网络首发时间：2025-08-15 15:24:49　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20250815.1250.018

本维莫德调控 NRF2/ROS/NLRP3 通路减轻特应性皮炎

陆　芸[1,2],董丽萍[1,2],黄茂欣[1,2],王　宇[1,2],邓婷月[1,2],肖风丽[1,2,3]
([1] 安徽医科大学第一附属医院皮肤科,合肥　230032;[2] 安徽医科大学皮肤病研究所
皮肤病教育部重点实验室,合肥　230032;[3] 炎症免疫疾病安徽省实验室,合肥　230032)

摘要　目的　探讨本维莫德(BVM)治疗特应性皮炎(AD)的作用机制。**方法**　利用 TNF-α 和 IFN-γ 刺激 HaCaT 细胞,将细胞分为 CON 组,TNF-α/IFN-γ 组,TNF-α/IFN-γ、BVM 组,TNF-α/IFN-γ、BVM、ML385 组;DNCB 诱导 Balb/c 小鼠的 AD 模型,动物分为 CON 组、DNCB 组、DNCB + BVM 组、DNCB + TAC 组,评估 BVM 效果,及其在抗氧化及焦亡调节中的作用。**结果**　与对照组相比,BVM 抑制了 TNF-α 和 IFN-γ 刺激的 HaCaT 细胞炎症反应,改善了 DNCB 诱导的 AD 小鼠模型皮损和炎症;同时,使核因子 E2 相关因子 2(NRF2)相关抗氧化应激蛋白表达显著增加,细胞活性氧(ROS)水平及焦亡蛋白表达显著降低。**结论**　BVM 可通过激活 NRF2/ROS/NLRP3 通路抑制焦亡,从而减轻 AD 中的炎症反应。

关键词　本维莫德;特应性皮炎;焦亡;NLRP3;NRF2;ROS
中图分类号　R758.23
文献标志码　A　**文章编号**　1000 - 1492(2025)08 - 1490 - 09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.08.018

特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)是常见的慢性炎症性皮肤病,已有研究[1]表明焦亡与 AD 的发病存在密切关系。焦亡通常由炎症小体 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD - like receptor family,pyrin domain - containing 3,NLRP3)触发并由 Gasdermin 蛋白家族成员执行,导致细胞内容物的释放[2]。活性氧(reactive oxygen species,ROS)被认为是 NLRP3 炎症小体激活的关键介质之一[3]。炎症小体的激活和随后的焦亡导致促炎细胞因子释放,放大皮肤中的炎症反应并导致 AD 的发生发展[4]。本维莫德(benvitimod,BVM)是一种小分子治疗药物,可激活核因子 E2 相关因子 2(nuclearfactorerythroid -2-relatedfactor 2,NRF2)通路,参与 ROS 的细胞防御[5]。目前尚不清楚 BVM 是否能通过抑制 ROS 的生成干扰焦亡而减轻 AD。该研究通过细胞和动物实验探索 BVM 的抗氧化应激及抑制焦亡的作用。结果表明 BVM 可激活 NRF2/ROS/NLRP3 通路抑制焦亡,从而减轻 AD 中的炎症反应。该研究为治疗

2025 - 02 - 14 接收
基金项目:国家自然基金项目(编号:82373481);安徽省高校自然科学基金重点项目(编号:2023AH053302)
作者简介:陆　芸,女,硕士研究生;
肖风丽,女,博士,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,E-mail:xiaofengli@126.com

eukaryotic expression recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag was constructed, and the gastric intrinsic factor was purified by nickel column after expression in HEK293F cells. The purity and activity of purified gastric intrinsic factor were verified by SDS-PAGE, Western blot and indirect ELISA. ***Results*** Gastric factor contained 417 amino acids and was a hydrophilic acid stable protein. It is a secreted protein with Sec original signal peptide. pcDNA3.1(+)-human GIF-His tag recombinant plasmid was successfully constructed and soluble expression was obtained in HEK293F cell expression system. ***Conclusion*** The eukaryotic source of human gastric intrinsic factor is successfully prepared, and the bioinformatics results show that the protein is a hydrophilic acid stable secreted protein, laying a foundation for the subsequent use of this protein as an immunogen and protein calibrator to construct an immunoassay for gastric factor.

Key words　gastric intrinsic factor; eukaryotic expression; bioinformatics; protein purification; activity identification; ELISA
Fund program　Major Science and Technology Program of Hainan Province (No. ZDKJ2021040)
Corresponding author　Wang Bo, E-mail:wangqugans@163.com

AD 提供了新的思路，未来可通过抑制焦亡通路来治疗炎症性皮肤病。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *实验所用细胞* 永生化人角质形成细胞（HaCaT）购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.1.2 *实验试剂* NLRP3（T5565）、Gasdermin D（GSDMD）（P30823）、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1（cysteinyl aspartate specific proteinase-1，caspase-1）（M025280）（上海艾比玛特医药科技有限公司），白细胞介素-18（interleukin-18，IL-18）（10663-1-AP）、IL-1β（WL00891）、NRF2（80593-1-RR）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）（60004-1-lg）、山羊抗鼠（SA00001-1）、山羊抗兔（SA00001-2）、组蛋白 H3（Histon-H3）（81984-2-RR）（武汉三鹰生物技术有限公司），活性氧检测试剂盒（15122020）（沈阳万类生物技术有限公司），醌氧化还原酶 1［quinoneoxidoreductase1 NAD（P）H，NQO1］（SC-32793）、血红素加氧酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）（SC-390991）（美国 Santa 公司），细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）（521942）（合肥白鲨生物科技有限公司），乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（C0016）、Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒（C2015S）（上海碧云天生物技术有限公司），组织切片活性氧检测试剂盒（BB-470516）（上海贝博生物科技有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 *细胞培养* 将 HaCaT 细胞置于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中（美国 Gibco Life Sciences 公司），在 37 ℃ 和 5% CO_2 培养箱里培养。使用 10 ng/mL 的肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）（苏州近岸蛋白质科技股份有限公司）刺激 HaCaT 细胞，用二甲基亚砜制备 100 mmol/L BVM 储备溶液（广东中昊药业有限公司）观察其作用。

1.2.2 *动物实验* 使用 Balb/c 小鼠（雌性，18～22 g，6～8 周，24 只），饲养在 SPF 级别环境中，12 h 的光暗循环条件，室温 20～25 ℃，湿度 50%～60%，自由进食、饮水，适应性饲养 7 d 后开始实验。小鼠购自江苏集萃药康生物，动物实验经安徽医科大学伦理委员会批准（批号：LLSC20242243）。

将小鼠采用随机数字表法分为对照组、DNCB 组、DNCB + BVM 组、DNCB + 他克莫司（tacrolimus，TAC）组，每组 6 只。DNCB 组于实验第 1、4、7 天使用 2% DNCB（20 μL）溶液均匀涂抹在小鼠耳部皮肤，第 14 天开始，每 2 d 用 0.5% DNCB（20 μL）溶液进行连续致敏刺激。DNCB + BVM/TAC 组用 0.5% DNCB 涂抹于耳部 4 h 后增加 1% BVM 乳膏（广东中昊药业有限公司）或 0.1% TAC 乳膏（沈阳安斯泰来制药有限公司）治疗。对照组给予溶液基质（丙酮∶橄榄油 = 3∶1）刺激，时间频率和 DNCB 组相同。流程见图 1。处决所有小鼠后，收集耳部组织保存于 4% 多聚甲醛或 −80 ℃ 冰箱中，用于后期实验。

1.2.3 *皮炎评分、耳朵厚度、脾脏指数的评估及组织病理观察* 检测给药前后各组小鼠耳部皮损炎症情况[6]。使用游标卡尺测量每只小鼠的双耳厚度，测量耳廓同一区域 3 次，取平均厚度。测量小鼠的体质量与脾脏质量。将组织制成石蜡包埋或新鲜冰冻组织切片。苏木精－伊红染色（hematoxylin - eosin staining，H&E）观察组织病理。甲苯胺蓝染色（toluidine blue staining，TB）检测肥大细胞。每张病理切片随机选择 3 个区域检测表皮和真皮厚度、肥大细胞数。免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）法检测 NLRP3、GSDMD、Caspase-1（1∶100）表达情况。使用活性氧试剂盒测量小鼠耳部新鲜冰冻组织中的 ROS 水平，在正置显微镜下（德国徕卡 DM6B）观测 ROS 荧光强度。

1.2.4 *细胞活力、ROS 及 LDH 检测* 根据相关试剂盒说明书处理细胞，通过多功能酶标仪（PE

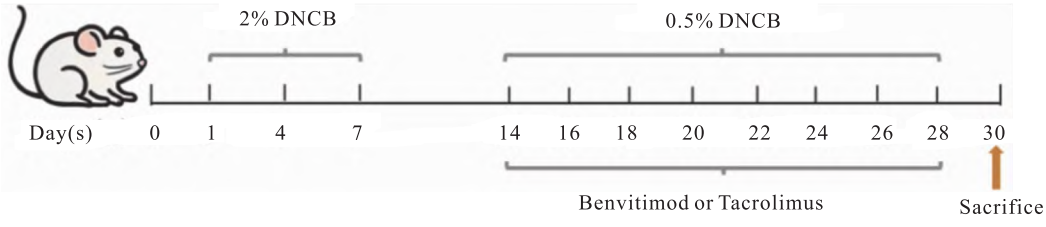

图 1 DNCB 诱导特应性皮炎小鼠流程图

Fig. 1 Flow chart of DNCB-induced atopic dermatitis mice

EnSpire)检测细胞存活率、ROS 与 LDH 水平。

1.2.5 碘化丙啶(propidium iodide staining,PI)染色 根据试剂盒方案进行洗涤染色检测。通过全自动活细胞成像仪对各组染色的活细胞进行成像。

1.2.6 Western blot(WB)实验 使用 RIPA 缓冲液收集细胞或动物组织蛋白质,SDS-PAGE 进一步分离并转移到硝酸纤维素膜,封闭后分别用一抗(1∶1 000 NLRP3/GSDMD/Caspase-1/IL1β/NRF2/NQO1/HO-1,1∶3 000 IL-18,1∶50 000 GAPDH/Histon-H3)在 4 ℃下孵育过夜。之后将膜与二抗(1∶10 000山羊抗兔或山羊抗鼠)在 4 ℃下孵育 1 h。最后进行条带检测。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)实验 提取小鼠皮肤组织中的 mRNA 进行分析。NRF2 引物序列:正向 5′-TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTGT-3′,反向 5′-GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC-3′。

1.3 统计学处理 采用 t 检验对两组进行比较,多组间的比较采用单因素方差分析。使用 GraphPad-Prism8.0 进行数据分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BVM 抑制 HaCaT 细胞焦亡 NLRP3 的过度激活可诱导焦亡导致炎性细胞因子的大量释放,为探究 BVM 能否减轻 HaCaT 细胞中焦亡的程度,首先使用 CCK-8 试剂盒测定不同浓度的 BVM 溶液对 HaCaT 细胞活力的影响。结果显示 20、40、60 μmol/L 的 BVM 对 HaCaT 细胞无明显毒性,细胞活力均不低于 90%(图 2A)。随后,使用 TNF-α 和 IFN-γ 建立炎症细胞模型。刺激 24 h 后,细胞内 ROS 水平明显升高,在 BVM 的治疗作用下,细胞内 ROS 水平随 BVM 浓度的升高而降低($F=54.86$,$P<0.000\ 1$)(图 2B)。WB 结果显示,随着 BVM 浓度的增加,焦亡蛋白 NLRP3($F=81.78$,$P<0.000\ 1$)、GSDMD-N($F=47.28$,$P<0.000\ 1$)、Caspase-1($F=73.51$,$P<0.000\ 1$)、IL-1β($F=52.73$,$P<0.000\ 1$)和 IL-18($F=55.17$,$P<0.000\ 1$)表达水平逐渐降低,NRF2($F=51.56$,$P<0.01$)及下游抗氧化基因 HO-1($F=36.77$,$P<0.01$)和 NQO1($F=38.54$,$P<0.01$)的蛋白表达水平依次升高(图 2 C-E)。由于 BVM 在 60 μmol/L 治疗效果最好,后续实验选择此浓度。以上结果表明,BVM 可抑制 NLRP3 炎症小体的激活进而抑制细胞发生焦亡。与此同时,BVM 促进 NRF2 移位至细胞核,并激活下游抗氧化基因 HO-1 和 NQO1。

2.2 BVM 通过激活 NRF2 通路抑制 TNF-α 和 IFN-γ 诱导的焦亡 探索 NRF2 与 ROS 以及焦亡的关系,加入 NRF2 抑制剂 ML385(5 μmol/L)处理 HaCaT 细胞。结果显示,加入 ML385 处理后,ROS 水平高于 BVM 组,这表明 ML385 的处理可消除 BVM 对 ROS 产生的抑制作用(图 3A)。收集细胞上清液以测量 LDH 释放量。结果表明,ML385 阻断了 BVM 对 LDH 的抑制作用($F=59.25$,$P<0.0001$)(图 3B)。PI 染色结果显示 BVM 可降低 TNF-α 和 IFN-γ 处理后的细胞死亡率,而 ML385 则阻断了 BVM 的这种作用(图 3C)。WB 结果显示,ML385 可阻断 BVM 对 NRF2($F=29.73$,$P<0.001$)、HO-1($F=95.76$,$P<0.000\ 1$)、NQO1($F=17.73$,$P=0.000\ 2$)蛋白的增强作用,同时抵消了 BVM 对 NLRP3($F=15.80$,$P<0.001$)、GSDMD-N($F=45.80$,$P<0.001$)、Caspase-1($F=38.76$,$P<0.001$)、IL-1β($F=49.58$,$P<0.000\ 1$)和 IL-18($F=51.81$,$P<0.000\ 1$)蛋白的抑制作用(图 3D-F)。这些结果表明,BVM 可通过激活 NRF2 通路抑制 ROS 的产生,同时抑制 NLRP3 炎症小体激活诱导的焦亡。

2.3 BVM 对焦亡的抑制受 ROS 水平的调控 为验证 ROS 是否导致上述焦亡过程,向细胞中加入 20 μmol/L 的 ROS 激活剂(H_2O_2)和 10 mmol/L 的 ROS 抑制剂(NAC)。加入 H_2O_2 后,NLRP3($F=74.57$,$P<0.000\ 1$)、GSDMD-N($F=68.76$,$P<0.000\ 1$)、Caspase-1($F=38.48$,$P<0.000\ 1$)的表达水平较对照组均升高(图 4A、B)。而加入 NAC 后,NLRP3($F=77.46$,$P<0.000\ 1$)、GSDMD-N($F=42.31$,$P<0.000\ 1$)、Caspase-1($F=74.03$,$P<0.000\ 1$)表达水平较 TNF-α 和 IFN-γ 组有所下降(图 4C、D)。因此,TNF-α 和 IFN-γ 诱导的焦亡,可被 H_2O_2 进一步上调并被 NAC 下调。

2.4 BVM 改善特应性皮炎小鼠症状 为探讨 BVM 在体内作用,本研究构建了 DNCB 诱导的 AD 模型小鼠(图 1)。小鼠耳部皮肤出现明显红斑、部分糜烂、结痂伴有搔抓次数增多等表现,显示 AD 造模成功。病理染色结果显示,与 DNCB 组相比,DNCB + BVM/TAC 组耳部表皮明显变薄($F=16.87$,$P<0.000\ 1$),肥大细胞浸润数明显减少,炎症减轻(图 5A、B);脾脏大小、脾脏指数($F=283.4$,$P<0.000\ 1$)以及皮炎评分($F=41.94$,$P<0.000\ 1$)显著下降(图5C-E),显示了BVM和TAC具有相同

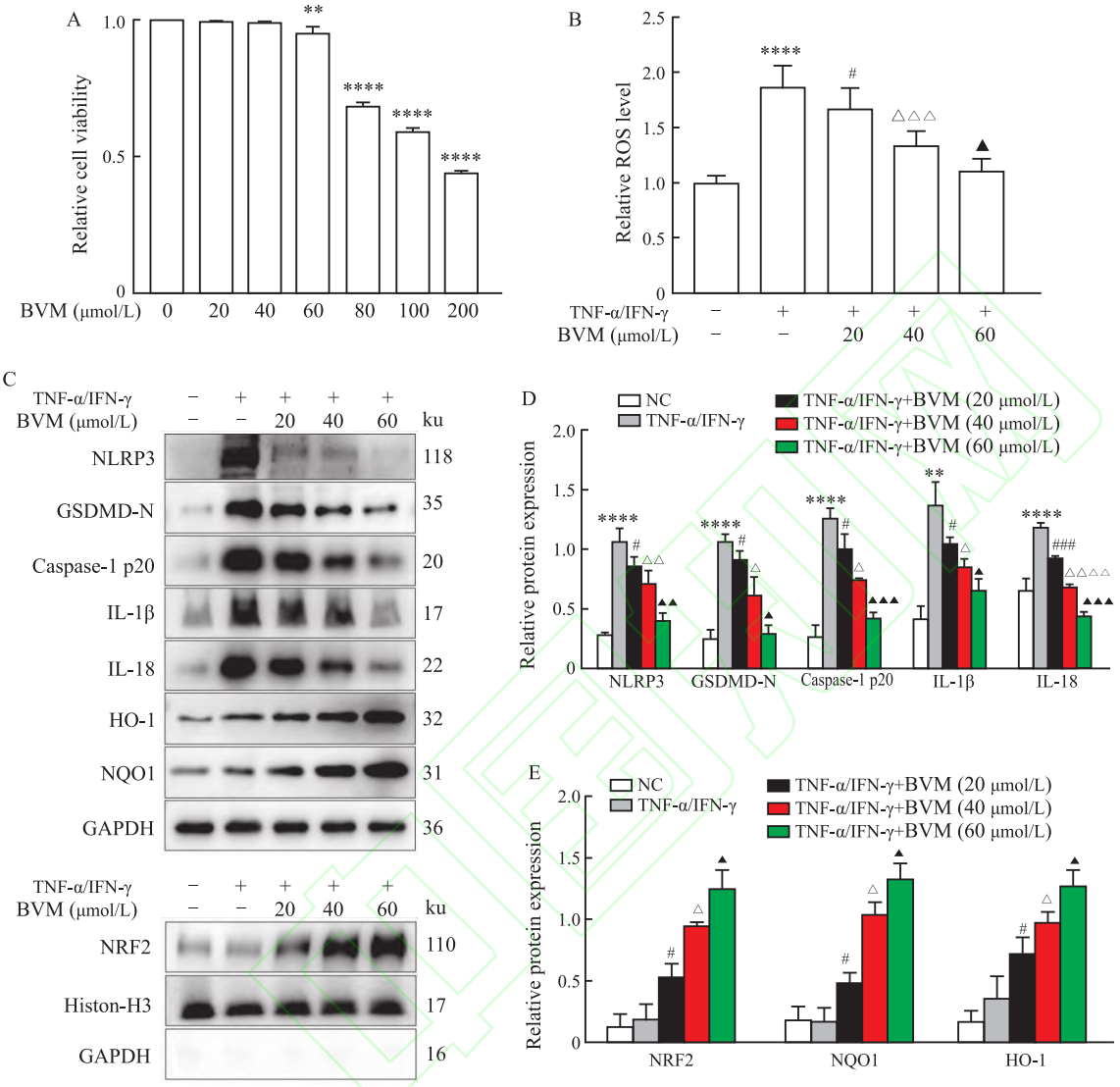

图 2 BVM 抑制 HaCaT 细胞焦亡

Fig. 2 BVM inhibited the pyroptosis of HaCaT cell

A: Cell viability was detected by CCK-8 in each group; B: ROS levels was detected by ROS Assay Kit in each group; C, D, E: WB analysis was used to measure the expression levels of NLRP3, GSDMD-N, Caspase-1 p20, IL-18, IL-1β and NRF2, HO-1, NQO1 protein expression in each group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.000\ 1$ *vs* NC; $^{\#}P<0.05$ *vs* TNF-α/IFN-γ group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* TNF-α/IFN-γ + BVM(20 μmol/L) group; $^{\blacktriangle}P<0.05$ *vs* TNF-α/IFN-γ + BVM(40 μmol/L) group.

的效果。

2.5 BVM 改善特应性皮炎小鼠 ROS 水平及焦亡程度 利用小鼠模型验证 BVM 能否改善 ROS 水平及焦亡程度。DNCB 组 ROS 荧光强度与对照组相比明显升高,而 DNCB + BVM/TAC 组 ROS 荧光水平对比 DNCB 组则显著下降(图 6A)。qRT-PCR 结果显示,BVM 显著提高 NRF2 mRNA 的表达($F=258.3$, $P<0.000\ 1$)(图 6B)。WB 结果显示,对比 DNCB 组,DNCB + BVM/TAC 组的 NLRP3($F=48.36$, $P<0.000\ 1$),GSDMD-N($F=11.44$, $P<0.01$),Caspase-1($F=33.65$, $P<0.000\ 1$),IL-18($F=17.45$, $P<0.001$)和 IL-1β($F=22.08$, $P<0.001$)蛋白水平明显下降,NRF2($F=37.51$, $P<0.000\ 1$)、HO-1($F=71.49$, $P<0.000\ 1$)、NQO1($F=28.50$, $P<0.000\ 1$)蛋白水平明显上升(图 6C-E)。IHC 检测结果与 WB 结果一致(图 6 F)。以上结果表明,BVM 可通过增强 NRF2 表达,降低 ROS 水平,抑制焦亡而改善 AD(图 7)。

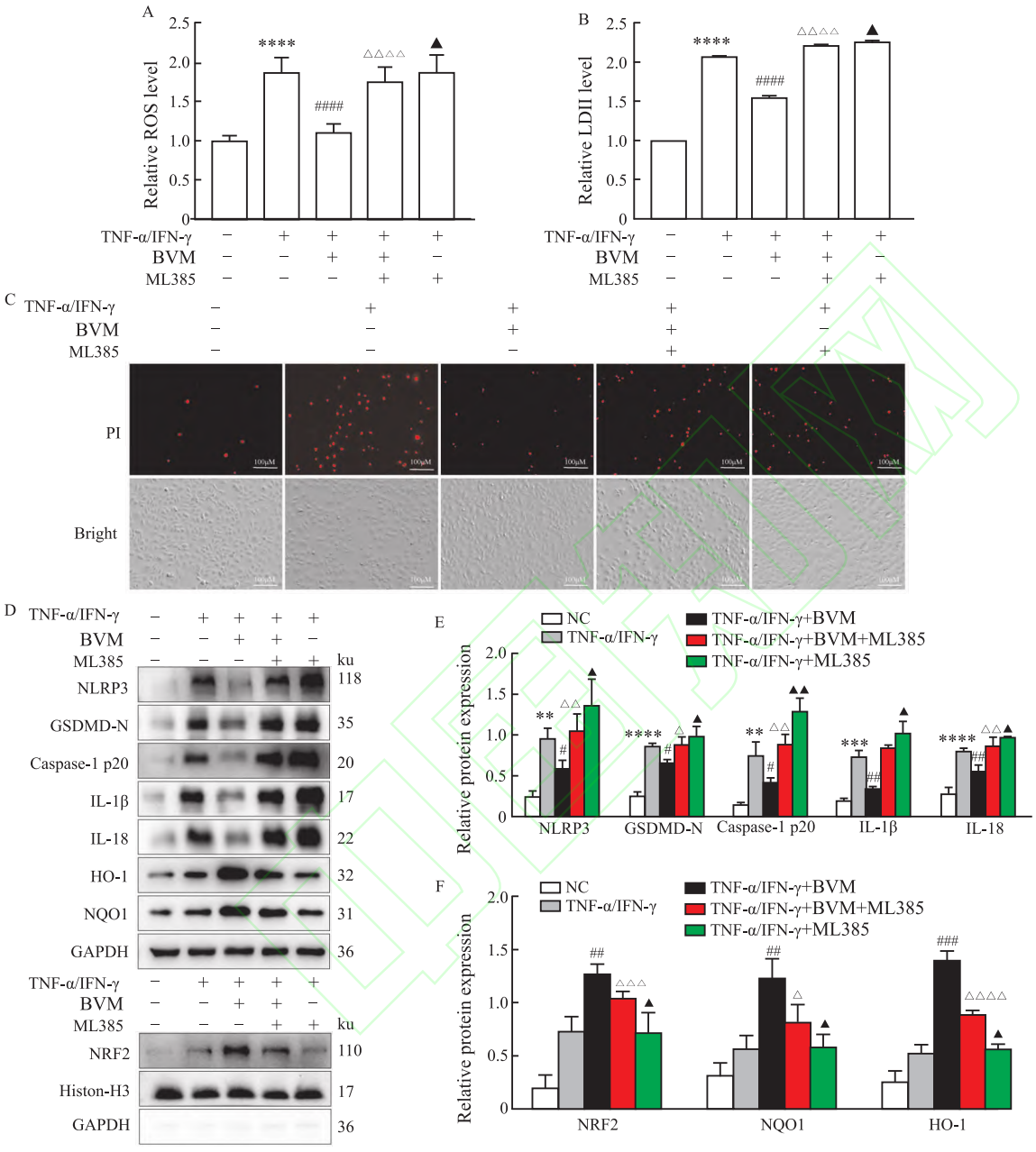

图 3 BVM 通过激活 NRF2 通路抑制 TNF-α 和 IFN-γ 诱导的焦亡

Fig. 3 Benvitimod inhibited TNF-α/IFN-γ-induced pyroptosis *via* NRF2 activation

A: ROS Assay Kit was used to detect the level of ROS in cells in each group; B: Lactate dehydrogenase cytotoxicity detection kit was used detect LDH levels in cells in each group; C: PI staining ×100; D, E, F: WB analysis was used to measure the expression levels of NLRP3, GSDMD-N, Caspase-1 p20, IL-18, IL-1β and NRF2, HO-1, NQO1 proteins in each group; $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$ *vs* NC group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#\#}P<0.0001$ *vs* TNF-α/IFN-γ group; $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$, $^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$, $^{\triangle\triangle\triangle\triangle}P<0.0001$ *vs* TNF-α/IFN-γ BVM group; $^{\blacktriangle}P<0.05$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$ *vs* TNF-α/IFN-γ+BVM+ML385 group.

3 讨论

AD 的发病机制涉及各种病理因素，NLRP3 炎性小体的激活可能是其发展的关键触发因素[7]。焦亡会加重 AD 等炎症性皮肤病[8]。在 AD 患者皮损中检测出焦亡相关蛋白水平的升高[9]。本研究中，BVM 可以通过激活 NRF2/ROS/NLRP3 调节轴，显著减少 AD 细胞模型与动物模型中焦亡相关蛋白的产生。

在 AD 患者中，氧化应激是评估皮肤炎症中重要指标。过量 ROS 会诱发高氧化应激，加重 AD 患者皮肤中的氧化损伤和膜脂质过氧化，导致细胞死

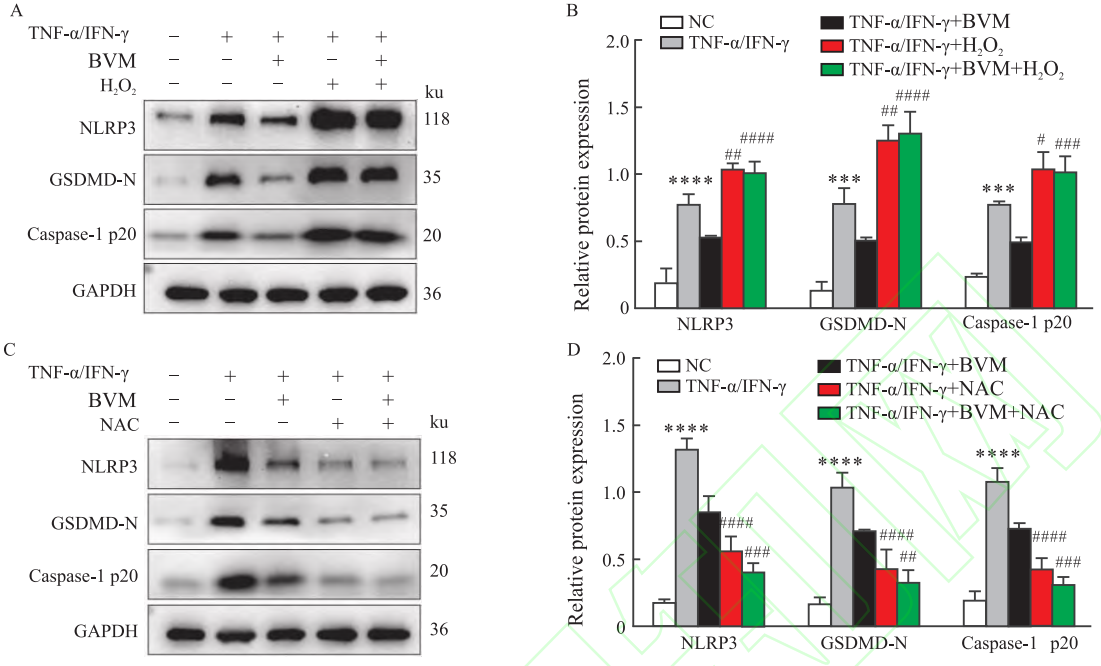

图 4　BVM 对焦亡的抑制受 ROS 水平的调控

Fig. 4　The inhibition of pyroptosis by BVM was regulated by ROS levels

A, B: After the addition of H_2O_2, the expression levels of NLRP3, GSDMD-N, and caspase-1 p20 protein were analyzed by WB; C, D: After the addition of NAC, the expression levels of NLRP3, GSDMD-N, and caspase-1 p20 protein were analyzed by WB; $^{****}P<0.001$, $^{*****}P<0.000\ 1$ *vs* NC group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$ *vs* TNF-α/IFN-γ + BVM group.

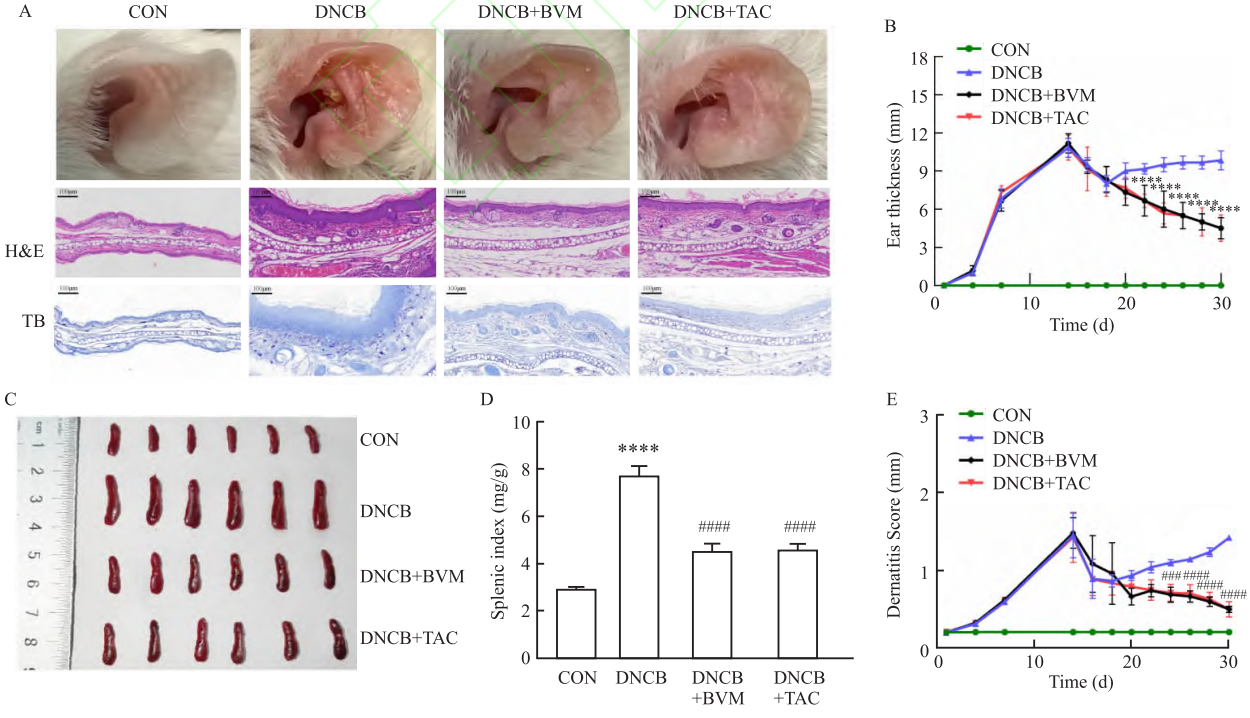

图 5　BVM 改善特应性皮炎小鼠症状

Fig. 5　Benvitimod improved symptoms in atopic dermatitis mice

A: Morphological and histological changes in mice in each group, HE staining ×20, TB staining ×20; B: Ear tissue thickness; C: Spleen size; D: Spleen index; E: Dermatitis score; $^{*****}P<0.001$ *vs* CON group; $^{*\#\#}P<0.001$ *vs* DNCB group.

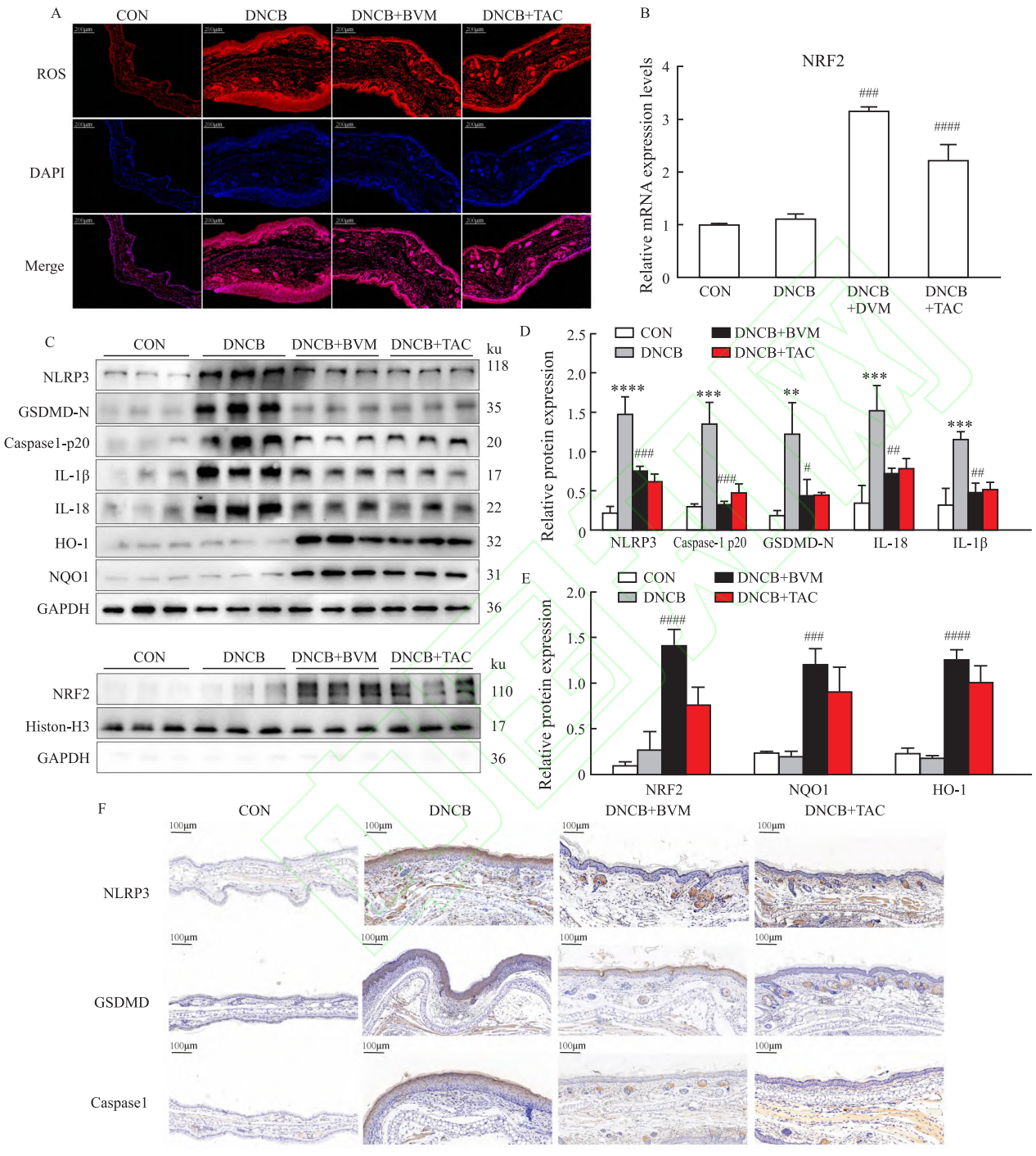

图 6　BVM 改善特应性皮炎小鼠 ROS 水平及焦亡程度

Fig. 6　BVM improved the ROS levels and pyroptosis in atopic dermatitis mice

A: ROS fluorescence staining of mouse ear tissues ×10; B: mRNA expression level of NRF2 in mouse ear tissues of each group; C, D, E: WB analysis was used to measure the expression levels NLRP3, GSDMD-N, Caspase-1 p20, IL-18, IL-1β and NRF2, HO-1, NQO1 protein expression levels in each group; F: IHC detection of NLRP3, GSDMD, Caspase-1 expression levels in mouse ear tissues ×20; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.000\ 1$ *vs* CON group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, $^{\#\#\#\#}P<0.000\ 1$ *vs* DNCB group.

亡,从而加重 AD[10]。ROS 的产生是 NLRP3 炎症小体激活的常见上游机制,抑制细胞中 ROS 水平可以抑制 NLRP3 炎症小体的激活[11]。

三期临床实验[12]显示 BVM 能有效治疗 AD。BVM 可激活 NRF2 抑制 ROS 水平,但对于焦亡的影响并无研究。本研究显示,BVM 的治疗减轻了 AD 小鼠的皮炎症状和组织病理学损伤,BVM 可通过抑制焦亡通路治疗 AD。通过 DNCB 诱导小鼠,TNF-α

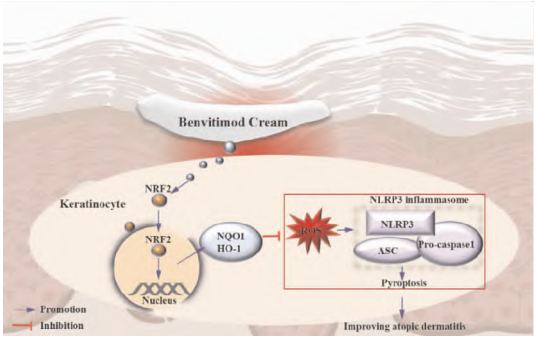

图 7 BVM 调控 NRF2/ROS/NLRP3 通路减轻特应性皮炎机制图

Fig. 7 The schematic drawing of the mechanisms of Beenvitimod attenuating atopic dermatitis by modulating the NRF2/ROS/NLRP3 pathway (Created with bioRender. com, with permission)

和 IFN-γ 诱导 HaCaT 细胞,建立 AD 小鼠模型和细胞模型,再使用 BVM 治疗。本实验再现了 AD 小鼠皮肤典型的病理变化,并且有效降低了细胞以及 AD 模型小鼠的焦亡程度。

BVM 能激活 NRF2 抗氧化信号通路,该通路在细胞对 ROS 和亲电应激的防御中起重要作用[13]。在 TNF-α 和 IFN-γ 诱导的 HaCaT 炎症细胞中,BVM 通过上调 NRF2 抗氧化应激通路,减少 ROS 的产生来抑制 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 的激活及 IL-1β、IL-18 炎症因子的释放。ROS 激活剂 H_2O_2 增强 ROS 对 NLRP3 炎性小体的促进作用,ROS 抑制剂 NAC 则逆转此作用,这表明 ROS 对 NLRP3 炎症小体的激活有直接作用。动物实验中,BVM 减轻 DNCB 诱导的 AD 模型小鼠的皮炎症状,抑制小鼠体内 ROS 及焦亡相关蛋白的产生。此外,BVM 减少脾脏指数提示其可能系统性地抑制 Th2 细胞活化,但本研究未检测 Th2 相关细胞因子(如 IL-4、IL-13),需后续实验补充。以上观察结果支持了 BVM 能通过调节 NRF2/ROS/NLRP3 轴减少 AD 中的炎症损伤和焦亡的结论。此研究为抑制焦亡途径可治疗 AD 这一结论提供了进一步的支持。

本研究有一定的局限性。一是研究范围仅限于焦亡经典途径在 AD 中的作用,并且未检测焦亡特征性事件(如细胞膜孔形成或 ATP 释放);二是需通过 NRF2 基因敲除动物模型或 ChIP 实验验证其直接靶点。

综上所述,BVM 通过上调 NRF2 的表达激活抗氧化应激通路,减少 ROS 的产生,有效抑制 AD 中的焦亡程度,从而起到治疗 AD 的作用,揭示了 BVM 可通过 NRF2/ROS/NLRP3 轴减轻 AD 中的炎症损伤和焦亡。

参考文献

[1] Lu Y, Sun Y, Peng Y, et al. Inhibition of gasdermin D (GSDMD) as a promising therapeutic approach for atopic dermatitis[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 124(Pt B): 110958. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110958.

[2] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(3): 143-57. doi:10.1038/s41577-019-0228-2.

[3] Dominic A, Le N T, Takahashi M. Loop between NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species[J]. Antioxid Redox Signal, 2022, 36(10-12): 784-96. doi:10.1089/ars.2020.8257.

[4] Lu Y, Sun Y, Peng Y, et al. Inhibition of gasdermin D (GSDMD) as a promising therapeutic approach for atopic dermatitis[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 124(Pt B): 110958. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110958.

[5] Smith S H, Jayawickreme C, Rickard D J, et al. Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans[J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(10): 2110-9. doi: 10.1016/j.jid.2017.05.004.

[6] Han J, Cai X, Qin S, et al. TMEM232 promotes the inflammatory response in atopic dermatitis *via* the nuclear factor-κB and signal transducer and activator of transcription 3 signalling pathways[J]. Br J Dermatol, 2023, 189(2): 195-209. doi:10.1093/bjd/ljad078.

[7] Douglas T, Champagne C, Morizot A, et al. The inflammatory caspases-1 and-11 mediate the pathogenesis of dermatitis in sharpin-deficient mice[J]. J Immunol, 2015, 195(5): 2365-73. doi:10.4049/jimmunol.1500542.

[8] Tang L, Zhou F. Inflammasomes in common immune-related skin diseases[J]. Front Immunol, 2020, 11: 882. doi:10.3389/fimmu.2020.00882.

[9] Zheng J, Yao L, Zhou Y, et al. A novel function of NLRP3 independent of inflammasome as a key transcription factor of IL-33 in epithelial cells of atopic dermatitis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 871. doi:10.1038/s41419-021-04159-9.

[10] Qiu L, Ouyang C, Zhang W, et al. Zn-MOF hydrogel: regulation of ROS-mediated inflammatory microenvironment for treatment of atopic dermatitis[J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 163. doi:10.1186/s12951-023-01924-0.

[11] Tao W, Hu Y, Chen Z, et al. Magnolol attenuates depressive-like behaviors by polarizing microglia towards the M2 phenotype through the regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153692. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153692.

[12] Wang X, Mao D, Jia J, et al. Benvitimod inhibits IL-4- and IL-13-induced tight junction impairment by activating AHR/ARNT pathway and inhibiting STAT6 phosphorylation in human keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2024, 144(3): 509-19.e7. doi: 10.1016/j.jid.2023.07.027.

[13] Park H B, Goddard T N, Oh J, et al. Bacterial autoimmune drug metabolism transforms an immunomodulator into structurally and functionally divergent antibiotics[J]. Angew Chem Int Ed, 2020, 59(20): 7871-80. doi:10.1002/anie.201916204.

(下转第 1505 页)

ured by CBA method. Hematoxylin and eosin (HE) staining was employed to examine pathological alterations in the spleen. The expression of PU.1 and IL-9 in spleen tissue was detected using immunohistochemistry. Additionally, the expression level of PU.1 protein in the spleen tissue was ascertained through Western blot analysis. ***Results*** The administration of DB2313 significantly ameliorated spleen lesions in MRL/lpr mice and decreased the levels of anti-ds-DNA, ANA, TNF-α, IL-6, and IFN-γ. It also reduced the proportion of total T cells, TFH cells, Th17 cells, and Th9 cells in the mouse spleen, while increasing the proportion of Treg cells. Furthermore, it lowered the level of PU.1 protein in the spleen. Immunohistochemistry results demonstrated that DB2313 treatment significantly diminished the expression of PU.1 and IL-9 in spleen tissue. ***Conclusion*** The PU.1 inhibitor DB2313 can improve spleen lesions in MRL/lpr mice and slow the progression of the disease, and its mechanism is related to the regulation of immune cell functions.

Key words systemic lupus erythematosus; PU.1 inhibitor; TACI-Ig; PU.1; MRL/lpr mice; immune function

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2020ZD15)

Corresponding authors Wei Wei, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn; Yan Shangxue, E-mail: yan-shx@163.com

---

(上接第 1497 页)

Benvitimod attenuates atopic dermatitis by regulating the NRF2/ROS/NLRP3 signaling pathway

Lu Yun[1,2], Dong Liping[1,2], Huang Maoxin[1,2], Wang Yu[1,2], Deng Tingyue[1,2], Xiao Fengli[1,2,3]

([1]*Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei* 230032; [2]*Institute of Dermatology, Key Laboratory of Dermatology, Anhui Medical University, Ministry of Education, Hefei* 230032; [3]*Inflammation and Immune Mediated Diseases Laboratory of Anhui Province, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To investigate the mechanism of action of benvitimod (BVM) in the treatment of atopic dermatitis (AD). ***Methods*** HaCaT cells were stimulated by TNF-α and IFN-γ, and the cells were grouped into control group, TNF-α/IFN-γ group, TNF-α/IFN-γ BVM group, and TNF-α/IFN-γ BVM ML385 group. The AD model of DNCB-induced Balb/c mice was divided into control group, DNCB group, DNCB + BVM group, and DNCB + TAC group. The efficacy of BVM and its roles in antioxidant and pyroptosis regulation were evaluated. ***Results*** Compared with the control group, BVM inhibited the inflammatory response of HaCaT cells stimulated by TNF-α and IFN-γ, and ameliorated the skin lesions and inflammation in the DNCB-induced AD mouse model; at the same time, it significantly increased the expression of nuclearfactorerythroid-2-relatedfactor2 (NRF2)-related anti-oxidative stress proteins, and significantly reduced the expression of cellular reactive oxygen species (ROS) levels and pyroptosis proteins. At the same time, the levels of NRF2-related anti-oxidative stress proteins significantly increased, and the levels of ROS and pyroptosis proteins significantly decreased. ***Conclusion*** BVM activates the NRF2/ROS/NLRP3 pathway to inhibit pyroptosis, thereby reducing the inflammatory response in AD.

Key words benvitimod; atopic dermatitis; pyroptosis; NLRP3; NRF2; ROS

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82373481); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053302)

Corresponding author Xiao Fengli, E-mail: xiaofengli@126.com