

## 壬二酸和水杨酸对痤疮丙酸杆菌诱导的细胞炎症因子及 TLR4 蛋白表达的影响

宋莎莎, 王永芳, 陈毅\*, 李新宇\*

中国医学科学院 北京协和医学院 皮肤病研究所, 江苏 南京 210042

**摘要:** 目的 探讨壬二酸和水杨酸对痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* 诱导的炎症因子及 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达的影响。方法 采用 CCK-8 法检测药物对人角质形成细胞 HaCaT 和人单核细胞 THP-1 增殖活力的影响, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测细胞培养上清中白细胞介素 (IL)-8、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 浓度, 利用分子对接技术分析壬二酸、水杨酸与 TLR4 蛋白的分子间相互作用, 并通过细胞免疫荧光和荧光强度分析验证其对 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白表达的影响。结果 经不同浓度的壬二酸或水杨酸处理 48 h 后, 在 HaCaT 细胞实验中, 壬二酸的最大实验质量浓度为 62.50  $\mu\text{g/mL}$ , 水杨酸为 31.25  $\mu\text{g/mL}$ ; THP-1 细胞实验中壬二酸的最大实验质量浓度为 1 000.00  $\mu\text{g/mL}$ , 水杨酸为 500.00  $\mu\text{g/mL}$ 。壬二酸和水杨酸对 *P. acnes* 胞壁成分肽聚糖 (PGN) + 脂磷壁酸 (LTA) 或热灭活 *P. acnes* 诱导后 HaCaT 细胞产生 IL-8 以及对佛波酯 (PMA) + 细菌脂多糖 (LPS) 或热灭活 *P. acnes* 诱导后的 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  均表现出一定的抑制作用, 呈剂量相关性。分子对接结果表明, 壬二酸、水杨酸均能与 TLR4 蛋白受体有效地结合。与对照组相比, PGN+LTA 或热灭活 *P. acnes* 刺激后 HaCaT 细胞表面 TLR4 荧光强度明显增高 ( $P < 0.01$ ), 经 62.50  $\mu\text{g/mL}$  壬二酸预处理后 PGN+LTA 刺激的 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ ), 31.25  $\mu\text{g/mL}$  水杨酸预处理后能明显降低热灭活 *P. acnes* 诱导的细胞表面 TLR4 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。结论 壬二酸和水杨酸能抑制 *P. acnes* 引起的角质形成细胞和单核巨噬细胞中促炎因子的产生, 同时还能减少角质形成细胞表面 TLR4 蛋白的表达, 从而发挥治疗痤疮的作用。

**关键词:** 壬二酸; 水杨酸; 痤疮丙酸杆菌; 炎症因子; Toll 样受体 4

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2024)02 - 0296 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.02.004

## Effects of azelaic acid and salicylic acid on the level of inflammatory factors and TLR4 protein induced by *Propionibacterium acnes*

SONG Shasha, WANG Yongfang, CHEN Yi, LI Xinyu

Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of azelaic acid and salicylic acid on the expression of inflammatory factors and Toll-like receptor4 (TLR4) induced by *Propionibacterium acnes*. **Methods** The effect of drugs on cell proliferation was detected by CCK-8 method. The concentrations of interleukin (IL)-8, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the supernatant of cell culture were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The molecular interaction of azelaic acid, salicylic acid and TLR4 protein receptor was analyzed by molecular docking. The expression of TLR4 protein on the surface of HaCaT cells was verified by cellular immunofluorescence and fluorescence intensity analysis. **Results** After treated with azelaic acid or salicylic acid for 48 h, the safe concentrations of azelaic acid and salicylic acid in HaCaT cells were 62.50  $\mu\text{g/mL}$  and 31.25  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The maximum experimental mass concentration of azelaic acid and salicylic acid in THP-1 cells were 1 000.00  $\mu\text{g/mL}$  and 500.00  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Azelaic acid and salicylic acid inhibited IL-8 production in HaCaT cells induced by *P. acnes* cell wall component peptidoglycan (PGN) + lipoteichoic acid (LTA) or heat inactivated *P. acnes*. Furthermore, azelaic acid and salicylic acid could also inhibit IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production in THP-1 cells induced by phorbol ester (PMA) + lipopolysaccharide (LPS) or heat inactivated *P. acnes* in a dose-dependent manner. Molecular docking showed that azelaic acid and salicylic acid could bind to TLR4 protein receptor effectively. Compared with the control group, the fluorescence intensity of TLR4 on the surface of HaCaT cells stimulated by PGN + LTA or heat inactivated

收稿日期: 2023-11-15

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (CAMS-2017-I2M-1-011)

作者简介: 宋莎莎, 女, 本科, 助理研究员, 研究方向为皮肤药理学。E-mail: shasha12ss@163.com

\*通信作者: 李新宇, 女, 博士, 研究员, 研究方向为皮肤病药物治疗学。E-mail: xinyusli609@163.com

陈毅, 博士, 助理研究员, 研究方向为皮肤药理学。E-mail: chenyl19931006@163.com

*P. acnes* was significantly increased ( $P < 0.01$ ). After treated with 62.50  $\mu\text{g/mL}$  azelaic acid, the expression of TLR4 protein on the surface of HaCaT cells was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, pretreatment with 31.25  $\mu\text{g/mL}$  salicylic acid could significantly reduce the expression of TLR4 protein on the surface of HaCaT cells induced by heat inactivated *P. acnes* ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Azelaic acid and salicylic acid can inhibit the production of pro-inflammatory factors in keratinocytes and mononuclear macrophages induced by *P. acnes*, and also reduce the expression of TLR4 protein on the surface of keratinocytes. Thus, azelaic acid and salicylic acid all play an important role in the treatment of acne.

**Key words:** azelaic acid; salicylic acid; propionibacterium acnes; inflammatory factors; TLR4

痤疮是皮肤科常见的一种慢性炎症性疾病, 主要发生于颜面和胸背多脂区, 临床主要表现为粉刺、丘疹、脓疱和结节等多形性皮损, 好发于青春期, 对青少年的心理和社交影响很大<sup>[1]</sup>。痤疮的发病机制主要包括皮脂腺大量分泌, 毛囊皮脂腺导管上皮过度角化, 微生物尤其是痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* 的定殖及炎症和免疫反应。机体免疫细胞如角质形成细胞、单核细胞等在抵抗 *P. acnes* 等入侵过程中释放白细胞介素 (IL) -1、IL-8 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子, 这些炎症因子将炎症细胞趋化至毛囊周围, 引起炎症损伤<sup>[2]</sup>。

壬二酸又名杜鹃花酸, 是一种来自杜鹃花的天然含有 9 个碳原子的饱和直链二羧酸。壬二酸的抗炎和抗氧化特性已被证实, 其外用可以治疗酒糟鼻、寻常痤疮、黄褐斑和炎症后色素沉着等疾病<sup>[3]</sup>。《中国痤疮治疗指南 (2019 修订版)》推荐壬二酸是轻中度痤疮的二线外用药<sup>[4]</sup>。水杨酸最早是从柳树皮中提取出的天然活性成分, 属于  $\beta$ -羟基酸, 因其具有较好的脂溶性, 更易深入毛囊皮脂腺深部而溶解粉刺, 被广泛用于治疗痤疮和脂溢性皮炎等疾病<sup>[5]</sup>。本研究体外观察壬二酸和水杨酸对 *P. acnes* 的胞壁成分肽聚糖 (PGN) 和脂磷壁酸 (LTA)、热灭活 *P. acnes* 以及佛波醇酯 (PMA) 和细菌脂多糖 (LPS) 分别诱导的人角质形成细胞 HaCaT 和人单核细胞 THP-1 产生炎症因子的影响, 通过分子对接技术分析 2 种药与 Toll 样受体 4 (TLR4) 蛋白间的相互作用模式以及实验验证对 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

壬二酸 (质量分数 99.15%, 上海易恩化学技术有限公司, 批号 RH244687); 水杨酸 (质量分数 99.7%, 山东新华制药股份有限公司提供, 批号 21036); 人角质形成细胞永生化细胞株 HaCaT、人单核细胞株 THP-1 (本室维持保存); *P. acnes* (ATCC6919, 本室维持保存); PGN、LTA、PMA、LPS (美国 Sigma 公司, 货号分别是 69554、L3265、

P1585、L4130); DMEM、RPMI 1640 培养基、胎牛血清、2-巯基乙醇 (美国 Gibco 公司); 脑心浸出液肉汤 (BHI, 青岛高科园海博生物技术有限公司); 人 IL-8、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (北京四正柏生物科技有限公司); 4% 多聚甲醛 (南京森贝伽生物科技有限公司); TLR4 抗体 (美国 Santa cruz 公司); Cell Counting Kit-8、Triton X-100、山羊血清、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)、DAPI 染色液、BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); ECL 显色液 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 厌氧产气袋和密封培养罐 (日本三菱 MGC)。酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 激光扫描共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** HaCaT 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清、0.05 mmol/L 2-巯基乙醇的 RPMI 1640 培养基培养, 培养条件为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ , 并以 1:3 每隔 2~3 d 传代 1 次, 取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

**1.2.2 灭活 *P. acnes* 的制备** 挑取在厌氧条件下血琼脂平皿中维持培养的 *P. acnes* 菌落接种于 BHI 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧环境下培养 24 h, 收集菌落, 用无菌 PBS 洗 3 次, 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 4 000 r/min 离心 15 min, 调整菌液浓度至  $4.5 \times 10^7$  CFU/ $\mu\text{L}$ , 置于 80  $^{\circ}\text{C}$  水浴中灭活 30 min。

**1.2.3 细胞增殖活力** HaCaT 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔培养板, 0.1 mL/孔, 培养过夜后弃去孔内培养基, 加入各浓度药液 0.2 mL; THP-1 细胞以  $3 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔培养板, 0.1 mL/孔, 培养过夜后每孔加入各浓度药液 0.1 mL。每组设 4 个复孔, 培养 48 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 于培养箱中孵育 4 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

**1.2.4 HaCaT 细胞培养上清液中 IL-8 含量** PGN+

LTA 诱导实验设置为对照组（仅加培养基）、模型组（加培养基和刺激剂）、溶媒组（加含溶媒培养基和刺激剂）、壬二酸（62.50、31.25、15.63、7.81、3.91  $\mu\text{g/mL}$ ）组和水杨酸（31.25、15.63、7.81、3.91、1.95  $\mu\text{g/mL}$ ）组；*P. acnes* 诱导实验设置为对照组、模型组、溶媒组、壬二酸（62.50、31.25、15.63、7.81  $\mu\text{g/mL}$ ）组和水杨酸（31.25、15.63、7.81、3.91  $\mu\text{g/mL}$ ）组。细胞以  $3 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔细胞培养板，0.1 mL/孔，培养 6 h 后更换无血清培养基进行饥饿培养，次日弃去孔内培养基，加入不同质量浓度的药液 0.1 mL/孔，孵育 16 h 或 6 h 后，弃去孔内溶液，加入 PGN + LTA（终质量浓度 12.5  $\mu\text{g/mL}$  + 12.5  $\mu\text{g/mL}$ ）和不同质量浓度药液共同作用 24 h，或 *P. acnes*（终浓度  $2.25 \times 10^9$  CFU/mL）和不同质量浓度药液共同作用 48 h，收集细胞上清液，按 ELISA 试剂盒说明检测细胞培养上清液中 IL-8 含量。

**1.2.5 THP-1 细胞培养上清中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量** PMA + LPS 诱导实验设置为对照组、模型组、溶媒组、壬二酸（1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25  $\mu\text{g/mL}$ ）组和水杨酸（500.00、250.00、125.00、62.50、31.25  $\mu\text{g/mL}$ ）组；*P. acnes* 诱导实验设置为对照组、模型组、溶媒组、壬二酸（1 000.00、500.00、250.00、125.00  $\mu\text{g/mL}$ ）组和水杨酸（500.00、250.00、125.00、62.50  $\mu\text{g/mL}$ ）组。细胞用无血清 RPMI 1640 培养基调整成  $12 \times 10^5$  个/mL 或  $6 \times 10^5$  个/mL 细胞悬液接种 96 孔培养板，加入不同质量浓度的药液孵育 18 h 或 6 h，继续加入 PMA + LPS（终质量浓度 100 ng/mL + 500 ng/mL）和不同质量浓度药液共同作用 48 h，或加入 *P. acnes*（终浓度  $2.25 \times 10^9$  CFU/mL 或  $2.25 \times 10^8$  CFU/mL）和不同质量浓度药液共同作用 48 h，收集细胞上清液，按 ELISA 试剂盒说明检测细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量。

**1.2.6 分子对接分析壬二酸、水杨酸与 TLR4 蛋白受体的分子间相互作用模式** 利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分别下载壬二酸、水杨酸的化学结构文件，再导入 Chem 3D (v15.0) 软件生成 3D 化学结构并使其能量最小化。通过 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 TLR4 蛋白的晶体结构文件，采用 PyMOL 软件去除蛋白结构中的溶剂和有机物，然后利用 AutoDock (v4.2.6) 软件对蛋白结构进行加氢、计算电荷、添加原子类型。由 Autodock vina 分别实施壬二酸、水杨酸和 TLR4 蛋白受体的分子对接，再利用 PLIP 分别分析

壬二酸、水杨酸和 TLR4 蛋白受体对接的分子间相互作用模式，最后通过 PyMOL 软件可视化结果。

**1.2.7 细胞免疫荧光检测 TLR4 蛋白表达** HaCaT 细胞悬液 1 mL ( $1 \times 10^5$  个/mL) 接种于直径 15 mm 玻底培养皿，待细胞贴壁后加入药液（壬二酸 62.50  $\mu\text{g/mL}$ 、水杨酸 31.25  $\mu\text{g/mL}$ ）孵育 16 h，弃去孔内药液后加入 PGN + LTA（终浓度 50  $\mu\text{g/mL}$  + 50  $\mu\text{g/mL}$ ）或 *P. acnes*（终浓度  $2.25 \times 10^9$  CFU/mL）及配制好的药液（壬二酸 62.50  $\mu\text{g/mL}$ 、水杨酸 31.25  $\mu\text{g/mL}$ ），继续作用 24 h。无菌 PBS 漂洗 3 次，经 4% 多聚甲醛固定、0.5% Triton X-100 破膜、10% 山羊血清封闭后，加入 TLR4（1 : 50）抗体，置 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜，弃一抗，PBS 清洗，加入 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG（1 : 500），避光孵育 1 h，DAPI 核染 5 min，激光共聚焦显微镜（ $\times 100$ ）观察并拍照。

**1.2.8 壬二酸和水杨酸组合物对不同刺激剂诱导 HaCaT 产生 IL-8 及 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响** 将壬二酸和水杨酸按 15 : 1 的比例配制成组合物，即质量浓度为 125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91  $\mu\text{g/mL}$ 。组合物对不同刺激剂诱导后 HaCaT 细胞产生 IL-8 以及 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响，实验步骤同 1.2.4 和 1.2.5。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，通过单因素方差分析比较总体的组间差异，再采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 壬二酸和水杨酸对 HaCaT 和 THP-1 细胞增殖的影响

细胞分别经 62.50~1 000.00  $\mu\text{g/mL}$  的壬二酸和水杨酸作用 48 h 后，发现壬二酸质量浓度为 1 000.00、500.00  $\mu\text{g/mL}$  时，HaCaT 细胞的存活率分别为 16%、35%，而壬二酸质量浓度为 250.00  $\mu\text{g/mL}$  及以下时，HaCaT 细胞的存活率均高于 75%；相同受试质量浓度范围内的壬二酸对 THP-1 细胞活力无明显影响。1 000.00  $\mu\text{g/mL}$  水杨酸作用 48 h，HaCaT 细胞存活率为 43%，THP-1 细胞存活率为 61%，而在 500  $\mu\text{g/mL}$  及以下质量浓度，2 种细胞的存活率均高于 75%，见图 1。

因此，在后续的 HaCaT 细胞实验中，选择壬二酸 62.50  $\mu\text{g/mL}$ 、水杨酸 31.25  $\mu\text{g/mL}$  为最大实验质量浓度；THP-1 细胞实验中壬二酸的最大实验质量浓度为 1 000.00  $\mu\text{g/mL}$ ，水杨酸为 500.00  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.2 壬二酸和水杨酸对不同刺激剂诱导后 HaCaT 细胞产生 IL-8 的影响

如图 2 所示, 不同受试浓度的壬二酸、水杨酸对 PGN+LTA 或热灭活 *P. acnes* 诱导后 HaCaT 细胞产生 IL-8 均表现出一定的抑制作用, PGN+LTA

诱导后, 壬二酸: 半数效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 为  $5.17 \mu\text{g/mL}$ , 水杨酸  $EC_{50}$  为  $3.50 \mu\text{g/mL}$ 。热灭活 *P. acnes* 诱导后, 壬二酸  $EC_{50}$  为  $2.76 \mu\text{g/mL}$ , 水杨酸  $EC_{50}$  为  $2.80 \mu\text{g/mL}$ 。且随着药物浓度的增加, IL-8 含量明显下降, 抑制作用呈剂量相关性。

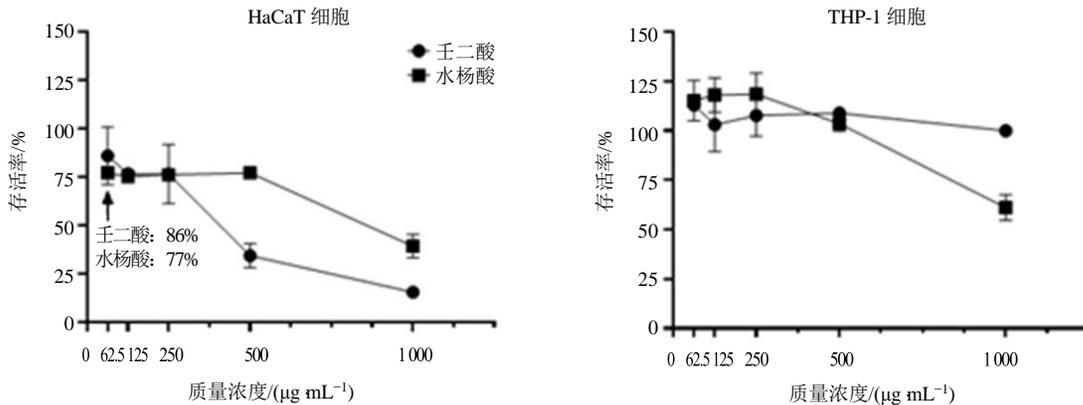
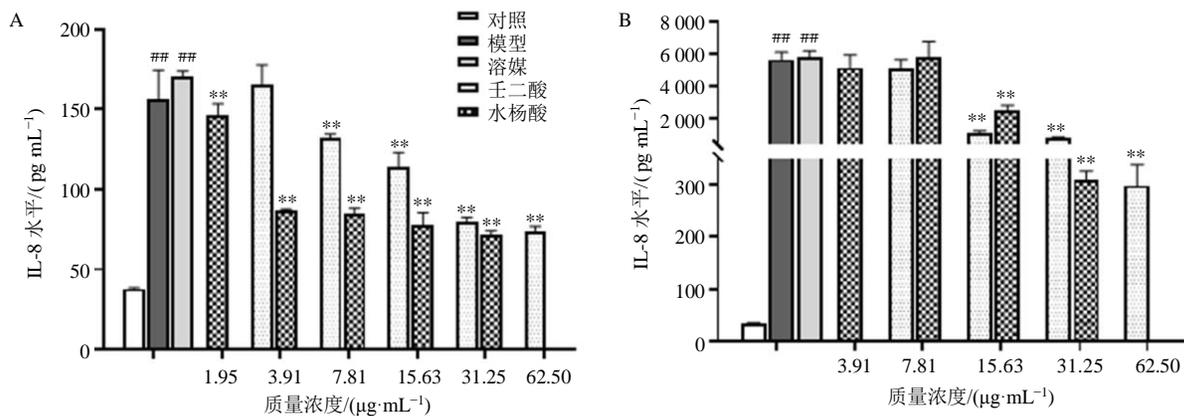


图 1 CCK-8 法检测药物作用 48 h 对 HaCaT 细胞和 THP-1 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 1 Effect of drugs on the cell proliferation in HaCaT and THP-1 cells by CCK-8 method ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



与对照组比较:  $##P < 0.01$ ; 与溶媒组比较:  $**P < 0.01$ 。

$##P < 0.01$  vs control group;  $**P < 0.01$  vs medium group.

图 2 壬二酸和水杨酸对 PGN+LTA (A) 或热灭活 *P. acnes* (B) 诱导后的 HaCaT 细胞产生 IL-8 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effects of azelaic acid and salicylic acid on IL-8 production in HaCaT cells induced by PGN + LTA (A) and heat inactivated *P. acnes* (B) stimulants ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

## 2.3 壬二酸和水杨酸对不同刺激剂诱导后 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的影响

如图 3 所示, 不同受试浓度的壬二酸、水杨酸对 PMA+LPS 或热灭活 *P. acnes* 诱导后的 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  均有一定的抑制作用。PGN+LTA 诱导后壬二酸抑制 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$ , 壬二酸  $EC_{50}$  为  $1.05 \mu\text{g/mL}$ , 水杨酸  $EC_{50}$  为  $2.16 \mu\text{g/mL}$ , PGN+LTA 诱导后壬二酸抑制 THP-1 细胞产生 TNF- $\alpha$ , 壬二酸  $EC_{50}$  为  $3.74 \mu\text{g/mL}$ ; 水杨酸的抑制率均 >

90%; 热灭活 *P. acnes* 诱导后抑制 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  中, 壬二酸  $EC_{50}$  为  $3.04 \mu\text{g/mL}$ , 水杨酸  $EC_{50}$  为  $2.17 \mu\text{g/mL}$ ; 热灭活 *P. acnes* 诱导后抑制 THP-1 细胞产生 TNF- $\alpha$  中, 壬二酸  $EC_{50}$  为  $4.05 \mu\text{g/mL}$ , 水杨酸  $EC_{50}$  为  $3.02 \mu\text{g/mL}$ 。且随着药物浓度的增加, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量均明显下降, 呈量效关系。

## 2.4 壬二酸和水杨酸与 TLR4 蛋白的分子间相互作用模式分析

如图 4 所示, 壬二酸可通过氢键、疏水相互作用

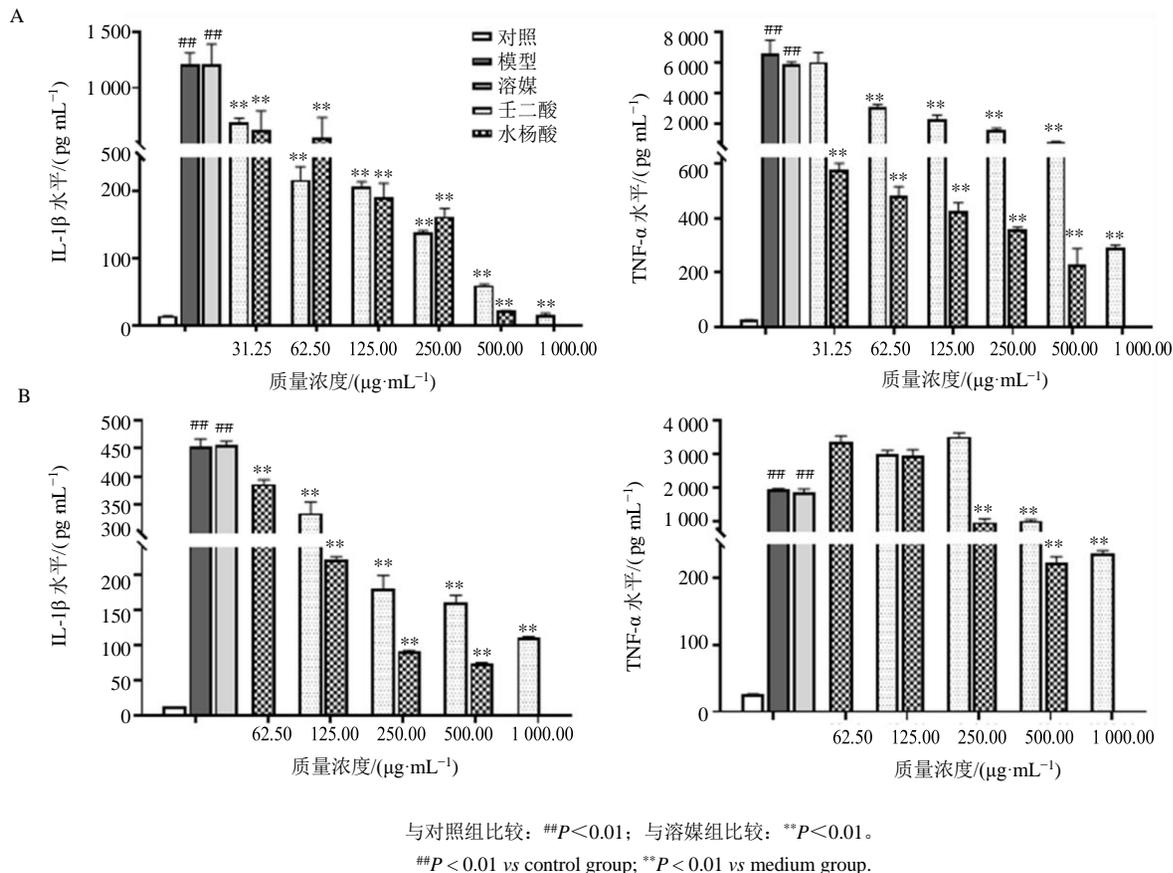


图 3 壬二酸和水杨酸对 PMA+LPS (A) 或热灭活 *P. acnes* (B) 诱导后 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Fig. 3 Effects of azelaic acid and salicylic acid on expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in THP-1 cells after induced by PMA + LPS (A) and heat inactivated *P. acnes* (B) stimulants ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

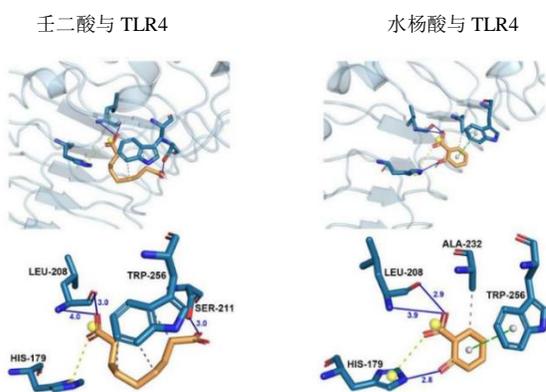


图 4 壬二酸和水杨酸与 TLR4 蛋白受体的分子对接  
Fig. 4 Molecular docking of azelaic acid, salicylic acid and TLR4 protein receptor

用、盐桥相互作用与 TLR4 蛋白受体结合, 亲和力为  $-27.72$  kJ/mol; 水杨酸可通过氢键、疏水相互作用、盐桥相互作用、 $\pi$ -堆积(平行)作用与 TLR4 蛋白受体结合, 亲和力为  $-31.5$  kJ/mol。结果表明, 壬二酸、水杨酸均能与 TLR4 蛋白受体有效地结合。

### 2.5 壬二酸和水杨酸处理后对 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白表达的影响

与对照组相比, PGN+LTA 或 *P. acnes* 刺激后细胞表面 TLR4 蛋白荧光强度明显增高 ( $P < 0.01$ ), 62.50  $\mu\text{g/mL}$  壬二酸预处理后, PGN+LTA 刺激的 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ ); 而 31.25  $\mu\text{g/mL}$  水杨酸预处理后能明显降低灭活后的 *P. acnes* 诱导的细胞表面 TLR4 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 见图 5、6。

### 2.6 壬二酸和水杨酸及两者 15:1 组合物对刺激剂诱导后炎症因子 EC<sub>50</sub> 值比较

根据 ELISA 结果计算 EC<sub>50</sub> 值发现, 对 PGN+LTA 联合刺激以及 *P. acnes* 灭活菌诱导 HaCaT 细胞产生 IL-8, 两者联合应用后效价强度增高, 同时组合物对于 *P. acnes* 灭活菌诱导 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  的抑制作用也表现出显著的联合应用优势, 见表 1。

## 3 讨论

痤疮俗称粉刺、青春痘, 是一种累及毛囊皮

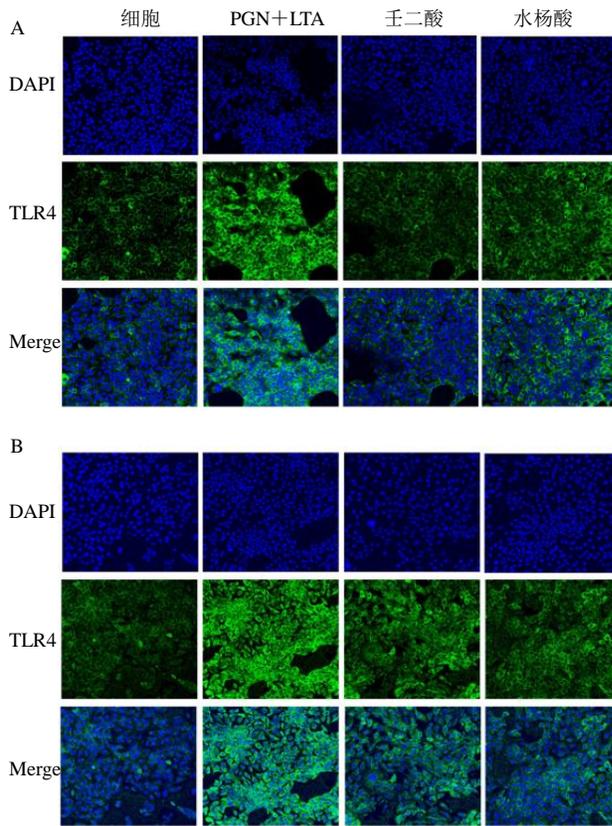
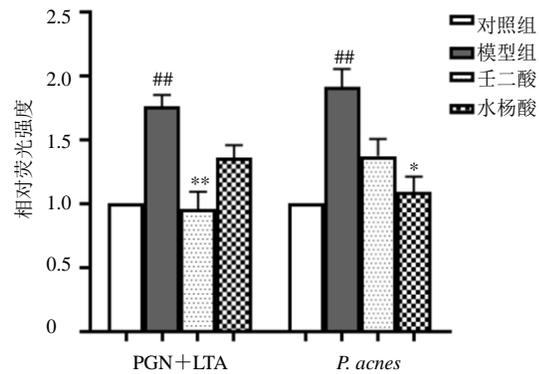


图 5 壬二酸和水杨酸对 PGN+LTA (A) 或热灭活 *P. acnes* (B) 诱导后 HaCaT 细胞 TLR4 蛋白表达的影响 (×100)  
 Fig. 5 Effects of azelaic acid and salicylic acid on TLR4 protein expression in HaCaT cells induced by PGN + LTA (A) and heat inactivated *P. acnes* (B) stimulants (×100)



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ .  
 ## $P < 0.01$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 6 壬二酸和水杨酸对不同刺激剂诱导后 HaCaT 细胞 TLR4 相对蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
 Fig. 6 Effects of azelaic acid and salicylic acid on relative protein level of TLR4 in HaCaT cells induced by different stimulants ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

脂腺的慢性炎症性皮肤病, 发病因素较多, 主要影响皮脂腺丰富的区域, 严重的可导致疤痕和毁容, 是一种对患者的心理和身体健康有较大影响的疾病。*P. acnes* 是体表的正常菌群之一, 为革兰阳性厌氧菌, 是痤疮发病和炎症维持的关键因素之一。*P. acnes* 通过激活与痤疮相关的关键细胞上 Toll 样受体 (TLRs) 表达, 可转录激活转录因子蛋白家族 (NF- $\kappa$ B) 信号通路, 诱导下游促炎细胞因子如 IL-1、IL-8、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等表达, 引起炎症反应<sup>[6]</sup>, 是天然

表 1 壬二酸和水杨酸及两者组合物对刺激剂诱导后炎症因子 EC<sub>50</sub> 值比较

Table 1 Comparison on EC<sub>50</sub> values of azelaic acid, salicylic acid and their mixture on inflammatory factor induced by stimulants

指标	诱导条件	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		
		壬二酸	水杨酸	组合物
IL-8	PGN+LTA	5.17	3.50	4.33
	<i>P. acnes</i>	2.76	2.80	1.60
IL-1 $\beta$	PMA+LPS	1.05	2.16	抑制率均在 80% 以上, 未获得 EC <sub>50</sub>
	<i>P. acnes</i>	3.04	2.17	2.44
TNF- $\alpha$	PMA+LPS	3.74	抑制率均在 90% 以上, 未获得 EC <sub>50</sub>	
	<i>P. acnes</i>	4.05	3.02	抑制率均在 75% 以上, 未获得 EC <sub>50</sub>

免疫系统的重要模式识别分子。角质形成细胞是人类皮肤中抵御外源性病原体的第一道屏障, 细胞中 TLRs 可识别广泛的微生物或其成分的配体, 包括 PGN、LTA、LPS 和细菌脂蛋白等<sup>[7]</sup>。*P. acnes* 的主要胞壁成分 PGN 和 LTA 能刺激免疫细胞释放炎症介质, LPS 作为革兰阴性菌的组成部分亦是一种免

疫刺激因子<sup>[8]</sup>。TLR4 是角质形成细胞表面存在的 TLRs 中的一个亚型。过往研究报导 LPS 和 LTA 均能触发 TLR4 的激活, 导致下游 IL-8 产生的级联反应<sup>[9-10]</sup>。本研究中细胞免疫荧光结果也已证实, 给予 PGN+LTA 联合应用刺激, 或用灭活 *P. acnes* 刺激后均能上调 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白的表达。

痤疮的治疗主要包括口服药、外用药及物理治疗等，外用药治疗中的维甲酸应用较多，但该药易引起局部刺激。抗生素对痤疮的治疗虽然有效，但随之而来的耐药性亦成为一个巨大的挑战<sup>[11-12]</sup>，寻找和使用安全有效的局部用药一直是临床治疗痤疮的重要需求。

壬二酸具有多种药理作用，能够抑制线粒体代谢和微生物蛋白的合成，具有抗炎、抗菌以及改变毛囊表皮过度增殖和炎症反应等活性，有利于痤疮的治疗<sup>[13-15]</sup>。作为一种非甾体类、亦具有抗炎活性的物质，水杨酸还有抑制真菌和细菌的作用，同时具有低浓度下调节角质细胞、高浓度松解剥脱角质细胞能力及美白作用，它在治疗痤疮的同时也对痤疮炎症后的色素沉着有淡化作用<sup>[16-17]</sup>，因此应用较为广泛。但是 2 种药物治疗痤疮的机制有必要进一步研究。本研究结果表明，壬二酸和水杨酸对 *P. acnes* 成分 PGN+LTA，或 *P. acnes* 本身诱导的 HaCaT 细胞产生 IL-8，以及 THP-1 细胞产生 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ，均具有较强的抑制作用。分子对接结果表明，壬二酸、水杨酸均能与 TLR4 蛋白受体有效地结合。体外实验进一步表明，壬二酸、水杨酸对上述刺激剂诱导下的 HaCaT 细胞表面 TLR4 蛋白的表达也有明显的下调作用，这些结果均提示，壬二酸和水杨酸能抑制 *P. acnes* 引起的角质形成细胞表面 TLR4 蛋白的表达，以及下游促炎因子 IL-8 的产生，和抑制 *P. acnes* 诱导的单核细胞 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的产生，这可能是 2 种药物在临床上治疗痤疮有效的机制之一。

另外，本研究还发现将壬二酸和水杨酸按 15:1 联合处理细胞后，再测定 PGN+LTA 或 *P. acnes* 诱导的 HaCaT 细胞产生 IL-8 的水平以及 *P. acnes* 诱导的 THP-1 细胞 IL-1 $\beta$  的产生，发现联合用药时的效价强度优于单独用药。这一结果也提示，壬二酸与水杨酸的联合作用可能更有利于发挥痤疮治疗中的抗炎效果。在痤疮治疗中壬二酸可能对皮脂的产生并不表现抑制作用<sup>[18]</sup>，而水杨酸为一种脂溶性物质，它可与毛囊中的表皮脂质和皮脂腺脂质相溶，具有良好的溶解角质和消除粉刺的特性<sup>[19-20]</sup>，结合以上的结果，本研究将壬二酸与水杨酸联合应用，不仅利用了各自的作用特点，同时在对抗痤疮促炎因子的产生中更有优势。

综上所述，壬二酸和水杨酸能抑制 *P. acnes* 引起的角质形成细胞和单核巨噬细胞中促炎因子的产生，同时还能减少角质形成细胞表面 TLR4 蛋白的

表达，从而发挥治疗痤疮的作用。2 种药物联合应用后治疗痤疮的其他机制仍值得深入探讨。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Drake L, Reyes-Hadsall S, Barbieri J S, et al. New developments in topical acne therapy [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2022, 23(2): 125-136.
- [2] Lim H J, Kang S H, Song Y J, et al. Inhibitory effect of quercetin on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107557.
- [3] 许文静, 韩鑫鑫, 蔡蓓蕾, 等. 壬二酸在皮肤病治疗中的应用 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2022, 21(2): 187-191.
- [4] 鞠强. 中国痤疮治疗指南(2019 修订版) [J]. 临床皮肤科杂志, 2019, 48(9): 583-588.
- [5] Lee K C, Wambier C G, Soon S L, et al. Basic chemical peeling: Superficial and medium-depth peels [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2019, 81(2): 313-324.
- [6] 张莉, 胡志帮. 痤疮炎症的发生机制研究进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(34): 110-112.
- [7] K dlisch G, Kalali B N, Voelcker V, et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes [J]. *Immunology*, 2005, 114(4): 531-541.
- [8] O'Neill A M, Gallo R L. Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 177.
- [9] Suvanprakorn P, Tongyen T, Prakhongcheep O, et al. Establishment of an anti-acne vulgaris evaluation method based on TLR2 and TLR4-mediated interleukin-8 production [J]. *In Vivo*, 2019, 33(6): 1929-1934.
- [10] Zhang Y S, Liang X J, Bao X F, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 235: 114291.
- [11] 张丽媛, 王奇飒, 朱纹懿, 等. 我国痤疮患者皮损中痤疮丙酸杆菌对抗生素耐药性的 Meta 分析 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(9): 515-519.
- [12] 刘馨镁, 鲁莎, 席丽艳. 痤疮与皮肤微生物 [J]. 皮肤病与性病, 2022, 44(1): 23-26.
- [13] Chilicka K, Rogowska A M, Szyguła R, et al. A comparison of the effectiveness of azelaic and pyruvic acid peels in the treatment of female adult acne: A randomized controlled trial [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12612.
- [14] Schulte B C, Wu W, Rosen T. Azelaic acid: Evidence-based update on mechanism of action and clinical

- application [J]. *J Drugs Dermatol*, 2015, 14(9): 964-968.
- [15] 聂廷芬, 张彦秀, 郑宝勇. 壬二酸乳膏联合克拉霉素治疗玫瑰痤疮的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(8): 2016-2020.
- [16] 唐莉, 尹锐, 罗娜, 等. 超分子水杨酸外用治疗轻、中度痤疮疗效观察 [J]. *中国美容医学*, 2018, 27(9): 31-33.
- [17] Zheng Y, Yin S C, Xia Y, *et al.* Efficacy and safety of 2% supramolecular salicylic acid compared with 5% benzoyl peroxide/0.1% adapalene in the acne treatment: A randomized, split-face, open-label, single-center study [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2019, 38(1): 48-54.
- [18] Searle T, Ali F R, Al-Niimi F. The versatility of azelaic acid in dermatology [J]. *J Dermatolog Treat*, 2022, 33(2): 722-732.
- [19] Arif T. Salicylic acid as a peeling agent: A comprehensive review [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2015, 8: 455-461.
- [20] 方婧, 邓小忠, 李桂香, 等. 耳尖放血联合超分子水杨酸治疗中重度痤疮的疗效 [J]. *中国医疗美容*, 2023, 13(4): 25-30.

[责任编辑 金玉洁]