

祛风汤对博来霉素诱导的皮肤纤维化模型小鼠的改善作用及机制

李 晗¹, 刘肖芸¹, 宋 玲¹, 高云航¹, 陈腾飞¹, 贾颖爽², 曹 科², 叶宇飞², 张广平^{1*}, 霍 旺^{2*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100029

2. 解放军总医院第六医学中心 中医医学部, 北京 100048

摘要: **目的** 探讨祛风汤对系统性硬化症 (SSc) 皮肤纤维化模型小鼠的干预作用及分子机制。**方法** 采用 sc 博来霉素建立 SSc 皮肤纤维化小鼠模型, 随机分为对照组、模型组、尼达尼布 (NTD, 39 mg·kg⁻¹) 组及祛风汤低、中、高剂量 (3.9、7.8、15.6 g·kg⁻¹) 组, 连续 ig 给药 28 d。通过苏木素-伊红 (HE) 染色、Masson 染色及飞秒无标记成像观察皮肤组织病理变化; 免疫组化检测 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和转化生长因子- β (TGF- β) 表达; ELISA 法检测羟脯氨酸 (HYP) 及炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 含量; 转录组学筛选差异表达基因及富集通路; Western blotting 检测单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)/脂联素 (Adiponectin) 通路蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 祛风汤各剂量组小鼠真皮厚度显著变薄 ($P < 0.01$ 、 0.001), 胶原纤维沉积减少、排列趋于疏松, 皮下脂肪层有所恢复, 炎症细胞浸润减轻; α -SMA 和 TGF- β 蛋白表达下调 ($P < 0.05$); 飞秒无标记成像显示胶原纤维表达量呈剂量相关性下降; 祛风汤高剂量组皮肤组织中 HYP 含量及 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 转录组学分析显示, 差异表达基因显著富集于 PPAR- γ 相关信号通路; Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织中 p-AMPK/AMPK、PPAR- γ 及 Adiponectin 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而祛风汤中、高剂量组上述蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 祛风汤可改善博来霉素诱导的皮肤纤维化, 其机制与 AMPK/PPAR- γ /Adiponectin 信号通路激活相关, 可能涉及该通路对 TGF- β 介导的成纤维细胞活化及胶原异常沉积的调控。

关键词: 祛风汤; 皮肤纤维化; AMPK/PPAR- γ 信号通路; 博来霉素; 转录组学

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)09-3076-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.009

Qufeng Decoction ameliorates skin fibrosis in bleomycin-induced dermal fibrosis mice and its underlying mechanism

LI Han¹, LIU Xiaoyun¹, SONG Ling¹, GAO Yunhang¹, CHEN Tengfei¹, JIA Yingshuang¹, CAO Ke², YE Yufei², ZHANG Guangping¹, HUO Wang²

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100029, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, The Sixth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: Objective To investigate the ameliorative effect of Qufeng Decoction on bleomycin-induced dermal fibrosis mouse model and to elucidate the underlying molecular mechanisms. **Methods** A mouse model of SSc skin fibrosis was established by subcutaneous injection of bleomycin (BLM). The mice were randomly divided into control, model, nintedanib (NTD, 39 mg·kg⁻¹), and Qufeng Decoction low-, medium-, and high-dose (3.9, 7.8, and 15.6 g·kg⁻¹) groups, and were ig administered for 28 consecutive days. Skin histopathological changes were evaluated by hematoxylin-Eosin (HE) staining, Masson staining, and femtosecond label-free imaging. Immunohistochemistry was used to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and transforming growth factor- β (TGF- β). Hydroxyproline (HYP) and inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) in skin tissue were measured by ELISA. Transcriptomic analysis was performed to screen differentially expressed genes (DEGs) and enriched pathways. Western blotting was

收稿日期: 2026-05-09

基金项目: 解放军总医院第六医学中心创新培育基金资助项目 (CXPY202406); 中央级公益性科研院所基本业务费专项资金资助 (ZXKT22045, ZXKT25006); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2026A04618); 中国中医科学院优秀青年科技人才培养专项 (ZZ16-YQ-027)

作者简介: 李 晗 (1989—), 女, 副研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: hli1989@icmm.ac.cn

***通信作者:** 张广平 (1975—), 男, 研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: gpzhang@icmm.ac.cn

霍 旺 (1987—), 男, 副主任医师, 研究方向为中西医结合。E-mail: huowang1987@163.com

conducted to examine protein expression in the AMPK/PPAR- γ /Adiponectin pathway. **Results** Compared with the model group, Qufeng Decoction treatment significantly reduced dermal thickness in all dose groups ($P < 0.01, 0.001$), attenuated collagen fiber deposition with a more loosely arranged pattern, partially restored the subcutaneous fat layer, and alleviated inflammatory cell infiltration. The protein expression of α -SMA and TGF- β was significantly downregulated ($P < 0.05$). Femtosecond label-free imaging revealed a dose-dependent decrease in collagen fiber content. In the Qufeng Decoction high-dose group, skin HYP content and levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$, and 0.001). Transcriptomic analysis showed that differentially expressed genes were significantly enriched in peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ)-related signaling pathways. Western blotting results indicated that the ratios of p-AMPK/AMPK, as well as PPAR- γ and Adiponectin protein expression, were significantly downregulated in the model group ($P < 0.01$ and 0.001), whereas Qufeng Decoction at medium and high doses significantly reversed these changes ($P < 0.05, 0.01$, and 0.001). **Conclusion** Qufeng Decoction ameliorates BLM-induced skin fibrosis in mice, and the mechanism is associated with activation of the AMPK/PPAR- γ /Adiponectin signaling pathway, potentially involving the modulation of TGF- β -mediated fibroblast activation and abnormal collagen deposition.

Key words: Qufeng Decoction; skin fibrosis; AMPK/PPAR- γ signaling pathway; bleomycin; transcriptomics

系统性硬化症 (SSc) 为一种慢性自身免疫性结缔组织病, 以皮肤广泛增厚、组织或器官的局限性或弥漫性纤维化为主要临床特征^[1-2], 并可累及肺、心、消化道及肾脏等器官, 引发间质性肺病、肺动脉高压等严重并发症^[3-4]。目前, SSc 的治疗仍以糖皮质激素和免疫抑制剂为主, 但疗效有限且不良反应较大^[5-6], 生物制剂如利妥昔单抗^[7]、托珠单抗^[8]虽有一定近期疗效, 但远期效果及不良反应尚不明确。皮肤纤维化是 SSc 最突出且致残性的临床表现, 也是目前临床干预的重点和难点, 针对该环节的治疗研究具有明确的临床指向性。

SSc 属中医“皮痹”范畴, 风、寒、湿为主要致病因素^[9], 风邪为先导, 袭肌表、闭腠理, 致气血凝滞, 日久肌肤失养而硬化^[10]。祛风汤以《外科正宗》消风散为基本方加减而成, 由秦艽、防风、蛇床子、地肤子、白鲜皮、苍术、苦参、黄柏、川芎、当归组成^[11]。其中秦艽、防风祛风通络, 配伍苍术、苦参、黄柏清热燥湿, 佐川芎、当归活血养血, 符合“风闭-湿蕴-血瘀-失养”之病机演变, 并具有祛风除湿、濡润肌肤的功效。同时本课题组前期研究表明^[12], 祛风汤可通过调控白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及核因子 (NF)- κ B 信号通路发挥抗炎作用, 改善皮肤炎症损伤。然而, 目前祛风汤治疗 SSc 皮肤纤维化的干预作用及分子机制尚未明确。因此, 本研究旨在基于前期实验基础上通过体内药效学实验与转录组学技术, 初步探讨祛风汤对 SSc 皮肤纤维化模型小鼠皮肤纤维化的改善作用, 并筛选其可能相关的调控通路, 为祛风汤治疗 SSc 皮肤纤维化的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

60 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (京) 2023-0077。小鼠饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房, 12 h 明暗交替, 温度 (23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 湿度 (50 $\pm$ 15) %, 自由进食饮水。实验方案经中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核批准, 实验动物伦理审查编号为 2025B136。

1.2 药品与主要试剂

注射用盐酸博来霉素 (BLM, 日本化药株式会社, 批号 X10750); 尼达尼布 (NTD) (北京百灵威科技有限公司, 批号 990617); 秦艽、防风、蛇床子、地肤子、白鲜皮、苍术、苦参、黄柏、川芎、当归均购于安国市同利中药材有限公司, 由中国中医科学院中药研究所陈腾飞研究员鉴定, 秦艽为龙胆科植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 的干燥根, 防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的根; 蛇床子为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的果实; 地肤子为藜科植物地肤 *Kochia scoparia* (L.) Schrad. 的果实; 白鲜皮为芸香科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮; 苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 或北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 等的根茎; 苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的根; 黄柏为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮; 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎; 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis*

(Oliv.) Diels 的干燥根。祛风汤由秦艽、防风、蛇床子、地肤子、白鲜皮、苍术、苦参、黄柏、川芎和当归组成。称取秦艽 10 g、防风 10 g、蛇床子 5 g、地肤子 5 g、白鲜皮 5 g、苍术 5 g、苦参 5 g、黄柏 5 g、川芎 5 g、当归 5 g, 共 60 g, 加 8 倍量纯化水, 浸泡 1 h 后常规煎煮 2 次, 每次 1 h, 纱布滤过, 合并滤液, 旋转蒸发浓缩并定容至 50 mL, 浓缩至生药质量浓度 $1.20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。经 LC-MS 检测, 祛风汤水提液中含指标成分龙胆苦苷 $1.762 0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、地肤子皂苷 $1.546 3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、苦参碱 $0.617 0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、小檗碱 $0.621 0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、阿魏酸 $0.197 5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体、转化生长因子- β (TGF- β) 抗体、单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 抗体、磷酸化单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (p-AMPK) 抗体、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ) 和脂联素 (Adiponectin) (美国 Proteintech 公司, 批号 00016979、00028495、00057841、00057868、00036729、00017963); β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (上海碧云天生物技术股份有限公司, 批号 091323240524); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20250423); 羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20250311、20250317、20250219 和 20250401), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

SpectraMax i3x 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Centrifuge 5810R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); MP Fastprep-24 匀浆仪 (美国 MP Biomedicals 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); 电泳与转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); Amersham Imager 600 化学发光成像分析仪 (美国 GE Healthcare 公司); Finesse 325 切片机与全自动染色机 (美国 Thermo 公司); VIP-6 全自动脱水机 (日本樱花公司); 石蜡包埋机 (科迪仪器设备有限公司); NIKON CI-S 型倒置显微镜 (日本尼康公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

小鼠适应性喂养 3 d 后称取体质量, 依据体质量随机分为对照组、模型组、NTD (阳性药, $39 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和祛风汤低、中、高剂量 (3.9 、 7.8 、 $15.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,

$7.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为临床等效剂量) 组, 每组 10 只。实验前 1 d, 以脱毛膏对小鼠背部中央区 (靠近尾侧) 进行脱毛处理 (脱毛面积约 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$)。除对照组外, 其余各组小鼠于区域中心 $\text{sc } 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BLM 溶液 0.1 mL , 每天 1 次, 连续 28 d^[13]; 对照组小鼠于相同部位 sc 等体积 0.9% 氯化钠溶液。自造模之日起, 各给药组每天 1 次 ig 给予相应药物溶液, 对照组与模型组则 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 所有组别均连续干预 28 d。

2.2 小鼠皮肤组织获取及处理

完成 4 周注射后的次日, 1.2% 阿佛丁 $16 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉后, 取小鼠背部 sc 部位全层皮肤, 将其平分为 3 部分: 一部分放入 4% 多聚甲醛中固定, 用于病理学观察及免疫组化检测, 一部分使用 OCT 包埋后用于冷冻切片, 一部分剪碎, 置于 -80°C 冰箱保存, 用于后续转录组学分析与组织蛋白提取; 随后腹主动脉取血 1 mL , $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (半径 9.5 cm), 取血清 $100 \mu\text{L}$, 置于 -80°C 冰箱保存。

2.3 小鼠皮肤组织病理学观察

常温固定 24 h 后, 进行脱水、透明、浸蜡、包埋与切片, 随后进行苏木素-伊红 (HE) 染色与 Masson 染色, 以鉴定皮肤中病理变化和胶原沉积情况。光学显微镜下观察其病理形态并采用 Image J 软件测定真皮厚度, 其定义为从颗粒层顶部到真皮和皮下脂肪之间的接合处的皮肤厚度, 每张切片随机取 3 处测真皮厚度, 取平均值。同时, 采用 Image J 软件进行半定量分析测定相对胶原面积, 通过 “Image $\rightarrow$ Adjust $\rightarrow$ Color Threshold” 功能分别选取胶原 (蓝色) 和非胶原区域, 利用 “Analyze $\rightarrow$ Measure” 计算蓝色像素面积占组织总面积的百分比并进行统计。

2.4 小鼠皮肤组织 α -SMA 和 TGF- β 蛋白表达测定

石蜡切片常规脱蜡、水化, 经抗原修复后, 按免疫组化试剂盒说明书进行操作。切片滴加 α -SMA 和 TGF- β 一抗 ($1:400$), 4°C 孵育过夜; 次日磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后滴加相应酶标记二抗, 室温孵育 1 h; PBS 洗涤后 DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 中性树胶封片。光学显微镜下观察并记录皮肤组织 α -SMA 和 TGF- β 蛋白的阳性表达。

2.5 小鼠皮肤飞秒无标记成像分析

取小鼠背部皮肤组织, 去除多余结缔组织后, 以 OCT 包埋剂包埋并速冻, 制备连续冷冻切片 (厚

度 8 μm)。采用配备飞秒激发光源的非线性光谱成像系统,采集胶原纤维的高对比度和高分辨率二次谐波图像。图像采集参数如下:帧尺寸为 1 000 $\times$ 1 000 像素,通道波长为 414~436 nm。

2.6 小鼠皮肤组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、HYP 含量的测定

取冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 的皮肤组织,称取约 100 mg,剪碎后置入含钢珠的研磨管中,加入 1 mL 预冷且含 1%蛋白酶抑制剂混合物的蛋白裂解液,于匀浆机中以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 匀浆处理。匀浆液于冰上裂解 30 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清。随后严格按 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA 检测试剂盒及 HYP 检测试剂盒说明书进行检测。

2.7 小鼠皮肤组织转录组学分析

随机选取对照组、模型组及祛风汤高剂量组冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 的皮肤组织($n=3$),进行总 RNA 提取、文库构建及转录组测序(Illumina NovaSeq 6000 平台);原始测序数据经质控滤过后,采用 HISAT2 软件比对至小鼠参考基因组(mm10),利用 StringTie 进行基因表达定量,获取各样本基因 Read Counts 数据;针对各组间两两比较,使用 R 语言中的 DESeq2 包进行差异表达基因分析,以 $P\leq 0.05$ 为筛选标准筛选出差异表达基因,并利用 R 语言中的 ggplot2 软件包绘制火山图与聚类热图,实现数据可视化;随后利用 Venny 2.1.0 工具获取各组间共有的差异表达基因集;最后采用 R 语言中的 ClusterProfiler 包,对共表达差异基因集进行基因本体(GO)功能

及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,以 $P<0.05$ 为显著性阈值,并展示排名靠前的富集结果。

2.8 Western blotting 法检测皮肤组织中 p-AMPK、AMPK、PPAR- γ 和 Adiponectin 蛋白表达水平

蛋白提取与定量方法同“2.6”项。取 50 μg 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后,转至膜上,封闭 1 h。分别加入 p-AMPK (1:1 000)、AMPK (1:2 000)、PPAR- γ (1:2 000)、Adiponectin (1:1 000) 抗体及 β -actin 抗体 (1:2 000),孵育后以 TBST 洗膜,再加入相应二抗 (1:2 000) 进行孵育。洗膜后以增强型化学发光试剂显色,采用凝胶成像系统采集图像。使用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参 β -actin 灰度值的比值进行半定量分析。

2.9 统计方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 27.0 统计软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐性时组间两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠组织病理学的影响

结果如图 1 所示,HE 染色结果显示,对照组小鼠注射部位皮肤结构完整,表皮与真皮层次清

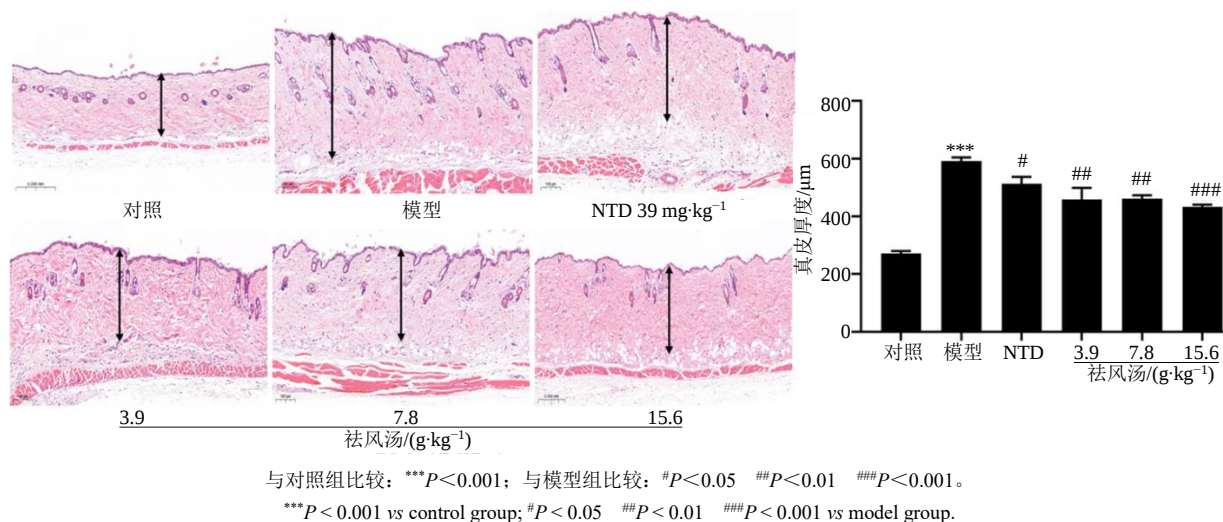


图 1 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤病理变化的影响 ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 1 Effects of Qufeng Decoction on skin pathological changes in bleomycin-induced dermal fibrosis mice ($\times 200$, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

晰, 未见明显炎症细胞浸润。与对照组相比, 模型组小鼠注射部位皮肤表皮棘层及真皮层显著增厚, 皮下脂肪层变薄甚至消失, 部分毛囊、皮脂腺等皮肤附属器萎缩或减少; 部分血管壁增厚、管腔狭窄, 血管周围可见淋巴细胞浸润, 提示 SSc 皮肤纤维化模型复制成功。与模型组相比, 各干预组小鼠皮肤组织病理形态均有不同程度改善, 主要表现为真皮层厚度变薄, 胶原纤维减少、排列趋于疏松, 皮下脂肪层有所恢复, 炎症细胞浸润减轻。真皮厚度测

定结果同样显示, 与对照组相比, 模型组小鼠真皮层明显增厚 ($P<0.001$); 与模型组相比, 祛风汤各剂量组的真皮层明显变薄 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

Masson 染色结果显示 (图 2), 对照组小鼠注射部位皮肤真皮层胶原纤维呈蓝色, 分布均匀, 排列有序, 未见异常沉积。与对照组相比, 模型组小鼠真皮层可见大量蓝色胶原纤维异常沉积, 染色浓重且分布紊乱, 相对胶原面积显著升高 ($P<0.001$), 提示皮肤组织存在明显的纤维化病理改变。与模型

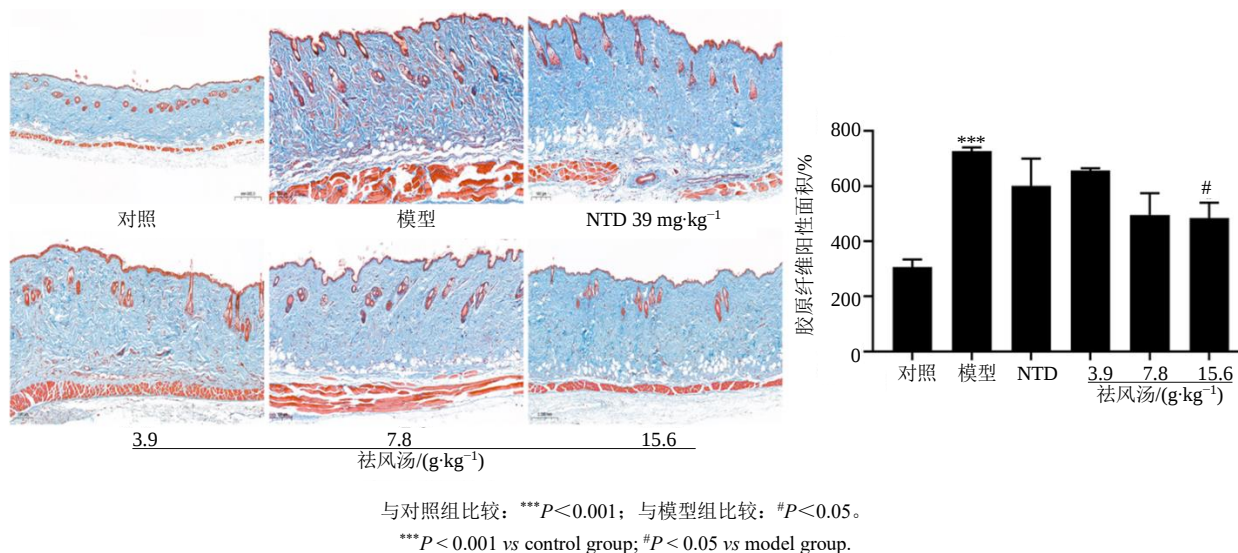


图 2 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠胶原纤维变化的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Effects of Qufeng Decoction on collagen fiber changes in bleomycin-induced dermal fibrosis mice ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组相比, 各给药组小鼠真皮层蓝色胶原纤维沉积均有不同程度减轻, 表现为染色强度减弱, 排列有序性提升, 相对胶原面积降低, 其中高剂量组改善显著 ($P<0.05$)。

3.2 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织 α -SMA 和 TGF- β 蛋白表达的影响

结果如图 3 所示, 对照组小鼠皮肤组织中 α -SMA 与 TGF- β 呈弱阳性表达, 而模型组小鼠皮肤组织中上述两指标呈强阳性表达, 镜下可见大量棕黄色颗粒沉积于细胞膜。各给药组干预后, α -SMA 与 TGF- β 的阳性染色强度较模型组均有不同程度降低, 且呈一定剂量相关性。

3.3 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织胶原纤维的影响

结果如图 4 所示, 对照组小鼠皮肤组织中仅见少量绿色胶原纤维; 模型组中绿色胶原纤维表达则显著增强; 经各给药组干预后, 绿色胶原纤维的表达量较模型组均有不同程度下降, 且呈现一定的剂

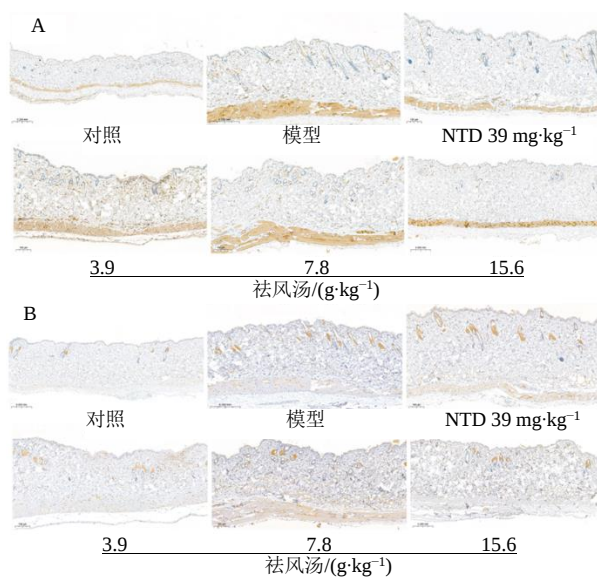


图 3 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织 α -SMA (A) 和 TGF- β (B) 蛋白表达的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effects of Qufeng Decoction on protein expression of α -SMA (A) and TGF- β (B) in skin tissue of bleomycin-induced dermal fibrosis mice ($\times 200$)

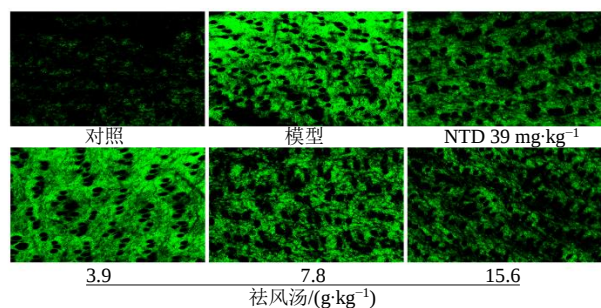
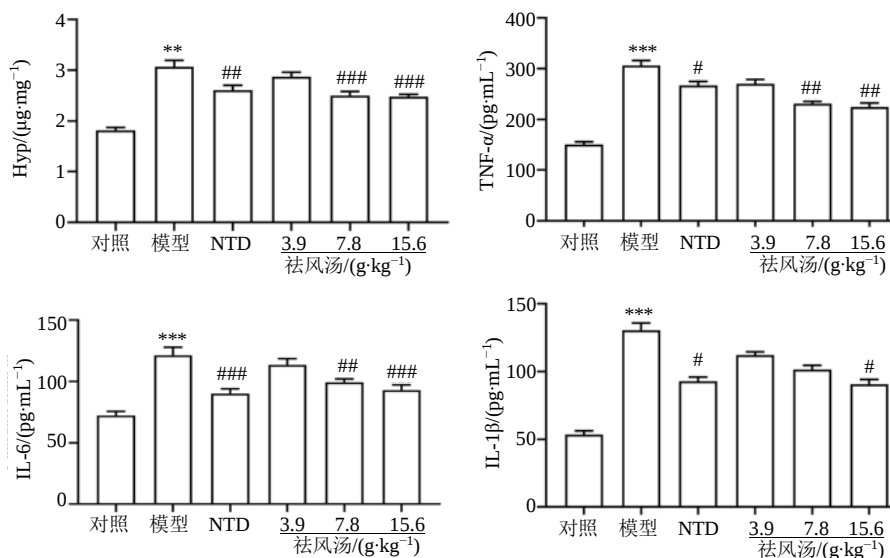


图 4 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织胶原纤维的影响 ($\times 400$)

Fig. 4 Effects of Qufeng Decoction on collagen fibers in skin tissue of bleomycin-induced dermal fibrosis mice ($\times 400$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 5 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、HYP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 5 Effects of Qufeng Decoction on TNF- α , IL-6, IL-1 β and HYP contents in skin tissue of bleomycin-induced dermal fibrosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.5 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织差异表达基因的影响

如图 6、7 所示, 转录组学分析显示, 与对照组相比, 模型组共筛选出 160 个差异表达基因, 其中上调基因 112 个、下调基因 48 个; 与模型组相比, 祛风汤高剂量组共筛选出 98 个差异表达基因, 其中上调基因 48 个、下调基因 50 个。2 者共表达基因 22 个, 排除趋势相同基因后, 得到模型组异常表达且给药后能显著改善的基因共计 21 个。聚类热图分析显示, 各组样本间基因表达存在显著差异, 且能够实现良好区分。对 21 个共表达差异基因进行 GO 功能 KEGG 通路富集分析, 结果显示, GO 生物学过程 (BP) 主要涉及脂质代谢过程、视黄醛代谢过程、类固醇生物合成过程及 NADP 分解代谢

量相关性。

3.4 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、HYP 含量的影响

结果如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织中 HYP、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量均显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001)。与模型组比较, 祛风汤各剂量组上述指标均呈不同程度下降: 其中祛风汤中剂量组可显著降低 HYP、TNF- α 、IL-6 含量 ($P < 0.01$ 、0.001); 祛风汤高剂量组可显著降低 HYP、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

过程等; 细胞组分 (CC) 主要富集于线粒体内膜、线粒体基质及线粒体外膜; 分子功能 (MF) 则以催化活性和铁离子结合为主。KEGG 通路富集分析主要涉及 PPAR 信号通路、辅因子生物合成及初级胆汁酸生物合成等信号通路。

3.6 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织 PPAR- γ 通路蛋白表达水平的影响

结果如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组 p-AMPK/AMPK、PPAR- γ 和 Adiponectin 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.01$ 、0.001); 而与模型组相比, 祛风汤中剂量组的 p-AMPK/AMPK 和 Adiponectin 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01), 高剂量组 p-AMPK/AMPK、PPAR- γ 和 Adiponectin 蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 、0.001)。

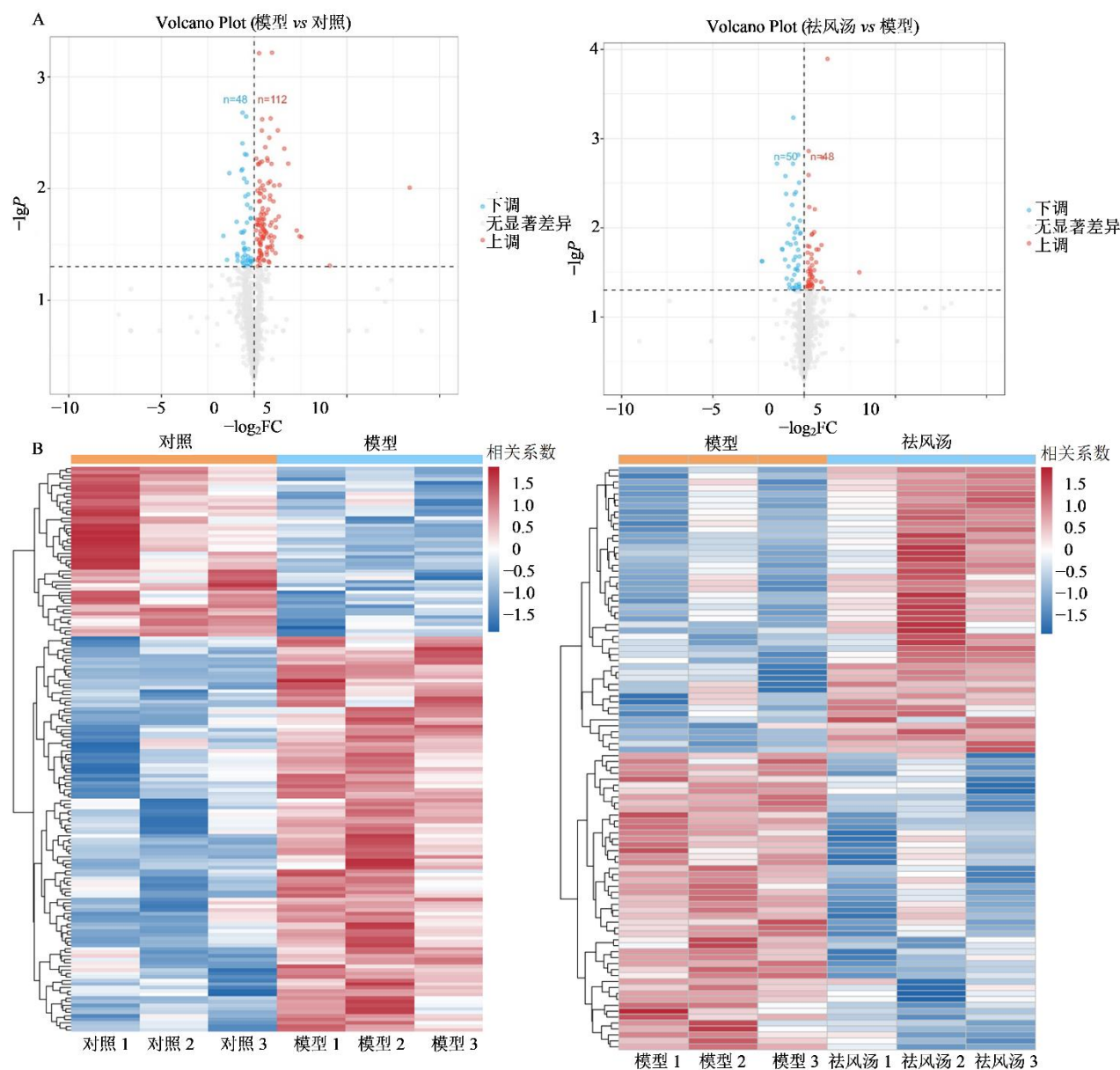


图 6 小鼠皮肤组织差异表达基因的火山图 (A) 及聚类热图 (B)

Fig. 6 Volcano plot (A) and clustering heatmap (B) of differentially expressed genes in mouse skin tissue

4 讨论

SSc 是一种以皮肤和内脏器官进行性纤维化为主要特征的慢性自身免疫性结缔组织病, 临床表现复杂多样, 常首发雷诺现象, 随病情进展可出现皮肤肿胀增厚、指端萎缩, 并累及肺、心、消化道及肾脏等器官, 导致间质性肺病、肺动脉高压及肾危象等严重并发症, 显著影响患者生存质量^[14-15]。皮肤纤维化作为 SSc 最突出且致残性的临床表现, 不仅是疾病诊断与分型的核心依据, 也是目前临床干预的重点和难点。目前 SSc 的病因及发病机制尚未

完全阐明, 临床仍缺乏根治或有效延缓病情进展的特效药物, 现有治疗手段在疗效与安全性方面存在明显局限, 患者依从性及长期预后均不理想^[16]。因此, 从新的策略探索安全有效的干预方案, 仍是当前治疗研究领域亟待解决的关键问题。

硬皮病的发病机制尚未完全明确, 但近年研究表明 PPAR- γ 在抑制结缔组织生物合成及调控纤维化进程中具有重要作用。PPAR- γ 属于核激素受体家族的配体响应性转录因子, 可通过拮抗 TGF- β /Smad 信号通路抑制成纤维细胞活化及细胞外基质过度

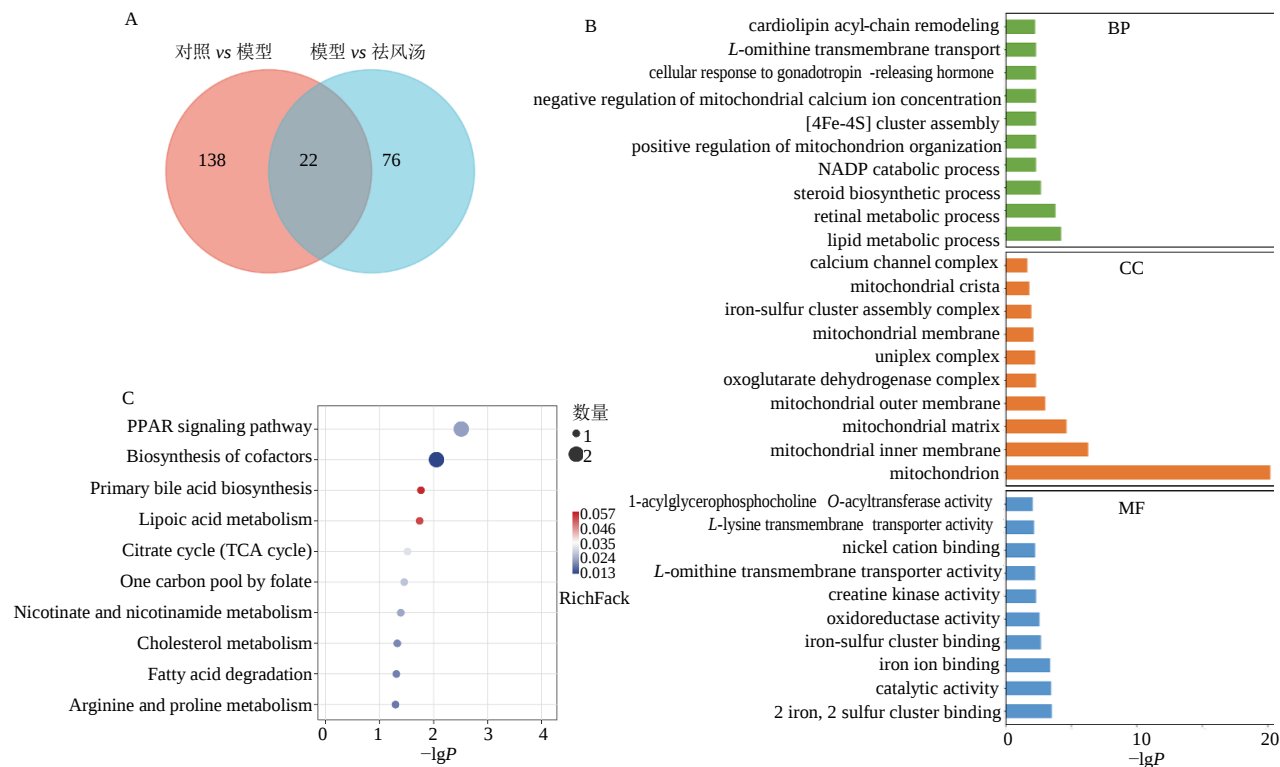


图 7 小鼠皮肤组织差异表达基因的韦恩图 (A)、GO 功能富集分析 (B)、KEGG 通路富集分析 (C)
Fig. 7 Venn diagram of differentially expressed genes in mouse skin tissue (A), GO functional enrichment analysis (B), KEGG pathway enrichment analysis (C)

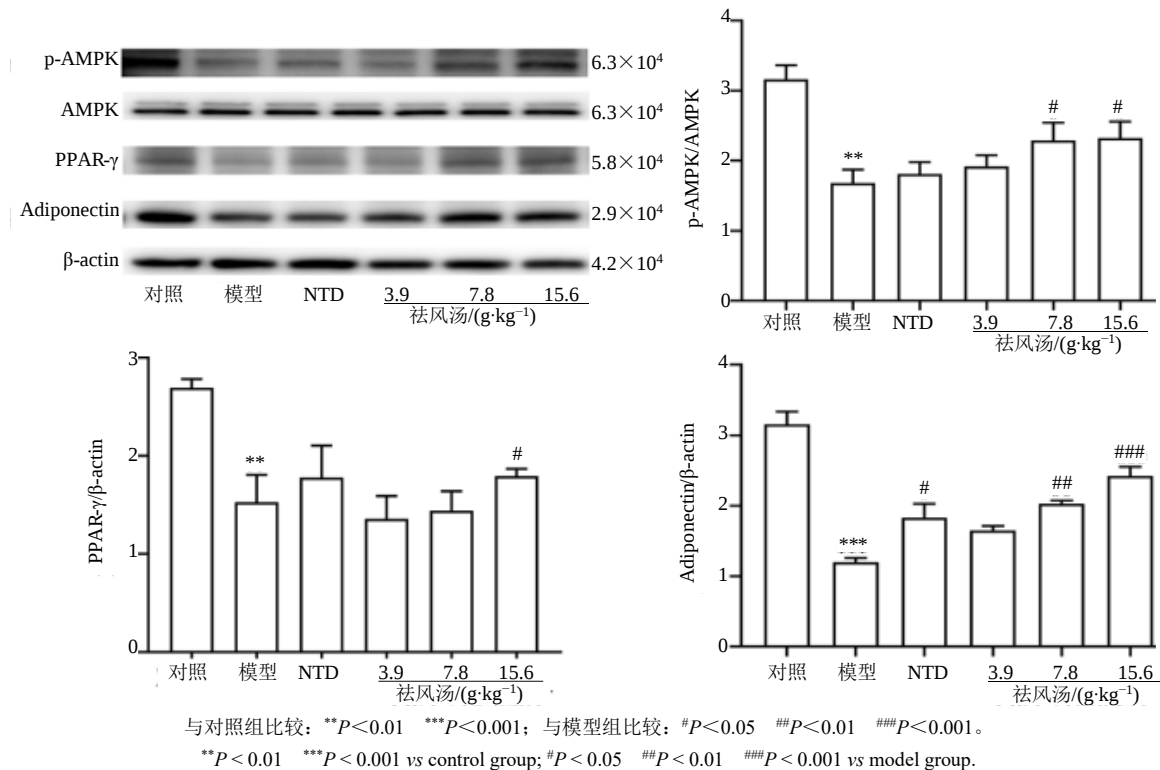


图 8 祛风汤对皮肤纤维化模型小鼠皮肤组织 PPAR-γ 通路蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 8 Effects of Qufeng Decoction on protein expression levels of the PPAR-γ pathway in the skin tissue of bleomycin-induced dermal fibrosis mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

沉积^[17-18]。研究发现,SSc 患者皮肤组织、肺活检样本及皮肤成纤维细胞中 PPAR- γ 表达明显降低,其激活标志物脂联素水平亦显著减少,且与皮肤纤维化程度相关^[19-20];在纤维化及硬皮病动物模型的病灶组织中,PPAR- γ 表达同样显著降低^[21]。体内实验进一步证实,合成 PPAR- γ 配体可减轻实验性肝、心、肾纤维化,并预防 BLM 诱导的皮肤纤维化,同时 PPAR- γ 激动剂罗格列酮亦能抑制 BLM 诱导的硬皮病模型纤维化进展^[22-23]。然而,报道显示罗格列酮存在液体潴留、心力衰竭及其他心血管事件等不良反应,其临床应用受到明显限制^[24-25]。

本研究采用 BLM sc 诱导建立 SSc 皮肤纤维化小鼠模型,该方法操作简便且重复性良好,可有效模拟 SSc 皮肤局部的炎症-纤维化级联反应(如胶原过度沉积、肌成纤维细胞活化、TGF- β 高表达等),是目前研究 SSc 皮肤纤维化的常用动物模型^[26-27]。然而,该模型主要反映局部注射部位的皮肤纤维化病理过程,尚不能完全模拟 SSc 全身性自身免疫紊乱、血管病变及内脏器官(如肺、心、消化道、肾脏)纤维化等复杂病理特征。因此,本研究结论目前仅适用于祛风汤对皮肤纤维化环节的干预作用。组织纤维化是成纤维细胞异常活化、胶原合成增多并过度沉积的病理过程^[28]。HYP 为胶原特有的氨基酸成分,其组织含量可客观反映纤维化严重程度^[29]。实验结果显示,模型组 HYP 水平明显上升,进一步验证了纤维化病变。 α -SMA^[30]与 TGF- β ^[31]作为肌成纤维细胞的特征性标志物,其高表达可诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞表型转化,促进细胞外基质过量分泌,进而引起皮肤硬化。祛风汤干预后,各剂量组小鼠皮肤组织学损伤均得到缓解,表现为真皮层变薄、胶原纤维减少且排列趋于松散、炎症浸润减轻,同时 HYP 水平下降, α -SMA 和 TGF- β 蛋白表达量降低。以上结果表明祛风汤能够抑制皮肤纤维化模型小鼠皮肤纤维化进展,减轻组织病理损害。

上述结果证实祛风汤对 SSc 皮肤纤维化模型小鼠具有确切的抗皮肤纤维化效应。为深入阐明其分子机制,本研究采用转录组学技术对皮肤组织进行基因表达谱分析,共筛选出 21 个共表达差异基因,这些基因在模型组中异常表达且经祛风汤干预后显著改善。GO 功能富集分析显示,这些差异基因主要参与脂质代谢过程、视黄醛代谢过程及类固醇生物合成过程等生物学过程,并显著富集于线粒体内膜、线粒体基质等细胞组分,提示祛风汤可能通

过调控细胞能量代谢及线粒体功能发挥抗纤维化作用。KEGG 通路富集分析进一步揭示,差异基因显著富集于 PPAR 信号通路,该通路是调控脂质代谢、炎症反应及纤维化的关键信号轴。

为进一步验证转录组学预测结果,采用 Western blotting 检测了 PPAR- γ 通路关键蛋白的表达变化。结果显示模型组小鼠皮肤组织中 AMPK 磷酸化水平、PPAR- γ 及其下游效应分子 Adiponectin 的蛋白表达均明显降低;祛风汤各组上述蛋白表达呈剂量相关性回升,高剂量组上调趋势尤为突出。基于上述结果推测,祛风汤的抗 SSc 皮肤纤维化效应可能伴随 AMPK 磷酸化水平升高、PPAR- γ 及脂联素表达上调,进而与 TGF- β 介导的成纤维细胞激活及胶原异常沉积的抑制相关。该通路是否为祛风汤发挥药效的必需环节,有待进一步功能验证。

本研究以中药复方祛风汤为研究切入点,首次证明其可有效改善 BLM 诱导的皮肤纤维化模型小鼠皮肤纤维化,该作用与祛风汤上调皮肤组织中 AMPK 磷酸化水平、PPAR- γ 及其下游效应分子 Adiponectin 的表达相关,并可能涉及对 TGF- β 介导的成纤维细胞异常活化及胶原过度沉积的抑制。本研究不仅为祛风汤治疗 SSc 皮肤纤维化的临床应用提供了实验依据,也为后续以“AMPK/PPAR- γ ”轴为靶点的抗纤维化机制验证研究提供了候选方向。鉴于本研究模型的局限性,未来工作将采用 Tsk-1 小鼠、次氯酸(HCLO)诱导的全身性硬皮病模型或结合自身免疫背景的模型,进一步验证祛风汤对 SSc 全身病变及多器官纤维化的潜在干预作用,以更全面地评价其临床转化价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Di Battista M, Lepri G, Codullo V, et al. Systemic sclerosis: One year in review 2025 [J]. Clin Exp Rheumatol, 2025: 1369-1379.
- [2] Gabrielli A, Avvedimento E V, Krieg T. Scleroderma [J]. N Engl J Med, 2009, 360(19): 1989-2003.
- [3] Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón C P, et al. Mortality and survival in systemic sclerosis: Systematic review and meta-analysis [J]. Semin Arthritis Rheum, 2014, 44(2): 208-219.
- [4] Distler O, Highland K B, Gahlemann M, et al. Nintedanib for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease [J]. N Engl J Med, 2019, 380(26): 2518-2528.

- [5] Del Galdo F, Lescoat A, Conaghan P G, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: 2023 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2025, 84(1): 29-40.
- [6] Tashkin D P, Roth M D, Clements P J, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in Scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): A randomised controlled, double-blind, parallel group trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2016, 4(9): 708-719.
- [7] Ebata S, Yoshizaki A, Oba K, et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic sclerosis (DESIREs): A double-blind, investigator-initiated, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Rheumatol*, 2021, 3(7): e489-e497.
- [8] Kuster S, Jordan S, Elhai M, et al. Effectiveness and safety of tocilizumab in patients with systemic sclerosis: A propensity score matched controlled observational study of the EUSTAR cohort [J]. *RMD Open*, 2022, 8(2): e002477.
- [9] 王特, 刘艺, 陈秋朴, 等. 中医内治法治疗硬皮病研究进展 [J]. *天津中医药*, 2021, 38(3): 400-403.
Wang T, Liu Y, Chen Q P, et al. Research progress of Scleroderma treated by internal treatment of traditional Chinese medicine [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2021, 38(3): 400-403.
- [10] 秦松林, 李绍林, 张晓娜, 等. 从伏邪学说探讨硬皮病的治疗思路 [J]. *环球中医药*, 2017, 10(7): 732-734.
Qin S L, Li S L, Zhang X N, et al. Discussion on the treatment of Scleroderma from the theory of latent evil [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2017, 10(7): 732-734.
- [11] 曹科, 周登峰, 韩宝, 等. 止痒祛风汤坐浴治疗湿热下注型肛周湿疹的临床观察 [J]. *北京中医药*, 2014, 33(11): 817-818.
Cao K, Zhou D F, Han B, et al. Hip bath of Zhiyangqufeng decoction for perianal eczema with downward flow of damp-heat syndrome: Clinical research [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2014, 33(11): 817-818.
- [12] 霍旺, 李晗, 曹科, 等. 基于网络药理学及动物实验研究祛风汤治疗肛周湿疹的作用机制 [J]. *中医药导报*, 2024, 30(11): 41-47.
Huo W, Li H, Cao K, et al. Exploring mechanism of Qufeng Tang (祛风汤) against perianal eczema based on network pharmacology and animal experiments [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharmacol*, 2024, 30(11): 41-47.
- [13] Rosa I, Romano E, Fioretto B S, et al. Scleroderma-like impairment in the network of telocytes/CD34+ stromal cells in the experimental mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12407.
- [14] Volkmann E R, Andréasson K, Smith V. Systemic sclerosis [J]. *Lancet*, 2023, 401(10373): 304-318.
- [15] Rana S S, Dilshad R A, Nawaz S, et al. Impact of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease, with and without pulmonary hypertension, on survival: A systematic review [J]. *Cureus*, 2025, 17(7): e87303.
- [16] Sieiro Santos C, Del Galdo F. New horizons in systemic sclerosis treatment: Advances and emerging therapies in 2025 [J]. *RMD Open*, 2025, 11(3): e005776.
- [17] Wei J, Ghosh A K, Sargent J L, et al. PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: A novel mechanism for progressive fibrogenesis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13778.
- [18] Dantas A T, Pereira M C, de Melo Rego M J B, et al. The role of PPAR gamma in systemic sclerosis [J]. *PPAR Res*, 2015, 2015: 124624.
- [19] Lakota K, Wei J, Carns M, et al. Levels of adiponectin, a marker for PPAR-gamma activity, correlate with skin fibrosis in systemic sclerosis: Potential utility as biomarker [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3): R102.
- [20] Żółkiewicz J, Stochmal A, Zaremba M, et al. Circulating peroxisome proliferator-activated receptor γ is elevated in systemic sclerosis [J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2020, 37(6): 921-926.
- [21] de Almeida A R, Dantas A T, de Oliveira Gonçalves M E, et al. PPAR γ partial agonist LPSF/GQ-16 prevents dermal and pulmonary fibrosis in HOC1-induced systemic sclerosis (SSc) and modulates cytokine production in PBMC of SSc patients [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32(1): 433-446.
- [22] Xu S, Jiang B, Wang H, et al. Curcumin suppresses intestinal fibrosis by inhibition of PPAR γ -mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7876064.
- [23] Muruganandam M, Ariza-Hutchinson A, Patel R A, et al. Biomarkers in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of systemic sclerosis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 4633-4660.
- [24] 郑媛媛, 聂鹏. 罗格列酮的不良反应机制及应用研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(9): 1282-1289.
Zheng Y Y, Nie P. Research progress of adverse reaction mechanisms and applications of rosiglitazone [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2023, 40(9): 1282-1289.
- [25] Wallach J D, Wang K, Zhang A D, et al. Updating insights into rosiglitazone and cardiovascular risk through shared data: Individual patient and summary level meta-analyses [J]. *Bmj*, 2020: 17078.

- [26] Liang M R, Lv J Y, Zou L L, et al. A modified murine model of systemic sclerosis: Bleomycin given by pump infusion induced skin and pulmonary inflammation and fibrosis [J]. Lab Invest, 2015, 95(3): 342-350.
- [27] 黄奕, 李永强, 张洪琳, 等. 不同浓度博来霉素诱导硬皮病小鼠模型胃肠道并发症的病理研究 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(11): 27-30.
- Huang Y, Li Y Q, Zhang Y L, et al. Pathological study of gastrointestinal complications in Scleroderma model mice induced by different concentrations of Bleomycin [J]. China Med Her, 2023, 20(11): 27-30.
- [28] Chang Y J, Lee J W N, Holle A W. The mechanobiology of fibroblast activation in disease [J]. APL Bioeng, 2025, 9(2): 021505.
- [29] 李晗, 高云航, 宋玲, 等. 复方苦参注射液抗博来霉素致大鼠肺纤维化药效学研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 241-250.
- Li H, Gao Y H, Song L, et al. Pharmacodynamic study of Compound Kushen Injection on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(2): 241-250.
- [30] van Caam A, Vonk M, van den Hoogen F, et al. Unraveling SSc pathophysiology; the myofibroblast [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2452.
- [31] Mendoza F A, Piera-Velazquez S, Jimenez S A. Role of growth factors in the pathogenesis of systemic-sclerosis-associated fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(19): 9596.

[责任编辑 兰新新]