

开玄解毒核心方调节银屑病模型小鼠冷敏TRPM8神经元 衍生信号改善银屑病皮损

肖雪¹, 杨斌¹, 孙美琪¹, 杨昊若², 张宁馨¹, 李佳琦¹, 刘欢¹, 江梦瑶³, 余远遥^{1*}, 宋坪^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 天津中医药大学, 天津 301617;

3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] **目的:**探讨在寒冷环境暴露下,开玄解毒核心方对银屑病样模型小鼠皮损的改善作用,并分析其对瞬时受体电位(TRP)通道及相关神经免疫调节因子的影响。**方法:**将36只C57BL/6J小鼠随机分为6组,每组6只。设常温与寒冷[模拟低温环境(10 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,每日6 h]2种饲养条件,采用咪喹莫特外涂诱导银屑病样小鼠模型,模型动物分为模型组和开玄解毒核心方($30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续灌胃5 d)治疗组,以相应正常小鼠作为对照,分别为常温组、常温模型组、常温开玄解毒核心方组、寒冷对照组、寒冷模型组、寒冷开玄解毒核心方组。通过苏木素-伊红(HE)染色观察皮损组织病理变化;免疫荧光法检测分化簇(CD)3⁺T淋巴细胞、CD11c⁺树突状细胞(DCs)、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)及P物质(SP)的表达;通过蛋白免疫印迹法检测皮肤组织中瞬时受体电位阳离子通道亚家族M成员8(TRPM8)蛋白的表达;免疫组化与实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分别检测TRPM8、瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员1(TRPV1)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族A成员1(TRPA1)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员2(TRPV2)在蛋白和mRNA水平的表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)分析血清中降钙素基因相关肽(CGRP)与神经肽Y(NPY)含量;结合GEO数据库进行差异基因富集分析及TRP通路网络构建;免疫荧光双验证该方影响皮损中TRPM8与CGRP的共表达。**结果:**常温和寒冷组模型小鼠均出现典型银屑病样皮损,与常温、寒冷对照组比较,模型组小鼠表皮角化过度、棘层增厚及真皮炎症浸润,病理评分明显升高($P<0.05$),CD3⁺、CD11c⁺细胞浸润及p-ERK、SP表达增加,TRPM8、TRPA1、TRPV2的mRNA表达上升,TRPV1的mRNA表达明显下降($P<0.05$),血清中CGRP含量显著降低,而NPY含量升高。而与常温和寒冷组模型小鼠比较,开玄解毒核心方组能显著改善银屑病样小鼠病理表现及病理评分($P<0.05$),并可抑制CD3⁺、CD11c⁺细胞浸润及p-ERK、SP表达。基因富集分析提示银屑病差异基因显著富集于白细胞介素(IL)-17信号通路、TRP通道炎症调节等通路。开玄解毒核心方组较常温与寒冷模型组小鼠比较,可逆转上述TRP通道亚家族相关基因mRNA的异常表达($P<0.05$),并调节CGRP水平回升、NPY水平下降。免疫荧光双标进一步证实相较于模型组,开玄解毒核心方能下调皮损中TRPM8与CGRP的共表达。**结论:**开玄解毒核心方可能通过下调皮损中过度表达的冷敏受体TRPM8,纠正其介导的神经肽(如SP、CGRP)释放紊乱,进而通过抑制IL-23/辅助性T细胞(Th)17核心炎症通路抑制炎症细胞浸润与ERK信号通路激活,调控“玄府-TRPM8-神经免疫”轴,从而改善银屑病样皮损。

[关键词] 开玄解毒核心方;银屑病;瞬时受体电位阳离子通道亚家族M成员8(TRPM8);神经免疫;玄府

[中图分类号] R256;R275;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)19-0089-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20261522

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260608.1039.006>

[网络出版日期] 2026-06-08 12:43:07 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Kaixuan Jiedu Core Prescription Alleviates Psoriatic Skin Lesions in Mice by Modulating Cold-sensitive TRPM8 Neuron-derived Signaling

XIAO Xue¹, YANG Bin¹, SUN Meiqi¹, YANG Haoruo², ZHANG Ningxin¹, LI Jiaqi¹,
LIU Huan¹, JIANG Mengyao³, SHE Yuanyao¹, SONG Ping¹

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

[收稿日期] 2026-03-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82474521);北京市高层次创新创业人才支持计划“登峰、青苗、春蕾”项目(G202514020)

[第一作者] 肖雪,博士,住院医师,从事皮肤性病学研究,E-mail:drxiaoxue@126.com

[通信作者] *宋坪,博士,主任医师,教授,博士生导师,从事皮肤性病学研究,E-mail:songping@vip.126.com;

*余远遥,博士,副主任医师,从事皮肤性病学研究,E-mail:sheyuanyao@aliyun.com

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the ameliorative effects of Kaixuan Jiedu core prescription (KXJD) on skin lesions in psoriasis-like mouse models under cold environment exposure, and to analyze its influences on transient receptor potential (TRP) channels and related neuroimmune regulatory factors. **Methods:** Thirty-six C57BL/6J mice were randomized into 6 groups, with 6 mice in each group. Two feeding conditions were set: Normal temperature and cold [simulating a cold environment at $(10 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, for 6 h daily]. Mice were induced to develop psoriasis-like lesions by applying imiquimod externally. The model mice were allocated into model groups and KXJD ($30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, continuous gavage for 5 days) groups. Normal mice were used as the control group. Specifically, mice were allocated into normal temperature, normal temperature model, normal temperature+KXJD, cold exposure control, cold exposure model, and cold exposure+KXJD groups. The pathological changes in skin lesions were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of cluster of differentiation (CD) 3^+ T lymphocytes, $\text{CD}11\text{c}^+$ dendritic cells (DCs), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), and substance P (SP) were detected by immunofluorescence assay. The protein level of transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (TRPM8) in the skin tissue was determined by Western blot. The expression of TRPM8, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), transient receptor potential cation channel subfamily A member 1 (TRPA1), and transient receptor potential cation channel subfamily V member 2 (TRPV2) at the protein and mRNA levels was determined by immunohistochemistry and Real-time PCR, respectively. The levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and neuropeptide Y (NPY) in the serum were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) and TRP pathway network construction were conducted based on the GEO database. The co-expression of TRPM8 and CGRP in the skin lesions was verified by immunofluorescence double labeling. **Results:** Both the normal temperature and cold exposure model groups showed typical psoriasis-like skin lesions. Compared with the normal temperature and cold exposure control groups, the model groups had excessive epidermal keratinization, thickened spinous layer, and inflammatory infiltration in the dermis, with increased pathological scores ($P<0.05$), increased infiltration of $\text{CD}3^+$ and $\text{CD}11\text{c}^+$ cells and expression of p-ERK and SP, upregulated mRNA levels of TRPM8, TRPA1, and TRPV2, downregulated mRNA level of TRPV1 ($P<0.05$), and reduced content of CGRP and increased content of NPY in the serum. Compared with the normal temperature and cold exposure model groups, KXJD reduced the pathological manifestations and pathological scores of psoriasis-like skin lesions ($P<0.05$), and inhibited the infiltration of $\text{CD}3^+$ and $\text{CD}11\text{c}^+$ cells and the expression of p-ERK and SP. Gene enrichment analysis suggested that the DEGs of psoriasis were significantly enriched in the interleukin (IL)-17 signaling pathway and TRP channel inflammatory regulation. Compared with the normal temperature and cold exposure model groups, KXJD reversed the abnormal mRNA levels of genes related to the TRP channel subfamilies ($P<0.05$), increased the CGRP level, and decreased the NPY level. Immunofluorescence double labeling further confirmed that compared with the model groups, KXJD down-regulated the co-expression of TRPM8 and CGRP in the skin lesions. **Conclusion:** KXJD may ameliorate psoriasis-like skin lesions by downregulating the overexpressed cold-sensitive receptor TRPM8 in skin lesions and correcting the disorder of neuropeptide (such as SP and CGRP) release mediated by it, thereby inhibiting the IL-23/helper T cell 17 (Th17) core inflammatory pathway, suppressing the infiltration of inflammatory cells and the activation of the ERK signaling pathway, and regulating the Xuanfu (sweat pore)-TRPM8-neuroimmune response axis.

[Keywords] Kaixuan Jiedu core prescription; psoriasis; transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (TRPM8); neuroimmunology; Xuanfu (sweat pore)

银屑病(Psoriasis)是一类临床常见的慢性、炎症性、复发性皮肤病,皮损以边界清楚的浸润性红色斑、上覆银白色鳞屑为特征,该病在全球的患病率为2%~3%,累计患者近1.25亿人;在我国,患者数量已达600万人左右,并持续增长^[1]。其病理生理学涉及遗传易感性、免疫系统功能障碍及环境触发因素之间的复杂相互作用。本病在中医理论体系中常被归为“白疔”或“松皮癣”等范畴,其核心病机一般认为与营血亏虚、血热内蕴,进而化燥生风,最终导致肌肤失养。临床上主要辨证分为血热证、血燥证及血瘀证3种基本证型,相应的治疗策略多以

清热凉血、养血润燥及活血化瘀为主。然而,对于部分病程迁延、病机错综复杂的患者,沿用传统辨证方药常显现出疗效的局限性。宋坪教授在深度传承名老中医朱仁康临床心得派学术思想的基础上,结合其丰富的临床实践经验,创新性地提出以“开通玄府、通络解毒”,即开玄解毒法为核心的治疗法则。该法则认为玄府闭郁是银屑病深层病机之一,强调通过开通郁闭的玄府、疏通络脉以解除蕴结之毒邪^[2]。基于此法结合宋坪教授临床经验形成开玄解毒核心方,已成为银屑病中医治疗中的有效策略^[3]。

本病常呈现明显的季节性特征,尤其在寒冷季节易出现加重趋势。现有研究表明,低温环境可能对机体免疫调节功能产生多重影响,从而参与炎症反应的加剧过程^[4]。银屑病的炎症核心机制主要涉及白细胞介素(IL)-23/辅助性T细胞(Th)17信号通路的异常活化,这一自身免疫反应会驱动角质形成细胞发生异常的增殖与分化。多项研究提示,包括季节变化在内的环境因素可能通过干扰昼夜节律等生理过程,对银屑病的临床表现起到调节作用^[5]。团队前期研究证实,开玄解毒核心方在银屑病治疗中展现出明确的临床疗效,可显著改善患者皮损严重程度评分及局部症状表现。在机制层面,该方能下调银屑病发病过程中炎症因子表达,调节关键的Th17与调节性T细胞(Treg)之间的免疫失衡状态,纠正免疫异常反应。所谓“玄府”,中医意为汗孔,开通玄府即开合汗孔,开玄解毒法与银屑病环境温度调节因素存在相关性。具体而言,寒冷刺激可能通过改变皮肤局部微环境中的细胞因子平衡、影响角质形成细胞的正常生理功能及引起皮肤血管收缩和血流减少等途径,进一步促进银屑病相关的炎症级联反应。有证据显示,诸如气温与湿度变化这类季节性因素,能够损害皮肤屏障功能,进而参与银屑病的发生与发展,然而其具体的分子机制仍有待深入解析。

现代研究发现,皮肤作为人体最大的“玄府”实体,其屏障功能、感觉传导及局部微环境稳态与温度感受器密切相关。瞬时受体电位离子通道亚家族M成员8(TRPM8)激活会导致钙离子内流,从而引发神经信号传递,最终被大脑感知为冷的感觉。其作为人体主要的冷感受器,传统上被认为主要在外周感觉神经元中表达,负责介导8~28℃范围内的凉爽感知及薄荷醇等化学物质诱导的冷感错觉。TRPM8能够在冷应激中发挥抗炎作用,在维持体温稳态、介导冷觉及与多种疾病状态,如慢性疼痛和炎症疾病等相关联方面发挥着关键作用^[6]。近年来的研究已明确证实,TRPM8不仅存在于神经系统,在非神经组织中也具有重要的生理功能,尤其是在表皮角质形成细胞中的功能性表达,使其成为皮肤这一最大器官中关键的温度感受与信号转导分子^[7]。有研究表明,小鼠暴露于低温或薄荷醇可能引起过敏反应或荨麻疹,这可能与TRPM8激活肥大细胞释放组胺等炎症介质有关。玄府郁闭可能对应于TRPM8通道功能或信号传导的异常亢进,导致神经源性炎症和免疫紊乱。中医“开玄”的生

物学基础可能在于激活皮肤固有的TRPM8⁺冷觉神经元网络,从而调控下游树突状细胞等免疫细胞功能,恢复皮肤免疫稳态。

本研究将开玄解毒理论、温度感受神经生物学与皮肤免疫学相结合,旨在系统阐释开玄解毒核心方通过调节“TRPM8⁺感觉神经与树突状细胞的相互作用”轴改善银屑病的机制,为“玄府-神经-免疫”理论假说提供实证支持,并为银屑病治疗提供新靶点。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6J雄性小鼠共36只,6~8周龄,体质量(20±2)g,购买于北京维通利华动物科技有限公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0006。

1.2 伦理 本实验在已获得中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会批准后进行,伦理批件号2025XLC041-2。

1.3 仪器 TPI020型全自动脱水机、RM2016型病理切片机(德国Leica公司);BX53型显微镜(日本Olympus公司);C250 V型微型高速离心机(美国Labnet公司);HH6型数显恒温水浴锅(金坛市科研仪器有限公司);XH-C型旋涡混合器(江苏正基仪器有限公司);D1008型大龙EZeeMini掌上离心机(大龙兴创实验仪器北京股份公司);Centrifuge 5424R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo Scientific公司);7300型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);ZWF-211型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);SpectraMax M5/M5e型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);DYCZ-24DN型电泳仪、DYCZ-40D型转印槽(北京六一仪器厂);Universal Hood II型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.4 药物与试剂 开玄解毒核心方组成为麻黄6g、桂枝9g、赤芍9g、虎杖10g、青蒿20g、白花蛇舌草20g,北京康美制药有限公司生产,生产批号分别为250960521、251262081、250960001、251060921、251160651、251262051),购买于中国中医科学院广安门医院,经杨辉副主任药师鉴定,符合2025年版《中华人民共和国药典》标准。制备方法为1剂饮片加入5倍量无菌纯净水浸泡30min,煎煮至沸腾,转文火煎煮30min,滤取药液后续加5倍量的无菌蒸馏水,依前法煎煮后再次过滤。将2次滤取的中药原液混合,文火煎煮浓缩至

12.5 mL, 获得中药母液 $5.92 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4°C 储存, 给药前稀释至有效浓度。中药水煎液样品给药将人用量按成人 60 kg, 人转换系数 37, 小鼠转换系数 3 计算, 开玄解毒核心方组小鼠等效剂量分别为 $15.21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结合课题组前期摸索, 开玄解毒核心方二倍等效剂量即高剂量药效学效果最佳, 即每日给予中药剂量 $30.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。5% 咪喹莫特 (IMQ) 乳膏 (四川明欣药业有限责任公司, 规格 3 g, 国药准字 H20030129, 批号 19040440)。

二甲苯、牛血清白蛋白 (BSA)、Triton (德国 Sigma 公司, 货号分别为 534056、V900933、X100); 互补 DNA (cDNA) 反转录试剂盒、Real-time PCR SYBR Green 试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司, 货号分别为 11119ES60、11203ES03); 总核糖核酸 (RNA) 提取试剂盒、磷酸盐缓冲液 (PBS)、红细胞裂解液、无酶无菌水、中性甲醛固定液、切片石蜡、苏木素染液、伊红染液、高效放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液、二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、5×蛋白上样缓冲液 (含二硫苏糖醇)、增强化学发光 (ECL) 显色液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号分别为 R1200、P1020、R1010、R1600、G2161、YA0012、H8070、G1100、R0010、PC0020、P1040、PE0010); 三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 货号分别为 10006818、80109218、10009218); 内源性过氧化物酶阻断剂、酶标山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白 G (IgG) 聚合物通用试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号 PV-6000); 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (美国 Millipore 公司, 货号 WGPVDF45); 重组抗分化簇 (CD) 3 抗体、重组抗 CD11c 抗体、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 抗体、抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号分别为 ab11089、ab219799、ab217322、ab82226); TRPM8 兔单克隆抗体、瞬时受体电位阳离子通道亚家族 V 成员 1 (TRPV1) 多克隆抗体 (成都正能生物技术有限公司, 货号分别为 R382098、680834); 兔源人/小鼠/大鼠 P 物质 (SP) 多克隆抗体 (美国 RD 公司, 货号 MAB4375); 降钙素基因相关肽 (CGRP) 多克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 14348); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、洗脱液 (普通型)、预染蛋白分子量标准 (武汉赛维尔生物技术有限公司, 货号分别为 GB23301、GB23303、G2078-100ML、G2058-250UL)。

2 方法

2.1 银屑病模型小鼠的建立、分组及给药 本实验涉及所有 SPF 级小鼠于中国中医科学院西苑医院动物房屏障环境饲养, 实验期间环境温度 ($22.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$), 湿度 ($55 \pm 5\%$), 进行 12 h 光照、黑暗循环。实验开始前, 实验动物需对环境条件进行 1 周的适应性培养。实验开始前 1 d 进行背部脱毛, 使用电动剃毛刀剃除毛发, 局部涂抹脱毛膏清除残留的发根, 形成约 $2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$ 大小的皮肤暴露区域。将 36 只雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠在造模前通过随机数字表法分为 6 组, 以消除选择偏倚, 包括常温空白组、常温模型组、常温开玄解毒核心方组、寒冷空白组、寒冷模型组、寒冷开玄解毒核心方组。根据前期研究, 开玄解毒核心方的二倍等效剂量即高剂量药效最佳, 即开玄解毒核心方组小鼠给药剂量为 $30.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [2]。由于咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型维持周期较短, 本实验采取造模与药物干预同时进行的方法, 模型组与开玄解毒核心方组于实验开始第 1 日 11:00 外涂 5% 咪喹莫特软膏 62.5 mg 于小鼠背部脱毛暴露区域进行造模, 开玄解毒核心方治疗组小鼠从造模第 1 日起每日 17:00 予开玄解毒核心方中药液 0.2 mL 灌胃。造模有效性经临床表型与组织病理学双重验证: 小鼠皮损处可见境界清楚的红斑及片状鳞屑, 伴肥厚或隆起。组织病理学见表皮呈角化过度、棘层增厚等银屑病特征性改变, 提示造模成功。每日干预前对所有小鼠进行称质量、拍照。

常温组: 不造模, 背部外涂凡士林 62.5 mg, 每日予生理盐水 0.2 mL 灌胃, 进行对照实验; 常温模型组: 外涂 62.5 mg 咪喹莫特造模, 每日予生理盐水 0.2 mL 灌胃; 常温开玄解毒核心方组: 外涂 62.5 mg 咪喹莫特造模, 每日予开玄解毒核心方 ($30.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 水煎液 0.2 mL 灌胃。结合现有研究 [8-9] 及预实验, 寒冷环境小鼠分为寒冷对照组、寒冷模型组、寒冷开玄解毒核心方组, 均每日于相同固定时间 (9:00—15:00), 寒冷暴露小鼠分笼饲养于寒冷恒温舱 [$(10.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 相对湿度 ($55 \pm 5\%$)], 每日持续 6 h。寒冷暴露过程中监测箱内温度波动于 $\pm 0.5^\circ\text{C}$, 以确保寒冷刺激的稳定性。寒冷暴露结束后, 将 3 组小鼠重新置于常温环境, 环境及干预方式同常温对应组别。期间自由饮水饮食, 连续干预 5 d, 第 6 日取材。

2.2 小鼠皮肤组织样本采集 末次灌胃后 12 h 后, 即第 6 日, 进行拍照及称质量, 采用 0.3% 戊巴比妥

钠腹腔注射深度麻醉,确认角膜反射消失后,对小鼠进行脱颈处死后进行 C57BL/6J 小鼠组织样本取材。

2.3 HE染色观察小鼠皮肤组织病理变化 取固定在4%多聚甲醛中的皮肤组织,石蜡包埋,病理切片,经二甲苯脱蜡、无水乙醇梯度脱水,予HE染色、二甲苯透明、封片,在显微镜下观察小鼠皮肤组织病理组织形态学改变,组织切片通过单盲法进行评估,通过贝克(Baker)皮肤病理评分分析小鼠皮损严重程度^[10]。

2.4 免疫组化法(IHC)检测皮肤组织蛋白表达 小鼠皮肤组织石蜡包埋,切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇至水化,pH6.0柠檬酸盐高压修复、过氧化氢封闭,分别滴加一抗 TRPM8(1:200)、TRPV1(1:100),4℃冰箱过夜;次日滴加二抗,37℃孵育30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,封片。镜下拍照后,利用 Image J 图像分析软件进行分析,计算蛋白相对阳性表达面积。

2.5 免疫荧光法检测小鼠 CD3、CD11、p-ERK、SP、TRPM8 与 CGRP 基因表达 取小鼠背部皮损组织,4%多聚甲醛固定24 h,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,石蜡包埋,3 μm连续切片,切片依次脱蜡、水化处理,再使用乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲液实施抗原修复,以BSA进行封闭处理。将切片置于4℃条件下,与一抗 CD3(1:400)、CD11(1:200)、p-ERK(1:300)、SP(1:500)、TRPM8(1:200)与 CGRP(1:1000)孵育过夜。PBS洗涤3次,随后室温二抗孵育1 h,PBS洗涤二抗之后,滴加4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)溶液,孵育5 min。染色完成后,使用PBS避光清洗2次,抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下观察并采集图像。

2.6 Real-time PCR检测皮肤组织中信使核糖核酸(mRNA)表达 设计检测目的基因 TRPM8、TRPV1、瞬时受体电位阳离子通道亚家族A成员1(TRPA1)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族V成员2(TRPV2)及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物,交由北京易科基因技术有限公司合成,引物序列见表1。取小鼠皮肤组织样本,按照总RNA提取试剂盒说明书所述方法,进行样本总RNA的提取,并测定RNA浓度及纯度,按照逆转录扩增试剂盒说明书所述方法,将RNA逆转录为cDNA,逆转录条件为25℃、5 min,42℃、30 min,85℃、5 min,相对定量值进行统计分析,将样品加样于96-PCR板,置于Real-time PCR仪上进行PCR反应,两步法进行PCR

扩增程序:95℃预变性2 min,95℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸15 s,40个循环。各样品的目的基因和内参分别进行Real-time PCR反应,每个样本检测3个复孔。数据采用2^{-ΔΔC_T}法进行分析。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 CCACCATGTACCCAGGCATT	189
	下游 CGGACTCATCGTACTCCTGC	
TRPM8	上游 TATGAGACCCGAGCAGTGGA	155
	下游 GGCTGAGCGATGAAATGCTG	
TRPV1	上游 AGCCCCACATCTTTGCTACC	250
	下游 TCGAAGATGCTCCTGCGATC	
TRPA1	上游 TCTGCATATTGCCCTGCACA	159
	下游 ACTTTCATGCACTCGGGGAG	
TRPV2	上游 GCGAATGTTACATCCGAGC	234
	下游 CGCACTGTTCTCAGGTGAGT	

2.7 银屑病基因集获取及差异基因分析 本研究所用数据源于美国国立生物技术信息中心(NCBI)创立的基因表达数据库(GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),以“Psoriasis”为关键词检索,物种设置为“智人(Homo sapiens)”,获取银屑病数据集,数据集筛选要求:①数据集包含银屑病组和健康组,且每组样本量≥3;②银屑病组未经任何手段干预治疗;③数据集信息完整无缺失。使用RStudio(4.3.3版)的“limma”(3.58.1版)包对GSE14905数据集进行归一化处理,设定筛选标准为P<0.05,|log₂差异倍数(FC)|>1,得出银屑病差异基因(DEG),分别使用“ggplot2”(3.5.1版)包、“pheatmap”(1.0.12版)包绘制火山图和热图。

2.8 富集分析 运用“clusterProfiler”包(4.10.1版)通过基因本体(GO, <http://geneontology.org/>)和京都基因与基因组百科全书(KEGG, <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.Html>)数据库,以P<0.05,|log₂FC|>1为标准,对差异基因中上调最显著的前25个和下调最显著的25个基因进行富集分析。

2.9 蛋白免疫印迹法检测小鼠皮肤组织中目标蛋白表达 小鼠皮肤组织总蛋白通过裂解液裂解细胞后离心获得上清提取,并使用BCA法进行定量。经定量后,样品与上样缓冲液混合并煮沸变性。使用10%分离胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),依据蛋白分子量设置电泳参数。采用湿转法在100 V恒压条件下将蛋白转移至

PVDF膜上,转膜时间约1.5 h。转膜后用5%脱脂牛奶室温封闭2 h。将膜与稀释后的一抗TRPM8(1:1 000)、 β -actin(1:1 000)在4℃孵育过夜,TBST洗涤后,与相应种属的HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育2 h。使用ECL化学发光试剂在成像系统下进行显影与检测。

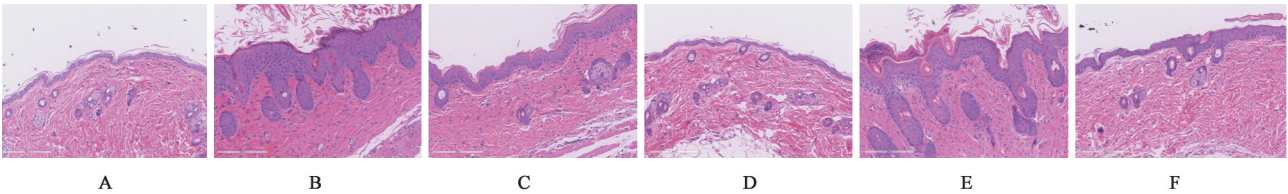
2.10 靶点蛋白预处理与分子对接分析可视化 本研究使用的蛋白TRPM8的结构来自蛋白质结构数据库(PDB,PDB ID: 7WRA),小分子的结构来自PubChem数据库,麻黄碱(ephedrine)CAS: 299-42-3,桂皮醛(Cinnamaldehyde)CAS: 104-55-2。使用Chemdraw将配体小分子从sdf格式转换为mol2格式文件。使用Autodock Vina (Version 1.5.7)软件对配体和受体进行去水加氢^[11],然后进行分子对接^[12],将整个蛋白设置为对接中心。通过“Iterated Local Search”算法,不断地进行局部搜索和重复迭代,寻找最佳的分子对接构象,对接次数设置为20次,根据对接得分进行构象排序挑选最优构象,使用PyMOL软件(Version 3.0.3)和Schrödinger

Maestro(14.0)进行结果分析与绘图操作。

2.11 统计学方法 数据采用SPSS 25.0软件进行统计分析,所有统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,组间两两比较采用SNK检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤组织病理学的改变 小鼠皮肤组织HE染色显示,与常温组、寒冷对照组小鼠比较,常温模型组及寒冷模型组小鼠皮肤角化过度,棘突增厚,皮突延长、起伏较大,存在Munro小脓肿,真皮层大量炎症细胞浸润,是典型的银屑病病理表现。与模型组比较,常温开玄解毒核心方组及寒冷开玄解毒核心方组皮损角质层与表皮层病理表现改善,开玄解毒核心方组皮损皮突起伏较为平缓,Munro小脓肿较少,见图1。与模型组比较,开玄解毒核心方能明显降低银屑病模型小鼠皮损Baker病理评分($P<0.05, P<0.01$),提示开玄解毒核心方能有效改善银屑病皮损病理表现。见表2。



注:A.常温组;B.常温模型组;C.常温开玄解毒核心方组;D.寒冷对照组;E.寒冷模型组;F.寒冷开玄解毒核心方组(图2-图8同)

图1 不同温度条件下开玄解毒核心方对银屑病小鼠皮肤组织病理学变化的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on histopathological changes of skin tissues in psoriatic mice under different temperature conditions (HE, ×200)

表2 不同温度条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤病理Baker评分的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on Baker's score of skin pathology in mice under different temperature conditions ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	皮肤病理Baker评分/分
常温组		0.42±0.38
常温模型组		7.00±0.84 ¹⁾
常温开玄解毒核心方组	30.42	2.67±0.61 ²⁾
寒冷对照组		0.42±0.38
寒冷模型组		7.17±1.08 ³⁾
寒冷开玄解毒核心方组	30.42	2.25±0.69 ⁴⁾

注:与常温组比较¹⁾ $P<0.01$;与常温模型组比较²⁾ $P<0.01$;与寒冷对照组比较³⁾ $P<0.05$;与寒冷模型组比较⁴⁾ $P<0.05$

3.2 不同温度下开玄解毒核心方对小鼠皮肤T淋巴细胞标记物CD3的表达 免疫荧光法测各组小鼠T淋巴细胞标记物CD3蛋白表达,阳性结果为绿

色。与常温组和寒冷对照组比较,常温模型组和寒冷模型组小鼠的皮肤病变中CD3的表达范围明显增大,荧光强度升高;与常温模型组和寒冷模型组比较,常温开玄解毒核心方组和寒冷开玄解毒核心方组皮肤组织CD3表达范围减少及荧光强度减弱。见图2。

3.3 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤T淋巴细胞标记物CD11c表达 免疫荧光法检测各组小鼠T淋巴细胞标记物CD11c蛋白表达,阳性结果为红色。与常温组和寒冷对照组比较,常温模型组和寒冷模型组小鼠的皮肤病变中CD11c的表达范围增大,荧光强度升高;与常温模型组和寒冷模型组比较,中药开玄解毒核心方组皮肤组织CD11c表达范围及荧光强度减少及荧光强度减弱。见图3。

3.4 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤p-ERK的表达 免疫荧光法检测各组小鼠皮肤中

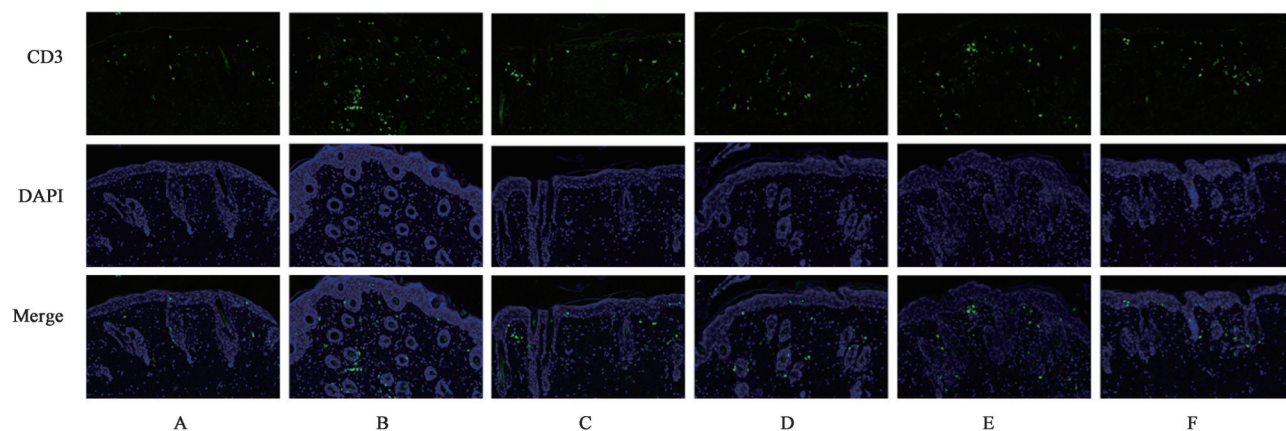


图2 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤皮损T淋巴细胞标志物CD3⁺的浸润变化的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 2 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription under cold condition on infiltration changes of T lymphocyte marker CD3⁺ in mouse skin lesions (IF,×200)

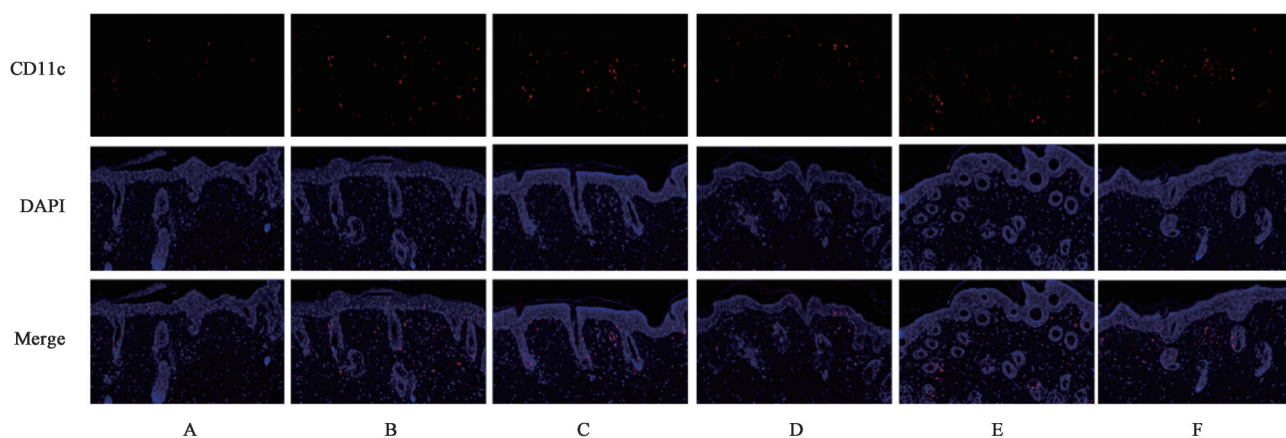


图3 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤皮损树突状细胞标志物CD11c⁺变化的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription under cold condition on changes of dendritic cell marker CD11c⁺ in mouse skin lesions (IF,×200)

p-ERK蛋白表达,阳性结果为绿色。与常温组和寒冷对照组比较,常温模型组和寒冷模型组小鼠的皮肤皮损中p-ERK的表达范围增大,荧光强度升高;与常温模型组和寒冷模型组比较,开玄解毒核心方组皮肤组织p-ERK表达范围减少及荧光强度减弱。见图4。

3.5 银屑病相关差异基因分析 检索GEO数据库获取银屑病基因数据集GSE14905,数据集基于芯片GPL570,包括银屑病皮损(Psoriasis)组样本33例,健康对照(Normal)组样本49例。均一化处理后,数据集各样本数据特征分布均匀。根据筛选标准,共获得1323个DEG,789个上调基因(红色点代表),534个下调基因(蓝色点代表)。健康人与银屑病患者差异基因及火山图见增强出版附加材料。

3.6 银屑病疾病差异相关基因GO和KEGG富集分析 对表达差异最显著的50个基因分别进行GO

和KEGG富集分析,以 $P<0.05$ 为筛选标准,将排名前5的相关生物学进程根据富集程度绘制成气泡图和弦图。结果显示,生物过程(BP)条目主要集中在应激反应、对外部刺激的反应、防御反应、自我平衡的过程及炎症反应上(GO-BP图见增强出版附加材料);细胞组分(CC)条目主要涉及细胞外区域、胞质、细胞外空间、细胞外区部分、囊泡(GO-CC图见增强出版附加材料);分子功能(MF)条目主要涉及信号受体结合、分子功能调节器、细胞因子活性、细胞因子受体结合、脂肪酸结合(GO-MF图见增强出版附加材料)。KEGG通路富集分析显示,主要与IL-17信号通路、Toll样受体信号通路、瞬时受体电位(TRP)通道的炎症介质调节,细胞因子-细胞因子受体相互作用、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、T细胞受体信号通路、Th17细胞分化、内皮生长因子(VEGF)信号

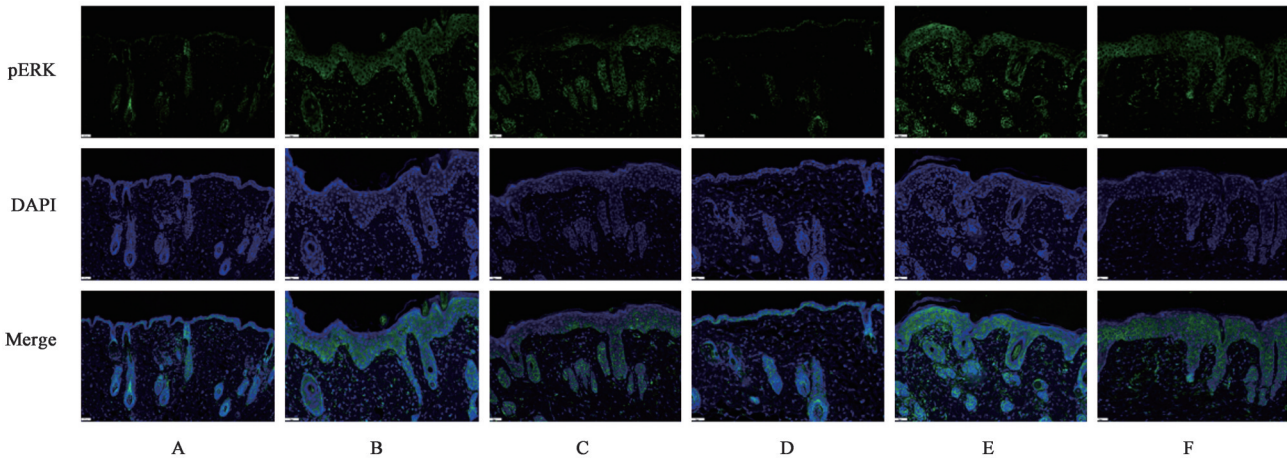


图4 不同温度下开玄解毒核心方对小鼠皮肤 p-ERK 变化的影响 (免疫荧光,×200)
Fig. 4 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on changes of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase p-ERK in mouse skin at different temperatures (IF,×200)

通路及 Th1 和 Th2 细胞分化有关(KEGG 分析图见增强出版附加材料)。进一步对 TRP 通路相关基因进行蛋白质互作网络分析,发现 TRPM8、TRPV1、TRPV2 等 TRP 家族成员为该网络中的关键节点 (TRP 相关通路交集靶点蛋白质相互作用网络见增强出版附加材料)。随后,笔者分析了这些基因在不同样本中的表达水平。结果显示,TRPM8 和 TRPV2 在银屑病皮损组织中呈现更高的表达水平,TRPV1 的表达水平降低 (GSE14905 验证相关分子表达图见增强出版附加材料)。

3.7 皮损组织中 TRPM8、TRPV1、TRPA1、TRPV2 mRNA 水平 通过 Real-time PCR 检测皮损组织中 TRP 通道家族成员 TRPM8、TRPV1、TRPA1、TRPV2 在 mRNA 的表达,与常温和寒冷对照组比较,常温模型、寒冷模型组小鼠皮肤中 TRPM8、TRPA1 及 TRPV2 mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$),TRPV1 的 mRNA 水平明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,常温、寒冷开玄解毒核心方组小鼠皮肤中 TRPM8、TRPA1 及 TRPV2 的 mRNA 水平明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 3。

表3 不同温度条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤组织中 TRPM8、TRPV1、TRPA1、TRPV2 mRNA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)
Table 3 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on expression levels of TRPM8, TRPV1, TRPA1 and TRPV2 mRNA in mouse skin tissue under different temperature conditions ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TRPM8	TRPV1	TRPA1	TRPV2
常温组		1.003±0.089	3.462±0.491	1.003±0.092	1.001±0.048
常温模型组		3.325±0.418 ²⁾	1.552±0.094 ¹⁾	2.479±0.151 ²⁾	3.043±0.394 ²⁾
常温开玄解毒核心方组	30.42	2.151±0.468 ⁴⁾	4.081±0.556 ⁴⁾	1.394±0.090 ⁴⁾	2.269±0.356 ³⁾
寒冷对照组		1.696±0.192 ¹⁾	2.041±0.399 ¹⁾	1.740±0.149 ¹⁾	1.514±0.194
寒冷模型组		4.899±0.692 ^{3,5)}	1.006±0.121 ^{3,5)}	3.427±0.381 ⁵⁾	5.065±0.712 ⁵⁾
寒冷开玄解毒核心方组	30.42	3.642±0.425 ⁷⁾	2.851±0.420	2.662±0.227 ⁷⁾	4.161±0.613 ⁶⁾

注:与常温组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与常温模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与寒冷对照组比较⁵⁾ $P<0.01$;与寒冷模型组比较⁶⁾ $P<0.05$,⁷⁾ $P<0.01$

3.8 蛋白免疫印迹法检测小鼠皮肤组织中 TRPM8 蛋白水平的表达 蛋白免疫印迹法检测开玄解毒核心方干预对银屑病小鼠皮损中 TRPM8 蛋白表达的影响,与常温组比较,寒冷对照组小鼠的皮肤组织中的 TRPM8 阳性表达增强 ($P<0.05$);与相应常温和寒冷对照组比较,常温和寒冷模型组小鼠的皮肤病变中的 TRPM8 阳性表达增强 ($P<0.05$),与对应的常温和寒冷模型组比较,常温和寒冷开玄解毒核心

方组小鼠皮肤组织 TRPM8 阳性表达减弱 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 5 及表 4。

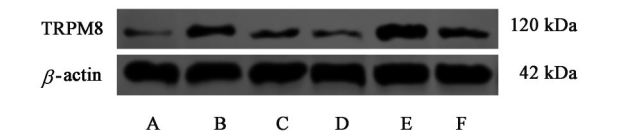


图5 小鼠皮肤皮损中 TRPM8 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of TRPM8 protein expression in mice skin lesions

表4 不同温度条件下开玄解毒核心方对银屑病小鼠皮损中TRPM8蛋白表达灰度值的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on gray value of TRPM8 protein expression in skin lesions of psoriasis mice under different temperature conditions ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TRPM8/ β -actin
常温组		0.14±0.03
常温模型组		0.50±0.08 ²⁾
常温开玄解毒核心方组	30.42	0.33±0.03 ³⁾
寒冷对照组		0.20±0.02 ¹⁾
寒冷模型组		0.67±0.05 ⁴⁾
寒冷开玄解毒核心方组	30.42	0.36±0.04 ⁵⁾

注:与常温组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与常温模型组比较³⁾ $P<0.05$;与寒冷对照组比较⁴⁾ $P<0.01$;与寒冷模型组比较⁵⁾ $P<0.01$

3.9 TRPM8与TRPV1蛋白水平的表达 免疫组化

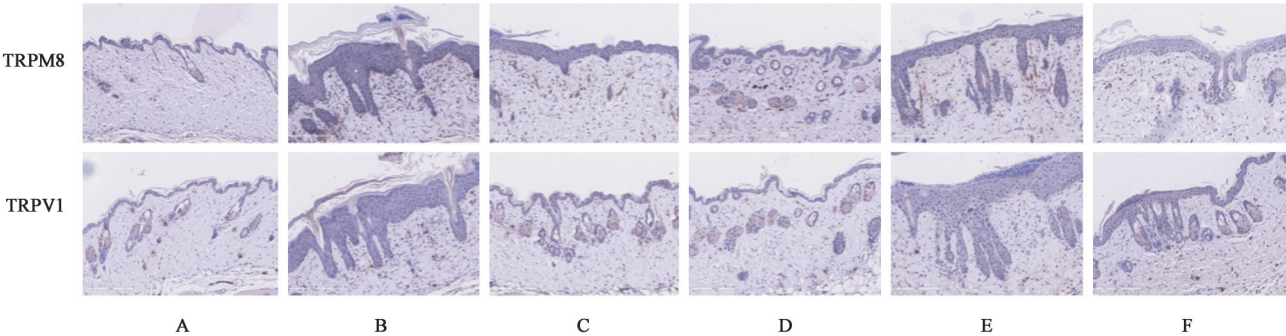


图6 不同温度条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤皮损中TRPM8与TRPV1表达的影响(免疫组化,×200)
Fig. 6 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on TRPM8 and TRPV1 in mouse skin lesions under different temperature conditions (IHC, ×200)

表5 不同温度条件下开玄解毒核心方对小鼠血清中细胞因子CGRP、NPY水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on levels of cytokines CGRP and NPY in mice serum under different temperature conditions ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CGRP	NPY
常温组		175.529±41.173	36.072±27.840
常温模型组		74.286±39.237	171.694±35.003
常温开玄解毒核心方组	30.42	186.059±32.181	118.208±21.374
寒冷对照组		236.523±76.234	68.106±78.301
寒冷模型组		89.092±53.407	231.508±45.194
寒冷开玄解毒核心方组	30.42	284.944±40.593	138.223±35.722

3.11 小鼠皮肤中SP的表达变化 免疫荧光法检测各组小鼠神经肽SP蛋白表达,阳性结果为绿色。与常温和寒冷正常组比较,常温和寒冷模型组小鼠的皮肤病变中SP的表达范围增大,荧光强度升高;与常温和寒冷模型组比较,中药开玄解毒核心方组皮肤组织SP

检测皮损组织中TRPM8、TRPV1在蛋白水平的表达,与常温和寒冷对照组比较,常温和寒冷模型组小鼠的皮肤病变中的TRPM8阳性表达增强,TRPV1阳性表达下降;与模型组比较,常温和寒冷开玄解毒核心方组皮肤组织TRPM8阳性表达减弱,TRPV1阳性表达增强。见图6。

3.10 血清中关键细胞因子CGRP、神经肽Y(NPY)水平 通过ELISA法检测各组小鼠血清中CGRP与NPY的表达水平。与常温组比较,银屑病模型组小鼠血清中CGRP含量降低,而NPY含量则升高,提示在银屑病发病过程中存在神经免疫调节因子的失衡。经中药干预后,开玄解毒核心方组小鼠血清中CGRP水平较模型组回升,NPY水平则下降,存在改善趋势,但差异均无统计学意义。见表5。

表达范围减少及荧光强度减弱。见图7。

3.12 免疫荧光染色分析开玄解毒核心方对TRPM8与CGRP交互的调控作用 通过免疫荧光双染评估开玄解毒核心方干预对银屑病模型小鼠皮损组织中TRPM8与CGRP表达水平及其相互作用的影响。与对照组比较,模型组小鼠皮损区域TRPM8及CGRP的荧光信号强度、共表达面积均显著升高;与模型组比较,开玄解毒核心方组小鼠皮损区域TRPM8及CGRP的荧光信号强度、共表达面积均下调。见图8。

3.13 TRPM8与开玄解毒核心方中药单体成分分子对接 将靶点蛋白TRPM8与开玄解毒核心方中共为君药的麻黄、桂枝的主要单体化合物成分麻黄碱(ephedrine)及桂皮醛(Cinnamaldehyde)进行分子对接,以结合能 ≤ -5.0 kcal·mol⁻¹(1 cal $\approx$ 4.184 J)为标准,数值越小提示结合能力越稳固,亲和力越强。对接结果表明靶蛋白TRPM8与活性成分有较好的亲和力,发生作用的可能性较大,化合物麻黄碱、桂皮醛与靶蛋白结合能分别为-5.864、-5.716 kcal·mol⁻¹

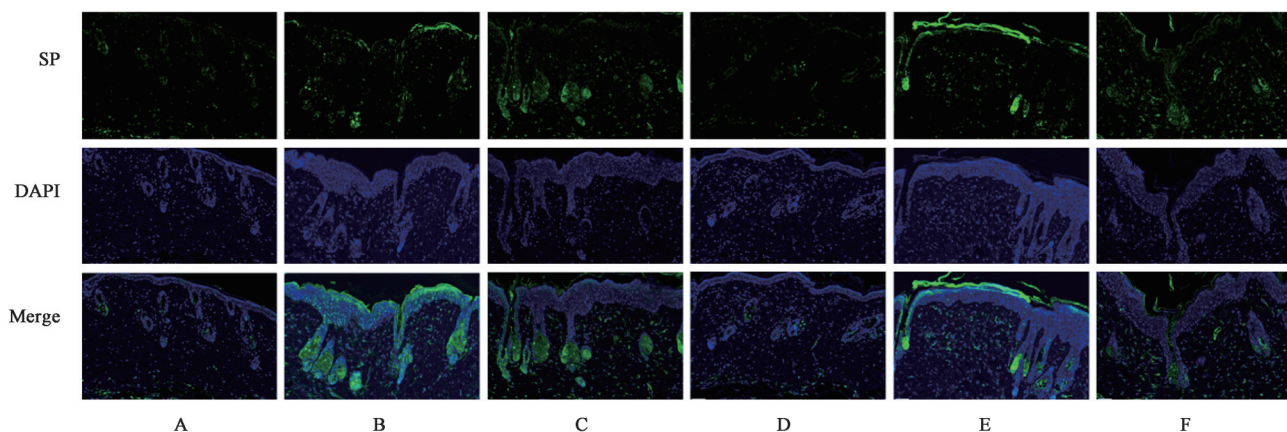


图7 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤中神经肽SP表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 7 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription under cold condition neuropeptide SP expression in mouse skin (IF,×200)

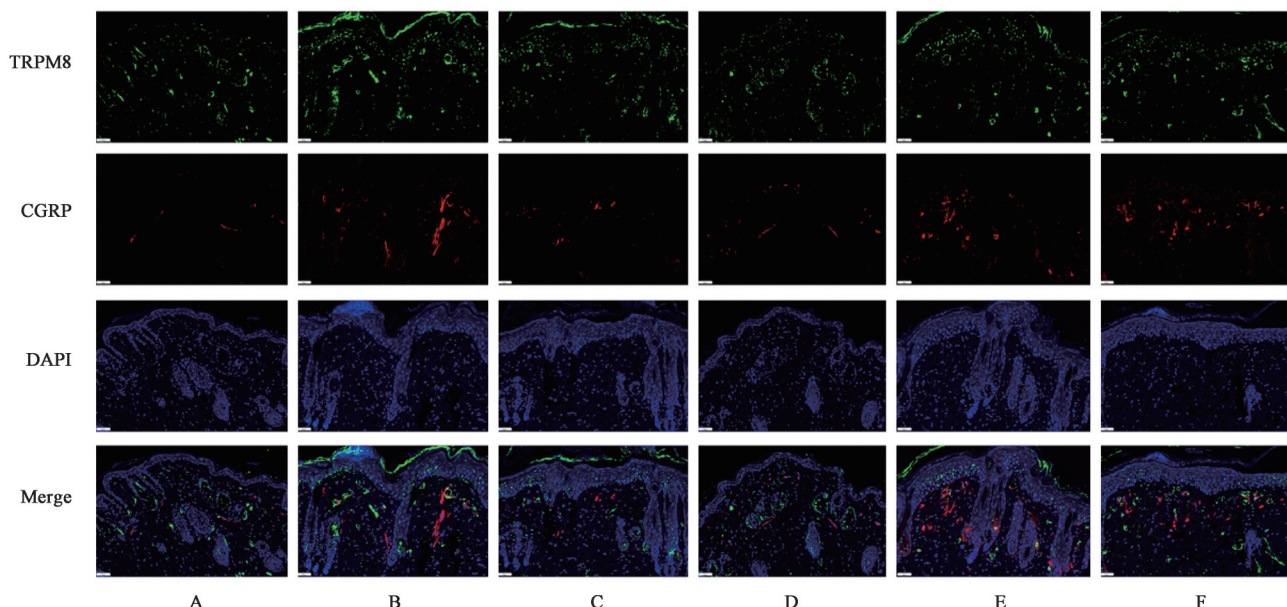


图8 寒冷条件下开玄解毒核心方对小鼠皮肤组织中TRPM8与CGRP的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 8 Effect of Kaixuan Jiedu core prescription on TRPM8 and CGRP in mouse skin tissues under cold condition (IF,×200)

(1 kcal≈4.18 kJ),均≤-5.0 kcal·mol⁻¹,结合能力相对稳固。

3.14 靶蛋白TRPM8与开玄解毒核心方中单体化合物的分子对接可视化 将TRPM8蛋白结构与开玄解毒核心方中核心化合物麻黄碱与桂皮醛分子对接进行可视化,TRPM8蛋白和小分子麻黄碱(ephedrine)之间的最佳结合模式,及配体与蛋白间相互作用,分子对接图见增强出版附加材料。分子对接的结合能为-5.864 kcal·mol⁻¹,主要通过氢键和疏水作用稳定结合。蛋白中的TYR1005(2.4 Å)与小分子形成氢键。蛋白中的PHE738、VAL742、TYR745、ILE846、TYR1005、PHE1013与小分子产生疏水相互作用。

4 讨论

银屑病作为一种慢性、复发性炎症性皮肤病,其发病机制复杂,涉及先天与适应性免疫系统的异常激活,尤其是IL-23/Th17轴的核心驱动作用^[13]。临床常见银屑病患者于感冒或外感风寒后发作或加重,提示外寒束表、玄府闭塞可能是触发或加剧内在“郁热”的重要外在因素^[14]。中医理论从整体观出发,认为其核心病机在于“血分郁热”,而“玄府郁闭”则是导致热毒壅遏、不得透泄的关键病理环节。“玄府”作为气液流通之微观门户,其功能障碍与现代医学中皮肤屏障受损、神经-免疫-表皮细胞间通讯紊乱等微观病理改变高度契合。从玄府理论角度理解,寒邪外束不仅导致汗孔闭阖、卫气郁遏,更易引起深层玄府闭塞,使内伏之瘀热不得外

透,发为红斑、鳞屑。在银屑病的临床辨治中,开玄解毒法以“开通玄府”为核心,开玄府、解毒热^[15],强调通过宣通体内微观窍道以恢复气血津液流通,从而达到解毒、退斑之效^[16]。本研究将“开玄解毒”中医治则与现代神经免疫学及温度感受机制相结合,探讨其核心方在银屑病模型中的作用,发现其可能通过调控冷觉感受器 TRPM8 及其下游信号,恢复“玄府”通利,从而发挥治疗作用。

研究结果表明,开玄解毒核心方能显著改善咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠模型的皮损症状,抑制表皮过度增生与真皮炎症细胞浸润。进一步的机制探索揭示,开玄解毒核心方的治疗效应与多层面、相互关联的信号调控有关。首先,在免疫炎症层面,开玄解毒核心方显著降低了皮损中 CD3⁺ T 淋巴细胞和 CD11c⁺树突状细胞的浸润密度。CD11c⁺树突状细胞是 IL-23 的关键生产者,而 IL-23 是驱动 Th17 细胞分化和维持其功能的核心细胞因子^[17]。开玄解毒核心方对 CD11c⁺细胞的抑制作用,可能直接削弱了 IL-23/Th17 轴的上游驱动力。与此同时,p-ERK 表达的下降,提示 MAPK 信号通路这一重要的炎症与增殖传导枢纽被抑制。ERK 通路的激活在银屑病角质形成细胞异常增殖和炎症因子产生中扮演关键角色^[18]。开玄解毒核心方对 p-ERK 的下调,从信号转导层面解释了其抗增生与抗炎效果。

更重要的是,本研究发现了 TRP 离子通道家族,特别是 TRPM8,在开玄解毒核心方作用机制中的潜在核心地位。有研究指出在银屑病样小鼠模型中皮损处 TRPM8 的表达发生变化,中药能通过 TRPM8 通道影响颈背根神经节(DRG)神经元中的 Ca²⁺反应,针对性地干预影响疾病进程^[19]。生物信息学分析提示 TRP 通道相关基因在银屑病皮损中异常富集,实验验证显示,模型组小鼠皮损中 TRPM8 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调,而开玄解毒核心方干预能有效逆转这一趋势。将 TRPM8 与开玄解毒核心方中君药麻黄、桂枝核心化合物单体分子对接,提示 TRPM8 与 2 种单体化合物存在着较高的亲和力。TRPM8 作为主要的冷觉感受器,其生理功能与中医“玄府”主管的“开阖”与“通泄”功能存在高度的契合。在生理状态下,TRPM8 参与体温调节和冷感觉;在病理状态下,其过度激活可能成为“玄府郁闭”的现代生物学表征之一。研究表明,寒冷刺激可通过激活感觉神经元上的 TRPM8,导致诸如 IL-18 等细胞因子释放,进而募集并激活 2 型固有淋巴细胞(ILC2s)等免疫细胞,加剧皮肤炎

症^[20]。这与本研究中观察到的寒冷条件加剧模型表型,并伴随 TRPM8 表达进一步升高的现象相符。因此,开玄解毒核心方下调 TRPM8 的表达,可能直接阻断了“寒冷刺激-TRPM8 激活-神经源性炎症/免疫细胞激活”这一导致或加重银屑病的环境-神经-免疫轴。

本研究结果勾勒出一个“玄府-TRPM8-神经免疫”的初步机制网络。一方面,TRPM8 本身可能直接作用于角质形成细胞,调节其增殖与分化。有研究显示,表皮角质形成细胞自身也表达 TRPM8,其激活可影响屏障功能相关基因的表达。另一方面,TRPM8 在感觉神经末梢的激活,可调控神经肽(如 CGRP、SP)的释放。神经肽在银屑病神经免疫调控中的作用日益受到关注,值得注意的是,尽管模型小鼠血清 CGRP 呈下降趋势,皮损局部 CGRP 却表达增高且与 TRPM8 共定位。这种局部与全身的差异可能源于局部过度释放的 CGRP 被中性内肽酶快速降解或与受体结合后内化,导致进入循环的有效浓度降低,类似现象在慢性炎症性疾病中已有报道^[21]。本研究发现模型组皮肤中 SP 表达升高,且存在 TRPM8 与 CGRP 的共表达增加,血清中 CGRP 水平降低,NPY 升高,提示神经肽分泌紊乱。SP 是强效的促炎神经肽,可促进血管扩张、血浆外渗并直接激活免疫细胞^[22]。而 CGRP 的作用则更为复杂,既有促炎潜力,也在特定环境下具有免疫调节作用。经开玄解毒核心方干预后神经肽的失衡得到纠正,表明开玄解毒核心方可能通过抑制 TRPM8 的过度活性,减少 SP 等促炎神经肽的释放,同时调节 CGRP 等神经肽的平衡,从而间接影响树突状细胞(如 CD11c⁺细胞)的活化状态及局部细胞因子环境(如 IL-23),最终抑制 Th17 主导的免疫应答^[23]。此路径将温度感受、神经信号与适应性免疫紧密串联。这与文献报道一致,CGRP 和 SP 在银屑病皮损中升高可激活树突细胞和 T 细胞,驱动 IL-23/Th17 轴^[24]。同时,p-ERK 下调表明该方剂可能抑制 MAPK 通路,阻断下游炎症信号传导,与 KEGG 分析结果相呼应。

本研究通过 GEO 数据库分析发现,银屑病皮损组织中 TRP 通道相关基因表达异常,与文献报道一致,这些通道参与皮肤炎症和感觉神经调控^[25]。TRPM8 作为寒冷感受器,其功能与“玄府司开阖,主疏泄”的异常高度相关,在寒冷刺激下激活可能加剧银屑病症状。本研究观察到寒冷模型组 TRPM8 表达升高,而开玄解毒核心方显著下调其表达,提

示该方剂可能通过抑制 TRPM8 介导的冷诱导炎症途径发挥作用。寒冷暴露可降低皮肤湿度、增加应激反应,从而加重银屑病表型,与临床观察相符。有实验证实,在维持体温方面存在缺陷的硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)基因敲除小鼠中,冷应激会导致 CCR10⁺CD81⁺ST2⁺皮肤 ILC2 过度激活并引发相关炎症。从机制上讲,刺激皮肤感觉神经元中表达的冷觉受体 TRPM8 会导致 IL-18 产生增加,进而激活皮肤 ILC2,促进皮肤炎症^[26]。这一通路涉及神经-免疫互作,凸显了 TRPM8 在整个皮肤微环境中的中心地位。TRPM8 在炎症中角色复杂,在急性期或特定环境下可能具有抗炎作用,一项针对化合物 Lipimoid 的研究发现,该化合物能够上调表皮 TRPM8 的表达,并同时发挥抗炎和改善皮肤屏障的作用^[27]。但在慢性炎症如银屑病中,其持续异常激活可能主导促炎效应。本研究观察到 TRPM8/p-ERK 信号的上调可被开玄解毒核心方抑制,更支持其在疾病状态下促炎的一面,但也提示未来需在不同阶段、不同刺激下全面考察其功能。值得注意的是,表皮 TRPM8 的活性受到多种内源性和外源性因素的精密调控。TRPM8 在表皮中的表达远非简单的温度传感器冗余。其作为一个多功能的信号整合平台,在角质形成细胞中通过介导钙信号,深刻影响着皮肤屏障的构建、细胞增殖的平衡、炎症反应的调控及潜在的肿瘤抑制功能。此外,本研究观察到开玄解毒核心方对其他 TRP 通道表达的调节作用,TRPV1 表达下调可能削弱其抗炎保护作用,而 TRPV2 上调促进炎症细胞募集^[28]。TRP 通道家族成员功能交织,形成复杂的调控网络。开玄解毒核心方对多重 TRP 通道的协调调节,体现了中药复方多靶点、多途径的作用特点,可能共同服务于恢复皮肤局部微环境稳态的总体目标。

综上所述,通过寒冷刺激可直接激活皮肤感觉神经末梢上的 TRPM8 通道。TRPM8 的激活可调控神经肽 CGRP、SP 的释放。这些神经肽是连接神经系统与免疫系统的关键信使。SP 是强效的促炎神经肽,可直接激活树突状细胞等免疫细胞,促进炎症细胞因子的产生,从而驱动 Th17 免疫应答。这正是“神经源性炎症”的核心路径。与笔者提出的“玄府-TRPM8-神经免疫”轴假设吻合。模型组小鼠皮损中 TRPM8 表达上调,且与 CGRP 共定位增强;同时促炎神经肽 SP 升高,血清神经肽谱紊乱;开玄解毒核心方干预逆转这些变化,缓解表皮增生与炎症浸润,为“冷刺激通过 TRPM8 介导神经免疫交叉对

话加重银屑病”提供了实验依据。

本研究存在一定局限性,如仅限于动物模型,需进一步开展体外实验验证。未来的研究可进一步利用 TRPM8 特异性拮抗剂或基因敲除技术,直接验证该通道在开玄解毒核心方疗效中的必要性,后续开展多组学联合分析,深入解析方中活性成分与 TRPM8 等靶点的相互作用,为开玄解毒核心方的临床应用提供实验依据,特别是对与寒冷因素相关或加重的银屑病患者的临床应用及新药转化提供科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杨昊若,肖雪,李佳琦,等. 基于生物信息学和实验验证探讨开玄解毒方通过调控铁死亡缓解银屑病的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(17): 69-78.
YANG H R, XIAO X, LI J Q, et al. Exploring the mechanism of Kaixuan Jiedu formula in alleviating psoriasis by regulating ferroptosis based on bioinformatics and experimental verification[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(17): 69-78.
- [2] 肖雪,康利平,代丹,等. 开玄解毒核心方调控 PTGS2 改善银屑病模型小鼠皮损的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(17): 49-59.
XIAO X, KANG L P, DAI D, et al. Mechanism of core Kaixuan Jiedu formula regulating PTGS2 to improve skin lesions in psoriasis model mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(17): 49-59.
- [3] 张宁馨,李佳琦,刘欣茜,等. 开玄-解毒配伍减轻银屑病小鼠的皮损及炎症反应[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(17): 79-88.
ZHANG N X, LI J Q, LIU X Q, et al. Compatibility of Kaixuan-Jiedu alleviates skin lesions and inflammatory response in psoriasis mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(17): 79-88.
- [4] YANG J, LI G, YUE L, et al. The impacts of seasonal factors on psoriasis [J]. Exp Dermatol, 2025, 34(3): e70078.
- [5] NIEDŹWIEDŹ M, SKIBIŃSKA M, CIAŹYŃSKA M, et al. Psoriasis and seasonality: Exploring the genetic and epigenetic interactions [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(21): 11670.
- [6] YIN Y, LEE S Y. current view of ligand and lipid recognition by the menthol receptor TRPM8 [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(9): 806-819.
- [7] HEMIDA A S, HAMMAM M A, HERIZ N A E M, et al. Expression of transient receptor potential channel of melastatin number 8 (TRPM8) in non- melanoma skin cancer: A clinical and immunohistochemical study [J]. J Immunoassay Immunochem, 2021, 42(6): 620-632.
- [8] 王博伦,关小川,邹朋书,等. 冻一放射复合伤中雄性小鼠生殖系统损伤情况及其机制研究[J]. 中国临床实用医学,

- 2023,14(3): 7-11.
- WANG B L, GUAN X C, ZOU P S, et al. Study on reproductive system damage and its mechanism in male mice with freezing-radiation combined injury[J]. Chin Clin Pract Med, 2023,14(3): 7-11.
- [9] SPILJAR M, STEINBACH K, RIGO D, et al. Cold exposure protects from neuroinflammation through immunologic reprogramming [J]. Cell Metab, 2021, 33 (11): 2231-2246.
- [10] CHEN W, LIANG J, HE S, et al. She-Chuang-Si-Wu-Tang alleviates inflammation and itching symptoms in a psoriasis mouse model by regulating the Th17/IL-17 axis via the STAT3/MAPK pathways [J]. J Inflamm Res, 2024, 17: 5957-5975.
- [11] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings[J]. J Chem Inf Model, 2021,61(8): 3891-3898.
- [12] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010,31(2): 455-461.
- [13] 孟娇玉,李领娥,王雅静,等. 中医调节 Th1/Th2 失衡、抑制 IL-23/Th17 轴作用治疗寻常型银屑病的进展[J]. 中国医药导报,2022,19(33):37-40,58.
- MENG J Y, LI L E, WANG Y J, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating psoriasis vulgaris by regulating Th1/Th2 imbalance and inhibiting IL-23/Th17 axis [J]. Chin Med Herald, 2022,19(33): 37-40,58.
- [14] 李佳琦,宁博彪,张宁馨,等. 从“佛郁”论治银屑病[J]. 中国实验方剂学杂志,2025,31(17): 39-48.
- LI J Q, NING B B, ZHANG N X, et al. Treatment of psoriasis based on stagnation depression theory [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025,31(17): 39-48.
- [15] 宁博彪,宁思敏,李颖慧,等. 温阳开玄法治疗红皮病型银屑病验案一则[J]. 环球中医药,2025,18(09): 1902-1904.
- NING B B, NING S M, LI Y H, et al. A clinical case of erythrodermic psoriasis treated by warming Yang and opening sweat pore method[J]. Glob Tradit Chin Med, 2025, 18(9): 1902-1904.
- [16] 张丹丹,赵月纯,宋坪. 宋坪教授从“玄府理论”分期辨证论治银屑病经验[J]. 世界中西医结合杂志,2025,20(02): 283-287.
- ZHANG D D, ZHAO Y C, SONG P. Professor SONG Ping's experience in staged differentiation and treatment of psoriasis based on the sweat pore theory[J]. World J Integr Tradit West Med, 2025,20(2): 283-287.
- [17] 韩盈盈,徐曦,王景乐,等. 紫草素联合当归饮子方调控 IL-23/IL-17 轴对咪喹莫特诱导银屑病样小鼠模型的保护作用[J]. 中国皮肤性病学杂志,2022,36(10):1137-1143,1171.
- HAN Y Y, XU X, WANG J L, et al. Protective effect of shikonin combined with Danggui Yinzi decoction on imiquimod-induced psoriasis-like mice via regulating IL-23/IL-17 axis[J]. Chin J Derm Venereol, 2022,36(10): 1137-1143,1171.
- [18] 曹爽,周妍妍,闫景东. 中医药调控银屑病相关信号通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(15):243-250.
- CAO S, ZHOU Y Y, YAN J D. Research progress of traditional Chinese medicine regulating psoriasis-related signaling pathways[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(15): 243-250.
- [19] WANG W, WANG H, ZHAO Z, et al. Thymol activates TRPM8-mediated Ca²⁺ influx for its antipruritic effects and alleviates inflammatory response in Imiquimod-induced mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020,407: 115247.
- [20] LIU Y, MIKRANI R, HE Y, et al. TRPM8 channels: A review of distribution and clinical role[J]. Eur J Pharmacol, 2020,882: 173312.
- [21] SCHOU WS, ASHINA S, AMIN FM, et al. Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review [J]. J Headache Pain. 2017,18(1):34.
- [22] GAO X, FRAKICH N, FILIPPINI P, et al. Effects of substance P on human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 are mediated exclusively through a truncated NK-1 receptor and depend on cell confluence [J]. Neuropeptides, 2022,95: 102265.
- [23] ZHANG X, CAO J, ZHAO S, et al. Nociceptive sensory fibers drive interleukin-23 production in a murine model of psoriasis via calcitonin gene-related peptide [J]. Front Immunol, 2021,12: 743675.
- [24] REICH A, ORDA A, WIŚNICKA B, et al. Plasma concentration of selected neuropeptides in patients suffering from Psoriasis [J]. Exp Dermatol, 2007,16(5): 421-428.
- [25] UCHIDA H, WU X, ZHOU Y, et al. Role of ion channels in immune regulation of Psoriasis [J]. Curr Opin Immunol, 2026,98: 102688.
- [26] XU M, LI C, YANG J, et al. Activation of CD81⁺ skin ILC2s by cold-sensing TRPM8⁺ neuron-derived signals maintains cutaneous thermal Homeostasis [J]. Sci Immunol, 2022,7(72): eabe0584.
- [27] JUNG Y R, PARK M H, CHOI E B, et al. Anti-inflammatory and skin barrier-improving effects of lipimoids in relation to epidermal transient receptor potential melastatin 8 upregulation [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2025,38(5/6): 198-210.
- [28] KIM H, CHOI M R, JEON S H, et al. Pathophysiological roles of ion channels in epidermal cells, immune cells, and sensory neurons in psoriasis [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (5): 2756.

[责任编辑 张丰丰]