

能减轻或消除临床症状,减少复发,同时提示有可能有消退 KOA 滑膜炎,促进关节积液吸收作用。治疗前后 KOA 关节腔积液个数有减少,但差异无统计学意义,提示在今后的研究中应加大样本量。

3.4 手法能够改善膝关节活动度、纠正关节错位、恢复膝关节静态及动态应力学平衡、加强膝关节的稳定性。通过牵拉合缝法可纠正膝关节错位及缓解下肢肌肉痉挛。

KOA 为慢性进行性退行性变,人群中 20 岁以后,特别是中老年后,随年龄增加,膝关节软骨等的退行性变不断进行和加速^[7],KOA 关节软骨退变是继发性滑膜炎关节积液的基础,本研究对膝关节保健也有非常重要意义。

参考文献

- 1 曾庆余,主编.骨关节炎[M].天津:天津科学技术出版社,1999:78-79,102,104.
- 2 吴林生,金嫣莉,主编.膝痛[M].北京:人民卫生出版社,1997:351.
- 3 王济伟,史炜镔,杜宁,等.手法治疗实验性膝骨关节炎的血流动力学研究[J].中国骨伤,1997,10(6):13-15.
- 4 杜宁,陆勇,顾翔,等.手法促进膝关节软骨修复的核磁共振病例对照研究[J].中国骨伤,2008,21(11):824-827.
- 5 吕亚南.张涛研究员手法治疗膝关节损伤经验[J].陕西中医,2007,27(10):1259-1260.
- 6 Lu YN. Comparison of the digital point pressure and massage on meridians with acupuncture[J]. J Tradit Chin Med,2009,29(2):111-114.
- 7 陆勇,丁晓毅,宋卫峰,等.汉族成人膝关节软骨厚度变化规律的研究[J].生物医学工程与临床,2007,11(5):385-389.

[收稿日期 2014-02-13][本文编辑 刘京虹 韦所苏]

课题研究·论著

来氟米特对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞增殖和凋亡的影响

程秋梅, 潘延斌, 谭美乐, 李建民

基金项目: 南宁市科学研究与技术开发计划项目(编号:2007011408C)

作者单位: 530031 广西,南宁市第二人民医院皮肤科

作者简介: 程秋梅(1986-),女,医学硕士,住院医师,研究方向:银屑病的诊治。E-mail:269202163@qq.com

通讯作者: 李建民(1964-),男,医学硕士,主任医师,研究方向:免疫性疾病、红斑鳞屑性疾病及变态反应性皮肤病的诊治。E-mail:4830380@163.com

[摘要] **目的** 观察来氟米特活性代谢产物 A771726 对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞增殖和凋亡的影响。
方法 采用 MTT 法检测细胞增殖水平的变化;流式细胞仪检测细胞凋亡;倒置相差显微镜下观察细胞形态。
结果 A771726 对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞的增殖有明显的抑制作用,具有时间-浓度依赖性;A771726 能促进细胞凋亡,凋亡率随浓度的增加而增加;倒置显微镜下观察,脂多糖组细胞呈致密单层,随着 A771726 浓度升高,细胞体积变小、细胞间隙变大、细胞内空泡增多。
结论 来氟米特可以抑制脂多糖诱导下 HaCaT 细胞增殖,促进其凋亡,这可能是来氟米特治疗银屑病的作用机制之一。

[关键词] 来氟米特; 角质形成细胞; 银屑病; 凋亡

[中图分类号] R 751 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)04-0302-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.04.09

Effects of leflunomide on the proliferation and apoptosis of the lipopolysaccharide-induced HaCaT cells

CHENG Qiu-mei, PAN Yan-bin, TAN Mei-le, et al. Department of Dermatological, the Second People's Hospital Nan-ning, Guangxi 530031, China

[Abstract] **Objective** To observe the proliferation and apoptosis of the lipopolysaccharide (LPS)-induced HaCaT cells in the presence of the active leflunomide metabolite A771726. **Methods** MTT was used to detect the level of cell proliferation; flow cytometry (FCM) was used to detect apoptosis of HaCaT cells; inverted phase contrast

microscope (IPCM) was used to observe morphologic changes. **Results** The A771726 significantly inhibited the proliferation of LPS-induced HaCaT cells, the inhibition effect was concentration-and-time dependent; the A771726 promoted cell apoptosis and the apoptosis rate increased with its concentration, the LPS group showed dense monolayer cells under an inverted microscope, as the concentration of the A771726 increased, the volume of the cells got smaller and intercellular space got larger, and the more vacuoles was observed in the cells. **Conclusion** Leflunomide can inhibit the proliferation of the LPS induced HaCaT cells and expedite their apoptosis, which may be one of the mechanisms of leflunomide in the treatment of psoriasis.

[Key words] Leflunomide; HaCaT; Psoriasis; Apoptosis

来氟米特 (leflunomide, LEF) 是一种新型的免疫抑制剂,口服后主要在胃肠道和肝脏分解代谢为活性代谢产物 A771726 而发挥药理作用。目前临床主要用于类风湿性关节炎和狼疮性肾炎的治疗。由于来氟米特具有良好的抗炎及抗增殖作用,近年来在皮肤科领域被用于治疗银屑病及天疱疮等,取得较好的效果^[1,2]。本课题采用脂多糖诱导 HaCaT 细胞(人永生化角质形成细胞)增殖,建立炎症模型,观察来氟米特活性代谢产物 A771726 对该细胞增殖和凋亡的影响,探讨其对角质形成细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂 HaCaT 细胞购自中国科学院昆明细胞库;水溶性 A771726 粉剂由美国欣凯公司上海代表处提供。RPMI-1640 培养基、胎牛血清(加拿大维森特公司生产),脂多糖、噻唑兰(MTT,美国 Sigma 公司),AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒(美国 Invitrogen),0.25% 胰酶(美国 Gibco)。

1.2 细胞培养 HaCaT 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基于 37 °C 5% CO₂ 饱和水汽细胞培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次,待细胞长成致密单层时传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞增殖检测 用 MTT 法检测 HaCaT 细胞增殖,以 0.25% 胰酶消化 HaCaT 细胞,制成细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^4 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,使每孔细胞数为 5 000 个。96 孔板边缘加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS)以防止边缘效应。24 h 细胞贴壁后,吸去旧培养液,加入 100 μ l 含终浓度为 1 μ g/ml 的脂多糖和终浓度为 10 μ g/ml、30 μ g/ml、90 μ g/ml、270 μ g/ml、810 μ g/ml 的 A771726。同时设置仅含终浓度为 1 μ g/ml 脂多糖的阳性对照组和仅含培养液的空白组。每组各复 6 孔,每孔终体积为 100 μ l。将细胞置于 37 °C 5% CO₂ 饱和水汽温箱中培养。分别于 24 h、48 h、72 h 后,每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μ l,置于培养箱孵育 4 h,吸去细胞上清液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μ l,在摇床上震荡

10 min,使用酶标仪在 492 nm 波长处检测 OD 值。计算细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{药物组 OD 值} / \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测 HaCaT 细胞凋亡以 1×10^6 个/ml 的密度将细胞悬液接种于 6 孔板,每孔 1 ml。24 h 细胞贴壁后,吸去培养液,加入 1 ml 含终浓度为 1 μ g/ml 的脂多糖和终浓度为 30 μ g/ml、90 μ g/ml、270 μ g/ml 的 A771726。同时设置仅含终浓度为 1 μ g/ml 脂多糖的阳性对照组和仅含培养液的空白组。每组各复 2 孔,每孔终体积是 1 ml。按上述分组加 A771726 终浓度分别为 30 μ g/ml、90 μ g/ml、270 μ g/ml。每组各复 2 孔。48 h 后消化收集细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次,用缓冲液重悬细胞,加入异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)工作液至细胞样本中,混匀,室温避光孵育 15 min。流式细胞仪检测分析得出凋亡散点图分为四个象限,左下象限为活细胞,左上象限为机械损伤细胞,右下象限为凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞。细胞凋亡率 = $(\text{右上象限} + \text{右下象限}) / \text{细胞比率}$ 。

1.5 倒置相差显微镜下细胞形态观察 以 1×10^6 个/ml 的密度将细胞悬液接种于 6 孔板,每孔 1 ml。(1)脂多糖组:含终浓度为 1 μ g/ml 的脂多糖,含细胞的培养基。(2)脂多糖 + A771726 组:含终浓度为 1 μ g/ml 的脂多糖,不同浓度的 A771726,含细胞的培养基。24 h 细胞贴壁后,吸去培养液,按上述分组加入相应试剂,A771726 终浓度分别为 30 μ g/ml、90 μ g/ml、270 μ g/ml。48 h 后倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.6 统计学方法 应用 SPSS17.0 软件对数据进行分析,实验结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,MTT 实验结果采用重复测量数据两因素多水平方差分析,流式细胞仪检测细胞凋亡率采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A771726 对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞在不同

时点的抑制率 用 MTT 法检测 A771726 对 HaCaT 细胞的增殖作用表明, A771726 可以抑制脂多糖诱导下 HaCaT 细胞的增殖。10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度起能够部分抑制 HaCaT 细胞的增殖, 随着浓度和时间的延长, 抑制作用逐渐增强。见表 1。

表 1 A771726 对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞在不同时点的抑制率

组别 (n=6)	抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0	0	0
脂多糖组	-21.46 \pm 3.48	-16.64 \pm 1.51	-13.74 \pm 2.20
A10 组	-13.49 \pm 1.22	-2.83 \pm 3.51	-1.40 \pm 1.73
A30 组	7.20 \pm 7.97	32.80 \pm 2.60	38.42 \pm 1.36
A90 组	20.35 \pm 8.16	42.13 \pm 2.74	47.97 \pm 0.48
A270 组	26.98 \pm 8.16	46.37 \pm 1.91	53.59 \pm 1.28
A810 组	36.13 \pm 5.48	56.66 \pm 2.09	62.27 \pm 1.21

注: $F_{\text{时间}} = 302.997, P_{\text{时间}} = 0.000; F_{\text{组别}} = 1456.631, P_{\text{组别}} = 0.000; F_{\text{时间} \times \text{组别}} = 9.581, P_{\text{时间} \times \text{组别}} = 0.000$

2.2 不同浓度 A771726 对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞作用 48 h 的凋亡率 用流式细胞仪检测结果表明, 空白组和脂多糖组凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 加入 A771726 后可诱导 HaCaT 细胞凋亡, 且凋亡率与药物剂量呈正相关。不同浓度 A771726 组凋亡细胞明显高于空白组和脂多糖组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同浓度 A771726 对脂多糖诱导下 HaCaT 细胞作用 48 h 的凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡率(%)
空白组	2	7.92 \pm 0.80
脂多糖组	2	8.01 \pm 0.70
A30 $\mu\text{g/ml}$ 组	2	15.76 \pm 0.87 Δ^*
A90 $\mu\text{g/ml}$ 组	2	23.27 \pm 0.53 Δ^*
A270 $\mu\text{g/ml}$ 组	2	29.41 \pm 1.01 Δ^*

注: 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$; 与脂多糖组比较, $*P < 0.05$

2.3 倒置相差显微镜下细胞形态变化观察结果 倒置相差显微镜下观察脂多糖组 HaCaT 细胞贴壁生长, 呈梭形、多角形。随着加入 A771726 浓度的增大, 细胞形态出现改变, 表现为细胞皱缩、体积变小、变圆, 细胞间隙变大, 漂浮细胞增多等凋亡形态改变。见图 1。



①为脂多糖组; ②为 A30 $\mu\text{g/ml}$ 组; ③为 A90 $\mu\text{g/ml}$ 组; ④为 A270 $\mu\text{g/ml}$ 组(未染色, $\times 10$)

图 1 倒置相差显微镜下的细胞形态变化

3 讨论

3.1 目前使用来氟米特治疗银屑病的临床研究绝大多数是用于关节病型银屑病。Nash 等^[3]使用来氟米特和安慰剂对 190 例关节病型银屑病患者进行的随机双盲实验显示, 来氟米特对关节和皮损的疗效明显高于安慰剂组。张改连等^[4]发现来氟米特对皮损的作用效果与甲氨蝶呤疗效相当。Behrens 等^[5]研究表明来氟米特对银屑病关节患者皮损的改善程度为 60%。然而也有研究表明来氟米特对关节炎改善效果与甲氨蝶呤相当, 但对皮损疗效低于甲氨蝶呤^[6]。来氟米特对银屑病皮肤的疗效目前尚有争议。为了解来氟米特对表皮细胞的作用机制, 我们选择 HaCaT 细胞做药物观察对象, 选用脂多糖作为刺激因子造成角质形成细胞过度增殖模型, 模拟银屑病的病理过程, 观察来氟米特活性代谢产物 A771726 对角质形成细胞增殖和凋亡的影响。

3.2 A771726 是通过抑制蛋白酪氨酸激酶和二氢乳酸脱氢酶的活性, 从而抑制细胞活化增殖。通过本实验证明, A771726 可以抑制 HaCaT 细胞增殖, 作用具有时间-浓度依赖性, 同时来氟米特还可以促进 HaCaT 细胞凋亡, 具有明显浓度依赖性。而既往有研究表明 A771726 对 HaCaT 细胞的增殖有明显抑制作用, 但对凋亡影响不大^[7], 而本实验研究发现 A771726 能促进 HaCaT 细胞凋亡, 结论与该研究不一致。考虑与实验浓度范围设置不同有关。有研究表明来氟米特是一种具有细胞保护和细胞毒性双向作用效果的免疫抑制剂^[8]。Leger 等^[9]首次报道低剂量的 A771726 (2.7 $\mu\text{g/ml}$) 能激活 PI3K/Akt 信号从而延长红白血病细胞的存活率, 减少细胞凋亡,

而较高剂量的 A771726 (27 $\mu\text{g/ml}$) 则诱导细胞凋亡。傅玉如等^[10]研究发现 A771726 对胰腺癌细胞株的增殖具有双重作用,低浓度(5 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$) 有轻度促进细胞增殖的作用,高浓度(>40 $\mu\text{g/ml}$) 则可明显抑制增殖,并能促进细胞凋亡。表明 A771726 的作用效应与剂量有明显相关性,大剂量时促进细胞凋亡,而中小剂量则对细胞凋亡可能无明显影响。A771726 对细胞凋亡的具体机制仍需要进一步研究。

3.3 角质形成细胞的过度增殖是银屑病的主要病理特点之一,而抑制角质形成细胞的增殖是治疗银屑病的作用靶点之一。我们的实验表明来氟米特对角质形成细胞具有良好的抗增殖作用,可以尝试用于治疗银屑病,今后可开展临床试验进一步验证其对皮损的疗效。

参考文献

- 1 Tlacuilo-Parra JA, Guevara-Gutiérrez E, Rodríguez-Castellanos MA, et al. Leflunomide in the treatment of psoriasis: results of a phase II open trial[J]. Br J Dermatol, 2004, 150(5): 970-976.
- 2 王万卷,王颖娟,陈丽. 来氟米特治疗皮质激素减量困难的寻常型天疱疮临床研究[J]. 陕西医学杂志, 2006, 35(6): 661-662.
- 3 Nash P, Thaci D, Behrens F, et al. Leflunomide improves psoriasis in patients with psoriatic arthritis: an in-depth analysis of data from the TOPAS study[J]. Dermatology, 2006, 212(3): 238-249.
- 4 张改连,黄烽,张江林,等. 来氟米特与甲氨蝶呤治疗银屑病关节炎皮肤病变的临床研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2011, 14(4): 256-258.
- 5 Behrens F, Finkenwirth C, Pavelka K, et al. Leflunomide in psoriatic arthritis: results from a large European prospective observational study [J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2013, 65(3): 464-470.
- 6 王刚. 重症银屑病的治疗[J]. 皮肤病与性病, 2011, 33(6): 327-328.
- 7 郭志丽,顾军,米庆胜,等. 来氟米特对角质形成细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(10): 580-582.
- 8 Vrenken TE, Buist-Homan M, Kalsbeek AJ, et al. The active metabolite of leflunomide, A771726, protects rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis[J]. J Hepatol, 2008, 49(5): 799-809.
- 9 Leger DY, Liagre B, Beneytout JL. Low dose leflunomide activates signalling in erythroleukemia cells [J]. Apoptosis, 2006, 11(10): 1747-1760.
- 10 傅玉如,陈梅. A771726 对胰腺癌细胞株 Capen2 增殖及凋亡的作用[J]. 中国临床医药研究杂志, 2003, (110): 115-116.

[收稿日期 2014-02-10][本文编辑 黄晓红 韦颖]

博硕论坛·论著

哮喘儿童肺通气功能检测的临床分析

陈泓伶, 谢庆玲, 贺海兰, 黎重清, 温志红

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院儿科

作者简介: 陈泓伶(1988-),女,在读研究生,研究方向:儿童呼吸系统疾病的诊治。E-mail: 775408279@qq.com

通讯作者: 谢庆玲(1961-),女,大学本科,医学学士,主任医师,研究方向:儿童呼吸系统疾病的诊治。E-mail: qinglingxie@aliyun.com

[摘要] **目的** 通过监测哮喘儿童急性发作期与缓解期肺通气功能各指标变化情况,了解其在儿童哮喘病情评估及指导治疗中的作用。**方法** 应用德国 Jaeger Master Screen 肺功能仪对 43 例 5~12 岁哮喘急性发作期和经治疗后进入缓解期的哮喘儿童进行肺通气功能检测,包括大气道指标(FVC、FEV1、FEV1/FVC、PEF)及小气道指标(FEF25、FEF50、FEF75、MMEF75/25),同时收集哮喘患儿病史资料和治疗情况。**结果** 哮喘急性发作期患儿肺功能指标 FVC、FEV1、FEV1/FVC、PEF 与缓解期及健康对照组儿童比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);哮喘缓解期患儿的 FVC、FEV1、PEF 与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。小气道功能指标 FEF25、FEF50、FEF75、MMEF75/25 在哮喘急性发作期患儿中均明显降低,与缓解期组及健康对照组儿童相比差异有统计学意义($P < 0.01$);哮喘治疗缓解期组中 FEF25、FEF50、FEF75、MMEF75/25 仍低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。哮喘急性发作期不同严重程度患儿的肺通气功能指标(FVC% pred、FEV1% pred、PEF% pred、FEF25% pred、FEF50% pred、FEF75% pred、MMEF75/25% pred)随哮喘严重程度增加各指标越低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 哮喘急性发作期肺通气功能受损,治疗缓解后小气道肺功能指标仍低于正常。肺通气功能的小气道功能指标在儿童哮喘的病情评估及治疗监测指导中意义更大。