

基于网络药理学和实验验证探究六神凝胶治疗痤疮的作用机制

梁晋如¹, 庞亚琪¹, 张亚云², 余海谦², 崔萌轶², 王恒斌², 吕美君³, 罗 碧^{1*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 雷允上药业集团有限公司, 江苏 苏州 215000

3. 合阳县人民医院, 陕西 渭南 715300

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验探究六神凝胶治疗痤疮的作用机制。 **方法** 通过网络药理学筛选六神凝胶的活性成分和作用靶点, 采用 String 数据库对活性成分靶点与痤疮疾病靶点进行蛋白互作网络分析, 并通过 DAVID 数据库对六神凝胶治疗痤疮的靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。大鼠耳部皮内注射痤疮丙酸杆菌联合外部涂抹油酸建立痤疮模型, 考察六神凝胶对大鼠耳部外观、病理变化、耳部组织炎症因子水平的影响, 采用 Western blotting 检测大鼠耳部组织 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2) /p38/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路相关蛋白表达, 采用免疫荧光检测大鼠耳部组织 NF- κ B p65 表达。 **结果** 共获得六神凝胶活性成分 27 个, 药物靶点 831 个, 痤疮靶点 120 个, 活性成分与疾病的交集靶点 41 个。六神凝胶治疗痤疮的主要成分为麝香酮、胆固醇、菜油甾醇、胆酸和吗啡等, 核心靶点为肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、瘦素 (leptin, LEP)、TLR4 和 CXCL8 趋化因子配体 8 (CXCL8) 等, 关键信号通路可能包括 IL-17 信号通路、TLR 信号通路、NOD 样受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、NF- κ B 信号通路等。动物实验结果表明, 六神凝胶能够显著缓解大鼠耳部痤疮症状, 减轻大鼠耳肿胀程度, 显著抑制耳组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、IL-23 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 水平 ($P < 0.001$), 并显著降低痤疮组织中 TLR2、p38 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。 **结论** 六神凝胶通过抑制 TLR2/p38/NF- κ B 信号通路的活化, 减少炎症因子的分泌, 减轻痤疮模型大鼠炎症反应, 从而治疗痤疮。

关键词: 痤疮; 六神凝胶; 炎症因子; Toll 样受体 2; p38; 核因子- κ B; 麝香酮; 胆固醇; 菜油甾醇; 胆酸; 吗啡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)09-3165-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.014

Mechanism of Liushen Gel in treatment of acne based on network pharmacology and experimental verification

LIANG Jinru¹, PANG Yaqi¹, ZHANG Yayun², YU Haiqian², CUI Mengyi², WANG Hengbin², LYU Meijun³, LUO Bi¹

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Lei Yun Shang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Suzhou 215000, China

3. Heyang County People's Hospital, Weinan 715300, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Liushen Gel (六神凝胶) in treatment of acne based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** The active ingredients and targets of Liushen Gel were screened by network pharmacology, and the protein interaction network between the active ingredient targets and acne disease targets was analyzed by String database. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of targets of Liushen Gel for acne treatment were conducted by DAVID database. The rat model of acne was established by intradermal injection of *Propionibacterium acnes* and external application of oleic acid. The effects of Liushen Gel on the appearance, pathological changes,

收稿日期: 2024-11-06

基金项目: 雷允上药业集团有限公司技术服务项目 (XS-LS-YL-202201); 广东省中医药局项目 (20221222); 广州市基础研究的计划基础与应用基础研究项目 (202201010293)

作者简介: 梁晋如, 讲师, 从事中药药效物质研究。E-mail: jinru.liang@gdpu.edu.cn

*通信作者: 罗 碧 (1988—), 女, 博士, 讲师, 从事药用植物及其内生菌活性物质的发现与功能研究。E-mail: luobi1225@163.com

and levels of inflammatory factors in ear tissue of rats were investigated. Western blotting was used to detect the expressions of Toll-like receptor 2 (TLR2)/p38/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway related proteins in ear tissue of rats, and immunofluorescence was used to detect the expression of NF- κ B p65 in ear tissue of rats. **Results** A total of 27 active ingredients from Liushen Gel, 831 drug targets, 120 acne targets and 41 cross targets of active ingredients and diseases were obtained. The main ingredients of Liushen Gel in the treatment of acne were muscone, cholesterol, campesterol, cholic acid and morphine, the core targets were tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β), leptin (LEP), TLR4 and CXC chemokine ligand 8 (CXCL8), the key signal pathways may included IL-17 signaling pathway, TLR signaling pathway, NOD like receptor signaling pathway, C-type lectin receptor signaling pathway, TNF signaling pathway and NF- κ B signaling pathway, etc. The animal experiment results showed that Liushen Gel could significantly alleviate the symptoms of acne in ear of rats, reduce the degree of ear swelling, significantly inhibit the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-23 and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in ear tissue ($P < 0.001$), significantly reduce the expression levels of TLR2, p38 and p-NF- κ B p65 proteins in acne tissue ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Liushen Gel could treat acne by inhibiting the activation of TLR2/p38/NF- κ B signaling pathway, reducing the secretion of inflammatory factors and alleviating the inflammatory response of acne model rats.

Key words: acne; Liushen Gel; inflammatory factors; Toll-like receptor 2; p38; nuclear factor- κ B; muscone; cholesterol; campesterol; cholic acid; morphine

痤疮是一种由毛囊皮脂腺发炎引起的慢性皮肤病, 主要发生在青少年和年轻人中, 女性发病率高于男性, 在临床上表现为丘疹、脓疱、结节、囊肿等多种类型的皮疹, 同时伴随皮肤的瘙痒和刺痛, 影响皮肤的正常功能^[1-2]。重度痤疮通常会引起患者焦虑、自卑、抑郁和社交恐惧症等心理障碍。痤疮的发病机制复杂, 目前研究认为痤疮丙酸杆菌感染、皮脂分泌过多、炎症及免疫反应紊乱是痤疮发病的重要因素^[3]。在痤疮发病初期, 痤疮丙酸杆菌能够激活 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2), TLR2 参与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活, 进而诱导促炎细胞因子的产生^[4-5]。研究发现, 角质形成细胞、皮脂细胞和单核细胞中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloprotein 9, MMP9) 在痤疮病变皮肤中高度表达, 参与炎症的发展^[6]。IL-23/IL-17 轴在痤疮的发病机制中也起着重要作用^[7]。六神凝胶是著名的国家机密处方六神丸的改剂型外用制剂, 由人工麝香、雄黄、蟾酥等 6 种中药组成^[8]。六神凝胶临床上已被应用于治疗痤疮^[9-10], 作为皮肤外用的涂抹剂型, 六神凝胶具有直接作用于患部和延长药物作用的优点, 临床表现出良好的治疗效果, 但尚未有药理学研究阐明其治疗痤疮的作用和潜在机制。本研究通过对大鼠耳部皮内注射痤疮丙酸杆菌联合油酸外部涂抹刺激建立了一种改良的

Kligman 痤疮炎症模型, 并结合网络药理学对六神凝胶治疗痤疮的有效成分、治疗靶点以及作用机制进行深入挖掘。

1 材料

1.1 动物和菌株

SPF 级 SD 大鼠 32 只, 雌雄各半, 8~10 周龄, 购自南方医科大学, 生产许可证号 SCXK(粤)2021-0041, 动物质量合格证号 No. 44002100031987。动物饲养于温度 22~26 °C、相对湿度 40%~70%、光照/黑暗周期 12 h 的环境中, 自由进食饮水。动物实验经广东药科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 L2022111)。

痤疮丙酸杆菌(保藏号 CICC10312)购自广州市微生物研究所有限公司。

1.2 药品与试剂

六神凝胶(国药准字 Z20060460, 批号 UD1002)由雷允上药业集团有限公司提供; 维 A 酸乳膏(国药准字 H50021816, 批号 20010128)购自重庆华邦医药集团有限公司; 油酸(批号 S24GS162292)购自上海源叶生物科技有限公司; BHI 培养基(货号 CM1135)购自麦格生物有限公司; p38 抗体(批号 GR3396412-3)、TLR2 抗体(批号 GR3422003-1)、p-NF- κ B p65 抗体(批号 GR3423511-2)购自英国 Abcam 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 10021642)、二抗(批号 20000576)购自 Proteintech 公司; IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 JN216)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 JN3398)、TNF- α ELISA 试剂

盒(批号 JN4759)、MMP9 ELISA 试剂盒(批号 JN1722)、IL-17 ELISA 试剂盒(批号 JN5643)、IL-23 ELISA 试剂盒(批号 JN2049)购自上海纪宁生物有限公司;NF- κ B 激活-核转运检测试剂盒(批号 SN368)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 仪器

DW-86L338J 型医用低温保存箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司);MNT-150T 型电子数显游标卡尺(上海美耐特实业有限公司);Centrifuge5401 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);DNM-9602A 型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);DHP-9272 型恒温培养箱(上海捷呈实验仪器有限公司);YQX-11 型厌氧培养箱(上海皓庄仪器有限公司);T100 型 PCR 仪(济南欧莱博科学仪器有限公司);YXQ-75SII 型灭菌锅(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);BBS-V800 型超净工作台(博科控股集团有限公司);WD-9403F 型凝胶成像系统、DYY-12 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Gene Pulser Xcell 电穿孔转化仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];Dmi8 型 Leica 倒置荧光显微镜(德国徕卡公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 六神凝胶活性成分及潜在靶点的筛选 通过 TCMSP 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、合 TCMID 数据库(<http://www.megabionet.org/tcmid/>)、BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)搜索六神凝胶中 6 味中药(牛黄、人工麝香、雄黄、蟾酥、冰片、珍珠)的活性成分,以上数据库皆未纳入的中药通过文献检索获得活性成分。根据 TCMSP 数据库上显示的化合物吸收、分布、代谢、排泄(absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME)参数进行筛选,纳入口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 20\%$ 且类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.10 的活性成分^[11];同时将不满足以上 ADME 参数筛选标准但《中国药典》2020 年版收载的指标性成分重新纳入。筛选后的成分通过 TCMSP、PubChem 数据库检索药物靶点并合并。

2.1.2 痤疮疾病相关基因的收集 以“acne”为关键词,在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 DisGeNET 数据库(<http://www.disgenet.org/>)检索疾病基因,在 Genecards 数据库

检索结果中选择关联分数 >10 的疾病靶点^[12],在 DisGeNET 数据库检索结果中选择 EI=1、score ≥ 0.01 的基因,2 个数据库得到的基因合并去重后获得痤疮疾病相关基因。

2.1.3 “活性成分-靶点”网络的构建与拓扑分析 将活性成分和疾病靶点导入 Cytoscape 软件生成“活性成分-靶点”网络,对该网络中节点进行拓扑参数分析,计算每个节点的度值,以度值 >2 倍平均度值的节点作为网络中的核心节点^[13],筛选出六神凝胶治疗痤疮的核心成分和核心靶点。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建与分析 将六神凝胶治疗痤疮的靶点上传 String 平台,物种选择为“Homo sapiens”,选择 high confidence 为 0.4(中度可信度)^[14],构建 PPI 网络,计算每个节点的度值,筛选度值 $>$ 平均度值的靶点作为六神凝胶治疗痤疮的重要靶点^[15]。

2.1.5 基因本体(gene ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析 将六神凝胶治疗痤疮的作用靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)^[16],进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析,将 $P<0.01$ 作为通路聚类标准,筛选出的显著生物功能和信号通路分别以条形图和高级气泡图进行可视化。

2.2 动物实验

2.2.1 痤疮丙酸杆菌的培养 痤疮丙酸杆菌用 10 mL BHI 培养基于 37 °C、厌氧条件下培养,将痤疮丙酸杆菌悬浮液于 80 °C 冰箱中放置 30 min 进行热灭活反应,热灭活后的痤疮丙酸杆菌悬浮液于 4 °C 保存备用。

2.2.2 造模、分组与给药 大鼠适应性饲养 7 d 后,随机选取 8 只大鼠作为对照组,其余大鼠采用改良 Kligman 痤疮造模方法^[17]进行造模。大鼠于左、右耳内侧面耳导管开口处涂抹油酸溶液 1.0 mL,涂抹后向耳部皮内注射 50 μ L 痤疮丙酸杆菌(1×10^9 CFU/mL),1 次/d,连续 18 d,对照组注射等体积的生理盐水。当造模部位出现清晰扩张状的毛细血管,耳部皮肤出现暗红肿胀、脱屑、表皮粗糙及隆起丘疹时,提示大鼠耳廓复合痤疮模型制备成功。分别于造模前及造模成功后采用游标卡尺测量双耳同一处厚度,计算肿胀度。于实验第 19 天根据双耳的平均肿胀度进行随机分组,分为模型组、维 A

酸乳膏组和六神凝胶组, 每组 8 只。分组当天对大鼠造模区域涂抹药物治疗, 涂抹厚度为 1~2 mm, 1 次/d, 连续干预 7 d。

2.2.3 耳廓组织外观观察及组织病理学检查 造模及治疗期间, 每周对大鼠耳部进行观察并拍照, 用微型游标卡尺测量大鼠耳朵厚度。末次给药结束后, 大鼠 ip 5%戊巴比妥钠麻醉, 测量双耳厚度后, 剪下大鼠左、右耳片, 于 10%福尔马林溶液中固定。使用梯度乙醇对固定组织进行脱水处理, 经石蜡包埋、切片后进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察皮肤结构、炎症细胞浸润等病理学变化。

2.2.4 ELISA 检测右耳组织炎症因子水平 取各组大鼠右耳组织, 加入预冷的 PBS (pH 7.4) 制备组织匀浆, 低温高速离心 15 min 后收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MMP9、IL-17 和 IL-23 水平。

2.2.5 Western blotting 检测右耳组织 TLR2、p38、p-NF- κ B p65 蛋白表达 取各组大鼠右耳组织, 加入含蛋白酶抑制剂的裂解液, 低温高速离心后提取蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h, 分别加入 TLR2 (1:1 000)、p38 (1:1 000) 和 p-NF- κ B p65 (1:1 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日洗涤, 加入二抗, 室温孵育 1 h 后显影, 使用 Image J 1.8.0 软件进行图像分析, 并量化目标条带的灰度值。

2.2.6 免疫荧光检测右耳组织 NF- κ B p65 蛋白表达 取各组大鼠右耳组织石蜡切片, 加入固定液固定 5~15 min, 除去固定液用洗涤液洗净, 加入免疫染色封闭液, 室温封闭 1 h。吸除免疫染色封闭液, 加入 NF- κ B p65 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤液洗涤完全后加入抗兔 Cy3, 室温孵育 1 h。洗涤抗兔 Cy3 后加入细胞核染色液 (DAPI), 室温染色 5 min。吸除细胞核染色液后用洗涤液洗涤完全, 滴加适当量抗荧光淬灭封片液, 盖玻片封片后于荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.7 统计学分析 使用 SPSS 19 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较组间差异。

3 结果

3.1 网络药理学分析

3.1.1 六神凝胶治疗痤疮的靶点筛选 获得六神凝胶中活性成分 27 个 (表 1), 雄黄作为砷的硫化

表 1 六神凝胶中的活性成分

Table 1 Active ingredients in Liushen Gel

序号	化合物	序号	化合物
1	蟾毒灵	15	吗啡
2	华蟾酥毒基	16	乙酸龙脑酯
3	脂蟾毒配基	17	龙脑香醇酮
4	蟾二烯羟酸内酯	18	龙脑
5	蟾毒色胺内盐	19	积雪草酸
6	柳珊瑚酸	20	胆酸
7	胆固醇	21	胆红素
8	海州骨碎补苷	22	猪去氧胆酸
9	菜油甾醇	23	硫化汞
10	蛇纹石素	24	麝香酮
11	去氢蟾酥碱	25	桑黄素
12	蟾蜍噻吩	26	N-去甲基荷叶碱
13	肾上腺素	27	胆甾醇阿魏酸酯
14	去乙酰化酶		

物矿物之一, 其主要有效成分为二硫化二砷, 未检索到相关靶点。根据 TCMSP、TCMID、BATMAN-TCM、PubChem 数据库以及文献检索筛选后获得六神凝胶活性成分的靶点 831 个, 通过 GeneCards 和 DisGeNET 数据库检索并获得痤疮疾病相关基因 120 个。将药物靶点与疾病基因进行交集, 得到六神凝胶治疗痤疮的潜在作用靶点 41 个, 见图 1。

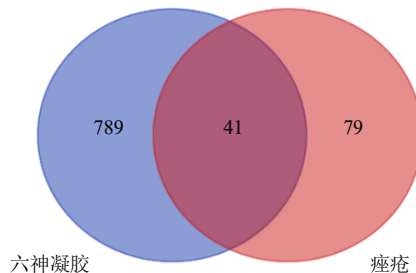


图 1 六神凝胶治疗痤疮靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn of targets of Liushen Gel in treatment of acne

3.1.2 “活性成分-靶点”网络的构建及拓扑分析 采用 Cytoscape 3.6.0 软件对六神凝胶治疗痤疮的 41 个潜在靶点构建“活性成分-靶点”网络, 如图 2 所示, 网络中有 58 节点, 其中作用靶点 41 个, 与作用靶点对接的活性成分 17 个 (有 10 个活性成分未与潜在靶点对接, 因此不在图中显示)。对 58 个节点进行拓扑结构分析, 得到平均度值为 3.83, 图中节点按度值大小进行显示, 并筛选大于 2 倍平均度值的节点为网络中的核心节点, 获得 5 个核心成分, 分别为麝香酮、胆固醇、菜油甾醇、胆酸、吗啡。推测以上化合物可能在六神凝胶治疗痤疮中发挥主要作用。

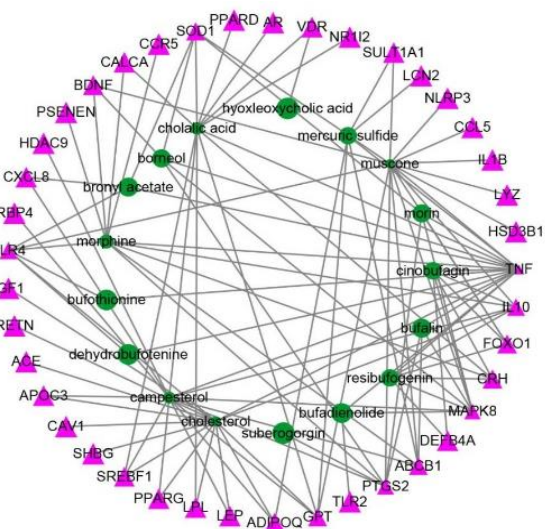


图 2 “活性成分-靶点”网络
Fig. 2 “Active ingredient-target” network

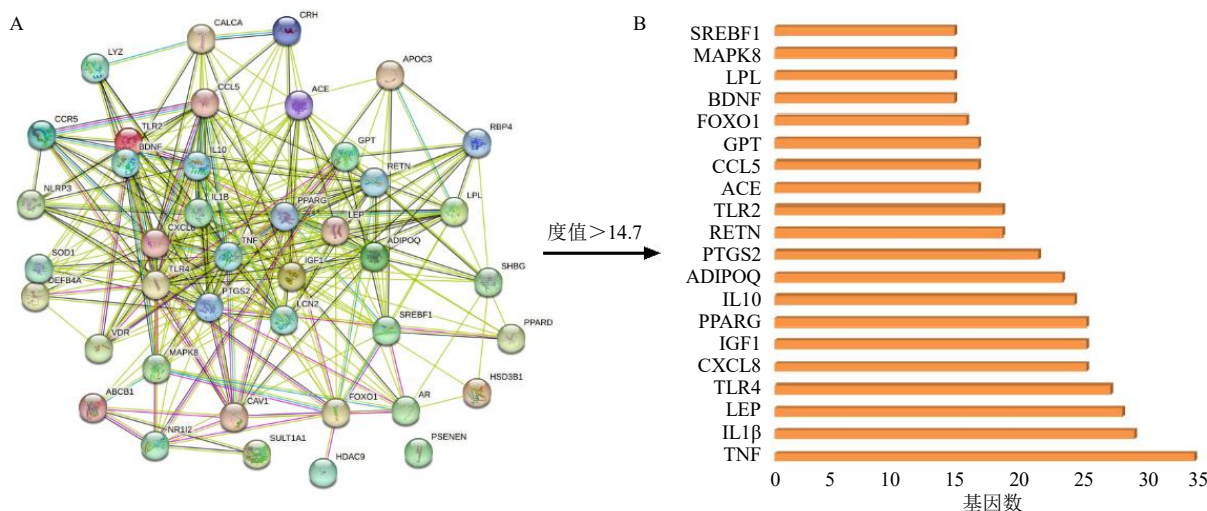


图 3 六神凝胶治疗痤疮潜在靶点的 PPI 网络 (A) 及前 20 个重要靶点 (B)
Fig. 3 PPI network (A) of potential targets for Liushen Gel in treatment of acne and top 20 important targets (B)

获得 135 条显著富集的生物功能，其中生物过程 (biological process, BP) 119 条、细胞组分 (cell component, CC) 6 条、分子功能 (molecular function, MF) 10 条，GO 分析分别取以上 3 个部分的显著前 10 条目录进行条形图展示，见图 4-A。结果显示，重要靶点主要分布于细胞表面、细胞胞外区、受体复合物和大分子复合物等区域，主要参与调控炎症反应、细胞对脂多糖的反应、IL-8 的表达、血压和衰老等等生物进程。对 41 个潜在靶点进行 KEGG 信号通路富集，以 $P < 0.01$ 为标准共获得 37 条显著富集的信号通路，其中排名前 20 的通路见图 4-B，

3.1.3 PPI 网络的构建与分析 在 STRING 数据库中设置 high confidence 为 0.4，构建六神凝胶治疗痤疮靶点的 PPI 网络。此网络共包含 40 个节点，301 条边，所有节点平均度值为 14.7，平均局部聚类系数为 0.715， $P < 1.0 \times 10^{-16}$ ，表明该组相互作用靶点与随机相似靶点组合对比具有显著差异。筛选度值 $>$ 平均度值的靶点作为重要靶点，获得 20 个重要靶点 (图 3)，其中排名前 5 的靶点分别为 TNF、IL-1B、瘦素 (leptin, LEP)、TLR4 和 CXCL8)，推测以上重要靶点可能在六神凝胶治疗痤疮中发挥关键作用。

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 应用 DAVID 平台对六神凝胶治疗痤疮的 41 个潜在靶点进行 GO 功能富集分析，以 $P < 0.01$ 为标准，筛选

结果显示 IL-17 信号通路、TLR 信号通路、核苷酸结合寡聚化结构域样受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、NF-κB 信号通路富集程度高，包含靶点较多，可能在六神凝胶治疗痤疮中起关键作用。

3.2 动物实验

3.2.1 六神凝胶对痤疮模型大鼠耳部外观和病理变化的影响 如图 5-A 所示，对照组大鼠耳廓组织柔软，表面整体光滑，呈淡粉色，毛细血管清晰可见，未见肿胀、脱屑，无粉刺、结节、丘疹等炎症症状。模型组大鼠耳部颜色变为暗红色，皮肤表面

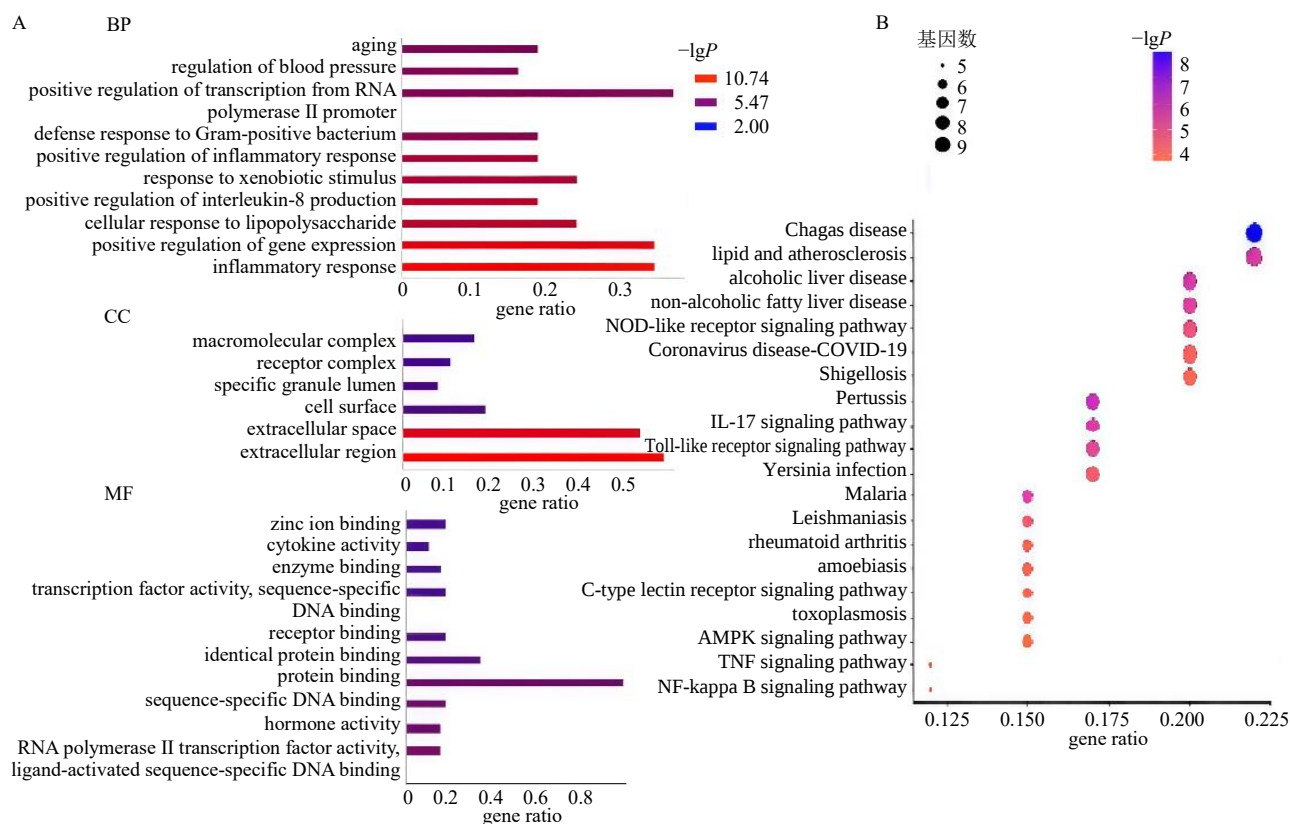


图 4 六神凝胶治疗痤疮靶点的 GO 功能 (A) 及 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of targets of Liushen Gel in treatment of acne

出现粗糙、肿胀和明显脱屑的现象，伴随隆起的丘疹和囊肿，表明大鼠耳廓痤疮模型成功建立。经维 A 酸乳膏或六神凝胶治疗 7 d 后均能明显改善大鼠耳廓组织红肿，减轻毛细血管扩张，减少耳部组织皮肤、丘疹以及皮损程度，且六神凝胶减少皮肤的效果优于维 A 酸乳膏，提示六神凝胶具有一定的保湿和护肤功效。

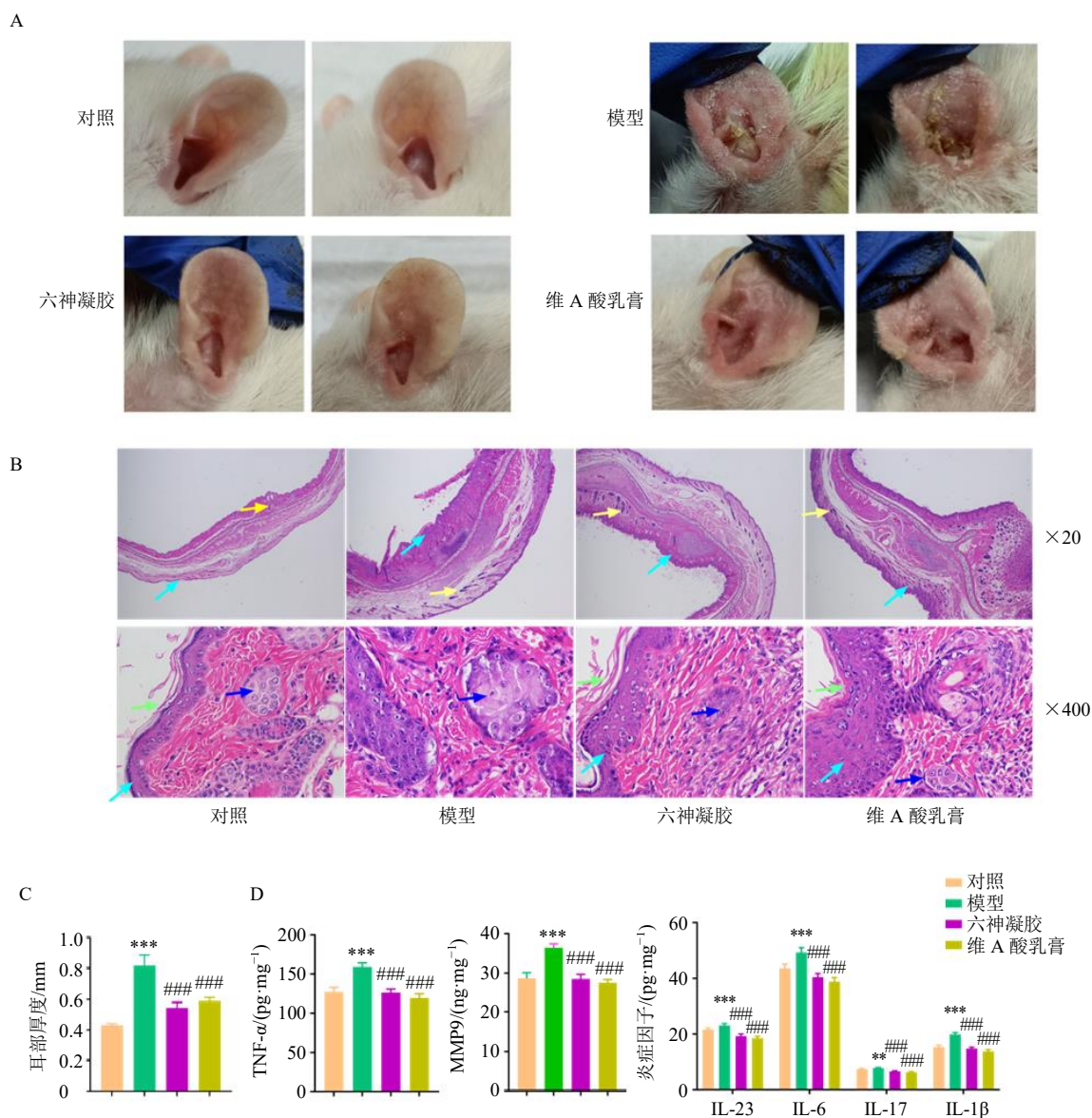
耳部组织 HE 染色结果见图 5-B，对照组大鼠耳廓表皮层和真皮层均较薄，厚度均一，能清晰观察到表皮、真皮以及皮下组织之间的边界，皮脂腺体积正常大小，没有明显的炎症浸润现象。模型组大鼠耳部皮肤表皮层明显增厚，伴随角化过度、毛囊增生、角栓堵塞、皮脂腺增大等病理变化，同时因角化物质积聚过多，毛细血管明显扩张，严重充血，毛囊漏斗部呈壶状，真皮层可见淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等大量炎性细胞浸润。维 A 酸乳膏或六神凝胶治疗后能明显改善大鼠耳部痤疮组织的毛囊增生，减少皮脂腺增大，减轻角质化程度，且真皮层中浸润的炎性细胞数量较模型组明显减少，且六神凝胶组治疗效果更明显，表明六神凝胶能明显减轻痤疮组织的炎症，改善痤疮皮

肤状态。

如图 5-C 所示，与对照组比较，模型组大鼠耳部厚度明显增加 ($P < 0.001$)，大鼠耳肿胀严重；与模型组比较，六神凝胶组和维 A 酸乳膏组大鼠耳部厚度显著降低 ($P < 0.001$)，表明六神凝胶对痤疮丙酸杆菌联合油酸诱导的大鼠耳痤疮模型具有良好的治疗作用。

3.2.2 六神凝胶对痤疮模型大鼠耳部组织炎症因子水平的影响 参考网络药理学分析结果，对大鼠耳组织匀浆中炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MMP9、IL-17、IL-23) 水平进行检测，结果见图 5-D，与对照组比较，模型组大鼠耳组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MMP9、IL-17 和 IL-23 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与模型组比较，六神凝胶组和维 A 酸乳膏组耳组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MMP9、IL-17 和 IL-23 水平均显著降低 ($P < 0.001$)，表明六神凝胶能明显抑制痤疮模型大鼠局部痤疮组织的炎症反应。

3.2.3 六神凝胶对痤疮模型大鼠耳部组织 TLR2、p38 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达的影响 如图 6-A 所示，与对照组比较，模型组大鼠耳部组织中 TLR2、



B 图中青绿色箭头表示角质层, 淡蓝色箭头表示表皮, 深蓝色箭头表示皮脂腺, 黄色箭头表示毛囊; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 图 6 同。

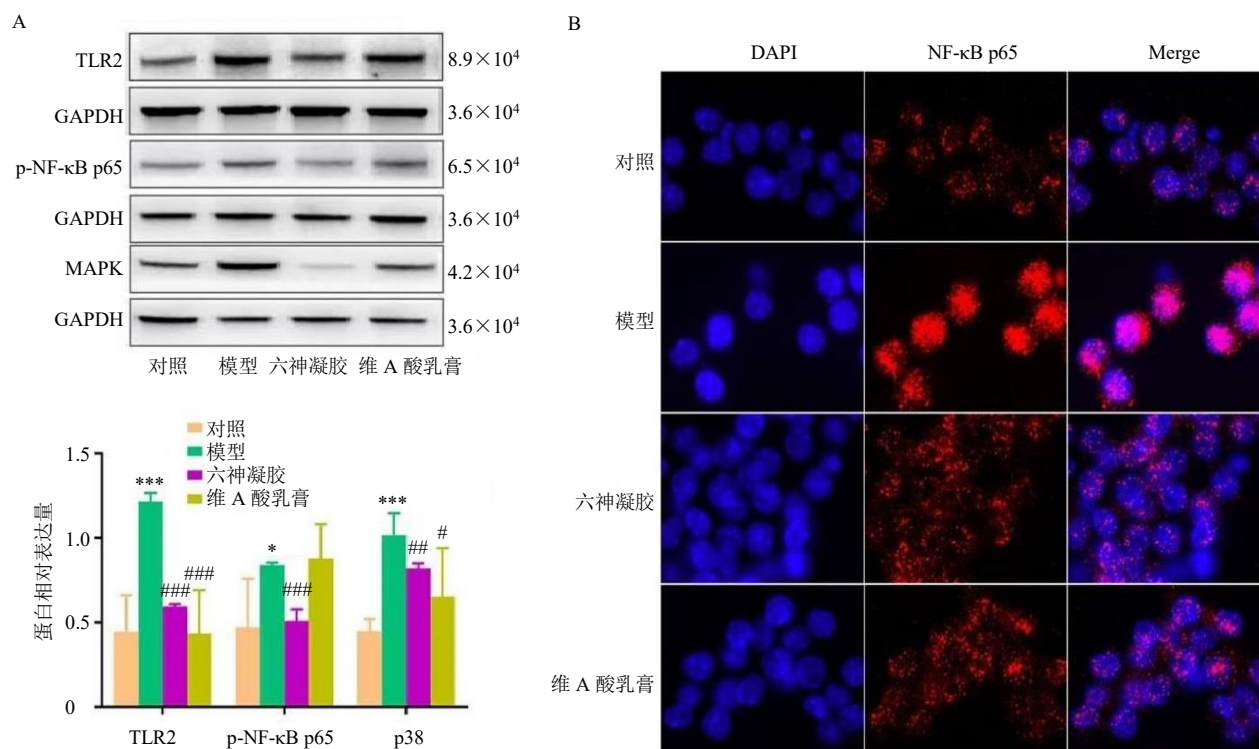
In figure B, turquoise arrow represents stratum corneum, light blue arrow represents epidermis, dark blue arrow represents sebaceous glands, and yellow arrow indicates hair follicles; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as Fig. 6.

图 5 六神凝胶对痤疮模型大鼠耳部外观 (A)、耳部组织病理变化 (B)、耳部厚度 (C) 和耳组织炎症因子水平 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effects of Liushen Gel on ear appearance (A), histopathological changes (B), ear thickness (C) and levels of inflammatory factors in ear tissue (D) of acne model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

p-NF-κB p65 和 p38 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.001$); 与模型组比较, 六神凝胶组大鼠耳部组织 TLR2、p-NF-κB p65 和 p38 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$), 维 A 酸乳膏组 TLR2 和 p38 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.001$)。如图 6-B 所示, 对照组 NF-κB p65 蛋白的表达量较少, 主

要集中在胞质中; 模型组 NF-κB p65 的表达量明显增加, 且部分向核内移位; 与模型组比较, 六神凝胶组和维 A 酸乳膏组 NF-κB p65 蛋白的表达量减少, 且均明显抑制了 NF-κB p65 核移位, 表明六神凝胶可通过调控 TLR 信号通路、NF-κB 信号通路治疗痤疮, 与网络药理学预测结果一致。



A-Western blotting 检测各组大鼠耳部组织 TLR2、p-NF-κB p65 和 p38 蛋白表达; B-免疫荧光检测各组大鼠耳部组织 NF-κB p65 表达 (×400)。
A-expressions of TLR2, p-NF-κB p65 and p38 proteins in ear tissues of rats in each group detected by Western blotting; B-NF-κB p65 expression in ear tissues of rats in each group detected by immunofluorescence (×400).

图 6 六神凝胶对痤疮模型大鼠耳部组织 TLR2/p38/NF-κB 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of Liushen Gel on TLR2/p38/NF-κB signaling pathway in ear tissues of acne model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

痤疮是一种慢性皮肤病,引起痤疮的因素众多,包括激素、皮脂、细菌、压力、饮食等,其中系统免疫反应和炎症病变被认为是核心因素^[3-4]。目前临床上治疗痤疮主要应用类固醇和抗生素,长期使用可能会引起不良反应^[18],因此,中药在治疗痤疮方面具有巨大潜力。六神丸/凝胶是著名的中成药,由人工麝香、蟾酥、雄黄等传统中药材组成。六神丸是一种传统的口服制剂,临床应用已有 250 多年的历史,用于治疗口腔疾病、呼吸系统感染、皮肤病和肿瘤^[19-21],在治疗痤疮方面亦有显著成效,六神凝胶处方同六神丸,是专门针对皮肤疾病而研制的外用制剂,可直接作用于患部皮肤,不仅抗炎抗感染效果好,还具有镇痛止痒功效,此外也能降低由于药物服用所产生的心脏、肝脏和肾脏毒性等^[22-27]。

本研究中网络药理学结果显示,六神凝胶活性成分 27 个,与痤疮的交集靶点 41 个,治疗痤疮的主要成分为麝香酮、胆固醇、菜油甾醇、胆酸和吗

啡等。文献报道显示,麝香酮是麝香中最重要的具有生理活性的组分,能够调节炎症,含有麝香酮成分的疮愈涂剂能够有效促进皮肤慢性创面愈合^[28];胆固醇与植物甾醇化学结构相似,植物甾醇(酯)具有抑制皮肤炎症、修复皮肤屏障、减缓皮肤瘙痒、抗敏修复等作用^[29]。将预测得到六神凝胶治疗痤疮的关键靶点进行 PPI 网络分析以及 KEGG 通路富集分析,结果表明 TNF、IL-1β、LEP、TLR4 以及 CXCL8 等靶点可能是六神凝胶治疗痤疮的关键靶点,而 IL-17 信号通路、TLR 信号通路、NOD 样受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路、NF-κB 信号通路可能是六神凝胶治疗痤疮调控的主要信号通路。

在痤疮炎症的发生发展过程中, TNF-α 是介导炎症反应和先天免疫的关键促炎细胞因子,IL-1β 被认为是促炎细胞因子产生的诱导剂^[30]; IL-6 参与中性粒细胞的募集^[31]; IL-17 在炎症部位聚集并激活单核细胞、中性粒细胞,增加细胞通透性,诱发炎症反应^[32]; IL-23 是由激活的树突状细胞、巨噬细

胞和单核细胞分泌的促炎细胞因子,诱导 Th17 细胞分化产生 IL-6、IL-17,从而引起炎症因子的级联反应^[33];MMP9 是一种锌依赖性内肽酶,存在于细胞外基质中,在促炎性细胞因子(如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)的刺激下表达增加,MMP9 的高表达可加速皮肤胶原纤维的降解,同时参与炎症的发展,促进瘢痕生成^[34-35]。结合网络药理学分析结果以及文献报道,对大鼠耳部痤疮组织中炎症因子进行检测,结果显示六神凝胶能明显降低大鼠耳部局部痤疮组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MMP9、IL-17 和 IL-23 水平,抑制痤疮组织的局部炎症细胞浸润,减轻痤疮区域的肿胀和毛细血管通透性,从而治疗痤疮,该结果与网络药理学分析结果以及病理结果一致。

为了验证网络药理学通路筛选的准确性并确定六神凝胶治疗痤疮的作用机制,进一步检测了大鼠耳部痤疮组织中 TLR2、p38 MAPK 和 p-NF- κ B p65 蛋白的表达。TLR 既是细胞内受体,也是细胞外受体,参与 MARK 和 NF- κ B 信号通路的激活,MAPK 信号通路炎症介质的合成密切相关^[36],NF- κ B 通路激活导致促炎细胞因子的表达^[37]。当 TLR2 上调时,下游的 MAPK 和 NF- κ B 信号通路被激活,释放促炎细胞因子和趋化因子包括 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等。本研究结果显示,痤疮大鼠涂抹六神凝胶干预 7 d 后,能明显降低痤疮病变组织中 TLR2、p38 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达,表明六神凝胶可能通过调控 TLR 信号通路、MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路发挥治疗痤疮的作用。

综上,本研究通过网络药理学初步筛选出六神凝胶治疗痤疮的主要活性成分、作用靶点及关键信号通路,并基于改良的复合型大鼠痤疮模型,进一步验证了六神凝胶的药效作用及其作用机制。六神凝胶可能通过调控 TLR、MAPK、NF- κ B 等信号通路,抑制痤疮组织中炎症因子的分泌,从而减轻局部炎症反应。然而,六神凝胶关键活性成分与作用靶点之间的直接相互作用机制尚未完全阐明,作用机制链条的完整性仍需进一步验证。未来研究可重点围绕基础药效学与作用机制进行深入探索,同时通过开展临床随机对照试验获取更多循证医学证据,为动物实验到人体应用的转化研究积累更多科学依据,为六神凝胶的临床应用提供理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 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.

[2] 张静娴,王丽丽,汪国鑫,等.金花消痤丸联合异维 A 酸治疗重度痤疮的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(10): 2601-2605.

[3] Fang F, Xie Z P, Quan J Y, *et al.* Baicalin suppresses *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation by downregulating the NF- κ B/MAPK signaling pathway and inhibiting activation of NLRP3 inflammasome [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(12): e9949.

[4] Guo M M, An F L, Wei X, *et al.* Comparative effects of schisandrin A, B, and C on acne-related inflammation [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 2163-2172.

[5] Nguyen C T, Sah S K, Zouboulis C C, *et al.* Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4024.

[6] 刘婧,朱鹏,郑婷,等.黄芩素对痤疮模型大鼠局部组织 IL-4、MMP-9 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(10): 1572-1574.

[7] 李炳男,郭斐斐,刘婧,等.三黄凝胶对耳郭痤疮模型大鼠血清 IL-17、IL-23 水平的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(27): 2991-2995.

[8] Wei W L, An Y L, Zhang Y Z, *et al.* Quantitative analysis of fourteen bufadienolides in *Venenum Bufonis* crude drug and its Chinese patent medicines by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112490.

[9] 祝英,朱胜娟.寻常型痤疮采用六神凝胶联合维 A 酸乳膏治疗的临床疗效 [J]. *内蒙古中医药*, 2023, 42(8): 128-130.

[10] 王丹,王彩梅.六神丸治疗寻常型痤疮的临床效果观察 [J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2020, 19(5): 428-430.

[11] 李思颖,李佳川,宋琴,等.基于“关键成分-潜在靶点-核心通路”交互网络的酒蒸黄连生物碱-石菖蒲挥发油配伍防治糖尿病认知功能障碍机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(19): 5910-5921.

[12] 李若男,陈喜,赵李娜,等.基于网络药理学吴茱萸治疗结直肠癌作用机制探讨及实验验证 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(1): 38-45.

[13] 朱晓云,巴元明.基于网络药理学探讨柴胡疏肝散治疗慢性前列腺炎的作用机制 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18(9): 30-34.

[14] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein

- association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [15] 宋辉, 黄晓俏, 孙向明, 等. 基于网络药理学、分子对接和动物实验探讨菟丝子醇提物抗乳腺癌作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(14): 4747-4758.
- [16] 芦殿香, 张虹波, 梁焯森, 等. 基于转录组学和网络药理学探讨肉豆蔻挥发油干预低氧性肺动脉高压的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3375-3387.
- [17] 张睿, 吕美豫, 张建军, 等. 痤疮动物模型建立及评价研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 398-405.
- [18] Shah S A, Ormerod A D. Dermatitis herpetiformis effectively treated with heparin, tetracycline and nicotinamide [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2000, 25(3): 204-205.
- [19] 陈乐, 王东. 六神丸联合庆大霉素治疗口腔溃疡的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2669-2672.
- [20] Ma Q H, Chen R H, Zeng J, *et al*. Investigating the effects of Liushen Capsules on the metabolome of seasonal influenza: A randomized clinical trial [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 968182.
- [21] 黄云娜. 六神丸合剂联合高氧液治疗晚期肿瘤患者压疮的效果评价 [J]. 中国实用护理杂志, 2011, 27(23): 10-12.
- [22] 孙建辉, 霍海如, 李小芹, 等. 六神丸对非感染性、感染性炎症动物模型抗炎作用研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(10): 60-65.
- [23] Ma Q H, Huang W B, Zhao J, *et al*. Liu Shen Wan inhibits influenza a virus and excessive virus-induced inflammatory response via suppression of TLR4/NF- κ B signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 252: 112584.
- [24] Zhang H, Jiang J, Chen X, *et al*. Liushen Pills inhibit inflammation and growth of esophageal cancer by promoting the inflammatory cell infiltration [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2020, 13(2): 604-610.
- [25] 张慧, 黄立中, 田莎, 等. 构建食管癌移植瘤模型及不同剂量六神丸干预后的微血管密度变化 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(5): 766-771.
- [26] 李娟, 狄留庆, 李俊松, 等. HPLC-MS 法同时测定六神丸中 9 种蟾蜍二烯内酯类化合物 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 700-705.
- [27] 张庆丽, 吴倩, 谢媛媛, 等. 六神丸和雄黄中砷的组织分布研究 [J]. 药学学报, 2011, 46(6): 701-706.
- [28] 何秀娟. 疡愈涂剂对愈合迟缓性皮肤伤口的愈合作用及局部免疫调节机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2004.
- [29] 王小康, 陈文, 张太军, 等. 植物甾醇(酯)的研究与应用前景 [J]. 日用化学工业: 中英文, 2023, 53(4): 445-452.
- [30] Tsai T H, Huang W C, Lien T J, *et al*. Clove extract and eugenol suppress inflammatory responses elicited by *Propionibacterium acnes* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Agric Immunol*, 2017, 28(5): 916-931.
- [31] Trivedi N R, Gilliland K L, Zhao W, *et al*. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(5): 1071-1079.
- [32] Xu C H, Hao K K, Yu L K, *et al*. Serum interleukin-17 as a diagnostic and prognostic marker for non-small cell lung cancer [J]. *Biomarkers*, 2014, 19(4): 287-290.
- [33] Hunter C A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(7): 521-531.
- [34] 余贺玲, 柏冰雪. 基质金属蛋白酶在痤疮发病机制中的作用 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2015, 31(12): 726-729.
- [35] You Y, Zhang J F, Li Y L, *et al*. CADM1/TSLC1 inhibits melanoma cell line A375 invasion through the suppression of matrix metalloproteinases [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2621-2626.
- [36] Arumugam S, Thandavarayan R A, Veeraveedu P T, *et al*. Involvement of AMPK and MAPK signaling during the progression of experimental autoimmune myocarditis in rats and its blockade using a novel antioxidant [J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(2): 183-189.
- [37] Kumar A, Takada Y, Boriek A M, *et al*. Nuclear factor-kappaB: Its role in health and disease [J]. *J Mol Med*, 2004, 82(7): 434-448.

[责任编辑 李亚楠]