

• 药理与临床 •

基于深度学习和转录组学探讨 11-羧基- β -乙酰乳香酸治疗变应性接触性皮炎的作用机制余佳玥¹, 和金凤^{1,3}, 谭艳颖¹, 韩学斌¹, 熊 慧^{1*}, 梅之南²

1. 中南民族大学药学院, 湖北 武汉 430074

2. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070

3. 赣南医科大学赣南创新与转化医学研究院, 重大疾病新药靶发现及新药创制全国重点实验室, 江西 赣州 341000

摘要: 目的 探究 11-羧基- β -乙酰乳香酸 (acetyl-11-keto- β -boswellic acid, AKBA) 对小鼠变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 的治疗作用。方法 通过人工智能模型药物深度双线性注意力网络 (drug deep bilinear attention network, DrugBAN) 预测 AKBA 对 ACD 的治疗作用和潜在效应分子; 利用方酸二丁酯建立小鼠 ACD 模型, 评估 AKBA 的治疗效果, 连续 3 d 给予 AKBA 治疗, 记录小鼠挠痒次数、皮肤病变程度; 通过苏木素-伊红染色和甲苯胺蓝染色观察小鼠颈部皮肤病理变化; 应用转录组测序和分析, 获取小鼠颈部皮肤差异表达基因; 利用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 AKBA 对小鼠颈部皮肤组织中主要差异基因的表达水平及相关通路关键蛋白的调控作用。结果 DrugBAN 预测 AKBA 可作用于肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1), 并干预 Janus 激酶-信号传导及转录激活因子 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)、趋化因子等信号通路治疗 ACD。动物实验发现, AKBA 显著降低 ACD 小鼠抓挠频率、改善颈部皮肤损伤 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 转录组学分析共得到 169 个共同差异基因, 主要富集到丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路。Western blotting 验证结果显示 AKBA 能显著降低 ACD 小鼠颈部皮肤组织中 TNFR1、磷酸化 p38 MAPK、磷酸化细胞外信号调节激酶、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶和磷酸化 STAT3 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。qRT-PCR 验证结果显示, AKBA 显著下调 ACD 小鼠皮肤组织 *TNF- α* 、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、*IL-17*、CXC 基序趋化因子配体 2 (C-X-C motif chemokine ligand 2, *CXCL2*)、C-C 基序趋化因子配体 3 (C-C motif chemokine ligand 3, *CCL3*)、*CCL28* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 AKBA 通过下调多种炎症因子表达, 调控 TNFR/MAPK 和 JAK-STAT 信号通路发挥对 ACD 小鼠的治疗作用。

关键词: 11-羧基- β -乙酰乳香酸; 变应性接触性皮炎; 转录组学; 肿瘤坏死因子受体 1; 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4270-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.011

Mechanism of acetyl-11-keto- β -boswellic acid in treatment of allergic contact dermatitis based on deep learning and transcriptomicsYU Jiayue¹, HE Jinfeng^{1,3}, TAN Yanying¹, HAN Xuebin¹, XIONG Hui¹, MEI Zhinan²

1. School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China

2. College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

3. Gannan Institute of Innovation and Translational Medicine, State Key Laboratory of New Targets and Drug Development for Major Diseases, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) on allergic contact dermatitis (ACD) in mice. **Methods** Drug deep bilinear attention network (DrugBAN) artificial intelligence model was used to predict the

收稿日期: 2024-12-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82474188); 湖北省自然科学基金面上项目 (2023AFB755); 重大疾病新药靶发现及新药创制全国重点实验室开放课题 (SKLD2024M05)

作者简介: 余佳玥, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药的药效物质基础与作用机制。E-mail: yujiayue1007@163.com

*通信作者: 熊 慧, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: xionghui0311020@163.com

characteristics of AKBA for ACD treatment. A mouse ACD model was established using squaric acid dibutylester to evaluate the effect of AKBA on ACD. AKBA was given on ACD mice for 3 d. The number of scratching times of mice was recorded, and the degree of skin lesions was evaluated. The pathological changes in mouse neck skin were observed by hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining. The differentially expressed genes in mouse neck skin were obtained by transcriptome sequencing and analysis. Furthermore, the expression levels of main differentially expressed genes and the regulation of key proteins of related pathways by AKBA were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** DrugBAN analysis predicted that AKBA acted on effector molecules such as tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) and interfered with Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway and chemokine signaling pathways to treat ACD. The animal experiments showed that AKBA could significantly reduce scratching bouts and improved neck skin damage in ACD mice ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001). A total of 169 common differentially expressed genes were obtained from transcriptomics analysis, which were mainly enriched to mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. According to the results of Western blotting, AKBA significantly inhibited the expressions of TNFR1, phospho-p38 MAPK, phospho-extracellular regulated kinase 1/2, phospho-c-Jun N-terminal kinase and phospho-STAT3 in skin tissues of ACD mice ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). The results of qRT-PCR also exhibited that AKBA significantly down-regulated the expression levels of *TNF- α* , interleukin-1 β (*IL-1 β*), *IL-17*, CXC chemokine ligand 2 (*CXCL2*), C-C motif chemokine ligand 3 (*CCL3*), and *CCL28* in skin tissues of ACD mice ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** AKBA could exert a treatment effect in ACD mice by declining the expressions of various pro-inflammatory cytokines and modulating TNFR/MAPK and JAK-STAT signaling pathways.

Key words: acetyl-11-keto- β -boswellic acid; allergic contact dermatitis; transcriptomics; tumor necrosis factor receptor 1; mitogen-activated protein kinase

变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 常由皮肤接触半抗原引发, 是一种由 T 细胞介导的延迟型超敏反应疾病^[1]。ACD 的特征表现为接触过敏原的皮肤区域出现红斑, 并伴随强烈瘙痒、水肿, 可破坏皮肤屏障引起免疫紊乱, 该症状还可能扩展至邻近非接触部位^[2]。ACD 相关的危险因素包括职业暴露、年龄和性别, 日常生活中接触过敏原如镍、铬、钴等金属、防腐剂、染发剂、丙烯酸酯、环氧树脂等都有可能诱发 ACD, 且 ACD 的发病率现呈逐年上升趋势, 影响了全球 15%~20% 的人群, 其中 5%~10% 的人每年至少出现 1 次临床症状^[3]。ACD 患者常因其无法控制的抓挠行为而导致皮肤和深层组织的损伤, 严重影响患者身心健康及生活质量^[4]。目前临床上治疗药物主要包括抗组胺类药物、皮质类固醇和钙调磷酸酶抑制剂等, 但这些药物存在疗效有限、不良反应较多等局限性^[5]。

乳香为橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 及同属植物 *B. bhaw-dajiana* Birdw. 树皮渗出的树脂, 具有活血定痛、消肿生肌的功效, 可用于风湿痹痛、跌打损伤、痈肿疮疡等^[6]。11-羧基- β -乙酰乳香酸 (acetyl-11-keto- β -boswellic acid, AKBA) 是乳香主要有效成分之一, 具有良好的抗炎、抗肿瘤、抗溃疡和改善记忆等作用^[7-8]。研究发现 AKBA 对光敏性皮炎具有较好的治疗效果^[9]。此外, AKBA 能抑制银屑病小鼠皮肤中树突状细胞成熟, 通过阻断 Toll 样受体 7/8 和干扰素调节因子信号通路的激

活降低炎症因子表达来治疗银屑病^[10]。其修饰后的化合物赛克乳香酸可直接作用于乙酰辅酶 A 羧化酶 1 进而抑制辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 介导的炎症反应, 降低银屑病小鼠皮肤中炎症因子白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 蛋白的表达, 发挥治疗效果^[11], 还可通过调控细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated kinase, ERK) 信号通路抑制肥大细胞活化缓解特应性皮炎的症状^[12]。目前 AKBA 在治疗特应性皮炎、银屑病等皮肤病方面展现了良好的疗效, 然而其对 ACD 的治疗作用尚缺乏系统性研究。本研究采用方酸二丁酯 (squaric acid dibutylester, SADBE) 建立小鼠 ACD 模型^[13], 通过人工智能模型预测联合转录组学进行分析, 探究 AKBA 对 ACD 小鼠的治疗效果。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 7 周龄, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。动物饲养于中南民族大学动物实验中心, 温度 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 12 h 光暗交替体系, 自由进食饮水。动物实验经中南民族大学科研伦理科技安全委员会批准 (批准号 2024-scuec-013)。

1.2 药品与试剂

SADBE (批号 1003470919) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; RNAiso Plus (批号 AN93027A) 购自日本 TaKaRa 公司; RNA Keeper Tissue Stabilizer (批号

7E740G3)、ChamQ Universal SYBR qPCR MasterMix (批号 7E0813G4) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 反转录试剂盒 (批号 P1279588) 购自美国 Thermo 公司; β -微管蛋白 (β -tubulin) 抗体 (批号 10004491)、 β -actin 抗体 (批号 10024215) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 抗体 (批号 9)、p-p38 MAPK 抗体 (批号 13)、ERK1/2 抗体 (批号 28)、p-ERK1/2 抗体 (批号 21)、应激活化蛋白激酶/c-Jun 氨基末端激酶 (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK) 抗体 (批号 17)、p-SAPK/JNK 抗体 (批号 17)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体 (批号 17)、p-STAT3 抗体 (批号 43) 购自美国 CST 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 2610812) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 抗体 (批号 5500033866) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 氢化可的松软膏 (批号 22101005) 购自天津金耀药业有限公司; AKBA (批号 AFBJ1101, 质量分数为 98%) 购自成都埃法生物科技有限公司, 分别取 3.75、7.50、15.00 mg AKBA, 加入 0.5 mL 丙二醇, 超声至溶解, 现用现配, 每只小鼠每次涂抹 50 μ L 含 AKBA 的丙二醇溶液于颈部。

1.3 仪器

ML31 型生物显微镜 (广州明美光电技术有限公司); Multiskan GO 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5200Multi 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 基于人工智能的靶点预测

从 GEO 数据库获取 ACD 患者的疾病和正常皮肤组织的转录组测序数据, 根据人工智能模型端到端双线性注意力深度学习框架 (drug deep bilinear attention network, DrugBAN) 探寻药物-靶点相互作用^[14], 预测 AKBA 分子靶标, 取两者的交集基因, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集注释、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。

2.2 动物造模、分组及给药

小鼠适应性饲养 1 周后, 剃除小鼠腹部和颈部

皮肤处约 2 cm² 毛发, 除对照组小鼠外, 第 0 天取 20 μ L 0.5% SADBE 丙酮溶液滴于小鼠腹部剃毛的部位, 连续刺激 3 d; 间隔 5 d 后, 于第 8 天将 20 μ L 0.5% SADBE 丙酮溶液滴在小鼠颈部剃毛的位置, 连续诱导 3 d。于第 11 天连续记录小鼠 1 h 内的挠痒次数, 将造模成功的小鼠随机分为模型组及 AKBA 低、中、高剂量 (15、30、60 mg/kg) 组和氢化可的松 (1.7 g/kg) 组, 每组 6 只。于第 12 天开始在小鼠颈部剃毛部位涂抹 50 μ L AKBA 溶液或氢化可的松, 对照组和模型组涂抹等体积的丙二醇, 连续给药 3 d。

2.3 小鼠挠痒情况及皮肤损伤评分

记录小鼠第 12~14 天抓挠情况, 给药 0.5 h 后将小鼠置于透明观察盒中, 录像记录小鼠 1 h 内的挠痒行为, 以小鼠抬起后爪抓挠颈部皮肤并放下计为 1 次^[15]。第 14 天录像后对小鼠颈部皮肤损伤情况评分, 根据皮肤的红斑、水肿、表皮剥落和苔藓化 4 项, 按无、轻度、中度、重度分别为 0、1、2、3 分依次评分, 4 项总和为皮肤损伤评分^[16]。

2.4 组织病理学染色

第 14 天, 用气体吸入麻醉法处理小鼠, 分离小鼠颈部皮肤组织, 经 4% 多聚甲醛中固定、梯度乙醇脱水后, 将样本石蜡包埋, 并进行苏木素-伊红 (HE) 染色和甲苯胺蓝染色。在显微镜下采集样本图片, 使用明美显微数码测量分析系统测量小鼠表皮厚度, 应用 Image J 软件记录肥大细胞数量。

2.5 转录组测序

取小鼠颈部皮肤组织存放于 RNA 保存液中, 提取 RNA 进行高通量转录组测序, 将得到的 clean data 与参考基因组进行比对。使用 DESeq2 对基因表达进行差异分析, 以 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) ≥ 1 且 $P < 0.05$ 为条件筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并进行 GO 和 KEGG 分析。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

取 20 mg 小鼠颈部皮肤组织, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 加入研磨珠研磨, 于冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 变性后的蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转至 PVDF 膜, 孵育一抗、二抗, 经成像系统检测蛋白的表达水平。

2.7 qRT-PCR 检测相关基因表达

取 20 mg 小鼠颈部皮肤组织, 加入 TRIzol 试

剂提取总 RNA, 通过反转录试剂盒合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 以 β -actin 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算促炎细胞/趋化因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、*IL-1 β* 、*IL-17*、CXC 基序

趋化因子配体 2 (CXC chemokine ligand 2, *CXCL2*)、C-C 基序趋化因子配体 3 (C-C motif chemokine ligand 3, *CCL3*)、*CCL28* 的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>IL-1β</i>	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG	CTGCCTGAAGCTCTTGTGTGATG
<i>TNF-α</i>	CAGAAAGCATGATCCGCGAC	GGAAGTCTCTCATCCCTTTGG
<i>CCL3</i>	CCAGCCAGGTGTCATTTTCCTG	GGAATGTTCCGGGGCTCAAG
<i>CXCL2</i>	CCCAGACAGAAAGTCATAGCCAC	TGGTCTTCCGTTGAGGGAC
<i>CCL28</i>	ATGAGAGCCTCAGAGGTAAAGA	TGTTCTGTGCTCTCTCGTAGTG
<i>IL-17</i>	ACCGCAATGAAGACCCTGATAG	AGCATCTTCTCGACCCTGAAAG
<i>β-actin</i>	GTACTCTGTGTGGATCGGTGG	AAACGCAGCTCAGTAACAGTCC

2.8 统计学分析

使用 Graph Pad Prism 软件进行统计分析和绘图, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析进行多组间数据样本比较, 多组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。

3 结果

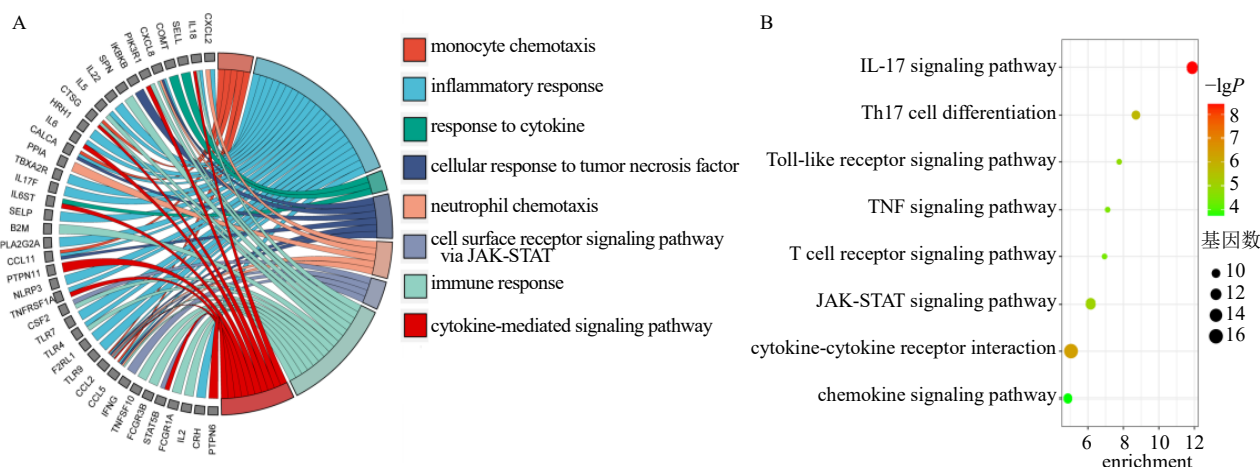
3.1 基于人工智能的 AKBA 药理作用预测

通过 DrugBAN 模型训练对 AKBA 进行分析, 预测到 AKBA 的潜在效应分子 97 个, 包括 *TNFR1*、*CXCL2*、*IL-17F* 等。将 97 个效应分子导入在线 DAVID 工具, 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 分析 (图 1-A) 发现 AKBA 治疗 ACD 的作用主要涉及炎症反应、免疫反应、细胞黏附等生物学功能等相关途径, KEGG 分析 (图 1-B) 主要富集到 *TNF* 信号通路、Janus 激酶-信号传导及转录激活因

子 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT) 信号通路、趋化因子信号通路和 *IL-17* 信号通路等, 这些通路可能成为 AKBA 调节 ACD 的途径。以上结果预示了 AKBA 治疗 ACD 的抗炎潜力。

3.2 AKBA 对 ACD 小鼠挠痒次数和颈部皮肤损伤的影响

如图 2-A、B 所示, 造模第 11 天, 与对照组比较, 造模组小鼠挠痒次数显著增加 ($P < 0.01$), 提示 ACD 小鼠造模成功。给予 AKBA 或氢化可的松治疗后, 小鼠挠痒次数较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且小鼠皮肤损伤得到改善。如图 2-C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的皮肤损伤评分显著升高 ($P < 0.001$), 给药后小鼠皮肤损伤评分均显著下降 ($P < 0.001$)。以上结果表明 AKBA 可以显著抑

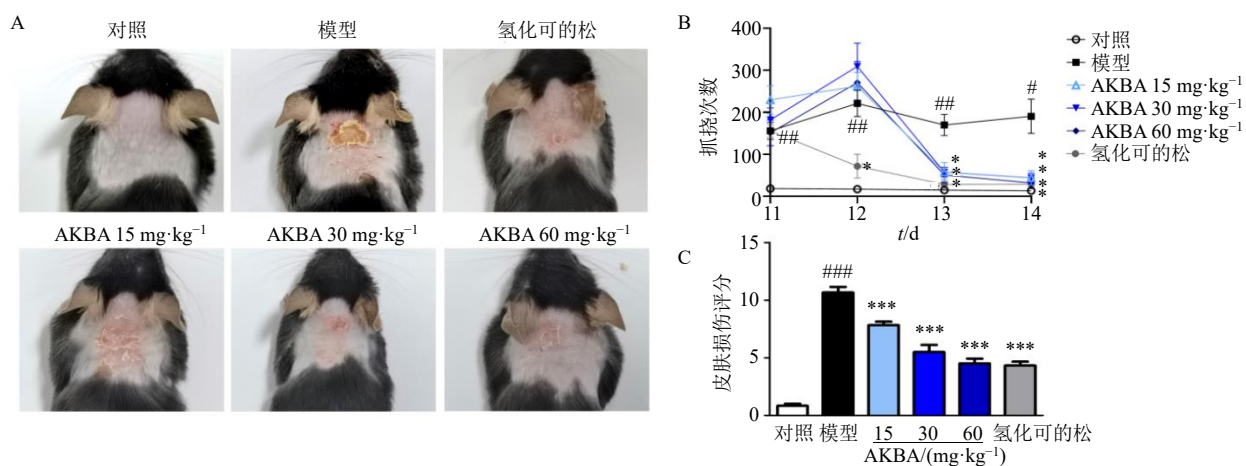


A-GO 分析弦图; B-KEGG 富集分析气泡图。

A-GO analysis string diagram; B-KEGG enrichment analysis bubble plot.

图 1 基于人工智能模型预测 AKBA 治疗 ACD 靶点的富集分析

Fig. 1 Enrichment analysis of AKBA treatment targets for ACD based on artificial intelligence model prediction



A-各组小鼠颈部损伤图片；B-小鼠抓挠次数统计；C-各组小鼠颈部皮肤损伤评分；与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ ，下图同。

A-images of neck injuries of mice in each group; B-statistics of scratch frequency in mice; C-neck skin injury score of mice in each group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 2 AKBA 缓解 ACD 小鼠皮肤损伤并抑制小鼠抓挠行为 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

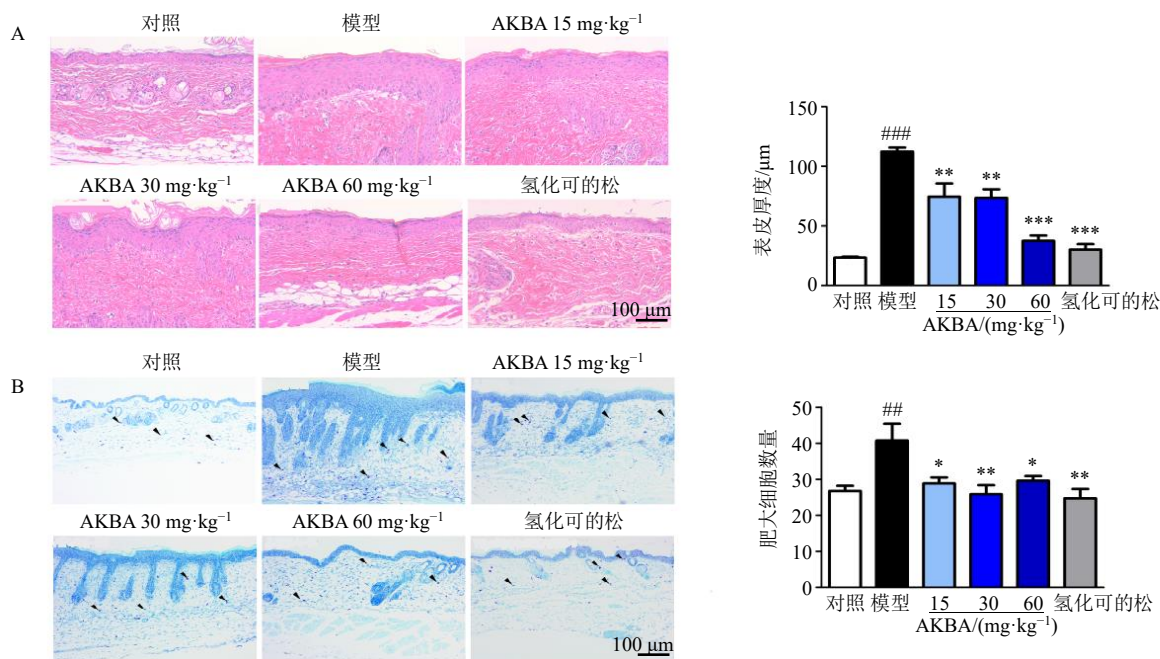
Fig. 2 AKBA alleviates skin injury and inhibits scratching behavior in ACD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

制 ACD 小鼠的搔痒行为，改善皮损症状。

3.3 AKBA 对 ACD 小鼠颈部皮肤组织病理变化的影响

HE 染色结果 (图 3-A) 显示，ACD 小鼠表皮过度增殖和增厚，AKBA 或氢化可的松治疗组小鼠皮肤表皮层厚度明显降低 ($P < 0.01, 0.001$)，且炎

性细胞浸润减少。此外，如图 3-B 所示，模型组肥大细胞数量显著增加 ($P < 0.01$)，AKBA 或氢化可的松治疗组肥大细胞数量相较于模型组显著减少 ($P < 0.05, 0.01$)。结果提示，AKBA 能减少 ACD 引起的表皮异常增生，抑制肥大细胞脱颗粒，改善 ACD 小鼠皮肤炎症。



A-小鼠颈部皮肤 HE 染色图片 ($\times 200$) 和表皮厚度统计；B-小鼠颈部皮肤甲苯胺蓝染色图片 ($\times 200$ ，箭头表示肥大细胞) 和肥大细胞数统计。
A-HE staining images ($\times 200$) and epidermal thickness statistics of mouse neck skin; B-methylamine blue staining images ($\times 200$, arrows represent mast cells) and mast cell count statistics of mouse neck skin.

图 3 AKBA 抑制 ACD 所致的表皮异常增生并减少炎症细胞的浸润 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 AKBA inhibits ACD-induced epidermal proliferation and reduces inflammatory cell infiltration ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 转录组分析

对原始测序数据进行滤过,得到 Clean Reads 比率均在 91%以上,样品的 Q_{20} 均高于 98%、 Q_{30} 均高于 96%,碱基 GC 含量在 51%左右,说明测序数据质量良好,可用于后续转录组学分析。

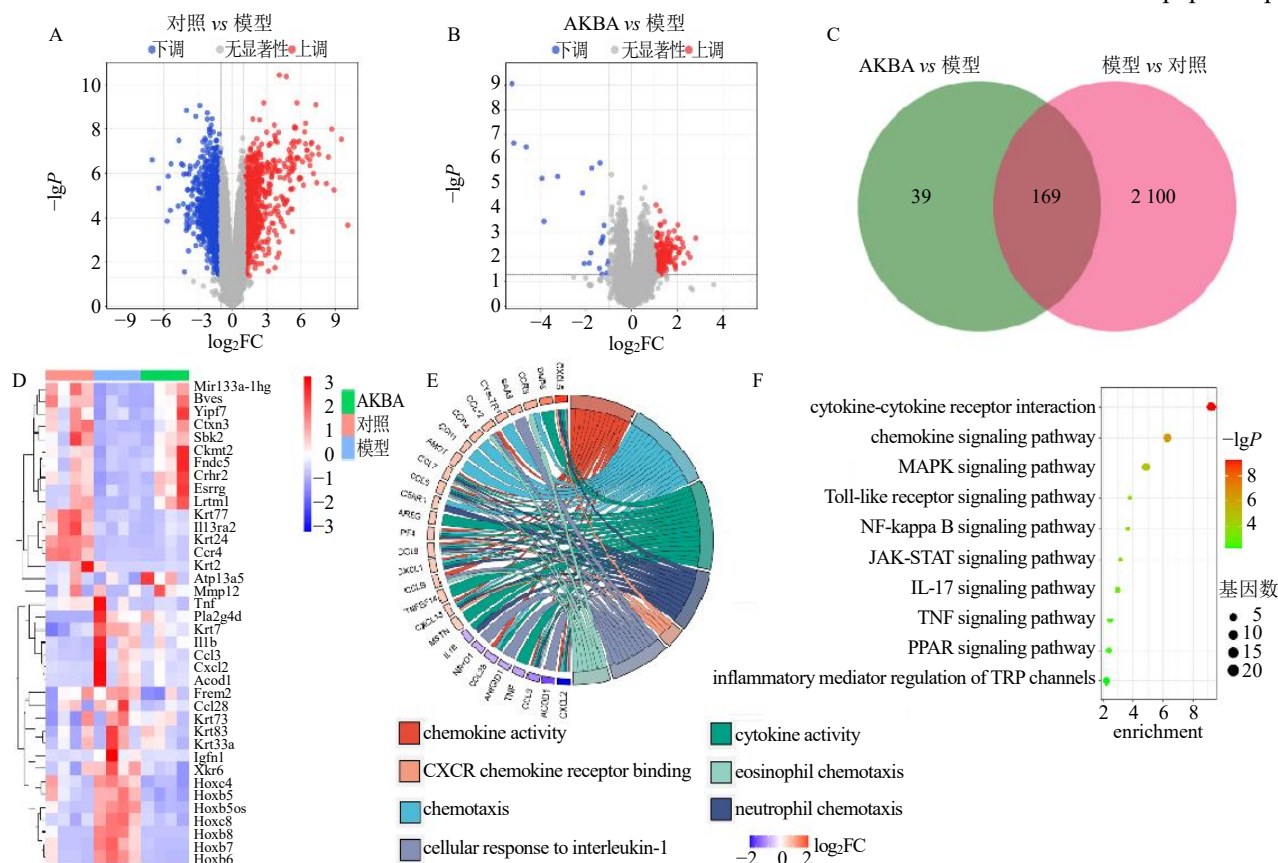
3.4.1 DEGs 分析 如图 4-A~C 所示,与对照组比较,模型组共筛选出 2 269 个 DEGs,其中下调基因 1 384 个,上调基因 885 个;与模型组比较,AKBA 组筛选出 208 个 DEGs,其中下调基因 21 个,上调基因 187 个;韦恩图结果所示,二者共有 169 个差异基因。依据上述筛选出的相重合的 DEGs,选取其中 39 个与 ACD 相关基因进行聚类分析,如图 4-D 所示,造模后与皮肤炎症相关的基因如 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*CXCL2*、*CCL3*、*CCL28* 等出现了上调的趋势,但在 AKBA 干预组呈现下调趋势。

3.4.2 GO 分析与 KEGG 分析 结果显示 GO 分析富集的功能通路与炎症反应密切相关,主要涉及趋

化因子活性、细胞因子活性、以及趋化因子受体结合等过程(图 4-E)。KEGG 富集分析显示 10 条相关通路,主要与炎症有关,包括细胞因子-细胞因子受体相互作用和细胞因子受体、MAPK 信号通路、TNF 信号通路、趋化因子信号通路等(图 4-F),这些途径在调控免疫细胞迁移和炎症信号传导中发挥关键作用。

3.5 AKBA 对 ACD 小鼠颈部皮肤 TNFR/MAPK 和 JAK-STAT 通路相关蛋白表达的影响

联合转录组学与人工智能预测分析,二者通过 KEGG 富集到了共同的信号通路如 JAK-STAT 信号通路和 TNF 信号通路等(图 5-A)。综合分析, TNFR/MAPK 和 JAK-STAT 信号通路可能是 AKBA 干预 ACD 的主要调控通路。应用 Western blotting 验证 AKBA 对 TNFR/MAPK 和 JAK-STAT 信号通路的调控作用。结果如图 5-B、C 所示,与对照组比较,模型组小鼠颈部皮肤 TNFR1、p-p38、p-

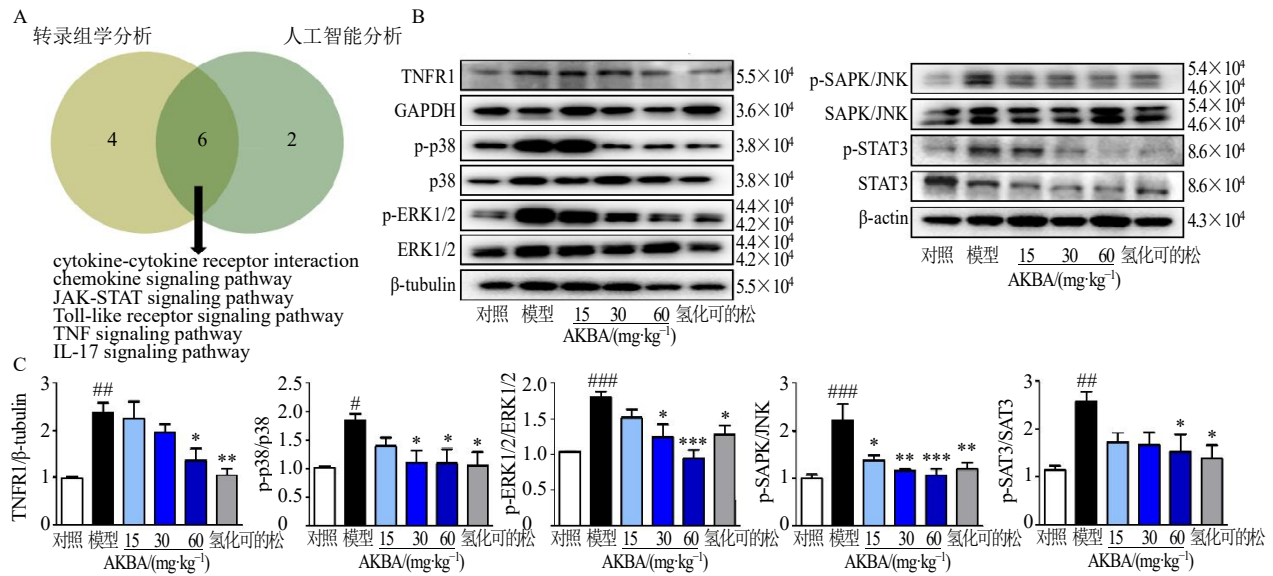


A-对照组和模型组 DEGs 的火山图; B-AKBA 组和模型组 DEGs 的火山图; C-交集韦恩图; D-AKBA 组和模型组 DEGs 热图; E-共同 DEGs 的 GO 分析弦图; F-共同 DEGs 的 KEGG 气泡图。

A-volcanic maps of DEGs in control group and model group; B-volcanic maps of DEGs in AKBA group and model group; C-intersection Venn diagram; D-DEGs heatmaps of AKBA group and model group; E-GO analysis string diagram of common DEGs; F-KEGG bubble chart of shared DEGs.

图 4 ACD 小鼠颈部皮肤的转录组学分析

Fig. 4 Transcriptomic analysis of neck skin of ACD mice



A-转录组学与人工智能分析的共同信号通路；B、C-各组小鼠颈部皮肤中 TNFR1、p-p38、p-ERK1/2、p-SAPK/JNK、p-STAT3 蛋白的表达量。
A-common signaling pathway between transcriptomics and artificial intelligence analysis; B, C-expression levels of TNFR1, p-p38, p-ERK1/2, p-SAPK/JNK and p-STAT3 proteins in neck skin of each group of mice.

图 5 AKBA 通过 TNFR/MAPK 和 JAK-STAT 信号通路调节 ACD 所致的炎症反应 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 AKBA regulates ACD-induced inflammatory responses through TNFR/MAPK and JAK-STAT signaling pathways ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

ERK1/2、p-SAPK/JNK、p-STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；给予高剂量 AKBA 干预后，上述蛋白表达均出现了显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.001)。结果表明 AKBA 能调控 TNFR/MAPK 和 JAK-STAT3 信号通路改善 ACD 小鼠的炎症反应。

3.6 AKBA 对 ACD 小鼠颈部皮肤中炎症相关因子基因表达的影响

利用 qRT-PCR 对人工智能与转录组学联合分

析所获取的主要差异分子进行验证，如图 6 所示，与对照组比较，模型组小鼠颈部皮肤中与炎症相关的细胞因子 *IL-1β*、*IL-17*、*TNF-α* 以及趋化因子 *CXCL2*、*CCL3*、*CCL28* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；除 AKBA 低剂量组 *IL-17* mRNA 表达无统计学差异外，AKBA 干预后以上细胞/趋化因子 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

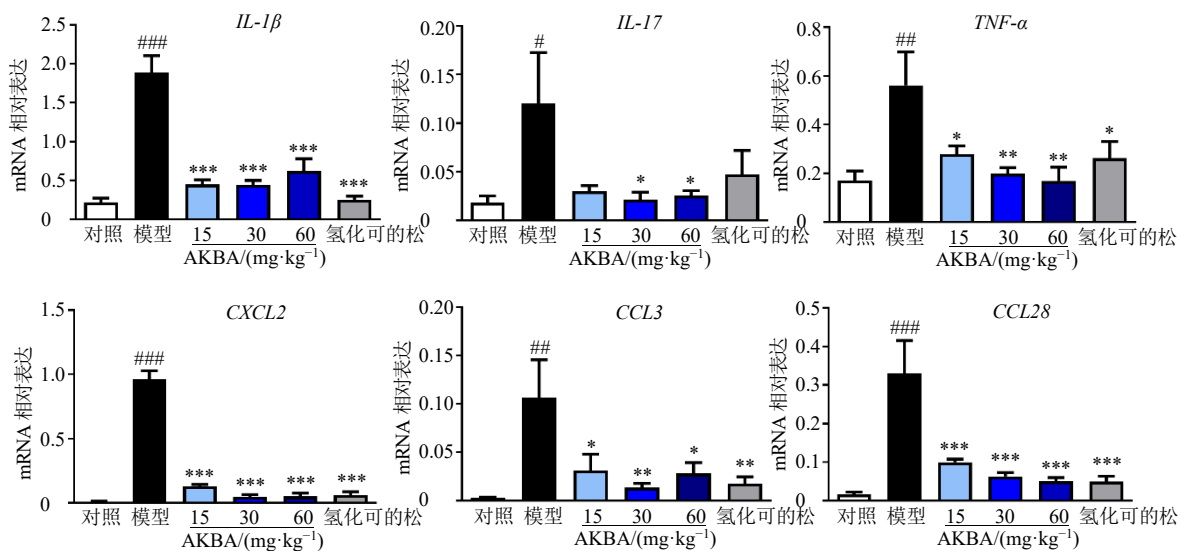


图 6 AKBA 对 ACD 小鼠颈部皮肤中主要细胞/趋化因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of AKBA on mRNA expressions of major cytokines and chemokines in neck skin of ACD mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

ACD 是生活中常见的皮肤病。目前, 皮质类固醇、抗生素和免疫抑制剂是治疗 ACD 的常用药物, 虽具有良好的抗炎效果, 但在临床应用中仍存在诸多局限性, 如短期使用效果好、易产生耐药性, 以及局部应用可能引起皮肤刺激^[3]。这些药物的不良反应不仅影响治疗效果, 还可能降低患者的依从性。近年来中药制剂在皮肤病上的应用愈加广泛, 因此基于中药筛选和开发新型治疗策略仍是该领域的重要研究方向。

AKBA 是中药乳香中的主要活性成分。体外研究发现 AKBA 可以减少由紫外线照射引起的人永生表皮细胞 (HaCaT) 内活性氧和炎症介质的增加, 提高细胞内超氧化物歧化酶活性, 产生保护皮肤的作用^[17]。此外, AKBA 还被证实可以直接作用于甲硫氨酸腺苷转移酶 2A, 调节一碳代谢, 减少促炎特性的代谢输出, 发挥治疗银屑病的作用^[18]。本研究在已有的基础上, 探讨了 AKBA 对 ACD 的治疗效果, 发现 AKBA 能有效缓解 SADBE 所致的 ACD 小鼠痒觉异化和皮肤炎症。

本研究应用人工智能预测发现 AKBA 可能作用于 TNFR1 发挥治疗 ACD 的作用。TNFR1 是干预银屑病、系统性红斑狼疮、特应性皮炎等免疫介导的炎症性疾病的常见治疗靶点, 现有临床治疗药物以 adalimumab、certolizumab 等生物制剂为主, 小分子 TNFR1 抑制剂仍是研究的热点^[19]。研究证实 TNF 与 TNFR1 结合后, 可以激活下游的 MAPK 信号通路, 从而诱导 IL-6、CCL2 等炎症因子的表达^[20-21]。ACD 小鼠皮肤组织中 MAPK 和 JAK-STAT3 等信号通路呈现异常激活状态^[15], 拮抗 TNFR1 可以有效抑制 MAPK 信号通路的激活^[22]。此外, Oetjen 等^[23]研究发现, JAK 抑制剂可有效减少特应性皮炎小鼠的抓挠行为, 减轻皮肤损伤。本研究发现 AKBA 能下调 TNFR1 的表达, 抑制 p38、ERK1/2、SAPK/JNK、STAT3 的磷酸化, 减轻炎症反应, 发挥治疗作用。

MAPK 信号通路在免疫调控、炎症反应以及细胞生长等过程中发挥重要作用, MAPK 信号通路的激活导致 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的释放^[21,24]; 已有研究表明 ACD 小鼠皮肤中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子以及 CCL2、CXCL9 等趋化因子的表达明显增加^[15], 同时临床研究发现 ACD 患者血液中 TNF- α 水平显著升高^[25]。IL-1 β 和 TNF- α 是经典的

促炎性因子, 在接触性过敏原的反应中起着核心作用^[26]。IL-1 β 调控 T 细胞向 Th1 和 Th17 细胞的分化, 促进 IL-17 的产生^[27], 参与皮肤慢性炎症反应。趋化因子 CXCL2 则可以通过募集免疫细胞进入炎症部位, 进一步加重炎症反应^[28]; 同时趋化因子 CCL3 也参与炎症反应的调控^[29]; CCL28 的过量表达会抑制皮肤伤口的愈合^[30]。本研究发现 AKBA 下调 ACD 小鼠颈部皮肤中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-17、CCL3、CXCL2 和 CCL28 的表达, 减轻皮肤炎症。

综上, 本研究通过人工智能模型预测与转录组学等现代技术探寻乳香中主要药效成分 AKBA 对 ACD 的作用, 推测 AKBA 通过降低促炎因子的表达、抑制 TNFR/MAPK 和 JAK-STAT 信号通路来发挥对 ACD 小鼠的抗炎止痒的作用, 为 AKBA 的有效开发和 ACD 的药物治疗提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu A W, Gillis J E, Sumpter T L, *et al.* Neuroimmune interactions in atopic and allergic contact dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2023, 151(5): 1169-1177.
- [2] Johansen J D, Bonefeld C M, Schwensen J F B, *et al.* Novel insights into contact dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2022, 149(4): 1162-1171.
- [3] Brites G S, Ferreira I, Sebastião A I, *et al.* Allergic contact dermatitis: From pathophysiology to development of new preventive strategies [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 162: 105282.
- [4] Koppes S A, Engebretsen K A, Agner T, *et al.* Current knowledge on biomarkers for contact sensitization and allergic contact dermatitis [J]. *Contact Dermatitis*, 2017, 77(1): 1-16.
- [5] Ahlström M G, Thyssen J P, Wennervaldt M, *et al.* Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, exposure, and treatment [J]. *Contact Dermatitis*, 2019, 81(4): 227-241.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 233.
- [7] 哈瑞雯, 周海燕, 詹志来, 等. 乳香化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(11): 94-107.
- [8] 刘迪, 张冰洋, 姚铁, 等. 乳香化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(22): 5900-5914.
- [9] Huang X, Nisar M F, Wang M, *et al.* UV-responsive AKBA@ZnO nanoparticles potential for polymorphous light eruption protection and therapy [J]. *Mater Sci Eng C*, 2020, 107: 110254.
- [10] Wang M X, Zhao J X, Meng Y J, *et al.* Acetyl-11-keto- β -

- boswellic acid inhibits the secretion of cytokines by dendritic cells via the TLR7/8 pathway in an imiquimod-induced psoriasis mouse model and *in vitro* [J]. *Life Sci*, 2018, 207: 90-104.
- [11] Lou F Z, Xu Z Y, Bai J, *et al.* Identification and pre-clinical investigation of 3-*O*-cyclohexanecarbonyl-11-keto- β -boswellic acid as a drug for external use to treat psoriasis [J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(8): 1290-1307.
- [12] Tong J J, Li Y, Cai X J, *et al.* CKBA suppresses mast cell activation via ERK signaling pathway in murine atopic dermatitis [J]. *Eur J Immunol*, 2023, 53(9): e2350374.
- [13] Feng J, Yang P, Mack M R, *et al.* Sensory TRP channels contribute differentially to skin inflammation and persistent itch [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 980.
- [14] Bai P Z, Miljković F, John B, *et al.* Interpretable bilinear attention network with domain adaptation improves drug-target prediction [J]. *Nat Mach Intell*, 2023, 5: 126-136.
- [15] Ju Y K, Luo M, Yan T, *et al.* TRPA1 is involved in the inhibitory effect of Ke-Teng-zi on allergic contact dermatitis via MAPK and JAK/STAT3 signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: 116182.
- [16] Zhao J H, Lin King J V, Paulsen C E, *et al.* Irritant-evoked activation and calcium modulation of the TRPA1 receptor [J]. *Nature*, 2020, 585(7823): 141-145.
- [17] Yang S Y, Zhou B, Xu W, *et al.* Nrf2- and Bach1 may play a role in the modulation of ultraviolet A-induced oxidative stress by acetyl-11-keto- β -boswellic acid in skin keratinocytes [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2017, 30(1): 13-23.
- [18] Bai J, Gao Y Y, Chen L J, *et al.* Identification of a natural inhibitor of methionine adenosyltransferase 2A regulating one-carbon metabolism in keratinocytes [J]. *EBio Medicine*, 2019, 39: 575-590.
- [19] Veerasubramanian P K, Wynn T A, Quan J, *et al.* Targeting TNF/TNFR superfamilies in immune-mediated inflammatory diseases [J]. *J Exp Med*, 2024, 221(11): e20240806.
- [20] van Loo G, Bertrand M J M. Death by TNF: A road to inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(5): 289-303.
- [21] Braicu C, Buse M, Busuioc C, *et al.* A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1618.
- [22] Xiang R Y, Hu L H, Li S Y, *et al.* Tiamulin inhibits TNF- α and alleviates psoriasis-like dermatitis [J]. *J Dermatol Sci*, 2022, 107(1): 32-40.
- [23] Oetjen L K, Mack M R, Feng J, *et al.* Sensory neurons co-opt classical immune signaling pathways to mediate chronic itch [J]. *Cell*, 2017, 171(1): 217-228.
- [24] Qinwufeng G, Lin J C, Lu X L, *et al.* Jiu-Wei-Yong-An Formula suppresses JAK1/STAT3 and MAPK signaling alleviates atopic dermatitis-like skin lesions [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 295: 115428.
- [25] 丁俐元. 防风通圣颗粒联合糠酸莫米松乳膏治疗过敏性皮炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(2): 419-422.
- [26] Yeung K, Mraz V, Geisler C, *et al.* The role of interleukin-1 β in the immune response to contact allergens [J]. *Contact Dermatitis*, 2021, 85(4): 387-397.
- [27] Subudhi I, Konieczny P, Prystupa A, *et al.* Metabolic coordination between skin epithelium and type 17 immunity sustains chronic skin inflammation [J]. *Immunity*, 2024, 57(7): 1665-1680.
- [28] Funch A B, Mraz V, Gadsbøll A Ø, *et al.* CD8⁺ tissue-resident memory T cells recruit neutrophils that are essential for flare-ups in contact dermatitis [J]. *Allergy*, 2022, 77(2): 513-524.
- [29] Ni X H, Xu Y, Wang W, *et al.* IL-17D-induced inhibition of DDX5 expression in keratinocytes amplifies IL-36R-mediated skin inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(11): 1577-1587.
- [30] Chen Z L, Haus J M, Chen L, *et al.* Inhibition of CCL28/CCR10-mediated ENOS downregulation improves skin wound healing in the obesity-induced mouse model of type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2022, 71(10): 2166-2180.

[责任编辑 李亚楠]