

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250327.004

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250327.1140.008>

基于网络药理学和非靶向代谢组学探究异丁酰紫草素抗银屑病的作用机制

马悦¹, 马英兰¹, 李建光^{1,2}✉, 张露¹✉

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆第二医学院, 新疆 克拉玛依 834000)

[摘要] **目的:** 结合网络药理学和非靶向代谢组学技术探究异丁酰紫草素抗银屑病的潜在作用机制。**方法:** 通过网络药理学筛选异丁酰紫草素抗银屑病的作用靶点和通路, 并进行分子对接验证。体外以 RAW264.7 细胞和 HaCaT 细胞为研究对象, 通过脂多糖(LPS)诱导促炎性质 M1 型巨噬细胞炎症模型和白细胞介素 4(IL-4)诱导抑炎性质 M2 型巨噬细胞极化考察异丁酰紫草素的体外抗炎活性。采用 RT-qPCR 法检测 M1 型巨噬细胞中 *TNF- α* 、*iNOS*、*CXCL9*、*CXCL10* 和 M2 型巨噬细胞中 *CD206*、*TGF- β* 、*Arg-1*、*IL-10* 的表达水平; 采用 Griess 试剂法、荧光染色法检测巨噬细胞中一氧化氮、活性氧水平; 通过 Western blot 检测 JAK/STAT 信号通路相关蛋白表达水平; 采用免疫荧光法考察 p-STAT3 蛋白的核易位情况; 采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 通过白细胞介素 17A 诱导 HaCaT 细胞炎症, 检测异丁酰紫草素差异代谢物和代谢途径。**结果:** 网络药理学与分子对接结果显示异丁酰紫草素主要作用于 JAK/STAT 信号通路, 与关键靶点 STAT3 的结合能 < -5 kJ/mol, 能自发地结合。与对照组相比, 异丁酰紫草素上调了 *CD206*、*TGF- β* 、*Arg-1*、*IL-10* 的 mRNA 表达水平; 与模型组相比, 异丁酰紫草素下调了 M1 型巨噬细胞 *TNF- α* 、*iNOS*、*CXCL9*、*CXCL10* 的 mRNA 表达水平, 降低了一氧化氮、活性氧的含量, 抑制了 JAK/STAT 信号通路中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白的表达和 p-STAT3 蛋白的核易位, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。非靶向代谢组学结果提示异丁酰紫草素能通过谷胱甘肽代谢途径调节白细胞介素 17A 诱导的 HaCaT 细胞炎症水平。**结论:** 异丁酰紫草素可能通过 JAK/STAT 信号通路抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症, 可能通过谷胱甘肽代谢途径调控 HaCaT 细胞炎症。

[关键词] 异丁酰紫草素; 银屑病; 炎症; 网络药理学; 非靶向代谢组学

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)23-1823-10

Mechanism of isobutyrylshikonin against psoriasis based on network pharmacology and untargeted metabolomics

MA Yue¹, MA Yinglan¹, LI Jianguang^{1,2}✉, ZHANG Lu¹✉

(1. Pharmaceutical School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Xinjiang Second Medical College, Karamay 834000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the "Tianshan Talent" Young Science and Technology Top-Notch Talent Project (2022TSYCCX0019); Postdoctoral Science Foundation Project of Xinjiang Medical University (0103010211); the Third Batch of "Tianchi Talents" Introduction Program of the Autonomous Region-Young Doctoral Talent Project

[Author]: MA Yue, E-mail: 2260326113@qq.com.

[Correspondence to]: LI Jianguang, Ph.D., Professor, Doctoral Supervisor, E-mail: xjykd_xljg@163.com; ZHANG Lu, Ph.D., E-mail: 407005571@qq.com.

Received: 2025-01-17

Revised: 2025-03-12

JHMu, 2025;31(23):1823-1832

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[基金项目] “天山英才”青年科技拔尖人才项目(2022TSYCCX0019); 新疆医科大学博士后科学基金项目(0103010211); 自治区第三批“天池英才”引进计划-青年博士人才项目

[作者简介] 马悦, E-mail: 2260326113@qq.com。

[通讯作者] 李建光, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: xjykd_xljg@163.com; 张露, 博士, E-mail: 407005571@qq.com。

[收稿日期] 2025-01-17 **[修回日期]** 2025-03-12 **网络出版时间:** 2025-03-27 15:50:06

[Abstract] Objective: To explore the potential mechanism of isobutyrylshikonin in the treatment of psoriasis by combining network pharmacology and untargeted metabolomics techniques. **Methods:** Network pharmacology was employed to screen the targets and pathways of isobutyrylshikonin in psoriasis treatment, followed by molecular docking verification. RAW264.7 cells and HaCaT cells were used as the research objects *in vitro*. The anti-inflammatory activity of isobutyrylshikonin was investigated using a lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory model of M1 macrophages (pro-inflammatory) and an interleukin-4 (IL-4)-induced polarization model of M2 macrophages (anti-inflammatory). RT-qPCR was conducted to detect the expression of *TNF- α* , *iNOS*, *CXCL9*, *CXCL10* in M1 macrophages, and *CD206*, *TGF- β* , *Arg-1*, *IL-10* in M2 macrophages. Nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) levels in macrophages were measured by Griess reagent method and fluorescence staining method. Western blot was used to detect the expression levels of proteins related to the JAK/STAT signaling pathway. Immunofluorescence was employed to investigate the nuclear translocation of p-STAT3 protein. UPLC-Q-TOF/MS technology was utilized to detect the differential metabolites and metabolic pathways associated with isobutyrylshikonin in IL-17A-induced HaCaT cell inflammation. **Results:** Network pharmacology and molecular docking results indicated that isobutyrylshikonin mainly acts on the JAK/STAT pathway and can spontaneously bind to the key target STAT3 with a binding energy of < -5 kJ/mol. Compared to the control group, isobutyrylshikonin upregulated the mRNA expression levels of *CD206*, *TGF- β* , *Arg-1*, and *IL-10*. Compared to the model group, isobutyrylshikonin downregulated the mRNA expression levels of *TNF- α* , *iNOS*, *CXCL9*, and *CXCL10* in M1 macrophages, reduced the levels of NO and ROS, inhibited the expression of p-JAK2 and p-STAT3 proteins in the JAK/STAT signaling pathway, and suppressed the nuclear translocation of p-STAT3 protein, with statistically significant differences observed ($P < 0.05$). The results of untargeted metabolomics suggested that isobutyrylshikonin may regulate the inflammatory level of IL-17A-induced HaCaT cells through the glutathione metabolism pathway. **Conclusion:** Isobutyrylshikonin may inhibit LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through the JAK/STAT signaling pathway and regulate the inflammatory of HaCaT cells through the glutathione metabolism pathway.

[Key words] Isobutyrylshikonin; Psoriasis; Inflammation; Network pharmacology; Untargeted metabolomics

银屑病是一种由自身免疫系统功能障碍引起的慢性炎症性皮肤病,易复发且难治愈。在全球范围内,成年人银屑病的患病率大约为 0.51%~11.43%^[1]。银屑病典型的临床表现为皮肤出现红色丘疹或斑块,表面覆盖灰色或银白色的干燥鳞屑,同时伴有瘙痒和疼痛等^[2],给患者心理和生理带来双重压力,严重降低了患者的生活质量。银屑病发病机制异常复杂,多个研究显示,角质形成细胞异常增殖分化导致免疫细胞聚集浸润,反之免疫细胞的募集刺激角质形成细胞不断增殖,二者形成级联反应,导致并加剧银屑病病情^[3,4]。目前的治疗方案随着时间的推移,会出现患者依从性差、副作用明显等弊端^[5]。近年来,中医中药在银屑病治疗中表现出不良反应少、价格低廉等优势。因此,从天然药物中寻找高疗效、低毒性的银屑病治疗新药具有重要意义。

紫草是新疆紫草、紫草或内蒙紫草的干燥根,其中的萘醌类化合物是其主要活性成分,具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等多种药理活性^[6]。在银屑病治疗方面,临床已有局部应用紫草油缓解银屑病症状的案例。同时研究发现,紫草素可通过抑制 JAK/STAT 通路上蛋白的表达促进 HaCaT 细胞凋亡^[7],还可以通过诱导 M2 型巨噬细胞分化来调节巨噬细胞 M1/M2 平衡来减缓银屑病小鼠症状^[8]。异丁酰紫草素(isobutyrylshikonin, Iso)是一种天然存在

的紫草萘醌类化合物,但目前基于 Iso 治疗银屑病的药理学作用及潜在分子机制尚缺乏系统性研究。故本文借助网络药理学及分子对接技术、非靶向代谢组学技术,通过体外实验初步探究其抗炎机制,旨在为 Iso 的机制研究和临床应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购于普诺赛,人永生角质形成细胞 HaCaT 购于赛百慷。

1.2 药物与试剂

异丁酰紫草素(规格 10 mg)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)、白细胞介素 17A(interleukin 17A, IL-17A)均购于上海陶术生物(批号分别为 158860、233726、233392、234759)。JAK2 抗体(批号:T05292188)购于沈阳万类生物;STAT3、p-STAT3、p-JAK2 抗体均购于武汉赛维尔生物(批号分别为 AC240325038、AC240325124、AC240325034)。RNA 提取试剂盒(批号:7E0331K3)购于南京诺唯赞生物;RNA 逆转录试剂盒、SYBR GREEN 扩增试剂盒、RIPA 裂解液、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒均购于武汉赛维尔生物(批号分别为 MPC2305046、MPC2308003、CR2311046、MPC2402039);一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)检测试剂盒(批号 Z938240801)购于碧云天。

1.3 仪器

Multiskan GO 型全自动酶标仪; QuantStudio 1 Plus 型实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞); ND200 型核酸定量仪(基因有限公司); 电泳仪(BIO-RAD); Fusion FX 型凝胶成像仪(Vilber); Xevo G2-XSQ-TOF 四级杆飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(美国 Waters 公司)。

1.4 网络药理学与分子对接

以“isobutylshikonin”为关键词在 pharmmapper 数据库(<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)中查找 Iso 相关靶点,以“psoriasis”为关键词在 genecards 数据库(<https://www.genecards.org>)中查找银屑病相关靶点,将二者交集靶点导入 string 数据库(<https://cn.string-db.org>)中进行 PPI 分析并利用 cytoscape 软件进行可视化处理。交集靶点导入 metascape 数据库(<https://metascape.org>)中进行 KEGG 通路富集分析。PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>)下载核心靶点蛋白 STAT3 SDF 格式文件, pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载 Iso MOL2 格式文件, autodock 与 pymol 软件进行分子对接和可视化分析,以显示 Iso 与 STAT3 蛋白的相互作用力。

1.5 细胞培养

细胞专用培养基培养 25 代以内的 HaCaT 细胞和巨噬细胞,置于含 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养,待细胞长至 80% 左右时进行传代处理,进行后

续实验。

1.6 CCK-8 检测 Iso 的细胞毒性作用

巨噬细胞和 HaCaT 细胞以 8 000 个/孔接种于 96 孔板中,细胞贴壁后,分为空白组、对照组、系列浓度 Iso 组。培养巨噬细胞 Iso 系列浓度:1、2、5、10、15、20 μmol/mL,培养 HaCaT 细胞 Iso 系列浓度:1、2、3、4、5、7.5、10、15 μmol/mL。两种细胞分别培养 24 h 和 48 h 不同时间后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,避光孵育 1 h,450 nm 处检测吸光度值计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.7 RT-qPCR 检测 M1、M2 型巨噬细胞炎症相关因子 mRNA 的表达及 M1 型巨噬细胞形态观察

细胞分为对照组、模型组(500 ng/mL LPS)、低剂量组(500 ng/mL LPS + 2 μmol/L Iso)、高剂量组(500 ng/mL LPS + 5 μmol/L Iso),于 6 孔板中培养 48 h 后拍照观察各组细胞形态学改变情况。提取细胞总 RNA,以 β-actin 为内参计算 M1 型巨噬细胞内 TNF-α、iNOS、CXCL9、CXCL10 的 mRNA 表达水平。

细胞分为对照组、模型组(50 ng/mL IL-4)、低剂量组(50 ng/mL IL-4 + 2 μmol/L Iso)、高剂量组(50 ng/mL IL-4 + 5 μmol/L Iso),于六孔板中培养 48 h 后提取细胞总 RNA,以 β-actin 为内参计算 M2 型巨噬细胞内 CD206、TGF-β、Arg-1、IL-10 的 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequence

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
TNF-α	TCCAGTGTGCTCCTTCCGAAGT	TGCCTCCGCCAGAAGCTGTA
iNOS	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG
CXCL9	AATCCCTCAAAGACCTCAAACA	TCCCATTCTTTTCATCAGCTTCT
CXCL10	CAACTGCATCCATATCGATGAC	GATTCCGGATTTCAGACATCTCT
CD206	CAAGGAAGGTTGGCATTGT	CCTTTCAGTCCTTTTGCAAGC
TGF-β	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
Arg-1	AAGAATGGAAGAGTCAGTGTGG	GGGAGTGTTGATGTGTCAGTGTG
IL-10	GCCTTATCGGAAATGATCCA	AGGGGAGAAATCGATGACAG
β-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1.8 M1 型巨噬细胞中 NO、ROS 含量的测定

细胞分为对照组、模型组(500 ng/mL LPS)、低剂量组(500 ng/mL LPS + 2.5 μmol/L Iso)、中剂量组(500 ng/mL LPS + 5 μmol/L Iso)、高剂量组(500 ng/mL LPS + 10 μmol/L Iso)。于 96 孔板中培养 24 h 后每孔取 50 μL 细胞培养基上清于另一 96 孔板中,加入 NO 检测试剂避光孵育 30 min,450 nm

处检测每孔吸光度值,计算每组细胞 NO 含量。

接着向每孔中加入 100 μL 完全培养基配制的 DCFH-DA 工作液(稀释比 1:1 000),避光孵育 45 min 后,PBS 洗涤 3 次,加入 100 μL PBS 防止细胞风干。荧光酶标仪设置激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm,根据荧光强度值计算每组细胞 ROS 含量。

1.9 Western blot检测M1型巨噬细胞JAK/STAT信号通路相关蛋白的表达

按“1.8”进行细胞分组给药,于6孔板中培养24 h后提取细胞总蛋白,电泳分离蛋白后转至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温下封闭1 h。JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3一抗(稀释比为1:1 000、1:1 000、1:500、1:1 500)4℃孵育过夜,二抗(稀释比均为1:3 000)室温孵育1 h,显影。以 β -actin为内参分析各组蛋白灰度值。

1.10 免疫荧光检测M1型巨噬细胞p-STAT3蛋白的核易位

按“1.8”进行细胞分组给药,于12孔板中培养24 h后用4%多聚甲醛固定30 min,0.5% Triton X-100通透15 min,10%山羊血清封闭1 h后,加入p-STAT3一抗(稀释比为1:1 000)4℃孵育过夜,二抗(稀释比为1:400)室温孵育1 h。每孔加入100 μ L含DAPI封片剂,荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.11 非靶向代谢组学分析Iso差异代谢物和代谢途径

1.11.1 样品制备 HaCaT细胞分为对照组、模型组(25 ng/mL IL-17A)、给药组(25 ng/mL IL-17A + 3 μ mol/L Iso)。于10 cm皿中培养48 h后用预冷的80%乙腈水刮取细胞,置于EP管中氮吹。检测时加入100 μ L 50%乙腈水复溶,14 000 r/min,4℃离心20 min,取上清检测。

1.11.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm,1.7 μ m),进样量:5 μ L,柱温:35℃,流速:0.4 mL/min。流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)。洗脱梯度:0~0.5 min,2%~7% B;0.5~15 min,7%~40% B;15~22 min,40%~67% B;22~25 min,67%~100% B;25~40 min,100%~2% B。

1.11.3 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI),灵敏度模式下,分别采用正、负离子检测模式。扫描质核比(m/z)范围:50~1 200;毛细管电压:3.0 kV;锥孔电压:20 V;锥孔气流速:50 L/h;脱溶剂气流速:900 L/h;脱溶剂气温度:350℃;碰撞气流速:0.2 mL/min;离子源温度:120℃。采用亮氨酸-脑啡肽 $[M+H]^+m/z$ 为556.277 1、 $[M+H]^-m/z$ 为554.261 5作为校正标准液,对仪器进行实时校正。

1.11.4 数据处理 根据UPLC-Q-TOF/MS检测到的化合物精确分子质量,采用质量偏差小于10 ppm和二级质谱匹配方式,检索HMDB数据库对物质进行定性分析。在正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis,

OPLS-DA)模型下,以变量重要性投影(VIP) ≥ 1 , $P < 0.05$,倍数变化(Fold Change) ≥ 1.5 为筛选标准,通过MetaboAnalyst在线平台进行差异代谢途径分析。

1.12 统计学处理

Graphpad Prism 9.5软件进行统计学分析,多组间比较采用one-way ANOVA单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学及分子对接

pharmmapper数据库中查找到Iso作用靶点285个,genecards数据库查找到银屑病作用靶点4 681个,韦恩图得二者交集靶点150个,作PPI网络分析。KEGG富集分析显示Iso发挥抗银屑病活性主要集中在JAK/STAT信号通路。分子对接显示Iso与STAT3蛋白的结合能为-5.6 kJ/mol,具有较强的结合活性。见图1。

2.2 Iso干预巨噬细胞和HaCaT细胞的安全剂量

Iso对巨噬细胞和HaCaT细胞具增殖抑制作用,根据细胞存活率,后续实验使用2.5 μ mol/L Iso培养巨噬细胞48 h,2.5、5、10 μ mol/L Iso培养巨噬细胞24 h,3 μ mol/L Iso培养HaCaT细胞48 h。见图2。

2.3 Iso对M1、M2型巨噬细胞炎症相关因子mRNA表达的影响

采用LPS诱导巨噬细胞极化为M1型促炎巨噬细胞。与对照组相比,模型组*TNF- α* 、*iNOS*、*CXCL9*、*CXCL10*的mRNA表达水平明显提高。与模型组相比,Iso下调了*TNF- α* 、*iNOS*、*CXCL9*、*CXCL10*的mRNA表达水平。见图3。通过形态学观察,LPS诱导的模型组M1型巨噬细胞呈纺锤形,Iso干预后,M1型巨噬细胞数量减少。见图4。

采用IL-4诱导巨噬细胞极化为M2型抑炎巨噬细胞。与对照组相比,模型组*CD206*、*TGF- β* 、*Arg-1*、*IL-10*的mRNA表达提高($P < 0.05$);Iso低剂量组*CD206*、*TGF- β* 、*Arg-1*、*IL-10*的mRNA表达水平上调不明显;Iso高剂量组*CD206*、*TGF- β* 、*Arg-1*、*IL-10*的mRNA表达水平明显上调($P < 0.05$)。见图5。

2.4 Iso对M1型巨噬细胞NO、ROS含量的影响

NO和ROS通过激活炎症信号通路、促进炎症细胞因子的表达和释放、调节细胞凋亡等多种机制,共同调控M1型巨噬细胞的促炎功能。检测结果显示,与对照组相比,模型组NO和ROS含量明显增加($P < 0.000 1$)。与模型组相比,Iso低、中、高剂量组NO和ROS的含量降低呈浓度依赖性($P < 0.000 1$)。见图6。

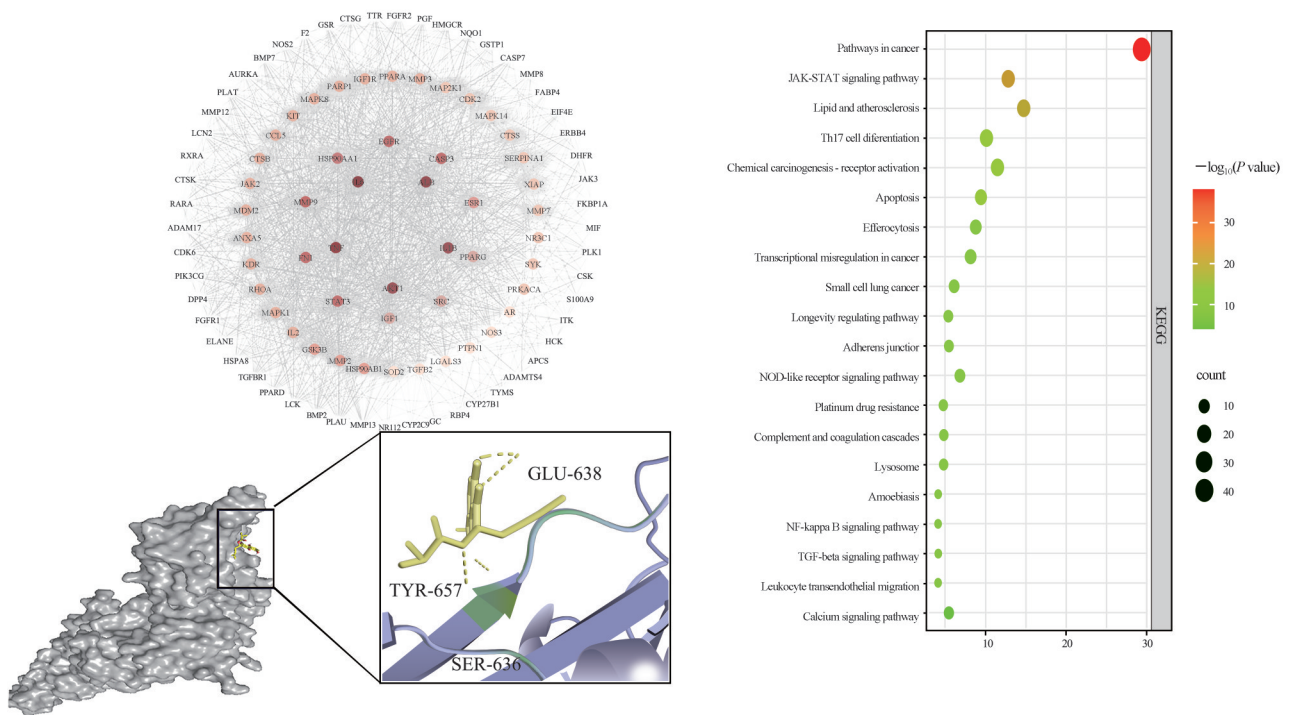
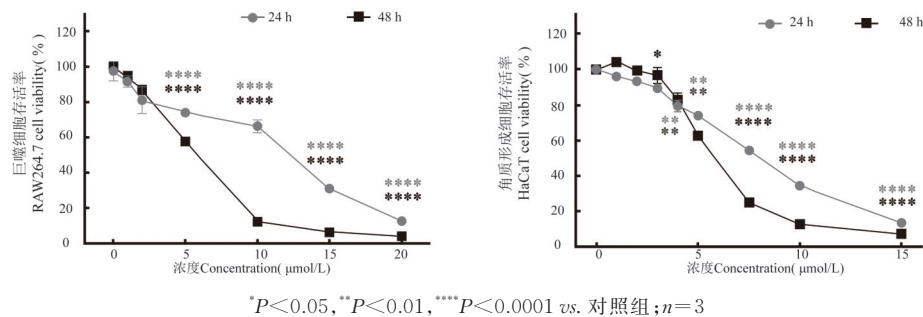


图1 网络药理学与分子对接

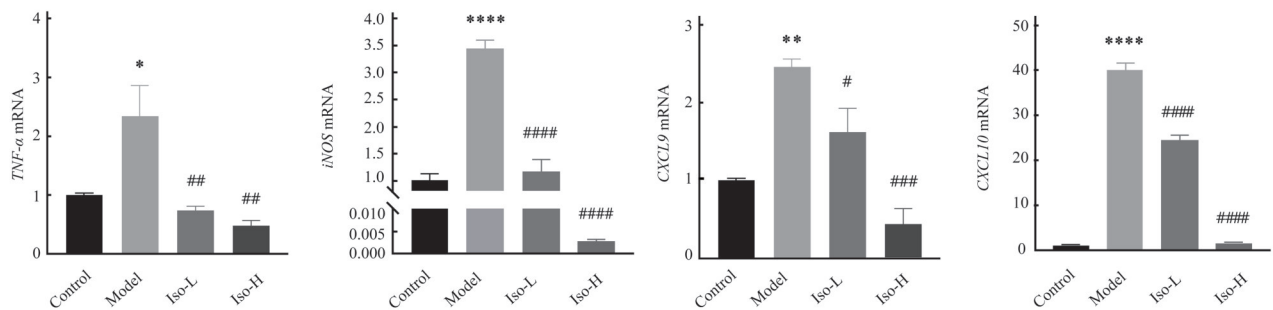
Fig 1 Network pharmacology and molecular docking



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. 对照组; $n = 3$

图2 Iso对巨噬细胞和HaCaT细胞存活率的影响

Fig 2 Effect of Iso on the viability of RAW264.7 cells and HaCaT cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs. 对照组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs. 模型组; $n = 3$

图3 Iso对M1型巨噬细胞中*TNF-α*、*iNOS*、*CXCL9*、*CXCL10* mRNA表达水平的影响

Fig 3 Effects of Iso on mRNA expressions level of *TNF-α*, *iNOS*, *CXCL9*, *CXCL10* in M1 macrophages

2.5 Iso对M1型巨噬细胞JAK/STAT信号通路相关蛋白表达的影响

网络药理学结果提示, Iso作用途径可能与

JAK/STAT信号通路相关。采用Western blot考察Iso对JAK/STAT信号通路相关蛋白表达水平的影响。与模型组相比, Iso低、中、高剂量组呈浓度依赖

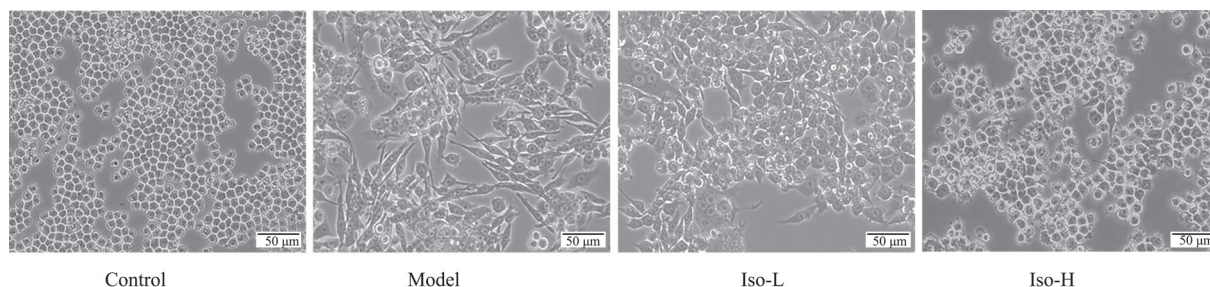


图4 细胞形态的变化(200×)

Fig 4 Changes in cell morphology (200×)

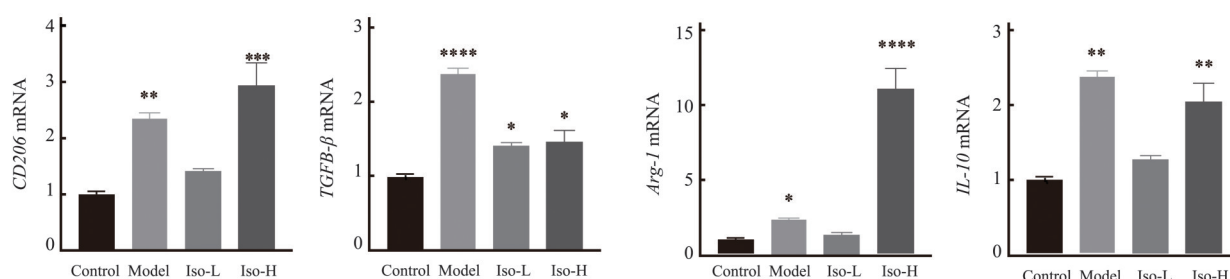
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; $n = 3$

图5 Iso对M2型巨噬细胞中CD206、TGF-β、Arg-1、IL-10 mRNA表达水平的影响

Fig 5 Effects of Iso on mRNA expression levels of CD206, TGF-β, Arg-1, and IL-10 in M2 macrophages

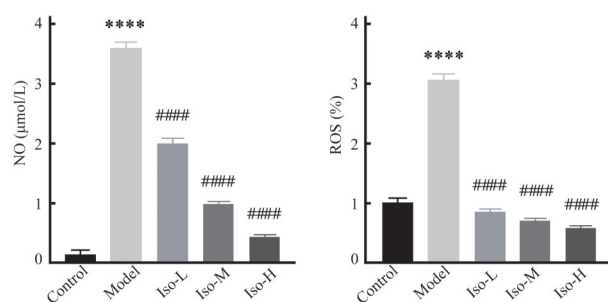
与对照组相比, **** $P < 0.0001$; 与模型组相比, #### $P < 0.0001$; $n = 3$

图6 Iso对巨噬细胞中NO和ROS含量的影响

Fig 6 Effect of Iso on NO and ROS content in macrophages

性地抑制p-JAK2、p-STAT3蛋白的表达($P < 0.05$), 表明Iso抑制了JAK/STAT信号通路的激活。见图7。

2.6 Iso对M1型巨噬细胞p-STAT3蛋白核易位的影响

p-STAT3易位至细胞核后激活下游炎症基因的转录, 进一步采用免疫荧光法考察Iso对p-STAT3蛋白核易位的影响。与对照组相比, 模型组绿色荧光面积和强度增加。与模型组相比, Iso中剂量组绿色荧光面积和强度明显减少。见图8。

2.7 非靶向代谢组学分析Iso的差异代谢途径

主成分分析(principal component analysis, PCA)显示, 正离子模式下, 各组细胞代谢物对应的散点

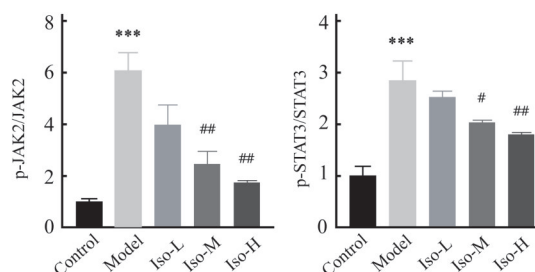
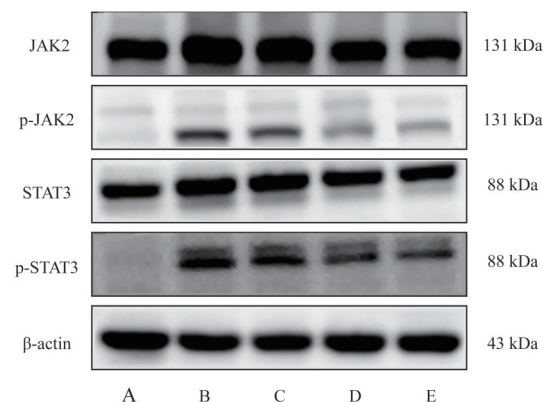
A: 对照组; B: 模型组; C: Iso-L组; D: Iso-M组; E: Iso-H组; 与对照组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 3$

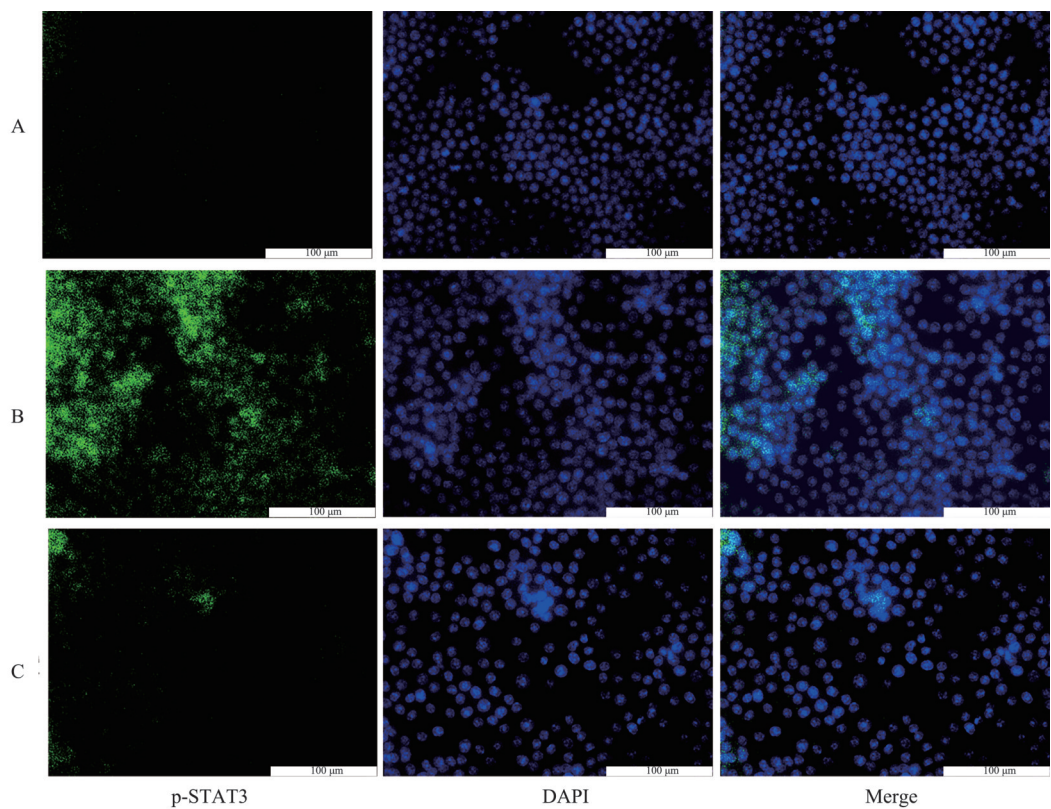
图7 Iso对JAK/STAT信号通路相关蛋白表达的影响

Fig 7 Effects of Iso on the expression of JAK/STAT signaling pathway-related proteins

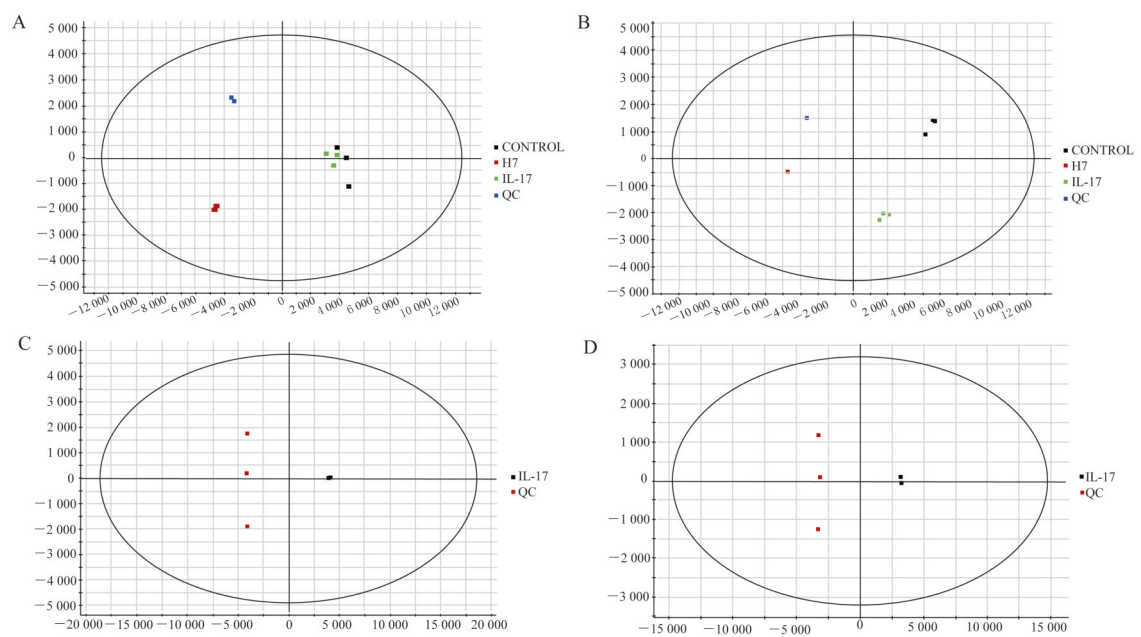
组内相互聚集, 一致性较高。组间比较, 对照组和模型组散点无明显区分, Iso组与模型组具有良好的

区分度,表明 Iso 影响了细胞代谢。见图 9A。负离子模式下,各组代谢物组内聚集,组间有明显的区分度。见图 9B。利用 OPLS-DA 筛选 Iso 组与模型

组之间的差异代谢物,正、负离子模式下两组间具有明显区分。见图 9C、D。



A: 对照组; B: 模型组; C: Iso-M 组
图 8 p-STAT3 蛋白的核易位 (200×)
Fig 8 Nuclear localization of p-STAT3 protein (200×)



A: 正离子模式下 PCA 分析; B: 负离子模式下 PCA 分析; C: 正离子模式下 OPLS-DA 分析; D: 负离子模式下 OPLS-DA 分析
图 9 正、负离子模式下 PCA 与 OPLS-DA 分析
Fig 9 PCA and OPLS-DA analysis in positive and negative ion modes

结合 HMDB 数据库筛选出模型组与 Iso 组之间内源性差异代谢物共 146 个。代谢途径图显示, Iso 的代谢主要涉及精氨酸和脯氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、精氨酸的生物合成、丙氨酸天冬氨酸和谷氨酸代谢等途径。通过对以上 4 条代谢途径相关代谢物

的峰面积进行分析发现,与对照组相比,模型组氧化脯氨酸、脯氨酸、羟基谷氨酸半醛、磷酸肌酸、 α -酮戊二酸和天冬氨酸的峰面积下降。给予 Iso 干预后,上述 6 个代谢物的峰面积明显提升。见图 10。

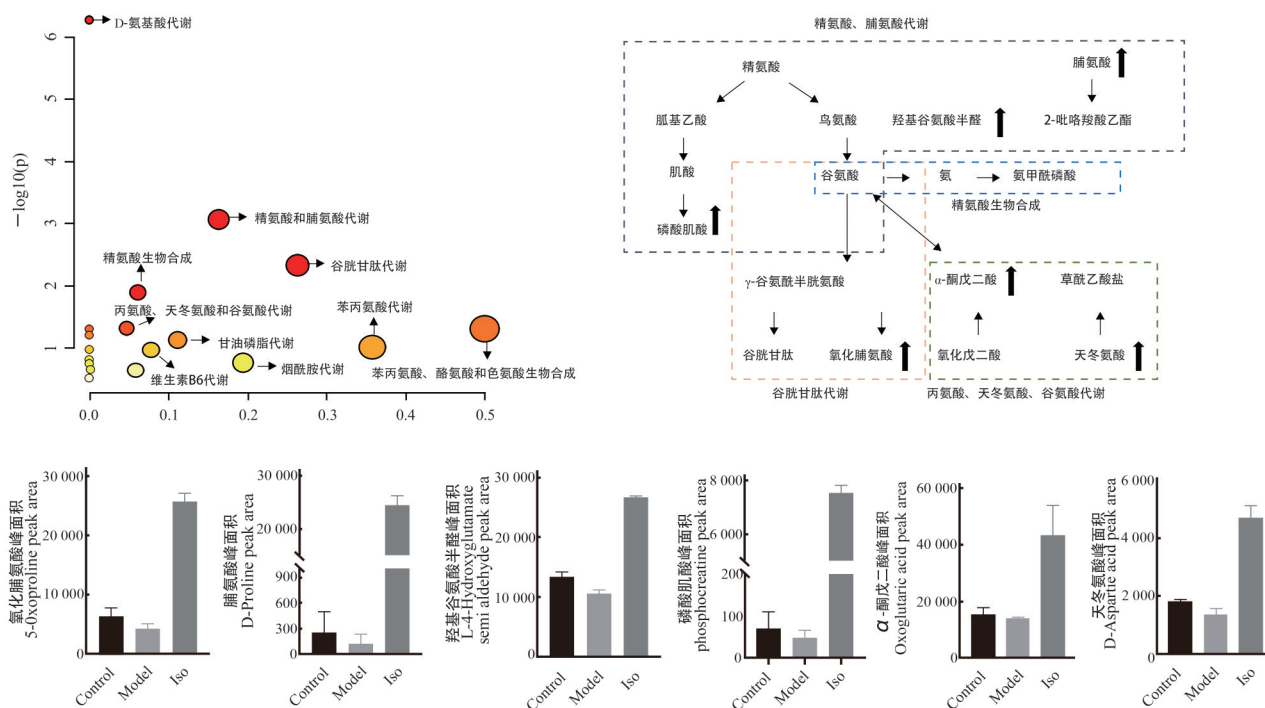


图 10 差异代谢物代谢通路和变化趋势

Fig 10 Differential metabolite metabolism pathway and trends

3 讨论

银屑病的病理生理机制复杂,影响因素众多,其中免疫炎症反应是重要机制之一,巨噬细胞作为免疫细胞之一极为重要。TNF- α 是 M1 型巨噬细胞分泌的核心促炎因子^[9],CXCL9/10 刺激 Th1 细胞分泌 TNF- α ,促进巨噬细胞向 M1 型极化,诱导角质形成细胞异常增殖和分化,进一步释放 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子^[10]。M2 型巨噬细胞通过分泌 Arg-1、TGF- β 、IL-10,发挥 M2 型巨噬细胞抗炎和组织修复的功能^[11]。M1 型巨噬细胞在活化状态下,高表达 iNOS 催化 L-精氨酸生成 NO^[12],同时通过 NADPH 氧化酶等途径产生大量 ROS 导致氧化应激^[13]。NO 可以与 ROS 反应生成过氧亚硝酸盐,后者具有更强的氧化和硝化能力,能够导致更严重的细胞损伤^[14]。本研究证实, Iso 通过下调 M1 型巨噬细胞分泌的 TNF- α 、iNOS、CXCL9、CXCL10 的表达水平,上调 M2 型巨噬细胞 TGF- β 、Arg-1、IL-10、CD206 的表达水平,并通过抑制 NO、ROS 的释放发挥抗炎活性。

JAK/STAT 信号通路是细胞因子信号传导的关键通路之一,在银屑病中通过调节炎症反应和细胞增殖推动疾病进展。STAT3 通过诱导 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达,促进 Th17 细胞分化,放大炎症反应^[15],还可通过上调抗凋亡蛋白的表达,抑制角质形成细胞的凋亡,导致银屑病典型的表皮增厚和鳞屑形成^[16]。研究发现,IFN- γ 与其受体结合后,激活 JAK2/STAT1 信号通路,诱导巨噬细胞向 M1 型极化^[17]。AMPK 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路,减弱 M1 型巨噬细胞的极化,从而减轻炎症反应^[18]。本研究表明, Iso 通过下调 p-JAK2、p-STAT3 的表达,抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活,调节巨噬细胞向 M1 型极化,从而发挥抑制炎症的活性作用。

谷胱甘肽是细胞内最重要的抗氧化剂之一,在银屑病中通过调节氧化应激和炎症反应参与疾病的病理过程。TNF- α 的异常分泌会诱导角质形成细胞和成纤维细胞释放大量 ROS^[19],ROS 通过激活 NF- κ B 等信号通路促进炎症因子的释放^[20],形成正

反馈循环。ROS的增加诱导谷胱甘肽代谢途径的激活^[21],谷胱甘肽通过清除ROS,抑制NF-κB等信号通路的激活,减少促炎因子的表达,从而打破炎症与氧化应激的恶性循环。非靶向代谢组学结果提示,Iso可能通过调控谷胱甘肽代谢通路,减少ROS的生成来改善氧化应激和炎症水平,进而发挥其抗银屑病炎症的潜在作用活性。

非靶向代谢组学结果进一步提示,精氨酸脯氨酸代谢、精氨酸生物合成和丙氨酸天冬氨酸谷氨酸代谢这3条代谢途径也与Iso发挥抗银屑病炎症作用有关。精氨酸通过iNOS生成NO和瓜氨酸,NO在银屑病中加剧炎症反应^[22],瓜氨酸进一步转化为谷氨酸,通过激活其受体促进角质形成细胞增殖和炎症反应^[23]。精氨酸还可通过鸟氨酸转化为多胺和脯氨酸,多胺在细胞增殖中起关键作用,而脯氨酸是胶原蛋白的主要成分,其代谢异常可能导致皮肤结构改变和屏障功能受损^[24,25]。丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸则参与能量代谢和核苷酸合成,其代谢异常可能影响细胞的能量供应和增殖,进一步加剧银屑病的病理过程^[26]。

综上所述,Iso能够降低LPS诱导的巨噬细胞炎症水平,其作用机制可能与抑制JAK/STAT信号通路激活、调节谷胱甘肽代谢通路有关。Iso具有明显的体外抗银屑病炎症得作用活性,需进行体内实验进一步明确其抗银屑病的药效活性作用。

作者贡献度说明:

马悦:实验实施、文章撰写;马英兰:部分实验结果图的制作;李建光:文章审阅;张露:实验设计及文章修改、校对。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Wei L, Chen S, Zhang Z, et al. Prevalence of tobacco smoking and its association with disease severity among patients with psoriasis in China: A cross-sectional study [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 883458.
- Tang L, Li T, Zhang B, et al. Punicalagin alleviates psoriasis by inhibiting NF-κB-mediated IL-1β transcription and Caspase-1-regulated IL-1β secretion [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 817526.
- Chen R, Zhai YY, Sun L, et al. Alantolactone-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles suppress psoriasis by deactivating STAT3 pathway and restricting immune cell recruitment [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2022, 17 (2): 268-283.
- Chen Y, Lian P, Peng Z, et al. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist alleviates psoriasis-like inflammation through inhibition of the STAT3 and NF-κB signaling pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 (1): 141.
- 刘柳, 孙晓颖, 莫美, 等. 中医药临床优势病种探讨—银屑病 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(5): 260-268. Liu L, Sun XY, Mo M, et al. Clinical diseases responding specially to TCM treatment: Psoriasis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2025, 31 (5): 260-268.
- Le TT, Kang TK, Lee WB, et al. Antiallergic effects of N,N-dicoumaroylspermidine isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on mast cells and ovalbumin-induced allergic rhinitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10403.
- 曾楚若, 莫征波, 徐毅. 中药单体紫草素介导 JAK/STATs 信号通路对银屑病细胞生物学活性的作用机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(12): 3023-3027. Zeng CR, Mo ZB, Xu Y. The mechanism of action of the traditional Chinese medicine monomer shikonin in mediating the JAK/STATs signaling pathway on the biological activity of psoriasis cells [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(12): 3023-3027.
- 陶庭俊. 紫草素调节巨噬细胞 M1/M2 平衡及对银屑病小鼠的治疗作用 [D]. 广东: 广州中医药大学, 2023. Tao TJ. Regulation of macrophage M1/M2 balance by shikonin and its therapeutic effect on mice with psoriasis [D]. Guangdong: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2023.
- Diez-Fuertes F, López-Huertas MR, García-Pérez J, et al. Transcriptomic evidence of the immune response activation in individuals with limb girdle muscular dystrophy dominant 2 (LGMD2) contributes to resistance to HIV-1 infection [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 839813.
- Weng YS, Tseng HY, Chen YA, et al. MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18 (1): 42.
- Liu B, Zhang Y, Yang Z, et al. ω-3 DPA protected neurons from neuroinflammation by balancing microglia M1/M2 polarizations through inhibiting NF-κB/MAPK p38 signaling and activating neuron-BDNF-PI3K/AKT pathways [J]. *Mar Drugs*, 2021, 19(11): 587.
- John V, Kotze LA, Ribechini E, et al. Caveolin-1 controls vesicular TLR2 expression, p38 signaling and T cell suppression in BCG infected murine monocytic myeloid-derived suppressor cells [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2826.
- Choi JY, Byeon HW, Park SO, et al. Inhibition of

- NADPH oxidase 2 enhances resistance to viral neuroinflammation by facilitating M1-polarization of macrophages at the extraneural tissues[J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1):115.
- 14 Sze SCW, Zhang L, Zhang S, et al. Aberrant transferrin and ferritin upregulation elicits iron accumulation and oxidative inflammation causing ferroptosis and undermines estradiol biosynthesis in aging rat ovaries by upregulating NF- κ B-activated inducible nitric oxide synthase: First demonstration of an intricate mechanism[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12689.
 - 15 Shen J, Yang L, You K, et al. Indole-3-acetic acid alters intestinal microbiota and alleviates ankylosing spondylitis in mice[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 762580.
 - 16 Ding H, Yu X, Yan Z. Ailanthone suppresses the activity of human colorectal cancer cells through the STAT3 signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(2): 21.
 - 17 Pormohammad A, Hansen D, Turner RJ. Antibacterial, antibiofilm, and antioxidant activity of 15 different plant-based natural compounds in comparison with ciprofloxacin and gentamicin[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(8): 1099.
 - 18 Lei J, Shu Z, Zhu H, et al. AMPK regulates M1 macrophage polarization through the JAK2/STAT3 signaling pathway to attenuate airway inflammation in obesity-related asthma[J]. *Inflammation*, 2025, 48(1): 372-392.
 - 19 Wang WM, Jin HZ. Role of neutrophils in psoriasis[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020(3): 1-6.
 - 20 Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363-383.
 - 21 Liu W, Jiang J, Li Z, et al. Energy competition remodels the metabolic glucose landscape of psoriatic epidermal cells[J]. *Theranostics*, 2024, 14(8): 3339-3357.
 - 22 Chen J, Li X, Wang H, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in psoriasis: Implications for inflammation and angiogenesis[J]. *Br J Dermatol*, 2021, 184(3): 456-464.
 - 23 Lee DE, Kim HJ, Kim JH, et al. Glutamate signaling in psoriasis: A potential therapeutic target[J]. *Exp Dermatol*, 2021, 30(5): 678-685.
 - 24 Kim HK, Lee JH, Park SH, et al. Arginase 1 overexpression in psoriasis promotes keratinocyte proliferation via polyamine synthesis[J]. *J Dermatol Sci*, 2020, 98(2): 89-97.
 - 25 Zhang X, Wang Y, Li J, et al. Proline metabolism in psoriasis: A link to collagen synthesis and skin barrier dysfunction[J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139(8): 1725-1734.
 - 26 Wang Y, Chen L, Liu S, et al. Metabolic profiling reveals altered amino acid metabolism in psoriasis[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2022, 36(4): 567-575.

[本文编辑] 朱金月