

基于网络药理学和动物实验探讨牡丹皮提取物对接触性皮炎的改善作用

叶佳丰¹, 韩婕琚², 龚天贵², 王 斌², 陈 贤³, 王春丽^{1*}
(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 2. 美出莱化妆品有限责任公司, 浙江 杭州 311121; 3. 广州伽能生物科技有限公司, 广东 广州 511335)

摘要: **目的** 通过网络药理学和动物实验研究牡丹皮提取物外用治疗接触性皮炎的作用机制。**方法** 采用 DNCB 诱导的接触性皮炎小鼠模型, 评价牡丹皮提取物体内抗炎活性。通过 TCMSP 等数据库收集牡丹皮活性成分及相关作用靶点信息; 通过 DisGeNET 等数据库得到接触性皮炎的相关靶点; 构建活性成分-潜在作用靶点网络图及蛋白-蛋白互作网络图, 利用 cytoHubba 插件筛选出关键靶点; 采用 DAVID 数据库对潜在交集靶点进行 GO 分析及 KEGG 信号通路富集分析; 采用 Reactome Pathway 数据库进行 Reactome 信号通路富集分析; 采用分子对接验证成分与关键靶点的结合水平, 并对关键靶点通路进行实验验证。**结果** 动物实验显示, 牡丹皮提取物能减少接触性皮炎小鼠皮肤组织中的炎细胞浸润, 调节脾脏、胸腺指数, 降低小鼠皮肤组织 IL-6 水平 ($P<0.01$)。网络药理学显示, 牡丹皮活性成分 18 种, 潜在作用靶点 317 个, 富集于多个生物进程、多条信号通路, 筛选得到 SRC、MAPK1、PIK3R1、HSP90AA1、TP53 等关键靶点。分子对接显示出良好的小分子-蛋白亲和性。验证试验显示, 牡丹皮提取物提高了小鼠皮肤组织 p-ERK1/2、p-Akt 蛋白表达及 PI3K mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 牡丹皮提取物可能通过 MAPK/ERK、PI3K-Akt 信号通路来抑制炎症水平, 发挥治疗接触性皮炎的作用。

关键词: 牡丹皮提取物; 接触性皮炎; 网络药理学; 动物实验; MAPK; PI3K

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)01-0278-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.048

变应性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 是一种迟发型超敏反应, 分为致敏期和激发期^[1-2], 是皮肤或黏膜接触外源性物质后发生的过敏性炎症反应, 常在接触部位甚至它处发生。除了临床常用的皮质类固醇和抗组胺药, 中药对接触性皮炎也有较好的疗效, 如苦木^[3]、地肤子^[4]、阴地蕨^[5]等。

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 性微寒, 味辛、苦, 归心、肝、肾经, 功效清热凉血、活血化瘀, 具有抗炎、抗肿瘤、降糖、抗过敏、保护心血管等作用^[6]。丹皮酚是牡丹皮中的主要作用成分, 也是皮炎、湿疹的有效治疗药物。牡丹皮提取物具有治疗接触性皮炎的潜力, 且机制尚不明确。

本研究采用网络药理学的方法对牡丹皮提取物治疗接触性皮炎的作用机制进行探究, 对牡丹皮提取物治疗接触性皮炎效果进行了简单评价, 并对其作用机制进行初步的验证, 为牡丹皮提取物开发外用抗炎舒缓的药品或化妆品提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 ICR 小鼠 20 只, 体质量 18~20 g, 购自上海必凯科翼生物科技有限公司 [动物生产许可证号 SCXK (沪) 2018-0006], 于室温 20~25 ℃、相对湿度 40%~60%、12 h/12 h 明暗交替的动物房内适应性喂养 1 周。动物实验经华东理工大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 ECUST-2021-03007)。

1.2 药物 牡丹皮购自北京同仁堂股份有限公司, 经华东理工大学药学院马磊教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 其提取物的制备方法参考文献 [7] 报道。复方醋酸地塞米松乳膏 (华润三九医药股份有限公司, 批号 2102019X)。

1.3 试剂 1-氯-2, 4-二硝基苯 (DNCB) (东京化成工业株式会社, 批号 WT6CA-VO); BCA 总蛋白定量试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 O20HR198586); 小鼠白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (北京冬歌博业生物科技有限公司, 批号 202210); β -actin、ERK1/2 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 GB15001、GB11560); p-ERK1/2 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 4370);

收稿日期: 2023-09-15
基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09735002)
作者简介: 叶佳丰 (1999—), 男, 硕士生, 研究方向为中药筛选和评价。Tel: 18057536091, E-mail: Y53210022@mail.ecust.edu.cn
* 通信作者: 王春丽 (1971—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为天然抗氧化剂的发现与应用。Tel: 13801951663, E-mail: wangchunli@ecust.edu.cn

p-Akt (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 AA329)。

1.4 仪器 正置白光拍照显微镜 (日本 Nikon 公司, 型号 Eclipse Ci-L); 酶标仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司, 型号 RT-6100); 台式高速冷冻离心机 (北京大龙兴创实验仪器有限公司, 型号 D3024R); 研磨仪、脱色摇床、垂直电泳仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 型号 KZ-III-F、DS-2S100、SVE-2); 转印电泳仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 型号 SVT-2); 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号 JY92-11N); 化学发光仪 (上海勤翔科学仪器有限公司, 型号 6100); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号 CFX Connect); PCR 仪 (北京东胜创新生物科技有限公司, 型号 ETC811)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组和牡丹皮组, 每组 5 只。采用 DNCB 诱导建立接触性皮炎模型^[8], 并适当改进, 实验前 1 d 对小鼠腹部及背部去毛, 第 1 天和第 2 天上午 9:00 在下腹部 2 cm×2 cm 脱毛部位处均匀涂抹含 5% DNCB 的乙醇 50 μL 致敏; 第 6 天开始, 在小鼠尾基底部以上 1 cm 处的背部脱毛部位 (2 cm×2 cm) 涂抹含 1% DNCB 的乙醇 25 μL 激发, 每 3 d 1 次, 共 4 次, 均在上午 9:00 进行。从致敏日起预防给药, 给药面积 2 cm×2 cm, 每天 1 次, 至激发结束, 均在下午 5:00 进行。牡丹皮组给予 0.5% 牡丹皮提取物 0.2 mL, 阳性药组给予醋酸地塞米松乳膏 0.2 g, 各组均匀涂抹至没有液体残留, 并采用无刺激胶布固定以防止小鼠舔舐。

2.2 取材 末次给药 24 h 后, 脱颈处死小鼠, 取给药部位皮肤 2 cm×2 cm, 平均分成 1 cm×1 cm 的 4 份, 左上部分用于 HE 染色, 左下部分用于 ELISA 检测, 右上部分用于 Western blot 实验, 右下部分用于 RT-qPCR 检测。

2.3 脾脏、胸腺指数检测 小鼠脱颈处死后, 测定体质量, 解剖取脾脏及胸腺并测定其质量, 脾脏、胸腺指数以脾脏、胸腺质量与体质量的比值表示。

2.4 HE 染色观察皮肤组织病理形态 取各组小鼠皮肤组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 经乙醇脱水、石蜡包埋切片后用苏木精-伊红染色后脱水、透明、封片, 于显微镜下观察皮肤组织结构形态及炎细胞浸润情况。

2.5 ELISA 法检测皮肤组织 IL-6 水平 取各组小鼠皮肤组织, 用预冷的 PBS (pH 7.4) 冲洗, 去除残留血液, 并用加有蛋白酶抑制剂的 PBS 匀浆, 反复冻融后于 4℃、5 000×g 下离心 10 min, 取上清, 利用 BCA 法测定总蛋白含量, 按照试剂盒说明书操作, 于 450 nm 波长处测定各孔光密度 (OD) 值, 计算 IL-6 水平。

2.6 网络药理学研究

2.6.1 牡丹皮成分的获取及筛选 通过 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>), 以牡丹皮为搜索对象收集相关成分并进行筛选, 标准为分子量 (MW) ≤ 500、脂水分配系数 (AlogP) 1~3^[9], 得到符合要求的透皮吸收成分。由于类药性低并不代表没有药效, 如丹皮酚

的类药性值为 0.04, 依然有较好的药理活性, 因此不考虑类药性的筛选。

2.6.2 潜在作用靶点的收集 通过 TCMSP 收集各活性成分的靶点信息, 并将 Swisstarget Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) Probability ≥ 0.1、TargetNet 数据库 (<http://targetnet.scbdd.com/>) Probability ≥ 0.9、PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) Probability ≥ 0.5 的高分预测靶点纳入活性成分靶点中, 将蛋白名用 UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 转换为相应的 gene symbol, 并通过 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、TTD 数据库 (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 以“contact dermatitis”“allergic contact dermatitis”为关键词收集接触性皮炎靶点信息, 取各数据库靶点信息的并集作为最终的疾病靶点集。活性成分靶点与疾病靶点的交集即为牡丹皮提取物治疗接触性皮炎的潜在作用靶点。

2.6.3 活性成分-潜在作用靶点网络图的构建 整理活性成分信息及潜在作用靶点信息, 得到对应的 Network 及 Type 文件, 导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 构建活性成分-潜在作用靶点网络图。

2.6.4 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络图的构建 在 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>) 导入潜在作用靶点信息, 限定物种“*Homo sapiens*”, 选择最高置信度 0.900, 隐藏游离节点, 获得潜在作用靶点蛋白的互作关系, 导出为 TSV 格式文件, 并导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 构建 PPI 网络图。再利用 cytoHubba 插件工具计算节点的拓扑参数。

2.6.5 GO、KEGG 富集分析 利用生物学信息注释数据库 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 以揭示牡丹皮提取物外用治疗接触性皮炎的生物进程、细胞组分、分子功能及相关通路情况。

2.6.6 Reactome 信号通路富集分析 在 Reactome Pathway 数据库 (Reactome Pathway Database, <https://reactome.org/>) 中导入潜在作用靶点信息, 限定物种为“*Homo sapiens*”, 进行通路富集分析。

2.6.7 分子对接验证 在 Protein Data Bank 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中, 筛选解析度 <3Å 的靶点蛋白, 得到对应的 PDB 格式文件。并从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载活性成分 3D 结构 SDF 文件, 通过 Open Babel 2.4.1 转换为 PDB 格式^[10]。使用 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接, Autodock Tool 1.5.6 对关键靶点进行包括去水、加氢、去配体等预处理, 测定小分子扭转键, 导出蛋白及配体的 pdbqt 文件。随后将配体与处理后的蛋白对接, 并用 PyMOL 2.3.4 处理对接结果, 通过结合能判断活性成分与靶点蛋白结合

效果^[11]。

2.7 Western blot 法检测皮肤组织 p-ERK1/2、p-Akt 蛋白表达 取各组小鼠皮肤组织，匀浆裂解得到总蛋白，使用 BCA 法进行蛋白定量，经电泳分离、转膜后 5% 脱脂牛奶室温封闭 30 min，加一抗 4 ℃ 摇床孵育过夜，加二抗孵育 30 min，加入 ECL 发光液进行化学发光检测。采用 Image J 分析图像条带灰度值。

2.8 RT-qPCR 法检测皮肤组织 *PI3K* mRNA 表达 取各组小鼠皮肤组织，用 RNA 提取液提取总 RNA，逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增，反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火延伸 30 s，循环 40 次。采用 2^{-ΔΔCT} 法进行数据处理。*GAPDH* 正向引物序列 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3'，反向引物序列 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT-3'；*PI3K* 正向引物序列 5'-CACGCGCATTACACTCTTACACTA-3'，反向引物序列 5'-CACTGGGTAGAGCAACTTCACATC-3'。

2.9 统计学分析 通过 IBM SPSS Statistics 26 和 Graph Pad 8.4.3 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 牡丹皮提取物对小鼠皮肤组织病理的影响 如图 1 所示，模型组小鼠皮肤出现明显的结痂、潮红，伴有皮肤粗糙破损；与模型组比较，阳性药组及牡丹皮组小鼠皮肤结痂消失，少见皮肤潮红，皮肤状态优于模型组。HE 染色结果显示，与空白组比较，模型组表皮重度增厚（黑色箭头），角质层增厚，可见脓性灶（紫色箭头）；表皮局部缺失，真皮裸露（红色箭头）；真皮胶原纤维排列紊乱，真皮及皮下可见大量的淋巴细胞、粒细胞呈弥散性浸润（蓝色箭头）。与模型组比较，阳性药组及牡丹皮组小鼠皮肤组织皮肤结构完整，淋巴细胞浸润较少（蓝色箭头）。

3.2 牡丹皮提取物对小鼠脾脏、胸腺指数的影响 如表 1 所示，与空白组比较，模型组小鼠脾脏指数升高（*P*<0.01），显示超敏反应发生；与模型组比较，阳性药组及牡丹皮组小鼠脾脏指数降低（*P*<0.05，*P*<0.01）。与空白组比较，模型组小鼠胸腺指数降低（*P*<0.01）；与模型组比较，牡丹皮组小鼠胸腺指数升高（*P*<0.01），而阳性药组小鼠胸腺指数降低（*P*<0.05）。

表 1 各组小鼠脾脏指数、胸腺指数比较（mg/10 g， $\bar{x}\pm s$ ，*n*=5）

组别	脾脏指数	胸腺指数
空白组	39.35±3.52	36.68±0.38
模型组	49.18±1.52 ^{##}	22.30±1.78 ^{##}
阳性药组	15.36±1.95 ^{**}	19.50±0.66 [*]
牡丹皮组	42.70±0.83 [*]	29.51±1.48 ^{**}

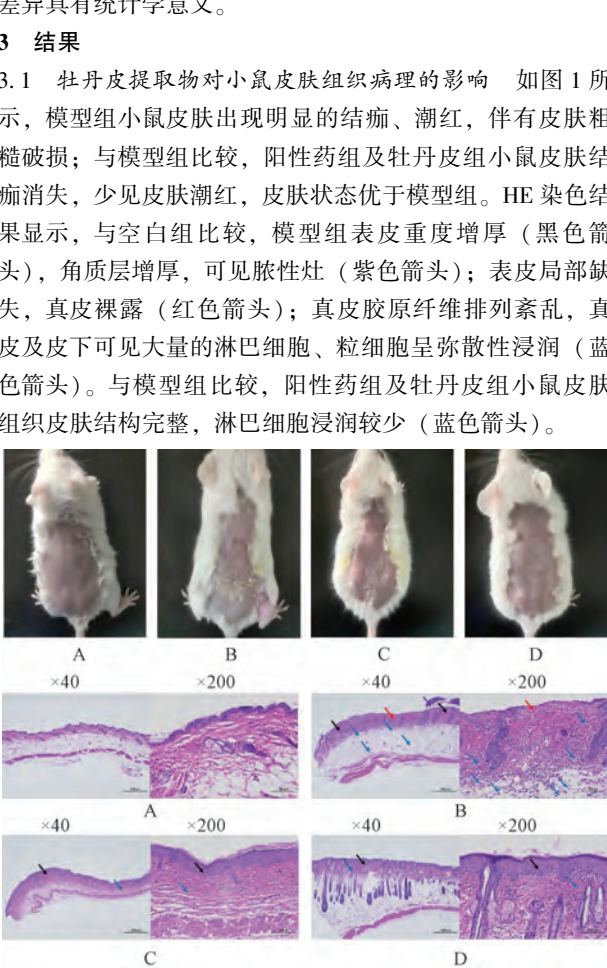
注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

3.3 牡丹皮提取物对小鼠皮肤组织 IL-6 水平的影响 如图 2 所示，与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织 IL-6 水平升高（*P*<0.01）；与模型组比较，阳性药组及牡丹皮组小鼠皮肤组织 IL-6 水平降低（*P*<0.01）。

3.4 牡丹皮提取物的活性成分 从 TCMS 数据库中筛选得到牡丹皮活性成分 18 种。如表 2 所示，这些化合物具有较小的分子量及较好的透皮性质，可作为后续研究的有效成分。

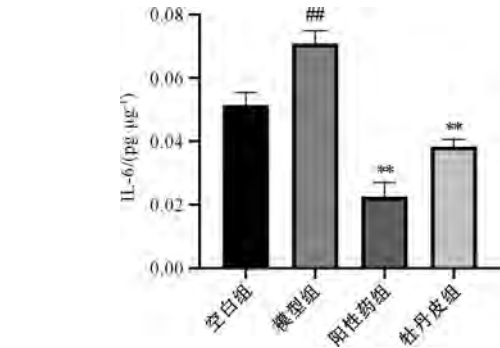
3.5 牡丹皮提取物的潜在作用靶点 通过多个数据库收集各活性成分的靶点信息，去除重复项共得到 628 个靶点。从 DisGeNET 数据库、GeneCards 数据库、TTD 数据库收集疾病靶点，去除重复项，得到靶点信息共 2 317 条。使用 Venny 2.1.0 平台（<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>）取活性成分靶点和疾病靶点的交集，得到潜在作用靶点共 317 个，见图 3。

3.6 牡丹皮提取物活性成分-潜在作用靶点网络图 如图 4 所示，活性成分与潜在作用靶点网络图包含 336 个节点（1 个药、18 种成分、317 个靶点）、1 380 条边。槲皮素（MOL000098）、山柰酚（MOL000422）可结合靶点较多，分别为 199、132 个。



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为阳性药组，D 为牡丹皮组。

图 1 各组小鼠皮肤形态及 HE 病理染色



注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。

图 2 各组小鼠皮肤组织 IL-6 水平比较（ $\bar{x}\pm s$ ，*n*=5）

表 2 牡丹皮有效成分信息

编号	ID	化学名	CAS 号	相对分子质量	AlogP
1	MOL000103	4-hydroxybenzoic acid	99-96-7	138. 13	1. 17
2	MOL000114	vanillic acid	121-34-6	168. 16	1. 15
3	MOL001246	(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-6,6-dimethylnorpinan-2-one	77982-63-9	138. 23	1. 52
4	MOL002046	hexanoic acid	142-62-1	116. 18	1. 81
5	MOL002095	diethyl phthalate	84-66-2	222. 26	2. 24
6	MOL000223	caffeic acid	501-16-6	180. 17	1. 37
7	MOL000254	eugenol	97-53-0	164. 22	2. 55
8	MOL002786	apocynin	498-02-2	166. 19	1. 29
9	MOL003881	6-hydroxycoumarin	6093-68-1	162. 15	1. 63
10	MOL000422	kaempferol	520-18-3	286. 25	1. 77
11	MOL000492	(+)-catechin	154-23-4	290. 29	1. 92
12	MOL006869	2',4'-dihydroxyacetophenone	89-84-9	152. 16	1. 03
13	MOL000719	methyl salicylate	119-36-8	152. 16	1. 42
14	MOL007372	3-hydroxy-4-methoxyacetophenone	6100-74-9	166. 19	1. 29
15	MOL007373	1-(2,3-dihydroxy-4-methoxyphenyl) ethanone	708-53-2	182. 19	1. 02
16	MOL007374	5-[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl] methylene barbituric acid	301312-49-2	312. 30	2. 05
17	MOL000874	paeonol	552-41-0	166. 19	1. 29
18	MOL000098	quercetin	117-39-5	302. 25	1. 50

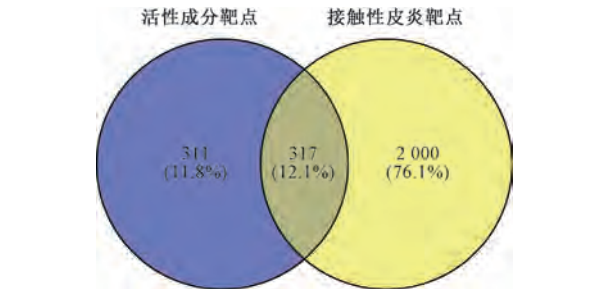


图 3 活性成分靶点-接触性皮炎靶点 Venn 图

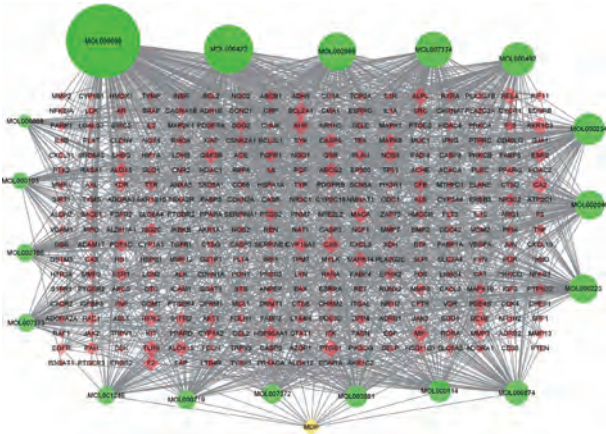


图 4 活性成分-潜在作用靶点网络图

3.7 PPI 网络分析 PPI 网络图（图 5）反映了靶点之间的联系，共含 270 个节点（47 个游离节点）、1 423 条边，各靶点的拓扑参数可反映 1 个靶点对 PPI 网络的影响^[12]。该网络图中颜色表示度值（Degree），字体大小表示紧密度（Closeness），节点大小表示介度（Betweenness），取 Degree、Closeness、Betweenness 前 15 位的靶点作为关键靶点^[13]。表 3 显示，牡丹皮外用治疗接触性皮炎主要作用于原癌基因酪氨酸蛋白激酶（SRC）、有丝分裂原激活的蛋白

激酶 1（MAPK1）、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚单元 α（PIK3R1）等关键靶点。

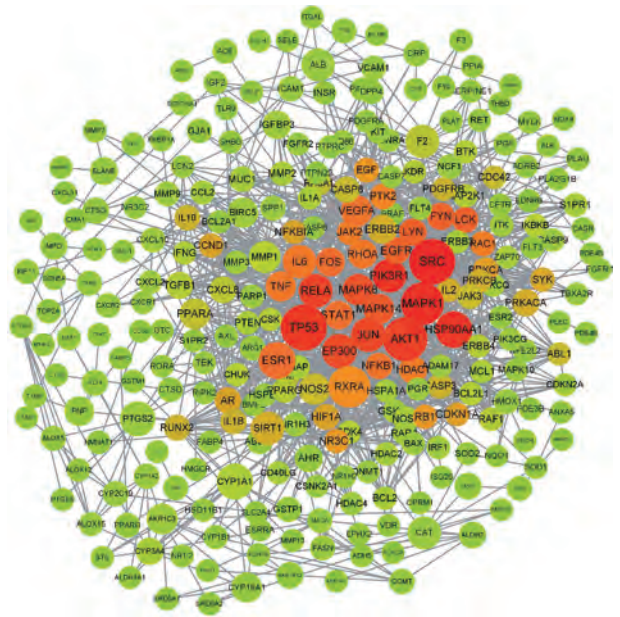


图 5 潜在作用靶点 PPI 网络图

表 3 关键靶点拓扑参数

编号	基因	Degree	Closeness	Betweenness
1	SRC	64	150. 38	6 254. 50
2	MAPK1	56	146. 40	5 430. 18
3	PIK3R1	55	141. 15	2 968. 86
4	HSP90AA1	53	142. 87	3 786. 93
5	TP53	51	142. 98	6 388. 43
6	Akt1	50	142. 10	5 835. 51
7	RELA	47	141. 25	2 976. 49
8	JUN	46	140. 08	3 152. 40
9	EP300	45	138. 38	3 179. 06

3.8 GO、KEGG 富集分析 如图 6 所示，GO 富集分析得到显著性 $P<0.05$ 的生物进程 (biological process, BP) 条目 892 条，细胞组分 (cellular component, CC) 条目 88 条，分子功能 (molecular function, MF) 条目 112 条。牡丹皮外用治疗接触性皮炎的生物进程主要涉及对药物的反应 (response to drug)、对脂多糖的反应 (response to lipopolysaccharide)、炎症反应 (inflammatory response) 等，细胞组分主要涉及在细胞外空间 (extracellular space)、膜筏 (membrane raft)、胞液 (cytosol) 等，分子功能主要涉

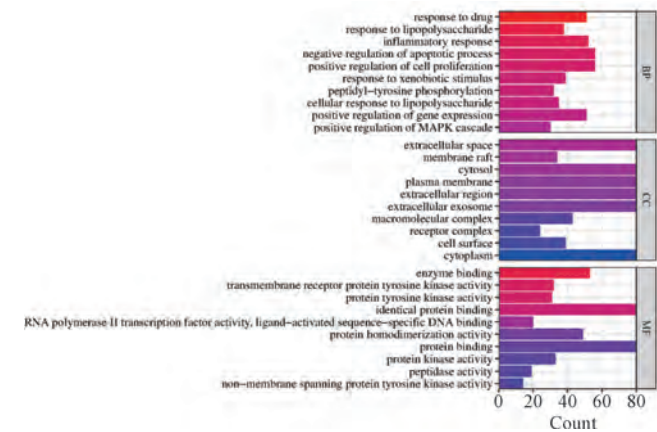


图 6 潜在作用靶点 GO、KEGG 富集分析图

3.9 Reactome 信号通路富集分析 Reactome 信号通路富集共得到 $P<0.05$ 条目 1 427 条，如图 7 所示，潜在作用靶点显著富集于信号转导 (signal transduction)、免疫系统 (immune system)、免疫系统中的细胞因子信号 (cytokine signaling in immune system) 等，表明 PI3K-Akt 信号通路的传导可能在牡丹皮提取物治疗接触性皮炎中发挥重要作用。

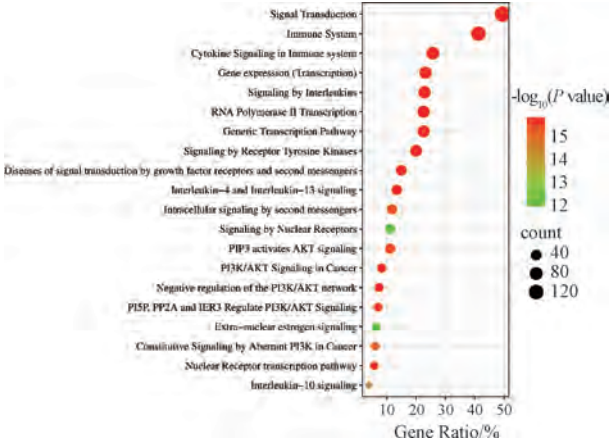


图 7 Reactome 信号通路富集分析结果

3.10 分子对接验证 关键成分槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、邻苯二甲酸二乙酯 (diethyl phthalate)、5-[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl] methylene} barbituric acid、儿茶素 [(+)-catechin] 与关键靶点 SRC (1A07)、MAPK1 (3SA0)、PIK3R1 (1H9O)、HSP90AA1 (1BYQ)、TP53 (3Q01) 分子对接验证的结果见图 8，可知结合能均

及在酶结合 (enzyme binding)、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity) 等。

KEGG 信号通路富集分析得到显著性 $P<0.05$ 的条目共 177 条。潜在作用靶点显著富集于 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) 等^[1-2,14]，表明牡丹皮提取物可能通过 PI3K-Akt、MAPK 信号通路发挥治疗接触性皮炎的作用。

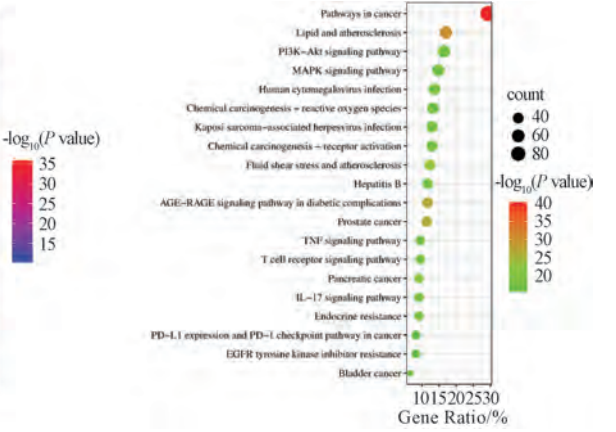
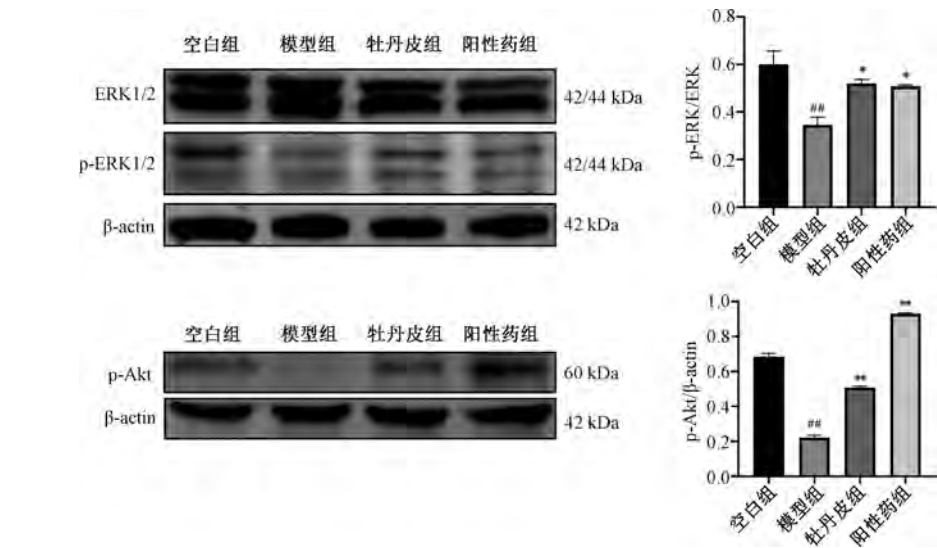


图 8 分子对接结果热图及对接模式图

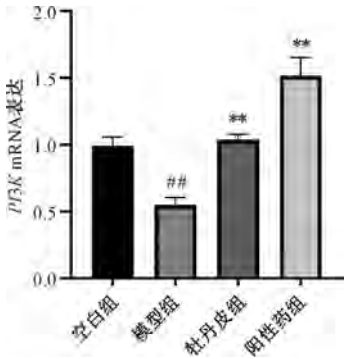
3.11 牡丹皮提取物对小鼠皮肤组织 p-ERK、p-Akt 表达的影响 如图 9 所示，与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织 p-ERK1/2、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，阳性药组及牡丹皮组小鼠皮肤组织 p-ERK1/2、p-Akt 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.12 牡丹皮提取物对小鼠皮肤组织 *PI3K* mRNA 表达的影响 如图 10 所示，与空白组比较，模型组小鼠皮肤组织 *PI3K* mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，阳性药组



注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 9 各组小鼠皮肤组织 p-ERK、p-Akt 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=5)



注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。

图 10 各组小鼠皮肤组织 *PI3K* mRNA 表达降低 ($\bar{x}\pm s$, *n*=5)

及牡丹皮组小鼠皮肤组织 *PI3K* mRNA 表达升高 (*P*<0.01)。

4 讨论

接触性皮炎发病机制复杂，这是一种由多种细胞因子介导的免疫细胞应答反应，包括白细胞介素、肿瘤坏死因子、干扰素等^[16-17]。本研究动物实验结果显示，牡丹皮提取物可以降低小鼠皮肤组织的炎细胞浸润及 IL-6 水平，维持皮肤组织结构；牡丹皮提取物给药可以降低模型小鼠的脾脏指数，减轻过敏反应，表明牡丹皮提取物可以有效缓解小鼠接触性皮炎的症状。此外，IL-6 可以影响 MAPK 信号通路，调节细胞应激和凋亡^[18]。本研究网络药理学分析显示，牡丹皮提取物中的 18 种活性成分通过调节多种生物进程，发挥多种分子功能发挥改善接触性皮炎的作用，包括免疫应答和对脂多糖的反应^[2,19]等；其次牡丹皮提取物还可以调节包括 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路在内的多个通路，这些通路与免疫炎症调节有重要关系^[20-22]。

MAPK、PI3K-Akt 信号通路在调节细胞生长代谢、增殖分化中发挥着重要的作用^[23-24]。MAPK1 编码的 MAP 激酶 1 (ERK2) 通过 MAPK/ERK 信号通路依赖的机制被细胞外信

号激活，调控细胞的增殖凋亡等生理活动。PI3K/Akt 信号通路可介导炎症反应，与多种炎性介质密切相关^[25]，其中 Akt 是 PI3K 通路的中心介质，其 C 端调节区的 Ser473 位点对 Akt 的完全激活起着重要作用^[26]。研究表明，激活 ERK1/2 可以减少心肌细胞凋亡^[27]，减轻大鼠脑缺血诱导的炎症反应^[28]。同时有研究指出，激活 PI3K-Akt 信号通路可以减轻前列腺素诱导的氧化应激及炎症水平，抑制自噬，减轻细胞损伤及凋亡^[29]。本研究结果显示，牡丹皮提取物可以提高接触性皮炎小鼠皮肤组织 p-ERK、p-Akt 蛋白表达及 *PI3K* mRNA 表达，激活了 MAPK/ERK、PI3K-Akt 信号通路，发挥炎症抑制的作用。

综上所述，研究表明，牡丹皮提取物可以降低接触性皮炎小鼠皮肤组织 IL-6 水平，改善皮肤状态，调节小鼠脾脏、胸腺指数；其次通过网络药理学和分子对接探讨了牡丹皮提取物治疗接触性皮炎的机制，并进行了简单的实验验证。验证结果也表明，牡丹皮提取物可通过提高 p-ERK1/2 表达激活 MAPK/ERK 通路，提高 p-Akt 蛋白表达及 *PI3K* mRNA 表达，激活 PI3K-Akt 信号传导发挥炎症抑制的作用。MAPK/ERK、PI3K-Akt 信号通路可能是牡丹皮提取物治疗接触性皮炎的关键信号通路。详细的通路传导机制有待进一步的验证。

参考文献：

[1] 王 谊，任孟月. 中药治疗变应性接触性皮炎的药理作用机制[J]. 中国药房, 2022, 33(14): 1776-1781.
[2] Farrar J D, Asnagli H, Murphy K M. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(4): 431-435.
[3] 赵文娜, 惠 先, 杨 鑫, 等. 苦木水提物外用对变应性接触性皮炎模型小鼠的改善作用研究[J]. 中国药房, 2019, 30(1): 64-68.
[4] 蔡 需, 文晓柯, 欧阳 波, 等. 地肤子总黄酮对二硝基

氯苯致大鼠接触性皮炎的抗炎作用[J]. 中国医药导报, 2019, 16(20): 17-20.

[5] Lim D, Kim M K, Jang Y P, *et al.* *Sceptridium ternatum* attenuates allergic contact dermatitis-like skin lesions by inhibiting T helper 2-type immune responses and inflammatory responses in a mouse model[J]. *J Dermatol Sci*, 2015, 79 (3): 288-297.

[6] 翟春梅, 孟祥瑛, 付敬菊, 等. 牡丹皮的现代药学研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 109-114.

[7] 聂艳峰. 积雪草提取物的制备及其在化妆品中的应用[D]. 广州: 暨南大学, 2017.

[8] 刘 青, 王思农. 二十五味儿茶凝胶对小鼠慢性变应性接触性皮炎的作用及抗炎机制探讨[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(8): 930-934.

[9] 曹日曲. 基于数据挖掘的中医外治黄褐斑的网络药理学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.

[10] 高 寒, 徐 伟, 张宇航, 等. 基于网络药理学的刺五加总苷抗疲劳作用机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(2): 413-421.

[11] 梁田野, 商 磊, 张大军, 等. 基于网络药理学和分子对接技术研究七白膏治疗晒斑的分子机制[J]. 保健医学研究与实践, 2021, 18(5): 56-62.

[12] 贡巴加, 任 越, 马 婧, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨藏族药佐木阿汤治疗高血压病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5383-5392.

[13] 马梓育, 陆 洋. 基于网络药理学与细胞实验的三白汤治疗皮肤色素沉着机制探究与初证[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2021, 23(7): 2153-2169.

[14] 康 君. D1NP 通过激活 NF-κB 调节 TRPA1 离子通道加重小鼠过敏性皮炎[D]. 武汉: 华中师范大学, 2018.

[15] Li B J, Rui J Q, Ding X J, *et al.* Exploring the multicomponent synergy mechanism of Banxia Xiexin Decoction on irritable bowel syndrome by a systems pharmacology strategy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 233: 158-168.

[16] Gittler J K, Krueger J G, Guttman-Yassky E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2): 300-313.

[17] 金 莉, 曹经江. 变应性接触性皮炎的免疫学机制新进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2020, 36(1): 61-64.

[18] Dayer J M, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(1): 15-24.

[19] Kadono H, Kido J, Kataoka M, *et al.* Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(6): 2841-2846.

[20] 陈姣蓉, 洪小平, 段妍君, 等. 蛇床子素对特异性皮炎小鼠皮肤屏障及慢性瘙痒的作用[J]. 中成药, 2021, 43 (12): 3489-3492.

[21] 尹谢添, 赵诗超, 向 楠, 等. 基于 JNK/p38 MAPK 信号通路探讨夏枯草胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠的作用[J]. 中成药, 2022, 44(12): 3817-3823.

[22] 朱 君, 付立霞, 支 青, 等. 桑枝乙醇提取物通过 NF-κB 和 MAPKs 信号通路对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的抗炎作用[J]. 中成药, 2022, 44(11): 3648-3653.

[23] Zhao H, Li C, Li L, *et al.* Baicalin alleviates bleomycininduced pulmonary fibrosis and fibroblast proliferation in rats *via* the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(6): 2321-2334.

[24] Li Q T, Feng Y M, Ke Z H, *et al.* KCNN4 promotes invasion and metastasis through the MAPK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Invest Med*, 2020, 68(1): 68-74.

[25] Zou Z. Brg1 aggravates airway inflammation in asthma *via* inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3212-3218.

[26] Manning B D, Toker A. Akt/PKB signaling: Navigating the network[J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.

[27] 吴江立, 贾玉涛, 代 成, 等. 归脾汤对心肌缺血大鼠 ERK1/2 和 p38 MAPK 表达的影响[J/OL]. 中国实验方剂学杂志: 1-9 (2023-05-15) [2023-09-05]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230905>.

[28] 涂献坤, 石松生, 杨卫忠, 等. 齐留通通过激活 ERK1/2 信号通路减轻大鼠脑缺血炎症反应和缺血性脑损伤[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1441-1444.

[29] 葛 亮, 冷玉芳, 张 鹏, 等. 右美托咪定通过激活 PI3K/AKT 信号通路对前列腺素诱导分娩窒息小鼠氧化应激和炎症水平的影响及脑保护机制[J]. 实用医学杂志, 2023, 39 (6): 688-695.