

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.23.014

实验研究

凉血退紫方对过敏性紫癜血热证模型大鼠皮肤组织 RAF/MEK/ERK 通路及血清 NETs 标志物的影响

姜盈盈¹, 杨满翔², 袁振华¹, 席乐迎¹, 蔡明阳¹, 马迪雅², 李一凡²,
牛宇航², 刘润泽², 曹嘉文², 陈熙麟², 任献青^{1,2}✉

1. 河南中医药大学第一附属医院儿科医院, 河南省郑州市金水区人民路 19 号, 450000; 2. 河南中医药大学儿科医学院

[摘要] **目的** 从快速加速纤维肉瘤激酶 (RAF) /丝裂原活化蛋白激酶 (MEK) /细胞外信号调节激酶 (ERK) 通路调控中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 失衡探讨凉血退紫方治疗过敏性紫癜 (HSP) 血热证的可能作用机制。**方法** 将 70 只 Wistar 大鼠随机分为空白组 14 只和造模组 56 只。造模组大鼠采用改良的卵白蛋白 (OVA) 致敏联合热性中药灌胃构建 HSP 血热证大鼠模型, 造模周期共 8 周。将造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、复方甘草酸苷组、凉血退紫方组、RAF 抑制组、凉血退紫方+RAF 激动组, 每组 10 只, 另取空白组 10 只。造模第 11 周开始, 空白组、模型组大鼠在 0.9% 氯化钠溶液 0.5 ml/ (kg·d) 腹腔注射基础上给予 1 ml/ (100 g·d) 超纯水灌胃; 凉血退紫方组、复方甘草酸苷组在 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射基础上分别给予 7.5 g/ (kg·d) 凉血退紫颗粒混悬液灌胃、13.5 mg/ (kg·d) 复方甘草酸苷混悬液灌胃; RAF 抑制组予 1 mg/ (kg·d) GW5074 混悬液腹腔注射及超纯水灌胃; 凉血退紫方+RAF 激动组予 7.5 g/ (kg·d) 凉血退紫颗粒混悬液灌胃及 1 mg/ (kg·d) 紫杉醇混悬液腹腔注射。各组干预均每天 1 次, 持续 4 周。干预结束后, HE 染色法观察大鼠皮肤组织病理形态, 免疫荧光法检测皮肤组织免疫球蛋白 A (IgA) 沉积情况, ELISA 法检测大鼠血清中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 含量, 比色法检测大鼠血清髓过氧化物酶 (MPO) 水平, RT-qPCR 法检测大鼠皮肤组织 RAF、MEK、ERK mRNA 表达水平, Western Blot 法检测大鼠皮肤组织 RAF、MEK、ERK、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 (p-MEK)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 水平。**结果** 空白组大鼠皮肤组织正常, 模型组大鼠皮肤组织出现中性粒细胞浸润、红细胞破裂出血; 各药物干预组大鼠皮肤组织中中性粒细胞浸润、出血渗出现象明显减轻, 且以凉血退紫方组大鼠改善效果显著。与空白组比较, 模型组大鼠皮肤组织 IgA 荧光强度增强, 血清 NE、MPO、TNF- α 及 VCAM-1 含量升高, RAF、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达升高, RAF 蛋白水平及 p-MEK/MEK、p-ERK/ERK 比值升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 各药物干预组大鼠皮肤组织 IgA 荧光强度减弱, 血清 NE、MPO、TNF- α 及 VCAM-1 水平降低 ($P<0.05$); 凉血退紫方组及 RAF 抑制组大鼠皮肤组织 RAF、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达降低, RAF 蛋白水平及 p-MEK/MEK、p-ERK/ERK 比值降低 ($P<0.05$)。与凉血退紫方+RAF 激动组比较, 复方甘草酸苷组、凉血退紫方组及 RAF 抑制组大鼠皮肤组织 IgA 荧光强度减弱, 血清 NE、MPO、TNF- α 及 VCAM-1 含量降低, MEK mRNA 表达及 p-MEK/MEK 比值降低 ($P<0.05$)。**结论** 凉血退紫方治疗过敏性紫癜血热证的可能机制是抑制皮肤组织 RAF/MEK/ERK 通路, 减少 NETs 过度形成, 从而降低皮下小血管 IgA 沉积及机体炎症反应。

[关键词] 过敏性紫癜; 血热证; 免疫球蛋白 A; 中性粒细胞胞外诱捕网; 快速加速纤维肉瘤激酶; 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞外信号调节激酶; 凉血退紫方

基金项目: 国家自然科学基金 (82374519); 河南省省级科技研发计划联合基金 (优势学科培育类) 项目 (222301420022); 河南省中原英才计划 (育才系列) 项目 (豫组通 [2021] 44 号); 中国博士后科学基金 (2025M773948); 河南省卫生健康委员会国家中医药传承创新中心联合共建科研专项 (2024ZXZX1056); 河南省中医“双一流”创建科学研究专项 (HSRP-DFCTCM-2023-8-07、HSRP-DFCTCM-2023-3-02)

✉ 通讯作者: renxq723@163.com

过敏性紫癜(henoch-schönlein purpura, HSP), 又称免疫球蛋白 A 血管炎(immunoglobulin A vasculitis, IgAV), 是儿童期最常见的系统性小血管炎, 炎性细胞浸润、血管内皮细胞损伤是其重要病理基础^[1]。目前, HSP 的“新多重打击”发病假说强调中性粒细胞异常激活, 诱导快速加速纤维肉瘤激酶(RAF)/丝裂原活化蛋白激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)通路级联反应, 并释放含有脱氧核糖核酸(DNA)框架的胞外网状结构, 即中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)。NETs 持续过度生成或清除障碍, 可在局部组织聚集并附着于血管内皮, 释放促炎因子和细胞毒性蛋白酶, 直接诱导血管内皮功能障碍, 造成全身小血管损伤^[2-3], 加剧 HSP 的系统性血管炎过程。已有研究^[4]证实, HSP 患者血液、皮肤及肾组织中广泛存在 NETs, 其表达水平与免疫球蛋白 A (IgA) 沉积及疾病活动呈正相关。

目前现代医学治疗 HSP 主要依赖糖皮质激素和免疫抑制剂, 长期使用可能导致感染、骨髓抑制等严重不良反应, 增加多脏器损伤的风险^[5]。HSP 可归属于中医学“紫癜风”“葡萄疫”“肌衄”等范畴^[6], 血热妄行证最为多见^[7]。本团队根据多年临床经验, 将 HSP 的中医核心病机总结为伏邪潜内、新感触发、络脉受损^[8], 并创制凉血退紫方, 该方具有清热凉血、解毒通络的功效。前期网络药理学^[9]及蛋白组学^[10]研究提示, 其治疗 HSP 的作用机制可能聚焦于 RAF、MEK、ERK 等关键分子, 参与调节 NETs 异常形成及中性粒细胞活化, 减轻血管炎症损伤。因此, 本研究以 HSP 血热证模型大鼠为对象, 从 RAF/MEK/ERK 信号通路调控 NETs 失衡角度探讨凉血退紫方治疗 HSP 的可能作用机制, 为其应用防治 HSP 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康 Wistar 雄性大鼠 70 只, 4 周龄, 体重(80±20) g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2020-0002。本研究在河南中医药大学动物实验中心完成, 并经河南中医药大学伦理委员会审批(批件号: IACUC-202402020)。SPF 屏障环境内饲养, 温度 20~26℃、相对湿度 40%~70%, 12 h 光暗循环, 自由进食饮水, 适应性喂养 1 周。

1.2 药物

干姜、芫荽、胡椒(批号分别为 220401、2210271、2110251)购于河南中医药大学第一附属医院门诊中药房, 将以上 3 味中药粉碎、过筛, 按质量比 1:1:1 加入适量超纯水煎煮, 制成质量分数为 0.15 g/ml 的水煎液, 充分过滤备用。凉血退紫方颗粒组成: 生地黄 10 g, 牡丹皮 10 g, 紫草 10 g, 白芍 10 g, 忍冬藤 15 g, 络石藤 12 g, 川芎 10 g, 炙甘草 6 g, 购自四川新绿药业科技发展有限公司(批号分别为 21080006、21100036、21070158、21100360、21080141、21100052、21100182、21100287)。复方甘草酸苷片(规格: 25 mg/片, 批号: B211001B1, 乐普药业股份有限公司)。

1.3 主要试剂与仪器

卵白蛋白(OVA, 货号: A5503)、弗氏完全佐剂(货号: F5881), 美国 Sigma 公司; RAF 抑制剂 GW5074(货号: HY-10542), 美国 MedChem-Express 公司; RAF 激活剂紫杉醇(货号: sc-201439)、白细胞分化抗原 34(CD34)抗体(货号: Sc-74499), 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; IgA 抗体(货号: PAA546Ra01), 武汉云克隆科技股份有限公司; 大鼠中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)ELISA 试剂盒(货号: ELK1521), 武汉科鹿生物科技有限公司; 大鼠髓过氧化物酶(MPO)比色法检测试剂盒(货号: E-BC-K074-M)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 货号: E-EL-R2856)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1, 货号: E-EL-R1061)ELISA 试剂盒, 武汉 Elab-science 公司; Trizol(货号: 15596026), 美国 Life Technology 公司; HE 染色试剂盒(货号: G1076)、基因组 DNA 去除与反转录试剂盒(货号: G3337)、SYBR Green qPCR 预混液(货号: G3326)、RAF 抗体(货号: GB11780)、MEK 抗体(货号: GB11600)、磷酸化 MEK(p-MEK)抗体(货号: GB115603)、ERK 抗体(货号: GB11560)、磷酸化 ERK(p-ERK)抗体(货号: GB113492)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号: GB15002), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)溶液(货号: G1401)、二辛可酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(货号: PC0020), 北京索莱宝科技有限公司。

JB-P5 型组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机(上海徕卡公司); Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜(日本尼康公司); HBS-1096A 型酶标仪(南京德铁生物科技有

限公司); ETC811 型 PCR 仪 (北京东胜创新公司); Mini Trans-Blot 型电泳转印仪 (美国 Bio-Rad 公司); SCG-W3000 型化学发光仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.4 造模方法

将 70 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为空白组 14 只和造模组 56 只。造模组大鼠采用改良的 OVA 抗原致敏联合热性中药灌胃建立 HSP 血热证大鼠模型。1) 血热证建立^[10]: 造模组大鼠每天灌胃 0.15 g/kg 的干姜、荜茇、胡椒制备而成的热性中药水煎液, 每天 1 次, 灌胃量为 1 ml/100 g, 连续 3 周。空白组大鼠予等体积超纯水灌胃。2) 连续抗原刺激致敏^[11]: 第 4 周开始将 OVA、弗氏完全佐剂等体积混合至终浓度为 10 mg/ml 的乳化液。造模组每只大鼠腹腔注射乳化液 0.5 ml, 每周 1 次, 连续 3 周刺激致敏。空白组予腹腔注射等体积的 0.9% 氯化钠溶液。3) 抗原多次冲击激发过敏反应^[11]: 第 7 周开始, 大鼠皮肤剃毛, 造模组每只大鼠尾静脉注射 10 mg/ml 的 OVA 溶液 0.5 ml, 随机在背部皮肤选取 5 处进行皮内联合皮下注射 0.3% OVA 溶液 (每处 0.4 ml), 每只共注射 2 ml, 每隔 3 天皮内联合皮下激发 1 次, 共激发 5 次。空白组予等体积的 0.9% 氯化钠溶液尾静脉及皮内联合皮下注射。

造模第 10 周末按照随机数字表法选取空白组、造模组大鼠各 3 只, 取背部皮肤组织约 1 cm×1 cm, 制作 5 μm 石蜡切片用于 HE 染色及免疫荧光染色, 进行模型评价。HSP 大鼠造模成功的评价依据^[10-11]: 1) 皮肤出现皮疹, 色红高出皮肤, 周围红肿; 2) 镜下皮疹区血管壁及管周可见炎性细胞浸润、红细胞破裂和出血等血管炎表现; 3) 免疫荧光检测皮肤血管壁可见 IgA 沉积。

1.5 动物分组及干预方法

56 只造模大鼠中 1 只死亡、2 只未出现皮疹、3 只用于模型评价。剩余 50 只造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组、复方甘草酸苷组、凉血退紫方组、RAF 抑制组、凉血退紫方+RAF 激动组, 每组 10 只, 另取空白组 10 只。造模第 11 周开始, 凉血退紫方组予临床等效剂量^[12]的凉血退紫颗粒混悬液 7.5 g/ (kg·d) 灌胃及 0.9% 氯化钠溶液 0.5 ml/ (kg·d) 腹腔注射; 复方甘草酸苷组予复方甘草酸苷混悬液 13.5 mg/ (kg·d) 灌胃及 0.9% 氯化钠溶液 0.5 ml/ (kg·d) 腹腔注射; RAF 抑制组予 1 ml/ (100 g·d) 超纯水灌胃及 GW5074 混悬液

1 mg/ (kg·d) 腹腔注射; 凉血退紫方+RAF 激动组予凉血退紫颗粒混悬液 7.5 g/ (kg·d) 灌胃及紫杉醇混悬液 1 mg/ (kg·d) 腹腔注射。空白组和模型组大鼠分别予 1 ml/ (100 g·d) 超纯水灌胃及 0.9% 氯化钠溶液 0.5 ml/ (kg·d) 腹腔注射。各组均每天灌胃 1 次, 腹腔注射 1 次, 持续 4 周。

1.6 标本采集与处理

药物干预结束次日, 称取大鼠体质量, 背部皮肤剃毛, 用 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血 5 ml, 置于红色采血管, 静置后离心 (4 °C, 3000 r/min, 10 min, r=8.5 cm), 取上清液待测; 取背部皮肤组织约 1 cm×1 cm, 部分组织置于 4% 多聚甲醛中固定、石蜡包埋、制备切片 (5 μm), 剩余组织置于冻存管, 液氮速冻后置于 -80 °C 中备用。采用随机数字表法各组选取 6 只大鼠的血清用于 ELISA 及比色法实验, 选取 3 只大鼠的背部皮肤组织用于 HE 染色、免疫荧光染色、RT-qPCR 及 Western Blot 实验。

1.7 观察指标与方法

1.7.1 皮肤组织病理学形态 采用 HE 染色法, 大鼠皮肤组织切片进行 HE 染色、封片, 按照试剂盒说明书步骤进行, 显微镜下观察皮肤炎症细胞浸润及组织形态变化情况。

1.7.2 皮肤组织 IgA 沉积情况 采用免疫荧光法检测, 皮肤组织切片脱蜡、抗原修复, 进行 IgA (1:50) 和 CD34 (1:50) 的免疫荧光双标染色, 镜检采集图像, Image J 1.54f 软件分析 IgA 沉积荧光强度, 空白组 IgA 目标荧光强度值取均值, 然后其余各组将 IgA 目标荧光强度值除以空白组的比值均值, 使空白组归一化值=1, 其他组为倍数变化。

1.7.3 血清 NE、MPO、TNF-α、VCAM-1 含量

采用 ELISA 法检测大鼠血清 NE、TNF-α、VCAM-1 含量, 比色法检测大鼠血清 MPO 含量, 具体步骤按照试剂盒说明书进行, 根据酶标仪检测的各样本吸光度 (OD) 值计算含量。

1.7.4 皮肤组织 RAF、MEK、ERK mRNA 表达

采用 RT-qPCR 法检测, 取约 20 mg 皮肤组织, 加入 1 ml Trizol, 研磨、分离、离心取上清, 提取 RNA 并测定浓度、纯度, 进行反转录、实时荧光定量 PCR 分析。反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 进行 40 个循环。mRNA 表达量以 GAPDH 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行计算。引物序列的合成均由苏州金唯智生物科技有限公司完成, 引物序列见表 1。

表 1 大鼠皮肤组织 *RAF*、*MEK*、*ERK*、*GAPDH* 引物序列

Table 1 Primer sequences for *RAF*, *MEK*, *ERK*, and *GAPDH* in skin tissue of rats

引物	序列 (5'→3')	长度/bp
<i>RAF</i>	上游: GATGCTGTCTACTCGGATTGGC	116
	下游: GAAGTTGCTCTGGAGTTGGGTC	
<i>MEK</i>	上游: CGTCAATGAGCCTCCTCCAAA	162
	下游: AAGTCTACCTCCTCGGCATCAG	
<i>ERK1</i>	上游: GCCGCGCTACACTAATCTCT	784
	下游: GTCAGCGTTTGGGAACAACC	
<i>ERK2</i>	上游: AATTGGTCAGGACAAGGGCT	105
	下游: GAGTGGGTAAGCTGAGACGG	
<i>GAPDH</i>	上游: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	下游: TTTGAGGCTGCAGCGAACTT	

注: *RAF*, 快速加速纤维肉瘤激酶; *MEK*, 丝裂原活化蛋白激酶; *ERK1*, 细胞外信号调节激酶 1; *ERK2*, 细胞外信号调节激酶 2; *GAPDH*, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.7.5 皮肤组织 *RAF* 蛋白水平及 *p-MEK/MEK*、*p-ERK/ERK* 比值 采用 Western Blot 法检测, 取约 40 mg 皮肤组织研磨、裂解、提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 电泳分离, 室温封闭, 加入 *RAF*

(1 : 500)、*MEK* (1 : 1000)、*p-MEK* (1 : 500)、*ERK* (1 : 500)、*p-ERK* (1 : 500) 和 *GAPDH* (1 : 2000) 一抗, 4 ℃ 孵育摇床过夜, 再将膜与二抗 (1 : 5000) 室温孵育、显影、拍照, AI WBwell™ 分析软件分析条带灰度值, 将目标蛋白灰度值除以内参 (或总蛋白) 灰度值, 再除以空白组的比值均值, 使空白组归一化值=1, 其他组为倍数变化。

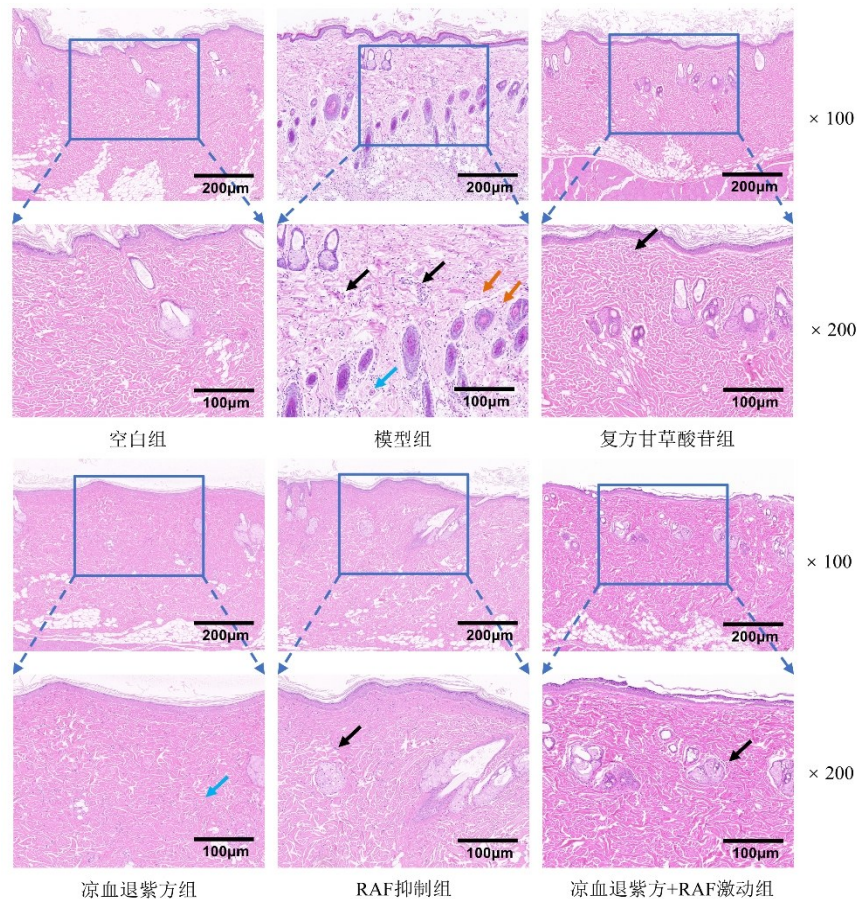
1.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。本研究计量资料均符合正态分布, 以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐则组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐则采用 Tamhane's *T*² 检验。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠皮肤组织形态学比较

图 1 示, 空白组大鼠皮肤组织表皮完整, 结构清晰, 未见炎性细胞浸润。模型组大鼠皮肤组织伴



注: 图中黑色箭头指示为中性粒细胞, 橙色箭头指示为出血渗出, 蓝色箭头指示为毛细血管充血扩张。

图 1 各组大鼠皮肤组织形态比较 (HE 染色)

Figure 1 Comparison of skin tissue morphology of rats in each group (HE staining)

有中等量的中性粒细胞浸润，红细胞破裂出血，毛细血管充血扩张。复方甘草酸苷组、RAF抑制组和凉血退紫方+RAF激动组大鼠皮肤组织中性粒细胞浸润、出血渗出现象明显减轻。凉血退紫方组大鼠未见中性粒细胞浸润，出血渗出现象减轻，病理改善效果显著。

2.2 各组大鼠皮肤组织 IgA 沉积情况比较

表 2 示，与空白组比较，模型组大鼠皮肤组织 IgA 相对荧光强度增强 ($P<0.05$)；与模型组比较，各药物干预组大鼠皮肤组织 IgA 相对荧光强度减弱

表 2 各组大鼠皮肤组织 IgA 相对荧光强度比较
Table 2 Comparison of the relative IgA immunofluorescence intensity in skin tissues of rats among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	相对荧光强度
空白组	3	1.00±0.11
模型组	3	2.53±0.20 ^{a)}
复方甘草酸苷组	3	1.47±0.12 ^{b)} ^{c)}
凉血退紫方组	3	1.40±0.11 ^{b)} ^{c)}
RAF抑制组	3	1.25±0.06 ^{b)} ^{c)}
凉血退紫方+RAF激动组	3	1.89±0.16 ^{b)}

注：IgA，免疫球蛋白 A。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；
c) 与凉血退紫方+RAF激动组比较， $P<0.05$ 。

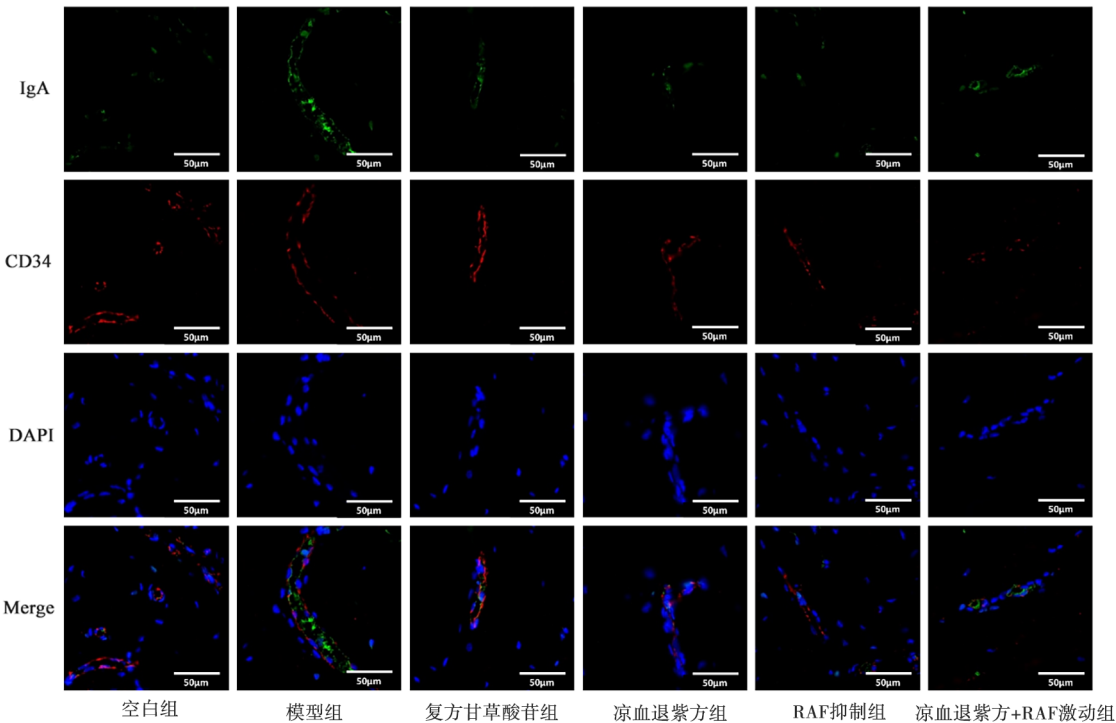
($P<0.05$)；与凉血退紫方+RAF激动组比较，复方甘草酸苷组、凉血退紫方组及 RAF抑制组大鼠皮肤组织 IgA 相对荧光强度减弱 ($P<0.05$)。各组大鼠皮肤组织 IgA 沉积荧光图见图 2。

2.3 各组大鼠血清 NE、MPO、TNF-α、VCAM-1 含量比较

表 3 示，与空白组比较，模型组大鼠血清 NE、MPO、TNF-α 及 VCAM-1 含量升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，各干预组大鼠血清 NE、MPO、TNF-α 及 VCAM-1 含量降低 ($P<0.05$)；与凉血退紫方+RAF激动组比较，复方甘草酸苷组、凉血退紫方组及 RAF抑制组大鼠血清 NE、MPO、TNF-α 及 VCAM-1 含量降低 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠皮肤组织 RAF、MEK、ERK mRNA 表达比较

表 4 示，与空白组比较，模型组大鼠皮肤组织 RAF、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，复方甘草酸苷组大鼠皮肤组织 MEK mRNA 表达降低，凉血退紫方组及 RAF抑制组大鼠皮肤组织 RAF、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达降低，凉血退紫方+RAF激动组大鼠皮肤组织 RAF、MEK mRNA 表达降低 ($P<0.05$)；



注：IgA，免疫球蛋白 A；CD34，白细胞分化抗原 34，用于标记血管内皮细胞；DAPI，4',6-二脒基-2-苯基吡啶，用于标记细胞核；Merge 为 IgA、CD34 和 DAPI 的合图。

图 2 各组大鼠皮肤组织 IgA 沉积荧光图 (×400)
Figure 2 Fluorescence map of IgA deposition in skin tissue of rats in each group (×400)

表3 各组大鼠血清NE、MPO、TNF-α、VCAM-1含量比较

Table 3 Comparison of serum levels of NE, MPO, TNF-α, and VCAM-1 in rats among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NE/ng·ml ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹	TNF-α/ng·ml ⁻¹	VCAM-1/ng·ml ⁻¹
空白组	6	67.69±5.27	409.63±53.36	155.44±17.22	86.76±7.46
模型组	6	98.55±11.34 ^{a)}	882.13±138.77 ^{a)}	236.68±20.44 ^{a)}	146.33±11.07 ^{a)}
复方甘草酸苷组	6	70.01±6.33 ^{b) c)}	470.56±33.54 ^{b) c)}	175.05±10.14 ^{b) c)}	101.78±7.02 ^{b) c)}
凉血退紫方组	6	70.80±6.75 ^{b) c)}	412.87±75.22 ^{b) c)}	164.60±20.18 ^{b) c)}	95.01±6.02 ^{b) c)}
RAF抑制组	6	70.41±2.58 ^{b) c)}	408.33±69.52 ^{b) c)}	162.95±7.68 ^{b) c)}	92.72±5.69 ^{b) c)}
凉血退紫方+RAF激动组	6	81.48±5.09 ^{b)}	624.81±36.04 ^{b)}	199.92±22.66 ^{b)}	123.37±10.92 ^{b)}

注：NE，中性粒细胞弹性蛋白酶；MPO，髓过氧化物酶；TNF-α，肿瘤坏死因子α；VCAM-1，血管细胞黏附分子1。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与凉血退紫方+RAF激动组比较， $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠皮肤组织RAF、MEK、ERK mRNA相对表达量比较

Table 5 Comparison of RAF, MEK, and ERK mRNA expression levels in skin tissues of rats among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	RAF	MEK	ERK1	ERK2
空白组	3	1.00±0.46	1.00±0.41	1.00±0.06	1.00±0.14
模型组	3	5.86±2.17 ^{a)}	5.41±0.57 ^{a)}	1.82±0.41 ^{a)}	1.66±0.21 ^{a)}
复方甘草酸苷组	3	3.99±2.07	3.97±0.40 ^{b)}	1.47±0.28	1.53±0.23
凉血退紫方组	3	2.20±1.51 ^{b)}	1.85±0.30 ^{b) c)}	1.32±0.18 ^{b)}	1.21±0.06 ^{b)}
RAF抑制组	3	1.70±0.43 ^{b)}	1.85±0.90 ^{b) c)}	1.22±0.10 ^{b)}	1.15±0.15 ^{b)}
凉血退紫方+RAF激动组	3	2.64±0.56 ^{b)}	3.45±0.83 ^{b)}	1.47±0.27	1.42±0.03

注：RAF，快速加速纤维肉瘤激酶；MEK，丝裂原活化蛋白激酶；ERK1，细胞外信号调节激酶1；ERK2，细胞外信号调节激酶2。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与凉血退紫方+RAF激动组比较， $P<0.05$ 。

与凉血退紫方+RAF激动组比较，凉血退紫方组及RAF抑制组大鼠皮肤组织MEK mRNA表达降低($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠皮肤组织RAF蛋白水平及p-MEK/MEK、p-ERK/ERK比值比较

表5示，与空白组比较，模型组大鼠皮肤组织RAF蛋白水平及p-MEK/MEK、p-ERK/ERK比值升

表5 各组大鼠皮肤组织RAF蛋白水平及p-MEK/MEK、p-ERK/ERK比值比较

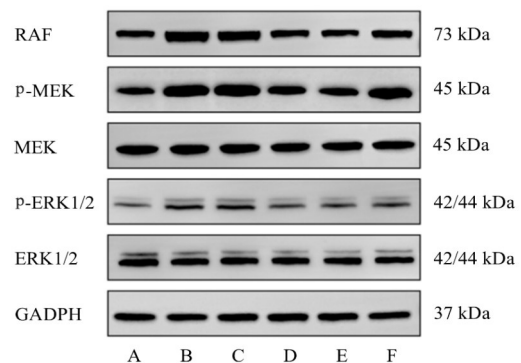
Table 5 Comparison of the protein expression levels of RAF, p-MEK/MEK, and p-ERK/ERK in skin tissues among rat groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	RAF	p-MEK/MEK	p-ERK/ERK
空白组	3	1.00±0.17	1.00±0.07	1.00±0.14
模型组	3	1.99±0.21 ^{a)}	1.64±0.04 ^{a)}	2.53±0.23 ^{a)}
复方甘草酸苷组	3	1.88±0.24	1.57±0.04	2.34±0.28
凉血退紫方组	3	1.03±0.17 ^{b)}	1.03±0.07 ^{b) c)}	1.07±0.13 ^{b)}
RAF抑制组	3	1.02±0.17 ^{b)}	1.02±0.07 ^{b) c)}	1.05±0.15 ^{b)}
凉血退紫方+RAF激动组	3	1.23±0.16 ^{b)}	1.26±0.04 ^{b)}	1.36±0.17 ^{b)}

注：RAF，快速加速性纤维肉瘤激酶；p-MEK，磷酸化丝裂原活化蛋白激酶；MEK，丝裂原活化蛋白激酶；p-ERK，磷酸化细胞外信号调节激酶；ERK，细胞外信号调节激酶。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与凉血退紫方+RAF激动组比较， $P<0.05$ 。

高($P<0.05$)；与模型组比较，凉血退紫方组、RAF抑制组及凉血退紫方+RAF激动组大鼠皮肤组织RAF蛋白水平及p-MEK/MEK、p-ERK/ERK比值降低($P<0.05$)；与凉血退紫方+RAF激动组比较，凉血退紫方组及RAF抑制组大鼠皮肤组织p-MEK/MEK比值降低($P<0.05$)。各组大鼠皮肤组织RAF/MEK/ERK通路相关蛋白电泳图见图3。



注：RAF，快速加速纤维肉瘤激酶；p-MEK，磷酸化丝裂原活化蛋白激酶；MEK，丝裂原活化蛋白激酶；p-ERK1/2，磷酸化细胞外信号调节激酶1/2；ERK1/2，细胞外信号调节激酶1/2；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；A，空白组；B，模型组；C，复方甘草酸苷组；D，凉血退紫方组；E，RAF抑制组；F，凉血退紫方+RAF激动组。

图3 各组大鼠皮肤组织RAF/MEK/ERK通路相关蛋白表达电泳图

Figure 3 Electrophoresis of RAF/MEK/ERK pathway-associated protein expression in skin tissues of rats from different groups

3 讨论

HSP所累及的全身小血管与形态细小、纵横交织、遍布全身的中医之“络脉”相似，二者结构与功能均有相通之处。因此，本团队总结儿童HSP病因关键为“伏邪”，病位在“络”，且小儿肺脾肾常不足、禀赋体弱、邪易侵袭，引而邪动、伏而后发^[8]，故病情易反复迁延、缠绵难愈。既往真实世界研究^[13]发现，HSP患者中血热妄行证占62.20%。小儿体秉属阳，所患热病居多，热为阳邪，最易灼伤血络，迫血妄行，诱发紫癜，故本研究以构建HSP血热证大鼠模型为研究对象。凉血退紫方具清热凉血、祛风通络、活血解毒之功，方中牡丹皮、生地黄清热凉血、活血养阴，为君药；紫草活血、凉血、通络，忍冬藤、络石藤能入络清热活血化瘀、祛风畅络止痛，共为臣药；川芎活血祛瘀、行气止痛，白芍与川芎相配可生血脉、通营阴，为佐药；炙甘草缓急止痛、调和诸药，顾护脾胃，为使药。全方标本兼治，清热不伤阴、止血不留瘀，热清血宁、邪祛络通，使伏邪无所依附。

本研究通过改良的卵白蛋白致敏联合热性中药灌胃成功构建HSP血热证大鼠病证结合模型，以治疗HSP常用的复方甘草酸苷^[5]为阳性对照药，并加入RAF抑制剂、激活剂进行对比，观察凉血退紫方的治疗效果。结果表明，模型组大鼠皮肤组织出现中性粒细胞浸润、红细胞破裂出血等；皮肤组织免疫荧光结果显示皮下小血管壁可见IgA沉积，提示造模成功。经药物干预后，复方甘草酸苷组、RAF抑制组和凉血退紫方+RAF激动组可改善皮肤炎性细胞浸润、减轻皮肤血管损伤程度，凉血退紫方组未见炎性细胞浸润。各药物干预组均可减少皮肤组织IgA沉积，减轻血管损伤程度，但凉血退紫方+RAF激动剂组效果不如其余药物干预组。

IgA沉积于血管壁是HSP的重要特征，研究表明，IgA可与中性粒细胞的Fc α 受体I结合，激活RAF/MEK/ERK通路，使活性氧释放，促进NE和MPO向细胞核易位^[14-15]，染色质和核膜破裂，致NETs过度释放，而阻断该通路可减少NETs形成^[16]。NE和MPO是具有较强细胞毒性的酶，是评估NETs形成状态的生物标志物^[17]。NETs还可诱导TNF- α 等促炎细胞因子的产生，趋化炎症细胞向血管壁黏附，导致VCAM-1增加，引起血管内膜损伤和炎症^[18-19]，从而加剧HSP进展。本研究结果显示，模型组大鼠血清NE、MPO、TNF- α 、VCAM-1含量

及皮肤组织RAF、MEK、ERK1、ERK2 mRNA表达均升高，RAF蛋白水平及p-MEK/MEK、p-ERK/ERK比值亦升高，说明模型组大鼠RAF/MEK/ERK通路激活，诱导NETs过量形成，机体炎症级联反应激活，释放大量促炎因子，促使炎症向血管深层浸润，从而加重大鼠血管内皮损伤。而凉血退紫方组和RAF抑制剂组可降低大鼠血清NE、MPO、TNF- α 、VCAM-1含量，降低RAF、MEK、ERK1、ERK2 mRNA表达和RAF、p-MEK/MEK、p-ERK/ERK水平。与凉血退紫方+RAF激动组比较结果，进一步表明凉血退紫方通过抑制RAF/MEK/ERK通路活性，减少NETs异常形成，抑制炎症因子水平，改善毛细血管通透性，降低血管内皮黏附因子释放，改善机体血管损伤状态，发挥免疫调节作用。复方甘草酸苷也可降低大鼠血清NE、MPO、TNF- α 、VCAM-1含量，但可能并非完全通过RAF/MEK/ERK通路调节NETs稳态失衡发挥改善血管内皮损伤的作用，需进一步研究证实。

综上所述，凉血退紫方可能通过抑制RAF/MEK/ERK通路、减少NETs过度释放，降低机体炎症反应和皮下小血管IgA沉积，从而改善HSP血热证模型大鼠血管内皮损伤程度。本研究仅关注了凉血退紫方对NETs两个标志物的影响，后续将开展高质量的细胞分子实验，深入探究凉血退紫方对NETs形成变化的分子机制，为该方的临床应用提供更坚实的科学证据。

参考文献

- [1]XU SS, HAN SS, DAI YL, et al. A review of the mechanism of vascular endothelial injury in immunoglobulin a vasculitis [J]. Front Physiol, 2022, 13: 833954. doi: 10.3389/fphys.2022.833954.
- [2]HASTINGS MC, RIZK DV, KIRYLUK K, et al. IgA vasculitis with nephritis: update of pathogenesis with clinical implications[J]. Pediatr Nephrol, 2022, 37(4): 719-733.
- [3]XU LY, LI YZ, WU XC. IgA vasculitis update: epidemiology, pathogenesis, and biomarkers[J]. Front Immunol, 2022, 13: 921864. doi:10.3389/fimmu.2022.921864.
- [4]BERGQVIST C, SAFI R, HASBANI GEL, et al. Neutrophil extracellular traps are present in immune-complex mediated cutaneous small vessel vasculitis and correlate with the production of reactive oxygen species and the severity of vessel damage[J]. Acta Derm Venereol, 2020, 100(17): adv00281. doi:10.2340/00015555-3363.
- [5]UMEDA C, FUJINAGA S, ENDO A, et al. Preventive

- effect of tonsillectomy on recurrence of Henoch-Schönlein purpura nephritis after intravenous methylprednisolone pulse therapy [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2020, 250(1): 61-69.
- [6] 丁樱, 孙晓旭, 毕玲莉, 等. 过敏性紫癜中医诊疗指南 [J]. *中医儿科杂志*, 2011, 7(6): 1-4.
- [7] 张霞, 徐向宇, 于文静, 等. 1228 例过敏性紫癜儿童中医证候分布规律研究 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(18): 1577-1579, 1595.
- [8] 袁振华, 任献青, 丁樱, 等. 基于络病学说探讨小儿过敏性紫癜辨治规律 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(1): 75-78.
- [9] 李伟霞, 许爽, 陈毓龙, 等. 基于网络药理学和代谢组学探讨凉血退紫合剂治疗过敏性紫癜的潜在成分和作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(12): 3327-3344.
- [10] 许爽, 席乐迎, 蔡明阳, 等. 凉血退紫方治疗过敏性紫癜的作用机制 [J]. *世界中医药*, 2025, 20(11): 1912-1922.
- [11] 潘仕红, 钟建桥. 简化版过敏性紫癜大鼠模型的构建与鉴定 [J]. *四川医学*, 2021, 42(7): 669-672.
- [12] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算 [J]. *江西医学院学报*, 1997, 37(4): 41.
- [13] 燕丽, 王连心, 谢雁鸣, 等. 真实世界中过敏性紫癜的发病特点及中医证候分布 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(21): 1872-1876.
- [14] BURGNER SS, SCHRODER K. Neutrophil extracellular traps in host defense [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12(7): a037028.
- [15] HAKKIM A, FUCHS TA, MARTINEZ NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(2): 75-77.
- [16] YANG SC, CHEN PJ, CHANG SH, et al. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 154: 384-396. doi:10.1016/j.bcp.2018.06.003.
- [17] LEFRANÇAIS E, MALLAVIA B, ZHUO HJ, et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(3): e98178.
- [18] DUMONT C, MÊROUANI A, DUCRUET T, et al. Clinical relevance of membrane attack complex deposition in children with IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura [J]. *Pediatr Nephrol*, 2020, 35: 843-850. doi:10.1007/s00467-019-04445-x.
- [19] PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(2): 134-147.

Effect of *Liangxue Tuizi Formula* (凉血退紫方) on RAF/MEK/ERK Pathway in Skin Tissue and Serum NETs Biomarkers in Henoch-Schönlein Purpura Model Rats with Blood Heat Syndrome

JIANG Yingying¹, YANG Manxiang², YUAN Zhenhua¹, XI Leying¹, CAI Mingyang¹, MA Diya², LI Yifan², NIU Yuhang², LIU Runze², CAO Jiawen², CHEN Xilin², REN Xianqing^{1,2}

1. Pediatric Hospital, First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000; 2. College of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of *Liangxue Tuizi Formula* (凉血退紫方, LXTZF) in treating Henoch-Schönlein Purpura (HSP) by examining its regulatory effect on neutrophil extracellular trap (NETs) dysregulation via the rapidly accelerated fibrosarcoma kinase (RAF)/mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. **Methods** Seventy Wistar rats were randomly allocated into a blank control group (n=14) and a modeling group (n=56). Rats in the modelling group underwent an eight-week modelling period to establish HSP rat models with blood-heat syndrome via modified ovalbumin (OVA) induction method combined with oral administration of heat-property Chinese herbal medicine. Fifty successfully modeled rats were subsequently randomly divided into five groups (n=10 per group), model group, compound glycyrrhizin group, LXTZF group, RAF inhibitor group, and LXTZF + RAF agonist group. Additionally, 10 rats were selected from the original blank control group for the final experiment. From the 11th week of modelling, rats in the blank control group and the model group received 1 ml/(100 g·d) ultrapure water via oral administration, in addition to 0.5 ml/(kg·d) 0.9% sodium chloride solution via intraperitoneal injection. The LXTZF group and the compound glycyrrhizin group received 7.5 g/(kg·d) LXTZF granule suspension via gavage, 13.5 mg/(kg·d) compound glycyrrhizin suspension via gavage, respectively. The RAF inhibitor group received 1 mg/(kg·d) GW5074 suspension via intraperitoneal injection and ultrapure water via oral administration; the LXTZF + RAF agonist group received

7.5 g/(kg·d) LXTZF granule suspension via gavage and 1 mg/(kg·d) paclitaxel suspension via intraperitoneal injection. All administrations were performed once daily for 4 weeks. After intervention, skin tissue histopathology was examined by hematoxylin and eosin (H&E) staining, immunoglobulin A (IgA) deposition was assessed via immunofluorescence, serum levels of neutrophil elastase (NE), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), serum myeloperoxidase (MPO) level was determined by a colorimetric assay; the mRNA expression levels of *RAF*, *MEK*, and *ERK* in skin tissue were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); and the protein expression of RAF, MEK, ERK, as well as phosphorylated MEK (p-MEK) and phosphorylated ERK (p-ERK), were analyzed by Western Blot. **Results** Skin tissue in the blank control group rats remained normal, whereas the model group exhibited neutrophil infiltration and haemorrhage with red blood cell rupture. In all drug intervention groups, neutrophil infiltration and haemorrhagic exudation reduced markedly, with LXTZF group demonstrating the most pronounced improvement. Compared with the blank control group, rats in the model group exhibited enhanced IgA fluorescence intensity in skin tissue, elevated serum levels of NE, MPO, TNF- α and VCAM-1, increased mRNA expression of *RAF*, *MEK*, *ERK1* and *ERK2*, as well as heightened RAF protein levels and p-MEK/MEK and p-ERK/ERK ratios ($P < 0.05$). Compared with the model group, the drug intervention groups exhibited reduced IgA fluorescence intensity in skin tissue, along with decreased serum levels of NE, MPO, TNF- α , and VCAM-1 ($P < 0.05$). In LXTZF group and RAF inhibition groups, reduced mRNA expression of *RAF*, *MEK*, *ERK1*, and *ERK2* was observed in rat skin tissue, alongside decreased RAF protein levels and reduced p-MEK/MEK and p-ERK/ERK ratios ($P < 0.05$). Compared with LXTZF + RAF agonist group, the compound glycyrrhizin group, LXTZF group, and RAF inhibitor group exhibited reduced IgA fluorescence intensity in skin tissue, decreased serum NE, MPO, TNF- α , and VCAM-1 levels, and decreased MEK mRNA expression and p-MEK/MEK ratio ($P < 0.05$). **Conclusion** The potential mechanism by which LXTZF treats Henoch-Schönlein purpura with blood heat syndrome may involve blocking the RAF/MEK/ERK signaling pathway in skin tissue, and suppressing excessive formation of NETs, thereby reducing IgA deposition in dermal microvessels and attenuating systemic inflammatory responses.

Keywords Henoch-Schönlein purpura; blood heat syndrome; immunoglobulin A; neutrophil extracellular traps; rapidly accelerated fibrosarcoma kinase; mitogen-activated protein kinase; extracellular signal-regulated kinase; *Liangxue Tuizi Formula* (凉血退紫方)

(收稿日期: 2025-06-17; 修回日期: 2025-07-21)

[编辑: 邓媛]