

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250509.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250509.1032.002>

复方茵陈蒿汤通过 TRPV3/TLR2/NF- κ B 信号通路抑制痤疮丙酸杆菌诱导的皮肤炎症的机制研究

江雪冰, 张文宪, 李怀军, 张雪冰, 刘成祥, 战晶玉✉

(黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**探讨复方茵陈蒿汤通过调控 TRPV3/TLR2/NF- κ B 信号通路对痤疮丙酸杆菌诱导的巨噬细胞炎症反应的影响, 阐明其治疗痤疮的作用机制。 **方法:**采用肽聚糖刺激巨噬细胞构建痤疮丙酸杆菌感染的体外细胞模型, 分别予以复方茵陈蒿汤或异维 A 酸干预治疗。检测各组细胞一氧化氮(NO)生成量、炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、COX2)水平及氧化应激指标(SOD、MDA、ROS); 通过蛋白质印迹法(Western blot)和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测 TRPV3/TLR2/NF- κ B 通路关键分子表达。 **结论:**与模型组比较, 复方茵陈蒿汤能够显著抑制巨噬细胞中 NO 的生成, 降低 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、COX2、MDA 的含量, 抑制 ROS 的荧光强度, 和增加 SOD 的活力, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。Western blot 与 RT-qPCR 结果显示, 复方茵陈蒿汤还能显著下调巨噬细胞 TRPV3 蛋白和 mRNA 的表达, 抑制 TLR2 和 p-I κ B α 蛋白的表达, 降低 p-IKK β /IKK β 和 p-p65/p65 的比值, 上调 I κ B α 蛋白的表达, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 亚细胞定位分析表明, 复方茵陈蒿汤可增加细胞质 p-p65 蛋白表达, 同时降低核内 p-p65 水平, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论:**复方茵陈蒿汤可通过抑制 TRPV3/TLR2/NF- κ B 信号通路活化调控氧化应激与炎症反应, 从而发挥抗痤疮作用。

[关键词] 复方茵陈蒿汤; 痤疮丙酸杆菌; 巨噬细胞; TRPV3/TLR2/NF- κ B 通路; 氧化应激; 炎症反应

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)19-1494-08

Fufang Yinchenhao Decoction inhibits *Cutibacterium acnes*-induced skin inflammation via TRPV3/TLR2/NF- κ B signaling pathway

JIANG Xuebing, ZHANG Wenxian, LI Huaijun, ZHANG Xuebing, LIU Chengxiang, ZHAN Jingyu✉

(Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Traditional Chinese Medicine Research Project of Heilongjiang Province (ZHY2023-110)

[Author]: JIANG Xuebing, E-mail: 3651298901@qq.com.

[Correspondence to]: ZHAN Jingyu, Associate Chief Physician, E-mail: 18945000248@163.com.

Received: 2024-12-28

Revised: 2025-04-17

JHMu, 2025;31(19):1494-1501

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Fufang Yinchenhao Decoction on *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)-induced inflammatory response in macrophages by regulating the TRPV3/TLR2/NF- κ B signaling pathway, and to elucidate its mechanism in treating acne. **Methods:** An in vitro cell model of *C. acnes* infection was established by stimulating macrophages with peptidoglycan, which was then treated with Fufang Yinchenhao Decoction or isotretinoin. The levels of nitric oxide (NO), inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , iNOS, and COX2), and oxidative stress markers (SOD, MDA, and ROS) were measured. The expression of key molecules in the TRPV3/TLR2/NF- κ B pathway was detected using Western blot and RT-qPCR. **Results:** Compared to the model group, Fufang Yinchenhao Decoction significantly inhibited the production of NO in macrophages, reduced the levels of TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX2, and MDA, suppressed the fluorescence intensity of ROS, and enhanced the activity of SOD,

[基金项目] 黑龙江省中医药科研项目(ZHY2023-110)

[作者简介] 江雪冰, E-mail: 3651298901@qq.com。

[通讯作者] 战晶玉, 副主任医师, E-mail: 18945000248@163.com。

[收稿日期] 2024-12-28

[修回日期] 2025-04-17

网络出版时间: 2025-05-09 14:28:27

with all differences being statistically significant ($P < 0.01$). Western blot and RT-qPCR results further demonstrated that Fufang Yinchenhao Decoction significantly downregulated the expression of TRPV3 protein and mRNA, inhibited the expression of TLR2 and p-I κ B α proteins, decreased the ratios of p-IKK β /IKK β and p-p65/p65, and upregulated the expression of I κ B α protein, with all differences showing statistical significance ($P < 0.01$). Subcellular localization analysis revealed that Fufang Yinchenhao Decoction increased the expression of cytoplasmic p-p65 while reducing the level of nuclear p-p65, with both changes being statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** By inhibiting the activation of the TRPV3/TLR2/NF- κ B signaling pathway and regulating oxidative stress and inflammatory responses, Fufang Yinchenhao Decoction exerts its anti-acne effects.

[Key words] Fufang Yinchenhao Decoction; *Cutibacterium acnes*; Macrophages; TRPV3/TLR2/NF- κ B pathway; Oxidative stress; Inflammatory response

痤疮是一种常见的慢性毛囊皮脂腺炎症性疾病,以皮脂腺丰富的区域(如面部及胸背部)的粉刺、炎性丘疹、脓疱和结节为主要表现^[1]。作为全球第八大常见疾病,痤疮的发病率约为9.4%,其中青少年和年轻人的患病率最高^[2]。痤疮的发病机制涉及多种因素,目前多认为与皮脂分泌过多、痤疮丙酸杆菌(*Cutibacterium acnes*, *C. acnes*)细菌的过度增殖、毛囊角化异常和炎症反应相关^[3]。炎症反应作为痤疮发生、发展的核心环节,然而深入机制有待进一步阐明。

巨噬细胞作为先天免疫系统的重要成员,在痤疮的炎症启动、放大及消退中均发挥关键作用^[4]。生理条件下,巨噬细胞通过清除细胞碎片、吞噬皮脂、分泌细胞因子来维持组织稳态。当组织损伤后,*C. acnes*及受损细胞释放的白介素8(IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1、趋化因子配体10等趋化因子,吸引单核细胞从血液迁移至毛囊周围,分化为巨噬细胞。激活的巨噬细胞还通过分泌IL-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α),进一步招募中性粒细胞、Th17细胞等,形成炎症浸润^[5]。中医药已被证实改善巨噬细胞介导的痤疮炎症方面具有一定的优势^[6]。复方茵陈蒿汤为治疗寻常型痤疮的经验方,具有清热解毒、凉血散瘀、燥湿排脓功效,临床疗效显著^[7,8]。肽聚糖为*C. acnes*的细胞壁的重要组成部分,本研究通过肽聚糖诱导巨噬细胞模拟*C. acnes*痤疮细胞模型,通过观察复方茵陈蒿汤对巨噬细胞瞬时受体电位香草酸亚型3(TRPV3)/Toll样受体2(TLR2)/核因子- κ B(NF- κ B)信号通路的影响,从而阐明其治疗痤疮的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞Raw264.7购于中国典型培养物保藏中心(货号:GDC0143)。Raw264.7细胞在90% DMEM基础培养基+10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素溶液的培养基中培养。培养基置于含5% CO₂的37℃恒温细胞培养箱

中。当细胞处于对数生长期时,进行后续实验。本研究经黑龙江省中医药科学院实验动物伦理委员会批准(编号:SY3R-2023008)。

1.2 试剂

复方茵陈蒿汤(由茵陈30 g、蒲公英30 g、白花蛇舌草30 g、防风15 g、黄芩15 g、栀子15 g、黄连10 g、丹皮15 g、紫花地丁10 g、苦参20 g、菊花20 g、生地20 g、赤芍20 g、浙贝母20 g组成)购于北京同仁堂哈尔滨大药房有限公司。所有药物先浸泡60 min,随后经煎煮、滤过、浓缩后制成浓缩液溶液备用。异维A酸(Isotretinoin,又名13-cis-Retinoic acid)购于美国MedChemExpress公司(货号:HY-15127)。细胞核和细胞质提取试剂购于美国Thermo Fisher公司(货号:78833)。一氧化氮(NO)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所(货号:A013-2-1)。TNF- α 、IL-1 β 和诱导型NO合酶(iNOS)检测试剂盒购于上海江莱生物科技有限公司(货号:JL10484、JL18442、JL20675)。小鼠环氧合酶2(COX2)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购于英国Abcam公司(货号:ab210574)。活性氧(ROS)检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司(货号:S0035S)。丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)购于江苏酶免实业有限公司(货号:20111016R、20111011R)。兔抗TRPV3、NF- κ B p65、Phospho-NF- κ B p65(Ser536)和Histone H3一抗购于美国Cell Signaling Technology公司(货号:3484、8242、3033、9715)。兔抗TLR2、I κ B α 、Phospho-I κ B α (Ser32/36)、 β -actin一抗和HRP标记的山羊抗兔二抗购于武汉Proteintech公司(货号:66645-1-Ig、10268-1-AP、82349-1-RR、66009-1-Ig、SA00001-2)。兔抗IKK β 和p-IKK α / β (Ser176/180)一抗购于北京百奥莱博科技有限公司(货号:YT808、YT809)。SuperSignal™ West Pico PLUS化学发光底物购于美国Thermo Fisher公司(货号:34580)。BCA蛋白法含量测试盒购于上海酶联生物科技有限公司(货号:ml076982)。

1.3 含药血清制备

Sprague-Dawley大鼠适应性饲养1周后按照体质量随机分为空白对照组与复方茵陈蒿汤低、中与高剂量组,每组各5只。根据人与动物等效剂量换算,复方茵陈蒿汤低、中、高剂量组分别给予67.5、135、270 mg/kg的复方茵陈蒿汤浓缩液进行灌胃,空白对照组则给予等体积蒸馏水灌胃。每次2 mL,持续7 d。末次灌胃后2 h,大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉。在无菌条件下,通过腹主动脉采血,采血后将血液静置4 h。随后,以3 000 r/min离心(4℃,15 min)分离血清。分离出的血清通过0.22 μm滤膜过滤,并在56℃下水浴灭菌30 min以灭活潜在的病原体。处理后的血清样本保存于-20℃备用。

1.4 细胞分组与药物干预

使用对数生长期的Raw264.7细胞,按照 1×10^5 个细胞/孔接种至24孔板,分为以下组别:空白组、模型组、复方茵陈蒿汤低剂量组、中剂量组、高剂量组和西药组。除空白组外,余下各组分别参照文献[9]中方法以肽聚糖(10 μg/mL)诱导12 h构建痤疮细胞模型。造模后各组给予相应的含药血清或药物预处理24 h,具体如下:空白组(900 μL基础培养基+100 μL胎牛血清)、模型组(900 μL基础培养基+100 μL空白血清)、复方茵陈蒿汤低剂量组(900 μL基础培养基+100 μL复方茵陈蒿汤低剂量含药血清)、复方茵陈蒿汤中剂量组(900 μL基础培养基+100 μL复方茵陈蒿汤中剂量含药血清)、复方茵陈蒿汤高剂量组(900 μL基础培养基+100 μL复方茵陈蒿汤高剂量含药血清)和西药组(900 μL基础培养基+100 μL胎牛血清+10 μmol/L Isotretinoin)。

1.5 指标检测

1.5.1 NO含量的检测 24 h后收集各组细胞,1 000 r/min离心(10 min)后弃上清,PBS洗涤2次,1 000 r/min离心(10 min)后弃上清。加入0.1 mol/L的PBS冰上匀浆。参照试剂盒说明书使用酶标仪检测各空550 nm处吸光度值,计算NO的含量。

1.5.2 酶联免疫吸附试验 24 h后收集各组细胞,1 000×g离心(20 min),弃上清,采用酶标仪检测各组样品450 nm处吸光度值(OD)。按照ELISA试剂盒说明书绘制标准曲线,根据OD计算各组细胞上清中IL-6和IL-8的浓度。

1.5.3 SOD和MDA测定 24 h后收集各组细胞,

1 000×g离心(20 min),取上清。参照试剂盒说明书检测SOD的活力和MDA的含量。

1.5.4 荧光探针检测ROS水平 24 h后收集各组细胞,清洗后加入终浓度为5 μmol的CM-H₂DCF-DA(稀释比例1:1 000),37℃细胞培养箱内孵育30 min。PBS洗涤3次,以荧光显微镜使用495 nm激发波长,530 nm发射波长观察CM-DCF的荧光强度。

1.5.5 蛋白质印迹 24 h后收集各组细胞,冰上裂解后进行蛋白浓度的测定。取筒灯蛋白上样后进行凝胶电泳,转印至PVDF膜。随后加入适当比例稀释后的TRPV3、TLR2、p-IKKα、IKKα、Phospho-IκBα (Ser32/36)、IκBα、Phospho-NF-κB p65 (Ser536)、NF-κB p65及β-actin抗体,4℃下孵育过夜。次日,通过洗膜后加入稀释后的HRP标记的二抗继续孵育1 h(室温)。加入ECL显影液显影后凝胶成像系统拍照。采用ImageJ软件分析条带的灰度值,以β-actin作为内参蛋白,以目的蛋白与β-actin灰度值的比值作为目的蛋白的表达水平。此外,通过细胞质和细胞核蛋白分离细胞蛋白,以β-actin作为细胞质内参蛋白,以Histone H3作为细胞核内参蛋白,分别以Phospho-NF-κB p65与β-actin及Histone H3的比值作为p65蛋白在细胞质和细胞核内的表达。

1.5.6 定量逆转录聚合酶链反应 24 h后收集各组细胞,采用试剂盒法提取细胞中总RNA并逆转录为cDNA,加入PCR反应混合物进行PCR反应。引物序列:TRPV3, Forward primer: 5'-GCT-GAAGAAGCGCATCTTTGCA-3', Reverse primer: 5'-TCATAGGCCTCCTCTGTGTACT-3'; β-actin, Forward primer: 5'-GATCCTCACCGAGCGC-GGCTACA-3', Reverse primer: 5'-TCATAGGCC-TCCTCTGTGTACT-3'。使用ABI PRISM 7500系统进行扩增,以β-actin作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TRPV3 mRNA的表达。

1.6 统计学处理

本研究使用SPSS 29.0进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的方式表示,两组间比较与多组间的比较分别使用Student's *t*检验及单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 复方茵陈蒿汤对巨噬细胞NO生成的影响

与空白组相对比,模型组中Raw264.7细胞中

NO 的含量显著增加,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型组相比,复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞中 NO 的含量显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

2.2 复方茵陈蒿汤对巨噬细胞炎症因子水平的影响

与空白组相对比,模型组中 Raw264.7 细胞中 TNF-α、IL-1β、iNOS、COX2 的含量显著增加,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型组相比,复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞中 TNF-α、IL-1β、iNOS 和 COX2 的含量显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

2.3 复方茵陈蒿汤对巨噬细胞氧化应激的影响

与空白组相对比,模型组中 Raw264.7 细胞中 MDA 的含量和 ROS 的荧光强度显著增加,SOD 的活力显著降低,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型

表 1 各组巨噬细胞 NO 生成的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
Tab 1 Comparison of NO production in macrophages among all groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
组别	NO 生成 (μmol/L)
空白组	6.19±0.31
模型组	53.67±3.42**
复方茵陈蒿汤低剂量组	42.13±3.07 [#]
复方茵陈蒿汤中剂量组	34.62±0.73 [#]
复方茵陈蒿汤高剂量组	18.64±1.27 [#]
西药组	18.17±1.34 [#]
统计值	222.69
P	<0.01

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

组相比,复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞中 MDA 的含量和 ROS 的荧光强度显著降低,SOD 的活力显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 3、图 1。

表 2 各组巨噬细胞炎症因子水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)				
Tab 2 Comparison of inflammatory cytokine levels in macrophages among all groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)				
组别	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	iNOS (IU/mL)	COX2 (μg/mL)
空白组	96.50±1.21	5.10±0.28	20.45±1.06	3.27±0.12
模型组	304.94±17.76**	28.39±1.31**	223.11±8.23**	13.13±0.71**
复方茵陈蒿汤低剂量组	276.58±28.26 [#]	21.83±0.43 [#]	172.19±7.70 [#]	11.42±0.14 [#]
复方茵陈蒿汤中剂量组	219.10±4.67 [#]	17.85±1.40 [#]	156.05±2.60 [#]	9.14±0.10 [#]
复方茵陈蒿汤高剂量组	160.25±6.11 [#]	13.40±0.54 [#]	100.03±8.21 [#]	5.17±0.22 [#]
西药组	161.28±4.28 [#]	14.44±0.31 [#]	108.04±3.20 [#]	5.66±0.23 [#]
统计值	102.88	261.93	415.26	415.16
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

表 3 各组巨噬细胞氧化应激水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)			
Tab 3 Comparison of oxidative stress levels in macrophages among all groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)			
组别	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	ROS (AU)
空白组	37.26±1.82	5.34±0.15	16.99±0.35
模型组	13.96±0.57**	50.54±2.10**	111.09±9.79**
复方茵陈蒿汤低剂量组	18.12±0.70 [#]	42.39±1.28 [#]	89.99±0.71 [#]
复方茵陈蒿汤中剂量组	20.31±0.91 [#]	31.89±2.00 [#]	72.23±3.88 [#]
复方茵陈蒿汤高剂量组	25.28±1.62 [#]	22.79±1.53 [#]	50.97±1.69 [#]
西药组	24.81±1.14 [#]	24.83±0.38 [#]	56.44±5.20 [#]
统计值	131.86	362.59	136.58
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

2.4 复方茵陈蒿汤对巨噬细胞 TRPV3 表达的影响

与空白组相对比,模型组中 Raw264.7 细胞中 TRPV3 蛋白和 mRNA 的表达显著增加,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型组相比,复方茵陈蒿汤低

剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞中 TRPV3 蛋白和 mRNA 的表达显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 4、图 2。

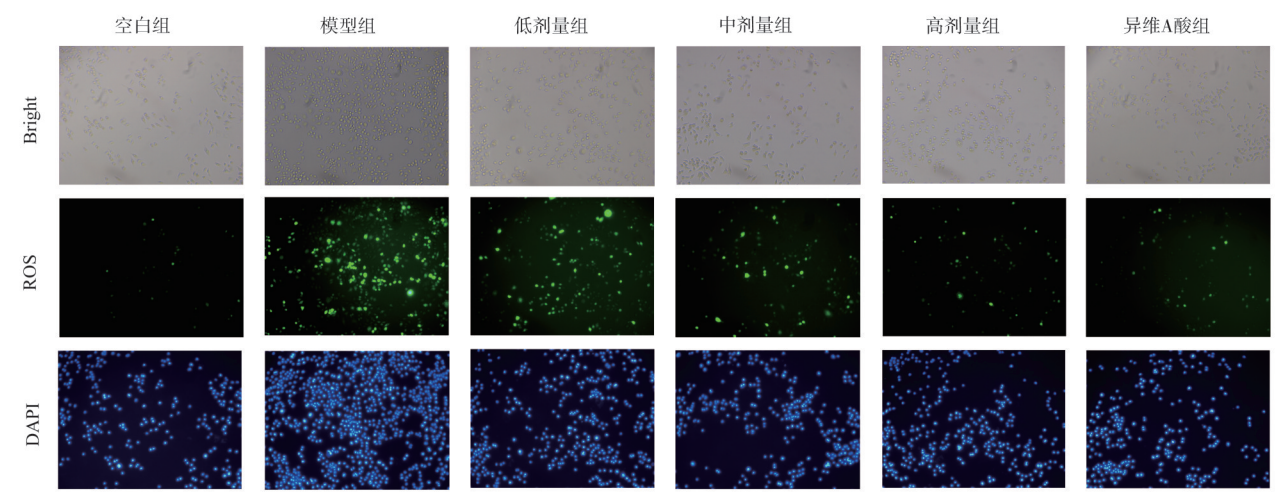


图 1 免疫荧光检测各组巨噬细胞 ROS 的水平

Fig 1 Detection of ROS levels in macrophages among all groups by immunofluorescence

表 4 各组巨噬细胞中 TRPV3 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 4 Comparison of TRPV3 expression in macrophages among all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TRPV3/ β -actin	TRPV3 mRNA
空白组	0.09 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01
模型组	0.92 $\pm$ 0.09**	6.18 $\pm$ 0.11**
复方茵陈蒿汤低剂量组	0.51 $\pm$ 0.05 [#]	5.27 $\pm$ 0.43 [#]
复方茵陈蒿汤中剂量组	0.34 $\pm$ 0.03 [#]	3.39 $\pm$ 0.36 [#]
复方茵陈蒿汤高剂量组	0.19 $\pm$ 0.03 [#]	2.08 $\pm$ 0.49 [#]
西药组	0.17 $\pm$ 0.07 [#]	2.24 $\pm$ 0.36 [#]
统计值	93.84	103.33
P	<0.01	<0.01

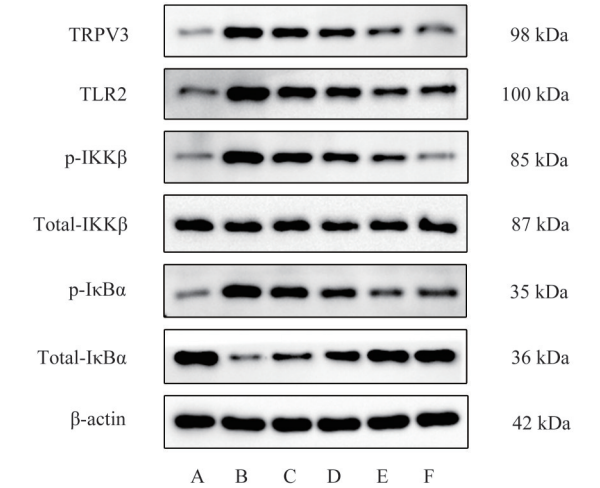
注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

2.5 复方茵陈蒿汤对巨噬细胞 TLR2/NF- κ B 信号通路的影响

与空白组相对比,模型组中 Raw264.7 细胞中 TLR2 和 p-I κ B α 蛋白的表达与 p-IKK β /IKK β 的比值显著上调,I κ B α 蛋白的表达显著降低,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型组相比,复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞中 TLR2 和 p-I κ B α 蛋白的表达与 p-IKK β /IKK β 的比值显著降低,I κ B α 蛋白的表达显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 5、图 2。

2.6 复方茵陈蒿汤对巨噬细胞 NF- κ B p65 蛋白细胞核易位的影响

与空白组相对比,模型组中 p-p65/p65 的比值显著增加,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型组相比,复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞中 p-p65/p65 的比值显著降低,差异具有统计学意



A:空白组;B:模型组;C:复方茵陈蒿汤低剂量组;D:复方茵陈蒿汤中剂量组;E:复方茵陈蒿汤高剂量组;F:西药组

图 2 Western blot 检测各组巨噬细胞 TRPV3 与 TLR2/NF- κ B 信号通路中蛋白的表达

Fig 2 TRPV3 and protein expression in the TLR2/NF- κ B signaling pathway in macrophages among all groups detected by Western blot

义($P<0.01$)。此外,通过分离细胞质与细胞核中蛋白,结果显示与空白组相对比,模型组细胞质和细胞核中 p-p65 蛋白的表达均显著增加,差异具有显著性($P<0.01$)。与模型组相比,复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组、复方茵陈蒿汤低剂量组和西药组 Raw264.7 细胞细胞质中 p-p65 蛋白的表达显著增加,细胞核中 p-p65 蛋白的表达显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 6、图 3。

表 5 各组巨噬细胞 TLR2/NF-κB 信号通路中蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 5 Comparison of protein expression in the TLR2/NF-κB signaling pathway in macrophages among all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TLR2/ β -actin	p-IKK β /IKK β	p-IκB α / β -actin	IκB α / β -actin
空白组	0.10±0.01	0.09±0.01	0.11±0.04	1.34±0.05
模型组	1.08±0.08**	0.97±0.15**	0.91±0.28**	0.17±0.08**
复方茵陈蒿汤低剂量组	0.79±0.12 [#]	0.81±0.09 [#]	0.59±0.07 [#]	0.37±0.04 [#]
复方茵陈蒿汤中剂量组	0.54±0.08 [#]	0.74±0.06 [#]	0.46±0.07 [#]	0.38±0.08 [#]
复方茵陈蒿汤高剂量组	0.28±0.01 [#]	0.22±0.02 [#]	0.29±0.07 [#]	0.90±0.06 [#]
西药组	0.33±0.02 [#]	0.18±0.03 [#]	0.34±0.08 [#]	0.83±0.12 [#]
统计值	84.86	72.33	13.57	97.89
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

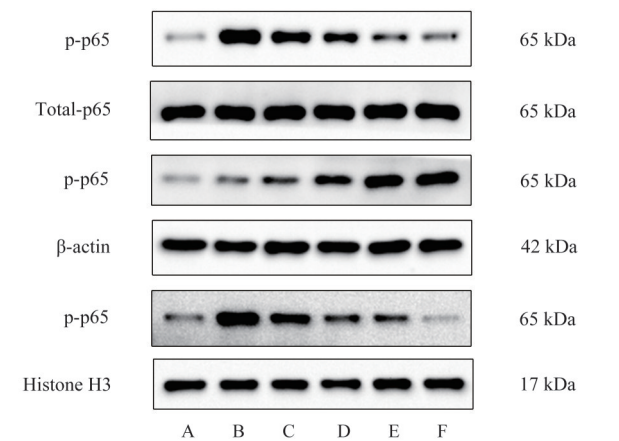
注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

表 6 各组巨噬细胞炎症因子水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 6 Comparison of inflammatory cytokine levels in macrophages among all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	p-p65/p65	细胞质 p-p65	细胞核 p-p65
空白组	0.07±0.02	0.04±0.01	0.10±0.03
模型组	0.94±0.11**	0.14±0.04**	1.17±0.05**
复方茵陈蒿汤低剂量组	0.52±0.06 [#]	0.23±0.03 [#]	1.02±0.04 [#]
复方茵陈蒿汤中剂量组	0.33±0.03 [#]	0.32±0.02 [#]	0.59±0.15 [#]
复方茵陈蒿汤高剂量组	0.13±0.01 [#]	0.85±0.03 [#]	0.26±0.03 [#]
西药组	0.11±0.03 [#]	0.82±0.05 [#]	0.10±0.05 [#]
统计值	128.07	321.56	128.31
P	<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。



A:空白组;B:模型组;C:复方茵陈蒿汤低剂量组;D:复方茵陈蒿汤中剂量组;E:复方茵陈蒿汤高剂量组;F:西药组

图 3 Western blot 检测各组巨噬细胞细胞质与细胞核中 NF-κB p65 蛋白的表达

Fig 3 NF-κB p65 protein expression in the cytoplasm and nucleus of macrophages among all groups detected by Western blot

3 讨论

炎症是一个复杂的生物学过程,是机体对致病性因素及损伤的一种正常防御反应。TNF- α 与 IL-1 β 是由巨噬细胞分泌的两种重要炎症因子,在痤疮炎症反应中发挥重要的作用^[10]。NO 是一种自由基气体分子,当巨噬细胞在痤疮炎症中被激活后通过

大量 NO 的生成,促进皮脂腺炎症的发生^[11]。此外,NO 还可以通过诱导趋化因子和促炎细胞因子的表达,放大炎症信号。NO 主要由 iNOS 所合成,在 *C. acnes* 的刺激下,iNOS 通过将 L-精氨酸催化生成 NO 和 L-瓜氨酸,从而参与炎症反应的发生和发展^[12]。COX2 通过催化花生四烯酸转化形成前列腺素 E2,参与毛囊角化与炎症反应^[13]。本研究结果显示,在肽聚糖诱导的巨噬细胞模型中,TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、COX2 的含量显著增加,而复方茵陈蒿汤能够显著抑制巨噬细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、COX2 的含量,从而抑制炎症反应。

除参与炎症外,NO 还可与超氧化物反应生成过氧亚硝酸盐,引起氧化应激损伤。在炎症反应中,巨噬细胞通过 NADPH 氧化酶、线粒体呼吸链和酶促反应等途径生成产生大量的 ROS,促进炎症细胞因子和趋化因子的生成造成组织损伤^[14]。SOD 是一类抗氧化酶,能够催化超氧化物自由基转化为过氧化氢和氧气,从而减少超氧化物对细胞的毒性^[15]。MDA 是脂质过氧化的终产物之一,是氧化应激程度的标志物^[16]。此外,MDA 还可与细胞表面 RAGE 结合,促进炎症细胞因子的生成,加剧炎症反应^[17]。本研究结果显示,在肽聚糖诱导的巨噬细胞模型中 NO 的生成、MDA 的含量和 ROS 的荧光强度显著增加,SOD 的活力显著降低,而复方茵

陈蒿汤能够显著增加巨噬细胞SOD的活力,抑制NO的生成、MDA的含量和ROS的荧光强度,从而抑制氧化应激反应。

TLR2属于Toll样受体家族成员,广泛表达于巨噬细胞、树突状细胞及上皮细胞。激活后的TLR2通过胞内TIR结构域招募MyD88,随后通过转化生长因子 β 活化激酶1磷酸化激活IKK复合物(包括IKK α 、IKK β 和IKK γ)^[18]。激活后的IKK β 进一步磷酸化I κ B α 的N端Ser32和Ser36位点,导致其泛素化和蛋白酶体降解^[19]。I κ B α 的降解使得NF- κ B p65能够进入细胞核,激活下游炎症相关基因的表达^[20]。p65的磷酸化通过改变构象,增强与DNA结合能力,促进其与转录共激活因子(如CBP/p300)的相互作用,从而增强其转录活性^[21]。TRPV3是一种重要的离子通道,主要定位于细胞膜,参与温度感知、机械感知和炎症反应。已有研究证实,TRPV3通过FOSL1的磷酸化激活TLR2,参与皮脂腺炎症反应^[22]。

复方茵陈蒿汤由茵陈、蒲公英、白花蛇舌草、防风、黄芩、栀子、黄连、丹皮、紫花地丁、苦参、菊花、生地、赤芍、浙贝母组成,具有清热解毒、凉血散瘀、燥湿排脓的功效。方中茵陈、蒲公英及白花蛇舌草三药为君药,以清热解毒,利湿消肿。臣以防风、黄芩、栀子、黄连、丹皮、紫花地丁以清热燥湿,泻火解毒,凉血消肿。佐以苦参、菊花、生地、赤芍、浙贝母以清热凉血,化痰散结。贝母素是从中草药贝母中提取的主要天然生物碱类化合物,已被证实可通过NF- κ B通路抑制*C. acnes*诱导的小鼠皮肤炎症^[23]。此外,研究证实菊花具有一定的抗菌作用,已被证实可以缓解*C. acnes*诱导的THP-1细胞炎症^[24]。本研究结果显示,在肽聚糖诱导的巨噬细胞模型中TRPV3的表达显著上调,而复方茵陈蒿汤能够显著抑制巨噬细胞中TRPV3的表达。进一步研究表明,复方茵陈蒿汤能够显著下调TLR2和p-I κ B α 蛋白的表达,降低p-IKK β /IKK β 的比值,上调I κ B α 蛋白的表达,从而抑制p65的磷酸化水平。不仅如此,当前的研究结果还证实复方茵陈蒿汤能够显著降低细胞核中磷酸化p65蛋白的表达,从而抑制p65的入核。

综上所述,复方茵陈蒿汤通过TRPV3/TLR2/NF- κ B信号通路的激活,有效抑制*C. acnes*诱导的巨噬细胞氧化应激和炎症反应,从而减轻痤疮相关炎症损伤。上述分子机制为复方茵陈蒿汤的临床抗痤疮疗效提供了重要药理学依据。

作者贡献度说明:

江雪冰:设计;张文宪和李怀军:完成实验;张雪冰:指标检测,刘成祥和战晶玉:实验数据进行统计,并撰写论文。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会皮肤性病学分会,等.寻常痤疮基层诊疗指南(2023年)[J].中华全科医师杂志,2023,22(2):138-145.
Chinese Medical Association, Chinese Medical Association Publishing House, Chinese Society of Dermatology, et al. Guidelines for the primary care of acne vulgaris (2023) [J]. Chin J Gen Pract, 2023, 22(2): 138-145.
- 2 Baldwin H, Tan J. Effects of diet on acne and its response to treatment[J]. Am J Clin Dermatol, 2021, 22(1): 55-65.
- 3 Cruz S, Vecerek N, Elbuluk N. Targeting inflammation in acne: Current treatments and future prospects[J]. Am J Clin Dermatol, 2023, 24(5): 681-694.
- 4 Feng Y, Li J, Mo X, et al. Macrophages in acne vulgaris: Mediating phagocytosis, inflammation, scar formation, and therapeutic implications[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1355455.
- 5 Do TH, Ma F, Andrade PR, et al. TREM2 macrophages induced by human lipids drive inflammation in acne lesions[J]. Sci Immunol, 2022, 7(73): eabo2787.
- 6 Zhao D, Wang Y, Wu S, et al. Research progress on the role of macrophages in acne and regulation by natural plant products[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1383263.
- 7 李怀军,张文宪,江雪冰.复方茵陈蒿汤结合面膜治疗寻常型痤疮154例[J].光明中医,2011,26(9):1845-1846.
Li HJ, Zhang WX, Jiang XB. Treatment of common acne with 154 cases using Fufang Yinchenhao Decoction combined with face mask[J]. Guangming J Tradit Chin Med, 2011, 26(9): 1845-1846.
- 8 李怀军,江雪冰.复方茵陈蒿汤结合中药面膜治疗寻常型痤疮154例疗效观察[J].中国中医药科技,2011,18(3):195.
Li HJ, Jiang XB. Observation on the efficacy of Fufang Yinchenhao Decoction combined with Chinese herbal face mask in treating common acne in 154 cases[J]. Chin J Tradit Chin Med Sci Technol, 2011, 18(3): 195.
- 9 Lee H, Hwang D, Lee M, et al. Micro-current stimulation suppresses inflammatory responses in peptidoglycan-treated raw 264.7 macrophages and *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation via TLR2/NF- κ B signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2508.
- 10 秦华萍,林燕,赵丽娟,等.苓楼合剂对兔耳痤疮模型

- 病理变化及血清睾酮、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的影响[J]. 云南中医药大学学报, 2024, 47(1): 51-56.
- Qin HP, Lin Y, Zhao LJ, et al. Effects of Qinlou mixture on pathological changes and serum testosterone, TNF- α , IL-6, and IL-1 β of rabbit ear acne model[J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(1): 51-56.
- 11 Liu P, Liu X, Zhang L, et al. ALA-PDT augments intense inflammation in the treatment of acne vulgaris by COX2/TREM1 mediated M1 macrophage polarization [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 208: 115403.
 - 12 Delgado IL, Scarim CB, Fernandes FH, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of a new N-Oxide derivative for acne vulgaris treatment[J]. Med Chem, 2025, 21(1): 32-45.
 - 13 Jeong SH, Park MY, Bhosale PB, et al. Potential anti-oxidant and anti-inflammatory effects of *Lonicera japonica* and *Citri Reticulatae Pericarpium* polyphenolic extract (LCPE)[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(8): 1582.
 - 14 赵剑秋, 韩晓群, 邓琴, 等. 基于 Nrf2 通路姜黄素抑制卡介苗感染巨噬细胞氧化应激[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(12): 2523-2527.
 - 15 袁向科, 江瑞. 甘木通醇提物通过 miR-142-3p 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 损伤及 SOD、MDA、CAT 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(22): 5591-5596.
 - 16 关石凤. 加味桃红四物汤治疗慢性湿疹对患者 MDA 以及 SOD 水平的影响[J]. 中国处方药, 2023, 21(7): 160-163.
 - 17 孙权, 刘士臣, 徐伟明, 等. 褪黑素对糖尿病大鼠心肌 MDA、CAT 及 GSH-Px 含量和 AGE、RAGE 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(16): 3503-3508.
 - 18 Luo X, Bao X, Weng X, et al. The protective effect of quercetin on macrophage pyroptosis *via* TLR2/Myd88/NF- κ B and ROS/AMPK pathway [J]. Life Sci, 2022, 291: 120064.
 - 19 Dong X, Jiang J, Lin Z, et al. Nuanxinkang protects against ischemia/reperfusion-induced heart failure through regulating IKK β /I κ B α /NF- κ B-mediated macrophage polarization [J]. Phytomedicine, 2022, 101: 154093.
 - 20 Guo Q, Jin Y, Chen X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: New insights and translational implications [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 53.
 - 21 Yu H, Lin L, Zhang Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: Mechanism and clinical study [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.
 - 22 Wei Z, Gao M, Liu Y, et al. TRPV3 promotes sebocyte inflammation *via* transcriptional modulating TLR2 in acne[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870(5): 167195.
 - 23 Cha SJ, Kim SS, Shin JH, et al. Peiminine exerts its anti-acne effects by regulating the NF- κ B Pathway[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(1): 131.
 - 24 Liu X, Li Y, Su S, et al. Comparative analysis of chemical composition and antibacterial and anti-inflammatory activities of the essential oils from *Chrysanthemum morifolium* of different flowering stages and different parts [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 5954963.

[本文编辑] 邹洲 宋睿璞 陈思润