

开玄解毒核心方通过抑制 NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2 信号通路介导的神经炎症治疗咪喹莫特诱导的银屑病样小鼠

江梦瑶^{1,2}, 李佳琦¹, 刘欢¹, 肖雪¹, 张宁馨¹, 杨斌^{1*}, 宋坪^{1*}

(1. 中国中医科学院 西苑医院, 北京 100091;

2. 中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的:探讨开玄解毒核心方(KXJD)通过调控神经生长因子-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)信号通路对咪喹莫特(IMQ)诱导的银屑病样小鼠神经炎症及免疫炎症的影响及分子机制。方法:采用雄性C57BL/6J小鼠,建立IMQ诱导的银屑病样皮损模型,将24只小鼠随机分为空白组、模型组、甲氨蝶呤组(MTX, 1 mg·kg⁻¹)和KXJD组(30.42 g·kg⁻¹),每组6只。采用免疫组化(IHC)检测皮损中分化簇3(CD3)、巨噬细胞标志物F4/80、淋巴细胞抗原6复合位点G(Ly6G)、P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)、NGF、磷酸化(p)-TrkA、p-TRPV1、PAR-2表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清白细胞介素(IL)-17A、IL-23水平;免疫荧光(IF)与蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(p-p38 MAPK)、p-核转录因子-κB p65(NF-κB p65)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测皮损中IL-1β、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-6、趋化因子配体1(CXCL1)mRNA水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠皮损中CD3⁺、F4/80⁺、Ly6G⁺阳性面积明显增加($P<0.05$),血清IL-17A、IL-23水平明显升高($P<0.05$),皮损中SP、CGRP阳性面积明显增加($P<0.05$),NGF、p-TrkA、p-TRPV1、PAR-2阳性面积明显增加($P<0.05$),p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-NF-κB p65/NF-κB p65明显升高($P<0.05$),IL-1β、TNF、IL-6、CXCL1的mRNA表达水平明显上调($P<0.05$)。与模型组比较,KXJD组上述指标均明显逆转($P<0.05$);MTX组p-TRPV1、PAR-2表达明显下调($P<0.05$),NGF、p-TrkA、CGRP表达差异无统计学意义。结论:KXJD抑制NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2信号通路,减少神经肽释放,同时下调p38 MAPK/NF-κB信号通路及下游促炎因子表达,改善银屑病样神经炎症与免疫炎症,即KXJD改善银屑病样炎症的效应与抑制NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2信号通路密切相关,为“玄府理论”的现代阐释提供实验依据。

[关键词] 开玄解毒核心方; 银屑病; 神经炎症; 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; p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/核转录因子-κB(NF-κB)信号通路

[中图分类号] R275;R285;R277 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)19-0111-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20261121

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260409.1006.001>

[网络出版日期] 2026-04-09 16:26:08 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Kaixuan Jiedu Core Prescription Ameliorates Imiquimod-induced Psoriasis-like Skin Lesions in Mice by Inhibiting Neuroinflammation Mediated by NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2 Signaling Pathway

JIANG Mengyao^{1,2}, LI Jiaqi¹, LIU Huan¹, XIAO Xue¹, ZHANG Ningxin¹, YANG Bin^{1*}, SONG Ping^{1*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and molecular mechanisms of Kaixuan Jiedu core prescription (KXJD) on

[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)

[第一作者] 江梦瑶,在读博士,执业医师,从事中医药防治皮肤病的机制研究,E-mail:434839638@qq.com

[通信作者] * 宋坪,博士,主任医师,从事中西医结合防治皮肤病研究,E-mail:songping@vip.126.com;

* 杨斌,硕士,副研究员,主要从事中药药理学研究,E-mail:bean5@126.com

neuroinflammation and immuno-inflammation in the mouse model of imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like skin lesions by regulating the nerve growth factor (NGF)-tropomyosin receptor kinase A (TrkA)/transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)-protease-activated receptor-2 (PAR-2) signaling pathway. **Methods:** A psoriasis-like skin lesion model was established in male C57BL/6J mice with IMQ. A total of 24 mice were randomized into four groups ($n=6$ per group): Blank control, model, methotrexate (MTX, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and KXJD ($30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Immunohistochemistry was employed to detect the expression of cluster of differentiation 3 (CD3), EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (F4/80), lymphocyte antigen 6 complex locus G (Ly-6G), substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), NGF, phosphorylated TrkA (p-TrkA), phosphorylated TRPV1 (p-TRPV1), and PAR-2 in skin lesions. Serum levels of interleukin-17A (IL-17A) and interleukin-23 (IL-23) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescence assay and Western blot were employed to determine the expression of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK) and phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65). Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to measure the mRNA levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6), and C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) in skin lesions. Correlation analysis was performed. **Results:** Compared with the blank control group, the model group showed increased positive areas of CD3⁺, F4/80⁺, and Ly-6G⁺ in skin lesions ($P<0.05$), elevated serum levels of IL-17A and IL-23 ($P<0.05$), increased positive areas of SP and CGRP in skin lesions ($P<0.05$), increased positive areas of NGF, p-TrkA, p-TRPV1, and PAR-2 ($P<0.05$), elevated ratios of p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ($P<0.05$), and upregulated mRNA levels of IL-1 β , TNF, IL-6, and CXCL1 ($P<0.05$). Compared with those in the model group, all the above indicators were reversed in the KXJD group ($P<0.05$). MTX only downregulated the expression of p-TRPV1 and PAR-2 ($P<0.05$), with no significant effects on the expression of NGF, p-TrkA, or CGRP. **Conclusion:** KXJD inhibits the NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2 signaling pathway to reduce neuropeptide release and simultaneously downregulates the p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway and the expression of downstream pro-inflammatory factors to ameliorate psoriasis-like neuroinflammation and immuno-inflammation. The therapeutic effect of KXJD on psoriasis-like inflammation is closely associated with the inhibition of the NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2 signaling pathway. This study provides experimental evidence for the modern interpretation of the Xuanfu theory.

[Keywords] Kaixuan Jiedu core prescription; psoriasis; neuroinflammation; nerve growth factor-tropomyosin receptor kinase A/transient receptor potential vanilloid 1-protease-activated receptor-2 (NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2) signaling pathway; p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway

银屑病(PSO)是一种以表皮过度增生、异常分化及慢性炎症为核心特征的免疫介导性皮肤病,全球发病率逐年上升,严重影响患者身心健康^[1]。传统研究认为,辅助性T细胞17及其下游白细胞介素(IL)-23/IL-17信号轴是驱动疾病发生发展的核心通路^[2]。然而,临床中PSO患者常伴随的瘙痒、灼痛等感觉神经异常及皮损区域神经纤维分布异常,提示神经与免疫系统的交互作用在疾病进程中扮演关键角色,这一“神经免疫交互”机制已成为近年研究的重点^[3-4]。神经源性炎症是神经免疫交互的核心表现形式,其核心机制在于感觉神经末梢释放的神经肽对局部炎症反应的放大效应^[5]。P物质(SP)和降钙素基因相关肽(CGRP)是皮肤中主要促炎神经肽,可促进炎症因子分泌及免疫细胞浸润,形成“神经肽-炎症因子”正反馈环路^[6]。神经生长因子(NGF)及其高亲和力受体原肌球蛋白受体激酶A(TrkA)是调控该环路的关键上游信号^[7]。NGF激活TrkA,不仅促进SP、CGRP等神经肽合成与释放,还能上调并敏化瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)通道^[8]。TRPV1与蛋白酶激活受体2(PAR-2)在皮肤中存在功能协同,联合激活可放大

神经肽释放,激活下游p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)及核转录因子- κ B(NF- κ B)等促炎通路,形成“NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2”神经免疫信号通路,在银屑病炎症的启动与维持中发挥枢纽作用^[9]。目前,该信号通路在银屑病神经炎症中的完整调控机制尚未完全阐明,针对该通路的中医药干预策略也缺乏系统研究。

宋坪教授基于中医“玄府理论”,提出PSO核心病机为玄府开合失常导致毒邪内蕴、瘀血阻滞^[10]。据此,在麻黄汤基础上,以开通玄府、解毒活血为治法,自拟“开玄解毒核心方(KXJD)”。前期临床研究证实,KXJD可显著改善银屑病患者皮损症状^[11];基础实验亦表明,该方能够抑制咪喹莫特(IMQ)诱导的银屑病样小鼠模型的免疫炎症反应,下调IL-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等促炎因子表达^[12]。中医“玄府”功能与现代神经-血管-免疫-内分泌网络的调节作用高度契合,提示“开通玄府”可能通过调控神经免疫交互网络发挥治疗效应。此外,本课题组前期鉴定的KXJD入血活性成分,如虎杖苷、绿原酸可抑制神经炎症,为KXJD调控神经炎症提供了物质基础^[13-14]。基于此,本研究以IMQ诱

导的银屑病样小鼠模型为对象,系统探讨KXJD调控银屑病神经炎症的分子机制,明确其对炎症水平、皮肤神经肽表达及二者相关性的影响,验证其对NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2信号通路及下游p38 MAPK/NF- κ B信号通路、促炎因子转录的调控作用,旨在从“神经免疫交互”视角揭示KXJD治疗新机制,为中医“玄府理论”提供现代实验依据,助力银屑病中医药精准治疗。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6J小鼠共24只,雄性,6~8周龄,体质量(20 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0006。动物饲养于中国中医科学院西苑医院实验动物中心,温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 10)%。

1.2 伦理 动物实验经中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会批准,伦理批号为2025XLC041-2。

1.3 药物与试剂 KXJD(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),中药饮片均由中国中医科学院广安门医院制剂中心提供,并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。制备方法为饮片加水浸泡30min,煎煮2次,合并2次煎煮的滤液浓缩至25mL,即25mL煎煮剂相当于74g生药,即每1mL煎煮剂相当于2.96g生药($2.96\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4°C 冰箱储存备用。将人用剂量按成人60kg,人转换系数37,小鼠转换系数3计算,KXJD等效剂量为 $15.21\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。结合课题组前期确认KXJD二倍等效剂量的药效学效果最佳,即每日给予KXJD剂量为 $30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。5%IMQ乳膏(四川明欣药业有限责任公司,规格3g,国药准字H20030128,批号24113902);甲氨蝶呤片(MTX,上海信宜药厂有限公司,规格2.5mg,国药准字H31020644,批号036201005);虎杖苷(成都曼思特生物科技有限公司,批号MST20240115,纯度 $\geq 98\%$);新绿原酸(上海源叶生物科技有限公司,批号Y120240208,纯度 $\geq 98\%$);分化簇3(CD3)抗体、NGF抗体、PAR-2抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab11089、ab216419、ab180953);巨噬细胞标志物F4/80抗体、淋巴细胞抗原6复合物位点G(Ly6G)抗体、CGRP抗体、磷酸化(p)-p38 MAPK抗体、p38 MAPK抗体、p-NF- κ B p65抗体、NF- κ B p65抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为29414-1-

AP、65078-1-Ig、14348-1-AP、81212-2-RR、14064-1-AP、82335-1-RR、10745-1-AP);SP抗体(美国RD公司,货号MAB4375);p-TrkA抗体(成都正能生物公司,货号680694);p-TRPV1抗体(美国Thermo公司,货号PA5-106215);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号A19056);小鼠IL-17A、IL-23酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为ml058052、ml027404);蛋白定量法(BCA)蛋白定量试剂盒、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为PC0040-500T、R0010);TransZol RNA提取试剂盒、EasyScript[®] First-Strand cDNA Synthesis SuperMix、PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix(北京全式金生物公司,货号分别为ET101-01-V2、AE301-02、AQ601-01-V2)。

1.4 仪器 RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);ECLIPSE C1型正置荧光显微镜(日本Nikon公司);LAMBDA365+型酶标仪(美国Perkin Elmer公司);Mini-PROTEAN[®] Tetra型电泳系统及Mini Trans-Blot[®] Module型WB转膜仪(美国Bio-Rad公司);SimpliAmp型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Thermo Fisher公司);Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies公司)。

2 方法

2.1 采用高效液相色谱法(HPLC)检测KXJD中虎杖苷和新绿原酸色谱图 取KXJD冻干粉末,精密称定,加甲醇超声提取30min,使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜过滤,取续滤液制成供试品溶液(生药质量浓度相当于 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$);分别精密称取虎杖苷、新绿原酸对照品,加甲醇溶解,使用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜过滤,制成对照品溶液(虎杖苷 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,新绿原酸 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。色谱分离采用Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱(0~2min, 5%~12%A; 2~5min, 12%~28%A; 5~7min, 28%~5%A),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长290nm,柱温 30°C ,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.2 小鼠分组及给药 C57BL/6J小鼠适应性饲养1周后,随机分为4组:空白组、模型组(IMQ, $62.5\text{ mg } 5\% \text{ IMQ乳膏}$)、MTX组(MTX, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃)、KXJD组(KXJD, $30.42\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃),每组6只。除空白组外,其余组小鼠于背部剃毛区域(约 $2\text{ cm}\times 3\text{ cm}$)每日涂抹5%IMQ乳膏,连续5d,诱导银屑病样皮损。空白组涂抹等量凡士林。从造模第1天开

始,各给药组每日灌胃相应药物,空白组和模型组灌胃等体积生理盐水。

2.3 样本采集 所有小鼠末次给药后24 h,麻醉小鼠,采集血液,4℃、3 000 r·min⁻¹(离心半径10 cm)离心15 min,分离血清,-80℃保存。脱颈处死小鼠,取背部皮肤组织,部分置于4%多聚甲醛中固定,部分冻存于-80℃备用。

2.4 免疫组化(IHC)检测皮肤石蜡切片 取石蜡切片经脱蜡至水后,采用柠檬酸盐抗原修复液(pH6.0)微波炉加热修复15 min,自然冷却至室温。3%过氧化氢溶液室温避光孵育25 min以阻断内源性过氧化物酶活性,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次(每次5 min)。滴加3%牛血清白蛋白(BSA)封闭液,室温孵育30 min,弃去封闭液,滴加CD3、F4/80、Ly6G、SP、CGRP、NGF、p-TrkA、p-TRPV1、PAR-2一抗工作液,4℃孵育过夜。次日PBS洗涤3次(每次5 min),滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗,室温孵育50 min,再次PBS洗涤3次。滴加二氨基联苯胺(DAB)显色液,显微镜下控制显色时间(3~5 min),自来水冲洗终止显色。苏木素复染3 min,流水漂洗后分化、返蓝,梯度脱水、透明、封片。显微镜下观察并采集图像。

随机选取3只小鼠非连续石蜡切片,每张于皮损区随机采集5个视野(比例尺100 μm)。采用Image J软件定量,以空白组阴性区为参照统一设定灰度阈值(100~255),自动阈值结合人工校准。由2名实验人员双盲独立分析,结果差异>5%时第3人复核一致后纳入。分析前剔除伪影,框选有效视野。阳性判定标准:膜指标(CD3、F4/80、Ly6G)以胞膜棕黄染色计为阳性细胞;浆指标(SP、CGRP)以胞浆棕黄计为阳性区域;膜/浆共表达指标(p-TrkA等)以胞膜或胞浆棕黄计为阳性细胞。一抗经浓度梯度预实验优化(CD3、F4/80、Ly6G、SP、PAR-2为1:200;CGRP、NGF、p-TrkA、p-TRPV1为1:100),并经制造商验证及空白、同型对照证实特异性。阳性面积数据统计为3只小鼠皮肤样本的双盲评分结果,变异系数(CV)在病理检测常规变异范围(CV<30%)内。

2.5 采用免疫荧光(IF)染色检测 p-p38 MAPK、p-NF-κB p65、p-p38 MAPK、p-NF-κB p65 水平 取4%多聚甲醛固定的皮损组织制作冰冻切片(厚度8 μm),室温晾干后PBS洗涤3次(每次5 min)。柠檬酸盐抗原修复液(pH6.0)微波炉加热修复10 min,自然冷却后PBS洗涤3次。3%BSA封闭液室温孵

育30 min,弃去封闭液,滴加p-p38 MAPK、p-NF-κB p65(1:200)一抗工作液,4℃孵育过夜。PBS洗涤,滴加Alexa Fluor 488标记二抗,室温避光孵育1 h。PBS洗涤,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液室温避光孵育5 min进行核染色,荧光淬灭封片剂封片。在正置荧光显微镜下观察并采集图像。

2.6 采用ELISA检测小鼠血清中IL-17A、IL-23的含量 小鼠麻醉后经眼球取血,置于离心管中室温静置1 h,4℃、3 000 r·min⁻¹离心15 min,分离血清并置于-80℃保存备用。严格按照ELISA试剂盒说明书操作,检测血清中IL-17A、IL-23的含量。在酶标仪450 nm波长处测定各孔吸光度A,根据标准曲线计算样本中各细胞因子的浓度。本次实验为6只小鼠血清样本检测结果,即n=6。

2.7 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-NF-κB p65、NF-κB p65 蛋白表达水平 取-80℃冷冻保存的皮损组织约50 mg,加入预冷RIPA裂解液(含1%蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂),组织研磨机冰上研磨至匀浆,4℃、12 000 r·min⁻¹离心30 min,取上清液即为总蛋白。采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,调整各样本蛋白浓度一致后,加入5×SDS上样缓冲液,95℃煮沸5 min使蛋白变性。取蛋白样品30 μg进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳结束后转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,滴加p-p38 MAPK(1:1 000),p38 MAPK、p-NF-κB p65、NF-κB p65(1:200),GAPDH(1:10 000)一抗工作液,4℃孵育过夜。TBST洗涤3次后,滴加二抗(1:5 000)室温孵育1 h,再次TBST洗涤3次。增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒显影,化学发光成像仪采集图像,采用Image J软件分析目标蛋白条带灰度值。

2.8 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 IL-1β、TNF、IL-6、CXCL1 mRNA的表达 使用TransZol提取液提取皮肤组织总RNA,检测浓度与纯度(A_{260}/A_{280})。按照逆转录试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA。以GAPDH为内参基因,使用SYBR Green法在Real-time PCR仪上进行扩增。反应条件:94℃预变性60 s;95℃变性5 s,60℃退火/延伸60 s,共40个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法计算IL-1β、TNF、IL-6、CXCL1 mRNA的相对表达量。引物序列由北京易科基因技术有限公司合成,见表1。

2.9 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0软件进

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'-3')	长度/bp
IL-1 β	上游 GCAACTGTTCTGAAGTCAACT	89
	下游 ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	
TNF	上游 CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	61
	下游 GCTACGACGTGGGCTACAG	
IL-6	上游 TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	76
	下游 TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	
CXCL1	上游 CTGGGATTACCTCAAGAACATC	117
	下游 CAGGGTCAAGGCAAGCCTC	
GAPDH	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTG	123
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著差数法(LSD)- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析中,若 $P > 0.05$,数据符合正态分布,用Pearson相关分析;若 $P < 0.05$,用Spearman相关分析。

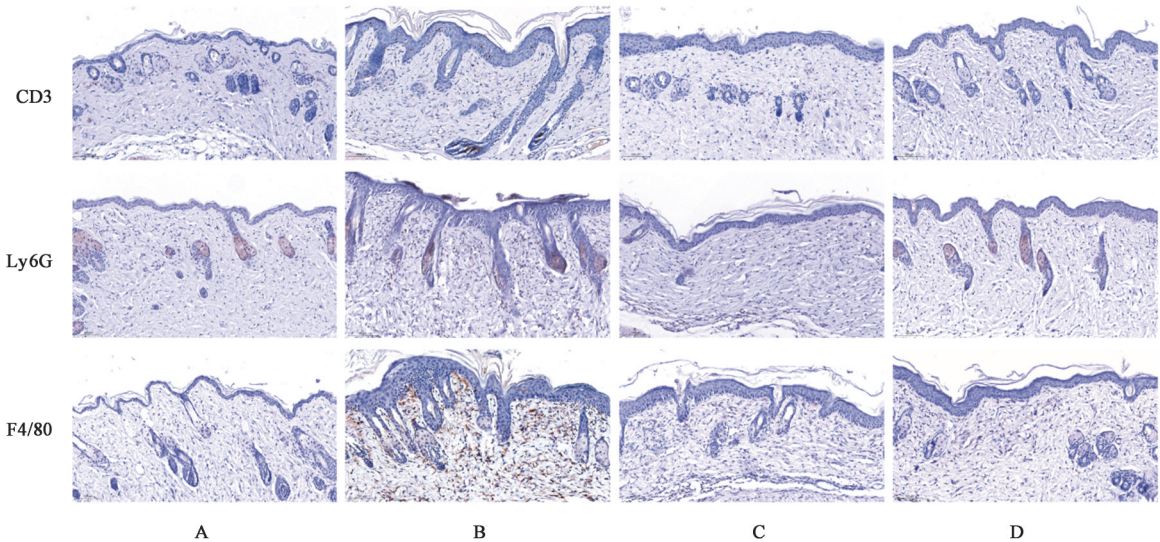
3 结果

3.1 KXJD 色谱图分析 色谱图(见增强出版附加材料)显示,在优化后的7 min梯度洗脱条件下,标准品溶液中新绿原酸与虎杖苷的保留时间分别约为0.728 min和1.552 min,与KXJD色谱峰保留时间一致,且峰形对称、分离度良好,无拖尾、重叠及其他杂质峰干扰。该结果表明,所建立的HPLC方法能够特异性识别并有效分离KXJD中的2种指标成分,具备作为质量控制手段的技术可行性。

3.2 KXJD对银屑病样小鼠的炎症反应的影响

3.2.1 KXJD对银屑病小鼠的皮肤炎症反应的影响

与空白组比较,模型组小鼠皮损组织中CD3 T细胞、F4/80巨噬细胞及Ly6G中性粒细胞的阳性浸润面积明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,KXJD组及MTX组的上述免疫细胞的阳性浸润面积均明显减少($P < 0.05$)。见图1、表2。上述结果表明,KXJD可有效减少银屑病样小鼠皮损局部免疫细胞浸润,改善皮肤炎症反应。



注:A.空白组;B.模型组;C.MTX组;D.KXJD组(图2,图3同)

图1 KXJD对PSO小鼠皮损中CD3、Ly6G、F4/80表达的影响(IHC, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of KXJD on CD3, Ly6G, and F4/80 expression in PSO mouse skin lesions (IHC, $\times 200$)

3.2.2 KXJD对银屑病小鼠的全身炎症反应的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中IL-17A、IL-23水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,KXJD组及MTX组血清IL-17A、IL-23水平均明显降低($P < 0.05$)。见表3。上述结果表明,KXJD可有效降低银屑病样小鼠全身促炎因子水平,降低全身炎症反应。

3.3 KXJD对银屑病小鼠皮肤中神经肽表达与释放的影响

与空白组比较,模型组小鼠皮肤组织中SP

和CGRP的阳性面积明显增强($P < 0.05$),阳性信号主要分布于表皮基底层、真皮乳头层及血管周围;与模型组比较,KXJD组SP和CGRP的阳性面积水平明显降低($P < 0.05$),MTX组SP表达明显下调($P < 0.05$),CGRP表达差异无统计学意义。见表4、图2。

3.4 皮肤中神经肽表达与炎症指标的相关性分析

相关性分析结果显示,皮损中神经肽SP、CGRP的表达水平与皮损局部CD3 $^{+}$ T细胞、F4/80 $^{+}$ 巨噬细胞及Ly6G $^{+}$ 中性粒细胞阳性面积呈显著正相关($P <$

表 2 KXJD 对 PSO 小鼠皮损中 CD3、Ly6G、F4/80 阳性面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of KXJD on positive areas of CD3, Ly6G, and F4/80 in PSO mouse skin lesions ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CD3 ⁺	Ly6G ⁺	F4/80 ⁺
空白组		0.066±0.042	1.649±0.527	0.128±0.097
模型组		0.885±0.127 ¹⁾	5.212±1.034 ¹⁾	4.915±0.611 ¹⁾
MTX 组	0.001	0.140±0.078 ²⁾	1.840±0.885 ²⁾	0.951±0.691 ²⁾
KXJD 组	30.42	0.100±0.060 ²⁾	1.968±0.480 ²⁾	0.846±0.738 ²⁾

注：与空白组比较¹⁾ $P<0.05$ ；与模型组比较²⁾ $P<0.05$ （表 3-表 7 同）

表 3 KXJD 对小鼠血清中炎症因子表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Effect of KXJD on expression of inflammatory mediators in mouse serum ($\bar{x}\pm s, n=6$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-17A	IL-23
空白组		13.028±1.079	26.228±2.536
模型组		38.945±3.363 ¹⁾	79.487±4.238 ¹⁾
MTX 组	0.001	19.425±1.337 ²⁾	36.485±1.889 ²⁾
KXJD 组	30.42	28.519±2.948 ²⁾	44.928±3.602 ²⁾

0.05)；而 SP 与所有免疫标志物的相关性均高于 CGRP，尤其与 F4/80⁺巨噬细胞的相关性最强($r=$

表 4 KXJD 对 PSO 小鼠皮损中 CGRP、SP 阳性面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of KXJD on positive areas of CGRP and SP in PSO mouse skin lesions ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CGRP	SP
空白组		14.697±2.093	3.994±0.852
模型组		30.283±5.027 ¹⁾	9.933±1.071 ¹⁾
MTX 组	0.001	22.082±3.521	7.719±0.814 ²⁾
KXJD 组	30.42	16.731±3.815 ²⁾	5.250±0.904 ²⁾

0.814)。以上提示神经肽释放深度参与了银屑病的皮肤炎症进程。PSO 小鼠皮肤中神经肽表达与炎症浸润的相关性分析图及 Pearson 相关系数见增强出版附加材料。

3.5 KXJD 对皮肤 NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2 信号通路激活神经炎症的影响 IHC 结果显示，与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织中 NGF、p-TrkA、p-TRPV1 及 PAR-2 的蛋白表达水平均明显上调($P<0.05$)；与模型组比较，KXJD 组上述通路蛋白的异常高表达均被明显抑制($P<0.05$)；MTX 组 p-TRPV1、PAR-2 表达明显下调($P<0.05$)，NGF、p-TrkA 表达差异无统计学意义。见图 3、表 5。

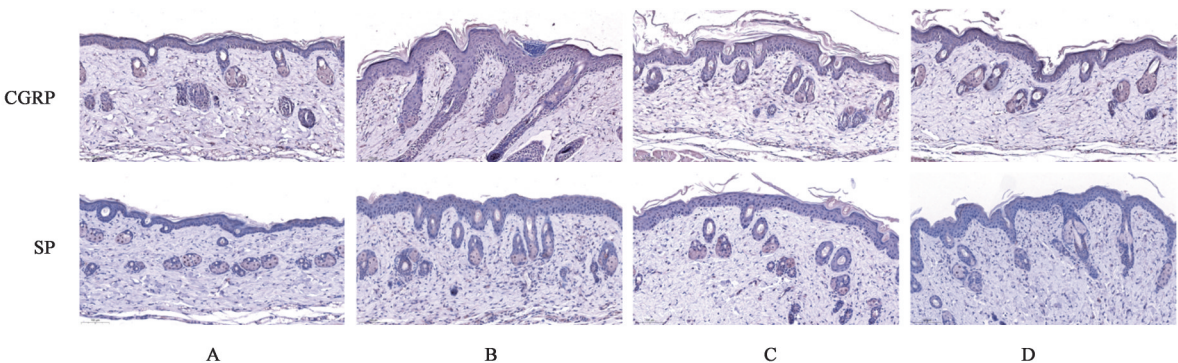


图 2 KXJD 对 PSO 小鼠皮损中 CGRP、SP 表达的影响 (IHC, ×200)
Fig. 2 Effect of KXJD on CGRP and SP expression in PSO mouse skin lesions (IHC, ×200)

3.6 KXJD 对 p38 MAPK/NF-κB 信号通路及促炎因子表达的影响

3.6.1 KXJD 对 p38 MAPK/NF-κB 信号通路的影响 与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织中 p-p38 MAPK 和 p-NF-κB p65 的阳性面积显著增多；与模型组比较，KXJD 组上述磷酸化蛋白的阳性细胞数明显减少。见图 4。

Western blot 结果显示，与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织中 p-p38 MAPK/p38 MAPK 和 p-NF-κB p65/NF-κB p65 明显升高($P<0.05$)；与模型组比较，KXJD 组 p-p38/p38 MAPK、p-NF-κB p65/NF-κB p65

的比值均明显降低($P<0.05$)。见图 5、表 6。

3.6.2 KXJD 对 p38 MAPK/NF-κB 信号通路下游促炎因子表达的影响 Real-time PCR 检测显示，与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织中 IL-1β、TNF、IL-6、CXCL1 mRNA 表达水平明显上调($P<0.05$)；与模型组比较，KXJD 组上述促炎因子的转录水平均明显下降($P<0.05$)。见表 7。

4 讨论

银屑病作为一种慢性免疫炎症性皮肤病，其发病机制已从传统的“免疫细胞-角质形成细胞交互”拓展为“神经-免疫-皮肤”网络协同失调的复杂体

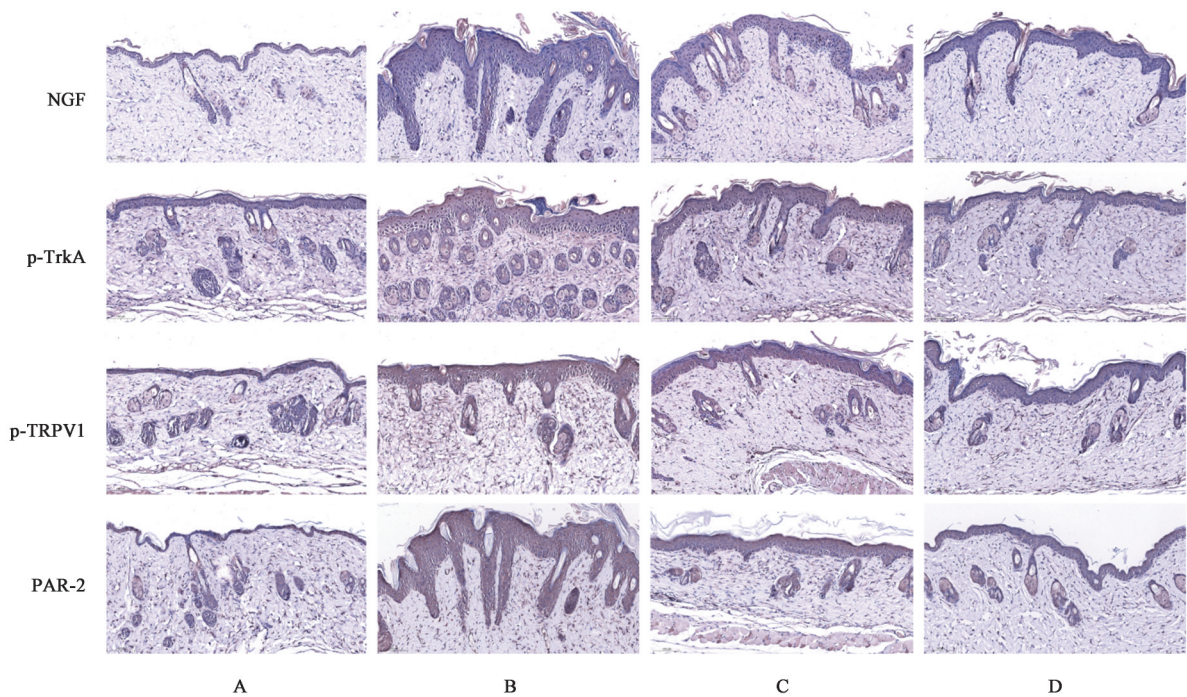


图3 KXJD对PSO小鼠皮损中NGF、p-TrkA、p-TRPV1、PAR-2表达的影响(IHC,×200)
Fig. 3 Effect of KXJD on expression of NGF, p-TrkA, p-TRPV1, and PAR-2 in PSO mouse skin lesions (IHC,×200)

表5 KXJD对PSO小鼠皮损中NGF、p-TrkA、p-TRPV1、PAR-2阳性面积的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of KXJD on positive areas of NGF, p-TrkA, p-TRPV1, and PAR-2 in PSO mouse skin lesions ($\bar{x}\pm s, n=3$)

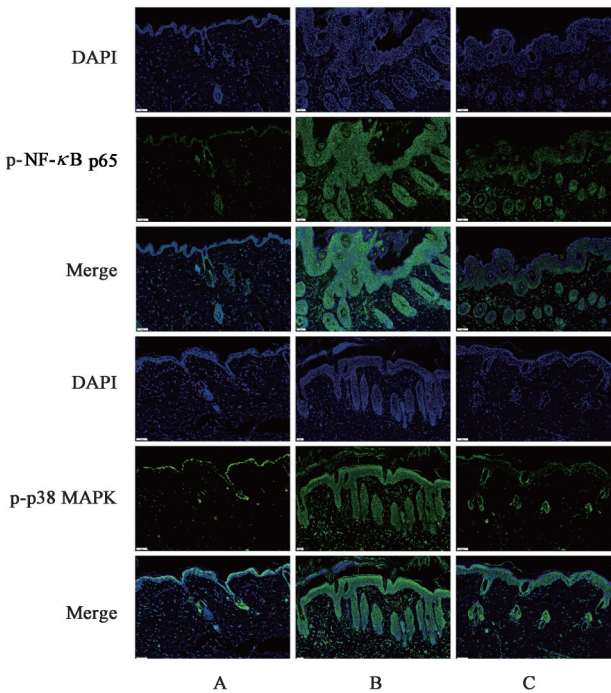
组别	剂量/g·kg ⁻¹	NGF	p-TrkA	p-TRPV1	PAR-2
空白组		5.853±1.640	20.569±1.861	16.738±2.157	13.521±2.074
模型组		17.063±3.779 ¹⁾	37.875±2.068 ¹⁾	28.367±2.437 ¹⁾	36.870±2.508 ¹⁾
MTX组	0.001	16.769±3.793	33.376±2.394	22.492±2.530 ²⁾	30.379±2.043 ²⁾
KXJD组	30.42	8.915±2.552 ²⁾	23.347±2.086 ²⁾	18.124±2.617 ²⁾	17.423±2.211 ²⁾

系,神经免疫交互作为连接多系统的关键纽带,在疾病进展中发挥核心驱动作用^[15]。基于中医“玄府理论”认为银屑病核心病机为“玄府郁闭,热毒蕴结”,玄府作为气血津液与信号传导的微观门户,其开合失常可导致神经信号传导紊乱、免疫炎症放大,这与现代医学“神经-免疫”紊乱的病理特征高度契合。本研究基于中医“玄府理论”拟定KXJD,首次在IMQ诱导的银屑病样小鼠模型中,系统探讨了其对皮肤神经炎症通路的调控作用及分子机制。

研究发现,KXJD的治疗效应呈现“双重调控”特征,且优势显著优于阳性药MTX。在免疫炎症层面,KXJD显著改善模型小鼠炎症反应,减少皮损局部CD3 T细胞、F4/80巨噬细胞及Ly6G中性粒细胞阳性浸润,也降低血清IL-17A、IL-23等系统性炎症因子水平,直接抑制免疫炎症;在神经炎症层面,KXJD可特异性下调皮损中神经肽SP与CGRP的表达,且二者水平与免疫细胞浸润、促炎因子浓度呈

显著正相关,提示KXJD能同步阻断“免疫炎症-神经肽释放”的恶性循环,体现出中医药“多靶点、网络化调控”的独特优势。

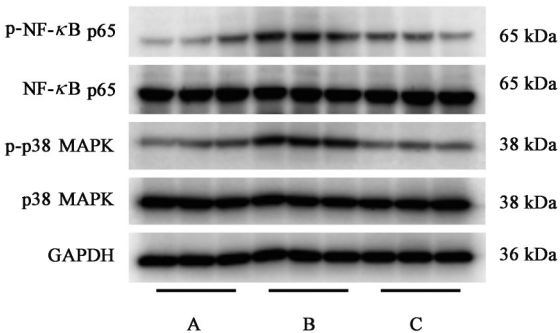
为阐明KXJD抑制神经炎症的核心机制,本研究聚焦调控神经肽释放的上游信号通路NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2及下游炎症通路。结果表明,IMQ诱导的皮损中该上游通路被显著激活,NGF、p-TrkA、p-TRPV1及PAR-2表达异常升高。提示KXJD干预能全面抑制上述关键节点的活化,更进一步证明其可能通过抑制NGF表达及TrkA磷酸化以减少神经肽合成,同时下调TRPV1与PAR-2的协同激活以阻断神经肽释放,最终打破“神经源性炎症”正反馈环路。下游炎症信号检测显示,KXJD还能有效抑制p38 MAPK及NF-κB p65的磷酸化激活,降低IL-1β、TNF、IL-6、CXCL1等促炎因子的mRNA表达。p38 MAPK与NF-κB作为连接神经信号与免疫炎症的核心枢纽,其被抑制进一步印证了KXJD通



注:A.空白组;B.模型组;C.MTX组

图4 KXJD对PSO小鼠皮损中p-NF-κB p65、p-p38 MAPK表达的影响(IF, ×200)

Fig. 4 Effect of KXJD on p-NF-κB p65 and p-p38 MAPK expression in PSO mouse skin lesions (IF, ×200)



注:A.空白组;B.模型组;C.KXJD组

图5 小鼠皮损中p-NF-κB p65、NF-κB p65、p-p38 MAPK、p38 MAPK蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of expression of p-NF-κB p65, NF-κB p65, p-p38 MAPK, and p38 MAPK proteins in mouse skin lesions

表6 KXJD对小鼠皮损中相关蛋白表达的影响(̄x±s, n=3)

Table 6 Effect of KXJD on expression of related proteins in mouse skin lesions (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-NF-κB p65 /NF-κB p65	p-p38 MAPK /p38 MAPK
空白组		0.345±0.174	0.434±0.142
模型组		0.889±0.128 ¹⁾	1.000±0.039 ¹⁾
KXJD组	30.42	0.470±0.138 ²⁾	0.431±0.072 ²⁾

过“上游通路阻断-核心介质抑制-下游信号下调”的层级调控模式发挥作用,形成了从神经免疫轴心到

表7 KXJD对小鼠皮损中炎症因子mRNA表达的影响(̄x±s, n=4)

Table 7 Effect of KXJD on inflammatory factor mRNA expression in mouse skin lesions (̄x±s, n=4)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-1β	TNF	IL-6	CXCL1
空白组		1.000±0.332	1.000±0.502	1.000±0.232	1.000±0.359
模型组		3.126±0.844 ¹⁾	5.395±2.043 ¹⁾	3.144±0.584 ¹⁾	5.194±0.869 ¹⁾
KXJD组	30.42	1.870±0.571 ²⁾	2.849±1.665 ²⁾	2.013±0.530 ²⁾	2.430±1.114 ²⁾

经典炎症通路的完整作用链条,进一步印证了其多通路协同作用模式。

MTX作为临床常用免疫抑制剂,本研究显示其仅能抑制免疫炎症(如减少CD3⁺T细胞浸润、降低IL-17A),但对神经炎症通路关键分子(NGF、p-TrkA、CGRP)无显著调控作用,提示其“仅靶向免疫、不影响神经”的单一作用特征;而KXJD可同步抑制“免疫炎症(CD3⁺T细胞和F4/80⁺巨噬细胞浸润、IL-17A、IL-23等)”与“神经炎症(NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2信号通路、SP/CGRP释放)”,形成“神经-免疫双调控”效应,这与中医药“整体调节”理论一致,也解释了其在改善银屑病患者瘙痒(神经感觉异常)方面的潜在优势,凸显KXJD作为中药复方的独特价值。

从“玄府理论”视角审析,“开通玄府”旨在恢复微观门户的通利,对应于现代机制中调控神经信号传导、改善神经免疫对话^[16];“解毒活血”则旨在清除内蕴之毒邪与瘀滞,对应于抑制免疫细胞浸润、减少炎症介质释放^[17]。本研究表明,KXJD通过抑制NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2信号通路以调节神经功能,即“开玄府”,并通过下调p38 MAPK/NF-κB信号通路以减轻免疫炎症,即“解毒活血”,为“玄府理论”治疗银屑病的现代生物学阐释提供了直接的实验依据。

综上所述,本研究表明KXJD抑制皮肤局部NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2神经免疫信号通路,减少SP、CGRP等神经肽释放,同时下调p38 MAPK/NF-κB信号通路及下游促炎因子表达,改善了银屑病样神经炎症与免疫炎症,表明KXJD改善银屑病样炎症的效应与抑制NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2信号通路密切相关,为KXJD治疗银屑病提供了新的神经免疫机制解释,也为“玄府理论”的现代科学内涵提供了支撑。本研究未设联合组,未探讨KXJD与MTX的协同作用,但该设置符合本研究“聚焦KXJD机制”的核心定位,故不影响核心结论可靠性。后续研究将深入挖掘KXJD调控神经炎症的独

立分子通路,完善其治疗银屑病的机制依据。同时,本研究仅观察到 KXJD 与 NGF-TrkA/TRPV1-PAR-2 信号通路的相关性,未进行因果验证。后续将采用 TrkA 特异性抑制剂开展挽救实验进一步证实该信号通路为 KXJD 的作用靶点,为方剂的精准应用提供更深层次支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BOEHNCKE W H, SCHÖN M P. Psoriasis[J]. Lancet, 2015, 386(9997):983-994.
- [2] GHORESCHI K, BALATO A, ENERBÄCK C, et al. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis[J]. Lancet, 2021, 397(10275):754-766.
- [3] RIOL-BLANCO L, ORDOVAS-MONTANES J, PERRO M, et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation[J]. Nature, 2014, 510(7503):157-161.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] KEENAN E L, GRANSTEIN R D. Proinflammatory cytokines and neuropeptides in psoriasis, depression, and anxiety[J]. Acta Physiol, 2025, 241(3):e70019.
- [7] YU T, CALVO L, ANTAS B, et al. *In vivo* regulation of NGF-mediated functions by Nedd4-2 ubiquitination of TrkA[J]. J Neurosci, 2014, 34(17):6098-6106.
- [8] SHANG L, ZHAO S, SHI H, et al. Nerve growth factor mediates activation of transient receptor potential vanilloid 1 in neurogenic pruritus of psoriasis[J]. Int Immunopharmacol, 2023, doi:10.1016/j.intimp.2023.110063.
- [9] BAI D, CHENG X, LI Q, et al. Eupatilin inhibits keratinocyte proliferation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice via the p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2023, 45(2):133-139.
- [10] 宋坪, 吴志奎, 邹忆怀, 等. 银屑病中医辨证治疗及开玄解毒新思路探索[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(12):90-91.

- SONG P, WU Z K, ZOU Y H, et al. Exploration of new ideas of psoriasis treatment and Kaixuan detoxification in traditional Chinese medicine[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2009, 16(12):90-91.
- [11] 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 responses in psoriasis mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(17):79-88.
- [12] 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 LP, DAI D, et al. Mechanism of Kaixuan Jiedu core formula regulating PTGS2 to improve skin lesions in psoriasis model mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(17):49-59.
- [13] WANGJ P, MEN Y, WANGZ, et al. Polydatin alleviates chronic stress-induced depressive and anxiety-like behaviors in a mouse model[J]. ACS Chem Neurosci, 2023, 14(5):977-987.
- [14] CHENX D, TANGJ J, FENG S, et al. Chlorogenic acid improves PTSD-like symptoms and associated mechanisms[J]. Curr Neuropharmacol, 2021, 19(12):2180-2187.
- [15] MAREK-JOZEFOWICZ L, CZAJKOWSKIR, BORKOWSKAA, et al. The brain-skin axis in psoriasis-psychological, psychiatric, hormonal, and dermatological aspects[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2):669.
- [16] 臧书哈, 黄娟, 胡木, 等. 基于玄府-络脉理论探析中枢神经系统脱髓鞘疾病的中医诊治思路[J]. 中医学报, 2025, 40(4):787-790.
- ZANG S H, HUANG J, HU M, et al. Exploring TCM diagnosis and treatment ideas for central nervous system demyelinating diseases based on Xuanfu-collateral theory[J]. Acta Chin Med, 2025, 40(4):787-790.
- [17] 张晓岚, 李俊超, 荀向红. 活血解毒方对银屑病小鼠皮肤损伤和炎症反应的影响[J]. 解剖科学进展, 2025, 31(6):772-775.
- ZHANG X L, LI J C, XUN X H. Effect of Huoxue Jiedu formula on skin injury and inflammatory response in psoriasis mice[J]. Prog Anat Sci, 2025, 31(6):772-775.

[责任编辑 张丰丰]