◆实验研究◆

凉血解毒透邪法调节皮肤常驻记忆性T细胞缓解寻常型银屑病复发的作用及机制研究

张文娟[1]，胡冯菊[2]，黎莉[2]，卢月[2]，吴晶晶[2]，韩凌[2]，危建安[2]

1. 广州中医药大学第一附属医院，广东 广州 510405
2. 广州中医药大学第二临床医学院，广东 广州 510006

［摘要］**目的：**观察凉血解毒透邪法（银屑灵方）对寻常型银屑病复发症状的影响及其对皮肤常驻记忆性T细胞（TRM）的影响。**方法：**选择72只SPF级Balb/C小鼠，体质量18～22 g，雄性，随机分为正常对照组、单发模型组，复发模型组、阳性药组（甲氨蝶呤，0.3 mg·kg^{-1}·d^{-1}）、银屑灵方低、高剂量组（生药23.5 g·kg^{-1}·d^{-1}，47.0 g·kg^{-1}·d^{-1}），共6组，每组12只。除正常对照组外，其它小鼠裸背处涂抹5%咪喹莫特乳膏（IMQ）50 mg，每天1次，连续7 d。放置不作处理，为银屑病缓解期模型。4周后进行2次造模（复发造模），除了正常对照组和单发模型组以外，其余小鼠背部涂抹5% IMQ 50 mg，每天1次，连续5 d。给药：给药时间为首次造模期间和造模后2周。在2次造模的第3天，对各组小鼠皮损进行了第1次银屑病面积与严重性指数（PASI）评分；在2次造模的第5天，再次对各组小鼠皮损进行了PASI评分；并处死动物，对小鼠体质量丢失量、脾脏指数进行分析。采用HE染色，在显微镜下评价黏膜病理损伤指数；采用免疫组织化学检测小鼠皮损的PCNA蛋白的表达；采用荧光定量qPCR检测银屑病相关炎症因子mRNA的表达；采用流式细胞术检测皮损区TRM细胞数量的变化，并用荧光定量qPCR检测TRM细胞产生与存活相关因子的表达水平，采用免疫组织化学和蛋白免疫印迹法检测TRM细胞表型和存活相关蛋白的表达。**结果：**与复发模型组比较，银屑灵方能够缓解银屑病复发模型小鼠皮损外观症状，抑制体质量丢失和表皮增厚；减低皮损处白细胞介素（IL）17、IL23、肿瘤坏死因子α（TNFα） mRNA的表达和皮肤PCNA蛋白的表达。银屑灵方能够减少银屑病小鼠缓解期皮损区表型为CD3$^+$TCRγδ$^+$CD8$^+$CD103$^+$的TRM细胞数量；并能抑制皮损区IL7、IL15、BCL6和PRDM1 mRNA的表达水平及STAT5磷酸化水平。**结论：**银屑灵方有效减缓银屑病复发小鼠的皮损，其机制可能是通过抑制TRM形成的转录因子水平、调控TRM存活与增殖的信号STAT5通路及下游信号分子IL7、IL15的表达，减少缓解期原皮损区TRM细胞数量，达到改善银屑病复发的效果。

［关键词］寻常型银屑病；复发；凉血活血、解毒透邪法；组织常驻记忆T细胞；Balb/C小鼠
［中图分类号］R285.5；R758.63 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2025）02-0166-10
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2025.02.030

Study on Effect of Expelling Pathogen Method of Cooling the Blood and Resolving Toxins on Mitigation of Psoriasis Vulgaris Relapse by Adjusting Tissue-Resident Memory T Cells and Its Mechanism

ZHANG Wenjuan[1], *HU Fengju*[2], *LI Li*[2], *LU Yue*[2], *WU Jingjing*[2], *HAN Ling*[2], *WEI Jian'an*[2]

［收稿日期］2023-12-22
［修回日期］2024-09-28
［基金项目］国家自然科学基金项目（82274527）；广东省自然科学基金项目（2021A1515011245）
［作者简介］张文娟（1996-），女，医师，E-mail：20201110285@stu.gzucm.edu.cn。
［通信作者］危建安（1975-），男，副研究员，E-mail：jianan.wei@gzucm.edu.cn。

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510405, China; 2. The Second Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510006, China

Abstract: Objective: To observe the effect of expelling pathogen method of cooling the blood and resolving toxins (Yinxieling Prescription) on the recurrent symptoms of psoriasis vulgaris and the tissue-resident memory T cells (TRM). **Methods:** A total of 72 SPF male Balb/C mice, weighing about 18~22 g, were randomly divided into six groups, including the normal control group, the single-onset model group, the relapse model group, the positive medicine group (Methotrexate, 0.3 $m \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$), the low-dose Yinxieling Prescription group and the high-dose Yinxieling Prescription group (crude herbs, 23.5 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ and 47.0 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$), with 12 mice in each group. Except for the normal control group, the other mice were smeared with 50 mg of 5% Imiquimod Cream (IMQ) on the nude back, once a day for seven consecutive days. The mice given no any treatment were used as the models for psoriasis in remission stage. After four weeks, the second modeling was done (modeling for relapse). Except for the normal control group and the single-onset mode group, the other mice were smeared with 50 mg of 5% IMQ on the back, once a day for five consecutive days. Administration: the administration was conducted respectively during the first modeling period and two weeks after modeling. The first psoriasis area and severity index (PASI) scoring of skin lesions was performed in each group on the third day of the second modeling. The PASI scoring of skin lesions in each group was evaluated again on the fifth day of the second modeling; after the mice were sacrificed, their weight loss and spleen index were analyzed. HE staining was used to evaluate the pathological injury index of mucous membrane under the microscope; the expression of PCNA protein in skin lesions of mice was detected by immunohistochemistry; quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the mRNA expression of psoriasis-related inflammatory factors; flow cytometry was used to detect the changes in the number of TRM cells in the lesion area, and qPCR was used to detect the expression levels of survival-related factors produced by TRM cells; immunohistochemistry and western blot were used to detect the phenotype of TRM cells and the expression of survival-related proteins. **Results:** Compared with the relapse model group, Yinxieling Prescription can alleviate the appearance symptoms of skin lesions in mice model of psoriasis relapse, inhibit the weight loss and epidermal thickening, and reduce the mRNA expression of interleukin (IL) 17, IL23, and tumor necrosis factor α (TNF-α) and the expression of PCNA protein in the skin. Yinxieling Prescription can reduce the number of TRM cells with phenotype of $CD3^+TCR\gamma\delta^+CD8^+CD103^+$ in the skin lesions of psoriasis mice in the remission stage; it can also inhibit the mRNA expression levels of IL7, IL15, BCL6 and PRDM1 and the phosphorylation level of STAT5 in the skin lesions. **Conclusion:** Yinxieling Prescription can effectively alleviate the skin lesions of mice model of psoriasis relapse, whose mechanism may lie in the inhibition of the level of transcription factors formed by TRM, regulation of the STAT5 signal pathway of TRM survival and proliferation and the expression of downstream signal molecules (IL7 and IL15), reduction of the number of TRM cells in the primary skin lesion area in the remission stage so as to improve the recurrent symptoms of psoriasis.

Keywords: Psoriasis vulgaris; Relapse; Cooling and activating blood, resolving toxins and expelling pathogen method; Tissue-resident memory T cells; Balb/C mice

银屑病是一种在遗传和环境的影响下由免疫介导的慢性炎症性、复发性皮肤病[1]，可合并或诱发心血管疾病、代谢综合征或类风湿性关节炎等[2-3]。患病率受种族、地理位置和环境的影响，北美和欧洲的发病率约2%[4]。我国北方6个城市流行病学调查结果患病率为0.47%，推算我国约有银屑病患者650万[5]。银屑病典型临床表现为鳞屑性红斑或斑块，局限或广泛分布，无传染性，治疗困难。银屑病分型主要

有寻常型、脓疱型、红皮病型、关节型，其中寻常型银屑病是最为常见类型[6]。目前对其发病机制的研究已日益成熟，认为IL23/T17轴是其核心发病机制[4,7]。

复发是银屑病临床治疗的难点，即使生物制剂的临床治愈率可以达到90%[8]，但仍存在一个棘手问题——“瘥后复发”。研究表明复发于皮损消退区（原位复发）占寻常型银屑病复发的90%以上[8-9]。经过甲氨蝶呤、NB-UVB或抗IL23等治疗后，皮损缓解区域仍然长期驻留和存活大量皮肤组织常驻记忆性T细胞（TRM）细胞，并能诱导产生多种与银屑病复发的关键细胞因子，且复发首先由局部TRM细胞启动[7,10-11]。因此，目前认为寻常型银屑病复发的内因主要是由TRM细胞介导启动[9,12]。本研究团队前期将中医学伏邪的“动态时空”“潜藏隐匿”“自我积聚”等3个主要特征[13]，与现代医学TRM细胞驻留组织特异性、低迁移性、长期存活和自我更新等特征进行对比，发现两者均具感而引动、待机而发的致病特点，并提出引起免疫性炎症疾病反复发作的伏邪生物学基础是组织致病性TRM的假说[14]。

国医大师禤国维教授提出银屑病宜从血论治，创立银屑灵方，全方以凉血活血解毒药为主，佐以祛风通络透邪之效，前期研究显示银屑灵方可明显改善银屑病患者皮损，降低银屑病的复发，且副作用少[15]。故本研究拟从调控TRM细胞的角度，探讨凉血解毒通络透邪法（以银屑灵方为代表）减缓银屑病复发的作用与调控伏邪的生物学基础——TRM的关系。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级Balb/C小鼠共72只，体质量18～22 g，雄性，购于广州斯嘉景达生物科技有限公司。生产许可证号：SCXK（粤）2010-0052；合格证号为：No.44825400001052。饲养于广东省中医院实验动物中心，使用许可证号：SYXK（粤）2018-0094。在整个实验过程中，给予小鼠自然昼夜节律光照，小鼠可以自由获得食物和水。所有有关动物实验的操作均符合《实验动物福利评审指南》《实验动物护理与使用指南》的伦理标准。本研究动物实验方案经广东省中医院动物伦理委员会批准（伦理号：2021030）。

1.2 药物与试剂 甲氨蝶呤片（MTX，上海信谊药厂有限公司，国药准字H31020644）、咪喹莫特乳膏（IMQ，四川明欣药业有限公司，国药准字H20030129）。Leukocyte Activation Cocktail抗体（BD Pharmingen，货号550583）、APC-cy7标记Anti-Mouse CD3抗体（eBioscience，型号17-0032-82）、FITC标记Anti-Mouse TCRγδ抗体（eBioscience，型号11-5711-82）、PercP-cy5.5标记Anti-Mouse CD8a抗体（eBioscience，型号45-0081-80）、PE标记Anti-Mouse CD69抗体（BD Pharmingen，货号553237）、APC标记Anti-Mouse CD103抗体（BD Pharmingen，货号562711）、Fluor@450标记Anti-Mouse CD4抗体（eBioscience，型号48-0041-80）、FITC标记Anti-Mouse IL17抗体（eBioscience，型号11-71-77-81）、Liberase酶（Roche，货号05401020001）、脱氧核糖核酸酶（DNaseI，Roche，货号11284932001）、RIPA裂解液（RIPA Lysis Buffer，北京康为世纪，货号20531）、磷酸酶抑制剂混合物（Phosphatase Inhibitor Cocktail，北京康为世纪，货号70505）、蛋白酶抑制剂混合物（Protease Inhibitor Cocktail，北京康为世纪，货号20529）、HRP标记山羊抗兔IgG二抗[Goat Anti-Rabbit IgG（H+L）HRP，Affinity Bioscience，S0001]、Pierce™ BCA（Thermo Fisher ScientiFic，#23227）、TRIZOL试剂（北京康为世纪，货号01761）、Evo M-MLV反转录试剂预混液（艾科瑞生物，货号AG11706）、SYBR Green Pro Taq HS预混悬qPCR试剂盒（艾科瑞生物，货号AG11 718）、抗增殖细胞核抗原抗体（PCNA）抗体（CST，#85118）、人磷酸化信号转导子与转录激活子5抗体（P-STAT5 Ab，CST，25656S）、人磷酸化信号转导和转录激活因子5抗体STAT5 Ab（CST，9359S）。银屑灵方中药饮片由广东省中医院药学部提供。

1.3 仪器 流式细胞分选仪（BD，FACS AriaIII）、CO_2培养箱（Eppendorf，Galaxy 170S）、冷冻台式高速离心机（Eppendorf，5418R）、荧光定量PCR仪（美国赛默飞世尔，ABI ViiA 7）。

1.4 银屑灵方汤剂制备 银屑灵方处方：紫草、乌梅、土茯苓、生地黄、肿节风各20 g，赤芍15 g，甘草、醋莪术、酒川芎、当归各10 g。3剂，按照中药饮片的常规煎煮方法，煎煮2次，最后将药液浓缩成为200 mL。参照人体临床用量，人体与小鼠药物剂量换算系数为9.1，以临床等效剂量作为实验的低剂量，以临床剂量的2倍剂量作为实验的高剂量组。

1.5 分组、造模与给药 将72只Balb/C小鼠于随机

分为正常对照组、单发模型组、复发模型组、阳性药组(甲氨蝶呤)、银屑灵方低剂量组和银屑灵方高剂量组，共6组，每组12只。造模：所有小鼠于背部下方靠近尾巴处进行剃毛、脱毛处理(范围大约为3 cm×4 cm)。除正常对照组外，其它小鼠裸背处涂抹5%IMQ 50 mg，每天1次，连续7 d。放置不作处理，为银屑病缓解期模型。4周后进行二次造模(复发造模)，除了正常对照组和单发模型组以外，其余小鼠背部涂抹5% IMQ 50 mg，每天1次，连续5 d。给药：给药时间为首次造模期间和造模后1周，其中甲氨蝶呤片，根据人体的临床用量(每周12.5 mg·60 kg^{-1})和体表面积比(换算系数为9.1)，换算成小鼠的用量为0.3 mg·kg^{-1}·d^{-1}，每天1次。银屑灵方以银屑灵方水煎液灌胃给药，低剂量组为临床等效剂量，23.5 g·kg^{-1}·d^{-1}，高剂量组为临床等效剂量2倍，47.0 g·kg^{-1}·d^{-1}，分2次给药。

1.6　取材　在设置时间点，每组取4只小鼠，腹腔注射0.3%戊巴比妥钠溶液(0.1 mL·10 g^{-1}体质量)麻醉，取背部皮肤或相关组织。复发造模前(缓解期)，取材用于分析TRM细胞、功能和TRM产生/存活相关因子基因表达水平；复发造模第4天，取材用于分析银屑病发作相关炎症因子基因表达和TRM存活相关激酶和表型蛋白；复发造模结束时，评估皮损，取材用于检测表皮厚度和增殖标志物。实验动物造模与取材示意图如下，动物实验重复2次。流程见图1。



图1　动物实验造模与分组、给药示意图

1.7　方法与观察指标

1.7.1　小鼠皮肤原代细胞分离　取小鼠背部皮肤2 cm×3 cm，去除皮下黏附组织，放于装有预冷的3mL Liberase工作液，将皮肤剪成16～25个小块，在37 ℃空气摇床中孵育75 min充分裂解；取出小皿放置冰上，加入3 mL DnaseI工作液用尖镊将皮肤块撕碎，放入37 ℃空气摇床，孵育15 min后，用5 mL注射器反复抽吸皿内混悬液8次，使细胞充分分离；然后放置冰上，先后用200目和300目滤网过滤，将所得滤液在4 ℃冷冻离心机中以离心8 min；计数细胞用于流式细胞术分析用。

1.7.2　流式细胞术检测TRM细胞表型及分析　将细胞计数后，用流式染色液将细胞悬液浓度调整至10^6·100 μL^{-1}，在U底96孔板中每孔加入2 μL CD16/32抗体和100 μL单细胞悬液，混匀，冰盒中封闭孵育10 min。然后，加入如表1预混的荧光抗体，用排枪吹打混匀，避光在冰盒中孵育30 min。4 000 r·min^{-1}离心3 min，甩去孔内液体，每孔加入PBS 100 μL，吹打混匀，重复此步骤1次，重新加入100 μL，用排枪轻轻吹打混匀，准备上机检测。所有采集数据均采用FlowJo V10软件进行分析。

表1　预混的荧光抗体类型及使用量

抗体	使用量/(μL/只)
Anti-CD3-APC-cy7	1
Anti-TCRγδ-FITC	1
Anti -CD8a-PercP-cy5.5	1
Ant i-CD69-PE	1
An ti-CD103-APC	1
Anti-CD4-Fluor@450	1

1.7.3　银屑病皮损面积和疾病严重程度(PASI)评分　以正常对照组为基准，对其它各组小鼠背部皮损给予评分，小鼠的皮肤红斑、鳞屑及浸润增厚程度分别按0～4计分，将3项分值相加得到总分。PASI评分标准如下。0分为无，1分为轻度，2分为中度，3分为重度，4分为极重度。每天造模的同时观察各组小鼠的精神状态，并详细记录各组小鼠体质量、背部皮肤红斑、鳞屑与浸润厚度等情况，计算各组别小鼠PASI评分。

1.7.4　皮肤组织苏木精-伊红染色法(HE)检测表皮厚度　取小鼠皮损区的皮肤，固定于4%多聚甲醛溶液，装入脱水盒放置于自动脱水机，进行脱水。取出贴放于包埋框底部，置于冷冻台，加入融化的石蜡冷却凝固后取出，用于切片。切皮厚度设定为3 μm，于42 ℃的水面上展平，用载玻片捞片，65 ℃烘箱中烘烤过夜。染色前进行复水，将切片放于苏木素染液中染3 min，再用自来水洗去浮色；用1%盐酸乙醇浸泡2 s分化，自来水漂洗；放于伊红染液中浸泡3 min染细胞质；脱水后用中性树胶封片。每张切片选取5个不同位置进行测量，取平均值作为该

小鼠表皮厚度。

1.7.5 免疫组化检测表皮增殖和TRM标志蛋白 取蜡块切片，60 ℃ 2 h融化石蜡，二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡。枸橼酸盐缓冲液中98 ℃加热15 min修复抗原，滴加3%H_2O_2阻断内源性过氧化物剂，室温孵育10 min。5%正常山羊血清进行封闭20 min，滴加一抗（CD3或CD103或PCNA抗体），放在湿盒中4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育15 min。滴加HRP标记亲和素工作液，室温孵育15 min，滴加DAB显色液，苏木精染色液复染8 s，0.5%盐酸乙醇分化2 s，自来水返蓝30 min。切片经过梯度乙醇脱水，用中性树脂封片，显微镜观察并拍照。

1.7.6 荧光定量qPCR检测mRNA表达 取皮肤组织约20 mg，加1 mL Trizol试剂，5 000 r·min^{-1} 30 s匀浆组织，异丙醇沉淀，75%乙醇洗涤法提取总核糖核酸（RNA），在核酸蛋白微量定量仪上测RNA纯度和浓度。将浓度调整为1 000 ng·mL^{-1}左右。按照相关反转录试剂盒说明，将总RNA逆转录成互补脱氧核糖核酸（cDNA），总RNA为1 000 ng，每个样品的逆转录体系为20 μL。引物序列由NCBI网站软件设计，由Life technology公司合成。qPCR反应体系为10 μL，其中引物终浓度为400 nmol·L^{-1}，反转录产物1 μL；反应条件设置Step 1：95 ℃ 30 s；Step 2：95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40个循环。

表2 引物的序列

genes	Primer sense(5'-3')	Primer antisense(5'-3')
β-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL7	TTCCTCCACTGATCCTTGTTCT	AGCAGCTTCCTTTGTATCATCAC
IL15	ACATCCATCTCGTGCTACTTGT	GCCTCTGTTTTAGGGAGACCT
BCL6	CCGGCACGCTAGTGATGTT	TGTCTTATGGGCTCTAAACTGCT
PRDM1	CTTCTCTTGGAAAAACGTGTGGG	TCATATCAGCGTCCTCCATGT
Eomes	GCGCATGTTTCCTTTCTTGAG	GGTCGGCCAGAACCACTTC
IL17	GGCCCTCAGACTACCTCAAC	TCTCGACCCTGAAAGTGAAGG
IL23	AATAATGTGCCCCGTATCCAGT	GCTCCCCTTTGAAGATGTCAG
TNFα	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC

1.7.7 蛋白质印迹法（Western blot）检测STAT5磷酸化水平 称取约50 mg皮肤组织，剪碎，加入8体积的RIPA裂解液，用匀浆机匀浆，冰上裂解30 min，期间偶尔涡旋震荡。然后在4 ℃ 12 000 r·min^{-1}，离心10 min，取上清，BCA法测定蛋白浓度后。蛋白上样量为30 μg，与上样缓冲液混匀，100 ℃加热10 min变性，样品-20 ℃保存备用。配制8%丙烯酰胺分离胶，半干转法转膜（PVDF膜），转膜结束用5% BSA封闭1 h。根据说明书稀释人磷酸化信号转导子与转录激活子5抗体（P-STAT5 Ab）（CST，25656S），于4 ℃孵育过夜；用含5% BSA按1∶5 000提前配制HRP标记的二抗，室温孵育1 h。按1∶1配制化学发光液，在化学发光成像仪上成像，Image J软件分析蛋白条带。

1.7.8 统计学方法 实验数据均符合正态分布，以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用独立样本t检验进行2组间比较；以$P<0.05$为差异有统计学意义。关于免疫印迹法的数据统计，首先对每张膜的各条带光密度值采用整体均数法使各条带归一化，每次重复的实验结果均采用该方法先归一化，再合并每次的结果进行统计分析。实验的相关数据和结果以Graphpad Prism 8.0软件进行数据统计与分析和作图。

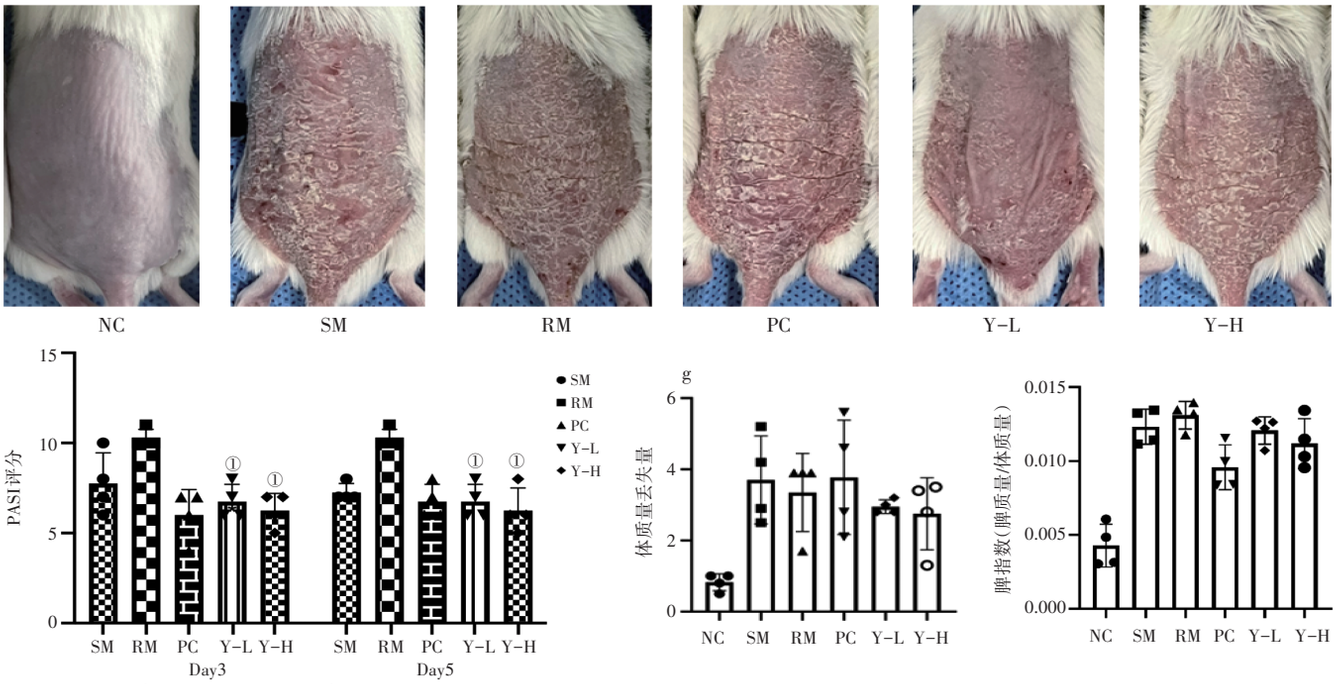
2 结果

2.1 银屑灵方能改善银屑病复发模型小鼠皮损 见图2。复发造模第3天，所有造模小鼠皮肤出现了典型的银屑病样病变，如红斑、鳞屑和浸润明显；与单发模型组比较，复发模型组表现更为严重；阳性药组与银屑灵方低剂量组、高剂量组的病变程度较轻；第5天维持类似情况，阳性药组以及银屑灵方低剂量组、高剂量组小鼠与复发模型组比较，皮肤增厚较轻，红斑、鳞屑等皮损症状轻。造模第3天、第5天，银屑灵方低剂量、高剂量组小鼠的背部皮肤PASI评分较复发模型组下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。值得注意的是，阳性药组在单次给药时能明显减轻皮损症状（图未展示），但在复发过程中，对皮损并无明显的缓解作用。此外，银屑灵方能降低脾脏指数，抑制小鼠造模期间的体质量丢失，这提示银屑灵方不仅能缓解寻常型银屑病复发症状，还能减轻造模剂IMQ的副作用。

2.2 银屑灵方抑制银屑病复发模型小鼠皮损区表皮增殖 见图3。取复发模型小鼠皮损区皮肤作HE染色，观察表皮增殖情况。每组小鼠中所有小鼠选取5个不同位置进行测量，测量值取平均值作为该小鼠表皮厚度，记录数据进行统计。结果显示：与空白组比较，单发模型组和复发模型组小鼠表皮均明显增厚，皮棘也较多。与复发模型组比较，阳性药组未见明显变薄，皮棘数量也未见减少；而银屑灵方

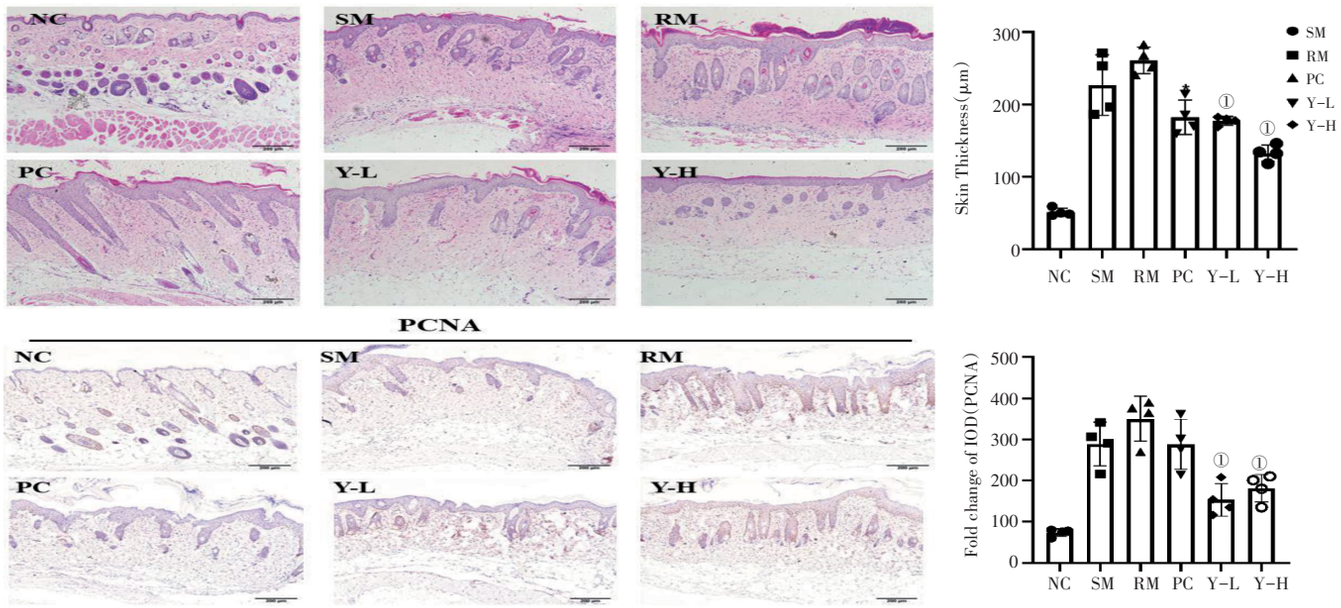
给药组(高、低剂量)皮棘明显减少，银屑灵方高剂量组小鼠表皮变薄($P<0.05$)。

PCNA是细胞增殖的标志蛋白，表达在细胞核内，实验发现在银屑病复发模型小鼠的皮肤组织中表达升高。与复发模型组比较，银屑灵方低剂量和高剂量组小鼠皮肤组织PCNA蛋白表达明显下降($P<0.05$)。



注：NC：正常对照组；SM：单发模型组；RM：复发模型组；PC：阳性药组(作为阳性药对照组)；Y-L：银屑灵低剂量组；Y-H：银屑灵高剂量组。①与复发模型组比较，$P<0.05$

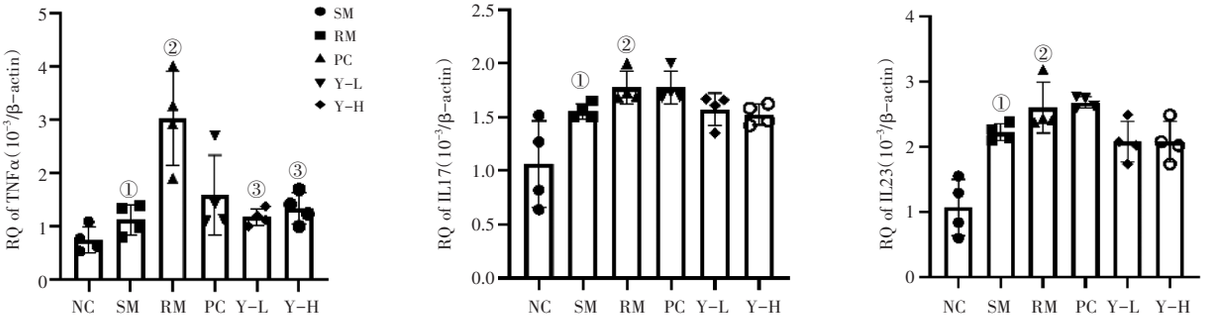
图2　银屑病复发小鼠皮损评分及体质量丢失、脾指数情况



注：NC：正常对照组；SM：单发模型组；RM：复发模型组；PC：阳性药组；Y-L：银屑灵低剂量组；Y-H：银屑灵高剂量组。①与复发模型组比较，$P<0.05$

图3　小鼠皮损区表皮厚度和PCNA表达情况(标尺：200 μm)

2.3　银屑灵方下调银屑病相关炎症因子mRNA表达　见图4。白细胞介素(IL)17/IL23是银屑病的关键发病轴，在寻常型银屑病模型小鼠，IL17、IL23、肿瘤坏死因子α(TNFα)在发病小鼠皮损处的mRNA表达水平显著升高。与正常对照组比较，单发模型组IL17、IL23、TNFα mRNA的表达水平均有所升高；与单发模型组比较，复发模型组IL17、IL23、TNFα mRNA的表达水平显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；与复发模型组比较，银屑灵方给药组(高、低剂量)小鼠TNFα表达量显著下降，差异有统计学意义($P<0.05$)；IL17和IL23mRNA的表达水平有下降的趋势，但差异无统计学意义($P>0.05$)。



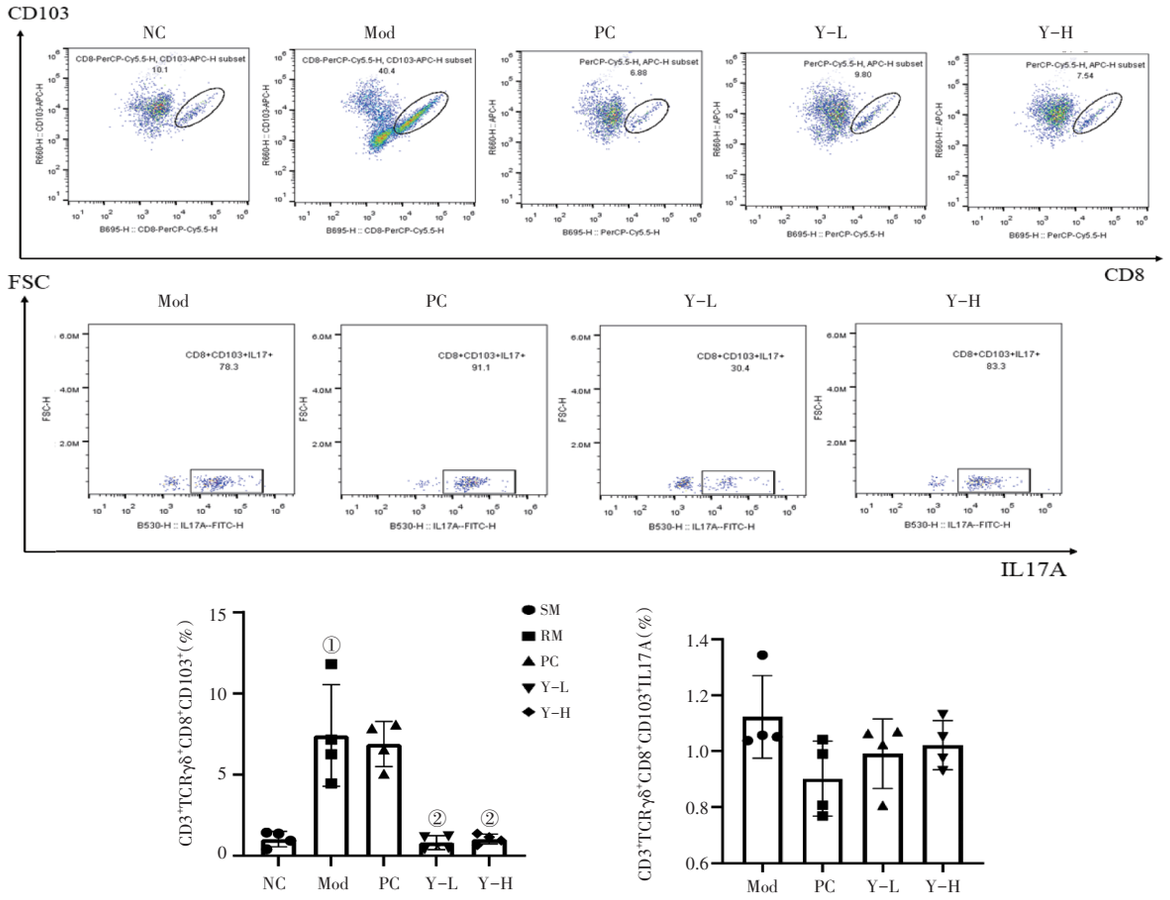
注：NC：正常对照组；SM：单发模型组；RM：复发模型组；PC：阳性药组；Y-L：银屑灵低剂量组；Y-H：银屑灵高剂量组。①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与单发模型组比较，$P<0.05$；③与复发模型组比较，$P<0.05$

图4　银屑病相关炎症因子mRNA表达的表达

2.4　银屑灵方抑制银屑病小鼠缓解期皮损区TRM细胞数量和功能　见图5。通过分析皮肤T细胞多种组合表型，发现在复发模型组小鼠缓解期的皮损区，表型为$CD3^+TCR\gamma\delta^+CD8^+CD103^+$的细胞数量较正常对照组明显增多($P<0.05$)，可推断这类细胞与寻常型银屑病的复发密切相关的TRM细胞。与复发模型组比较，银屑灵方低、高剂量组小鼠皮肤$CD3^+TCR\gamma\delta^+CD8^+CD103^+$细胞数量有显著性下降($P<0.05$)。另取分离的原代皮肤细胞，用Leukocyte Activation Cocktail刺激5 h后，进行胞内IL17A染色，用流式细胞术检测其含量。与预期结果不同的是，正常对照组细胞较模型组产生的IL17A多，但银屑灵方给药低、高剂量组则产生减少，但差异并无统计学意义($P>0.05$)。以上结果提示银屑灵方可能是通过调节缓解期TRM的数量和功能达到减缓后续复发模型的症状。

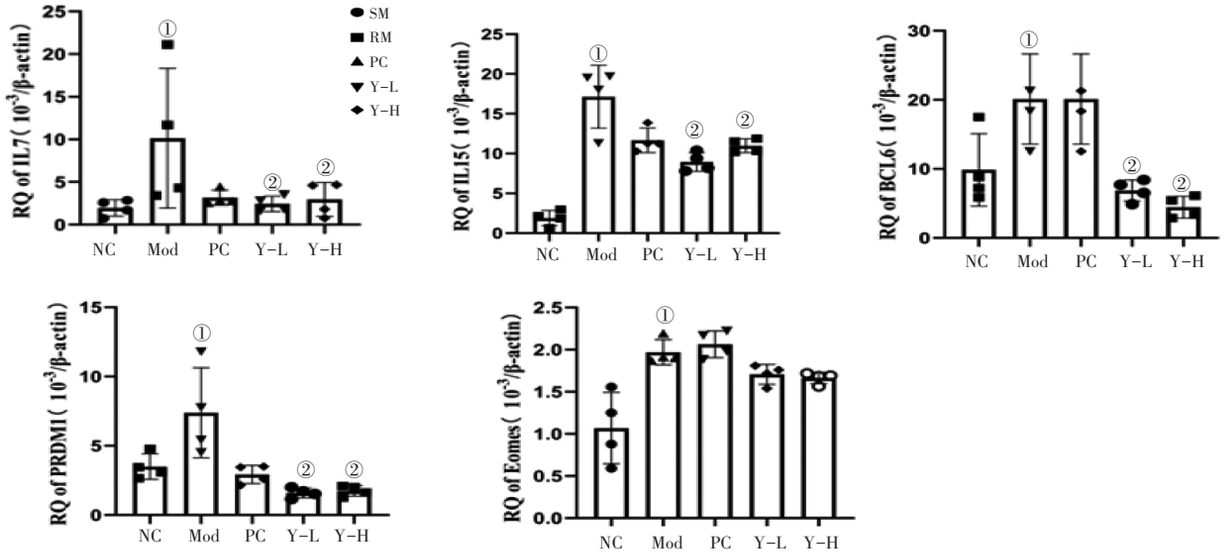
2.5　银屑灵方下调TRM细胞产生与存活相关因子水平　见图6。采用荧光定量PCR方法，检测银屑病小鼠缓解期皮损区IL7、IL15、BCL6、PRDM1和Eomes等基因表达水平。结果显示，与正常对照组比较，复发模型组小鼠缓解期皮损的IL7、IL15、BCL6、PRDM1和Eomes基因表达水平显著上调($P<0.05$)，其中IL7、IL15、BCL6和PRDM1基因表达，在银屑灵方低或高剂量组均有显著下调($P<0.05$)。Eomes基因表达水平在银屑灵方低、高剂量组也有下调，但差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果提示银屑灵方可以通过调节皮损区微环境的部分促TRM细胞形成与存活的因子，抑制TRM的数量与功能而发挥改善银屑病复发症状。

2.6　银屑灵方抑制TRM细胞表型和存活相关蛋白表达　见图7。为进一步观察银屑灵方对皮肤组织原位TRM细胞数量的影响，采用免疫组化方法，染色TRM细胞特征性表型蛋白CD3和CD103，与TRM细胞流式细胞术结果一致。与正常对照组比较，CD3和CD103蛋白在复发模型组染色数目明显增多，而在银屑灵方低剂量和高剂量组的染色数目均有减少，差异均有统计学意义($P<0.05$)。为了探讨皮损区IL15上游激酶STAT5的活性水平，采用免疫印迹的方法检测皮肤STAT5磷酸化水平，复发模型小鼠STAT5的磷酸化水平显著上调($P<0.05$)；在银屑灵方低、高剂量组均有显著下调($P<0.05$)。该结果从组织原位角度提示TRM细胞数量和活性在皮损区有所下降。



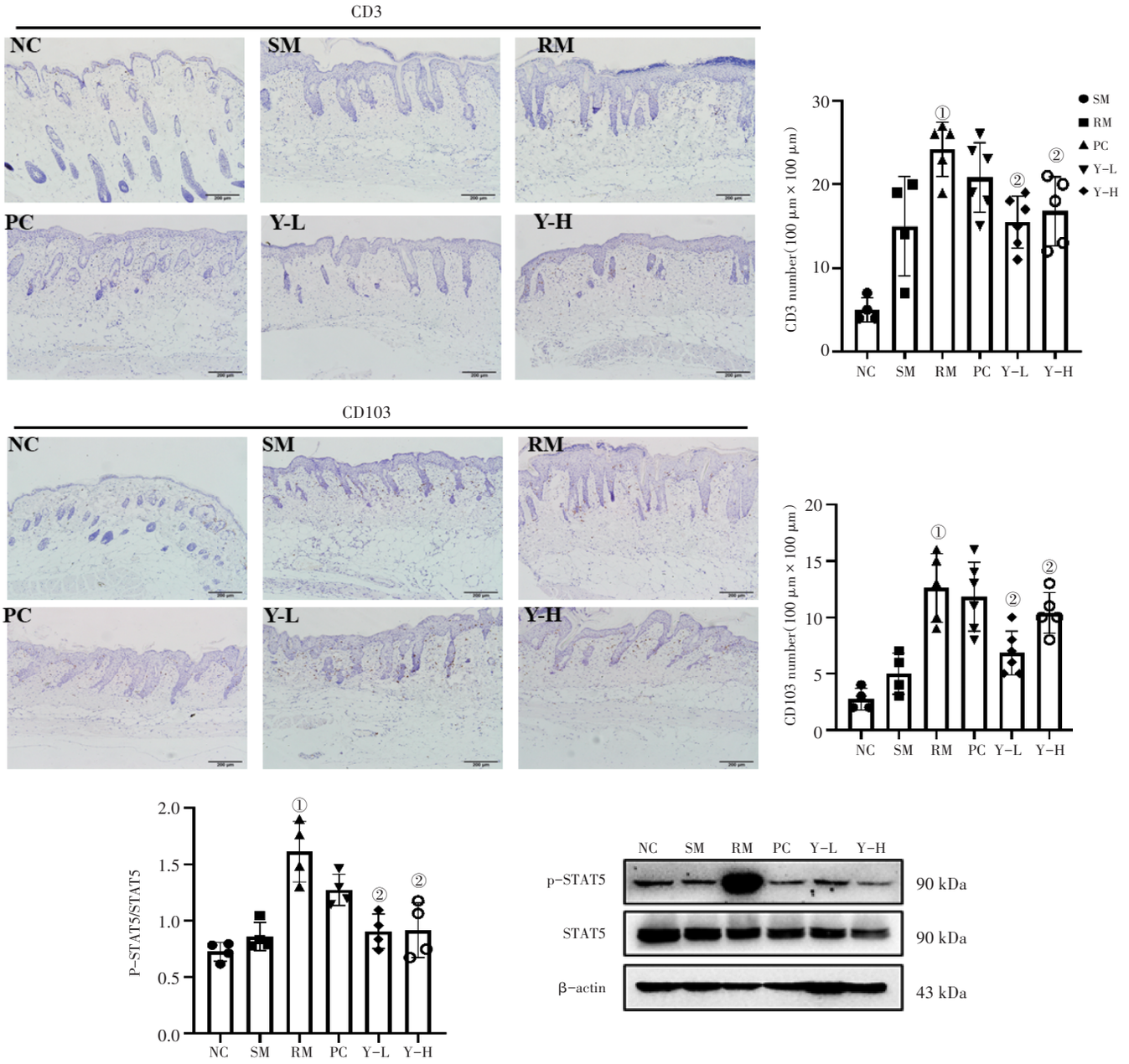
注：NC：正常对照组；Mod：复发模型组；PC：阳性药组；Y-L：银屑灵方低剂量组；Y-H：银屑灵方高剂量组。①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与复发模型组比较，$P<0.05$

图5　银屑病缓解期TRM细胞（$CD3^+TCR\gamma\delta^+CD8^+CD103^+$）数量和功能



注：NC：正常对照组；Mod：复发模型组；PC：阳性药组；Y-L：银屑灵低剂量组；Y-H：银屑灵高剂量组。①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与复发模型组比较，$P<0.05$

图6　TRM细胞产生与存活相关因子的表达水平



注：NC：正常对照组；SM：单发模型组；RM：复发模型组；PC：阳性药组；Y-L：银屑灵低剂量组；Y-H：银屑灵高剂量组。①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与复发模型组比较，$P<0.05$

图7　银屑病复发小鼠皮损组织CD3、CD103表达及STAT5活化情况（标尺：200 μm）

3　讨论

瘥后防复属中医治未病范畴，也是临床治疗难点。近年来，现代中医逐渐认识到伏邪是慢性炎症性疾病复发的重要内因，寻常型银屑病正是此类疾病。禤国维教授认为，银屑病的发生是由于气血凝滞，营卫失和，毒邪蕴热，外发于皮肤而发病；若伴有脏腑受损，血气失和，久病入络等诸多病理因素，终致邪毒遏伏机表，无以充养新血，瘀毒难以宣泄而发病。因此治疗时以瘀、毒、燥立论，以凉血活血解毒为主、佐以祛风通络润燥。银屑灵方中以紫草、赤芍、莪术、土茯苓等凉血活血解毒药为主，佐以辛、苦、微温之肿节风和辛、温之川芎，既防寒凉药物滞留邪气之弊，又增强透邪外出之效，组方精妙。

本研究观察银屑灵方对银屑病复发模型小鼠复发症状的效果，主要从小鼠皮损表观、PASI评分、体质量、脾脏指数、HE染色观察组织形态学变化；细胞因子IL17、IL23、TNFα以及PCNA蛋白等进行分析。发现银屑灵方能缓解银屑病复发模型小鼠的部分皮损症状和调节部分微观指标，如表皮厚度和银屑病发病相关促炎因子TNFa的表达。另外，本研究还探讨了银屑灵方对银屑病模型小鼠缓解期(复发前)原皮损区TRM数量与功能，以及TRM存活微环境因子IL7、IL15、BCL6、PRDM1和Eomes等的影响，发现银屑灵方能够减少银屑病小鼠缓解期皮损处表型为$CD3^+TCR\gamma\delta^+CD8^+CD103^+$TRM细胞数量及分泌IL17A的功能。对皮损微环境中IL15、IL7、BCL6和PRDM1基因表达均有抑制效应，下调IL15上游激酶STAT5的磷酸化水平。这些结果提示凉血活血解毒透邪法可调节TRM细胞存活与增殖的微环境，从而达到减缓寻常型银屑病复发的效果。由于技术限制，未能对皮损区TRM细胞进行原位多重染色，开展定位研究，提供更为直观的证据。但本研究采用免疫组化单染方法作为替代，观察皮损区TRM细胞特征性表型蛋白CD3、CD103，发现该复方可以不同程度降低特征性蛋白的染色数目，可辅助说明皮损区TRM细胞的减少。

银屑病作为慢性、免疫性炎症性疾病的代表，此类疾病易临床治愈后复发，是临床实践中需解决的棘手问题，本研究关注的致病性TRM细胞作为伏邪的生物学基础，用透邪方法作为祛伏邪的常识性研究，为中医药治疗复发型炎症性疾病的研究和治疗提供一种新的思路。

[参考文献]

[1] ARMSTRONG A，READ C. Pathophysiology，Clinical Presentation，and Treatment of Psoriasis：A Review[J]. JAMA，2020，323(19)：1945-1960.

[2] GRIFFITHS C E M，ARMSTRONG A W，GUDJONSSON J E，et al. Psoriasis[J]. The Lancet，2021，397(10281)：1301-1315.

[3] NESTLE F O，KAPLAN D H，BARKER J. Mechanisms of Disease：Psoriasis[J]. N Engl J Med，2009，361(5)：496-509.

[4] TASHIRO T，SAWADA Y. Psoriasis and Systemic Inflammatory Disorders[J]. Int J Mol Sci，2022，23(8)：4457.

[5] 伊美慧，邱莹. 银屑病复发相关的免疫学研究进展[J]. 皮肤性病诊疗学杂志，2019，26(1)：53-56.

[6] 张学军. 中国银屑病诊疗指南(2018完整版)[J]. 中华皮肤科杂志，2019，52(10)：667-710.

[7] RENDON A，SCHAKEL K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment[J]. Int J Mol Sci，2019，20(6)：1475.

[8] SASSON S C，GORDON C L，CHRISTO S N，et al. Local heroes or villains：tissue-resident memory T cells in human health and disease[J]. Cell Mol Immunol，2020，17(2)：113-122.

[9] TIAN D，LAI Y. The Relapse of Psoriasis：Mechanisms and Mysteries[J]. JID Innov，2022，2(3)：100116.

[10] DELI F，ROMANO F，GUALINI G，et al. Resident memory T cells：Possible players in periodontal disease recurrence[J]. J Periodontal Res，2020，55(2)：324-30.

[11] DAS D，AKHTAR S，KURRA S，et al. Emerging role of immune cell network in autoimmune skin disorders：An update on pemphigus，vitiligo and psoriasis[J]. Cytokine Growth Factor Rev，2019，45：35-44.

[12] OWCZARCZYK SACZONEK A，KRAJEWSKA-WLODARCZYK M，KASPROWICZ-FURMANCZYK M，et al. Immunological Memory of Psoriatic Lesions[J]. Int J Mol Sci，2020，21(2)：625.

[13] 张鑫. 中医伏邪理论研究[D]. 济南：山东中医药大学，2007.

[14] 张文娟，韩凌，危建安. 从免疫性炎症疾病复发特征试论中医伏邪的生物学基础[J]. 中国中西医结合杂志，2023，43(2)：236-240.

[15] 王蕾，黄咏菁，王敏华. 银屑灵片治疗寻常型银屑病的临床观察[J]. 广州中医药大学学报，2009，26(6)：520-522，525.

(责任编辑：冯天保，邓乔丹)