

# 蜈蚣败毒饮对HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达的影响<sup>Δ</sup>

杨素清<sup>1\*</sup>, 魏巍<sup>2</sup>, 闫景东<sup>1</sup>, 安月鹏<sup>1</sup>(1.黑龙江中医药大学附属第一医院皮肤科, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学临床医学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4420-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.02

**摘要** 目的:研究蜈蚣败毒饮对角质形成(HaCaT)细胞角蛋白Keratin6 mRNA表达的影响。方法:36只Wistar大鼠随机均分为空白对照(等容生理盐水)组、甲氨蝶呤(0.22 g/100 g)组、复方青黛胶囊(0.26 g/100 g)组与蜈蚣败毒饮高、中、低剂量(11.88、5.94、2.96 g/100 g)组,ig给药,每天2次,连续3 d。末次给药后取腹主动脉血,各组血清作用于相应的HaCaT细胞培养24 h。通过实时荧光酶链聚合反应(RT-PCR)法测定HaCaT细胞Keratin6 mRNA的表达。结果:与空白对照组比较,各药组HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达减弱,蜈蚣败毒饮在减弱HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达方面呈现出非剂量依赖关系。结论:蜈蚣败毒饮可能通过抑制Keratin6 mRNA的表达,从而降低了HaCaT细胞增殖来发挥抗银屑病作用。

**关键词** 蜈蚣败毒饮;银屑病;角质形成细胞;角蛋白;信使RNA

## Effects of Wugong Baiduyin on mRNA Expression of Keratin6 in HaCaT Cells

YANG Su-qing<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>2</sup>, YAN Jing-dong<sup>1</sup>, AN Yue-peng<sup>1</sup>(1.Dept. of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China; 2.College of Clinical Medicine, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of Wugong baiduyin on mRNA expression of Keratin6 in HaCaT cells. METHODS: 36 Wistar rats were randomly divided into blank control group (constant volume of normal saline), methotrexate group (0.22 g/100 g), Compound qingdai capsule group (0.26 g/100 g) and Wugong baiduyin high-dose, medium-dose and low-dose groups (11.88, 5.94, 2.96 g/100 g). They were given relevant medicine intragastrically twice a day for consecutive 3 d. Blood samples were collected from aorta abdominalis after last administration, and HaCaT cells were cultured for 24 h. mRNA expression of Keratin6 in HaCaT cells was determined by RT-PCR. RESULTS: Compared with blank control group, mRNA expression of Keratin6 in HaCaT cells were decreased in other groups, and Wugong baiduyin decreased mRNA expression of Keratin6 in HaCaT cells in nondose dependent. CONCLUSIONS: Wugong baiduyin plays the role of anti-psoriasis through inhibiting the mRNA expression of Keratin6 and decreasing the proliferation of HaCaT cells.

**KEYWORDS** Wugong baiduyin; Psoriasis; HaCaT Cell; Keratin; mRNA

银屑病以角质形成(HaCaT)细胞的高度增殖为特征,通过HaCaT细胞的加速增生,表皮更新周期缩短,致使其角化过度和角化不全现象产生,同时伴随大量炎性细胞的浸润,从而发生了一系列银屑病特有的皮肤损害表现<sup>[1]</sup>。角蛋白(Keratin)由HaCaT细胞产生,角蛋白基因表达异常可引起HaCaT细胞的不完全分化,表现为增殖性皮肤病。目前普遍认为,银屑病患者表皮内角蛋白的变化主要体现在Keratin6中,其常被作为表皮细胞增殖的特异性标记蛋白<sup>[2]</sup>。因此,研究解毒化瘀之中药蜈蚣败毒饮对HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达的影响,对中医治疗银屑病具有一定的指导意义。

## 1 材料

### 1.1 仪器

细胞培养瓶、细胞培养板(美国Corning公司);TC2323D型细胞培养箱(广州南方生化医学部);DMEM培养基(美国Hyclone公司);702型超低温冰箱(美国ULT Freezer公司);XDS-1型倒置显微镜(重庆光电仪器总公司);DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂);OptimaTM XL-look Ultra centrifuge高速低温离心机(美国Beckman公司);TGL-16G型台式离心机(上

海安亭科学仪器厂);YLN-2000型凝胶成像分析系统(北京亚利恩机电技术研究所);GeneAmp<sup>®</sup>聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司)。

### 1.2 药品与试剂

甲氨蝶呤片(上海信谊药厂有限公司,批号:070803);复方青黛胶囊(陕西医药控股集团,批号:201207013);胎牛血清(杭州四季青公司);磷酸盐缓冲液(PBS,美国Hyclone公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);焦碳酸二乙酯(DEPC,美国Sigma公司);引物设计合成(上海生工生物工程有限公司);DNA Marker DL2000(大连TaKaRa公司);TransScript逆转录酶、2×EasyTaq PCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司);无菌蒸馏水、乙醇、异丙醇、氯仿、戊巴比妥钠(北京天安联合科技有限公司)。

### 1.3 动物与细胞株

Wistar大鼠36只,♂,体质量180~220 g,购自黑龙江中医药大学实验动物中心(实验动物生产合格证号:医动字第09-3-3号),饲养于室温中,食物、饮水、空气等环境因素均正常。HaCaT细胞购于武汉大学保藏中心。

## 2 方法

### 2.1 药液的制备

2.1.1 蜈蚣败毒饮 取蜈蚣3 g,紫草30 g,土茯苓30 g,鬼箭

<sup>Δ</sup> 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12531619)

\* 主任医师,教授,博士。研究方向:中医药治疗疑难性皮肤病。

E-mail:ysq\_6410@163.com

羽30 g,乌梢蛇20 g,甘草10 g,经2次煎煮,首次煎煮时加8倍量水经4 h浸泡后进行,煎煮时间为1 h;末次煎煮时加6倍量水直接进行,时间为1 h。将两次煎汁混合均匀,分别浓缩成5.94、2.97、1.48 g/ml的高、中、低质量浓度的溶液。

2.1.2 甲氨蝶呤混悬液 取甲氨蝶呤片15 mg,溶于134.41 ml无菌蒸馏水中,制成质量浓度为0.11 mg/ml的甲氨蝶呤混悬液。

2.1.3 复方青黛胶囊混悬液 取复方青黛胶囊18 g,溶于134.43 ml无菌蒸馏水中,制成质量浓度为0.13 g/ml的复方青黛胶囊混悬液。

## 2.2 含药血清的提取

将36只Wistar大鼠随机均分为6组,即空白对照(等容生理盐水)组、甲氨蝶呤(0.22 g/100 g)组、复方青黛胶囊(0.26 g/100 g)组与蜈蚣败毒饮高、中、低剂量(11.88、5.94、2.96 g/100 g)组。ig给药,每天2次,连续3 d。末次给药后给予大鼠ip戊巴比妥钠(35 mg/kg)进行麻醉,在4℃环境下取腹主动脉血,静置,1 h后以3 000×g离心5 min进行血清分离,经56℃灭活30 min,混匀,滤菌,分装,贮藏。

## 2.3 细胞分组和培养

采用随机方法将HaCaT细胞分成6组。取细胞以 $2 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup>的密度接种于培养瓶中,每瓶4 ml,培养24 h后,在显微镜下观察细胞贴壁生长良好,吸弃上清液和没有贴壁的细胞,分别给予“2.2”项下6组大鼠血清,并按照比例加入胎牛血清、DMEM,使其与含药血清的比例保持在1:8:1(V/V/V),各自处理48 h。

## 2.4 观察指标和检测方法

采用RT-PCR法测定蜈蚣败毒饮对HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达的影响。

2.4.1 RNA提取及检测 (1)应用TRIzol试剂盒提取细胞总RNA。将培养瓶内的培养液倒出,用预冷的PBS清洗细胞表面3次,按照1 ml/25 cm<sup>2</sup>的比例加入TRIzol,反复吹打后移入新的DEPC处理过的Eppendorf管内。(2)RNA的分离。室温下孵育细胞5 min,使核蛋白完全碎裂。按每1 ml TRIzol加入0.2 ml的比例加入氯仿,盖紧管盖,剧烈震荡混匀30 s,室温下孵育2~3 min,4℃下,以12 000×g离心10~15 min,Eppendorf管内液体即分为3层,最上层是含mRNA的水性上清液。(3)RNA的沉淀。小心吸取最上层的水性上清液,加入异丙醇0.5 ml,颠倒混匀,室温孵育10 min后,4℃下,以12 000×g离心10 min,RNA沉淀管底,呈胶冻状。(4)洗涤。弃上清液,保留沉淀,加入4℃的75%乙醇,每1 ml TRIzol至少加入1 ml乙醇,振荡。2~8℃下,以7 500×g离心5 min,弃上清液。(5)重新溶解RNA。小心吸弃上清液后空气干燥3~5 min,加入10 μl DEPC,吹打溶解RNA,进行纯度及完整性检测,冻存于-70℃,备用。

2.4.2 第一链cDNA合成 加入总RNA 500 ng,Anchored Oligo(dT)18(0.5 μg/μl) 1 μl,10 mmol/L三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs) 1 μl,5×RT Buffer 4 μl,Ribonuclease Inhibitor(50 u/μl) 0.5 μl,TransScript RT 1 μl,加重蒸水至终体积20 μl,轻轻混匀,42℃孵育30 min,85℃加热5 min失活。

2.4.3 PCR法检测基因表达 从美国NCBI数据库下载mRNA序列,用Primer 3.0引物设计软件设计。Keratin 6上游引物: TCACTGTTGGTAAAGCCCAGCCCT;下游引物: CT-GATGGTGGTGGATGTGCTGGC;产物: 201 bp。ACTB上游引物: ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATC;下游引物: ATCCTTCTGACCCATGCCACCA;产物: 208 bp。反应体系: Template DNA 2 μl,上游引物(10 μmol/L) 1 μl,下游引物(10

μmol/L) 1 μl,2×EasyTaq PCR SuperMix 25 μl,加重蒸水50 μl。PCR循环:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃延伸5 min。

2.4.4 PCR产物分析 应用凝胶图像处理系统对电泳后的凝胶进行观察、拍照,测量各产物的光密度。以目的基因光密度值与同时扩增的内参基因光密度值的比值表示目的基因mRNA的相对表达水平。以上实验重复5次。

## 2.5 统计学方法

采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,然后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

蜈蚣败毒饮对HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达的影响结果见图1、表1。

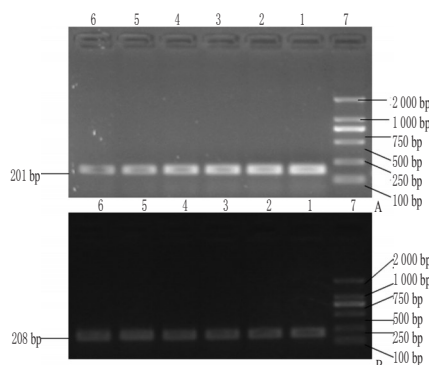


图1 Keratin6 mRNA的表达

A.Keratin6;B.ACTB;1.空白对照组;2.复方青黛胶囊组;3.蜈蚣败毒饮低剂量组;4.蜈蚣败毒饮中剂量组;5.蜈蚣败毒饮高剂量组;6.甲氨蝶呤组;7.DNA maker

Fig 1 mRNA expression of Keratin6

A.Keratin6;B.ACTB;1.blank control group;2.Compound qingdai capsule group;3.Wugong baidu yin low-dose group;4.Wugong baidu yin medium-dose group;5.Wugong baidu yin high-dose group;6.methotrexate group;7.DNA maker

表1 蜈蚣败毒饮对HaCaT细胞Keratin6 mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 1 Effects of Wugong baidu yin on mRNA expression of Keratin6 in HaCaT cells( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量,g/100 g	Keratin6 mRNA表达
空白对照组		2.85 ± 0.13
甲氨蝶呤组	0.22	2.19 ± 0.12*
复方青黛胶囊组	0.26	2.54 ± 0.26*
蜈蚣败毒饮低剂量组	2.96	2.59 ± 0.20*
蜈蚣败毒饮中剂量组	5.94	2.44 ± 0.17*
蜈蚣败毒饮高剂量组	11.88	2.24 ± 0.12*

与空白对照组比较: \* $P < 0.05$

vs.blank control group: \* $P < 0.05$

## 4 讨论

银屑病是一种角化过度并伴有角化不全的炎症性皮肤病,目前临床发病率逐年上升。现代研究表明,其可能与遗传、免疫、感染等多种因素有关<sup>[3]</sup>,但其终游机制仍与角质形成细胞的增殖异常密不可分,而角蛋白作为其所表达的重要蛋白之一,成为目前银屑病研究的热点<sup>[4]</sup>。所以,对于“基因-蛋白-细胞”通路机制的探索<sup>[5]</sup>,可以有效地对本病病因进行溯源。

角蛋白是脊椎动物细胞中的重要细胞骨架蛋白之一。早

# 盐酸小檗碱对2型糖尿病大鼠胰岛素敏感指数影响的Meta分析

庄星星<sup>1\*</sup>, 杨晓旭<sup>1</sup>, 魏良兵<sup>2</sup>, 高家荣<sup>1,2#</sup> (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230038; 2.安徽中医药大学第一附属医院/国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230031)

中图分类号 R282;R587.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4422-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.03

**摘要** 目的:系统评价盐酸小檗碱对2型糖尿病大鼠胰岛素敏感指数(ISI)的影响。方法:通过计算机检索万方医学数据库、中国期刊全文数据库、中国生物医学文献数据库以及PubMed数据库,收集盐酸小檗碱治疗2型糖尿病大鼠的随机对照实验,采用Rev Man 5.2软件进行Meta分析。结果:共纳入6篇文献,94只大鼠。Meta分析结果显示,盐酸小檗碱可以改善2型糖尿病大鼠的ISI[WMD: -0.67, 95% CI(-1.03, -0.31),  $P < 0.000 01$ ],各研究之间存在异质性。结论:盐酸小檗碱可以明显改善2型糖尿病大鼠的ISI。

**关键词** 盐酸小檗碱; 2型糖尿病; 大鼠; 胰岛素敏感指数; Meta分析

## Effects of Berberine Hydrochloride on ISI in Type 2 Diabetic Rats: A Meta-analysis

ZHUANG Xing-xing<sup>1</sup>, YANG Xiao-xu<sup>1</sup>, WEI Liang-bing<sup>2</sup>, GAO Jia-rong<sup>1,2</sup> (1.College of Pharmacy, Anhui University of TCM, Hefei 230038, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM, TCM Preparation Level 3 Laboratory, State Administration of TCM, Hefei 230031, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To evaluate the effects of berberine hydrochloride on insulin sensitivity index (ISI) in type 2 diabetic rats. METHODS: Retrieved from Wanfang database, CNKI, CBM and PubMed, RCTs about berberine hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes in rats were included. A Meta-analysis was conducted by using Rev Man 5.2 software. RESULTS: 6 literatures were included, involving 94 rats. Meta-analysis showed that heterogeneity existed among all involved studies and berberine hydrochloride could improve the ISI in type 2 diabetic rats [WMD: -0.67, 95% CI(-1.03, -0.31),  $P < 0.000 01$ ]. CONCLUSIONS: Berberine hydrochloride can improve ISI in type 2 diabetic rats significantly.

**KEYWORDS** Berberine hydrochloride; Type 2 diabetic; Rats; Insulin sensitivity index; Meta-analysis

在1960年有学者<sup>[5]</sup>就发现银屑病患者和正常人相比表皮角蛋白有些差异。银屑病角质形成细胞增殖的实验研究证实,银屑病皮损部位的角蛋白Keratin 6表达明显增加<sup>[6]</sup>,但中医药对于Keratin 6等相关蛋白的干预性研究报道仍较为少见。本研究的结果表明,甲氨蝶呤、复方青黛胶囊、蜈蚣败毒饮的含药血清均可降低HaCaT细胞Keratin6 mRNA的表达,与空白对照组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );蜈蚣败毒饮高、中剂量组与复方青黛胶囊组比较,Keratin6 mRNA表达减弱,差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ ),并呈现出非剂量依赖关系。因此笔者推测,蜈蚣败毒饮抑制HaCaT细胞增殖的机制可能是通过抑制细胞中角蛋白Keratin 6基因的表达,以使细胞增殖减慢而发挥抗银屑病的作用。这一结论也与银屑病角蛋白的相关研究结果相互吻合<sup>[4]</sup>。

本研究以中药蜈蚣败毒饮作为主要对象,从中医“病由毒生”和“久病必瘀”的理论出发,重视疾病发生的源头和转归及疾病在发生、发展过程中的动态演变,侧重于对中医药“毒”、

“瘀”理论的研究和认识,在用药中突出了清热毒、除湿毒、化痰毒的运用,可为银屑病的“毒”、“瘀”理论发病学说提供依据<sup>[7]</sup>。

## 参考文献

- [1] 高春芳,郑茂荣.角质形成细胞在银屑病发病机制中的研究进展[J].国外医学:皮肤病学分册,2000,26(4):216.
- [2] 贺芬,李敦国,陈明亮,等.重组人II型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白联合银屑病颗粒治疗中、重度寻常型银屑病的疗效观察[J].中国药房,2013,24(24):2245.
- [3] 樊平申.角蛋白及IL-20在银屑病动物模型中的分子机制研究[D].西安:第四军医大学博士学位论文,2001:13.
- [4] 任虹,张瑞丽.银屑病角质形成细胞p14ARF基因甲基化的研究[J].中国麻风皮肤病杂志,2006,22(12):983.
- [5] 孙林潮.角蛋白17反义寡核苷酸对KC增殖、凋亡的影响以及对银屑病动物模型的作用研究[D].西安:第四军医大学博士学位论文,2005:23.
- [6] Morrers JM, Van Rossum MM, Van Erp PE, et al.Changes in keratin6 and keratin 10 (co-) expression in lesional and symptomless skin of spreading psoriasis[J]. *Dermatology*, 2000, 201(1):15.
- [7] 杨素清,王研,闫景东,等.蜈蚣败毒饮对HaCaT细胞增殖影响的实验研究[J].新中医,2012,44(12):138.

(收稿日期:2014-06-06 修回日期:2014-06-30)

△ 基金项目:国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题(No.JDZX2012003)

\* 硕士研究生。研究方向:中药制剂研究与开发。E-mail: zxx900913@126.com

# 通信作者:主任药师,硕士研究生导师。研究方向:中药制剂工艺和新药研发。电话:0551-2838556。E-mail: zyfygir2006@sohu.com