

基于 P38/Erk/NF-κB 信号通路探讨扶正和肤止痒方对银屑病炎症微环境的改善作用

廖怡静¹, 刘炎杰^{2#}, 卢月¹, 唐斌¹, 张骏鸿¹, 喻靖傑¹, 邓浩¹, 韩凌¹,
卢传坚^{3,4*}, 陈海明^{3,4*}
(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 深圳市宝安区中医院, 广东 深圳 518100;
3. 广州中医药大学第二附属医院, 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510120; 4. 广州中医药大学第二附属医院, 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 探究扶正和肤止痒方对小鼠银屑病样皮损改善及免疫调节的作用。**方法** 体内实验: 将 30 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、地塞米松组 (1.5 g/kg 复方醋酸地塞米松乳膏) 和扶正和肤止痒方 (FZHFZY) 低、高 (2.5、5 g/kg) 剂量组, 每组 6 只。FZHFZY 各剂量组涂抹相应剂量扶正和肤止痒方, 空白组和模型组涂抹生理盐水, 地塞米松组涂抹复方醋酸地塞米松乳膏, 连续给药 10 d。给药第 4 天开始, 除空白组外各组小鼠涂抹咪喹莫特乳膏进行造模, 连续 7 d。PASI 评分评估各组小鼠银屑病皮损面积和严重程度; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察皮损组织病理学变化; 免疫组化 (IHC) 染色检测皮损组织 F4/80 水平; Western blot 法检测皮损组织 P38、p-P38、Erk、p-Erk、P65 和 p-P65 表达; RT-qPCR 法检测皮损组织 *TNF-α*、*IL-17*、*IL-23* 和 *IL-1β* mRNA 表达。体外实验: 培养 RAW264.7 细胞, 分为空白组、LPS 组和 FZHFZY 1 200、600、300、150 μg/mL 组, Western blot 法检测细胞 P38、p-P38、Erk、p-Erk、P65 和 p-P65 蛋白表达, RT-qPCR 法检测细胞 *IL-6*、*TNF-α*、*IL-23*、*IL-8* mRNA 表达。**结果** 体内实验结果显示, 与模型组比较, FZHFZY 组小鼠 PASI 评分降低 ($P<0.01$); 皮损组织表皮增厚、角化不全等病变均得到改善, F4/80 表达降低; 皮损组织 p-P38/P38、p-Erk/Erk、p-P65/P65 蛋白表达比值降低 ($P<0.01$); *TNF-α*、*IL-17*、*IL-23* 和 *IL-1β* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。体外实验结果显示, 0~2 400 μg/mL FZHFZY 对 RAW264.7 细胞无明显毒性 ($P>0.05$)。与 LPS 组比较, FZHFZY 1 200、600 μg/mL 组细胞 p-P38/P38、p-Erk/Erk、p-P65/P65 蛋白表达比值降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); *TNF-α*、*IL-17*、*IL-23* 和 *IL-1β* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 扶正和肤止痒方可能通过抑制 P38/Erk/NF-κB 信号通路减轻了咪喹莫特诱导的小鼠银屑病皮损和 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症反应。

关键词: 扶正和肤止痒方; 银屑病; 咪喹莫特乳膏; 地塞米松; 炎症反应; P38/Erk/NF-κB 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2550-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.010

Mechanistic investigation of Fuzheng Hefu Zhiyang Formula in alleviating psoriasis inflammatory microenvironment via P38/Erk/NF-κB signaling pathway

LIAO Yi-jing¹, LIU Yan-jie^{2#}, LU Yue¹, TANG Bin¹, ZHANG Jun-hong¹, YU Jing-jie¹,
DENG Hao¹, HAN Ling¹, LU Chuan-jian^{3,4*}, CHEN Hai-ming^{3,4*}
(1. College of Clinical Medicine II, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Shenzhen Baoan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518100, China; 3. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndromes, The Second Affiliated

收稿日期: 2024-11-20
基金项目: 省部共建中医湿证国家重点实验室项目 (SZ2021ZZ34, SZ2021ZZ45); 广州市科技计划项目 (202201020353); 广东省中医院“拔尖人才”计划 (BJ2022KY02); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助 (SZZYSM202106008)
作者简介: 廖怡静 (2001—), 女, 硕士生, 从事中医药防治免疫性疾病的研究。E-mail: 20241110883@stu.gzucm.edu.cn
#共同第一作者: 刘炎杰 (1991—), 男, 博士生, 从事中医药防治银屑病的研究。E-mail: liuyanjie@szbazyy.net
*通信作者: 卢传坚 (1964—), 博士, 教授, 从事中西医结合治疗皮肤病的研究。E-mail: lcj@gzucm.edu.cn
陈海明 (1988—), 博士, 副研究员, 从事中医药防治免疫性疾病的研究。E-mail: hemin066@gzucm.edu.cn

Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 4. State Key Laboratory of Dampness Syndrome in Chinese Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect of Fuzheng Hefu Zhiyang Formula (FZHFZY) on psoriasis-like skin lesions and immune regulation in mice. **METHODS** In the *in vivo* experiment, 30 BALB/c mice were randomly divided into the blank group, the model group, the dexamethasone group (1.5 g/kg of compound dexamethasone acetate cream), and the low-dose (2.5 g/kg) and high-dose (5 g/kg) FZHFZY groups, with six mice in each group. The experiment groups were treated with respective FZHFZY and dexamethasone, and the other groups were given normal saline for 10 consecutive days, during which psoriatic skin lesions were induced with imiquimod cream for 7 consecutive days. The mice had their area and severity of psoriasis assessed by PASI score; their histological changes of skin lesions. observed with Hematoxylin-eosin (HE) staining; their F4/80 ratio of skin lesions observed with immunohistochemical (IHC) staining; their protein expressions of P38, p-P38, Erk, p-Erk, P65 and p-P65 detected by Western blot; and their mRNA expressions of tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), *IL-17*, *IL-23* and *IL-1 β* detected by RT-qPCR. In the *in vitro* research, the cultured RAW264.7 cells were divided into the blank group, the LPS group, and the FZHFZY groups (1 200, 600, 300, 150 μ g/mL). The cells had their protein expressions of P38, p-P38, Erk, p-Erk, P65 and p-P65 detected with Western blot; and their mRNA expressions of *IL-6*, *TNF- α* , *IL-23* and *IL-8* detected by RT-qPCR. **RESULTS** The *in vivo* experiment showed that compared to the model group, the FZHFZY groups demonstrated decreased PASI score ($P<0.01$); improved epidermal thickening and parakeratosis of skin lesions as revealed by HE staining result and increased expression of F4/80 in IHC staining sections; decreased protein expression ratios of p-P38/P38, p-ERK/Erk and p-P65/P65 in skin ($P<0.05$, $P<0.01$); and reduced mRNA expressions of *TNF- α* , *IL-17*, *IL-23* and *IL-1 β* in the skin ($P<0.01$). FZHFZY (0~2 400 μ g/mL) showed no significant cytotoxicity towards RAW264.7 cells *in vitro* ($P>0.05$). Compared to those of the LPS group, the cells exposed to FZHFZ at concentrations of 1 200 and 600 μ g/mL demonstrated decreased protein expression ratios of p-P38/P38, p-ERK/Erk, and p-P65/P65 ($P<0.05$, $P<0.01$); and significantly decreased mRNA expressions of *TNF- α* , *IL-17*, *IL-23* and *IL-1 β* ($P<0.01$). **CONCLUSION** FZHFZY alleviates imiquimod-induced psoriatic lesions in mice and suppresses inflammatory response in LPS-stimulated RAW264.7 cells by inhibiting P38/Erk/NF- κ B signaling pathway. **KEY WORDS:** Fuzheng Hefu Zhiyang Formula (FZHFZY); psoriasis; imiquimod cream; dexamethasone; inflammatory response; P38/Erk/NF- κ B signaling pathway

银屑病是一种慢性炎症性皮肤病，其发病因素众多，包括遗传因素、环境因素和行为因素等，这些因素直接或间接触发机体炎症，导致角质形成细胞过度增殖、细胞凋亡减少、血管生成增多，最终形成银屑病样皮损^[1-2]。银屑病具有病程较长、易反复发作的特点，临床常用药物尚存在停药后易复发、长期安全性不佳的缺点^[3]，因此寻找替代疗法具有重要意义。当前，白细胞介素（interleukin, IL）-17/IL-23 轴被认为是银屑病的核心驱动因素^[2]，巨噬细胞独特的免疫调控网络在银屑病中也发挥着重要作用^[4]。核因子 κ B（nuclear factor kappa-B, NF- κ B）作为炎症反应的核心转录因子，在银屑病病程中占据枢纽地位^[5]。丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）是一组蛋白激酶，可被不同的细胞外刺激激活，参

与细胞的增殖、转化、分化及凋亡^[6]。p38 MAPK 和细胞外信号调节激酶（extracellular regulated protein kinases, Erk）作为 MAPK 家族的重要成员，分别通过调控转录因子和细胞周期蛋白，驱动角质形成细胞异常增殖与炎症因子分泌，是银屑病病程中的关键环节^[7]。调控 P38/Erk/NF- κ B 信号通路对银屑病的治疗具有一定价值。

中医药因不良反应少、治疗效果好、价格低廉，在银屑病治疗中具有显著优势。扶正和肤止痒方（FZHFZY）由白鲜皮、当归、熟地黄、蛇床子、石榴皮、土茯苓和徐长卿等 7 味中药组成，具有扶正化湿、和肤止痒的功效。前期研究发现，FZHFZY 通过外用治疗银屑病具有较好的临床疗效，但具体机制尚不明晰。本研究通过体内外实验探讨该方对银屑病样皮损的改善作用及其抗炎作用

机制，以期为 FZHFZY 的推广和运用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 30 只，6~8 周龄，体质量 20~22 g，购自南方医科大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK（粤）2021-0167]，饲养于广东省中医药科学院实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK（粤）2018-0094]，饲养环境温度 22~25 ℃，12 h/12 h 明暗交替，自由饮食、饮水。本动物实验方案经广东省中医院动物实验伦理委员会批准（审批编号为 201912），动物实验操作遵守实验动物福利和伦理标准。

1.2 细胞 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞购自美国典型培养物保藏中心。

1.3 药物 复方醋酸地塞米松乳膏（DXA，华润三九医药股份有限公司，批号 H44024170）；咪喹莫特乳膏（IMQ，四川明欣药业有限公司，批号 H20030128）；FZHFZY 由白鲜皮（批号 180203641）30 g、当归（批号 180105951）20 g、熟地黄（批号 180405611）30 g、蛇床子（批号 180102811）20 g、石榴皮（批号 180400431）30 g、土茯苓 30 g、徐长卿（批号 180200041）30 g 组成，组方药材由康美药业股份有限公司提供，按照常规流程切块、浸泡、煎煮、浓缩，制成 0.5 g/mL 药液。

1.4 试剂 DMEM 培养基、胎牛血清（美国 Gibco 公司，批号 1848509）；脂多糖（LPS）、噻唑蓝（MTT）、胰酶（美国 Sigma 公司，货号 L2755、M2118、25200-56）；TRIzol（美国 Invitrogen 公司，批号 15596026）；定量 PCR 专用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）、高特异性 qPCR 试剂 TB Green® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）（日本 TaKaRa 公司，货号 RR047A、RR820A）；β-actin、P38 MAPK、p-P38 MAPK、Erk1/2、p-Erk1/2、NF-κB P65、NF-κB p-P65 抗体、Anti-rabbite IgG 二抗、Anti-mouse IgG 二抗（美国 Cell Signaling Technology 公司，货号 4967、8690、4511、4695、4370、8242、3033、7074S、7076P2）；肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-17、IL-23、IL-1β、IL-6、IL-8 ELISA 试剂盒（江苏酶免实业有限公司，货号 MM-0132M1、MM-48024M2、MM-45773M2、MM-0905M2、MM-2552

1011M2、MM-1292O2）。
1.5 仪器 荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，型号 ViiA7）；倒置相差显微镜（日本 Olympus 公司，型号 BX-41）；低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司，型号 5810R）；酶标仪（美国 Perkinelmer 公司，型号 VICTOR X5）；CO₂ 培养箱（加拿大 New Brunswick 公司，型号 Galaxy 170 S）。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组、造模及给药 30 只 BALB/c 小鼠适应性喂养 1 周后，随机分为空白组、模型组、地塞米松组（1.5 g/kg）和 FZHFZY 低、高剂量（2.5、5 g/kg）组，每组 6 只，FZHFZY 组给药剂量参照前期研究^[8]。参考文献 [9] 报道，各组小鼠背部剃除约 6 cm² 毛发，在剔除毛发区域进行局部涂抹给药，FZHFZY 低、高剂量组涂抹 FZHFZY 2.5、5 g/kg，空白组和模型组涂抹生理盐水，地塞米松组涂抹复方醋酸地塞米松乳膏 1.5 g/kg，连续给药 10 d。给药第 4 天开始造模，于背部剃毛区域涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 3.125 g/kg，空白组则涂抹等剂量凡士林，造模 7 d。

2.1.2 PASI 评分 每日观察并记录各组实验小鼠的皮损变化情况，根据小鼠银屑病皮损面积和严重程度指数（PASI）的 3 个参数（红斑、鳞屑、浸润增厚程度）在 0~4 分范围内独立评分，三者评分相加为最终 PASI 评分^[10]。PASI 评分标准见表 1。

表 1 PASI 评分标准

Tab. 1 PASI scoring criteria

参数	评分/分	特征
红斑	0	无
	1	淡红色
	2	红色
	3	深红色
	4	红色极深
鳞屑	0	无
	1	部分皮损表明覆有鳞屑,细微鳞屑为主
	2	大多数皮损表面覆有鳞屑,鳞屑成片
	3	几乎全部皮损覆有鳞屑,鳞屑较厚成层
	4	全部皮损表面均覆有鳞屑,鳞屑很厚成层
浸润增厚	0	无
	1	皮损轻微高于正常皮肤
	2	皮损易触及,边缘圆形或斜坡形
	3	皮损隆起,边缘清晰
	4	皮损高度肥厚,隆起极明显

2.1.3 苏木精-伊红（HE）染色观察皮损组织病理形态 将皮损组织固定于 4% 多聚甲醛中，石蜡包埋，然后切成 5 μm 的切片，用二甲苯及梯度乙

醇脱水，再用苏木精-伊红（hematoxylin-eosin staining, HE）染色，用中性树脂封片，于显微镜下观察组织学改变。

2.1.4 免疫组化染色检测皮损组织 F4/80 表达 皮损组织石蜡切片脱水后，放入柠檬酸抗原修复缓冲液（pH 6.0）中进行抗原修复，再放入 3% 双氧水溶液中静置以阻断内源性过氧化物酶，滴加 3% BSA 封闭 30 min。加入抗 F4/80 的特异性一抗，4℃ 孵育过夜；加入二抗，室温孵育 50 min；使用 DAB 显色，苏木素复染。将切片于显微镜下观察皮损组织 F4/80 阳性表达。

2.1.5 Western blot 法检测皮损组织 P38、p-P38、Erk、p-Erk、P65 和 p-P65 蛋白表达 每组随机选取皮肤组织样本 3 份，剪碎、研磨后加入 RIPA 裂解液继续充分研磨，离心后收集上清，进行蛋白定量，加入蛋白上样缓冲液后进行蛋白变性。取蛋白样品上样，10% SDS-PAGE 胶电泳，转膜，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h，再加入 P38、p-P38、Erk、p-Erk、P65 和 p-P65 一抗 4℃ 孵育过夜，洗膜 3 次，加入兔二抗室温孵育 1 h，洗膜后用增强化学发光显影，凝胶图像分析仪曝光，通过 Image J 软件对条带强度进行分析，以 β -actin 为内参计算目的蛋白相对表达量。

2.1.6 RT-qPCR 法检测皮损组织 *TNF- α* 、*IL-17*、*IL-23* 和 *IL-1 β* mRNA 表达 每组随机选取皮肤组织样本 3 份，TRIzol 法提取 RNA，用 DEPC 水溶解，测定浓度，逆转录为 cDNA，随后进行扩增反应。通过 GenBank 查询目标基因序列，PrimerBank 进行引物设计。引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成，引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')
<i>TNF-α</i>	正向 ACTGATGAGAGGGAGGCCAT
	反向 CCGTGGGTTGGACAGATGAA
<i>IL-6</i>	正向 TTCTTGGGACTGATGCTGGT
	反向 CCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>IL-8</i>	正向 CTAGGCATCTTCGTCCGTCC
	反向 CAGAAGCTTCATTGCCGGTG
<i>IL-17</i>	正向 TCAAAGCTCAGCGTGTCCAA
	反向 TCTTCATTGCGGTGGAGAGTC
<i>IL-23</i>	正向 CAAAGGATCCGCCAAGGTCT
	反向 GGAGGTGTGAAGTTGCTCCA
<i>IL-1β</i>	正向 TGCCACCTTTTGACAGTGATG
	反向 AAGGTCCACGGGAAAGACAC
<i>β-actin</i>	正向 GTGACGTTGACATCCGTAAAGA
	反向 GCCGGACTCATCGTACTCC

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 1% 双抗（青霉素和链霉素）和 10% FBS 的 DMEM 培养基，置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下的培养箱中培养，取对数生长期的细胞进行实验。

2.2.2 药物制备 将白鲜皮 30 g、当归 20 g、熟地黄 30 g、蛇床子 20 g、石榴皮 30 g、土茯苓 30 g、徐长卿 30 g 用蒸馏水提取，将提取物浓缩至 5 g/mL，滤过后加入 DMEM 培养基稀释至 150、300、600、1 200、2 400、4 800 μ g/mL，在 4℃ 下保存备用。

2.2.3 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中，每孔加入不同质量浓度 FZHFZY（150、300、600、1 200、2 400、4 800 μ g/mL），每组设 3 个复孔。孵育 24 h 后加入 10% MTT 孵育 4 h，弃去上清液，每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷（DMSO），摇床振荡 10 min 后，于酶标仪 490 nm 波长处检测各孔光密度（OD）值。细胞活性 = （实验组 OD 值 - 空白组 OD 值） / （对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值） × 100%。

2.2.4 细胞分组及造模 取对数生长期的 RAW264.7 细胞，以每孔 1.5×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，分为空白组、LPS 组和 FZHFZY 1 200、600、300、150 μ g/mL 组。空白组不做处理，LPS 组用 1 μ g/mL LPS 处理 12 h，FZHFZY 组用相应质量浓度 FZHFZY 处理 12 h 后再加入 1 μ g/mL LPS 刺激 12 h。

2.2.5 Western blot 法检测细胞 P38、p-P38、Erk、p-Erk、P65 和 p-P65 蛋白表达 细胞按“2.2.4”项下方法处理，干预结束后收集各组细胞，加入 RIPA 裂解液充分裂解，提取总蛋白。按“2.1.5”项下方法检测细胞 P38、p-P38、Erk、p-Erk、P65 和 p-P65 蛋白相对表达。

2.2.6 RT-qPCR 法检测细胞 *IL-6*、*TNF- α* 、*IL-23*、*IL-8* mRNA 表达 收集各组细胞，按“2.1.6”项下方法检测细胞 *IL-6*、*TNF- α* 、*IL-23*、*IL-8* mRNA 表达。

2.3 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行处理，实验结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体内评价

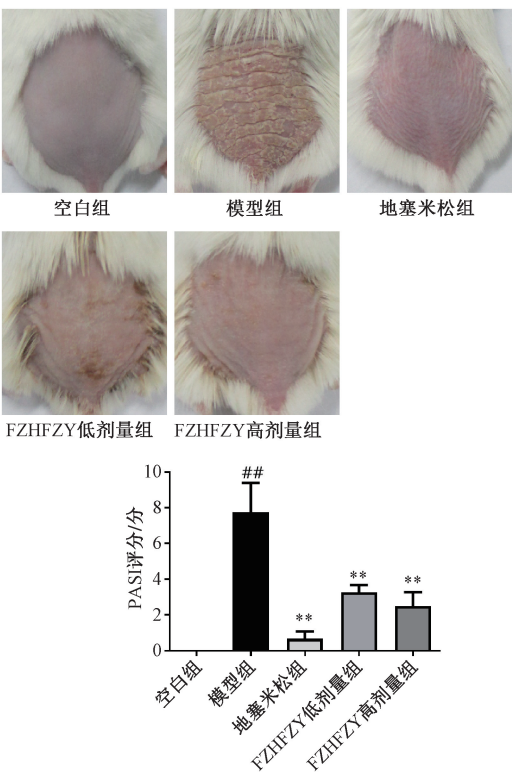
3.1.1 FZHFZY 对银屑病小鼠银屑病样皮损的影

响 如图 1 所示,经咪喹莫特造模后,模型组小鼠出现明显的银屑病样病变,包括皮肤红斑、鳞屑和皮肤厚度增加,PASI 评分升高 ($P<0.01$)。与模型组比较,地塞米松组和 FZHFZY 低、高剂量组小鼠银屑病样病变明显改善,且 PASI 评分均降低 ($P<0.01$)。

3.1.2 FZHFZY 对银屑病小鼠皮损组织病理形态及 F4/80 表达的影响 HE 染色显示,空白组小鼠表皮正常,无明显炎症或病变;模型组小鼠皮损组织表皮增生增加、棘层肥厚、角化不全、拉长的网状嵴和大量的炎症浸润;地塞米松组和 FZHFZY 各剂量组均表现出较平滑的表皮,较少的角化不全和表皮增厚。

F4/80 染色显示,皮肤组织中巨噬细胞的募集和活化被认为是银屑病重要的致病因素^[11-12],使用 F4/80 标记可以明确区分巨噬细胞与其他细胞^[13]。与空白组比较,模型组小鼠皮损组织 F4/80 表达增加;与模型组比较,地塞米松组和 FZHFZY 各剂量组小鼠皮损组织 F4/80 表达有不同程度的减少。结果见图 2。

3.1.3 FZHFZY 对银屑病小鼠皮损组织 $TNF-\alpha$ 、 $IL-17$ 、 $IL-23$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达的影响 如图 3 所示,与空白组比较,模型组小鼠皮损组织



注:与空白组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图 1 FZHFZY 对银屑病小鼠银屑病样皮损的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Effects of FZHFZY on mouse psoriatic skin lesions ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

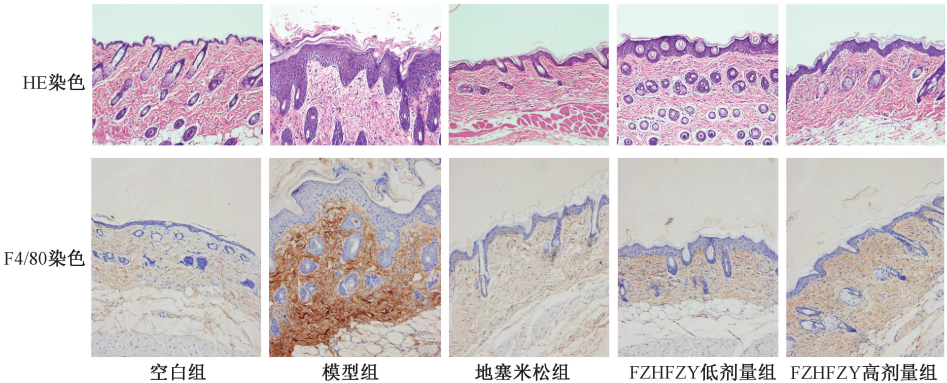


图 2 FZHFZY 对银屑病小鼠皮损组织 HE 染色 F4/80 染色的影响 ($\times 100$)

Fig. 2 Effects of FZHFZY on mouse psoriatic skin lesions (HE staining and F4/80 staining at $\times 100$ magnification)

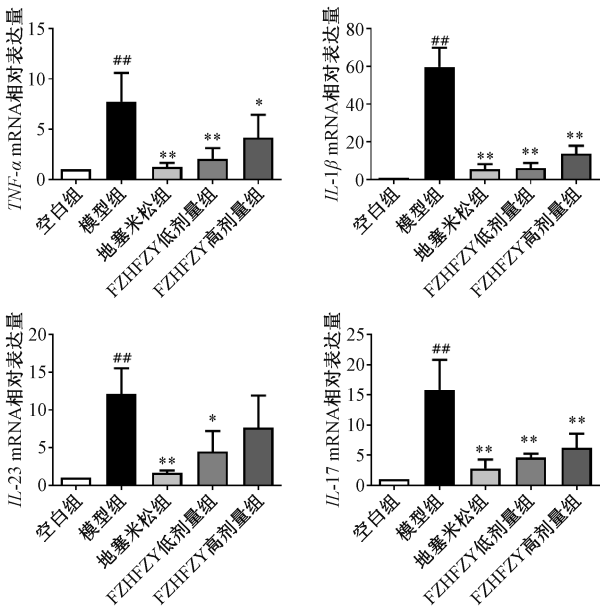
$TNF-\alpha$ 、 $IL-17$ 、 $IL-23$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组和 FZHFZY 高剂量组小鼠皮损组织 $TNF-\alpha$ 、 $IL-17$ 、 $IL-23$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),FZHFZY 低剂量组 $TNF-\alpha$ 、 $IL-17$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.1.4 FZHFZY 对银屑病小鼠皮损组织 P38/Erk/ NF- κ B 信号通路的影响 如图 4 所示,与空白组比

较,模型组小鼠皮损组织 p-P38/P38、p-Erk/Erk 和 p-P65/P65 蛋白表达比值均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组和 FZHFZY 高剂量组 p-P38/P38、p-Erk/Erk 和 p-P65/P65 蛋白表达比值均降低 ($P<0.01$)。

3.2 体外评价

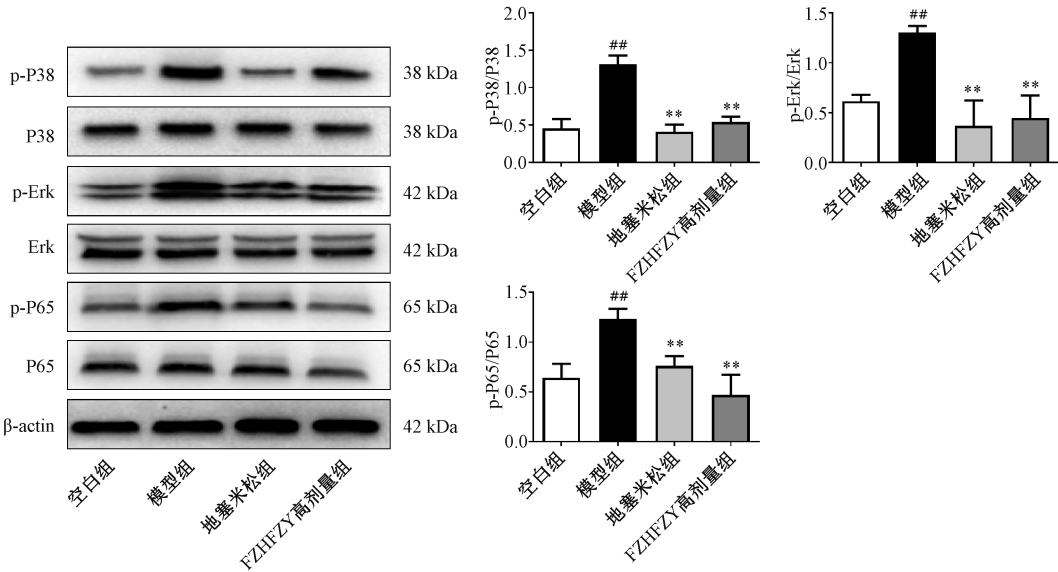
3.2.1 FZHFZY 对 RAW264.7 细胞活性的影响 如图 5 所示,FZHFZY ($0\sim 2\ 400\ \mu\text{g/mL}$) 对



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图3 FZHFZY对银屑病小鼠皮损组织 $TNF-\alpha$ 、 $IL-17$ 、 $IL-23$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effects of FZHFZY on mRNA expressions of $TNF-\alpha$, $IL-17$, $IL-23$ and $IL-1\beta$ in mouse psoriatic lesions ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图4 FZHFZY对银屑病小鼠皮损组织 p-P38/P38、p-Erk/Erk 和 p-P65/P65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effects of FZHFZY on protein expressions of p-P38/P38, p-Erk/Erk and p-P65/P65 protein in mouse psoriatic lesions ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

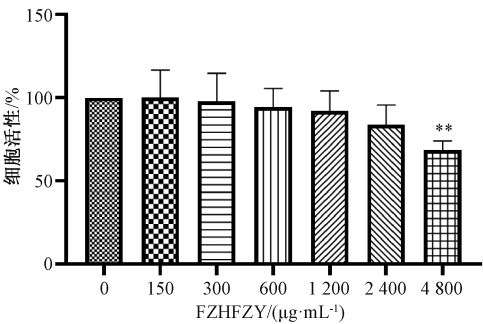
全球流行病学调查显示，银屑病的发病率为1%~3%^[14]，该病具有病程长、治愈率低、易反复发作的特征，对患者的身心影响巨大，在世界范围内广受关注^[15-16]。近年来兴起的生物制剂虽然有

RAW264.7 细胞无毒性作用。因此，选择 150、300、600 和 1 200 $\mu\text{g/mL}$ FZHFZY 进行后续实验。

3.2.2 FZHFZY 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-23$ 和 $IL-8$ mRNA 表达的影响 如图 6 所示，与空白组比较，LPS 组 RAW264.7 细胞 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-23$ 和 $IL-8$ mRNA 表达均升高 ($P<0.01$)；与 LPS 组比较，FZHFZY 300、600 和 1 200 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-23$ 和 $IL-8$ mRNA 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，FZHFZY 150 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 $IL-6$ 、 $IL-23$ 和 $IL-8$ mRNA 表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.2.3 FZHFZY 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 P38/Erk/NF- κB 信号通路的影响 如图 7 所示，与空白组比较，LPS 组 RAW264.7 细胞 p-P38/P38、p-Erk/Erk 和 p-P65/P65 蛋白表达比值均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与 LPS 组比较，FZHFZY 1 200、600 $\mu\text{g/mL}$ 组 RAW264.7 细胞 p-P38/P38、p-Erk/Erk 和 p-P65/P65 蛋白表达比值均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

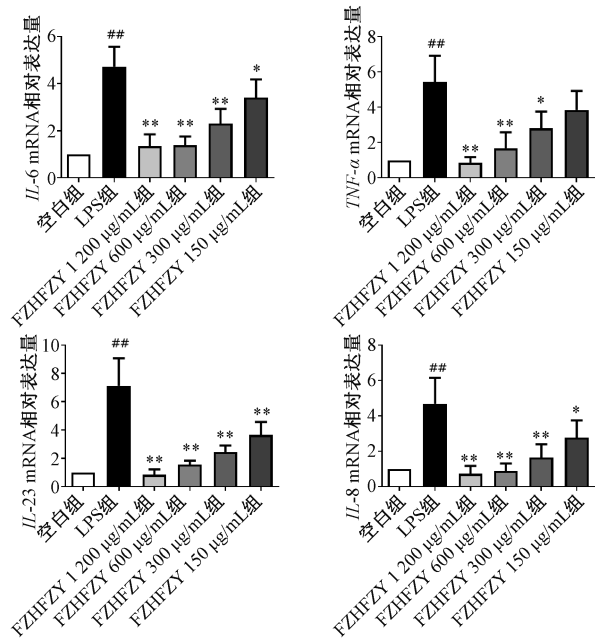
效，但存在价格昂贵、长期疗效难以保持等问题^[17]。中医药治疗银屑病的历史悠久，由卢传坚教授提出的中药新复方——扶正和肤止痒方 (FZHFZY)，在临床上已被证明具有显著的抗银屑病作用。前期研究发现该方的主要活性成分包括没



注：与空白组（0 $\mu\text{g/mL}$ ）比较，** $P < 0.01$ 。

图 5 FZHFZY 对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effects of FZHFZY on the viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



注：与空白组比较， $^{##} P < 0.01$ ；与 LPS 组比较， $^* P < 0.05$ ， $^{**} P < 0.01$ 。

图 6 FZHFZY 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 *IL-6*、*TNF- α* 、*IL-23* 和 *IL-8* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effects of FZHFZY on mRNA expressions of *IL-6*, *TNF- α* , *IL-23* and *IL-8* in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

食子酸、绿原酸、儿茶素、落新妇苷、异落新妇苷等^[18]。相关研究表明儿茶素、没食子酸、绿原酸等活性物质具有调控炎症因子影响银屑病病程的功效^[19-20]。然而，FZHFZY 治疗银屑病的具体作用机制尚不清楚，因此本研究通过体内外实验探索 FZHFZY 在银屑病样皮肤炎症中的保护作用及其机制。

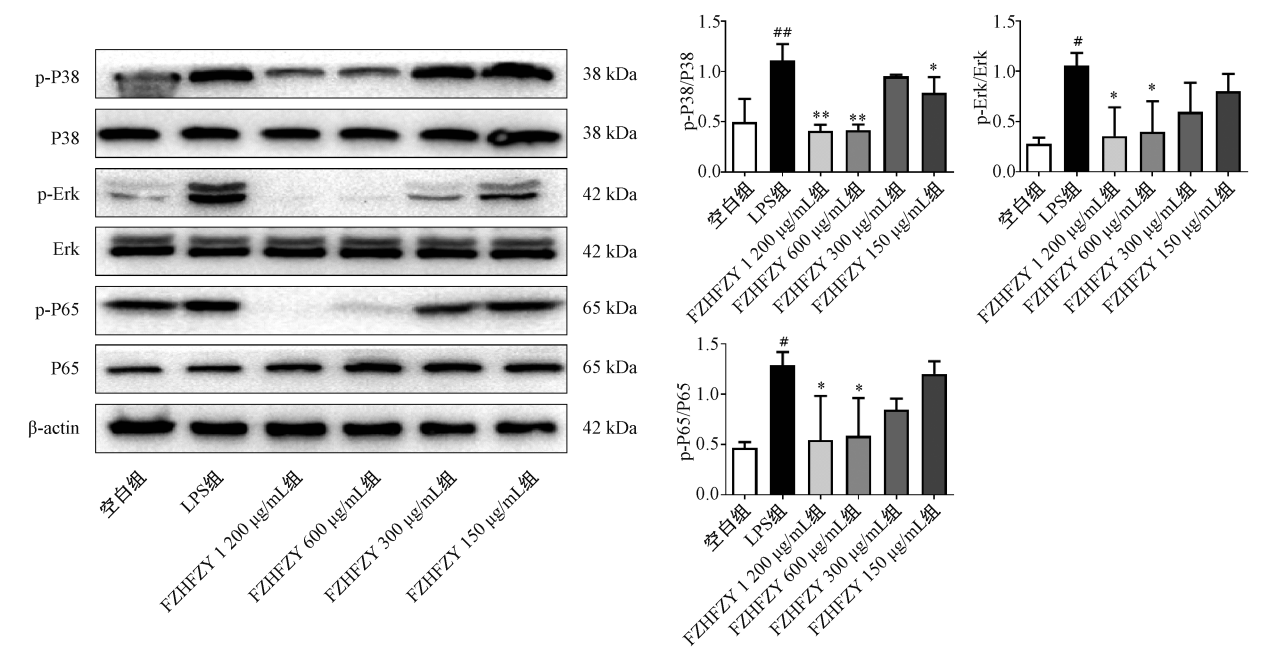
体内实验发现，FZHFZY 表现出良好的银屑病

表型改善作用，减少了皮肤红斑、鳞屑、表皮增厚、炎症浸润等银屑病样皮损现象。巨噬细胞通过分泌炎症递质，在促进免疫失调、角质形成细胞和血管内皮细胞异常增殖中发挥着重要作用，极大地影响着银屑病的发病过程^[21]。本研究发现，FZHFZY 可减少巨噬细胞的增殖，减轻银屑病样皮损。既往研究表明，M1 型巨噬细胞在干扰素、肿瘤坏死因子等细胞因子的诱导下活化，可分泌 *IL-6*、*IL-1 β* 、*IL-23*、*IL-12*、*IL-17A* 等多种具有促炎作用的炎症因子^[21]。本研究发现，FZHFZY 能降低皮损组织中 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-23* 和 *IL-17* mRNA 表达。体外实验也表现出相似的结果，不同质量浓度 FZHFZY 能在不同程度上降低 *IL-6*、*TNF- α* 、*IL-23* 和 *IL-8* mRNA 表达。

Erk 是 MAPKs 中最重要、最经典的信号转导途径之一，与细胞的增殖相关，在特定细胞中还可以介导分化信号、调节细胞周期及凋亡。p38 是 MAPKs 的亚类之一，在炎症、应激方面有重要作用，是调节细胞和自身免疫反应的关键^[22]。研究表明 P38 MAPK 和 Erk1/2 广泛参与了银屑病的发病过程^[7]，而 P38 MAPK 磷酸化在介导 *IL-1 α* 和 *IL-1 β* 等下游炎症因子表达上调中起到重要调控作用^[23]。已有临床证据表明，银屑病患者皮损组织中 NF- κ B p65、p38 以及 Erk 磷酸化水平升高^[24-25]，在咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型中，NF- κ B 信号通路的特异性抑制可减轻表皮增厚和炎症浸润^[26]。此外，p38、Erk 和 NF- κ B 之间存在复杂的协同激活网络，可促进下游炎症因子的释放从而放大银屑病炎症。NF- κ B p65 亚基核易位和磷酸化是皮肤炎症的关键过程，既可直接驱动 *IL-6*、*IL-1 β* 等炎症因子的快速转录，亦能通过 TLR4 等通路交互作用放大炎症级联反应^[27]。本研究发现，FZHFZY 可下调皮肤组织和细胞中的 p-P38/P38、p-Erk/Erk、p-P65/P65 蛋白表达。以上结果表明 FZHFZY 能通过阻断 MAPK、NF- κ B 信号通路，下调下游 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-12*、*IL-23* 和 *IL-17* 等炎症因子的表达、减少巨噬细胞的增殖，最终达到对银屑病样皮损的改善作用。

综上所述，FZHFZY 可能是通过调控 P38/Erk/NF- κ B 信号通路减轻炎症反应，从而改善咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮损模型和 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症模型。

利益冲突：本文不存在任何利益冲突。



注：与空白组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 7 FZHFZY 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 p-P38/P38、p-Erk/Erk 和 p-P65/P65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effects of FZHFZY on protein expressions of p-P38/P38, p-Erk/Erk and p-P65/P65 in LPS-induced RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

参考文献:

[1] Armstrong A W, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review[J]. *JAMA*, 2020, 323(19): 1945-1960.

[2] Boehncke W H, Schön M P. Psoriasis[J]. *Lancet*, 2015, 386 (9997): 983-994.

[3] Mahil S K, Smith C H. Psoriasis biologics: a new era of choice[J]. *Lancet*, 2019, 394(10201): 807-808.

[4] Schon M P, Erpenbeck L. The interleukin-23/interleukin-17 axis links adaptive and innate immunity in psoriasis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1323.

[5] Xu J, Duan X, Hu F, et al. Resolvin D1 attenuates imiquimod-induced mice psoriasisform dermatitis through MAPKs and NF- κ B pathways[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 89(2): 127-135.

[6] 高黎, 赵志英. MAPK 信号转导通路及其意义[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(53): 25-27.

[7] Mavropoulos A, Rigopoulou E I, Liaskos C, et al. The role of p38 MAPK in the aetiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 569751.

[8] Lu Y, Chen H, Zhang J, et al. Fuzhengfufuzhiyang Formula (FZHFZY) improves epidermal differentiation via suppression of the Akt/mTORC1/S6K1 signalling pathway in psoriatic models[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 650816.

[9] Chen H, Liu H, Tang B, et al. The protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on imiquimod-induced psoriasis in mice via suppression of mTOR/STAT3 signaling[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 1980456.

[10] Samarasekera E, Sawyer L, Parnham J, et al. Assessment and management of psoriasis: summary of NICE guidance[J]. *BMJ*, 2012, 345: e6712.

[11] Chen J, Fu Y, Xiong S. Keratinocyte derived HMGB1 aggravates psoriasis dermatitis via facilitating inflammatory polarization of macrophages and hyperproliferation of keratinocyte[J]. *Mol Immunol*, 2023, 163: 1-12.

[12] Jiang W, Zhang T, Qiu Y, et al. Keratinocyte-to-macrophage communication exacerbate psoriasisform dermatitis via LRG1-enriched extracellular vesicles[J]. *Theranostics*, 2024, 14(3): 1049-1064.

[13] Dos A C A. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen[J]. *Results Probl Cell Differ*, 2017, 62: 161-179.

[14] Michalek I M, Loring B, John S M. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2017, 31(2): 205-212.

[15] 杨小娟, 孟祥慧. 银屑病的治疗进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2020, 41 (6): 120-124.

[16] Zhao Y K, Zhang Y Q, Wang F, et al. Developing shingles-induced koebner phenomenon in a patient with psoriasis: a case report[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(26): e1009.

[17] Ferrara F, Verduci C, Laconi E, et al. Current therapeutic overview and future perspectives regarding the treatment of psoriasis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143 (Pt 1): 113388.

[18] Chen L, Chen H, Lu Y, et al. Decoding active components in a formulation of multiple herbs for treatment of psoriasis based on three cell lines fishing and liquid chromatography-mass spectrometry analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020,

186; 113331.

[19] Xie M, Zhang M, Qiao Y, *et al.* Molecular mechanism of PSORI-CM01 for psoriasis by regulating the inflammatory cytokines network[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318 (Pt A): 116935.

[20] Yang Y, Zhao Y, Lai R, *et al.* An emerging role of proanthocyanidins on psoriasis: evidence from a psoriasis-like mouse model[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5800586.

[21] 陈建霞, 冯燕艳. 巨噬细胞在银屑病发病机制中作用的研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2019, 48(11): 714-716.

[22] Mavropoulos A, Orfanidou T, Liaskos C, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) -mediated autoimmunity: lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris[J]. *Autoimmun Rev*, 2013, 12 (5): 580-590.

[23] Yeung Y T, Bryce N S, Adams S, *et al.* p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells[J]. *J Neurooncol*, 2012, 109(1): 35-44.

[24] Gesser B, Rasmussen M K, Iversen L. Dimethyl fumarate targets MSK1, RSK1, 2 and IKK α / β kinases and regulates NF- κ B/p65 activation in psoriasis: a demonstration of the effect on peripheral blood mononuclear cells, drawn from two patients with severe psoriasis before and after treatment with dimethyl fumarate[J]. *Psoriasis (Auckl)*, 2020, 10: 1-11.

[25] Aarebrot A K, Solberg S M, Davies R, *et al.* Phosphorylation of intracellular signalling molecules in peripheral blood cells from patients with psoriasis on originator or biosimilar infliximab[J]. *Br J Dermatol*, 2018, 179(2): 371-380.

[26] Xu J, Duan X, Hu F, *et al.* Resolvin D1 attenuates imiquimod-induced mice psoriasiform dermatitis through MAPKs and NF- κ B pathways[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 89(2): 127-135.

[27] 王 宁, 牛凡琪, 李彦梅, 等. 银屑病相关信号通路的中 药调控研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(7): 118-129.

基于 PGAM5-Drp1 轴探讨温肺降浊方对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导 BV-2 细胞线粒体功能的影响

张 鼎¹, 胡芷涵², 周珂青¹, 陈 炜³, 秦红玲³, 向军军³, 胡跃强^{3*}
(1. 广西中医药大学研究生院, 广西南宁 530001; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 3. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023)

摘要: **目的** 探讨温肺降浊方对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导 BV-2 细胞线粒体功能的影响。**方法** 通过 A β ₂₅₋₃₅ 诱导 BV-2 细胞建立阿尔茨海默病 (AD) 细胞模型, 确定 A β ₂₅₋₃₅ 干预的最佳浓度和时间点, 设置 LFHP-1c 组 (抑制剂) 和温肺降浊方含药血清组。CCK-8 法检测最佳干预浓度和时间点, Transwell 实验观察细胞迁移情况, Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡情况, 免疫荧光法检测 PGAM5、Drp1 的阳性细胞表达情况, RT-qPCR 法和 Western blot 法检测细胞 PGAM5、Drp1、OPA1、Mfn1/2 mRNA 和蛋白表达。**结果** 以终浓度 5 μ mol/L 的 A β ₂₅₋₃₅ 干预 48 h 为制备 AD 细胞模型的最佳条件, 20% 温肺降浊方含药血清干预 48 h 细胞活性最佳。与对照组比较, 模型组细胞迁移数量减少, 存在较多亮蓝色阳性凋亡细胞, PGAM5、Drp1 阳性细胞数、mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.05$), OPA1、Mfn1/2 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组细胞迁移数量增加, 亮蓝色阳性凋亡细胞减少, PGAM5、Drp1 阳性细胞数、mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$), OPA1、Mfn1/2 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.05$)。**结论** 温肺降浊方可以调控 PGAM5-Drp1 轴减轻 AD 模型细胞损伤, 改善线粒体稳态平衡, 从而提高认知水平, 发挥脑保护效应。

关键词: 温肺降浊方; 阿尔茨海默病; A β ₂₅₋₃₅; PGAM-Drp1 轴; 线粒体稳态平衡; BV-2 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)08-2558-08

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2025. 08. 011

收稿日期: 2024-03-18
基金项目: 国家自然科学基金 (82260904); 国家中医药管理局高水平重点学科 (ZYYZDXK-2023166); 广西中医脑病临床研究中心项目 (桂科 AD20238028); 广西中医药重点学科建设项目 (GZXK-Z-20-13); 广西中医药大学“歧黄工程”高层次人才团队 (202410); 广西中医药大学博士研究生创新项目 (YCBXJ2023010)
作者简介: 张 鼎 (1993—), 男, 博士生, 从事中医药防治缺血性中风和血管性痴呆的基础与临床研究。E-mail: 1301482056@qq.com
*** 通信作者:** 胡跃强 (1973—), 男, 教授, 从事中医药防治缺血性脑血管疾病。Tel: 13152510678, E-mail: 137463195@qq.com
网络出版日期: 2024-07-22
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240719.1021.002.html>.