

网络出版时间:2023-04-21 11:33:50 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230420.1339.006.html

# 克立硼罗软膏调节角质形成细胞异常活化缓解小鼠银屑病作用

桂雨晴<sup>1</sup>,唐彩红<sup>1</sup>,陈镜宇<sup>1</sup>,姜玲<sup>1,2</sup>,魏伟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 明确克立硼罗软膏(Cri)外用对咪喹莫特(IMQ)诱导小鼠银屑病的治疗作用与机制。方法 用Balb/c小鼠建立IMQ小鼠银屑病模型,分为Cri(7.5、15、30 mg/cm<sup>2</sup>)组、卤米松(15 mg/cm<sup>2</sup>)组、模型组及正常组。对小鼠皮损进行银屑病面积和严重程度指数(PASI)评分,HE染色观察表皮病理变化;免疫组化测定皮损处角蛋白的表达;检测皮损处皮肤环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)、磷酸化-cAMP反应元件结合蛋白(p-CREB)水平。结果 与模型组相比,Cri组小鼠皮肤鳞屑、红斑和增厚减轻,PASI评分降低,皮损处增殖角蛋白(K)6、K16、K17表达水平降低( $F=12.62, 19.41, 28.39, P<0.01$ ),而分化角蛋白K1、K10表达水平增加( $F=27.95, 9.64, P<0.01$ )。Cri能提升小鼠皮损处皮肤中cAMP、PKA水平,增加p-CREB的表达。结论 Cri可能通过调节角质形成细胞异常增殖和分化发挥对IMQ诱导的小鼠银屑病的治疗作用。

**关键词** 银屑病;克立硼罗;增殖;分化;角质细胞;PKA;CREB

**中图分类号** R 967

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0735-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.006

克立硼罗(crisaborole, Cri)是磷酸二酯酶4(phosphodiesterases 4, PDE4)抑制剂,通过抑制PDE4活性,增加细胞内环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的含量,发挥抗炎免疫作用。Cri软膏能显著减轻特应性皮炎的瘙痒反应,用于治疗3个月以上儿童和成人的轻度或中度特应性皮炎<sup>[1]</sup>,也有报道<sup>[2]</sup>Cri对银屑病有效,但机制不清楚。银屑病是一种慢性炎症增殖性皮肤病,角质形成细胞的异常增殖分化是其重要特点。角质形成细胞的异常分化引起银屑病斑块脱落,同时参与皮

损区T细胞活化,起着放大皮损区免疫异常作用<sup>[3]</sup>。体外研究<sup>[4]</sup>表明Cri体外可以降低人表皮角质形成细胞促炎介质肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\alpha$ 和趋化因子8的表达,提示角质形成细胞可能是Cri的靶细胞,而Cri软膏是否通过调节角质形成细胞功能发挥对银屑病的治疗作用仍不清楚。该研究利用银屑病小鼠模型,从角质形成细胞的角度探讨Cri治疗银屑病的作用机制,为开发Cri新的适应证提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** Balb/c小鼠,48只,雌性,7~8周龄,购于北京斯贝福生物科技有限公司[生产许可证:SCXK(京)2019-0010],饲养在安徽医科大学临床药理研究所的SPF动物研究室。所进行的动物实验,都经过安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会认可(动物伦理批号:PZ-2022-001)。本实验中所涉及的技术,都遵循动物实验的有关准则和规范。

**1.2 药物与试剂** 角蛋白(keratin, K)1一抗、K10一抗(美国Proteintech公司,批号:00045116、14t1484);K6一抗、K16一抗、GAPDH一抗(英国Affinity公司,批号:00059940、39d4400、62u0922);K17一抗、磷酸化-cAMP反应元件结合蛋白(phospho-cAMP response element binding protein, p-CREB)一抗(美国Cell Signaling公司,批号:4543T、9189S);ECL化学发光试剂(美国赛默飞公司,批号:TG269475);EDTA抗原修复液(pH 9.0)、免疫组化通用型试剂盒(北京中杉金桥公司,批号:19042401、2010D1217);咪喹莫特(imiquimod, IMQ)乳膏(四川明欣药业有限责任公司,批号:19070240);Cri软膏(美国辉瑞公司,批号:8119272);卤米松(香港澳美制药公司,批号:0101390227);凡士林乳膏(天津市博迪化工有限公司,批号:11021);脱毛膏(植物医生温和套装,北京明弘科贸有限责任公司,批号:ACG0800604)。

**1.3 仪器** 酶标仪(型号:Infinite M1000 PRO,瑞

2023-02-15 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2019A0263)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032

<sup>2</sup>中国科学技术大学附属第一医院,合肥 230001

作者简介:桂雨晴,女,硕士研究生;

姜玲,女,主任药师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ahslyyjl@126.com;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wwwei@ahmu.edu.cn

士 TECAN 公司);正置荧光显微镜(型号:DM2500,德国 Leica 公司);化学发光成像系统(型号:ImageQuant,美国 GE 公司)。

**1.4 动物分组与银屑病模型的建立** 将 48 只 Balb/c 小鼠随机分成模型组、正常组、Cri (7.5、15、30 mg/cm<sup>2</sup>) 组 (Cri 低、中、高剂量组)、卤米松 (15 mg/cm<sup>2</sup>) 组,每组 8 只,造模前 3 d 每只背部脱毛 (2 cm × 3 cm) 2 min,为防止背部毛发再生影响后续造模及评分,造模前 1 d 进行第 2 次背部脱毛。造模后第 1~3 天,正常组涂抹凡士林以外,其余各组背部皮肤涂抹 62.5 mg IMQ (5%) 乳膏每天 1 次,第 4 天开始各给药组先涂抹 62.5 mg IMQ (5%) 乳膏 1 次,待其吸收后,Cri 组涂抹相应的 Cri 剂量 (45、90、180 mg) 1 次,卤米松组涂抹卤米松 (90 mg) 1 次,连续涂抹药物 4 d,第 8 天处死小鼠。

**1.5 小鼠背部皮肤观察** 造模后第 1、3、5、7 天对小鼠拍照观察并且根据银屑病面积和严重程度指数 (psoriasis area and severity index, PASI) 对小鼠皮损处的厚度、红斑状况、银屑状况进行评分。PASI 评分标准为:0~4 分,分别对应皮损程度无、轻度、中等、严重和极重度;总分为厚度、红斑、银屑 3 项评分之和 (0~12 分),得分越高,皮损越严重<sup>[5]</sup>。

**1.6 小鼠皮肤组织病理学观察** 第 8 天处死小鼠当天,去小鼠背部皮损处皮肤,小鼠背部 1/4 的皮肤用 4% 多聚甲醛固定,其余组织放在 -80 °C 保存。2 周后石蜡切片、HE 染色,在显微镜下观看和拍照,随机对每个切片选取 3 个位置,测其角质层到基底层垂直距离,并对其进行统计分析。

**1.7 免疫组化检测小鼠皮肤中增殖及分化蛋白的表达** 将动物皮肤进行石蜡包埋法后切片,烤片 2 h,梯度脱蜡,PBS 清洗,再加 EDTA 抗原结合修复液 20 min 后,用 PBS 清洗,再加入内源性过氧化物酶抑制剂 15 min,然后滴加一抗 (K1、K10、K6、K16、K17) 4 °C 过夜,第 2 天取出,室温放 30 min,PBS 清洗,二抗孵育,DAB 显色,用苏木精复染,梯度脱水,中性树脂封片,在显微镜下观察。

**1.8 ELISA 检测小鼠皮肤中蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、cAMP 的表达** ELISA 试剂盒检测小鼠背部皮损处皮肤中 PKA、cAMP 的表达,首先搅拌试剂使均匀,以防止形成气泡而造成误差,在各个标准品和待测样品孔都设置 2 个复孔,再确定所需要的孔数。加检测抗体孵育,洗板,加酶孵育,洗板后,加着色剂显色反应,取出酶标板,再加终止液使化学反应完全停止,并立即在 450 nm 波长处测量

各孔的吸光度值;绘制标准曲线,并算出 PKA、cAMP 的水平。

**1.9 Western blot 检测小鼠皮肤中 p-CREB 水平蛋白的表达** 配制裂解溶液,RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂=98:1:1,裂解液 4 °C 裂解 2 h,离心后,取其上清液;加入上样缓冲液煮沸。电泳,转膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,洗膜后加入 p-CREB 抗体孵育 4 °C 过夜;第 2 天洗膜后二抗孵育 2 h,洗膜、显影,并分析灰度值。

**1.10 统计学处理** 该实验数据采用 Graphpad Prism 8 分析,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠皮肤形态学观察** 正常组小鼠皮肤光洁平整。模型组小鼠第 1 天开始就出现轻度鳞屑和增厚;第 3 天出现明显的鳞屑和增厚症状;第 5 天鳞屑明显增加并覆盖大面积皮肤,增厚症状更加突出,红斑也增加;第 7 天鳞屑几乎遍布整个背部皮肤,表皮厚度也大大增加,出现明显的红斑。Cri 各剂量组和卤米松组的小鼠前几天皮损加重,但从第 5 天开始皮损处开始改善。见图 1。

**2.2 Cri 对小鼠皮肤 PASI 评分影响** 从第 1 天开始每天对实验小鼠背部拍照观察,按照 PASI 的评分标准进行评分。模型组小鼠从第 2 天开始有鳞屑、红斑、增厚的情况。模型组小鼠增厚评分在 7 d 内持续升高,见图 2A;与模型组相比,Cri 低剂量 ( $F = 10.17, P < 0.05$ ) 组、Cri 中剂量组 ( $F = 10.17, P < 0.01$ )、高剂量组 ( $F = 10.17, P < 0.01$ ) 和卤米松组 ( $F = 10.17, P < 0.01$ ) 增厚评分降低,差异有统计学意义。模型组小鼠鳞屑评分在 6 d 内不断增加,见图 2B;与模型组相比,Cri 中剂量组 ( $F = 4.43, P < 0.01$ )、高剂量组 ( $F = 4.43, P < 0.01$ ) 和卤米松组 ( $F = 4.43, P < 0.05$ ) 鳞屑评分降低,差异有统计学意义。模型组小鼠红斑评分在 6 d 内不断增加,见图 2C;与模型组相比,Cri 低剂量 ( $F = 4.63, P < 0.01$ ) 组、Cri 中剂量组 ( $F = 4.63, P < 0.01$ )、高剂量组 ( $F = 4.63, P < 0.01$ ) 和卤米松组 ( $F = 4.63, P < 0.01$ ) 红斑评分降低,差异有统计学意义。将各项评分相加后得到总分,总分在 6 d 内不断增加,见图 2D;与模型组相比,Cri 中剂量组 ( $F = 6.44, P < 0.01$ ) 和高剂量组 ( $F = 6.44, P < 0.01$ ) 总分降低,PASI 评分差异有统计学意义;Cri 各剂量组和卤米



图1 各组小鼠在第1~7天皮损变化

a: 正常组; b: 模型组; c: Cri 7.5 mg/cm<sup>2</sup> 组; d: Cri 15 mg/cm<sup>2</sup> 组; e: Cri 30 mg/cm<sup>2</sup> 组; f: 卤米松组

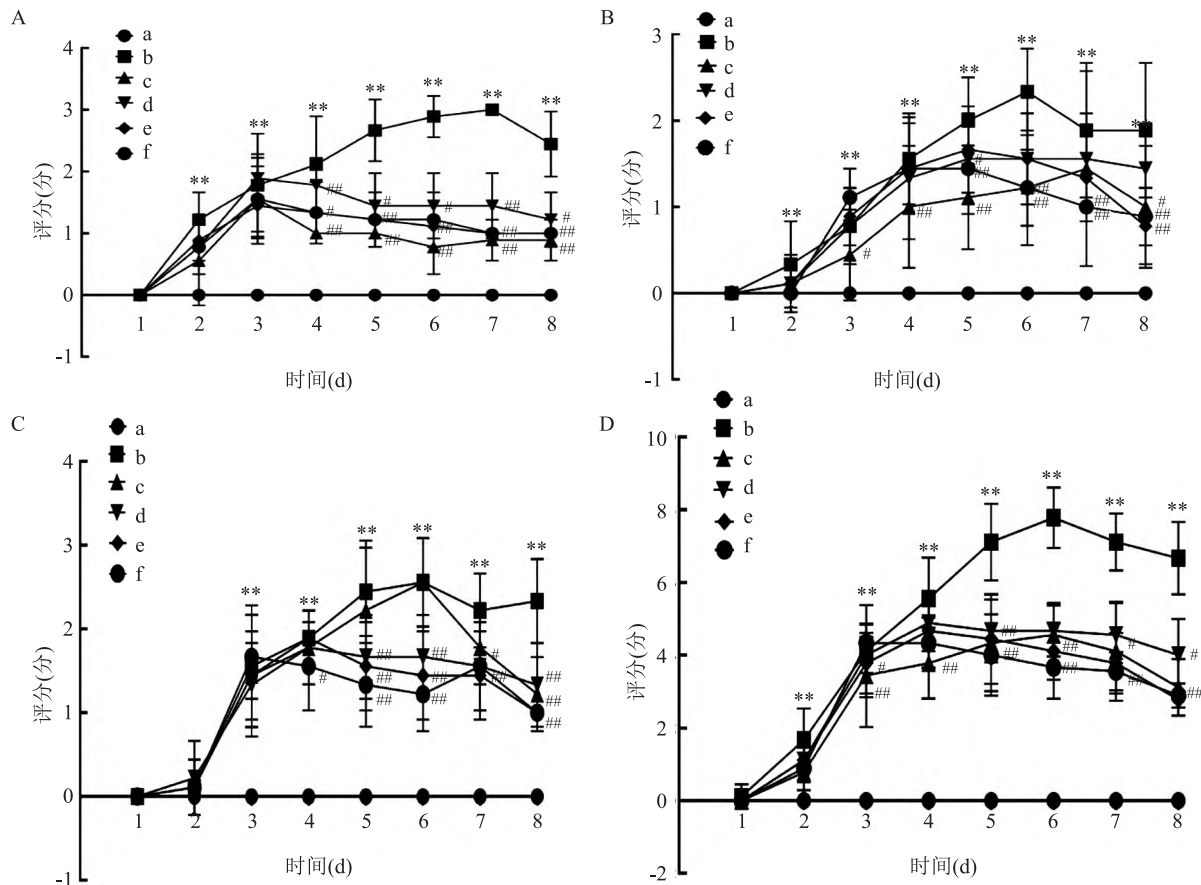
松组间 PASI 评分差异无统计学意义。以上结果表明, Cri 低、中、高剂量组和卤米松组可以不同程度地改善小鼠皮肤的红斑、鳞屑、增厚情况。

**2.3 Cri 对小鼠皮肤组织病理学和表皮厚度的影响** HE 染色后观察小鼠皮肤病理改变, 相较于正常组, 模型组小鼠表皮明显增厚、血管增生和炎症细胞浸润, 角化不全或角化过度, 颗粒层变薄, 棘层肥厚以及棘层不规则延长。上述病理变化在各给药组有不同程度改善。对病理切片随机选取的3处角质层到基底层垂直距离进行测量, 取其平均值用 Image J 软件进行统计学分析。与正常组相比, 模型组表皮厚度明显增厚, 差异有统计学意义 ( $F = 57.78, P < 0.01$ )。与模型组相比, Cri 低剂量组 ( $F = 18.64, P < 0.05$ )、中剂量组 ( $F = 18.64, P < 0.01$ )、高剂量组 ( $F = 18.64, P < 0.01$ ) 及卤米松组 ( $F = 18.64, P < 0.01$ ) 表皮厚度明显减小, 差异有统计学意义; 与 Cri 低剂量组相比, Cri 中剂量组 ( $F = 4.996, P < 0.05$ )、高剂量组 ( $F = 4.996, P < 0.05$ ) 及卤米松组 ( $F = 4.996, P < 0.05$ ) 表皮厚度明显减小, 差异有统计学意义; 与卤米松组相比, Cri 中、高剂量

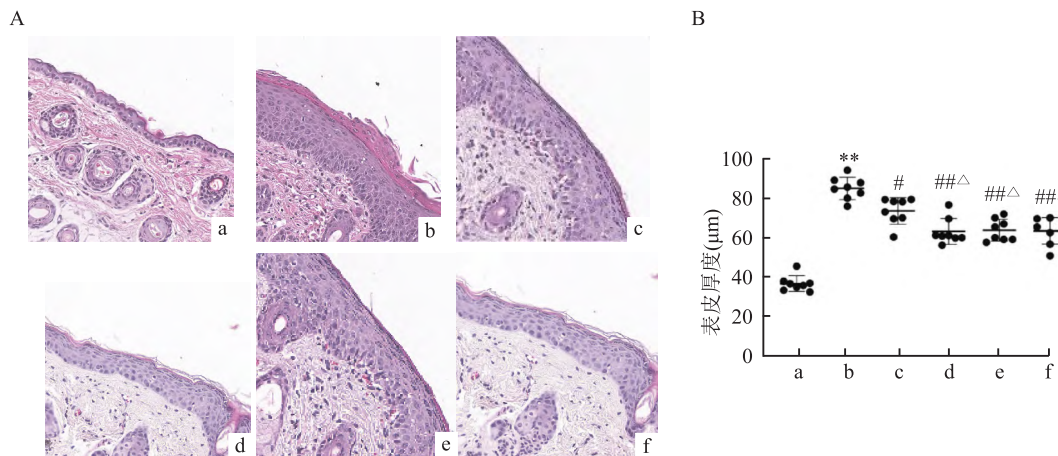
组表皮厚度差异无统计学意义。见图3。

**2.4 Cri 对小鼠皮肤组织中角质形成细胞增殖蛋白表达的影响** 免疫组化结果表明模型组小鼠在皮损部位的皮肤组织中 K6、K16、K17 蛋白表达水平高于正常组, 差异有统计学意义 ( $F = 12.62, 19.41, 28.39, P < 0.01$ )。与模型组比较, Cri 高剂量组和卤米松组 K6 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ( $F = 12.62, P < 0.01$ ); Cri 中、高剂量组和卤米松组 K16 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ( $F = 19.41, P < 0.01$ ); Cri 中、高剂量组和卤米松组 K17 蛋白表达明显降低, 差异有统计学意义 ( $F = 28.39, P < 0.01$ )。Cri 各剂量组与卤米松组比较, K6、K16、K17 的表达差异无统计学意义。以上结果提示模型组小鼠皮损处皮肤中角质形成细胞出现了过度增殖, Cri、卤米松可以缓解角质形成细胞过度增殖。见图4。

**2.5 Cri 对小鼠皮肤组织中角质形成细胞分化蛋白表达的影响** 模型组中 K10、K1 的表达水平明显低于正常组, 差异存在统计学意义 ( $F = 27.95, 9.64, P < 0.01$ ), 提示模型组小鼠皮损处皮肤中角

图2 Cri对IMQ诱导的小鼠PASI评分的影响( $n=8$ )

A:增厚;B:鳞屑;C:红斑;D:总分;a:正常组;b:模型组;c:卤米松组;d:Cri 7.5 mg/cm<sup>2</sup>组;e:Cri 15 mg/cm<sup>2</sup>组;f:Cri 30 mg/cm<sup>2</sup>组;与正常组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较:#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$

图3 Cri对IMQ诱导的小鼠皮肤病理变化和表皮厚度的影响( $n=8$ )

A:各组小鼠皮肤病理变化 HE ×200;B:各组小鼠 HE 染色下表皮厚度变化;a:正常组;b:模型组;c:Cri 7.5 mg/cm<sup>2</sup>组;d:Cri 15 mg/cm<sup>2</sup>组;e:Cri 30 mg/cm<sup>2</sup>组;f:卤米松组;与正常组比较:\*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较:#  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ;与 Cri 7.5 mg/cm<sup>2</sup>组比较:Δ  $P < 0.05$

质形成细胞出现了低分化。与模型组相比,Cri 中、高剂量组及卤米松组 K10 的表达增加,Cri 高剂量组及卤米松组 K1 的表达增加,提示中、高剂量的

Cri 以及卤米松可以促进角质形成细胞分化。Cri 各剂量组与卤米松组比较,K10、K1 的表达差异无统计学意义。见图 5。

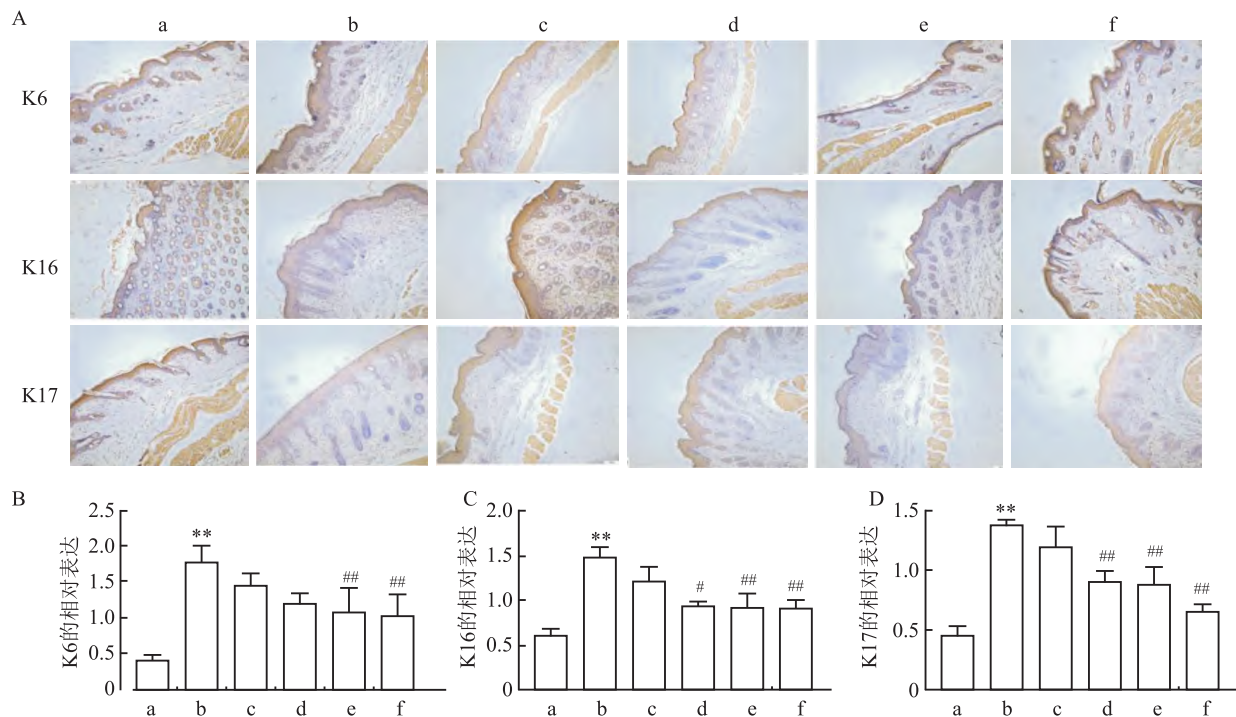


图4 Cri对IMQ诱导的小鼠皮肤组织K6、K16、K17中表达的影响( $n=3$ )

A:各组小鼠组化染色结果  $\times 20$ ; B:K6蛋白相对表达; C:K16蛋白相对表达; D:K17蛋白相对表达; a:正常组; b:模型组; c:Cri 7.5 mg/cm<sup>2</sup>组; d:Cri 15 mg/cm<sup>2</sup>组; e:Cri 30 mg/cm<sup>2</sup>组; f:卤米松组; 与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

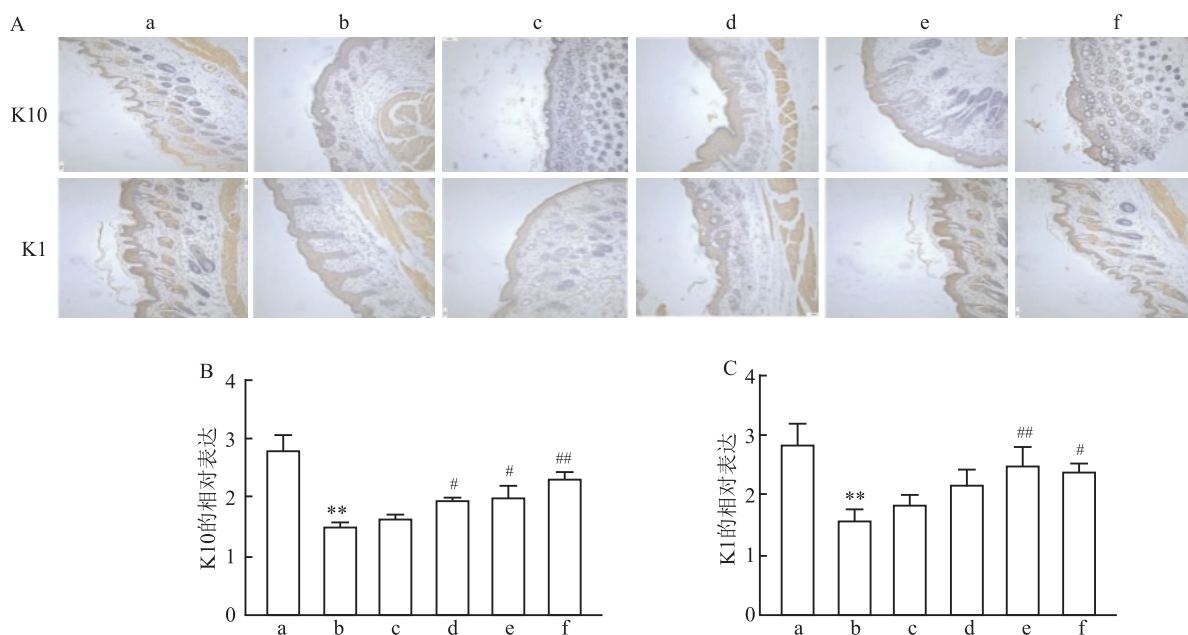


图5 Cri对IMQ诱导的小鼠皮肤组织K10、K1、中表达的影响( $n=3$ )

A:各组小鼠组化染色结果  $\times 20$ ; B:K10蛋白相对表达; C:K1蛋白相对表达; a:正常组; b:模型组; c:Cri 7.5 mg/cm<sup>2</sup>组; d:Cri 15 mg/cm<sup>2</sup>组; e:Cri 30 mg/cm<sup>2</sup>组; f:卤米松组; 与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.6 Cri对IMQ诱导的银屑病小鼠皮肤中cAMP-PKA-pCREB信号的影响** 与正常组相比,模型组小鼠皮肤中cAMP、PKA、pCREB水平下降,差异有

统计学意义( $F_{cAMP} = 41.89, P < 0.01$ ;  $F_{PKA} = 7.46, P < 0.05$ ;  $F_{pCREB} = 7.52, P < 0.05$ )。与模型组相比, Cri组cAMP、PKA、pCREB水平升高,差异有统计学

意义 ( $F_{\text{cAMP}} = 48.94, P < 0.01; F_{\text{PKA}} = 12.20, P < 0.05; F_{\text{pCREB}} = 18.13, P < 0.05$ ); 与模型组相比, 卤米松组 cAMP、PKA 水平升高, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{cAMP}} = 48.94, P < 0.01; F_{\text{PKA}} = 12.20, P < 0.05$ )。提示 Cri 缓解小鼠银屑病的的作用与促进 cAMP-PKA-pCREB 信号通路有关, 见图 6。

### 3 讨论

cAMP 是调节多种细胞功能的第二信使, 通过调节下游的信号分子, 调节机体的炎症免疫反应<sup>[6]</sup>。PDE4 通过上调 cAMP 的水平, 减少炎症介质的生成, 从而抑制银屑病的发生、发展<sup>[7]</sup>。以 PDE4 作为靶点的 PDE4 抑制剂已经被开发用于治疗银屑病等慢性炎性疾病<sup>[8]</sup>。目前已经获准用于银屑病治疗的 PDE4 抑制剂有口服阿普斯特, 能够明显缓解银屑病和银屑病性关节炎的临床表现, 但有腹泻、恶心等不良反应。外用 PDE4 抑制剂可以大大减少胃肠道不适的不良反应, 外用 Cri 软膏已经获批用于治疗特应性皮炎。有临床研究<sup>[2]</sup>报道 Cri 软膏对银屑病有效, 但作用机制不清楚。IMQ 是一种 Toll 样受体和有效的免疫激活剂, 小鼠皮肤上局部连续涂抹 IMQ 可诱导小鼠银屑病样皮炎, 模拟人银屑病的发病和全身炎症。IMQ 诱导的小鼠银屑病模型是公认的银屑病动物模型, 广泛用于银屑病的病理机制和药物药效学研究<sup>[9]</sup>。本研究利用银屑病小鼠模型, 探讨 Cri 治疗银屑病的作用, 结果发现 Cri 可以降低 IMQ 诱导银屑病小鼠 PASI 评分, 改善皮肤鳞屑、增厚、红斑、角化不全、角化过度、炎性浸润等皮肤病理状况, 提示 Cri 对 IMQ 诱导的小鼠银屑病有治疗作用。

银屑病的临床特征为角质形成细胞异常增殖和分化。角质形成细胞先天性免疫反应失调可能导致炎症失控和银屑病的发生<sup>[10]</sup>。体外研究发现 Cri

体外可以降低人表皮角质形成细胞促炎因子 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  和 CXCL8 的表达<sup>[4]</sup>, 提示角质形成细胞可能是 Cri 作用的靶细胞。角蛋白是角质形成细胞中的主要结构中间丝蛋白, 在角质形成细胞的不同分化阶段以高度特异性模式表达, 维持角质形成细胞的结构稳定性和完整性。角蛋白已被广泛用作各种上皮细胞增殖或分化阶段以及表皮疾病诊断的标志蛋白, K10、K1 是标记角质形成细胞分化的重要标记蛋白, K6、K16、K17 的表达代表了病理条件下角质形成细胞的高度活化和增殖。角蛋白表达的变化可能引起表皮角质形成细胞的不完全分化, 导致皮肤过度增生等<sup>[11]</sup>。本实验结果表明, 与正常组比较, 模型组中表皮的 K1、K10 表达明显降低, K6、K16、K17 表达明显升高, 而 Cri 给药后, K1、K10 表达明显增强, K6、K16、K17 表达则明显降低; 提示 Cri 能够抑制角质形成细胞异常增殖, 促使其正常分化, 这或许与其改善 IMQ 引起的银屑病小鼠的皮肤损伤的作用密切相关。

在炎症免疫信号影响下, G 蛋白偶联受体通过 G $\alpha$ s 活化腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC), 形成 cAMP, 并活化 cAMP-PKA 信号<sup>[12]</sup>。PKA 活化引起 CREB 的磷酸化, 从而启动基因的表达<sup>[13]</sup>。CREB 活化后还能够与 NF- $\kappa$ B 竞争性结合 CBP、p300 控制 NF- $\kappa$ B 的转录, 从而降低 NF- $\kappa$ B 相关促炎因子基因的表达水平<sup>[14]</sup>。角质形成细胞的分化和角蛋白的表达受到 cAMP-PKA-CREB 信号的调节<sup>[15]</sup>。有研究表明牛蒡子苷元可以与 PDE4D 的催化结构域结合, 通过抑制 PDE4 导致细胞内 cAMP 升高和 CREB 磷酸化, 调节角蛋白的表达。Cri 是 PDE4 的抑制剂, 通过抑制 PDE4 活性, 增加细胞内 cAMP 的含量, 发挥抗炎免疫调节作用。本研究结果表明 Cri 能提高 cAMP、PKA 水平升高, 促进 CREB 的磷酸化, 提示 Cri 治疗 IMQ 诱导的小鼠

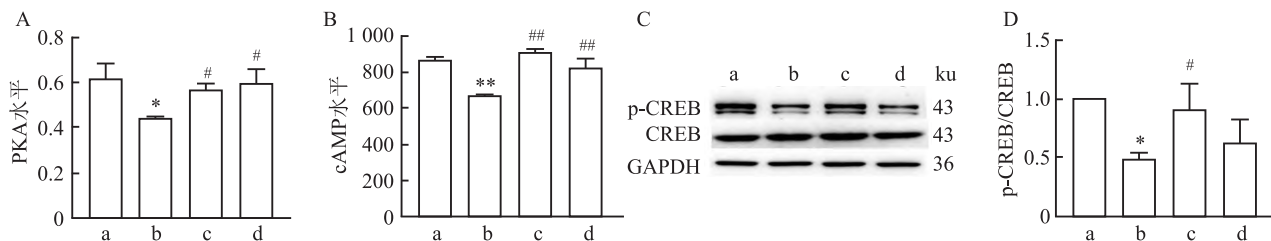


图 6 Cri 对 IMQ 诱导的小鼠皮肤组织中 cAMP-PKA-CREB 通路表达的影响 ( $n=3$ )

A: 各组小鼠 PKA 水平; B: 各组小鼠 cAMP 水平; C: pCREB/CREB 的蛋白免疫印迹实验结果; D: 各组小鼠 pCREB/CREB 的相对表达; a: 正常组; b: 模型组; c: Cri 15 mg/cm<sup>2</sup> 组; d: 卤米松 15 mg/cm<sup>2</sup> 组; 与正常组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

银屑病可能与激活 cAMP-PKA-CREB 通路有关。

### 参考文献

- [1] Paller A S, Tom W L, Lebwohl M G, et al. Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2016,75(3):494–503.
- [2] Hashim P W, Chima M, Kim H J, et al. Crisaborole 2% ointment for the treatment of intertriginous, anogenital, and facial psoriasis: a double-blind, randomized, vehicle-controlled trial[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2020,82(2):360–5.
- [3] Wu S, Zhao M, Sun Y, et al. The potential of diosgenin in treating psoriasis: studies from HaCaT keratinocytes and imiquimod-induced murine model[J]. *Life Sci*, 2020,241:117115.
- [4] Kataoka S, Takaishi M, Nakajima K, et al. Phosphodiesterase-4 inhibitors reduce the expression of proinflammatory mediators by human epidermal keratinocytes independent of intracellular cAMP elevation[J]. *J Dermatol Sci*, 2020,100(3):230–3.
- [5] Qin S, Wen J, Bai X C, et al. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids protect against imiquimod-induced psoriasis-like inflammation *via* the IL-17/IL-23 axis[J]. *Mol Med Rep*, 2014,9(6):2097–104.
- [6] Zhang H, Kong Q, Wang J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020,9(1):32.
- [7] Schafer P. Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012,83(12):1583–90.
- [8] Schafer P H, Parton A, Capone L, et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity[J]. *Cell Signal*, 2014,26(9):2016–29.
- [9] Thatikonda S, Pooladanda V, Sigalapalli D K, et al. Piperlongumine regulates epigenetic modulation and alleviates psoriasis-like skin inflammation *via* inhibition of hyperproliferation and inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(1):21.
- [10] 罗婷婷,韩陈陈,崔东倩,等. 性别对咪喹莫特诱导小鼠银屑病模型建立的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020,55(4):634–9.
- [11] Sanz-Gómez N, Freije A, Gandarillas A. Keratinocyte differentiation by flow cytometry[J]. *Methods Mol Biol*, 2020,2109:83–92.
- [12] Tavares L P, Negreiros-Lima G L, Lima K M, et al. Blame the signaling: role of cAMP for the resolution of inflammation[J]. *Pharmacol Res*, 2020,159:105030.
- [13] Barútki B L, Huber K, Sármay G, et al. Inflammatory signal induced IL-10 production of marginal zone B-cells depends on CREB[J]. *Immunol Lett*, 2019,212:14–21.
- [14] Zhou Y, Bastian I N, Long M D, et al. Activation of NF- $\kappa$ B and p300/CBP potentiates cancer chemoimmunotherapy through induction of MHC-I antigen presentation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021,118(8):e2025840118.
- [15] Li H, Zhang X, Xiang C, et al. Identification of phosphodiesterase-4 as the therapeutic target of arctigenin in alleviating psoriatic skin inflammation[J]. *J Adv Res*, 2021,33:241–51.

## Crisaborole ointment regulates abnormal activation of keratinocytes and relieves psoriasis in mice

Gui Yuqing<sup>1</sup>, Tang Caihong<sup>1</sup>, Chen Jingyu<sup>1</sup>, Jiang Ling<sup>1,2</sup>, Wei Wei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*Institute of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University, Hefei 230032;*

<sup>2</sup>*The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001)*

**Abstract Objective** To study the effect of crisaborole on imiquimod (IMQ) -induced psoriasis in mice. **Methods**

Forty eight Balb/c mice were randomly divided into crisaborole group (7.5, 15, 30 mg/cm<sup>2</sup>), halometasone group (15 mg/cm<sup>2</sup>), model group and normal group. IMQ was applied to the back of mice to establish the psoriasis model. Psoriasis area and severity index (PASI) score was calculated, pathological changes, skin epidermal thickness and inflammatory cell infiltration in the dermis were observed by HE staining. The expressions of keratin (K)1, K10, K6, K16 and K17 in skin lesions were detected by Western blot and immunohistochemistry. The levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA) and phospho-cAMP response element binding protein (p-CREB) were detected. **Results** Compared with the model group, the PASI score of the crisaborole group decreased, the expression levels of proliferative keratin (K6, K16 and K17) decreased ( $F = 12.62, 19.41, 28.39, P < 0.01$ ), and the expression levels of differentiation keratin (K1 and K10) increased ( $F = 27.95, 9.64, P < 0.01$ ). **Conclusion** Crisaborole plays a therapeutic role in IMQ-induced psoriasis in mice by regulating the abnormal proliferation and differentiation of keratinocytes.

**Key words** psoriasis; crisaborole; proliferation; differentiation; keratinocytes; PKA; CREB