

基于 MAPK/NF- κ B 通路研究丹参白芍消方联合甲氨蝶呤治疗银屑病的作用机制

张梦欣^{1,2}, 高铭淑^{1,2}, 周宇航^{1,2}, 李玉琪^{1,2}, 曾晓璇², 阮清锋², 黄传奇², 徐宏峰^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 武汉市第一医院 药学部, 湖北 武汉 430030

摘要: **目的** 探究丹参白芍消方联合甲氨蝶呤治疗银屑病的作用机制。**方法** 将 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、雷公藤多苷 (12 mg/kg) 组、甲氨蝶呤 (1 mg/kg) 组及丹参白芍消方低、高剂量 (6、12 g/kg) 组和低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组、高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组, 每组 6 只。小鼠连续 14 d 于背部涂抹 5% 咪喹莫特乳膏造模, 第 8~14 天给予相应药物干预。通过银屑病面积和严重程度指数 (psoriasis area and severity index, PASI) 评分、肝脏/脾脏指数、皮损组织病理染色、血清炎症因子水平以及皮损组织丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路相关蛋白表达, 综合评价各组疗效, 探究丹参白芍消方联合甲氨蝶呤治疗银屑病的作用机制。**结果** 与模型组比较, 各给药组可显著降低 PASI 评分、表皮厚度 ($P<0.01$), 显著抑制血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-17A 水平及皮损组织 p38、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated kinase 1/2, ERK1/2)、NF- κ B p65、核因子- κ B α 抑制蛋白 (inhibitor of nuclear factor- κ B α , I κ B α) 的磷酸化水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。与甲氨蝶呤组比较, 低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组可显著降低肝脏和脾脏指数 ($P<0.01$), 显著抑制血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-23 水平以及皮损组织 p38 的磷酸化水平 ($P<0.05$ 、 0.01); 高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组可显著抑制血清中 IL-23 水平以及皮损组织 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、NF- κ B p65 的磷酸化水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。主成分分析结果显示联和用药组与对照组最接近, 药效最好。**结论** 丹参白芍消方与甲氨蝶呤联用能够减轻咪喹莫特诱导的银屑病小鼠症状, 其作用机制可能与抑制 MAPK/NF- κ B 通路有关。

关键词: 丹参白芍消方; 甲氨蝶呤; 银屑病; 炎症; 丝裂原活化蛋白激酶; 核因子- κ B; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 盐酸小檗碱; 升麻素苷; 苦参碱; 甘草酸铵

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)12-4316-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.015

Mechanism of Danshen Baibixiao Formula combined with methotrexate in treatment of psoriasis based on MAPK/NF- κ B signaling pathway

ZHANG Mengxin^{1,2}, GAO Mingshu^{1,2}, ZHOU Yuhang^{1,2}, LI Yuqi^{1,2}, ZENG Xiaoxuan², RUAN Qingfeng², HUANG Chuanqi², XU Hongfeng^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Department of Pharmacy, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430030, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Danshen Baibixiao Formula (丹参白芍消方, DBF) combined with methotrexate (MTX) in the treatment of psoriasis. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, *Tripterygium wilfordii* polyglycoside (12 mg/kg) group, MTX (1 mg/kg) group, DBF low- and high-dose (6, 12 g/kg) groups, low- and high-dose groups of DBF combined with MTX, with six mice in each group. Mice were treated with 5% imiquimod cream on their backs for 14 consecutive days to create a model, and corresponding drug intervention was administered from day 8 to day 14. Through the evaluation of psoriasis area and severity index (PASI) score, liver/spleen index, pathological staining of skin lesions, serum inflammatory factor levels, and protein expressions related to the mitogen activated protein kinase (MAPK)/nuclear factor- κ B (NF-

收稿日期: 2025-01-19

基金项目: 武汉市中医药科研项目重大项目 (WZ22M02)

作者简介: 张梦欣 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与分析。E-mail: 15303235494@163.com

*通信作者: 徐宏峰 (1979—), 副主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制与新制剂开发。E-mail: 282215830@qq.com

κ B) pathway in skin lesions, the efficacy of each group was comprehensively evaluated to explore the mechanism of DBF combined with methotrexate in the treatment of psoriasis. **Results** Compared with model group, each administration group could significantly reduce the PASI score and epidermal thickness ($P < 0.01$), significantly inhibit the levels of interleukin-6 (IL-6), IL-17A in serum and phosphorylation of p38, extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2), NF- κ B p65, inhibitor of nuclear factor- κ B α (I κ B α) in skin lesions ($P < 0.05, 0.01$). Compared with MTX, low-dose combination group could significantly reduce the liver and spleen indexes ($P < 0.01$), significantly inhibit the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-23 in serum and phosphorylation of p38 in skin lesions ($P < 0.05, 0.01$); High-dose combination group could significantly inhibit the level of IL-23 in serum and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK), NF- κ B p65 in skin lesions ($P < 0.05, 0.01$). The results of principal component analysis showed that the combination group was closest to the control group and had the best efficacy. **Conclusion** The combination of DBF and MTX can alleviate the symptoms of psoriasis mice induced by imiquimod, and its mechanism may be associated with the inhibition of MAPK/NF- κ B pathway.

Key words: Danshen Baibixiao Formula; methotrexate; psoriasis; mitogen-activated protein kinase; nuclear factor- κ B; salvianolic acid B; tanshinone IIA; berberine; prim-*O*-glucosylcimifugin; matrine; monoammonium glycyrrhizinate

银屑病是由遗传与环境共同作用诱发的免疫介导的慢性、炎症性、复发性、系统性疾病,其临床表现为鳞屑性红斑或斑块,局限或广泛分布^[1]。截止到 2019 年,全球约有 1.25 亿银屑病患者。其中中国患病率为 0.54%,患病人数超过 760 万例,且呈逐年增长趋势^[2-3]。该病病程长、易复发、难根治,还可引发关节炎、淋巴瘤、代谢综合征等多系统并发症,给患者带来沉重的生理、心理及经济负担,严重者会导致毁容、残疾甚至危及生命,对患者健康及社会发展构成巨大隐患^[4]。目前临床上治疗银屑病多采用局部外用化学药、系统用药、生物制剂等,其中甲氨蝶呤作为叶酸拮抗剂,为治疗银屑病最有效的系统药物之一,对各型银屑病均有良好的疗效。然而,随着使用剂量或者时间的增加,甲氨蝶呤可在体内蓄积,从而增加不良反应发生的概率。其不良反应主要包括骨髓抑制、表皮坏死松解、肝毒性等,且在银屑病治疗中肝毒性尤为常见^[5-7]。

在全国银屑病防治协作会议上众位专家达成共识:“中医与中西医结合是防治银屑病的方向”。中医药最大的优势在于注重疾病的根源及病因,注重调整整体身体平衡,增强机体自身的免疫功能。中西医相结合,可以依据病情与辨证,综合发挥二者优势,不仅可以减少或延缓病情的进展,同时还可以降低药物不良反应发生率及银屑病复发率^[8-10]。在中医中关于银屑病的记载较多,将其归入“白疔”“干癣”“风癣”等范畴。结合历代医家对银屑病病机病因的认识,发现银屑病本质在“血”,主张银屑病应“从血论治”,分为血热证、血瘀证、血燥证 3 个证型来辨证论治。以清热凉血、活血化瘀、解毒利湿为治疗大法,养血滋阴贯穿其中,注重攻补兼施,标本兼顾^[11-13]。基于“从血论治”理论,武汉市第

一医院胡长发教授通过实验筛选得出丹参白疔消方。全方由丹参、全蝎、酒乌梢蛇、大黄、蝉蜕、土鳖虫、徐长卿、山楂、板蓝根、红花、防风、苦参、关黄柏、蜈蚣、甘草 15 味中药组成,具有清热解毒、燥湿祛风、凉血活血的功效。应用于临床已有 20 余年的历史,治疗银屑病有效率达到 73.7%^[14]。本课题组前期研究发现,丹参白疔消方能够调节白细胞介素-23 (interleukin-23, IL-23)/Th17 轴、抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活,具有良好的抗银屑病作用^[15]。目前,丹参白疔消方与甲氨蝶呤联合治疗银屑病在临床上使用较多,但是二者联合用药机制尚不明确。因此,本研究基于 MAPK/NF- κ B 信号通路,深入探究丹参白疔消方联合甲氨蝶呤治疗银屑病的药效及作用机制,探讨二者联用是否可以起到“增效减副”的作用,以期为中西医结合提高银屑病临床治疗效果提供更坚实的科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,体质量 (20 $\pm$ 2) g,购自湖北贝恩特生物科技有限公司,许可证号 SCXK(鄂)2021-0027。动物饲养于湖北中医药大学实验动物中心,温度 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度 (55 $\pm$ 5) %,12 h 昼夜明暗交替,适应性喂养 1 周,自由进食饮水。动物实验经湖北中医药大学伦理委员会批准(批准号 HUCMS-00310802)。

1.2 药材

丹参白疔消方由丹参 120 g、全蝎 60 g、酒乌梢蛇 60 g、大黄 60 g、蝉蜕 60 g、土鳖虫 60 g、徐长卿 60 g、山楂 180 g、板蓝根 180 g、红花 60 g、

防风 120 g、苦参 60 g、关黄柏 120 g、蜈蚣 3 条、甘草 30 g 组成, 上述药材批号均为 202305012, 购自湖北天济中药饮片有限公司, 并经湖北中医药大学李娟教授分别鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体、游蛇科动物乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* (Cantor) 的干燥体、蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎、蝉科昆虫黑蚱 *Cryptotympana pustulata* Fabricius 的若虫羽化时脱落的皮壳、鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 的雌虫干燥体、萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 的干燥根和根茎、蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实、十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花、伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根、豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根、芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮、蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch 的干燥体、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.3 药品与试剂

雷公藤多苷片(批号 231001)购自上海复旦复华药业有限公司; 甲氨蝶呤片(批号 MAH02197231101)购自上海上药信谊药厂有限公司; 5%咪喹莫特乳膏(批号 240401)购自湖北科益药业股份有限公司; 组织固定液(批号 230807)购自南昌雨露实验器材有限公司; IL-17A、IL-23、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 ELISA 试剂盒(批号分别为 A217H40324、A22340714、A282H30715、A206H40853)购自杭州联科生物技术有限公司; p38、p-p38、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated kinase 1/2, ERK1/2)、p-ERK1/2、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p-JNK、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、核因子- κ B α 抑制蛋白(inhibitor of nuclear factor- κ B α , I κ B α)、p-I κ B α 抗体(批号分别为 9212S、4511S、4695S、4370S、9252S、4668S、6956S、3031S、4814S、2859S)、PVDF 膜(批号 12369P2)、ECL 发光剂(批号 6883P3)购自美国 CST 公司; RIPA 裂解液(批号 R0278)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批

号 71285-3)购自德国默克公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号分别为 60004-1-Ig、SA00001-9、SA00001-1)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器

DW-86L578J 型-80 °C 超低温冰箱(青岛海尔集团); Centrifuge 5424R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); BX53 型光学显微镜(日本奥林巴斯有限公司); MS100 型微孔板振荡器(杭州瑞诚仪器有限公司); Scientific multiskan go 型酶标仪(美国 Thermo 公司); T10 型匀浆机(德国 IKA 公司); DY CZ-40K 型转印电泳仪(北京六一生物科技有限公司); Bio-Rad ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 丹参白芍消方的制备

将全方各药材按“1.2”项下比例混合, 加入 10 倍量水浸泡, 煮沸 1 h, 滤过; 滤渣加入 10 倍量水, 煮沸 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 浓缩备用。本课题组前期采用高效液相色谱串联高分辨质谱对丹参白芍消方进行了含量测定, 其中丹酚酸 B、丹参酮 II_A、盐酸小檗碱、升麻素苷、苦参碱、甘草酸铵的质量分数分别为 12.3、0.13、6.71、3.04、49.5、5.96 μ g/mg^[15]。

2.2 动物分组、造模与给药

48 只小鼠适应性喂养 1 周后, 于背部去毛, 面积约 3 cm $\times$ 4 cm。将小鼠随机分为对照组、模型组、雷公藤多苷(12 mg/kg)组、甲氨蝶呤(1 mg/kg)组、丹参白芍消方低、高剂量(6、12 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、2 倍^[16])组、低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组(6 g/kg+1 mg/kg)、高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤(12 g/kg+1 mg/kg)组, 每组 6 只。除对照组外, 其余组小鼠每天在背部皮肤上涂抹 80 mg 咪喹莫特乳膏, 连续 14 d。第 8~14 天, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水。第 15 天, 称量并记录各组小鼠体质量后, 摘眼球取血, 收集血清。颈椎脱臼处死小鼠, 收集肝、脾及背部皮肤组织, 部分皮肤于组织固定液中固定, 其余组织及血清放于-80 °C 冰箱备用。

2.3 小鼠背部皮损银屑病面积和严重程度指数(psoriasis area and severity index, PASI)评分

观察小鼠病变皮肤, 参照 PASI 标准^[17], 对红

斑、鳞屑、表皮增厚的严重程度进行评分。

2.4 肝脏、脾脏指数的测定

称定各组小鼠肝脏、脾脏质量，计算肝脏指数和脾脏指数。

肝脏指数=肝脏质量/体质量

脾脏指数=脾脏质量/体质量

2.5 皮肤组织苏木素-伊红(HE)染色

取固定于组织固定液中的皮肤组织，经脱水、透明、包埋制成石蜡切片，切片依次经脱蜡复水、HE 染色、脱水封片后，于显微镜下观察并采集图片，利用 Image J 软件测量表皮厚度。

2.6 ELISA 检测血清中 IL-6、TNF- α 、IL-17A、IL-23 水平

取各组小鼠血清，按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6、TNF- α 、IL-17A、IL-23 水平。

2.7 Western blotting 检测皮肤组织 MAPK/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

取各组小鼠皮损组织，加入 RIPA 裂解液提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，于 5%脱脂牛奶中室温封闭 2 h，加入一抗(1:1000)，4℃孵育过夜；TBST 洗膜 3 次，10 min/次，加入二抗，37℃孵育 1.5 h，上机显影，采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.8 主成分分析(principal component analysis, PCA)

将 PASI 评分、肝脏/脾脏指数、表皮厚度、炎

症因子水平、蛋白表达量为变量，以获取到的主成分特征值 ≥ 1 为筛选条件，进行 PCA。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 29.0 统计软件进行数据分析，并以 Origin 2024 软件绘制统计学图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，若数据符合正态分布，各组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，方差齐时各组间比较采用最小显著性差异法(LSD)进行事后检验，方差不齐时各组间比较采用邓尼特 T3 法进行事后检验；若不满足正态分布，则选用非参数检验。

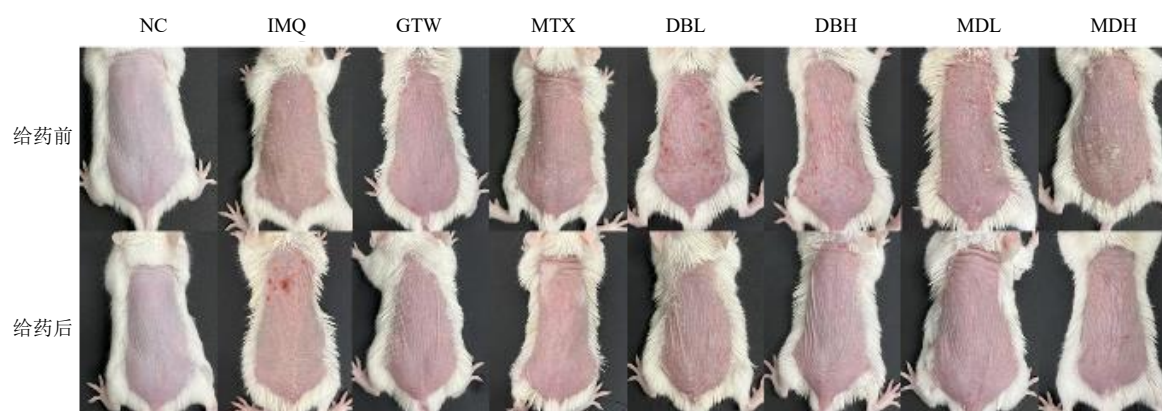
3 结果

3.1 各组小鼠背部皮损 PASI 评分的比较

由图 1 可见，与对照组比较，造模后各组小鼠背部均出现红斑、鳞屑及皮肤增厚的症状，PASI 评分持续升高(图 2)；给药 7 d 后，与模型组比较，各给药组小鼠症状出现不同程度减轻，PASI 评分显著下降($P < 0.01$)。

3.2 各组小鼠肝脏指数和脾脏指数比较

课题组在预实验中观察到咪喹莫特造模后，小鼠肝脾肿大现象明显。肝脏指数是评估肝脏健康的关键指标，是对肝脏整体功能的初步评估，间接反映了药物治疗对肝组织的影响^[18]。脾脏是免疫系统的主要器官，脾脏指数是反映免疫功能和脾脏状态的重要指标，脾脏指数升高表明免疫细胞数量增多和炎症加剧^[19-20]。因此在实验中测定肝脏/脾脏指数，以衡量炎症反应以及药物对肝脏、脾脏的影响。如图 3 所示，与对照组比较，模型组脾脏、肝脏指

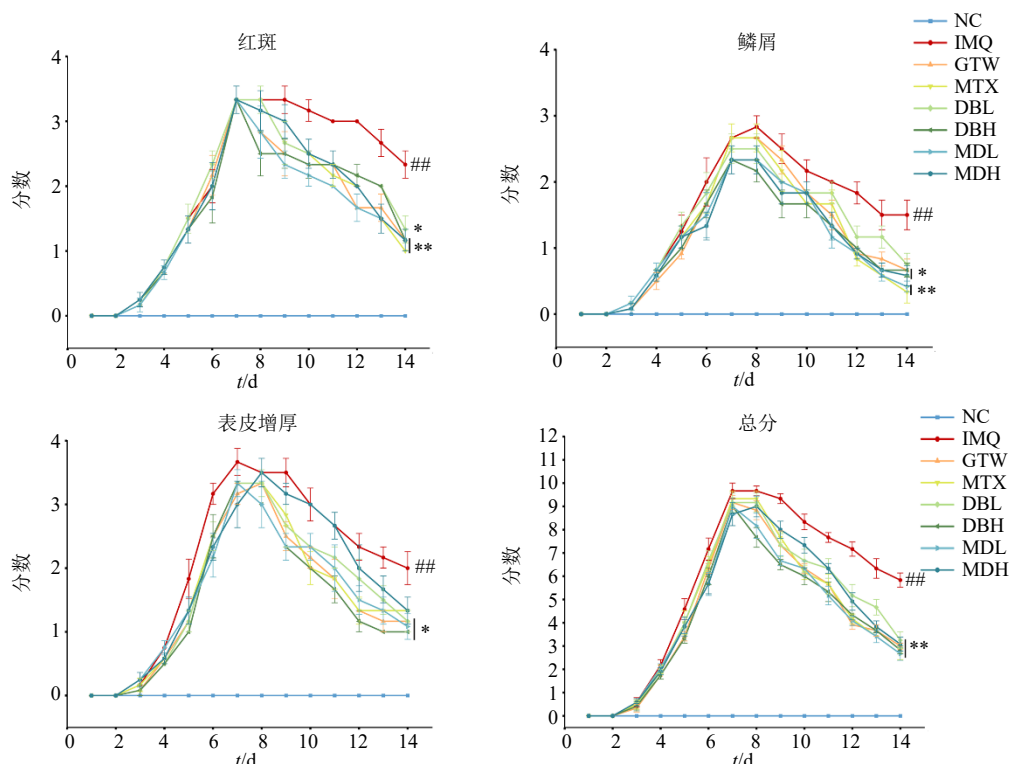


NC-对照组，IMQ-模型组，GTW-雷公藤多苷组，MTX-甲氨蝶呤组，DBL-丹参白芍消方低剂量组，DBH-丹参白芍消方高剂量组，MDL-低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组，MDH-高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组，下图同。

NC-control group, IMQ-model group, GTW-Tripterygium wilfordii polysaccharide group, MTX-methotrexate group, DBL-Danshen Baibixiao Formula low-dose group, DBH-Danshen Baibixiao Formula high-dose group, MDL-low-dose Danshen Baibixiao Formula + methotrexate group, MDH-high-dose Danshen Baibixiao Formula + methotrexate group, same as below figures.

图 1 各组小鼠银屑病皮损图像

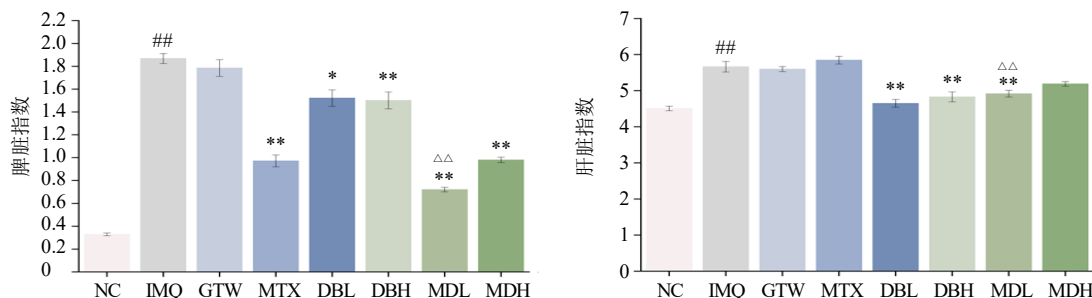
Fig. 1 Images of psoriatic skin lesions of mice in each group



与 NC 组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$; 与 IMQ 组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 下图同。
 $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs NC group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs IMQ group, same as below figures.

图 2 各组小鼠背部皮损的 PASI 评分 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 PASI score of back skin lesions of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与 MTX 组比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$, 图 5~7 同。

$^{\Delta}P<0.05$ $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs MTX group, same as Figs. 5~7.

图 3 各组小鼠脾脏指数及肝脏指数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Spleen index and liver index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

数显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 除雷公藤多苷组外, 各给药组脾脏指数显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01), 丹参白芍消方低、高剂量组和低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组肝脏指数显著下降 ($P<0.01$); 与甲氨蝶呤组比较, 低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组脾脏指数和肝脏指数显著下降 ($P<0.01$)。

3.3 各组小鼠皮肤组织病理变化

如图 4 所示, 对照组小鼠皮肤组织结构清晰完整, 皮下炎症细胞浸润少; 模型组小鼠皮肤组织表

皮增厚、棘突显著延长, 炎症细胞浸润明显; 与模型组比较, 各给药组小鼠皮肤组织表皮厚度明显降低 ($P<0.01$), 丹参白芍消方低剂量组小鼠皮肤组织炎症细胞浸润情况无明显改善, 其余各组小鼠皮肤组织炎症细胞浸润情况减轻。

3.4 各组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-23、IL-17A 水平

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-23、IL-17A 水平显著升高 ($P<$

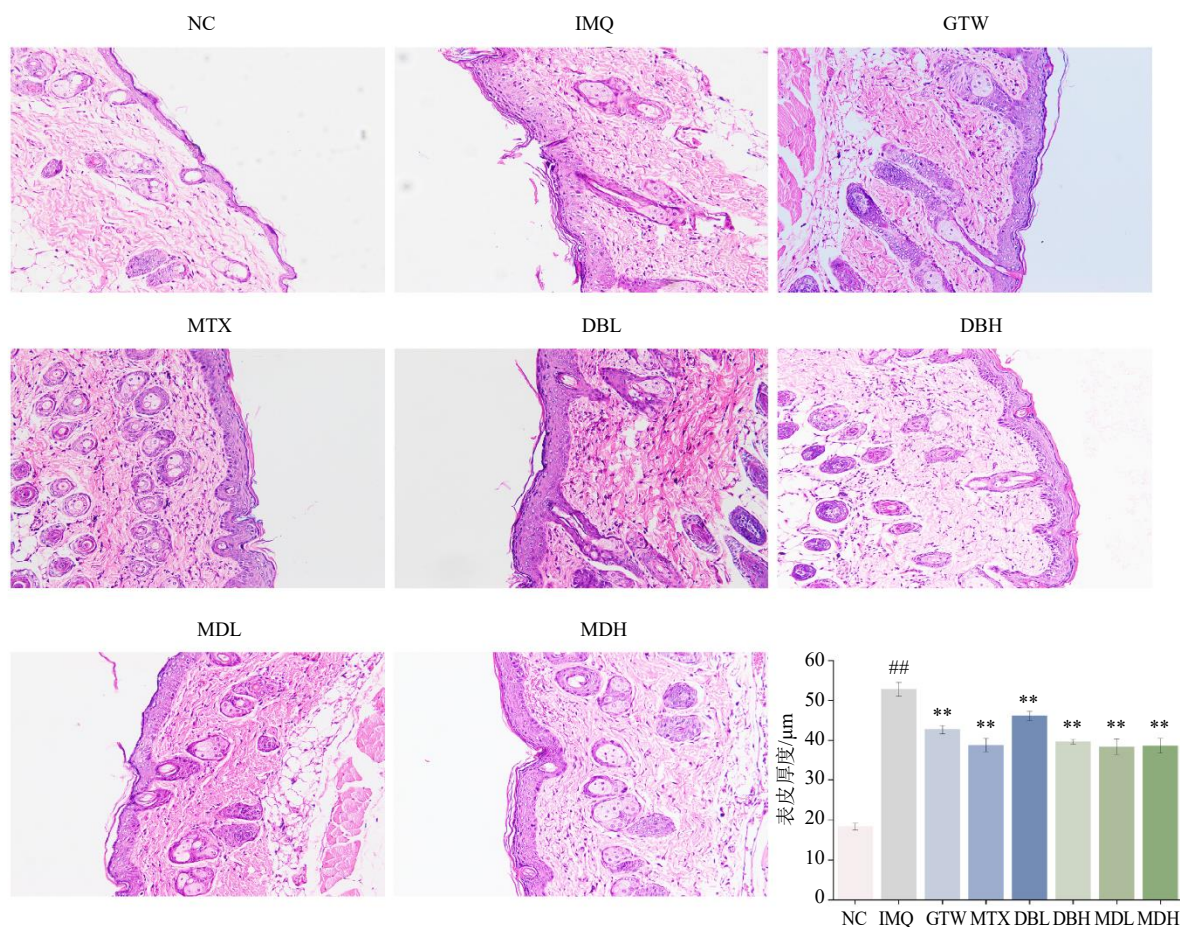


图 4 各组小鼠皮肤组织 HE 染色 (×200; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 HE staining of skin in mice of each group (×200; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

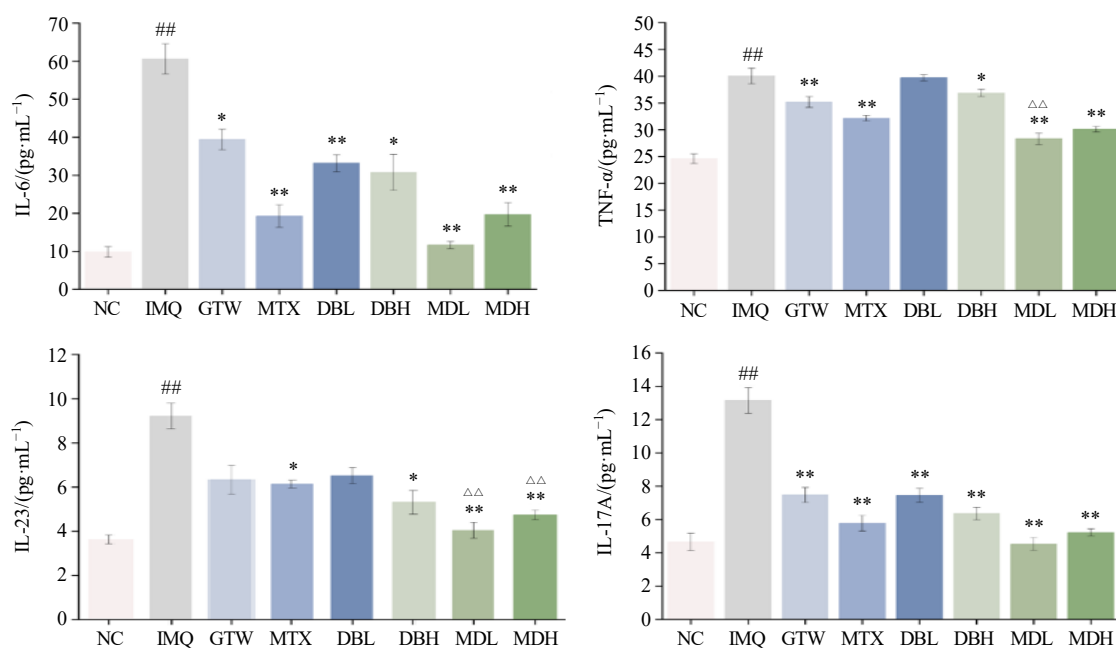


图 5 各组小鼠血清中 IL-6、TNF-α、IL-23、IL-17A 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Levels of IL-6, TNF-α, IL-23 and IL-17A in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

0.01); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 IL-6、IL-17A 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 雷公藤多苷组、甲氨蝶呤组、丹参白芍消方高剂量组、低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组和高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 甲氨蝶呤组、丹参白芍消方高剂量组、低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组和高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 IL-23 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 与甲氨蝶呤组比较, 低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$), 低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组和高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 IL-23 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 各组小鼠皮肤组织中 MAPK 信号通路相关蛋白表达

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织中 p-p38/p38、p-ERK1/2/ERK1/2、p-JNK/JNK 值显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组皮肤组织 p-p38/p38、p-ERK1/2/ERK1/2 值显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 雷公藤多苷组及丹参白芍消方低、高剂量组和高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 p-JNK/JNK 值显著降低 ($P < 0.01$)。与甲氨蝶呤组比较, 低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 p-p38/p38 值显著降低 ($P < 0.01$), p-ERK1/2/ERK1/2 值显著升高 ($P < 0.01$), p-JNK/JNK 值呈下降趋势但无显著性; 高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组 p-p38/p38、

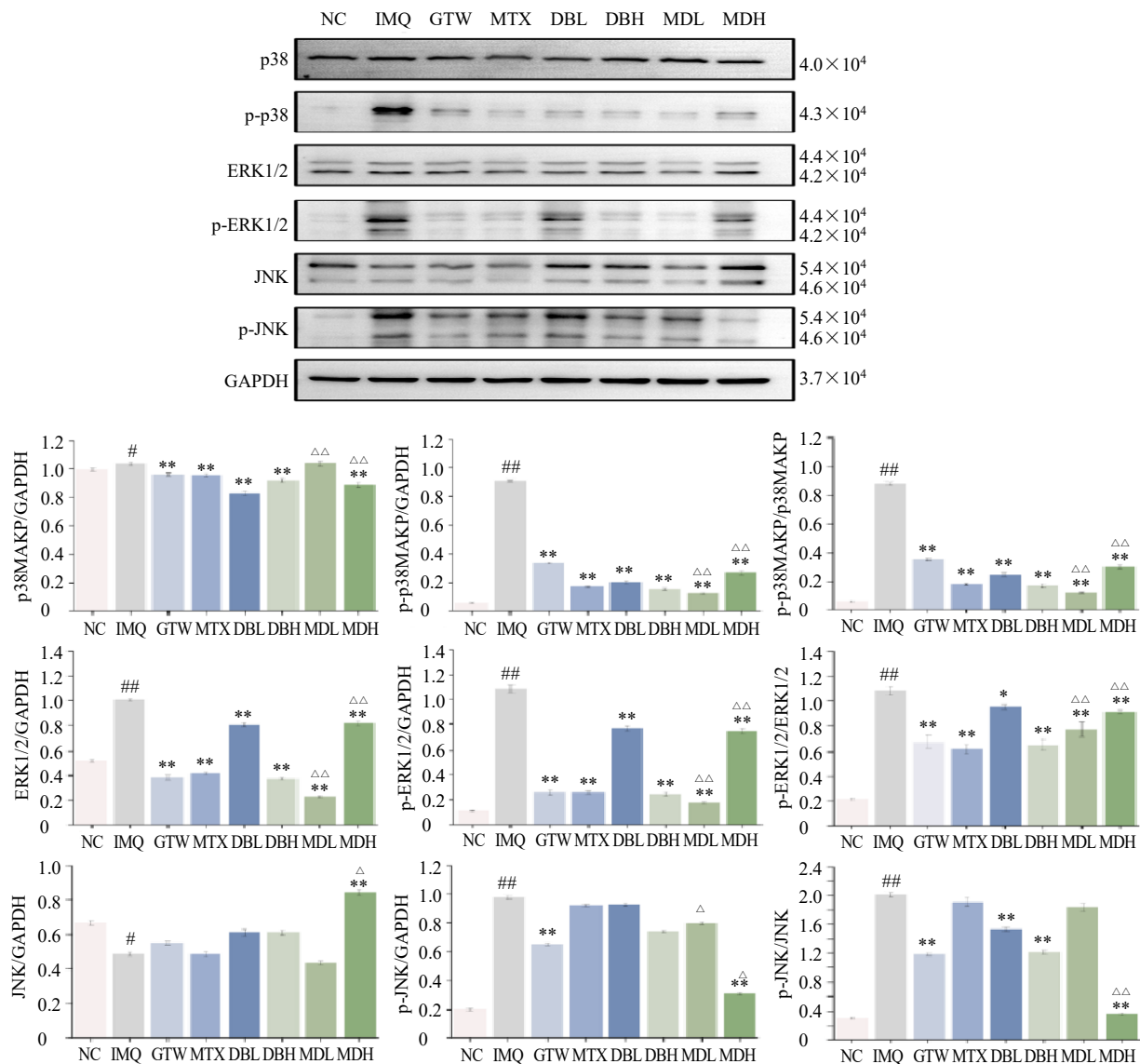


图 6 各组小鼠皮肤组织中 MAPK 信号通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Expressions of MAPK signaling pathway-related proteins in skin of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

p-ERK1/2/ERK1/2 值显著升高 ($P<0.01$), p-JNK/JNK 值显著降低 ($P<0.01$)。

3.6 各组小鼠皮肤组织中 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织中 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-I κ B/I κ B 值显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组皮肤组

织 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 值显著降低 ($P<0.01$), 甲氨蝶呤组、丹参白芨消方高剂量组和高剂量丹参白芨消方+甲氨蝶呤组 p-I κ B/I κ B 值显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 与甲氨蝶呤组比较, 高剂量丹参白芨消方+甲氨蝶呤组 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 值显著降低 ($P<0.05$), 高剂量丹参白芨消方+甲氨蝶呤组 p-I κ B/I κ B 值显著升高 ($P<0.05$)。

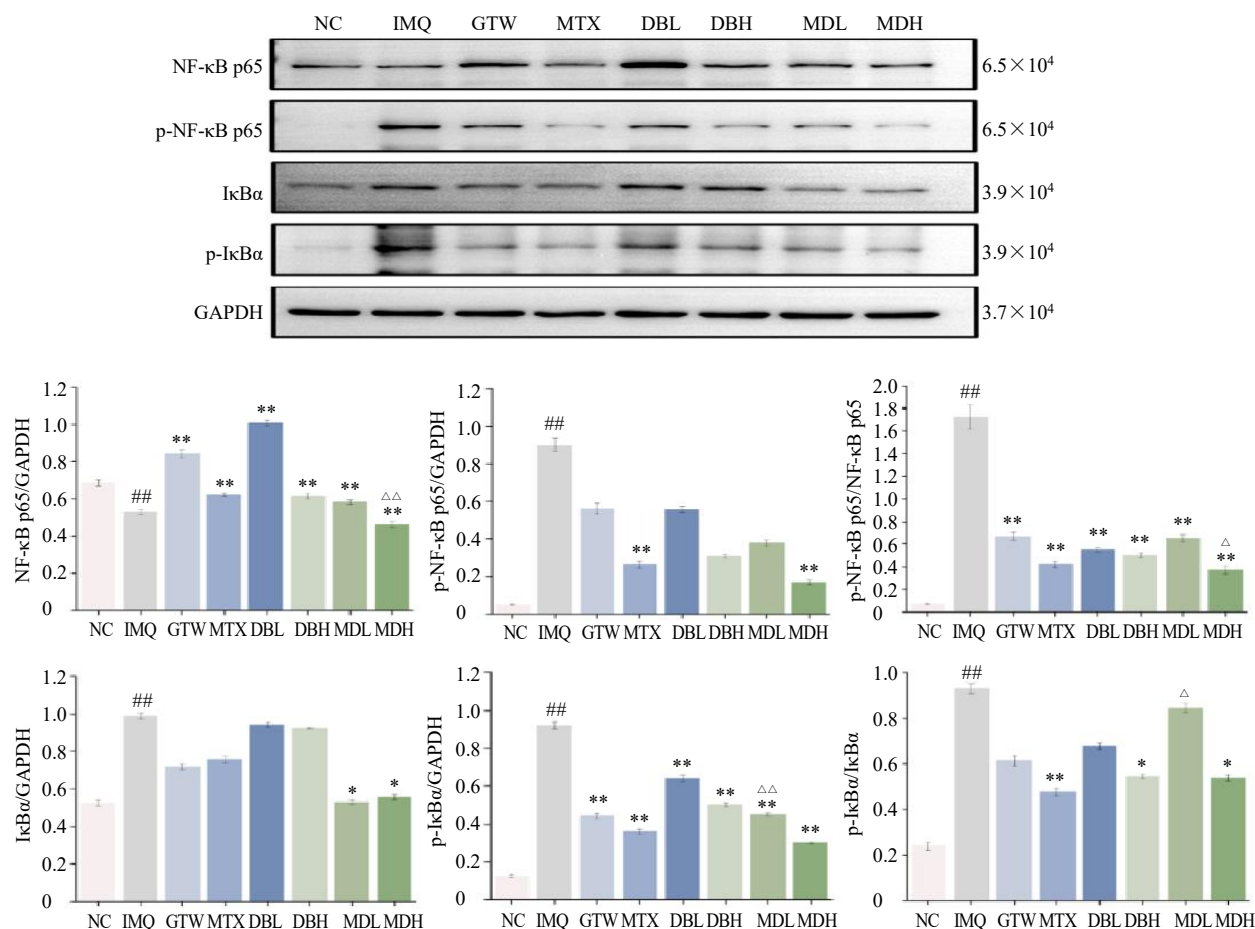


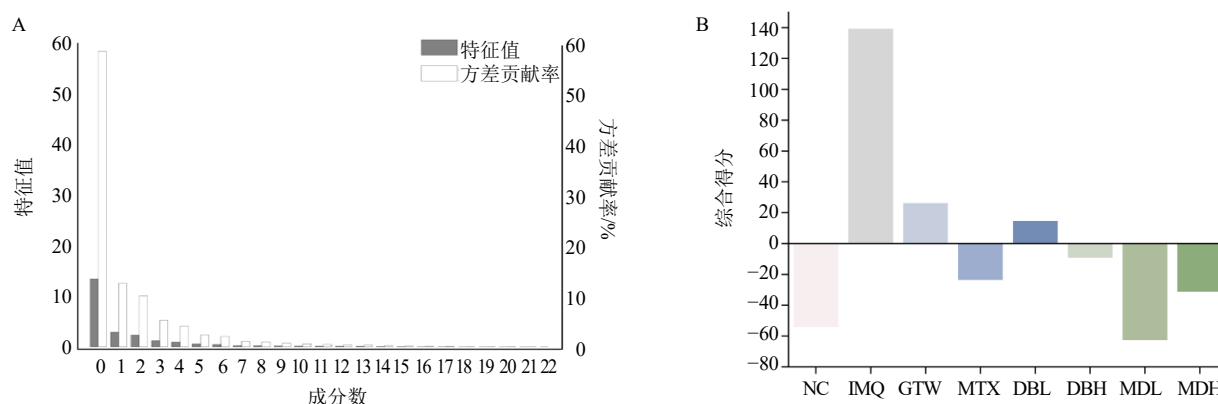
图 7 各组小鼠皮肤组织中 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 7 Expressions of NF- κ B signaling pathway-related proteins in skin of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.7 PCA 结果

为更好地反映各组间的差异, 将 PASI 评分、肝脏/脾脏指数、表皮厚度、炎症因子水平、蛋白表达量为变量, 以获取到的主成分特征值 ≥ 1 为筛选条件, 进行 PCA, 结果见图 8-A。使用 SPSS 软件进行 PCA, KMO 统计量 >0.7 、巴特利球形检验 <0.001 , 说明所选择变量数据适合进行因子分析。通过分析得到第 1 主成分初始特征值的方差贡献率为 58.442%, 是贡献最大的成分; 第 2 主成分初始特征值的方差贡献率为 12.590%; 第 3 主成分初始特

征值的方差贡献率为 10.082%; 第 4 主成分初始特征值的方差贡献率为 5.255%; 4 个主成分的累积方差贡献率为 86.368% $>85\%$, 说明提取的 4 个主成分初始特征值可代表各组治疗银屑病的药效的绝大部分信息。用生成的 4 个主成分得分 F_1 、 F_2 、 F_3 、 F_4 计算各组综合得分 F ($F=58.442 F_1+12.590 F_2+10.082 F_3+5.255 F_4$) 并排序, 结果见图 8-B。其中对照组排名第 7, 模型组排名第 1, 低剂量丹参白芨消方+甲氨蝶呤组、高剂量丹参白芨消方+甲氨蝶呤组分别排名第 8、第 6, 效果最好。



A-PCA 中各成分的特征值及方差贡献率; B-各组的综合得分。

A-eigenvalues and variance contribution rates of each component in PCA; B-overall score of each group.

图 8 各组药效的 PCA 结果

Fig. 8 PCA results of pharmacological effects in each group

4 讨论

银屑病是一种涉及多系统的慢性炎症性疾病,目前银屑病的确切病因尚未完全阐明,但遗传、环境与免疫在银屑病的发病中发挥着重要的作用。研究发现,T 细胞、树突细胞、角质形成细胞等多种细胞可以通过相关细胞因子,引起银屑病特征性变化。活化的树突细胞等可以产生 IL-12、IL-23、IL-6,诱导 Th1、Th17、Th22 细胞活化或增殖,产生 IL-17A、TNF- α 、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)等相关细胞因子,刺激角质形成细胞过度增殖,产生相关细胞因子、趋化因子,形成炎症循环^[1,21]。其中 MAPK/NF- κ B 信号通路是关键通路之一,参与银屑病免疫反应、炎症反应及细胞异常增殖、分化等发展过程^[22-23]。在银屑病中,MAPK 及 NF- κ B 通路均可被 IL-17、TNF- α 激活。IL-17A/IL-17A 同源二聚体为银屑病免疫微环境中的中心分子,通过募集和激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6),进一步激活活化蛋白 1(activator protein 1, AP1)、kappa B 抑制因子激酶(inhibitor of kappa B kinase, IKK),从而激活 MAPK 和 NF- κ B 通路。TNF- α 主要与肿瘤坏死因子受体 I(tumor necrosis factor receptor I, TNFRI)结合,通过复合物 I 募集转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)激活的转化生长因子激酶 1(transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)来激活 MAPK;复合物 I 还可以通过 Lys63 连接的泛素激活 IKK,导致下游 NF- κ B 通路的激活^[24]。NF- κ B 在炎症和免疫反应中可充当 MAPK 信号通路的下游靶标,MAPK 可以

通过调节 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化级联反应来激活 NF- κ B。NF- κ B 激活后,p-NF- κ B 可促进 NF- κ B 从细胞质转移到细胞核,并显著增加 IL-6、TNF- α 、IL-17、IL-23 等炎症因子的产生。而炎症因子的产生又可进一步刺激 MAPK 与 NF- κ B 通路,从而形成循环,加剧炎症反应^[25-28]。因此,抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路的激活能够对银屑病起到有效的治疗作用。

目前治疗银屑病的经典用药甲氨蝶呤是一种叶酸类似物,也是一种免疫抑制剂,具有抗增殖、抗炎和免疫调节的作用。其在胞质内活化为多聚谷氨酸甲氨蝶呤(methotrexate polyglutamates, MTXPGs),竞争性地与二氢叶酸还原酶结合,干扰胸腺嘧啶核苷酸和嘌呤核苷酸的合成,从而抑制角质形成细胞、T 淋巴细胞的异常增殖^[29]。其虽然可在一定程度上控制银屑病的发生与持续,但是长期应用或每天服用都可能会导致 MTXPGs 在细胞中累积,不仅会导致肝毒性还有可能出现轻微至严重的黏膜溃疡、皮肤病变等皮肤毒性表现^[30-31]。本研究也发现,1 mg/kg 甲氨蝶呤治疗银屑病小鼠无法降低其肝脏指数,肝脏指数甚至呈上升趋势。而肝脏指数作为评估肝脏健康的重要指标,可以反映部分肝脏损伤的程度^[32-33],由此推测,现剂量下甲氨蝶呤可能会加重咪喹莫特引起的肝损伤现象。将中西药各自优势相结合,可有效提高整体疗效,具有安全、经济、不良反应少等优点^[34-35]。本研究发现,BALB/c 小鼠连续涂抹咪喹莫特诱导银屑病症状^[36],给予丹参白芨消方治疗后,可以显著改善小鼠银屑病症状,显著抑制小鼠血清中炎症因子水平以及皮

肤组织中 NF- κ B、MAPK 信号通路相关蛋白的表达。结合前期研究结果^[15], 丹参白芍消方在 C57BL/6、BALB/c 2 种品系小鼠的银屑病模型上均具有良好的抗银屑病活性。此外, 与甲氨蝶呤组比较, 低剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组可以显著降低肝脏和脾脏指数, 显著抑制皮肤组织中 p38 的磷酸化水平, 说明二者合用可以协同增加疗效并减轻肝损伤现象; 高剂量丹参白芍消方+甲氨蝶呤组肝脏指数虽有下降趋势但无显著性, 且可以显著抑制皮肤组织中 NF- κ B p65、JNK 的磷酸化水平。通过 PCA 从整体观角度评价各给药组的药效, 反映各组间的差异。根据综合得分排名可以发现, 联和用药组与对照组更为接近, 表明联和用药组的药效最好。

综上, 丹参白芍消方与甲氨蝶呤联用可通过抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路发挥抗炎、抗银屑病的作用, 实现对咪喹莫特诱导的银屑病小鼠的治疗作用, 并且二者联用可以起到“增效减副”的作用。但本研究发现, 联和用药组部分蛋白表达水平比单用组要高, 但整体来看联和用药组效果较单独给药组好且呈剂量相关性, 提示在甲氨蝶呤与丹参白芍消方联合应用时可能需要对给药剂量进行进一步调整。因此, 后续研究将重点进行毒理实验, 以期找到具体原因以优化联用方案, 找到二者联合的最佳给药剂量, 实现更加安全有效的银屑病治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会, 张学军. 中国银屑病诊疗指南 (2023 版) [J]. 中华皮肤科杂志, 2023, 56(7): 573-625.
- [2] Armstrong A W, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: A review [J]. *JAMA*, 2020, 323(19): 1945-1960.
- [3] Damiani G, Bragazzi N L, Karimkhani Aksut C, et al. The global, regional, and national burden of psoriasis: Results and insights from the global burden of disease 2019 study [J]. *Front Med*, 2021, 8: 743180.
- [4] WHO. *Global report on psoriasis* [M]. Switzerland: WHO Press, 2016.
- [5] Kalantari E, Zolbanin N M, Ghasemnejad-Berenji M. Protective effects of empagliflozin on methotrexate induced hepatotoxicity in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 115953.
- [6] 陈浩, 尹连红, 彭金咏. 甲氨蝶呤对器官毒性的作用机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(2): 213-218.
- [7] Menter A, Gelfand J M, Connor C, et al. Joint American Academy of Dermatology-National Psoriasis Foundation Guidelines of care for the management of psoriasis with systemic nonbiologic therapies [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2020, 82(6): 1445-1486.
- [8] 李勃男. 中医药治疗银屑病的机制研究与临床应用进展 [J]. 黑龙江中医药, 2023, 52(6): 393-395.
- [9] 赵敏, 曹毓佳, 吴卓, 等. 秦息痛联合甲氨蝶呤治疗银屑病关节炎的疗效与安全性观察 [J]. 贵州医药, 2022, 46(9): 1427-1429.
- [10] 姜文成, 沈芳, 郑淇, 等. 甲氨蝶呤治疗银屑病的临床应用 [J]. 世界临床药物, 2019, 40(11): 765-770.
- [11] 王家悦, 陈朝霞, 王燕, 等. 基于 STAT3-CASP4/5 通路诱导银屑病细胞焦亡基因调控网络的构建及潜在药物预测 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8142-8152.
- [12] 仪凡, 但文超, 王晓旭, 等. 基于数据挖掘从血论治银屑病的用药规律探究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(13): 1859-1864.
- [13] 姜昊, 马文珂, 时沙沙, 等. 基于数据挖掘的清热解毒方治疗银屑病用药规律及其作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 850-861.
- [14] 靳晓琪. 丹参白芍消丸治疗银屑病的活性与作用机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [15] Jin X Q, Xu H F, Huang C Q, et al. A traditional Chinese medicine formula Danshen Baibixiao ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 749626.
- [16] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- [17] 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.
- [18] Tian J, Lu Y, Zhao Q L, et al. DHA-enriched phosphatidylserine alleviates bisphenol A-induced liver injury through regulating glycerophospholipid metabolism and the SIRT1-AMPK pathway [J]. *Heliyon*, 2024, 10(14): e34835.
- [19] Li B, Jiao S W, Guo S Q, et al. Deep eutectic solvent self-assembled reverse nanomicelles for transdermal delivery of sparingly soluble drugs [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 272.
- [20] Sun Y M, Wang J H, Hu P Y, et al. Molecular mechanism through which *Tripterygium hypoglaucom* (Lévl.) Hutch alleviates psoriasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 181: 117647.
- [21] Liu L J, Zhang H L, Tang X R, et al. Geniposide

- ameliorates psoriatic skin inflammation by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B p65 signaling pathway and MMP9 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133: 112082.
- [22] 刘闯, 张鑫妍, 安月鹏, 等. 中药调控核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路治疗银屑病的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(7): 1906-1912.
- [23] Guo H K, Li M, Liu H M. Selenium-rich yeast peptide fraction ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice by inhibiting inflammation via MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2112.
- [24] Guo J, Zhang H Y, Lin W R, *et al.* Signaling pathways and targeted therapies for psoriasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 437.
- [25] Meng Z N, Li M Y, Wang X L, *et al.* *Inula britannica* ameliorates alcohol-induced liver injury by modulating SIRT1-AMPK/Nrf2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 667-678.
- [26] Liu Q Y, Zhai T, Ma L, *et al.* CD1d affects the proliferation, migration, and apoptosis of human papillary thyroid carcinoma TPC-1 cells via regulating MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Open Med*, 2024, 19(1): 20240949.
- [27] Kong Y F, Wei X H, Zhang D, *et al.* Prevention and treatment of anthracycline-induced cardiotoxicity: A bibliometric analysis of the years 2000-2023 [J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e29926.
- [28] Wu M L, Wang Q, Li X D, *et al.* Gut microbiota-derived 5-hydroxyindoleacetic acid from pumpkin polysaccharides supplementation alleviates colitis via MAPKs-PPAR γ /NF- κ B inhibition [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 264(Pt 1): 130385.
- [29] 陈翔, 崔勇, 陈宏翔, 等. 甲氨蝶呤皮下注射治疗银屑病专家指导意见 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2024, 38(1): 10-14.
- [30] Hamed K M, Dighriri I M, Baomar A F, *et al.* Overview of methotrexate toxicity: A comprehensive literature review [J]. *Cureus*, 2022, 14(9): e29518.
- [31] Asaduzzaman M, Karim M R, Saha P, *et al.* Accidental methotrexate overdose leading to multisystem toxicity: A case report [J]. *Toxicol Rep*, 2024, 13: 101821.
- [32] Zhao X Y, Wang L Q, Zhang H, *et al.* Protective effect of artemisinin on chronic alcohol induced-liver damage in mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 52: 221-226.
- [33] Zhang L, Lu L Q, Jiang S Q, *et al.* Salvianolic acid extract prevents *Tripterygium wilfordii* polyglycosides-induced acute liver injury by modulating bile acid metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 327: 117939.
- [34] 世界中医药学会联合会. 寻常型银屑病中西医结合诊疗指南 [J]. *世界中医药*, 2024, 19(17): 2535-2544.
- [35] 史玉玲. 《中国银屑病诊疗指南 (2023 版)》解读 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2023, 44(5): 631-633.
- [36] 许秋玲, 宁俊博, 罗佳棋, 等. 常见自身免疫性疾病动物模型研究进展 [J]. *广东药科大学学报*, 2024, 40(4): 143-148.

[责任编辑 李亚楠]