

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.19.002

齐墩果酸通过调控 STAT3 通路改善咪喹莫特诱导的 银屑病样小鼠皮损表现 *

冯 放^{1,2} 王 燕² 赵京霞² 底婷婷² 蒙玉娇² 陈朝霞² 齐 聪^{2,3}
胡雪晴^{1,2} 王亚卓^{2,3} 赵 宁^{2,3} 李 萍^{2,4}

(1 北京中医药大学 北京 100029; 2 首都医科大学附属北京中医医院 北京市中医药研究所
银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室 北京 100010; 3 首都医科大学 北京 100069)

摘要 目的:观察齐墩果酸对咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠的皮损及 STAT3 通路的干预作用。**方法:**72 只 BALB/c 雄性小鼠,按随机数字表法随机分为空白组、模型组、甲氨蝶呤组、齐墩果酸低、中、高剂量组,每组 12 只,于背部备皮。除空白组外,其余各组小鼠每日于背部备皮区域涂抹 5%咪喹莫特乳膏诱导银屑病样皮损;甲氨蝶呤组及齐墩果酸各浓度组每日灌胃对应药物 0.2 mL/只;每日观察皮损状态并拍照记录,每日对小鼠皮损面积及严重程度(Psoriasis Area and Severity Index, PASI)进行评分;造模第 4、7 天取小鼠皮损区域皮肤,免疫印迹法检测皮损中 STAT3 信号通路中 STAT3 磷酸化表达情况;第 7 天称量小鼠体重及脾重,计算脾指数,同时取小鼠皮损区域皮肤;苏木素-伊红(HE)染色观察皮损组织病理学改变,并测量表皮厚度;免疫组织化学法及免疫组织荧光法检测皮损中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞浸润情况及 Ki67 表达情况;实时荧光定量 PCR 法检测皮损中白介素-17 (Interleukin-17, IL-17)mRNA 相对表达情况。**结果:**与空白组相比,造模后模型组小鼠背部皮肤出现红斑、鳞屑、浸润性皮损,第 4 天及第 7 天 PASI 评分升高($P<0.01$);第 7 天模型组表皮厚度明显增加,体重下降,脾指数上升,皮损中 Ki67、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞表达量升高,皮损中 IL-17 的 mRNA 相对表达量升高(均 $P<0.01$);第 4 及第 7 天,模型组小鼠皮损中 p-STAT3 的表达量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组相比,第 4 天各治疗组在 PASI 评分略降低($P>0.05$),第 7 天各治疗组 PASI 评分明显降低(均 $P<0.01$);第 7 天齐墩果酸各剂量组小鼠体重略有上升($P>0.05$);甲氨蝶呤组小鼠脾指数明显下降($P<0.01$),齐墩果酸低、中剂量组小鼠脾指数略下降($P>0.05$);各治疗组小鼠表皮厚度较模型组明显下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$),小鼠皮肤中 Ki-67 表达量、CD4⁺、CD8⁺T 细胞表达量均明显降低(均 $P<0.01$);甲氨蝶呤组、齐墩果酸低、中、高剂量组小鼠皮损中 CD3⁺T 细胞表达量均下降($P<0.05$, $P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$),其中在齐墩果酸各剂量组中,中剂量组在脾指数下降、表皮厚度变薄、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞减少方面均略优于低、高剂量组($P>0.05$);甲氨蝶呤组及齐墩果酸中剂量组小鼠皮损中 IL-17 的 mRNA 水平较模型组明显下降($P<0.01$, $P<0.05$);造模给药第 4 天,甲氨蝶呤组小鼠皮损中 p-STAT3 水平较模型组明显下降($P<0.05$),齐墩果酸中剂量组略下降($P>0.05$);造模给药第 7 天,两个治疗组小鼠皮损中 p-STAT3 水平较模型组均明显下降(均 $P<0.01$)。**结论:**齐墩果酸低、中、高剂量均可以改善咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮损的严重程度,减轻炎性细胞浸润,中剂量组疗效较好,其机制可能通过抑制 STAT3 通路中 p-STAT3 的表达从而降低了 IL-17 的含量,且药效随作用时间的延长而逐渐增加。

关键词:银屑病;咪喹莫特;齐墩果酸;STAT3 通路

中图分类号:R-33;R758.63;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)19-3608-10

Oleanolic Acid Ameliorates Imiquimod-induced Psoriatic Lesions in Mice by Regulating STAT3 Pathway*

FENG Fang^{1,2}, WANG Yan², ZHAO Jing-xia², DI Ting-ting², MENG Yu-jiao², CHEN Zhao-xia², QI Cong^{2,3},
HU Xue-qing^{1,2}, WANG Ya-zhuo^{2,3}, ZHAO Ning^{2,3}, LI Ping^{2,4}

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China; 2 Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory of Clinical Basic Research on Psoriasis, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing, 100010, China; 3 Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of oleanolic acid on psoriatic lesions and STAT3 pathway in imiquimod-induced mice. **Methods:** 72 BALB/c male mice were randomly divided into control group, model group, methotrexate group, along with oleanolic acid low-dose group, medium-dose group and high-dose group according to random number table method, with 12 mice in each group. Except the control group, each group of mice was topical applicated with 5% imiquimod cream on the back skin to induce psoriasis-like lesions. Methotrexate group and oleanolic acid groups were administered intragastrically with 0.2 mL of corresponding drugs per mouse.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82074180;82074434)

作者简介:冯放(1992-),女,博士研究生,主要研究方向:银屑病的中医药治疗机制研究,E-mail: xiacaokong@sina.com

△ 通讯作者:李萍,女,博士生导师,研究员,主要研究方向:银屑病的中医药治疗机制研究,

E-mail: liping@bjzhongyi.com, 电话:010-52176679

(收稿日期:2022-01-25 接受日期:2022-02-22)

Observe and take photos daily to record the changes of the skin lesion. The psoriasis area and severity index (PASI) of mice were scored daily. On day 4 and 7 of modeling, the skin lesions of mice were taken and the phosphorylation of STAT3 was detected by western blotting. On the 7th day, the body weight and spleen weight of mice were weighed to calculate the spleen index, and the skin in the lesions area of mice was taken. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes and measure the epidermal thickness. CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T cell infiltration and Ki67 expression were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. The relative expression of interleukin-17 (IL-17) mRNA in skin lesions was detected by real-time quantitative PCR. **Results:** Compared with blank group, the back skin of mice in model group showed erythema, scales and infiltrating skin lesions after modeling, and the PASI score increased on day 4 and 7 ($P<0.01$). On day 7, the epidermal thickness, body weight, spleen index, Ki67, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T cell expression in the skin lesion increased significantly, and the mRNA relative expression of IL-17 in the skin lesion increased (all $P<0.01$). On day 4 and 7, the expression of p-STAT3 in the skin lesions of model group was increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the PASI score in each treatment group was lower at the 4th day ($P>0.05$), the PASI score was decreased significantly at the 7th day ($P<0.01$). On day 7, the body weight of mice in each dose of oleanolic acid groups increased slightly ($P>0.05$). The spleen index of mice in methotrexate group decreased significantly ($P<0.01$), spleen index of mice in low and medium dose of oleanolic acid groups decreased slightly ($P>0.05$). Compared with model group, epidermal thickness of mice in treatment groups were decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$), and the expression levels of Ki-67, CD4⁺ and CD8⁺T cells in skin were decreased significantly (all $P<0.01$). The expression of CD3⁺T cells in the skin lesions of mice in methotrexate group and three doses of oleanolic acid groups were decreased ($P<0.05$, $P>0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). The mRNA levels of IL-17 in the skin lesions of methotrexate group and oleanolic acid medium-dose group were significantly lower than that of model group ($P<0.01$, $P<0.05$). On day 4, the level of p-STAT3 in skin lesions in methotrexate group was significantly lower than that in model group ($P<0.05$), and that in oleanolic acid medium-dose group was slightly lower ($P>0.05$). On the 7th day, p-STAT3 level in skin lesions of mice in both treatment groups was significantly lower than that in model group ($P<0.01$). **Conclusions:** The three doses of oleanolic acid can improve the severity of imiquimod-induced psoriasis lesions and the expression of inflammatory cells. Among them, the medium does of oleanolic acid has a better effect. Inhibition of STAT3 signaling activation and decrease of IL-17 expression may be one of the mechanisms for its better effect. Moreover, the pesticide effect increases gradually with the prolongation of time.

Key words: Psoriasis; Imiquimod; Oleanolic acid; STAT3 pathway

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R758.63; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)19-3608-10

前言

银屑病(Psoriasis)是以皮肤红斑、鳞屑、浸润肥厚为主要表现的慢性炎症性疾病^[1]。银屑病皮损起源于先天性和适应性免疫系统成分与皮肤细胞类型失调的相互作用,发病机制涉及遗传、感染、免疫等众多因素^[2],其中T细胞介导的适应性免疫是重要因素^[3]。T细胞受细胞因子刺激分化为T辅助细胞17(T helper cell, Th17)细胞,产生白细胞介素-17A、17F和22(Interleukin-17A, IL-17A, Interleukin-17F, IL-17F, Interleukin-22, IL-22)等多种介质,IL-17A和IL-17F是中枢效应细胞因子,这些介质可诱导角质细胞增殖以及银屑病的其他特征性表现^[2,4]。而信号传感器和转录激活因子3(Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路是介导Th17分泌IL-17的重要信号通路^[5]。通过抑制STAT3的磷酸化并降低IL-17的产生是治疗银屑病的重要途径。

齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)是一种广泛存在于植物中的五环三萜类化合物,其最主要的来源是橄榄和橄榄制品,在中草药中,白花蛇舌草、山楂、女贞子和木瓜也是齐墩果酸的重要来源^[6]。齐墩果酸具有护肝、抗炎、抗氧化、抗癌、抗菌等作用^[8-10]。在黑色素瘤、特应性皮炎、接触性皮炎及皮肤老化等皮肤相关疾病中起到治疗作用^[11-14],并对STAT3信号通路具有调节作用^[15,16]。根据齐墩果酸的药理作用推测,其可能具有治疗银屑病的作用,但相关研究内容尚未见报道。因此,本文采用咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型,验证齐墩果酸在不同时间点对银屑

病样小鼠皮损的干预作用,探索齐墩果酸治疗银屑病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 72只BALB/c雄性小鼠,6~8周龄,体重20g~22g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物许可证编号为SCXK(京)2019-0008。单笼饲养于北京市中医研究所SPF级动物饲养间。室温20℃~26℃,相对湿度40%~70%,昼夜明暗交替时间12h/12h,所有动物均自由采食灭菌饲料、饮用灭菌水。动物实验获得北京市中医研究所动物伦理委员会的批准。实验过程严格遵循中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局及中国国家标准化管理委员会2018年发布的《实验动物福利伦理审查指南》。

1.1.2 药物与试剂 齐墩果酸购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度>98%;5%咪喹莫特乳膏购自四川明欣药业有限责任公司;甲氨蝶呤购自上海上药信谊药厂有限公司;兔来源抗Ki-67、CD3、CD4、CD8抗体购自英国abcam公司;兔来源抗p-STAT3抗体、抗STAT3抗体购自美国CST公司;柠檬酸盐抗原修复缓冲液、封闭用羊血清、通用二步法检测试剂盒(兔增强聚合物法检测系统)、DAB显色液、荧光封片剂(含DAPI)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;山羊抗兔488荧光二抗购自北京冠星宇公司;BCA试剂盒、预制胶10%、中分子量蛋白marker、ECL购自美国Thermo公司;β-actin mouse抗体购自锐

尔康生物;山羊抗兔、鼠 IgG(H+L),HRP 购自美国 Jackson 公司;TRNzol 总 RNA 提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser,SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus),ROX plus,DL2,000 DNA Marker 购自日本 TaKaRa(宝生物);PCR 引物购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.3 实验仪器 组织脱水机、石蜡包埋机、全自动轮转式切片机、烤片机、HE 全自动染色仪购自德国徕卡,型号分别为 ASP6025、EG1150C、RM2255、HI1220、autostainer XL;正置荧光显微镜及图像分析系统购自德国徕卡 Image Scope,型号 CS2;正置荧光显微镜及 ZEN 图像分析系统购自德国 Zeiss,型号 Imager M2;涡旋振荡仪购自宁波市鄞州群安实验仪器有限公司,型号 MIX-28;垂直电泳仪、电转仪、购自上海天能科技有限公司,型号 VE180、VE586;曝光仪购自上海易宇特公司,型号 eBlot;NANODROP 2000 分光光度计购自美国 Thermo 公司,型号 NANODROP 2000;荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems,型号 ABI7500。

1.2 方法

1.2.1 实验分组、造模及给药 小鼠适应性饲养一周后,按随机数字表法随机分为空白组(Ctrl)、模型组(Model)、甲氨蝶呤组(methotrexate,MTX)、齐墩果酸低剂量组(Oleanolic acid Low does,OAL)、齐墩果酸中剂量组(Oleanolic acid Medium does,OAM)、齐墩果酸高剂量组(Oleanolic acid High does,OAH),每组 12 只。

采用经典的咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型^[7]。小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(80 mg/kg)进行麻醉,对背部 2 cm×3 cm 区域去毛,备皮后单笼饲养。空白组小鼠背部备皮区域内每日涂抹凡士林 62.5 mg,其余各组小鼠每日于背部备皮区域内涂抹 5%咪喹莫特,每日 1 次。用药小鼠皮肤出现红斑、鳞屑、浸润性银屑病样皮损,并每日逐渐加重,提示造模成功。

抹药前先行灌胃,每日 1 次,每只 0.2 mL,连续 6 天。空白组及模型组灌胃纯水,甲氨蝶呤组灌胃甲氨蝶呤片溶液(1 mg/kg),齐墩果酸低、中、高剂量组分别灌胃对应浓度药液,分别为:10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg。抹药首日记为第 1 天,分别于第 4 天及第 7 天取材,每次各组取材 6 只。

1.2.2 小鼠背部银屑病样皮损表现及 PASI 评分 每日观察小鼠皮损情况并进行拍照,根据红斑、浸润、鳞屑的程度及面积进行评分,各项满分 4 分,PASI 评分标准为:无(0 分):皮肤无红斑、鳞屑,与正常皮肤平齐;轻度(1 分):小部分皮肤为淡红色,上覆细碎鳞屑,皮损略高于正常皮肤;中度(2 分):大部分皮肤为红色,鳞屑为片状,斑块边缘为圆斜坡状;重度(3 分):几乎全部皮肤为深红色,均覆肥厚鳞屑,皮损隆起明显高于正常皮肤;极重度(4 分):全部皮肤区域均为暗红色,鳞屑肥厚,皮损隆起明显高于正常皮肤。总分为 3 项分数总和,满分 12 分。绘制 PASI 评分折线图,观察小鼠皮损动态变化。

1.2.3 小鼠体重及脾指数 于第 7 日对小鼠进行体重及脾脏的称重,计算脾指数:[脾质量/体质量(mg/g×10)]。

1.2.4 小鼠皮损观察组织形态及表皮厚度 造模第 7 天,取小鼠背部皮肤于福尔马林中固定 48 h,常规脱水,于石蜡内包埋,切片机切片(5 μm)。二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素染色 3 分钟,自来水冲洗,纯水冲洗 1 分钟,返蓝液洗 30 分钟,纯水洗 1 分钟,伊红染色 30 分钟,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树

胶封片。于 400× 正置显微镜下观察小鼠皮肤组织形态结构,每个组织随机选取 3 个视野,采用 Image Scope 软件拍照,每个视野随机测量 5 处表皮厚度,求取平均值。

1.2.5 小鼠皮损 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞表达 造模第 7 天,取小鼠背部皮肤,于福尔马林中固定 48 小时,常规脱水,于石蜡内包埋,切片机切片(5 μm)。二甲苯中脱蜡,梯度酒精脱水,纯水泡洗 10 分钟,柠檬酸盐 100℃水浴抗原修复 20 分钟,滴加内源性过氧化物酶阻断剂 10 分钟,滴加封闭用山羊血清 37℃孵育 30 分钟,甩干血清,滴加 CD3、CD4、CD8 一抗(1:100、1:1000、1:1000),4℃湿盒过夜(18 小时);滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,37℃孵育 1 小时,DAB 显色 1 分钟,纯水泡洗 10 分钟,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。于 400× 正置显微镜下观察,每个组织采用 Image Scope 软件随机选取 5 个视野拍照,对深染褐色的阳性点计数,求取平均值。

1.2.6 小鼠皮损中 Ki-67 的表达 造模第 7 天,取小鼠背部皮肤,于福尔马林中固定 48 小时,常规脱水,于石蜡内包埋,切片机切片(5 μm)。二甲苯中脱蜡,梯度酒精脱水,纯水泡洗 10 分钟,柠檬酸盐 100℃水浴抗原修复 20 分钟,于组织上滴加内源性过氧化物酶阻断剂 10 分钟,滴加封闭用山羊血清 37℃孵育 30 分钟,甩干血清,滴加 Ki-67 一抗(1:300),4℃湿盒过夜(18 小时);避光滴加山羊抗兔 488 荧光二抗(1:800),37℃避光孵育 1 小时,用荧光封片剂避光封片。于 400× 正置荧光显微镜下观察,每个组织采用 ZEN 软件随机选取 5 个视野拍照,对绿色阳性点计数,求取平均值。

1.2.7 小鼠皮损细胞因子 IL-17 的 mRNA 相对表达量 造模第 7 天,取小鼠背部皮肤,液氮中速冷后,于 -80℃保存。取小鼠背部皮肤放入已预冷的研钵中研磨至粉末状,采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取,使用 NanoDrop® ND-2000 测定 RNA 浓度和纯度,采用反转录试剂盒进行反转录及扩增,按试剂盒说明配制反应体系:37℃孵育 15 分钟,85℃,5 秒,降至 4℃后取出,96 孔板上样,于 PCR 仪中行 PCR 反应:95℃,30 秒;40 个 PCR 循环(95℃,5 秒;60℃,40 秒(收集荧光))。各样品的目的基因和内参分别进行 Realtime PCR 反应,每个样本检测 3 个复孔。数据采用 2^{-ΔΔCT} 法进行分析。引物序列详见表 1。

1.2.8 小鼠皮损中 STAT3 及 p-STAT3 的表达量 造模第 4 天及第 7 天,取小鼠背部皮肤,液氮中速冷后,于 -80℃保存。裂解液由 RIPA 裂解液加 PMSF(1:100)及磷酸酶抑制剂(1:100)配制,将小鼠背部皮肤加 250 μL 裂解液后剪碎,研磨,离心,提取皮肤组织蛋白上清。使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,计算样本浓度。100℃高温变性 5 分钟,准备预制胶,上样,电泳 80 V 30 分钟后转为 100 V 60 分钟,制备转膜三明治,转膜 260 mA 1.5 小时,5%脱脂奶粉封闭 30 分钟,一抗 4℃过夜孵育(p-STAT3 1:500;STAT3 1:500),TBST 洗膜 3 次,每次 5 分钟,二抗室温孵育 1 小时(羊抗兔 IgG 1:5000),TBST 洗膜 3 次,每次 5 分钟,ECL 加到 PVDF 膜上后避光反应 3-5 min,eBlot 曝光仪曝光。Stripping Buffer 洗膜,37℃洗膜 30 min,去离子水及 TBST 洗膜,5%脱脂奶粉封闭 30 分钟,孵育内参 4℃过夜(β-actin 1:10000),TBST 洗膜 3 次,每次 5 分钟,二抗室温孵育 1 小时(羊抗小鼠 IgG 1:5000),TBST 洗膜 3 次,每次 5 分钟,ECL 加到 PVDF 膜上后避光反应 3-5 min,eBlot 曝光仪曝光。Image J 计算条带灰度值。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequence

Name		The primer sequence (5'to 3')	Product(bp)
IL-17	F	CCTCAGACTACCTCAACCGTTCC	191
IL-17	R	AGGCTCCCTCTTCAGGACCAG	
ACTIN	F	CCATCTACGAGGGCTATGCT	150
ACTIN	R	CTTTGATGTCACGCACGATT	

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism8 统计软件分析及作图, 数据均采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm$ SD)表示。多组间差异采用单因素方差分析(one way ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey 法检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠皮损表现及 PASI 评分

空白组小鼠背部皮肤平滑, 肉粉色, 无红斑、鳞屑、浸润改

变。模型组小鼠造模 2 天后皮肤逐渐出现银屑病样皮损: 背部红斑, 鳞屑, 皮肤增厚浸润, 且随时间增加, 严重程度逐渐加重, 面积逐渐增大。第 4 天及第 7 天 PASI 评分在红斑、鳞屑、浸润及总分中均明显高于空白组(均 $P<0.01$), 提示模型建造成功。甲氨蝶呤组及齐墩果酸各剂量组小鼠与模型组小鼠同期相比较, 皮肤红斑、鳞屑、浸润情况减轻, 在第 4 天此三项及总分较模型组略降低, 但无统计学差异($P>0.05$); 在第 7 天, 各治疗组皮损颜色减淡, 鳞屑减少, 浸润厚度减轻, PASI 评分均明显降低(均 $P<0.01$), 而各治疗组之间无差异(均 $P>0.05$)。见图 1、图 2。

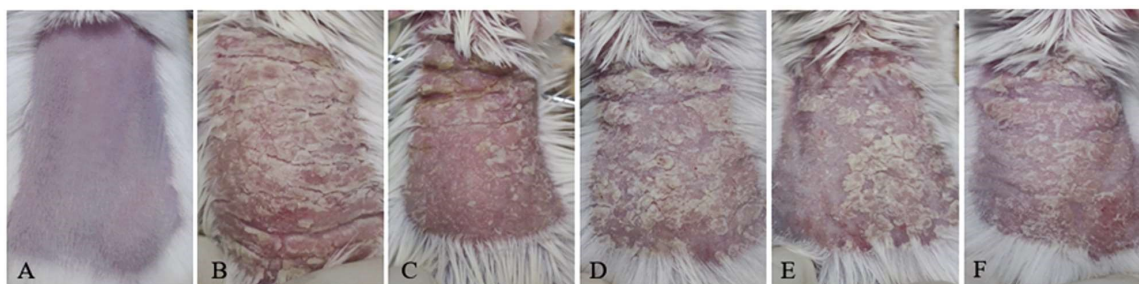


图 1 各组小鼠第 7 天皮损表现

Fig. 1 Skin lesion of the psoriasis-like mice in each group on the 7th day

Note: A: Ctrl; B: Model; C: MTX; D: OAL; E: OAM; F: OAH.

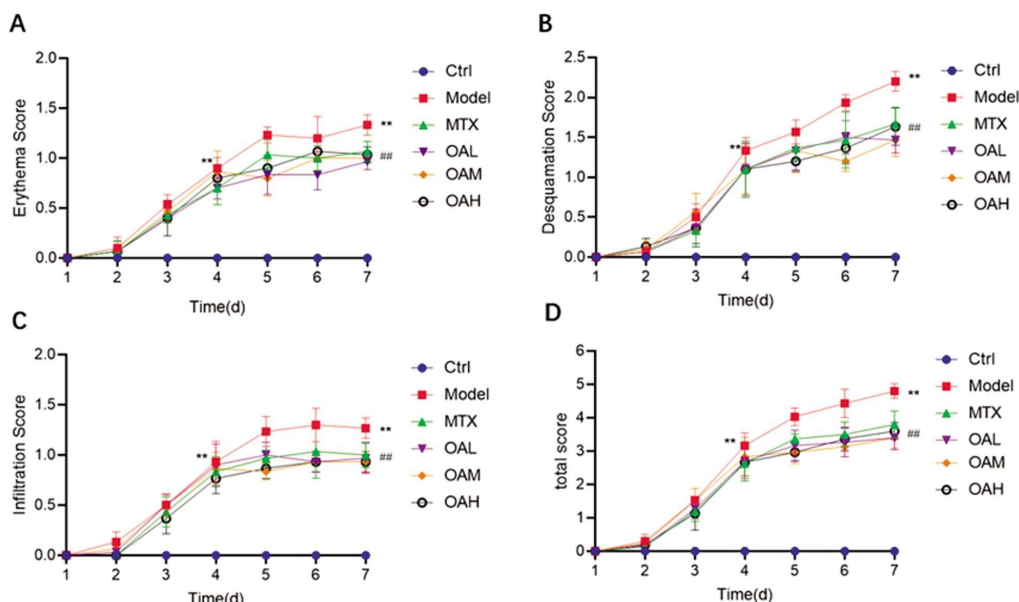


图 2 各组小鼠 1-7 天 PASI 评分趋势

Fig. 2 PASI scores of mice skin lesions during day 1-7

Note: $\bar{x}\pm$ SD. n=6. (A)Erythema score; (B)Desquamation score; (C)Infiltration score; (D) Total score. Compared with the same day,

** $P<0.01$ compared with Ctrl group, ### $P<0.01$ compared with Model group.

2.2 各组小鼠体重及脾指数

造模给药第 7 天, 模型组小鼠体重较空白组明显下降

($P<0.01$), 齐墩果酸各剂量组与模型组小鼠相比, 体重略有上升, 但无统计学差异($P>0.05$)。脾指数代表免疫系统异常活化

情况,空白组小鼠脾指数较低,模型组小鼠较空白组小鼠脾指数明显上升($P<0.01$);与模型组相比,甲氨蝶呤组小鼠脾指数

明显下降($P<0.01$),齐墩果酸低、中剂量组略下降,但无统计学意义(均 $P>0.05$)。见图 3。

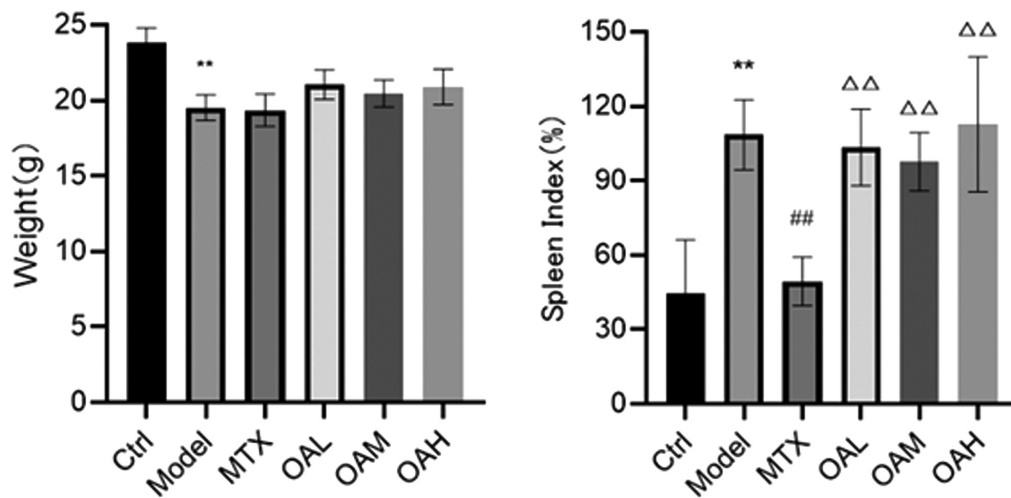


图 3 各组小鼠体重及脾指数

Fig.3 The weight and spleen index of mice in each group

Note: $\bar{x} \pm SD$, $n=6$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group. ## $P<0.01$ compared with Model group. $\Delta\Delta$ $P<0.01$ compared with MTX group.

2.3 各组小鼠皮损组织形态变化及表皮厚度

HE 结果显示,造模给药第 7 天,空白组小鼠皮肤表皮层较薄,形态正常。与空白组相比,模型组小鼠表皮明显增厚($P<0.01$),可见角化过度及角化不全,真皮层可见较多炎性细胞浸润。与

模型组相比,各治疗组小鼠表皮厚度明显下降(均 $P<0.01$),炎症细胞浸润减少。各治疗组间,甲氨蝶呤组表皮厚度下降最多,齐墩果酸中剂量组小鼠表皮厚度略低于低、高剂量组,但均无统计学差异(均 $P>0.05$)。见图 4。

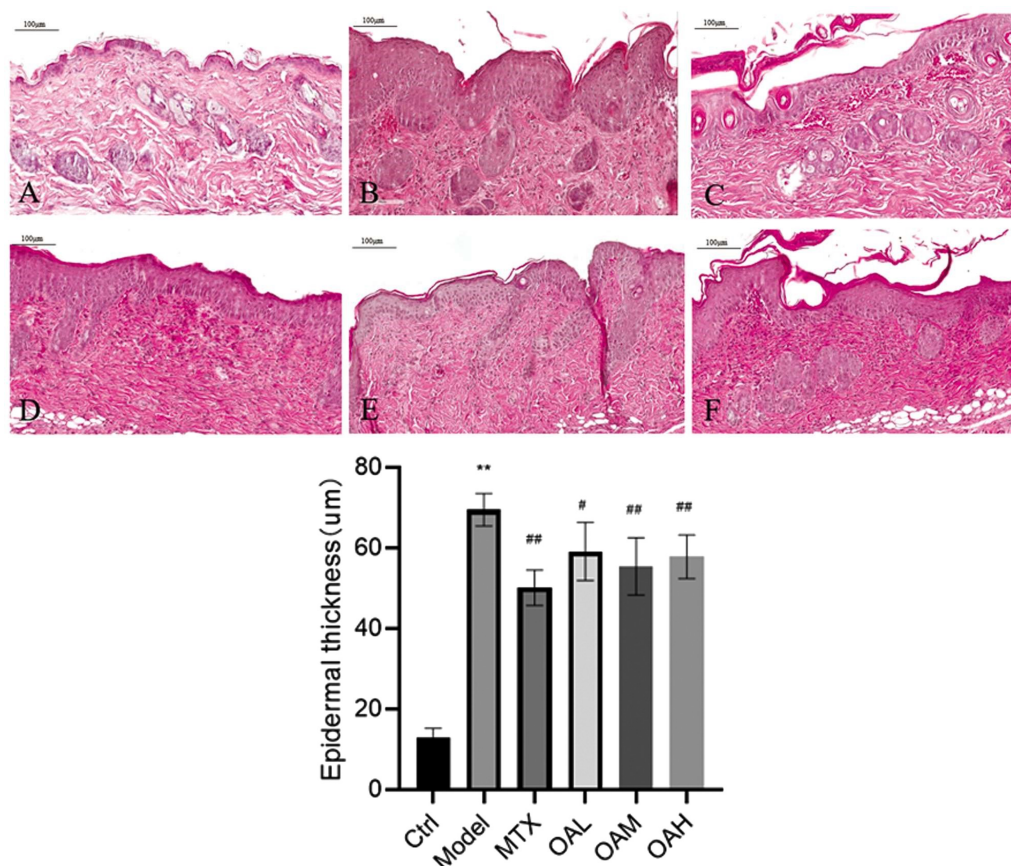


图 4 各组小鼠皮肤 HE 染色后组织形态学改变及表皮厚度改变

Fig. 4 Histopathological changes and the epidermal thickness of mice in each group (HE staining 200 $\times$)

Note: A: Ctrl; B: Model; C: MTX; D: OAL; E: OAM; F: OAH. $\bar{x} \pm SD$, $n=6$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl group. # $P<0.05$ compared with Model group.

$P<0.01$ compared with Model group.

2.4 各组小鼠皮损中 Ki-67 的表达

Ki-67 免疫荧光染色结果显示,空白组小鼠皮肤中 Ki-67 表达位于基底层,且为单层,数量较少。与空白组相比,模型组小鼠 Ki-67 表达量显著增多($P<0.01$),且为多层分布。与模型组

小鼠相比,各治疗组 Ki-67 表达均明显下降(均 $P<0.01$)。齐墩果酸三个剂量组与甲氨蝶呤组相比阳性点数量降低,其中,高剂量组具有统计学意义($P<0.05$)。见图 5。

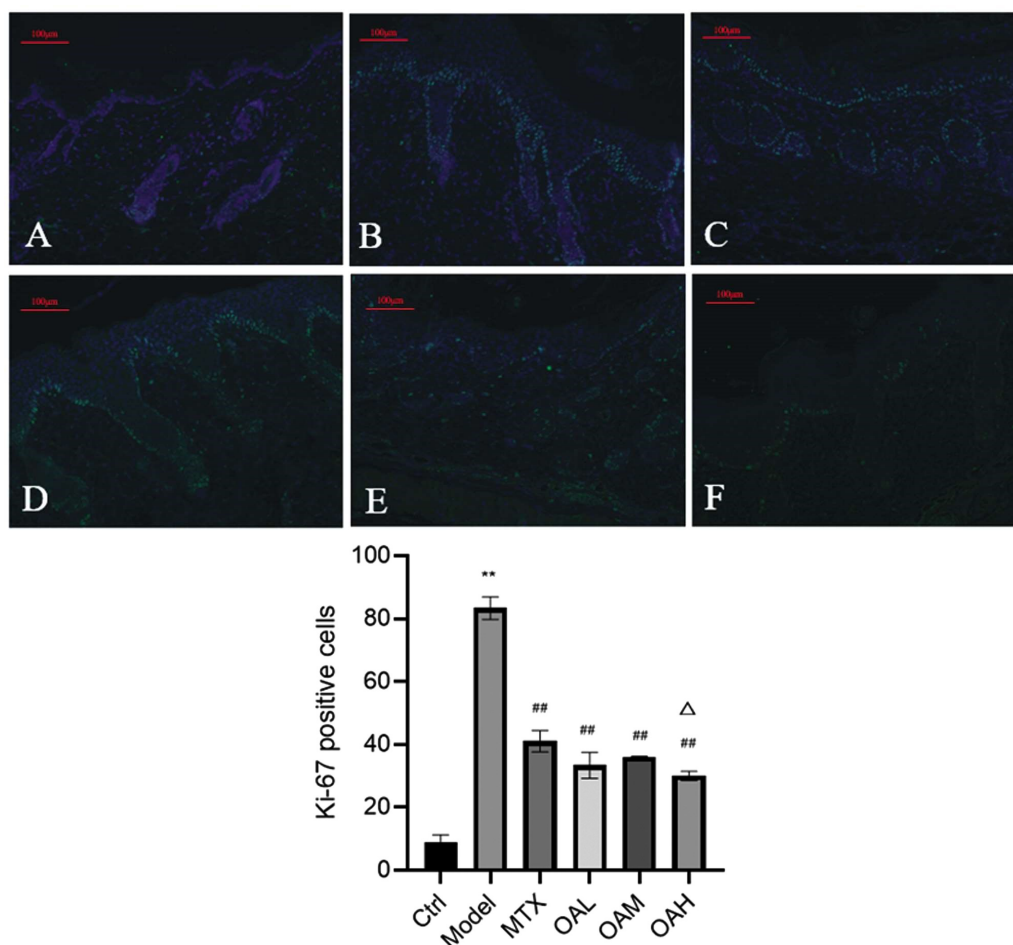


图 5 各组小鼠免疫荧光法检测皮损 Ki-67 的表达 (IF 染色 200×)

Fig.5 Ki-67 expression in the skin of mice in each group (IF staining 200×)

Note: Blue: DAPI; Green: Ki-67. A: Ctrl; B: Model; C: MTX; D: OAL; E: OAM; F: OAH. $\bar{x} \pm SD$, $n=3$, ** $P<0.01$ compared with Ctrl. ## $P<0.01$ compared with Model. Δ $P<0.05$ compared with MTX group.

2.5 各组小鼠皮损中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞的表达

免疫组化结果显示,在空白组小鼠中 CD3、CD4、CD8 阳性 T 细胞的表达均较少。与空白组相比,模型组中 CD3、CD4、CD8 阳性 T 细胞数量明显增多(均 $P<0.01$)。与模型组小鼠相比,各治疗组 CD4、CD8 阳性 T 细胞数量均明显下降(均 $P<0.01$)。在 CD3⁺T 细胞方面,与模型组相比,甲氨蝶呤组、齐墩果酸中、高剂量组明显下降($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$),低剂量组也略下降 ($P>0.05$)。与甲氨蝶呤组相比,齐墩果酸低剂量组在降低 CD4⁺T 细胞数量方面疗效不如甲氨蝶呤组($P<0.01$)。齐墩果酸中、高剂量组在降低 CD3⁺、CD8⁺T 细胞数量方面略优于甲氨蝶呤组($P>0.05$)。齐墩果酸中剂量组在降低 CD3⁺、CD8⁺T 细胞的表达方面略优于高剂量组($P>0.05$)。见图 6、图 7、图 8。

2.6 各组小鼠皮损中细胞因子 IL-17 mRNA 的相对表达量

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与空白组小鼠相比,模型组小鼠皮损中 IL-17 的 mRNA 相对表达量显著升高($P<0.01$)。甲氨蝶呤组及齐墩果酸中剂量组小鼠 IL-17 的 mRNA 相对表达量较模型组明显降低($P<0.01$, $P<0.05$),其中,甲氨蝶呤

组比齐墩果酸中剂量组降低更明显($P<0.05$)。见图 9。

2.7 各组小鼠皮损中 STAT3、p-STAT3 的表达

在造模给药第 4 天及第 7 天,与空白组比较,模型组小鼠皮损中 p-STAT3/STAT3 表达量均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与同一时间模型组相比,甲氨蝶呤组小鼠皮损中 p-STAT3/STAT3 表达量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组相比,在造模给药第 4 天,齐墩果酸中剂量组小鼠皮损中 p-STAT3/STAT3 表达量略降低($P>0.05$);在造模给药第 7 天,齐墩果酸中剂量组小鼠皮损中 p-STAT3/STAT3 表达量明显降低($P<0.01$)。见图 10。

3 讨论

银屑病是一种免疫介导的遗传性疾病,临床表现主要为皮肤的潮红斑块,上覆较厚白色鳞屑。因其较高的流行率、慢性反复的病程以及代谢等相关的共病,给银屑病的治疗带来了较大挑战^[2,18,19]。在众多发病机制中,T 细胞介导的适应性免疫是重要环节^[20]。在银屑病中,树突状细胞、巨噬细胞等分泌的 IL-6、

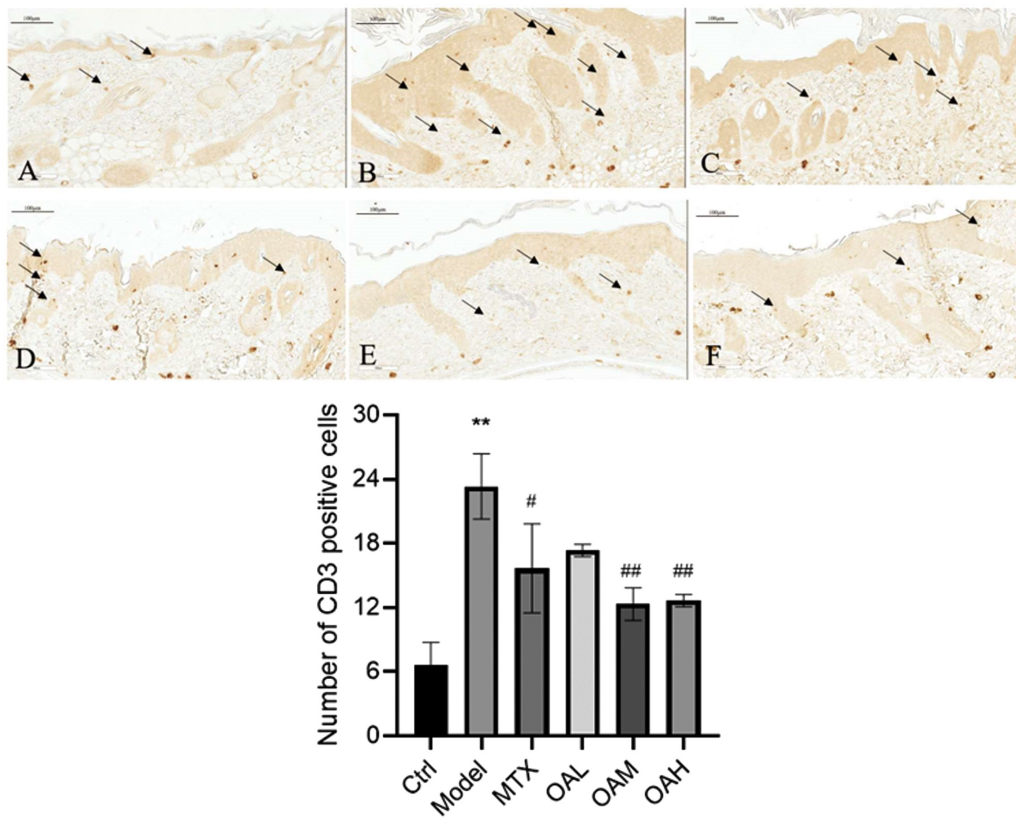


图 6 各组小鼠免疫组化法检测皮损 CD3⁺T 细胞的表达

Fig.6 CD3⁺T cell expression in the skin of mice in each group (IHC staining 200×)

Note: A: Ctrl; B: Model; C: MTX; D: OAL; E: OAM; F: OAH. $\bar{x} \pm SD$, n=3, **P<0.01 compared with Ctrl group. #P<0.05 compared with Model group. ##P<0.01 compared with Model group.

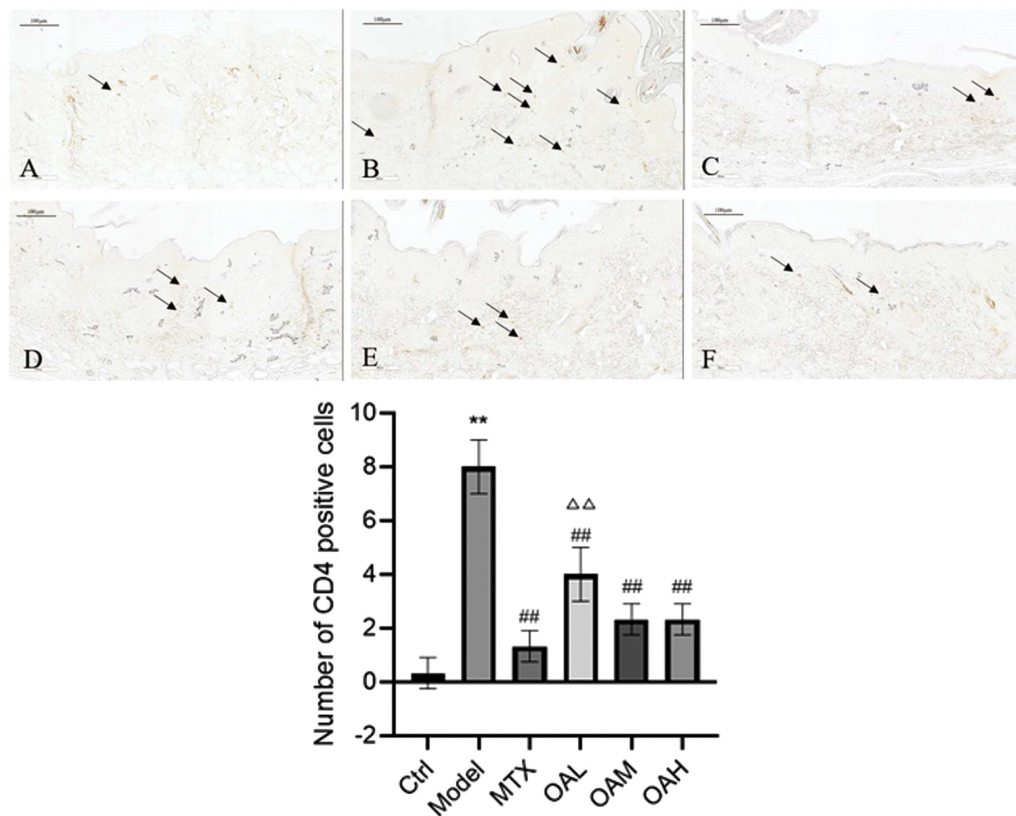


图 7 各组小鼠免疫组化法检测皮损 CD4⁺T 细胞的表达

Fig.7 CD4⁺T cell expression in the skin of mice in each group (IHC staining 200×)

Note: A: Ctrl; B: Model; C: MTX; D: OAL; E: OAM; F: OAH. $\bar{x} \pm SD$, n=3, **P<0.01 compared with Ctrl group. ##P<0.01 compared with Model group. ΔP<0.01 compared with MTX group.

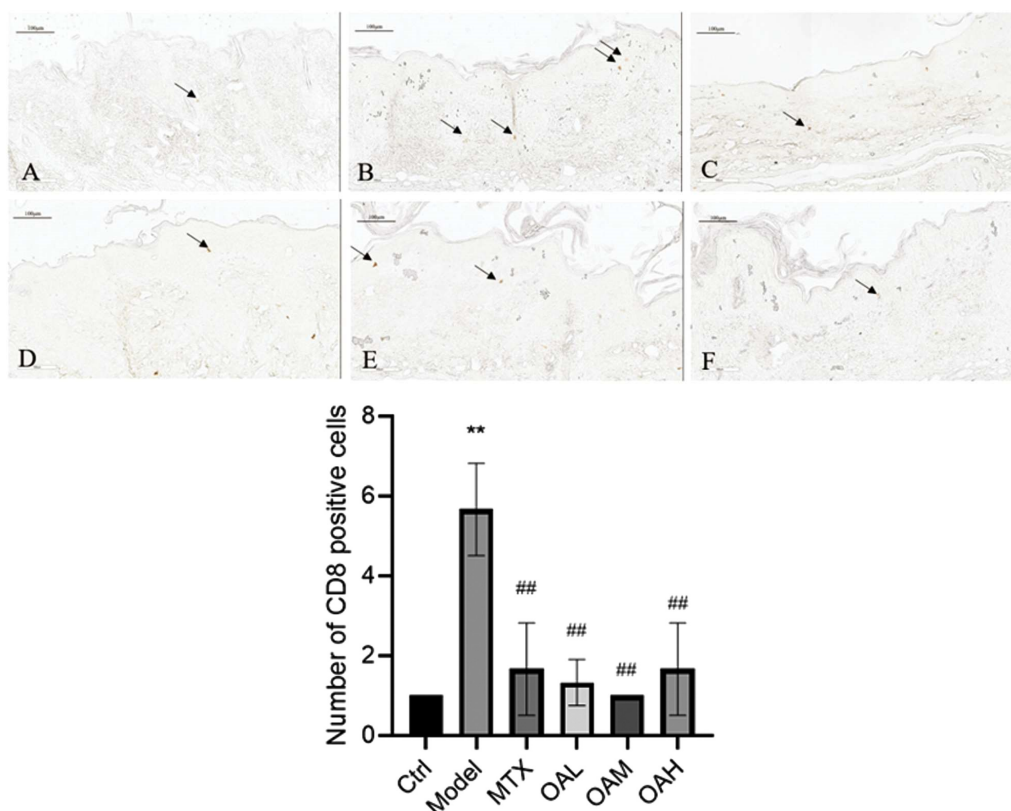
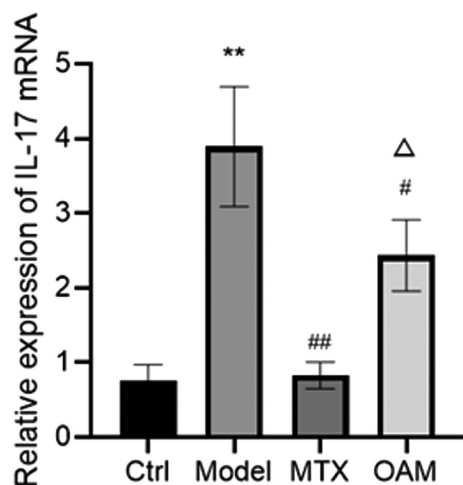
图 8 各组小鼠免疫组化法检测皮损 CD8⁺T 细胞的表达Fig.8 CD8⁺T cell expression in the skin of mice in each group (IHC staining 200×)Note: A: Ctrl; B: Model; C: MTX; D: OAL; E: OAM; F: OAH. $\bar{x} \pm SD$, n=3, **P<0.01 compared with Ctrl group. ##P<0.01 compared with Model group.

图 9 各组小鼠实时荧光 PCR 法检测皮损 IL-17 相对表达水平

Fig.9 The relative expression of IL-17 of mice in each group

Note: $\bar{x} \pm SD$, n=3, **P<0.01 compared with Ctrl group. #P<0.05 compared with Model group. ##P<0.01 compared with Model group.^Δ P<0.05 compared with MTX group.

IL-21、IL-23 等细胞因子，可以激活 T 细胞中的 STAT3 通路，诱导 T 细胞分化为 Th17 细胞^[21,22]。STAT3 同源二聚体诱导视黄酸相关的孤儿受体 γ T (Related Orphan Receptor, ROR γ T) 和视黄酸相关的孤儿受体 α (Related Orphan Receptor, ROR α) 的表达，ROR γ T 和 ROR α 与 STAT3 同源二聚体和 STAT3/STAT4 异质二聚体一起，激活 Th17 相关基因，介导下游 IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22 和 IL-23R 的表达^[15,23,24]。IL-17 局部水平的失调是驱动银屑病病理生理的关键效应机制，可以引

起中性粒细胞内流和角质形成细胞增生^[4]，从而造成局部炎症反应持续存在。通过调控 STAT3 介导的 Th17 活化及 IL-17 生成可以有效缓解银屑病。

齐墩果酸可见于多种中草药，治疗银屑病的常用药物白花蛇舌草中亦有较高含量的齐墩果酸^[7,25]。研究发现齐墩果酸在皮肤病方面，可以抑制微粒物质 10 (Particulate Matter 10, PM10) 诱导的细胞色素 P450 超家族 (Cytochromes P450, CYP1A1)，降低 PM10 诱导的肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 的升高，还可降低 PM10 诱导的活性氧过量产生、应激活化蛋白激酶/Jun-氨基末端激酶 (Stress-Activated Protein Kinase/Jun-Amino-Terminal Kinase, SAPK/JNK) 的活化，治疗 PM10 引起的皮肤老化^[11,12]。齐墩果酸可能通过调节表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 的活性从而抑制细胞增殖，介导恶性黑色素瘤 A375 细胞的凋亡^[13]。齐墩果酸乙酸酯 (Oleanolic Acid Acetate, OAA) 通过下调核因子激活的 B 细胞的 κ -轻链增强子 (Nuclear Factor Kappa B, NF- κ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) 通路抑制 HaCaT 细胞中细胞因子和趋化因子的表达，并对特应性皮炎 (Atopic Dermatitis, AD) 和过敏性接触性皮炎 (Allergic Contact Dermatitis, ACD) 的症状有改善作用^[14]。齐墩果酸衍生物 HA-19 可增加雪旺氏细胞的增殖，并提高细胞睫状神经营养因子 (Ciliary Neurotrophic Factor, CNTF) 的产量，调节 Janus 激酶 2 (Janus Kinase 2, JAK2) 和 STAT3 的磷酸化以达到抗去神经诱导的肌肉萎缩^[16]。齐墩果酸还被报道可以通过干扰酪氨酸激酶 2-信号传感器和转录激活因子 1/3 (Tyrosine Kinase

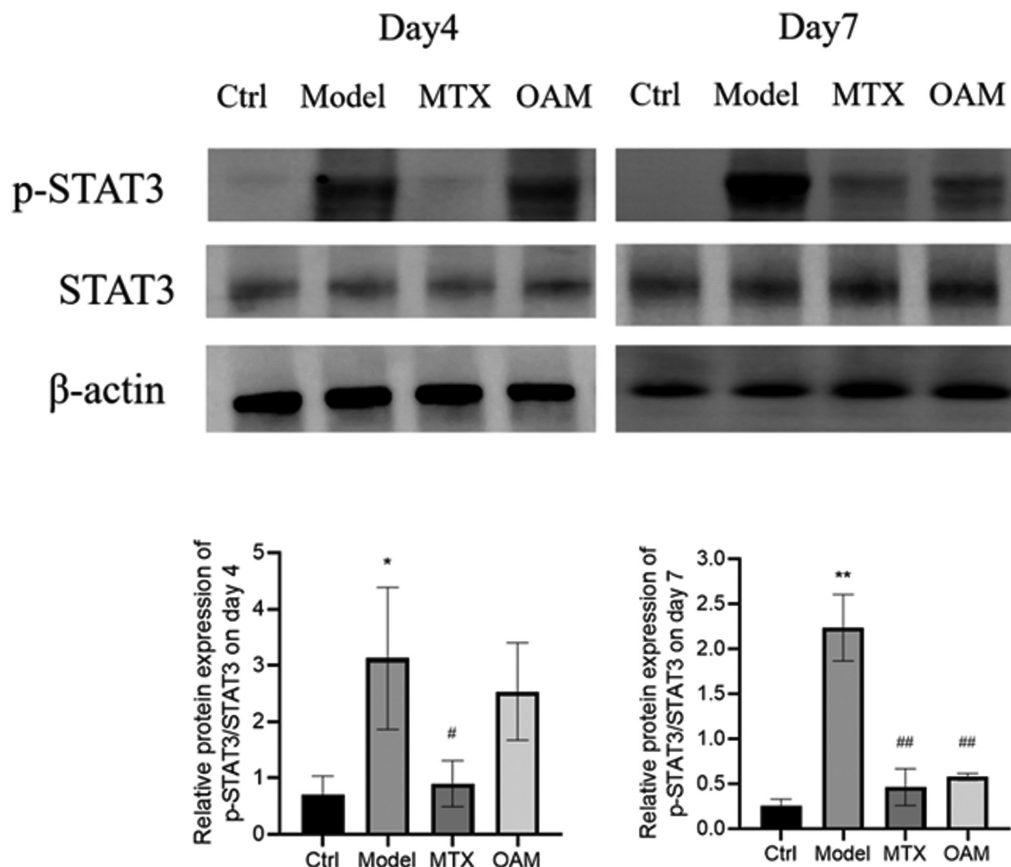


图 10 第 4 天及第 7 天各组小鼠免疫印记法检测皮损中 p-STAT3、STAT3 的表达量

Fig.10 The expression of p-STAT3, STAT3 of mice in each group at day 4 and day 7

Note: $\bar{x} \pm SD$, n=3, * $P < 0.05$ compared with Ctrl group. ** $P < 0.01$ compared with Ctrl group. # $P < 0.05$ compared with Model group. ## $P < 0.01$ compared with Model group.

2-Signal Transducer and Activator of Transcription 1/3, Tyk2-STAT1/3) 信号通路, 抑制脂肪细胞分化相关的抵抗素及脂肪生成^[15]。基于既往研究, 齐墩果酸具有调控 STAT3 信号通路作用, 这与银屑病发病机制中 STAT3 信号通路的激活相对应。

本文应用经典的咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型, 并应用银屑病临床一线用药甲氨蝶呤为阳性对照药^[126]。研究表明咪喹莫特可以诱导 IL-17A、IL-17F 和 IL-23 在小鼠皮肤中表达, 而 IL-17 受体的缺失几乎完全消除了皮肤病, 证明了咪喹莫特模型为 IL-17 依赖的炎症^[27,28]。

本研究中, 经过咪喹莫特外用, 小鼠皮肤表现为红斑、鳞屑、浸润型皮损, PASI 评分升高, 表皮明显增厚, 是银屑病模型的特征性表现, 提示造模成功^[29]。甲氨蝶呤及齐墩果酸各剂量组均可以改善咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠的皮损表现。在第 4 天时, 各治疗组 PASI 评分降低不明显, 但第 7 天 PASI 评分及表皮厚度明显降低。Ki-67 的多种分子功能可以表现细胞类型特异性的变化, 并与细胞周期的不同阶段相关, 多作为细胞增殖标志物^[30]。本文应用 Ki-67 标记增殖的角质形成细胞, 各治疗组 Ki-67 表达量均明显低于模型组。上述结果提示齐墩果酸的治疗可以改善皮损表现以及角质形成细胞的增殖。对于炎症细胞浸润的情况, 应用免疫组化对各组小鼠皮肤中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 进行检测, 齐墩果酸中剂量及高剂量在三种细胞浸润中均能起到抑制作用, 低剂量组可以改善 CD4⁺ 及 CD8⁺T 细胞的浸润。齐墩果酸三个剂量组相比较, 中剂量组在降低表皮厚度、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 细胞表达量方面均优于低、高剂量

组, 因此后续检测选取中剂量组进行比较。对于 IL-17 的抑制作用, 模型组小鼠皮损中 IL-17 含量比空白组明显升高, 甲氨蝶呤及齐墩果酸中剂量组中 IL-17 明显下降。提示齐墩果酸可以改善银屑病样小鼠皮肤中炎症细胞的浸润及炎症因子的释放。对于机制的探讨, 本文通过对第 4 天及第 7 天的小鼠皮损中 STAT3 通路的检测, 发现在第 4 天及第 7 天, 模型组小鼠 p-STAT3 表达量较空白组均明显升高, 提示咪喹莫特能持续诱导 STAT3 通路的磷酸化。甲氨蝶呤组在两个时间点均能明显降低 p-STAT3 的表达, 齐墩果酸中剂量浓度对 p-STAT3 的抑制作用在第 4 天不显著, 在第 7 天抑制效果明显。结果提示甲氨蝶呤在疾病早期即可以发挥较好药效, 抑制 STAT3 的磷酸化, 并持续至疾病后期。而齐墩果酸发挥抑制 STAT3 通路磷酸化的作用可能是在疾病的后期, 需要体内药物浓度累积到一定程度后才能发挥明显的药效, 这可能与齐墩果酸的低溶解性及较低的口服生物利用度有关^[31]。本文验证了齐墩果酸对银屑病样小鼠的治疗作用, 对于日后应用齐墩果酸治疗银屑病提供了理论依据, 并为日后提高齐墩果酸生物利用度的剂型改良提供了研究基础。

综上所述, 持续应用齐墩果酸可以改善小鼠银屑病样皮损, 抑制角质细胞的增殖, 降低炎症细胞的浸润及炎症因子的分泌, 其机制可能与抑制 STAT3 的磷酸化, 减少炎症因子 IL-17 的分泌有关。

参考文献 (References)

[1] Armstrong A W, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and

- treatment of psoriasis: A Review [J]. JAMA, 2020, 323 (19): 1945-1960
- [2] Boehncke W H, Schon M P. Psoriasis [J]. Lancet, 2015, 386(9997): 983-994
- [3] Schon M P. Adaptive and innate immunity in psoriasis and other inflammatory disorders[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1764
- [4] Prinz I, Sandrock I, Mrowietz U. Interleukin-17 cytokines: Effectors and targets in psoriasis-A breakthrough in understanding and treatment[J]. J Exp Med, 2020, 217(1): e20191397
- [5] Li B, Huang L, Lv P, et al. The role of Th17 cells in psoriasis[J]. Immunol Res, 2020, 68(5): 296-309
- [6] Zibera L, Samec D, Mocan A, et al. Oleanolic acid alters multiple cell signaling pathways: Implication in cancer prevention and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 643
- [7] Xu H, Ge J H, Zhu L, et al. Study on quality standard of hedyotis diffusa herba[J]. Strait Pharm J, 2020, 32(10): 45-49
- [8] Ayeleso T B, Matumba M G, Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases[J]. Molecules, 2017, 22(11): 1915
- [9] Sun Y, Sun Y, Wu B Y, et al. Experimental study of oleanolic acid inducing apoptosis of hepatic carcinoma cells [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2021, 49(11): 33-37
- [10] Shi Y, Leng Y, Liu D, et al. Research advances in protective effects of ursolic acid and oleanolic acid against gastrointestinal diseases[J]. Am J Chin Med, 2021, 49(2): 413-435
- [11] Kim Y J, Lee J E, Jang H S, et al. Oleanolic acid protects the skin from particulate matter-induced aging[J]. Biomol Ther (Seoul), 2021, 29(2): 220-226
- [12] Fu H, Yen F L, Huang P H, et al. Oleanolic acid nanofibers attenuated particulate matter-induced oxidative stress in keratinocytes [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(9)
- [13] Ghosh S, Bishayee K, Khuda-Bukhsh A R. Oleanolic acid isolated from ethanolic extract of *Phytolacca decandra* induces apoptosis in A375 skin melanoma cells: drug-DNA interaction and signaling cascade[J]. J Integr Med, 2014, 12(2): 102-114
- [14] Choi J K, Oh H M, Lee S, et al. Oleanolic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 269(1): 72-80
- [15] Kim H S, Sung H Y, Kim M S, et al. Oleanolic acid suppresses resistin induction in adipocytes by modulating Tyk-STAT signaling [J]. Nutr Res, 2013, 33(2): 144-153
- [16] Cui W, Liu C X, Wang J, et al. An oleanolic acid derivative reduces denervation-induced muscle atrophy via activation of CNTF-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 861: 172612
- [17] Seifarth F G, Lax J E M, Harvey J, et al. Topical heat shock protein 70 prevents imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice [J]. Cell Stress and Chaperones, 2018, 23(5): 1129-1135
- [18] He Q, Zhang B, Hu F, et al. Triptolide inhibits the proliferation of HaCaT cells induced by IL22 via upregulating miR-181b-5p[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 2927-2935
- [19] Subedi S, Gong Y, Chen Y, et al. Infliximab and biosimilar infliximab in psoriasis: efficacy, loss of efficacy, and adverse events [J]. Drug Des Devel Ther, 2019: 132491-2502
- [20] Qie C, Jiang J, Liu W, et al. Single-cell RNA-Seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of skin macrophages in Vsr (-/-) murine psoriasis [J]. Theranostics, 2020, 10 (23): 10483-10497
- [21] Hou Y, Zhu L, Tian H, et al. IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis [J]. Protein Cell, 2018, 9(12): 1027-1038
- [22] Conrad C, Di Domizio J, Mylonas A, et al. TNF blockade induces a dysregulated type I interferon response without autoimmunity in paradoxical psoriasis[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 25
- [23] Calautti E, Avallè L, Poli V. Psoriasis: A STAT3-Centric View[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1)
- [24] Blauvelt A, Chiricozzi A. The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2018, 55(3): 379-390
- [25] Zhang S, Liu Y, Wang X, et al. Antihypertensive activity of oleanolic acid is mediated via downregulation of secretory phospholipase A2 and fatty acid synthase in spontaneously hypertensive rats [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(6): 2019-2034
- [26] Committee on psoriasis, Chinese society of dermatology. Guideline for the diagnosis and treatment of psoriasis in China (2018 complete edition)[J]. Chin J Dermatol, 2019, 52(10): 667-668
- [27] Chuang S Y, Lin C H, Sung C T, et al. Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2018, 13(6): 551-562
- [28] Singh T P, Zhang H H, Hwang S T, et al. IL-23- and imiquimod-induced models of experimental psoriasis in mice[J]. Curr Protoc Immunol, 2019, 125(1): e71
- [29] Jabeen M, Boisgard A S, Danoy A, et al. Advanced characterization of imiquimod-induced psoriasis-like mouse model[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(9): 789
- [30] Sun X, Kaufman P D. Ki-67: more than a proliferation marker[J]. Chromosoma, 2018, 127(2): 175-186
- [31] Zhang M F, Shen Y Q. Research advance on pharmacokinetics of oleanolic acid[J]. Drug Eval Res, 2017, 40(11): 1664-1670