

消疣汤对大鼠银屑病样皮损处病理改变的影响^{*}

胡文韬 贾敏[#] 石惠

(贵阳中医学院第一附属医院 贵州贵阳 550002)

摘要:目的:将大鼠诱导成银屑病样皮损模型,并对其进行治疗,证实消疣汤对大鼠银屑病样皮损处病理改变有影响,为消疣汤的临床应用提供实验室依据。方法:(1)将 50 只 SD 大鼠(雌雄各半)随机分成五组,即空白组、造模组、造模后对照组、消疣汤组、阿维 A 胶囊组,除空白组正常饲养外,余四组用心得安乳液涂抹大鼠双侧耳廓皮肤,两周后取下造模组大鼠双侧耳廓皮肤,显微镜下观察病理改变见明显银屑病样皮损改变后提示造模成功;(2)造模成功后消疣汤组和阿维 A 胶囊组分别予相应药物灌胃治疗,两周后取下各组大鼠双耳组织,切片、HE 染色观察各组病理差异;(3)用 Baker 评分法对各组切片进行评分并进行统计学处理。结果:(1)除空白组以外,余四组在涂抹心得安乳剂 2 周后耳廓组织相继出现局部红肿、鳞屑增多、刮之易落、皮肤萎缩等症状,造模组送检表现出角化过度、角化不全等典型银屑病样病理改变,Baker 评分统计学处理结果显示造模组与空白组相比较($P<0.05$)组间有统计学差异,提示造模成功;(2)经消疣汤和阿维 A 胶囊治疗后,其耳部组织的角化过度、角化不全等病理情况得到明显改善,统计学处理结果显示消疣汤组和阿维 A 胶囊组 Baker 评分与造模组相比较 $P<0.05$,差异有统计学意义,提示治疗有效;(3)消疣汤组与阿维 A 胶囊组评分相比 $P=0.116>0.05$,差异无统计学意义,提示消疣汤和阿维 A 胶囊均有抑制角化过度、角化不全的作用,且疗效无明显差异。结论:(1)用心得安乳液涂抹制造银屑病样皮损的造模方法可行;(2)消疣汤和阿维 A 胶囊对银屑病样皮损处病理改变治疗均有效。

关键词:银屑病;消疣汤;阿维 A 胶囊

The Effect of Xiaobi Decoction on Pathologic Changes of Rat Psoriasis-like Skin Lesions Expression

HU Wen-tao, JIA Min, SHI Hui

(The First Affiliated Hospital of Guiyang College of TCM, Guiyang, Guizhou 550002)

Abstract: Objective: To treat rats with induced psoriasis-like skin lesions so as to confirm whether Xiaobi decoction has effect on pathologic changes of rat psoriasis-like skin lesions and provide an experimental basis for the clinical application of Xiaobi decoction. Methods: At first, 50 SD rats with half males and half females were randomly divided into five groups, namely the control group, the modeling group, the control group after modeling, the Xiaobi decoction group and the acitretin capsule group. Propranolol emulsion was applied on the auricle skin of two ears in all rats except the control group, rats in the control group were fed normally. After two weeks, the auricle skins of two ears of rats in the modeling group were collected, and the pathologic changes under microscope showed obvious psoriasis-like skin lesions, indicating that the modeling was succeeded. Secondly, after success of modeling, rats in the Xiaobi decoction group and the acitretin capsule group were treated with intragastric administration of corresponding drugs respectively. The auricle skin tissues of two ears of rats of each group were collected, sectioned, and stained by HE to observe their pathological changes. Finally the sections of each group were scored using Baker score and analyzed statistically. Results: Except the control group, all other four groups exhibited local swelling, scales increasing, easy falling when scaling, skin atrophy and other symptoms in auricle tissues after two weeks of using propranolol emulsion. Typical psoriasis-like pathological changes like hyperkeratosis and parakeratosis are reported in submitted samples from the modeling group. The results of Baker scores demonstrated statistically significant differences between the modeling group and the control group ($P<0.05$), which indicated the successful modeling. After the treatment using Xiaobi decoction and acitretin capsules, in auricle tissues the pathological conditions including hyperkeratosis, parakeratosis were significantly improved. Results showed statistically significant differences ($P<0.05$) in the Xiaobi decoction group and the acitretin capsule group compared with modeling group, thus confirming the treatment effectiveness. The difference in scores between the Xiaobi decoction group and acitretin capsule group was not statistically significant ($P=0.116$), indicating that both Xiaobi decoction and acitretin capsules can inhibit hyperkeratosis and parakeratosis without significant difference in efficacy. Conclusions: It is feasible to build psoriasis-like skin lesion models by applying propranolol emulsion. Both Xiaobi decoction and acitretin capsule are proved to be effective in improving the pathological symptoms for psoriasis-like skin lesions.

Key words: Psoriasis; Xiaobi decoction; Acitretin capsule

中图分类号: R758.63

文献标识码: B

doi: 10.13638/j.issn.1671-4040.2017.09.001

银屑病又称“白疔”,是一种常见的慢性复发性炎症性皮肤病,典型的组织病理学改变主要为角化过度伴角化不全,角化不全区可见 Munro 微脓肿,颗粒层明显减少或消失,棘层增厚,表皮突整齐向下

延伸;真皮乳头凸毛细血管扩张增生,炎细胞浸润^[1]。银屑病具有发病率高、发病范围广、病程反复且难以治愈等特点^[2]。目前,西医的治疗药物如抗糖皮质激素、维 A 酸类药物、免疫抑制剂、免疫调节剂、细胞

^{*} 基金项目:贵州省贵阳市科技计划项目(编号:20151001)

[#] 通讯作者:贾敏, E-mail: 281780920@qq.com

抑制剂、抗生素类药物等^[3],其近期疗效尚可但远期疗效较差。近些年中医中药以其疗效确切、副作用小等优点,在银屑病的防治中越来越受到重视。消疣汤是贾敏教授多年诊治银屑病的临床经验方,在临床上运用近 30 年,疗效颇佳^[4]。本实验通过银屑病动物模型造成角化过度、角化不全、棘层肥厚等银屑病样组织病理改变,再通过药物灌胃治疗以达到或接近正常皮肤来证实该药物的有效性。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验选用清洁级 SD 大鼠 50 只,体重 200~240 g,雌雄各半,SD 大鼠标准饲料喂养,统一置于温度 25℃、湿度 60%~70%动物房中饲养。

1.2 实验材料及器械 消疣汤主要以生地 20 g,黄芩、金银花、连翘、乌梢蛇、桃仁、红花、当归、川芎、蒲公英、紫花地丁、法半夏各 15 g,蜂房、水蛭各 10 g 为主方(中药饮片剂由我院药剂室提供及煎制)。5%心得安乳液由盐酸普萘洛尔片(国药准字 H32020267)5 g、50%的乙醇(上海紫一试剂厂提供)100 ml、月桂氮卓酮(成都市科龙化工试剂厂提供)5 ml、聚乙烯吡咯烷酮(成都市科龙化工试剂厂提供)5 g 配置而成。阿维 A 胶囊(国药准字 H20010126)、切片机(徕卡-1850)、德国 BMJ-III 型包埋机、显微镜等。

1.3 实验方法

1.3.1 实验流程 试验动物分组→构建银屑病样皮损模型→造模后分组处理→取耳部标本浸于 4%多聚甲醛中固定→石蜡包埋→切片→HE 染色→显微镜下观察、拍照→统计学处理。

1.3.2 造模方法 参照普萘洛尔诱导耳部模型法^[5]进行造模:五组大鼠正常饲养,除空白对照组不予处理,其余四组均予棉签沾取 5%心得安乳液均匀涂于大鼠双侧耳背皮肤,3 次/d,连续 2 周,使其产生银屑病皮损样病理改变。

1.3.3 实验分组 试验动物随机分组如下:A 组:空白对照组 10 只 SD 大鼠,雌雄各半,同剂量生理盐水灌胃 2 周后处死,切取双侧耳廓皮肤组织送检;B 组:造模组 10 只 SD 大鼠,雌雄各半,药物涂擦 2 周,造模成功后处死,切取双侧耳廓皮肤组织送检;C 组:造模后观察组 10 只 SD 大鼠,雌雄各半,造模成功后,予同剂量生理盐水灌胃 2 周,处死切取双侧耳廓皮肤组织送检;D 组:消疣汤组 10 只 SD 大鼠,雌雄各半,造模成功后,予消疣汤灌胃治疗 2 周,处死切取双侧耳廓皮肤组织送检;E 组:阿维 A 组 10

只 SD 大鼠,雌雄各半,造模成功后,予阿维 A 灌胃治疗 2 周,处死切取双侧耳廓皮肤组织送检。

1.3.4 治疗 各组大鼠予精心饲养,造模后消疣汤组予消疣汤灌胃(药物浓度 18 g/kg,每次容量 10 ml/kg,3 次/d,持续 2 周);阿维 A 组予阿维 A 灌胃治疗(药物浓度 3 mg/kg,每次容量 10 ml/kg,2 次/d,持续 2 周);C 组大鼠予同剂量生理盐水灌胃 2 周)。

1.3.5 收集标本 各组大鼠饲养到预定时间,以颈椎脱位法处死,手术切除取下大鼠双侧耳廓皮肤组织标本经取材、固定、修块、流水冲洗、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后,石蜡切片,HE 染色、封片。

1.3.6 石蜡切片 (1)固定:将切好的耳部组织立即投入 4%多聚甲醛溶液中固定,密封,标上组别;(2)脱水:将固定好的组织置于加盖的玻璃皿中,分别加入 50%酒精→70%酒精→80%酒精→95%酒精→100%酒精→100%酒精脱水,每级持续 0.5 h;(3)透明:脱水后置于 1/2 二甲苯+1/2 无水乙醇(2 h)→纯二甲苯(1.5 h)溶液中,经二甲苯过渡置换出组织中的乙醇,使组织呈现出不同程度的透明状态;(4)浸蜡:将透明好的组织置于 1/2 石蜡+1/2 二甲苯中,40℃烘箱 30 min。再放入石蜡 I 30 min、石蜡 II 40 min。以除去组织中的透明剂(二甲苯),使石蜡渗透到组织内部达到饱和程度以便包埋;(5)包埋:先提升恒温箱的温度至 60℃,换脱蜡 3 次,每次 1 h,用硬电光纸叠纸盒,置于 45~60℃的烫板上,倒入材料,补足石蜡,倒好后置于冷水盆中,待石蜡全部凝固后取出晾干;(6)切片:用切片机将已固定和修好的石蜡块切出约 5 μm 厚的薄片;(7)粘片:将切下的薄片置于薄玻片上,然后置烘片台上,使切片展开烫平,同时以记号笔在玻片上编号,放 45℃恒温箱中烘干。

1.3.7 HE 染色 (1)脱蜡:将烘干的石蜡切片冷却后浸入纯二甲苯(10 min)→纯二甲苯(10 min)→依次放入 1/2 二甲苯+1/2 纯乙醇、100%、95%、85%、75%乙醇中各 5 min→蒸馏水冲洗 2 min→切片放入苏木精中染色约 10 min→用自来水冲洗 10 min 使切片颜色变蓝;(2)分化和漂洗:将切片放入 1%盐酸乙醇液中分化约 20 s,自来水冲洗,见切片变红颜色较浅即可再放入 1%氨水中 5 min,自来水充分冲洗使其恢复蓝色;(3)脱水 I 和复染:将切片放入 75%乙醇→85%乙醇中各 5 min。用 0.5%伊红乙醇液对比染色 1 min;(4)脱水 II 和透明:将切片放入 95%乙醇中洗去多余的红色→放入无水乙醇中 5

min→用吸水纸吸干多余的乙醇→放入二甲苯 I、II 中各透明 5 min; (5) 封藏: 中性树胶封片; (6) 光镜下观察切片病理变化。

1.3.8 Baker 法组织评分 手术切取大鼠两侧耳部标本, 每只耳廓皮肤组织各制作 1 张切片, 每组各选取 20 张切片进行显微观察和分析。对 HE 染色切片在光学显微镜 10(目镜)×40(物镜)视野下逐一地观察耳部皮肤病理变化, 用 PAS8000 病理摄像系统进行拍照, 分别随机选取 5 个视野, 参考 Baker^[6]的方法制定组织学评分标准。

1.3.8 统计学方法 运用 SPSS19.0 统计软件, 各组大鼠耳部组织 Baker 评分以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数多重比较, 采用 LSD 法。

2 结果

2.1 各组大鼠情况 2 周后 A 组大鼠反应灵敏、食欲好、二便调、毛色正常有光泽。余四组大鼠双侧耳廓及周围出现脱毛现象, 随着涂药次数增多, 局部逐渐出现充血、肿胀, 涂药 2 周时局部可见明显鳞屑, 部分融合成块状, 刮之易落, 鳞屑剥落处显现鲜红色皮肤部分可见点状出血, 且该四组大鼠涂药 2 周后均出现不同程度活动减少、精神萎靡、食量减少等症。4 周后, C 组大鼠耳部皮损较 2 周前稍有好转, 肉眼可见鳞屑较之前稍减少, 充血、肿胀稍减轻, 余无明显好转, 无新发皮损, D 组和 E 组大鼠治疗后耳廓皮肤可见新生毛发, 无明显充血、红肿, 无鳞屑及出血点, 食欲好转, 活动量可, 大小便调。D 组大鼠较 E 组大鼠精神较好, E 组大鼠有 1 只在三余周时出现尿血, 另有一只大鼠死亡, 经解剖后发现胃肠无内容物, 饮水量较 D 组大, 余情况 D 与 E 组无明显差异。

2.2 HE 染色观察结果

2.2.1 A 组 镜下见皮肤结构完整, 表皮未见角化过度、角化不全、颗粒层缺乏、棘层增厚; 真皮未见血管扩张充血周围无炎性细胞浸润。见图 1。

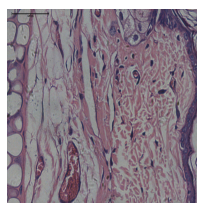


图 1 A 组皮损组织学改变(HE×40)

2.2.2 B 组 镜下可见表皮层明显增厚, 可见不同程度角化过度, 棘层肥厚, 表皮凸延长并成波浪状起伏, 部分见 Munro 小脓肿; 真皮层内血管扩张充血、水肿伴炎性细胞浸润, B 组病理改变结合银屑病组

织病理学特点提示造模成功。见图 2。

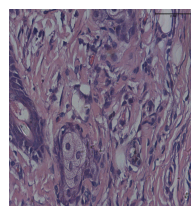


图 2 B 组皮损组织学改变(HE×40)

2.2.3 C 组 和 B 组相比, 除表皮层角化过度、角化不全稍改善以外, 棘层肥厚、真皮层炎细胞浸润、毛细血管扩张等无明显改变, 提示该造模方式造成的病理改变在不接受 5% 心得安乳液刺激的情况下可基本维持 2 周不变。见图 3。

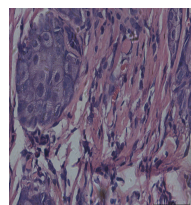


图 3 C 组皮损组织学改变(HE×40)

2.2.4 D 组 镜下可见表皮结构完整, 无明显角化过度, 棘层无明显增厚, 表皮突延长程度明显减轻, 未见 Munro 小脓肿, 真皮层内未见血管扩张充血及水肿, 部分见炎性细胞浸润, 和 B 组病理改变相比较, 差异显著, 且接近 A 组病理特点, 提示消疤汤治疗大鼠银屑病样皮损病理改变有效。见图 4。

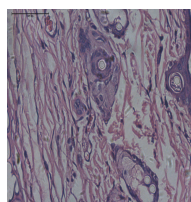


图 4 D 组皮损组织学改变(HE×40)

2.2.5 E 组 和 D 组相比, 皮肤结构完整, 表皮层基本无角化过度, 真表皮交界较平整规则, 8 例无炎性细胞浸润, 余无明显差异, 提示阿维 A 治疗大鼠银屑病样皮损病理改变亦有效, 且阿维 A 对角化过度改善较消疤汤稍好。见图 5。

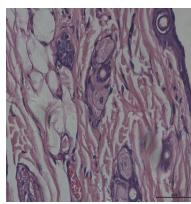


图 5 E 组皮损组织学改变(HE×40)

2.3 各组 Baker 评分结果 见表 1。

表 1 各自 Baker 评分统计学结果(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量	标本数量	Baker 评分结果
A 组		20	0.92± 0.40
B 组		20	7.07± 0.76
C 组		20	6.75± 0.75
D 组(消疣汤)	18 g/kg	20	2.92± 0.61
E 组(阿维 A)	3 mg/kg	20	2.60± 0.64
F			351.524
P			<0.001

2.3.1 空白组和造模组 Baker 评分比较 A 组和 B 组 Baker 评分比较, 结果有显著差异 ($P=0.000<0.05$), 造模组病理改变明显, 提示造模成功。见表 2。

表 2 空白组和造模组 Baker 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数量	Baker 评分结果
A 组	20	0.92± 0.40
B 组	20	7.07± 0.76*

注: 与 A 组比较, * $P=0.00<0.05$ 。

2.3.2 造模组和造模后对照组 Baker 评分比较 B 组与 C 组 Baker 评分比较, 结果无明显差异 ($P=0.116>0.05$), 提示该造模方式造成的皮损改变可维持 2 周无明显改变。见表 3。

表 3 造模组和造模后对照组 Baker 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数量	Baker 评分结果
B 组	20	7.07± 0.76
C 组	20	6.75± 0.75 [△]

注: 与 B 组比较, [△] $P=0.116>0.05$ 。

2.3.3 造模组和消疣汤组及阿维 A 组 Baker 评分比较 B 组与 D 组及 E 组 Baker 评分比较, 结果有显著差异 ($P=0.000<0.05$), 提示消疣汤及阿维 A 胶囊对银屑病样皮损病理改变均有效。消疣汤组与阿维 A 组 Baker 评分比较, 结果无明显差异 ($P=0.116>0.05$), 提示消疣汤和阿维 A 胶囊治疗银屑病样皮损时对病理改变的疗效无明显差异。见表 4。

表 4 造模组和消疣汤组及阿维 A 组 Baker 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数量	Baker 评分结果
B 组	20	7.07± 0.76
D 组	20	2.92± 0.61 [#]
E 组	20	2.60± 0.64 ^{**}

注: 与 B 组比较, [#] $P=0.00<0.05$; 与 D 组比较, ^{*} $P=0.116>0.05$ 。

3 讨论

银屑病是由多种诱发因素共同作用的慢性炎症性皮肤病, 其病理学改变主要为角质层细胞过度增生及角化不全、炎症细胞浸润、真皮毛细血管扩张等。银屑病病因尚不完全清楚并难以根治, 具有复杂的发病机制, 且除人类外罕见于任何非人类动物, 因此理想的动物模型对银屑病的研究显得尤为重要。

银屑病动物模型的模拟为银屑病治疗研究提供了很大的空间, 但由于其发病机制的复杂性, 迄今为止尚不能模拟出银屑病的整体模型, 只能创建出接近人类银屑病典型皮损的模型。近年来国内外关于银屑病动物模型的建立主要有小鼠尾部鳞片模型、

雌鼠阴道上皮模型、异种移植动物模型、T 细胞皮内注射构建银屑病动物模型、普萘洛尔诱导耳部模型法等^[7]。1978 年 Gaylarde 首次用普萘洛尔涂于豚鼠背侧皮肤造成了表皮角化过度、角化不全和棘层增厚等类似银屑病的组织病理改变, 并指出该皮损和刺激性皮炎有本质性的差异。刺激性接触性皮炎指皮肤或黏膜接触刺激性物品后局部皮肤出现红斑、肿胀、丘疹、水疱、大疱直至坏死和溃疡, 而普萘洛尔则是通过阻滞 β - 肾上腺素能受体, 降低细胞内 cAMP 水平, 从而使角质形成、细胞增殖加速而造成角化过度、角化不全、棘层肥厚和角质层内多形核细胞浸润等组织学改变。因其操作简便、重复性好、价格低廉, 该造模方法在被国内外学者多次重复后证实普萘洛尔乳液外涂大鼠耳部 2 周后即可造成银屑病样动物模型^[8], 且至今仍用于银屑病的药物筛选。

消疣汤是贾敏教授多年诊治银屑病的临床经验方, 对于进行期证属血热风燥型的寻常型银屑病, 疗效颇佳。贾敏教授认为银屑病患者多素体阳盛, 既而感受外邪, 或饮食辛辣, 七情内伤, 体内血热内蕴, 久则耗伤阴血, 使血热煎熬成块, 瘀热互结形成瘀血, 致肌肤失养, 瘀阻经络, 疾病迁延难愈久。因此, 将“从血论治”贯穿治疗银屑病始终。全方由十四味中草药组成, 以清热解毒、祛风止痒为主, 活血化瘀、消痈散结为辅, 金银花、连翘、黄芩、生地为君药, 共奏清热解毒凉血之功; 蜂房、乌梢蛇为臣药, 两药合用, 增强祛风止痒之力; 桃仁、当归、红花、川芎、水蛭共为佐药, 佐助君药解毒散结之力, 与君药配伍, 起到凉血活血的作用, 使凉血而不滞血、活血而不动血; 蒲公英、法半夏、紫花地丁为佐使药, 其中蒲公英、紫花地丁清热解毒、消痈力强, 法半夏性温、入脾胃经, 能燥湿散结、降逆止呕, 全方以寒凉药为多, 佐使药法半夏可缓和药性, 能缓解因药性寒凉而致的胃脘不适。

参考文献

- [1] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 第 3 版. 南京: 江苏科技出版社, 2010. 1016
- [2] 张建中. 银屑病的流行病学与危险因素[J]. 实用医院临床杂志, 2013, 10(1): 4-6
- [3] 张学军. 皮肤性病学[M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013. 144
- [4] 贾敏, 贺爱娟, 夏槐林, 等. 消疣汤治疗寻常型银屑病的疗效观察[J]. 贵阳中医学院学报, 2012, 34(1): 33-35
- [5] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010. 1315-1318
- [6] Baker BS, Swain AF, Fry L, et al. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis [J]. Br J Dermatol, 1984, 110 (5): 555-564
- [7] 热比姑丽·伊拉斯木, 阿瓦姑力·伊拉斯木, 斯拉甫·艾白. 银屑病动物模型研究概况[J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2726-2729
- [8] 黄敏, 张淑芝. 心得安涂药造成豚鼠耳部银屑病样病理变化[J]. 中华皮肤科杂志, 1991, 24(2): 96-97

(收稿日期: 2017-05-03)