

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.09.014

苦参对特应性皮炎模型小鼠皮损组织 PAR-2、TrK-A 蛋白表达的影响



宋雪¹, 王成祥¹, 袁姣姣², 张新荣³, 王国蜜⁴, 高珊珊¹, 孙占学¹✉

1. 北京中医药大学第三附属医学院, 北京市朝阳区安外小关街 51 号, 100029; 2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 北京市昌平区东小口社区卫生服务中心; 4. 北京中医药大学

[摘要] **目的** 探讨苦参治疗特应性皮炎的可能作用机制。**方法** 60 只 BALB/c 雄性小鼠随机分为正常组、模型组、西替利嗪组和苦参高、中、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组小鼠用卵清蛋白 (OVA) 诱导特应性皮炎模型, 造模成功后, 苦参高、中、低剂量组小鼠分别给予苦参 3.75、2.50、1.25 g/(kg·d) 灌胃, 西替利嗪组给予西替利嗪片 10 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每天灌胃 2 次, 连续 3 周。分别于干预 1、2、3 周时观察小鼠每 30min 内搔抓次数; 干预 3 周后采用 HE 染色观察皮损组织病理形态学变化, 测定血清中 P 物质 (SP)、降钙素基因相关肽 (CGRP)、前列腺素 E2 (PGE2)、白三烯 B4 (LTB4) 浓度, 分别采用免疫印记和免疫组化法检测皮损组织中蛋白酶激活受体 2 (PAR-2) 和酪氨酸激酶 A (TrK-A) 蛋白表达。**结果** 与正常组同时间相比, 模型组小鼠干预 1、2、3 周时搔抓次数显著增加 ($P<0.01$); HE 染色显示小鼠的表皮过度角化、真皮层增厚、炎细胞浸润; 血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度明显升高; 皮损组织中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白表达增多 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组同时间比较, 除苦参低剂量组干预 1 周时外, 西替利嗪组和苦参各剂量组各时间点小鼠搔抓次数显著降低 ($P<0.01$); 西替利嗪组和苦参各剂量组小鼠的表皮和真皮比模型组明显变薄, 炎症细胞浸润明显减轻, 且以西替利嗪组和苦参高剂量组改善明显; 西替利嗪组和苦参各剂量组小鼠血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度均降低, 皮损组织中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与苦参高剂量组同时间比较, 苦参低剂量组小鼠搔抓次数明显升高 ($P<0.05$)。西替利嗪组及苦参各剂量组组间两两比较, 小鼠血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度, 皮损组织中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 苦参可以改善特应性皮炎瘙痒程度, 其机制可能与抑制皮损组织中 PAR-2 和 TRK-A 蛋白表达有关。**[关键词]** 特异性皮炎; 瘙痒; 苦参; 蛋白酶激活受体-2; 酪氨酸激酶 A

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种以严重瘙痒为主要临床症状的慢性炎症性皮肤病, 最常见于婴幼儿, 但有部分患者持续到成年^[1-2]。AD 容易复发, 并可全身瘙痒难忍, 严重影响患者生活质量^[3]。一般来说, 瘙痒是 AD 的前兆, 其瘙痒程度随着疾病的进展而加重^[4]。AD 瘙痒与许多因素有关, 其中已经证明蛋白酶激活受体 2 (PAR-2) 在炎症和瘙痒发病机制中发挥关键的调节作用^[5]。PAR-2 在 AD 患者的皮损中异常表达和激活, 导致

炎症和免疫反应、瘙痒和持续性表皮屏障紊乱^[6-7]。

苦参 (*Radix Sophorae Flavescentis*) 是豆科苦参属植物, 其根是重要的中药药用部分。苦参味苦、性寒, 具有清热解毒、燥湿止痒之功。临床研究^[8-9]表明, 苦参治疗 AD 临床效果显著, 可以缓解 AD 造成的皮炎和瘙痒。本研究通过皮肤敷育卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导小鼠 AD 模型, 并且通过检测苦参给药前后小鼠瘙痒程度、皮损指数以及酪氨酸激酶 A (TrK-A) 和 PAR-2 表达的变化情况, 探究苦参发挥治疗作用的可能分子机制, 为苦参在 AD 的临床应用提供临床依据。本研究通过中国中医科学院中医基础理论研究所动物实验伦理

基金项目: 国家留学基金青年骨干教师项目 (201906555021); 北京中医药大学 2018 年度青年教师项目 (2018-JYBZZ-JS181)

✉ 通讯作者: sunzhanxue@163.com

委员会批准(批号:2018-019)。

1 材料方法

1.1 动物

BALB/c 雄性小鼠 60 只, 4~6 周龄, 体质量 10~20 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物合格证号: SCXK(京)2020-0004。饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级动物实验室, 饲养条件: 光和暗循环各 12 h, 相对湿度 45%~65%, 温度 18~23 ℃, 自由饮食和水。

1.2 药物

苦参颗粒购自北京康仁堂药业有限公司(货号: 18021421), 按照生药浓度 0.5 g/ml 将苦参颗粒溶于无菌水制备苦参汤剂, 于 4 ℃ 冰箱保存。西替利嗪片购自 Sigma 公司(货号: Y0001197)。

1.3 主要试剂及仪器

OVA(货号: A8041)、4% 多聚甲醛(货号: P1110)、10% 中性福尔马林缓冲(货号: G2161)、HE 染色试剂(货号: G1120), 索莱宝科技有限公司; 前列腺素 E2 (PGE2, 批号: SEKM-0173-96T)、降钙素基因相关肽 (CGRP, 批号: SEKM-0034-96T)、白三烯 B4 (LTB4, 批号: SEKM-0007-96T)、P 物质 (SP, 批号: SEKM-0002-96T) ELISA 试剂盒, 联科生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: MD913053)、RIPA 蛋白裂解液(批号: MDL91201), 百奥思科生物医学技术有限公司; 抗 PAR-2 抗体(货号: ab138479)、抗 TrK-A(货号: ab8871)、抗 GAPDH 抗体(货号: ab8245), Abcam 公司; 免疫组化检测试剂盒(货号: SPN-9001), 中杉金桥生物技术有限公司; 戊巴比妥钠(批号: 20210019), 上海思域化工科技有限公司。

PowerPac Universal Power Supply 型 SDS-PAGE 电泳系统 (Bio-Rad 公司); ChemiDocMp 型化学发光成像系统 (Bio-Rad 公司); FDR-AX700 4K HDR 型摄像机 (Sony 公司); DM4000B 型显微镜 (Leica 公司); 3-30K 型低温离心机 (Sigma 公司); Multi-skan FC 型酶标仪 (Thermo Fisher 公司)。

1.4 动物分组及模型制备

小鼠适应性饲养 10 天后, 将 60 只小鼠依次编号 1~60, 从随机数字表中抽出前 10 个数字, 为正常组; 据此方法依次等分为正常组、模型组、西替利嗪组和苦参高、中、低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组小鼠根据文献 [10] 方法用

OVA 诱导 AD 模型, 具体方法为: 将 100 mg OVA 溶解于 100 μ l 生理盐水中, 把液体加到纱布 (1 cm $\times$ 1 cm) 上, 然后给予颈部皮肤处理, 1 周后移除, 并立即重复上述过程, 每只小鼠致敏 3 次。待小鼠出现剧烈的瘙痒、明显的湿疹样变和皮肤干燥的症状, 即为造模成功 [10]。造模成功后, 根据临床等效剂量 [11] 换算, 苦参的相应剂量为 2.50 g/(kg $\cdot$ d), 将此剂量设置为苦参中剂量组给药剂量, 在此基础上, 设置苦参高、低剂量组, 给药剂量分别为 3.75 和 1.25 g/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 西替利嗪组给予西替利嗪片 10 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 正常组和模型组给予 10 ml/(kg $\cdot$ d) 的体积量进行生理盐水灌胃。各组均每天灌胃 2 次, 连续 3 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 瘙痒程度 分别于干预 1、2、3 周后各评价 1 次。根据文献 [10] 的方法观察动物行为。首先将小鼠置于观察笼 (18 cm $\times$ 24 cm $\times$ 30 cm) 中驯化 1 h。移除纱布后, 立即将小鼠放回观察笼中。搔抓行为由 8 mm 摄像机自动记录 30 min。通过回放记录的录像评估搔抓频率。用后爪搔抓背部前额部分被认为是一种瘙痒反应, 一次搔抓通常包括 3 次以上重复的后爪搔抓动作。

1.5.2 皮肤病理 HE 染色 干预 3 周后, 将小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉。然后从皮损处切下 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 的皮肤标本, 立即用 4% 多聚甲醛固定 24 h。脱水、蜡浸和石蜡包埋后, 制作连续切片并放置在 10% 聚赖氨酸涂层玻片上进行 HE 染色, 然后在显微镜下观察皮肤病理变化。

1.5.3 血清 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度检测 干预 3 周后小鼠眼内眦取血, 然后在 4 ℃ 下以 3500 g 常温离心 15 min 以获得血清。根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 水平, 用酶标仪测定 450 nm 的 OD 值, 绘制出各自的标准曲线, 并根据标准曲线计算相应物质的浓度。

1.5.4 免疫印记法检测 PAR-2 和 TrK-A 蛋白表达 干预 3 周后, 各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠, 从皮损处切下 1.5 cm $\times$ 1.5 cm 的皮肤标本, 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中充分裂解。用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 胶进行电泳分离, 半干法转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭后, 使用抗 PAR-2、抗 TrK-A 和抗 GAPDH (1:2500) 一抗孵育, 然后使用辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的二抗孵育。通过增强型化学发光试剂观察和记录印迹信

号。使用 Image J pro plus 6.0 软件分析蛋白质的相对表达量。

1.5.5 免疫组化检测 PAR-2 和 TrK-A 蛋白表达
干预 3 周后, 各组采用随机数字表法选取 3 只大鼠, 从皮损处切下 1.5 cm×1.5 cm 的皮肤标本, 将其固定在 10% 中性甲醛缓冲液中。将组织包埋在石蜡中, 并切成 4 μm 厚的切片。经脱蜡、抗原修复和血清封闭液孵育后, 使用抗 PAR-2 和抗 TrK-A 抗体对脱蜡切片进行免疫组织化学标记染色。所有染色切片均通过光学显微镜进行检查, 以评估组织学变化。通过 Image J proplus 6.0 软件进行形态计量分析, 计算蛋白阳性率。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理, 图表采用 GraphPad Prism 6.0 软件制作。计量资料满足正态分布且方差齐时, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。不满足正态分布或方差不齐时, 则采用 Bonferroni 校正和 Kruskal-Wallis 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间瘙痒程度比较

表 1 示, 与正常组同时间比较, 模型组小鼠干预 1、2、3 周时搔抓次数显著增加 (*P*<0.01)。与模型组同时间比较, 除苦参低剂量组干预 1 周时外, 其余各组各时间点小鼠搔抓次数显著降低 (*P*<0.01)。与西替利嗪组同时间比较, 苦参各剂量组各时间点小鼠搔抓次数升高 (*P*<0.05)。与苦参高剂量组同时间比较, 苦参低剂量组各时间点小鼠搔抓次数明显升高 (*P*<0.05), 而苦参中剂量组差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

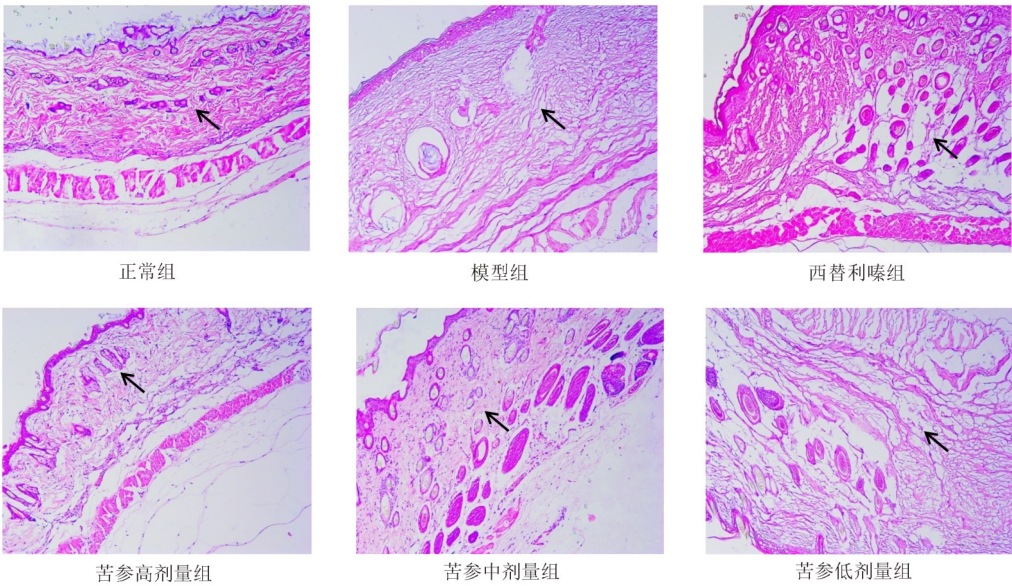
2.2 各组小鼠皮损组织病理学结果比较

图 1 (彩图请扫描本文二维码获取) 示, 与正常组比较, 模型组小鼠的表皮过度角化、真皮层增厚、炎细胞浸润, 表明模型制备成功。西替利嗪组和苦参各剂量组小鼠的表皮和真皮比模型组明显变薄, 炎症细胞浸润明显减轻, 说明西替利嗪组和苦参各剂量组均具有良好的治疗效果, 并且苦参高剂

表 1 各组小鼠不同时间每 30min 内搔抓次数比较 (次, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	干预 1 周	干预 2 周	干预 3 周
正常组	10	1.90±0.74 ^{a)}	2.50±0.53 ^{a)}	2.50±0.97 ^{a)}
模型组	10	135.40±6.40	130.10±2.13	139.30±5.01
西替利嗪组	10	49.00±3.46 ^{a)}	51.50±2.17 ^{a)}	51.00±3.65 ^{a)}
苦参高剂量组	10	62.80±3.61 ^{a) b)}	64.50±1.78 ^{a) b)}	62.50±2.37 ^{a) b)}
苦参中剂量组	10	73.30±1.88 ^{a) b)}	70.30±4.95 ^{a) b)}	72.70±2.87 ^{a) b)}
苦参低剂量组	10	104.30±8.43 ^{b) c)}	109.10±5.74 ^{a) b) c)}	100.60±2.63 ^{a) b) c)}

注: a) 与模型组比较, *P*<0.01; b) 与西替利嗪组比较, *P*<0.05; c) 与苦参高剂量组比较, *P*<0.05。



注: 图中箭头所示为炎症细胞浸润

图 1 各组小鼠皮损组织病理学变化 (HE 染色, ×100)

表 2 各组小鼠血清中 PEG2、SP、CGRP 和 LTB-4 浓度比较

(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PEG2	SP	CGRP	LTB-4
正常组	10	119.88±1.29 ^{a)}	51.50±15.71 ^{a)}	10.06±0.34 ^{a)}	84.05±4.93 ^{a)}
模型组	10	146.69±5.62	77.28±4.51	13.01±0.41	100.13±2.59
西替利嗪组	10	110.74±11.28 ^{a)}	56.03±0.91 ^{b)}	9.01±0.17 ^{b)}	85.52±2.00 ^{b)}
苦参高剂量组	10	114.05±4.23 ^{a)}	59.77±12.72 ^{b)}	9.11±0.62 ^{a)}	82.15±7.44 ^{a)}
苦参中剂量组	10	125.69±11.87 ^{a)}	56.28±5.79 ^{a)}	9.63±1.08 ^{a)}	81.95±6.66 ^{b)}
苦参低剂量组	10	118.60±10.79 ^{a)}	58.20±9.53 ^{a)}	8.74±0.71 ^{a)}	81.34±5.99 ^{a)}

注: PGE2, 前列腺素 E2; CGRP, 降钙素基因相关肽; LTB4, 白三烯 B4; SP, P 物质。

a) 与模型组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

量组和西替利嗪组改善最明显。

2.3 各组小鼠血清 PEG2、SP、CGRP 和 LTB-4 浓度比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 西替利嗪组和苦参各剂量组小鼠血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。西替利嗪组及苦参各剂量组组间两两比较, 小鼠血清中 PGE2、CGRP、LTB4 和 SP 浓度差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组小鼠皮损组织中 PAR-2、TrK-A 蛋白表达免疫印记法检测结果比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组小鼠皮损组织中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白相对表达量增多 ($P<0.01$)。与模型组比较, 西替利嗪组和苦参各剂量组小鼠皮损组织中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。西替利嗪组及苦参各剂量组组间两两比较, 小鼠皮损组织中 PAR-2、TrK-A 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠皮损组织中 PAR-2、TrK-A 蛋白电泳图见图 2。

表 3 各组小鼠皮损组织中 PAR-2 和 TRK-A 蛋白

相对表达量比较 ($/\text{GAPDH}$, $\bar{x} \pm s$)

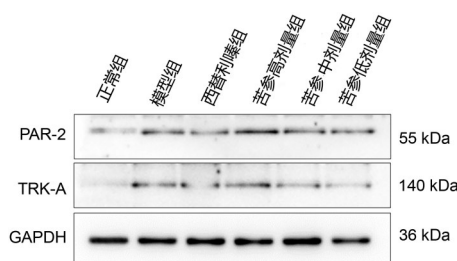
组别	鼠数	PAR-2/GAPDH	TrK-A/GAPDH
正常组	3	7.79±0.52 ^{a)}	3.64±0.09 ^{a)}
模型组	3	12.36±0.59	11.13±0.13
西替利嗪组	3	9.95±0.49 ^{b)}	7.91±0.15 ^{a)}
苦参高剂量组	3	10.41±0.40 ^{b)}	9.89±0.06 ^{b)}
苦参中剂量组	3	9.23±0.28 ^{b)}	6.78±0.16 ^{a)}
苦参低剂量组	3	9.09±0.23 ^{a)}	6.01±0.13 ^{a)}

注: PAR-2, 蛋白酶激活受体 2; TrK-A, 酪氨酸激酶 A。

a) 与模型组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠皮损组织中 PAR-2、TrK-A 蛋白表达免疫组化法检测结果比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组小鼠皮损组织



注: PAR-2, 蛋白酶激活受体 2; TrK-A, 酪氨酸激酶 A。

图 2 各组小鼠皮损组织中 PAR-2、TrK-A 蛋白电泳图

中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白阳性率显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 西替利嗪组和苦参各剂量组 PAR-2 和 TrK-A 蛋白阳性率均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。西替利嗪组及苦参各剂量组组间两两比较, 小鼠皮损组织中 PAR-2 和 TrK-A 蛋白阳性率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 各组小鼠皮损组织中 PAR-2 和 TRK-A 蛋白表达

免疫组化检测结果比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PAR-2 蛋白阳性率	TrK-A 蛋白阳性率
正常组	3	3.83±0.49 ^{a)}	4.15±0.07 ^{a)}
模型组	3	5.76±0.51	5.41±0.26
西替利嗪组	3	4.43±0.39 ^{a)}	4.16±0.12 ^{a)}
苦参高剂量组	3	4.41±1.00 ^{a)}	4.53±0.04 ^{a)}
苦参中剂量组	3	3.18±0.38 ^{b)}	3.34±0.26 ^{b)}
苦参低剂量组	3	3.99±0.33 ^{a)}	4.28±0.27 ^{a)}

注: PAR-2, 蛋白酶激活受体 2; TrK-A, 酪氨酸激酶 A。

a) 与模型组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

近年来, AD 的发病率呈上升趋势, 严重瘙痒是 AD 的常见现象^[12]。西替利嗪是西医临床常用口服抗组胺类药物, 故本研究将其设为对照药物。中医学认为, AD 的主因先天禀赋不足, 脾失健运, 湿热内生, 复感风湿热邪, 郁于腠理而发病。苦参作为一味传统中药, 具有清热燥湿、解毒祛风的功效, 如《滇南本草》中记载苦参“疗皮肤瘙痒, 血风癬疮, ……消风, 消肿毒”;《药性论》言其“治热

毒风，皮损烦躁生疮”。现代药理学研究结果显示，苦参中的类生物碱如苦参碱等有抗炎、抑菌、抗过敏、调节免疫等多种药理作用^[12]。本研究结果显示，与正常组同时间相比，模型组小鼠干预1、2、3周后搔抓次数显著增加，而西替利嗪组和苦参各剂量组均可显著抑制小鼠搔抓行为，但苦参各剂量减少小鼠搔抓次数不如西替利嗪片。苦参各剂量组间比较，苦参高剂量小鼠搔抓次数最低，且明显低于苦参低剂量组。另外，病理染色的结果表明，西替利嗪组和苦参各剂量组小鼠的表皮和真皮比模型组明显变薄，炎症细胞浸润明显减轻，说明西替利嗪片和苦参均具有良好的治疗效果，并且苦参高剂量和西替利嗪片效果相当。

既往研究显示，SP在AD患者瘙痒的形成中起着重要作用，其在AD患者皮损中的浓度也有所增加，神经生长因子（NGF）上调瘙痒神经肽[包括SP、CGRP和辣椒素受体（TRPV1）]的表达，导致肥大细胞脱颗粒^[13]。PAR-2介导包括皮肤在内的各种组织的广泛炎症^[14]，PAR-2诱导TRPV1神经纤维的激活以诱导SP和CGRP的释放，随后导致炎症介质的分泌和激活，最后增加瘙痒敏感性^[15-16]。临床研究表明，AD患者皮损中LTB4增加，同时皮下注射低剂量LTB4可诱导小鼠抓痒行为，提示LTB4是一种重要的内源性瘙痒物质^[17-18]。同时，PGE2是一种弱内源性瘙痒物质，可以显著降低皮肤对组胺和其他内源性瘙痒物质的瘙痒反应阈值^[19]。本研究结果表明，模型组小鼠血清中PGE2、CGRP、LTB4和SP浓度明显升高，皮损组织中PAR-2和TrK-A蛋白表达亦升高；而西替利嗪组及苦参各剂量组均可以降低血清中PGE2、CGRP、LTB4和SP浓度及皮损组织中PAR-2和TrK-A蛋白表达。另外，苦参各剂量组和西替利嗪组在降低血清中PGE2、CGRP、LTB4和SP浓度，抑制PAR-2受体和下游受体蛋白TrK-A的表达方面差异无统计学意义，这一结果需要进一步研究以验证。

综上所述，苦参治疗AD的作用机制可能是通过调节皮损组织中PAR-2和下游受体蛋白TrK-A的表达，降低血清中PGE2、LTB4、SP和CGRP的含量，从而改善瘙痒症状，但是本研究未直接验证苦参对该通路的调控作用。下一步将通过基因敲除鼠、离体细胞实验并增加受体阻断剂或干扰RNA等方法进一步阐释苦参是否直接通过该通路发挥作用，为苦参的综合利用提供科学依据。

参考文献

- [1] THOMSEN S. Epidemiology and natural history of atopic diseases[J]. Eur Clin Res J, 2015; 2. doi: 10.3402/ecrj.v2.24642.
- [2] AHN C, HUANG W. Clinical presentation of atopic dermatitis[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1027: 39-42. doi: 10.1007/978-3-319-64804-0_4.
- [3] TOMINAGA M, OGAWA H, TAKAMORI K. Possible roles of epidermal opioid systems in pruritus of atopic dermatitis[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(9): 2228-2235.
- [4] TERESIAK-MIKOŁAJCZAK, CZARNECKA-OPERACZM, JENEROWICZ D, et al. Neurogenic markers of the inflammatory process in atopic dermatitis: relation to the severity and pruritus[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2013, 30(5): 286-292.
- [5] TRIPATHI T, ALIZADEH H. Role of protease-activated receptors 2 (PAR2) in ocular infections and inflammation[J]. Receptors Clin Investig, 2014, 1(6): e2991.
- [6] BARRTP, GARZIAC, GUHAS, et al. PAR2 peptiducin-based suppression of inflammation and itch in atopic dermatitis models[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(2): 412-421.
- [7] LEE Y, KIM M, KONG ID, et al. Clinical improvement of atopic dermatitis by a topical cream containing a protease-activated receptor-2 (PAR-2) inhibitor 'Pal-KTTKS peptide'[J]. Korean J Dermatol, 2010, 48(11): 966-974.
- [8] 马天明, 韩宪伟, 刘贵军. 苦参祛风丸治疗成人轻中度特应性皮炎临床观察[J]. 河北中医, 2018, 40(11): 1671-1674.
- [9] 姬爱华, 王广新, 史传奎, 等. 苦参洗剂对儿童特应性皮炎皮损定植金黄色葡萄球菌影响的体内外研究[J]. 遵义医学院学报, 2017, 40(6): 641-645.
- [10] HAKUGAWA J, BAE SJ, VINUESA MA, et al. The inhibitory effect of LTB4 antagonist on eosinophil infiltration in cutaneous and gut late phase response in BALB/C mice sensitized with ovalbumin (OVA)[J]. Arerugi, 1997, 46(1): 42-48.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [12] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱对皮肤疾病的药理作用及其临床应用近况[J]. 抗感染药学, 2019, 16(12): 2040-2045.
- [13] NAKATSUJIT, HATA TR, TONG Y, et al. Development of a human skin commensal microbe for bacteriotherapy of atopic dermatitis and use in a phase 1 randomized clinical trial[J]. Nat Med, 2021, 27(4): 700-709.
- [14] DAVIDSON S, GIESLER GJ. The multiple pathways for itch and their interactions with pain[J]. Trends

Neurosci, 2010, 33(12):550-558.

- [15] GRANT AD, COTTRELL GS, AMADESI S, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice [J]. J Physiol, 2007, 578 (3): 715-733.
- [16] STEINHOFF M, VERGNOLLE N, YOUNG SH, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism[J]. Nat Med, 2000, 6 (2):151-158.
- [17] ANDOH T, SAITO A, KURAISHI Y. Leukotriene

B4 mediates sphingosylphosphorylcholine-induced itch-associated responses in mouse skin [J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(12):2854-2860.

- [18] ANDOH T, KATSUBE N, MARUYAMA M, et al. Involvement of leukotriene B4 in substance P-induced itch-associated response in mice[J]. J Invest Dermatol, 2002, 117(6):1621-1626.
- [19] TAKENAKA M, TANAKA Y, ANAN S, et al. IgE-mediated monocyte production of prostaglandin E2 (PGE2) by mite antigen in atopic dermatitis (AD)[J]. J Dermatol Sci, 1994, 8(1):55.

Effects of Kushen (*Radix Sophorae Flavescentis*) on the Expression of PAR-2 and TrK-A Protein in Skin Lesions of Atopic Dermatitis Model Mice

SONG Xue¹, WANG Chengxiang¹, YUAN Jiaojiao², ZHANG Xinrong³, WANG Guomi⁴, GAO Shanshan¹, SUN Zhanxue¹

1. Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Dong Xiao Kou Community Health Service Center; 4. Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of Kushen (*Radix Sophorae Flavescentis*) in the treatment of atopic dermatitis (AD). **Methods** Sixty BALB/c male mice were randomly divided into normal group, model group, cetirizine group and Kushen high-, medium- and low-dose groups, with 10 mice in each group. Except for the normal group, mice were induced with ovalbumin (OVA) to develop the atopic dermatitis model. After successful modeling, the mice in the Kushen high-, medium- and low-dose groups were given 3.75, 2.50, and 1.25 g/(kg·d) of Kushen by gavage respectively; mice in the cetirizine group were given 10 mg/(kg·d) of cetirizine tablets, while those in the normal group and model group received 10 ml/(kg·d) of normal saline by gavage. All the interventions were administered twice a day for three consecutive weeks. The number of scratches over 30 minutes was observed after 1-, 2- and 3-week treatment. After 3-week treatment, HE staining was used to assess the pathological changes of skin lesions, and the concentrations of substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), prostaglandin E2 (PGE2) and leukotriene B4 (LTB4) in serum were determined; immunoblotting and immunohistochemistry were used to detect the protein expressions of protease-activated receptor 2 (PAR-2) and tyrosine kinase A (TrK-A) in skin lesions, respectively. **Results** Compared to the results measured after 1-, 2- and 3-week treatment in the normal group, the number of scratches significantly increased at the corresponding time in the model group ($P < 0.01$). Moreover, HE staining results showed that the epidermis in the model group was hyperkeratinized; the dermis was thickened, and inflammatory cells were infiltrated in the mice; the concentrations of PGE2, CGRP, LTB4 and SP significantly increased, and PAR2 and TrK-A protein expressions in skin lesions significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the results measured after 1-, 2, and 3-week treatment in the model group, the number of scratches significantly decreased at the corresponding time in the cetirizine group and three Kushen groups, except for the result of low-dose Kushen group after 1-week treatment ($P < 0.01$). Moreover, the cetirizine group and three Kushen groups had thinner epidermis and dermis, and reduced inflammatory cell infiltration than the model group, and more improvement was seen in the cetirizine group and high-dose Kushen group; the concentrations of PGE2, CGRP, LTB4 and SP in the serum, as well as the protein expressions of PAR2 and TrK-A in the skin lesions in the cetirizine group and three Kushen groups significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the high-dose group, the low-dose Kushen group had significantly increased number of scratches ($P < 0.05$). There were no significant differences in the concentrations of PGE2, CGRP, LTB4 and SP in the serum, and the protein expressions of PAR2 and TrK-A in the skin lesions for the pairwise comparisons between the cetirizine group and three Kushen groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Kushen can improve the itching degree of AD, and the mechanism may be related to the inhibition of PAR-2 and TRK-A protein expression in skin lesions.

Keywords atopic dermatitis; pruritus; *Radix Sophorae Flavescentis*; protease-activated receptor-2; tyrosine kinase A

(收稿日期: 2021-09-28; 修回日期: 2022-01-15)

[编辑: 邓媛]