 的蛋白水平, S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 水平显著低于模型组($P < 0.05$)。结论 复方龙胆合剂可以促进小鼠皮肤激光损伤后屏障功能的恢复, 其作用和炎症抑制相关。**关键词:** 复方龙胆合剂; 皮肤损伤; 屏障; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)21-2652-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.21.006

引用本文: 罗光云, 赵丽娟, 秦雪琴, 等. 复方龙胆合剂对小鼠激光损伤后皮肤屏障功能修复的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2652-2656.

Effect of Fufang Longdan Compound Preparation on Skin Barrier Function After Laser Injury in Mice

LUO Guangyun¹, ZHAO Lijuan², QIN Xueqin¹, WANG Lifan^{2*} (1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Fufang Longdan compound preparation on barrier repair of mice after laser injury. **METHODS** Forty BALB/c mice were selected, ten mice were set as normal group and the other 30 mice's back was depilated by Q switch 1064 laser. The laser damaged skin model was constructed with 5 Hz frequency, 3 mm spot and 6 J energy. Laser damaged spin model were randomly divided into model group, control group and experimental group. Mice in the model group were not treated. The control group was coated with a single substrate. The mice in the experimental group were given Fufang Longdan compound preparation daily on the basis of matrix smear. The skin moisture, percutaneous fluid loss and proliferating cell nuclear antigen staining in mice skin were tested at 6, 24, 48 h, 7, 14 d after intervention. ELISA was used to detect the protein expression of myeloid differentiation factor 88(MyD88) and interleukin 6(IL-6) in skin tissue. RT-QPCR was used to detect the mRNA levels of epidermal antibacterial peptide S100a8, S100a9, MyD88 and IL-6 in skin. **RESULTS** There was no significant statistical significance between the model group and the control group in the comparison of skin water content and water loss in the skin, but the skin moisture in the experimental group was significantly higher than that in the model group and the water loss in the skin was significantly lower than that in the model group($P < 0.05$). The expression of proliferating cell nuclear antigen was stronger in the experimental group. The levels of MyD88 and IL-6 and mRNA level of S100a8, S100a9 in the skin of the model group and control group were not statistically significant, but were significantly higher than those of the normal group($P < 0.05$). The protein level of MyD88 and IL-6 in the skin of the experimental group, the mRNA level of S100a8, S100a9, MyD88 and IL-6 in the skin of the experimental group was significantly lower than that in the model group($P < 0.05$). **CONCLUSION** Fufang Longdan compound preparation can promote barrier function recovery after skin laser injury in mice, and its effect is related to inflammation inhibition.

KEYWORDS: Fufang Longdan compound preparation; skin injury; barrier; inflammation.

基金项目: 云南省卫生科技计划项目(2017NS139)

作者简介: 罗光云, 女, 硕士, 讲师 Tel: 13577155258 E-mail: 543400650@qq.com *通信作者: 王丽芬, 女, 硕士, 副主任医师 Tel: 15809711551 E-mail: wlf15808711551@163.com

光损伤性皮肤病是一种由日光,特别是紫外线直接或间接照射皮肤引起的皮肤病,该类疾病常发生于曝光部位,易反复,难治愈,甚至容易引起癌变,严重危害身心健康^[1-2],在光损伤性皮肤病中就证型分类来看,湿热证型较多^[3]。临床中用于光损伤的皮肤病治疗常用透明质酸、胶原蛋白等外敷或莫匹罗星软膏涂抹,但是效果有限^[4]。云南省中医医院的复方龙胆合剂是由已故国家级名中医刘复兴主任经验药物组成,主要作用为清热利湿、泻火解毒,为治疗光损伤湿热证之药方^[5],本研究主要报道复方龙胆合剂对于皮肤激光损伤小鼠皮肤屏障的修复作用,为复方龙胆合剂的使用和推广提供支持。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级 BALB/c 小鼠 40 只,♀♂各半,5~6 周龄,体质量(22±5)g,购于云南中医药大学动物实验中心,许可证号:SYXK(滇)2012-0045;动物合格证号:201200165。动物实验室温度为 20~25 °C,湿度为(70±5)%,依据国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养,大鼠活动自由、摄食自由。

1.2 复方龙胆合剂制备

由云南省中医医院配制,配方为龙胆草 10 g、车前子 30 g、通草 6 g、炒黄芩 15 g、苦参 15 g、土茯苓 30 g;髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号:17856544,18023541);cDNA 试剂盒(凯基生物技术有限公司,批号:KGA1311);NP-40 裂解液、BCA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:C1052,C18544);实时定量 PCR 试剂盒 /SYBR Green Realtime PCR Master Mix(Sinobio 公司,批号:182135);总 RNA 提取试剂盒(TRIZOL 法)(BioTeKe 公司,批号:170542a),增殖细胞核抗原抗体(Abcam 公司,批号:a18547),偶联辣根过氧化物酶二抗、DAB 显色剂(丹麦 Dako 公司,批号:174741c,1824547)。

1.3 仪器

Medilte C6 型激光仪(美国 HoYa-ConBio 公司);Q 开关 1064 型激光机;Tewameter 仪(用于测定表皮 TEWL 值,Couraga Khazaka 公司);MY808S 型 Moisture checker 仪(用于测定表皮含水量,日本 Scalar)。

1.4 动物建模和分组

将 40 只小鼠随机分为正常组、模型组、对照组、实验组,每组 10 只,每只小鼠使用脱毛膏除去两侧背部毛发,面积约为 2 cm×2 cm。除正常组外,其余 3 组小鼠 48 h 后使用激光仪以 5 Hz 频率、3 mm 光斑、6 J 能量照射脱毛区。6 h 后观察小鼠皮肤发红水肿情况。选择皮肤外观发红、水肿、较多炎症细胞浸润的小鼠。正常组小鼠为健康小鼠,模型组、对照组以及实验组进行激光造模,对照组和实验组使用基质涂抹,1 日 3 次,实验组在基质涂抹的基础上每日灌胃给药复方龙胆合剂,10 g·kg⁻¹,1 日 3 次。而正常组和模型组小鼠每日灌胃给予等剂量的生理盐水。造模后,模型组、对照组和实验组小鼠造模成功分别为 8 只、9 只、8 只。

1.5 检测指标

①无创性皮肤测试:使用 Tewam eter 仪和 Moisture checker 仪在药物干预 6, 24, 48 h, 7, 14 d 检测小鼠背部皮肤经皮失水量和表皮含水量。测试期间在室温 25~27 °C,湿度 50%~60%,并平行进行 3 次检测,取平均值。②增殖细胞核抗原表达检测:将小鼠处死后取损伤皮肤组织,用 4% 甲醛固定后,石蜡包埋,脱蜡后用 3%过氧化氢孵育后 0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸钠抗原修复,高压法抗原修复 5 min 后,使用 5%的血清封闭 30 min,加入一抗过夜孵育,加入二抗后孵育 30 min。DAB 显色后经过脱水、透明、封片,镜下观察。③ELISA 法检测皮肤组织中 MyD88 以及 IL-6 的表达水平:取皮肤组织,在液氮下研磨后加入 NP-40 裂解液冰上裂解 0.5 min,待无颗粒状后 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清液后采用 BCA 试剂盒进行蛋白量测定,调整蛋白浓度后,按照 ELISA 试剂盒说明操作。④RT-QPCR 检测 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 表达:取皮肤组织,PBS 洗 2 次后采用 Trizol 法提取总 RNA 后采用 cDNA 试剂盒逆转录,采用实时定量 PCR 试剂盒检测目标 mRNA 的表达量。其中引物设计见表 1。

1.6 统计学处理

无创型皮肤测试采用 ANOVA 单因素分析,增殖细胞核抗原表达用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等相关性分析, $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因名称	引物名称	序列(5'-3')	bp 值
GAPDH	F primer	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	216
	R primer	TGGTCCAGGTTTCTTACTCC	
MyD88	F primer	TGGAGCTTTTGAGACTCAGGA	159
	R primer	TCGATTAAGCAGGTGAGGTTCG	
S100a8	F primer	TGAAGGACTTAGTCATGGGGAC	106
	R primer	CGCAGCTTGTGATTGACCTAGC	
S100a9	F primer	GTTACGCTCGCGCGATCGGG	213
	R primer	CGGGCCTTACATCGTGCCATG	
IL-6	F primer	CTGCCCTTATGCTGGTAG	121
	R primer	GTCCTATGCACCCGTCGGC	

2 结果

2.1 无创性皮肤测试

皮肤含水量的实验结果显示, 模型组和对照组小鼠含水量无统计学意义, 而 24 h 后, 实验组小鼠皮肤含水量显著高于模型组($P<0.05$), 结果见表 2。经皮失水量实验结果显示, 模型组和对照组小鼠皮肤失水量无统计学意义, 24 h 后, 实验组小鼠皮肤失水量显著低于模型组($P<0.05$), 结果见表 3。

2.2 小鼠皮肤增殖细胞核抗原表达检测

抗原染色后, 阳性物质呈有色颗粒, 位于细胞核, 阳性程度越高证明小鼠皮肤细胞增殖程度越高, 说明小鼠皮肤再生能力较强。从结果来看, 阳性物质在正常组小鼠细胞中为阴性, 而模型组和对照组中呈现弱阳性, 实验组呈阳性。从结果

表 2 小鼠皮肤含水量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Skin water content of mice($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	6 h	24 h	48 h	7 d	14 d	%
正常组	29.31±0.92	30.10±1.12	28.60±1.25	31.32±1.52	30.67±1.51	
模型组	20.31±1.21 ¹⁾	18.32±2.10 ¹⁾	19.33±1.21 ¹⁾	20.31±1.13 ¹⁾	22.31±1.21 ¹⁾	
对照组	19.89±1.10 ¹⁾	19.64±1.82 ¹⁾	20.33±2.15 ¹⁾	19.34±1.34 ¹⁾	21.33±1.31 ¹⁾	
实验组	20.31±2.15 ¹⁾	23.22±1.63 ¹⁾²⁾	26.32±1.24 ¹⁾²⁾	26.10±1.22 ¹⁾²⁾	28.31±2.10 ¹⁾²⁾	

注: 同一时间点, 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: At the same time point, compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

表 3 小鼠经皮失水量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 3 Percutaneous water loss in mice($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	6 h	24 h	48 h	7 d	14 d	$\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$
正常组	12.35±1.32	13.22±2.13	12.98±0.98	11.96±0.52	12.65±0.67	
模型组	32.32±2.31 ¹⁾	35.33±1.93 ¹⁾	36.32±1.34 ¹⁾	38.35±2.12 ¹⁾	36.65±1.65 ¹⁾	
对照组	31.65±1.82 ¹⁾	34.33±2.15 ¹⁾	34.97±1.64 ¹⁾	37.31±2.34 ¹⁾	35.34±2.13 ¹⁾	
实验组	33.35±2.34 ¹⁾	28.33±1.34 ¹⁾²⁾	25.31±1.64 ¹⁾²⁾	20.31±2.10 ¹⁾²⁾	19.64±1.37 ¹⁾²⁾	

注: 同一时间点, 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: At the same time point, compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

来看, 实验组细胞皮肤细胞新生能力较强。结果见图 1。

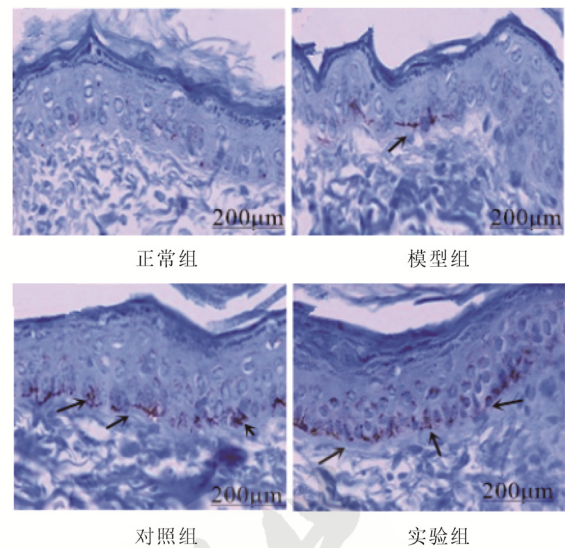


图 1 增殖细胞核抗原表达检测结果(抗原染色, 400×)

Fig. 1 Detection results of proliferating cell nuclear antigen expression(antigen staining, 400×)

2.3 皮肤中 MyD88 和 IL-6 的水平

经过 ELISA 试剂盒检测后, 结果显示, 正常组小鼠皮肤中 MyD88 和 IL-6 的水平相比模型组和对照组显著较低($P<0.05$)。而模型组和对照组比较无显著性差异。实验组中 MyD88 和 IL-6 的水平相比模型组显著降低($P<0.05$), 结果见图 2。

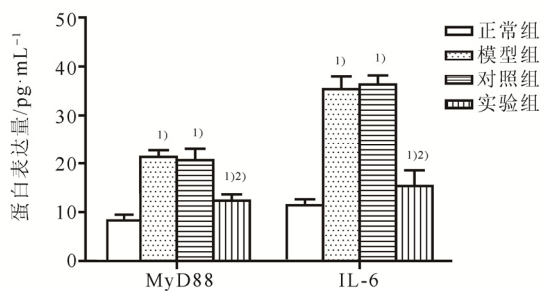


图2 皮肤中 MyD88 和 IL-6 的水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 MyD88 and IL-6 levels in skin ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

2.4 皮肤中 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 表达水平

模型组和对照组中 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 水平比较无显著性差异, 而显著高于正常组 ($P<0.05$)。实验组中 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 水平相比模型组显著下调, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见图 3。

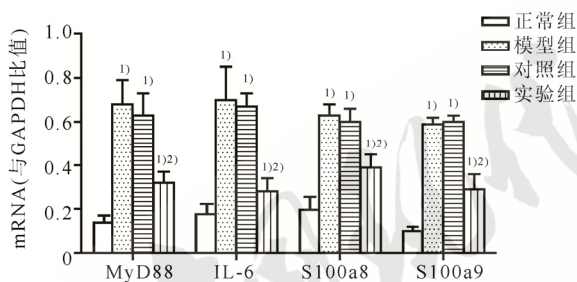


图3 皮肤中 S100a8、S100a9、MyD88 以及 IL-6 的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 mRNA expression levels of S100a8, S100a9, MyD88 and IL-6 in skin ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

光损伤性皮肤病的治疗中, 西医治疗主要以糖皮质激素、免疫抑制剂抗疟疾药物治疗为主, 但是不良反应较高, 限制了临床的使用^[6-7]。而中医药可以针对患者个体辨证治疗, 缓解患者的临床症状, 提高患者的生活质量。在明朝就有针对光损伤性皮肤病的治疗, 光损伤性皮肤病属于中医“日晒疮”的范畴, 申斗恒在《外科启玄》中提出, 日晒疮只需消暑热之药, 如青蒿一味饮之, 外用末药敷之即安^[8]。清代陈士铎等^[9]以清热法为主应用清热药物治疗光敏性皮肤病, 而在现代中医的

研究中, 有学者应用龙胆泻肝汤加减治疗日光性皮炎, 效果显著^[10], 也有文献报道称急性期皮肤病多由湿热之毒引起, 所以在临床中可以用清热除湿汤治疗。本研究所用复方龙胆合剂中龙胆草清热燥湿、泻肝定惊, 为君药, 车前子利水、清热、明目、祛痰, 为臣药, 通草清湿利水, 与车前子共为臣药, 炒黄芩泻实火、除湿热、止血, 苦参清热燥湿、杀虫、利尿, 与炒黄芩共为佐药, 土茯苓除湿解毒、通利关节, 为使药。方剂清热利湿, 泻火解毒, 为治疗光损伤之要方。

本研究采用激光构建真皮层损伤、皮肤屏障破坏的小鼠动物模型。观察复方龙胆合剂对小鼠皮肤屏障功能的修复。皮肤屏障的主要作用是保持皮肤水平, 维持正常的生理功能, 经皮失水量是反映皮肤扩散入外界水分的指数, 是反映皮肤屏障功能的重要参数之一, 其数值越高说明皮肤损伤越严重, 从本研究结果看, 激光后皮肤水分散失严重, 而复方龙胆合剂可以显著减少经皮失水量。同样的皮肤水分检测时测定皮肤中水含量, 间接反映出皮肤屏障的保湿功能^[11-12], 从本研究的结果来看, 复方龙胆合剂可以很好地提高屏障锁水能力。增殖细胞核抗原是一种细胞核多肽, 其表达和细胞增殖以及周期调整有关, 是 DNA 聚合酶辅助蛋白, 参与调解 DNA 合成, 其阳性率越高说明细胞增殖能力越强, 从本研究结果看, 皮肤激光损伤后, 细胞增殖活力较弱, 而复方龙胆合剂可以显著增强皮肤细胞的增殖能力。

一般皮肤损伤后伴随着细胞和真菌的感染, 所以皮肤组织中炎症因子的表达会进一步促进皮肤屏障的损害^[13], 而本研究发现复方龙胆合剂可以降低皮肤组织中炎症因子的表达, 降低 MyD88、IL-6 的蛋白表达以及相关 mRNA 的表达, MyD88 是炎症信号 NF- κ B 重要组成蛋白, 其高表达水平可以反映 NF- κ B 的激活。所以复方龙胆合剂可能通过调控 NF- κ B 信号的表达, 抑制炎症反应。S100A8 和 S100A9 在以往的研究中已经发现在炎症性皮肤病、皮肤癌中表达增高, 其作用和促进炎症因子的表达有关, 而本研究也发现复方龙胆合剂可以降低两者的 mRNA 表达, 这也是调控炎症反应的机制之一。

综上, 复方龙胆合剂可以修复小鼠光损伤后皮肤屏障的损害, 其作用机制和促进皮肤细胞增殖, 抑制皮肤炎症反应有关。

REFERENCES

- [1] LU Y Z, FERNANDO N, NATOLI R, et al. 670nm light treatment following retinal injury modulates Müller cell gliosis: Evidence from *in vivo* and *in vitro* stress models [J]. *Exp Eye Res*, 2018(169): 1-12.
- [2] YAMADA K, MIZUKOSHI E, SEIKE T, et al. Light alcohol consumption has the potential to suppress hepatocellular injury and liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191026. Doi: 10.1371/journal.pone.0191026.
- [3] 徐跃. 以“光毒郁肤”理论探讨急性光损伤小鼠模型建立[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [4] MAALOUF D, BATTISTELLA M, BOUAZIZ J D. Neutrophilic dermatosis: disease mechanism and treatment [J]. *Curr Opin Hematol*, 2015, 22(1): 23-29.
- [5] 黄虹, 欧阳晓勇, 叶建州. 复方龙胆合剂治疗湿热型皮炎湿疹类疾病疗效观察[J]. *皮肤病与性病*, 2010, 32(3): 30-31.
- [6] GUO M H, LIU D, CHEN W, et al. Construction and application of standardized prevention and treatment system of photo-damaged dermatosis [J]. *J Dermatol Venereol(皮肤病与性病)*, 2014, 36(5): 257-258.
- [7] 何黎. 恢复皮肤屏障是防治光损伤性皮肤病的首要措施[J]. *皮肤病与性病*, 2013, 35(2): 78-79.
- [8] SUN L Y, ZHANG G Z, WANG P, et al. Clinical observation of anti-photosensitivity mixture on photosensitive dermatosis [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2013, 28(8): 2483-2485.
- [9] 宋文婷, 赵广. 急性光毒反应性皮肤病的发病机制及中西医结合防治对比[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2011, 10(5): 337-339.
- [10] LI Y, YANG H Y. Clinical experience of “Longdan Xiegan decoction” in treating dermatosis [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志)*, 2008, 42(2): 46-47.
- [11] ZHANG W J, ZHANG X Z. Efficacy of qingpeng ointment for the treatment of chronic eczema and its effect on skin barrier function [J]. *Chin J Dermatovenereol(中国皮肤性病学杂志)*, 2017, 31(1): 115-117.
- [12] 何雪冬. 加味知柏地黄汤联合他克莫司软膏对阴虚内热型糖皮质激素依赖性皮炎患者皮肤屏障功能的影响[J]. *环球中医药*, 2017, 10(1): 100-102.
- [13] 王高峰. 模拟日光照射后皮肤屏障损伤与真菌感染的相关性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

收稿日期: 2018-11-26

(本文责编: 李艳芳)