

基于 MAPK/ERK/JNK 信号通路探究染料木黄酮对荨麻疹大鼠的保护作用

翟翊然, 曹丽楠, 李伟栋, 郭冰心, 翟伟

南阳市中心医院 皮肤科, 河南 南阳 473000

摘要:目的 从丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) /胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) /c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (JNK1/2) 通路探究染料木黄酮对荨麻疹大鼠的保护机制。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、染料木黄酮低、高剂量 (150、300 mg/kg) 组, MAPK 激活剂 (茴香霉素) 组、染料木黄酮+茴香霉素组, 每组 12 只。通过卵蛋白血清致敏诱导建立大鼠慢性荨麻疹模型。观察大鼠搔抓症状; ELISA 法检测血清免疫球蛋白 E 抗体 (IgE) 及炎症介质如组胺、白三烯、前列腺素 (PGD₂)、5-羟色胺 (5-HT) 水平; 伊文思蓝染色观察血管通透性改变; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察蓝斑皮肤组织病理变化; 取腹腔肥大细胞计算脱颗粒比率; 免疫组化法观察蓝斑组织皮肤中磷酸化 MAPK (p-MAPK) 阳性表达水平; Western blotting 法检测蓝斑组织皮肤中 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路蛋白表达及上游酪氨酸激酶 (Lyn)、脾酪氨酸激酶 (Syk) 磷酸化蛋白、下游激活蛋白-1 (AP-1)、炎症通路核转录因子 κ B (NF- κ B) 蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠搔抓次数增多、耳部血管通透性升高、血清 IgE 及炎症介质分泌增多、肥大细胞脱颗粒比率升高、大鼠背部皮肤水肿及炎性浸润等病理损伤均加重, 背部蓝斑组织 MAPK/ERK/JNK 通路活化, 其下游炎症及脱颗粒相关通路蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 染料木黄酮低、高剂量组大鼠搔抓次数减少, 耳部血管通透性和肥大细胞脱颗粒比率降低, 血清 IgE 及炎症反应降低, 背部皮肤水肿及炎性浸润等病理损伤减轻, MAPK/ERK/JNK 通路及其介导的炎症、脱颗粒等信号途径活化受到抑制 ($P < 0.05$), 且染料木黄酮 300 mg/kg 组上述抑制作用更明显 ($P < 0.05$)。茴香霉素可逆转染料木黄酮的上述作用 ($P < 0.05$)。**结论** 染料木黄酮可抑制 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路活化, 阻断肥大细胞脱颗粒, 改善荨麻疹病理症状。

关键词: 染料木黄酮; 荨麻疹; 丝裂原活化蛋白激酶; 胞外信号调节激酶 1/2; c-Jun 氨基末端激酶 1/2; 肥大细胞脱颗粒

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)03-0458-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.03.003

Exploring the protective effect of genistein on urticaria rats based on MAPK/ERK/JNK signaling pathway

ZHAI Yi-ran, CAO Li-nan, LI Wei-dong, GUO Bing-xin, ZHAI Wei

Department of Dermatology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective From the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)/c-Jun N-terminal kinase 1/2 (JNK1/2) pathway, to explore the protective mechanism of genistein on urticaria rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, genistein low and high dose groups, MAPK activator (anisomycin) group, and genistein + anisomycin group, with 12 rats in each group. The rat model of chronic urticaria was established by serum sensitization induced by albumin. The scratching symptoms of rats were observed, ELISA method was used to detect the levels of serum immunoglobulin E antibody (IgE) and inflammatory mediators such as histamine, leukotriene, PGD₂, 5-HT, etc. Evans blue staining was used to observe changes in vascular permeability. HE staining was used to observe the pathological changes of locus coeruleus skin tissue, the mast cells of the abdominal cavity was taken to calculate the degranulation ratio, immunohistochemical method was used to observe the positive expression level of phosphorylated MAPK (p-MAPK) in the skin of locus coeruleus tissue. Western Blotting method was used to detect the expression of MAPK-ERK1/2-JNK1/2 pathway protein in the skin of locus coeruleus tissue, and the expression of upstream tyrosine kinase (Lyn), spleen tyrosine kinase (Syk) phosphorylation protein, downstream activator protein-1 (AP-1) and inflammatory pathway nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) protein. **Results** Compared with the control group, rats in the model group had increased the number of scratches, increased ear vascular permeability, increased the secretion of serum IgE and inflammatory mediators, and mast cell degranulation rate. The pathological damage of dorsal skin edema and inflammatory infiltration was aggravated. The MAPK/ERK/JNK pathway was activated in dorsal locus coeruleus, and the protein expression of downstream

收稿日期: 2022-01-06

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20200904)

作者简介: 翟翊然 (1985—), 男, 主治医师, 研究方向为皮肤性病。E-mail: qxysjn@163.com

inflammation and degranulation related pathway was increased ($P < 0.05$). Compared with model group, genistein group reduced scratching times, ear vascular permeability, and mast cell degranulation rate. And the vascular permeability and mast cell degranulation ratio were decreased, serum IgE and inflammatory response were decreased, pathological damage of back skin edema and inflammatory infiltration were alleviated, and activation of MAPK/ERK/JNK pathway and its mediated inflammation and degranulation signal pathway were inhibited ($P < 0.05$). The higher the dose of genistein was, the more obvious the inhibition was ($P < 0.05$). Anisomycin could reverse the above effects of genistein ($P < 0.05$). **Conclusion** Genistein can inhibit the activation of the MAPK-ERK1/2-JNK1/2 pathway, block the degranulation of mast cells, and improve the pathological symptoms of urticaria.

Key words: genistein; urticaria; MAPK; ERK1/2; JNK1/2; mast cell degranulation

荨麻疹是一种皮肤过敏性疾病, 具有发病反复、多发、迁延不愈等特点^[1]。荨麻疹发病机制复杂, 目前研究认为肥大细胞活化脱颗粒并释放组胺、白三烯等生物活性介质及白细胞介素等炎症因子, 是引起荨麻疹皮肤、黏膜血管扩张及水肿发生的关键机制^[2]。

近来有研究发现, 过敏原再次刺激机体时, 肥大细胞表面的免疫球蛋白 E (IgE)/高亲和力 IgE 受体 (FcεRI) 复合物可特异性结合过敏原, 刺激酪氨酸激酶磷酸化, 激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 响应细胞外刺激, 通过调节胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶 1/2 (JNK1/2) 活化, 介导炎症介质的释放, 导致过敏性反应的发生^[3]。预示调控 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路, 可能对阻断过敏反应的发生有重要作用。

染料木黄酮对皮肤损伤、炎症损伤有抑制作用, 对银屑病、过敏性接触性皮炎等慢性皮肤病有治疗作用^[4], 研究证实, 染料木黄酮可阻断 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路活化发挥抗癌作用^[5]。预示染料木黄酮也可能在荨麻疹皮肤病中有应用价值, 且其治疗作用很可能与调控 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路活化阻断过敏反应有关。本研究建立大鼠荨麻疹模型, 对此进行探究验证, 以期探寻治疗荨麻疹的特异性有效药物, 从而有效缓解患者疾病痛苦。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 SD 大鼠, 清洁级, 雄性, 体质量 180~220 g, 购自江苏华创信诺医药科技有限公司, 批号: SCXK (苏) 2020-0009。所有大鼠于本院动物房中适应性饲养 1 周, 温度 24 °C, 湿度 25%, 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 鼠笼保持清洁及透气。本实验经本院动物伦理委员会批准同意, 批号为 IACUC-01 (201901222)。

染料木黄酮 (质量分数 98%, 艾美捷科技有限公司, 货号 SIH-446); MAPK 激活剂茴香霉素 (艾

美捷科技有限公司, 货号 VB2176-10); 免疫球蛋白 E 抗体 (IgE) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (南京赛泓瑞生物科技有限公司, 货号 SEA545Mu03); 组胺 (上海将来实业股份有限公司, 货号 ST12436); 白三烯 ELISA 试剂盒 (上海韵泰信息科技有限公司, 货号 YT30098); 前列腺素 D2 (PGD2) ELISA 试剂盒 (武汉益普生物科技有限公司, 货号 YX-E20985); 5-羟色胺 ELISA 试剂盒 (上海臻科生物科技有限公司, 货号 ZK-7537); 伊文思蓝染液 (上海雅吉生物科技有限公司, 货号 D018); 苏木精-伊红 (HE) 染液 (上海雅吉生物科技有限公司, 货号 I032); MAPK (货号 ab227995)、p-MAPK (货号 ab4822)、ERK1/2 (货号 ab176640)、磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2, 货号 ab214362)、JNK1/2 (货号 ab112501)、磷酸化 JNK1/2 (p-JNK1/2, 货号 ab131499); 酪氨酸激酶 (Lyn, 货号 ab1890)、磷酸化 Lyn (p-Lyn, 货号 ab33914)、脾酪氨酸激酶 (Syk, 货号 ab40781)、磷酸化 Syk (p-Syk, 货号 ab192587)、激活蛋白-1 (AP-1, 货号 ab230273)、转录因子 κB (NF-κB, 货号 ab16502)、磷酸化 NF-κB (p-NF-κB, 货号 ab76302) 等抗体均购自美国 Abcam 公司; E100 光学显微镜 (日本尼康公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组 取 SD 大鼠, 参照文献方法^[6] ip 含卵白蛋白 1 mg/mL 氢氧化铝悬液混合液进行初次免疫, 第 10 天进行再次免疫, 建立荨麻疹模型, 以耳部及背部出现规则皮丘, 视为造模成功。

大鼠于初次免疫 6 d 后, 按随机数字表法, 随机分为模型组, 染料木黄酮低 (150 mg/kg)、高 (300 mg/kg) 剂量组, 茴香霉素 (10 μL/只) 组, 染料木黄酮+茴香霉素组, 每组 12 只。染料木黄酮和茴香霉素分别参照文献方法^[7-8]设置剂量, 染料木黄酮用 5% 乙醇溶解成 15、30 mg/mL 的溶液, 按 10 mL/kg 剂量 ig; 茴香霉素组经 ip 给予 10 mmol/mL、10 μL/只的茴香霉素; 染料木黄酮+茴香霉素组 ip 给予

300 mg/kg 染料木黄酮的同时, ip 给予茴香霉素; 模型组大鼠 ip 10 mL/kg 的 5% 乙醇溶液。各组均每天给药 1 次, 共 7 d。另取 12 只正常大鼠, 除不给予抗卵白蛋白抗体外, 其余同模型组, 作为对照组。末次给药结束后, 背部皮肤及耳部注射 0.1% 磷酸组胺 24 h 后, 经尾静脉注射 1% 伊文思蓝, 观察背部皮肤及耳部蓝染情况。

1.2.2 大鼠行为变化及搔抓次数统计 给药结束后观察大鼠行为变化, 并将大鼠单独置于安静环境中, 统计 15 min 内大鼠搔抓耳朵次数。

1.2.3 ELISA 法检测血清 IgE、组胺、白三烯、PGD₂、5-羟色胺 (5-HT) 水平 将大鼠麻醉, 取腹主动脉血 3 mL, 按 ELISA 试剂盒说明书方法测血清 IgE、组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 水平。

1.2.4 肥大细胞脱颗粒测定 随机取 6 只大鼠, 麻醉处死, 参照文献方法^[6]开腹、取腹腔液制备肥大细胞悬液, 用胶头滴管吸取 3 滴细胞悬液置于离心管中, 再于离心管中滴入中性红染液 1 滴, 混匀后取 1 滴于载玻片, 置于光学显微镜下计数脱颗粒的肥大细胞, 若细胞肿胀, 边缘不齐、颗粒褪色或自细胞膜内向外流, 则为脱颗粒细胞。计算肥大细胞脱颗粒比率。迅速取背部皮肤组织于 -80 °C 冰箱保存备用。

肥大细胞脱颗粒比率 = 脱颗粒数 / 肥大细胞总数

1.2.5 耳部皮肤血管通透性检测 剩余 6 只大鼠, 在背部皮肤及耳部注射 0.1% 磷酸组胺、尾静脉注射 1% 伊文思蓝后 30 min, 麻醉处死大鼠, 收集所有耳朵, 于丙酮 - 盐水 (7:3) 溶液中浸泡 24 h 后, 用酶标仪于 610 nm 处测溶液上清吸光度 (A) 值, A 值越大, 皮肤血管通透性越高。

1.2.6 HE 染色观察背部皮肤损伤状况 取背部蓝斑皮肤, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 常规水化、透明, 石蜡包埋制成石蜡切片, 取相同部位石蜡切片, 按 HE 染色液说明书方法染色处理后, 置于光镜下观察拍照。

1.2.7 免疫组化法检测背部皮肤组织 p-MAPK 阳性表达水平 取背部蓝斑皮肤组织石蜡切片, 脱蜡、水化、透化及抗原修复后, 滴加 p-MAPK 一抗 (1:300) 避光孵育 24 h 后, 滴加 IgG 二抗室温孵育 3 h, DAB 显色后于光镜下观察拍照, Image J 软件分析单位面积内阳性染色 (红棕色) 区域的平均光密度值。

1.2.8 Western blotting 检测背部蓝斑皮肤组织

MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路蛋白及上下游相关蛋白表达 取 -80 °C 保存的背部皮肤组织, 4 °C 解冻, 冰上研磨粉碎后, 取研磨液, 蛋白提取试剂盒轴提蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 取 80 μg 蛋白进行电泳及 Bio-Rad 转膜反应, 5% 脱脂奶粉封闭液室温水浴封闭 1.5 h, 4 °C 孵育盒中滴加一抗 MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2、Lyn、p-Lyn、Syk、p-Syk、NF-κB、p-NF-κB、AP-1 (1:1 500), β-actin (1:2 000) 孵育过夜, 滴加 1:2 000 的 HRP 羊抗兔二抗室温孵育 2 h, 化学发光法显影、曝光后拍照, 用 Quantity One 4.6.2 软件分析蛋白条带的相对灰度值。

1.3 统计学分析

SPSS 22.0 统计分析数据, $\bar{x} \pm s$ 表示数据 (符合正态分布), 独立样本间比较用 *t* 检验, 组间比较、两组间多重比较, 行单因素方差分析及 SNK-*q* 检验, *P* < 0.05 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染料木黄酮对大鼠一般行为及搔抓次数、血管通透性的影响

各组大鼠初次免疫后, 均无异常行为。再次免疫后, 与对照组比较, 模型组大鼠背部及耳部皮肤组织出现蓝染, 抓耳、易惊、烦躁不安行为增多, 大鼠搔抓耳部次数、耳部血管通透性均升高 (*P* < 0.05)。与模型组比较, 染料木黄酮 150、300 mg/kg 组大鼠抓耳、烦躁行为减少, 搔抓耳部次数、耳部血管通透性降低 (*P* < 0.05), 且染料木黄酮剂量越高上述症状改善越明显; 茴香霉素组抓耳、烦躁行为进一步加重, 搔抓耳部次数、耳部血管通透性升高 (*P* < 0.05)。染料木黄酮 + 茴香霉素组大鼠搔抓次数、耳部血管通透性高于染料木黄酮各剂量组 (*P* < 0.05), 见表 1。

2.2 染料木黄酮对大鼠 IgE 及组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 IgE、组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 水平均升高 (*P* < 0.05)。与模型组相比, 染料木黄酮 150、300 mg/kg 组大鼠血清 IgE、组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 水平均降低 (*P* < 0.05), 染料木黄酮 300 mg/kg 对上述指标改善作用优于 150 mg/kg 组; 茴香霉素组血清 IgE、组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 水平进一步升高 (*P* < 0.05)。染料木黄酮 + 茴香霉素组上述指标水平高于染料木黄酮 150、300 mg/kg 组 (*P* < 0.05), 见表 2。

表 1 大鼠搔抓次数、耳部血管通透性比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of scratching times and ear vascular permeability in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	搔抓次数(n=12)	A 值(n=6)
对照	—	1.40±0.10	0.06±0.01
模型	—	8.89±0.81*	0.26±0.02*
染料木黄酮	150 mg·kg ⁻¹	5.58±0.60 [#]	0.18±0.02 [#]
	300 mg·kg ⁻¹	2.51±0.29 ^{#@}	0.10±0.01 ^{#@}
茴香霉素	10 μL	13.35±1.26 ^{#@▲}	0.35±0.03 ^{#@▲}
染料木黄酮+茴香霉素	300 mg·kg ⁻¹ +10 μL	8.55±0.82 ^{@▲}	0.25±0.02 ^{@▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与染料木黄酮 150 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与染料木黄酮 300 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$;

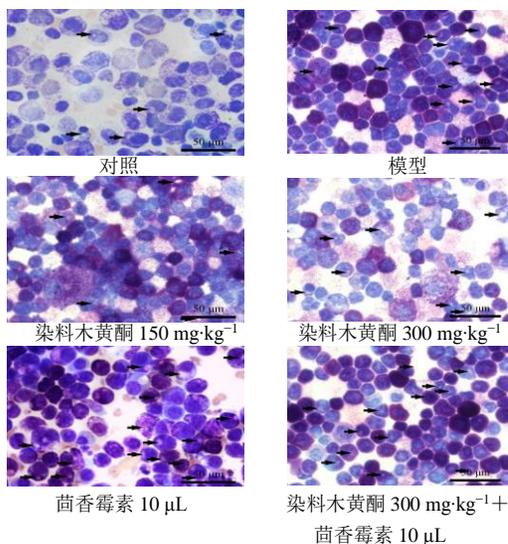
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [@] $P < 0.05$ vs genistein 150 mg·kg⁻¹ group; [▲] $P < 0.05$ vs genistein 300 mg·kg⁻¹ group

表 2 各组大鼠血清 IgE、组胺、白三烯、PGD2、5-羟色胺水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Table 2 Comparison of serum IgE, histamine, leukotriene, PGD2 and 5-HT levels in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量	IgE/(ng·mL ⁻¹)	组胺/(ng·mL ⁻¹)	白三烯/(pg·mL ⁻¹)	PGD2/(pg·mL ⁻¹)	5-HT/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	14.21±1.42	0.92±0.09	3.03±0.32	1.21±0.13	7.86±0.71
模型	—	30.33±3.03*	1.91±0.19*	20.26±2.03*	7.81±0.47*	30.33±3.21*
染料木黄酮	150 mg·kg ⁻¹	23.29±2.07 [#]	1.55±0.15 [#]	15.28±1.54 [#]	4.70±0.24 [#]	24.08±2.08 [#]
	300 mg·kg ⁻¹	16.77±1.69 ^{#@}	1.11±0.10 ^{#@}	8.11±0.82 ^{#@}	2.33±0.15 ^{#@}	16.32±1.23 ^{#@}
茴香霉素	10 μL	39.88±3.83 ^{#@▲}	2.45±0.23 ^{#@▲}	26.76±2.23 ^{#@▲}	9.41±0.63 ^{#@▲}	42.26±4.31 ^{#@▲}
染料木黄酮+茴香霉素	300 mg·kg ⁻¹ +10 μL	29.96±2.91 ^{@▲}	1.96±0.19 ^{@▲}	19.94±1.39 ^{@▲}	7.84±0.69 ^{@▲}	29.90±2.25 ^{@▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与染料木黄酮 150 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与染料木黄酮 300 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$;

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [@] $P < 0.05$ vs genistein 150 mg·kg⁻¹ group; [▲] $P < 0.05$ vs genistein 300 mg·kg⁻¹ group



“↑”为脱颗粒的肥大细胞
“↑” show degranulated mast cells

图 1 各组大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒形态图 ($n = 6$)Fig. 1 Morphology of degranulation of abdominal mast cells of rats in each group ($n = 6$)

2.3 染料木黄酮对腹腔肥大细胞脱颗粒的影响

与对照组相比,模型组大鼠腹腔肥大细胞肿胀、变形、胞膜边缘不整齐,石榴红色颗粒胞膜内向外流出,部分颗粒出现褪色、空泡化,肥大细胞脱颗粒比率增多 ($P < 0.05$)。与模型组相比,染料木黄酮 150、300 mg/kg 组大鼠肥大细胞胞质染色趋于均匀,胞膜逐渐完整,肥大细胞脱颗粒比率降低 ($P < 0.05$),其中染料木黄酮 300 mg/kg 组对肥大细胞脱颗粒比率的降低作用明显优于 150 mg/kg 组;茴香霉素组肥大细胞脱颗粒比率进一步升高 ($P < 0.05$)。染料木黄酮+茴香霉素组肥大细胞脱颗粒比例明显高于染料木黄酮各剂量组 ($P < 0.05$),见图 1、表 3。

表 3 各组大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒比率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 3 Comparison on the ratio of degranulation of mast cells in abdominal cavity of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量	肥大细胞脱颗粒比率/%
对照	—	9.88±0.81
模型	—	45.26±2.42*
染料木黄酮	150 mg·kg ⁻¹	30.18±1.52 [#]
	300 mg·kg ⁻¹	22.33±1.02 ^{#@}
茴香霉素	10 μL	55.37±2.70 ^{#@▲}
染料木黄酮+茴香霉素	300 mg·kg ⁻¹ +10 μL	44.83±2.21 ^{@▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与染料木黄酮 150 mg·kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与染料木黄酮 300 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$;

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [@] $P < 0.05$ vs genistein 150 mg·kg⁻¹ group; [▲] $P < 0.05$ vs genistein 300 mg·kg⁻¹ group

2.4 染料木黄酮对大鼠背部皮肤组织病理变化的影响

HE 染色可见,对照组大鼠皮肤表皮层薄厚正常,细胞结构清晰,无水肿;模型组大鼠可见表皮

层增厚及角化，真皮肿胀、周围小血管炎性浸润、水肿及扩张严重。与模型组相比，染料木黄酮 150、300 mg/kg 组大鼠表皮增厚及角化不全缓解，真皮水肿、炎性细胞减轻。茴香霉素组背部皮肤表层增厚、血管水肿及炎性细胞浸润进一步加重。染料木黄酮+茴香霉素组背部皮肤损伤情况较染料木黄酮组严重，见图 2。

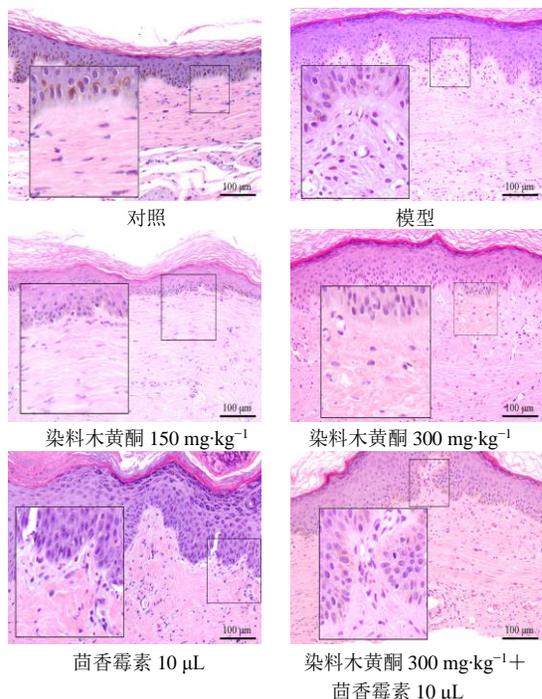


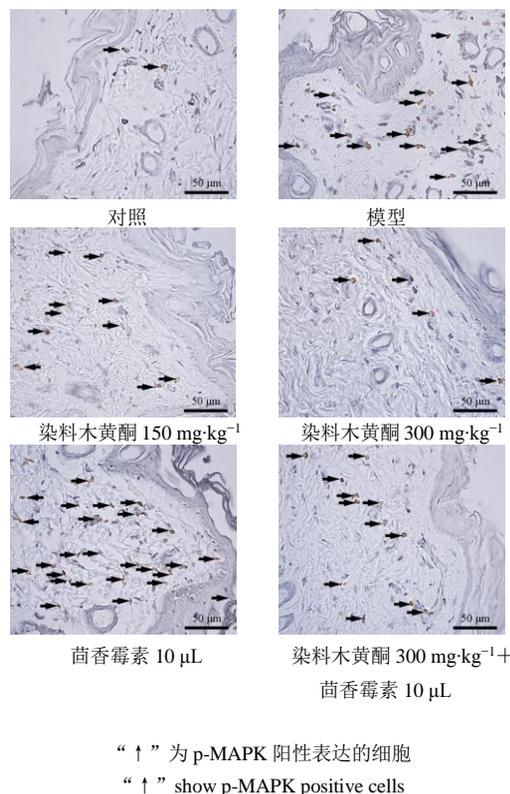
图 2 各组大鼠背部皮肤组织 HE 染色图 (×200/×400)
Fig. 2 HE staining back skin tissue of rat in each group (×200/×400)

2.5 染料木黄酮对大鼠 p-MAPK 阳性表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠背部皮肤组织中 p-MAPK 阳性表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比，染料木黄酮 150、300 mg/kg 组大鼠 p-MAPK 阳性表达降低 ($P < 0.05$)，染料木黄酮 300 mg/kg 组对上述指标的改善作用优于 150 mg/kg 组；茴香霉素组 p-MAPK 阳性表达进一步升高 ($P < 0.05$)。染料木黄酮+茴香霉素组上述指标水平较染料木黄酮组高 ($P < 0.05$)，见图 3、4。

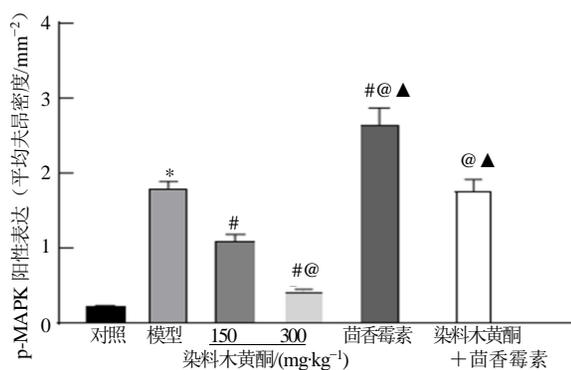
2.6 染料木黄酮对大鼠 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路及通路上下游相关蛋白 Lyn、Syk、NF-κB、AP-1 表达的影响

与对照组比较，模型组背部蓝斑皮肤组织中 p-MAPK/MAPK、(p-ERK1/2)/(ERK1/2)、(p-JNK1/2)/(JNK1/2)、p-Lyn/Lyn、p-Syk/Syk、p-NF-κB/NF-κB、AP-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组



“↑”为 p-MAPK 阳性表达的细胞
“↑” show p-MAPK positive cells

图 3 大鼠背部皮肤组织 p-MAPK 免疫组化染色图 (×400)
Fig. 3 Immunohistochemical staining of p-MAPK in back skin tissue (×400)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与染料木黄酮 150 mg·kg⁻¹ 组比较: @ $P < 0.05$; 与染料木黄酮 300 mg·kg⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$;

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; @ $P < 0.05$ vs genistein 150 mg·kg⁻¹ group; ▲ $P < 0.05$ vs genistein 300 mg·kg⁻¹ group

图 4 各组大鼠背部皮肤组织 p-MAPK 阳性表达水平比较 (n = 6)

Fig. 4 Comparison of p-MAPK positive expression in rat back skin tissue (n = 6)

相比，染料木黄酮 150、300 mg/kg 组大鼠背部蓝斑皮肤组织中 p-MAPK/MAPK、(p-ERK1/2)/(ERK1/2)

及 (p-JNK1/2) / (JNK1/2)、p-Lyn/Lyn、p-Syk/Syk、p-NF- κ B/NF- κ B、AP-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，染料木黄酮 300 mg/kg 组对上述指标的改善作用优于 150 mg/kg 组；茴香霉素组背部蓝斑皮肤组织中上述蛋白表达进一步升高 ($P < 0.05$)。染料木黄酮+茴香霉素组上述蛋白水平较染料木黄酮各剂量组高 ($P < 0.05$)，见图 5、6。

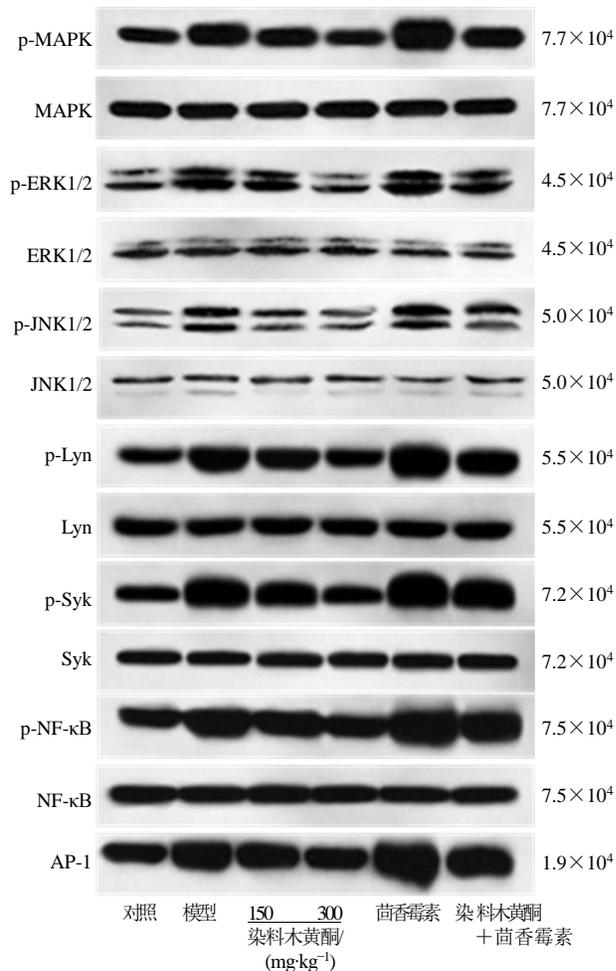


图 5 大鼠背部皮肤组织 p-MAPK/MAPK、(p-ERK1/2) / (ERK1/2) 及 (p-JNK1/2) / (JNK1/2)、p-Lyn、Lyn、p-Syk、Syk、p-NF- κ B、NF- κ B、AP-1 蛋白表达免疫印迹图

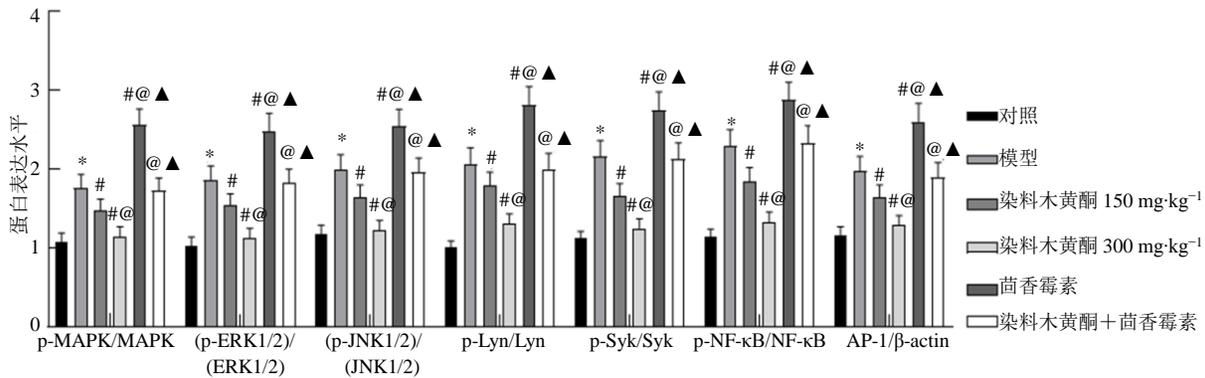
Fig. 5 Immunoblot of p-MAPK/MAPK, (p-ERK1/2) / (ERK1/2), (p-JNK1/2) / (JNK1/2), p-Lyn, Lyn, p-Syk, Syk, p-NF- κ B, NF- κ B, AP-1 protein expression in back skin tissue

3 讨论

风团、红斑、血管性水肿，瘙痒反复发作是荨麻疹的主要症状^[9]。动物卵蛋白血清致敏是模拟人类荨麻疹病症的主要方法之一^[10]。本研究用上述方法复制大鼠慢性荨麻疹模型后发现，大鼠出现抓耳

挠腮、易惊、烦躁不安现象，蓝斑皮下组织可见表皮层增厚、真皮层水肿、血管周围炎性浸润等类似人类荨麻疹组织学病理特征，提示造模成功。荨麻疹属于 IgE 介导的超敏反应。罗金成等^[11]发现致敏原初次刺激机体时，机体可产生特性 IgE 抗体，IgE 与肥大细胞及嗜碱性粒细胞表面的高亲和力受体结合，可再次识别相同抗原，并诱发肥大细胞脱颗粒，释放组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 等炎症介质，造成皮肤黏膜血管扩张、血管通透性增加、黏膜肿胀等变态反应的发生。本研究发现，模型组大鼠耳部皮肤血管通透性升高，血清 IgE、组胺、白三烯、PGD₂、5-HT 等炎症介质也明显升高的同时，肥大细胞脱颗粒数目也明显增多，进一步表明造模成功。染料木黄酮为大豆异黄酮中的主要成分，也可作为蛋白酪氨酸激酶特异性抑制剂，在抗癌领域中的研究较多^[12]。近来研究发现，染料木黄酮具有抗炎、促进皮肤损伤后修复等作用，研究发现其可治疗银屑病、过敏性接触性皮炎等慢性皮肤炎症损伤性病变^[5, 13]。但染料木黄酮在荨麻疹领域的研究较少。本研究发现经染料木黄酮干预治疗后，大鼠抓耳挠腮症状减轻，蓝斑区皮肤组织肿胀、血管扩张及炎症浸润等病变减轻，血管通透性、血清 IgE 及炎症介质释放降低，肥大细胞脱颗粒比率减少，且染料木黄酮剂量越高，大鼠上述荨麻疹病理变化减轻明显，表明染料木黄酮可能在治疗荨麻疹方面有潜在应用价值。

肥大细胞是过敏反应的效应细胞，阻断肥大细胞脱颗粒是治疗皮肤过敏性反应的关键思路^[14]。MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路是参与肥大细胞脱颗粒活化的关键通路之一。研究证实，肥大细胞表面的 IgE/Fc ϵ RI 受体识别及结合再次侵入机体的过敏原时，Fc ϵ RI 受体上体的 β 链和 γ 链可磷酸化，并给 Lyn 及 Syk 等磷酸化提供结合位点，磷酸化的 Lyn 及 Syk 促进生长因子受体结合蛋白 2 (GRB2) 的相关结合蛋白 2 (Gab2) 结合在 T 细胞活化连接蛋白上，诱发酪氨酸基序的 Btk 结合位点磷酸化，从而激活 MAPK 来放大细胞信号传导^[15-16]。MAPK 活化不仅可调控下游 ERK1/2 及 JNK1/2 转录因子活化，来激活炎症通路 NF- κ B 磷酸化活化，促进白细胞介素等炎症介质释放，还可激活转录因子 AP-1 活化来调控肥大细胞转录活化，而释放 PGD₂ 等花生酸类炎症介质，加重皮肤组织损伤^[17]。本研究发现，模型组大鼠蓝斑皮肤组织中 MAPK-ERK1/2-



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与染料木黄酮 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$; 与染料木黄酮 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; @ $P < 0.05$ vs genistein 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.05$ vs genistein 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group

图 6 大鼠背部皮肤组织 p-MAPK/MAPK、(p-ERK1/2)/(ERK1/2) 及 (p-JNK1/2)/(JNK1/2)、p-Lyn、Lyn、p-Syk、Syk、p-NF-κB、NF-κB、AP-1 表达比较 ($n = 6$)

Fig. 6 Rat back skin tissue p-MAPK/MAPK, (p-ERK1/2)/(ERK1/2) and (p-JNK1/2)/(JNK1/2), p-Lyn, Lyn, p-Syk, Syk, p-NF-κB, NF-κB, AP-1 expression comparison ($n = 6$)

JNK1/2 通路及其上游 Lyn-Syk 处于磷酸化活化状态, 提示 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路磷酸化活化可能参与荨麻疹肥大细胞活化及炎症介质释放。张小红等^[18]研究认为抑制肥大细胞脱颗粒过程中的 MAPK 活化, 可发挥抗过敏反应, 改善荨麻疹症状。茴香霉素可磷酸化 JNK1/2, 诱导 MAPK-ERK1/2 磷酸化活化, 已有大量文献将茴香霉素用作 MAPK 的激活剂来调控疾病的发展^[19]。本研究用 MAPK 激活剂茴香霉素进一步促进 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路活化后, 发现大鼠表现出更为严重的荨麻疹病理症状, 提示促进 MAPK-ERK1/2-JNK1/2 通路活化, 可能加重荨麻疹过敏反应进程。染料木黄酮组大鼠剂量越高, MAPK - ERK1/2 - JNK1/2 通路及 Lyn - Syk 通路抑制越明显, 肥大细胞脱颗粒数目及大鼠荨麻疹症状改善越明显, 证实染料木黄酮治疗荨麻疹作用, 可能与抑制 MAPK - ERK1/2 - JNK1/2 通路活化有关, 这与 Li 等^[5]发现的染料木黄酮抑制特异性皮炎 MAPK 通路活化, 发挥抗炎及止痒作用机制相一致。MAPK 激活剂茴香霉素可逆转染料木黄酮的上述作用。

综上所述, 染料木黄酮可抑制 MAPK - ERK1/2 - JNK1/2 通路活化, 阻断肥大细胞脱颗粒, 改善荨麻疹病理症状, 为染料木黄酮在荨麻疹领域的治疗提供一定依据。但肥大细胞脱颗粒介导过敏反应机制复杂, 涉及多条通路共同调节, 染料木黄酮发挥抗过敏作用改善荨麻疹症状的其他机制还需继续探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵作涛. 慢性荨麻疹诊治: 现状与展望 [J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(12): 1105-1109.
- [2] Wang H, Xu Y, Jin M, et al. SELE downregulation suppresses mast cell accumulation to protect against inflammatory response in chronic idiopathic urticaria [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2021, 182(2): 83-93.
- [3] Vukman K V, Ferencz A, Fehér D, et al. An implanted device enables *in vivo* monitoring of extracellular vesicle-mediated spread of pro-inflammatory mast cell response in mice [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 10(1): e12023.
- [4] Xu J, Xiong H, Zhao Z, et al. Genistein suppresses allergic contact dermatitis through regulating the MAP2K2/ERK pathway [J]. *Food Funct*, 2021, 12(10): 4556-4569.
- [5] Li K, Hong S, Lin S, et al. Genistein inhibits the proliferation, migration and invasion of the squamous cell carcinoma cells via inhibition of MEK/ERK and JNK signalling pathways [J]. *J BUON*, 2020, 25(2): 1172-1177.
- [6] 王垣芳, 王琳, 赵峰, 等. 防风通圣颗粒对大鼠慢性荨麻疹模型的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(11): 1374-1378.
- [7] 李洪英, 常瑞, 朱秋劲, 等. 染料木黄酮对大鼠体内 N-羟乙酰神经氨酸含量的影响及其与唾液酸转移酶相互作用的探讨 [J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 857-870.
- [8] 王富贵, 夏永智, 余海军, 等. P38 MAPK 在大鼠脊髓损伤后胶质瘢痕形成早期对 GFAP、vimentin 表达的调

- 控作用 [J]. 基础医学与临床, 2016, 36(4): 462-467.
- [9] 孙彬, 刘文珊, 李宏坤, 等. 中药调节慢性荨麻疹免疫机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 206-211.
- [10] Akca H M, Tuncer Kara K. Correlation of urticaria activity score in chronic spontaneous urticaria with serum C-reactive protein level and neutrophil/lymphocyte ratio [J]. *Dermatol Ther*, 2020, 33(6): e14532.
- [11] 罗金成, 陈曙光, 刘文英, 等. 自体全血注射对自身反应性慢性荨麻疹患者血浆 IgG 抗 FcεRI 自身抗体、总 IgE 水平和嗜碱性粒细胞 FcεRIα 表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(3): 248-253.
- [12] Vodnik V V, Mojić M, Stamenović U, *et al.* Development of genistein-loaded gold nanoparticles and their antitumor potential against prostate cancer cell lines [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 124:112078.
- [13] Wang A, Wei J, Lu C, *et al.* Genistein suppresses psoriasis-related inflammation through a STAT3-NF-κB-dependent mechanism in keratinocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 270-278.
- [14] Nakamura Y, Ishimaru K, Nakao A, *et al.* Time-restricted feeding in rest phase alters IgE/mast cell-mediated allergic reaction in mice [J]. *Allergol Int*, 2020, 69(2): 296-299.
- [15] Moñino-Romero S, Lexmond W S, Singer J, *et al.* Soluble FcεRI: A biomarker for IgE-mediated diseases [J]. *Allergy*, 2019, 74(7): 1381-1384.
- [16] Zhao X, Kawano S I, Masuda J, *et al.* G-CSF-dependent neutrophil differentiation requires downregulation of MAPK activities through the Gab2 signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(9): 1919-1933.
- [17] Fu L X, Chen T, Sun Q M, *et al.* Interleukin-35 inhibited the production of histamine and pro-inflammatory cytokines through suppression MAPKs pathway in HMC-1 cells [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2021, 17(1): 38.
- [18] 张小红, 李飞飞, 齐越, 等. 电针对荨麻疹大鼠腹腔肥大细胞中丝裂原活化蛋白激酶及细胞因子表达的影响 [J]. 针刺研究, 2020, 45(4): 299-304.
- [19] 于竹芹, 汪贯习, 王潇璐, 等. 胡黄连苷 II 干预脑缺血/再灌注损伤后 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路的作用机制 [J]. 解剖学报, 2021, 52(2): 196-204.

[责任编辑 高源]