

· 开玄解毒核心方治疗银屑病的机制研究专题(二) ·

[编者按] 银屑病(PSO)是一种由遗传、免疫与环境因素共同驱动的慢性复发性炎症性皮肤病,全球患病率2%~3%。银屑病具有精神应激加重、冬重夏轻、皮肤瘙痒及易原位复发等特征,与神经免疫互作及环境应激网络密切相关,常规抗炎治疗多针对单一炎症环节,难以覆盖该网络的整体失调。中国中医科学院西苑医院宋坪教授团队基于“气液玄府理论”,在经典方剂麻黄汤的基础上,创立开玄解毒核心方(麻黄、桂枝、赤芍、虎杖、青蒿、白花蛇舌草),治疗银屑病取得较好效果。该治法以调畅玄府气机为核心,兼具透邪外出与整体调节优势,在改善情志状态、适应温度变化、缓解神经症状方面独具特色。依托多项国家自然科学基金面上项目,该团队前期已证实该方可通过抗炎、恢复Th17/Treg免疫平衡、修复线粒体生物合成功能、抑制铁死亡、改善鞘脂代谢等多途径改善银屑病病理表现;近期将研究视野拓展至神经免疫与环境应激交互调控网络,着力揭示情志刺激、寒冷暴露等外源性诱因驱动病情进展与反复的核心病理环节。研究团队通过构建多种复合银屑病小鼠模型,系统阐释该方的多维度调控机制:针对情志应激加重的银屑病,该方可调控下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)功能,调控神经-免疫轴抑制Th17细胞皮肤归巢;针对寒冷诱导的病情加重,该方可改善微循环与皮肤屏障,靶向瞬时受体电位离子通道亚家族M成员8(TRPM8)阻断寒冷介导的神经源性炎症;针对神经免疫互作,该方可通过抑制TrkA受体磷酸化恢复CGRP表达并纠正树突状细胞活化失衡,同时通过阻断神经生长因子-原肌球蛋白受体激酶A/瞬时受体电位香草酸亚型1/蛋白酶激活受体-2(NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2)信号通路抑制下游炎症级联反应。该研究为中医药干预环境与心理应激诱发的难治性银屑病提供了实验依据与研究思路。

开玄解毒核心方通过调控神经-免疫轴抑制 Th17 细胞皮肤归巢改善 IMQ 联合束缚应激诱导的小鼠银屑病的机制

杨昊若¹, 张宁馨², 金秋百², 李佳琦², 肖雪², 孙美琪², 杨斌^{2*}, 宋坪^{2*}

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

[摘要] 目的:观察开玄解毒核心方(KXJD)对咪喹莫特(IMQ)联合束缚应激诱导的银屑病样小鼠Th17细胞皮肤归巢的影响及治疗作用,并基于神经-免疫轴视角探究其潜在机制。方法:30只雄性C57BL/6J小鼠随机分为5组($n=6$):正常组、模型(IMQ)组、束缚应激模型(IMQ+RS)组、开玄解毒核心方(KXJD)组和甲氨蝶呤(MTX)组。使用5%IMQ外涂联合束缚应激诱导银屑病样小鼠模型,造模同时各给药组按相应剂量药物干预,正常组、IMQ组、IMQ+RS组等量生理盐水灌胃,每天1次,共5d。苏木素-伊红(HE)染色观察皮肤组织病理改变并进行Baker评分;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清白细胞介素(IL)-1 β 、血管生成素-2(Ang-2)水平;检测皮肤组织基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)、趋化因子配体20(CCL20)、CC基序趋化因子受体6(CCR6)水平;免疫组化法(IHC)检测皮肤淋巴细胞相关抗原(CLA)、整合素 α_E (CD103)、角蛋白10(CK10)、核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达。免疫荧光双染法(DIF)分别检测皮肤组织血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和小血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、CCR6和CD103、P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)和蛋白基因产物9.5(PGP9.5)的表达水平及其定位情况。实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测IL-10、IL-17A、IL-23 mRNA表达。结果:与正常组比较,IMQ组和IMQ+RS组小鼠皮肤组织炎症细胞浸润,表皮细胞异常增殖、角化等病理改变显著,Baker评分明显升高;血清IL-1 β 、Ang-2与皮损组织MMP-9、CCL20、CCR6水平和CLA、CD103、CK10、NF- κ B、IL-17A mRNA、IL-23 mRNA表达水平明显升高,TIMP-1、IL-10水平明显降低;共定位荧光强度VE-cadherin和CD31、CCR6和CD103、SP和PGP9.5、CGRP和PGP9.5明显上升($P<0.05$)。与IMQ组比较,IMQ+RS组上述指标进一步加重。与IMQ+RS组比较,KXJD组和MTX组小鼠皮损病理损伤得到缓解,Baker评分明显降低;血清IL-1 β 、Ang-2与皮损组织MMP-9、CCL20水平和CLA、CD103、CK10、NF- κ B、IL-17A mRNA、IL-23 mRNA表达水平明显降低,TIMP-1、IL-10 mRNA水平升高;VE-cadherin和CD31、CCR6和CD103、CGRP和PGP9.5、SP和PGP9.5共定位荧光强度明显降低($P<0.05$)。结论:开玄解毒核心方可显著改善IMQ联合束缚

[收稿日期] 2026-01-22

[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);中国中医科学院创新工程项目(CI2021A00901)

[第一作者] 杨昊若,在读硕士,从事皮肤性病学及中药药理学研究,E-mail:y2356862808@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,Email:songping@vip.126.com;

* 杨斌,副研究员,从事中药药理学及分子病理学研究,E-mail:bean5@126.com

应激诱导的小鼠银屑病样皮肤损伤,其机制或与调节神经-免疫轴从而抑制Th17细胞皮肤归巢现象有关。

【关键词】 银屑病;开玄解毒方;束缚应激;免疫;神经炎症;Th17细胞;归巢;小鼠

【中图分类号】 R269;R285;R275 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-9903(2026)19-0055-14

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2026122

【网络出版地址】 <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260423.1514.006>

【网络出版日期】 2026-04-23 15:38:22



Kaixuan Jiedu Core Prescription Ameliorates Psoriasis Induced by IMQ Combined with Restraint Stress in Mice by Regulating Neuro-immune Axis and Inhibiting Skin Homing of Th17 Cells

YANG Haoruo¹, ZHANG Ningxin², JIN Qiubai², LI Jiaqi², XIAO Xue², SUN Meiqi²,
YANG Bin^{2*}, SONG Ping^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

【Abstract】 **Objective:** To observe the effect and therapeutic effect of Kaixuan Jiedu core prescription (KXJD) on skin homing of Th17 cells in the mouse model of imiquimod (IMQ) combined with restraint stress-induced psoriasis-like skin damage, and to explore its potential mechanism from the perspective of neuro-immune axis. **Methods:** Thirty male C57BL/6J mice were randomly allocated into five groups ($n=6$): Control, model (IMQ), restraint stress model (IMQ+RS), KXJD, and methotrexate (MTX). The mouse model of psoriasis-like skin damage was established by 5% IMQ combined with restraint stress. At the same time of modeling, each treatment group was treated with corresponding doses of drugs, and the control, IMQ, and IMQ+RS groups were treated with the same amount of normal saline by gavage once a day for 5 days. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the skin tissue and Baker scoring was performed. Serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and angiopoietin-2 (Ang-2) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20), and C-C motif chemokine receptor 6 (CCR6) in the skin tissue were determined. Immunohistochemistry (IHC) was employed to determine the protein expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), integrin α_E (CD103), cytokeratin 10 (CK10), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in the skin. Immunofluorescence double staining (DIF) was adopted to detect the expression and co-localization of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31), CCR6, CD103, substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and protein gene product 9.5 (PGP9.5) in the skin tissue. Real-time PCR was employed to quantify the mRNA levels of IL-10, IL-17A, and IL-23. **Results:** Compared with the control group, the IMQ group and IMQ+RS group showed significant inflammatory cell infiltration, abnormal proliferation of epidermal cells, keratinization and other pathological changes in the skin tissue, and a significant increase in Baker score, elevated levels of IL-1 β and Ang-2 in the serum and MMP-9, CCL20 and CCR6 in the skin lesions, upregulated expression of CLA, CD103, CK10, NF- κ B, IL-17A mRNA, and IL-23 mRNA in the skin lesions, and downregulated expression of TIMP-1 and IL-10 mRNA. In addition, the fluorescence intensities of VE-cadherin and CD31 co-localization, CCR6 and CD103 co-localization, SP and PGP9.5 co-localization, and CGRP and PGP9.5 co-localization were increased ($P<0.05$). Compared with the IMQ group, the above indicators in the IMQ+RS group were further aggravated. Compared with the IMQ group, the above indicators in the IMQ+RS group were further aggravated. Compared with the IMQ+RS group, KXJD and MTX significantly alleviated the pathological damage of skin lesions, significantly decreased the Baker score, lowered the levels of IL-1 β and Ang-2 in the serum and MMP-9, CCL20 and CCR6 in skin lesions, downregulated the expression of CLA, CD103, CK10, NF- κ B, IL-17A mRNA and IL-23 mRNA in skin lesions, and upregulated the expression of TIMP-1 and IL-10 mRNA. Furthermore, KXJD and MTX reduced the fluorescence intensities of VE-cadherin and CD31 co-localization, CCR6 and CD103 co-localization, CGRP and PGP9.5 co-localization, and SP and PGP9.5 co-localization ($P<0.05$). **Conclusion:** KXJD can significantly ameliorate the psoriasis-like skin damage induced by IMQ combined with restraint stress in mice by regulating the neural-immune axis and inhibiting the skin homing of Th17 cells.

【Keywords】 psoriasis; Kaixuan Jiedu prescription (KXJD); restraint stress; immunity; neuroinflammation; Th17 cells; homing; mice

银屑病是一种由遗传、环境、行为等多种因素共同作用诱发的慢性复发性自身免疫性疾病,临床上以界限清楚的局限或广泛分布的鳞屑性红斑或斑块为特征。全球现有约1.25亿银屑病患者,而我国的患病人数已超过760万,并呈现出逐年递增的趋势^[1]。银屑病病程漫长且易复发是其核心临床挑战之一。患者常因瘙痒、疼痛(夜间尤甚)导致睡眠质量的严重下降,同时还易罹患关节炎、代谢综合征等多系统并发症,不仅造成持续的生理痛苦,也对患者的精神心理产生了极大影响^[2]。银屑病致病机制繁复目前仍无定论,但由T淋巴细胞介导的皮肤局部异常免疫炎症被公认为是驱动本病发生与持续进展的核心环节,其中辅助性T细胞17(Th17)的异常皮肤归巢现象在这一病理过程中扮演重要角色^[3]。Th17的皮肤归巢是指Th17细胞通过特定趋化因子受体与配体的相互作用,实现从血液向组织的定向迁移。归巢至皮肤的Th17细胞可产生大量白细胞介素(IL)-17A/F及IL-22,触发炎症级联效应并刺激角质形成细胞异常增殖与分化^[4]。更关键的是,即使临床皮损消退,表皮内残留的整合素 α_6 (CD103)⁺组织驻留记忆T细胞(TRM)仍具备皮肤归巢表型[如C-C趋化因子受体6阳性(CCR6⁺)Th17细胞],可在促炎因子的刺激下迅速重启炎症,导致疾病的原位复发^[5]。此外,有研究指出负面的心理因素是诱发和加重银屑病的重要因素之一。情绪应激可激活外周感觉神经元,促使神经激素和P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)等神经肽释放,进而诱发皮肤神经源性炎症,这可能是银屑病早期炎症形成的重要机制之一^[6]。同时,这些神经递质亦可直接或间接刺激角质形成细胞异常增殖,最终导致表皮增厚、免疫细胞浸润等银屑病典型病理改变^[7]。由此可见,从神经-免疫视角调控Th17细胞的异常皮肤归巢,或有望成为阻断本病复发、改善长期预后的新型治疗策略。

银屑病属中医“白疔”“风癣”等范畴,与西医治疗比较,中医药治疗银屑病具有多靶点整体调节、疗效确切、经济安全等显著优势,展现出独特的临床价值。开玄解毒核心方(KXJD)是宋坪教授基于银屑病患者“皮损灼热无汗、汗出热减,冬重夏轻,感寒后易入里化热加重病情”等典型表现所创立的临床验方,银屑病治疗总有效率高达81.89%^[8]。KXJD是宋坪教授在传承名老中医的基础上,结合大量临床实践所创立的临床验方,由麻黄、桂枝、赤芍、虎杖、青蒿、白花蛇舌草6味药组成。方中麻黄、

桂枝辛温通玄,开腠理之郁闭,为君;赤芍、虎杖清热凉血、通络解毒,为臣;青蒿、白花蛇舌草透热外出、清解郁毒,为佐使。全方紧扣“郁-闭-热-毒”的病机演变,以“开玄”为纲、“解毒”为目,旨在恢复玄府开阖之常,使气液流通、热毒得解,从而改善皮损。值得注意的是,本团队在临床观察中发现,接受KXJD治疗的患者在皮损改善的同时,部分患者的情绪与睡眠障碍等症状也获得缓解,提示该方可能通过调节“神-形”互动,实现对银屑病的整体调控。本团队前期大量临床及基础研究表明,KXJD系列方剂能显著改善银屑病患者皮损,抑制角质形成细胞异常增殖,并修复皮肤与血管屏障功能,可通过调节IL-17A/IL-23轴,纠正由Th17/调节性T细胞(Treg)免疫漂移造成的慢性炎症反应^[9-10]。此外,还可通过恢复鞘脂代谢平衡,降低活性氧(ROS)及脂质过氧化物水平遏制铁死亡相关炎症放大效应。这些发现从多维度揭示了KXJD抗银屑病的协同作用机制^[11-13]。然而,现有研究多聚焦于KXJD对角质形成细胞增殖、免疫细胞分化的直接调控,其是否通过影响神经-免疫对话进而干预Th17细胞功能,迄今尚缺乏直接证据。值得注意的是,Th17细胞的异常皮肤归巢是驱动银屑病慢性化与复发的核心事件,而神经肽(如SP、CGRP)已被证实可调控趋化因子表达及免疫细胞迁移。从神经-免疫轴视角探讨KXJD对Th17细胞归巢的影响,不仅有望揭示其“形神共治”的现代生物学内涵,也可能为阻断银屑病复发提供新的干预靶点。因此,本研究基于神经-免疫互作调控机制,采用咪喹莫特(IMQ)联合束缚应激诱导银屑病样小鼠模型,旨在探讨KXJD对Th17细胞皮肤归巢的影响及其在银屑病进展中的作用,以期为银屑病的临床防治提供新的策略和方案。

1 材料

1.1 动物 30只C57BL/6JSPF级雄性健康成年小鼠(体质量20~24 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2021-0006。饲养于中国中医科学院西苑医院实验中心动物房,温度20~24℃,湿度40%~60%。

1.2 伦理 动物实验程序经中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会审查批准,动物伦理批准号为2025XLC041-2。

1.3 药品与试剂 KXJD组成包括麻黄6 g、桂枝9 g、赤芍9 g、虎杖10 g、青蒿20 g、白花蛇舌草20 g,中药饮片均来自中国中医科学院广安门医院中药房,经杨辉副主任药师专业鉴别后,确认符合

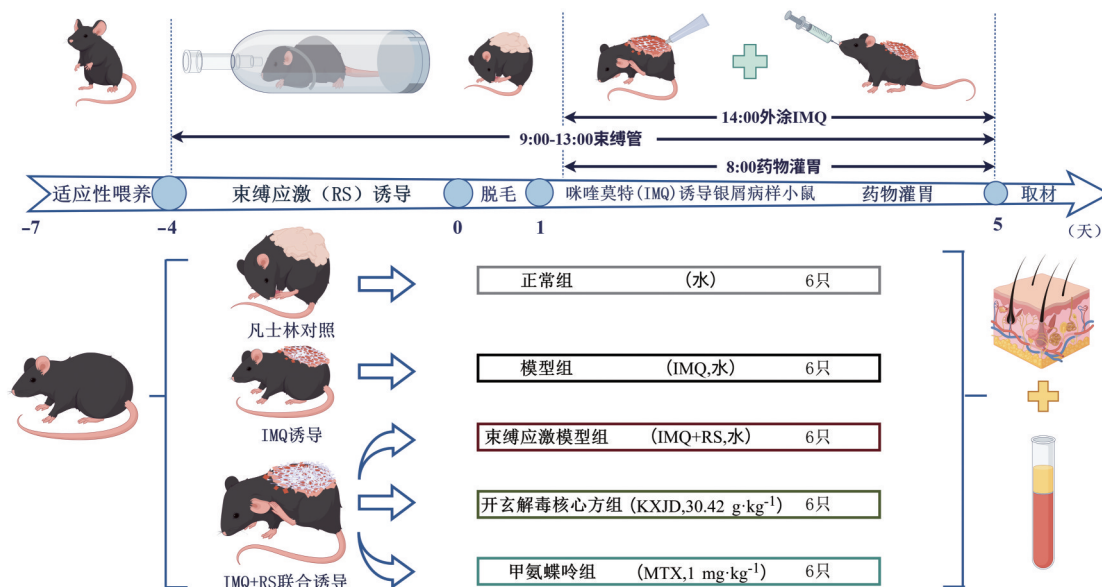
2025年版《中华人民共和国药典》质量标准。中药饮片煎煮2次,每次取汁100 mL,混合2次煎煮的药汁后,文火浓缩至25 mL的药液,作为成人KXJD每日剂量的中药原液($2.96\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤网过滤,分装后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。5%IMQ(四川明欣药业有限责任公司,国药准字H20030128,批号24113902,规格 0.25 g);甲氨蝶呤(MTX)注射液(美国Pfizer Inc公司,国药准字HJ20140205,批号240385,规格 $2\text{ mL}:50\text{ mg}$);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G1120);RIPA裂解液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为G2026);放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号为P0013c);辣根过氧化物酶标山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号PV6000);CC基序趋化因子受体6(CCR6)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和蛋白基因产物9.5(PGP9.5)抗体(法国R&D Systems公司,货号分别为MAB590、AF1002、MAB60072);P物质(SP)兔多克隆抗体、降钙素基因相关肽(CGRP)兔多克隆抗体、血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)重组抗体、角蛋白10(CK10)兔多克隆抗体、Ki-67兔多克隆抗体、核转录因子- κB (NF- κB)兔多克隆抗体(武汉Proteintech公司,货号分别为13839-1-AP、14348-1-AP、85898-4-RR、18343-1-AP、14348-1-AP、80979-1-RR);CD103兔多克隆抗体(英国Abcam公司,货号为ab224202);CD162亚基皮肤淋巴细胞相关抗原(CLA)兔多克隆抗体、IL-1 β 、TRIzol™Plus RNA纯化试剂盒、逆转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)(美国ThermoFisher公司,货号分别为PA5-102457、88-7013、12183555、A45003、1176102K);血管生成素-2(Ang-2)(武汉优尔生生物科技有限公司,货号USEA009Mu);基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、趋化因子配体20(CCL20)抗体(杭州联科生物科技有限公司,货号分别为EK2M09、EK2211);组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)(武汉云克隆科技有限公司,货号SEA552Mu)。

1.4 仪器 MLS-3750型全自动高压灭菌器(日本SANYO公司);TPI020型全自动脱水机、RM2016型病理切片机(德国Leica公司);Epoch型酶标检测仪(美国BioTek公司);D3024R型台式高速冷冻离心机(北京大龙兴创实验仪器股份公司);ENZ-COV-1型全自动染色封片一体机(济南恩众医疗科技有限公司);PBM-B型包埋机[普瑞斯星(常州)医疗器械

有限公司];CR-601ST型轮转式切片机(金华克拉泰仪器有限公司);Olympus BX53F2C型显微镜(日本Olympus公司);EasyScan NFC 60型病理切片扫描仪(麦克奥迪实业集团有限公司);SLAN-96S全自动医用PCR分析系统(上海宏石医疗科技有限公司);SMV-3500型涡旋混匀仪、KZ-II型高速组织研磨仪、SMP-2型微孔板离心机、KZ-5F-3D型三维冷冻研磨仪、SMC-5000F型掌上离心机(武汉赛维尔生物科技有限公司);Image-Pro Plus 6.0软件(美国Media Cybernetics公司)。

2 方法

2.1 银屑病样小鼠模型的构建、分组及干预 30只C57BL/6J小鼠根据体质量随机分为正常组、模型(IMQ)组、束缚应激模型(IMQ+RS)组、开玄解毒核心方(KXJD, $30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和MTX($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组6只。小鼠KXJD给药剂量和阳性药给药剂量参考《药理实验方法学》中人和小鼠体表面积换算等效剂量($15.21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),并结合本课题组前期研究基础,确认其2倍等效剂量($30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)具有最优效果,每只小鼠体质量按 22 g 计,每日 0.2 mL 中药液灌胃^[9,11-12,14]。适应性喂养3 d后,于IMQ造模前5 d开始,除正常组和IMQ组外,每日9点将小鼠置于束缚管中,束缚期间小鼠可正常呼吸,但不可移动,同时禁食禁水,每日于13点放出。小鼠出现焦虑、挣扎、畏缩、颤抖等状态为造模成功的表现^[15]。于IMQ造模前1 d,采用剃毛刀对小鼠背部的毛发(面积约 $3\text{ cm}\times 2\text{ cm}$)进行剔除并使用温和型脱毛膏去除底部绒毛,确保背部皮肤充分暴露。除正常组外,其余各组每日14点5%IMQ 62.5 mg 均匀涂抹于小鼠背部裸露皮肤,正常组等量凡士林外用,每日1次,持续5 d。小鼠背部皮肤见暗红色斑块伴有鳞屑,组织病理学见炎性细胞浸润、角质层和棘层增厚、角化异常等银屑病特征性改变,可认为成功建立银屑病样小鼠模型^[9,11-12,16]。造模同时进行药物干预,各给药组每天定时按相应剂量药物灌胃,正常组、模型组予等量生理盐水灌胃,每天1次,共5 d。末次给药后,于当日24:00对各组小鼠禁食禁水,0.3%戊巴比妥钠麻醉,通过观察学小鼠是否存在翻身反应判断麻醉效果。小鼠完全麻醉后,摘取一侧眼球以收集眼血。脱颈处死所有小鼠后,收集背部皮肤组织。部分样本采用4%多聚甲醛固定以观察组织病理学改变、免疫荧光及免疫组化染色检测,剩余部分存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。见图1。



注:RS.束缚应激

图1 KXJD对银屑病样小鼠模型构建的实验流程

Fig. 1 Experimental procedure for studying action of KXJD in psoriasis-like mice

2.2 HE染色观察小鼠皮损病理学改变及Baker评分 取固定24 h以上小鼠皮肤组织,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,制4 μm 切片,脱蜡、水化后切片,苏木素染色5 min,蒸馏水洗,返蓝,流水冲洗,伊红染色5 min,再次梯度乙醇脱水、二甲苯透明并封片。病理观察采用盲法进行,由两名未知分组情况的研究人员在光镜下独立观察皮损组织形态变化,并依据Baker评分标准^[17]进行评估。Baker评分标准,①角质层:角化过度0.5分、角化不全1分、发现Munro小脓肿2分;②表皮层:颗粒层变薄或消失1分,棘层增厚1分,轻、中、重度皮突延长、起伏,分别计0.5、1、1.5分;③真皮层:乳突上顶0.5分,毛细血管扩张0.5分,轻、中、重度单核或多核细胞浸润,分别计0.5、1、2分。

2.3 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清IL-1 β 、Ang-2水平 取血清,严格按照相应ELISA试剂盒说明书要求操作,检测血清中IL-1 β 、Ang-2的水平。

2.4 检测皮肤组织MMP-9、TIMP-1、CCL20、CCR6水平 取皮肤组织,加入RIPA裂解30 min,于冰上研磨后,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,制备10%组织匀浆,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心半径13 cm,离心20 min,取上清提取总蛋白。BCA试剂盒检测各组小鼠提取的皮肤组织蛋白浓度。使用酶标仪于450 nm处测定MMP-9、TIMP-1、CCL20、CCR6水平。

2.5 免疫组织化学法(IHC)检测皮肤组织CLA、CD103、CK10、NF- κB 蛋白表达水平 常规石蜡包

埋,4 μm 切片,二甲苯除蜡、梯度乙醇水化,3%过氧化氢(H_2O_2)避光15 min,枸橼酸盐修复液(pH6.0)高压热修复3 min,分别加入CLA、CD103、CK10、NF- κB 抗体(1:100,1:200,1:150,1:300),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日滴加二抗,室温孵育30 min,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,于镜下控制反应时间,染色后蒸馏水冲洗,苏木素复染,脱水,透明,中性树脂胶封片。在光学显微镜下观察,阳性信号为淡黄至棕黄色颗粒,每张切片随机选取5个高倍视野($\times 200$),Image-Pro Plus 6.0软件测定阳性信号的吸光度A。

2.6 免疫荧光双染法(DIF)检测皮肤组织VE-cadherin和CD31、CCR6和CD103、SP、CGRP和PGP9.5水平及共定位情况 皮肤组织常规包埋,3 μm 切片,脱蜡水化,贴附载玻片后,滴加VE-cadherin、CD31、CCR6、CD103、SP、CGRP和PGP9.5一抗(1:200,1:200,1:300,1:200,1:150,1:200,1:250),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日取出切片,PBS冲洗3次后滴加相应的二抗(1:200),湿盒中避光孵育30 min,PBS冲洗3次洗脱抗体,DAPI复染细胞核,避光孵育10 min,抗淬灭封片,于荧光显微镜下观察并摄片。每组随机选取3个视野($\times 100$)进行统计分析,使用Image-Pro Plus 6.0软件分析每个视野的平均荧光强度,对免疫荧光结果进行定量分析。

2.7 Real-time PCR检测皮肤组织中IL-10、IL-17A、IL-23表达 取各组小鼠剩余皮肤组织100 mg,IL-10、IL-17A、IL-23 mRNA与内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶

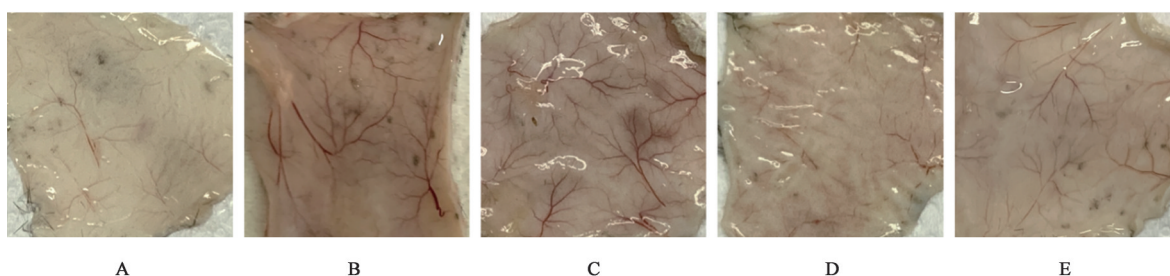
(GAPDH)引物使用Primer 5.0软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列分别为(IL-10, 81 bp,上游5'-AATAAGCTCCAAGACCAAGGTGT-3',下游5'-CATCATGTATGCTTCTATGCAGTTG-3'; IL-17A, 104 bp,上游5'-CCATGTGCCTGATGCTGTTG-3',下游5'-GTTATTGGCCTCGGCGTTT-3'; IL-23, 121 bp,上游5'-CAAAGGATCCGCCAAGGTCT-3',下游5'-GGCCCAGTAGGGAGGTATGA-3'; GAPDH, 156 bp,上游5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3',下游5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3')。按照试剂盒说明书提取总RNA并逆转录为cDNA。PCR反应体系(20 μ L)组成:cDNA 2 μ L,上、下游引物各0.8 μ L,双蒸水6.4 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 95 $^{\circ}$ C变性20 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。并通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各样品中目的基因mRNA的相对表达丰度。

2.8 统计方法 使用SPSS 25.0软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态性与方差齐性分布的组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),不符合方差齐性的多个独立样本采用Kruskal-Wallis H (Dunn)秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据

分析和统计图绘制。

3 结果

3.1 KXJD对小鼠一般情况及皮损部位血管的影响 正常组小鼠背部皮肤光滑平整未见异常。各造模组小鼠背部皮肤均呈现不同程度红斑、鳞屑和表皮增厚等表现,其中IMQ+RS组皮损程度最严重。此外,除正常组和IMQ组小鼠外,其余各组小鼠在束缚应激造模后出现不同程度的颤抖、畏缩、焦虑不安等表现,提示束缚应激造模成功。与IMQ组及IMQ+RS组比较,KXJD组与MTX组小鼠的上述症状均得到显著改善。提示KXJD可有效改善小鼠银屑病样皮损。正常组小鼠背部皮肤未见明显血管扩张或充血。各造模组小鼠背部皮肤均出现肉眼可见的血管变化,表现为局部皮肤血管网清晰可见、伴有不同程度的弥漫性或局灶性充血,提示浅表毛细血管扩张与血流量增加。其中IMQ+RS组血管反应最为显著,可见广泛而明显的充血区域,血管迂曲扩张表现突出。与各造模组比较,KXJD组与MTX组小鼠背部皮肤的血管扩张与充血程度均显著减轻,肉眼可见血管纹理趋于正常,提示局部血管状态改善。提示KXJD可有效缓解银屑病样皮损中伴随的血管异常反应。见图2。



注:A.正常组;B.IMQ组;C.IMQ+RS组;D.KXJD组;E.MTX组(图3-图8同)

图2 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮损部位血管的影响

Fig. 2 Effect of KXJD core recipe on blood vessels in skin lesions of psoriasis-like mice

3.2 KXJD对小鼠皮肤组织HE染色病理学形态及Baker评分的影响 正常组小鼠皮肤各层结构完整清晰,表皮及角质层厚度均匀,层次分明,毛囊排列整齐,未见明显炎症细胞浸润;与正常组比较,IMQ组和IMQ+RS组小鼠表皮异常增生,角质层可见大量角化过度、角化不全的角质细胞,棘层厚度明显增大,表皮钉突延长呈杵状,真皮层大量炎症细胞浸润,病理改变显著,Baker评分明显升高($P < 0.05$),与IMQ组比较,IMQ+RS组皮肤病理改变进一步加剧;与IMQ+RS组比较,KXJD组和MTX组小鼠上述皮损改变均得到不同程度改善,Baker评分明显下降($P < 0.05$),其中KXJD组的效果最为突出。表

明KXJD可有效减轻银屑病样小鼠皮肤组织病理改变。见图3、表1。

3.3 KXJD对小鼠血清IL-1 β 、Ang-2水平的影响 与正常组比较,IMQ组小鼠血清IL-1 β 、Ang-2水平明显上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$),与IMQ组比较,IMQ+RS组小鼠血清IL-1 β 、Ang-2水平明显上升($P < 0.05$)。与IMQ+RS组比较,各给药组小鼠血清IL-1 β 、Ang-2水平明显降低($P < 0.05$)。提示KXJD可减轻银屑病样小鼠促炎介质分泌及血管损伤。见表2。

3.4 KXJD对小鼠皮损组织MMP-9、TIMP-1、CCL20、CCR6水平的影响 与正常组比较,IMQ组

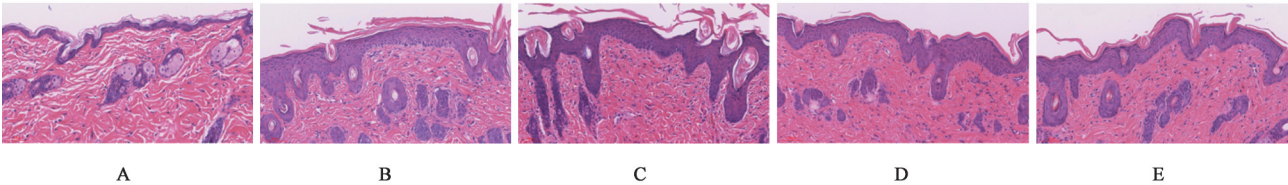


图3 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织病理形态影响(HE,×200)

Fig. 3 Effect of KXJD on pathological morphology of skin tissue in psoriasis-like mice (HE,×200)

表1 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠Baker评分的影响(̄x±s,n=6)
Table 1 Effect of KXJD on Baker score in psoriasis-like mice (̄x±s,n=6)

组别	剂量	Baker/分
IMQ组		7.95±0.46 ¹⁾
IMQ+RS组		8.98±0.53 ^{1,2)}
KXJD组	30.42 g·kg ⁻¹	4.83±0.67 ^{2,3)}
MTX组	1 mg·kg ⁻¹	5.79±0.58 ³⁾

注:正常组小鼠Baker评分为0;与正常组比较¹⁾P<0.05;与IMQ组比较²⁾P<0.05;与IMQ+RS组比较³⁾P<0.05

小鼠皮肤组织MMP-9、CCL20、CCR6含量明显上升(P<0.05),TIMP-1含量明显降低(P<0.05);且相较于IMQ组,IMQ+RS组小鼠血清皮肤组织MMP-9、CCL20、CCR6、IMP-1含量明显升高(P<0.05)。与IMQ+RS组比较,各给药组皮肤组织MMP-9、

表2 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠血清IL-1β、Ang-2水平的影响(̄x±s,n=6)

Table 2 Effect of KXJD on serum IL-1β and Ang-2 levels in psoriasis-like mice (̄x±s,n=6)

组别	剂量	IL-1β/ng·L ⁻¹	Ang-2/μg·L ⁻¹
正常组		0.73±0.35	0.99±0.29
IMQ组		3.50±1.92 ¹⁾	2.51±0.28 ¹⁾
IMQ+RS组		5.69±0.78 ²⁾	3.75±0.26 ²⁾
KXJD组	30.42 g·kg ⁻¹	1.60±0.57 ³⁾	1.62±0.31 ³⁾
MTX组	1 mg·kg ⁻¹	2.92±2.07 ³⁾	1.86±0.26 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与IMQ组比较²⁾P<0.05;与IMQ+RS组比较³⁾P<0.05(表3-表6同)

CCL20水平明显降低,TIMP-1含量明显升高(P<0.05)。提示KXJD可减轻银屑病样小鼠细胞外基质降解和归巢信号分子释放。见表3。

表3 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织MMP-9、TIMP-1、CCL20、CCR6水平的影响(̄x±s,n=6)

Table 3 Effect of KXJD on levels of MMP-9, TIMP-1, CCL20 and CCR6 in skin tissues of psoriasis-like mice (̄x±s,n=6)

组别	剂量	MMP-9/μg·L ⁻¹	TIMP-1/ng·L ⁻¹	CCL20/ng·L ⁻¹	CCR6/μg·L ⁻¹
正常组		1.32±0.52	181.65±25.50	11.75±3.37	1.05±0.08
IMQ组		5.93±1.03 ¹⁾	26.54±5.88 ¹⁾	114.09±16.41 ¹⁾	2.08±0.14 ¹⁾
IMQ+RS组		7.14±0.82 ²⁾	58.63±7.44 ²⁾	232.61±28.60 ²⁾	2.28±0.38 ²⁾
KXJD组	30.42 g·kg ⁻¹	3.64±0.99 ³⁾	160.18±26.94 ³⁾	67.23±12.76 ³⁾	1.79±0.08 ³⁾
MTX组	1 mg·kg ⁻¹	4.56±0.98 ³⁾	158.70±19.06 ³⁾	75.52±14.97 ³⁾	2.06±0.23

3.5 KXJD对小鼠皮肤组织CLA、CD103、CK10、NF-κB蛋白表达水平的影响 CLA、CD103、CK10、NF-κB阳性信号显示为黄色至棕黄色,CLA、CD103表达于胞膜,CK10表达于胞浆,NF-κB表达于细胞核和胞浆。与正常组比较,IMQ组小鼠皮肤组织CLA、CD103、CK10、NF-κB表达量明显升高,差异

具有统计学意义(P<0.05)。与IMQ组比较,IMQ+RS组小鼠皮肤组织CLA、CD103、CK10、NF-κB表达进一步升高,差异具有统计学意义(P<0.05)。与IMQ+RS组比较,各给药组皮肤组织内CLA、CD103、CK10、NF-κB表达明显降低(P<0.05)。见表4、图4。

表4 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织CLA、CD103、CK10、NF-κB蛋白表达的影响(̄x±s,n=3)

Table 4 Effect of KXJD on expression of CLA,CD103,CK10,NF-κB in skin tissue of psoriasis-like mices (̄x±s,n=3)

组别	剂量	CLA	CD103	CK10	NF-κB
正常组		35.19±3.87	44.21±5.71	70.23±8.93	38.59±5.08
IMQ组		73.82±6.21 ¹⁾	87.35±7.92 ¹⁾	193.67±13.92 ¹⁾	97.89±12.35 ¹⁾
IMQ+RS组		92.65±6.92 ²⁾	98.23±8.12 ²⁾	237.56±15.33 ²⁾	122.97±13.76 ²⁾
KXJD组	30.42 g·kg ⁻¹	53.85±5.28 ³⁾	60.23±6.14 ³⁾	128.14±10.78 ³⁾	68.92±8.82 ³⁾
MTX组	1 mg·kg ⁻¹	57.11±4.97 ³⁾	57.29±5.88 ³⁾	141.88±11.74 ³⁾	72.78±7.65 ³⁾

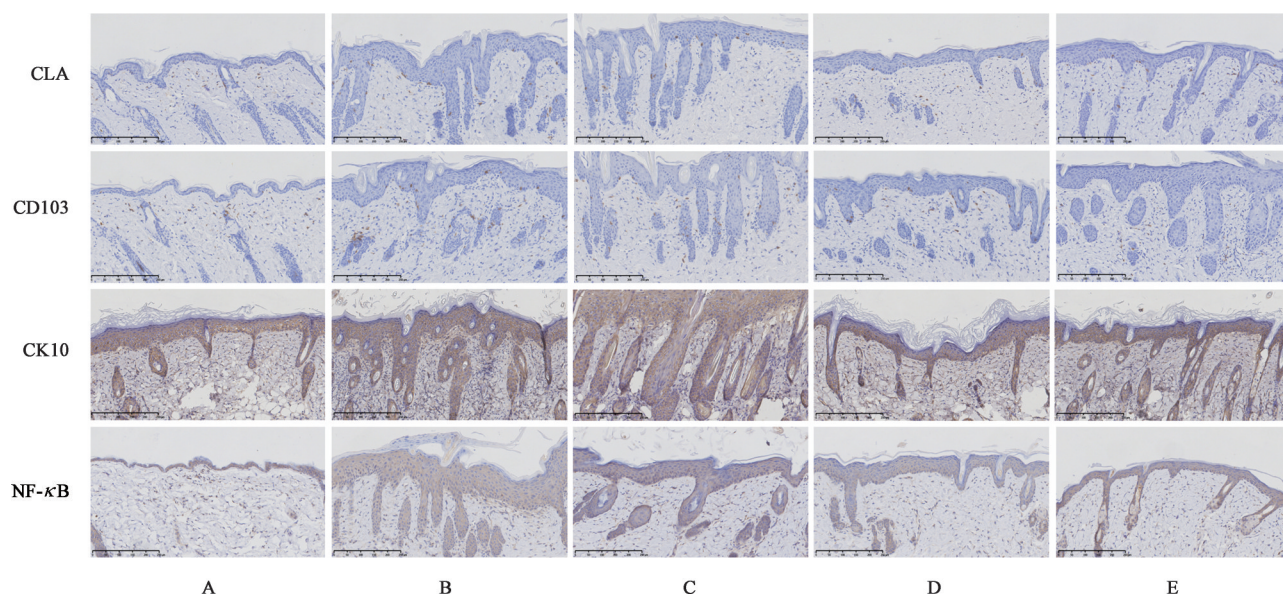


图4 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织 CLA、CD103、CK10、NF-κB 蛋白阳性表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 4 Effect of KXJD on expression of CLA, CD103, CK10, NF-κB in skin tissue of psoriasis-like mice (IHC, ×200)

3.6 KXJD 对小鼠皮肤组织 VE-cadherin 和 CD31, CCR6 和 CD103, PGP9.5 与 SP 和 CGRP 表达的影响 正常组皮肤组织中, VE-cadherin 与 CD31 共定位于微血管内皮细胞连接处与胞膜, 荧光信号连续且强度均匀。IMQ 组小鼠皮损区域 VE-cadherin⁺CD31⁺双阳性信号显著增强, 平均荧光强度较正常组明显增强 ($P<0.05$), 但膜定位的连续性普遍中断, 与 IMQ 组比较, IMQ+RS 组平均荧光强度明显增强 ($P<0.05$), 阳性表达区域面积进一步扩大, 但表现为不规则、颗粒状或斑片状的异常分布, 提示血管内皮黏附连接结构遭到破坏, 提示各造模组小鼠出现血管内皮连接紊乱与新生血管异常增生。与 IMQ+RS 组比较, 各给药组平均荧光强度及分布范围均有明显减弱 ($P<0.05$)。表明药物干预可促进血管内皮结构稳定并抑制病理性血管生成。见图 5。

正常组皮肤真皮层偶见散在 CCR6⁺CD103⁺双阳性细胞。IMQ 组及 IMQ+RS 组小鼠皮损中双阳性细胞大量浸润, 主要分布于真皮乳头层及血管周围, 其细胞密度与平均荧光强度较正常组均明显上升 ($P<0.05$), 符合 CCL20-CCR6 通路驱动的 Th17 细胞皮肤归巢与局部活化的病理特征。各给药组均能减少 CCR6⁺CD103⁺细胞聚集, 阳性细胞数目与平均荧光强度较 IMQ+RS 组均明显下降 ($P<0.05$), 提示 KXJD 可抑制皮肤局部异常免疫炎症。见图 6。

正常组皮肤中, SP⁺和 CGRP⁺分别与 PGP9.5⁺的共标神经纤维稀疏分布于真皮浅层。IMQ 组及

IMQ+RS 组小鼠皮损内三者共标的神经纤维密度及平均荧光强度值较正常组明显增高 ($P<0.05$), 纤维形态增粗、分支增多, 并向表皮方向延伸, 表明感觉神经纤维异常增生及神经肽释放活性增强, 在 IMQ+RS 组中, 上述异常改变进一步加剧, 神经纤维密度与平均荧光强度均较 IMQ 组明显增高 ($P<0.05$)。与 IMQ+RS 组比较, 各给药组小鼠皮损共标神经纤维的密度与平均荧光强度均明显降低 ($P<0.05$), 提示 KXJD 可能通过抑制感觉神经纤维的异常活化及神经肽释放调节神经源性炎症通路, 缓解银屑病样皮损的病理进程。见图 7、图 8、表 5。

3.7 KXJD 对各组小鼠皮肤组织 IL-10, IL-17A, IL-23 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 与正常组比较, IMQ 组小鼠皮肤组织 IL-17A, IL-23 表达水平明显上升, IL-10 表达水平明显下降 ($P<0.05$)。与 IMQ 组比较, IMQ+RS 组小鼠皮肤组织 IL-17A, IL-23 表达水平上升, IL-10 表达水平明显下降 ($P<0.05$)。与 IMQ+RS 组比较, 各给药组皮肤组织内 IL-17A, IL-23 表达水平明显下降, IL-10 表达水平明显上升 ($P<0.05$), 差异具有统计学意义。见表 6。

4 讨论

银屑病是一种由 T 细胞异常活化介导的, 以表皮自稳状态失调为特征的慢性炎症性皮肤病。因其病程迁延、难以根治、容易反复发作的特点, 又被称为“不死的癌症”。除免疫调节异常、遗传易感性及环境因素等传统诱因外, 心理压力等负性情绪应

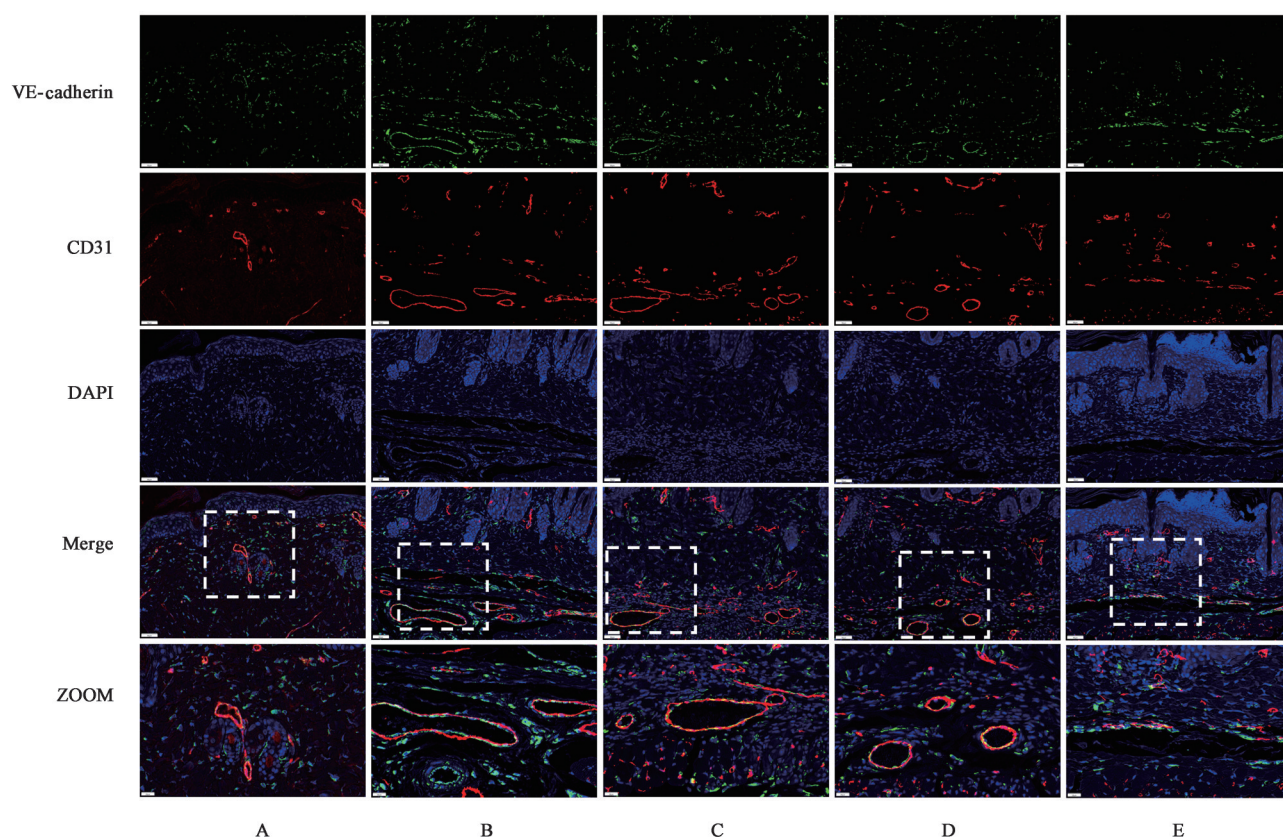


图5 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织 VE-cadherin 和 CD31 水平影响 (IF, $\times 100, \times 200$)

Fig. 5 Effect of KXJD on VE-cadherin and CD31 levels in skin tissue of psoriasis-like mice (IF, $\times 100, \times 200$)

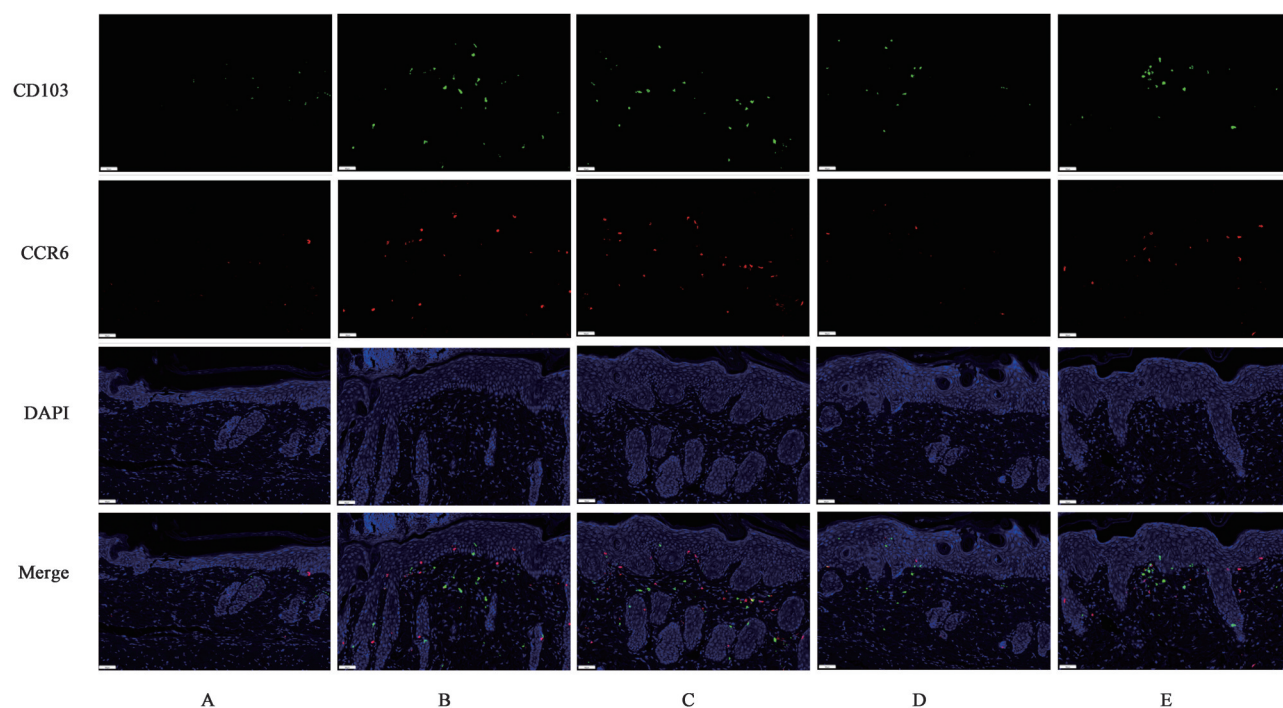


图6 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织 CCR6 和 CD103 水平影响 (IF, $\times 100, \times 200$)

Fig. 6 Effect of KXJD on CCR6 and CD103 levels in skin tissue of psoriasis-like mice (IF, $\times 100, \times 200$)

激的作用日益明确^[18]。该机制主要通过调节神经-免疫轴促进炎症反应,成为银屑病发生与进展中的

重要环节。银屑病患者常伴有持续性瘙痒和局部疼痛,这些感觉症状与神经纤维过敏化及神经递质

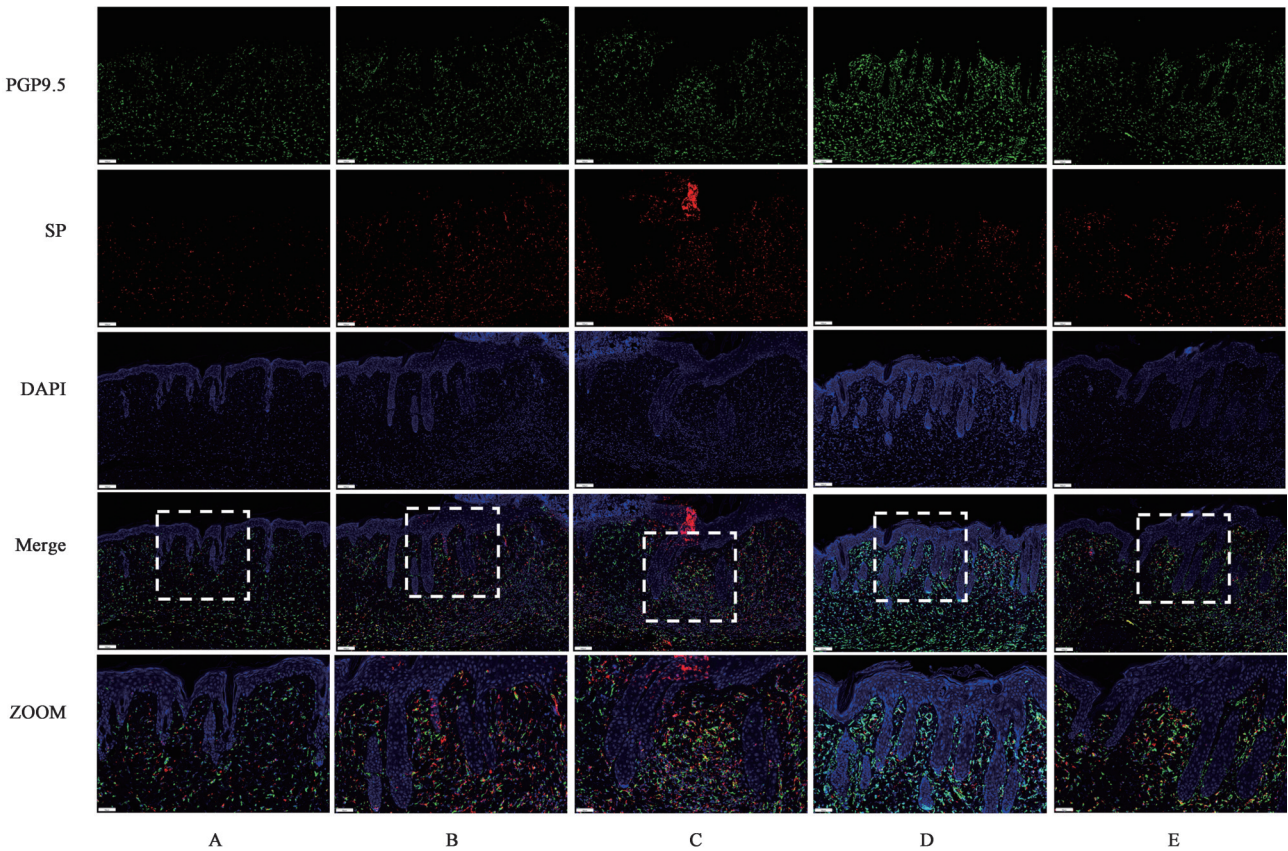


图7 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织SP和PGP9.5水平影响(IF,×100,×200)

Fig. 7 Effect of KXJD on SP and PGP9. 5 levels in skin tissue of psoriasis-like mice (IF ,×100 ,×200)

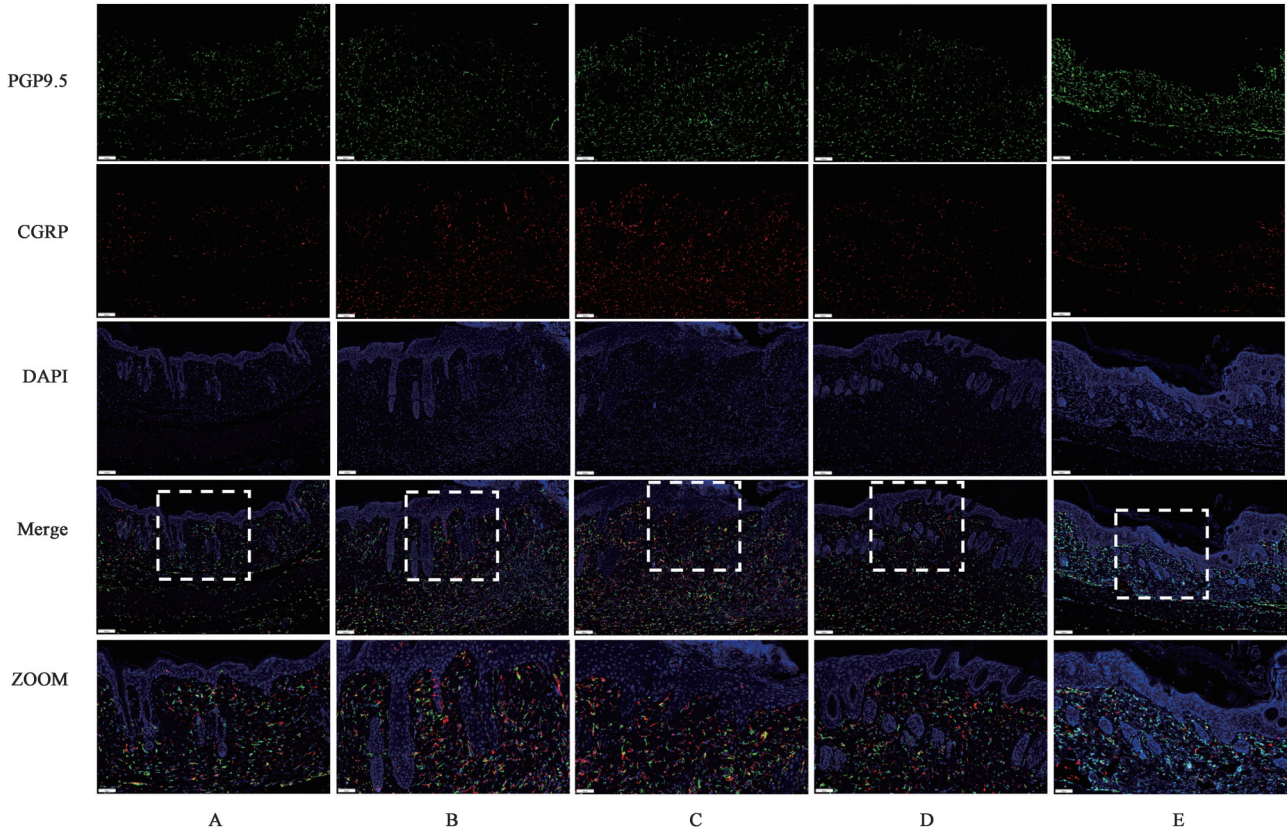


图8 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织CGRP和PGP9.5水平影响(IF,×100,×200)

Fig. 8 Effect of KXJD on CGRP and PGP9. 5 levels in skin tissue of psoriasis-like mice (IF ,×100 ,×200)

表5 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织VE-cadherin/CD31、CCR6/CD103、PGP9.5/SP、PGP9.5/CGRP共表达定量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Quantitative effect of KXJD on co-expression of VE-cadherin/CD31, CCR6/CD103, PGP9.5/SP, PGP9.5/CGRP in psoriasis-like mice skin tissues ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	VE-cadherin/CD31	CCR6/CD103	SP/PGP9.5	CGRP/PGP9.5
正常组		1.12±0.18	0.11±0.03	0.27±0.06	0.23±0.09
IMQ组		3.35±0.32 ¹⁾	1.51±0.13 ¹⁾	3.62±0.52 ¹⁾	2.93±0.42 ¹⁾
IMQ+RS组		4.96±0.51 ²⁾	2.09±0.16 ²⁾	4.16±0.43 ²⁾	3.95±0.38 ²⁾
KXJD组	30.42 g·kg ⁻¹	2.15±0.14 ³⁾	0.35±0.08 ³⁾	1.63±0.24 ³⁾	1.36±0.29 ³⁾
MTX组	1 mg·kg ⁻¹	2.08±0.13 ³⁾	0.41±0.07 ³⁾	2.13±0.31 ³⁾	1.52±0.17 ³⁾

表6 开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮肤组织IL-10、IL-17A、IL-23 mRNA表达影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 6 Effect of KXJD on mRNA expression of IL-10, IL-17A, IL-23 in shin tissue of psoriasis mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	IL-10	IL-17A	IL-23
正常组		1.18±0.03	1.06±0.09	1.12±0.08
IMQ组		0.31±0.09 ¹⁾	2.83±0.46 ¹⁾	2.56±0.33 ¹⁾
IMQ+RS组		0.19±0.12 ²⁾	3.26±0.53 ²⁾	2.85±0.41 ²⁾
KXJD组	30.42 g·kg ⁻¹	0.68±0.11 ³⁾	1.94±0.25 ³⁾	1.77±0.29 ³⁾
MTX组	1 mg·kg ⁻¹	0.71±0.09 ³⁾	1.97±0.31 ³⁾	1.85±0.24 ³⁾

释放密切相关^[19]。负性的心理状态可刺激感觉神经末梢释放的SP、CGRP等神经肽释放,可直接作用于局部免疫细胞及角质形成细胞,增强IL-1 β 等促炎因子的表达,并降低瘙痒感知的阈值^[20]。而长期的瘙痒-搔抓循环不仅加重皮损,也进一步激活局部神经-免疫炎症通路,加剧神经源性炎症,形成难以缓解的恶性循环^[21]。此外,银屑病相关的系统性并发症(如关节病变等)也可能与全身性神经免疫调节紊乱有关^[22]。由此可见,心理因素触发的神经免疫机制在银屑病的致病机制中具有重要作用,并深刻影响患者的长期预后与生活质量。

银屑病归属中医学“白疔”范畴,宋坪教授认为本病的核心在于“玄府郁闭,热毒蕴结”,并据此开创了“开通玄府,通络解毒”法及开玄解毒系列方剂,临床疗效显著。值得注意的是,本团队在临床观察中发现,接受KXJD治疗的患者在皮损改善的同时,部分患者的情绪与睡眠障碍等症状也获得缓解。考虑到长期心理压力与情志失调是加重银屑病的重要因素,且由银屑病本身及并发症所导致的患者抑郁、焦虑乃至自杀风险也逐年增加。从“神-形-体”的中医整体观审视,KXJD的临床疗效或与其对神机与形质的双重调节密不可分。玄府作为气液流通、神机运转的微观通道,其开阖失常不仅是形态之闭,更是气机升降出入与神机运转的功能之郁。情志不畅或五志过极,皆可导致“神机郁

遏”,神郁则气机阻滞,进而引发玄府开阖失司,形成由神及形、从功能紊乱到结构壅滞的关键病机转折。玄府既闭,则阳气怫郁于腠理之间,郁结之气不得宣散,化热生火,火盛成毒。热毒内蕴,灼伤营血,则阴液被耗,肌肤失养,故见层层脱屑,内滞络脉,则气血壅塞,瘀阻不通,故见斑块肥厚、底现红晕,外发肌肤,形成“郁-闭-热-毒”的胶结态势。IMQ是Toll样受体(TLR)7/8的激动剂,其诱导的皮损病变在组织病理学特征和病程发展上与人类银屑病高度相似,被认为是最经典的银屑病样动物模型之一^[9]。鉴于负性情绪应激对银屑病发生发展的重要影响,本研究在现有IMQ诱导模型的基础上,参考文献造模方法^[12,15,19],联合束缚应激构建了一种复合型银屑病样小鼠模型,旨在揭示心理应激因素影响银屑病进程的神经免疫机制。结果显示,与正常组比较,模型组与束缚应激模型组小鼠均呈现典型的银屑病样组织病理学改变,包括表皮厚度增加,角质层角化过度、不全,真皮层大量炎性细胞浸润,Baker评分显著升高。且与单纯IMQ诱导比较,各束缚应激联合造模组小鼠上述银屑病样皮损改变进一步加重,并出现焦躁、恐惧、颤抖及挣扎等应激行为学表征。与文献报道一致,表明银屑病样皮炎模型及其与束缚应激复合模型均成功建立。经KXJD干预后,小鼠皮肤组织的异常增殖与炎性浸润明显减轻,银屑病样皮损得到有效缓解,Baker评分降低。同时小鼠焦虑不安等应激行为表现也有明显改善,揭示KXJD在银屑病治疗方面兼具皮损修复与情绪调节的独特价值。

在银屑病的发病机制中,Th17细胞的皮肤归巢是一个高度协调的炎症放大过程,其本质源于局部组织微环境与系统性免疫失调之间的相互作用。这一过程的启动并非仅依赖于循环淋巴细胞的被动外渗,其核心机制在于CCR6-CCL20趋化轴的特异性引导作用。循环中的Th17细胞高表达CCR6,而银屑病皮损区域的角质形成细胞在IL-17A等炎

症因子刺激下大量分泌CCL20,形成显著的趋化梯度,从而引导Th17细胞向表皮定向迁移^[4,23]。值得注意的是,表皮-真皮屏障的局部破坏为此过程提供了重要条件。研究显示,在银屑病早期,表皮屏障功能受损促使角质形成细胞释放预先储存的CCL20,并在IL-17A介导的正反馈机制下持续合成新的CCL20^[24]。这一双重机制保障了趋化信号的持续存在,为Th17细胞的定向迁移创造了有利环境。在血管层面,微血管内皮屏障的功能紊乱进一步促进了Th17细胞的渗漏。循环中的Th17细胞通过表面特异性表达的CLA与内皮细胞相互作用,活化的内皮细胞将释放Ang-2,破坏VE-cadherin等内皮连接蛋白,从而增强血管通透性,促进Th17细胞的跨内皮迁移^[25]。迁移至表皮的Th17细胞高表达CD103,该分子可与表皮基底层中的E-钙黏蛋白特异性结合,促使Th17细胞在局部长期滞留,并分化为TRM。TRM可在皮肤等外周组织中长期存活,时间能够长达数年,在局部形成可稳定的免疫记忆^[26]。有研究者指出,银屑病高达90%以上的原位复发特征,与Th17细胞介导的这一具有空间特异性免疫记忆机制关系密切^[27]。锚定于皮肤具有归巢表型的CCR6⁺Th17细胞在促炎因子的刺激下可迅速重启免疫应答,驱动疾病原位复发。临床研究表明^[28],银屑病发病早期即可出现CCR6⁺T细胞亚群的活化,其水平与功能异常上调,并伴随患者外周血中Th17细胞比例的显著升高。GÓMEZ-MELERO等^[29]认为通过抑制CCR6-CCL20趋化轴表达,阻断Th17细胞皮肤持续募集与局部滞留,可减轻银屑病皮损并控制炎症进一步扩散。此外,DE JESÚS-GIL等^[30]研究发现,在银屑病、特应性皮炎等炎性皮肤病中,Th17细胞表面高表达特异性皮肤归巢受体CLA,并具备在无外源刺激条件下自主产生大量IL-17A的能力,实现炎症的自我维持。同时患者CLA⁺T细胞数量与银屑病面积和严重程度指数(PASI)评分呈正相关,可作为临床治疗响应的有效参照。因此,通过抑制Th17细胞皮肤归巢,从源头阻断致病性炎症环路的建立与维持,有望为银屑病治疗带来超越症状控制的潜在干预策略。

近年来,神经免疫的相互作用在银屑病发病过程中的重要性日益凸显。支配皮肤的周围感觉神经不仅可传递伤害性信号,还可通过分泌SP、CGRP等神经肽类介质,建立与树突状细胞等免疫细胞形成活跃的交互网络,主动参与塑造银屑病特征性炎症微环境^[20,31]。而神经免疫调控的范围并不局限于

传统免疫细胞。研究发现,神经信号通过多种神经肽不仅促进角质形成细胞释放IL-36、CCL20等趋化因子,还参与调节真皮成纤维细胞的活化状态与胞外基质重塑,并影响血管内皮细胞的通透性与新生血管形成^[32-33]。这些非免疫细胞的响应进一步扩大并固化了银屑病的病理过程。此外,银屑病皮损区存在显著的神经重塑现象,表现为神经纤维密度异常升高和分布模式紊乱^[7]。值得关注的是,在慢性炎症的刺激下,外周感觉神经元自身也会发生表型和功能改变,包括离子通道表达谱的重编程和神经肽合成能力的上调。这种趋于“中枢化”的兴奋特性,使得外周感觉神经元即使在缺乏外界刺激的情况下,仍能维持异常神经肽的释放,从而持续驱动局部免疫炎症反应^[34]。研究发现,这种改变与TRM的长期存活也存在密切关联。基于以上机制,本课题推断神经免疫轴很可能通过调控Th17细胞皮肤归巢,在银屑病的慢性化与复发进程中发挥重要作用^[35]。PGP9.5是感觉神经轴突特异性标记,可量化皮损区神经密度^[19]。银屑病中MMP-9/TIMP-1失衡(MMP-9高表达,TIMP-1相对不足)是导致细胞外基质降解,加剧皮损形成和血管屏障破坏的重要因素之一^[36]。NF- κ B的持续激活是银屑病慢性炎症状态发生的基础,CK10是角质细胞角化异常的标志^[11-12]。本次研究结果发现,相较正常组,模型组与束缚应激模型组小鼠血管迂曲扩张表现突出,血清IL-1 β 、Ang-2水平和皮损组织MMP-9、CCL20、CCR6含量及CLA、CD103、CK10、NF- κ B、IL-17A、IL-23表达水平平均明显升高,皮损组织TIMP-1、IL-10表达水平降低。免疫荧光双染发现,VE-cadherin和CD31、CCR6和CD103、SP和PGP9.5、CGRP和PGP9.5荧光共定位强度均显著上升。提示银屑病皮损区外周感觉神经出现异常激活,并通过释放神经肽,刺激CCR6-CCL20趋化轴活化,破坏血管屏障的完整性及功能,引起Th17细胞向皮肤组织迁移并长期滞留,加剧异常角化及炎症,最终导致组织进行性损伤。相较各造模组,KXJD干预后可有效逆转上述异常改变。结果表明,KXJD能够有效阻断皮损部位的异常神经活化与增殖,通过减少SP、CGRP等神经肽的释放,抑制促炎介质及损伤分子分泌,改善血管屏障完整性及功能破坏,减少Th17由血液向皮肤的定向迁移,从而缓解银屑病样皮损的异常角化及炎症反应。

综上所述,本研究表明开玄解毒核心方KXJD能有效缓解IMQ联合束缚应激诱导的小鼠银屑病

样皮损及焦虑样行为。其作用机制可能是通过阻断皮损区感觉神经的异常活化,减少SP、CGRP等神经肽的释放,下调CCL20/CCR6趋化轴活性,最终抑制Th17细胞向皮肤的迁移与滞留,该路径可能是KXJD打断神经-免疫炎症恶性循环,减轻银屑病样皮损的关键环节。然而,本研究尚存在一定局限性。在模型验证层面,本文对束缚应激造模成功的判断主要依赖行为学定性描述,后续研究应引入旷场实验、高架十字迷宫等行为学检测,并结合多时间点神经内分泌监测,以更严谨地评估应激模型的有效性。同时,关于神经活性抑制与Th17细胞归巢减少之间的直接因果联系,尚需通过特异性神经元调控技术进一步验证。此外,在临床转化层面,KXJD的物质基础和作用靶点有待阐明。后续将开展入血成分分析,结合网络药理学筛选关键活性分子,并通过临床队列研究评估KXJD对银屑病患者神经肽水平、Th17归巢表型及情绪障碍的改善作用,尝试建立“神经免疫指标-中医证候-临床疗效”的关联模型,为KXJD的精准应用提供依据。后续研究将围绕上述机制展开深入探索,为阐明KXJD在银屑病治疗中“皮损-情志”共治作用的科学内涵提供更坚实的理论依据。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] LIU L, WANG R, PENG Y, et al. Global psoriasis burden and forecasts to 2050 [J]. *JAMA Dermatol*, 2026, 162 (2) : 201-203.
- [2] FABRAZZO M, ROMANO F, ARRIGO M, et al. A multivariate analysis of depression prevalence in psoriasis patients: A cohort study [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(4):2060.
- [3] CHIU H Y, CHAN K K, WANG J R, et al. Single-cell transcriptomics reveal circulating skin-homing CLA⁺ CTSW⁺ cytotoxic CD4⁺ T cells contribute to relapse of psoriasis [J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(11):e70518.
- [4] SIGURGRÍMSDÓTTIR H, EYSTEINSDÓTTIR J H, KRISTJÁNSSON Á K, et al. Skin-homing potential of peripheral immune cells from psoriasis patients and the effects of LL-37 on their secretion of chemokines during psoriasis-mimicking stimulation [J]. *Scand J Immunol*, 2025, 102(5): e70066.
- [5] RYAN G E, HARRIS J E, RICHMOND J M. Resident memory T cells in autoimmune skin diseases [J]. *Front Immunol*, 2021, doi: 10. 3389/fimmu. 2021. 652191.
- [6] LI Z, QUAN H, LIU W, et al. Stress-induced activation of prolactin-NR4A1-midkine axis exacerbates skin inflammation [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2026, 13(5):e09679.
- [7] HUANG C, SUN P Y, JIANG Y, et al. Sensory ASIC3 channel exacerbates psoriatic inflammation via a neurogenic pathway in female mice [J]. *Nat Commun*, 2024, 15 (1) : 5288.
- [8] 宋坪, 王晓旭, 杨茂誉, 等. 开通玄府、通络解毒法治疗斑块状银屑病 120 例疗效观察 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(17): 1476-1479.
- SONG P, WANG X X, YANG M Y, et al. Clinical observation of 120 cases of plaque psoriasis treated with Xuanfu and Tongluo Jiedu method [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 54(17):1476-1479.
- [9] 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. Kaixuan-Jiedu compatibility alleviates skin lesions and inflammatory reactions in psoriasis-like mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(17):79-88.
- [10] 宋坪, 王晓旭, 李景利, 等. 斑块状银屑病皮损部位末梢血和肘正中静脉血中相关炎症因子含量的检测 [J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2014, 13(2):75-77.
- SONG P, WANG X X, LI J L, et al. Detection of inflammatory cytokine levels in peripheral blood from lesional skin and median cubital venous blood in plaque psoriasis [J]. *Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med*, 2014, 13(2):75-77.
- [11] 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. Study on the mechanism of Kaixuan Jiedu core prescription in regulating PTGS2 to improve skin lesions in psoriasis mouse models [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(17):49-59.
- [12] 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. Exploration of the Kaixuan Jiedu core prescription's efficacy in alleviating psoriasis through modulation of ferroptosis pathways: An integrative approach involving bioinformatics and experimental validation [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(17):69-78.
- [13] 覃叶萍, 刘文慧, 代丹, 等. 基于鞘脂代谢探索开玄解毒核心方对银屑病样小鼠皮损 SPHK2/S1P/MCP-1 通路的调控作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(17):60-68.
- QIN Y P, LIU W H, DAI D, et al. Exploring effect of KXJD core formula on regulating SPHK2/S1P/MCP-1 pathway in psoriasis-like mouse model based on sphingolipid metabolism [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(17):60-68.
- [14] 牛凡琪, 李炳男, 王思农, 等. 探讨桃红四物汤在治疗银屑病中的抗炎作用及对 Caspase-14、EVPL 干预作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(20):12-21.

- NIU F Q, LI B N, WANG S N, et al. To investigate the anti-inflammatory effect of Taohong Siwu decoction in the treatment of psoriasis and its mechanism of intervention on Caspase-14 and EVPL [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(20): 12-21.
- [15] TANG J, ZHAO S, SU Y, et al. Psychological stress overactivates IL-23/Th17 inflammatory axis and increases cDC2 in imiquimod-induced psoriasis models of C57BL/6 mice[J]. *Exp Dermatol*, 2025, 34(6): e70128.
- [16] LI Y, ZHANG G, CHEN M, et al. Rutaecarpine inhibited imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis via inhibiting the NF- κ B and TLR7 pathways in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1876-1883.
- [17] CHEN L, HUANG D, HUANG Z, et al. Decreased HMGCS1 inhibits proliferation and inflammatory response of keratinocytes and ameliorates imiquimod-induced psoriasis via the STAT3/IL-23 axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, doi: 10. 1016/j. intimp. 2024. 112033.
- [18] DING W, YAO M, WANG Y, et al. Patient needs in psoriasis treatment and their influencing factors: A nationwide multicentre cross-sectional study in China [J]. *Indian J Dermatol*, 2023, 68(5): 587.
- [19] GE H, MAO Y, CHEN W, et al. Stress aggravates imiquimod-induced psoriasiform inflammation by promoting M1 macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110899.
- [20] KEENAN E L, GRANSTEIN R D. Proinflammatory cytokines and neuropeptides in psoriasis, depression, and anxiety[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2025, 241(3): e70019.
- [21] LIU A W, ZHANG Y R, CHEN C S, et al. Scratching promotes allergic inflammation and host defense via neurogenic mast cell activation [J]. *Science*, 2025, 387(6733): eadn9390.
- [22] LUBRANO E, AMBROSINO P, PERROTTA F M. Psychological health in the management of patients with psoriatic arthritis: An intricate relationship [J]. *Rheumatol Ther*, 2025, 12(3): 407-419.
- [23] LAWLER W, CASTELLANOS T, ENGEL E, et al. Impact of obesity on the CCR6-CCL20 axis in epidermal $\gamma\delta$ T cells and IL-17A production in murine wound healing and psoriasis[J]. *J Immunol*, 2025, 214(1): 153-166.
- [24] ZHAO L, LI J, JIANG B, et al. GRP78 Downregulation in keratinocytes promotes skin inflammation through the recruitment and activation of CCR6+ IL-17A-Producing $\gamma\delta$ T cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(7): 1557-1567. e11.
- [25] DEBERG H A, FAHNING M L, VARKHANDE S R, et al. T cells promote distinct transcriptional programs of cutaneous inflammatory disease in keratinocytes and dermal fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 2025, 145(11): 2811-2827.
- [26] CARDINEZ C, HAO Y, KWONG K, et al. IKK2 controls the inflammatory potential of tissue-resident regulatory T cells in a murine gain of function model[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 2345.
- [27] TANG J, DANG E, WANG G. Implication of epigenetic factors in development and recurrence of psoriasis [J]. *Curr Opin Immunol*, 2025, doi: 10. 1016/j. coi. 2025. 102636.
- [28] TSIOGKAS S G, MAVROPOULOS A, DARDIOTIS E, et al. A sharp decrease of Th17, CXCR3+Th17, and Th17. 1 in peripheral blood is associated with an early anti-IL-17-mediated clinical remission in psoriasis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2022, 210(1): 79-89.
- [29] GÓMEZ-MELERO S, CABALLERO-VILLARRASO J. CCR6 as a potential target for therapeutic antibodies for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Antibodies (Basel)*, 2023, 12(2): 30.
- [30] DE JESÚS-GIL C, SANS-DE SANNICOLÀS L, GARCÍA-JIMÉNEZ I, et al. The translational relevance of human circulating memory cutaneous lymphocyte-associated antigen positive T cells in inflammatory skin disorders [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 652613.
- [31] PEPIN R, RINGUET J, BEAUDET M J, et al. Sensory neurons increase keratinocyte proliferation through CGRP release in a tissue engineered *in vitro* model of innervation in psoriasis[J]. *Acta Biomater*, 2024, 182: 1-13.
- [32] FANG Z, JIANG R, WANG Y, et al. Topical TYK2 inhibitor ameliorates psoriasis-like dermatitis via the AKT-SP1-NGFR-AP1 pathway in keratinocytes[J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(3): e70256.
- [33] CAI X, HAN M, LOU F, et al. Tenascin C⁺ papillary fibroblasts facilitate neuro-immune interaction in a mouse model of psoriasis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2004.
- [34] REN Q, GAO Z, HAN W, et al. Inhibition of Ephrin receptor signaling in the paraventricular nucleus attenuates psoriasis-like dermatitis via synaptic plasticity and immune homeostasis modulation[J]. *J Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 211.
- [35] WILCOX N C, TAHERI G, HALIEVSKI K, et al. Interactions between skin-resident dendritic and Langerhans cells and pain-sensing neurons [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 154(1): 11-19.
- [36] AMEZCUA-GUERRA L M, BOJALIL R, ESPINOZA-HERNANDEZ J, et al. Serum of patients with psoriasis modulates the production of MMP-9 and TIMP-1 in cells of monocytic lineage[J]. *Immunol Invest*, 2018, 47(7): 725-734.

[责任编辑 张丰丰]