

☆ XXXX ☆

电针“合谷”“曲池”调控PAR2/TRPV3通路对特应性皮炎小鼠细胞Parthanatos的影响

黄柳杨^{1,2}, 杨姝瑞¹, 唐倩¹, 陆大敏¹, 薛廷政¹, 杨文卓¹, 何千里¹, 梁凤霞^{1,2,3}, 陈瑞⁴
(¹湖北中医药大学针灸骨伤学院/针灸治未病湖北省协同创新中心, 武汉 430061; ²湖北时珍实验室, 武汉 430060; ³湖北中医药大学附属医院针灸科, 武汉 430060; ⁴华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科, 武汉 430014)

【摘要】 目的:基于蛋白酶激活受体2(PAR2)/瞬时感受器电位香草酸受体3(TRPV3)通路,观察电针“合谷”“曲池”对特应性皮炎(AD)小鼠皮肤炎性损伤、瘙痒及皮肤细胞PARP1依赖性细胞死亡(Parthanatos)的影响,探讨电针治疗AD的可能机制。方法:将36只BALB/c雄性小鼠随机分为正常组、模型组和电针组,每组12只。采用卡泊三醇(MC903)溶液涂抹法复制AD模型。造模成功后,电针组电针双侧“合谷”“曲池”(每日1次,30 min/次,连续7 d)。干预前后对各组小鼠进行特应性皮炎严重程度评分指数(SCORAD)评分及搔抓次数记录;HE染色观察皮肤组织病理形态;TUNEL染色检测皮肤组织细胞凋亡情况;Western blot法检测小鼠皮肤组织PAR2/TRPV3通路、白细胞介素(IL)-33、IL-31、IL-13、多聚ADP核糖聚合酶1(PARP1)、线粒体凋亡诱导因子1(AIFM1)、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)蛋白表达;实时荧光定量PCR法检测小鼠皮肤组织PAR2/TRPV3通路、炎症因子(IL-33、IL-31和IL-13)、细胞Parthanatos相关基因(PARP1、PAR、AIFM1和MIF)表达水平免疫荧光法检测PARP1表达。结果:与正常组相比,模型组小鼠SCORAD皮损评分升高($P<0.01$),搔抓次数增多($P<0.01$),皮肤组织细胞凋亡率升高($P<0.01$),皮肤组织中PAR2、TRPV3、炎症相关因子(IL-33、IL-31和IL-13)、Parthanatos相关因子(PARP1、AIFM1和MIF)蛋白及mRNA表达水平升高($P<0.01$, $P<0.05$),PARP1荧光强度升高($P<0.01$)。与模型组相比,电针组小鼠SCORAD皮损评分降低($P<0.01$),搔抓次数减少($P<0.01$),皮肤组织细胞凋亡率降低($P<0.01$),皮肤组织中PAR2、TRPV3、炎症相关因子(IL-33、IL-31和IL-13)、Parthanatos相关因子(PARP1、AIFM1和MIF)蛋白及mRNA表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),PARP1荧光强度下降($P<0.01$)。HE染色结果显示,模型组小鼠皮损严重,表皮增生明显并伴大量炎性细胞浸润;电针组小鼠皮肤表皮结构相对完整,结构损伤明显减轻,炎性细胞浸润较少。结论:电针“合谷”“曲池”可以改善AD小鼠皮肤炎性损伤及瘙痒,其机制可能与下调PAR2/TRPV3通路,抑制皮肤细胞Parthanatos相关。

【关键词】 电针;特应性皮炎;蛋白酶激活受体2/瞬时感受器电位香草酸受体3通路;PARP1依赖性细胞死亡

Effects of electroacupuncture at “Hegu” (LI4) and “Quchi” (LI11) on Parthanatos in atopic dermatitis mice by regulating the PAR2/TRPV3 pathway

HUANG Liu-yang^{1,2}, YANG Shu-rui¹, TANG Qian¹, LU Da-min¹, XUE Ting-zheng¹, YANG Wen-zhuo¹, HE Qian-li¹, LIANG Feng-xia^{1,2,3}, CHEN Rui⁴ (¹College of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine/ Hubei Provincial Collaborative Innovation Center of Preventive Treatment by Acupuncture and Moxibustion, Wuhan 430061, China; ²Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430060; ³Acupuncture and Moxibustion Department, Affiliated Hospital of Hubei

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250715

引用格式:黄柳杨,杨姝瑞,唐倩,等.电针“合谷”“曲池”调控PAR2/TRPV3通路对特应性皮炎小鼠细胞Parthanatos的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:湖北省自然科学基金创新发展联合基金项目(No.2024AFD272);针灸治未病湖北省协同创新中心科研项目(No.HBPCIC-2023-01)

共同通信作者:梁凤霞,E-mail:315938821@qq.com

陈瑞,E-mail:unioncr@163.com

University of Chinese Medicine, Wuhan 430060; ⁴Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effects of electroacupuncture (EA) at “Hegu” (LI4) and “Quchi” (LI11) on skin inflammatory injury, itching, and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)-dependent cell death (Parthanatos) in mice with atopic dermatitis (AD) based on the protease-activated receptor 2 (PAR2)/transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) pathway, and to explore the possible mechanism of EA in the treatment of AD. **Methods** Thirty-six male BALB/c mice were randomly divided into a normal group, a model group, and an EA group, with 12 mice in each group. The AD model was established by topical application of calcipotriol (MC903) solution. After successful modeling, the EA group received EA at bilateral LI4 and LI11 once daily, 30 min per session, for 7 consecutive days. The scoring atopic dermatitis (SCORAD) index and scratching frequency were recorded before and after intervention in each group. Histopathological morphology of skin tissue was observed by HE staining. Cell apoptosis in skin tissue was detected by TUNEL assay. The protein expressions of PAR2/TRPV3 pathway, interleukin (IL)-33, IL-31, IL-13, poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), mitochondrial apoptosis-inducing factor 1 (AIFM1), and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in skin tissue were measured by Western blot. The mRNA expression levels of PAR2/TRPV3 pathway, inflammatory factors (IL-33, IL-31, IL-13), and Parthanatos-related genes (PARP1, PAR, AIFM1, MIF) in skin tissue were detected by qRT-PCR. The expression of PARP1 was determined by immunofluorescence. **Results** Compared with the normal group, the model group showed significantly increased SCORAD score ($P<0.01$), elevated scratching frequency ($P<0.01$), higher skin cell apoptosis rate ($P<0.01$), up-regulated protein and mRNA expressions of PAR2, TRPV3, inflammatory factors (IL-33, IL-31, IL-13), and Parthanatos-related factors PARP1, AIFM1, MIF ($P<0.01$, $P<0.05$), as well as enhanced PARP1 fluorescence intensity ($P<0.01$). Compared with the model group, the EA group exhibited decreased SCORAD score ($P<0.01$), reduced scratching frequency ($P<0.01$), lower skin cell apoptosis rate ($P<0.01$), down-regulated protein and mRNA expressions of PAR2, TRPV3, inflammatory factors (IL-33, IL-31, IL-13), and Parthanatos-related factors PARP1, AIFM1, MIF ($P<0.05$, $P<0.01$), and weakened PARP1 fluorescence intensity ($P<0.01$). HE staining showed severe skin lesions, marked epidermal hyperplasia and massive inflammatory cell infiltration in the model group, whereas the EA group displayed relatively intact epidermal structure, significantly alleviated structural damage, and less inflammatory cell infiltration. **Conclusion** EA at LI4 and LI11 can alleviate skin inflammatory injury and itching in AD mice, and its mechanism may be related to down-regulating the PAR2/TRPV3 pathway and inhibiting Parthanatos in skin cells.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Atopic Dermatitis; Protease-activated receptor 2/transient receptor potential vanilloid 3 pathway; Parthanatos

特应性皮炎(AD)是一种以反复出现湿疹样皮损和剧烈瘙痒为主要特征的常见炎性皮肤病,全球约15%~20%的儿童和高达10%的成人受其影响^[1]。目前研究认为免疫异常、皮肤屏障功能障碍、菌群紊乱等是AD发病的关键因素^[2]。AD的治疗方法包括光疗、局部激素类药膏、非激素抗炎药膏和润肤剂的三联疗法,以及免疫抑制剂(如度普利尤单抗),主要调控局部症状。然而,尽管这些治疗方法在一定程度上取得了成效,但仍然存在治疗周期长、不良反应多、药物依赖性强及复发率高等问题^[3]。研究显示,针刺可以通过影响感觉神经通路及局部结缔组织^[4],调节神经递质^[5]等方面治疗AD,但其具体作用机制仍不清楚,限制了其在临床上的应用。

PARP1依赖性细胞死亡(Parthanatos)是一种由多聚ADP核糖聚合酶1(PARP1)过度激活引起

的程序性细胞死亡形式,当细胞DNA严重受损时,PARP1酶过度激活会催化产生过量的多聚ADP核糖(PAR)溢出至细胞质,使线粒体凋亡诱导因子1(AIFM1)从线粒体释放并携带巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)入核将DNA剪切成大片段,导致细胞死亡。最新研究显示,瞬时感受器电位香草酸受体3(TRPV3)的过度激活通过扰乱氧化还原平衡,激活PARP1/AIFM1/MIF轴,导致皮肤细胞Parthanatos可能是AD发病的关键机制^[6]。蛋白酶激活受体2(PAR2)作为细胞表面传感器,在炎性和特应性皮肤病中高表达,是影响表皮稳态、皮肤屏障和瘙痒感觉的重要因子^[7]。既往研究已证实,PAR2在TRPV3上游作用产生信号级联反应,参与整合皮肤细胞中的瘙痒信号传递^[8]。基于此,我们推测电针可能通过下调AD模型小鼠皮损区域细胞PAR2表达,抑制TRPV3通道激活,减少细胞Parthanatos,

从而抑制瘙痒信号的传递。本研究拟验证此猜测以为AD的临床治疗提供选穴依据和理论依据。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组

7周龄BALB/c雄性小鼠36只,体质量(20±2)g,从北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司购买,生产许可证号:SCXK(鄂)2022-0030。小鼠自由摄食与饮水,维持室内温度为(22±2)℃,相对湿度控制在40%~60%范围内,适应性喂养1周,饲养环境和营养卫生条件均达到SPF级实验动物要求。用随机数字表法将小鼠分为正常组、模型组和电针组,每组12只。本实验操作均严格按照国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》及相关动物伦理规范^[9]要求进行,由湖北中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查通过,伦理审查编号: BUCMS-58884767。

1.2 主要试剂与仪器

卡泊三醇(MC903,重庆新维创),戊巴比妥钠(美国Sigma),4%多聚甲醛组织固定液、反转录试剂盒(武汉赛维尔),苏木精、伊红染液(武汉旗赛),BCA蛋白浓度测定试剂盒(广州捷倍斯),PAR2、TRPV3、PARP1、AIFM1、MIF、白细胞介素(IL)-33、IL-31、IL-13抗体(美国Cell Signaling Technology),总RNA提取试剂(北京索莱宝),Real-time PCR扩增试剂盒(德国Qiagen),DAPI(上海碧云天)。

华佗牌一次性无菌针灸针(0.20 mm×25 mm)、SDZ-II 华佗牌电针仪(苏州医疗用品厂),组织脱水机、组织包埋机(武汉俊杰),石蜡切片机、显微镜(德国Leica),冷冻高速离心机、台式高速冷冻离心机(湖南可成),分析天平(波兰瑞多威),样品组织研磨仪(上海净信),实时荧光定量PCR仪(上海宏石),电泳仪(北京六一),PCR扩增仪(美国赛默飞),凝胶成像分析仪(北京六一),荧光显微镜(日本奥林巴斯),酶标仪(美国BIO-Tek)。

1.3 造模方法

实验前1 d使用剪毛器和脱毛膏仔细去除小鼠颈部毛发,面积约为1 cm×1 cm。将MC903溶于100%乙醇中配制MC903溶液,每天以40 μL(2 nmol)局部均匀涂抹小鼠颈部皮肤,连续给药9 d,诱导AD模型^[10]。空白组给予溶液基质刺激,时间和频率与模型组相同。第9天造模完成后24 h内拍摄小鼠颈部皮损照片。经MC903溶液刺激后小

鼠颈部皮肤出现红斑、部分糜烂、水肿、结痂、搔抓次数增多,即为造模成功^[11]。

1.4 各组处理方法

实验第10天继续给予模型组和电针组小鼠MC903干预直至实验结束。造模成功后,电针组选取小鼠“合谷”“曲池”,提前将穴位周围鼠毛剃短,充分暴露穴位所在区域,便于观察进针情况。穴位定位依据《实验动物常用穴位名称与定位 第3部分:小鼠》^[12],参照人体经穴定位取“合谷”“曲池”。于每日早晨9点固定时间,将各组小鼠固定于特定固定台上,电针组小鼠乙醇棉球局部消毒,然后选用毫针刺。电子针疗仪连接电极线,正极连接曲池,负极连接合谷,疏密波,频率100 Hz,电流强度为1 mA,以穴位出现局部颤动为佳,1次/d,30 min/次,连续治疗7 d。正常组和模型组在同一时间进行抓取和捆绑,但不进行电针干预。

1.5 观察指标及检测方法

小鼠抓挠次数观察:先将所有小鼠依次放入具有透明盖的树脂玻璃记录场所中,连续适应3 d,每次30 min。在造模后及干预结束后,对每只小鼠录像30 min,在录像过程中,实验者离开实验房间并保持实验房间安静。回播录像,由两名不知分组情况的实验者统计抓痒次数。当小鼠后肢直接抓颈部造模区时界定为在抓痒,当小鼠回撤咬/舔脚趾或将后肢放在地板上时记为一次抓挠行为。

取材:干预结束后,各组小鼠禁食不禁水12 h,在拍照和抓挠检测结束后腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后处死。剪取部分颈部皮损皮肤组织置于-80℃冰箱冻存。剩余置于多聚甲醛中固定。

小鼠皮损评分:在造模结束(第9天)及针刺干预结束后(第16天),根据特异性皮炎严重程度评分指数(SCORAD)评估各组小鼠的5种典型症状严重程度:红斑、水肿/出血、渗血/结痂、表皮脱落和苔藓化。每种症状按0(无)、1(轻度)、2(中度)或3(严重)的等级进行评分,评分之和为皮损严重程度评分(0~15分)^[13]。

HE染色检测小鼠皮肤组织病理变化:取小鼠颈部皮损部位皮肤组织,用4%多聚甲醛固定,之后经梯度乙醇脱水、常规包埋和切片(厚度约5 μm),制备小鼠AD组织病理切片。经HE染色,封片,观察AD小鼠皮肤组织的病理变化。

TUNEL染色检测皮肤组织细胞凋亡:取每组6只小鼠切片常规脱蜡至水,按照TUNEL染色试剂盒说明书染色,水溶性封片剂封片,在荧光显微

镜下观察发光情况并拍照。凋亡细胞核为绿色荧光, DAPI 染色细胞核呈蓝色荧光。细胞凋亡率(%)=TUNEL 阳性细胞÷DAPI 阳性细胞×100%。

Western blot 法检测小鼠皮肤组织 PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31、IL-13、PARP1、AIFM1 和 MIF 蛋白表达:收集各组 3 只小鼠颈部皮损组织,严格按照蛋白提取试剂盒说明书步骤操作,提取皮肤组织总蛋白。上样后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭。一抗(均 1:200)4℃孵育过夜,次日洗膜后室温下与相应二抗孵育 21 h,再次洗膜 3 次。加入 ECL 显色,利用 Image J 进行条带灰度值的计算,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

实时荧光定量 PCR 法检测小鼠皮肤组织 PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31、IL-13、PARP1、AIFM1 和 MIF mRNA 表达:取-80℃冰箱中保存的每组 3 只小鼠皮肤组织约 50 mg,研磨,Trizol 法提取 RNA,反转录合成对应 cDNA 并进行扩增。反应条件为:预变性 95℃ 30 s;变性 95℃ 10 s,退火 60℃ 30 s,共 40 个循环;延伸 95℃ 15 s、60℃ 60 s、95℃ 15 s。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

免疫荧光染色法检测皮肤组织中 PARP1 水平:取每组 3 只小鼠切片经 60℃烘烤、二甲苯及梯度乙醇脱蜡后,进行柠檬酸盐抗原热修复。冷却后用 PBS 清洗,以 5% 牛血清室温封闭 1 h,降低非特异性背景。随后滴加适当稀释的 PARP1 一抗(1:1 000),于 4℃湿盒中孵育过夜。次日,PBS 充分洗涤未结合一抗,加入对应种属的荧光标记二抗(1:10 000),室温避光孵育 1 h。再次洗涤后,使用 DAPI 对细胞核进行复染。最后,用抗荧光淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.6 统计学方法

数据分析使用 SPSS26.0 软件,计量资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布,所有数值均用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析。若方差齐,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;若方差不齐,则采用 Games-Howell 检验。采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行常规分析与作图。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠皮损严重程度评分和抓挠次数比较

造模结束后(第 9 天),与正常组比较,模型组小

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
PAR2	上游 TGTACGTAGCCATCCAGGCT	136
	下游 TTCTCCAGGGAGGAAGAGGA	
TRPV3	上游 ACGGTCACCAAGACCTCTC	145
	下游 GACTGTTGGGATTGGATGGGG	
IL-33	上游 TCCAACCTCAAGATTTCCCCG	120
	下游 CATGCAGTAGACATGGCAGAA	
IL-31	上游 TCAGCAGACGAATCAATACAGC	107
	下游 TCGCTCAACACTTTGACTTTCT	
IL-13	上游 CCTGGCTCTTGCTTGCTT	116
	下游 GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA	
PARP1	上游 GGCAGCCTGATGTTGAGGT	160
	下游 GCGTACTCCGCTAAAAAGTCAC	
AIFM1	上游 TCCAGAGGCCGAAACAGAG	119
	下游 CATTTTGCCCCCTGATGAACC	
MIF	上游 GCCAGAGGGGTTTCTGTCTG	118
	下游 GTTCGTGCCGCTAAAAAGTCA	

注:PAR2 为蛋白酶激活受体 2, TRPV3 为瞬时感受器电位香草酸受体 3, IL-33 为白细胞介素 33, IL-31 为白细胞介素 31, IL-13 为白细胞介素 13, PARP1 为多聚 ADP-核糖聚合酶 1, PAR 为蛋白酶激活受体, AIFM1 为线粒体凋亡诱导因子 1, MIF 为巨噬细胞迁移抑制因子。

鼠的皮损程度评分升高($P<0.01$),搔抓次数增多($P<0.01$),说明模型制作成功。治疗结束后(第 16 天),与正常组比较,模型组小鼠的皮损程度评分升高($P<0.01$),搔抓次数增多($P<0.01$);与模型组比较,电针组小鼠皮损程度评分降低($P<0.01$),搔抓次数减少($P<0.01$)。见图 1。

2.2 各组小鼠皮肤组织形态学比较

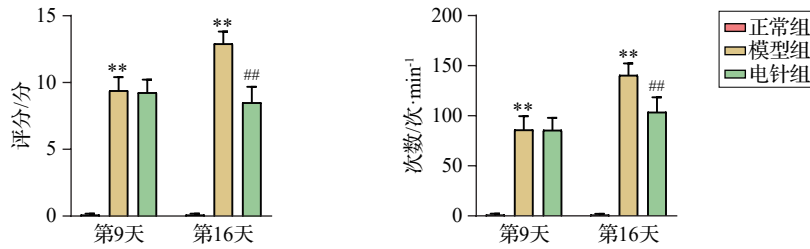
HE 染色结果显示,正常组小鼠皮肤组织厚度正常,层次清晰,结构完整,未见明显水肿或炎性细胞浸润;与正常组比较,模型组小鼠皮损严重,表皮增生明显,角化过度,内皮细胞水肿、充血、伴随大量炎性细胞浸润;电针组小鼠皮肤表皮结构完整但厚度增加,与模型组相比小鼠皮肤结构损伤明显减轻,角化程度有所降低,炎性细胞浸润明显减少。见图 2。

2.3 各组小鼠皮肤组织细胞凋亡情况比较

TUNEL 染色结果显示,与正常组相比,模型组小鼠皮损组织细胞凋亡率明显增高($P<0.01$);与模型组相比,电针组小鼠皮损组织细胞凋亡率明显降低($P<0.01$)。见图3。

2.4 各组小鼠皮肤组织PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31和IL-13蛋白表达水平的比较

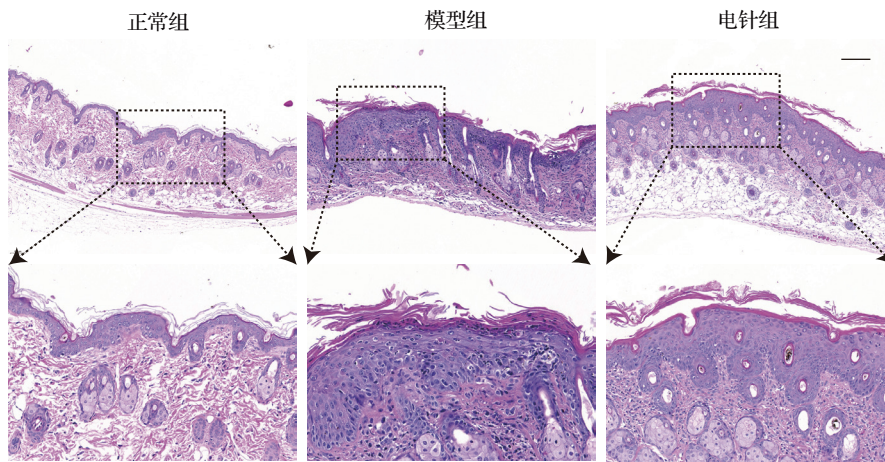
与正常组相比,模型组小鼠皮损组织中PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31和IL-13的蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,电针



注:与同时间点正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与同时间点模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图1 各组小鼠皮损评分及搔抓次数的比较($\bar{x}\pm s$, 12只鼠/组)

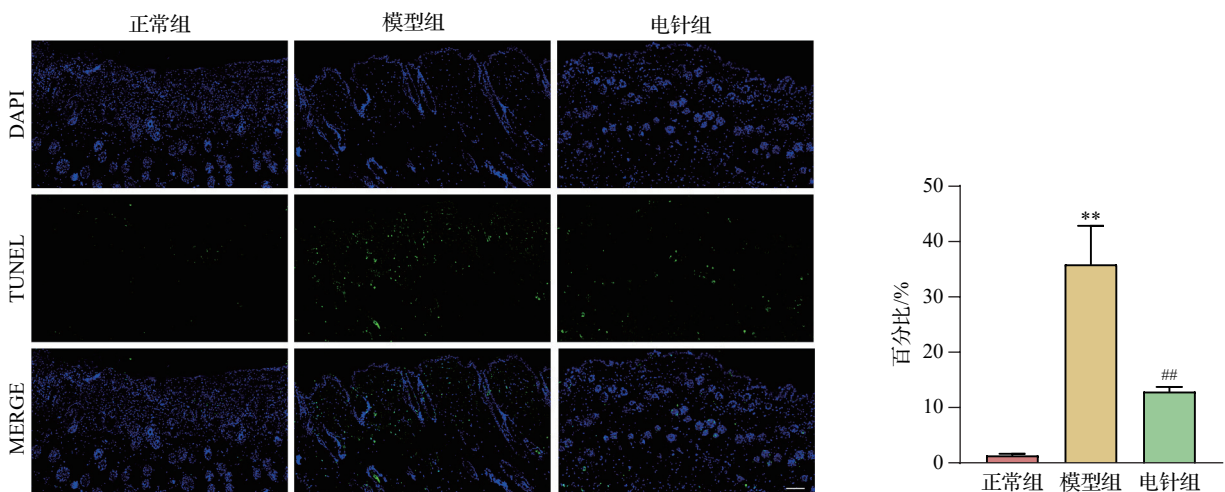
Fig. 1 Comparison of skin lesion scores and scratching frequencies of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 12 mice/group)



注:上图标尺=200 μm 。

图2 各组小鼠皮肤组织病理学结果比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of histopathological results of skin tissues of mice in the 3 groups (HE staining)



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠皮肤组织细胞凋亡比较($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of apoptotic cells in skin tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 mice/group)

组小鼠皮损组织中 PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31 和 IL-13 的蛋白表达水平降低 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 4。

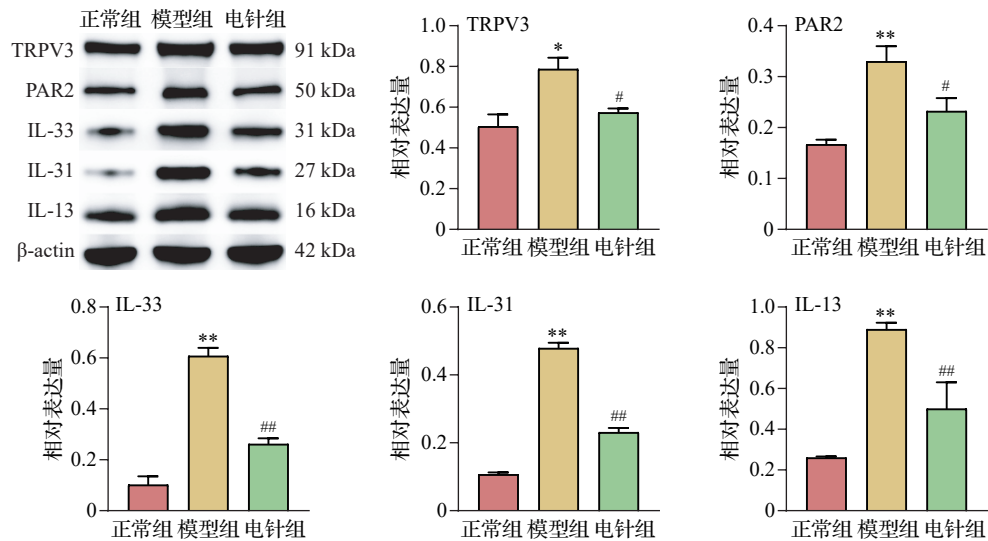
2.5 各组小鼠皮肤组织 Parthanatos 相关蛋白表达水平的比较

与正常组相比,模型组小鼠皮损组织中 PARP1、PAR、AIFM1 和 MIF 蛋白表达水平升高

($P<0.01$);与模型组比较,电针组小鼠皮损组织中 PARP1、PAR、AIFM1 和 MIF 蛋白表达水平降低 ($P<0.01, P<0.05$)。见图 5。

2.6 各组小鼠皮肤组织 PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31 和 IL-13 mRNA 表达水平比较

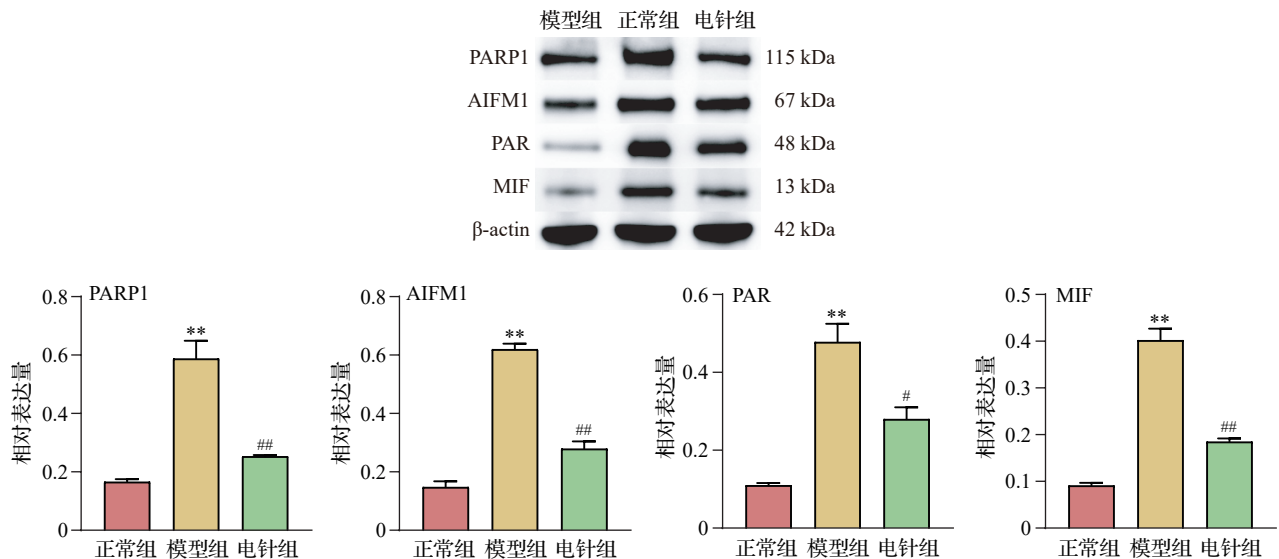
与正常组相比,模型组小鼠皮损组织中 PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31 和 IL-13 的 mRNA 表达水平升



注:TRPV3为瞬时感受器电位香草酸受体3,PAR2为蛋白酶激活受体2,IL-33为白细胞介素33,IL-31为白细胞介素31,IL-13为白细胞介素13。与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图4 各组小鼠皮肤组织中 PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31、IL-13 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, 3$ 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of protein expression levels of PAR2, TRPV3, IL-33, IL-31, and IL-13 in skin tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s, 3$ mice/group)



注:PARP1为多聚ADP-核糖聚合酶1,AIFM1为线粒体凋亡诱导因子1,PAR为蛋白酶激活受体,MIF为巨噬细胞迁移抑制因子。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图5 各组小鼠皮肤组织中 PARP1、PAR、AIFM1、MIF 蛋白表达水平比较 ($\bar{x}\pm s, 3$ 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of protein expression levels of PARP1, PAR, AIFM1, and MIF in skin tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s, 3$ mice/group)

高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,电针组小鼠皮损组织中PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31和IL-13的mRNA表达水平降低($P<0.05, P<0.01$)。见图6。

2.7 各组小鼠皮肤组织 Parthanatos 相关基因表达水平比较

与正常组相比,模型组小鼠皮损组织中PARP1、AIFM1和MIF的mRNA表达水平升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,电针组小鼠皮损组织中PARP1、AIFM1和MIF的mRNA表达水平降低($P<0.05$)。见图7。

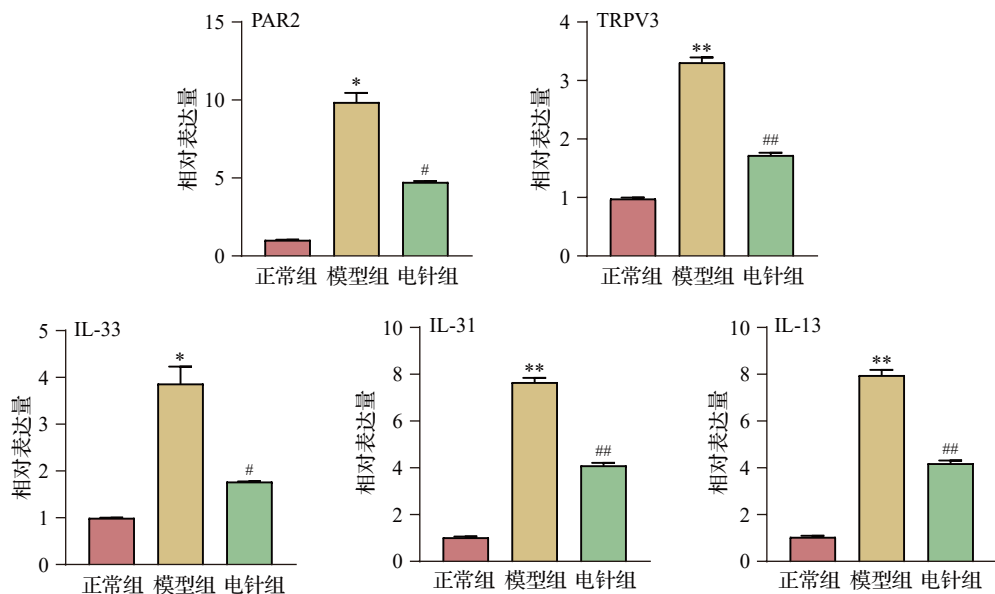
2.8 各组小鼠皮肤组织 PARP1 荧光水平比较

免疫荧光结果显示,与正常组相比,模型组小

鼠皮损组织中PARP1荧光强度显著上调($P<0.01$);与模型组相比,电针组小鼠皮损组织中PARP1荧光强度显著下降($P<0.01$)。见图8。

3 讨论

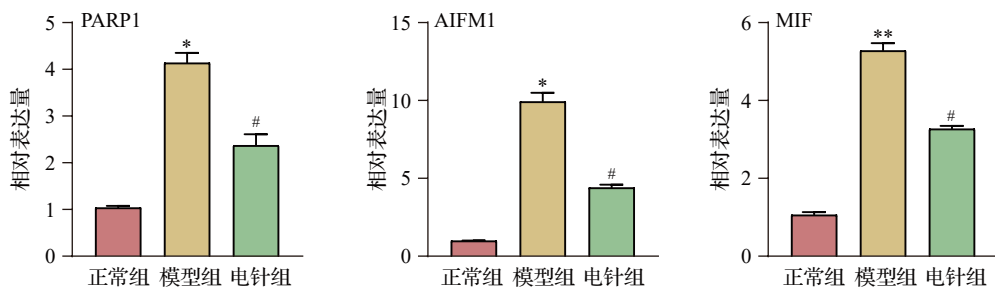
在中医学中,AD被归类为“四弯风”“湿疮”“浸淫疮”等范畴^[14],中医多认为患者因先天禀赋不耐,脾虚不足,加之外感风、湿、热诸邪,相搏于皮肤而发病,并且反复发作,缠绵不愈,久而津液营血亏虚,肌肤失养,导致脾虚血燥或血虚风燥^[15]。故本病以脾虚血虚为本,风燥为标。治宜标本兼治,以健脾养血为治本,祛风止痒为治标。针灸是我国独具特色的优势学科,是全球应用最广泛的传统医学疗



注:PAR2为蛋白酶激活受体2,TRPV3为瞬时感受器电位香草酸受体3,IL-33为白细胞介素33,IL-31为白细胞介素31,IL-13为白细胞介素13。与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图6 各组小鼠皮肤组织中PAR2、TRPV3、IL-33、IL-31、IL-13 mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s, 3$ 只鼠/组)

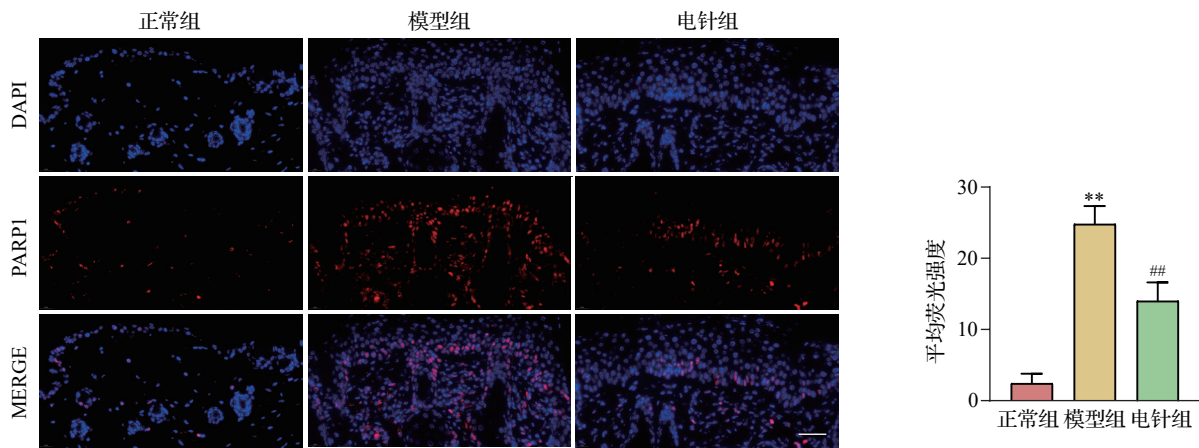
Fig. 6 Comparison of mRNA expression levels of PAR2, TRPV3, IL-33, IL-31, and IL-13 in skin tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s, 3$ mice/group)



注:PARP1为多聚ADP-核糖聚合酶1,PAR为蛋白酶激活受体,AIFM1为线粒体凋亡诱导因子1,MIF为巨噬细胞迁移抑制因子。与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图7 各组小鼠皮肤组织中PARP1、AIFM1、MIF mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s, 3$ 只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of mRNA expression levels of PARP1, AIFM1, and MIF in skin tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s, 3$ mice/group)



注:标尺=50 μm 。PARP1为多聚ADP-核糖聚合酶1。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图8 各组小鼠皮肤组织PARP1荧光强度比较($\bar{x}\pm s$,3只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of PARP1 fluorescence intensity in skin tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)

法,70多年来,针灸科学研究已在多个领域取得了重要进展,奠定了针灸学的现代科学基础,也推动了针灸的国际发展^[16]。中医理论认为“肺属卫主表,外合皮毛”,曲池为阳明经合穴,刺激曲池可以激发阳明经气血,调和营卫之气,用以解表,起到治疗皮肤疾患的作用。合谷为手阳明大肠经原穴,有疏风散表、宣通气血的作用,合谷、曲池相配以祛风止痒,共调气血。基于Apriori算法的针灸治疗AD选穴规律研究揭示,曲池是治疗AD最常用的腧穴^[17],且合谷是与曲池作为配伍频次最高的组合腧穴^[18]也是继血海后与曲池合用最常用且有效的临床治疗瘙痒穴位^[19]。有趣的是,有研究显示电针“曲池”“合谷”治疗小鼠颈部急性痒的效果优于远端的双侧足三里取穴^[20]。另有研究观察到在瘙痒部位(颈部)同节段取穴,即在“曲池”和“合谷”给予强度为1 mA,频率为100 Hz的电针治疗,可以有效缓解慢性痒行为^[21],而且效果优于异节段取穴(“血海”和“足三里”)^[22],这为我们的研究提供了选穴依据。

尽管AD是一种异质性疾病,不同年龄、不同种族患者的发病特征并不完全一致,但在所有的AD表型中,瘙痒是患者共有的症状。研究显示,在AD中慢性瘙痒的患病率为87%~100%^[23],患者通常由于长期慢性瘙痒,形成搔抓-瘙痒恶性循环,引起严重睡眠和认知障碍,同时导致焦虑、抑郁等负面情绪,严重影响患者的生活质量^[24]。一项基于循证医学的系统评价对针灸治疗AD瘙痒的临床研究进行了综合分析,结果显示相比安慰剂针刺组和等待治疗组,针灸可有效缓解AD患者的瘙痒症状^[25]。针刺治疗AD瘙痒的可能机制也在逐渐被研究揭示。研究证实,电针通过释放强啡肽减轻注射辣椒素诱

导的大鼠AD样皮损和瘙痒症状^[26]。予以4-二硝基氯苯(DNCB)诱发的AD样模型小鼠电针则可能通过提高脊髓中强啡肽的含量、抑制P物质(SP)水平而减轻瘙痒^[4]。另有研究显示,针灸还可通过阻断5-HT(2)和受体显著改善AD皮肤炎症反应及急、慢性瘙痒^[27]。以上研究表明,针刺可通过多种途径发挥改善AD瘙痒及皮肤损伤的作用。与上述研究结果一致,本研究结果显示,电针干预后,与模型组比较,电针组小鼠皮损程度评分降低、搔抓次数减少,皮肤组织结构损伤明显减轻,角化程度降低,炎性细胞浸润明显减少,说明电针可有效改善AD小鼠的皮肤组织损伤及瘙痒症状。

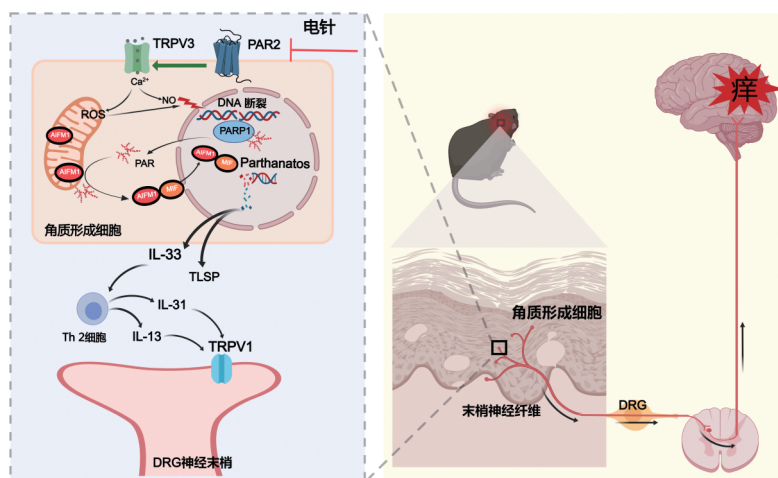
炎性因子在AD的发病机制中起着至关重要的作用。已有研究表明,辅助性T细胞(Th)2的重要产物IL-13水平与病变皮肤的疾病严重程度密切相关^[28];此外,IL-31可通过直接刺激IL-31受体亚基 α (IL-31R α)及表达瞬时受体电位香草素亚型1(TRPV1)或瞬时受体电位锚蛋白1的神经元引发瘙痒^[29];IL-33则通过激活Th2、2型固有淋巴细胞(ILC2)及肥大细胞,生成IL-31和IL-13,参与增强Th2型免疫反应并促进炎症反应^[30]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组小鼠皮肤组织中IL-33、IL-31和IL-13蛋白和mRNA相对表达量升高;与模型组比较,电针组小鼠IL-33、IL-31和IL-13蛋白和mRNA相对表达量降低,提示电针改善AD皮损及瘙痒症状可能与降低炎症因子水平相关。

PAR2作为一种G蛋白偶联受体,在皮肤发生炎症反应时可被促炎因子激活,已被证实可以促进Th2炎症反应和瘙痒^[31]。PAR2在不同的皮肤细胞类型中广泛表达,并被认为是表皮稳态、屏障形成、

免疫反应、疼痛和瘙痒感中发挥着多方面作用。在 PAR2 基因敲除小鼠皮肤中, Th2 分泌的细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 水平较野生型小鼠明显降低; 相反, PAR2 激活可诱导促 Th2 细胞因子释放胸腺基质淋巴细胞生成素(TLSP), 引起表皮屏障破坏^[32]。TRPV3 是一种非选择性阳离子通道蛋白, 在皮肤细胞中表达最为丰富, 对维持皮肤稳态至关重要^[33]。越来越多的研究证明 TRPV3 功能突变与皮肤炎症反应和瘙痒密切相关, 是导致包括 AD 在内的多种炎性皮肤病的重要原因^[34]。研究显示, TRPV3 激动剂可引起小鼠的抓挠行为, 而敲除 TRPV3 或使用 TRPV3 抑制剂则可缓解小鼠的皮肤瘙痒和炎症反应^[35]。近期有研究观察到, TRPV3 介导的钙流入诱导皮肤溶解, 引起角质形成细胞死亡, 导致炎症趋化因子释放, 是破坏皮肤屏障功能的重要原因^[36]。TRPV3 的过度激活会促使角质形成细胞分泌 TLSP 及 IL-33 等细胞因子, 诱导小鼠的搔抓行为^[37]。而过表达的 IL-33 会进一步刺激 Th2 释放 IL-13 和 IL-31, 激活背根神经节(DRG)末梢神经上的 TRPV1, 引起瘙痒向中枢传递^[38]。

Parthanatos 作为一种特殊的程序性细胞死亡方式, 主要特征是 PARP1 的激活和 DNA 损伤, 且这种死亡方式不依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase), 与凋亡和坏死有明显区别。最新研究结果显示, 无论 MC903 诱导的 AD 小鼠模型还是 AD 患者, 其皮肤中均发生了显著的 Parthanatos, 同时

TRPV3 的过度激活通过扰乱氧化还原平衡, 激活 PARP1/AIFM1/MIF 轴, 并导致皮肤细胞 Parthanatos^[6], 证明了 Parthanatos 可能是 AD 发病的关键机制。Parthanatos 通常与严重的氧化应激和 DNA 损伤相关, 伴随能量危机和炎症反应, 广泛存在于脑卒中、帕金森病、糖尿病、心力衰竭、脑缺血再灌注损伤等多种疾病中^[39]。研究显示, Parthanatos 也是介导多种皮肤疾病细胞死亡, 引起皮肤炎症反应的重要原因^[40]。已经有研究证实, PAR2 通过作用于 TRPV3 影响细胞中的瘙痒信号传递^[8]。因此, 我们推测电针可能通过下调 AD 模型小鼠皮损区域皮肤细胞中 PAR2 的表达, 抑制 TRPV3 通道的激活, 减少细胞 Parthanatos, 从而进一步减少炎症因子 IL-33、IL-31 和 IL-13 的释放及抑制瘙痒信号的传递, 最终改善 AD 的皮肤损伤和瘙痒症状。本研究结果表明, 与模型组相比, 电针合谷、曲池能降低 AD 小鼠皮肤组织 PAR2、TRPV3 及 Parthanatos 相关蛋白(PARP1、AIFM1、MIF)及 mRNA 表达水平, 减少 AD 小鼠皮肤组织细胞凋亡及 PARP1 阳性细胞数。表明电针合谷、曲池可以改善 AD 小鼠的皮肤炎症损伤及瘙痒, 其作用机制可能通过下调皮损区域细胞中 PAR2 表达, 抑制 TRPV3 通道激活, 减少细胞 Parthanatos, 从而进一步减少炎症因子 IL-33、IL-31、IL-13 的释放及抑制瘙痒信号的传递。见图 9。



注: PAR2 为蛋白酶激活受体 2, TRPV3 为瞬时感受器电位香草酸受体 3, Ca²⁺ 为钙离子, ROS 为活性氧, NO 为一氧化氮, DNA 为脱氧核糖核酸, PARP1 为聚 ADP-核糖聚合酶 1, PAR 为蛋白酶激活受体, AIFM1 为细胞凋亡诱导因子线粒体相关 1, MIF 为巨噬细胞迁移抑制因子, IL-33 为白细胞介素 33, TLSP 为胸腺基质淋巴细胞生成素, IL-31 为白细胞介素 31, Th 为辅助性 T 细胞, IL-13 为白细胞介素 13, TRPV1 为瞬时感受器电位香草酸受体 1, DRG 为背根神经节。

图 9 电针治疗特应性皮炎研究机制假说图

Fig. 9 Research mechanism hypothesis diagram of electroacupuncture treatment for atopic dermatitis

虽然本研究为探索电针合谷、曲池治疗AD提供了新的视角和实验依据,但也存在一定的局限性。本研究仅观察到电针组PAR2/TRPV3表达下降与Parthanatos减少存在相关性,未证明该通路是电针起效的必要条件,将在后续的研究中进一步设立阳性对照,观察电针效应是否被逆转。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者梁凤霞为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

- [1] CAO F, YANG Y J, GUO C, et al. Advancements in artificial intelligence for atopic dermatitis: diagnosis, treatment, and patient management[J]. *Ann Med*, 2025, 57(1): 2484665.
- [2] STÄNDER S. Atopic dermatitis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(12): 1136-1143.
- [3] SIMPSON E L, GOODERHAM M, WOLLENBERG A, et al. Efficacy and safety of lebrikizumab in combination with topical corticosteroids in adolescents and adults with moderate-to-severe atopic dermatitis: a randomized clinical trial (ADhere)[J]. *JAMA Dermatol*, 2023, 159(2): 182-191.
- [4] 蒋丽, 谢长才, 黄键澎, 等. 电针对特异性皮炎瘙痒模型小鼠的止痒作用及对强啡肽、P物质的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(16): 3874-3877.
JIANG L, XIE C C, HUANG J P, et al. Antipruritic effect of electroacupuncture on atopic dermatitis and pruritus model mice and its influence on dynorphin and substance P (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2016, 36(16): 3874-3877.
- [5] GE W Q, OU-YANG Z M, CHEN C, et al. Electroacupuncture reduces chronic itch *via* cannabinoid CB1 receptors in the ventrolateral periaqueductal gray [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 931600.
- [6] SONG Z Y, GAO M, LI T X, et al. TRPV3-activated PARP1/AIFM1/MIF axis through oxidative stress contributes to atopic dermatitis[J]. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(12): 2695-2705.e8.
- [7] IN KIM H, LEE G B, SONG D E, et al. FSLLRY-NH(2), a protease-activated receptor 2 (PAR2) antagonist, activates mas-related G protein-coupled receptor C11 (MrgprC11) to induce scratching behaviors in mice[J]. *Life Sci*, 2023, 325: 121786.
- [8] ZHAO J H, MUNANAIRI A, LIU X Y, et al. PAR2 mediates itch via TRPV3 signaling in keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(8): 1524-1532.
- [9] 《针刺研究》编辑部.《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单[J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
Editorial Board of *Acupuncture Research*. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [10] XU Y, QIU Z Q, GU C Y, et al. Propionate alleviates itch in murine models of atopic dermatitis by modulating sensory TRP channels of dorsal root ganglion[J]. *Allergy*, 2024, 79(5): 1271-1290.
- [11] 吴百威, 羊小华, 占润之. 甘草酸对特异性皮炎小鼠皮肤屏障功能的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(10): 1324-1327.
WU B W, YANG X H, ZHAN R Z. Effects of glycyrrhizin on skin barrier function in atopic dermatitis mice (in Chinese) [J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2020, 36(10): 1324-1327.
- [12] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分: 小鼠[J]. *针刺研究*, 2021, 46(4): 445-446.
China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 445-446.
- [13] Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis[J]. *Dermatology*, 1993, 186(1): 23-31.
- [14] 孙坤坤, 韩学超, 孙孝凤, 等. 中医药防治特异性皮炎研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 266-273.
SUN K K, HAN X C, SUN X F, et al. Prevention and treatment of atopic dermatitis with traditional Chinese medicine: a review (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(5): 266-273.
- [15] 林颖, 陈达灿, 莫秀梅. 特异性皮炎中医证候分类现状与辨证施治疗效的评价[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2005, 4(4): 266-271.
LIN Y, CHEN D C, MO X M. Classification of symptoms and signs and evaluation of effects of traditional Chinese medicine on patients with atopic dermatitis (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Dermatovenereology of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2005, 4(4): 266-271.
- [16] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划[J]. *针刺研究*, 2025, 50(1): 1-2.
Alliance Acupuncture Scientific Research. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.
- [17] 刘悦, 汤晓冬, 李伟红, 等. 基于Apriori算法的针灸治疗特异性皮炎选取腧穴规律研究[J]. *河北医学*, 2023, 29(6): 916-922.
LIU Y, TANG X D, LI W H, et al. Apriori algorithm based acupuncture for the treatment of atopic dermatitis: a study on the regularity of acupoint selection (in Chinese) [J]. *Hebei Medicine*, 2023, 29(6): 916-922.
- [18] 吴霞, 谭金曲, 沈福隆, 等. 曲池穴主治病症的古代文献研究[J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33(7): 1285-1290.
WU X, TAN J Q, SHEN F L, et al. Ancient medical literature study on Quchi acupoint indications based on frequency of statistical methods (in Chinese) [J]. *Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 33(7): 1285-

- 1290.
- [19] 徐菁, 赵百孝, 段行武, 等. 基于数据挖掘的针刺治疗皮肤瘙痒取穴规律研究[J]. 中国医药导报, 2022, 19(35): 120-124.
- XU J, ZHAO B X, DUAN X W, et al. Study on point selection rule of acupuncture treatment for pruritus based on data mining (in Chinese)[J]. China Medical Herald, 2022, 19(35): 120-124.
- [20] LEE Y C, LIN C H, HUNG S Y, et al. Manual acupuncture relieves bile acid-induced itch in mice: the role of microglia and TNF- α [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(9): 953-960.
- [21] LI H P, WANG X Y, CHEN C, et al. 100 Hz electroacupuncture alleviated chronic itch and GRPR expression through activation of kappa opioid receptors in spinal dorsal horn[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 625471.
- [22] 李洪萍. 内源性大麻素系统参与电针抑制慢性痒及痒特异性受体 GRPR 表达的神经生物学机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- LI H P. Neurobiological mechanisms of electroacupuncture inhibiting chronic itch and GRPR receptor expression by endocannabinoid system (in Chinese)[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2019.
- [23] DAWN A, PAPOIU A D P, CHAN Y H, et al. Itch characteristics in atopic dermatitis: results of a web-based questionnaire[J]. Br J Dermatol, 2009, 160(3): 642-644.
- [24] BAKKER D S, DE GRAAF M, NIERKENS S, et al. Unraveling heterogeneity in pediatric atopic dermatitis: Identification of serum biomarker based patient clusters[J]. J Allergy Clin Immunol, 2022, 149(1): 125-134.
- [25] TAN H Y, LENON G B, ZHANG A L, et al. Efficacy of acupuncture in the management of atopic dermatitis: a systematic review[J]. Clin Exp Dermatol, 2015, 40(7): 711-715; quiz 715-6.
- [26] JUNG D L, LEE S D, CHOI I H, et al. Effects of electroacupuncture on capsaicin-induced model of atopic dermatitis in rats[J]. J Dermatol Sci, 2014, 74(1): 23-30.
- [27] PARK H J, AHN S, LEE H, et al. Acupuncture ameliorates not only atopic dermatitis-like skin inflammation but also acute and chronic serotonergic itch possibly through blockade of 5-HT (2) and 5-HT (7) receptors in mice[J]. Brain Behav Immun, 2021, 93: 399-408.
- [28] BIEBER T. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis[J]. Allergy, 2020, 75(1): 54-62.
- [29] LANGAN S M, IRVINE A D, WEIDINGER S. Atopic dermatitis[J]. Lancet, 2020, 396(10247): 345-360.
- [30] ZHENG J, YAO L, ZHOU Y J, 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.
- [31] MISERY L, PIERRE O, LE GALL-IANOTTO C, et al. Basic mechanisms of itch[J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 152(1): 11-23.
- [32] YANG H, CHEN W W, ZHU R K, et al. Critical players and therapeutic targets in chronic itch[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9935.
- [33] 魏明镜, 陈文琦. TRPV3 在皮肤病发生及治疗中的研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2024, 40(1): 66-70.
- WEI M J, CHEN W Q. Update of TRPV3 in the occurrence and treatment of skin diseases (in Chinese)[J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2024, 40(1): 66-70.
- [34] UM J Y, KIM H B, KIM J C, et al. TRPV3 and itch: the role of TRPV3 in chronic pruritus according to clinical and experimental evidence[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14962.
- [35] GUO Y T, SONG Y J, LIU W, et al. Novel insights into the role of keratinocytes-expressed TRPV3 in the skin[J]. Biomolecules, 2023, 13(3): 513.
- [36] DU Y X, QI X B, ZHANG L, et al. Calcium influx-induced lytic cell death disrupts skin immune homeostasis[J]. Cell Discov, 2023, 9(1): 124.
- [37] SEO S H, KIM S, KIM S E, et al. Enhanced thermal sensitivity of TRPV3 in keratinocytes underlies heat-induced pruritogen release and pruritus in atopic dermatitis[J]. J Invest Dermatol, 2020, 140(11): 2199-2209.e6.
- [38] MENG J H, LI Y Q, FISCHER M J M, et al. Th2 modulation of transient receptor potential channels: an unmet therapeutic intervention for atopic dermatitis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 696784.
- [39] HUANG P, CHEN G W, JIN W F, et al. Molecular mechanisms of parthanatos and its role in diverse diseases[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7292.
- [40] MARTÍNEZ-MORCILLO F J, CANTÓN-SANDOVAL J, MARTÍNEZ-NAVARRO F J, et al. NAMPT-derived NAD⁺ fuels PARP1 to promote skin inflammation through parthanatos cell death[J]. PLoS Biol, 2021, 19(11): e3001455.

收稿日期:2025-07-04 修回日期:2025-11-04