徐可欣,王丹丹,金泓宇,等. 毛兰素通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路缓解特应性皮炎 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 11-20.
Xu KX, Wang DD, Jin HY, et al. Erianin alleviates atopic dermatitis by regulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 11-20.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.002

毛兰素通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路缓解特应性皮炎

徐可欣[1,2],王丹丹[1,2],金泓宇[1,2],杜　月[1,2],李　莉[1,2],宋艺兰[1,2],
延光海[1,2],李良昌[1,2*]

(1.延边大学吉林常见过敏性疾病免疫与靶向研究重点实验室,吉林 延吉　133002;
2.延边大学医学院,吉林 延吉　133002)

【摘要】　目的　探究毛兰素(Erianin)在特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)中的作用及其在高迁移率族蛋白 1(high mobility group box-1,HMGB1)/晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)-Ras 同源基因家族成员 A(Ras homolog gene family member A, RhoA)/Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶 1(recombinant Rho associated coiled coil containing protein kinase 1,ROCK1)信号通路中的调控机制。**方法**　1-氯-2,4-二硝基苯(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene,DNCB)诱导 BALB/c 小鼠作为 AD 的模型,测量小鼠的皮肤厚度、脾和淋巴结的重量。甲苯胺蓝和 HE 染色检测小鼠的背部皮肤和耳朵的病理改变;ELISA 检测炎症因子水平;肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)刺激 HaCaT 细胞建立 AD 体外模型;采用流式细胞术检测细胞活性氧(reactive oxygen species,ROS);免疫荧光法检测线粒体活性氧(mitochondrion reactive oxygen species,mtROS);TUNEL 检测细胞凋亡情况;免疫蛋白印迹法检测 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 蛋白表达情况。**结果**　在体内实验中毛兰素抑制皮肤厚度的增加,减轻脾和淋巴结重量,改善炎症细胞的浸润和肥大细胞脱颗粒,降低炎症因子水平($P<0.05$)。在体外实验中,毛兰素减少 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞 ROS、mtROS 的产生($P<0.01$)。毛兰素治疗后 HMGB1、RAGE、RhoA 及 ROCK1 的蛋白表达量下降($P<0.01$);使用 RAGE 特异性阻断剂(TFA)处理 r-HMGB1 刺激的 HaCaT 细胞后,HMGB1 的表达没有发生变化,RAGE、RhoA 及 ROCK1 表达减少($P<0.01$);在 Rho 激酶抑制剂 Y-27632+r-HMGB1 组中,除 RAGE 的表达没有降低,其余结果与 TFA+r-HMGB1 组相近。**结论**　毛兰素可能通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路缓解特应性皮炎。

【关键词】　毛兰素;特应性皮炎;HMGB1;RAGE;RHOA;ROCK1
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2025) 04-0011-10

Erianin alleviates atopic dermatitis by regulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 signaling pathway

[**基金项目**]国家自然科学基金(82060008);吉林省科技厅项目(YDZJ202201ZYTS140)。
[**作者简介**]徐可欣(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:过敏性疾病。E-mail:1806454672@qq.com
[**通信作者**]李良昌(1978—),男,博士,教授,研究方向:过敏性疾病。E-mail:lclee@ybu.edu.cn

XU Kexin[1,2], WANG Dandan[1,2], JIN Hongyu[1,2], DU Yue[1,2], LI Li[1,2], SONG Yilan[1,2],
YAN Guanghai[1,2], LI Liangchang[1,2*]
(1. Key Laboratory of Immunology and Targeted Research on Common Allergic Diseases in Jilin, Yanbian University, Yanji 133002, China. 2. School of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002)

【Abstract】 **Objective** To explore the role of Erianin in atopic dermatitis (AD) and its regulatory mechanism involving the high-mobility group box 1 (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE)-Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) signaling pathway. **Methods** An AD model was induced in BALB/c mice using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB). Skin thickness and spleen and lymph node weight were measured and pathological changes in the back skin and ears were detected using methylamine blue and hematoxylin and eosin staining. Inflammatory factors were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. An *in vitro* model of AD was established in HaCaT cells stimulated by tumor necrosis factor (TNF)-α. Cellular reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry and mitochondrial ROS (mtROS) were detected by immunofluorescence assay. Cell apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling. HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 proteins were detected by Western blot. **Results** Erianin inhibited the increase in skin thickness, reduced the spleen and lymph node weights, improved the infiltration of inflammatory cells and the degranulation of mast cells, and reduced the levels of inflammatory factors($P<0.05$). Erianin also reduced the production of cellular ROS and mtROS induced by TNF-α *in vitro*($P<0.01$), and decreased the protein expression of HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 ($P<0.01$). Treatment of HMGB1-stimulated HaCaT cells with a RAGE-specific blocker (TFA) had no effect on HMGB1 expression, while expression levels of RAGE, RhoA, and ROCK1 were decreased($P<0.01$). Cells treated with the Rho kinase inhibitor Y-27632 +r-HMGB1 group showed similar result to the TFA+r-HMGB1 group, except for RAGE. **Conclusions** Erianin relieves AD by regulating the HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK signaling pathway.

【Keywords】 Erianin; atopic dermatitis; HMGB1; RAGE; RhoA; ROCK1
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)是一种常见的慢性炎症性皮肤病[1-2],且常合并哮喘、过敏性鼻炎等其他过敏性疾病[3]。AD 目前还无法完全治愈,临床上的治疗主要集中于缓解症状,减少复发,严重影响患者生存质量。

毛兰素(2-methoxy-5-(2-(3,4,5-trimethoxypheny)-phenol),Erianin)是一种从石斛中分离出来的天然产物[4],具有抗氧化和抗炎活性[5-6]。DOU 等[7]研究表明,毛兰素通过协同调节 TLR4 和 STAT3 在葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎中发挥抗炎作用。也有研究表明毛兰素抑制 NF-κB 信号通路调控肺泡巨噬细胞 M1 极化[8]。因此,毛兰素有望成为一种治疗 AD 的天然药物。高迁移率族蛋白 1(high mobility group box-1,HMGB1)是一种有效的炎症调节剂,参与机体炎性反应[9]。有研究表明,在 AD 中,HMGB1 蛋白表达量升高[10]。应用 HMGB1 抑制剂或 RAGE 抑制剂可减少巨噬细胞/小胶质细胞的数量,同时增加抗炎细胞的数量[11]。

目前,关于 HMGB1/RAGE 信号通路在 AD 中的作用还不清楚,因此,本文旨在探究毛兰素对 AD 的作用及其在 HMGB1/RAGE 信号通路中的调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

40 只雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠,6 周龄,体质量 18~25 g。购自延边大学实验动物中心[SCXK(吉)2022-0005],所有小鼠饲养于延边大学实验动物中心[SYXK(吉)2020-0009]。所有动物实验过程均由延边大学医学院伦理委员会批准(YD20240530003),本实验全程遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

HaCaT 细胞,即非肿瘤源性的人永生化角质形成细胞,购自丰晖生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

毛兰素(货号:B20844-100 mg)购于上海源叶科技生物有限公司;HE 试剂盒(货号:G1120-100 mL)购自索莱宝科技有限公司;甲苯胺蓝(货号:G3670-100 mL)购自索莱宝科技有限公司;HMGB1(货号:ab190377)、RAGE(货号:ab216329)购自 Abcam 公司;RhoA(货号:bs-1180R)购自 BIOSS 公司;ROCK1(货号:28999)购自 CST 公司;ROS Assay 试剂盒(货号:ab186029)购自 Abcam 公司;胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin,TSLP)ELISA 试剂盒(货号:CSB-RA025141A1HU)、白介素-4(interleukin-4,IL-4)(货号:CSB-RA240377A0HU)、白介素-13(interleukin-13,IL-13)(货号:CSB-E04601 h-IS)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)(货号:CSB-EP024154HUe1)购自华美生物有限公司;MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator 试剂盒(货号:M36008)购自 Invitrogen 公司。

厚度测量仪购自威海新威量量具有限公司;数字扫描显微成像系统 Slide Scanning Image System 购自强生科技有限公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特有限公司;Cytation 5 购自美国博腾仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立及分组

采用 1-氯-2,4-二硝基苯(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene,DNCB)诱导 AD 模型。将 40 只 BALB/c 小鼠随机取 8 只作为对照组、剩下的 32 只小鼠建立 AD 模型。用电动剃毛刀剔除小鼠背部毛发,面积约为 2 cm×2 cm。将 1% DNCB 溶液应用于小鼠的背部,每周 3 次,给药 1 周,进行致敏。休息 1 周后,用 0.5% DNCB 溶液,每周 3 次,连续给药 3 周进行激发,建立小鼠特应性皮炎模型。

实验分为对照(Control)组、模型(AD)组、毛兰素低剂量治疗(AD+EL)组、毛兰素高剂量治疗(AD+EH)组、地塞米松阳性对照(AD+DXM)组。对照组和模型组:腹腔注射等体积的生理盐水;毛兰素低剂量治疗组:腹腔注射毛兰素 5 mg/kg;毛兰素高剂量治疗组:腹腔注射毛兰素 15 mg/kg;地塞米松阳性对照组:腹腔注射地塞米松 2.5 mg/kg。以上各组在激发阶段第 1 天 8:00 开始给药,给药 1 d,休息 1 d,共给药 10 次。

1.3.2 样本收集

模型建立后第 2 天 8:00 进行实验,处死小鼠,取小鼠背皮、耳朵。用厚度测量仪测量小鼠背部皮肤和耳朵的厚度,进行记录。

1.3.3 苏木素-伊红(HE)染色和甲苯胺蓝染色

用 4%多聚甲醛固定小鼠背部皮肤和耳朵 4 周后,对组织进行脱水处理,用石蜡进行包埋,且切成 3 μm 的组织切片。将组织切片分别用 HE 和甲苯胺蓝试剂盒进行染色,用载玻片扫描系统对图片进行处理分析。

1.3.4 ELISA 检测

将小鼠皮肤组织研磨成匀浆,离心 10 min。采用 ELISA 试剂盒检测 TSLP、IL-4、IL-13、TNF-α 的含量。

1.3.5 细胞模型的建立及分组

用 DMEM 培养液培养 HaCaT 细胞,置于 CO_2 培养箱培养。培养至对数生长期后,进行实验分组。实验分为对照(Control)组、细胞模型(TNF-α)组、毛兰素低剂量治疗(TNF-α+EL)组、毛兰素高剂量治疗(TNF-α+EH)组。对照组:用 DMEM 培养液培养 24 h;细胞模型组:用含 10 μg/L TNF-α 的 DMEM 培养液培养 24 h;毛兰素低剂量治疗组:在 TNF-α 诱导前 2 h 将毛兰素 1 nmol/L 加入细胞培养基中培养 24 h;毛兰素高剂量治疗组:在 TNF-α 诱导前 2 h 将毛兰素 4 nmol/L 加入细胞培养基中培养 24 h。

为了验证毛兰素是否通过 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴来缓解 AD,将实验分为对照(Control)组、r-HMGB1 组、TFA+r-HMGB1 组、Y-27632+r-HMGB1 组。对照组:用 DMEM 培养液培养 24 h;r-HMGB1 组:加入重组的 HMGB1(r-HMGB1)刺激后,用 DMEM 培养液培养 24 h;TFA+r-HMGB1 组:用 RAGE 的抑制剂 TFA 处理 r-HMGB1 诱导 HaCaT 细胞后,用 DMEM 培养液培养 24 h;Y-27632+r-HMGB1 组:用 RhoA/ROCK1 特异性的抑制剂 Y-27632 处理 r-HMGB1 诱导 HaCaT 细胞后,用 DMEM 培养液培养 24 h。

1.3.6 活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行消化,制备

细胞悬液,按 3×10^4/mL 的细胞浓度接种于 6 孔板内,根据各实验分组加入相应的药物作用 24 h。弃去培养液,使用 ROS Assay 试剂盒进行 ROS 检测,将 HaCaT 细胞与荧光探针在 37 ℃孵育 30 min 后 PBS 清洗,离心重悬,采用流式细胞仪对各实验分组的 HaCaT 细胞进行活性氧检测。

1.3.7 线粒体活性氧(mitochondrion reactive oxygen species, mtROS)检测

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行消化,制备细胞悬液,接种于 6 孔板内,根据各实验分组加入相应的药物作用 24 h。弃去培养液,PBS 清洗,使用 MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator 试剂盒检测 mtROS。将染料与细胞共同孵育 30 min 后 PBS 清洗,加入含 DAPI 的抗荧光猝灭封闭液。采用 Cytation 5 仪器对各实验分组的 HaCaT 细胞进行分析。

1.3.8 TUNEL 检测

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行消化,制备细胞悬液,接种于 6 孔板内,根据各实验分组加入相应的药物作用 24 h。弃去培养液,PBS 清洗,使用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行荧光检测。细胞固定后通透 10 min,加入 TUNEL 溶液孵育 30 min。使用 Cytaion 5 仪器对各实验分组的 HaCaT 细胞进行凋亡检测。

1.3.9 Western blot

将 HaCaT 细胞按各实验分组加入相应的药物作用 24 h 后,收集到离心管中离心,去除上清液,加入 RIPA 蛋白裂解液,静置 30 min,采用 BCA 法进行蛋白浓度的测定。用 10% SDS-PAGE 的分离胶进行电泳,转膜,奶粉封闭。一抗 4 ℃孵育过夜,包括 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1。二抗室温孵育 1 h。用 ECL 进行显色处理,采用 Quantity One 1.0 软件检测,使用 Image J 2.0.0 软件分析蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用 Prism 10.0 软件进行统计学分析。数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛兰素对 AD 小鼠背部皮肤及耳朵厚度的影响

为了探究毛兰素对 AD 的治疗作用。与对照组相比,模型组小鼠的背部皮肤和耳朵厚度显著增加,出现显著的 AD 样病变,如出血、水肿、表皮脱落等($P<0.05$)。与模型组相比,毛兰素治疗后减轻了小鼠背侧皮肤和耳朵厚度及 AD 样病变($P<0.05$),见图 1,表 1。以上结果表明,毛兰素治疗可以降低 AD 小鼠的皮肤厚度,有缓解 AD 的作用。

2.2 毛兰素对 AD 小鼠背部皮肤及耳朵的组织病理学影响

采用 HE 染色和甲苯胺蓝染色法观察 AD 小鼠背部皮肤及耳朵的组织病理学变化。如图 2A 所示,毛兰素治疗后,AD 小鼠的背部皮肤和耳朵的棘层厚度减少。如图 2B 所示,肥大细胞浸润减少,脱颗粒现象明显缓解。以上结果说明,毛兰素可以改善 AD 小鼠的皮肤棘层厚度,减缓 AD 小鼠中的肥大细胞脱颗粒情况。

2.3 毛兰素对 AD 小鼠炎症因子表达的影响

为研究毛兰素对小鼠血清 AD 相关炎症因子

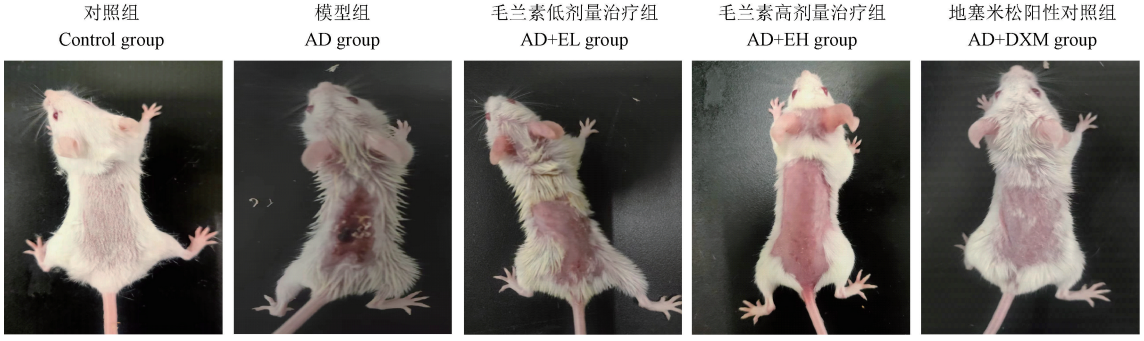


图 1 不同组 AD 小鼠皮肤和耳朵的大体形态变化

Figure 1 Gross morphological changes of skin and ears in different groups of AD mice

的影响，采用 ELISA 法检测细胞因子的表达情况。结果见表 2，与对照组相比，模型组小鼠的 TSLP、IL-4、IL-13、TNF-α 的含量显著上升（$P<0.05$）。经毛兰素治疗后，AD 相关炎症因子显著下降（$P<0.05$）。以上结果表明，毛兰素可通过下调 AD 相关炎症因子的表达来改善炎症反应。

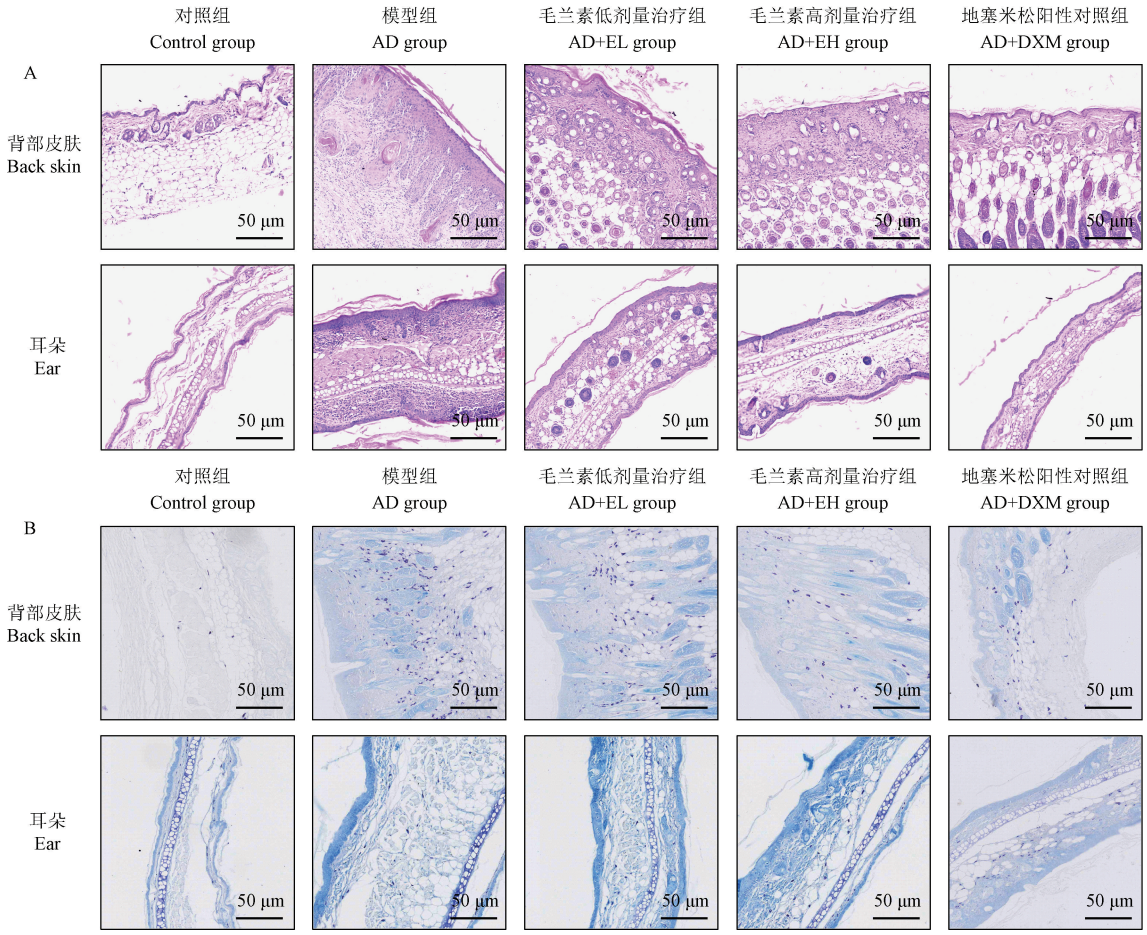
表 1　各组小鼠背部皮肤及耳朵的厚度（$\bar{x}\pm s, n=8$）

Table 1　Thickness of back skin and ears in each group of mice（$\bar{x}\pm s, n=8$）

组别 Groups	背部皮肤厚度/μm Back skin thickness	耳朵厚度/μm Ear thickness
对照组 Control group	56.00±0.14	25.00±0.17
模型组 AD group	129.00±0.26*	67.00±0.32*
毛兰素低剂量治疗组 AD+EL group	108.00±0.11$^{**\#}$	51.00±0.36$^{**\#}$
毛兰素高剂量治疗组 AD+EH group	94.00±0.24$^{**\#}$	46.00±0.27$^{**\#\#}$
地塞米松阳性对照组 AD+DXM group	79.00±0.06$^{**\#\#}$	32.00±0.08$^{**\#\#}$

注：与对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note. Compared with Control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with AD group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.



注：A：HE 检测棘层厚度的变化；B：甲苯胺蓝染色观察肥大细胞的数量和脱颗粒情况。

图 2　毛兰素对 AD 小鼠背部皮肤及耳朵的组织病理学影响

Note. A, HE to detect changes in spinous layer thickness. B, Observe the number and degranulation of mast cells using methylamine blue staining.

Figure 2　Histopathological effects of Erianin on the back skin and ears of AD mice

2.4　毛兰素抑制 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞中 ROS 和 mtROS 的产生

为了探究毛兰素对由 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞中 ROS 和 mtROS 产生的影响,采用流式细胞术检测 ROS,免疫荧光检测 mtROS。结果如图 3A 所示,与 TNF-α 组相比,毛兰素可以显著抑制

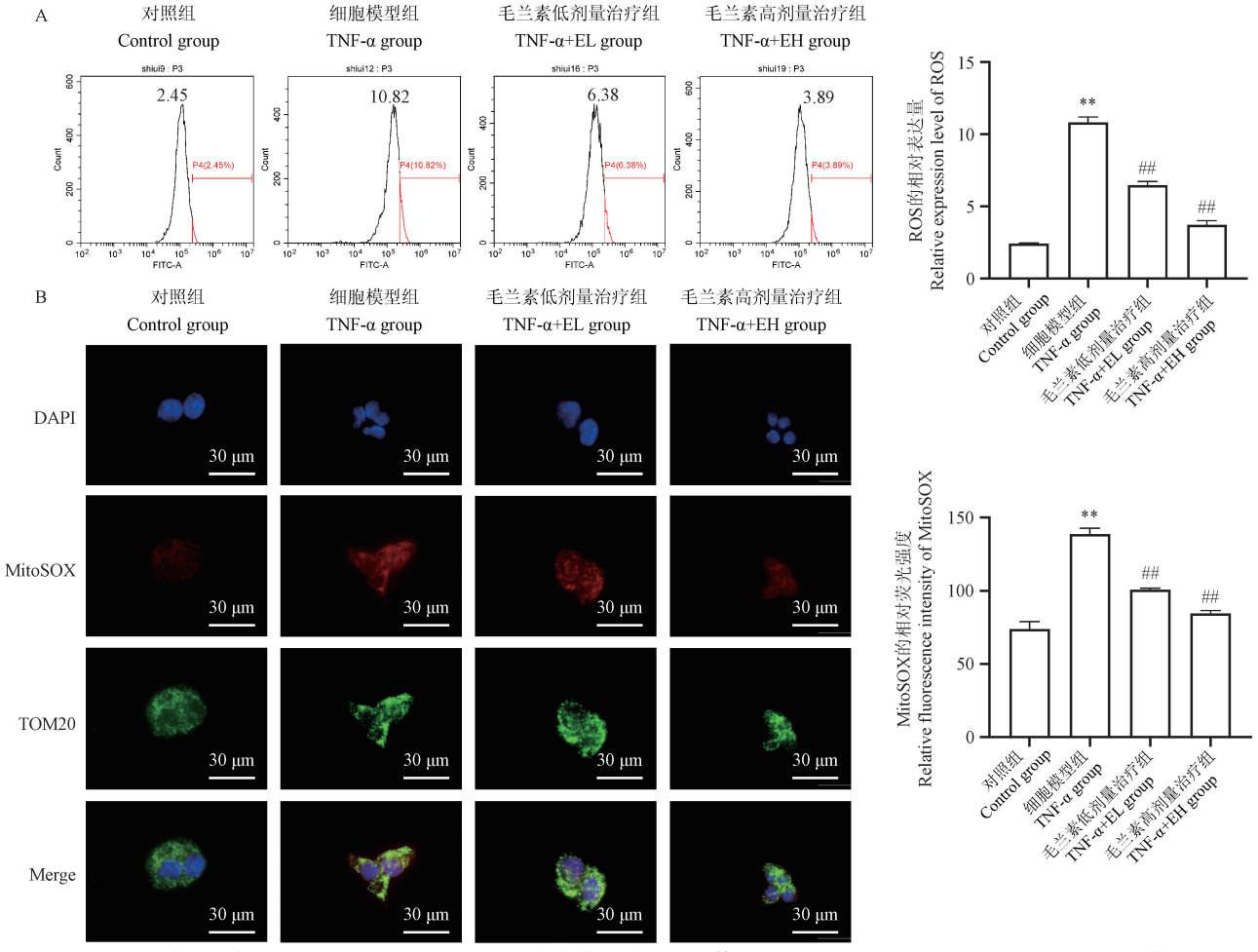
表 2　各组炎症因子相对表达量比较($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

Table 2　Comparison of relative expression levels of inflammatory factors in different groups($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别 Groups	TSLP/(ng/mg)	IL-4/(ng/mg)	IL-13/(ng/mg)	TNF-α/(ng/mg)
对照组 Control group	0.64±0.11	0.97±0.16	1.02±0.33	0.67±0.27
模型组 AD group	8.12±0.63*	7.52±0.33*	4.33±0.42*	8.28±0.39*
毛兰素低剂量治疗组 AD+EL group	5.65±0.34$^{*\#\#}$	6.15±0.27$^{*\#\#}$	3.17±0.26$^{*\#}$	7.42±0.51$^{*\#}$
毛兰素高剂量治疗组 AD+EH group	3.71±0.26$^{**\#\#}$	4.37±0.31$^{**\#\#}$	2.66±0.16$^{*\#\#}$	5.81±0.28$^{**\#\#}$
地塞米松阳性对照组 AD+DXM group	2.96±0.22$^{**\#\#}$	2.18±0.23$^{**\#\#}$	1.98±0.21$^{**\#\#}$	3.43±0.12$^{**\#\#}$

注:与对照组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$。

Note. Compared with Control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with AD group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.



注:A:流式细胞术检测各组活性氧含量及量化分析;B:免疫荧光检测线粒体活性氧。与对照组相比,$^{**}P<0.01$;与细胞模型组相比,$^{\#\#}P<0.01$。

图 3　毛兰素对 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞中 ROS 和 mtROS 产生的影响

Note. A, Flow cytometry detection and quantitative analysis of ROS content. B, Immunofluorescence detection of mitochondrial reactive oxygen species. Compared with Control group, $^{**}P<0.01$. Compared with TNF-α group, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 3　Effect of Erianin on ROS and mtROS production in TNF-α-induced HaCaT cells

ROS 的产生($P<0.01$)。免疫荧光结果如图 3B 显示,毛兰素治疗后 mtROS 的产生显著减少($P<0.01$)。以上结果表明,毛兰素可以减少 ROS 和 mtROS 的积累,保护线粒体功能。

2.5　Erianin 抑制由 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞凋亡

为了探究毛兰素是否能减轻 HaCaT 细胞因 TNF-α 诱导的细胞凋亡,采用 TUNEL 法发现毛兰素对细胞凋亡有显著的抑制作用。图 4 结果表明,毛兰素能抑制由 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞凋亡。

2.6　毛兰素对 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴调的影响

为了探究毛兰素在 AD 中 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号通路的治疗作用,采用 Western blot 的方法检测相关蛋白的表达。在体内实验中,与 AD 组相比,毛兰素治疗后 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 蛋白表达量均发生了下降($P<0.01$,图 5)。体外实验发现,与 TNF-α 组相比,毛兰素治疗后 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 蛋白表达量下降($P<0.01$,图 6A)。为了验证毛兰素是否通过 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴来缓解 AD,本研究选用 RAGE 的抑制剂 TFA 刺激 HaCaT 细胞后,加入重组的 HMGB1(r-HMGB1)刺激,发现 TFA + r-HMGB1 组的 HMGB1 蛋白表达量,与对照组相比明显增高($P<0.01$),与 r-HMGB1 组相比没有明显改变,而 RAGE、RhoA 及 RCOK1 的表达量,与 r-HMGB1

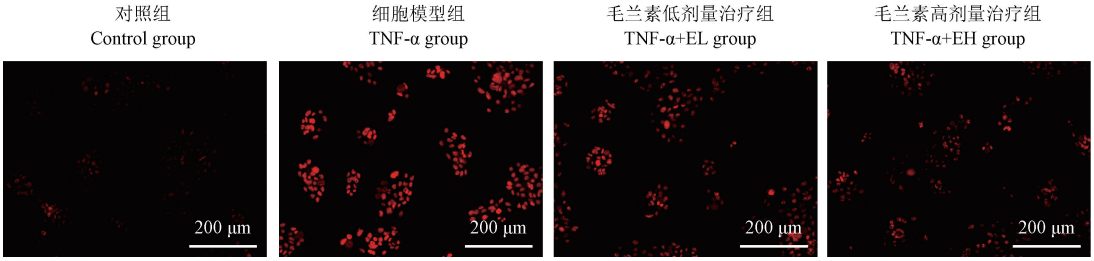
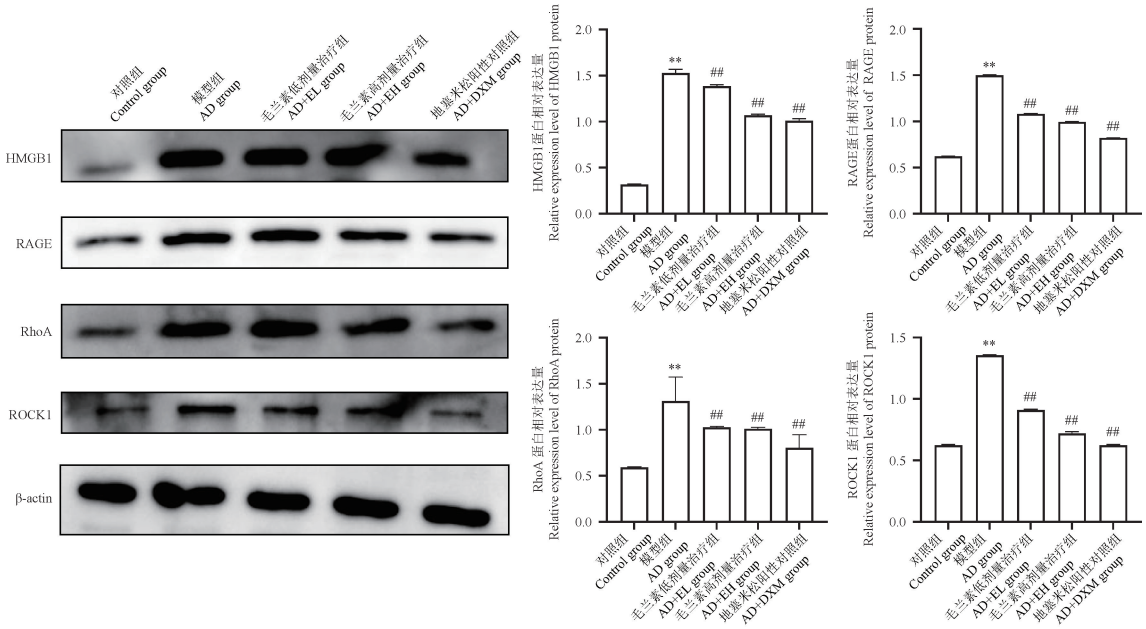


图 4　TUNEL 法检测 Hacat 细胞凋亡情况

Figure 4　TUNEL for detecting apoptosis of Hacat cells



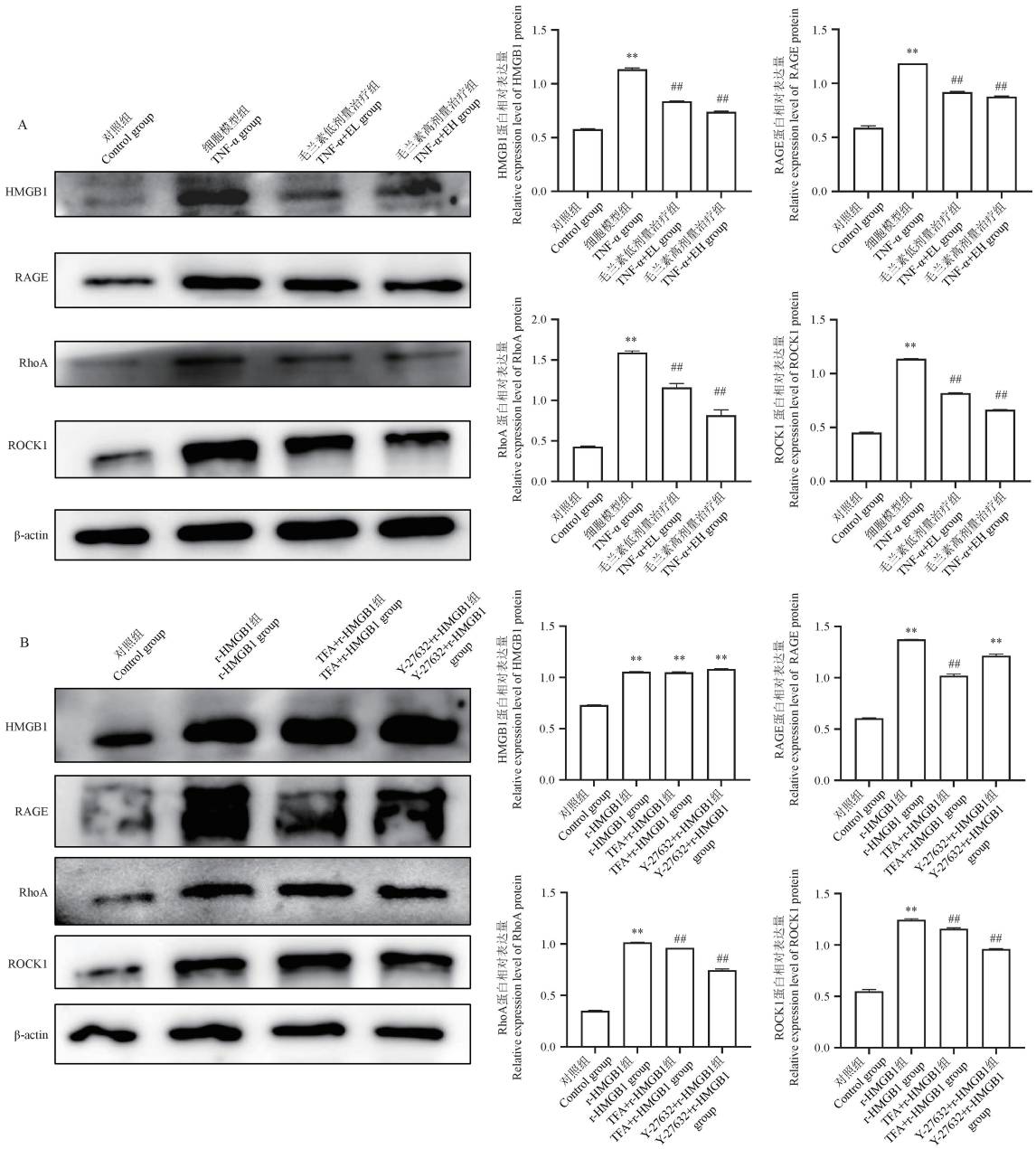
注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$;

图 5　Western blot 检测体内实验中不同分组 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 的表达情况($n=3$)

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with AD group, ## $P<0.01$.

Figure 5　Western blot detection of HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 expression in different groups during *in vivo*($n=3$)

组相比明显降低($P<0.01$);Y-27632+r-HMGB1 组的 HMGB1、RAGE 的表达量,与 r-HMGB1 组相比没有明显改变,而 RhoA 及 RCOK1 的表达量,与 r-HMGB1 组相比明显降低($P<0.01$,图 6B)。以上结果表明,毛兰素通过调节 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 信号轴来缓解 AD。



注:A:毛兰素对 HaCaT 细胞相关蛋白表达的 Western blot 分析。与对照组相比,$^{**}P<0.01$;与细胞模型组相比,$^{\#\#}P<0.01$;B:Western blot 检测在使用抑制剂条件下 HaCaT 细胞中相关蛋白的表达。与对照组相比,$^{**}P<0.01$;与 r-HMGB1 组相比,$^{\#\#}P<0.01$。

图 6 Western blot 检测体外实验中不同分组 HMGB1、RAGE、RhoA、ROCK1 的表达情况($n=3$)

Note. A, Western blot assay for protein expression in HaCaT cell. Compared with Control group, $^{**}P<0.01$. Compared with TNF-α group, $^{\#\#}P<0.01$. B, Western blot assay the expression of related proteins in HaCaT cells under inhibitor conditions. Compared with Control group, $^{**}P<0.01$. Compared with r-HMGB1 group, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 6 Western blot detection of HMGB1, RAGE, RhoA, and ROCK1 expression in different groups during *in vitro* ($n=3$)

3 讨论

AD 是一种常见的炎症性皮肤病。AD 的发生主要与皮肤屏障受损和免疫功能紊乱有关[12]。Th2 细胞介导的炎症反应在 AD 急性期和慢性期损伤中均有作用,而 Th1 细胞介导的炎症反应则在 AD 的慢性损伤中扮演着重要的角色[13]。AD 急性发作期,胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin,TSLP)可作用树突状细胞最终导致 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,进而促进 Th2 细胞的增殖并分泌 Th2 型细胞因子白细胞介素(interleukin,IL)-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13 等,导致浆细胞过量释放免疫球蛋白 E(immunoglobulin E,IgE),嗜酸性粒细胞数增加[14];在 AD 慢性期,则以产生干扰素 γ(interferon γ,IFN-γ)、TNF、IL-2、IL-12、IL-18 等细胞因子为主介导免疫反应[15],引起机体炎症的发生。在本文的研究中发现毛兰素可以抑制 DNCB 诱导的 AD 模型小鼠皮肤增厚,减少皮肤炎症细胞的浸润,阻止肥大细胞脱颗粒,降低炎症因子 TSLP、IL-4、IL-13 的表达,具有明显抗 AD 炎症作用。近年来研究表明过量的 ROS 介导的氧化应激与 AD 的发生有关[16]。氧化应激引发细胞内活性氧的过度累积和线粒体功能障碍,导致细胞凋亡,加剧 AD 病理进程[17]。本研究结果表明,毛兰素可以抑制 TNF-α 诱导的 HaCaT 细胞 ROS 和 mtROS 产生,抑制细胞凋亡,进一步显示毛兰素具有抗 AD 生物活性。

HMGB1 是一种高度保守的核蛋白,作为 HMGB 家族的重要成员之一,广泛分布于哺乳动物细胞[18]。HMGB1 核蛋白被认为是染色质结构的重要结合因子,其在核小体结构的维护及基因转录过程中发挥着关键作用,不仅有助于维持染色质的稳定性,还参与了细胞 DNA 的重组等多种生物学功能。同时,细胞外的 HMGB1 蛋白在调控细胞分化、细胞迁移与转移、细胞凋亡以及炎症反应等生物过程中也扮演着重要角色。研究揭示,细胞外 HMGB1 能够作为损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns,DAMP)激活先天免疫系统,与 RAGE 受体结合激活细胞内信号通路,促进炎症反应的进程。近年来研究表明,HMGB1 与 RAGE 结合会激活 NF-κB,毛兰素通过调控细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2,ERK1/2)-NF-κB 信号通路抑制小胶质细胞引起的炎症[19]。同时,HMGB1 与配体 RAGE 结合能介导 RhoA/ROCK1 信号通路激活,参与氧化应激、细胞凋亡和炎症的发生和发展等重要生理病理过程[20-21]。本研究显示,毛兰素能够降低 AD 小鼠 HMGB1 和 RAGE 表达,抑制 RhoA/ROCK1 通路激活并参与 AD 炎症的发生。体外利用 r-HMGB1 刺激 HaCaT 细胞,抑制 RAGE 后 RhoA、ROCK1 表达量会下降。而抑制 RhoA/ROCK1 后,RAGE 蛋白表达量没有发生显著改变,结果显示 HMGB1/RAGE 激活 RhoA/ROCK1 信号通路参与 AD 病理过程,毛兰素通过调控该通路发挥抗 AD 炎症作用。

综上所述,毛兰素有明显抗 AD 炎症作用,其作用机制可能是通过调控 HMGB1/RAGE-RhoA/ROCK1 通路缓解 AD 炎症反应。

参考文献:

[1] LANGAN S M, IRVINE A D, WEIDINGER S. Atopic dermatitis [J]. Lancet, 2020, 396(10247): 345-360.

[2] ZHANG Q, WANG H, RAN C, et al. Anti-inflammatory effects of amarogentin on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like mice and in HaCat cells [J]. Anim Model Exp Med, 2023, 6(3): 255-265.

[3] YU H, LIN J, YUAN J, et al. Screening mitochondria-related biomarkers in skin and plasma of atopic dermatitis patients by bioinformatics analysis and machine learning [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1367602.

[4] GONG Y Q, FAN Y, WU D Z, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent [J]. Eur J Cancer, 2004, 40(10): 1554-1565.

[5] SU C, ZHANG P, LIU J, et al. Erianin inhibits indoleamine 2, 3-dioxygenase-induced tumor angiogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 521-528.

[6] TSAI S W, WANG J H, CHANG Y K, et al. Erianin alleviates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting Th17 cell differentiation [J]. Open Life Sci, 2023, 18(1): 20220703.

[7] DOU B, HU W, SONG M, et al. Anti-inflammation of Erianin in dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis mice model *via* collaborative regulation of TLR4 and STAT3 [J]. Chem Biol Interact, 2020, 324: 109089.

[8] PIAO X M, FENG M F, ZHAO W P, et al. Dendrocandin U from *Dendrobium officinale* kimura et migo inhibits M1 polarization in alveolar macrophage by suppressing NF-κB

signaling pathway [J]. Chem Biodivers, 2023, 20(11): e202300999.

[9] LOTZE M T, DEMARCO R A. Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4(12): 1405-1409.

[10] LUAN Z, HU B, WU L, et al. Unfractionated heparin alleviates human lung endothelial barrier dysfunction induced by high mobility group box 1 through regulation of P38-GSK3β-snail signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(5): 1907-1918.

[11] FAN H, TANG H B, CHEN Z, et al. Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 295.

[12] PATOLI D, MIGNOTTE F, DECKERT V, et al. Inhibition of mitophagy drives macrophage activation and antibacterial defense during sepsis [J]. J Clin Invest, 2020, 130(11): 5858-5874.

[13] DAS P, MOUNIKA P, YELLURKAR M L, et al. Keratinocytes: an enigmatic factor in atopic dermatitis [J]. Cells, 2022, 11(10): 1683.

[14] SROKA-TOMASZEWSKA J, TRZECIAK M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4130.

[15] CHEN G, WARD M F, SAMA A E, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine [J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(6): 329-333.

[16] ZHANG Y, WENG J, HUAN L, et al. Mitophagy in atherosclerosis: from mechanism to therapy [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1165507.

[17] HERB M, SCHRAMM M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(2): 313.

[18] ZHANG S, HU L, JIANG J, et al. HMGB1/RAGE axis mediates stress-induced RVLM neuroinflammation in mice *via* impairing mitophagy flux in microglia [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 15.

[19] ZHANG T, OUYANG H, MEI X, et al. Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells *via* inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF-κB signaling pathway [J]. FASEB J, 2019, 33(11): 11776-11790.

[20] DONG Q, LUO Y, YIN Y, et al. RhoA/ROCK1 regulates the mitochondrial dysfunction through Drp1 induced by *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(15): 2123-2135.

[21] 吴进福, 周晓慧, 范慧敏, 等. RhoA/ROCK 信号通路在左心疾病致大鼠肺动脉高压模型中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 612-616.
WU J F, ZHOU X H, FAN H M, et al. The role of RhoA/ROCK pathway in the rat models of left heart disease-associated pulmonary hypertension [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(6): 612-616.

〔收稿日期〕2024-10-15