



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 熊果酸通过诱导角质形成细胞自噬改善小鼠特应性皮炎症状
作者: 李红艳, 吴小婷, 刘佳淼, 梅元蕊, 祁晓烨, 刘振兴
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250168
收稿日期: 2025-11-06
网络首发日期: 2026-07-09
引用格式: 李红艳, 吴小婷, 刘佳淼, 梅元蕊, 祁晓烨, 刘振兴. 熊果酸通过诱导角质形成细胞自噬改善小鼠特应性皮炎症状[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250168>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250168

熊果酸通过诱导角质形成细胞自噬改善 小鼠特应性皮炎症状

李红艳^{1,2}, 吴小婷¹, 刘佳淼¹, 梅元蕊¹, 祁晓烨^{1,2}, 刘振兴¹
(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津嘉氏堂科技有限公司, 天津 300457)

摘要: 探究熊果酸 (ursolic acid, UA) 对角质形成细胞自噬的调控作用及其在特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 皮肤屏障修复和炎症改善中的治疗潜力。体外实验证实, UA 能有效诱导人永生化角质形成细胞 (HaCaT) 的自噬, 并逆转由 IL-4/IL-13 引起的自噬抑制及屏障功能损伤 ($P<0.05$)。在 2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 诱导的 AD 小鼠模型中, UA 干预显著降低 AD 小鼠的皮炎严重度评分及搔抓频次 ($P<0.05$), 并有效减轻表皮增厚及肥大细胞浸润 ($P<0.05$)。在机制上, UA 不仅上调皮肤组织中自噬蛋白 LC3 的表达, 还增强紧密连接屏障蛋白 Claudin-1 和 ZO-1 的表达, 并显著降低关键促炎细胞因子 IFN- γ 、IL-4、IL-13 的水平 ($P<0.05$)。UA 能够激活角质形成细胞自噬, 修复皮肤屏障功能, 并显著缓解 DNCB 诱导的 AD 症状。本研究结果为熊果酸作为新型自噬调节剂治疗特应性皮炎提供了重要的理论与实验依据。

关键词: 熊果酸; 特应性皮炎; 角质形成细胞; 自噬; 皮肤屏障

中图分类号: R758.2, R966

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Ursolic Acid Alleviates Atopic Dermatitis Symptoms in Mice by Inducing Autophagy in Keratinocytes

LI Hongyan^{1,2}, WU Xiaoting¹, LIU Jiamiao¹, MEI Yuanrui¹, QI Xiaoye^{1,2}, LIU Zhenxing¹
(1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Joystar Science and Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: This study investigated the regulatory effects of ursolic acid (UA) on keratinocyte autophagy and its therapeutic potential for repairing skin barrier function and ameliorating inflammation in atopic dermatitis (AD). *In vitro*, UA effectively induced autophagy in human keratinocytes (HaCaT) and reversed the autophagy inhibition and barrier dysfunction caused by IL-4/IL-13 ($P<0.05$). In a DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene) induced AD mice model, UA intervention significantly reduced the dermatitis severity score and scratching frequency ($P<0.05$), and effectively reduced epidermal thickening and mast cell infiltration ($P<0.05$). Mechanistically, UA not only upregulated the expression of the autophagy protein LC3 but also enhanced the expression of tight junction proteins Claudin-1 and ZO-1, while significantly reducing the levels of key pro-inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, and IL-13 in skin tissues ($P<0.05$). In conclusion, UA activated keratinocyte autophagy, repaired skin barrier function, and significantly alleviated DNCB-induced AD symptoms. These findings provide a significant theoretical and experimental basis for UA as a novel autophagy modulator for the treatment of AD.

收稿日期: 2025-11-06; 修回日期: 2026-01-21

基金项目: 天津科技大学技术开发项目 (24188)

作者简介: 李红艳 (1977—), 女, 天津人, 博士研究生; 通信作者: 刘振兴, 副研究员, liuzx@tust.edu.cn

Key words: ursolic acid; atopic dermatitis; keratinocytes; autophagy; skin barrier

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种常见的慢性炎症性皮肤病, 其核心发病机制涉及皮肤屏障功能缺陷与免疫系统异常^[1]。皮肤屏障受损不仅是特应性皮炎的始动因素, 还可促进过敏原渗透, 驱动疾病的慢性化与复发^[2]。寻找能够有效修复皮肤屏障并抑制炎症的药物是特应性皮炎治疗的关键。细胞自噬 (autophagy) 是维持细胞内环境稳态的关键生理过程, 负责降解受损的细胞器和异常蛋白^[3]。新近研究表明, 角质形成细胞的自噬功能障碍参与了特应性皮炎的病理过程, 而激活自噬能够促进皮肤屏障相关蛋白合成, 并减轻炎症反应^[4-5]。因此, 靶向调控自噬已成为治疗特应性皮炎的潜在有效途径。

熊果酸 (ursolic acid, UA) 是一种具有多种生物活性的天然三萜类化合物, 其在特应性皮炎治疗中的抗炎及免疫调节作用已有报道^[6]。然而, 熊果酸对角质形成细胞自噬及皮肤屏障功能的直接影响及其相关机制仍有待阐明。本研究通过体外及体内实验, 系统探讨熊果酸对角质形成细胞自噬的诱导作用, 及其对特应性皮炎小鼠模型皮肤屏障功能和炎症反应的改善效果, 旨在为熊果酸治疗特应性皮炎提供新的机制解析和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞

人永生化角质形成细胞 (HaCaT) 购自上海瑾原生物科技有限公司, 并通过短串联重复序列 (short tandem repeat) 鉴定。细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1000 U/mL 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ 青链霉素的 DMEM 培养基中。培养条件: 含 5% CO_2 的空气, 恒温 37 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 80%。

1.1.2 实验动物

ICR 小鼠 (15 只 SPF 级雌性 6 周龄小鼠, 体重 20~22 g) 购自河南斯克贝斯生物科技有限公司 (许可证号: SCXK (豫) 2025-0005)。小鼠随机分为 3 组: 对照组、2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 组、UA 干预组, 每组 5 只。小鼠饲养于独立气笼 (IVC), 每笼 5 只, 自由饮水与摄食。环境温度 (23 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~55%, 12 h/12 h 明/暗交替循环。本实验已获天津科技大学学术委员会批准, 批号为

2025[SW]0301, 所有动物实验操作均严格遵守实验动物伦理规范。

1.1.3 试剂与仪器

熊果酸 (UA), Selleck 公司; 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、DMEM 培养基, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-4 (IL-4) 和白介素-13 (IL-13), 金少源 (上海) 生物科技有限公司; 牛血清蛋白、HRP-山羊抗兔 IgG, 北京索莱宝科技有限公司; RIPA 裂解液、Hoechst3334 细胞核染料、ECL 化学发光试剂盒, 碧云天; 蛋白酶抑制剂复合物 (PIC)、巴佛洛霉素 A1、重组 IL-4 和 IL-13, 美国 MedChemExpress 公司; LC3B 抗体、PVDF 膜, Sigma 公司; β -actin 抗体, 武汉爱博泰克生物科技有限公司; Claudin-1, ZO-1 和 phospho-P70S6K 抗体, 杭州华安生物技术有限公司; phospho-AMPK 抗体, 美国 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP)-山羊抗小鼠 IgG, 北京博奥龙免疫技术有限公司; Alexa Fluor 488-山羊抗兔 IgG, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

HR40-7IIA2 生物安全柜, 青岛海尔生物医疗股份有限公司; 042BR 稳压稳流电泳仪、221BR 半干转印槽, 美国 Bio-Rad 公司; miniChemi610 化学发光/荧光成像分析系统, 北京森西赛智科技有限公司; MIKRO 220R 台式冷冻离心机, 德国 Hettich 公司; Eclipse Ti 倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; AMWX-1200 生物显微镜, 德国 AMG 公司; MANDELA 酶标仪, 英国 TECNA 公司; 311 型细胞培养箱、QuantStudio 1 Plus 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Millicell ERS 2 跨膜电阻仪, 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 UA 的制备

将 45.67 mg UA 溶解在 1 mL 的二甲基亚砜 (DMSO) 中, 配制为 100 mmol/L 的 UA 储备液, 将其分装后贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 使用时依情况进行稀释。

1.2.2 细胞处理

细胞密度达到 80%~90% 时, 进行细胞传代。以每孔 3×10^5 接种于 6 孔板中, 待细胞汇合度为 70% 时, 使用 40 $\mu\text{mol/L}$ UA 处理细胞 3~9 h。

1.2.3 免疫印迹 (Western blot)

收集细胞, 加入含有 PIC 的 RIPA 裂解缓冲液, 于冰上裂解 20 min, 期间定时涡旋振荡。裂解液在 4 °C、12000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液。向上清液中加入 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液, 95 °C 加热 5 min 使蛋白变性, 冷却后于 -20 °C 保存备用。取等量蛋白样品进行 12% SDS-PAGE, 随后通过半干法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。将 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶 (溶于 PBST 缓冲液) 于室温封闭 1 h 后, 加入一抗 (稀释比例参照说明书), 4 °C 孵育过夜。用 PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5000 稀释) 室温孵育 2 h, 再次用 PBST 缓冲液洗膜 3 次。使用化学发光法 (ECL) 检测蛋白条带, 并利用 ImageJ 软件分析条带灰度值。以 β -actin 为内参, 对目标蛋白进行相对定量分析。

1.2.4 RNA 提取与实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

采用 TRIzol 试剂提取药物处理后 HaCaT 细胞的总 RNA, 并利用逆转录试剂盒将其反转录为 cDNA。基于 SYBR Green 荧光染料体系, 在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增检测。实验以 β -actin 为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因的相对 mRNA 表达水平。本实验所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 相关引物序列

Tab. 1 Primers were used in RT-qPCR

基因	引物方向	引物序列 (5'-3')
β -actin	正向	GTGGCCGAGGACTTTGATTG
	反向	AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG
LC3B	正向	ACCATGCCGTCGGAGAAG
	反向	ATCGTTCTATTATCACCGGGATT
SQSTM1	正向	ATCGGAGGATCCGAGTGT
	反向	TGGCTGTGAGCTGCTCTT
ATG5	正向	AGAAGCTGTTTCGTCTGTGG
	反向	AGGTGTTTCCAACATTGGCTC
LAMP1	正向	ATGTGTTAGTGGCACCCAGG
	反向	TGTTACACGCGTGTCTCTCC
CTSD	正向	GCAAAGTCTGGACATCGCTTG
	反向	GCCATAGTGGATGTCAAACGAGG
MCOLIN1	正向	CCATGCTGTGGACCACTACC
	反向	ATGGTCTTCAGCCGGAAGTG

1.2.5 细胞跨膜电阻 (TEER) 测量

将对数生长期的 HaCaT 细胞消化、计数后, 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 Transwell 小室 (上

室膜面积 0.6 cm^2) 中, 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞形成汇合的单层后, 更换为含 $1.8 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$ 的高钙培养基, 构建上皮屏障模型。随后, 在培养基中分别加入 UA 或联用细胞因子 IL-4 和 IL-13 进行处理, 作用 48 h 后, 使用 Millicell ERS-2 电阻仪测量各组细胞单层的跨上皮电阻 (TEER)。为确保溶剂影响最小化, 所有处理组中 DMSO 的终质量分数均控制在 0.1% 以下。

1.2.6 DNCB 诱导的 AD 小鼠模型构建

实验小鼠适应性喂养 5 d 后, 采用 DNCB 诱导建立 AD 模型。对小鼠背部皮肤 ($2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$) 进行脱毛处理, 次日局部涂抹 1% DNCB 溶液 (DNCB 溶于丙酮与橄榄油体积比为 3:1 的混合溶剂中) $100 \mu\text{L}$, 进行初次致敏。从第 4 天起, 每隔一日使用 0.5% DNCB 溶液进行重复刺激, 持续至第 20 天。模型建成后 (第 21 天起), AD 小鼠每日接受皮下注射 UA 溶液, 剂量为 75 mg/kg (注射体积 $100 \mu\text{L}$, 质量浓度 15 mg/mL), 连续给药 7 d。在第 27 天末次给药后, 处死小鼠并收集相关样本进行后续分析。

1.2.7 组织病理学染色与分析

将小鼠背部皮肤组织样本在 4% 多聚甲醛溶液中固定, 经石蜡包埋并切成 $5 \mu\text{m}$ 厚的切片。部分切片进行常规苏木精-伊红 (HE) 染色, 以评估表皮与真皮厚度及炎症细胞浸润情况。其余切片采用甲苯胺蓝染色, 用于特异性观察并计数浸润的肥大细胞。染色后的切片在光学显微镜下成像, 并使用 ImageJ 软件进行定量分析。

1.2.8 小鼠皮炎严重程度评分

在实验第 27 天, 对小鼠皮炎的临床严重程度进行评估, 评估指标为红斑、鳞屑/干燥、水肿及表皮剥脱的情况。每项指标依据其严重程度进行 4 级评分: 0 分 (无症状)、1 分 (轻度)、2 分 (中度)、3 分 (重度)。4 项指标得分之和为该小鼠的临床总分。

1.2.9 组织免疫荧光

石蜡切片经脱蜡复水后, 置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 在 95 °C 水浴中热诱导抗原修复 30 min。自然冷却后, 切片经 0.1% Triton X-100 室温通透 15 min, 并用 3% BSA 溶液封闭 30 min 以阻断非特异性结合; 加入 LC3、Claudin-1 和 ZO-1 抗体 (1 : 1000 稀释), 在 4 °C 孵育过夜。经 PBST 缓冲液充分洗涤后, 加入 Alexa Fluor 488 标记的二抗 (1 : 2000 稀释), 室温避光孵育 1 h。使用含 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 的抗荧光淬

灭封片剂进行封片。采用 Nikon ECLIPSE Ti2 型激光扫描共聚焦显微镜采集图像, 并利用 ImageJ 软件对目标蛋白的荧光强度进行定量分析。

1.2.10 ELISA 检测炎症细胞因子水平

取约 100 mg 小鼠皮肤组织, 在液氮中充分研磨成粉末, 加入 1 mL 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液进行匀浆, 将匀浆液于 4 °C、12000 r/min 条件下离心 15 min, 吸取上清液。采用 BCA 法测定上清液中的总蛋白质量浓度。根据 ELISA 试剂盒说明书, 检测上清液中干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-4 (IL-4) 和白介素-13 (IL-13) 的浓度。

1.3 统计学处理

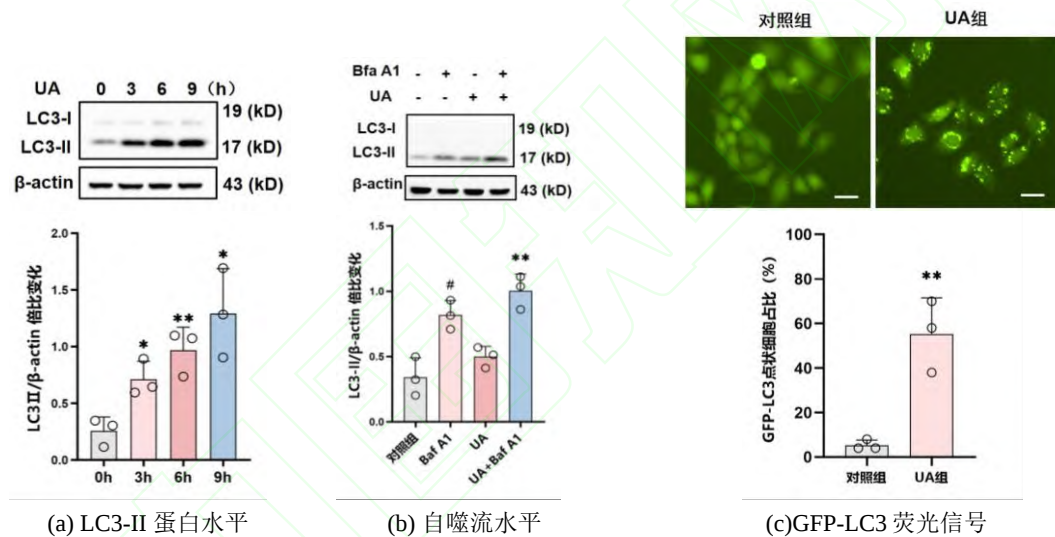
使用 GraphPad Prism 8.4 软件进行统计学分析。数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 两组比较采用 Student *t* 检验, 采用单因素方差分析

(ANOVA) 进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 UA 对 HaCaT 细胞自噬的影响

UA 对 HaCaT 细胞自噬的影响如图 1 所示。由图 1 (a) 免疫印迹结果可知, 与对照组细胞相比, 40 $\mu\text{mol/L}$ UA 处理 3、6、9 h, HaCaT 细胞内自噬标志蛋白 LC3-II 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。由图 1 (b) 可知, 在 UA 与 Baf A1 共处理组中, LC3-II 的蛋白水平显著高于 UA 单独处理组 ($P < 0.01$), 表明自噬流水平增加。由图 1 (c) 可知, 与对照组细胞相比, UA 处理 6 h 显著升高 GFP-LC3 自噬体数量 ($P < 0.01$)。



注: *和**表示与对照组相比差异显著 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$; ##表示与 UA 组相比差异显著 $P < 0.01$; 比例尺为 20 μm 。

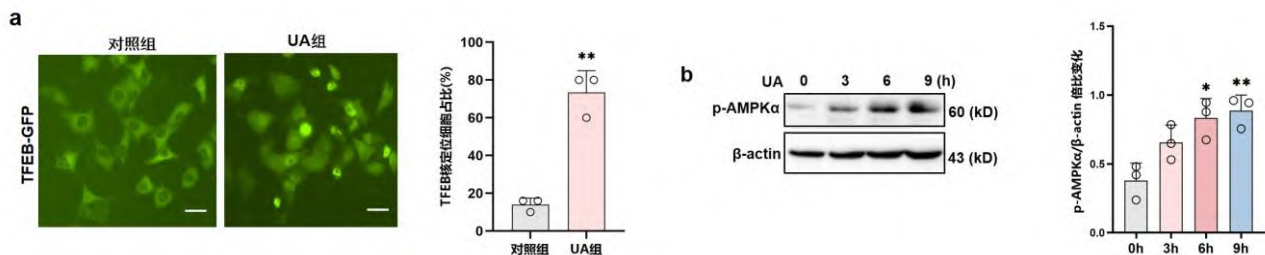
图 1 UA 对 HaCaT 细胞自噬的影响

Fig. 1 Effects of UA on autophagy in HaCaT cells

2.2 UA 对转录因子 TFEB 活性的影响

UA 对转录因子 TFEB 活性的影响如图 2 所示。与对照组细胞相比, UA 处理 6 h 显著增加 TFEB-GFP 核定位细胞的数量 ($P < 0.01$)。与对照组细胞相比, UA 处理 6 h 显著升高 AMPK 的磷酸化

水平 ($P < 0.05$), 并降低 P70S6K 的磷酸化水平 ($P < 0.01$)。此外, UA 处理 12 h 自噬相关基因 LC3、SQSTM1、ATG5 及溶酶体相关基因 MCOLIN1、LAMP1、CTSD 的 mRNA 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。



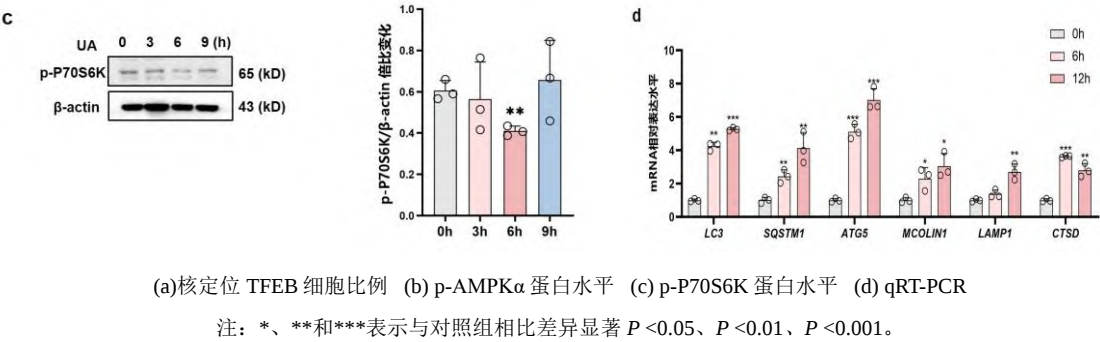


图 2 UA 对转录因子 TFEB 活性的影响

Fig. 2 Effects of UA on the activity of transcription factor TFEB

2.3 UA 对 IL-4/IL-13 处理的 HaCaT 细胞跨膜电阻的影响

UA 对 HaCaT 细胞跨膜电阻的影响如图 3 所示。与对照组细胞相比, IL-4/IL-13 处理显著降低 HaCaT 细胞 LC3-II 的蛋白水平 ($P < 0.05$); 与 IL-4/IL-13 处理组相比, UA 干预显著升高 LC3-II 的蛋

白水平 ($P < 0.05$)。TEER 结果显示, 与对照组细胞相比, IL-4/IL-13 处理显著降低 HaCaT 细胞的 TEER 值 ($P < 0.01$), 而 UA 处理后 TEER 显著高于 IL-4/IL-13 处理组 ($P < 0.05$)。在 shATG7 HaCaT 中, UA 不能显著提高 TEER ($P > 0.05$)。

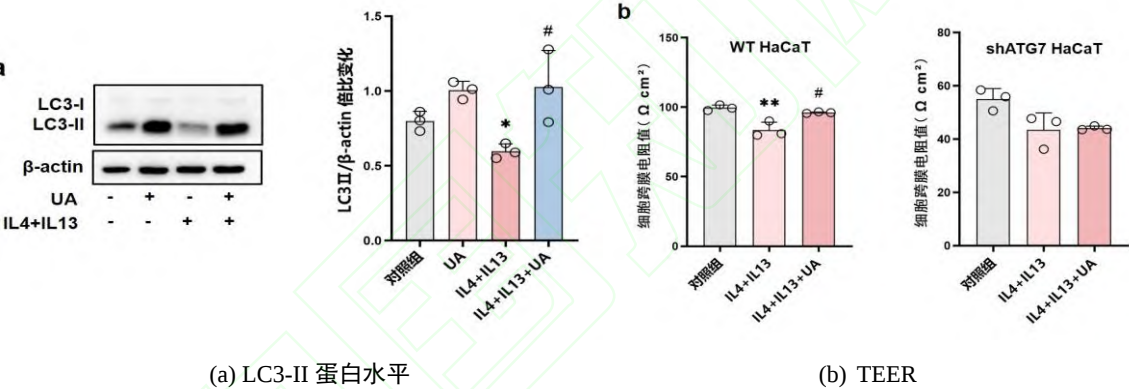


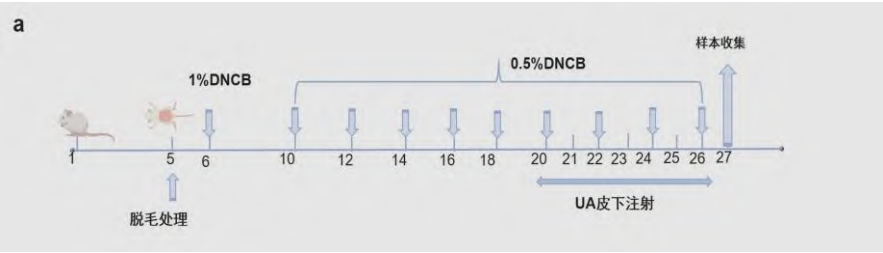
图 3 UA 对 HaCaT 细胞跨膜电阻的影响

Fig. 3 Effects of UA on the TEER value of HaCaT cells

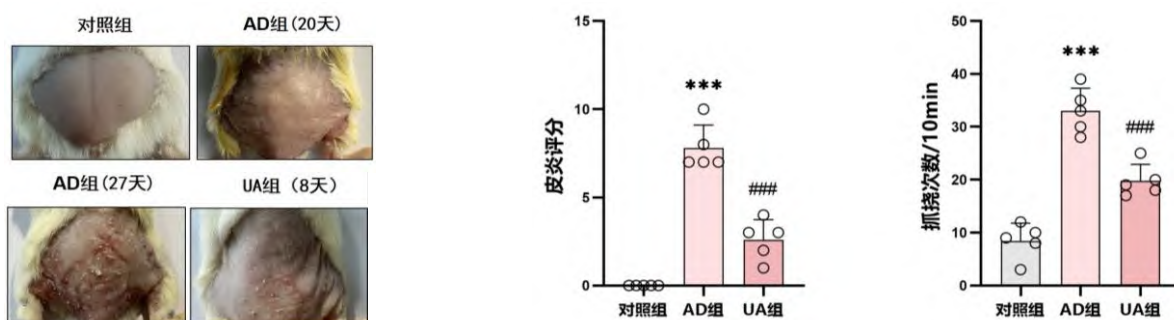
2.4 UA 对 AD 小鼠皮肤屏障修复的作用

UA 对 AD 小鼠皮肤组织形态的影响如图 4 所示。对照组小鼠背皮区外观正常, 模型组小鼠背皮区出现明显红肿、结痂、溃疡等, 而 UA 组小鼠皮损减轻, 无明显红肿、溃疡。各组小鼠皮损严重程度

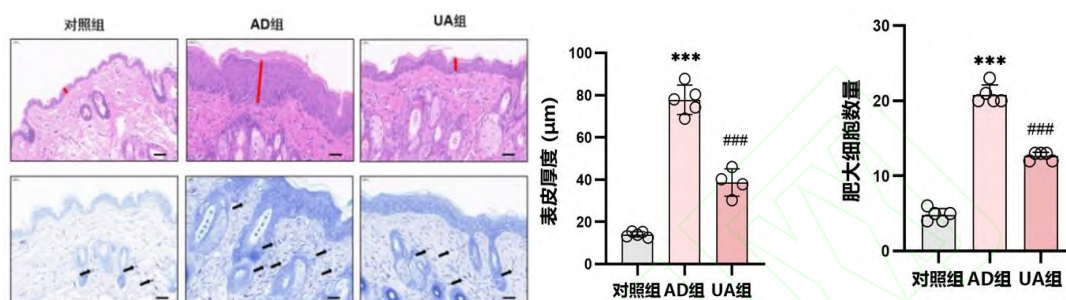
评分统计结果显示: 实验第 27 天, 与正常对照组小鼠比较, AD 模型组小鼠皮炎严重程度评分 (DAS) 和搔抓次数显著增加 ($P < 0.001$); 与 AD 模型组比较, UA 组小鼠 DAS 和搔抓次数显著降低 ($P < 0.001$)。



(a)动物实验示意图



(b) 皮炎评分及抓挠次数



(c) HE 与甲苯胺蓝染色

注: ***表示与对照组相比差异显著 $P < 0.001$; ###表示与 AD 模型组相比差异显著 $P < 0.001$; 比例尺: 100 μm。

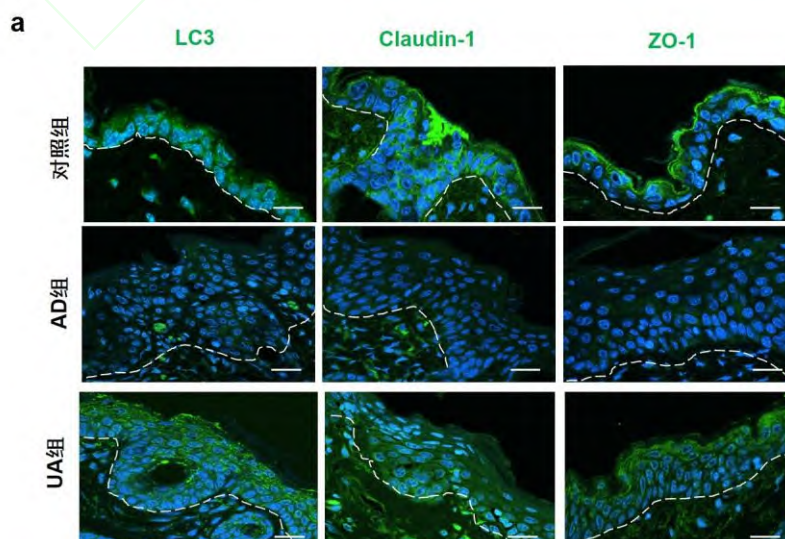
图 4 UA 对 AD 小鼠皮肤组织形态的影响

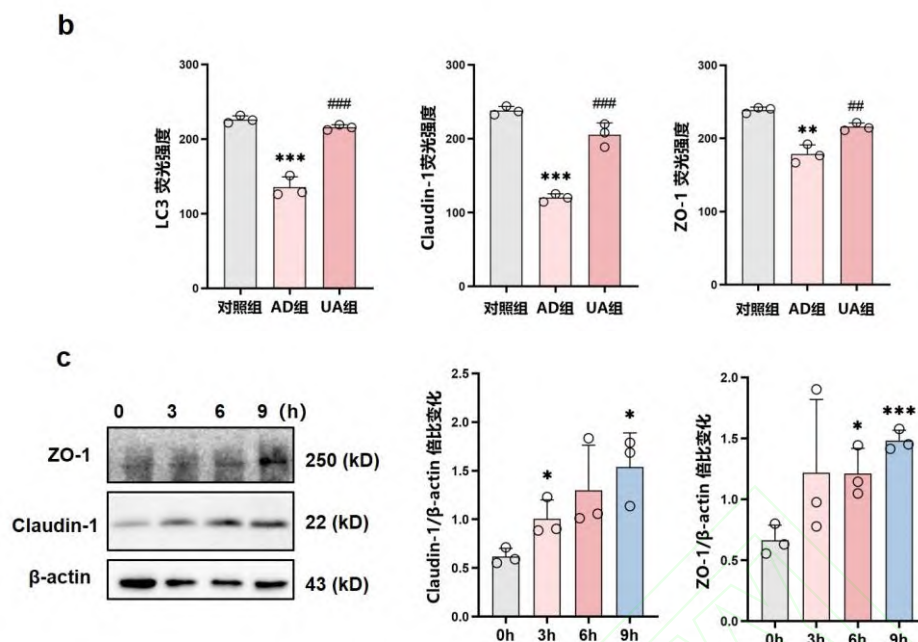
Fig. 4 Effects of UA on skin tissue morphology in AD mice

HE 染色结果显示, 与正常对照组小鼠比较, AD 模型组小鼠表皮厚度显著增加 ($P < 0.001$); 与 AD 模型组比较, UA 组小鼠表皮厚度显著降低 ($P < 0.001$), 甲苯胺蓝染色显示, 与正常对照组小鼠比较, AD 模型组小鼠肥大细胞浸润显著增加 ($P < 0.001$); 与 AD 模型组比较, UA 组小鼠肥大细胞浸润显著降低 ($P < 0.001$)。

2.5 UA 对 AD 小鼠皮肤自噬蛋白及 TJ 屏障蛋白表达的影响

UA 对 AD 小鼠皮肤组织中 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达的影响如图 5 所示。免疫荧光检测显示, 与正常对照组小鼠比较, AD 模型组小鼠皮肤组织中 LC3、Claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$); 与 AD 模型组比较, UA 组小鼠皮肤组织中 LC3、Claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。此外, 与对照组细胞相比, UA 处理 9 h 能够显著升高 HaCaT 细胞中 Claudin-1 和 ZO-1 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。





(a) 免疫组织荧光 (b) 荧光强度定量 (c) Claudin-1 和 ZO-1 蛋白水平

注: *、**和***表示与对照组相比差异显著 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$; ##和###表示与 AD 组相比差异显著 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$; 比例尺为 10 μm 。

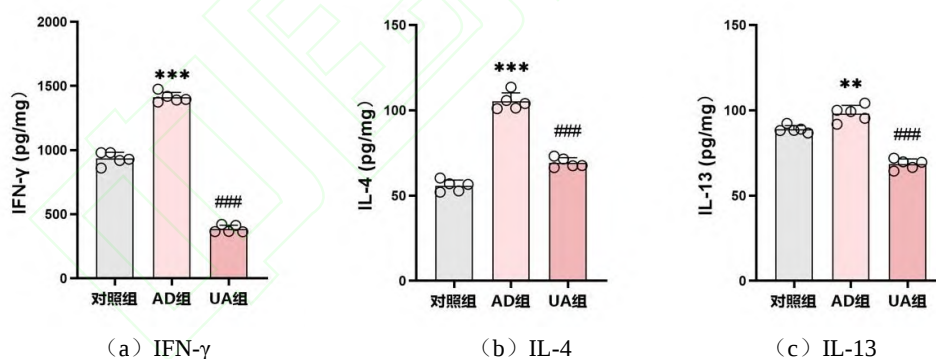
图 5 UA 对 AD 小鼠皮肤组织中 Claudin-1 和 ZO-1 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of UA on the protein expression of Claudin-1 and ZO-1 in AD mice skin tissue

2.6 UA 对 AD 小鼠皮肤组织中炎症细胞因子水平的影响

与对照组相比, AD 模型组小鼠皮肤组织中的 IFN- γ ($P < 0.001$)、IL-4 ($P < 0.001$) 和 IL-13

($P < 0.05$) 水平均显著升高(图 6)。UA 组小鼠皮肤组织中炎症因子水平 IFN- γ ($P < 0.001$)、IL-4 ($P < 0.001$) 和 IL-13 ($P < 0.001$) 较 AD 模型组均下降。



注: **和***表示与对照组相比差异显著 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$; ###表示与 AD 组相比差异显著 $P < 0.001$ 。

图 6 UA 对 AD 小鼠皮肤组织中炎症细胞因子水平的影响

Fig. 6 Effects of UA on the levels of inflammatory cytokines in the skin tissue of AD

3 讨论

AD 是一种常见的慢性复发性炎症性皮肤病, 影响全球 15%~20%的儿童和 2%-5%的成年人^[7]。在我国, 尤其是在城市地区, 儿童 AD 的患病率亦呈现高发态势^[8]。随着环境变迁、过敏原暴露增多及生活方式的现代化, AD 的发病率持续攀升。目前, 临床上主要依赖皮质类固醇、免疫抑制剂及生

物制剂等进行治疗。尽管这些疗法能有效缓解临床症状, 但长期使用常伴随皮肤屏障受损、感染易感性增加以及药物依赖等不良反应^[9-10]。因此, 开发兼具高效性与长期安全性的全新治疗策略已成为 AD 临床管理的迫切需求。

皮肤屏障功能受损是 AD 的核心病理环节, 在维持皮肤免疫稳态中具有关键作用。皮肤屏障修复不仅可显著降低患者对过敏原的敏感性, 还能有效减轻免疫炎症反应^[2,11]。自噬是一种高度保守的细

胞内降解与循环利用机制,能够通过自噬体与溶酶体融合清除受损蛋白质与细胞器,从而维持细胞稳态^[3]。在皮肤组织中,角质形成细胞的自噬水平直接影响其正常分化、脂质代谢及屏障蛋白合成^[12-14]。因此,激活角质形成细胞自噬不仅有助于重建皮肤屏障,还能抑制过度炎症反应。越来越多的证据表明,自噬功能障碍在包括 AD 在内的多种皮肤免疫性疾病中发挥重要作用。例如,在 AD 患者及小鼠模型的表皮中,自噬标志物 LC3 水平显著降低,自噬底物 p62 异常积聚^[15],同时功能性溶酶体蛋白酶(如组织蛋白酶 D 和 L)活性明显下降^[16]。这些结果提示,靶向调控自噬可能成为 AD 治疗的潜在策略。已有研究表明,自噬诱导剂雷帕霉素可缓解 NC/Nga 小鼠的 AD 样症状^[17],人 β -防御素-3 也可通过激活角质形成细胞自噬修复皮肤屏障并降低炎症水平^[15]。本课题组近期研究也发现天然产物七叶皂苷通过激活角质形成细胞自噬修复 AD 小鼠皮肤屏障并降低炎症水平^[18]。

UA 是一种天然五环三萜类化合物,在多种炎症模型中表现出抗炎、抗氧化及免疫调节作用^[19]。既往研究表明,UA 可通过多种信号通路诱导或增强细胞自噬,从而发挥抗氧化、调节代谢以及抗肿瘤等多重效应。例如,在 H_2O_2 诱导的氧化应激模型中,UA 通过促进自噬清除受损线粒体、降低 ROS 水平,提高大鼠心肌细胞 H9C2 的存活率^[20];在老年大鼠肝脏中,UA 显著上调 LC3B、Beclin 1 等自噬相关蛋白的表达,改善脂质沉积及代谢异常^[21]。然而,UA 在皮肤角质形成细胞中的自噬调控作用及其在 AD 治疗中的机制尚不明确。本研究证实,UA 可促进角质形成细胞自噬,并在 AD 细胞及小鼠模型中修复皮肤屏障功能,缓解病理症状,为其作为自噬诱导剂应用于 AD 治疗提供了依据。

在分子机制上,转录因子 EB (TFEB) 作为自噬与溶酶体生物合成的核心转录因子,其活性受 AMPK 和 mTORC1 精确调节。mTORC1 的磷酸化可抑制 TFEB 功能,而 AMPK 通过抑制 mTORC1 磷酸化间接激活 TFEB^[22-23]。本研究发现,UA 可降低 mTORC1 下游 P70S6K 的磷酸化水平,同时促进 AMPK 磷酸化,这表明 AMPK-mTORC1 信号参与 UA 激活 TFEB 的过程。此外,UA 还显著上调了 LAMP1、MCOLIN1 和 CTSD 等溶酶体相关基因的表达。鉴于 AD 患者表皮存在溶酶体功能受损^[16],UA 介导的溶酶体活性增强在改善 AD 症状中的作用需进一步探究。

辅助型 T 细胞 2 (Th2) 细胞因子(尤其 IL-4 和 IL-13)的表达升高是 AD 炎症的显著特征。这些因子可通过激活 mTOR 信号通路抑制角质形成细胞自噬,并损伤由紧密连接(TJ)维系的皮肤屏障功能^[24,15]。本研究证实,IL-4 与 IL-13 联合处理可显著降低 HaCaT 细胞单层的跨上皮电阻(TEER);UA 处理能够恢复由 IL-4 和 IL-13 引起的 TEER 下降,表明其有效改善 Th2 细胞因子介导的皮肤 TJ 屏障损伤。AD 的炎症反应涉及多种免疫细胞及促炎因子。Th2 细胞分泌 IL-4 和 IL-13,促进 B 细胞活化与 IgE 生成,进而诱导肥大细胞脱颗粒,释放组胺及其他炎症介质;Th1 细胞分泌的 IFN- γ 可激活巨噬细胞炎症信号通路^[25]。本研究进一步证实,UA 处理可降低 DNCB 诱导的 AD 小鼠皮肤中 IFN- γ 、IL-4 和 IL-13 的水平,减少肥大细胞的浸润。既往研究也显示,UA 可通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路并激活 Nrf2/HO-1 通路减少 IL-4/IL-13 释放,从而减轻 DNCB 诱导的皮肤炎症与氧化应激^[6]。未来仍需深入研究 UA 是否通过调节 Th1/Th2 平衡发挥免疫调节作用,明确其对 AD 免疫应答的具体分子机制。

表皮屏障破坏与自噬缺陷存在密切关联。已有研究发现,在 AD 患者及小鼠模型的表皮中,自噬标志物 LC3 缺失显著^[15]。在本研究中,DNCB 处理同样导致小鼠表皮中 LC3 蛋白水平下降,自噬受抑制。自噬功能障碍不仅阻碍角质形成细胞的终末分化,还会减少 Claudin-1 和 ZO-1 等关键 TJ 蛋白的表达,从而进一步损伤皮肤屏障完整性^[5,15]。UA 给药不仅恢复了 LC3 水平,还显著增强了 Claudin-1 和 ZO-1 在表皮的表达与分布,表明其可通过促进自噬流并调控 TJ 蛋白表达双重机制改善 AD 小鼠皮肤屏障功能。

综上所述,本研究揭示了 UA 在 AD 治疗中的新机制:通过激活 AMPK-mTORC1-TFEB 信号轴促进角质形成细胞自噬与溶酶体功能,从而增强皮肤屏障功能并抑制炎症反应。这些发现不仅强调了靶向自噬在 AD 治疗中的潜在价值,也为 UA 作为新型自噬调节剂治疗以皮肤屏障受损和自噬缺陷为特征的皮肤疾病提供了重要的理论与实验依据。

参考文献:

- [1] Langan S M, Lrvine A D, Weidinger S. Atopic dermatitis[J]. Lancet, 2020, 396(10247): 345-360.

- [2] Egawa G, Kabashima K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: essential topics to prevent the atopic march[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016, 138(2): 350-358.
- [3] Feng Yuchen, He Ding, Yao Zhiyuan, et al. The machinery of macroautophagy[J]. *Cell Research*, 2014, 24(1): 24-41.
- [4] Liu Chi, Gu Lei, Ding Jie, et al. Autophagy in skin barrier and immune-related skin diseases[J]. *The Journal of Dermatology*, 2021, 48(12): 1827-1837.
- [5] Lin Yi, Wu Xiuyi, Yang Yiwen, et al. The multifaceted role of autophagy in skin autoimmune disorders: a guardian or culprit?[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1343987.
- [6] Wang Zhehuan, Zhang Huiru, Qi Caihong, et al. Ursolic acid ameliorates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms in mice by regulating TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 118: 110079.
- [7] Flohr C, Mann J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis[J]. *Allergy*, 2014, 69(1): 3-16.
- [8] 聂智峰, 肖若薇, 宋佳芳, 等. 中国儿童特应性皮炎的疾病经济负担与医疗资源利用情况 (英文) [J]. *中国药*, 2024, 33 (5): 458-469.
- [9] Patel S V, Khan D A. Adverse reactions to biologic therapy[J]. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2017, 37(2): 397-412.
- [10] Sayaseng K Y, Vernon P. Pathophysiology and management of mild to moderate pediatric atopic dermatitis[J]. *Journal of Pediatric Health Care*, 2018, 32(2): 2-12.
- [11] Elias P M, Hatano Y, Williams M L. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 121(6): 1337-1343.
- [12] Simpson C L, Tokito M K, Uppala R, et al. NIX initiates mitochondrial fragmentation via DRP1 to drive epidermal differentiation[J]. *Cell Reports*, 2021, 34(5): 108689.
- [13] Geng Qingwei, Wei Guoqi, Hu Yebe, et al. Alterations of autophagy modify lipids in epidermal keratinocytes[J]. *Clinical Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2023, 16: 1569-1581.
- [14] Xue Shenghao, Lin, Yumeng, Chen Haoran, et al. Mechanisms of autophagy and their implications in dermatological disorders[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1486627.
- [15] Peng Ge, Tsukamoto S, Ikutama R, et al. Human beta-defensin-3 attenuates atopic dermatitis-like inflammation through autophagy activation and the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(17): e156501.
- [16] Klapan K, Frangez Z, Markov N, et al. Evidence for lysosomal dysfunction within the epidermis in psoriasis and atopic dermatitis[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2021, 141(12): 2838-2848.
- [17] Jung K E, Lee Y J, Ryu Y H, et al. Effects of topically applied rapamycin and mycophenolic acid on TNCB-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 26(2): 432-438.
- [18] Liu Zhenxing, Zhao Jingye, Zhang Lei, et al. Escin alleviates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms by promoting autophagy activation and tight junction barrier restoration[J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2025, 189: 106865.
- [19] Luan Mingzhu, Wang Huiyun, Wang Jiazhen, et al. Advances in anti-inflammatory activity, mechanism and therapeutic application of ursolic acid[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2022, 22(3): 422-436.
- [20] 王绮雯, 陈志健, 张旺发, 等. 熊果酸通过促进自噬保护 H_2O_2 诱导的 H9C2 大鼠心肌细胞氧化应激损伤[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32 (11): 1615-1621.
- [21] 赖颖, 马朋, 姚玲, 等. 熊果酸改善自然衰老大鼠糖脂代谢紊乱与自噬能力的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31 (5): 858-863.
- [22] Martina J A, Chen Y, Gucsek M, et al. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB[J]. *Autophagy*, 2012, 8(6): 903-914.
- [23] Paquette M, El-Houjeiriri L, Zirden L C, et al. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 3957-3975.
- [24] Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, et al. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2015, 77(1): 28-36.
- [25] Fagundes B O, De-Sousa T R, Victor J R. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cell-derived cytokines (IL-4, IL-17, IFN- γ and IL-10) and their possible implications for atopic dermatitis

development[J]. International Journal of Dermatology,
2023, 62(4): 443-448.

