

• 实验研究 •

过敏煎通过 JAK-STAT 信号通路抑制巨噬细胞炎症干预 Th2 型特异性皮炎的药效作用

刘燕娇, 谭 伟, 鲁 诚, 王睿睿, 张 玮*, 张丽娟*

(云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 探讨中药方剂过敏煎(Guomin Decoction, GMJ)通过 JAK1/JAK2-STAT1/STAT3 信号通路抑制巨噬细胞炎症干预 Th2 型特异性皮炎的药效作用。**方法** 将 48 只 BALB/c 小鼠随机分成 6 个组, 分别是正常组(Normal 组)、模型组(Model 组)、地塞米松阳性药组(Dex 组)、过敏煎高、中、低剂量组(GMJ-H、GMJ-M、GMJ-L 组), 采用 2 nmol MC903(Calcipotriene)反复涂抹于小鼠右耳诱导建立特异性皮炎(atopic dermatitis, AD)小鼠模型, 观察小鼠搔抓次数、测量小鼠耳肿胀程度、脏器系数, 采用 HE 染色观察皮肤形态变化, 采用甲苯胺蓝染色观察肥大细胞数目变化, 采用 ELISA 法检测小鼠血清中 IL-4、IL-5、IL-33、TSLP、HIS、LTB4、IgE 含量, 采用免疫组化法测定小鼠皮肤组织中 IL-4、IL-33、TNF- α 的表达。体外, 采用 MTT 法检测过敏煎对 RAW264.7 细胞增殖活力的影响, 采用 1 μ g/mL LPS 诱导 RAW264.7 细胞构建细胞炎症模型, 采用 Griess 法检测细胞培养液 NO 的含量, 采用 ELISA 法检测细胞培养液中 IL-6 的含量, 采用 Western blot 法检测各组细胞中磷酸化 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3 蛋白表达。**结果** 与 Model 组比较, 过敏煎干预后特异性皮炎小鼠的搔抓次数明显减少、耳肿胀明显减轻、耳部皮损处病理明显改善; 脾脏指数降低、胸腺指数升高, 皮损中肥大细胞数目下降, 血清中 TSLP、IL-4、IL-5、IL-33、IgE、HIS 和 LTB4 的表达以及皮损组织 IL-4、TNF- α 和 IL-33 表达水平下调; 体外实验结果表明, 过敏煎在 23~750 μ g/mL 浓度范围内对 RAW264.7 细胞增殖活性没有明显影响, 受试剂量下过敏煎显著抑制炎症细胞中 NO、IL-6 的表达和释放, 抑制 JAK/STAT 通路中相关蛋白 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3 蛋白磷酸化水平。**结论** 过敏煎可能通过抑制巨噬细胞 JAK-STAT 通路的激活, 从而发挥改善特异性皮炎小鼠炎症反应的药效作用。

关键词: 过敏煎; Th2 型特异性皮炎; 炎症; JAK-STAT 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2025)04-0034-11

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2025.04.007

The Intervention Effect of Guomin Decoction on Th2 Atopic Dermatitis by Inhibiting Macrophage Inflammation through JAK-STAT Signaling Pathway

LIU Yanjiao, TAN Wei, LU Cheng, WANG Ruirui, ZHANG Yi, ZHANG Lijuan

(Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the therapeutic effects of the Chinese herbal prescription Guomin Decoction (GMJ) on Th2-type atopic dermatitis (AD), with a focus on its potential to inhibit macrophage-mediated inflammation via the JAK1/JAK2-STAT1/STAT3 signaling pathway. **Methods** A total of 48 BALB/c mice were randomly assigned to six groups: the Normal group (control), the Model group (AD model), the Dexamethasone-positive control group (Dex. group), and the

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760741, 82160782); 云南省科技厅中医联合专项重点项目(202301AZ070001-006); 云南省科技厅中医联合专项面上项目(202101AZ070001-18, 202301AZ070001-060); 云南省匡海学专家工作站(202305AF150029)

作者简介: 刘燕娇(1998-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: 1593676643@qq.com

* **通信作者:** 张 玮(1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药民族药及天然产物活性及机制研究, E-mail: 574378413@qq.com;
张丽娟(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中西医结合抗炎研究, E-mail: 953257594@qq.com

Guomin Decoction high-dose (GMJ-H), medium-dose (GMJ-M), and low-dose (GMJ-L) groups. Each group received its respective treatment, and outcomes were analyzed to assess the efficacy of GMJ in mitigating AD symptoms and inflammation. A mouse model of AD was established by repeatedly applying 2 nmol MC903 (Calcipotriene) to the right ear of mice. The number of scratches was recorded to observe changes in scratching behavior. Ear swelling was measured to assess inflammation, and the organ coefficient was calculated. Histological changes in skin morphology were examined using HE staining, while toluidine blue staining was employed to evaluate the number of mast cells. The serum levels of IL-4, IL-5, IL-33, TSLP, HIS, LTB4, and IgE were quantified using the ELISA method. Additionally, the tissue levels of IL-4, IL-33, and TNF- α in the skin lesions were determined through immunohistochemistry. RAW264.7 cells were cultured in vitro to evaluate the effects of Guomin Decoction on cell viability using the MTT assay. Experimental groups included Control, Model, GMJ-94 (94 $\mu\text{g/mL}$), GMJ-187 (187 $\mu\text{g/mL}$), and GMJ-375 (375 $\mu\text{g/mL}$). A macrophage inflammation model was established by stimulating RAW264.7 cells with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS. After 24 hours of stimulation, the cell culture supernatant was collected for analysis. Nitric oxide (NO) levels were measured using the Griess method, while IL-6 concentrations were determined by ELISA. Western blot analysis was performed to detect the expression of phosphorylated JAK1, JAK2, STAT1, and STAT3 proteins in each group. **Results** In vivo, Guomin Decoction demonstrated significant therapeutic effects in a mouse model of AD. Compared with the Model group, Guomin Decoction intervention significantly reduced scratching behavior, ear swelling, and pathological changes in ear lesions. Additionally, the spleen index was downregulated, the thymic index was elevated, and the number of mast cells was reduced. Serum levels of TSLP, IL-4, IL-5, IL-33, IgE, HIS, and LTB4 were significantly decreased, as were IL-4, TNF- α , and IL-33 levels in skin lesion tissues. Cellular experiments further revealed that Guomin Decoction concentrations ranging from 23 to 750 $\mu\text{g/mL}$ had no significant impact on RAW264.7 cell viability. The decoction notably suppressed NO and IL-6 production, as well as the phosphorylation of JAK1, JAK2, STAT1, and STAT3 proteins in the JAK/STAT pathway. **Conclusion** Guomin Decoction may alleviate the inflammatory response in AD by inhibiting the activation of the macrophage JAK1/JAK2-STAT1/STAT3 signaling pathway, highlighting its potential as a therapeutic agent for inflammatory skin diseases.

KEY WORDS: Guomin Decoction; Th2-type atopic dermatitis; inflammation; JAK-STAT

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD), 又称湿疹和特应性湿疹, 是最常见的皮肤炎症性疾病之一。当过敏原入侵机体表皮时角质形成细胞受到外界刺激或损伤时通过释放胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)和 IL-33 等细胞因子, 募集并激活 Th2 型细胞及其细胞因子释放(如: IL-4 和 IL-5), 同时, 巨噬细胞作为抗原提呈细胞识别过敏原, 释放细胞因子, 并募集肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞等, 扩大炎症反应, 导致组织损伤, 严重影响 AD 患者的情绪、睡眠和整体生活质量等^[1]。目前, 临床上常采用糖皮质激素、钙调磷酸酶抑制剂、生物抑制剂 Dupilumab 及 Janus 激酶抑制剂治疗 AD。但对于需要长期治疗的人群来说显然无法承受上述治疗过程中伴随的局部或长期的不良反应。因此, 急需筛选疗效显著、持久、无不良反应的药物。

中医药在治疗瘙痒和皮炎方面具有独特的优势。特应性皮炎在中医辨证中以气分湿、血分热、血虚津亏为主, 治以凉血祛湿止痒、健脾养血、祛风生津^[2]。过敏煎(Guomin Decoction, GMJ)是著名老中医祝谌予

之经验方, 方中防风为君药, 祛风胜湿, 润而不燥, 为“祛风圣药”, 通治一切内外风, 上通皮毛、下通经脉之气; 银柴胡为臣药, 味甘而微苦、性凉, 清热凉血、疏风散邪; 乌梅味酸、性温, 生津润肺, 滋润皮毛; 五味子味酸、甘, 性平, 益气、敛肺、滋补阴肾、生津。四味药物相辅相成, 辛散、酸收、甘润、苦泄; 温热相生、阴阳调和、滋阴润燥、益气固表、祛风化邪止痒, 临床上常作为基础方随症加减治疗各种过敏性疾病, 如过敏性哮喘^[3]、荨麻疹^[4]和花粉症/过敏性鼻炎^[5]等。课题组前期研究发现过敏煎能够改善 DNCB(1-氯-2,4-二硝基苯)诱导的特应性皮炎小鼠 AD 样症状^[6]。DNCB 诱导的 AD 样小鼠模型被报道是基于模拟类超敏反应, 与 Th2 型反应为主要特征的人类 AD 显然具有差异。因此, 本研究体内采用反复给予小鼠耳部涂抹 MC903(Calcipotriene) 构建 Th2 反应 AD 小鼠模型, 体外采用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞构建细胞炎症模型, 进一步探讨过敏煎缓解 AD 的药效学作用机制。

1 材料

1.1 仪器 SpectraMax Plus384 型全波长多功能酶

标仪(美国美谷);5810R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);AR224CN 型电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司);DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-24DN 型电泳槽(北京六一生物科技有限公司);TS-1 型水平摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Tanon 4600sf 型化学发光凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 试剂与药物 防风 10 g, 银柴胡 10 g, 乌梅 10 g, 五味子 10 g(云南新世纪中药饮片有限公司);地塞米松片(Dex., 浙江仙琚制药股份有限公司);4%多聚甲醛组织固定液、HE 染液套装、甲苯胺蓝染液、柠檬酸(PH6.0)抗原修复液(武汉塞维尔生物科技有限公司);Rabbit Anti-IL-4、Rabbit Anti-IL-33、Rabbit Anti-TNF- α (北京博奥森生物技术有限公司);NO 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);IL-6 ELISA 试剂盒(深圳欣博胜生物技术有限公司);IL-4、IL-5、IL-33、IgE、HIS、TSLP 和 LTB4 试剂盒(江苏酶免实业有限公司);LPS(纯度 $\geq 98\%$, 北京索莱宝科技有限公司);MC903(纯度 $\geq 98\%$, 上海 Sigma);p-JAK1 抗体、p-JAK2 抗体、JAK2 抗体、p-STAT1(Tyr701)抗体、p-STAT1(Ser727)抗体、p-STAT3(Tyr705)抗体(美国 Cell Signaling Technology);JAK1 抗体、STAT1 抗体、STAT3 抗体、 α -Tubulin 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 动物 6~8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 48 只, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0010, 体质量(20 ± 2) g。饲养环境的相对湿度(55 ± 5)%, 温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 保持昼夜节律各 12 h, 自由进食进水。动物实验经云南中医药大学动物实验伦理委员会审查通过(编号 R-062021107)。

1.4 细胞 小鼠单核-巨噬细胞(RAW264.7)购自普诺赛生物科技有限公司。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 过敏煎的制备 银柴胡 10 g, 防风 10 g, 乌梅 10 g, 五味子 10 g, 加 10 倍量水浸泡 1 h 后煎煮 2 次, 第一次煮沸 1.5 h, 第 2 次再加 10 倍量水煎煮 1 h。过滤后合并 2 次滤液, 浓缩至稠膏状, 冷冻干燥后得到 22.16 g 冻干粉, 计算得到 55.4%的提取率。人与

小鼠等效剂量换算: 成人和小鼠标准体质量分别按 70 kg、20 g 计算, 参照体表面积折算法, 人和小鼠折算系数为 0.0026, 根据下列公式则可以计算出等效剂量, 即为中剂量, 高剂量和低剂量再分别乘以 2 和 1/2。公式为: 小鼠等效剂量 = $X(\text{mg/kg}) \times 70 \text{ kg} \times 0.0026 / 0.02 \text{ kg}$, X 为成人临床剂量。过敏煎成人剂量为每日 40 g, 再乘以 55.4%的提取率, 则可计算出其高、中、低剂量分别为 5.76 g/kg、2.88 g/kg、1.44 g/kg。

2.1.2 动物造模、分组及给药 小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为正常组(Normal)、模型组(Model)、地塞米松阳性药组(Dex., 1 mg/kg)、过敏煎高剂量组(GMJ-H, 5.76 g/kg)、中剂量组(GMJ-M, 2.88 g/kg)和低剂量组(GMJ-L, 1.44 g/kg), 每组 8 只。

本次造模方法采用 MC903 反复多次涂抹诱发 AD 小鼠模型^[7]。除 Normal 组小鼠左右耳均涂抹等量无水乙醇外, 其余各组在小鼠右耳涂抹 2 nmol/20 μL 的 MC903、左耳涂抹 20 μL 的无水乙醇, 每天 1 次, 连续诱导 10 d(第 0~10 天)。造模第 4 天起各组小鼠灌胃给予相应药物治疗, Normal 组和 Model 组小鼠灌胃给予 0.5%的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液, 连续给药 7 d(第 4~10 天), 每天 1 次。

2.1.3 各组小鼠搔抓次数检测 第 2、4、6、8、10 天观察小鼠 15 min 内搔抓次数并记录小鼠搔抓次数。以小鼠前爪搔抓, 或嘴撕咬后足(连续撕咬或搔抓至短暂停止)为一次搔抓。

2.1.4 各组小鼠耳朵厚度检测 第 2、3、4、5、6、7、8、9、10 天分别测量小鼠左右耳相同部位厚度变化, 取 3 次的平均值, 计算耳肿胀厚度。肿胀度(mm) = 右耳厚度 - 左耳厚度。

2.1.5 各组小鼠胸腺和脾脏脏器系数检测 使用 1%戊巴比妥钠麻醉动物, 腹主动脉采集血液, 剖取脾脏和胸腺, 称量脏器湿重并计算脏器系数。脏器系数(mg/g) = 脏器重量(mg)/体质量(g)。

2.1.6 各组小鼠耳部皮损组织一般病理学改变检测

取小鼠的耳部皮肤, 经固定脱水包埋制成石蜡切片, 采用 HE 和 TB 染色法(甲苯胺蓝染色法)进行染色, HE 染色观察一般组织病理形态学改变, 并在 200 倍数下, 随机选择 8 个视野, 用 ImageJ 软件分析表皮增厚情况, 测量表皮角质层至基底层垂直距离, 并进行统计学分析^[8]。TB 染色观察肥大细胞浸润情况, 并

在 200 倍数下,随机选择 8 个视野,用 ImageJ 软件统计肥大细胞的数目,并进行统计学分析^[8]。

2.1.7 各组小鼠血清细胞因子检测 采用 ELISA 法,按照试剂盒说明书检测各组小鼠血清中 TSLP、IL-4、IL-5、IL-33、HIS、LTB4、IgE 炎症因子的水平。

2.1.8 各组小鼠耳部组织中细胞因子表达水平检测

免疫组化法(IHC)测定皮损组织中 IL-4、IL-33 和 TNF- α 表达,用玻片扫描成像系统采集图像分析,并用 ImageJ 软件分析比较光密度,在 200 倍光学显微镜下,随意选择 8 个视角,计算不同组小鼠的 AOD 值^[8]。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞增殖检测 采用 MTT 法检测 GMJ 对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响。取浓度为 1×10^5 细胞/mL 处于对数增长期的 RAW264.7 细胞悬液接种 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h,分别加入浓度为 23、47、94、187、375、750、1500、3000 μ g/mL 过敏煎溶液,每浓度设置 3 个复孔,并设 Blank 孔(只加培液,不加细胞)和 Control 孔(加细胞,不加药物),继续培养 24 h 后,加入已配制的 MTT 溶液 (5 μ g/mL),20 μ L/孔,培养 2 h,弃液体,加入 DMSO 溶解结晶,每孔 150 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 振荡 5 min,于多功能酶标仪 490 nm 波长处测定 OD 值,并计算细胞活力。细胞活力(%)=(给药孔 OD-Blank 孔 OD)/(Control 孔 OD-Blank 孔 OD) $\times$ 100%。

2.2.2 各组细胞上清中细胞因子检测 采用 Griess 法检测各组细胞培养液中 NO 表达水平,采用 ELISA 法检测各组细胞培养液中 IL-6 表达水平。将浓度为 2×10^5 个/mL 处于对数增长期的 RAW264.7 细胞接种到 24 孔板中,每孔 500 μ L,组别设置为 Control 组、Model 组 (1 μ g/mL LPS)、GMJ-94 组 (94 μ g/mL GMJ)、GMJ-187 组 (187 μ g/mL GMJ)、GMJ-375 组 (375 μ g/mL GMJ),每组设置 3 个复孔,培养 36 h 后,除 Control 组和 Model 组,GMJ 给药组先给予相应剂量 GMJ (94 μ g/mL, 187 μ g/mL, 375 μ g/mL) 预保护 2 h,再给予 LPS 1 μ g/mL 刺激 RAW264.7,24 h 后,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书测定 NO 和 IL-6 的浓度。

2.2.3 各组细胞中 JAK-STAT 通路相关蛋白检测

采用 Western blot 法检测巨噬细胞中 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1

(Tyr701)、p-STAT1(Ser727)、p-STAT3(Tyr705)蛋白表达。将 2×10^5 个/mL 处于对数增长期的 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,组别设置同 2.2.2,培养 24 h 后换液,除 Control 组和 Model 组,GMJ 给药组先给予相应剂量 GMJ (94 μ g/mL, 187 μ g/mL, 375 μ g/mL) 预保护 2 h,再给予 1 μ g/mL LPS 刺激 RAW264.7,14 h 后,弃液,加入预冷 PBS 清洗两遍,弃尽 PBS,加入适量 RIPA 裂解液,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,蛋白样本进行电泳分离、转膜,随后依次进行封闭、洗膜、分别孵育上 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1 (Tyr701)、p-STAT1(Ser727)、p-STAT3(Tyr705)对应的一抗孵育过夜、洗膜、二抗孵育 60 min、洗膜,于多功能数字凝胶成像分析仪暗箱中曝光,使用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白灰度值/内参 α -Tubulin 灰度值作为目的蛋白的相对表达量。

2.3 统计学分析 通过 Graphpad Prim 8 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 过敏煎对特异性皮炎小鼠搔抓次数的影响 与 Normal 组相比,Model 组小鼠搔抓次数明显增多且持续上升 ($P < 0.001$),与 Model 组相比,Dex. 组小鼠搔抓次数显著下降 ($P < 0.001$),GMJ 各剂量组小鼠搔抓次数均明显下降 ($P < 0.05$),其中 GMJ 高剂量对 AD 小鼠搔抓行为的干预效果最佳 ($P < 0.001$);提示 GMJ 能够显著抑制特异性皮炎小鼠的瘙痒(见表 1)。

3.2 过敏煎对特异性皮炎小鼠耳厚的影响 与 Normal 组相比,Model 组小鼠耳厚显著增加 ($P < 0.001$),与 Model 组相比,Dex. 组小鼠耳厚显著下降 ($P < 0.001$),GMJ 可呈剂量依赖性降低耳肿胀 ($P < 0.05$) (表 2),各组小鼠耳部外观展示图如图 1。提示 GMJ 可抑制 AD 小鼠耳部炎症。

3.3 过敏煎对特异性皮炎小鼠脏器系数的影响 与 Normal 组相比,Model 组小鼠脾脏指数显著升高 ($P < 0.001$),胸腺指数显著降低 ($P < 0.001$);与 Model 组相比,Dex. 组能明显降低 AD 小鼠脾脏指数和胸腺指数 ($P < 0.001$),而经 GMJ 干预下脾脏指数呈一定的下调趋势 ($P < 0.05$),胸腺指数呈上升的趋势 ($P < 0.05$) (图 2)。

表 1 各组小鼠 15 min 内搔抓次数($\bar{x} \pm s, n = 8$)

时间	组别					
	Normal	Model	Dex.	GMJ-H	GMJ-M	GMJ-L
2	2.70±0.90	5.44±1.17	4.60±1.11	5.70±1.42	4.50±1.80	6.10±2.07
4	3.50±0.50	10.00±4.00	6.40±2.84	6.80±2.56	5.90±1.58	10.00±3.77
6	3.00±0.82	12.63±4.06	6.50±1.50	6.50±2.65	7.14±2.17	9.30±1.90
8	4.33±0.82	15.11±3.28	6.50±1.86	7.10±1.97	9.50±3.44	9.70±2.53
10	5.67±0.75	20.80±1.25 ^{###}	11.80±4.07 ^{***}	6.33±4.32 ^{***}	6.33±2.26 ^{***}	15.44±5.79 [*]

注:与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

表 2 各组小鼠左右耳厚度差($\bar{x} \pm s, n = 8$)

时间	组别					
	Normal	Model	Dex.	GMJ-H	GMJ-M	GMJ-L
2	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
3	0.01±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.04±0.02	0.05±0.01
4	0.01±0.00	0.06±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
5	0.00±0.00	0.08±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
6	0.00±0.00	0.10±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.10±0.02	0.08±0.01
7	0.01±0.00	0.27±0.01	0.10±0.02	0.19±0.09	0.24±0.03	0.24±0.02
8	0.00±0.01	0.36±0.01	0.13±0.07	0.25±0.02	0.31±0.01	0.33±0.01
9	0.00±0.00	0.45±0.01	0.16±0.02	0.27±0.01	0.37±0.01	0.41±0.02
10	0.00±0.00	0.54±0.02 ^{###}	0.25±0.05 ^{***}	0.39±0.02 ^{**}	0.45±0.01 ^{**}	0.49±0.01 [*]

注:与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

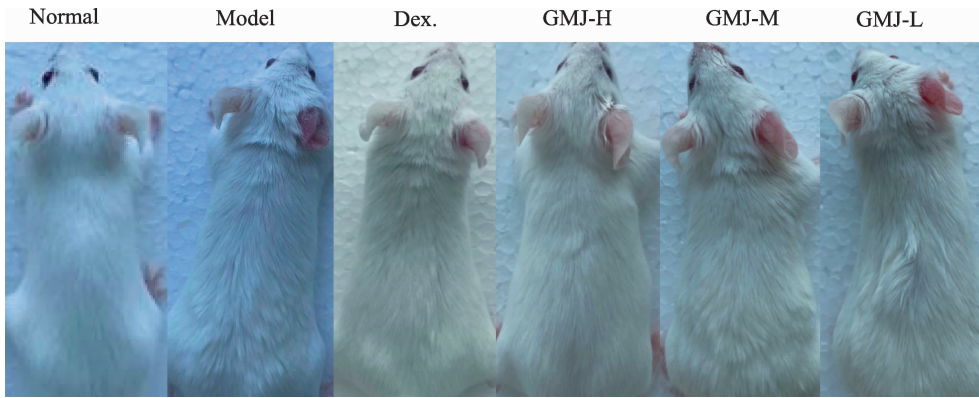
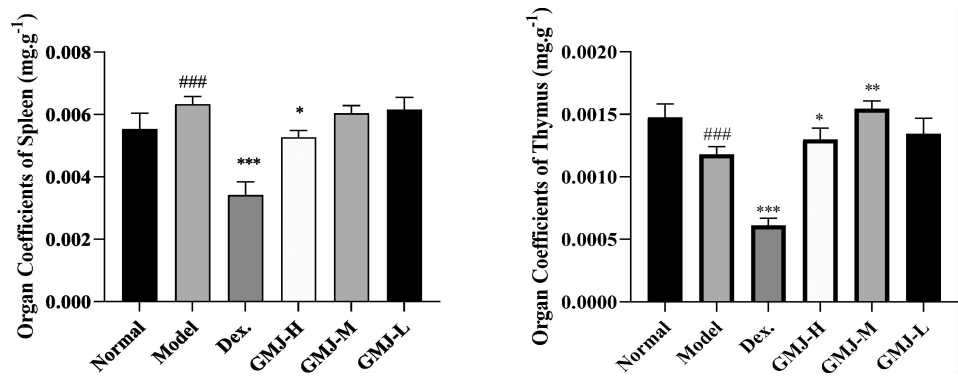


图 1 各组小鼠耳部展示图

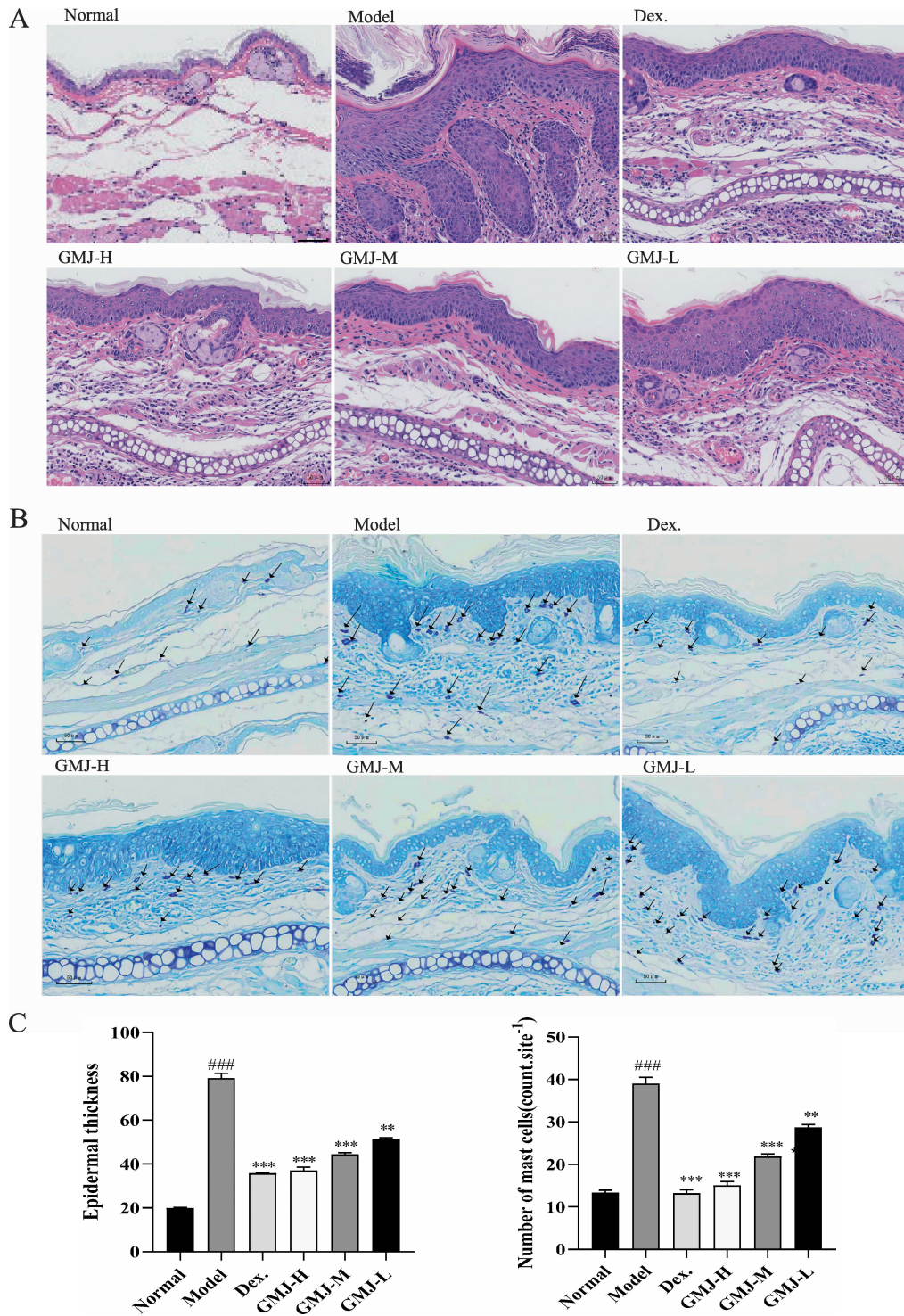


注:与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

图 2 各组小鼠脏器系数图($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 过敏煎对特异性皮炎小鼠皮损组织病理学的影响 HE 染色结果显示,Normal 组小鼠皮肤表皮较薄,皮肤毛囊较丰富,无水肿和淋巴细胞浸润。与 Normal 组相比,Model 组小鼠皮肤出现结构和功能障

碍,皮肤表皮增厚,角质层角化过度,棘层肥厚,皮肤表皮增厚($P<0.001$),真皮层增厚,大量炎性细胞浸润。与 Model 组相比,Dex.组小鼠皮肤过度角化、皮肤表皮增厚、真皮层增厚均明显减轻($P<0.001$);GMJ 治



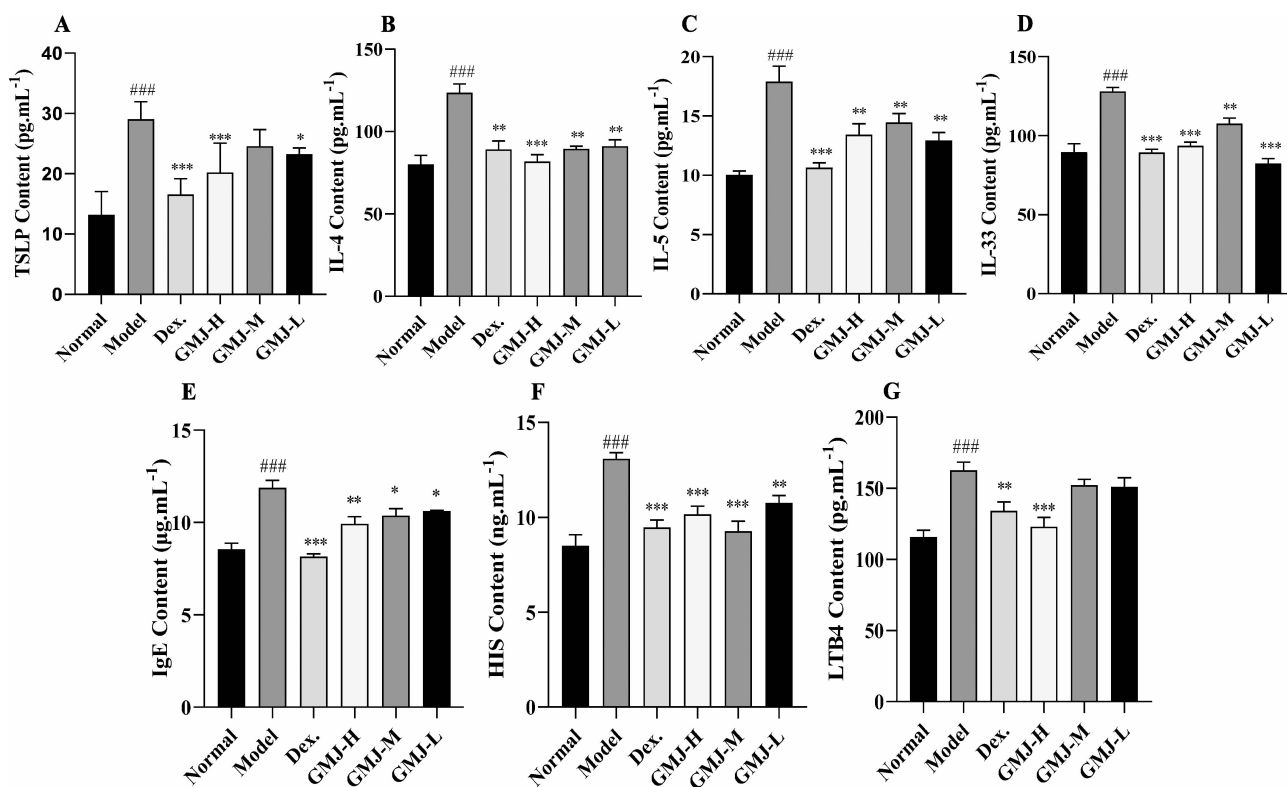
注: A. 耳部皮损病理改变图(HE 染色 $\times 200$, 比例尺 $50\ \mu\text{m}$); B. 耳部皮损肥大细胞浸润的情况(TB $\times 200$, 比例尺 $50\ \mu\text{m}$); C. HE 染色结果统计图和 TB 染色结果统计图。黑色箭头处指示肥大细胞;与正常组比较, $^{###}P<0.001$;与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$

图 3 各组小鼠耳部皮损改变及肥大细胞浸润情况

疗组小鼠表皮增厚、皮肤表皮角质层角化均明显减轻 ($P<0.05$), 皮肤组织炎性细胞浸润减少, 皮脂腺和毛囊增多, 皮肤炎症得到缓解, 且呈剂量依赖性 (图 3A)。TB 染色结果显示, 与 Normal 组相比, Model 组肥大细胞浸润较多 ($P<0.001$); 与 Model 组相比, Dex. 组肥大细胞数目显著减少 ($P<0.001$), GMJ 各剂量呈剂量依赖性减少小鼠皮肤组织中肥大细胞数量 ($P<$

0.05)(见图 3B)。

3.5 过敏煎对特异性皮炎小鼠血清细胞因子表达水平的影响 与 Normal 组相比, Model 组小鼠外周血中 TSLP、IL-4、IL-5、IL-33、IgE、HIS 和 LTB4 等因子含量均显著升高 ($P<0.001$); 与 Model 组相比, 和 GMJ 各剂量组小鼠外周血中 TSLP、IL-4、IL-5、IL-33、IgE、HIS 和 LTB4 的含量下调 ($P<0.001$) (图 4)。



注: A. TSLP 含量; B. IL-4 含量; C. IL-5 含量; D. IL-33 含量; E. IgE 含量; F. HIS 含量; G. LTB4 含量。

与正常组比较, ### $P<0.001$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 4 各组小鼠血清中细胞因子含量的表达差异图 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.6 过敏煎对特异性皮炎小鼠耳部皮损中细胞因子表达水平的影响 与 Normal 组比较, Model 小鼠耳部皮损 IL-4、TNF- α 、IL-33 表达水平显著上升 ($P<0.001$); 与 Model 组相比, Dex. 组和 GMJ 各剂量组可显著抑制皮损组织中 IL-4、TNF- α 和 IL-33 蛋白的表达 ($P<0.05$) (图 5)。

3.7 过敏煎对 RAW264.7 细胞增殖活性的影响

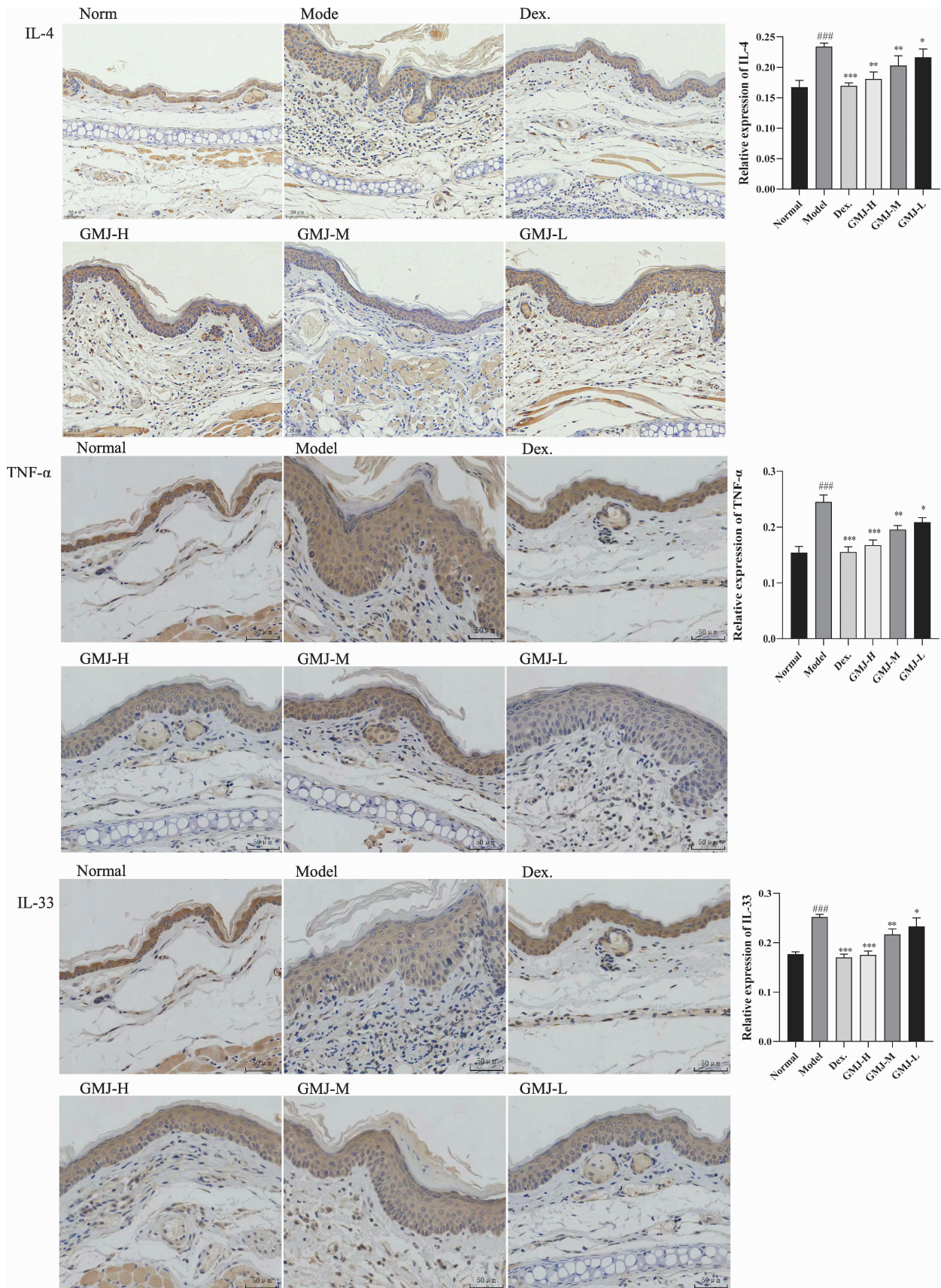
MTT 结果显示, 与 Control 孔相比, GMJ 浓度为 23~750 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞增殖活力无显著性差异, 当 GMJ 浓度 $\geq 1\,500\, \mu\text{g/mL}$ 时, 对 RAW264.7 细胞增殖活力表现出显著性抑制 ($P<0.05$), 说明过敏煎在 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 以下对 RAW264.7 细胞增殖活性均无

抑制作用 (图 6)。

3.8 过敏煎对巨噬细胞中 NO、IL-6 细胞因子的影响

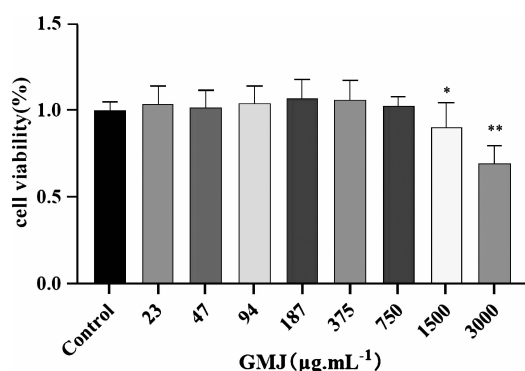
结果显示, 与 Control 组相比, Model 组 NO、IL-6 水平显著升高 ($P<0.001$), 与 Model 组相比, GMJ 各剂量组 NO、IL-6 的表达显著降低 ($P<0.01$) (图 7)。

3.9 过敏煎对巨噬细胞中促炎蛋白通路 JAK1/JAK2-STAT1/STAT3 表达的影响 结果显示, 与 Control 组相比, Model 组细胞中 p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1、p-STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与 Model 组比较, GMJ 呈剂量依赖性抑制了巨噬细胞中 p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1 (Tyr701)、p-STAT1 (Ser727)、p-STAT3 (Tyr705) 蛋白的表达 ($P<0.05$) (图 8)。



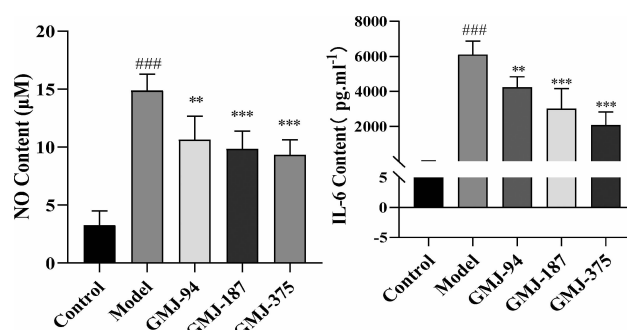
注:与正常组比较,### $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图 5 各组小鼠耳部皮损处 IL-4、TNF-α 和 IL-33 变化图($\times 200$, 比例尺 50 μm)($\bar{x} \pm s, n=8$)



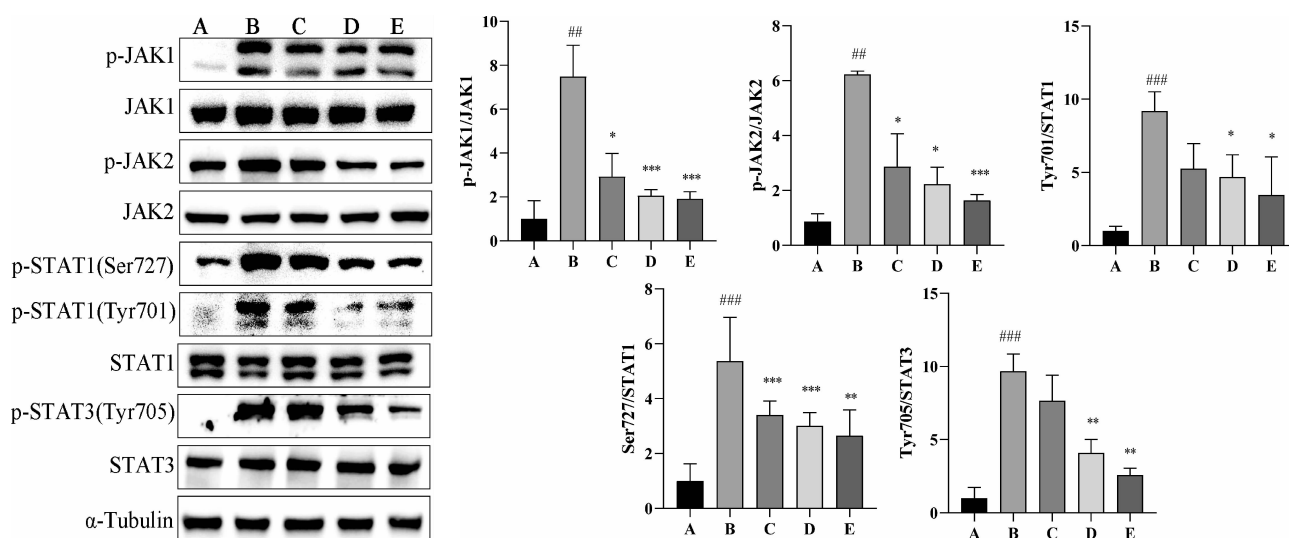
注:与 Control 孔相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 6 过敏煎对 RAW264.7 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:与 Control 组比较,### $P<0.001$;与 Model 组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图 7 各组细胞培养液中 NO 和 IL-6 的表达情况图($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:A. Control 组;B. Model 组;C. GMJ-94 组;D. GMJ-187 组;E. GMJ-375 组。

与 Control 组比较,### $P<0.001$;与 Model 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图 8 过敏煎对巨噬细胞 JAK1/JAK2-STAT1/STAT3 相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

AD 的临床特点主要表现为皮肤瘙痒、湿疹和疼痛^[9],目前多用糖皮质激素、钙调磷酸酶抑制剂、生物抑制剂 Dupilumab 及 Janus 激酶抑制剂治疗,但临床疗效和药物带来的副作用,以及高额的医疗费用,是研究高效、低毒治疗 AD 药物之急。

皮肤是抵抗过敏原的第一道防线,由角质形成细胞^[10]、巨噬细胞、上皮细胞等多种免疫细胞组成^[11]。当皮肤屏障被破坏或过敏原入侵时,角质形成细胞受到过敏原刺激,产生并释放细胞因子如 IL-33、IL-25 和 TSLP 等^[10],进一步激活 Th2 反应,释放 IL-4 和 IL-5 等 Th2 型炎症细胞因子^[12],IL-4 诱导 B 细胞的增殖并分化为产生 IgE 的浆细胞^[9,13]。另一方面,巨噬细胞作为先天性免疫的效应细胞,驻留在皮肤组织中,发

挥抗原提呈细胞的功能识别过敏原将其加工为抗原肽并通过主要组织相容性复合体 II 类(MHC-II)将其呈递给淋巴结中的幼稚 T 细胞,随后,触发 2 型极化^[14],促进 Th2 细胞因子的释放,Th2 细胞因子诱导 B 细胞的免疫球蛋白类转换重组和分化为浆细胞,进一步产生过量的 IgE^[15],而 IgE 与肥大细胞(mast cell, MC)表面高亲和力受体(FcεR1)结合,引发 MC 脱颗粒^[16]。MC 脱颗粒后释放 IL-4^[13]、HIS 和 LTB4 等细胞因子,介导过敏和炎症反应,加剧 AD 瘙痒。此外,巨噬细胞产生组胺释放因子(MCP-1)是一种有效的组胺释放激动剂,刺激 IgE 致敏的嗜碱性细胞和 MC 释放组胺并产生 IL-4 和 IL-13^[14],而巨噬细胞在抗原提呈的过程中,分泌细胞因子和脂质介质 IL-6、TNF-α、NO、PGD2、PGE2、CXCL-9、CXCL-10 等细胞因子

和趋化因子^[17],加重 AD 的炎症反应和皮肤组织损伤,并募集其他免疫细胞,如肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞等,进一步加重 AD 的发展^[18]。本研究通过反复给予 MC903 以模拟由角质形成细胞释放的 TSLP 驱动的过度 Th2 反应构建 AD 样小鼠模型^[19],并给予不同剂量 GMJ 干预。结果表明,GMJ 抑制 AD 样小鼠的搔抓次数;抑制 AD 小鼠耳肿胀;减轻表皮增厚,降低肥大细胞浸润;降低血清中 TSLP、IL-33、IL-4、IL-5、IgE、HIS 和 LTB4 水平;降低 AD 小鼠耳部皮肤组织中 IL-4、TNF- α 和 IL-33 蛋白水平。提示可见 GMJ 对 MC903 诱导的特应性皮炎小鼠有较好的治疗效果。

在 AD 中,巨噬细胞的持续激活介导 AD 慢性炎症。JAK-STAT 信号通路的激活是巨噬细胞活化的标志。当 JAK 被激活发生磷酸化诱导下游 STAT1 和 STAT3 磷酸化,磷酸化的 STAT1 和 STAT3 以二聚体形式转运至细胞核,调节促炎基因的表达^[20],从而诱导 IL-4^[21]、TNF- α 和 NO 等炎症介质的产生,进而导致炎症反应和组织损伤^[22],使 AD 进一步发展^[23]。因此,抑制巨噬细胞中 JAK-STAT 信号通路的激活是控制 AD 发生、发展的重要手段。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌外壁的主要结构成分,常用于造模炎症细胞^[24],而 LPS 刺激 RAW264.7 细胞常用作特应性皮炎体外模型^[25]。本研究运用 LPS 诱导 RAW264.7 构建体外炎性巨噬细胞模型,结果表明,GMJ 抑制巨噬细胞 IL-6 和 NO 的释放,下调 JAK1、JAK2、STAT1、STAT3 磷酸化水平。提示:GMJ 能降低巨噬细胞中 IL-6、NO 释放,下调 JAK1/JAK2-STAT1/STAT3 信号通路磷酸化水平。

综上所述,GMJ 改善 AD 模型小鼠搔抓,改善耳厚、耳组织病理,可能机理是通过抑制 Th2 细胞因子水平,抑制巨噬细胞炎症反应,抑制 JAK-STAT 信号通路相关蛋白磷酸化,值得深入研究。

参考文献:

- [1] ERICKSON S, HEUL A V, KIM B S. New and emerging treatments for inflammatory itch[J]. *Ann Allerg Asthma Im*, 2021, 126(1): 13-20.
- [2] 范子怡, 孙占学, 李林仙, 等. 从气血津液辨证分期治疗特应性皮炎经验[J]. *环球中医药*, 2021, 14(8): 1486-1489.
- [3] 叶小凯. 过敏煎联合布地奈德福莫特罗治疗咳嗽变异性哮喘的临床研究[J]. *中外医学研究*, 2019, 17(35): 143-145.
- [4] 钟如彬. 加味过敏煎治疗营卫不和型慢性荨麻疹的临床疗效观察[D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [5] 李媛, 冷辉. 过敏煎对过敏性鼻炎患者鼻腔分泌物嗜酸粒细胞浸润的影响[J]. *中国医学文摘 (耳鼻咽喉科学)*, 2018, 33(6): 477-478, 512, 428.
- [6] 高娟, 陈桂芳, 谭伟, 等. 过敏煎对特应性皮炎小鼠的干预作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(8): 1806-1810.
- [7] 谭伟, 刘燕娇, 邓世俊, 等. 当归苦参丸止痒功效的初步机制探究[J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(16): 1786-1794.
- [8] 高娟. 过敏煎调控 IgE 介导的肥大细胞活化干预特应性皮炎机制研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2022.
- [9] WEIDINGER S, BECK L A, BIEBER T, et al. Atopic dermatitis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 1.
- [10] CHIEOSILAPATHAM P, KIATSURAYANON C, UMEHARA Y, et al. Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 204(3): 296-309.
- [11] ZHUANG Y, LYGA J. Inflammaging in skin and other tissues—the roles of complement system and macrophage[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2014, 13(3): 153-161.
- [12] SEO S H, KIM S, KIM S E, et al. Enhanced thermal sensitivity of TRPV3 in keratinocytes underlies heat-induced pruritogen release and pruritus in atopic dermatitis[J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(11): 2199-2209.
- [13] NAKAJIMA S, TIE D, NOMURA T, et al. Novel pathogenesis of atopic dermatitis from the view of cytokines in mice and humans[J]. *Cytokine*, 2021, 148: 155664.
- [14] RODRIGUEZ-COIRA J, VILLASENOR A, IZQUIERDO E, et al. The importance of metabolism for immune homeostasis in allergic diseases [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 692004.
- [15] JIMENEZ-SAIZ R, CHU D K, MANDUR T S, et al. Lifelong memory responses perpetuate humoral T(H)2 immunity and anaphylaxis in food allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(6): 1604-1615.
- [16] TANAKA S, FURUTA K. Roles of IgE and histamine in mast cell maturation[J]. *Cells-Basel*, 2021, 10(8): 2170.
- [17] SOKOLOWSKA M, CHEN L Y, EBERLEIN M, et al. Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phos-

- pholipase A2 α and eicosanoid production in monocytes and macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(7):4470–4488.
- [18] MOUTSOPOULOS N M, KONKEL J E. Tissue-specific immunity at the oral mucosal barrier[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(4):276–287.
- [19] PELLEFIGUES C, NAIDOO K, MEHTA P, et al. Basophils promote barrier dysfunction and resolution in the atopic skin[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(3):799–812.
- [20] ZENG L T, LIU Y Q, XING C C, et al. Saponin from *periploca forrestii* schltr mitigates oxazolone-induced atopic dermatitis via modulating macrophage activation[J]. *Mediat Inflamm*, 2020, 2020:4346367.
- [21] COATES L C, FITZGERALD O, HELLIWELL P S, et al. Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: is all inflammation the same?[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2016, 46(3):291–304.
- [22] LAI X X, NAJAFI M. Redox interactions in chemo/radiation therapy-induced lung toxicity; mechanisms and therapy perspectives[J]. *Curr Drug Targets*, 2022, 23(13):1261–1276.
- [23] JI R R, DONNRLLY C R, NEDERGAARD M. Astrocytes in chronic pain and itch[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20(11):667–685.
- [24] 余玲, 康倩, 刘霞, 等. 雷公藤红素与吡哆美辛对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的协同抗炎作用研究[J]. *中南药学*, 2020, 18(11):1807–1813.
- [25] LU C, LI X Y, DU W X, et al. Exploration of costunolide derivatives as potential anti-inflammatory agents for topical treatment of atopic dermatitis by inhibiting MAPK/NF- κ B pathways[J]. *Bioorg Chem*, 2024, 143:107054.
- (收稿日期:2024-05-06)

(上接第 23 页)

- [21] QIN J, LIU Y S, LIU J, et al. Effect of *Angelica sinensis* polysaccharides on osteoarthritis in vivo and in vitro: a possible mechanism to promote proteoglycans synthesis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:794761.
- [22] PRABHAVATHI K, CHANDRA U S, SOANKER R, et al. A randomized, double blind, placebo controlled, crossover study to evaluate the analgesic activity of *Boswellia serrata* in healthy volunteers using mechanical pain model[J]. *Indian J Pharmacol*, 2014, 46(5):475–479.
- [23] 于定荣, 翁小刚, 王本晓, 等. 延胡索、白芷炮制配伍对元胡止痛方中延胡索乙素、欧前胡素含量以及镇痛作用的影响[J]. *中草药*, 2021, 52(8):2306–2312.
- [24] 徐一鑫, 黄从军. 芍药甘草汤诊治泌尿外科疾病医案举隅[J]. *中国民间疗法*, 2022, 30(21):102–105.
- [25] 朱俊, 柴旭斌, 王彦金, 等. 芍药甘草汤治疗大鼠脊髓损伤后肌痉挛的药物配比研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(5):7–11.
- [26] 吴玲芳, 李雨桐, 唐迎紫, 等. 芍药甘草汤化学成分及药理作用研究进展[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(6):1354–1360.
- [27] 何毅豪, 王冰, 杨骏, 等. 基于网络药理学和体外细胞实验探讨芍药甘草汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *上海中医药大学学报*, 2022, 36(6):59–69.
- [28] 单宇, 张伽妹, 丁月珠, 等. 水提取法和仿生提取法研究水蛭不同炮制品的体外抗凝活性[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(10):1843–1848.
- (收稿日期:2024-10-10)

(上接第 33 页)

- [22] 李德坤, 李鑫, 周政, 等. 基于生物力学角度探讨推拿手法对膝关节关节炎的治疗作用[J]. *中医药临床杂志*, 2024, 36(6):1016–1020.
- [23] 吴军尚, 吴军瑞, 吴汉卿, 等. 中医筋骨三针疗法治疗膝骨性关节炎经验理论探析[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(4):1588–1591.
- [24] 朱泳森, 欧阳希林, 钟根平, 等. 焦琳经筋手法松解术治疗膝关节骨关节炎临床经验[J]. *中国针灸*, 2024, 44(6):689–693.
- [25] 蓝枏英, 洪昆达. 吴炳煌教授从膝为筋之府理论针灸治疗膝骨性关节炎经验[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(3):83–85.
- [26] 张冀, 杨正春. 钱德金运用“3 点针法”治疗跷脉病的经验总结[J/OL]. *上海针灸杂志*, 1–6[2025-03-09]. <https://doi.org/10.13460/j.issn.1005-0957.2025.13.4045>.
- [27] 保善录, 赵亮, 祁永红, 等. 青鹏软膏联合针刺推拿治疗青藏地区膝关节关节炎患者的临床效果研究[J]. *中国医药*, 2023, 18(9):1396–1400.
- [28] 陈坚义, 唐宏图, 王华, 等. 探议足三里[J]. *中医学报*, 2020, 35(12):2521–2524.
- (收稿日期:2025-03-10)