

# 当归饮子对银屑病模型豚鼠神经酰胺含量、AQP-3 基因及蛋白表达的干预研究

文谦 李芳梅 杨志波

**【摘要】 目的** 探讨当归饮子对寻常型银屑病模型豚鼠皮肤神经酰胺 (ceramide, Cer) 含量、水通道蛋白 3 (aquaporin 3, AQP-3) 基因及蛋白表达的干预影响。**方法** 建立寻常型银屑病动物模型, 分为当归饮子组、甲氨蝶呤组、生理盐水组、模型对照组、空白对照组, 每组 8 只, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法检测造模皮损部位 Cer 含量, 逆转录 PCR (RT-PCR) 和免疫印迹试验 (Western blot) 法检测造模皮损部位 AQP-3 基因及蛋白表达, 分析寻常型银屑病动物模型皮损与皮肤屏障功能密切相关的基因及蛋白表达的变化。**结果** 豚鼠耳部皮肤银屑病模型造模成功。模型对照组皮损中 ELISA 法检测 Cer 含量, 以及 RT-PCR 和 Western blot 法检测 AQP-3 基因的蛋白表达均较低; 当归饮子组与甲氨蝶呤组和空白组中 Cer 含量、AQP-3 基因蛋白表达增强 ( $P < 0.01$ ), 且当归饮子组较甲氨蝶呤组增强明显 ( $P < 0.01$ )。**结论** 当归饮子能增强银屑病模型豚鼠皮肤 Cer 含量及 AQP-3 基因和蛋白表达, 对改善银屑病动物模型的皮肤屏障功能作用确切, 效果优于甲氨蝶呤组。

**【关键词】** 当归饮子; 寻常型银屑病; 动物模型; 皮肤屏障功能

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.08.003

**The intervention study of Danggui Yinzi decoction on the expression of gene and protein of AQP-3 and the content of ceramide in the psoriasis vulgaris model of guinea pig** WEN Qian, LI Fang-mei, YANG Zhi-bo. Department of Dermatological, Affiliated Hospital of Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: YANG Zhi-bo, E-mail: dr.yang888@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of Danggui Yinzi on the expression of AQP-3 gene and Cer protein of psoriasis model. **Methods** To establish an animal model of psoriasis vulgaris. The animals were divided into Danggui Yinzi group, methotrexate group, saline group, model control group and blank control group. Aquaporin 3 (AQP-3) of skin lesions part was detected with RT-PCR and Western blot methods and ELISA methods was used to detect the ceramide content of skin lesions part. Compared the results of the five groups, and the relationship of the expression changes of gene and protein in skin lesions and skin barrier function was analysed. **Results** The animal models of psoriasis vulgaris was successful. In model control group, the content of ceramide and the expression of gene and protein of AQP-3 were all decreased significantly ( $P < 0.01$ ). The expression index was increased in Danggui Yinzi group and methotrexate group and Danggui Yinzi group was increased obviously ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Danggui Yinzi can enhance the expression of gene and protein of AQP-3 and the protein content of ceramide in skin lesions of psoriasis vulgaris model. It has a definite effect for skin barrier function of psoriasis vulgaris in animal model. The results indicate that the therapeutic effect is more effective than methotrexate

基金项目: 湖南省科技计划 (2011FJ3026)

作者单位: 830000 乌鲁木齐, 新疆医科大学附属中医医院皮肤科 (文谦); 湖南中医药大学研究生院 (李芳梅); 湖南中医药大学第二附属医院中医外科皮肤科 (杨志波)

作者简介: 文谦 (1968-), 硕士, 主治医师。研究方向: 中医药防治皮肤病和性病的理论与临床研究。E-mail: wenq828@163.com

通讯作者: 杨志波 (1956-), 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师。研究方向: 中西医结合防治皮肤病研究。E-mail: dr.yang888@126.com

medicine.

【Key words】 *Danggui Yinzi*; *Posriasis vulgaris*; Animal model; Skin barrier function

水通道蛋白 3 (aquaporin 3, AQP-3) 是一种细胞膜上跨膜运输水、甘油和尿素等小分子物质的转运蛋白,是人类皮肤中表达最多的一种水通道蛋白亚型。AQP-3 不仅参与皮肤水合、皮肤屏障功能以及创伤愈合,维持皮肤的正常形态和功能,还与角质形成细胞的增殖和迁移甚至早期分化有关。AQP-3 与特应性皮炎、白癜风、皮肤肿瘤、银屑病等多种皮肤病的发病机制相关。神经酰胺 (ceramide, Cer) 是人体皮肤角质层细胞间混合脂类物质的主要成分,有防止水分散发和防护外界刺激的作用,具有保湿、滋润皮肤、抗衰老、抗过敏的功能。银屑病皮损中神经酰胺组成的改变可能与其表皮水分丢失增加有关,特别是 Cer1 的减少<sup>[1]</sup>。皮肤角质层神经酰胺分类较多,细胞内不同类型的神经酰胺可发挥不同甚至相反的作用<sup>[2-3]</sup>,同时测定生物样品中各种神经酰胺的含量对研究神经酰胺的生物学效应机制具有重要意义。文献报道中,基本分析神经酰胺的总体水平或某一种神经酰胺,很少涉及同时分类检测组织或细胞内几种神经酰胺的含量<sup>[4-5]</sup>。本研究仅测 Cer 总体水平。

研究通过观察当归饮子 (选自《重订严氏济生方》) 对寻常型银屑病动物模型的干预,用逆转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 和免疫印迹试验 (Western Blot) 法检测造模皮损部位 AQP-3 基因及蛋白表达,用酶联免疫吸附实验法 (ELISA) 检测造模皮损部位神经酰胺含量,分析寻常型银屑病动物模型皮损处与皮肤屏障功能密切相关的蛋白含量及其基因表达的变化,阐述当归饮子对银屑病模型豚鼠皮肤 AQP-3 和 Cer 基因及蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

中药制剂:当归 20 g、白芍 20 g、生地黄 20 g、川芎 15 g、防风 20 g、荆芥 20 g、何首乌 20 g、白蒺藜 20 g、黄芪 25 g、甘草 10 g,每剂药煎 3 次,混合 3 次药液浓缩至 300 mL。

豚鼠,雄性 20 只、雌性 20 只,共 40 只,体质量 210 ~ 250 g,由中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供。实验动物质量合格证:SCXK (军) 2012-0006,合格证编号:0022614,实验动物使用许可证:SYXK (苏) 2012-0047。

### 1.2 建模与药物处理

新鲜配制的 10% Na<sub>2</sub>S 溶液脱去豚鼠耳背毛发,次日开始实验。5% 心得安乳剂均匀涂于豚鼠耳背皮肤,厚度 1.0 mm,每天 3 次,连续 2 周,使其符合银屑病样病理改变<sup>[6]</sup>。40 只豚鼠,空白对照组 8 只,余下 32 只造模后随机分为模型对照组、生理盐水组、当归饮子组和甲氨蝶呤组 4 组,每组 8 只。空白对照组实验期间正常饲养。生理盐水组用生理盐水灌胃,3 次/d,每次每只按体重 0.01 mL/g,连续 2 周。当归饮子组用稀释的中药灌胃,每次每只 0.01 mL/g,3 次/d,连续 2 周。甲氨蝶呤组:按成人常规用量的 5 倍口服给药,给药剂量为 0.5 mg/kg,每天 1 次,连续 2 周。

### 1.3 标本取材及病理切片

2 周后,模型对照组 4 只豚鼠处理耳部皮肤用 10% 福尔马林固定,常规标本脱水,透明,石蜡包埋,连续性切片,厚约 4 μm,行 HE 染色。光学显微镜下观察皮肤有无变性坏死、溃疡、痂皮形成,上皮层次有无增厚,表面角化不全,真皮或皮下组织内有无充血、水肿、炎细胞浸润等病变。处死模型对照组另外 4 只与其余组豚鼠,分离耳部皮肤,绞碎组织, -80℃ 液氮冻存。

### 1.4 Western Blot 法检测 AQP-3 蛋白的含量

手动匀浆组织,加入蛋白裂解液,离心,获得全蛋白提取物,进行蛋白定量测定,取适量 (50 μg) 蛋白上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,半干转至硝酸纤维素膜上,加入一抗 (用一抗稀释液稀释),4℃ 冰箱过夜孵育后洗涤加入二抗,室温孵育 2 小时, TBST 洗涤缓冲液洗涤后,增强化学发光法 (electrochemiluminescence, ECL) 显色,使用 G: BOX chemiXR5 成像。

### 1.5 RT-PCR 法检测 AQP-3 基因表达

按 RT-PCR 反转录试剂盒说明书操作。采用软件 Primer 5 设计引物,由南京金斯瑞科技有限公司合成。

GAPDH 内参上游引物:5'-AAGGTCGGAGT-GAACGGATTT-3';下游引物:5'-AGATGATGAC-CCTTTTGGCAC-3',产物大小 352 bp。

AQP-3 上游引物:5'-CCCTCAGGACACTTGGACAT-3';下游引物:5'-CGTTCTCCTGCTCGGTAGAG-3',产物大小 391 bp。

所有基因 PCR 反应条件为:95℃5 分钟,95℃变性 30 秒,57℃退火 30 秒,72℃延伸 45 秒,32 个循环,72℃终末延伸 10 分钟。

### 1.6 PCR 产物鉴定

PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上成电泳、免疫印迹,ECL 显色,并使用 G:BOX chemiXR5 成像,所有扩增产物的光密度峰值均以 GAPDH 为基准校正。使用 Gel-Pro 32 软件对结果进行灰度分析。

### 1.7 ELISA 法检测 Cer 含量

在酶标包被板上空白孔、标准品及待测样品孔中准确加入标准品原液、标准品稀释液,后加入被稀释到 200 倍的样品,37℃温育 90 分钟,洗涤,加生物素化抗体按 1:30 用抗体稀释液稀释,置 37℃温育 60 分钟。再洗涤,标准品及待测样品孔中加入酶标试剂,37℃温育 30 分钟。再洗涤,加入显色液,37℃避光显色 15 分钟,终止反应。以空白孔调零,450 nm 波长按顺序测量每个孔的吸光度(OD)值。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 系统软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

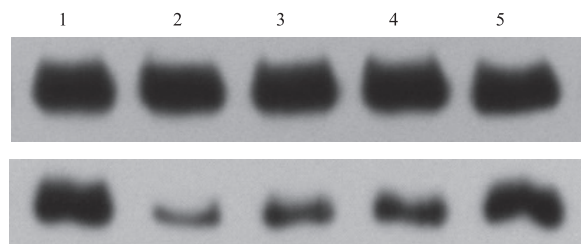
## 2 结果

### 2.1 造模结果

豚鼠一般情况良好,没有死亡。4 块豚鼠耳皮肤组织双面被覆复层鳞状上皮,上皮可见真皮和皮肤附件,中间为软骨,4 块组织病变相似,光学显微镜下示豚鼠耳部皮肤银屑病模型造模成功。

### 2.2 Western blot 检测 AQP-3 蛋白电泳结果

模型对照组和生理盐水组 AQP-3 蛋白少量表达,当归饮子组和甲氨蝶呤组表达明显增加,见图 1。

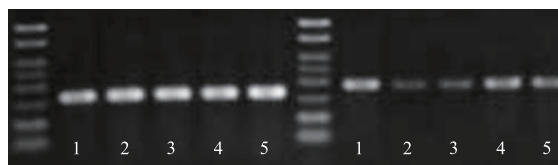


注:1 为空白对照组;2 为模型对照组;3 为生理盐水组;  
4 为当归饮子组;5 为甲氨蝶呤组

图 1 AQP-3 蛋白电泳图

### 2.3 RT-PCR 检测 AQP-3 电泳结果

PCR 产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳后,在 352、391 bp 处分别见 GAPDH 内参、AQP-3 mRNA 的表达,见图 2。AQP-3 mRNA 在不同模型组表达不一,模型对照组和生理盐水组表达最弱,而药物(当归饮子、甲氨蝶呤)组较前者表达明显增加,空白对照组表达最强。



注:1 为空白对照组;2 为模型对照组;3 为生理盐水组;  
4 为当归饮子组;5 为甲氨蝶呤组

图 2 各组 AQP-3 mRNA 的 PCR 电泳图

### 2.4 各组豚鼠皮肤组织细胞中 AQP-3 基因蛋白表达及 Cer 含量检测

模型对照组与生理盐水组 AQP-3 表达较空白对照组明显下降( $P < 0.01$ ),当归饮子组和甲氨蝶呤组 AQP-3 表达较模型对照组明显上升( $P < 0.01$ ),且当归饮子组较甲氨蝶呤组上升明显( $P < 0.01$ ),与空白对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。生理盐水组与模型对照组造模组 AQP-3 蛋白基因表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

空白孔调零,450 nm 波长按顺序测量每个孔的吸光度(OD)值。造模组药物干预前后 Cer 含量比正常组明显下降( $P < 0.01$ );造模组药物(甲氨蝶呤、当归饮子)干预后 Cer 蛋白含量比干预前上升( $P < 0.01$ ),当归饮子组比甲氨蝶呤组上升明显( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 AQP-3 基因蛋白表达及与 Cer 含量检测

组别	n	Western blot 法 检测 AQP-3	RT-PCR 法 检测 AQP-3	ELISA 法 检测 Cer
空白对照组	8	0.56±0.07	0.73±0.07	76.74±14.58
模型对照组	4	0.16±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	16.97±3.16 <sup>a</sup>
生理盐水组	8	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.02 <sup>a</sup>	20.41±4.29 <sup>a</sup>
当归饮子组	8	0.49±0.04 <sup>b</sup>	0.56±0.05 <sup>b</sup>	39.50±8.69 <sup>b</sup>
甲氨蝶呤组	8	0.31±0.03 <sup>c</sup>	0.45±0.04 <sup>c</sup>	30.36±5.86 <sup>c</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与当归饮子组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;其中模型对照组只取用 4 只,其余 4 只做病理分析。

## 3 讨论

神经酰胺是人体皮肤角质层细胞间混合脂类



物质的主要成分,有防止水分散发和外界刺激作用,具有保湿、滋润皮肤、抗衰老、抗过敏的功能。在皮肤中神经酰胺的含量随着机体的老化不断减少,神经酰胺的减少可引起皮肤功能的异常,瘙痒类皮肤病患者的干燥性皮损中神经酰胺的含量明显低于正常皮肤的含量<sup>[7]</sup>。在角质层中,神经酰胺具有保水作用,从而进一步提高了皮肤屏障功能。皮肤疾病如银屑病、异位性皮炎等的发生与角质层中神经酰胺水平的改变,都与经皮水分丢失密切相关<sup>[8]</sup>。神经酰胺参与细胞的增殖、分化、生长抑制、衰老、凋亡及细胞分泌等多种生理病理过程,其含量的减少可使角化细胞间黏着力下降,细胞排列紊乱、错位,水分丢失,导致皮肤干燥、脱屑,呈鳞片状<sup>[9]</sup>。AQP-3 的主要作用是跨膜转运水分、甘油、尿素等物质以调节皮肤的水平衡,起保湿作用。AQP-3 不仅参与皮肤水合作用、构成和调节皮肤屏障功能,保持正常皮肤的功能和形态,AQP-3 还参与角质形成细胞的分化,所以能够帮助皮肤外伤的愈合和恢复,在维持皮肤形态、皮肤屏障功能、保湿、创伤愈合中发挥重要作用,并与特应性皮炎、白癜风、瘤、银屑病等多种皮肤病的发病密切相关<sup>[10]</sup>。学者发现 AQP-3 在银屑病皮损中表达下降,且分布的部位发生异常,散在地分布于细胞质中<sup>[11]</sup>。

本实验结果显示,模型豚鼠耳部皮肤神经酰胺含量表达降低( $P<0.01$ ),模型豚鼠皮肤组织细胞中 AQP-3 基因及蛋白表达降低( $P<0.01$ ),表明 Cer 与 AQP-3 参与了银屑病的病理演变,直接或间接影响了皮肤的屏障功能。药物干预后,当归饮子组和甲氨蝶呤组 Cer 蛋白含量表达增强,表明药物干预对银屑病模型病理变化有改善作用,且当归饮子组优于甲氨蝶呤组( $P<0.01$ )。生理盐水组与模型对照组 AQP-3、Cer 蛋白表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示生理盐水对模型病理变化没有影响。

本研究中中药方剂当归饮子具有养血润燥,祛风止痒,益气固表,凉血,活血化瘀等功效。寻常型银屑病动物模型皮损的 AQP-3 基因及蛋白表达明显下降,Cer 含量也明显下降;当归饮子组和甲氨蝶呤组干预后 AQP-3、Cer 上升,证明当归饮子、甲氨蝶呤改善银屑病动物模型的皮肤屏障功能作用确

定,且当归饮子组优于甲氨蝶呤组。由于银屑病的发病机制不明,有复杂的生物学效应参与银屑病发病过程,推测当归饮子对寻常型银屑病模型皮肤屏障功能的调节作用可能是通过增加皮脂含量,调节皮肤屏障功能相关的保湿因子基因和蛋白的表达而使皮肤的屏障功能恢复正常。

## 参 考 文 献

- [1] Jennemann R, Sandhoff R, Langhein L, et al. Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis[J]. J Biol Chem, 2007, 282(5):3083-3094.
- [2] Senkal CE, Ponnusamy S, Bielawski J, et al. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways[J]. FASEB J, 2010, 24(1):296-308.
- [3] Sassa T, Suto S, Okayasu Y, et al. A shift in sphingolipid composition from C24 to C16 increases susceptibility to apoptosis in HeLa cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1821(7):1031-1037.
- [4] Kasumov T, Huang H, Chung YM, et al. Quantification of ceramide species in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2010, 401(1):154-161.
- [5] Haynes TAS, Duerksen-Hughes PJ, Filippova M, et al. C18 ceramide analysis in mammalian cells employing reversed-phase high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 2008, 378(1):80-86.
- [6] 孙建方, 高天文. 皮肤组织病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:20-35.
- [7] Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, et al. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties[J]. Eur Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics, 2009, 72:295-303.
- [8] Ishikawa J, Shimotoyodome Y, Chen S, et al. Eucalyptus increases ceramide levels in keratinocytes and improves stratum corneum function[J]. Int J Cosmet Sci, 2012, 34(1):17-22.
- [9] Menon GK, Kligman AM. Barrier Functions of Human Skin: A Holistic View[J]. Skin Pharmacol Physiol, 2009, 22(4):178-189.
- [10] 张静霞. AQP3 在皮肤病发病机制中的作用研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(17):3101-3103.
- [11] Voss KE, Bollag RJ, Fussell N, et al. Abnormal aquaporin-3 protein expression in hyperproliferative skin disorders[J]. Arch Dermatol Res, 2011, 303(8):591-600.

(收稿日期: 2015-12-27)

(本文编辑: 董历华)