

引用:焦翠琴,王浩,周小平.补益营卫方对衰老表皮结构蛋白 K17 的影响[J].湖南中医杂志,2020,36(1):132-134.

补益营卫方对衰老表皮结构蛋白 K17 的影响

焦翠琴,王浩,周小平

(宁夏医科大学中医学院,宁夏银川,750004)

[摘要] 目的:观察补益营卫方对衰老表皮结构蛋白 K17 的基因和蛋白水平的影响。方法:将 3 个月龄小鼠(年轻组)与 14 个月龄小鼠(老年组)表皮细胞消化分离出来,然后进行传代培养,其中 14 个月龄小鼠(老年组)的表皮细胞分为 2 组,一组用常规方法培养细胞,另一组用含 2.5% 的补益营卫方培养基进行培养,采用荧光定量 RT-PCR 法和 Western Blotting 法分别检测细胞 K17mRNA 表达和细胞 K17 蛋白表达。结果:与年轻组比较,老年组的 K17mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.05$);经药物干预后小鼠表皮细胞中 K17mRNA 和蛋白水平较老年组明显降低($P < 0.05$)。结论:补益营卫方可通过抑制衰老表皮结构蛋白 K17 的表达,起到延缓皮肤衰老作用。

[关键词] 衰老;补益营卫方;表皮结构;角蛋白 17;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.01.056

Effect of Buyi Yingwei prescription on keratin 17 in senescent epidermal structure

JIAO Cuiqin, WANG Hao, ZHOU Xiaoping

(School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Buyi Yingwei prescription on the mRNA and protein expression of keratin 17 (K17) in senescent epidermal structure. Methods: Epidermal cells were isolated from mice aged 3 months (young group) and those aged 14 months (elderly group), and then subculture was performed. The epidermal cells from the elderly group were divided into two groups; one group was cultured with conventional method, and the other group was cultured in the medium containing 2.5% Buyi Yingwei prescription. RT-qPCR and Western blotting were used to measure the mRNA and protein expression of K17 in cells. Results: Compared with the young group, the elderly group had significant increases in the mRNA and protein expression of K17 ($P < 0.05$). In the elderly group, the cells with drug intervention had significant reductions in the mRNA and protein expression of K17 compared with those without intervention ($P < 0.05$). Conclusion: Buyi Yingwei prescription delays skin aging by inhibiting the expression of K17 in senescent epidermal structure.

[Key words] senescence; Buyi Yingwei prescription; epidermal structure; keratin 17; experimental study

随着年龄的增加,外在皮肤护理在保持皮肤年轻上显得不足,研究内在皮肤衰老的机制及其对抗手段已成为衰老研究的热点领域之一^[1]。近年来随着对皮肤衰老认识的逐步深入,发现角质形成细胞在皮肤衰老中发挥着重要的作用,角蛋白作为表皮细胞结构蛋白,能够支撑纤维状蛋白质并且保护纤维状蛋白质功能的存在,具有维持细胞分化、参与细胞定位等功能^[2]。《内经》认为,营卫和谐是人体生命活动赖以发生的基础,与皮肤生理病理有十分密切的关系。营卫的盛衰是影响皮肤状态的重要因素^[3]。营卫循

于全身各处,调节着五脏六腑及全身功能,使人体功能活动正常。本实验研究补益营卫方对衰老表皮结构蛋白 K17 的影响,拟探讨补益营卫方延缓皮肤衰老的机制。现将实验结果报告如下。

1 实验方法

1.1 动物 选用健康清洁级昆明种雌性小鼠 20 只。年轻组:3 月龄,10 只,体质量 20~22g;老年组:14 月龄,10 只,体质量 28~31g。实验动物由常州卡文斯实验动物有限公司提供,使用许可证号:SYXK(苏)2011-0035。饲养于宁夏

基金项目:国家自然科学基金项目(30020702)

第一作者:焦翠琴,女,医师,研究方向:张仲景学术思想及其应用研究

通讯作者:周小平,男,医学博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:张仲景学术思想及其应用研究, E-mail:191008380@qq.com

医科大学动物实验中心。

1.2 药物 补益营卫方组成: 生黄芪 15g, 人参 5g, 炙甘草 7g。购买于宁夏银川市兴庆区胜利街古方中医院总院, 用蒸馏水先浸泡 30min 后煎 2 次, 将滤液混合一起浓缩成 1g/ml (每毫升含 1g 生药) 的中药, 放置 4℃ 冰箱冷藏备用。

1.3 主要试剂和仪器 胎牛血清胎牛血清(美国, Gibco 公司); DMEM(High Glucose)及磷酸盐缓冲液(BI); D-Hanks 液、中性蛋白酶(北京酷来博科技有限公司); Trizol 试剂(BioFlux 公司); DNase I(TaKaRa 公司); MEM-F12 培养基(美国, Gibco 公司)。SW-CJ-1FD 型超净工作台(中国苏净化公司); HF-90 恒温 CO₂ 培养箱(Thermo Scientific); CKX41 型倒置相差显微镜(日本 OLYM-PUS 公司); TDL-40B 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); 电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司); PCR 梯度扩增仪(北京索莱宝生物有限公司)、Rotor-Gene 3000 Realtime PCR 仪(Corbett Research)等均由宁夏医科大学解剖实验室和宁夏医科大学科技中心提供。

2 实验方法

2.1 细胞分离、培养、处理 将 2 组小鼠背部皮肤进行脱毛, 用 75% 乙醇消毒 5min, 取其皮肤, 剪成 1cm × 0.5cm 小块, 在含有青霉素和链霉素的 D-Hanks 液中浸洗 3 次, 持续 2min, 然后在 2.5g/L 中性蛋白酶(Dispase) 37℃、5% CO₂ 条件下消化 1.5h。使真皮与表皮分离, 得到表皮后制备表皮细胞悬液, 用 70μm 滤网过滤后用离心机以 1000r/min 离心 5min, 用吸管吸取上清液丢弃, 然后加入 K-SFM 培养基, 通过移液均匀制备成细胞, 将悬浮液以 1 × 10⁵/ml 的密度接种在培养皿里。将细胞放置在 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 24h 后更换溶液, 每次更换 2d 后, 在每次更换液之前和之后都在倒置显微镜下观察细胞的生长状况。在 70% ~ 80% 的细胞融合后传代细胞。将老年组细胞分为 2 组, 一组为常规培养, 另一组在含 2.5% 药物的培养基中培养, 48h 后收集细胞进行指标检测。

2.2 采用荧光定量 RT-PCR 法检测细胞 K17mRNA 表达 总 RNA 从各细胞培养 48h 后提取, cDNA 通过逆转录合成。靶基因上游 K17 引物: 5'-ACCATCCGCCAGTTT ACCTC-3'; 下游引物: 5'-ACTACCCAGGCCACTAGCTG-3'。内参参考 GAPDH 上游引物: 5'-TATGTCGTGGAGTCTACTGGT-3'; 下游引物: 5'-GAGTTGTCATATTTCTCTGCG-3'。将扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶, 并通过凝胶成像系统扫描拍照, 各电泳带的 GAPDH 带的灰度值的比计算, 作为目的基因的相对表达量。

2.3 通过 Western 印迹检测细胞 K17 蛋白表达 收集培养 48h 后的各组细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度。10μl 上样, 电泳、转染和阻断; 一抗孵育(兔抗人 K17 抗体滴度为 1:1000), 在 4℃ 摇床中孵育过夜。二抗孵育(羊抗兔

IgG 抗体滴度为 1:2000) 1 ~ 2h; BCIP/NBT 彩色显影液彩色显影, 凝胶成像系统观察结果。以目的蛋白条带与相应内参 GAPDH 条带的灰度值比值作为其蛋白水平的相对表达量。

2.4 统计学方法 采用统计软件 SPSS 21.0 进行统计学分析, 实验数据均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数采用单因素方差分析, 组间两两比较采用方差分析、LSD 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

与年轻组比较, 老年组 K17mRNA、K17 蛋白水平升高; 经 2.5% 药物干预后, K17mRNA、K17 蛋白在衰老表皮中的水平比老年组低, 但高于年轻组。提示补益营卫方对衰老小鼠表皮 K17mRNA 表达具有明显的抑制作用。(见表 1)

表 1 补益营卫方对衰老小鼠表皮 K17mRNA、K17 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	次数	K17mRNA	K17
年轻组	3	1.02 ± 0.03	0.20 ± 0.02
老年组	3	2.73 ± 0.11 ^{ab}	0.50 ± 0.06 ^{ab}
老年组 + 2.5% 药物组	3	1.97 ± 0.09	0.34 ± 0.03

注: 与年轻组比较, ^aP < 0.05; 与老年组 + 2.5% 药物组比较, ^bP < 0.05。

4 讨论

皮肤是人体最大的器官, 因此皮肤衰老现象是最先表现于外, 也是最易发觉的。中医药在数千年的发展历程中积累了很多抗衰老的理论和经验。《伤寒论·平脉法》第 69 条曰: “寸口脉微而涩, 微者卫气衰, 涩者荣气不足, 卫气衰, 面色黄, 荣气不足, 面色青”, 指出营卫充盛, 则肌肉健壮, 容光焕发, 无衰老之象; 反之, 营卫不足, 则面色青黄, 衰象显露。因此, 营卫和皮肤的衰老密切相关^[4]。

周小平教授通过《伤寒论》和《金匮要略》对营卫相关方剂的进行挖掘、整理和分析, 并做出进一步的研究与探讨。其认为营气不足是导致身体疼痛的主要病机, 故从桂枝新加汤证中选取补益营气的人参, 从治虚劳的黄芪建中汤证选取补益卫气的生黄芪, 两药相结合, 一味为表一味为里, 一味为阴一味为阳, 两药相互为用, 再将益气、调和诸药的炙甘草加入其中, 组成补益营卫方。前期研究发现, 在亚急性皮肤衰老模型中, 补益营卫方具有抗脂质过氧化、提高胶原水平和改善衰老皮肤形态学变化的作用^[5-6]。因此, 本实验从补益营卫的角度出发, 进一步探讨补益营卫方对衰老皮肤表皮中角蛋白 K17 的表达影响。

角蛋白作为表皮和毛发角质形成细胞内的主要结构蛋白, 是角质形成和其他上皮细胞的标志性成分。其通过直径为 10nm 的微丝在细胞内形成广泛的网状结构^[7]。I 型角蛋白也被称为酸性角蛋白, 包括细胞角蛋白(K9 至 K20) 和毛发角蛋白(Ha1 至 Ha8)。II 型角蛋白也叫碱性角蛋白,

包括细胞角蛋白(K1至K8)和毛发角蛋白(Hb1至Hb6)等^[8]。角蛋白属于I型和II型中间纤维,是上皮细胞中间纤维的主要成分蛋白。角蛋白对上皮细胞和组织的稳定性和完整性具有重要的功能。角蛋白17(K17)是角质形成细胞增殖的标志性分子,是一种I型角蛋白,分子量约为46KD,等电子为5.1,全长由432个氨基酸组成,其中E(谷氨酸)、I(亮氨酸)含量较高,而G(甘氨酸)含量偏低^[9]。K17主要分布在汗腺的基底细胞和深部外毛根鞘等处,在正常的基底细胞中也有轻度表达,当表皮角质形成细胞出现异常增殖、分化时,可出现K17的异常表达^[10]。有研究表明,K17在银屑病、脂溢性角化症、基底细胞癌、鳞状细胞癌等^[11-14]常见增殖性皮肤病中有明显的表达,作为细胞增殖分子标志的K17,可能在其他增殖性皮肤病中也有表达^[15-19]。而在本实验研究中发现,老年组小鼠较年轻组小鼠的K17蛋白表达量和基因表达水平明显增高,由此可以推断这种表达量的增高可能与角质形成细胞增殖有关,年龄越大,小鼠的增殖分化越多,表明其异常表达可能是引起衰老皮肤粗糙、机械屏障功能下降的原因之一,说明其皮肤衰老越严重。经2.5%的药物干预治疗后,我们发现老年组小鼠K17的蛋白表达量和基因表达都显著下降,这说明补益营卫方能够通过降低K17mRNA和蛋白的表达,调节表皮蛋白K17的表达,有抑制细胞增殖的作用,具有维持表皮结构蛋白表达水平稳定作用,从而达到延缓皮肤衰老的作用。

综上所述,补益营卫方通过有效抑制衰老皮肤表皮中角蛋白K17基因和蛋白表达水平,具有延缓皮肤衰老的作用。

参考文献

- [1] 马卫兵. 面部衰老的原因表现形式及对策[J]. 健康向导, 2018, 24(4): 48.
- [2] 焦林君, 杨森. 皮肤性病临床教学体会[J]. 包头医学院学报, 2014, 30(1): 127-128.
- [3] 丁元庆. 《内经》营卫理论回顾[J]. 山东中医药大学学报, 2017, 41(1): 3-7.
- [4] 周小平, 傅延龄. 营卫与皮肤及皮肤衰老的关系探讨[J]. 四川中医, 2008, 26(4): 22-23.
- [5] 周小平, 马燕红, 傅延龄. 健脾胃对补营卫抗皮肤衰老作用实验研究[J]. 中国美容医学, 2006, 15(4): 453-455.
- [6] 周小平, 马燕红, 傅延龄. 健脾补肺对D-半乳糖诱导小鼠皮肤衰老模型影响的实验研究[J]. 中国美容医学, 2007, 16(2): 252-254.
- [7] HANSSON A, BLOOR BK, HAIG Y, et al. Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture[J]. Oral Oncology, 2001, 37(5): 419-430.
- [8] 蒋正强. 角蛋白17在皮肤科中的研究进展[J]. 浙江医学, 2013, 35(20): 1860-1863.
- [9] 蒋正强, 李美芳, 葛朝喜, 等. 角蛋白16和17在部分表皮肿

瘤中的表达和意义[J]. 浙江医学, 2015, 37(4): 291-294, 355.

- [10] 李晓梅, 赵玉兰, 王洪梅. CK17及CK18在肺低分化鳞癌及腺癌鉴别诊断中的应用[J]. 伤残医学杂志, 2003, 11(3): 73-75.
- [11] 姚秋楠, 魏志平. 角蛋白17与银屑病[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2017, 33(1): 62-64.
- [12] TERRINONI A, SMITH FJ, DIDONA B, et al. Novel and recurrent mutations in the genes encoding keratins k6a, k16 and k17 in 13 cases of pachonychia congenita[J]. Journal of investigative dermatology, 2001, 117(6): 1391-1396.
- [13] CHU PG, WEISS LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms[J]. Histopathology, 2010, 40(5): 403-439.
- [14] LIU JIANBO, LIU LEI, CAO LINA, et al. Keratin 17 promotes lung adenocarcinoma progression by enhancing cell proliferation and invasion[J]. Medical science monitor; international medical journal of experimental and clinical research, 2018, 24(10): 158-165.
- [15] 马敬, 艾东方, 杨秀芳, 等. 角蛋白1和17在点滴状银屑病患者皮损中的表达[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2010, 26(3): 173-174.
- [16] 张巍, 史晓蔚, 呼雷, 等. 白介素22调控角质形成细胞表达角蛋白17的研究[J]. 临床皮肤科杂志, 2011, 40(4): 199-202.
- [17] 李天英, 郑松. 原发性恶性黑素瘤的临床病理分析[J]. 广东医学, 2013, 34(22): 3417-3418.
- [18] 孙林潮, 王刚, 王岩, 等. K17反义寡核苷酸对角质形成细胞增殖和K17表达的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(11): 642-644.
- [19] ZHANG W, DANG E, SHI X, et al. The pro-inflammatory cytokine IL-22 up-regulates keratin 17 expression in keratinocytes via STAT3 and ERK1/2. [J]. PLoS ONE, 2012, 7(7): e40797.

(收稿日期: 2019-07-12)

滋补御寒粥(二)

海米粥 取海米25g与米同煮。海米性温味甘,系强壮补精之佳品。海米粥适于肾虚所致的阳痿早泄、畏寒体乏及腰膝酸软者,其补肾壮阳之效尤显,但身患疮疥、湿疹、癣症等皮肤瘙痒者忌食。

核桃粥 取核桃肉50g捣碎,与大米100g煮粥食用。核桃肉含丰富的亚油酸,有补肾、养血、健脑和强筋骨的功效。本方温补精髓力强,常食可增强御寒能力,特别适宜年老体衰、病后虚弱者。

以上粥疗方甘温助热,凡胃火炽盛、湿热内蕴、肝阳上亢及感冒患者慎用。(http://paper.cntcm.com.cn/html/content/2019-11/27/content_620343.htm)