

复方泽漆冲剂含药血清调控PI3K/Akt/NF- κ B 通路与NLRP3炎症小体缓解银屑病细胞模型损伤作用机制研究

吴敏^{1,2}, 王久香¹, 刘涛峰¹, 刘小平¹, 曹宇¹, 章纬¹, 汪长中^{2*}

1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031

2. 安徽中医药大学 中西医结合学院, 安徽 合肥 230012

摘要: **目的** 探讨复方泽漆冲剂含药血清对银屑病细胞模型PI3K/Akt/NF- κ B通路及NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NLRP3) 炎症小体的调控作用以阐明该药对银屑病的干预机制。**方法** 制备复方泽漆冲剂大鼠含药血清, 体外以10 ng·mL⁻¹的角质形成细胞生长因子(KGF)刺激人永生角质形成细胞系HaCaT建立银屑病细胞模型, 将细胞分为对照组、模型组及复方泽漆冲剂5%、10%、20%含药血清组, CCK-8法检测不同体积分数含药血清作用于HaCaT细胞0、24、48、72 h时的细胞活力, 确定复方泽漆冲剂含药血清最佳体积分数及作用时间。体外以10 ng·mL⁻¹的KGF刺激HaCaT细胞建立银屑病细胞模型, 以siRNA基因沉默HaCaT细胞NLRP3, 将细胞分为对照组、模型组、10%含药血清组、si-NLRP3-NC组(质粒阴性对照)、si-NLRP3组, CCK-8法检测复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞相对活力的影响; ELISA检测含药血清干预后白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-17 α 、IL-23、IL-8和趋化因子配体(CXCL)1、CXCL2的分泌水平及乳酸脱氢酶(LDH)释放量; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析NLRP3、半胱氨酸蛋白酶(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)、核因子- κ B (NF- κ B)的mRNA表达水平; Western blotting分析NLRP3、Caspase-1、ASC、p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、cleaved-Caspase-1、Gasdermin D (GSDMD)的蛋白表达水平; 免疫荧光检测p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、ASC、Caspase-1的表达与分布。**结果** 10%复方泽漆冲剂含药血清及作用48 h为含药血清最佳作用体积分数和时间; 在KGF刺激HaCaT细胞增殖的银屑病细胞模型中, 与对照组比较, IL-17 α 、IL-23、IL-1 β 、IL-8和CXCL1、CXCL2的分泌水平升高, LDH释放量显著升高; 与模型组相比较, 10%复方泽漆冲剂含药血清干预48 h后, 银屑病细胞模型中IL-17 α 、IL-23、IL-1 β 、IL-8和CXCL1、CXCL2表达显著降低, LDH释放量显著下降; NLRP3、ASC、Caspase-1、PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA表达水平也有所降低; 含药血清处理后, NLRP3、Caspase-1、ASC、p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、cleaved-Caspase-1、GSDMD的蛋白表达水平下降明显, p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、ASC、Caspase-1的表达与分布也有所减少。**结论** 复方泽漆冲剂含药血清通过下调PI3K/Akt/NF- κ B信号通路及NLRP3炎症小体发挥对银屑病细胞模型的干预作用。

关键词: 复方泽漆冲剂; 银屑病; 含药血清; PI3K/Akt/NF κ B通路; NLRP3炎症小体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 05-1051-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.015

Mechanism of action of Compound Zeqi Punch-containing serum on psoriasis cell model by regulating PI3K/Akt/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome

WU Ming^{1,2}, WANG Jiuxiang¹, LIU Taofeng¹, LIU Xiaoping¹, CAO Yu¹, ZHANG Wei¹, WANG Changzhong²

1. The First Affiliated Hospital to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

2. School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on PI3K/Akt/NF- κ B pathway and NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome in psoriasis cell model, so as to elucidate the intervention mechanism of Compound Zeqi Punch on psoriasis. **Methods** Preparation of Compound Zeqi Punch rat

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 安徽中医药大学第一附属医院临床科学研究项目(2020yfyzc18)

第一作者: 吴敏, 博士研究生, 主要从事中西医结合治疗皮肤病相关研究。E-mail: ahzywm@163.com

*通信作者: 汪长中, 硕士, 教授, 主要从事中药免疫调节作用研究。E-mail: ahwc63@sina.com

serum, NLRP3 gene silencing was performed on human immortalized keratinocyte cell line HaCaT cells, HaCaT cells were stimulated with $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ keratinocyte growth factor (KGF) *in vitro* to establish a psoriasis cell model. The cells were divided into control group, model group, Compound Zeqi Punch-containing serum at 5 %, 10 % and 20 % dose groups. CCK-8 method was used to detect the cell viability of HaCaT cells treated with different concentrations of Compound Zeqi Punch-containing serum at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h, and the optimal concentration and action time of Compound Zeqi Punch-containing serum were determined. ELISA was used to detect the secretion levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-17 α , IL-23, IL-8, chemokine CXCL1 and CXCL2 and the release of LDH before and after the intervention of Compound Zeqi Punch-containing serum. The mRNA expression levels of *NLRP3*, cysteinyl aspartate specific proteinase (*Caspase-1*), apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain (*ASC*), *PI3K*, *Akt* and *NF- κ B* were analyzed by qRT-PCR. The protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, p-PI3K, p-Akt, p-NF- κ B, cleaved-Caspase-1 and gasdermin D (GSDMD) were analyzed by Western blotting. The expression and distribution of p-PI3K, p-Akt, p-NF- κ B, ASC and Caspase-1 were detected by immunofluorescence. **Results** The serum containing 10 % Compound Zeqi Punch and 48 h were selected as the optimal concentration and time of drug-containing serum. In the psoriasis cell model of KGF-stimulated HaCaT cell, compared with the control group, the secretion levels of inflammatory factors IL-17 α , IL-23, IL-1 β , IL-8 and chemokines CXCL1 and CXCL2 were increased, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) was significantly increased. Compared with the model group, the expression of inflammatory factors IL-17 α , IL-23, IL-1 β , IL-8 and CXCL1 and CXCL2 in the psoriasis cell model was significantly decreased after 48 h of intervention with 10% Compound Zeqi Punch-containing serum, and the release of LDH was significantly decreased. The mRNA expression levels of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *PI3K*, *Akt* and *NF- κ B* were also decreased. After treatment with the optimal concentration of Compound Zeqi Punch-containing serum, the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, ASC, p-PI3K, p-Akt, p-NF- κ B, cleaved-Caspase-1 and GSDMD decreased significantly, and the expression and distribution of p-PI3K, p-Akt, p-NF- κ B, ASC and Caspase-1 also decreased. **Conclusion** Compound Zeqi Punch-containing serum exerts an intervention effect on the psoriasis cell model by affecting the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway and NLRP3 inflammasome.

Key words: Compound Zeqi Punch; psoriasis; drug-containing serum; PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway; NLRP3 inflammasome

银屑病是一种慢性免疫炎症性皮肤病,发病特征主要表现为复发性、红色、鳞片状斑块和丘疹,常累及肘部、膝盖和头皮等部位,严重者可见于全身多个部位^[1-2]。该病累及全球近2%~3%的人口^[3]。近年来,其发病率呈逐年上升趋势,其发生一般认为与遗传易感性、感染、肥胖、吸烟、过量饮酒、精神因素以及药物使用等诸多因素相关^[4]。然而,这些因素通过何种确切的机制引发银屑病尚不明晰,目前也缺乏特效药物对其进行彻底治疗。因此,积极探索银屑病的发病机制并寻找或研发靶向明确的有效药物具有重要现实意义。

复方泽漆冲剂(皖药制字Z20210055000)是安徽中医药大学第一附属医院应用传统工艺配制的中药制剂,已由安徽省药品监督管理局审批并取得其备案号。该制剂在申请省药监局备案管理时,已经根据《中华人民共和国药品管理法》《中华人民共和国中医药法》《医疗机构制剂注册管理办法(试行)》《关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告》(2018年第19号)要求,建立了该制剂的质控标准,具体包括性状、鉴别、微生物限度检查、通则检查和含量测定^[5-9]。复方泽漆冲剂

在30余年的临床使用中,对银屑病治疗效果显著^[5-9]。该方由泽漆、白花蛇舌草、大青叶、板蓝根、鸡血藤、土茯苓、半枝莲、黄芩、龙胆草、贯众、莪术、五味子组成,具有清热、凉血、解毒功效,但其对银屑病确切的作用机制尚不清楚。

NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)属于NOD样模式识别受体家族成员,是固有免疫的重要组成部分之一,最新研究表明,NLRP3参与了银屑病的发生发展,同时,研究显示,NLRP3炎症小体的活性受到磷脂酰乙醇胺激酶(PI3K)、丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)、核因子(NF- κ B)等信号通路(PI3K/Akt/NF- κ B)的调控^[10-12],因此,NLRP3炎症小体及相关信号通路成为近年来抗银屑病药物研发的重要靶点。银屑病的发生与角质形成细胞过度活化及增殖密切相关,本研究通过体外构建银屑病细胞模型,观察复方泽漆冲剂含药血清对人角质形成细胞活化以及NLRP3表达与PI3K/Akt/NF- κ B信号通路的影响,以期阐明复方泽漆冲剂对银屑病的作用机制,为揭示复方泽漆冲剂治疗银屑病的科学内涵提供重要的实验依据。

1 材料

1.1 细胞株与药物

人永生化角质形成细胞(HaCat)购于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司(细胞货号:iCell-h066)。复方泽漆冲剂(规格:每袋相当于饮片33 g,每克含黄芩以黄芩苷计,不得少于4.0 mg)购自安徽中医药大学第一附属医院(皖药制备字Z20210055000,批号20210427)。

1.2 动物

用于制备含药血清的SPF级雄性SD大鼠,16只,体质量(200±20)g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004,饲养于安徽中医药大学第一附属医院实验动物房,实验环境:12 h/12 h明暗交替,环境温度为20~26℃,相对湿度在40%~70%,自由饮食。本实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号为AHUCM-rats-2021136。

1.3 培养基及主要试剂

DMEM培养基(Cytiva公司);CCK-8试剂盒(BJ05203090, Bioss公司);白细胞介素(IL)-1 β 、IL-8、IL-17A、IL-23、趋化因子配体(CXCL1、CXCL2)的ELISA试剂盒(GR2021-11,武汉基因美科技有限公司);角质形成细胞生长因子(KGF,100-19, Peprotech公司);RIPA细胞裂解液(09271919023, Beyotime公司)。抗体:山羊抗小鼠IgG(236000213)、山羊抗兔IgG(234750414, Zsbio公司);NF- κ B(GR3257717-4, Abcam公司);p-NF- κ B(17, Cell Signaling公司);PI3K(AI02187486, Bioss公司);p-PI3K(GR305773-2, Abcam公司);Akt(28)、p-Akt(25) Cell Signaling公司;Gasdermin D(GSDMD)(H1250)、cleaved-Caspase-1(G2155) Santa Cruz公司;Caspase-1(CN89330, Bioworld公司); β -actin(19C10509, Zsbio公司);NLRP3(87p8121, Affinity公司);凋亡相关斑点样蛋白(ASC)(AF03162934, Bioss公司)。TRIzol(350508, Life Technologies公司);抗荧光淬灭封片剂(含DAP, 08102309, Ebiogo公司);Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus(荧光染料, AM62082A, TaKaRa公司);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(反转录试剂盒, 20210716, 上海广诺化学科技有限公司)。

1.4 主要仪器

RT-6000酶标仪(雷杜生命科学股份有限公司);实时荧光定量PCR仪(Thermo Scientific公

司);荧光显微镜(德国Leica公司);VE-186转膜仪、VE-180电泳槽、EPS300电泳仪(上海天能科技有限公司);电热恒温箱(上海三发科学仪器有限公司);数字切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH)。

2 方法

2.1 复方泽漆冲剂含药血清的制备^[13]

以《医学实验动物学》为依据^[14],实验动物剂量为成人用量 $\times 6.17$,将复方泽漆冲剂用水配制成生药质量浓度1.35 g·mL⁻¹溶液。按随机数字表法将16只SPF大鼠随机分为对照组($n=8$)和复方泽漆冲剂组($n=8$),对照组大鼠ig等体积0.9%氯化钠溶液,复方泽漆冲剂组ig复方泽漆冲剂溶液,给药体积20 mL·kg⁻¹,按临床等效剂量的10倍给药(剂量为27 g·kg⁻¹);每天1次,连续给药7 d,末次给药1 h后,ip给予3%戊巴比妥钠40 mg·kg⁻¹麻醉,无菌条件下经腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取血清,56℃水浴30 min灭活,过0.22 μ m的滤膜除菌,-80℃保存备用。

2.2 HaCaT细胞的培养及传代

将HaCaT细胞置于DMEM培养基中,在37℃、5% CO₂培养箱中培养,选取对数生长期的HaCaT细胞进行后续实验。待细胞贴壁生长至80%~90%融合度时开始传代,弃旧培养基,PBS洗涤2次,胰酶消化,加入新的完全培养基终止消化,吹打均匀,15 mL离心管收集悬液,1 000 rmin⁻¹离心5 min,弃去上清,加入8 mL完全培养基,吹打均匀,分装后置于CO₂培养箱中继续培养。

2.3 银屑病细胞模型构建^[15]

取对数生长期的HaCaT细胞,待细胞贴壁生长24 h后,除对照组外,其他各组细胞加入KGF溶液以构建银屑病细胞模型,使其终质量浓度为10 ngmL⁻¹,KGF刺激细胞24 h后进行后续实验。

2.4 CCK-8法确定复方泽漆冲剂含药血清作用的最佳体积分数及时间

取对数生长期的HaCaT细胞,调整细胞悬液浓度至 5×10^4 个·mL⁻¹,接种于96孔板,每孔100 μ L,置于5% CO₂细胞培养箱内培养。细胞贴壁后,将细胞分为对照组、模型组及不同体积分数(5%、10%、20%)含药血清组。除对照组外,其他各组细胞按“2.3”项方法造模,24 h后含药血清组加入体积分数为5%、10%、20%的复方泽漆冲剂含药血清,对照组和模型组加入等量对照组空白血清,分别在处理24、48、72 h后,加入CCK-8溶液。用酶联免疫检测仪于450 nm处检测各孔的吸光度(A)值。计算细胞相对

存活率,确定含药血清对模型细胞作用的最佳体积分数及作用时间。

细胞相对存活率 = $A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}$

2.5 siRNA 基因沉默 HaCaT 细胞 NLRP3^[16] 及含药血清干预

取对数生长期的 HaCaT 细胞,调整细胞悬液浓度至 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,置于 5% CO_2 细胞培养箱内培养。将细胞分为对照组、模型组、10% 含药血清组、si-NLRP3-NC 组(质粒阴性对照)、si-NLRP3 组,待细胞贴壁生长 24 h 后,除对照组外,其他各组细胞按“2.3”项方法造模,24 h 后进行含药血清干预及 siRNA 转染。将混有 si-NLRP3 质粒的 LipofectamineTM 3000 慢慢加入 RPMI 1640 培养液混匀,室温静置 20 min 后,将混合液加入 HaCaT 细胞(对照组除外),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 6 h,更换新的培养液继续培养 24 h。si-NLRP3-NC 组以混有 si-NLRP3-NC(空白质粒)的 LipofectamineTM 3000 转染,其他步骤相同。转染后,10% 含药血清组以 10% 复方泽漆冲剂的含药血清继续培养 48 h,其他各组用等量培养基培养相同时间。si-NLRP3 的序列委托上海吉玛制药技术有限公司合成,si-NLRP3 引物序列:CGCUAAUGAUCGAC-UUCAUG(5' $\rightarrow$ 3'),UUGAAGUCGAUCA-UUAGCGUG(3' $\rightarrow$ 5')。

2.6 CCK-8 法测定含药血清对银屑病模型 HaCaT 细胞的活力影响

按照“2.5”项方法进行细胞分组、造模、转染及给药,按照 CCK-8 试剂盒说明书,在酶标仪 450 nm 波长处读取各孔的 A 值。计算细胞相对存活率。

2.7 银屑病模型细胞 LDH 释放量测定

收集“2.5”项各组细胞上清液,按照 LDH 试剂盒说明书方法进行检测,在酶标仪 450 nm 波长处读取各孔的 A 值。

2.8 ELISA 法检测银屑病模型细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-17 α 、IL-23、IL-8 和 CXCL1、CXCL2 水平

收集“2.5”项各组细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明检测 IL-1 β 、IL-17 α 、IL-23、IL-8 与 CXCL1、CXCL2 的水平。

2.9 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法检测银屑病模型细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1、PI3K、Akt、NF- κ B 的 mRNA 表达水平

根据 TRIzol 法提取“2.5”项各组细胞的总 RNA,按逆转录试剂盒说明书进行逆转录,采用 qRT-PCR 法检测,反应体系为 cDNA 1 μL 、上下游引物 0.4 μL 、SYBR Green Master Mix 10 μL 、ddH₂O 8.2 μL ;反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s,40 个循环,以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的相对表达水平,并进行统计分析。所需引物委托上海生工生物有限公司合成,各设计引物序列见表 1。

2.10 Western blotting 法检测银屑病模型细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1、p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、cleaved-Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达水平

从“2.5”项各组细胞中提取蛋白,经 10% SDS-PAGE 分离,湿法转移至 PVDF 膜,封闭 2 h,于一抗 β -actin(鼠抗,1:1 000)、NLRP3(兔抗,1:1 000)、ASC(鼠抗,1:1 000)、Caspase-1(兔抗,1:1 000)、p-PI3K(兔抗,1:1 000)、p-Akt(兔抗,1:2 000)、p-NF- κ B(鼠抗,1:1 000)、cleaved-Caspase-1(鼠抗,1:500)、GSDMD(鼠抗,1:500)中孵育过夜,用二抗 β -actin(山羊抗小鼠,1:20 000)、NLRP3(山羊抗兔,1:20 000)、ASC(山羊抗小鼠,1:20 000)、Caspase-1(山羊抗兔,1:20 000)、p-PI3K(山羊抗兔,1:20 000)、p-Akt(山羊抗兔,1:20 000)、p-NF- κ B(山羊抗小鼠,1:20 000)、cleaved-Caspase-1(山羊抗小鼠,1:200 00)、GSDMD(山羊抗小鼠,1:20 000)孵育 1 h,于 Tanon 5200 全自动化学发光成像分析系统显影。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	正向引物(5' $\rightarrow$ 3')	反向引物(5' $\rightarrow$ 3')	片段长度/bp
β -actin	AGTGTGACGTTGACATCCGT	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	120
ASC	AAGAAGAGTCTGGAGCTGTG	CCTGGTACTGTCCTTCAGTC	171
Caspase-1	ATCTGTATTACGCCCTGTT	CTCAGGATCTTGTCAGCCAT	101
NLRP3	GGGGCTAAAGCAACAGATGG	GCAGGCTGGAAAGGAAGAAG	92
PI3K	CACCTTAAATGGTGAGCACG	TTCGTCAGTTCTCCTGGATG	118
Akt	CCAGGGGAGGATGTTTCTAC	GGTCGCGTCAGTCCTTAATA	172
NF- κ B	GCTCCTGTTTCGAGTCTCCAT	TTGCGCTTCTCTTCAATCCG	119

曝光,用Image J进行灰度分析。

2.11 免疫荧光检测银屑病模型细胞 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、ASC、Caspase-1 的表达与分布

收集“2.5”项各组细胞,弃上清,4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,0.1% Triton X-100,冰上静置 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,1%BSA 室温孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,分别滴加 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、ASC、Caspase-1 一抗,4℃孵育过夜,室温下静置 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加荧光二抗,室温避光孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。于荧光显微镜下观察并拍摄,Image J 软件分析荧光强度。

2.12 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,以 GraphPad Prism 5.0 软件作图,采用 t 检验或单因素方差分析进行组间统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

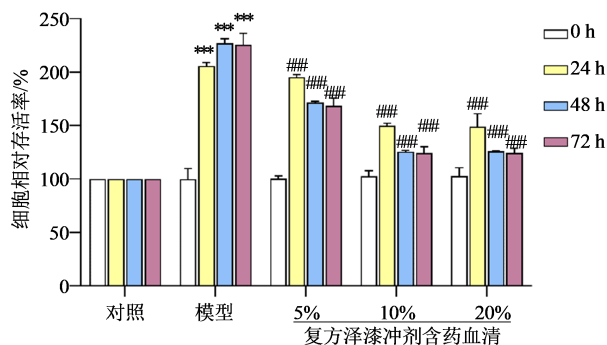
3 结果

3.1 复方泽漆冲剂含药血清最佳体积分数及时间的确定

与对照组比较,模型组培养 24、48、72 h 后,细胞相对存活率显著增加($P < 0.001$),说明 KGF 显著促进 HaCat 细胞的生长,银屑病细胞模型成功。与模型组比较,5%、10%、20% 复方泽漆冲剂含药血清作用 HaCaT 细胞 24、48、72 h 后,HaCaT 细胞相对存活率均显著下降($P < 0.001$),说明复方泽漆冲剂含药血清显著抑制银屑病模型 HaCat 细胞的生长。相同作用时间的情况下,含药血清不同体积分数组比较,10%、20% 含药血清组作用更显著,但两组同时点比较,差异不明显;相同体积分数下,作用 48 h 和作用 72 h,对细胞相对存活率的影响差异也不明显,综合比较,确定 10% 含药血清、处理 48 h 为最佳给药条件,后续实验均按此条件加药处理。具体结果见图 1。

3.2 含药血清对银屑病模型细胞相对存活率的影响

图 2 结果表明,与对照组比较,模型组培养 48 h 后,细胞相对存活率明显增加($P < 0.001$)。与模型组比较,si-NLRP3-NC 组(阴性对照)的细胞相对存活率无明显差异($P > 0.05$),而 10% 含药血清组、si-NLRP3 组(NLRP3 被敲减)细胞相对存活率显著下降($P < 0.001$)。结果表明,NLRP3 被敲减后,银屑病模型细胞的生长得到抑制,而 10% 含药血清同样可有效抑制银屑病模型细胞的相对存活率,推测其作用机制可能与下调 NLRP3 相关。

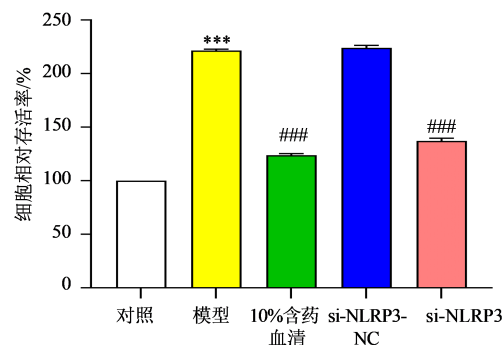


与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 1 复方泽漆冲剂含药血清作用不同时间对银屑病模型细胞相对存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on cell viability of psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 2 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞相对存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on cell viability of psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

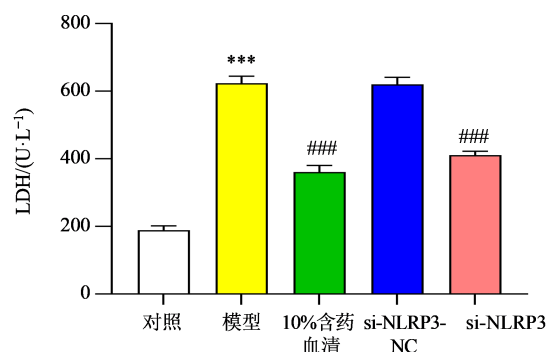
3.3 含药血清对银屑病模型细胞 LDH 释放的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中 LDH 的释放量显著增加($P < 0.001$),提示受到 KGF 刺激的角质形成细胞出现了一定程度的损伤。与模型组比较,si-NLRP3-NC 组的 LDH 水平无明显差异($P > 0.05$),而 10% 含药血清组与 si-NLRP3 组的 LDH 释放量显著降低($P < 0.001$),结果提示复方泽漆冲剂含药血清对角质形成细胞损伤有一定保护作用。

3.4 含药血清对银屑病模型细胞 IL-1 β 、IL-17 α 、IL-23、IL-8 和 CXCL1、CXCL2 水平的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组培养 48 h 后,促炎因子 IL-1 β 、IL-17 α 、IL-23、IL-8 和趋化因子

CXCL1、CXCL2水平均明显升高($P < 0.001$)。与模型组比较, si-NLRP3-NC组(阴性对照)的上述因子水平无明显差异($P > 0.05$), 而10%含药血清组、si-NLRP3组的上述细胞因子水平均显著降低($P < 0.001$)。结果提示, 复方泽漆冲剂含药血清可能通过调节NLRP3进而降低银屑病细胞模型中相关促炎因子与趋化因子的表达。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

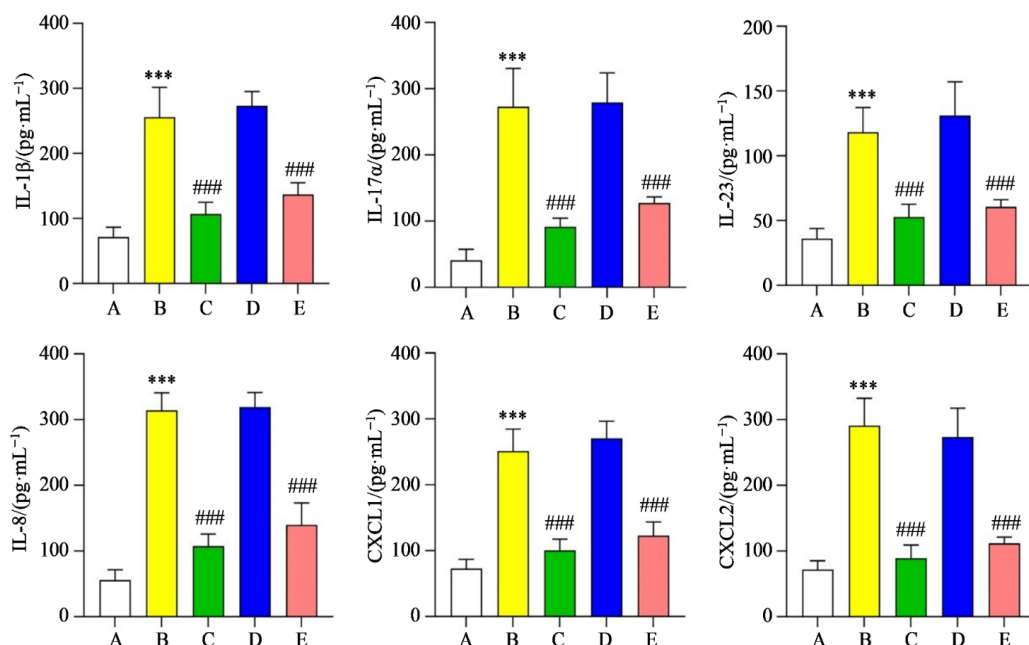
图3 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞LDH释放的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on LDH release by psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.5 含药血清对银屑病模型细胞ASC、Caspase-1、NLRP3、PI3K、Akt、NF- κ B mRNA表达的影响

如图5所示, 与对照组比较, 模型组培养48 h后, ASC、Caspase-1、NLRP3的mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$)。与模型组比较, si-NLRP3-NC组的ASC、Caspase-1、NLRP3的mRNA表达水平无明显差异($P > 0.05$), 而10%含药血清组与si-NLRP3组的ASC、Caspase-1、NLRP3的mRNA表达水平显著降低($P < 0.001$), 结果表明, 复方泽漆冲剂含药血清可有效降低银屑病细胞模型中的ASC、Caspase-1、NLRP3的mRNA表达水平, 进一步提示其发挥作用可能与调控NLRP3炎症小体密切相关。

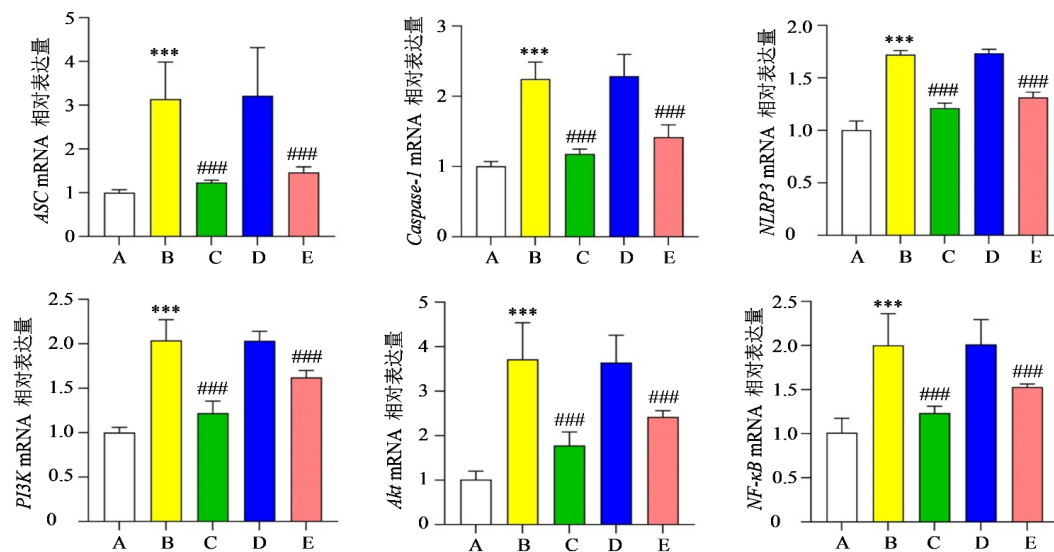
与对照组比较, 模型组的PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA表达水平明显升高($P < 0.001$)。与模型组比较, si-NLRP3-NC组PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA表达水平无显著差异($P > 0.05$), 而10%含药血清组与si-NLRP3组PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA表达水平显著降低($P < 0.001$)。结果表明, 10%含药血清可有效抑制银屑病细胞模型PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA表达水平, 进一步从转录水平揭示复方泽漆冲剂含药血清作用机制可能与调节PI3K/Akt/NF- κ B通路密切相关。



A-对照组; B-模型组; C-10%含药血清组; D-si-NLRP3-NC组; E-si-NLRP3组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。
A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC group; E-si-NLRP3 group; *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图4 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病细胞模型促炎因子及趋化因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on levels of pro-inflammatory factors and chemokines of siRNA gene-silenced psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-对照组;B-模型组;C-10%含药血清组;D-si-NLRP3-NC组;E-si-NLRP3组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$ 。
A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC组; E-si-NLRP3group; *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

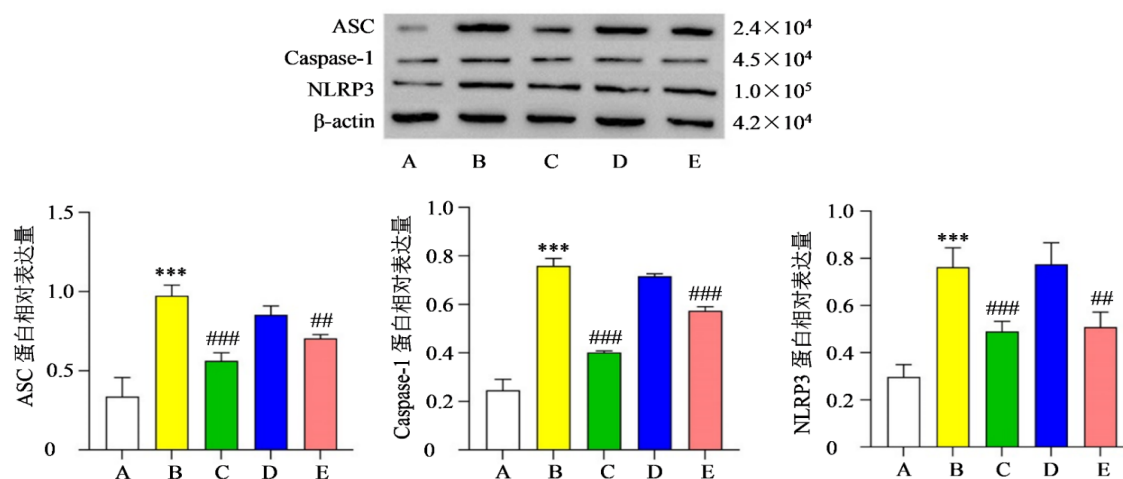
图5 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞ASC、Caspase-1、NLRP3、PI3K、Akt、NF-κB mRNA表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on mRNA expression of ASC, Caspase-1, NLRP3, PI3K, Akt, NF-κB of psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 含药血清对银屑病模型细胞ASC、Caspase-1、NLRP3蛋白表达水平的影响

如图6所示,与对照组比较,模型组培养48 h后,ASC、Caspase-1、NLRP3的蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$)。与模型组比较,si-NLRP3-NC组的上述蛋白表达水平无明显差异($P > 0.05$),而10%含

药血清组与si-NLRP3组的上述蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01, 0.001$)。上述结果表明,复方泽漆冲剂含药血清可有效降低银屑病模型细胞中的ASC、Caspase-1、NLRP3的蛋白表达水平,更进一步提示其发挥作用的机制可能与调节NLRP3炎症小体密切相关。



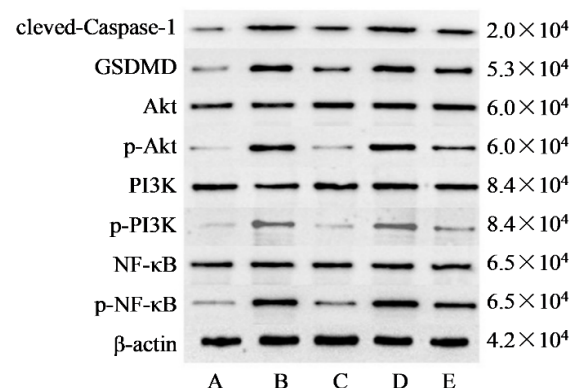
A-对照组;B-模型组;C-10%含药血清组;D-si-NLRP3-NC组;E-si-NLRP3组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC组; E-si-NLRP3group; *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图6 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞ASC、Caspase-1、NLRP3蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on protein expression of ASC, Caspase-1, and NLRP3 of psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 含药血清对银屑病模型细胞p-PI3K、p-Akt、p-NF-κB、Cleaved-caspase-1、GSDMD蛋白表达的影响

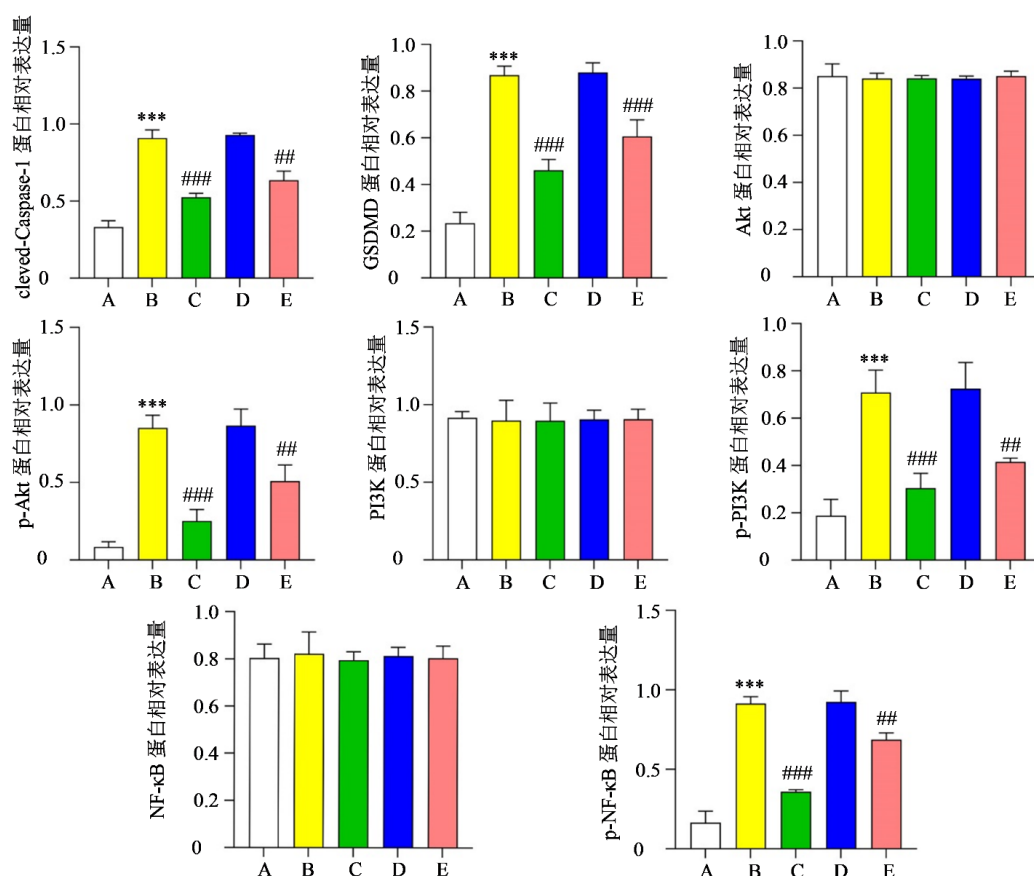
如图7和8所示,与对照组比较,模型组细胞Cleaved-caspase-1、GSDMD、p-Akt、p-NF-κB、p-PI3K蛋白表达水平均显著升高($P < 0.001$),而非磷酸化的Akt、NF-κB、PI3K的蛋白表达水平未见显著变化($P > 0.05$)。与模型组相比,si-NLRP3-NC组的Cleaved-caspase-1、GSDMD、p-Akt、p-NF-κB、p-PI3K蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),而10%含药血清组和si-NLRP3组的Cleaved-caspase-1、GSDMD、p-Akt、p-NF-κB、p-PI3K蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01, 0.001$)。结果表明,10%含药血清可显著抑制银屑病模型细胞中的Cleaved-caspase-1、GSDMD、p-Akt、p-NF-κB、p-PI3K蛋白表达,进一步提示复方泽漆冲剂含药血清作用机制可能与调节PI3K/Akt/NF-κB通路和NLRP3炎症小体相关。



A-对照组;B-模型组;C-10%含药血清组;D-si-NLRP3-NC组;E-si-NLRP3组。

A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC group; E-si-NLRP3 group.

图7 Western blotting法检测银屑病模型细胞相关蛋白表达
Fig. 7 Associated protein expression in psoriasis model cell by Western blotting



A-对照组;B-模型组;C-10%含药血清组;D-si-NLRP3-NC组;E-si-NLRP3组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC group; E-si-NLRP3 group; *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

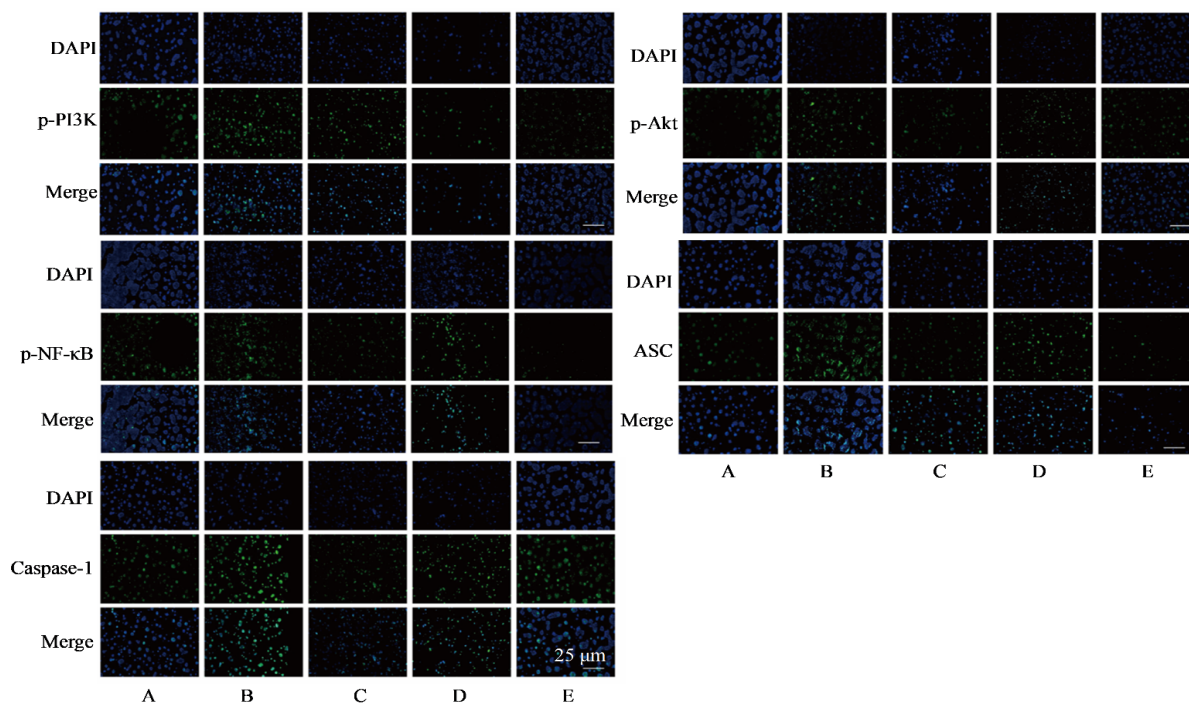
图8 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、NF-κB、p-NF-κB、cleaved-Caspase-1、GSDMD蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, NF-κB, p-NF-κB, cleaved-Caspase-1 and GSDMD of psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.8 免疫荧光检测银屑病模型细胞 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、ASC、Caspase-1 的表达与分布

免疫荧光双染结果如图9和10所示,其中DAPI所染细胞核在紫外激发下为蓝色,p-PI3K、p-Akt、pNF- κ B、ASC、Caspase-1 蛋白表达为绿光。与对照组比较,模型组上述蛋白表达水平显著升高($P <$

0.01)。与模型组比较,si-NLRP3-NC组各蛋白表达变化无统计学意义($P > 0.05$),而10%含药血清组与si-NLRP3组的上述蛋白表达明显降低,差异显著($P < 0.01$ 、0.001),提示复方泽漆冲剂含药血清作用机制可能与调节PI3K/Akt/NF- κ B通路相关。



A-对照组;B-模型组;C-10%含药血清组;D-si-NLRP3-NC组;E-si-NLRP3组。
A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC group; E-si-NLRP3 group.

图9 蛋白免疫荧光双染结果($\times 100$)

Fig. 9 Results of protein by immunofluorescence double staining ($\times 100$)

4 讨论

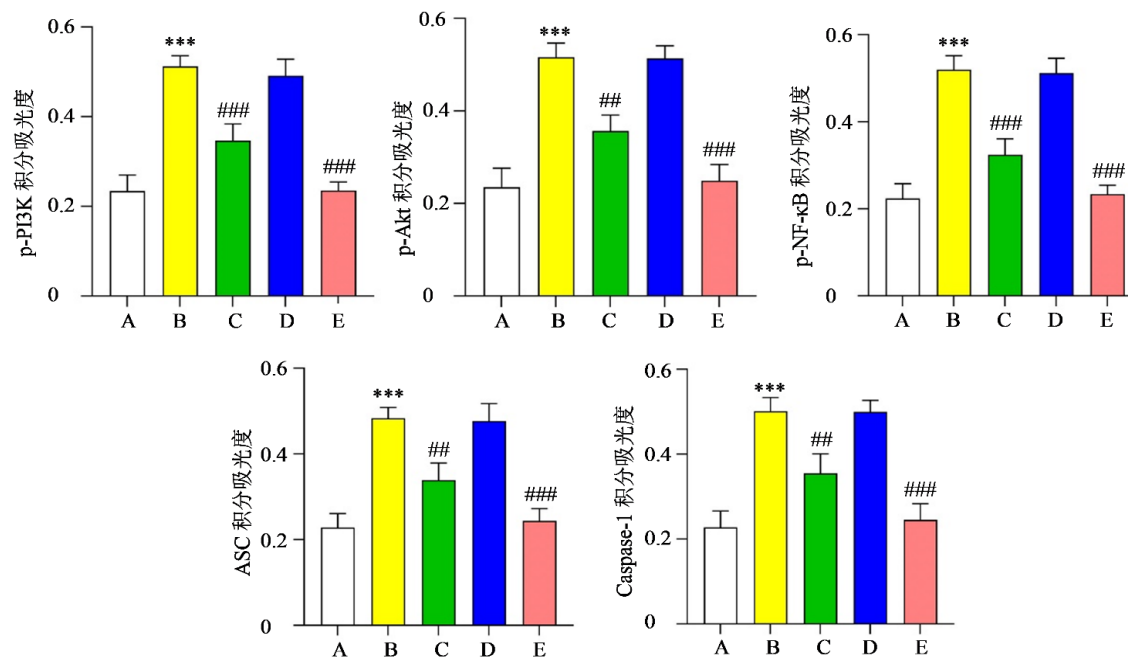
银屑病是一种慢性复发性炎症性皮肤病,其病理机制涉及由遗传因素和多种环境因素共同介导的有多种免疫细胞和免疫因子参与的免疫功能紊乱,通过抗炎和调节免疫往往能改善银屑病的临床表现^[1-4]。

复方泽漆冲剂由安徽中医药大学第一附属医院根据银屑病病因病机及临床表现组方而成,以泽漆、白花蛇舌草、大青叶清热解毒为君药;板蓝根凉血清解毒、鸡血藤养血活血、土茯苓清热利湿解毒、半枝莲清热解毒共为臣药;黄芩、龙胆草清热燥湿、泻肺及肝胆之火,贯众清气分血分之热毒,莪术破血行气,消血瘀癥积,五味子敛肺滋肾共为佐使药。全方共奏清热解毒凉血、活血散瘀之功效^[5-9]。

由于银屑病发病机制涉及多种免疫细胞、炎症因子及相关信号通路,在网络药理学对靶点预测及

预试验基础上,本研究以NLRP3炎症小体为切入点,探讨复方泽漆冲剂治疗银屑病的作用机制。NLRP3炎症小体是NOD样受体家族的一个重要成员,参与多种免疫和炎症反应过程^[17]。当细胞受到病原相关分子模式(PAMPs)或危险相关分子模式(DAMPs)的信号刺激时,会触发NLRP3的自身寡聚化,并与ASC进行组装,招募并激活pro-Caspase-1。活化的Caspase-1裂解炎症因子IL-1 β 和IL-18的前体,形成并释放成熟的IL-1 β 和IL-18,引发机体炎症反应^[18]。研究表明,NLRP3炎症小体参与了银屑病的发生发展,抑制NLRP3炎症小体的表达可有效缓解银屑病^[10]。

角质形成细胞是机体固有免疫的重要组成部分,可以通过NLRP3感知胞内外的多种病原体或理化刺激,经NLRP3炎症小体活化所产生的炎症反应以清除病原体或理化刺激,恢复皮肤稳态^[19]。但研究发现,银屑病发生时,NLRP3炎症小体存在过度



A-对照组;B-模型组;C-10%含药血清组;D-si-NLRP3-NC组;E-si-NLRP3组;与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。
A-control group; B-model group; C-10% drug-containing serum; D-si-NLRP3-NC group; E-si-NLRP3 group; *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图10 复方泽漆冲剂含药血清对银屑病模型细胞p-PI3K、p-Akt、p-NF-κB、ASC、Caspase-1表达与分布的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 10 Effect of Compound Zeqi Punch-containing serum on protein expression and distribution of p-PI3K, p-Akt, p-NF-κB, and Caspase-1 of psoriasis model HaCat cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

活化,导致IL-1 β 等炎症因子的大量产生,引发角质形成细胞免疫炎症性损伤^[20]。因此,抑制NLRP3炎症小体的过度活化对缓解银屑病时角质形成细胞的炎性损伤至关重要。本研究以永生化的人角质形成细胞系——HaCaT细胞为研究对象,通过加入KGF构建银屑病细胞模型^[16],并采用siRNA沉默技术敲减角质形成细胞中NLRP3,观察并比较复方泽漆冲剂含药血清对银屑病状态下角质形成细胞NLRP3以及对其调控的PI3K/Akt/NF-κB通路表达及相关指标的影响。研究结果显示,与对照组比较,在KGF刺激HaCaT细胞增殖的银屑病细胞模型中,NLRP3、ASC、Caspase-1的mRNA与蛋白表达水平明显上升。在NLRP3敲减组,不仅NLRP3自身的mRNA与蛋白表达水平降低,ASC、Caspase-1的mRNA与蛋白表达水平也明显降低,表明在由NLRP3、ASC、Caspase-1共同构成的NLRP3炎症小体复合物中,该3种蛋白的表达水平呈正相关且相互影响,未出现某一种蛋白的“冗余”或“缺陷”,但对它们彼此之间存在何种内在联系有待进一步探讨。实验中也观察到复方泽漆冲剂含药血清能有效降低银屑病模型细胞中的NLRP3、ASC、Caspase-1的mRNA与蛋白表达水平。因此,推测复方泽漆冲

剂发挥作用的机制可能与抑制NLRP3炎症小体密切相关。

Lian等^[21]在银屑病患者的皮损组织、角质形成细胞以及咪喹莫特小鼠银屑病模型的皮损组织中均发现GSDMD的表达水平升高,提示GSDMD可能参与了银屑病的发生发展。在本研究中,检测了GSDMD的蛋白表达水平,结果显示,复方泽漆冲剂含药血清可显著抑制银屑病模型细胞中的GSDMD的蛋白表达,提示复方泽漆冲剂可能对角质形成细胞的焦亡具有抑制作用,从而缓解了银屑病角质形成细胞的炎性损伤。

角质形成细胞NLRP3活化后产生的IL-1 β 可刺激其他细胞产生趋化因子,后者募集中性粒细胞释放大量炎症因子,诱发或加重对角质形成细胞的损伤^[22]。研究表明,在银屑病患者外周血和中性粒细胞中炎症因子IL-1 β 、IL-17 α 、IL-23和趋化因子CXCL1、CXCL2均显著升高,且与银屑病严重程度呈正相关^[22-24]。本实验结果显示,模型组细胞的炎症因子IL-1 β 、IL-17 α 、IL-23、IL-8和趋化因子CXCL1、CXCL2的分泌水平升高;当敲减NLRP3后,上述的炎症因子和趋化因子表达显著降低;复方泽漆冲剂含药血清能有效降低银屑病模型细胞

中的上述炎症因子和趋化因子的水平,提示复方泽漆冲剂含药血清的作用可能与抑制NLRP3炎症小体从而下调IL-1 β 分泌有关。

进一步,观察了复方泽漆冲剂含药血清对角质形成细胞PI3K/Akt/NF- κ B信号通路在mRNA及蛋白表达水平的影响。结果显示,相较于对照组,模型组的PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA水平以及p-Akt、p-NF- κ B、p-PI3K蛋白表达水平显著升高,NLRP3敲减组的PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA水平及p-Akt、p-NF- κ B、p-PI3K蛋白水平则明显下降,复方泽漆冲剂含药血清组的PI3K、Akt、NF- κ B的mRNA水平及p-Akt、p-NF- κ B、p-PI3K蛋白水平也明显下降,提示复方泽漆冲剂含药血清对PI3K/Akt/NF- κ B信号通路也有影响。据此,可以推测,不仅PI3K/Akt/NF- κ B信号通路作为“上游”能调控“下游”NLRP3的表达,NLRP3也可以反过来调控PI3K/Akt/NF- κ B信号通路,即NLRP3与PI3K/Akt/NF- κ B信号通路之间可能存在“Cross-talk”,但这种“Cross-talk”的内在联系尚不明晰,有待于进一步阐明。本研究结果表明,复方泽漆冲剂对银屑病的缓解作用可能与下调PI3K/Akt/NF- κ B通路及NLRP3炎症小体有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Boehncke W H, Schön M P. Psoriasis [J]. Lancet, 2015, 386(9997): 983-994.
- [2] Korman N J. Management of psoriasis as a systemic disease: What is the evidence? [J]. Br J Dermatol, 2020, 182(4): 840-848.
- [3] Pannu S, Rosmarin D. Psoriasis in patients with metabolic syndrome or type 2 diabetes mellitus: Treatment challenges [J]. Am J Clin Dermatol, 2021, 22(3): 293-300.
- [4] Roszkiewicz M, Dopytalska K, Szymańska E, et al. Environmental risk factors and epigenetic alternations in psoriasis [J]. Ann Agric Environ Med, 2020, 27(3): 335-342.
- [5] 张虹亚,孙捷,刘涛峰,等.复方泽漆冲剂治疗进行期寻常性银屑病的疗效观察及对血清TNF- α , IL-8的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2008,22(5): 281-282.
Zhang H Y, Sun J, Liu T F, et al. Clinical obseruation on ZeQi Powder preparation for the progressive stage of psoriasis *Vulgaris* and effect on serum TNF- α and IL-8 [J]. Chin J Dermatovenereol, 2008, 22(5): 281-282.
- [6] 孙捷,张虹亚,刘小平.复方泽漆冲剂对进行期寻常型银屑病患者生活质量的影响[J].安徽中医学院学报, 2010, 29(6): 30-33.
Sun J, Zhang H Y, Liu X P. Effects of compound Zeqi Granules on life quality in patients with psoriasis vulgaris in active stage [J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll, 2010, 29(6): 30-33.
- [7] 刘涛峰,张虹亚,刘小平,等.复方泽漆冲剂对不同证型寻常性银屑病患者IL-23/Th 17细胞轴的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2012,26(5): 442-444.
Liu T F, Zhang H Y, Liu X P, et al. Ze qi granule treatment on diffentent TCM syndrome types of PV patients effect on IL-23/Th 17 cell axis [J]. Chin J Dermatovenereol, 2012, 26(5): 442-444.
- [8] 施丽丽,刘涛峰.复方泽漆冲剂对血热型寻常型银屑病患者血清中MMP-2、MMP-9和IL-18的影响[J].皮肤病与性病,2014,36(2): 68-69, 87.
Shi L L, Liu T F. The effect of compound Zeqi Granules on the serum content of MMP-2, MMP-9 and IL-18 in patients with psoriasis vulgaris [J]. J Dermatol Venereol, 2014, 36(2): 68-69, 87.
- [9] 吴敏,刘涛峰,刘小平,等.复方泽漆冲剂通过抑制NLRP3炎症小体活化改善咪喹莫特诱导银屑病样小鼠的作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2023,34(11): 1551-1558.
Wu M, Liu T F, Liu X P, et al. Study on the effect and mechanism of compound Zeqi Granules on inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome and improving psoriasis-like mice induced by imiquimod [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(11): 1551-1558.
- [10] Wang D, Duncan B, Li X Z, et al. The role of NLRP3 inflammasome in infection-related, immune-mediated and autoimmune skin diseases [J]. J Dermatol Sci, 2020, 98(3): 146-151.
- [11] Gong Y H, Qiu J X, Jiang T, et al. Maltol ameliorates intervertebral disc degeneration through inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B pathway and regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(1): 369-384.
- [12] Zhong R X, Xia T Y, Wang Y, et al. Physalin B ameliorates inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice by inhibiting NF- κ B and NLRP3 via the activation of the PI3K/Akt pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 284: 114777.
- [13] 陈健勤,邹玲,王莎莉,等.银屑I号含药血清对银屑病样细胞模型的增殖、凋亡相关蛋白及基因的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2021,35(4): 444-448.
Chen J Q, Zou L, WANG S L, et al. Effect of Yinxie I on proliferation and apoptosis-related proteins and genes of psoriasis-like cell model [J]. Chin J Dermatovenereol,

- 2021, 35(4): 444-448.
- [14] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- Tang J M, Chen M L. *Medical Laboratory Zoology* [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2012.
- [15] 曹璨, 孙颖, 穆震, 等. 葛根素对银屑病细胞模型 HaCaT 细胞增殖和炎症因子影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(24): 2999-3003.
- Cao C, Sun Y, Mu Z, et al. Effect of puerarin on proliferation and inflammatory factors in KGF-induced psoriasis HaCaT cell [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38 (24): 2999-3003.
- [16] 张硕, 刘柳, 李洪锦, 等. 决银方通过降低 WIF-1 基因甲基化改善寻常型银屑病血热证 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2023, 22(1): 8-13.
- Zhang S, Liu L, Li H J, et al. Jueyin decoction alleviate psoriasis vulgaris with blood-heat syndrome by hypomethylation of Wnt inhibitory factor-1 gene [J]. *Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med*, 2023, 22 (1): 8-13.
- [17] Sharma B R, Kanneganti T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22 (5): 550-559.
- [18] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (9): 2114-2127.
- [19] Galbiati V, Cornaghi L, Papale A, et al. Study on the inflammasome nlrp3 and blimp-1/nlrp12 after keratinocyte exposure to contact allergens [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 313: 130-136.
- [20] Carlström M, Ekman A K, Petersson S, et al. Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility [J]. *Exp Dermatol*, 2012, 21(12): 932-937.
- [21] Lian N, Chen Y J, Chen S H, et al. Gasdermin D-mediated keratinocyte pyroptosis as a key step in psoriasis pathogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(9): 595.
- [22] Cai Y H, Xue F, Quan C, et al. A critical role of the IL-1 β -IL-1R signaling pathway in skin inflammation and psoriasis pathogenesis [J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139 (1): 146-156.
- [23] van der Fits L, Mourits S, Voerman J S, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis [J]. *J Immunol*, 2009, 182(9): 5836-5845.
- [24] Zeng J Q, Chen X, Lei K, et al. Mannan-binding lectin promotes keratinocyte to produce CXCL1 and enhances neutrophil infiltration at the early stages of psoriasis [J]. *Exp Dermatol*, 2019, 28(9): 1017-1024.

[责任编辑 刘东博]