

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.19.015

土茯苓、乌梅及其配伍对银屑病样模型小鼠皮损组织炎症因子及 Notch 信号通路的影响

刘丽娟^{1,2}, 吴亚运², 赵亚², 赵瑞芝^{1,2}✉

1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东省广州市越秀区大德路 111 号, 510120; 2. 广州中医药大学第二附属医院

[摘要] **目的** 探讨土茯苓、乌梅及其配伍对咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型的干预作用及其可能的作用机制。**方法** 将 60 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组、土茯苓+乌梅组、土茯苓组、乌梅组, 每组 10 只。各给药组小鼠提前预防性给药 3 天, 土茯苓组、乌梅组、土茯苓+乌梅组小鼠分别给予相应药物 1.95、0.78、2.73 g/(kg·d) 灌胃, 甲氨蝶呤组给予甲氨蝶呤片 1 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组及模型组给予 10 ml/(kg·d) 纯净水灌胃, 每日 1 次。除正常组外, 其余各组小鼠第 4 天开始每日上午涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 62.5 mg 制备银屑病样小鼠模型, 每日下午各组继续按预防性给药剂量灌胃, 连续 6 天。观察记录各组小鼠的一般情况, 对皮损组织进行银屑病面积和严重程度指数 (PASI) 评分, 并用金 (正均) 氏公式定量分析土茯苓配伍乌梅的增效作用; HE 染色观察小鼠皮损组织的病理学变化并进行 Baker 评分; ELISA 法检测皮损组织白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 12 (IL-12)、白细胞介素 17 (IL-17)、白细胞介素 23 (IL-23) 含量; Western Blot 法检测皮损组织神经源性位点缺口同源蛋白 1 抗体 (Notch1)、Hes 家族 BHLH 转录因子 1 抗体 (Hes1)、锯齿典型 Notch 配体 1 抗体 (Jagged1) 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠毛发、精神状态等一般情况较差, 皮损区可见明显的红斑、鳞屑及皮损浸润增厚, PASI 评分、Baker 评分升高, 皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-23 含量及 Notch1、Hes1 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 土茯苓组、乌梅组、土茯苓+乌梅组、甲氨蝶呤组小鼠一般情况改善, 皮损区红斑和鳞屑有不同程度的减少, PASI 评分降低, 皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-23 含量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 土茯苓组、土茯苓+乌梅组、甲氨蝶呤组小鼠 Baker 评分降低, 土茯苓+乌梅组、甲氨蝶呤组小鼠 Notch1、Hes1 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与土茯苓组、乌梅组比较, 土茯苓+乌梅组小鼠 PASI 评分、Baker 评分降低 ($P<0.05$); 与土茯苓组比较, 土茯苓+乌梅组小鼠皮损组织中 Notch1 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与甲氨蝶呤组比较, 土茯苓+乌梅组小鼠各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。金 (正均) 氏公式计算得出土茯苓+乌梅联用指数 Q 值达 1.29 (>1.15), 表明土茯苓、乌梅配伍表现为协同增效作用。**结论** 土茯苓、乌梅配伍可协同改善银屑病小鼠的皮损症状, 其疗效较单用药物更好, 其作用机制可能与调节 Nocth 信号通路、抑制炎症反应有关。**[关键词]** 银屑病; 土茯苓; 乌梅; 中药配伍; Notch 信号通路; 协同增效

银屑病是一种临床常见的慢性炎症性、免疫性皮肤病, 其临床表现和长期治疗让患者承受着巨大的精神与经济负担^[1]。目前银屑病的治疗药物包括甲氨蝶呤、环孢素 A、阿维 A、类固醇、生物制剂

等, 但这些药物存在一种或多种严重不良反应, 如骨髓抑制、肝毒性、肾毒性、生殖毒性等^[2], 限制了其在临床上的应用。中医药在治疗银屑病方面疗效确切, 可在提高疗效的同时缩短疗程并降低复发率^[3]。中药乌梅味酸, 性平, 归肝、脾、肺、大肠经, 具有敛肺、涩肠、生津、安蛔等功效; 土茯苓味甘、淡, 性平, 归肝、胃经, 具有解毒、除湿、通利关节的功效, 二者在临床上常配伍使用治疗银

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20201130); 广东省中医药科学院专项 (YN2019QJ11、YN2019MJ06); 广东省科技计划 (2017B030314166); 省部共建中医湿证国家重点实验室项目 (SZ2021ZZ51)

✉ 通讯作者: 13610241754@163.com, (020)39318571

屑病^[4-6]。本课题组前期研究^[7]发现,乌梅可提高土茯苓有效成分落新妇苷的溶出,同时增强疗效,然而其发挥作用的机制尚未明确。本研究拟通过咪喹莫特诱导的银屑病小鼠模型,观察土茯苓、乌梅及其配伍是否具有协同治疗作用,并探究其可能的作用机制,以期“土茯苓-乌梅”药对在银屑病临床治疗中的应用提供数据支持。本研究经广东省中医院伦理委员会批准(批准号:2018040)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 60 只,6~8 周龄,体质量 20~25 g,购自广东省实验动物中心,实验动物生产许可证号:SYXK(粤)2018-0094。实验期间由广东省中医药科学院提供动物房及饲料,动物房干燥、通风,环境温度控制在 22~26℃,湿度 50%~70%,自由饮水和饮食,12 h 光照和黑暗循环进行。

1.2 药物

土茯苓(产地:广西,批号:170812511)、乌梅(产地:四川,批号:141212171),均购自康美药业股份有限公司。煎煮法:分别精密称定土茯苓 39 g、乌梅 15.6 g、土茯苓 39 g+乌梅 15.6 g,加入 10 倍量水,浸泡 0.5 h 后,武火煮沸,调文火微沸 1 h,过滤,收集滤液;药渣再加 10 倍量水煮沸后文火微沸 45 min,过滤,收集滤液,合并两次滤液,土茯苓+乌梅、土茯苓、乌梅分别浓缩至 0.20、0.08、0.27 g/ml,备用。咪喹莫特乳膏(批号:18070140,四川明欣药业有限责任公司);甲氨蝶呤片(批号:120306,上海信谊药厂有限公司),使用前加纯水配置成 0.1 mg/ml。

1.3 主要试剂与仪器

白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒(批号:M16016447),武汉华美生物科技有限公司;白细胞介素 12 (IL-12) ELISA 试剂盒(批号:M150907-006α),深圳欣博盛生物科技有限公司;白细胞介素 17 (IL-17) ELISA 试剂盒(批号:P246583)、白细胞介素 23 (IL-23) ELISA 试剂盒(批号:P233084),R&D Systems 公司;神经源性位点缺口同源蛋白 1 抗体(Notch1,货号:3608)、Hes 家族 BHLH 转录因子 1 抗体(Hes1,货号:11988)、锯齿典型 Notch 配体 1 抗体(Jagged1,货号:70109)、β-actin 抗体(货号:4970s),Cell Signaling Technology 公司;BCA 蛋白测定试剂盒(批号:23227),

Thermo Scientific 公司;ECL 化学发光液试剂盒(批号:2017802),EMD Millipore 公司;4% 多聚甲醛(批号:20170418),Solarbio 公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号:042415),Leica 公司;RIPA 裂解液(货号:P0013B),碧云天生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(批号:BST17C18B17D54),博士德生物技术有限公司;牛血清白蛋白(批号:Y70720),广州威佳科技有限公司;TBS(货号:#170-6435),美国 Bio-Rad 公司。

BT125D 型电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;Leica TP1020 型脱水机、Leica EG1160 型包埋机、Leica SM2000 型滑动切片机,德国徕卡仪器有限公司;BX53 型电子显微镜,日本 Olympus 公司;5418R 型低温离心机,美国 Eppendorf 公司;M1000pro 型多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司;T10 IKA 匀浆仪,德国 IKA 公司;PowerPac HC 型高电流电泳仪、Trans-Blot SD Cell 半干转膜系统、Chemi-Doc XRS-化学发光成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 动物分组及干预方法

60 只 BALB/c 小鼠根据体质量采用随机数字表法分为正常组、模型组、甲氨蝶呤组、土茯苓+乌梅组、土茯苓组、乌梅组,每组 10 只。各给药组小鼠提前预防性给药 3 天,参照《中药药理研究方法学》^[8],将土茯苓组、乌梅组、土茯苓+乌梅组按既往研究结果^[7]中临床的等效剂量 15、6、21 g 分别转化为小鼠给药剂量 1.95、0.78、2.73 g/(kg·d),甲氨蝶呤组小鼠给予甲氨蝶呤片 1 mg/(kg·d)灌胃,正常组及模型组给予 10 ml/(kg·d)纯净水灌胃,每日 1 次。除正常组外,其余各组小鼠于造模前一日背部剃毛,形成约 2 cm×3 cm 大小的皮肤暴露区。第 4 天开始每日上午在小鼠背部皮肤暴露区涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 62.5 mg,建立银屑病小鼠模型^[9],以皮损区出现明显红斑、白色层状鳞屑覆盖、斑块状突起明显、皮肤严重增厚表示造模成功^[9]。每日下午各给药组继续按预防性给药剂量灌胃,正常组及模型组给予 10 ml/(kg·d)纯净水灌胃,每日 1 次,连续 6 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 每日查看小鼠的一般情况,拍照并进行记录,主要观察毛发光泽度、精神状态、饮食、大小便。

1.5.2 银屑病面积和严重程度指数(PASI)评分 每日观察小鼠背部皮肤状态,按照文献^[9]对

皮损面积和皮损严重程度进行评分。根据造模区的红斑、鳞屑及浸润增厚程度进行独立评估,各项评分范围均为0~4分(0分,无;1分,轻度;2分,中度;3分,重度;4分,极重度),将3项评分累计得到PASI评分。

1.5.3 土茯苓、乌梅配伍作用评价^[10] 为了观察土茯苓、乌梅配伍的疗效是否具有协同作用,首先计算PASI评分好转率(E), $E_{\text{药物}} = (\text{PASI评分}_{\text{模型}} - \text{PASI评分}_{\text{药物}}) / \text{PASI评分}_{\text{模型}} \times 100\%$,之后采用金(正均)氏公式联用指数Q值。

$$Q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A \cdot E_B)$$

E_{A+B} 为联合用药之效应, E_A 、 E_B 分别为A药、B药单独用药之效应。Q值意义:0.85≤Q≤1.15为单纯相加(+);Q>1.15为增强(++);Q<0.85为拮抗(-),Q值越大,协同增效作用越强。

1.5.4 皮损组织病理学检测 实验第10天,麻醉处死BALB/c小鼠,收集皮损组织,将皮损组织分为2份,1份置于4%多聚甲醛固定液中用于病理学检测,另1份保存于-80℃冰箱中用于炎症因子与Notch信号通路相关蛋白表达的检测。

采用随机数字表法每组选取6只小鼠皮损组织在4%多聚甲醛固定液中固定24 h,于全自动脱水机中进行梯度脱水后置于液体石蜡中进行包埋,待蜡块冷却后切成3 μm厚度的切片,进行HE染色,封片后于倒置镜下观察,拍照进行Baker评分^[11]。评分标准:1)角质层:Munro脓肿计2分,角化不全计1分,角化过度计0.5分;2)表皮层:表皮突下延根据轻、中、重度分别计0.5、1.0、1.5分,棘层肥厚根据轻、中、重度分别计0.5、1.0、1.5分,颗粒层消失计0.5分;3)真皮层:炎细胞浸润根据轻、中、重度分别计0.5、1.0、1.5分,真皮乳突毛细血管的扩张及充血根据轻、中、重度分别计0.5、1.0、1.5分。

1.5.5 ELISA法检测皮损组织中炎症因子含量

采用随机数字表法每组选取5只小鼠皮损组织50 mg,电子天平精密称定,剪碎,加入500 μl RIPA裂解液,置于冰上,使用匀浆仪进行充分研磨。在4℃、5000 g条件下离心10 min,取上清液,按ELISA试剂盒说明书操作,检测皮损组织中IL-6、IL-12、IL-17、IL-23的含量。

1.5.6 Western Blot法检测皮损组织中Notch信号通路相关蛋白表达 采用随机数字表法每组选取3只小鼠皮损组织50 mg,用RIPA裂解液提取组织总蛋白,按照试剂盒说明书用BCA法定量总蛋白浓

度。制备10% SDS-PAGE凝胶,上样50 μg,70 V电泳0.5 h、100 V电泳2 h至指示剂迁移至凝胶末端;以半湿转法(15 V,25 min)将蛋白转印至PVDF膜上,含5%牛血清白蛋白的TBS-Tween-20缓冲液(TBST)封闭1 h,按1:1000的体积加入兔抗Notch1、Hes1、Jagged1、β-actin一抗,于4℃孵育过夜,弃一抗;用TBST缓冲液洗涤3次,再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗室温孵育2 h, TBST缓冲液洗涤3次, ECL反应液作用后暗室显影拍照,以β-actin蛋白作为内参对照,分别计算Notch1、Hes1、Jagged1蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据分析,计量数据符合正态分布以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较若方差齐性采用LSD检验,方差不齐则采用Dunnett's T^* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况比较

正常组小鼠毛发洁白有光泽,精神状态良好。模型组小鼠毛发微黄、干枯无光泽,有粘连,20%小鼠出现精神萎靡的现象。与模型组比较,土茯苓组、土茯苓+乌梅组小鼠毛发较白、有光泽,精神状态良好;乌梅组、甲氨蝶呤组小鼠毛发仍微黄但有光泽,精神状态良好。各组小鼠饮食与大小便均正常。

2.2 各组小鼠皮损组织大体观察及PASI评分比较

正常组小鼠皮肤薄而光滑,呈均匀的淡粉色。模型组小鼠受试皮肤出现典型的银屑病样皮损,红斑、白色层状鳞屑覆盖、斑块状突起明显、皮肤严重增厚。与模型组比较,土茯苓+乌梅组和甲氨蝶呤组小鼠皮损表现为浅红色斑点、褶皱处鳞屑薄而细小,斑状突起消失,皮肤增厚程度较轻;土茯苓组和乌梅组小鼠皮损表现中红斑、鳞屑减少,斑状突起与皮肤增厚未发生显著改变。

表1示,与正常组比较,模型组小鼠皮损组织PASI评分升高($P < 0.01$);与模型组比较,甲氨蝶呤组、土茯苓+乌梅组、土茯苓组、乌梅组小鼠皮损组织PASI评分均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与土茯苓组、乌梅组比较,土茯苓+乌梅组、甲氨蝶呤组小鼠皮损组织PASI评分均降低($P < 0.05$);甲氨蝶呤组、土茯苓+乌梅组皮损组织PASI评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠皮损组织 PASI 评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PASI 评分
正常组	10	0
模型组	10	9.00±0.82 ^{a)}
甲氨蝶呤组	10	4.40±0.84 ^{b) d) e)}
土茯苓+乌梅组	10	4.20±0.42 ^{b) d) e)}
土茯苓组	10	6.60±0.84 ^{c)}
乌梅组	10	7.20±0.79 ^{c)}

注: PASI, 银屑病面积和严重程度指数。
a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$;
c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与土茯苓组比较, $P<0.05$; e) 与乌梅组比较, $P<0.05$ 。

2.3 土茯苓、乌梅配伍作用评价结果

计算 PASI 评分好转率, 土茯苓+乌梅组 E_{A+B} 为 53.33%、土茯苓组 E_A 为 26.67%、乌梅组 E_B 为 20.00%, $Q=E_{A+B}/(E_A+E_B-E_A\cdot E_B)\approx 1.29$, $Q>1.15$, 表明土茯苓、乌梅配伍具有协同增效作用。

2.4 各组小鼠皮损组织 HE 染色病理结果

图 1 示 (彩图请扫描本文二维码获取), 正常组小鼠皮肤角质层完整, 表皮层平坦, 棘层薄, 可见颗粒层, 真皮层无炎细胞浸润, 未见毛细血管扩张及充血。模型组小鼠角质层角化不全, 表皮层表皮突重度下延呈杵状, 棘层重度肥厚, 颗粒层消

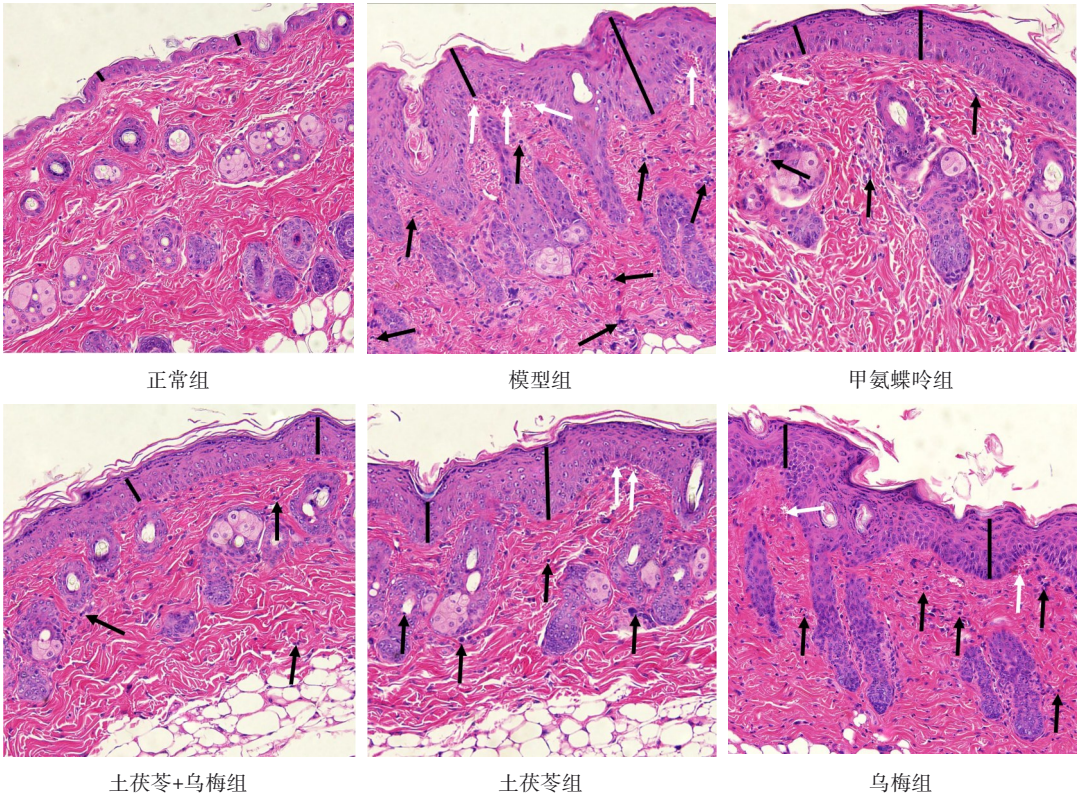
失, 真皮层炎细胞浸润显著增多, 真皮乳头血管迂曲扩张明显。甲氨蝶呤组小鼠皮肤角质层角化不全, 棘层轻度增厚, 真皮层内可见少量炎细胞浸润与血管扩张。土茯苓+乌梅组小鼠皮肤棘层轻度增厚, 真皮层内可见少量炎细胞浸润。土茯苓组小鼠角质层角化不全, 表皮层表皮突轻度下延, 棘层重度增厚, 真皮层内可见少量炎细胞浸润与血管扩张。乌梅组小鼠角质层角化过度, 表皮层表皮突重度下延, 棘层重度增厚, 真皮层内可见炎细胞浸润与血管扩张。

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠皮损组织 Baker 评分升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 甲氨

表 2 各组小鼠皮损组织 Baker 评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Baker 评分
正常组	6	0.24±0.18
模型组	6	7.73±0.63 ^{a)}
甲氨蝶呤组	6	2.73±0.31 ^{b) d) e)}
土茯苓+乌梅组	6	2.83±0.23 ^{b) d) e)}
土茯苓组	6	5.31±0.41 ^{c)}
乌梅组	6	6.69±0.77

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与土茯苓组比较, $P<0.05$; e) 与乌梅组比较, $P<0.05$ 。



注: 白色箭头指血管扩张; 黑色线段指棘层厚度; 黑色箭头指炎症细胞浸润。
图 1 各组小鼠皮损组织 HE 染色结果 (×200)

蝶呤组、土茯苓+乌梅组、土茯苓组 Baker 评分均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，乌梅组 Baker 评分差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与土茯苓组、乌梅组比较，土茯苓+乌梅组、甲氨蝶呤组 Baker 评分降低 ($P<0.05$)；甲氨蝶呤组与土茯苓+乌梅组 Baker 评分比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组小鼠皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-17、IL-23 含量比较

表 3 示，与正常组比较，模型组小鼠皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-23 含量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，甲氨蝶呤组、土茯苓+乌梅组、土茯苓组、乌梅组小鼠皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-23 含量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各药物组之间 IL-6、IL-12、IL-23 含量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；各组小鼠皮损组织中 IL-17 含量比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 各组小鼠皮损组织中 Notch 信号通路相关蛋白表达比较

表 4 示，与正常组比较，模型组小鼠皮损组织中 Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、Hes1 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，甲氨蝶呤组、土茯苓+乌梅组小鼠皮损组织中 Notch1、Hes1 蛋白表达均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与土茯苓组比较，土茯苓+乌梅组小鼠皮损组织中 Notch1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。各组小鼠皮损组织中 Jagged1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠皮损组织 Notch1、Hes1、Jagged1 蛋白电泳图见图 2。

3 讨论

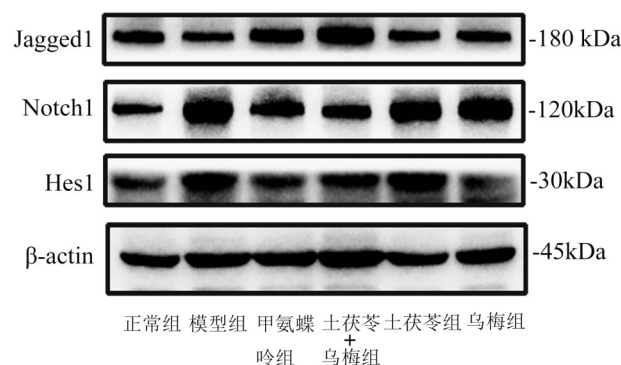
银屑病中医病名为“白疔”，是一种常见的慢性红斑鳞屑性皮肤病，以皮肤反复起红斑或丘疹，上覆多层白色鳞屑，刮去鳞屑可见薄膜现象和筛状出血为特征。目前，银屑病病因并不完全明确，主

表 4 各组小鼠皮损组织 Notch 信号通路相关蛋白

		蛋白表达比较 (/ β -actin, $\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	Notch1	Hes1	Jagged1
正常组	3	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	3	1.39 $\pm$ 0.01 ^{a)}	1.33 $\pm$ 0.10 ^{b)}	1.20 $\pm$ 0.37
甲氨蝶呤组	3	1.13 $\pm$ 0.16 ^{c)}	1.08 $\pm$ 0.16 ^{d)}	1.21 $\pm$ 0.24
土茯苓+乌梅组	3	1.01 $\pm$ 0.05 ^{c) e)}	1.06 $\pm$ 0.10 ^{d)}	1.25 $\pm$ 0.32
土茯苓组	3	1.57 $\pm$ 0.28	1.27 $\pm$ 0.20	1.10 $\pm$ 0.30
乌梅组	3	1.23 $\pm$ 0.24	1.09 $\pm$ 0.14	1.26 $\pm$ 0.36

注：Notch1，神经源性位点缺口同源蛋白 1；Hes1，Hes 家族 BHLH 转录因子 1；Jagged1，锯齿典型 Notch 配体 1。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与土茯苓组比较， $P<0.05$ 。



注：Notch1，神经源性位点缺口同源蛋白 1；Hes1，Hes 家族 BHLH 转录因子 1；Jagged1，锯齿典型 Notch 配体 1。

图 2 各组小鼠皮损组织 Notch 信号通路相关蛋白电泳图

要认为与遗传因素和环境因素等有关^[12]。当代医家在传统“从血论治”辨证体系上进行拓展延伸，提出玄府、微观、毒、六淫外邪等多种论治观点，且临床应用中医药防治银屑病已获得了良好疗效^[13]。禤国维教授认为银屑病与毒邪致病有关，由于先天禀赋不足，毒邪侵入人体，积聚皮肤，致气血凝滞，营卫失和而发病，临证善用土茯苓^[14]、乌梅^[15]治疗。《本草正义》载：“土茯苓，利湿去热，能入络”，络脉为经脉横行别出位置较浅的分

表 3 各组小鼠皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-17、IL-23 含量比较

		($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	IL-6/ng·ml ⁻¹	IL-12/ng·ml ⁻¹	IL-17/pg·ml ⁻¹	IL-23/pg·ml ⁻¹
正常组	5	56.11 $\pm$ 22.15	0.93 $\pm$ 0.27	26.32 $\pm$ 3.70	400.86 $\pm$ 35.30
模型组	5	386.11 $\pm$ 111.52 ^{a)}	2.73 $\pm$ 0.32 ^{b)}	25.47 $\pm$ 1.96	892.53 $\pm$ 41.36 ^{b)}
甲氨蝶呤组	5	81.25 $\pm$ 14.23 ^{c)}	0.47 $\pm$ 0.06 ^{d)}	24.62 $\pm$ 4.31	222.97 $\pm$ 16.90 ^{c)}
土茯苓+乌梅组	5	72.22 $\pm$ 34.70 ^{c)}	0.64 $\pm$ 0.18 ^{d)}	26.22 $\pm$ 5.17	268.85 $\pm$ 30.20 ^{c)}
土茯苓组	5	77.78 $\pm$ 35.93 ^{c)}	0.79 $\pm$ 0.20 ^{d)}	27.61 $\pm$ 2.66	285.47 $\pm$ 26.90 ^{c)}
乌梅组	5	86.11 $\pm$ 6.36 ^{c)}	0.52 $\pm$ 0.08 ^{d)}	32.74 $\pm$ 6.58	322.53 $\pm$ 26.90 ^{c)}

注：IL-6，白细胞介素 6；IL-12，白细胞介素 12；IL-17，白细胞介素 17；IL-23，白细胞介素 23。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

支, 其中浮络更是浮行于浅表, 可见土茯苓能祛除体表皮肤的热蕴毒邪, 对于热毒较重者, 重用土茯苓有良效^[14]。网络药理学研究^[16]结果显示, 土茯苓可能通过作用于 IL-17 信号通路及肿瘤坏死因子信号通路等相关靶点起到治疗寻常型银屑病的功效。土茯苓的主要成分落新妇苷可通过抑制 T 辅助细胞 17 (Th17) 相关炎症因子改善咪喹莫特诱导的 BALB/c 小鼠的银屑病样皮肤损伤^[17], 通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 抑制 IL-6 和 IL-22 的产生而改善银屑病样模型豚鼠的病变^[18], 同时还可改善 HaCaT 角质形成细胞的分化与异常增殖^[19]。《神农本草经》载乌梅有“去死肌”的作用。研究显示, 乌梅能去除死肌、敛阴生津、止痒解毒, 可有效缓解皮肤瘙痒^[15]; 乌梅具有抗氧化、抗炎作用^[20], 其水提取物可抑制脂多糖刺激的巨噬细胞中的促炎介质^[21], 还可通过抑制 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、Toll 样受体 4 (TLR4) 和核转录因子 κ B (NF- κ B) 蛋白, 进而抑制炎症的发生^[22], 从而有利于缓解银屑病的临床症状。

本研究证实, 土茯苓可显著改善银屑病样模型小鼠皮损区的鳞屑与红斑, 降低 PASI 评分、Baker 评分; 乌梅可一定程度地减轻银屑病样模型小鼠皮损区的鳞屑与红斑, 降低 PASI 评分, 但 Baker 评分无变化; 土茯苓配伍乌梅, 其抗银屑病作用显著增强, PASI 评分与 Baker 评分均较模型组显著降低, 且与甲氨蝶呤片效果相当。采用金 (正均) 氏公式定量分析土茯苓、乌梅配伍作用, 其联用指数表明为协同增效作用。以上结果均证实, 土茯苓、乌梅之间具有协同增效关系, 疗效较单味药更佳。

银屑病真皮中的树突状细胞和巨噬细胞产生 IL-23, 诱导 Th17 细胞活化, 活化的 T 细胞释放 IL-6、IL-12、IL-17 等炎症细胞因子^[23-24]。在皮肤炎症微环境下, 角质形成细胞又可产生更多的 IL-23 和其他炎症因子、趋化因子, 从而形成 IL-23/Th17 正反馈循环, 加剧银屑病慢性炎症病变过程^[12]。因此, 阻断炎症反应中的关键炎症因子 IL-6、IL-12、IL-17 和 IL-23 有利于银屑病的治疗。另外, 银屑病的发病机制涉及 Notch 信号通路的激活, Notch 信号通路包括四种受体 (Notch1-4) 和五种配体 (Delta1、3、4 及 Jagged1-2), 均散布于皮肤的表皮和附属器, 并高表达于棘层和颗粒层细胞, 参与角质形成细胞的发育分化、参与调节 T 细胞诱导的免疫反应、微血管生成^[25-26]。当 Notch 配体与相邻细胞的 Notch 受体结合, 经肿瘤坏死因子-转化酶 (TACE)

和 γ -促分泌酶切割释放出具有核定位信号的胞质区 (NICD), NICD 转移至细胞核并与 DNA 结合蛋白 CSL 形成转录复合体, 进一步激活靶基因如 Hes, 诱导 IL-6、IL-12、IL-17、IL-23 等炎症因子浸润, 发挥生物学效应^[27]。本研究结果显示, 造模后小鼠皮损组织中 IL-6、IL-12、IL-23 含量增加, Notch1、Hes1 蛋白表达升高; 给予土茯苓或乌梅单味药后, 虽然 IL-6、IL-12、IL-23 含量降低, 但 Notch1、Hes1 蛋白表达水平变化不显著; 土茯苓、乌梅配伍给药后, IL-6、IL-12、IL-23 含量及 Notch1、Hes1 蛋白表达均降低, 且与对照药物甲氨蝶呤片差异无统计学意义。各组小鼠皮损组织中 IL-17 含量差异无统计学意义, 分析原因可能与样本量较少有关, 故该结论仍需今后进一步验证。根据以上结果, 推测土茯苓、乌梅配伍可能是通过作用于 Notch 信号通路, 减少炎症因子浸润, 从而发挥改善银屑病小鼠皮损的作用。

综上, 土茯苓、乌梅配伍可协同减轻银屑病小鼠的皮损症状, 药效与阳性对照药甲氨蝶呤片无显著差异, 其增效作用靶点可能与 Noeth 信号通路有关。本研究仅从药效学的层面观察了土茯苓、乌梅协同增效作用及可能的作用靶点, 后续将从土茯苓、乌梅协同增效的药效成分的吸收、分布、代谢等方面进行研究, 并结合代谢酶与转运蛋白进行观察, 以进一步完善土茯苓、乌梅配伍协同增效的可能分子生物学机制。

参考文献

- [1] SCHONMANN Y, ASHCROFT DM, ISKANDAR I, et al. Incidence and prevalence of psoriasis in Israel between 2011 and 2017[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2019, 33(11):2075-2081.
- [2] KIM HJ, LEBWOHL MG. Biologics and psoriasis: the beat goes on[J]. Dermatol Clin, 2019, 37(1):29-36.
- [3] SU Y, QIN W, WU L, et al. A review of Chinese medicine for the treatment of psoriasis: principles, methods and analysis[J]. Chin Med, 2021, 16(1):138. doi: 10.1186/s13020-021-00550-y.
- [4] 曲永彬, 范瑞强. 禳国维治疗银屑病经验[J]. 中医杂志, 2006, 57(9):654-657.
- [5] 王蕾, 黄咏菁, 王敏华. 银屑灵片治疗寻常型银屑病的临床观察[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(6):520-522.
- [6] 王作人, 王兴国. 牛皮癣验方[J]. 山东中医杂志, 1986, 5(1):48.

- [7]刘丽娟,赵瑞芝,卢传坚. 基于“药效-成分分析”的银屑病优化方2号方抗银屑病配伍规律探讨[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(8): 4171-4174.
- [8]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [9]VAN DER FITS L, MOURITS S, VOERMAN JS, 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.
- [10]戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(5): 479-480.
- [11]BAKER BS, SWAIN AF, FRY L, et al. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis[J]. Br J Dermatol, 1984, 110(5): 555-564.
- [12]ARMSTRONG AW, READ C. Pathophysiology, Clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review[J]. JAMA, 2020, 323(19): 1945-1960.
- [13]董晓宛, 罗莎, 白彦萍. 中医药治疗银屑病的现状研究进展[J]. 北京中医药, 2021, 40(8): 806-810.
- [14]杨贤平, 张子圣, 黄焕杰, 等. 国医大师禚国维应用土茯苓治疗皮肤病经验[J]. 环球中医药, 2019, 12(1): 137-139.
- [15]杨贤平, 张子圣, 林颖, 等. 国医大师禚国维应用乌梅治疗皮肤病经验[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 1026-1028.
- [16]肖战说, 邹建华, 林建国, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨土茯苓治疗银屑病的作用机制[J]. 世界中医药, 2022, 17(5): 658-670.
- [17]DI TT, RUAN ZT, ZHAO JX, et al. Astilbin inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice via Jak3/Stat3 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 32: 32-38. doi: 10.1016/j.intimp.2015.12.035.
- [18]YU J, XIAO Z, ZHAO R, et al. Astilbin emulsion improves guinea pig lesions in a psoriasis-like model by suppressing IL-6 and IL-22 via p38 MAPK[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 3789-3796.
- [19]ZHANG C, XU Q, TAN X, et al. Astilbin decreases proliferation and improves differentiation in HaCaT keratinocytes[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 713-720. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.127.
- [20]BERETTA A, ACCINNI R, DELLANOCE C, et al. Efficacy of a standardized extract of prunus mume in liver protection and redox homeostasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Phytother Res, 2016, 30(6): 949-955.
- [21]CHOI HJ, KANG OH, PARK PS, et al. Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. J Med Food, 2007, 10(3): 460-466.
- [22]BIANCHI E, ROGGE L. The IL-23/IL-17 pathway in human chronic inflammatory diseases - new insight from genetics and targeted therapies[J]. Microbes Infect, 2019, 21(5/6): 246-253.
- [23]LIU Z, PENG Y, MA P, et al. An integrated strategy for anti-inflammatory quality markers screening of traditional Chinese herbal medicine Mume Fructus based on phytochemical analysis and anti-colitis activity[J]. Phytomedicine, 2022, 99: 154002. doi: 10.1016/j.phymed.
- [24]GANGULY D, HAAK S, SISIRAK V, et al. The role of dendritic cells in autoimmunity[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(8): 566-577.
- [25]SKARMOUTSOU E, TROVATO C, GRANATA M, et al. Biological therapy induces expression changes in Notch pathway in psoriasis[J]. Arch Dermatol Res, 2015, 307(10): 863-873.
- [26]ROONEY P, CONNOLLY M, GAO W, et al. Notch-1 mediates endothelial cell activation and invasion in psoriasis[J]. Exp Dermatol, 2014, 23(2): 113-118.
- [27]WANG Y, LI X, XING X, et al. Notch-Hes1 signaling regulates IL-17A⁺ $\gamma\delta$ T⁺ cell expression and IL-17A secretion of mouse psoriasis-like skin inflammation[J]. Mediat Inflamm, 2020: 8297134. doi: 10.1155/2020/8297134.

Effect of Tu Fu Ling (*Rhizoma Smilacis Glabrae*), Wu Mei (*Fructus Mume*) and Their Compatibility on Inflammatory Factors and Notch Signaling Pathway in Skin Lesions of Psoriasis-like Model Mice

LIU Lijuan^{1,2}, WU Yayun², ZHAO Ya², ZHAO Ruizhi^{1,2}

1. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510120; 2. The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the intervention effect of Tu Fu Ling (*Rhizoma Smilacis Glabrae*), Wu Mei (*Fructus Mume*) and their compatibility on imiquimod-induced psoriasis-like model mice and the underlying mechanism. **Methods** A total of 60 BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, methotrexate group, combination (Tu Fu Ling plus Wu Mei) group, Tu Fu Ling group and Wu Mei group with 10 mice in each

group. As prophylaxis, interventions were provided to the mice for three days. The corresponding herbal medicine at a dose of 1.95, 0.78 and 2.73 g/(kg·d) was given to the mice by gavage in the Tu Fu Ling group, Wu Mei group and the combination group, respectively; 1 mg/(kg·d) of methotrexate tablets was given to mice in the methotrexate group by gavage; and 10 ml/(kg·d) of purified water was given by gavage to the mice in the normal group and model group; all interventions were provided once daily. Since the fourth day, mice in all groups but the model group were smeared by 62.5 mg of 5% imiquimod cream every morning to establish the psoriasis-like mice model; the prophylaxis interventions were given continuously every afternoon for six consecutive days. The general conditions of mice in each group were observed, and psoriasis area severity index (PASI) score in each group was compared. Quantitative analysis in Jin's (Zheng jun) formula was performed to analyze the synergistic effect by the combination of Tu Fu Ling and Wu Mei. Changes in the skin lesions of histopathology were observed with HE staining and evaluated by Baker score. The levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), interleukin 17 (IL-17) and interleukin 23 (IL-23) in the skin lesions was determined by ELISA. The protein expressions of Neurogenic locus Notch homologous protein 1 antibody (Notch1), Hes family BHLH transcription factor 1 antibody (Hes1) and Jagged canonical Notch ligand 1 antibody (Jagged1) in the skin lesions were detected by western blotting.

Results Compared to those in the normal group, poor general condition of hair and mental state, obvious erythema, scales, and thickened skin lesions were observed, and the PASI score, the Baker score, the levels of IL-6, IL-12 and IL-23, and the protein expressions of Notch1 and Hes1 in the skin significantly increased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the general condition of the mice was improved, and the erythema and scale of skin lesions of mice, the PASI score, the levels of IL-6, IL-12 and IL-23 in the skin were significantly reduced in the Tu Fu Ling group, Wu Mei group, combination group and methotrexate group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the Baker score in the Tu Fu Ling group, combination group and methotrexate group, and the protein expressions of Notch1 and Hes1 in the combined group and methotrexate group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The combination group had lower PASI score and Baker score than the Tu Fu Ling group and Wu Mei group ($P < 0.05$), as well as decreased Notch1 expression than the Tu Fu Ling group ($P < 0.05$). There was no difference between the combined group and methotrexate group in all the indicators ($P > 0.05$). A synergistic effect with Q value up to 1.29 (> 1.15) was shown in the combination of Tu Fu Ling and Wu Mei with Jin's (Zheng jun) formula.

Conclusion Tu Fu Ling in combination with Wu Mei could improve the symptoms of skin lesions in psoriasis model mice with better effect than used alone, and its mechanism might be related to regulation of Notch1 signaling pathway and inhibition of inflammatory response.

Keywords psoriasis; Tu Fu Ling (*Rhizoma Smilacis Glabrae*); Wu Mei (*Fructus Mume*); compatibility of Chinese materia medica; Notch signaling pathway; synergy

(收稿日期: 2022-03-10; 修回日期: 2022-05-18)

[编辑: 邓媛]