

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.15.005

文章编号: 1005-8982(2019)15-0021-05

## 回阳固元方对人乳头瘤病毒感染 细胞凋亡的影响研究\*

曹萍<sup>1</sup>, 朱伟<sup>2</sup>, 杨同华<sup>1</sup>

(1. 云南省第一人民医院 皮肤科, 云南 昆明 650032;  
2. 昆明理工大学, 云南 昆明 650504)

**摘要:** **目的** 探讨回阳固元方对人乳头瘤病毒感染细胞凋亡的影响。**方法** 用不同浓度回阳固元方, 经 Transwell(转换池)吸收后, 与尖锐湿疣患者皮损中提取的角质形成细胞-单细胞悬液作用, 通过流式细胞仪测定其细胞周期及细胞凋亡。**结果** 固定中药浓度 20  $\mu\text{g/ml}$ , 随着时间的变化, G1 期细胞数量减少, G2 期细胞数量逐渐增多, S 期细胞数量较正常组减少, 角质形成细胞的凋亡率也逐渐增加; 固定时间 48 h, 随着中药浓度的增加, G1 期细胞数量降低, G2 期细胞数量极少, S 期细胞较正常组减少, 角质形成细胞的凋亡率呈逐渐增加的趋势 ( $P < 0.05$ )。**结论** 回阳固元方可诱导人乳头瘤病毒感染细胞的凋亡。

**关键词:** 尖锐湿疣; 角质形成细胞; 细胞培养; 细胞周期; 细胞凋亡

**中图分类号:** R572

**文献标识码:** A

## Effect of HuiYangGuYuan prescription on cell apoptosis of human papillomavirus infection\*

Ping Cao<sup>1</sup>, Wei Zhu<sup>2</sup>, Tong-hua Yang<sup>1</sup>

(1. Department of Dermatology, The First People's Hospital of Yunnan Province, Yunnan, Kunming 650032, China; 2. Kunming University of Science and Technology, Yunnan, Kunming 650504, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of HuiYangGuYuan Prescription on apoptosis of human papilloma virus infected cells. **Methods** Keratinocytes extracted from skin lesions of condyloma acuminatum patients was co-incubated with different concentrations of HuiYangGuYuan Prescription in Transwell pool system. Cell suspension was measured by flow cytometry. Cell cycle and apoptosis status was obtained. **Results** When concentrations of HuiYangGuYuan Prescription was remained on 20  $\mu\text{g/ml}$ , the number of G1 and S cells cell was decreased while G2 cells and apoptosis rate were increased along with increase of incubation time. When cells was co-incubated with HuiYangGuYuan Prescription for 48 hours, the number of G1 cell and S cells was significantly decreased while the apoptosis rate was increased in dose dependent manner ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HuiYangGuYuan Prescription may induce human papilloma virus infected cells.

**Keywords:** condyloma acuminatum; keratinocyte; cell culture; cell cycle; cell apoptosis

人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 是一种小分子 DNA 病毒, 容易吸附在人体皮肤及黏膜诱

发疾病。尖锐湿疣 (condyloma acuminatum, CA) 是由 HPV 感染引起的生殖器皮肤增生性疾病, 也是性传播

收稿日期: 2018-11-17

\* 基金项目: 云南省科技厅项目 (No: 2013FZ187)

疾病的一种,其发病率在我国性传播疾病中位居前列,在性接触较高的欧美国家,其发病率更高。因此,CA 受到全球学者的广泛关注<sup>[1-2]</sup>。

回阳固元方由回阳饮演化而来,回阳饮为清代四川名医郑钦安治疗下元亏损而设,以此为基础,云南省已故著名温阳大家吴附子吴佩衡先生创制大回阳饮<sup>[3]</sup>,临床上对多种中西医难治的疾病疗效颇佳。该方含附子、干姜,附子为第一温阳药,国内知名的温阳大家吴附子吴荣祖先生继续发展为回阳固元方,对包括 CA 在内的难治性疾病的疗效有很大提高。本研究用不同浓度的回阳固元方,探讨该方的扶正作用对 HPV 感染细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

标本皮肤组织取自云南省第一人民医院皮肤科 CA 患者局部切除的皮损 (HPV 感染组)。正常组皮肤组织为本院泌尿外科正常人包皮切除组织。器材一次性塑料培养瓶、培养板及塑料冻存管 2 ml (美国 Corning 公司),常规手术器械 (淮安市医疗用品厂),0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤器 (美国 Millipore 公司),荧光定量 PCR 仪 CFX96 (美国 BIO-RAD 公司),超净工作台 (苏净集团州安泰空气技术有限公司),5% 二氧化碳  $\text{CO}_2$  细胞培养箱 (美国 Heraeus 公司),倒置显微镜 (日本 Nikon 公司),酶标仪 (奥地利 Clini Bio 公司),直径 10 cm 细胞培养瓶和 96 孔培养板 (美国 Falcon 公司);流式细胞仪 FACS Calibur (美国 Becton Dickinson 公司)。

胰酶、PBS、青链霉素 (以色列 BI 公司),荧光定量 PCR 试剂盒: CWBIO CW09570, RNase (美国 Sigma 公司),胰酶抑制剂、限制性角质形成细胞无血清培养基 (美国 Gibco 公司),Dispase II (瑞士 ROCHE 公司)。二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB)、苏木精、细胞角蛋白 (广谱) CK (Pan)、鼠抗人单克隆抗体及二抗生物素标记的兔抗鼠 IgG (福州迈新生物技术开发有限公司)。Caco-2 细胞购置于中国科学院昆明细胞库。

### 1.2 方法

**1.2.1 CA 患者皮损处角质形成** 细胞的分离与培养、细胞形态学观察及鉴定、细胞周期的检测参照文献 [4]。

**1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡** 对于贴壁细胞,可将细胞直接接种于盖玻片培养细胞并诱导细胞凋亡。将回阳固元方不同药物浓度作用后的角质形成细胞采用细胞爬片的形式生长于盖玻片,诱导细胞凋亡,并设

立阴性对照组;取出盖玻片然后用 PBS 冲洗细胞 2 次,冲洗过程中不宜过于激烈以免冲走细胞;在 500  $\mu\text{l}$  缓冲液中加入 5  $\mu\text{l}$  磷脂结合蛋白 (Annexin V-FITC), 5  $\mu\text{l}$  碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 混匀;将上述溶液滴加于盖玻片表面,使盖玻片表面均匀覆盖、避光,室温反应 5 min。将盖玻片倒置于载玻片,于荧光显微镜下、双色滤光片 (FITC 和罗丹明) 观察。Annexin V-FITC 荧光信号呈绿色,PI 荧光信号呈红色。检测的细胞凋亡结果中,UL 区为坏死细胞区,LL 区为细胞存活区,LR 区为早期凋亡区,UR 区为晚期凋亡区,细胞凋亡率 = (LR+UR) / LL,以此统计不同浓度、时间段的细胞凋亡率。

**1.2.3 人结肠癌上皮细胞 Caco-2 模型的建立** 将 Caco-2 细胞接种于转运池 (Transwell) 中的微孔滤膜上可形成单层细胞层,是用来模拟小肠上皮细胞层的吸收模型,该滤膜可由硝酸纤维素或者多聚碳酸酯制成。由于多聚碳酸酯膜不会形成药物扩散过程中的屏障,所以常选用多聚碳酸酯膜作为细胞单层模型的支架。取出冷冻的 Caco-2 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中快速融化,用吸管吹打成单细胞悬液,转入 15 ml 离心管中,加入含 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM (高糖) 培养基,混匀后 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,充分吹打成单细胞悬液,再混匀后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入适量含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基重悬,吹打,调整细胞密度在  $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  个/L 左右,然后接种于 Transwell<sup>TM</sup> 细胞培养皿中 (2 ml/孔),共 6 孔,在培养皿的下腔加入 1 ml 的 DMEM 培养基,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  湿度为 90% 的培养箱中培养。第 2 天取出细胞,显微镜观察细胞的生长贴壁情况,弃出旧培养基,并加入新鲜培养基,然后拍照记录,以后培养过程中每隔 1 天更换 1 次培养基,并持续观察细胞生长状。结果表明,Caco-2 细胞约在接种后 1 周长至培养皿的 70% ~ 80%,再持续培养才可以长满至整个培养皿。通过对 Caco-2 细胞长满后每个孔的观察,结果发现细胞融合成完整的细胞层,细胞间连接紧密;该细胞形态与小肠上皮细胞极为相似,从形态学上可以确定所培养细胞为 Caco-2 细胞,细胞单层膜完整性较好,可用于药物吸收的转运实验。

**1.2.4 回阳固元方的制备回流提取法** 在应用乙醇等易挥发的有机溶剂作为溶媒提取中药中有效成分时,为减少溶媒的使用量和溶媒的消耗,而采用加热提取,是使溶媒挥发冷却后重新回流至锅内的一种方法。秤

取制附子 20 g, 干姜 15 g, 肉桂 10 g, 炙甘草 15 g, 麻黄 10 g, 细辛 3 g, 将称取好的中药材加工成细段或者粗粉放入多功能提取罐中, 加入 5 倍量蒸馏水浸泡 30 min, 用夹层蒸汽加热, 并及时打开冷凝器的冷却水, 沸腾时先排除罐内空气, 否则会使锅内带压, 再关闭排气阀。60 min 后收集滤液, 将滤液回流抽提 30 min, 过滤, 加入 3 倍量的蒸馏水回流抽提 30 min, 过滤, 低温低压浓缩成 1 g/ml 的提取液共 50 ml, 经 3 500 r/min 离心 5 min, 离心 3 次, 再以 13 000 r/min 离心 5 min, 离心 3 次, 最后用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$  密封无菌保存, 使用前再用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌。经回流抽提得到回阳固元方的浓缩液, 低温低压再浓缩成 1 g/ml 的提取液, 稀释成 5 个浓度梯度, 分别是 5、10、20、40 及 80  $\mu\text{g/ml}$ 。作用于目标细胞时分 5 个时间段, 分别是 12、24、48、72 及 96 h, 然后测得不同中药浓度和不同时间段的细胞指标。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 对数据进行方差齐性检验 (ANOVA) 分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CA 皮损处角质形成细胞

正常组皮肤组织获得的单细胞悬液, 在光学显微镜下可见细胞呈典型的的上皮样特征, 呈铺路石状, 细胞核较大, 且可见含有多个细胞核的细胞, 细胞质内含有较多颗粒, 细胞排列紧密折光性较好。CA 皮损处角质形成细胞培养制成的单细胞悬液, 细胞形态无铺路石状, 细胞近似圆形, 可在体外稳定培养。见图 1、2。

### 2.2 Caco-2 细胞

Caco-2 细胞形态呈不规则状, 细胞排列紧密, 具有微绒毛结构, 类似于小肠上皮细胞。Transwell (转运池) 建立, Caco-2 细胞培养于多聚碳酸酯膜上, 排列紧密后使药物透过 Caco-2 细胞层作用于目标细胞或者收集透过后的滤液无菌保存, 供后续实验使用。见图 3、4。

### 2.3 细胞凋亡

经 HPV 感染的角质形成细胞其凋亡率有所降低。见图 5、6。

固定 48 h 后, 不同药物浓度 HPV 感染角质形成细胞的凋亡率比较, 差异有统计学意义 ( $F = 159.932, P = 0.000$ ), 随着中药浓度的增加, 凋亡率逐渐增加; 固

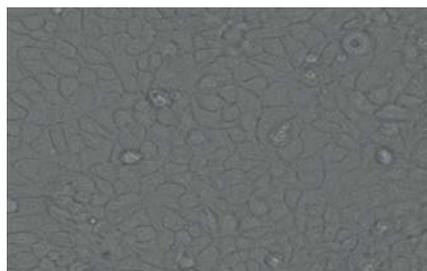


图 1 正常角质形成细胞 ( $\times 200$ )



图 2 CA 皮损角质形成细胞 ( $\times 200$ )

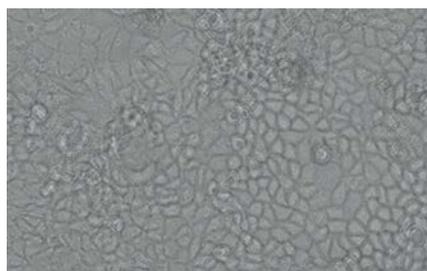


图 3 Caco-2 细胞 ( $\times 200$ )

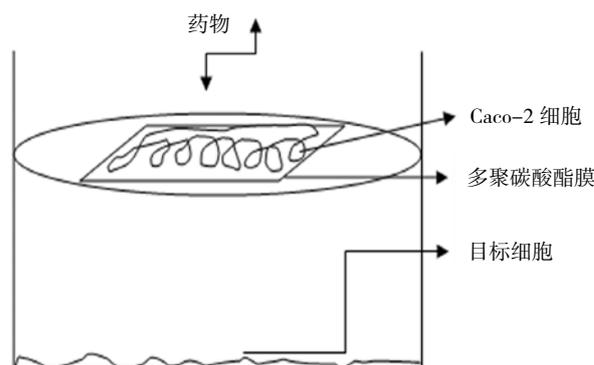


图 4 Transwell (转运池)

定药物浓度 20  $\mu\text{g/ml}$  后, 不同作用时间 HPV 感染角质形成细胞的凋亡率比较, 差异有统计学意义 ( $F = 140.794, P = 0.000$ ), 随着时间的增加, 角质形成细胞的凋亡率逐渐增加。见表 1、2。

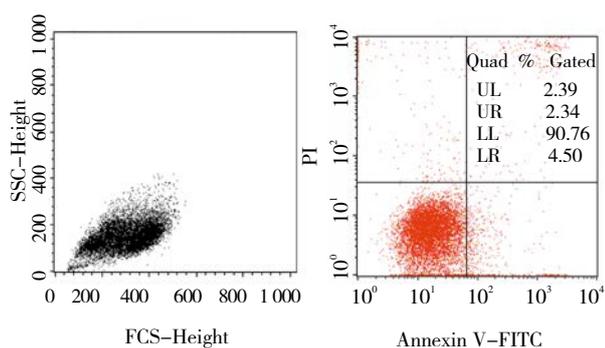


图 5 正常角质形成细胞凋亡

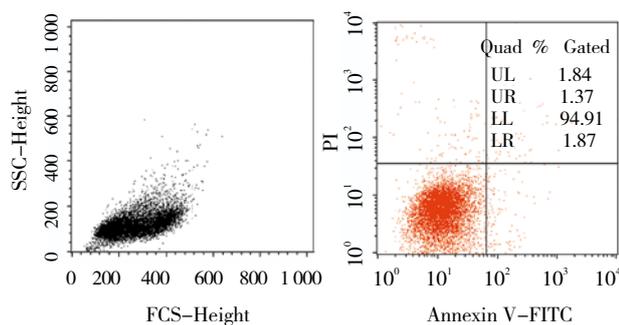


图 6 感染角质形成细胞凋亡

表 1 48 h 不同药物浓度 HPV 感染角质形成细胞的凋亡率

药物浓度	UL	LL	LR	UR	凋亡率/(%, $\bar{x} \pm s$ )
5 $\mu$ g/ml	3.84	84.91	7.87	3.37	13.64 $\pm$ 1.23
10 $\mu$ g/ml	1.94	78.22	15.50	4.34	24.36 $\pm$ 3.65
20 $\mu$ g/ml	3.91	71.17	13.73	11.19	36.74 $\pm$ 4.21
40 $\mu$ g/ml	3.71	64.97	14.14	17.18	49.27 $\pm$ 5.74
80 $\mu$ g/ml	2.03	55.30	14.57	29.10	76.35 $\pm$ 8.21

表 2 20  $\mu$  g/ml 不同作用时间 HPV 感染角质形成细胞的凋亡率

作用时间	UL	LL	LR	UR	凋亡率/(%, $\bar{x} \pm s$ )
12 h	3.41	87.03	4.59	4.97	10.98 $\pm$ 1.12
24 h	4.44	81.04	8.21	6.31	17.92 $\pm$ 2.24
48 h	3.71	70.97	13.13	12.19	35.68 $\pm$ 3.65
72 h	5.54	64.93	18.81	10.72	45.48 $\pm$ 4.57
96 h	5.82	59.68	22.55	11.95	57.81 $\pm$ 6.16

### 3 讨论

角质形成细胞受损可引起多种疾病，而 CA 是其中较严重的一种，目前其根除性治疗仍是临床中的一大难题<sup>[5]</sup>。在 CA 的发病过程中，角质形成细胞出现诸多

变化，如何调整角质形成细胞的细胞周期是解决 CA 治疗的关键所在<sup>[6]</sup>。1975 年 RHEINWALD 和 GREEN<sup>[7]</sup>首次在体外成功培养角质形成细胞，该里程碑式的成就为人类修复皮肤缺损奠定基础。1981 年 O'CONNOR 培养适于移植的人自体表皮细胞膜片<sup>[8]</sup>，为体外构建组织工程皮肤及临床应用提供重要的实验依据。但是关于角质形成细胞周期的研究甚少，如何阐述细胞周期与 CA 的发生、发展的相关性，是未来研究 CA 治疗的趋势。本研究发现，CA 皮损处角质形成细胞在培养过程中易受白假丝酵母菌的污染，连续传代及反复冻融都会破坏其细胞固有的生物学特性<sup>[9]</sup>。在检测 CA 发病前后角质形成细胞周期及细胞增殖能力发现，感染 HPV 后的角质形成细胞其周期缩短，导致细胞的增殖能力增强，使感染者快速出现皮损。临床中常用直接去除疣体的办法来治疗 CA，但治标不治本，CA 仍有较高的复发率。宿主局部免疫抑制和对 HPV 蛋白的异常识别导致的病毒免疫逃逸和持续感染是 HPV 感染相关疾病难以根治的主要原因<sup>[10]</sup>。

关于 CA 的中医治疗，国内外研究得不多<sup>[11]</sup>，而且几乎是以清热除湿祛邪为主，扶正固本者较少，中医抗 HPV 感染的治疗应抓住主流本质。本课题用极富云南特色的回阳固元方来诱导驯化 HPV 感染的角质形成细胞，利用人结肠癌上皮细胞 Caco-2 模型模拟人体小肠上皮细胞<sup>[12]</sup>，类似人体内环境，更接近于中药的体内吸收过程。通过测定中药作用后 CA 皮损角质形成细胞的凋亡率发现，随着作用时间和中药浓度的增加，角质形成细胞的凋亡率呈逐渐增加的趋势，说明回阳固元方的扶正作用可诱导驯化患者皮损处的角质形成细胞，促使其细胞凋亡。

CA 的发病机制尚不清楚，深入研究其发病机制对与皮损角质形成细胞有关的皮肤病有着重要的理论和实践意义，提示可以从细胞凋亡的途径来治疗相关的皮肤病，为其治疗开辟新的领域。

### 参 考 文 献:

[1] BHATIA N, LYNDE C, VENDER R et al. Understanding genital warts: epidemiology, pathogenesis, and burden of disease of human papillomavirus[J]. *Cutan Med Surg*, 2013, 17(12): 47-54.  
 [2] CHENG H, ZHANG N, DING D, et al. HPV type 16 infection switches keratinocytes from apoptotic to proliferative fate under TWEAK/Fn14 interaction[J]. *Invest Dermatol*, 2015, 135(10): 2427-2436.  
 [3] RHEINWALD J G, GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing

- colonies from single cells[J]. *Cell*, 1975, 6(3): 331-334.
- [4] 朱伟, 曹萍, 李永福. 尖锐湿疣患者角质形成细胞的培养及其生物学特性鉴定 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(11): 1150-1153.
- [5] FEIZOLLAH N, KHALIL R, AMIR REZA M, et al. Giant condyloma acuminatum of vulva frustrating treatment challenge[J]. *World J Plast Surg*, 2015, 4(2): 159-162.
- [6] GUDISEVA C, SWETHA P, GLENN M, et al. Differential effects of hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor on corneal epithelial cell cycle protein expression, cell survival, and growth[J]. *Molecular Vision*, 2014, 20(1): 24-37.
- [7] RHEINWALD J G, GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells[J]. *Cell*, 1975, 6(3): 331-334.
- [8] IMAN A, ALIAKBAR M, KHOSRAVI M, et al. Comparison of intradermal injection of autologous epidermal cell suspension vs. spraying of these cells on dermabraded surface of skin of patients with Post-Burn hypopigmentation[J]. *Indian Journal of Dermatology*, 2013, 58(3): 240.
- [9] KIM D H, DASHLKHUMBE B, WEN H. WU et al. Different characteristics of reactive oxygen species production by human keratinocyte cell line cells in response to allergens and irritants[J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(2): 99-103.
- [10] TORRES-POVEDA K, BAHENA-ROMÁN M, MADRID-GONZÁLEZ C, et al. Role of IL-10 and TGF-beta1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(4): 753-763.
- [11] REDVERS R P, AMY L I, PRITINDER K A U R. Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 13168-13173.
- [12] 杨秀伟, 郭庆梅, 王莹. 独活中 6 种香豆素类成分在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运研究 [J]. *中西医结合学报*, 2008, 6(4): 392-398.

(王荣兵 编辑)