

☆ XXXX ☆

电针调节瞬时受体电位香草酸亚型1改善荨麻疹大鼠皮肤瘙痒的机制

李记泉^{1,2}, 马铁明^{1,2}, 王巍¹, 陈怡然^{1,2}, 赵岩¹, 游林歆¹, 张京瑜¹, 王鹰³, 林星星¹,
郑曲¹, 赵夜雨⁴, 李思佳⁵

(¹辽宁中医药大学针灸推拿学院, 沈阳110847; ²辽宁省教育厅针灸生物学重点实验室, 沈阳110847; ³辽宁中医药大学养生康复学院, 沈阳110847; ⁴辽宁中医药大学附属医院, 沈阳110847; ⁵辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳110847)

【摘要】 目的:观察电针止痒穴对“曲池”“血海”对荨麻疹(UR)大鼠皮肤瘙痒的止痒效应,并基于瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)通道相关蛋白分析电针止痒效应的机制。**方法:**3只雄性SD大鼠采用卵蛋白(OVA)与免疫佐剂氢氧化铝[Al(OH)₃]混合液联合注射法制备抗OVA血清。16只雄性SD大鼠采用被动皮肤过敏反应(PCA)法制备UR模型,即大鼠背部皮内注射抗OVA血清稀释液,48 h后尾静脉注射OVA与伊文斯蓝稀释液进行抗原攻击,0.5 h后进行模型评价。将造模成功的大鼠随机分为模型组、电针组,每组8只,另取8只大鼠作为正常组。造模后第2天给予电针组大鼠双侧“曲池”“血海”电针处理,1次/d,连续5 d。记录电针干预前后大鼠搔抓背部致敏皮肤次数,测量背部致敏皮肤蓝斑面积。取大鼠背部致敏皮肤,比色法测定致敏皮肤蓝斑伊文斯蓝渗出量,HE染色法观察皮肤病理变化,透射电镜观察皮肤肥大细胞(MC)超微结构,甲苯胺蓝染色法观察皮肤MC形态并计算MC脱颗粒率,ELISA法检测血清免疫球蛋白E(IgE)、组胺(HIS)、5-羟色胺(5-HT)及白细胞介素(IL)-1 β 、IL-5及IL-6水平,免疫组织化学法检测皮肤磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)阳性细胞数,Western blot法检测皮肤蛋白激酶C(PKC)、p-PKC、TRPV1表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠搔抓背部致敏皮肤次数、致敏区域皮肤蓝斑面积及伊文思蓝渗出量升高($P<0.01$),致敏区域皮肤炎症反应表现显著,MC胞质内嗜碱性分泌颗粒增多,颗粒包膜受损,包膜内部颗粒密度降低,皮肤MC脱颗粒率升高($P<0.01$),血清IgE、HIS、5-HT及IL-1 β 、IL-5、IL-6水平升高($P<0.01$),皮肤PIP2阳性细胞数、PKC、TRPV1表达及p-PKC/PKC比值升高($P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠搔抓背部致敏皮肤次数、致敏区域皮肤蓝斑面积及伊文思蓝渗出量降低($P<0.05$, $P<0.01$),致敏区域皮肤炎症反应表现减轻,MC胞质内嗜碱性分泌颗粒减少、颗粒包膜恢复,包膜内部颗粒密度增高,皮肤MC脱颗粒率降低($P<0.01$),血清IgE、HIS、5-HT及IL-1 β 、IL-5、IL-6水平降低($P<0.01$),皮肤PIP2阳性细胞数、PKC、TRPV1表达及p-PKC/PKC比值降低($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**电针止痒穴对“曲池”“血海”可以改善UR大鼠皮肤瘙痒和风团损伤,其机制可能与抑制皮肤TRPV1通道相关蛋白,抑制皮肤MC脱颗粒,从而减轻皮损局部炎症反应有关。

【关键词】 荨麻疹;电针;瞬时受体电位香草酸亚型1;瘙痒;肥大细胞

Mechanism of electroacupuncture in alleviating skin itch in urticaria rats by regulating transient receptor potential vanilloid subtype 1

Li Jiquan^{1,2}, Ma Tieming^{1,2}, Wang Wei¹, Chen Yiran^{1,2}, Zhao Yan¹, You Linxin¹, Zhang Jingyu¹, Wang Ying³, Lin Xingxing¹, Zheng Qu¹, Zhao Yeyu⁴, Li Sijia⁵ (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Liaoning University of Traditional

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260134

引用格式:李记泉,马铁明,王巍,等.电针调节瞬时受体电位香草酸亚型1改善荨麻疹大鼠皮肤瘙痒的机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:国家自然科学基金青年基金项目(No.82205253);辽宁省科技计划联合计划(基金)项目:(No.2023-MSLH-187、2025-MSLH-468);辽宁省教育厅基本科研项目青年项目(No.JYTQN2023462);辽宁省教育厅高校基本科研项目储备项目(No.2024-JYTCB-015);辽宁中医药大学中医药科技创新多学科交叉团队项目(No.2025-DxkjcU45-23-08)

通信作者:李思佳, E-mail:lnzydxslj@163.com

Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; ²Key Laboratory of Acupuncture and Moxibustion Biology, Liaoning Provincial Department of Education, Shenyang 110847; ³College of Health Preservation and Rehabilitation, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847; ⁴Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847; ⁵College of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847)

【ABSTRACT】 Objective To observe the antipruritic effect of electroacupuncture (EA) at antipruritic acupoints “Quchi” (LI11) and “Xuehai” (SP10) on skin itch in urticaria (UR) rats, so as to analyze the mechanism underlying the antipruritic effect of EA based on transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) channel-related proteins. **Methods** Anti-ovalbumin (OVA) serum was prepared by combined injection of the mixture of OVA and aluminum hydroxide immune adjuvant in 3 male SD rats. A total of 16 male SD rats were adopted to establish UR models via passive cutaneous anaphylaxis (PCA); diluted anti-OVA serum was intradermally injected into the rat back, followed by antigen challenge via tail vein injection of diluted OVA and Evans blue solution 48 h later, and model evaluation was conducted 0.5 h after challenge. Successfully modeled rats were randomly divided into a model group and an EA group, with 8 rats in each group; another 8 rats were set as the normal group. Starting from the 2nd day after model establishment, rats in the EA group received EA stimulation at bilateral LI11 and SP10, once daily for 5 consecutive days. The scratching frequency of rats on sensitized back skin before and after EA intervention was recorded, and the area of blue spots on sensitized back skin was measured. Sensitized back skin tissues were harvested for subsequent detections: colorimetric method was used to quantify Evans blue exudation in blue spots of sensitized skin; hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe skin pathological lesions; transmission electron microscopy was applied to examine the ultrastructure of skin mast cells (MCs); toluidine blue staining was adopted to observe MC morphology and calculate the MC degranulation rate; ELISA was used to detect serum levels of immunoglobulin E (IgE), histamine (HIS), 5-hydroxytryptamine (5-HT), interleukin (IL)-1 β , IL-5 and IL-6; immunohistochemistry was conducted to count phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP2)-positive cells in skin tissues; Western blot was utilized to detect the protein expressions of protein kinase C (PKC), phosphorylated PKC (p-PKC) and TRPV1 in skin tissues. **Results** Compared with the normal group, the model group exhibited significantly increased scratching frequency, enlarged area of blue spots on sensitized skin and elevated Evans blue exudation ($P<0.01$), accompanied by severe inflammatory infiltration in sensitized skin. MCs showed increased basophilic secretory granules in cytoplasm, damaged granule membranes and decreased internal granule density, with a markedly elevated MC degranulation rate ($P<0.01$). Serum levels of IgE, HIS, 5-HT, IL-1 β , IL-5 and IL-6 were significantly up-regulated ($P<0.01$). In addition, the number of PIP2-positive cells, protein expressions of PKC and TRPV1, as well as the p-PKC/PKC ratio in skin tissues were all increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the EA group displayed reduced scratching frequency, smaller blue spot area and lower Evans blue exudation ($P<0.05$, $P<0.01$). Skin inflammatory lesions were alleviated; MCs presented fewer cytoplasmic basophilic secretory granules, restored intact granule membranes and higher internal granule density, alongside a decreased MC degranulation rate ($P<0.01$). Serum contents of IgE, HIS, 5-HT, IL-1 β , IL-5 and IL-6 were notably decreased ($P<0.01$). Meanwhile, the number of PIP2-positive cells, expressions of PKC and TRPV1, and the p-PKC/PKC ratio in skin tissues were down-regulated ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** EA at antipruritic acupoints LI11 and SP10 can relieve skin itch and wheal lesions in UR rats. Its therapeutic mechanism may be associated with inhibiting TRPV1 channel-related proteins in skin tissues and suppressing mast cell degranulation, thereby mitigating local inflammatory responses in lesioned skin.

【KEYWORDS】 Urticaria; Electroacupuncture; Transient receptor potential vanilloid subtype 1; Itch; Mast cell

皮肤是人体最大的感觉器官,能够感知温度、压力、疼痛和触觉等刺激,从而使机体对外部环境变化作出反应。存在于皮肤神经末梢的肥大细胞(MC)、角质形成细胞、成纤维细胞等细胞或结构感受器可将外界刺激转化为电信号,再通过神经传递给大脑进而产生感觉,是皮肤感觉传递的结构基础。瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)广泛表

达于皮肤多种伤害性感受器,参与瘙痒和疼痛形成^[1]。研究显示,TRPV1引起的感觉异常与荨麻疹(UR)发病密切相关^[2]。

UR以皮肤风团伴剧烈瘙痒为主要症状,止痒成为患者核心诉求之一。针灸治疗UR可以显著降低瘙痒严重程度评分及每周荨麻疹活动评分,提高患者生活质量,表明针灸具有明确的止痒效应^[3]。

前期研究中,课题组分析认为曲池、血海组成的止痒穴对是针刺治疗UR首选穴位组合^[4]。进一步的实验研究显示,电针“曲池”“血海”能够调节瞬时受体电位M2型通道(TRPM2)等蛋白表达,抑制MC脱颗粒,减轻UR模拟症状,从而改善UR^[5]。但是,电针“曲池”“血海”是否通过调节TRPV1介导的感觉异常发挥止痒效应而改善UR尚未见报道。因此,本研究采用分子生物学等技术分析TRPV1信号通路相关蛋白在电针改善UR皮肤瘙痒中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级8周龄健康雄性SD大鼠27只,体质量(200±20)g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。实验动物在辽宁中医药大学实验动物中心分笼适应性饲养1周。饲养条件:SPF级动物房,温度(23±2)℃,湿度(50±5)%,12 h/12 h明暗循环,自由饮水与摄食。实验通过辽宁中医药大学动物实验伦理审查(批准号:21000042023017),同时遵循2006年由中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》及相关实验动物福利伦理规范^[6]。

1.2 主要试剂与仪器

甲苯胺蓝(C0052)、伊文斯蓝(C0044)购自上海宝曼,免疫球蛋白E(IgE)试剂盒(MAB4491,美国abnova),戊巴比妥钠(081213,北京化学试剂),电镜固定液(G1102,武汉赛维尔),卵白蛋白(OVA)、氢氧化铝[Al(OH)₃](S30353)购自上海源叶,S12015,上海源叶),组胺(HIS)、5-羟色胺(5-HT)、白细胞介素(IL)-5试剂盒(MM-0535R2、MM-0442R2、MM-0094R2)均购自武汉酶免,蛋白激酶C(PKC)抗体(21991-1-AP)、HE染色试剂盒(PK10031)、DAB染色液(PR30018)均购自武汉三鹰,IL-1β、IL-6(E08055r、E04640r)试剂盒均购自武汉华美,p-PKC抗体(AP1376,武汉爱博泰克),瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)抗体、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)抗体(ab305299、ab11039)均购自英国Abcam。

一次性使用无菌针灸针(0.18 mm×13 mm)、电子针疗仪(SDZ-II型)购自苏州医疗用品厂,Image-Pro Plus 7.0图像分析系统(美国Media Cybernetics),生物组织包埋机(YB-7LF型,湖北亚光),冷冻切片机(CM1990型,德国Leica),酶标仪

(VLBL00D0型,美国赛默飞世尔),气体麻醉机(R550型,深圳瑞沃德),高速冷冻离心机(ICEN-24R型,杭州奥盛),电泳仪(Tanon EPS-300型)、凝胶成像系统(Tanon-4600型)购自上海天能,Image J图像分析系统(美国国家卫生研究院),全自动蛋白质印迹定量分析系统(美国Protein simple),光学显微镜(BX53型,日本奥林巴斯),SU8100型扫描电子显微镜(日本日立),全自动染色机(RS36型,常州派斯杰)。

1.3 模型制备

首先,采用抗原OVA与免疫佐剂Al(OH)₃联合注射法制备抗OVA血清^[7]。具体方法为:配制浓度为10 mg/mL的OVA抗原溶液和73.7 mg/mL Al(OH)₃免疫佐剂溶液,再将二者等体积混合摇匀,从而制成致敏液^[8]。取3只SD大鼠,以脊柱中段为中心备皮4 cm×4 cm大小区域,在该区域距离脊柱中段2 cm处选择注射点位,采用皮下注射法注射配制好的致敏液(1 mL/点),隔日注射1次,共计3次。末次注射10 d后取材,2%戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉下,采集3只大鼠腹主动脉血,离心后取血清,即为抗OVA血清原液。将原液混合并摇匀,加入0.9%氯化钠溶液稀释10倍,制成抗OVA血清稀释液,于-20℃冻存。

然后,以国家市场监督管理总局《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》推荐的皮肤被动过敏反应(PCA)法为指导原则^[9],采用优化后的最佳实验条件制备UR大鼠模型^[7,10]。具体方法为:24只SD大鼠以脊柱中段为中心备皮宽4 cm、长6 cm区域,并在该区域距离脊柱两侧各2 cm纵向等距离选择6个拟注射点位。其中16只大鼠采用皮内注射法向各拟注射点位注射抗OVA血清稀释液(0.1 mL/点),使之形成圆形苍白皮丘,从而使机体产生抗OVA抗体。剩余8只大鼠作为正常组,采用皮内注射等量0.9%氯化钠溶液。48 h后,采用0.9%氯化钠溶液配制抗原OVA稀释液(10 mg/mL)及伊文斯蓝溶液(0.5%),并按等体积混合成抗原液。采用尾静脉注射法向16只大鼠注射抗原液1 mL,进行抗原抗体在体反应,从而建立UR大鼠模型,并随机分为模型组、电针组,每组8只。正常组大鼠尾静脉注射等量0.9%氯化钠溶液。

各组大鼠尾静脉注射0.5 h后开始进行模型评价,记录0.5 h内大鼠搔抓致敏部位次数,以大鼠躁动不安伴搔抓致敏部位皮肤、致敏区域出现蓝斑(直径>5 mm)及皮肤病理炎性反应为模型成功

标准^[7,11]。

1.4 干预方法

在清醒状态下,将电针组大鼠固定于小动物针灸专用固定装置。根据大鼠腧穴定位法,取大鼠双侧“曲池”“血海”^[12],穴位消毒后,用0.18 mm×13 mm一次性无菌针灸针直刺2~3 mm。为防止电流跨越心脏,仅将右侧“曲池”与“血海”接入电针仪正负极。调节电针参数为电流强度0.5 mA、疏密波形、频率2 Hz/15 Hz,以大鼠肢体轻微抖动为宜,每次留针20 min,每天1次,连续干预5 d。正常组、模型组仅采取相同方式抓取和固定,而不进行电针干预。

1.5 观察指标及检测方法

行为学检测:造模成功后,每天上午9:00~9:30观察各组大鼠饮食和行为变化,并记录0.5 h内大鼠(8只鼠/组)搔抓背部致敏皮肤次数。

组织取材:采用2%戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉大鼠后,在每只大鼠背部致敏区域中线左右两侧分别取1 cm×1 cm大小的皮肤组织2块。左侧的2块皮肤组织,其中一块置于4%多聚甲醛溶液(预冷)固定24 h,常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度5 μm);另一块避光状态下置于电镜液固定保存。右侧2块皮肤组织置于-80℃冰箱冻存。取大鼠腹主动脉血,离心取血清,-80℃冰箱冻存待测。

Image J软件测量大鼠致敏皮肤蓝斑面积变化:相机固定距离拍摄大鼠背部致敏区域图像,将图像导入Image J软件预处理,分离蓝色通道,阈值分割以提取蓝斑区域,校正图像,测量大鼠皮肤蓝斑面积。

比色法测定大鼠致敏皮肤蓝斑伊文斯蓝渗出量:取-80℃冻存的致敏皮肤组织,切碎,加入丙酮、0.9%氯化钠溶液混合液(7:3)浸泡24 h,离心,取上清,用可见分光光度计测定620 nm处吸光度。

HE染色法检测大鼠致敏皮肤组织形态变化:取制备好的石蜡切片(厚度5 μm),常规脱蜡、水化,苏木精染色5 min,流水冲洗,5%盐酸乙醇分化1 min,伊红染色1 min,再流水冲洗,中性树胶封片。每个样本切3张片,每张片选取3个视野,光学显微镜观察致敏皮肤组织形态结构变化并采集图像。

透射电镜观察大鼠MC超微结构:取出4%多聚甲醛固定的皮肤组织(1 mm×1 mm×1 mm大小),0.1 mol/L磷酸盐缓冲液冲洗,1%锇酸固定,再次磷酸盐缓冲液冲洗,梯度乙醇(梯度为30%、50%、70%、80%)脱水,等比例90%乙醇、

90%丙酮脱水,干燥10 min,100%丙酮浸透3次(10 min/次),等比例100%丙酮和包埋液浸透1 h,包埋液浸透1.5 h,用包埋剂将组织在37℃恒温箱聚合12 h,包埋液60℃聚合48 h,超薄切片(厚度60~100 nm),醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,完全干燥后,透射电镜下观察其超微结构。

甲苯胺蓝染色法观察大鼠致敏皮肤组织形态变化:取制备好的石蜡切片(厚度5 μm),磷酸盐缓冲液冲洗,风干,甲醛乙酸乙醇固定,甲苯胺蓝染色,蒸馏水冲洗,乙醇分化,二甲苯透明,封片。每个样本切3张片,每张片选取3个视野,光学显微镜观察致敏皮肤MC形态,计数MC数量并计算MC脱颗粒率。MC脱颗粒率(%)=(脱颗粒MC数量÷MC总数量)×100%。

ELISA法检测大鼠血清IgE、HIS、5-HT及IL-1β、IL-5、IL-6含量:取冻存血清,按照ELISA试剂盒说明书使用酶标仪测定组织450 nm处吸光度值,绘制标准曲线并计算血清IgE、HIS、5-HT及IL-1β、IL-5、IL-6含量。

免疫组织化学法检测大鼠致敏皮肤PIP2阳性细胞数:将石蜡切片(厚度5 μm)常规脱蜡、水化,抗原修复,加3%过氧化物酶阻断浸泡10 min,5% BSA封闭30 min,4℃孵育稀释后的PIP2一抗(1:1 000)24 h,加入二抗原液,DAB显色,苏木精复染后脱水、透明、中性树胶封片。每个样本切3张片,每张片选取3个视野,光学显微镜观察并采集图像,Image-Pro Plus 7.0软件分析并计数PIP2阳性细胞数。

Western blot法检测大鼠致敏皮肤TRPV1、PKC及p-PKC蛋白表达:取-80℃冻存的皮肤组织100 mg,充分研磨,加入200 μL含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,匀浆,提取蛋白。计算样品蛋白浓度,95℃变性10 min,取50 μg蛋白样本进行凝胶电泳,转至PVDF膜,封闭,4℃孵育稀释后的一抗(TRPV1、PKC及p-PKC均1:1 000)24 h,TBST洗涤,孵育二抗(1:1 000),加入A、B发光液,显影、曝光、拍照,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参计算目的蛋白相对表达量。

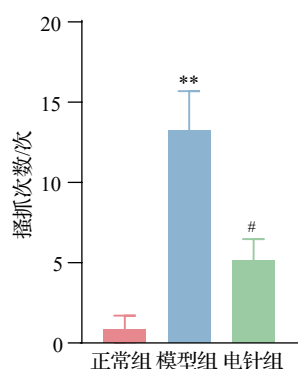
1.6 统计学方法

采用SPSS22.0软件分析数据。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,方差齐组间两两比较用LSD检验,方差不齐用Tamhane's T2检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态及行为学比较

正常组大鼠各项生命体征正常,基本未见搔抓背部行为;与正常组比较,模型组和电针组大鼠生命体征较为平稳,食欲有所下降,伴躁动不安和不时搔抓致敏皮肤现象,模型组大鼠搔抓致敏皮肤次数增多($P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠搔抓致敏皮肤次数减少($P<0.05$)。见图1。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图1 各组大鼠干预后搔抓致敏皮肤次数比较
($\bar{x}\pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of scratching frequency of sensitized skin of rats in the 3 groups after intervention
($\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

2.2 各组大鼠致敏皮肤蓝斑面积比较

正常组大鼠背部皮肤未出现致敏蓝斑现象;与正常组比较,模型组大鼠背部皮肤致敏蓝斑面积升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠背部皮肤致敏蓝斑面积降低($P<0.05$)。见图2。

2.3 各组大鼠致敏皮肤蓝斑伊文思蓝渗出量比较

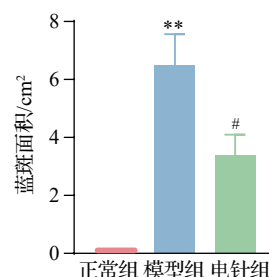
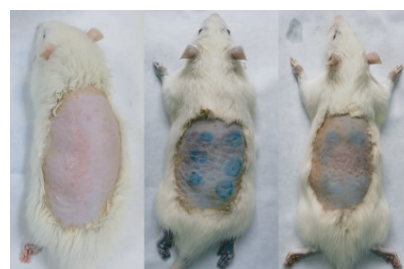
正常组大鼠背部皮肤无伊文思蓝渗出;与正常组比较,模型组大鼠背部皮肤伊文思蓝渗出量升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠背部皮肤伊文思蓝渗出量降低($P<0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠致敏皮肤病理形态比较

正常组大鼠致敏皮肤各层次结构清晰、排列整齐,真皮层炎性细胞数较少;与正常组比较,模型组大鼠背部致敏皮肤表皮水肿、破损,纤维组织肿胀、破裂,真皮层炎性细胞数显著增多,微小血管周围尤为明显;与模型组比较,电针组大鼠背部致敏皮肤组织受损表皮、纤维组织有所恢复,真皮层炎性细胞数显著减少。见图4。

2.5 各组大鼠致敏皮肤MC颗粒超微结构比较

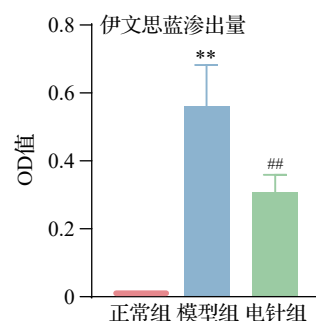
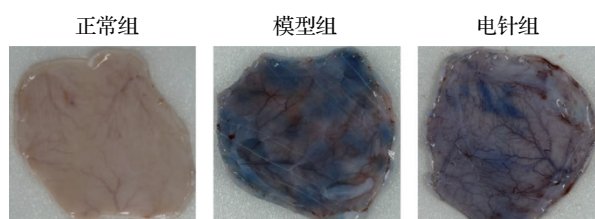
正常组大鼠致敏皮肤MC胞质内可见大小不同



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠干预后背部皮肤致敏蓝斑面积比较
($\bar{x}\pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of sensitization blue spot area on the back skin of rats the 3 groups after intervention
($\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

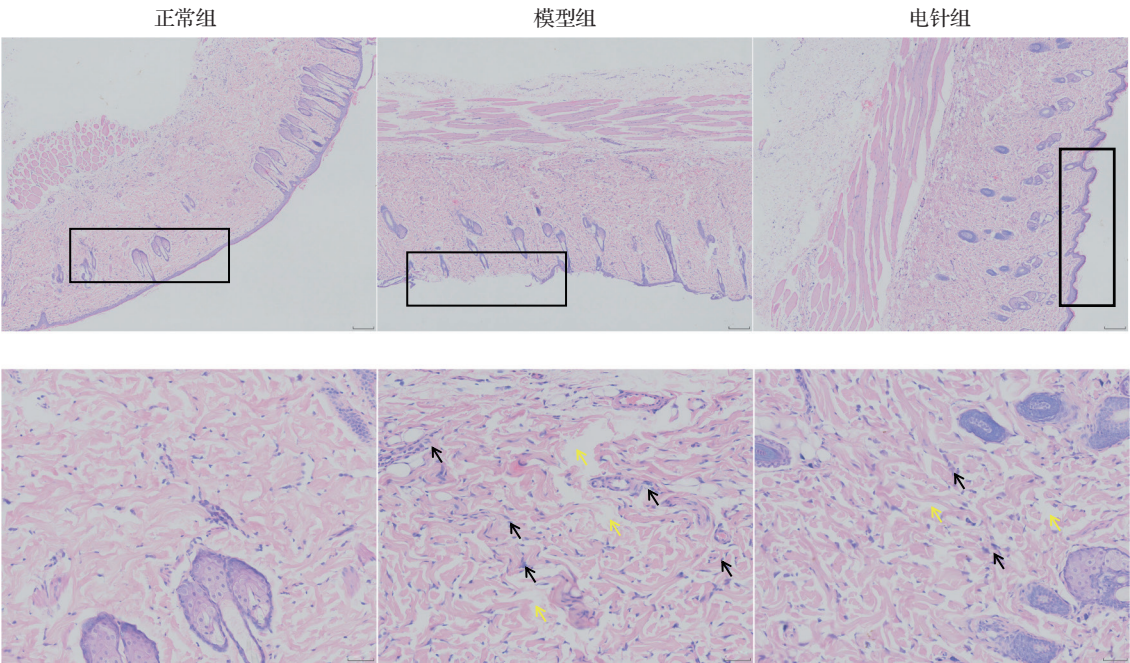


注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠致敏皮肤蓝斑伊文思蓝渗出量比较
($\bar{x}\pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of Evans blue exudation in sensitized skin lesions of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

的嗜碱性分泌颗粒,颗粒包膜完整、内容物致密;与正常组比较,模型组大鼠背部致敏皮肤MC胞质内嗜碱性分泌颗粒数量增多,颗粒包膜出现不同程度破裂,完整性受损,包膜内部颗粒密度下降;与模型组比较,电针组大鼠背部皮肤MC胞质嗜碱性分泌



注:下排为上排放大图,上排标尺=200 μm ,下排标尺=50 μm 。黑色矩形示受损表皮组织,黑色箭头示炎性细胞浸润,黄色箭头示纤维组织水肿。

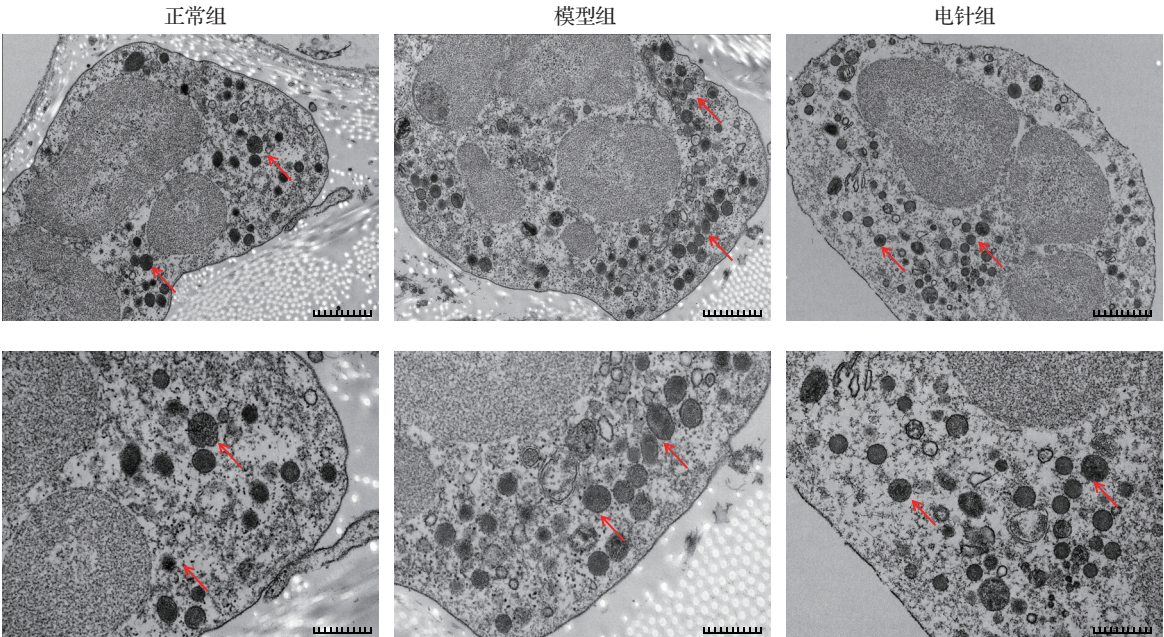
图4 各组大鼠致敏皮肤病理形态比较(HE染色)

Fig. 4 Comparison of pathological morphology of sensitized skin of rats in the 3 groups (HE staining)

颗粒数量减少,颗粒包膜完整性有所恢复,包膜内部颗粒密度有所增高。见图5。

2.6 各组大鼠致敏皮肤MC形态及脱颗粒率比较
正常组大鼠皮肤MC形态结构完整,较少见脱颗粒现象;与正常组比较,模型组大鼠皮肤MC形态

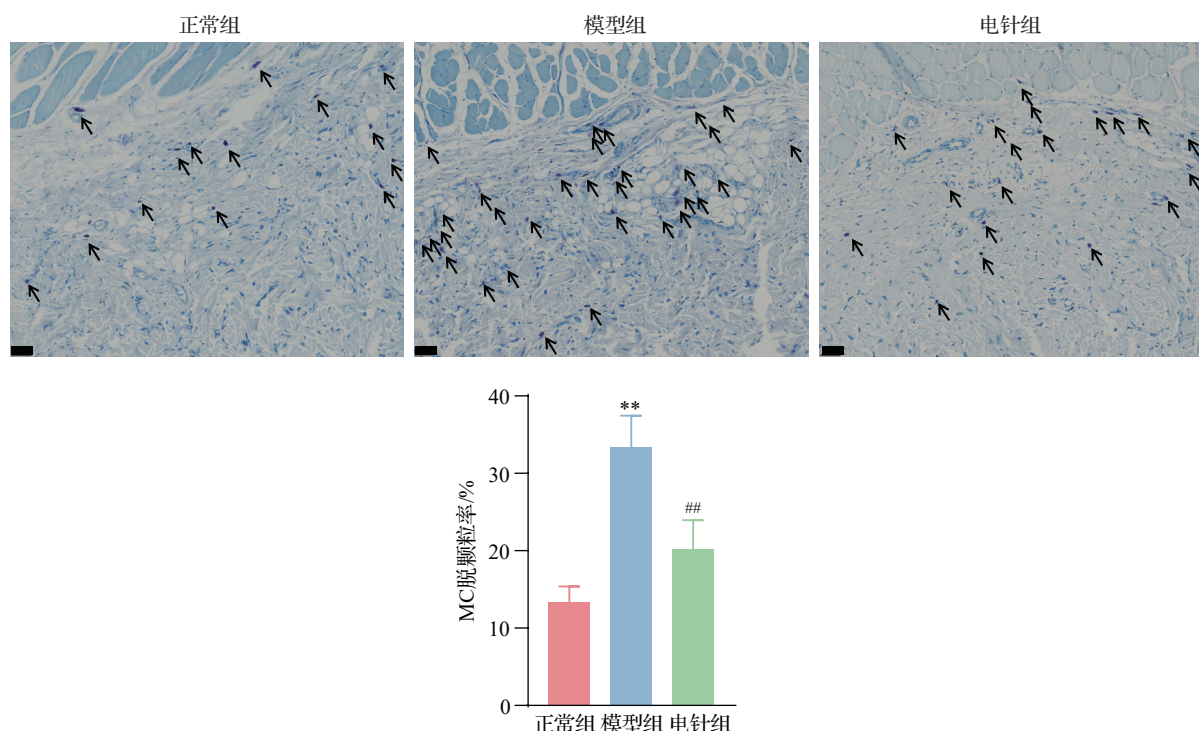
肿胀或破裂,胞质内异染颗粒溶解明显,脱颗粒率升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠皮肤MC形态相对完整,胞质内异染颗粒溶解减少,脱颗粒率降低($P<0.01$)。见图6。



注:MC为肥大细胞。下排为上排放大图,上排标尺=1 μm ,下排标尺=500 nm。红色箭头示肥大细胞内部不同状态致密颗粒。

图5 各组大鼠致敏皮肤MC颗粒超微结构比较(透射电镜)

Fig. 5 Comparison of the ultrastructure of MC particles in sensitized skin of rats in the 3 groups (transmission electron microscopy)



注:MC为肥大细胞。标尺=50 μm 。黑色箭头示不同状态MC。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠皮肤MC形态及脱颗粒率比较(甲苯胺蓝染色, $\bar{x}\pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of skin MC morphology and degranulation rate of rats in the 3 groups (toluidine blue staining, $\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

2.7 各组大鼠血清IgE、HIS、5-HT及IL-1 β 、IL-5、IL-6含量比较

与正常组比较,模型组大鼠血清IgE、HIS、5-HT及IL-1 β 、IL-5、IL-6含量升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠血清IgE、HIS、5-HT及IL-1 β 、IL-5、IL-6含量降低($P<0.01$)。见图7。

2.8 各组大鼠致敏皮肤PIP2阳性细胞数比较

与正常组比较,模型组大鼠皮肤PIP2阳性细胞数升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠皮肤PIP2阳性细胞数降低($P<0.01$)。见图8。

2.9 各组大鼠致敏皮肤TRPV1、PKC、p-PKC蛋白表达比较

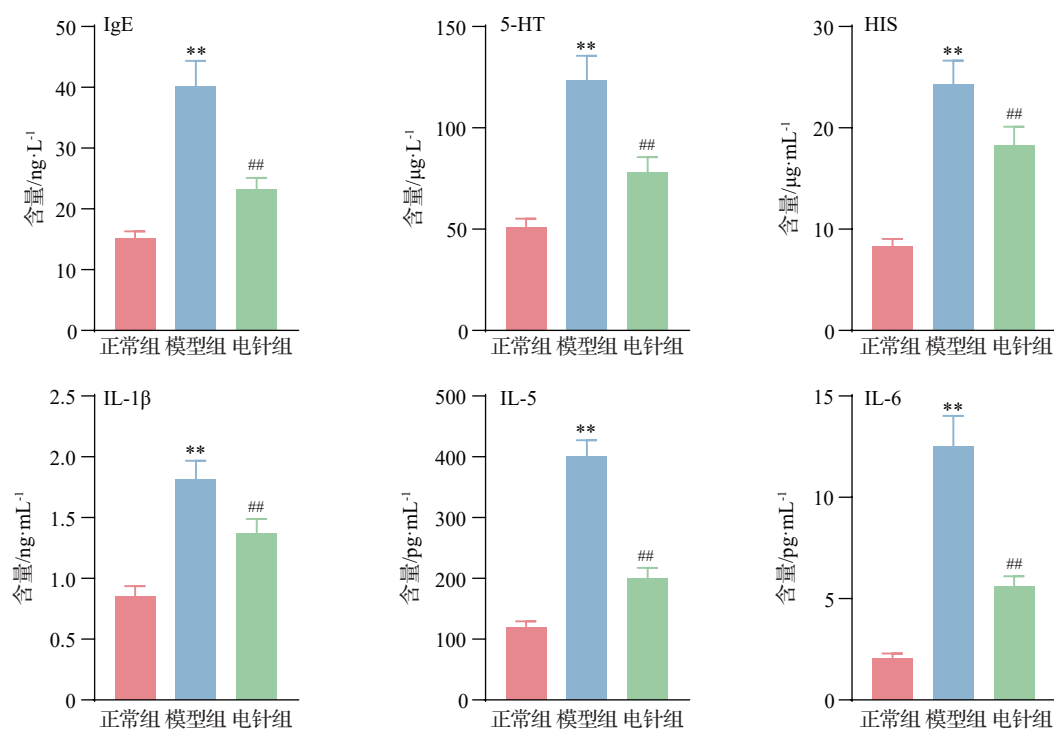
与正常组比较,模型组大鼠皮肤TRPV1、PKC蛋白表达及p-PKC/PKC比值升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠皮肤TRPV1、PKC蛋白表达及p-PKC/PKC比值降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图9。

3 讨论

UR属中医“风疹”“瘾疹”范畴。《金匱要略·水气病脉证并治》记载“风气相搏,风强则为瘾疹,身体为痒”,说明瘾疹是由风邪与体内正气相搏结所

致,以瘙痒为典型症状。《诸病源候论·风瘙隐疹生疮候》则有“人皮肤虚为风邪所折,则起瘾疹”说法,强调体质虚弱、感受风邪而发疹是本病核心病机。针灸曲池、血海治疗荨麻疹等皮肤瘙痒,由来已久。曲池为大肠经合穴,而“合主逆气而泄”,故临床常以其疏风泄热、调和营卫,如《针灸资生经》认为“曲池疗遍身风疹”。血海别名“百虫窠”,是治疗皮肤病入血分的主要穴位,《类经图翼》称其可疗“肾脏风,皮肤湿痒”。国医大师吕景山在《吕景山对穴》中提出“曲池清肺透表,血海调血和里,合则祛风止痒”,认为曲池、血海是针灸治疗风疹的核心对穴。因此本研究采用曲池、血海组成的止痒对穴作为针刺干预UR的穴位组合。电针是UR的特色针灸疗法之一^[13],根据既往临床及基础研究,本研究选择疏密波形、频率2 Hz/15 Hz参数电针干预“曲池”“血海”进一步探索电针治疗UR的机制^[14-15]。

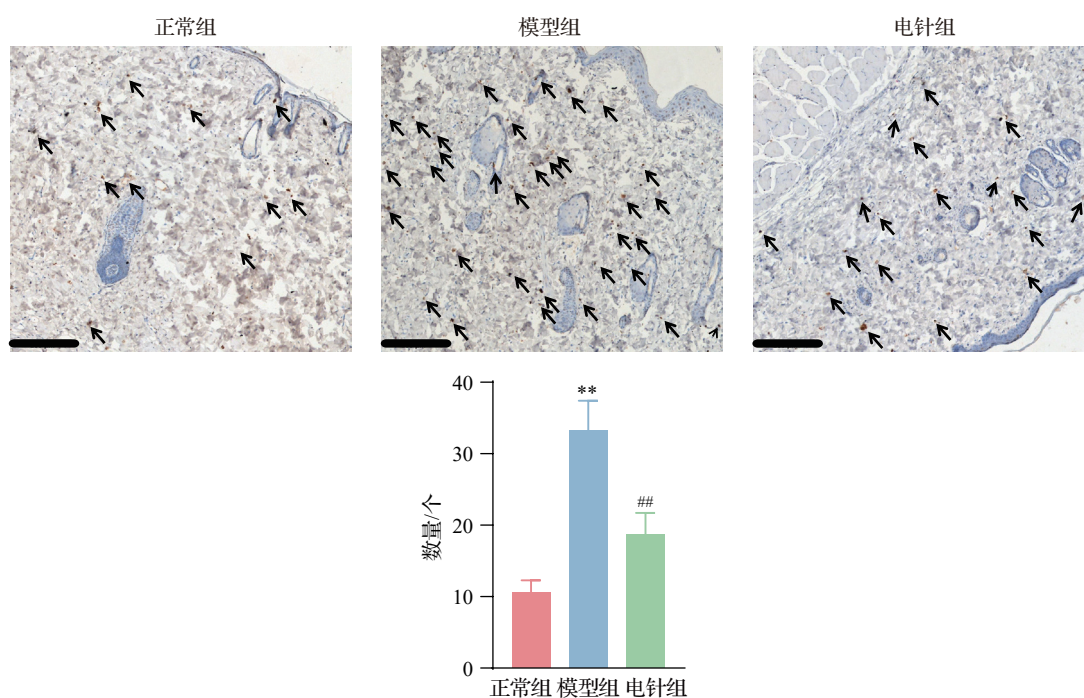
本研究采用优化后的PCA法构建UR大鼠模型,于造模后0.5 h观察结果显示:模型组与电针组大鼠均出现显著躁动不安,频繁搔抓背部、耳部等致敏区域,背部可见明显蓝斑。皮肤蓝斑面积、伊文思蓝渗出量及病理学改变可作为反映皮肤过敏反应与炎症程度的量化及病理学依据。经电针干



注: IgE 为免疫球蛋白 E, HIS 为组胺, 5-HT 为 5-羟色胺, IL 为白细胞介素。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 7 各组大鼠血清 IgE、HIS、5-HT 及 IL-1β、IL-5、IL-6 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, 8 只/组)

Fig. 7 Comparison of serum IgE, HIS, 5-HT, IL-1β, IL-5, and IL-6 contents of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 8 rats/group)



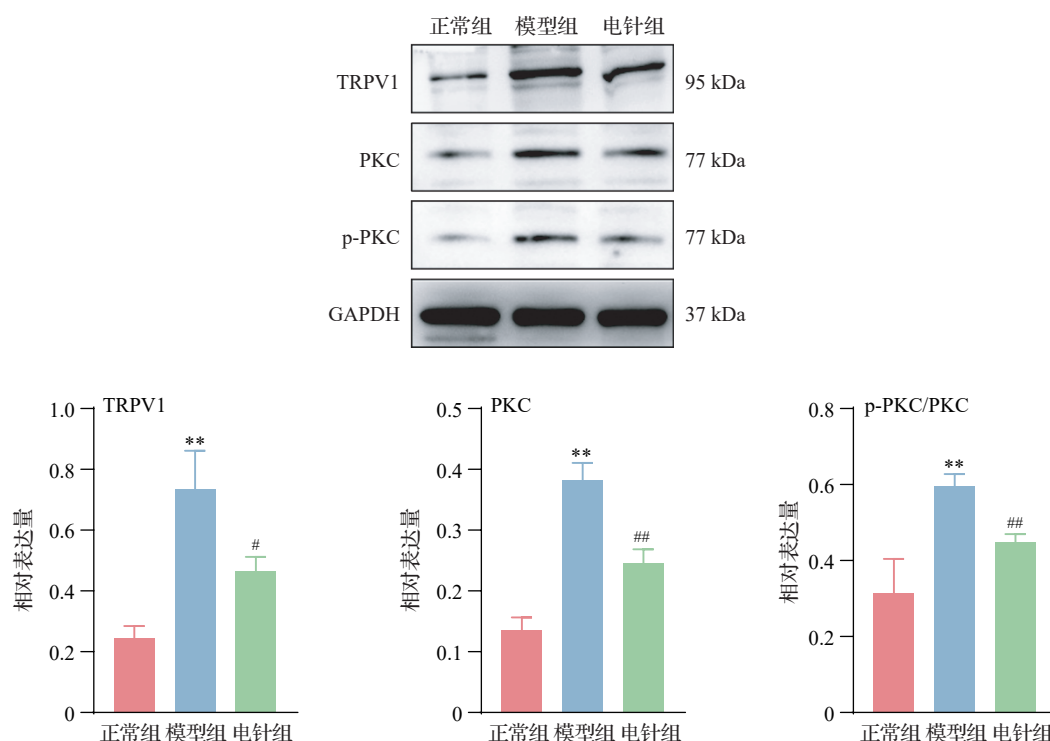
注: PIP2 为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸。标尺=200 μm。黑色箭头示 PIP2 阳性细胞。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 8 各组大鼠致敏皮肤 PIP2 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 8 Comparison of PIP2 positive cells in sensitized skin of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

预后,上述过敏症状及炎症反应较模型组显著减轻,提示电针对 UR 模型大鼠的皮肤瘙痒及风团损伤具有改善作用,初步验证了电针刺激干预 UR 的

效应有效性。MC 作为皮肤组织常驻免疫细胞,其活化时的脱颗粒过程是 UR 发病的标志性病理改变之一^[16]。本研究观察到:模型组大鼠致敏皮肤 MC



注: TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型 1, PKC 为蛋白激酶 C, p-PKC 为磷酸化的蛋白激酶 C。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 9 各组大鼠致敏皮肤 TRPV1、PKC、p-PKC 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

Fig. 9 Comparison of TRPV1, PKC, and p-PKC protein expression in sensitized skin of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

形态完整性受损, 伴随不同程度脱颗粒现象; 而电针“曲池”“血海”可促进致敏皮肤 MC 形态修复, 降低 MC 脱颗粒率, 该结果与本课题组前期研究结论一致^[17]。透射电镜观察结果显示: 与正常组相比, 模型组大鼠皮肤 MC 内致敏颗粒数量显著增加, 且颗粒包膜完整性受损、密度降低, 推测与 MC 受刺激后颗粒合成加速及脱颗粒增加相关; 电针“曲池”“血海”干预后, 皮肤 MC 胞质内嗜碱性分泌颗粒数量减少, 颗粒包膜完整性及包膜内颗粒密度均有所恢复, 提示电针“曲池”“血海”可通过抑制 MC 脱颗粒, 减轻其介导的继发性皮肤炎性损伤。

IgE 依赖性途径是 MC 激活的经典模式, MC 通过该途径激活后会释放 HIS、5-HT 等炎性介质^[18]。本研究结果显示, 模型组大鼠血清 IgE、HIS 及 5-HT 水平均显著高于正常组, 提示皮肤 MC 激活引发的致敏现象及炎性反应由 IgE 介导; 而电针止痒要穴“曲池”“血海”干预后, 上述指标显著降低, 表明电针可抑制 IgE 诱导的 MC 激活及其继发的过敏与炎性反应。值得关注的是, MC 颗粒除储存 HIS、5-HT 外, 还富含肝素、类胰蛋白酶、糜蛋白酶等多种蛋白酶及嗜酸性粒细胞趋化因子等趋化因子, 以

及多种细胞因子等活性物质, 这些成分在过敏反应调控、炎性反应进程及免疫防御中均发挥关键作用^[19]。本研究结果显示, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-5 及 IL-6 等促炎细胞因子水平显著升高, 证实这些炎性介质参与了过敏性瘙痒模型 UR 炎性反应的进展; 而电针“曲池”“血海”可下调 UR 模型大鼠血清 IL-1 β 、IL-5 及 IL-6 等炎性因子水平, 这一效应与本团队前期研究结论一致^[20]。

MC 脱颗粒的发生依赖于其颗粒膜与细胞膜的对接融合, 而细胞内 Ca^{2+} 浓度升高是这一过程的必要条件。其中, TRP 家族成员辣椒素受体 TRPV1 在此过程中起核心作用。TRPV1 作为躯体感受认知关键信号转换器通过高效介导 Ca^{2+} 跨膜转运 (效率约为其他阳离子的 5~10 倍), 将外源性或内源性刺激转换为电信号, 从而介导人体对环境冷热的感知及瘙痒、疼痛等知觉传递^[21]。皮肤 MC、真皮血管及毛囊周围 TRPV1 蛋白高度密集, 这一分布特征使皮肤成为人体接收外界信息最大的感觉器官^[22]。已有研究表明, TRPV1 通道不仅广泛参与 UR、特应性皮炎、神经性皮炎等瘙痒性皮肤病的急性发病过程, 还在慢性炎性反应阶段的维持中发挥重要作

用^[2]。本研究结果显示,模型组大鼠致敏皮肤 TRPV1 表达显著上调,而电针“曲池”“血海”干预后,TRPV1 表达显著降低,这提示 TRPV1 可能是电针“曲池”“血海”发挥止痒效应、改善 UR 瘙痒症状的关键调控蛋白,该结论与既往研究一致^[23]。

PIP2 作为 IgE-Fc 段与 MC 膜表面高亲和力受体 FcεRI 交联后 MC 内部活化的关键中间蛋白,是本团队前期证实的电针改善 UR 的信号蛋白之一^[24]。PIP2 水解产物亦深度参与后续信号级联,影响 UR 进展。一方面,PIP2 水解生成的肌醇三磷酸(IP3)在 UR 患者血清中显著升高,且与病情活动度正相关^[25]。本课题组前期已证实电针可通过调控皮肤组织 IP3 水平介导 TRP 家族亚型 TRPM2 表达,进而改善 UR^[5]。另一方面,PIP2 另一水解产物二酰基甘油(DAG)通过激活 PKC 等多个下游信号,促进细胞内 Ca²⁺水平升高,触发 MC 活化与脱颗粒^[26]。最新研究更表明 DAG 可经二酰基甘油激酶(DAGK)调控增强 TRPV1 通道活性敏感度,直接激活 TRPV1 通道^[27]。由此可见,PIP2、PKC 与 TRPV1 在 MC 活化过程中高度关联。其中 PKC 磷酸化形成的 p-PKC 是其发挥生物学效应的主要形式,p-PKC/PKC 为磷酸化占比,是直接反映 PKC 激活程度的关键指标。本研究显示,模型组大鼠皮肤组织中 PIP2、PKC 表达均显著增加,且 p-PKC/PKC 比值升高,提示 PIP2 及 PKC 活化增强参与了 UR 发病;而电针“曲池”“血海”干预后,PIP2、PKC 表达均显著降低,p-PKC/PKC 比值回落,表明它们是电针改善 UR 的效应蛋白。综上,PIP3、PKC 与 TRPV1 共同构成了电针止痒效穴“曲池”“血海”缓解 UR 皮肤瘙痒及风团皮损的核心效应分子通路。

总之,电针止痒效穴“曲池”“血海”可改善 UR 大鼠的皮肤瘙痒症状并减轻风团损伤,其作用机制可能与其下调皮肤 TRPV1 通道相关蛋白表达、抑制皮肤 MC 脱颗粒及减轻皮损局部炎症反应有关。然而 TRPV1 尚可表达于外周神经末梢、脊髓背根神经节等瘙痒传导通路上的多个关键节点^[28-29],未来应进一步探索针灸是否通过调控这些神经传导通路上的 TRPV1 活性或表达发挥止痒效应,从而在多维度上完善针灸调控的生物学规律解析^[30]。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 江夏,陈小玫,张敏. TRPV1 在皮肤中的分布及其介导的生理病理活动[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(6): 702-706.
- [2] Jiang X, Chen X M, Zhang M. TRPV1 in skin: the distribution and role in cutaneous physiopathologic activities (in Chinese) [J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2018, 32(6): 702-706.
- [3] Ruppenstein A, Limberg M M, Loser K, et al. Involvement of neuro-immune interactions in pruritus with special focus on receptor expressions[J]. Front Med, 2021, 8: 627985.
- [4] Zheng H, Xiao X J, Shi Y Z, et al. Efficacy of acupuncture for chronic spontaneous urticaria: a randomized controlled trial [J]. Ann Intern Med, 2023, 176(12): 1617-1624.
- [5] 李记泉,王巍,戴俭宇,等. 曲池和血海穴对止痒效应的研究进展[J]. 中国医药导报, 2023, 20(26): 51-54.
- [6] Li J Q, Wang W, Dai J Y, et al. Research progress on the antipruritic effect of qūchí and xuèhǎi acupoint pair (in Chinese)[J]. China Medical Herald, 2023, 20(26): 51-54.
- [7] 李记泉,李思佳,王列,等. 预电针调控瞬时受体电位通道相关蛋白防治荨麻疹的机制研究[J]. 针刺研究, 2023, 48(3): 274-280.
- [8] Li J Q, Li S J, Wang L, et al. Electroacupuncture preconditioning relieves cutaneous passive anaphylaxis by down-regulating IP3 mediated ROS/TRPM2 signaling pathway and inhibiting mast cell degranulation in rats with urticaria (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(3): 274-280.
- [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..
- [10] 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.
- [11] 戴学栋,方超,戴晓莉,等. SD 大鼠被动皮肤过敏实验影响因素的研究[J]. 中国药物警戒, 2014, 11(1): 4-7.
- [12] Dai X D, Fang C, Dai X L, et al. Study on experimental factors of passive cutaneous anaphylaxis in SD rats (in Chinese)[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2014, 11(1): 4-7.
- [13] 宋小仙,罗超利,兰波,等. AL(OH)3 佐剂的制备及其在 SD 大鼠被动皮肤过敏试验中的应用[C]//2016 年第六届全国药物毒理学年会, 2016: 228-229.
- [14] Song X X, Luo C L, Lan B, et al. Preparation of aluminum hydroxide adjuvant and its application in passive cutaneous anaphylaxis test of SD rats (in Chinese) [C]//The 6th National Annual Conference on Drug Toxicology, 2016: 228-229.
- [15] 光红梅,王庆利,王海学. 解读《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》[J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(9): 700-702.
- [16] Guang H M, Wang Q L, Wang H X. Introduction of guidance on stimulation, naphylaxis and hemolysis studies (in Chinese) [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2015, 34(9): 700-702.
- [17] Tsukamoto K, Yamamoto K, Makino T. Counteractive effect of *Paeonia lactiflora* root constituent mudanpioside E against

- suppressive effect of Shoseiryuto-extract on passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 884-889.
- [11] 李润祥, 冯承恩, 梁碧华, 等. Anti-DNP IgE联合DNFB诱导免疫性接触性荨麻疹小鼠模型的建立[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2015, 22(1): 25-28, 32.
- Li R X, Feng C E, Liang B H, et al. A mouse model of immunological contact urticaria by anti-dinitrophenol IgE combined with 2, 4-dinitrofluorobenzene (in Chinese) [J]. *Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-venereology*, 2015, 22(1): 25-28, 32.
- [12] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 255-257.
- Li Z R. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 2nd edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 255-257.
- [13] 李梦宇, 沈丹丹, 张波, 等. 针灸治疗慢性荨麻疹的临床经验[J]. *皮肤病与性病*, 2024, 46(5): 328-331.
- Li M Y, Shen D D, Zhang B, et al. Clinical experience of acupuncture in the treatment of chronic urticaria (in Chinese) [J]. *Journal of Dermatology and Venereology*, 2024, 46(5): 328-331.
- [15] 秦海燕. 电针促进外泌体FcεRI结合游离IgE抑制荨麻疹过敏反应机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2024.
- Qin H Y. Study on the mechanism of electroacupuncture promoting exosomal FcεRI binding to free IgE to inhibit urticarial allergic reaction (in Chinese) [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2024.
- [16] Nguyen S M T, Rupprecht C P, Haque A, et al. Mechanisms governing anaphylaxis: inflammatory cells, mediators, endothelial gap junctions and beyond[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7785.
- [17] 金曼诗. 电针对荨麻疹小鼠肥大细胞脱颗粒及NGF/TrKA/SP信号通路的影响研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2024.
- Jin M S. Effect of electroacupuncture on degranulation of mast cells and NGF/TrKA/SP signaling pathway in urticaria mice (in Chinese) [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2024.
- [18] Tanaka S, Furuta K. Roles of IgE and histamine in mast cell maturation[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2170.
- [19] Pahima H T, Dwyer D F. Update on mast cell biology[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2025, 155(4): 1115-1123.
- [20] 李记泉, 马铁明, 李思佳, 等. 预电针止痒穴对调节炎症反应防治荨麻疹的机制研究[J]. *针刺研究*, 2024, 49(10): 1047-1055.
- Li J Q, Ma T M, Li S J, et al. Electroacupuncture preconditioning prevents urticaria by regulating inflammatory response in rats with urticaria (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(10): 1047-1055.
- [21] Benítez-Angeles M, Morales-Lázaro S L, Juárez-González E, et al. TRPV1: structure, endogenous agonists, and mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3421.
- [22] Ständer S, Moormann C, Schumacher M, et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures [J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(3): 129-139.
- [23] 陈语嫣. 电针预处理对荨麻疹小鼠肥大细胞Tryptase/ PAR2/TRPV1/CGRP信号通路调控作用的机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2024.
- Chen Y Y. Study on the mechanism of electroacupuncture pretreatment on the regulation of Tryptase/ PAR2/TRPV1/ CGRP signal pathway in mast cells of urticaria mice (in Chinese) [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2024.
- [24] 陶金卓. 基于PIP2/IP3/Ca²⁺信号通路针刺血海、曲池穴治疗慢性荨麻疹的作用机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- Tao J Z. Study on the mechanism of acupuncture at Xuehai and Quchi acupoints in treating chronic urticaria based on the PIP2/IP3/Ca²⁺ signaling pathway (in Chinese) [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [25] Han Y L, Peng X M, Zhang H X, et al. Electroacupuncture regulates TRPV1 through PAR2/PKC pathway to alleviate visceral hypersensitivity in FD rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 1975228.
- [26] Draber P, Halova I, Polakovicova I, et al. Signal transduction and chemotaxis in mast cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778: 11-23.
- [27] Liu L Y, Yudin Y, Rohacs T. Diacylglycerol kinases regulate TRPV1 channel activity [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(24): 8174-8185.
- [28] Antal M. Molecular anatomy of synaptic and extrasynaptic neurotransmission between nociceptive primary afferents and spinal dorsal horn neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 2356.
- [29] Khalil N, Kagan T, Yosipovitch G. Cross-talk between neurons and immune cells in pruritus: from mechanisms to medicines [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2026, 26(1): 12.
- [30] 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.

收稿日期:2026-02-01 修回日期:2026-03-06