

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.005

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20181227.1736.008.html(2018-12-28)

## 马齿苋提取液对急性湿疹大鼠皮肤屏障功能的调控作用\*

胡一梅<sup>1,2</sup>,葛一漫<sup>1,2</sup>,雍江堰<sup>3</sup>,王毅<sup>1,2Δ</sup>(1. 成都中医药大学临床医学院,成都 610037;2. 成都中医药大学附属医院,成都 610075;  
3. 成都中医药大学医学技术学院,成都 610037)

【摘要】目的 探讨马齿苋提取液对皮肤屏障功能的调控作用及其治疗急性湿疹大鼠的可能作用机制。

方法 SD 大鼠 30 只,分为正常组、模型组、马齿苋组,各 10 只。采用二硝基氯苯(DNCB)建立急性湿疹模型,正常组除外。造模成功后,各组分别给予相应药物。用药后,采用皮肤表皮水分丧失测定仪测定各实验组大鼠经皮水分丢失量(TEWL);免疫组织化学法(SP法)染色蛋白酶激活受体 2(PAR-2),并采用病理图像分析系统半定量检测其水平;反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定皮肤人类中间丝聚合蛋白(FLG)基因表达。

结果 用药后,马齿苋组急性湿疹症状减轻,大鼠皮肤 TEWL( $3.25 \pm 0.47$ ) $\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 、PAR-2( $0.1541 \pm 0.0068$ ) $\mu\text{m}^2$ ,较模型组显著减少( $P < 0.05$ );FLG 基因表达值为  $4.34 \pm 1.21$ ,较模型组显著增高( $P < 0.05$ )。

结论 马齿苋治疗急性湿疹的机制之一可能是通过增加 FLG 基因表达,降低 PAR-2 水平,减少 TEWL,恢复皮肤屏障功能。

【关键词】马齿苋;湿疹;经皮水分丢失量;染色蛋白酶激活受体 2;皮肤人类中间丝聚合蛋白

【中图分类号】R446.62 【文献标识码】A 【文章编号】1671-8348(2019)10-1639-03

## Regulation effect of Purslane extracts on skin barrier function in rats with atopic eczema\*

HU Yimei<sup>1,2</sup>,GE Yiman<sup>1,2</sup>,YONG Jiangyan<sup>3</sup>,WANG Yi<sup>1,2Δ</sup>(1. College of Clinical Medical, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610037, China;  
2. Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610075,  
China; 3. College of Medical Technology, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610037, China)

【Abstract】Objective To investigate the mechanism of Purslane extracts in regulating the skin barrier

function and its possible mechanism in the treatment for rats with atopic eczema. **Methods** 30 SD rats were randomly divided into the normal group, the model group and the Purslane group with  $n = 10$ . Acute eczema model was established with dinitrochlorobenzene (DNCB), except the normal group. After successful modeling, the corresponding drugs were given to each group. After medication, the amount of transepidermal water loss (TEWL) in rats was determined by the tester. Immunohistochemical method (SP method) was used to stain protease-activated receptor 2 (PAR-2) and detect its level semi-quantitatively by pathological image analysis system. RT-PCR was used to determine gene expression of filaggrin (FLG) in human skin. **Results** After medication, the Purslane group presented alleviated acute eczema symptoms. Compared with the model group, the levels of TEWL [ $(3.25 \pm 0.47) \text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ], PAR-2 [ $(0.1541 \pm 0.0068) \mu\text{m}^2$ ] in rats skins in the Portulaca group significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression of FLG gene ( $4.34 \pm 1.21$ ) increased ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** One of the mechanisms of Purslane for the treatment of acute eczema may be by increasing FLG gene expression, lowering PAR-2 level reducing TEWL, and restoring the skin barrier function.

【Key words】portulaca oleracea;eczema;transepidermal water loss;protease activated receptor-2;filaggrin

急性湿疹是临床上常见的炎性皮肤病,该病发病机制复杂,目前与皮肤屏障功能障碍相关的研究为

主要方向之一<sup>[1-2]</sup>。皮肤屏障发挥正常的防御功能,以及保持表皮水分和电解质作用需要依靠角质层的

\* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81403405);四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ513);成都中医药大学附属医院科技发展基金项目(2016-D-YY-31);成都中医药大学科技发展基金课题(ZRQN1727)。 作者简介:胡一梅(1981-),副教授,博士,主要从事皮肤科疾病的临床及教学研究工作。 Δ 通信作者,E-mail:wangyi660323@126.com。

完整,即“砖-墙结构”的完整。角质细胞作为“砖头”构成支架结构,细胞间脂质作为“泥浆”用来黏合稳固“砖头”。以上任一结构发生变化可能导致皮肤屏障异常,从而诱发急性湿疹。

本实验拟通过运用马齿苋提取液对急性湿疹大鼠模型进行干预治疗,结合局部皮损处经皮水分丢失量(trans epidermal water loss, TEWL)、蛋白酶激活受体 2 (protease activated receptor-2, PAR-2) 及人类中间丝聚合蛋白(filaggrin, FLG) 的表达,探讨马齿苋对皮肤屏障的调控作用及其在急性湿疹发生发展中起到的主要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 体质量 180~220 g 的清洁级大鼠[成都达硕生物科技有限公司,许可证号:SCXK(111)2008-24]30 只,雌雄不限。

**1.1.2 药物与试剂** 马齿苋提取液(去根的新鲜马齿苋鲜榨提取获得)。二硝基氯苯(dinitrochlorobenzene, DNCB; 成都科龙化工试剂厂,批号:20090813)。

**1.1.3 仪器** AF200 皮肤表皮水分丧失测定仪(英国 BIOX 公司);反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司);Image-Pro Plus6.0 病理图像分析系统(福建省麦克奥迪实业集团有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及造模** 实验第 1 天首次致敏于大鼠腹部皮肤涂抹 5% DNCB 30  $\mu\text{L}$ , 2 d 后进行 2 次激发,在大鼠右背部皮肤涂抹 0.2% DNCB 50  $\mu\text{L}$ ,连续攻击 3 次,每 3 天 1 次。第 9 天将 20 只造模大鼠平均分为模型组和马齿苋组。另有不作处理的 10 只大鼠为正常组。第 10 天马齿苋组大鼠给予马齿苋药物进行治疗,连续 9 d。

**1.2.2 实验取材** 末次给药后,断颈处死大鼠,取大鼠皮损组织 2 块,一块固定于 10% 中性甲醛中 48 h;另一块置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  液氮中速冻,待测。

**1.2.3 观察指标** (1)表皮 TEWL 值测定:采用皮肤表皮水分丧失测定仪测定各组大鼠 TEWL 值。(2)各组大鼠皮肤 PAR-2 及其水平的测定:将上述各组大鼠右背部皮肤包埋的蜡块切成 4  $\mu\text{m}$  厚的组织切片,按照免疫组织化学试剂盒说明书进行 PAR-2 免疫组织化学染色,同时设置阳性和阴性对照。一抗 PAR-2 购自北京博奥森生物技术有限公司,克隆号:bs-1178R。二抗及相应试剂盒及阳性片购自北京中山金桥生物有限公司。染色后封片,显微镜下观察,图像分析系统计算 PAR-2 的积分光密度。(3)RT-PCR 检测大鼠皮肤 FLG 基因的表达:用 Trizol 法提

取急性湿疹大鼠皮肤组织中的总 RNA,并鉴定检测样品纯度。根据 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,使用 System SDS Software 软件计算循环阈值(Cycle threshold, Ct),采用  $\beta$ -actin 作为内参照基因,以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  作为 Filaggrin 基因的表达水平。Filaggrin 引物序列,上游 5'-AGG AGC GAG ACC ATC AGC-3';下游 5'-GCA CCT TGC CAC TCT GTT-3'。 $\beta$ -actin 引物序列,上游 5'-TCT AGG CAC GTG GCA AGG GTG TG-3';下游 5'-TCA TGA GGT AGT TGC CGT CAG G-3'。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示。首先行正态分布检验,方差齐性用 LSD,方差不齐用 Tamhane's  $T_2$  法,组间采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠大体外观比较** 正常组大鼠皮肤光滑无异常,模型组大鼠右背部造模区皮肤出现肉眼可见红肿、丘疹、水疱、糜烂和渗出等急性湿疹症状。马齿苋组大鼠用药后,造模区皮肤红肿、糜烂和渗出等皮损程度降低,丘疹和水疱消散,皮肤变得光滑。见图 1。

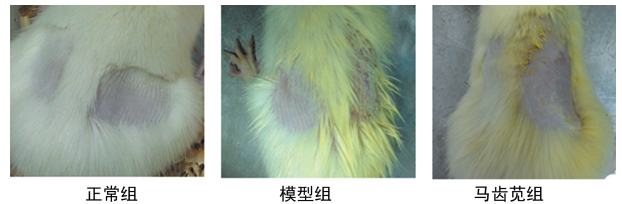


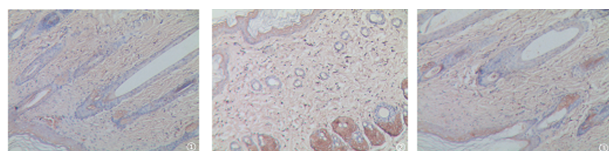
图 1 各组大鼠皮肤临床表现

**2.2 各组 TEWL 的检测结果** 用药后,正常组大鼠 TEWL 水平为  $(2.35\pm 0.18)\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ,模型组为  $(11.36\pm 1.66)\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ,马齿苋组为  $(3.25\pm 0.47)\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ,与模型组比,马齿苋组大鼠 TEWL 水平显著降低( $P<0.05$ ),但高于正常组( $P<0.05$ )。

**2.3 各组大鼠皮肤组织 PAR-2 检测结果** 镜下可见 PAR-2 阳性物质呈棕黄色、黄色、浅黄色颗粒状,位于皮肤表皮棘细胞、皮肤附属器汗腺细胞、皮脂腺细胞、毛囊细胞、真皮内炎细胞胞浆,部分位于真皮内间质组织中。用药后,马齿苋组 PAR-2 阳性物质染色变浅、分布面积减少(图 2)。用药后,正常组大鼠 PAR-2 水平为  $(0.1534\pm 0.0022)\mu\text{m}^2$ ,模型组为  $(0.1708\pm 0.0115)\mu\text{m}^2$ ,马齿苋组为  $(0.1541\pm 0.0068)\mu\text{m}^2$ ,与模型组相比,马齿苋组 PAR-2 水平明显降低( $P<0.05$ ),但略高于正常组( $P>0.05$ )。

**2.4 各组大鼠皮肤 FLG 的检测结果** 正常组大鼠 FLG 基因表达为  $(6.20\pm 0.68)$ ,模型组为  $(0.79\pm 0.19)$ ,马齿苋组为  $(4.34\pm 1.21)$ 。与模型组比,马齿苋组大鼠 FLG 基因的表达显著增高( $P<0.05$ ),但低

于正常组( $P < 0.05$ )。



正常组 模型组 马齿苋组

图 2 各组大鼠皮肤组织中 PAR-2 的表达(免疫组织化学染色 $\times 200$ )

### 3 讨论

外界过敏性物质对皮肤屏障的破坏是急性湿疹疾病发生、发展的诱因之一。由于皮肤屏障功能的异常表达,使过敏原从外环境渗透到皮肤,导致急性湿疹发生并进一步恶化<sup>[3]</sup>。马齿苋主要含有生物碱类、萜类、香豆素类、黄酮类、有机酸类、挥发油及多糖等化学成分,具有抗炎、抑菌、抗肿瘤、抗氧化、增强免疫力的作用,在临床上主要用于治疗湿疹、炎症、瘙痒症和糖尿病等疾病<sup>[4]</sup>。作者的前期研究发现,马齿苋能够明显改善 DNCB 所致的大鼠急性湿疹症状<sup>[5-6]</sup>。

研究发现,皮肤屏障功能的优劣与代表角质层水分流失量的 TEWL 呈负相关关系,TEWL 越高,表示角质层含水量越少,皮肤屏障功能损伤越严重<sup>[7]</sup>。本实验结果发现,急性湿疹大鼠 TEWL 明显增高,这与 SIMPSON 等<sup>[8]</sup>研究结果一致,马齿苋组 TEWL 比模型组显著降低。结果提示,马齿苋可能是通过减少 TEWL,增加角质层水分含量,修复受损的皮肤屏障,达到治疗急性湿疹的作用。

急性湿疹发生时,皮肤代谢功能异常,使得皮肤抗炎因子和脂质减少,皮肤出现炎症反应,皮肤表面 pH 值升高,增加了激肽释放酶(kallikrein, KLKs)的活性,KLKs 可进一步激活 PAR-2,活化的 PAR-2 可使板层小体掩埋在角质细胞内难以释放,抑制其正常分泌,引起细胞间脂质水平的减少,破坏皮肤屏障功能<sup>[9-10]</sup>。活化的 PAR-2 还可引起炎症因子的过表达,加重皮肤组织的炎症损伤程度,进一步破坏皮肤屏障,形成恶性循环<sup>[11]</sup>。本实验结果发现,马齿苋组 PAR-2 水平比模型组显著降低。提示,马齿苋可通过降低 PAR-2 水平,减少 TEWL,恢复皮肤屏障中“泥浆”的功能,缓解急性湿疹症状。

皮肤屏障的完整性是预防和治疗急性湿疹的前提,皮肤屏障形成的主要物质之一是 FLG。若 FLG 基因发生无义突变,可导致丝聚合蛋白原失去活性,减少 FLG 的产生,破坏角质细胞“砖块”结构的支架作用<sup>[12]</sup>。本实验结果发现,急性湿疹大鼠 FLG 基因呈低表达,这与 RIETHMULLER 等<sup>[13]</sup>研究结果一致,马齿苋组 FLG 基因表达比模型组明显增加,提示马齿苋通过增加 FLG 基因表达,增加 FLG 水平,恢复角质细胞“砖块”结构的支架作用,从而降低 TW-

EL,恢复皮肤屏障功能,达到治疗急性湿疹的目的。

FLG 基因的无义突变使 FLG 减少或缺失,这可引起天然保湿因子减少,导致皮肤表面偏碱性。表皮 pH 值的改变可激活 PAR-2,降低表皮脂质的水平,增加 TEWL,破坏皮肤屏障功能。本实验发现,用药后,马齿苋组中 PAR-2 表达较模型组降低,FLG 基因表达增加,提示作为急性湿疹的治疗靶点,不仅 PAR-2 的活性改变会影响治疗效果,其水平的改变也可能影响疗效。

综上所述,马齿苋可能是通过增加 FLG 基因表达,降低 PAR-2 水平,减少 TEWL,恢复皮肤屏障功能,从而发挥治疗急性湿疹的作用。马齿苋是否还可能通过增加 FLG 基因的表达来抑制 PAR-2 的活性,达到恢复皮肤屏障功能治疗急性湿疹的作用,有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] EGAWA G, KABASHIMA K. Barrier dysfunction in the skin allergy[J]. *Allergol*, 2018, 67(1): 3-11.
- [2] YAMADA K, MATSUSHITA K, WANG J, et al. Topical Glucose Induces Claudin-1 and Filaggrin Expression in a Mouse Model of Atopic Dermatitis and in Keratinocyte Culture, Exerting Anti-inflammatory Effects? by Repairing Skin Barrier Function [J]. *Acta Derm Venereol*, 2018, 98(1): 19-25.
- [3] PROKSCH E, DÄHNHARDT D, DÄHNHARDT-PFEIFFER S, et al. Epidermal barrier disorders in dermatoses[J]. *Hautarzt*, 2016, 67(11): 907-921.
- [4] 王天宁, 刘玉婷, 肖凤琴, 等. 马齿苋化学成分及药理活性的现代研究整理[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 224-234.
- [5] 葛一漫, 张朝明, 胡一梅, 等. 马齿苋提取物对急性湿疹大鼠皮肤 TNF- $\alpha$  与 IL-4 表达的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(12): 1637-1640.
- [6] 胡一梅, 艾儒棣, 朱晓燕, 等. 鲜马齿苋治疗急性湿疹 40 例[J]. *中医杂志*, 2012, 53(18): 1592-1593.
- [7] HON K L, TSANG K Y, KUNG J S, et al. Clinical signs, Staphylococcus and atopic eczema-related seromarkers [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 1-11.
- [8] SIMPSON E L, VILLARREAL M, JEPSON B, et al. Patients with atopic dermatitis colonized with staphylococcus aureus have a distinct phenotype and endotype[J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(10): 2224-2233.
- [9] JANG H, MATSUDA A, JUNG K, et al. Skin pH is the master switch of kallikrein 5-mediated skin barrier destruction in a murine atopic dermatitis model[J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136(1): 127-135.
- [10] LEE S E, JEONG S K, LEE S H. Protease and protease-activated receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis[J]. *Yonsei Med J*, 2010, 51(6): 808-822.
- [11] KIM H Y, GOO J H, JOO Y A, et al. Impact on inflammation and recovery of skin barrier (下转第 1645 页)

- tive breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(Suppl 6): S23-29.
- [2] CHEN S Y, SANG N L. Hypoxia-inducible factor-1: a critical player in the survival strategy of stressed cells [J]. *Cell Biochem*, 2016, 117(2): 267-278.
- [3] ESPOSTI D D, HERNANDEZ-VARGAS H, VOEGELE C, et al. Identification of novel long non-coding RNAs deregulated in hepatocellular carcinoma using RNA-sequencing[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31862-31877.
- [4] FENG T, SHAO F, WU Q, et al. miR-124 downregulation leads to breast cancer progression via LncRNA-MALAT1 regulation and CDK4/E2F1 signal activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16205-16216.
- [5] HUANG N S, CHI Y Y, XUE J Y, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37957-37965.
- [6] 徐益文, 徐庆祥, 丁义涛. 缺氧诱导因子 1 与肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 6(18): 1656-1660.
- [7] SEMENZA G L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics[J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 625-634.
- [8] JI P, DIEDERICH S, WANG W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031-8041.
- [9] CHOUDHRY H, SCHODEL J, OIKONOMOPOULOS S, et al. Extensive regulation of the non-coding transcriptome by hypoxia: role of HIF in releasing paused RNAPol2[J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(1): 70-76.
- [10] SHEN L, CHEN L, WANG Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. *Neurooncol*, 2015, 121(1): 101-108.
- [11] KONISHI H, ICHIKAWA D, YAMAMOTO Y, et al. Plasma level of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 is associated with liver damage and predicts development of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(2): 149-154.
- [12] LAI M C, YANG Z, ZHOU L, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1810-1816.
- [13] 周俭珊, 叶红. HIF-1 $\alpha$ , VEGF 及 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 轴在子宫内膜癌中的表达研究进展[J]. *海南医学*, 2015, 26(16): 2413-2416.
- [14] 刘彦琦, 于红刚. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  和血管内皮生长因子在胃癌组织中的表达及其与肿瘤细胞增殖的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(9): 2246-2248.
- [15] 孙慧霞, 孙会, 李国正. HIF-1 $\alpha$  和 Glut-1 蛋白在中老年宫颈癌组织中的表达及其意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(1): 16-19.
- [16] GUO F, GUO L, LI Y, et al. MALAT1 is an oncogenic long non-coding RNA associated with tumor invasion in non-small cell lung cancer regulated by DNA methylation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12): 15903-15910.
- [17] SHEN L, CHEN L, WANG Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes brain metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in lung cancer[J]. *J Neur Oncol*, 2015, 1121(1): 101-108.
- [18] LI S, WANG Q, QIANG Q, et al. Sp1-mediated transcriptional regulation of MALAT1 plays a critical role in tumor[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(11): 1909-1920.
- [19] 赵文明, 周炳娟, 李金梅, 等. HIF-1 $\alpha$ 、Glut-1 表达与乳腺癌分化程度及分子亚型的关系[J]. *河北医学*, 2018, 3(24): 353-357.
- [20] 张峻, 武月, 赵岩, 等. 生物信息学分析沉默 HIF-1 $\alpha$  后胃癌细胞系基因表达变化同胃癌发生发展的相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 4(26): 1155-1162.
- [21] 罗清, 曾梓涵, 赵玖, 等. 三阴性乳腺癌患者血清 HOTAIR、GAS5、MALAT-1 表达变化及其意义[J]. *山东医药*, 2018, 3(58): 75-77.
- [22] 李子博, 周江, 周琳, 等. 乳腺癌组织中 lncRNA、MALAT1 的表达及临床意义[J]. *医学研究杂志*, 2018, 3(47): 79-81.
- [23] 徐益文, 徐庆祥, 丁义涛. 缺氧诱导因子 1 与肿瘤的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 6(18): 1656-1660.

(收稿日期: 2018-08-12 修回日期: 2018-11-24)

(上接第 1641 页)

- by nordihydroguaiaretic Acid as a protease-activated receptor 2 antagonist[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2012, 20(5): 463-469.
- [12] MCALEER M A, IRVINE A D. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2): 280-291.

- [13] RIETHMULLER C, MCALEER M A, KOPPES S A, et al. Filaggrin breakdown products determine corneocyte conformation in patients with atopic dermatitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(6): 1573-1580.

(收稿日期: 2018-08-18 修回日期: 2018-11-27)