

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.02.012

基于 Caspase-1/GSDMD 蛋白通路探究青石止痒软膏对银屑病小鼠模型的干预机制

李雅瞳¹, 李元文²✉, 邓宇童¹, 任雪雯¹, 王雪皖¹, 于心荟¹, 刘唐云妮¹

1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 北京中医药大学东方医院

[摘要] **目的** 探讨青石止痒软膏治疗银屑病的可能作用机制。**方法** 将 40 只小鼠随机分成空白组、模型组、卡泊三醇组和青石组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组小鼠均采用咪喹莫特乳膏背部皮肤外用建立银屑病小鼠模型。每日造模 6 h 后, 卡泊三醇组和青石组分别在经造模处理的背部皮肤处给予卡泊三醇软膏 0.5 g、青石止痒软膏 0.5 g 外用治疗, 空白组和模型组不干预。隔日观察小鼠皮损变化并进行银屑病面积和严重程度指数 (PASI) 评分, 7 日后取背部皮肤组织 HE 染色观察组织病理学改变, ELISA 法测定白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18) 含量, Western Blot 法检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 1 前体 (Pro-Caspase-1)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1)、消皮素 D (GSDMD) 和消皮素 D 氮端活性结构域多肽 (GSDMD-N) 蛋白水平, 免疫组化法观测 GSDMD 蛋白水平。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠皮肤变红, 出现红斑、白色鳞屑, 镜下可见表皮增厚、棘突延长和炎症细胞浸润, 第 1、3、5、7 天皮肤组织 PASI 评分升高, GSDMD 蛋白的 IOD、AOD 值升高, Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平及 IL-18、IL-1 β 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 青石组和卡泊三醇组皮损较轻; 青石组第 5、7 天及卡泊三醇组第 3、5、7 天 PASI 评分降低; 两组 GSDMD 蛋白 IOD、AOD 值, Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平, 以及 IL-18、IL-1 β 水平均下降; 卡泊三醇组 Pro-Caspase-1 蛋白水平亦下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与卡泊三醇组比较, 青石组小鼠皮肤整体稍红, 角质层增厚明显, 毛细血管扩张现象减轻; 第 3、7 天 PASI 评分升高, 第 5 天 PASI 评分降低; Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白及 IL-18、IL-1 β 水平升高 ($P<0.05$)。**结论** 青石止痒软膏可有效缓解小鼠银屑病皮炎反应, 其作用机制可能与调节 Caspase-1/GSDMD 蛋白通路, 下调 IL-18、IL-1 β 水平, 减轻细胞焦亡相关。

[关键词] 银屑病; 青石止痒软膏; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 1; 消皮素 D

银屑病, 或称“白疔”“干癣”“牛皮癣”等, 是一种慢性、炎症性、自身免疫性皮肤病^[1], 主要表现为鳞屑性红斑、斑块、丘疹, 常伴瘙痒, 严重者可累及关节、内脏, 甚至造成死亡。目前银屑病的治疗手段中, 生物制剂临床疗效好, 但存在使用过程抗药抗体产生, 疗效下降甚至失效及长期使用的经济负担大等不足^[2]。银屑病大多为慢性病程, 需要进行长期药物干预, 相较于其他给药方式, 外用可避免首关效应和胃肠道破坏, 直达目标部

位, 降低毒性和不良反应^[3], 安全性高, 价格也相对低廉。在现有的外用药物中, 卡泊三醇软膏对银屑病有明确治疗效果^[4], 《中国银屑病诊疗指南 (2023 版)》推荐其为轻症银屑病首选外用药物^[5]。但长期外用卡泊三醇存在皮肤刺激、高钙血症、高钙尿症和甲状旁腺激素抑制等风险^[6]。

青石止痒软膏是一款由名老中医金起凤经验方改良而成的纯中药外用院内制剂, 可有效减轻寻常型银屑病患者的皮肤炎症、瘙痒感, 提高整体生活质量^[7], 且作用温和、刺激量小, 长期使用的安全性良好^[8]。研究发现, 细胞焦亡和炎症反应有着紧密的关联^[9-11], 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 1

基金项目: 北京市自然科学基金 (7232295); 北京中医药“十四五”重点专科项目 (BJZKBC0015)

✉ 通讯作者: 15810104902@163.com

(Caspase-1)、消皮素 D (GSDMD) 和白细胞介素 18 (IL-18)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 等细胞焦亡相关因子在银屑病皮肤炎症反应的形成和进展过程中扮演了关键角色^[12-13]。本研究旨在基于 Caspase-1/GSDMD 信号通路探讨外用青石止痒软膏对小鼠银屑病皮炎的疗效以及可能的作用机制,为银屑病的临床治疗提供依据。本实验通过北京中医药大学动物伦理委员审查(伦理批号: BUCM-2023082301-3185)。

1 材料及方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 40 只, 体重 18~25 g, 8 周龄, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCKX(京)019-0010。本实验于北京中医药大学和平街校区动物房进行。适应性饲养期间和实验过程中, 每 3 日更换 1 次垫料, 自由获取饮食及清洁饮用水。实验室环境温度 23~25 °C、湿度 50%, 每 12 h 进行 1 次明暗循环。

1.2 实验药物

青石止痒软膏组成: 青黛、煅炉甘石、煅石膏、苦参、黄柏、冰片, 比例为 2:6:3:3:3:1, 基质由橄榄油和蜂蜡组成, 院内制剂每克中含 0.18 g 生药, 由北京中医药大学东方医院制剂室提供, 制造许可证号京药制字 Z 20160001; 卡泊三醇软膏, 爱尔兰利奥制药有限公司, 批号 HJ 20160070; 规格 15 g: 0.75 mg; 咪喹莫特乳膏, 天方药业有限责任公司, 批号 H 20031230, 规格: 0.25 g: 12.5 mg。

1.3 主要试剂及仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白提取液、蛋白酶抑制剂、SDS-PAGE 预制胶套装、二抗(北京百奥思科生物医学技术有限公司, 货号分别为 MDL913053、MDL91201、MDL912893、MDL911919、MDL912565); 蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司, 货号 P0013B); 蛋白分子量标准、消皮素 D 氮端活性结构域多肽(GSDMD-N)抗体(苏州博奥龙生物科技有限公司, 货号分别为 BF06193S、BD-PT7991); 苏木素染液、辣根过氧化物酶显色套组、通用型广谱免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号分别为 ZLI-9609、ZLI-9017、SP-9000); 伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1100); VG 染色液

(北京雷根生物技术有限公司, 货号 DC0047); Caspase-1 抗体(美国 Santa 公司, 货号 sc-56036); 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 1 前体(Pro-Caspase-1)抗体(英国 Abcam 公司, 货号 179515); GSDMD 抗体、 β -Actin 抗体、HRP 结合山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 结合山羊抗鼠 IgG 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号分别为 20770-1-AP、20536-1-AP、SA00001-2、SA00001-1); 凡士林(山东德新康医疗科技有限公司, 批号 Q/371426DXK027); 水合氯醛(武汉华玖医药科技有限公司, 批号 H37022673)。4% 多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司, 货号 P1110); IL-18、IL-1 β 酶联免疫吸附试验试剂盒(江莱生物科技有限公司, 货号分别为 JL20253、JL18442)。

HWS-24 型电热恒温水浴槽, 上海一恒恒温设备厂; BG-subMIDI 型电泳仪, 北京百晶生物技术有限公司; TS-100 型脱色摇床, 海门其林贝尔仪器制造公司; CF1524R 型低温离心机, 北京兰杰柯科技有限公司; mini-PROTEAN® Tetra Cell with mini-Trans-Blot® Module And PowerPac™ Universal Power Supply 型 SDS-PAGE 电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; GelDoc-It310 型凝胶成像系统, 美国 UVP 公司; ChemiScope6100 型化学发光成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; 352 型酶标仪, 芬兰 Labsystems 公司; DM3000 型显微镜、ASP200S 型全自动脱水机、RM2235 型石蜡切片机、HI1220 型烤片台、G1150H 型加热石蜡包埋系统, 德国徕卡公司。

1.4 动物分组、造模及干预

采用随机数字表法将 40 只小鼠分为空白组、模型组、卡泊三醇组、青石组, 每组 10 只。小鼠适应性饲养 1 周后选取其背部面积约 2 cm $\times$ 3 cm 的长方形区域进行脱毛, 24 小时后小鼠脱毛处皮肤无损伤则开始造模。空白组小鼠背部脱毛区域外涂凡士林, 其余各组外涂 5% 咪喹莫特乳膏制备银屑病模型^[14], 每次约 62.5 mg, 每天涂抹 1 次, 持续 7 天。每天造模 6 小时后, 青石组和卡泊三醇组备皮部位擦拭后, 青石组每次涂抹 0.5 g 青石止痒软膏, 卡泊三醇组外用 0.5 g 卡泊三醇软膏, 空白组和模型组不进行干预。

1.5 取材

最后一次给药 24 h 后, 用 4% 水合氯醛(0.1 ml/10 g)腹腔注射进行麻醉, 以脊椎脱臼法处死小鼠, 取其背部银屑病皮损集中处面积约 2 cm $\times$ 2 cm

的全层皮肤, 分成4等份, 3份置于无菌无酶冻存管中液氮冷冻, 保存在 -80°C 超低温冰箱中, 以备蛋白及细胞因子测定; 1份置于4%多聚甲醛溶液中, 并于 4°C 固定, 以备显微镜观察。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 小鼠皮损情况评价 隔日观察小鼠背部皮损变化并进行银屑病面积和严重指数(PASI)评分^[14]以评估实验过程中小鼠的皮肤炎症情况, 主要从红斑、鳞屑和浸润程度三个方面评价, 无计0分、轻微计1分、较明显计2分、显著计3分、非常显著计4分, 三项分数的总和为总分, 总分越高, 皮损越严重。

1.6.2 皮肤组织病理形态 4%多聚甲醛液中保存的小鼠背部皮肤组织样本经过脱水、浸蜡、包埋、切片、贴片等一系列操作后, 以苏木素染色5 min, 接着用清水冲刷10 min, 复以伊红染色20 s。染色完毕之后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 最后以中性树胶密封, 在显微镜下观察并摄片。

1.6.3 Western Blot法检测Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N蛋白水平 用随机数字表法在每组中选取6只小鼠的皮损组织各1份, 加入蛋白裂解液, 超声震碎细胞后离心提取出小鼠皮肤组织蛋白, 采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度, 然后进行电泳、转膜和封闭, 并分别加入Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N(1:1000)及 β -actin(1:3000)抗体 4°C 孵育过夜, 4°C 反应过夜, 用TBST缓冲液洗净后再加入二抗(1:300), 洗净二抗后进行染色。最后用化学发光成像系统处理染色后所得图像, 通过测量主带的光密度值, 以Actin抗体作为内参, 计算出Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N蛋白的相对水平。

1.6.4 免疫组化法检测GSDMD蛋白水平 用随机数字表法在每组中选取3只小鼠保存于4%多聚甲醛溶液的皮损组织半份。取皮肤组织切片脱蜡水

化, 随后经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水、抗原修复、消除内源性过氧化物酶活性、封闭、加入GSDMD抗体(1:50)室温孵育过夜、二抗(1:200)室温孵育20 min、DAB显色剂显色、充分冲洗、苏木素复染、封片。用IMAGE J 1.54f图像分析软件, 圈选阳性区域, 收集IOD值并计算AOD值($\text{AOD}=\text{IOD}/\text{Area}$)。

1.6.5 ELISA法检测皮肤组织IL-1 β 、IL-18含量

用随机数字表法在每组中选取6只小鼠于 -80°C 超低温保存中的皮肤样本1份, 严格按照ELISA试剂盒使用说明书操作, 测定皮损组织中IL-1 β 和IL-18的含量。

1.7 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行数据处理。计量资料符合正态分布且方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较应用最小显著性差异法(Least-Significant Difference, LSD); 数据不满足正态分布或方差不齐时, 选择Kruskal-Wallis检验, 两两比较使用Bonferroni法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠背部皮肤观察

实验7日后, 空白组小鼠背部皮肤仍光滑平整, 而模型组小鼠背部皮肤遍布暗红斑块、基底浸润, 表面覆干燥鳞屑, 产生类银屑病样皮损; 与模型组小鼠相比, 青石组与卡泊三醇组背部皮损整体明显较轻, 斑块颜色呈淡红, 浸润较轻, 鳞屑细薄且分布局限; 与卡泊三醇组比较, 青石组整体皮肤偏红, 皮损炎症情况无明显差异。详见附图(请扫描本文二维码获取)。

2.2 各组小鼠背部皮肤PASI评分比较

表1示, 与空白组同时间比较, 模型组小鼠各时间点皮肤组织PASI评分升高($P<0.01$); 与模

表1 各组小鼠不同时间PASI评分比较

Table 1 Comparison of PASI scores at different time points in each group of mice

(分, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第1天	第3天	第5天	第7天
空白组	10	0	0	0	0
模型组	10	2.50 $\pm$ 1.43 ^{a)}	3.70 $\pm$ 1.06 ^{a)}	5.60 $\pm$ 0.84 ^{a)}	8.30 $\pm$ 1.57 ^{a)}
卡泊三醇组	10	2.10 $\pm$ 0.88	2.50 $\pm$ 0.97 ^{b)}	4.40 $\pm$ 0.84 ^{c)}	5.90 $\pm$ 1.59 ^{c)}
青石组	10	1.60 $\pm$ 0.52	2.70 $\pm$ 1.16 ^{d)}	4.30 $\pm$ 1.34 ^{b) d)}	6.60 $\pm$ 0.84 ^{b) d)}

注: PASI, 银屑病面积和严重指数。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与卡泊三醇组比较, $P<0.05$ 。

型组同时间比较,卡泊三醇组第3、5、7天小鼠皮肤组织 PASI 评分下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),青石组第5、7天皮肤组织 PASI 评分下降 ($P<0.05$);与卡泊三醇组同时间比较,青石组第3、7天皮肤组织 PASI 评分升高 ($P<0.05$),第5天皮肤组织 PASI 评分降低 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠背部皮肤病理学形态

图1示,空白组小鼠的背部皮肤结构完整,表皮层无明显异常,基底层平滑,真皮层无明显炎症反应和毛细血管扩张现象;与空白组相比,模型组背部皮肤角质层增厚和角化不全的现象同时存在,颗粒层变薄,棘层肥厚,向下突出,毛细血管扩张,真皮层炎症反应重;与模型组相比,青石组棘层较薄,基底层平滑,真皮层炎症反应较轻,卡泊三醇组角质层异常增殖及炎症反应等亦表现较轻,有毛细血管扩张;与卡泊三醇组比较,青石组角质层增厚更为明显,毛细血管扩张现象减轻。

2.4 各组小鼠皮肤组织 GSDMD 蛋白水平比较

表2示,与空白组比较,模型组 GSDMD 蛋白的 IOD、AOD 值升高 ($P<0.05$);与模型组相比,青石组和卡泊三醇组 GSDMD 蛋白的 IOD、AOD 值

均下降 ($P<0.05$);与卡泊三醇组相比,青石组 GSDMD 蛋白的 IOD、AOD 值差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组免疫组化结果见图2。

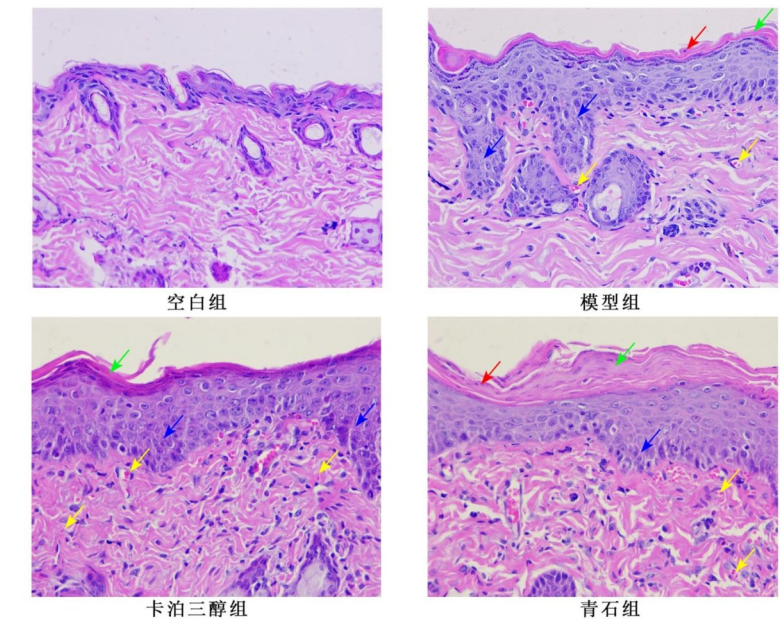
表 2 各组小鼠皮肤组织 GSDMD 蛋白的 IOD、AOD 值比较
Table 2 Comparison of Comparison of IOD and AOD values of GSDMD protein in skin tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IOD 值	AOD 值
空白组	3	810466.84±38281.41	0.23±0.02
模型组	3	1146665.32±36721.07 ^{a)}	0.28±0.01 ^{a)}
卡泊三醇组	3	895523.60±51860.45 ^{b)}	0.24±0.02 ^{b)}
青石组	3	869004.90±51860.68 ^{b)}	0.23±0.01 ^{b)}

注: GSDMD, 消皮素 D。
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

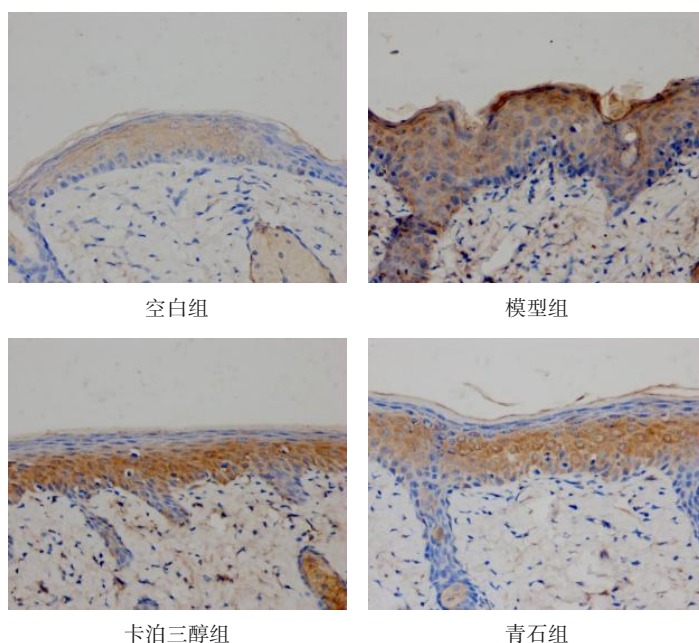
2.5 各组小鼠皮肤组织 Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平比较

表3示,与空白组比较,模型组、青石组小鼠背部皮肤组织中 Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平升高 ($P<0.05$),卡泊三醇组 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平升高 ($P<0.05$),Pro-Caspase-1 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$);与模型组比较,青石组和卡泊三醇组 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平均降低



注: 红色箭头指示为角化不全, 绿色箭头指示为角质层增厚, 蓝色箭头指示为棘层突出, 黄色箭头指示为毛细血管扩张。

图 1 各组小鼠背部皮肤组织 HE 染色结果 (×400)
Figure 1 Results of HE staining of dorsal skin tissues in each group of mice (×400)



注：GSDMD，消皮素D。

图2 各组小鼠皮肤组织GSDMD蛋白水平结果（免疫组化，×400）

Figure 2 Results of GSDMD protein levels in skin tissues of mice in each group (Immunohistochemistry, ×400)

表3 各组小鼠皮肤组织Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N蛋白水平比较

Table 3 Comparison of protein levels of Caspase-1, Pro-Caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N in skin tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Caspase-1	Pro-Caspase-1	GSDMD	GSDMD-N
空白组	6	0.46±0.03	0.52±0.07	0.55±0.05	0.51±0.06
模型组	6	0.74±0.05 ^{a)}	0.86±0.11 ^{a)}	0.83±0.05 ^{a)}	0.79±0.07 ^{a)}
卡泊三醇组	6	0.59±0.04 ^{a) b)}	0.63±0.09 ^{b)}	0.70±0.04 ^{a) b)}	0.62±0.03 ^{a) b)}
青石组	6	0.63±0.06 ^{a) b)}	0.72±0.08 ^{a) c)}	0.76±0.06 ^{a) b) c)}	0.68±0.06 ^{a) b) c)}

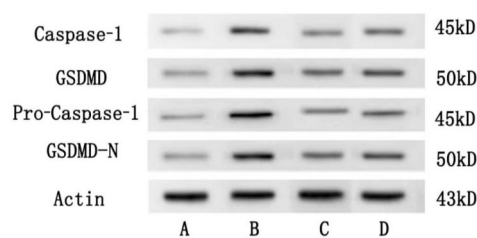
注：Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1；Pro-Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1前体；GSDMD，消皮素D；GSDMD-N，消皮素D氮端活性结构域多肽。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与卡泊三醇组比较， $P<0.05$ 。

($P<0.05$)，卡泊三醇组 Pro-Caspase-1 蛋白水平亦降低 ($P<0.05$)；与卡泊三醇组比较，青石组 Pro-Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平升高 ($P<0.05$)，Caspase-1 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各蛋白电泳图见图3。

2.6 各组小鼠皮肤组织中 IL-1 β 、IL-18 水平比较

表4示，与空白组比较，模型组、青石组及卡泊三醇组小鼠皮肤组织中 IL-1 β 、IL-18 的水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，青石组与卡泊三醇组 IL-1 β 、IL-18 的水平均降低 ($P<0.05$)；与卡泊三醇组比较，青石组的 IL-1 β 、IL-18 的水平升高 ($P<0.05$)。



注：Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1；GSDMD，消皮素D；Pro-Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1前体；GSDMD-N，消皮素D氮端活性结构域多肽。

A，空白组；B，模型组；C，卡泊三醇组；D，青石组。

图3 各组小鼠皮肤组织中Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N蛋白电泳图

Figure 3 Western Blotting images of Caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N proteins in skin tissues of mice in each group

表 4 各组小鼠皮肤组织中 IL-18、IL-1β 水比较
Table 4 Comparison of Comparison of IL-18 and IL-1β levels
in skin tissues of mice in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IL-18	IL-1β
空白组	6	44. 23±2. 48	20. 91±1. 56
模型组	6	112. 80±5. 66 ^{a)}	51. 87±2. 56 ^{a)}
卡泊三醇组	6	76. 03±4. 42 ^{a) b)}	36. 21±1. 17 ^{a) b)}
青石组	6	85. 73±4. 91 ^{a) b) c)}	40. 51±3. 11 ^{a) b) c)}

注: IL-18, 白细胞介素 18; IL-1β, 白细胞介素 1β。
a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;
c) 与卡泊三醇组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

中医学将银屑病归于“干癣”“顽癣”范畴,其发病的内因以“病在血分”为主,血热、血燥、血瘀三型最为常见^[15]。赵炳南^[16]、朱康仁^[17]均以“血分有热”为其核心病机,血分蕴热,由热生毒,热毒日久伤阴化燥,或是热邪入络,气血瘀滞而转为血瘀,血热贯穿银屑病病情发展的全程。本团队认为,银屑病的基本病机是在血热瘀阻,化燥生风的基础上,兼有湿、毒等外邪为患,治疗上应以清热凉血,燥湿解毒为原则。青石止痒软膏以青黛为君药,咸寒入血,凉血解毒;煅炉甘石、煅石膏为臣药,辅助君药加强解毒作用,同时收湿生肌止痒;佐药黄柏、苦参,以苦寒之味加强解毒燥湿之功;冰片为使,清香宣散,给邪以出路;加入橄榄油、蜂蜡作为基质,使药物具有良好的透皮吸收性^[18],同时在祛邪的基础上敛疮生肌、濡养滋润,能更好地促进皮损消退。全方配伍合宜,共奏清热凉血,燥湿解毒之功,契合银屑病血中蕴热,兼有湿、毒为患的基本病机^[7]。

银屑病主要病理变化体现为角质形成细胞的过度增殖及异常分化导致的表皮增生^[19]。细胞焦亡是一种由炎症小体引起的细胞程序性裂解死亡,与银屑病的发病存在着一定关联^[20]。炎症小体受到激活之后, Pro-Caspase-1 被水解为 Caspase-1, 被激活的 Caspase-1 切割细胞的焦亡效应蛋白 GSDMD, 生成 GSDMD-N 端。具有亲膜性的 GSDMD-N 端结构区域与细胞膜结合, 细胞膜形成微孔, 导致细胞破裂^[21-22], 同时被激活的 Caspase-1 分解白细胞介素的前体, 将之转换成具有生物学效应的 IL-1β 和 IL-18。胞内物质以及激活的 IL-1β 和 IL-18 等炎症因子得以产生、释放, 使得银屑病的炎症反应进一步放大^[13]。研究^[12-13]发现, 焦亡相关因子 IL-18、IL-1β、Caspase-1、Pro-Caspase-1、GSDMD 及

GSDMD-N 等在银屑病患者中的水平均高于健康人群。本研究结果显示, 模型组小鼠背部皮肤整体变红, 可见暗红色斑块、上覆银白色鳞屑, 皮肤组织 PASI 评分较空白组明显升高, 提示银屑病皮炎小鼠模型构建成功。相较空白组, 模型组小鼠皮肤组织中 Caspase-1、GSDMD、Pro-Caspase-1 及 GSDMD-N 蛋白水平显著上升, 提示咪喹莫特乳膏外用建立的银屑病小鼠皮肤组织中 Caspase-1、GSDMD、Pro-Caspase-1 及 GSDMD-N 蛋白被过度激活; 相较于模型组, 青石组小鼠背部皮肤红斑颜色变浅, 鳞屑减少, 整体的炎症有所缓解, 第 5、7 天皮肤组织 PASI 评分降低, 皮肤组织病理表现亦有所改善, 皮肤组织中的 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平均有所下降, 提示青石止痒软膏可能是通过抑制焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白的活化从而起到治疗银屑病皮炎的作用。青石组中 Pro-Caspase-1 蛋白水平与模型组差异无统计学意义, 提示实验过程青石止痒软膏对此蛋白的影响可能不明显, 考虑与用药时间较短有关, 具体原因有待进一步研究。此外, 本研究中青石组和卡泊三醇组中 GSDMD 蛋白的比较结果在 Western Blot 法和免疫组化法的检测中略有差异, 考虑可能与送检样本量较小产生的误差有关。

IL-18、IL-1β 在机体的炎症调控和免疫平衡中发挥着重要作用, 一旦二者被过度激活, 则协同加重炎症反应, 参与银屑病的发生^[13]。本研究结果显示, 相较模型组, 青石组小鼠皮肤组织中 IL-18、IL-1β 水平下降, 提示青石止痒软膏可能在抑制焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平同时调节小鼠免疫、抑制炎症因子释放从而改善银屑病皮肤炎症反应。

综上所述, 青石止痒软膏可有效抑制银屑病小鼠的皮肤炎症反应, 其起效机制可能是通过阻断皮肤组织 Caspase-1/GSDMD 信号通路, 同时降低皮肤组织局部 IL-18、IL-1β 水平, 减轻细胞焦亡水平而实现的。因本研究样本量较小, 考虑后续实验可增加检测样本量, 并增设 PCR 法检测 GSDMD 的基因转录情况, 以明确青石止痒软膏对 Caspase-1/GSDMD 蛋白通路的影响。

参考文献

[1]张学军,郑捷. 皮肤性病学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社,2018:133.
[2]LAMBERT J,NAST A,NESTLE FO,et al. Practical guid-

- ance on immunogenicity to biologic agents used in the treatment of psoriasis: what can be learnt from other diseases? [J]. *J Dermatolog Treat*, 2015, 26(6): 520-527.
- [3] 甘怀欣, 李利. 皮肤给药的经皮吸收与测量技术研究进展[J]. *药物评价研究*, 2023, 46(11): 2457-2466.
- [4] HIGHTON A, QUELL J. Calcipotriene ointment 0.005% for psoriasis: a safety and efficacy study. Calcipotriene Study Group [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1995, 32(1): 67-72.
- [5] 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会. 中国银屑病诊疗指南(2023 版)[J]. *中华皮肤科杂志*, 2023, 56(7): 573-625.
- [6] 杨依依, 赵文. 卤米松联合卡泊三醇治疗寻常型银屑病的研究[J]. *云南医药*, 2024, 45(2): 76-77.
- [7] 张益生, 张天博, 陈若曦, 等. 青石止痒软膏治疗进行期寻常型银屑病血热内蕴证观察[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(11): 2170-2173.
- [8] 姜颖娟, 付蓉, 李文元, 等. 青石止痒软膏的皮肤安全性试验[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(36): 144-146.
- [9] 张静雯, 王利, 赵敏, 等. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 介导细胞焦亡在痛风性关节炎中的作用机制研究[J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(5): 561-565.
- [10] 唐颖慧, 叶苗青, 何瑾瑜, 等. 化脂复肝颗粒通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 减轻 Kupffer 细胞炎症改善非酒精性脂肪性肝病机制研究[J]. *陕西中医*, 2022, 43(10): 1359-1363.
- [11] 周立雪, 付丽新, 陈涛, 等. 焦孔素家族在皮肤病中的研究进展[J]. *实用医院临床杂志*, 2024, 21(1): 183-186.
- [12] 张赛男, 陈菲菲, 李琳, 等. 血清半胱氨酸蛋白酶-1、Gasdermin 家族蛋白 D、Gasdermin 家族蛋白 D-N 端在银屑病患者血清及皮损中的表达和意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26(13): 7-11.
- [13] 王丽雅, 梁黛雯, 方佳懿, 等. 银屑病患者血清 IL-1 β 和 IL-18 水平及皮损 GSDMD、GSDMD-N 表达检测和意义[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2022, 43(2): 98-103.
- [14] 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.
- [15] 中华中医药学会皮肤科分会, 北京中医药学会皮肤病专业委员会, 北京中西医结合学会皮肤性病专业委员会. 寻常型银屑病(白疔)中医药循证临床实践指南(2013 版)[J]. *中医杂志*, 2014, 55(1): 76-82.
- [16] 北京中医医院. 赵炳南临床经验集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 269-274.
- [17] 李林, 李博鉴. 朱仁康老中医治疗银屑病的经验[J]. *中医杂志*, 1985(1): 12-14.
- [18] 姜颖娟, 蔡玲玲, 汤化琪, 等. 不同药物配伍与不同基质对甘石青黛膏经皮吸收的影响[J]. *环球中医药*, 2017, 10(5): 532-535.
- [19] 刘婧雯, 朱蕾. 银屑病发病机制及药物研究新进展[J]. *药学报*, 2023, 58(10): 2942-2951.
- [20] DENG GL, CHEN WJ, WANG P, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophage by cycloastragenol contributes to amelioration of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105682. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105682.
- [21] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128.
- [22] 任秋月, 姚蓉飞, 杨荣禄, 等. 抵挡汤对高糖环境下泡沫细胞焦亡炎症级联反应的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 8-15.

Exploration of the Intervention Mechanism of *Qingshi Anti-itch Ointment* (青石止痒软膏) on Psoriasis Model Mice Based on Caspase-1/GSDMD Protein Pathway

LI Yatong¹, LI Yuanwen², DENG Yutong¹, REN Xuwen¹, WANG Xuewan¹, YU Xinhui¹, LIU Tangyunni¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of *Qingshi Anti-itch Ointment* (青石止痒软膏, QAO) in the treatment of psoriasis. **Methods** Forty mice were randomly divided into four groups, blank group, model group, calcipotriol group and QAO group, with 10 mice in each group. Except for the blank group, psoriasis was induced by applying imiquimod cream to the dorsal skin. After modeling for 6 hours daily, the calcipotriol group and QAO group were treated with 0.5 g of calcipotriol ointment or 0.5 g of QAO, respectively, applied to the treated dorsal skin. The blank group and the model group received no treatment. The skin lesions were observed, and the psoriasis area and severity index (PASI) score was assessed every other day. After 7 days, Hematoxylin and Eosin (HE) staining was performed on dorsal skin tissue to observe pathological changes. The levels of interleukin 1 β (IL-1 β)

and interleukin 18 (IL-18) were determined by enzym-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein levels of Caspase-1, Pro-Caspase-1, gasdermin D (GSDMD) and gasdermin-D-N (GSDMD-N) were detected by Western Blot (WB). The protein levels of GSDMD were observed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank group, the model group mice showed redness, erythema, and white scales on their skin, with histological observations indicating epidermal thickening, elongated spines, and infiltration of inflammatory cells. The PASI scores of the skin tissue on days 1, 3, 5, and 7 were elevated; the IOD and AOD values of GSDMD protein increased; the protein levels of Caspase-1, Pro-Caspase-1, GSDMD, GSDMD-N, and IL-1 β and IL-18 were significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the QAO group and calcipotriol group showed lighter skin lesions; the PASI scores on day 5 and day 7 in the QAO group, and on day 3, 5, and 7 in the calcipotriol group, were reduced; the IOD and AOD values of GSDMD protein, and the protein level of Caspase-1, GSDMD, and GSDMD-N, as well as level of IL-18 and IL-1 β decreased in both groups; in the calcipotriol group, Pro-Caspase-1 protein level also decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the calcipotriol group, the QAO group showed slightly redder skin, more obvious thickening of the stratum corneum, and less capillary dilation; the PASI scores on day 3 and day 7 increased, while the score on day 5 was reduced; the protein level of Pro-Caspase-1, GSDMD, GSDMD-N, and the level of IL-18 and IL-1 β were increased in the QAO group ($P < 0.05$). **Conclusion** QAO can effectively relieve psoriasis dermatitis in mice. Its potential mechanism may be related to the regulation of the Caspase-1/GSDMD protein pathway, down-regulation of IL-18 and IL-1 β levels, and alleviation of pyroptosis.

Keywords psoriasis; *Qingshi Anti-itch Ointment* (青石止痒软膏); Caspase-1; gasdermin D

(收稿日期: 2024-08-14; 修回日期: 2024-09-29)

[编辑: 王利芬]

读者·作者·编者

如何正确引用网络文献

正确引用的参考文献是学术论文的重要组成部分,除传统的印刷版文献外,参考文献还包括了大量的网络文献。常见的网络文献资源包括电子公告(EB/OL)、电子图书(M/OL)、电子期刊(J/OL)、报纸(N/OL)、数据库(DB/OL)、专利文献(P/OL)等。根据《GB/T 7714—2015 信息与文献 参考文献著录规则》,不同文献类型有相应的著录格式。以下为电子资源著录格式。

著录格式

主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标识/文献载体标识]. 出版地:出版者,出版年:引文页码(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径. 数字对象唯一标识符.

著录格式示例

- [1] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-03-17]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03-04/content_5486705.htm.
- [2] 仝小林,李修洋,赵林华,等. 从“寒湿疫”角度探讨新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的中医药防治策略[J/OL]. 中医杂志. (2020-02-19)[2020-02-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2166.R.20200217.2034.006.html>.
- [3] 罗兰. “国医大师”王琦院士开的预防药方来了[N/OL]. 长江日报. (2020-01-29)[2020-05-12]. <http://www.cjrbapp.cjn.cn/wuhan/p/154889.html>.

(本刊编辑部)