

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.03.014

加味荆芥汤对玫瑰痤疮模型小鼠皮损组织炎症及免疫反应的影响

杨瑾, 赵丽娟, 伍迪, 张旭, 叶建州✉

云南省中医医院, 云南省昆明市五华区光华街120号, 650021



[摘要] **目的** 探讨加味荆芥汤治疗玫瑰痤疮的可能作用机制。**方法** 50只8周龄雌性BALB/c小鼠随机分为正常对照组、模型组和加味荆芥汤低、中、高剂量组,每组10只。除正常对照组外,其余各组小鼠予背部注射40 μ l抗菌肽LL-37(浓度为320 μ mol/L),每12 h重复注射1次,共注射4次,以制备玫瑰痤疮小鼠模型,正常对照组小鼠同时点背部皮内注射40 μ l PBS溶液。造模成功后加味荆芥汤低、中、高剂量组小鼠分别给予加味荆芥汤4.35、8.71、17.42 g/(kg·d)灌胃,正常对照组和模型组小鼠给予20 ml/(kg·d)生理盐水灌胃。各组均每日1次,持续5天。观察各组小鼠皮损变化,并进行红斑面积测定及红斑程度评分;取注射部位皮肤组织HE染色观察病理形态学变化,甲苯胺蓝染色检测肥大细胞数量;ELISA法检测皮损组织中白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;RT-qPCR法检测玫瑰痤疮发病机制中固有免疫关键因子[Toll样受体2(TLR2)及下游分子丝氨酸蛋白酶激活剂释放酶5(KLK5)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)]与相关炎症因子[IL-1 β 、IL-6、TNF- α] mRNA,适应性免疫CD4⁺T细胞相关因子干扰素 γ (INF- γ) mRNA表达;免疫组化染色法检测KLK5、MMP-9蛋白表达及CD4⁺T阳性细胞数;Western blot法检测CD4⁺T细胞相关因子[INF- γ 、CC趋化因子受体5(CCR5)、信号转导转录激活因子1(STAT1)、信号转导转录激活因子3(STAT3)]蛋白表达水平。**结果** 正常对照组小鼠背部注射部位皮肤正常,未见皮损及红斑,病理显示未见炎性细胞浸润。模型组小鼠红斑程度评分及红斑面积较正常对照组显著升高($P<0.05$),病理显示大量炎细胞浸润,部分可见深层结缔组织损伤。与模型组比较,加味荆芥汤中、高剂量组小鼠红斑程度评分及红斑面积均显著降低($P<0.05$),炎性渗出及炎性细胞浸润有所减少;加味荆芥汤低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),炎细胞浸润较模型组略有减轻。与正常对照组比较,模型组小鼠皮损组织肥大细胞数,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TLR2、INF- γ 、KLK5、MMP-9 mRNA表达,KLK5、MMP-9蛋白表达,CD4⁺T阳性细胞数,INF- γ 、STAT1蛋白表达均升高($P<0.05$)。与模型组比较,加味荆芥汤中、高剂量组肥大细胞数、IL-1 β 水平,IL-1 β 、TNF- α mRNA表达及CD4⁺T阳性细胞数降低;加味荆芥汤高剂量组IL-6、TNF- α 水平,IL-6、TLR2、INF- γ 、MMP-9 mRNA表达, MMP-9、KLK5蛋白表达,CD4⁺T阳性细胞数,INF- γ 、STAT1蛋白表达均降低($P<0.05$)。**结论** 加味荆芥汤对玫瑰痤疮小鼠模型皮肤症状具有显著改善作用,其作用机制可能与调控皮肤免疫炎症反应、进而减轻致病因子及炎症因子的释放相关。

[关键词] 玫瑰痤疮; CD4⁺T细胞; 炎症因子; 免疫反应; 加味荆芥汤

基金项目: 国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(国中医药人教函[2022]76号); 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目; 云南省高层次中医药后备人才培养对象(云卫中医发展发[2021]1号); 云南省科学技术厅中医联合专项(202101AZ070001-216)

✉ 通讯作者: kmyjz63@sina.com

玫瑰痤疮是一种好发于面中部,主要累及面部血管、神经及毛囊皮脂腺单位的慢性复发性炎症性皮肤病^[1]。本病好发于20~50岁的中青年,以面部皮肤阵发性潮红及红斑、丘疹、脓疱、毛细血管扩张、鼻赘和眼部病变为特征,且女性患者多于男性,常伴皮肤灼热、干燥、痒痛等不适^[2]。本病除影响美观,还常见抑郁症、心血管疾病、偏头痛、帕金森病、胃肠道疾病及自身免疫性疾病等多种并发症^[3-4],对患者的社交及身心健康产生明显影响。近年来,随着玫瑰痤疮发病率的逐年上升、共病的发生及治疗效果欠满意、易复发等诸多问题,寻求切实有效、不良反应小的治疗药物成为亟需解决的问题。

目前,中医药被广泛运用于玫瑰痤疮的治疗中。本课题组认为,血热瘀毒是玫瑰痤疮发病的核心病机,在云南省名老中医刘复兴教授经验方“荆芩汤”^[5]基础上加土茯苓、青蒿组成加味荆芩汤,全方具有清热凉血、解毒散瘀的功效。前期研究^[6-7]显示,荆芩汤及其加减方在炎症性皮肤病方面疗效肯定。本研究通过建立玫瑰痤疮小鼠模型,验证其防治玫瑰痤疮的药效并初步探讨其可能的作用机制,为该方临床应用提供依据。本研究经云南省中医医院动物伦理委员会批准,伦理审查编号:申2021-051。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性BALB/c小鼠50只,体质量18~22 g,8周龄,购自斯贝福(北京)生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SYXK(滇)K2018-0003。实验小鼠饲养于屏障级动物室,室温(22±2)℃,湿度48%±5%,自由摄食饮水,昼夜12 h交替,适应性饲养1周后开始实验。

1.2 药物

加味荆芩汤组成:荆芥15 g、黄芩15 g、生地黄30 g、牡丹皮15 g、赤芍30 g、紫草30 g、土茯苓30 g、青蒿30 g。药材均购自云南省中医医院中药房,全方经水泡三煎后,合并水煎液,过滤浓缩成稠浸膏,每克浸膏含有0.67 g生药,浸膏制备由云南省中医医院制剂室完成,分装放于-20℃冷冻备用。根据预实验结果,以临床等效剂量的8倍、4倍、2倍作为高、中、低受试剂量,分别为17.42、8.71、4.35 g/(kg·d)。

1.3 主要试剂及仪器

抗菌肽LL-37(序列号:LLGDFFRKSKEKIG-KEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES,货号:HY-P1222B),MCE公司;白细胞介素6(IL-6)ELISA试剂盒(货号:MB-2899A)、白细胞介素1β(IL-1β)ELISA试剂盒(货号:MB-2776B)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)ELISA试剂盒(货号:MB-2868B),江苏酶标生物科技有限公司;RNAiso Plus(货号:9109)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号:RR 036A)、TB Green Premix Ex Taq II(货号:RR 820A),宝日医生物技术(北京)有限公司;丝氨酸蛋白酶激肽释放酶5(KLK5)抗体(货号:10514-2-AP)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)抗体(货号:10514-2-AP)、干扰素γ(IFN-γ)抗体(货号:10514-2-AP)、信号转导转录激活因子1(STAT1)抗体(货号:10144-2-AP)、信号转导转录激活因子3(STAT3)抗体(货号:10253-2-AP)、CC趋化因子受体5(CCR5)抗体(货号:17476-1-AP)、山羊抗兔二抗(货号:SA00001),武汉三鹰生物工程有限公司;CD4抗体(货号:ab183685),美国Abcam公司;蛋白定量试剂盒(货号:P0010)、RIPA裂解液(货号:P0013B),碧云天生物工程有限公司;ECL显色试剂盒(货号:WBKLS0500),美国Merck Millipore公司;免疫组化二抗(货号:KIT5020),福州迈新生物技术有限公司;DAB显色试剂盒(货号:DA1016)、戊巴比妥钠(货号:57-33-0),美国Sigma公司;HE染色试剂盒(货号:G1120)、甲苯胺蓝染色液(货号:G3670),北京索莱宝生物科技有限公司。

RM2135型石蜡切片机,Lecia公司;BX53型正置显微镜,Olympus公司;LightCycler 96型实时荧光定量PCR仪,Roche公司;1658001型电泳仪,Bio-Rad公司;K3 TOUCH型酶标仪,Thermo公司。

1.4 分组、造模及干预方法

50只小鼠采用随机数字表法分为正常对照组、模型组和加味荆芩汤低、中、高剂量组,每组10只。除正常对照组外,其余各组小鼠采用背部注射抗菌肽LL-37方法^[8]建立玫瑰痤疮小鼠模型:实验前24 h剃除小鼠背部3 cm×3 cm范围毛发以备皮,抗菌肽LL-37以无菌水溶解后配成320 μmol/L浓度备用,用胰岛素注射器按40 μl/只向备皮中心部位皮内注射LL-37溶液,每间隔12 h重复注射1次,共注射4次。正常对照组小鼠同时间点背部皮内注射40 μl/只PBS溶液。末次注射12 h后观察注射部位

皮损变化,以可见边界清晰的明显红斑表示造模成功^[8]。造模成功后加味荆芥汤低、中、高剂量组分别给予加味荆芥汤 4.35、8.71、17.42 g/(kg·d)灌胃,模型组和正常对照组小鼠给予 20 ml/(kg·d)生理盐水灌胃。各组均每日 1 次,持续 5 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 玫瑰痤疮样皮损程度评价 末次给药结束 6h 后,对小鼠背部注射区拍照,按红斑程度评分及面积评估各组小鼠皮损程度。红斑程度评分标准^[8]:0 分为无红斑,1 分为隐约可见红斑,2 分为淡红斑明显但边界模糊,3 分为红斑明显且边界清楚,4 分为深色红斑且边界清楚;采用 Image J 1.8.0 软件测量皮损红斑面积。皮损程度评价结束后,以 1% 戊巴比妥钠按 0.2 ml/10 g 的剂量腹腔注射麻醉处死小鼠,收集背部皮损组织,一部分固定于 4% 多聚甲醛中用于 HE、甲苯胺蓝染色及免疫组化检测,另一部分冻存于 -80 °C 以备 ELISA、RT-qPCR 及 Western blot 检测。ELISA 检测每组取 7 个样本,其余指标每组按标号 1-5 取其中 5 个样本进行检测。

1.5.2 HE 染色观察小鼠背部皮损组织病理形态 取多聚甲醛固定的组织样本,经脱水、石蜡包埋,切片,常规 HE 染色后,200 倍显微镜下观察皮肤病理形态学变化。

1.5.3 甲苯胺蓝染色观察皮损组织肥大细胞浸润情况 取包埋好的石蜡组织样本,切成 5 μm 厚切片,按甲苯胺蓝染色试剂盒说明书进行染色,并在 200 倍显微镜下随机选取 5 个视野,计数每个视野内蓝紫色的肥大细胞数量。

1.5.4 ELISA 法检测小鼠皮损组织中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平 取冻存皮损组织 30 mg,各样本加入 PBS 冰浴进行组织匀浆后,4 °C、4000 r/min

离心 10 min (离心半径 10 cm),取上清,经 BCA 蛋白定量调整各样本浓度一致后,按 ELISA 试剂盒说明书检测。

1.5.5 RT-qPCR 法检测炎症因子及致病关键因子 mRNA 表达水平 取冻存皮损组织 30 mg,置于液氮预冷的研钵中,并少量多次加入液氮研磨成粉末状后,加入 RNAiso Plus 试剂匀浆,并按 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,测定各样本浓度。参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书逆转录成 cDNA,采用 SYBR GreenII 嵌合荧光法进行扩增反应检测炎症因子(包括 IL-1β、IL-6、TNF-α、INF-γ)及致病关键因子[包括 Toll 样受体 2 (TLR2)、KLK5、MMP-9]的 mRNA 表达变化。扩增条件为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,62 °C 退火及扩增 30 s,40 个循环。按 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物由生工(上海)生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.5.6 免疫组织化染色检测 KLK5、MMP-9 蛋白表达及 CD4⁺T 阳性细胞数量 石蜡切片经脱蜡、抗原修复、封闭处理后,在组织切片上滴加一抗 KLK5(1:100)、MMP-9(1:100)、CD4(1:100)4 °C 孵育过夜,次日 PBS 洗 5 min×3 次,加二抗工作液 37 °C 孵育 30 min,洗片,DAB 显色,洗片,苏木素复染,自来水冲洗返蓝,盐酸酒精分化数秒,洗片后脱水封片于 200 倍显微镜下随机取 5 个视野,采用 Image-pro6.0 图像分析软件分析,以阳性细胞数计算阳性表达。

1.5.7 Western blot 法检测小鼠皮损组织 CD4⁺T 细胞相关因子 CCR5、IFN-γ、STAT1、STAT3 蛋白表达 RIPA 蛋白裂解液提取各组小鼠背部皮损组织总蛋白,经 BCA 法检测总蛋白浓度,并调整各样本浓度一致后,经电泳分离蛋白,转膜、脱脂奶粉

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	上游	下游	产物长度/bp
IL-1β	CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC	TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTAC	145
IL-6	CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC	TCTGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTG	91
TNF-α	GGACTAGCCAGGAGGAGAACAG	GCCAGTGACTGAAAGGGACAGAAC	103
INF-γ	CTGGAGGAAGTGGCAAAAGGATGG	GACGCTTATGTTGCTGCTGATGGC	86
TLR2	CTCCCAGATGCTTCGTTGTTCCC	GTTGTCGCCTGCTTCCAGAGTC	128
KLK5	CCTGGAAATGGGCAATGGCTACC	GAATCCGTGCTGAGGTCTCTGTTG	131
MMP-9	CGCCACCACAGCCAATATGA	CTGCTTGCCAGGAAGACGAA	112

注:IL-1β,白细胞介素 1β;IL-6,白细胞介素 6;TNF-α,肿瘤坏死因子 α;INF-γ,干扰素 γ;TLR2,Toll 样受体 2;KLK5,丝氨酸蛋白酶激活剂释放酶 5;MMP-9,基质金属蛋白酶 9。

封闭、对应一抗，抗体稀释比例为 IFN- γ (1:000)、STAT1 (1:1000)、CCR5 (1:1000)、STAT3 (1:10 000)，4℃孵育过夜，TBST洗膜3次，加入二抗工作液(1:5000)，ECL法显色成像。采用 Image J 1.8.0 软件进行定量分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，方差齐多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 法；方差不齐用秩和检验，组间比较采用 Dunn's 检验或 Mann-Whitney *U* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠皮损红斑程度评分及红斑面积比较

表2示，正常对照组小鼠背部注射部位皮肤正常，未见皮损及红斑。模型组小鼠红斑程度评分及红斑面积较正常对照组显著升高($P<0.05$)。与模型组比较，加味荆芩汤中、高剂量组小鼠红斑程度评分及红斑面积均显著降低($P<0.05$)，加味荆芩汤低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。加味荆芩汤中、高剂量组比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠背部皮损组织 HE 染色病理损伤比较

HE 染色(图1)示，正常对照组小鼠皮肤结构正常，表皮、真皮、皮下组织及胶原纤维均匀分

表2 各组小鼠皮损红斑程度评分及红斑面积比较
Table 2 Comparison of erythema severity score and erythema area in the skin lesions of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

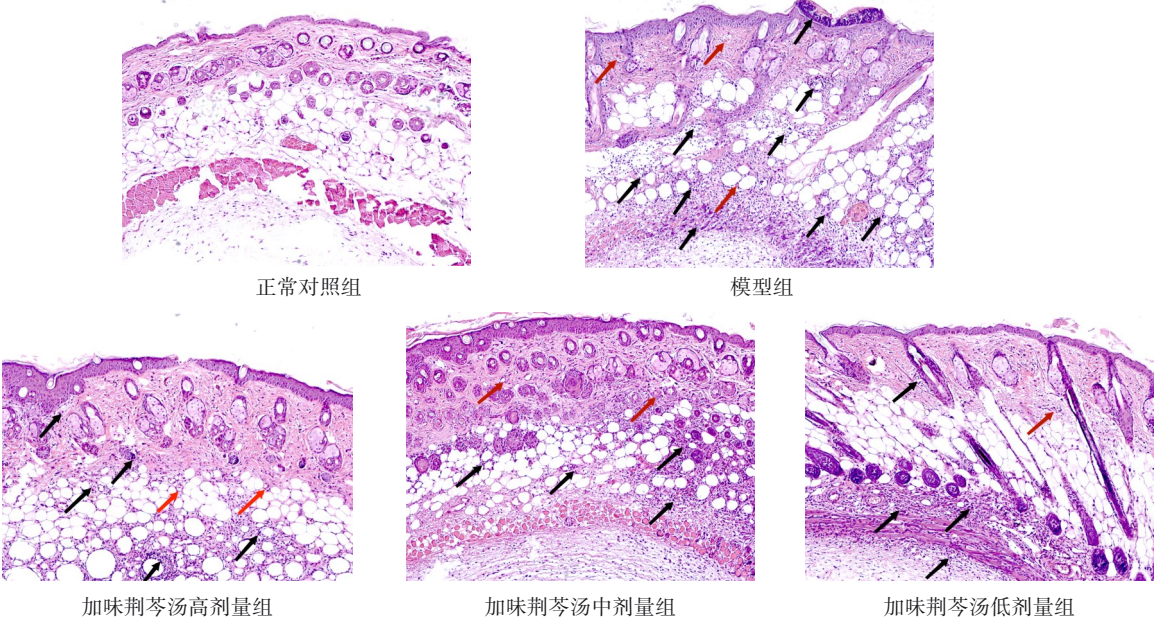
组别	鼠数	红斑程度评分/分	红斑面积/cm ²
正常对照组	7	0 ^{a)}	0 ^{a)}
模型组	7	3.50±0.71	0.54±0.10
加味荆芩汤高剂量组	7	2.30±0.67 ^{a)}	0.38±0.10 ^{a)}
加味荆芩汤中剂量组	7	2.20±0.79 ^{a)}	0.41±0.12 ^{a)}
加味荆芩汤低剂量组	7	3.10±0.57	0.50±0.14

注：a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

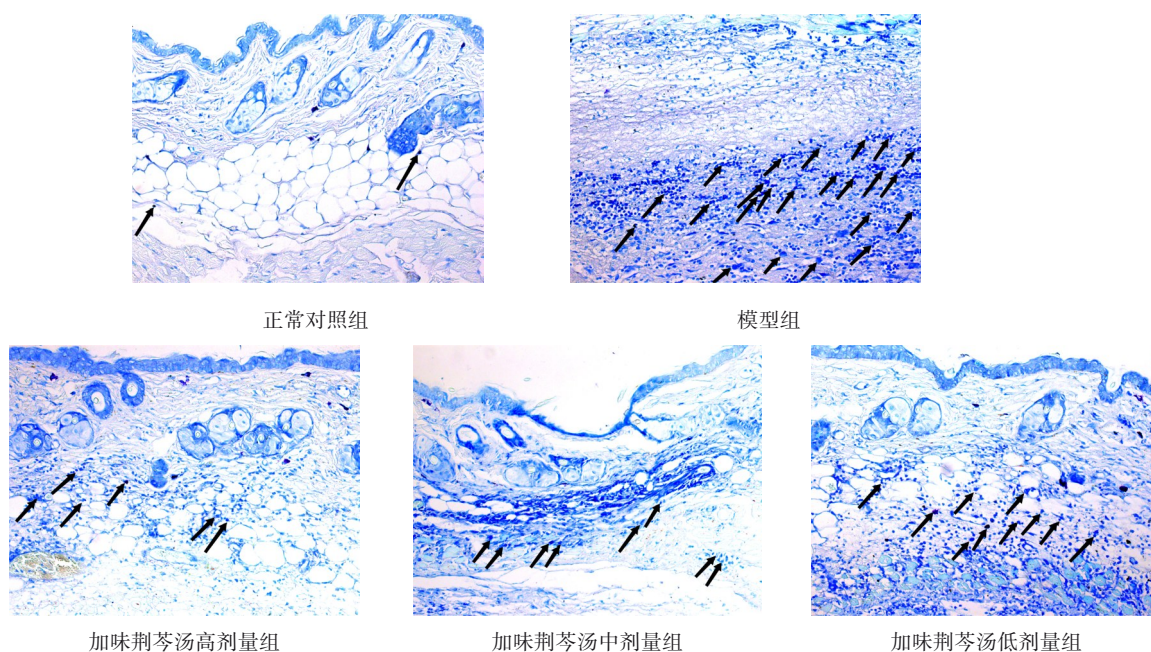
布，未见炎性细胞浸润。模型组小鼠可见皮肤组织增厚明显，皮肤屏障损伤，毛细血管增生，大量炎性细胞浸润，部分可见深层结缔组织损伤。与模型组比较，加味荆芩汤中、高剂量组皮肤增厚减轻，炎性渗出及炎性细胞浸润有所减少，毛细血管增生明显改善，整体病理损伤明显减轻，但两组间无明显差异；加味荆芩汤低剂量组炎性细胞浸润亦减轻，皮肤增厚有所改善，但改善情况不如加味荆芩汤中、高剂量组明显。

2.3 各组小鼠背部皮损组织肥大细胞浸润情况比较

甲苯胺蓝染色(图2)示，正常对照组小鼠皮肤组织真皮层可见少许肥大细胞，胞质呈淡蓝色，分布较为分散；模型组小鼠皮肤组织肥大细胞数量较正常对照组明显增多，可见肥大细胞颗粒向四周分散，同时伴见组织水肿等情况；与模型组比较，加味荆芩汤低剂量组肥大细胞数量无明显减少，加



注：图中黑色箭头指示为炎性细胞浸润，红色箭头指示为毛细血管增生。
图1 各组小鼠背部皮损组织病理形态(HE染色，×100)
Figure 1 Histopathological morphology of skin lesions in the back of mice in each group (HE staining, ×100)



注：黑色箭头指示为肥大细胞。

图 2 各组小鼠背部皮损组织肥大细胞浸润情况（甲苯胺蓝染色，×200）

Figure 2 Mast cell infiltration in the skin lesions of mice in each group (toluidine blue staining, ×200)

味荆芥汤中、高剂量组肥大细胞数量减少，血管扩张情况得到改善，且两组差异不显著。正常对照组肥大细胞数量为（7.25±0.95）个/视野，模型组为（23.25±3.59）个/视野，加味荆芥汤低剂量组为（20.75±1.50）个/视野，加味荆芥汤中剂量组为（11.50±1.29）个/视野，加味荆芥汤高剂量组为（10.05±1.29）个/视野。模型组肥大细胞数量较正常对照组显著增多（ $P<0.05$ ）；加味荆芥汤中、高剂量组肥大细胞数量较模型组显著减少（ $P<0.01$ ），加味荆芥汤低剂量组较模型组差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。加味荆芥汤中、高剂量组肥大细胞数量比较差异亦无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

2.4 各组小鼠背部皮损组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较

表 3 示，与正常对照组比较，模型组小鼠皮损组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平均显著升高（ $P<$

0.05）。与模型组比较，加味荆芥汤中剂量组 IL-1β 降低，加味荆芥汤高剂量组 IL-6、IL-1β、TNF-α 均显著降低（ $P<0.05$ ），加味荆芥汤低剂量组 IL-6、IL-1β、TNF-α 差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。加味荆芥汤中、高剂量组各指标比较差异亦无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

2.5 各组小鼠背部皮损组织炎症因子及致病关键因子 mRNA 表达比较

表 4 示，与正常对照组比较，模型组小鼠皮损组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、TLR2、INF-γ、KLK5、MMP-9 mRNA 表达均显著升高（ $P<0.05$ ）。与模型组比较，加味荆芥汤各剂量组 IL-1β、TNF-α mRNA 表达均降低，加味荆芥汤高、低剂量组 INF-γ mRNA 表达降低，加味荆芥汤高剂量组 IL-6、TLR2、MMP-9 mRNA 表达均降低（ $P<0.05$ ）。加味荆芥汤各剂量组 KLK-5 mRNA 水平均有下调但差

表 3 各组小鼠皮损组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较

Table 3 Comparison of IL-1β, IL-6, and TNF-α levels in the skin lesions of mice in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1β	IL-6	TNF-α
正常对照组	7	77.65±10.76 ^{a)}	78.19±13.30 ^{a)}	569.71±38.91 ^{a)}
模型组	7	109.56±26.77	102.15±16.58	664.71±98.10
加味荆芥汤低剂量组	7	99.83±17.60	92.82±6.70	630.43±99.88
加味荆芥汤中剂量组	7	80.71±10.42 ^{a)}	87.60±7.38	594.71±85.15
加味荆芥汤高剂量组	7	81.71±13.34 ^{a)}	82.51±4.31 ^{a)}	562.21±62.72 ^{a)}

注：IL-1β，白细胞介素 1β；IL-6，白细胞介素 6；TNF-α，肿瘤坏死因子 α。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

表 4 各组小鼠背部皮损组织炎症因子及致病关键因子 mRNA 表达比较

Table 4 Comparison of mRNA expression of inflammatory factors and key pathogenic factors in the skin lesions of mice in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	IL-6	TNF- α	INF- γ
正常对照组	5	1.13 $\pm$ 0.37 ^{a)}	0.88 $\pm$ 0.15 ^{a)}	0.93 $\pm$ 0.22 ^{a)}	1.04 $\pm$ 0.36 ^{a)}
模型组	5	3.09 $\pm$ 0.38	1.99 $\pm$ 0.36	3.61 $\pm$ 1.12	2.34 $\pm$ 1.04
加味荆芥汤高剂量组	5	1.29 $\pm$ 0.55 ^{a)}	1.21 $\pm$ 0.43 ^{a)}	1.87 $\pm$ 0.87 ^{a)}	0.92 $\pm$ 0.15 ^{a)}
加味荆芥汤中剂量组	5	1.04 $\pm$ 0.33 ^{a)}	1.99 $\pm$ 0.31	1.90 $\pm$ 1.10 ^{a)}	1.22 $\pm$ 0.68
加味荆芥汤低剂量组	5	1.16 $\pm$ 0.28 ^{a)}	2.21 $\pm$ 0.98	1.21 $\pm$ 0.60 ^{a)}	1.03 $\pm$ 0.20 ^{a)}
组别	鼠数	TLR2	KLK5	MMP-9	
正常对照组	5	1.20 $\pm$ 0.45 ^{a)}	1.16 $\pm$ 0.63 ^{a)}	1.06 $\pm$ 0.40 ^{a)}	
模型组	5	2.48 $\pm$ 0.89	2.60 $\pm$ 0.77	2.62 $\pm$ 0.94	
加味荆芥汤高剂量组	5	1.30 $\pm$ 0.64 ^{a)}	1.73 $\pm$ 0.43	1.57 $\pm$ 0.82 ^{a)}	
加味荆芥汤中剂量组	5	1.47 $\pm$ 1.09	1.89 $\pm$ 1.02	2.36 $\pm$ 0.73	
加味荆芥汤低剂量组	5	2.88 $\pm$ 0.80	2.36 $\pm$ 0.39	1.98 $\pm$ 0.55	

注：IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；IL-6，白细胞介素 6；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；INF- γ ，干扰素 γ ；TLR2，Toll 样受体 2；KLK5，丝氨酸蛋白酶 5；MMP-9，基质金属蛋白酶 9。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.6 各组小鼠背部皮损组织 KLK5、MMP-9 蛋白表达及 CD4⁺T 阳性细胞数比较

表 5 示，与正常对照组比较，模型组小鼠皮损组织 KLK5、MMP-9 蛋白表达及 CD4⁺T 阳性细胞数升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，加味荆芥汤高剂量组小鼠皮损组织 MMP-9、KLK5 蛋白表达及 CD4⁺T 阳性细胞数显著降低 ($P<0.05$)；加味荆芥汤中剂量组 CD4⁺T 阳性细胞数降低 ($P<0.05$)，但

与加味荆芥汤高剂量组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠背部皮损组织 KLK5、MMP-9 蛋白表达及 CD4⁺T 表达免疫组织化学染色图见附件 (请扫描本文二维码获取)。

2.7 各组小鼠背部皮损组织 CD4⁺T 相关细胞因子 CCR5、IFN- γ 、STAT1、STAT3 蛋白表达比较

表 6 示，与正常对照组比较，模型组小鼠皮损组织 IFN- γ 、STAT1 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，CCR5、STAT3 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>$

表 5 各组小鼠皮损组织 KLK5、MMP-9 蛋白表达及 CD4⁺T 阳性细胞数比较

Table 5 Comparison of protein expression of key pathogenic factors and the number of CD4⁺T cells in the skin lesions of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	KLK5/IOD	MMP-9/IOD	CD4 ⁺ T 阳性细胞数/个·视野 ⁻¹
正常对照组	5	0.41 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.30 $\pm$ 0.01 ^{a)}	8.50 $\pm$ 1.29 ^{a)}
模型组	5	0.56 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.01	17.50 $\pm$ 2.08
加味荆芥汤高剂量组	5	0.47 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.31 $\pm$ 0.04 ^{a)}	7.75 $\pm$ 2.50 ^{a)}
加味荆芥汤中剂量组	5	0.50 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.05	8.50 $\pm$ 1.29 ^{a)}
加味荆芥汤低剂量组	5	0.50 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.03	14.50 $\pm$ 2.08

注：KLK5，丝氨酸蛋白酶 5；MMP-9，基质金属蛋白酶 9。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

表 6 各组小鼠皮损组织 CD4⁺T 相关细胞因子蛋白表达比较

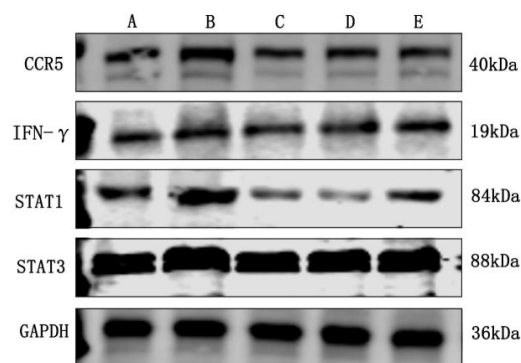
Table 6 Comparison of protein expression of CD4⁺T cell-related cytokines in the skin lesions of mice in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CCR5	IFN- γ	STAT1	STAT3
正常对照组	5	0.58 $\pm$ 0.25	0.64 $\pm$ 0.22 ^{a)}	0.52 $\pm$ 0.33 ^{a)}	0.81 $\pm$ 0.41
模型组	5	0.82 $\pm$ 0.27	1.03 $\pm$ 0.18	1.05 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.37
加味荆芥汤高剂量组	5	0.55 $\pm$ 0.12	0.72 $\pm$ 0.14 ^{a)}	0.48 $\pm$ 0.20 ^{a)}	0.81 $\pm$ 0.28
加味荆芥汤中剂量组	5	0.71 $\pm$ 0.21	0.81 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.42	0.85 $\pm$ 0.29
加味荆芥汤低剂量组	5	0.61 $\pm$ 0.16	0.85 $\pm$ 0.16	0.57 $\pm$ 0.38	0.71 $\pm$ 0.23

注：CCR5，CC 趋化因子受体 5；IFN- γ ，干扰素 γ ；STAT1，信号转导转录激活因子 1；STAT3，信号转导转录激活因子 3。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

0.05)。与模型组比较,加味荆芩汤高剂量组 IFN- γ 及 STAT1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。各组小鼠皮损组织 CCR5、IFN- γ 、STAT1、STAT3 蛋白电泳图见图 3。



注: A, 正常对照组; B, 模型组; C, 加味荆芩汤高剂量组; D, 加味荆芩汤中剂量组; E, 加味荆芩汤低剂量组; CCR5, CC 趋化因子受体 5; IFN- γ , 干扰素 γ ; STAT1, 信号转导转录激活因子 1; STAT3, 信号转导转录激活因子 3。

图 3 各组小鼠皮损组织 CCR5、IFN- γ 、STAT1、STAT3 蛋白电泳图

Figure 3 Protein electrophoresis of CCR5, IFN- γ , STAT1, and STAT3 in the skin lesions of mice in each group

3 讨论

玫瑰痤疮为临床常见难治性皮肤疾病,复发率高,不易根治,属于中医学“酒齄鼻”范畴。《诸病源候论·酒齄鼻候》曰:“此为饮酒,热势冲面,而遇风冷之气相搏所生,故令鼻面生齄,赤疱匝匝然也。”《外科大成》云:“酒渣鼻者,由肺经血热内蒸,遇风寒外束,血瘀凝滞而成,治须宣肺气,化滞血,使营卫流通。”热为阳邪,易侵犯人体头面部,皮损多发为红赤,和本病面中部潮红、红斑的特征性表现一致;血热生风,则见灼热、痒痛等症;血热夹湿毒,则见丘疹、脓疱;血热日久致瘀则发为鼻赘。加味荆芩汤紧扣玫瑰痤疮血热瘀毒的病机而组方,方中生地黄、紫草专入血分,滋阴凉血,解血分热毒,共为君药;牡丹皮、赤芍凉血散瘀,黄芩泻火解毒,三药为臣药;热盛易生风,荆芥透散血中风邪外出,土茯苓除湿解毒,青蒿凉血并可透血分虚热,三药为佐药。全方共奏清热凉血、解毒散瘀之功。

LL-37 是玫瑰痤疮发病的关键分子,小鼠皮内注射 LL-37 可引起类似玫瑰痤疮样的皮损^[9]。本研究中,造模成功模型小鼠给予加味荆芩汤不同剂量干预后,加味荆芩汤各剂量组均不同程度改善了玫

瑰痤疮样皮损,根据红斑面积及红斑程度评分,病理形态学观察及甲苯胺蓝染色结果,以加味荆芩汤中、高剂量改善作用尤为显著,表现为红斑颜色、面积及皮肤厚度、炎症浸润程度均较模型组明显减轻。该结果初步验证了加味荆芩汤临床治疗玫瑰痤疮的有效性。

研究已证实,LL-37 从表皮释放,可引起炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 分泌增多,进而激活肥大细胞^[10]。目前认为肥大细胞在玫瑰痤疮炎症中起着循环扩增的作用,研究发现小鼠皮肤如局部敲除肥大细胞,LL-37 则不能诱导玫瑰痤疮样炎症反应^[11]。肥大细胞激活后还可释放 MMP-9,进一步促进 LL-37 的产生^[12]。本研究结果显示,加味荆芩汤高剂量可明显降低皮损组织炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的水平,表明加味荆芩汤高剂量可抑制皮损部位的炎症因子释放,减轻皮肤炎症反应,进而降低肥大细胞的活性,该结果与甲苯胺蓝染色显示的明显减少受损部位肥大细胞浸润数量的结果基本一致。

玫瑰痤疮的免疫发病机制与固有免疫及适应性免疫密切相关^[13]。TLR2 为玫瑰痤疮中经典的固有免疫分子,TLR2 的过度表达是玫瑰痤疮的主要病理机制^[14]。皮肤角质形成细胞受到如紫外线、微生物等诱因刺激,可致 TLR2 表达增加,并上调人源阳离子抗菌肽 18(hCAP-18)表达, hCAP-18 可被 KLK-5 加工为 LL-37,诱导 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子增加,进一步激活肥大细胞释放 MMP-9^[9]。为了进一步研究,采用 RT-qPCR 检测皮损组织炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 及玫瑰痤疮致病关键因子 TLR2、KLK5、MMP-9 mRNA 的表达,并用免疫组化染色检测 KLK5、MMP-9 蛋白表达,以明确加味荆芩汤改善玫瑰痤疮的作用靶点。结果显示,加味荆芩汤各剂量组均可显著降低 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达,加味荆芩汤高剂量组对 IL-6、TLR2、MMP-9 mRNA 表达均具有明显下调作用。免疫组化染色结果显示,经加味荆芩汤高剂量干预后,小鼠皮损组织 MMP-9 和 KLK-5 蛋白表达均显著降低。以上研究结果提示,加味荆芩汤可通过调控固有免疫分子 TLR2 进而下调其下游分子 KLK5、MMP-9 及炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的转录及表达,可能是其治疗的重要作用环节。

适应性免疫失调是玫瑰痤疮另一发病机制。适应性免疫包括细胞免疫和体液免疫两个部分,其中细胞免疫主要由 T 淋巴细胞介导, CD4⁺T 细胞是适

应性免疫中的重要组成部分。玫瑰痤疮发病早期可见血管周围 CD4⁺T 细胞浸润明显, 且在各型玫瑰痤疮中, 炎症浸润占比最多的免疫细胞是 CD4⁺T 细胞, IFN- γ 是一种由 CD4⁺T 细胞产生的因子, 对适应性免疫具有重要影响^[15]。玫瑰痤疮发病时, LL-37 促进趋化因子产生, 进而募集 CD4⁺T 细胞在皮肤局部聚集, 促进 CD4⁺T 细胞相关因子 IFN- γ 、STAT1、CCR5、STAT3 表达升高, 加重皮肤炎症反应^[16]。本研究结果显示, 模型组小鼠 CD4⁺T 阳性细胞浸润显著增加, 加味荆芩汤中、高剂量均可不同程度减少 CD4⁺T 阳性细胞数量, 加味荆芩汤低、高剂量组可显著下调 INF- γ mRNA 水平, 且加味荆芩汤高剂量能显著降低 IFN- γ 及 STAT1 蛋白表达。以上结果提示, 加味荆芩汤对玫瑰痤疮小鼠适应性免疫失调具有一定调节作用, 可通过减少 CD4⁺T 阳性细胞浸润, 下调 CD4⁺T 细胞相关因子 IFN- γ 、STAT1 表达来降低皮肤炎症反应及损伤。

综上所述, 本研究初步明确加味荆芩汤对玫瑰痤疮小鼠炎症反应具有明显改善作用, 结合药效机制探究, 认为主要可能与其调节固有免疫及适应性免疫功能进而减轻炎症反应相关。本研究也存在不足: 如未设置阳性药物对照组, 由于本研究中加味荆芩汤高剂量组药效及机制初探结果较其他组显著, 后续研究可在此剂量基础上, 设置阳性药物对照组。另外, 亦可结合现代研究的结果, 从改善创面微环境、干预血管生成及抗微生物等方面探讨其他可能的作用机制, 进一步阐明加味荆芩汤干预玫瑰痤疮的作用机制。

参考文献

- [1] 中国医师协会皮肤科医师分会玫瑰痤疮专业委员会. 中国玫瑰痤疮诊疗指南(2021版)[J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(4): 279-288.
- [2] 李健, 宋志强. 玫瑰痤疮面部潮红与红斑新认识[J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(4): 360-363.
- [3] ZHANG H, TANG K, WANG Y, et al. Rosacea and its comorbidities: should be emphasized but should not be over-emphasized[J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19(12): 3414-3415.
- [4] DAI R, LIN B, ZHANG X, et al. Depression and anxiety in rosacea patients: a systematic review and meta-analysis[J]. Dermatol Ther, 2021, 11(6): 2089-2105.
- [5] 杨文星, 黄虹. 刘复兴教授运用荆芩汤治疗血热型皮肤病经验举隅[C]//云南省中医药学会, 云南省中西医结合学会, 云南省针灸学会, 等. 第六届兰茂论坛暨 2019 年云南省中医药界学术年会论文集. 玉溪: 云南省中医药学会, 云南省中西医结合学会, 云南省针灸学会, 2019: 112-113.
- [6] 唐浩然. 荆芩汤治疗多形日光疹的药效学研究和临床观察[D]. 昆明: 云南中医学院, 2013.
- [7] 黄虹, 欧阳晓勇, 叶建州, 等. 凉血止痒合剂治疗皮炎湿疹类疾病 136 例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(9): 42.
- [8] KIM M, KIM KE, JUNG HY, et al. Recombinant erythroid differentiation regulator 1 inhibits both inflammation and angiogenesis in a mouse model of rosacea[J]. Exp Dermatol, 2015, 24(9): 680-685.
- [9] 郑娟妮, 周杰, 张硕勋, 等. 抗菌肽 LL-37 诱导小鼠玫瑰痤疮样疾病模型的建立与评价[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(1): 37-43, 50.
- [10] GÖKÇİNAR NB, KARABULUT AA, ONARAN Z, et al. Elevated tear human neutrophil peptides 1-3, human beta defensin-2 levels and conjunctival cathelicidin LL-37 gene expression in ocular rosacea[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2019, 27(7): 1174-1183.
- [11] WANG L, WANG YJ, HAO D, et al. The theranostics role of mast cells in the pathophysiology of rosacea[J]. Front Med(Lausanne), 2019, 6: 324. doi: 10.3389/fmed. 2019. 00324.
- [12] MUTO Y, WANG Z, VANDERBERGHE M, et al. Mast cells are key mediators of cathelicidin-initiated skin inflammation in rosacea[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(11): 2728-2736.
- [13] VAN ZUUREN EJ. Rosacea[J]. N Engl J Med, 2017, 377(18): 1754-1764.
- [14] YAMASAKI K, KANADA K, MACLEOD DT, et al. TLR2 expression is increased in rosacea and stimulates enhanced serine protease production by keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(3): 688-697.
- [15] BUHL T, SULK M, NOWAK P, et al. Molecular and morphological characterization of inflammatory infiltrate in rosacea reveals activation of Th1/Th17 pathways[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(9): 2198-2208.
- [16] WANG Y, WANG B, LI J, et al. Multi-transcriptomic analysis and experimental validation implicate a central role of STAT3 in skin barrier dysfunction induced aggravation of rosacea[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 2141-2156. doi: 10.2147/JIR. S356551.

Effects of *Jiawei Jingqin Decoction* (加味荆芩汤) on Inflammatory and Immune Responses in Rosacea Model Mice

YANG Jin, ZHAO Lijuan, WU Di, ZHANG Xu, YE Jianzhou

Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 650021

ABSTRACT **Objective** To investigate the potential mechanisms of *Jiawei Jingqin Decoction* (加味荆芩汤) in the treatment of rosacea. **Methods** Fifty 8-week-old female BALB/c mice were randomly divided into normal control group, model group, and *Jiawei Jingqin Decoction* low, medium, and high-dose groups, with 10 mice in each group. Except for the normal control group, mice in the other groups were injected with 40 μ l of antimicrobial peptide LL-37 at a concentration of 320 μ mol/L on the back, repeated once every 12 hours for a total of 4 injections, to induce the rosacea mouse model. The mice in the normal control group were injected with 40 μ l of PBS solution at the same time. After successful modeling, the mice in the *Jiawei Jingqin Decoction* low, medium, and high-dose groups were orally administered *Jiawei Jingqin Decoction* at doses of 4.35, 8.71, and 17.42 g/(kg·d) respectively, while the mice in the normal control group and the model group were orally administered 20 ml/(kg·d) of normal saline. All groups were treated once daily for 5 days. The changes in skin lesions were observed, and the erythema area was measured and scored. Skin tissue at the injection site was collected for histopathological examination using HE staining, and the number of mast cells was detected using toluidine blue staining. The levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the skin lesion tissues were measured using the ELISA method. The mRNA expression levels of key factors in the innate immune response pathway of rosacea disease mechanism, including Toll-like receptor 2 (TLR2), downstream molecules serine protease kallikrein 5 (KLK5) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), as well as related inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, TNF- α), and adaptive immune CD4⁺ T cell-related factors interferon- γ (INF- γ) mRNA were detected using RT-qPCR. Immunohistochemical staining was performed to detect the protein expression of KLK5, MMP-9, and the number of CD4⁺ T-positive cells. Western blot analysis was used to determine the protein expression levels of CD4⁺ T cell-related factors including IFN- γ , CC chemokine receptor 5 (CCR5), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Results** The skin at the injection site on the back of mice in the normal control group appeared normal without any skin lesions or erythema, and histopathological examination showed no infiltration of inflammatory cells. The model group had significantly higher erythema scores and larger erythema areas compared to the normal control group ($P < 0.05$), and histopathological examination revealed a significant infiltration of inflammatory cells, with some signs of deep connective tissue damage. Compared to the model group, the *Jiawei Jingqin Decoction* medium and high-dose groups showed a significant decrease in erythema scores and erythema areas ($P < 0.05$), as well as a reduction in inflammatory exudates and inflammatory cell infiltration. However, the *Jiawei Jingqin Decoction* low-dose group did not show significant difference ($P > 0.05$), but there was a slight reduction in inflammatory cell infiltration compared to the model group. When compared to the normal control group, the rosacea skin tissues of the model group showed an increase in the number of mast cells, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , mRNA expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , TLR2, INF- γ , KLK5, MMP-9, protein expression of KLK5, MMP-9, and the number of CD4⁺ T-positive cells ($P < 0.05$). Compared to the model group, the *Jiawei Jingqin Decoction* medium and high-dose groups showed a decrease in the number of mast cells, levels of IL-1 β , mRNA expression of IL-1 β , TNF- α , and the number of CD4⁺ T-positive cells. The *Jiawei Jingqin Decoction* high-dose group showed a decrease in IL-6, TNF- α levels, mRNA expression of IL-6, TLR2, INF- γ , MMP-9, protein expression of MMP-9, KLK5, and the number of CD4⁺ T-positive cells, as well as a decrease in IFN- γ and STAT1 protein expression ($P < 0.05$) compared to the Model group. **Conclusion** *Jiawei Jingqin Decoction* has significant improvement effect on the skin symptoms of roseacne in a mouse model. Its mechanism might be related to regulating skin immune inflammatory reactions, thereby reducing the release of pathogenic factors and inflammatory factors.

Keywords rosacea; CD4⁺T positive cell; immune responses; immune responses; *Jiawei Jingqin Decoction* (加味荆芩汤)

(收稿日期: 2023-08-28; 修回日期: 2023-10-31)

[编辑: 邓媛]