

引用:乔善鑫,李方睿,禹亚杰,魏海燕,徐萌,王英,徐兴华,马亚琴.肤痒清凝胶通过调控p38 MAPK/JNK/Caspase-3信号通路改善DNCB诱导的小鼠特异性皮炎[J].中医导报,2025,31(6):55-60.

# 肤痒清凝胶通过调控p38 MAPK/JNK/Caspase-3信号通路改善DNCB诱导的小鼠特异性皮炎\*

乔善鑫<sup>1</sup>,李方睿<sup>2</sup>,禹亚杰<sup>3</sup>,魏海燕<sup>4</sup>,徐萌<sup>5</sup>,王英<sup>1</sup>,徐兴华<sup>1</sup>,马亚琴<sup>1</sup>

(1.内蒙古包头医院,内蒙古 包头 014010;

2.国药北方医院,内蒙古 包头 014010;

3.四川护理职业学院,四川 成都 610100;

4.上海市浦东新区南汇精神卫生中心,上海 200120;

5.四川省中西医结合医院,四川 成都 610100)

[摘要] 目的:探究肤痒清凝胶(FYQO)调控p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/c-Jun氨基末端激酶(JNK)/胱天蛋白酶-3(Caspase-3)信号通路对2,4-二硝基氯苯(DNCB)诱导的小鼠特异性皮炎(AD)皮损的改善作用。方法:75只小鼠随机分为对照组(Control组)、模型组(DNCB组)、肤痒清凝胶低剂量组(FYQO-1 g/kg组)、肤痒清凝胶中剂量组(FYQO-2 g/kg组)、肤痒清凝胶高剂量组(FYQO-4 g/kg组),每组15只。实验首日,小鼠腹部涂抹30  $\mu$ L 5.0% DNCB溶液致敏,第3天于背部涂50  $\mu$ L 0.2% DNCB溶液二次激发,此后每3 d重复1次,共计3次,第9天观察背部皮肤反应,若出现红肿、丘疹等即为造模成功。Control组不处理,DNCB组涂抹空白凝胶,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组分别涂抹1、2、4 g/kg肤痒清凝胶,2次/d,共9 d;在首次涂抹凝胶后的第3天和第9天观察小鼠搔抓行为,采用湿疹面积及严重程度指数(EASI)评分标准评价;苏木精-伊红(HE)染色观察皮损组织病理变化;免疫组织化学检测标志物蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)和免疫印迹检测p38 MAPK/JNK/Caspase-3通路相关标志物mRNA和蛋白水平。结果:在首次涂抹凝胶后第3、9天,与Control组比较,DNCB组小鼠搔抓次数显著增加,在停止涂抹凝胶当天及结束后1周,DNCB组EASI评分升高,小鼠背部皮肤出现AD样皮损,表皮和棘皮层增厚,炎性细胞浸润,P38、JNK和cleaved Caspase-3 mRNA和蛋白水平明显升高( $P<0.05$ );在首次涂抹凝胶后第3、9天,与DNCB组比较,FYQO-1 g/kg、FYQO-2 g/kg、FYQO-4 g/kg组小鼠的搔抓次数显著减少,在停止涂抹凝胶当天及结束后1周,小鼠的EASI评分显著降低,小鼠背部皮肤出现不同程度的皮肤变薄、红斑和水肿,表皮层和棘皮层轻度增厚,炎症细胞浸润减少等情况,P38、JNK和cleaved Caspase-3 mRNA和蛋白水平显著降低( $P<0.05$ );FYQO-4 g/kg组的效果优于FYQO-1 g/kg组和FYQO-2 g/kg组( $P<0.05$ )。结论:肤痒清凝胶可通过调控p38MAPK/JNK/Caspase-3信号通路改善DNCB诱导的小鼠特异性皮炎。

[关键词] 特异性皮炎;肤痒清凝胶;p38 MAPK/JNK/Caspase-3信号通路;2,4-二硝基氯苯;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)06-0055-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.010

Fuyangqing Ointment (肤痒清凝胶) Improves DNCB Induced Atopic Dermatitis in Mice by Regulating p38 MAPK/JNK/Caspase-3 Pathway

QIAO Shanxin<sup>1</sup>, LI Fangrui<sup>2</sup>, YU Yajie<sup>3</sup>, WEI Haiyan<sup>4</sup>, XU Meng<sup>5</sup>,

WANG Ying<sup>1</sup>, XU Xinghua<sup>1</sup>, MA Yaqin<sup>1</sup>

(1.Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou Inner Mongolia 014010, China; 2.National Pharmaceutical North Hospital, Baotou Inner Mongolia 014010, China; 3.Sichuan Nursing Vocational College, Chengdu Sichuan 610100, China; 4.Nanhui Mental Health Center, Pudong New Area, Shanghai 200120, China;

\*基金项目:内蒙古科技厅十四五重点研发与成果转化项目(2022YF5H0012)

通信作者:马亚琴,女,主任医师,研究方向为中医治未病

5.Sichuan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Chengdu Sichuan 610100, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of Fuyangqing Ointment (FYQO) on the improvement of skin lesions in mice with atopic dermatitis (AD) induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) by regulating p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) /c-Jun terminal kinase (JNK)/cysteine protease-3 (Caspase-3) pathway. Methods: Totally 75 mice were randomly divided into control group, model group (DNCB group), low dose group of Fuyangqing Ointment (FYQO-1 g/kg group), medium dose group of Fuyangqing Ointment (FYQO-2 g/kg group), and high dose group of Fuyangqing Ointment (FYQO-4 g/kg group), with 15 mice in each group. On the 1<sup>st</sup> day of the experiment, 30  $\mu$ L of 5.0% DNCB solution was applied to the abdomen of mice to induce sensitization. On the 3<sup>rd</sup> day, 50  $\mu$ L of 0.2% DNCB solution was applied to the back for a second stimulation. This was repeated every 3 days for a total of 3 times. On the 9<sup>th</sup> day, the skin reaction on the back was observed. If redness, swelling, papules, etc. appeared, the model was considered successful. The control group was not treated, while the DNCB group was smeared with blank gel. The FYQO-1 g/kg group, FYQO-2 g/kg group and FYQO-4 g/kg group were smeared with 1, 2, and 4 g/kg Fuyangqing Ointment respectively, twice a day for 9 days. Scratching behavior of mice was observed on the 3<sup>rd</sup> and 9<sup>th</sup> days after the 1<sup>st</sup> application of gel, and the scratching behavior was evaluated with the eczema area and severity index (EASI) scoring standard. Hematoxylin eosin staining was used to observe the pathological changes of skin lesions, and immunohistochemical was used to detect marker protein expression. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of p38MAPK/JNK/Caspase-3 pathway biomarkers. Results: On the 3<sup>rd</sup> and 9<sup>th</sup> day after the first application of gel, compared with the control group, the scratching times of mice increased in the DNCB group. On the day when the gel was stopped and one week after the end, the EASI score increased in the DNCB group, and the back skin of mice showed AD like lesions, thickening of epidermis and spinous cortex, and inflammatory cell infiltration. Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of P38, JNK and cleaved Caspase-3 were increased in DNCB group ( $P<0.05$ ). On the 3<sup>rd</sup> and 9<sup>th</sup> days after the first application of gel, compared with the DNCB group, the scratching times of the mice reduced in FYQO-1 g/kg, FYQO-2 g/kg, and FYQO-4 g/kg groups. On the day when the gel was stopped and one week after the end, the EASI scores of the mice reduced in FYQO-1 g/kg, FYQO-2 g/kg, and FYQO-4 g/kg groups. The skin of the mice's back was thinner, erythema and edema to varying degrees, and the epidermis and spinous cortex were slightly thickened in FYQO-1 g/kg, FYQO-2 g/kg, and FYQO-4 g/kg groups. The inflammatory cell infiltration was reduced in FYQO-1 g/kg, FYQO-2 g/kg, and FYQO-4 g/kg groups. Compared with the DNCB group, the mRNA and protein expression of levels of P38, JNK, and cleaved Caspase-3 reduced in FYQO-1 g/kg, FYQO-2 g/kg, and FYQO-4 g/kg groups ( $P<0.05$ ). The FYQO-4 g/kg group showed better effect than FYQO-2 g/kg and FYQO-4 g/kg groups ( $P<0.05$ ). Conclusion: Fuyangqing Ointment can improve DNCB induced atopic dermatitis in mice by regulating p38 MAPK/JNK/Caspase-3 pathway.

[Keywords] atopic dermatitis; Fuyangqing Ointment; p38 MAPK/JNK/Caspase-3 pathway; 2,4-dinitrochlorobenzene; mouse

特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)又称异位性皮肤炎或遗传性过敏性皮肤疾患,是一类以慢性病程、反复发作及显著炎症反应为特征的皮肤病理状态<sup>[1-2]</sup>。目前,AD的具体成因尚未得到全面阐明,然而,学术界普遍认同其发病机制的多元性,涉及遗传因素、免疫系统异常以及外界环境因素的复杂交互作用<sup>[3]</sup>。在全球范围内,AD的流行现状不容忽视,据估计至少有2.3亿人口受其困扰,这一数字凸显了AD作为全球性健康问题的严峻性<sup>[4]</sup>。AD在不同年龄阶段表现各异,一般分为婴儿期、儿童期和成人期3个阶段<sup>[5]</sup>。婴儿期主要发生于出生后第二或第三个月,症状以面部红斑、丘疹、丘疱疹及渗

液为主,常伴有剧烈瘙痒,严重影响患儿睡眠和生长发育<sup>[6]</sup>。随着年龄增长,AD症状逐渐变化,儿童期主要表现为亚急性皮炎,渗出减少,但瘙痒依然存在,且皮损多集中于四肢屈侧<sup>[7]</sup>。成人期则表现为四肢伸侧皮肤增厚、瘙痒且干燥。AD临床表现多样,除皮肤干燥、瘙痒和湿疹外,还可能伴有其他特异性症状,如鱼鳞病、毛周角化、掌纹症等<sup>[8]</sup>。患者常伴有家族过敏史,如哮喘、过敏性鼻炎等。治疗AD的方法包括常规治疗、外用药物治疗、紫外线治疗等<sup>[9]</sup>。近年来,随着生物医学研究的深入,p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)/c-Jun氨基末端激酶(c-Jun terminal kinase,

JNK)/胱天蛋白酶-3(cysteine protease-3,Caspase-3)信号通路在AD病理生理过程中的关键作用逐渐显露<sup>[10-11]</sup>。这一信号级联的激活与AD的炎症反应、细胞凋亡、皮肤屏障功能受损等关键环节紧密相连,为探索AD发病机制及开发新型治疗药物提供了重要靶标。肤痒清凝胶(Fuyangqing Ointment,FYQO),作为传统与现代工艺相结合的中药外用复方制剂,在前期研究中展现出对AD的良好疗效及安全性。本研究基于p38MAPK/JNK/Caspase-3信号通路,深入探讨FYQO干预AD小鼠模型的机制,为中医药在AD防治中的进一步应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 75只6~8周龄健康昆明小鼠,雌雄各半,体重18~22 g,购自北京艾德摩生物技术有限公司[(生产许可证号:SYXK(京)2018-0043)]。小鼠饲养于室温21~27℃,湿度35%~55%,12 h/12 h昼/暗循环环境中,并保持水食充足,饲养1周后进行后续实验。本研究通过内蒙古包钢医院动物实验伦理委员会批准(伦理号:2022MER-005)。

1.1.2 主要试剂 苏木素染液(批号:07232310)、醇溶伊红染液(批号:07222315)、柠檬酸盐修复液(批号:12092310)、山羊抗兔IgG(批号:09122309)、山羊抗小鼠IgG(批号:09062315)均购自安徽欣乐生物技术有限公司;P38抗体(批号:R25239)、JNK(批号:R24780)均购自成都正能生物科技有限责任公司;封闭用羊血清(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:242260328);曲拉通X-100[TritonX-100,上海国药集团化学试剂有限公司,批号:30188983];抗荧光淬灭封片剂[含4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI),美国eBioscience公司,批号:09262310];Gold Band三色微量蛋白标记(上海翊圣生物科技有限公司,批号:G7827730);BCA蛋白定量试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号:20220820);2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene,DNCB)(天津光复精细化工研究所,批号:20070713);cleaved Caspase-3抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号:9664T)。

1.1.3 主要仪器 RM2016徕卡切片机(德国Leica公司);SVE-2光学显微镜(日本Nikon公司);Tanon 5200全自动化学发光图像分析系统(北京原平皓生物技术有限公司);Tecan M1000PRO全自动多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);ME204电子天平(瑞士Mettler toledo公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 肤痒清凝胶的制备 肤痒清凝胶由大黄20 g、黄芩20 g、黄连15 g、黄柏20 g、牡丹皮15 g、姜黄20 g、苍术25 g、厚朴15 g、白芷10 g、白鲜皮30 g、生甘草15 g、苦参30 g、僵蚕10 g、银花藤30 g、冰片27 g、薄荷27 g组成,均购自内蒙古包钢医院,由内蒙古包钢医院中药鉴定教研室鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》<sup>[12]</sup>一部标准。浸膏提取方法如下:取处方量药材,加5倍量70%乙醇回流提取,每次1 h。提取3次,合并提取液,回收乙醇至干。取20%萃取获得的处方浸膏溶解于浓度为70%的乙醇中,制备成浓度标准为每毫升含有1 g原生药材的溶液,以备后续使用。随后,精确称取15%甘油、1.5%三乙醇胺、35%无水乙醇以及预先制备的中药溶液,进行充分

混合。若混合后体积不足,则采用蒸馏水补足至所需量。接着,将添加量在0.5%~2.0%之间的卡波姆粉末均匀撒布于混合物表面,任其充分溶胀,直至完全吸收。待溶胀过程完成后,沿固定方向持续搅拌,直至形成质地均匀、细腻且呈棕色透明的凝胶体。

1.2.2 动物模型制备和分组 75只小鼠随机分为对照组(Control组)、模型组(DNCB组)、肤痒清凝胶低剂量组(FYQO-1 g/kg)、肤痒清凝胶中剂量组(FYQO-2 g/kg)、肤痒清凝胶高剂量组(FYQO-4 g/kg),每组15只。Control组不造模。实验前24 h,在小鼠腹部剃毛,范围约9 cm×9 cm。实验首日,小鼠腹部皮肤均匀涂抹30 μL 5.0% DNCB溶液致敏,第3天,于背部涂抹50 μL 0.2% DNCB溶液二次激发,此后,每隔3 d重复此步骤,共计3次,第9天观察并记录背部皮肤反应,若出现红肿、丘疹、水疱或糜烂,即判定模型构建成功。所有小鼠均成模。于造模后10 d开始,DNCB组小鼠涂抹2 g/kg空白凝胶基质,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠分别给予1 g/kg、2 g/kg、4 g/kg的肤痒清凝胶,2次/d,共治疗9 d。

1.2.3 小鼠皮损评分及搔抓行为观察 在给药后的第3天和第9天,对每只小鼠实施单独隔离并录像观察,记录其在30 min内的搔抓行为频次,其中连续不断的搔抓动作视为单次计数。此外,于治疗前、治疗周期结束时以及治疗结束后1周这3个时间点,采用湿疹面积及严重程度指数(eczema area and severity index,EASI)评分标准<sup>[13]</sup>对小鼠的湿疹状况进行量化评估。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色检测小鼠皮损组织病理变化 给药结束后,每组取5只小鼠,于小鼠背部皮损区切取直径约5 mm的圆形全层皮肤组织。将皮肤组织置于4%多聚甲醛中固定过夜,随后制备石蜡切片(5 μm薄片),66℃烘烤20~30 min。切片经三道二甲苯脱蜡,每道5 min;再经三道递减浓度乙醇脱水,每道3 min。冲洗切片至乙醇清除,苏木素染色3 min,流动水冲洗。用6.1%盐酸酒精分化处理,碳酸锂蓝化,95%乙醇脱水,伊红复染,再次95%乙醇脱水,两道100%乙醇脱水,苯酚-二甲苯混合液透明化处理,最后用中性树胶封片,显微镜下观察记录。

1.2.5 免疫组化检测小鼠皮损组织相关标志物蛋白表达 取“1.2.4”制备的石蜡切片,滴加3%过氧化氢,室温孵育20 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)冲洗,加一抗(1:1 000稀释),37℃孵育60 min,PBS冲洗,滴加二抗(1:200稀释),37℃孵育20 min,PBS冲洗,加二氨基联苯胺显色剂,冲洗,苏木精复染,水洗,脱水、透明、封片,镜下观察P38、JNK和cleaved Caspase-3蛋白表达。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(real time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)检测小鼠皮损组织相关标志物mRNA水平 每组取10只小鼠,于小鼠背部皮损区切取直径约5 mm的圆形全层皮肤组织。于冰上用眼科剪将皮肤组织剪切成适当大小,-80℃冻存备用。取适量皮肤组织,加入Trizol裂解液裂解组织,离心取上清,加入氯仿/异丙醇抽提RNA,75%乙醇漂洗RNA沉淀,加入无酶水溶解RNA,电泳检测并定量。利用cDNA反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA

(37℃ 15 min, 85℃ 5 s)。使用SYBR Green试剂盒进行扩增(95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40个循环)。以GAPDH作内参,校正待测基因的Ct值,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算P38、JNK和cleaved Caspase-3 mRNA水平。PCR引物序列如下:P38-F: 5'-GCAAC-CTCGCTGTGAATGAAGA-3', P38-R: 5'-CACG-TAGCCGGTCATTTCGTC-3'; JNK-F: 5'-AGCCTGCCTGC-CAAG-TACAAG-3', JNK-R: 5'-TCAGTTGACACCAGCAGCAC-3'; cleaved-Caspase-3-F: 5'-GGACCTGTGGACCTGAAAAA-3', cleaved-Caspase-3-R: 5'-GCATGCCATATCATCTGTCAG-3'。

1.2.7 Western blotting检测小鼠皮损组织相关标志物蛋白水平 取“1.2.6”冻存的皮肤组织,加入RIPA裂解液进行匀浆,提取组织总蛋白,配制二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)工作液,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,各组取等量蛋白加入上样缓冲液加热,上样、电泳(电压80 V、电泳30 min,电压120 V,电泳40 min)。电泳结束后,采用湿转法转聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, PVDF膜置于5%脱脂牛奶中封闭2 h,含吐温-20的Tris盐酸缓冲液(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜,加入一抗(P38、p-P38、JNK、cleaved Caspase-3、GAPDH,稀释比例1:2 000)4℃孵育过夜。TBST洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的IgG抗体(稀释比例1:5 000)室温孵育2 h,使用增强型化学发光显色剂显色,凝胶成像仪拍照,计算蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法 使用SPSS 23.0分析数据,计量资料均符合正态分布和方差齐性,以“均数±标准差”( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

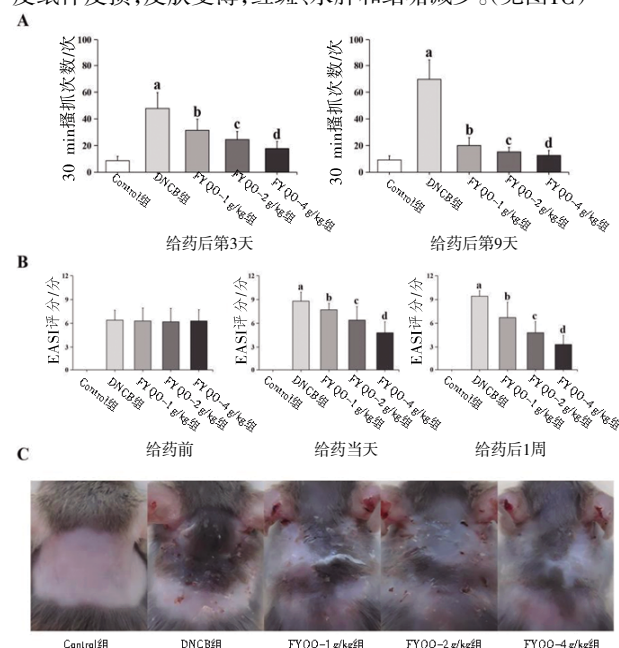
## 2 结果

2.1 肤痒清凝胶对特应性皮炎小鼠皮肤的影响 在给药后3 d,与Control组比较,DNCB组小鼠30 min内的搔抓次数显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与DNCB组比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠30 min内的搔抓次数显著减少( $P < 0.05$ ),且FYQO-4 g/kg组效果优于FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组( $P < 0.05$ )。在给药后9 d,与Control组比较,DNCB组小鼠30 min内的搔抓次数增加更为显著( $P < 0.05$ );与DNCB组比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠30 min内的搔抓次数显著降低( $P < 0.05$ ),且FYQO-4 g/kg组效果优于FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组( $P < 0.05$ )。(见图1A)

给药结束当天,与Control组比较,DNCB组小鼠EASI评分显著升高( $P < 0.05$ );与DNCB组比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠EASI评分有所降低( $P < 0.05$ ),且FYQO-4 g/kg组EASI评分低于FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组( $P < 0.05$ );给药结束后1周,与Control组比较,DNCB组小鼠EASI评分更加显著升高( $P < 0.05$ );与DNCB组比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠EASI评分显著降低( $P < 0.05$ ),且FYQO-4 g/kg组EASI评分低于FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组( $P < 0.05$ )。(见图1B)

与Control组比较,DNCB组小鼠背部皮损出现明显的AD样皮损,结痂、水肿、红斑、结垢和干燥;与DNCB组比较,

FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠出现羊皮纸样皮损,皮肤变薄,红斑、水肿和结垢减少。(见图1C)



注:A.各组小鼠的搔抓行为;B.各组小鼠EASI评分;C.各组小鼠皮损组织宏观图片。与Control组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与DNCB组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与FYQO-1 g/kg组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与FYQO-2 g/kg组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图1 肤痒清凝胶对特应性皮炎小鼠皮肤的影响

2.2 肤痒清凝胶对特应性皮炎小鼠皮损组织病理学的影响 Control组小鼠的皮肤组织结构维持了正常的生理状态,未显现出常变化;相较于Control组,DNCB组的小鼠皮肤则出现显著的病理改变,具体表现为表皮层与棘皮层的显著增厚,以及大量炎症细胞的广泛浸润;相较于DNCB组,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠的病理损伤均得到了不同程度的缓解,具体表现为表皮层与棘皮层的增厚现象有所减轻,同时炎症细胞的浸润数量明显减少。FYQO-4 g/kg组的改善程度优于FYQO-1 g/kg组与FYQO-2 g/kg组。(见图2)

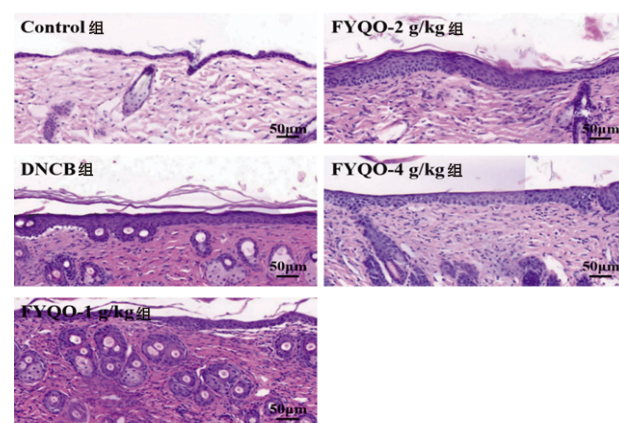


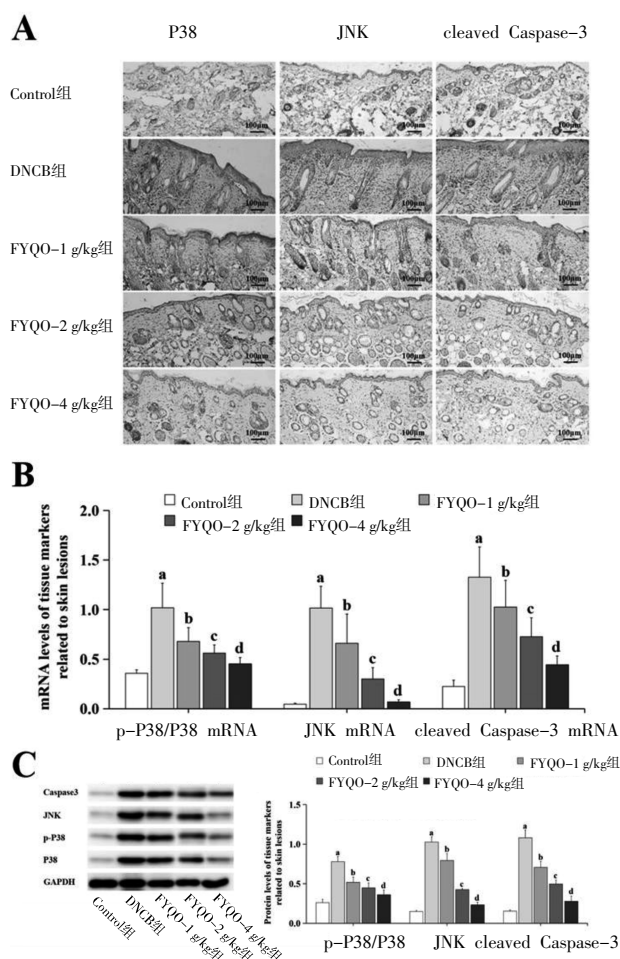
图2 各组小鼠皮损组织病理学变化 (HE, ×200)

2.3 肤痒清凝胶对特应性皮炎小鼠p38 MAPK/JNK/Caspase-3通路的影响 免疫组化染色显示,与Control组比较,DNCB组小鼠皮损组织中P38、JNK和cleaved Caspase-3蛋白表达量均

升高;与DNCB组小鼠比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠皮损组织中P38、JNK和cleaved Caspase-3蛋白表达量均下降,且FYQO-4 g/kg组小鼠表达量低于FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组。(见图3A)

RT-qPCR结果显示,与Control组比较,DNCB组小鼠皮损组织P38 mRNA、JNK mRNA和cleaved Caspase-3 mRNA相对表达量明显升高( $P<0.05$ );与DNCB组小鼠比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠皮损组织P38 mRNA、JNK mRNA和cleaved Caspase-3 mRNA相对表达量明显降低( $P<0.05$ );且FYQO-4 g/kg组效果优于FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组( $P<0.05$ )。(见图3B)

Western blot结果显示,与Control组比较,DNCB组小鼠皮损组织P38、p-P38、JNK和cleaved Caspase-3蛋白相对表达量明显升高( $P<0.05$ );与DNCB组小鼠比较,FYQO-1 g/kg组、FYQO-2 g/kg组、FYQO-4 g/kg组小鼠皮损组织P38、p-P38、JNK和cleaved Caspase-3蛋白相对表达量明显降低( $P<0.05$ );且FYQO-4 g/kg组效果优于FYQO-1 g/kg、FYQO-2 g/kg组( $P<0.05$ )。(见图3C)



注:A.皮肤组织免疫组化染色( $\times 200$ );B.皮肤组织RT-qPCR检测;C.皮肤组织Western blotting检测。与Control组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与DNCB组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与FYQO-1 g/kg组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与FYQO-2 g/kg组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

图3 肤痒清凝胶对特应性皮炎小鼠 p38 MAPK/JNK/Caspase-3 通路的影响

### 3 讨论

AD是一种慢性、反复发作的炎症性皮肤病,主要症状为四肢屈侧出现干燥性湿疹样皮疹和剧烈瘙痒<sup>[14]</sup>。其发病机制涉及遗传、环境、皮肤屏障功能、微生物群落失衡、免疫功能紊乱和皮肤炎症反应等多方面因素<sup>[15]</sup>。中医药疗法不仅关注症状,还深入分析患者体质和病因,实施个体化治疗策略,能有效缓解病情、改善患者生活质量并延缓疾病进展<sup>[16]</sup>。本研究结合中药组方与凝胶剂型,通过现代工艺技术加工中药,制成凝胶剂型,既保留了中药外治的安全性和低毒副作用,又避免了传统外治法的不便和易变质问题。这种凝胶剂型具有良好的生物相容性和可降解性,且理化和生物学特性优良。FYQO对皮肤刺激小,能有效缓释药物,减少用药次数,提高患者顺应性。

本研究发现,DNCB组小鼠在30 min内搔抓行为和EASI评分显著上升,背部皮肤出现AD样病变,包括结痂、水肿、红斑等症状,表皮和棘皮层增厚以及炎症细胞浸润。与DNCB组比较,使用不同剂量FYQO后,小鼠的搔抓次数和EASI评分显著下降,皮肤病变减轻,表皮和棘皮层轻度增厚,红斑、水肿、结垢减少,角化过度减轻,表明FYQO能有效减少AD样皮损,且高剂量效果更佳。

p38 MAPK是MAPK家族关键成员,参与应激和炎症调控。在AD中,应激因素激活p38 MAPK通路,影响炎症介质和细胞凋亡<sup>[17]</sup>。p38 MAPK在AD中调节炎症细胞浸润和活化、炎症介质释放等关键环节。研究<sup>[18]</sup>显示p38 MAPK激活可促进角质形成细胞异常增殖和分化,破坏皮肤屏障,加重AD病情。JNK是MAPK家族另一成员,参与应激反应和细胞凋亡调控。在AD中,JNK激活受应激因素诱导,通过磷酸化c-Jun形成AP-1复合体,调控炎症基因表达<sup>[19]</sup>。JNK信号通路过度激活会加剧AD的炎症和组织损伤。Caspase-3是细胞凋亡中的关键执行者,由炎症因子和细胞应激触发,在AD中参与皮肤细胞凋亡。皮肤细胞过度凋亡会破坏皮肤屏障功能,加重病情。p38 MAPK/JNK/Caspase-3信号通路在AD中相互作用,形成复杂网络,共同影响AD的发病机制和病理过程。有研究<sup>[20]</sup>表明,在AD小鼠模型中,p-P38蛋白表达水平高于正常小鼠。AD发展涉及皮肤屏障破坏、免疫激活和炎症介质释放。这些会影响JNK激活和表达,导致AD阶段JNK和Caspase-3蛋白含量上升<sup>[21-22]</sup>。本研究发现,与Control组比较,DNCB组小鼠皮肤组织中p-P38、JNK和cleaved Caspase-3的mRNA和蛋白水平显著升高。AD小鼠模型中,p38 MAPK信号通路因炎症反应和免疫失调而过度激活,导致p-P38蛋白含量增加,进而调控炎症和细胞凋亡。与DNCB组比较,经不同剂量FYQO给药后,小鼠皮肤组织中p-P38、JNK和cleaved Caspase-3的mRNA和蛋白水平降低,且FYQO-4 g/kg组效果最佳。表明FYQO可减轻AD损伤,保护皮肤屏障,改善微生态,抑制角质细胞增生。分析其原因为:FYQO中的大黄具有泻火解毒、活血祛瘀、清湿热的的作用,可缓解AD炎症,改善皮肤厚度,减少炎症细胞浸润,降低白细胞、嗜酸性粒细胞和血清IgE水平;牡丹皮具有清热凉血、活血化瘀的作用,对改善AD炎症和瘀血有效;生甘草中的甘草酸具有抗炎、抗过敏作用,可减轻炎症,缓解瘙痒。肤痒清凝胶



调控p38MAPK/JNK/Caspase-3通路改善DNCB诱导的小鼠特异性皮炎示意图见图4。

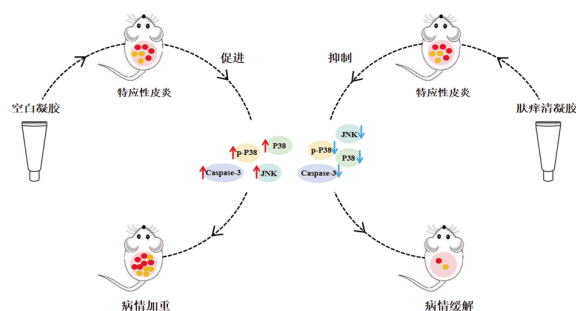


图4 肤痒清凝胶调控p38MAPK/JNK/Caspase-3通路改善DNCB诱导的小鼠特异性皮炎示意图

综上所述,FYQO可以通过抑制DNCB致敏的AD小鼠皮损组织中p-P38、JNK和cleaved Caspase-3蛋白含量,以达到治疗AD的目的。这在一定程度上揭示了FYQO通过p38MAPK/JNK/Caspase-3通路治疗AD的可能作用机制。

# 参考文献

- [1] MARTIN M J, ESTRAVÍS M, GARCÍA-SÁNCHEZ A, et al. Genetics and epigenetics of atopic dermatitis: An updated systematic review[J]. Genes,2020,11(4):442.
- [2] NEDOSZYTKO B, RESZKA E, GUTOWSKA-OWSIK D, et al. Genetic and epigenetic aspects of atopic dermatitis[J]. Int J Mol Sci,2020,21(18):6484.
- [3] HARTMANE I. Study of genetic mutations and their association with the development of atopic dermatitis and other skin diseases[J]. Plast Aesthet Nurs,2024,44(3):200–209.
- [4] SACOTTE R, SILVERBERG J I. Epidemiology of adult atopic dermatitis[J]. Clin Dermatol,2018,36(5):595–605.
- [5] RAMÍREZ-MARÍN H A, SILVERBERG J I. Differences between pediatric and adult atopic dermatitis[J]. Pediatr Dermatol,2022,39(3):345–353.
- [6] RINNOV M R, HALLING A S, GERNER T, et al. Skin biomarkers predict development of atopic dermatitis in infancy[J]. Allergy,2023,78(3):791–802.
- [7] ABUABARA K, YU A M, OKHOVAT J P, et al. The prevalence of atopic dermatitis beyond childhood: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies[J]. Allergy,2018,73(3):696–704.
- [8] CHAN A R, SANDHU V K, DRUCKER A M, et al. Adult-onset atopic dermatitis: Presentations and progress[J]. J Cutan Med Surg,2020,24(3):267–272.
- [9] GIAVINA-BIANCHI M, GIAVINA-BIANCHI P. Systemic treatment for severe atopic dermatitis[J]. Arch Immunol Ther Exp,2019,67(2):69–78.
- [10] LEE J H, SON S H, KIM N J, et al. p38 MAPK inhibitor NJK14047 suppresses CDNB-induced atopic dermatitis-like symptoms in BALB/c mice[J]. Biomol Ther, 2022,30(6):501–509.
- [11] LEE H S, KIM E N, KIM G R, et al. Persimmon leaf extract protects mice from atopic dermatitis by inhibiting T cell activation via regulation of the JNK pathway[J]. Phytother Res,2021,35(5):2545–2556.
- [12] 田硕,苗明三,熊维政,等.2020年版《中国药典》(一部)药材和饮片的外用功能及应用分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(8):161–167.
- [13] 秦宗碧,徐爱琴,蔡翔,等.黄连素调节PI3K/AKT/NF-κB信号通路对慢性湿疹大鼠皮肤损伤的影响[J].天津医药, 2023,51(8):834–840.
- [14] FRAZIER W, BHARDWAJ N. Atopic dermatitis: Diagnosis and treatment[J]. Am Fam Physician,2020,101(10):590–598.
- [15] LUGER T, AMAGAI M, DRENO B, et al. Atopic dermatitis: Role of the skin barrier, environment, microbiome, and therapeutic agents[J]. J Dermatol Sci, 2021,102(3):142–15
- [16] WOLLENBERG A, BARBAROT S, BIEBER T, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: Part I [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol,2018,32(5): 657–682.
- [17] DONG H, FENG C J, CAI X, et al. 7-Methoxy-isoflavone ameliorates atopic dermatitis symptoms by regulating multiple signaling pathways and reducing chemokine production[J]. Sci Rep,2022,12(1):8760.
- [18] QIN W, DUAN J F, XIE X M, et al. Exposure to diisononyl phthalate promotes atopic March by activating of NF-κB and p38 MAPK[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020,395:114981.
- [19] ESSER P R, HUBER M, MARTIN S F. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory response in allergic contact dermatitis[J]. Eur J Immunol,2023,53(7):e2249984.
- [20] ALYOUSSEF A. Blocking TGF-β type 1 receptor partially reversed skin tissue damage in experimentally induced atopic dermatitis in mice[J]. Cytokine,2018,106: 45–53.
- [21] 丁福岩,周梦琪,隋克毅,等.中医药调控NF-κB信号通路治疗特异性皮炎研究进展[J/OL].中医学报,1–8(2024–08–16)[2024–09–16].http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411. R.20240815.1531.006.html.
- [22] USTAOGU E, TURKOGLU Z, ULGEN O A, et al. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde in a mouse model of 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis[J]. Indian J Dermatol,2023,68(2):170–177.

(收稿日期:2024-09-26 编辑:罗英姣)