

基于生物信息学及动物实验探讨健脾解毒汤调控自噬干预银屑病的 作用

许孟月¹, 刘学伟^{2*}, 王子雯¹, 贾皇超¹, 王丽云¹, 刘红霞^{3*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院皮肤科, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450000;
3. 新疆维吾尔自治区中医医院皮肤科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 通过生物信息学和动物实验探讨健脾解毒汤调控自噬干预银屑病的作用。**方法** 从中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、Human Autophagy Database 数据库及基因表达综合数据库 (GEO) 中筛选出“健脾解毒汤-自噬-银屑病”差异表达基因 (DEGs)。利用 R 软件对 DEGs 进行基因本体 (GO) 生物功能分析、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 通过构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 筛选出健脾解毒汤治疗银屑病自噬相关的核心基因, 并进行风险因子的相关性分析。将 48 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组和健脾解毒汤低、中、高剂量组, 检测大鼠 MPASI 评分, HE 染色观察皮肤组织病理改变, ELISA 法检测血清 IL-17A、IL-22 水平, Western blot 法检测皮肤组织 PI3K、Akt、mTOR、Beclin1、LC3、p62 蛋白的表达。**结果** 共获得“健脾解毒汤-自噬-银屑病”差异表达基因 21 个。GO 富集提示主要涉及上皮细胞增殖、细胞对金属离子的反应、细胞对无机物的反应、细胞对氧化应激的反应等, KEGG 富集提示主要涉及 PI3K/Akt、HIF-1、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、IL-17 等信号通路。通过 PPI 网络筛选得到与银屑病自噬密切相关的 9 个核心基因, 核心基因的风险因子相关性分析结果验证了上述基因对银屑病的临床预测效能。动物实验结果表明, 与正常组比较, 模型组表皮角化过度伴角化不全, 表皮突向下延伸, 炎症细胞浸润, 真皮浅层内血管扩张, MPASI 评分升高 ($P < 0.01$), 血清 IL-17A、IL-22 水平升高 ($P < 0.01$), 皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p62 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), Beclin1、LC3 的蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 健脾解毒汤各剂量组 MPASI 评分和血清 IL-17A 水平降低 ($P < 0.01$); 健脾解毒汤中、高剂量组血清 IL-22 水平降低 ($P < 0.01$), 皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、mTOR 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Beclin1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 健脾解毒汤高剂量组皮肤组织 LC3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), P62 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 健脾解毒汤通过调控自噬干预银屑病的作用可能与 Akt、mTOR、BECN1 等关键分子靶点及其介导的 PI3K/Akt 信号通路密切相关。

关键词: 健脾解毒汤; 银屑病; 自噬; 生物信息学; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)09-3124-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.047

银屑病是一种慢性炎症性皮肤病, 全球约有 3 亿至 4 亿人罹患此病^[1]。银屑病不仅对患者的身体造成负面影响, 还常伴随焦虑、抑郁情绪, 使患者面临着心理和生理的双重挑战。传统的治疗方法可能导致皮肤萎缩、增加感染风险等问题, 生物制剂存在适应性限制、价格高昂的弊端^[2]。因此, 寻找一种安全、有效的治疗方法成为当前研究的热点之一。

中医药在银屑病治疗领域展现出独特优势。岐黄学者刘红霞基于新疆气候干燥、饮食多肉类易生湿化热, 伤及脾

胃的地域特点创制健脾解毒汤, 临床疗效显著^[3]。健脾解毒汤由土茯苓、绵萆薢、黄柏等 11 味中药组成。前期研究证实, 健脾解毒汤可以促进水通道蛋白 3 (aquaporin3, AQP3) 表达, 调节水液平衡^[4], 降低血清白细胞介素 (interleukin, IL) -17A 水平, 发挥治疗银屑病的作用^[5]。研究发现, 银屑病皮损存在自噬抑制现象^[6], 自噬相关蛋白表达降低直接影响角质形成细胞增殖与免疫功能, 恢复表皮的自噬水平有助于减轻炎症、修复皮肤屏障功能。结合近期药物治疗银屑病的机制在自噬途径上富集^[7], 由此

收稿日期: 2024-11-13

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (81960871); 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目 (2021B03001-2)

作者简介: 许孟月 (1994—), 女, 博士, 住院医师, 从事中医药防治皮肤病的研究。Tel: 15136483348, E-mail: 937151548@qq.com

* **通信作者:** 刘学伟 (1975—), 男, 博士, 主任医师, 从事中医药防治皮肤病的研究。Tel: 13939012767, E-mail: liuxuewei2004@aliyun.com

刘红霞 (1960—), 女, 主任医师, 从事中医、中西医结合治疗皮肤病的研究。Tel: 13999872599, E-mail: 1877538293@qq.com

可知调控自噬可能是治疗银屑病的一个突破口。因此,本研究将运用生物信息学技术筛选与银屑病密切相关的自噬差异基因,通过外部数据集和动物实验双重验证健脾解毒汤干预银屑病的作用机制是否与自噬有关。

1 材料

1.1 药物 健脾解毒汤由土茯苓 30 g、绵萆薢 10 g、黄柏 10 g、苦参 10 g、连翘 30 g、生薏仁 30 g、茯苓 10 g、炒白术 10 g、白花蛇舌草 30 g、丹参 10 g、炙甘草 6 g 组成,药材购自新疆维吾尔自治区中医院中药房。首先将所有药材加冷水浸泡 60 min,武火煎煮药液沸腾后,改文火煎煮 30 min,纱布过滤,滤渣加入适量冷水再用武火煎煮沸腾后,改用文火煎煮 20 min,纱布过滤,合并 2 次滤液,95 ℃ 水浴浓缩后,于 4 ℃ 冰箱保存备用。大黄配方颗粒剂(江阴天江药业有限公司,批号 2108042301,规格 2 g/袋,每 1 g 配方颗粒相当于饮片 3 g);5% 咪喹莫特乳膏(四川明欣药业有限责任公司,批号 211013);甲氨蝶呤片(湖南正清制药集团股份有限公司,批号 210905,规格 2.5 mg/片)。

1.2 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量 180~200 g,购自新疆医科大学[实验动物生产许可证号 SCXK(新)2018-0002],饲养于新疆医科大学动物饲养中心[实验动物使用许可证号 SYXK(新)2018-0003],温度(23±2)℃,相对湿度(60±10)%,期间大鼠自由摄食饮水,实验经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 20210822-08)。

1.3 试剂 BCA 蛋白定量试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司,货号 DQ111-01);IL-17A 试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,货号 EK317/3);IL-22 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号 CSB-E14918r);Anti-PI3 Kinase p85 alpha 抗体、Anti-PI3 Kinase p85 alpha (phospho Y607) 抗体、重组 Anti-mTOR 抗体[EPR390(N)]、重组 Anti-mTOR (phospho S2448) 抗体[EPR426(2)]、Phospho-Akt (Ser473) 抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab191606、ab182651、ab134903、ab109268、ab81283);Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb 抗体(美国 CST 公司,货号 4691S);苏木素染液(福州迈新生物技术开发有限公司,货号 CTS-1097);伊红染液、中性树胶(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号 ZLI-9613、ZLI-9555)。

1.4 仪器 xMark™ 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);DYCZ-24DN 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Chemscope 3000 型化学发光成像仪系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 生物信息学分析

2.1.1 健脾解毒汤活性成分及靶点的筛选 在 TCMS 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/index.php>)中检索土茯苓、绵萆薢、黄柏、苦参、连翘、生薏苡仁、茯苓、炒白

术、白花蛇舌草、丹参、炙甘草的化学成分,根据口服生物利用度(OB)≥30%且类药性(DL)≥0.15 的标准筛选出各药物的有效成分。将有效成分的靶点导入 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>),查询与靶点对应的基因名称并进行注释,对结果进行去重,得到健脾解毒汤的靶点信息。

2.1.2 “健脾解毒汤-自噬-银屑病”差异基因筛选 从 GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库中检索与银屑病相关的数据集,筛选标准定义为“生物组织样本”;样本信息完整且总样本量≥6 个。自噬相关基因信息表从 Human Autophagy Database 数据库中获取并进行整理。利用 Venn 图法将银屑病、自噬相关基因与健脾解毒汤靶点取交集得到自噬相关差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。

2.1.3 DEGs 相关性分析 为进一步研究健脾解毒汤治疗银屑病自噬相关 DEGs 的相互关系,利用“Spearman”法分析 DEGs, R 语言“ggplot2”包进行可视化处理。

2.1.4 DEGs 富集分析 运用 R 语言“clusterProfiler”“org. Hs. eg. db”“GOplot”包对健脾解毒汤治疗银屑病潜在自噬相关 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析,同时计算 Z score 值,以 P<0.05 为条件筛选富集显著的 GO 条目及 KEGG 通路。

2.1.5 蛋白互作网络的构建及核心靶点筛选 将筛选出的健脾解毒汤治疗银屑病潜在自噬相关 DEGs 导入 STRING 12.0 数据库(<https://string-db.org>),高等置信度得分设定为 > 0.7,构建蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。将导出的“TSV”格式文件输入 Cytoscape 3.10.1 软件中,进行 PPI 网络优化。利用 Cytoscape 中的 cytohubba 插件,通过 MCC、Betweenness、Degree、Closeness 值 4 种计算方法对健脾解毒汤干预银屑病自噬相关 DEGs 筛选核心基因(各种算法中均排前 10),之后取这些基因的交集,得到核心基因。

2.1.6 自噬 DEGs 与风险因子相关性分析 为进一步研究自噬 DEGs 与高风险因子的相互关系,利用 R 语言“corrplot”和“circlize”包对其进行分析,得出关键基因,最后进行可视化处理。

2.2 动物实验验证

2.2.1 分组、造模及给药 将 48 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组和健脾解毒汤低、中、高剂量组,每组 8 只。大鼠除去背部皮肤被毛(3 cm×3 cm),正常组大鼠给予凡士林涂抹背部剃毛区,其余组根据前期研究结果^[8],确定每天给予 5% 咪喹莫特 62.5 mg 涂抹背部剃毛区,同时每天灌胃给予大黄配方颗粒剂(10 g/kg),连续 10 d,造模成功后,甲氨蝶呤组每天给予甲氨蝶呤片 0.97 mg/kg,健脾解毒汤每天按照低、中、高剂量(2.32、4.64、9.26 g/kg)灌胃,正常组和模型组灌胃给予等体积生理盐水,连续 14 d。在给药结束后,腹主动脉取血,剪取背部皮肤,将血清及皮肤组织置于

-80 ℃冰箱保存备用。

2.2.2 皮肤组织病理学观察 剪取背部皮损处皮肤，于4%多聚甲醛中固定48 h，脱水包埋，切片，进行常规HE染色，封片后于光学显微镜下观察。

2.2.3 银屑病皮损面积和严重程度指数测定 根据红斑、鳞屑、浸润的程度进行评分，大鼠银屑病皮损面积和严重程度指数 (mice psoriasis area and severity index, MPASI) 评分标准为0分表示无症状，1分表示轻微症状，2分表示中度症状，3分表示重度症状，4分表示极重度症状，总分为三者评分之和。

2.2.4 血清炎症相关指标检测 严格按照试剂盒说明书操作，采用ELISA法检测血清IL-17A、IL-22水平。

2.2.5 Western blot法检测皮肤组织相关蛋白表达 取于液氮中保存的100 mg皮肤组织，加入400 μL RIPA裂解液，4 ℃放置60 min，12 000 r/min离心15 min，收集上清，采用BCA法测定蛋白浓度，上样，SDS-PAEG凝胶电泳分离蛋白，将蛋白转移至PVDF膜，加入5%脱脂奶粉封闭液封闭2 h，TBST洗涤3次，加入磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶B

(protein kinase B, Akt)、p-Akt、雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR、Beclin1、泛素结合蛋白 (sequestosome 1, p62)、微管相关蛋白1轻链3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 一抗4 ℃孵育过夜，次日TBST洗涤后加二抗室温孵育1 h，采用化学发光法显影，曝光拍照，以β-actin为内参，通过Image J软件定量分析，计算目的蛋白相对表达量。

2.2.6 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理，计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析，方差齐时进一步两两比较采用LSD法，方差不齐时采用Dunnett's T3法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 生物信息学分析

3.1.1 药物有效成分及潜在靶点 基于TCMSP数据库，以OB $\geq 30\%$ 且DL ≥ 0.15 为筛选条件，共得到312种活性成分，其中白花蛇舌草7种、白术7种、丹参65种、茯苓15种、甘草92种、黄柏32种、苦参45种、连翘23种、绵萆薢2种、土茯苓15种、薏苡仁9种，去重后得到223种活性成分，299个靶点。见图1。

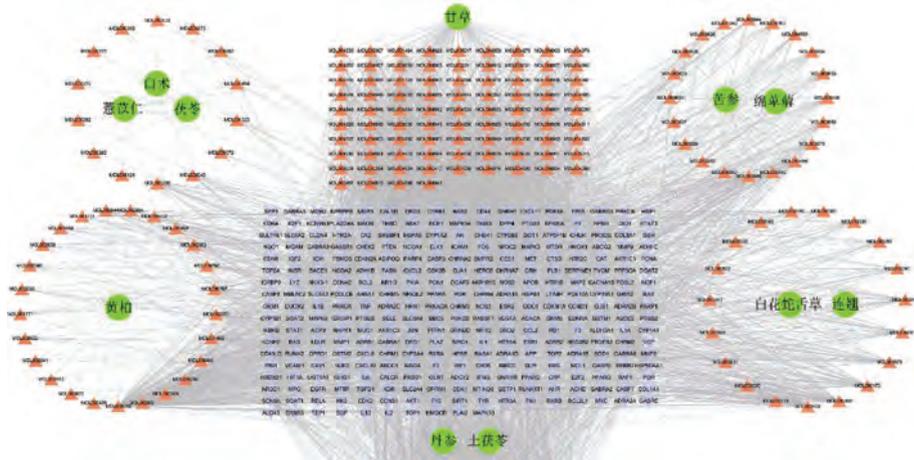


图1 健脾解毒汤治疗银屑病有效成分-靶点网络图

3.1.2 筛选“健脾解毒汤-自噬-银屑病”差异表达基因 通过GEO数据库获得数据集GSE166388 (GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array)，该数据集包含8个人皮肤样本，其中银屑病样本、健康样本各4个，选取银屑病样本与健康对照组进行分析。对GSE166388数据集合并基因矩阵进行归一化处理 (图2A) 和差异分析 (图2B)，同时以 $P < 0.05$ ， $|\log_2 \text{fold change} (\log_2 \text{FC})| \geq 1$ 为条件筛选DEGs。通过Human Autophagy Database数据库获得自噬相关基因222个，与GSE166388数据集DEGs、健脾解毒汤靶点交集，共获得21个健脾解毒汤治疗银屑病潜在自噬相关DEGs (图2C)，目的基因结果以热图 (图2D) 和染色体定位图 (图2E) 呈现。

3.1.3 DEGs相关性分析 IFNG和CCL2, HSPA5和LC3、PI3K、Akt、P62、HIF1A, RB1和PTEN、LC3、Akt、HIF1A, PI3K和P62, LC3和PI3K、Akt表现出较强的拮抗效应；mTOR和CCL2、IFNG表现出较强的协同效应，见图3。

3.1.4 DEGs富集分析 GO富集分析筛选出1 067条生物学过程，42条分子功能，32条细胞组分。健脾解毒汤治疗银屑病潜在自噬相关DEGs大多富集于对上皮细胞增殖、细胞对金属离子的反应、细胞对无机物的反应、细胞对氧化应激的反应、细胞对外界刺激的反应等生物学过程，见图4。KEGG富集结果显示，共获得130条KEGG通路，健脾解毒汤治疗银屑病潜在自噬相关DEGs主要富集于PI3K/

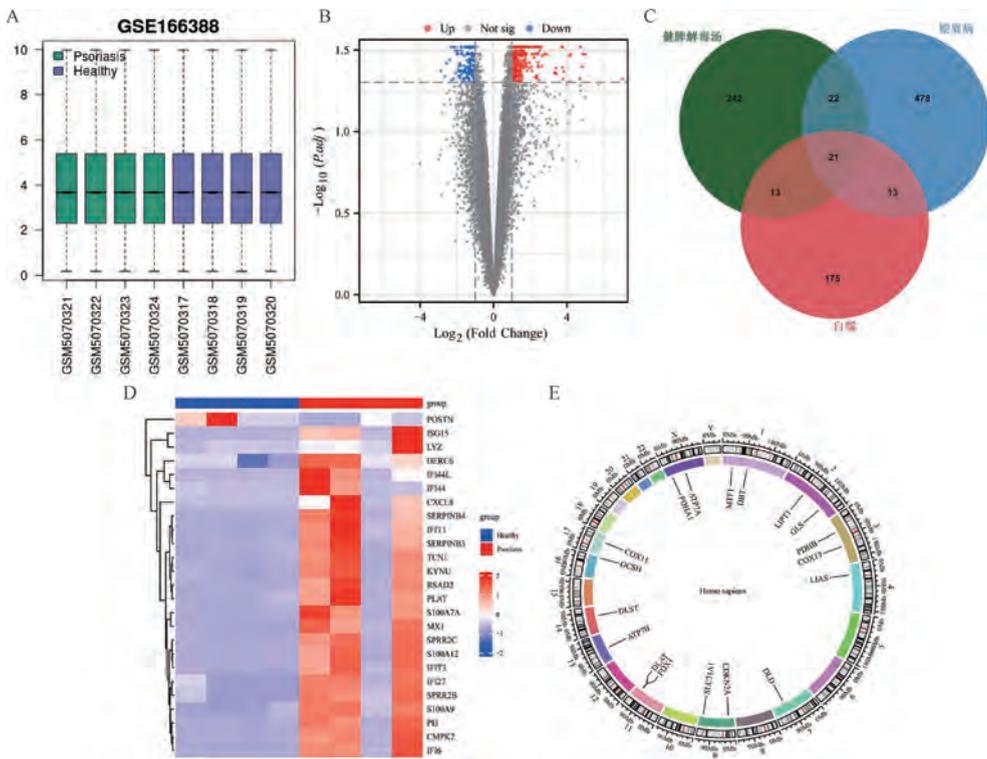


图2 “健脾解毒汤-自噬-银屑病” 差异表达基因筛选

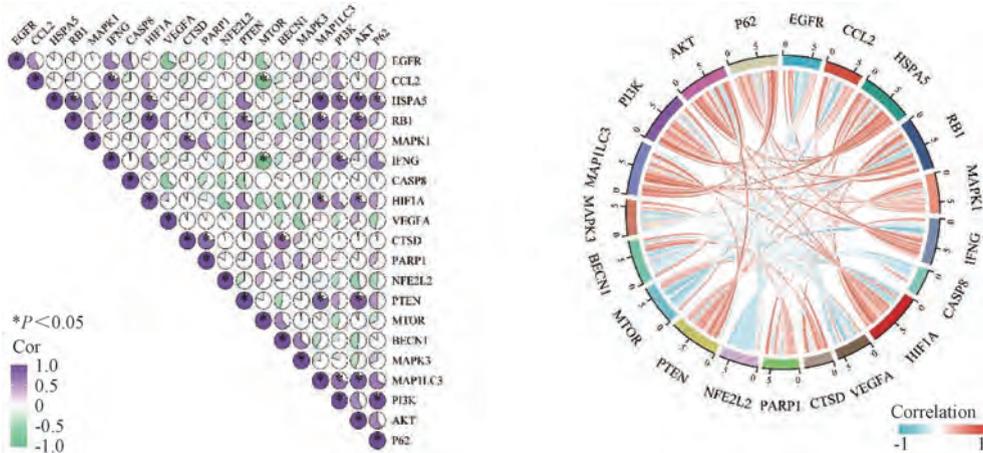


图3 差异表达基因相关性分析

Akt、HIF-1、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、IL-17、Th17 细胞分化、细胞凋亡等信号通路，选取富集倍数前 10、20 位的条目绘制柱状图、气泡图，并计算 Z score 值以弦图可视化，见图 5。

3.1.5 蛋白互作网络的构建及核心靶点筛选 将 21 个健脾解毒汤治疗银屑病潜在自噬相关 DEGs 导入 STRING 数据库，通过计算 MCC、Betweenness、Degree、Closeness 值筛选健脾解毒汤治疗银屑病其中自噬相关 DEGs 核心基因，最终得到 9 个核心基因，见图 6。

3.1.6 自噬 DEGs 与风险因子相关性分析 Akt 和 HIF1A、PTEN 表现出较强的拮抗效应，Akt 和 IFNG 表现出较强的协同效应，见图 7。

3.2 动物实验验证

3.2.1 健脾解毒汤对银屑病大鼠背部皮肤形态的影响 给药后大鼠背部皮肤形态见图 8。正常组背部皮肤呈均匀光滑细腻状态；模型组背部皮肤出现红斑、较厚的鳞屑；甲氨蝶呤组和健脾解毒汤各剂量组与模型组同一时间相比鳞屑明显减少，红斑颜色更淡、皮肤表皮更薄，以高剂量组呈现更明显的皮损改变。

3.2.2 健脾解毒汤对银屑病大鼠 MPASI 评分的影响 与正常组比较，模型组大鼠背部皮肤红斑、鳞屑、表皮增厚、基底潮红，MPASI 评分升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，甲氨蝶呤组和健脾解毒汤各剂量组大鼠背部皮肤红斑面积减小，鳞屑变薄，浸润减轻，MPASI 评分降低 ($P < 0.01$)，见表 1。

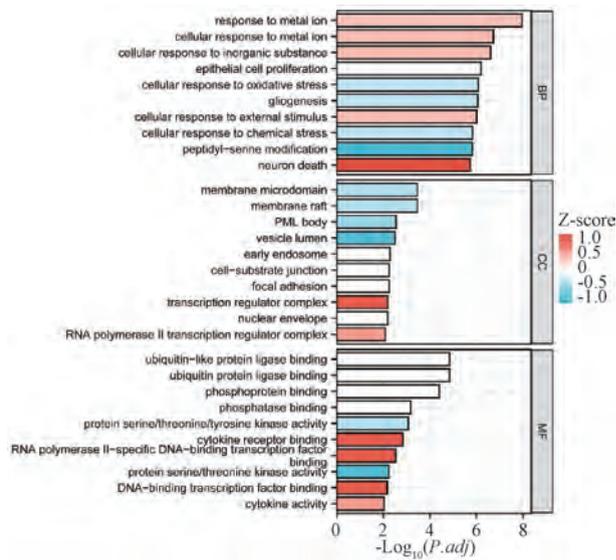


图4 GO富集分析

表1 各组大鼠MPASI评分比较 (分, $\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药前	给药后
正常组	0	0
模型组	7.50±0.76 ^{##}	9.38±0.52 ^{##}
甲氨蝶呤组	7.75±0.46	5.88±0.35 ^{**}
健脾解毒汤低剂量组	7.37±0.92	6.63±0.74 ^{**}
健脾解毒汤中剂量组	7.37±0.74	5.50±0.76 ^{**}
健脾解毒汤高剂量组	7.50±0.53	4.63±0.74 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

3.2.3 健脾解毒汤对银屑病大鼠皮肤组织病理形态的影响 正常组大鼠表皮未见明显增生, 真皮层较为紧密; 模型组大鼠表皮角化过度伴角化不全, 表皮突向下延伸, 炎症细胞浸润, 真皮浅层内血管扩张; 与模型组比较, 健脾解毒汤各剂量组大鼠表皮增生及角化不全程度有所减轻, 细胞间水肿程度减少, 表皮突起变短, 表皮和角质层内中性粒细胞数量减少, 真皮浅层的慢性炎症细胞浸润也减少, 真皮层内的血管扩张现象减弱, 以健脾解毒汤高剂量组更显著, 见图9。

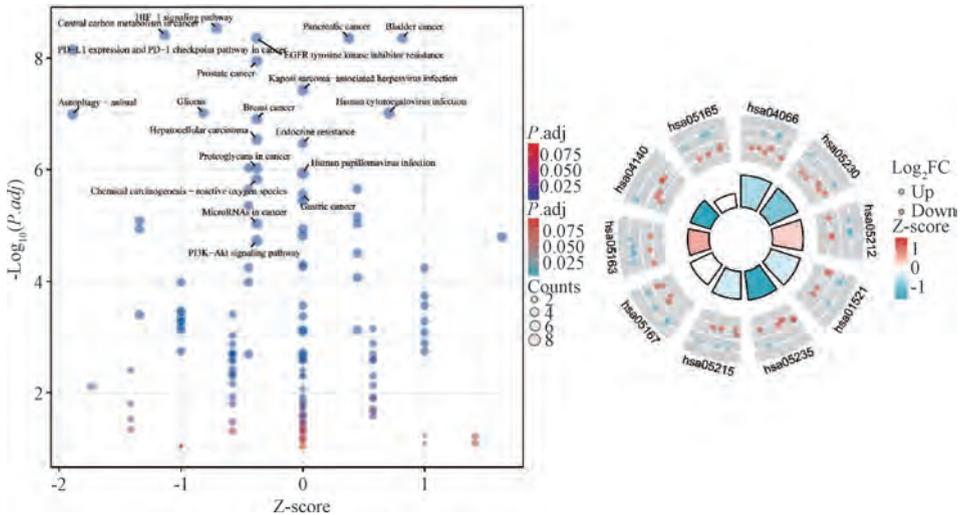


图5 KEGG富集分析

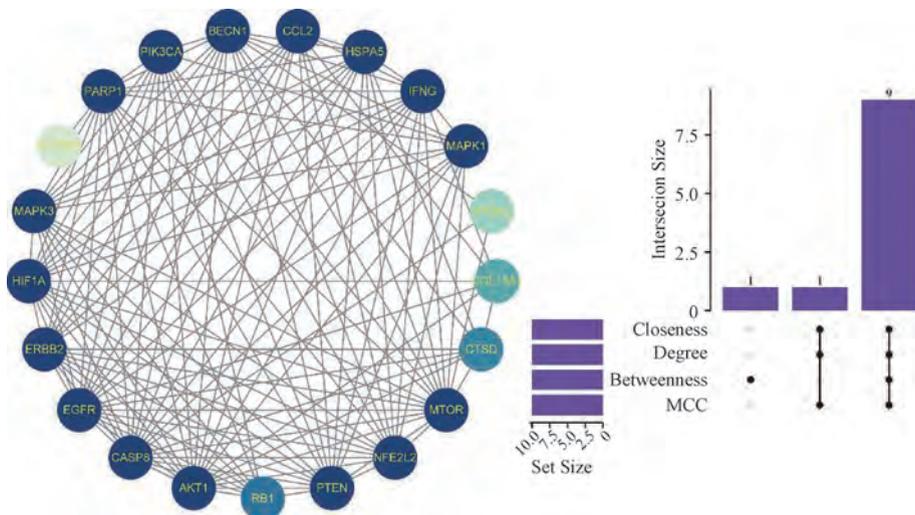


图6 蛋白交互网络的构建及核心靶点网络图

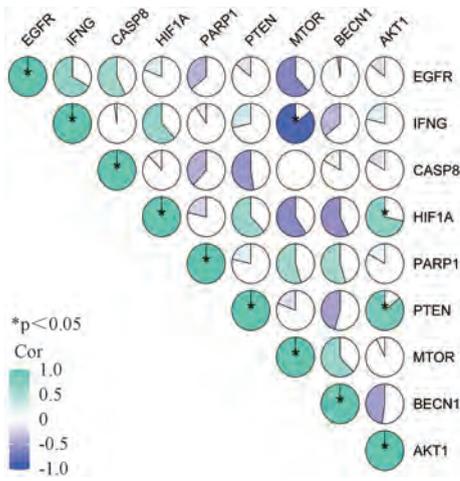


图7 自噬 DEGs 与风险因子相关性分析

3.2.4 健脾解毒汤对大鼠血清 IL-17A、IL-22 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 IL-17A、IL-22 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组和健脾解毒汤中、高剂量组大鼠血清 IL-17A、IL-22 水平降低 ($P<0.01$),健脾解毒汤低剂量组大鼠血清 IL-17A 水平降低 ($P<0.01$),见表2。

表2 各组大鼠血清 IL-17A、IL-22 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	IL-17A	IL-22
正常组	3.91±0.12	9.88±4.97
模型组	4.91±0.51 ^{##}	21.15±4.41 ^{##}
甲氨蝶呤组	3.89±0.23 ^{**}	10.88±2.94 ^{**}
健脾解毒汤低剂量组	3.92±0.18 ^{**}	20.31±10.35
健脾解毒汤中剂量组	3.86±0.15 ^{**}	10.22±3.10 ^{**}
健脾解毒汤高剂量组	3.93±0.22 ^{**}	8.68±1.94 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。



图8 各组大鼠背部皮肤形态

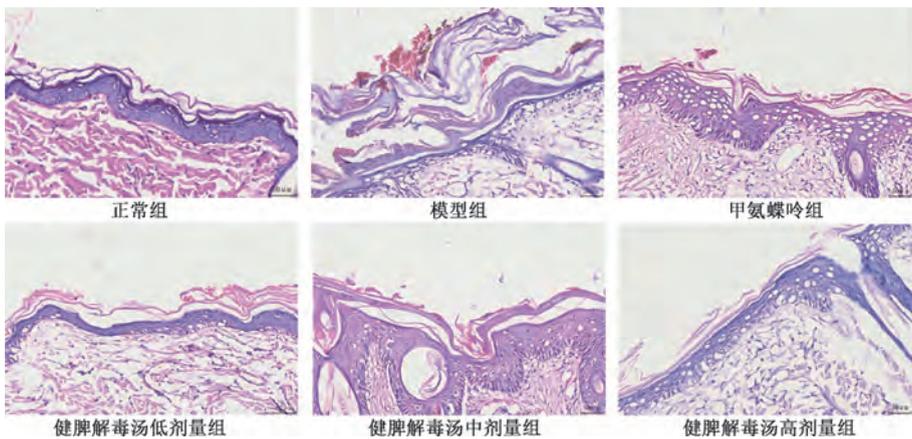


图9 各组大鼠皮肤组织病理形态 (HE, ×200)

3.2.5 健脾解毒汤对银屑病大鼠皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组和健脾解毒汤中、高剂量组大鼠皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$),见图10、表3。

3.2.6 健脾解毒汤对银屑病大鼠皮肤组织 Beclin1、LC3、p62 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠皮肤组织 Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达降低 ($P<0.01$), p62 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组和健脾

表3 各组大鼠皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
正常组	0.72±0.07	0.39±0.04	0.58±0.06
模型组	0.93±0.09 ^{##}	0.80±0.07 ^{##}	1.04±0.06 ^{##}
甲氨蝶呤组	0.68±0.13 [*]	0.51±0.06 ^{**}	0.70±0.06 ^{**}
健脾解毒汤低剂量组	0.78±0.12	0.69±0.07	0.94±0.07
健脾解毒汤中剂量组	0.69±0.06 [*]	0.63±0.05 ^{**}	0.79±0.04 ^{**}
健脾解毒汤高剂量组	0.65±0.12 ^{**}	0.57±0.08 ^{**}	0.79±0.05 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

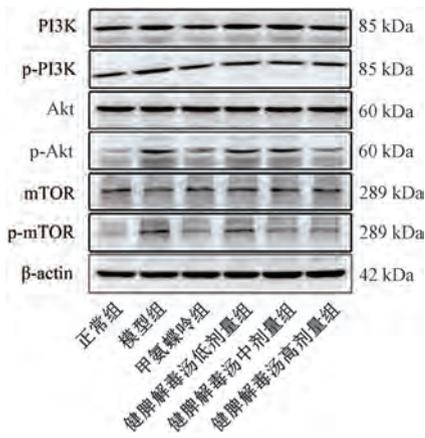


图 10 各组大鼠皮肤组织 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白条带图

解毒汤高剂量组大鼠皮肤组织 Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p62 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 健脾解毒汤中剂量组大鼠皮肤组织 Beclin1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 见图 11、表 4。

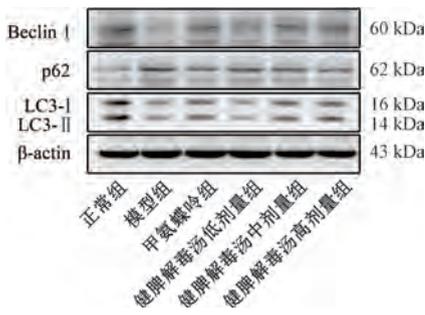


图 11 各组大鼠皮肤组织 Beclin1、LC3、p62 蛋白条带图

表 4 各组大鼠皮肤组织 Beclin1、LC3、p62 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	Beclin1/β-actin	p62/β-actin	LC3 II/LC3 I
正常组	0.68±0.08	0.39±0.02	1.07±0.04
模型组	0.45±0.04 ^{###}	0.60±0.01 ^{##}	0.91±0.02 ^{###}
甲氨蝶呤组	0.59±0.09 [*]	0.44±0.04 ^{**}	1.01±0.05 ^{**}
健脾解毒汤低剂量组	0.49±0.04	0.55±0.03	0.93±0.03
健脾解毒汤中剂量组	0.57±0.03 [*]	0.56±0.02	0.97±0.04
健脾解毒汤高剂量组	0.62±0.05 ^{**}	0.47±0.05 ^{**}	1.00±0.04 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

4 讨论

自噬与银屑病炎症、皮肤屏障功能密切相关。银屑病中 IL-23/IL-17 信号通路介导的炎症级联通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制自噬, 加剧角质细胞异常增殖和促炎循环^[9]。自噬还调节参与屏障功能的角质形成细胞蛋白的表达。自噬相关蛋白 7 (autophagy related 7, Atg7) 基因缺陷小鼠会出现棘皮病、角化过度 and 毛发生长异常^[10]。自噬调控因子 Beclin-1 敲除小鼠的表皮中整合素亚基 α6 (integrin subunit alpha 6, ITGA6) 的错误定位, 最终导致表皮屏障严重受损而死亡^[11]。靶向自噬途径有望成为中医药

防治银屑病的新的突破。

本研究通过生物信息学分析揭示健脾解毒汤通过调控自噬治疗银屑病的分子机制, 通路富集分析表明其作用涉及 PI3K/Akt、HIF-1、IL-17 等信号通路, 蛋白互作网络筛选出 *Akt1*、*mTOR*、*BECN1* 等 9 个核心基因, 其中 *Akt* 作为丝氨酸/苏氨酸激酶, 通过调控角质形成细胞分化与存活维持表皮稳态^[12-13]。*mTOR* 作为自噬关键调控因子, 调节细胞代谢与溶酶体生物合成^[14]。细胞周期蛋白依赖性激酶 7 (cyclin-dependent kinase 7, CDK7) 通过激活 Akt/mTOR/HIF-1A 途径调节糖酵解代谢, 调节 T 细胞活化和 Th17/Th1 细胞分化, 从而参与银屑病的发病^[15]。此外, 多项研究表明以上核心基因直接或间接参与了银屑病的疾病进程^[16-18]。本研究进行了自噬 DEGs 与风险因子的相关性分析, 结果显示 Akt 和 HIF1A、PTEN 表现出较强的拮抗效应, Akt 和 IFNG 表现出较强的协同效应。据此推测 Akt 可能是健脾解毒汤调控自噬治疗银屑病的关键靶点。

本研究进一步通过构建脾虚湿盛证银屑病大鼠模型进行实验验证, 发现模型组呈现表皮角化过度伴角化不全、炎症浸润及真皮血管扩张等典型病理改变。各剂量健脾解毒汤及甲氨蝶呤均改善皮损病理形态, 其中高剂量组疗效显著。Th17 细胞通过分泌 IL-17A、IL-22 等促炎因子驱动银屑病进展^[19], 而健脾解毒汤干预可降低模型大鼠血清 IL-17A、IL-22 水平。Beclin1、LC3、p62 是自噬的标志性蛋白。Beclin1 是自噬过程中的一个关键调节因子^[20]。LC3 则被用作标记自噬囊泡的膜结构, 并参与形成和扩张自噬囊泡^[21], LC3 II 常作为自噬活动的标志^[22]。在自噬活动减弱或受阻的情况下, p62 的积累增多^[23]。PI3K/Akt/mTOR 是自噬最重要的上游信号通路。本研究结果显示, 模型组 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p62 蛋白表达高于正常组, Beclin1、LC3 蛋白表达低于正常组; 而高剂量健脾解毒汤可降低 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、p62 蛋白表达并提高自噬标志蛋白 Beclin1、LC3 表达。以上结果表明, 健脾解毒汤能够通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白的表达促进自噬, 达到治疗银屑病的目的, 验证了生物信息学的结果。

综上所述, 本研究通过生物信息学对健脾解毒汤调控自噬治疗银屑病的分子机制进行了深入挖掘, 并通过动物实验加以验证, 可为后续探索健脾解毒汤治疗银屑病的研究提供新视角。

参考文献:

- [1] 李慧贤, 胡丽, 郑焱, 等. 基于全球疾病负担 (GBD) 大数据的中国银屑病流行病学负担分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2021, 35(4): 386-392.
- [2] 李曦芝, 宋萌萌, 骆志成. 银屑病经济负担及其影响因素[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2022, 16(4): 416-420.
- [3] 刘朝霞, 韩晓冰, 张成会, 等. 运用健脾祛湿法治疗银屑病思路[J]. 中医杂志, 2012, 53(23): 2005-2006.
- [4] 祖丽娅·吐尔地, 李斌, 许孟月, 等. 健脾解毒汤对脾虚

- 湿盛证银屑病大鼠皮肤组织 AQP3 蛋白表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(9): 1194-1198.
- [5] 刘朝霞, 魏建华, 姚尚萍, 等. 调控 JAKS/STATS 通路探讨健脾祛湿法治疗寻常型银屑病的机制[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2020, 19(4): 310-314.
- [6] Tang Z L, Zhang K, Lv S C, *et al.* LncRNA MEG3 suppresses PI3K/Akt/mTOR signalling pathway to enhance autophagy and inhibit inflammation in TNF- α -treated keratinocytes and psoriatic mice[J]. *Cytokine*, 2021, 148: 155657.
- [7] 郭宜城, 罗美兰, 许时贵, 等. 基于基因表达谱的银屑病自噬相关关键基因筛选和候选药物预测[J]. 重庆医学, 2022, 51(24): 4263-4269; 4280.
- [8] 郭 菲, 刘红霞. 银屑病脾虚证豚鼠模型构建初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 242-245.
- [9] Teng Y, Fan Y B, Ma J W, *et al.* The PI3K/Akt pathway: Emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1219.
- [10] Yoshihara N, Ueno T, Takagi A, *et al.* The significant role of autophagy in the granular layer in normal skin differentiation and hair growth[J]. *Arch Dermatol Res*, 2015, 307(2): 159-169.
- [11] Noguchi S, Honda S, Saitoh T, *et al.* Beclin1 regulates recycling endosome and is required for skin development in mice[J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 37.
- [12] Yu J S L, Cui W. Proliferation, survival and metabolism; the role of PI3K/Akt/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. *Development*, 2016, 143(17): 3050-3060.
- [13] Liang N, Chang W, Peng A, *et al.* Dermal mesenchymal stem cells from psoriatic lesions stimulate HaCaT cell proliferation, differentiation, and migration *via* activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Dermatology*, 2022, 238(2): 283-291.
- [14] Roy T, Banang-Mbeumi S, Boateng S T, *et al.* Dual targeting of mTOR/IL-17A and autophagy by fisetin alleviates psoriasis-like skin inflammation[J]. *Front Immunol*, 2023, 13: 1075804.
- [15] Lin Y, Xue K, Li Q, *et al.* Cyclin-dependent kinase 7 promotes Th17/Th1 cell differentiation in psoriasis by modulating glycolytic metabolism[J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(11): 2656-2667.
- [16] Dai X, Murakami M, Shiraishi K, *et al.* EGFR ligands synergistically increase IL-17A-induced expression of psoriasis signature genes in human keratinocytes *via* I κ B ζ and Bcl3[J]. *Eur J Immunol*, 2022, 52(6): 994-1005.
- [17] de Oliveira P S, Pereira M C, Silva de Paula S K, *et al.* Increased IL17A, IFNG, and FOXP3 transcripts in moderate-severe psoriasis: a major influence exerted by IL17A in disease severity[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 4395276.
- [18] Xu L, Leng H, Shi X, *et al.* MiR-155 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by PTEN signaling pathway in the psoriasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 524-530.
- [19] Blauvelt A, Chiricozzi A. The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 55(3): 379-390.
- [20] 李 鹏, 牛 璐, 赵国静, 等. 基于自噬探究补肺活血胶囊对博来霉素诱发小鼠肺纤维化的抑制作用[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1337-1342.
- [21] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.
- [22] Wang Z, Zhou H, Zheng H, *et al.* Autophagy-based unconventional secretion of HMGB1 by keratinocytes plays a pivotal role in psoriatic skin inflammation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 529-552.
- [23] Tao M M, Liu T, You Q D, *et al.* p62 as a therapeutic target for tumor[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 193: 112231.