

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002044

DNCB 诱导 TRPA1 基因敲除小鼠特应性皮炎模型的建立与评价

陈超¹, 周维康¹, 陈爱军¹, 吕凤林², 刘婉舒³, 马雪粟³

(1. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400016; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044;

3. 重庆市人民医院过敏反应科, 重庆 400014)

【摘要】目的:在 C57BL/6 遗传背景下的野生型以及瞬时受体电位通道 A1(transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1, TRPA1)基因敲除小鼠上建立 2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)诱导的特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)模型,初步探索 TRPA1 在该模型的作用。**方法:**首先将野生雄性 C57BL/6 小鼠随机分成实验组($n=6$),对照组($n=6$),建立 AD 模型。具体造模方案:在致敏阶段,于第 1 天小鼠背部及耳部分别使用 2% DNCB(丙酮/橄榄油 3:1)溶液及单纯丙酮/橄榄油溶液外涂。在激发阶段,于第 5、8、11、14、17、20 天背部及耳部分别外涂 0.5% DNCB 溶液及单纯丙酮/橄榄油溶液,共 6 次,造模后取皮损行 HE 染色,鉴定 AD 模型。通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测背部皮损 TRPA1 mRNA 和蛋白的表达水平,免疫组化检测 TRPA1 蛋白的定位及表达水平。然后随机选取 6 只 TRPA1^{+/+}(野生型)小鼠为模型组 I,6 只 TRPA1^{-/-}(敲基因型)小鼠为模型组 II,6 只 TRPA1^{+/+}小鼠为空白对照组,建立 AD 模型,具体造模方式同上。造模结束后取血清及耳部和背部皮损组织,检测病理生理各项指标。**结果:**皮损及 HE 染色显示,在野生型小鼠上成功建立了 AD 模型。qRT-PCR 结果显示,实验组背部皮损中 TRPA1 的 mRNA 相对表达升高,差异有统计学意义($t=4.93, P=0.008$);Western blot 结果显示,实验组背部皮损 TRPA1 蛋白表达升高,平均光密度值差异有统计学意义($t=34.32, P=0.000$);免疫组化显示,实验组 TRPA1 在表皮和真皮的表达均有不同程度的增加。进一步在 TRPA1 基因敲除小鼠上建立 AD 模型显示:与对照组相比,模型 I、II 组背部皮肤表现出明显的炎症性皮损,耳部明显肿胀。病理显示角化过度(和/或)角化不全、棘细胞层增厚、真皮淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,同时发现肥大细胞浸润增加。血清总 IgE 水平升高,且差异有统计学意义[(1.27 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ vs. (14.82 ± 0.26) $\mu\text{g/mL}$, $t=19.27, P=0.000$; (1.27 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ vs. (8.63 ± 0.28) $\mu\text{g/mL}$, $t=25.07, P=0.000$]。TH2 细胞因子[白介素-4(interleukin-4, IL-4)和白介素-13(interleukin-13, IL-13)]相对表达升高,且差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型 I 组相比,模型 II 组小鼠炎症性皮损和耳部肿胀程度减轻,棘细胞层的厚度及炎性细胞的浸润程度减轻,血清总 IgE 水平下降[(14.82 ± 0.26) $\mu\text{g/mL}$ vs. (8.63 ± 0.28) $\mu\text{g/mL}$, $t=16.34, P=0.000$], TH2 炎症因子相对表达下降。**结论:**在 C57BL/6 遗传背景下的野生型和 TRPA1 敲基因小鼠上成功建立 DNCB 诱导的 AD 模型,发现 TRPA1 表达上调及 TRPA1 基因敲除后抑制了 DNCB 诱导的 AD 炎症,说明 TRPA1 在 DNCB 诱导的 AD 中可能发挥重要的作用,但具体机制有待进一步研究。

【关键词】TRPA1;特应性皮炎;基因敲除;模型;小鼠**【中图分类号】**R758.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-11-08

Establishment and evaluation of a TRPA1-knockout mouse model of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis

Chen Chao¹, Zhou Weikang¹, Chen Aijun¹, Lü Fenglin², Liu Wanshu³, Ma Xuesu³

(1. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Bioengineering College, Chongqing University; 3. Department of Allergy, The Chongqing General Hospital)

【Abstract】Objective: To establish a model of 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced atopic dermatitis (AD) in wild-type andTRPA1-knockout C57BL/6 mice, and to investigate the role of TRPA1 in this model. **Methods:** Wild-type male C57BL/6 mice were randomly divided into experimental group and control group, with 6 mice in each group. A model of AD was established. In the sensitization stage, the mice were given external application of 2% DNCB and acetone-olive oil solution (3:1) on the back and acetone-olive oil solution alone on the ears on day

作者介绍: 陈超, Email: 244560524@qq.com,

研究方向: 特应性皮炎。

通信作者: 周维康, Email: zhou0506@163.com。

基金项目: 重庆市委资助项目(编号: cstc2015shmszx120063); 重庆市卫计委医学科资助项目(编号: 2015XMSB00025)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190327.0852.004.html>

(2019-03-27)

1, and in the challenge stage, the mice were given external application of 0.5% DNCB on the back and acetone-olive oil solution alone on the ears on days 5, 8, 11, 14, 17, and 20, with 6 times of treatment in total. HE staining was performed for skin lesions to identify whether an AD model was established successfully. Western blot and qRT-PCR were used to measure the protein and mRNA expression of TRPA1, and immunohistochemistry was used to identify the location of TRPA1 and measure its protein expression. A total of 6 TRPA1^{+/+} (wild-type) mice were randomly selected as model group I, 6 TRPA1^{-/-} (knockout genotype) mice were selected as model group II, and 6 TRPA1^{+/+} mice were selected as control group. An AD model was established according to the method above. After modeling, serum samples and skin lesions at the ears and the back were collected to measure related pathophysiological indices. **Results:** Skin lesions and HE staining showed that an AD model was successfully established in wild-type mice. As for the experimental group, the results of qRT-PCR showed a significant increase in the relative mRNA expression of TRPA1 in the back lesions ($t=4.93, P=0.008$); Western blot showed a significant increase in the protein expression of TRPA1 in the back lesions, with a significant change in mean optical density ($t=34.32, P=0.000$); immunohistochemistry showed varying degrees of increases in the expression of TRPA1 in the epidermis and the dermis. The AD model established in TRPA1-knockout mice showed that compared with the control group, the model groups I and II had marked inflammatory skin lesions on the back and marked ear swelling. Pathological examination showed hyperkeratosis and/or parakeratosis, thickening of the prickle cell layer, inflammatory cell infiltration dominated by lymphocytes in the dermis, and increased infiltration of mast cells in the model groups I and II. There was an increase in total serum IgE level and there was a significant difference between the control group and the model groups I/II [$(1.27 \pm 0.10) \mu\text{g/mL}$ vs. $(14.82 \pm 0.26) \mu\text{g/mL}$, $t=19.27, P=0.000$; $(1.27 \pm 0.10) \mu\text{g/mL}$ vs. $(8.63 \pm 0.28) \mu\text{g/mL}$, $t=25.07, P=0.000$]. There were increases in the relative expression of the TH2 cytokines interleukin-4 and interleukin-13, and there were significant differences between groups ($P<0.05$). Compared with the model group I, the model group II had significant reductions in the severity of inflammatory skin lesions, the degree of ear swelling, the thickening of the prickle cell layer, the degree of inflammatory cell infiltration, and the total serum IgE level [$(14.82 \pm 0.26) \mu\text{g/mL}$ vs. $(8.63 \pm 0.28) \mu\text{g/mL}$, $t=16.34, P=0.000$], as well as significant reductions in the relative expression of TH2 cytokines. **Conclusion:** A model of DNCB-induced AD has been successfully established in wild-type and TRPA1-knockout C57BL/6 mice. Upregulation of TRPA1 expression and TRPA1 knockout inhibit DNCB-induced inflammation in AD, suggesting that TRPA1 may play an important role in DNCB-induced AD, but further studies are needed to clarify the specific mechanism.

[Key words] TRPA1; atopic dermatitis; gene knockout; model; mouse

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种慢性炎症性皮肤病,其特征是剧烈瘙痒和复发性湿疹样病变^[1]。AD的发病机制可能是遗传和环境因素之间复杂的相互作用,与皮肤屏障功能障碍、免疫、瘙痒等多种因素有关^[2]。目前AD的治疗主要针对其症状,有效治疗仍然缺乏,有待进一步研究。

动物模型在AD领域对于疾病发病机制及治疗方法的探索发挥重要作用,DNCB作为一个半抗原,常用于建立AD动物模型。瞬时受体电位通道A1(TRPA1)是6次跨膜蛋白,属于TRP通道家族一员^[3],参与炎症、神经病理性疼痛以及作为组胺非依赖和组胺依赖性瘙痒的关键下游信号^[4]。研究显示,DNCB可以激活HEK细胞的TRPA1通道,是TRPA1的一种有效激动剂^[5]。本研究拟探索TRPA1是否参与DNCB诱导的AD模型形成,并初步评价TRPA1在该模型的作用。由于目前使用半抗原(如DNCB)诱导AD动物模型多采用BALB/c小鼠或NC/Nga

小鼠^[6],但是基因敲除或转基因小鼠大多是在C57BL/6遗传背景下建立,因此首先探索在C57BL/6小鼠上建立DNCB诱导AD的动物模型,初步研究TRPA1的表达变化。为进一步明确TRPA1的作用,在C57BL/6遗传背景下的TRPA1基因敲除小鼠上建立DNCB诱导AD的动物模型,并初步研究TRPA1在该模型的作用,为进一步机制研究奠定基础,同时为后续使用C57BL/6遗传背景下的基因敲除或转基因小鼠探讨AD提供一定的动物建模思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从美国Jackson实验室引种C57BL/6遗传背景下的TRPA1基因敲除小鼠。首先选取8~10周龄野生型C57BL/6雄性小鼠12只,随机分为实验组和对照组,每组各6只,建

立 AD 模型。然后选取 8~10 周龄雄性 TRPA1^{-/-}(敲基因型)6 只和 TRPA1^{+/+}(野生型)小鼠 12 只,建立 AD 模型。所有实验动物均在实验前 1 周进行适应性饲养,实验小鼠饲养于 SPF 级环境中,12 h 光照/12 h 黑暗交替。

1.2 主要试剂

2,4-二硝基氯苯(DNCB)购于 Sigma 公司,逆转录试剂盒购于 Thermo 公司,real-time PCR 试剂盒购于 Roche 公司,引物由 Invitrogen 公司合成。BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 ECL 发光试剂盒购自碧云天,TRPA1 抗体购自 Novus 公司,对应的荧光二抗购自 Proteintech 公司。小鼠 IgE ELISA 试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。HE 染色试剂盒、甲苯胺蓝染色试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 实验分组及 AD 模型的建立

小鼠适应性饲养 1 周后,开始建模。首先在野生型 C57BL/6 雄性小鼠上建模,将其随机分为实验组($n=6$)和对照组($n=6$),具体 AD 造模方式如图 1 所示。在造模前 2 d,剃去小鼠背部毛发。在造模致敏阶段,第 1 天用微量移液器与毛刷配合,将 2.0% DNCB 150 μ L 及溶剂(丙酮/橄榄油=3:1)150 μ L 均匀涂抹于实验组及对照组小鼠背部,另取 20 μ L 涂抹于小鼠双耳耳背部。在造模激发阶段,从第 5 天开始,将 0.5% DNCB 150 μ L 及溶剂(丙酮/橄榄油=3:1)150 μ L 均匀涂抹于实验组及对照组小鼠背部,另取 20 μ L 涂抹于小鼠双耳耳背部。再在第 8 天、第 11 天、第 14 天、第 17 天、第 20 天,每间隔 2 d 重复此刺激,于第 21 天处死小鼠。然后在 TRPA1 基因敲除小鼠上建立模型,选取 8~10 周龄雄性 TRPA1^{-/-}(敲基因型)6 只和 TRPA1^{+/+}(野生型)小鼠 12 只。其中随机选取 6 只 TRPA1^{+/+}小鼠为对照组,选取 6 只 TRPA1^{-/-}鼠为模型组 I,6 只 TRPA1^{-/-}小鼠为模型组 II,具体 AD 造模方式同上(图 1)。

1.4 检测指标以及方法

1.4.1 皮损及耳部肿胀程度评价 分别于每次 AD 模型建立过程中药物涂抹后评估小鼠皮损及耳部肿胀程度。参照文献报道^[7],皮损严重程度通过评估 4 个症状:水肿;红斑/出血;表皮剥脱;鳞屑/干燥,每种症状按照 0(无)、1(轻度)、2(中度)和 3(严重)等级,分别于药物涂抹后合计每只小鼠的症状评分。采用游标卡尺测量小鼠双侧耳部厚度,测量 3 次后取其平均值。

1.4.2 皮损组织病理学观察 处死小鼠后,剪取小鼠背部病灶/涂液部位皮肤及耳部组织以 4%多聚甲醛进行固定,经过常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后,按照试剂盒说明进行 HE 染色及甲苯胺蓝染色。

1.4.3 qRT-PCR 法检测皮损组织 mRNA 水平 于 21 d 时取下实验组与对照组背部皮肤,采用 Trizol Reagent 提取总 RNA,紫外线分光光度计测定 RNA 浓度。以总 RNA 为模板,按照 Thermo 反转录试剂盒说明书进行 cDNA 的合成,然后以 Sybr Green 作为荧光标记物进行 PCR 反应。反应条件为:预变性(95 $^{\circ}$ C 10 min);PCR 反应(40 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s;60 $^{\circ}$ C 60 s)。并增加溶解曲线;60 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C,每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}$ C。所有反应均设立 3 个复孔,以 GAPDH 为内参照,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
TRPA1-F	GTCCAGGCGTGTCTATCG	227
TRPA1-R	AGCACTTCACACGAAGAACCA	
IL4-F	GGTCTCAACCCCAAGCTAGT	102
IL4-R	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT	
IL13-F	TGAGCAACATCACACAAGACC	173
IL13-R	GGCCTTGCGGTTACAGAGG	
IFN- γ -F	TCGCTAACTGACTTGAATGTCCA	93
IFN- γ -R	TCGCTTCCTGTTTTAGCTGC	
GAPDH-F	CTCGTCCCGTAGACAAAATGGT	131
GAPDH-R	GAGGTCAATGAAGGGTCTGTT	

1.4.4 Western blot 检测皮损组织 TRPA1 的蛋白水平 在提取皮损组织的总蛋白后,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定提取蛋白的浓度,加入缓冲液,于沸水浴 6~8 min 使蛋白变性。然后取等量蛋白上样,经过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后用湿转法将凝胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上,室温下 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,一抗 TRPA1 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;经 TBST 冲洗膜 3 次后,室温孵育二抗 1 h,ECL 显影,凝胶成像仪器摄取凝胶图像。

1.4.5 免疫组化检测皮损组织 TRPA1 的蛋白表达 取小鼠皮肤组织经 4%甲醛溶液固定、石蜡包埋,4 μ m 厚度连续切片,经脱蜡和复水、抗原修复后,用 3% H_2O_2 孵育切片以阻断内源性过氧化物酶;随后血清室温封闭 30 min,加一抗 TR-

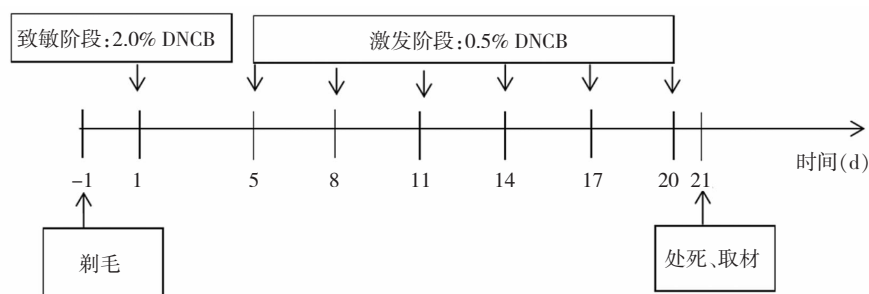


图 1 AD 造模方案

PA1(1:200)放于湿盒内 4℃ 孵育过夜,然后滴加辣根过氧化物酶标记二抗孵育室温孵育 1 h,经 DAB 显色、苏木素染色后脱水封片,显微镜下观察。

1.4.6 血清总 IgE 测定 于 21 d 时采用摘眼球取血法获得小鼠全血。在室温下放置 2 h,经 4℃ 1 000 × *g* 离心 20 min 后取其上清液,于 -80℃ 保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清总 IgE 浓度。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组实验数据使用独立样本 *t* 检验进行评估。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 野生型 C57BL/6 小鼠 AD 模型建立及 TRPA1 表达的变化

2.1.1 C57BL/6 小鼠 AD 模型建立 实验组小鼠背部及耳部皮肤逐渐可见水肿、红斑、脱屑、结痂等炎症反应,对照组小鼠皮肤无明显变化(图 2A)。与对照组鼠耳厚度[(0.16 ± 0.01) mm]相比,实验组小鼠耳厚度[(0.45 ± 0.01) mm]肿胀增厚明显,差异有统计学意义($t=10.58, P=0.000$)。背部与耳部皮损组织病理显示,实验组鼠皮损角化过度、表皮层增厚、真皮浅层有以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,而对照组小鼠皮肤未见明显炎症反应(图 2B)。以上实验结果表明在野生型 C57BL/6 小鼠中建立 AD 模型成功。

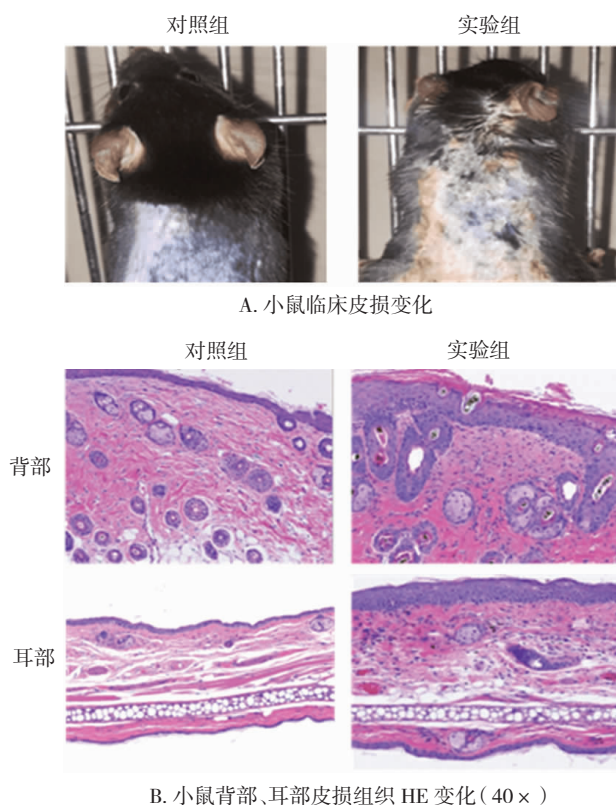
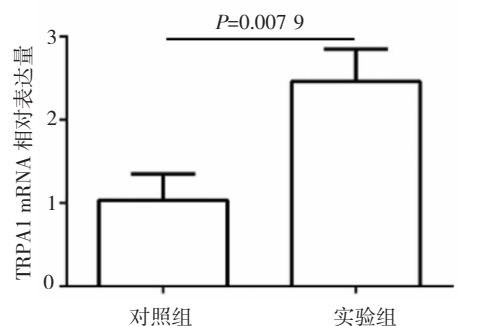
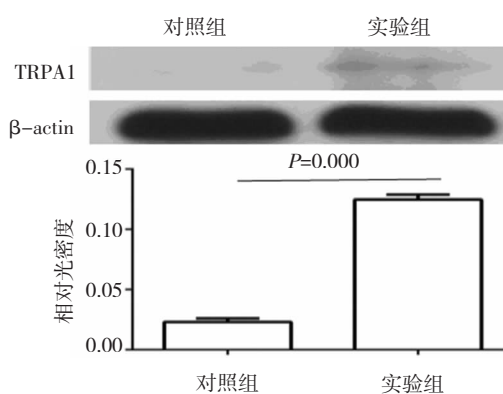


图 2 2 组 C57BL/6 小鼠皮损变化

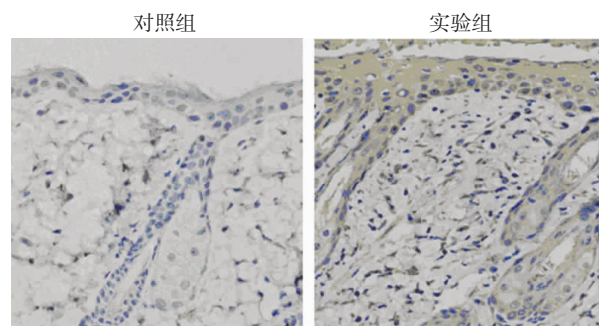
2.1.2 TRPA1 在 AD 小鼠皮肤组织中表达上调 qRT-PCR 分析皮损 TRPA1 mRNA 相对表达。结果显示,与对照组相比,实验组 TRPA1 的 mRNA 表达明显上调,差异有统计学意义($t=4.93, P=0.008$)(图 3A)。Western blot 分析皮损 TRPA1 蛋白表达。结果显示,与对照组相比,实验组 TRPA1 蛋白表达明显上调,平均光密度值有统计学差异[(0.023 ± 0.002) vs. (0.125 ± 0.002), $t=34.32, P=0.000$](图 3B)。免疫组化分析可见,与对照组相比,造模组小鼠皮肤组织中 TRPA1 在表皮、真皮均有表达,表达量明显增加(黑色箭头)(图 3C)。



A. qRT-PCR 检测 TRPA1 mRNA 的相对表达



B. Western blot 检测 TRPA1 蛋白的表达



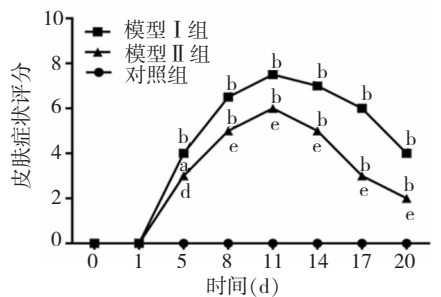
C. 免疫组化检测 TRPA1 蛋白的表达 (200 ×)

图 3 C57BL/6 小鼠对照组与实验组背部皮损组织中 TRPA1 的表达情况

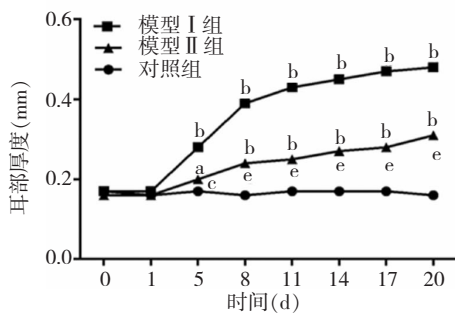
2.2 TRPA1 基因敲除小鼠 AD 模型的建立与评价

2.2.1 背部皮损及耳部肿胀程度的变化 经反复接触致敏后,对照组小鼠皮肤表现正常,模型 I、II 组小鼠皮肤可见不

同程度的水肿、红斑、脱屑、结痂等炎症反应。皮损动态评分显示,模型Ⅱ组低于模型Ⅰ组,且有统计学差异(图 4A)。小鼠耳部经反复接触致敏后,对照组小鼠耳部肿胀程度没有明显变化,模型Ⅰ、Ⅱ组小鼠耳部肿胀程度逐渐加重,模型Ⅱ组小鼠耳部厚度轻于模型Ⅰ组,且有统计学差异(图 4B)。



A. 不同组别小鼠皮炎症状评分



B. 不同组别小鼠耳部厚度动态变化

注:对照组,空白组;模型Ⅰ组:TRPA1^{-/-}小鼠造模组;模型Ⅱ组:TRPA1^{+/+}小鼠造模组;与对照组对比,^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.001$;模型Ⅰ组与模型Ⅱ组对比,^{*} $P < 0.05$; ^d $P < 0.01$; ^e $P < 0.001$

图 4 不同组别小鼠皮炎症状评分和耳部厚度动态变化

2.2.2 HE 组织学观察 对照组正常,未见炎症反应,模型Ⅰ、Ⅱ组小鼠背部或耳部皮肤可见角化过度和(或)角化不全、棘细胞层增厚、棘细胞部分细胞间水肿、细胞内水肿、真皮淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,且与模型Ⅰ相比较,模型Ⅱ组棘细胞层的肥厚程度及炎性细胞的浸润程度明显轻于模型Ⅰ组,如图 5 所示。

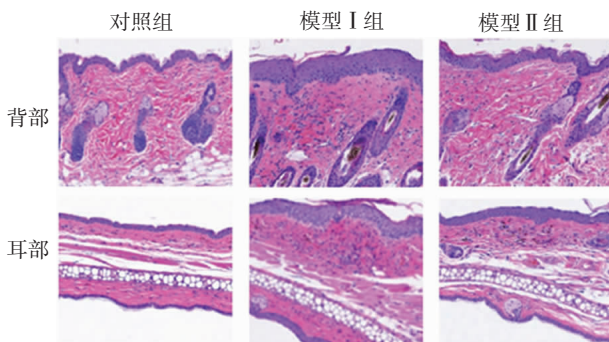
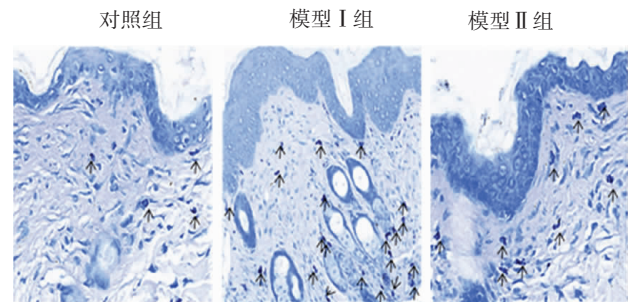


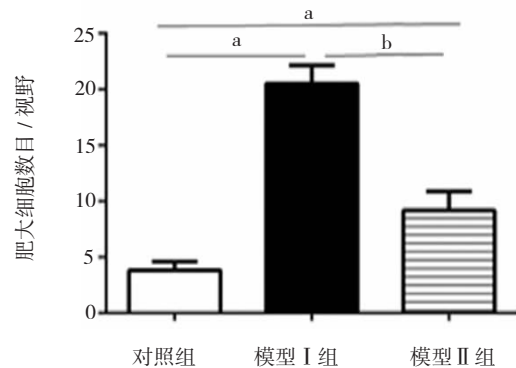
图 5 不同组别小鼠背部、耳部皮损组织 HE 变化 (40 ×)

2.2.3 肥大细胞计数 经台盼蓝染色后,通过计数平均肥大细胞数目发现,与对照组(3.83 ± 0.75)/视野,模型组Ⅰ组(20.50 ± 1.64)/视野和模型Ⅱ组(11.00 ± 1.55)/视野明显增加真皮肥大细胞数目,差异有统计学意义($t=22.59, P=0.000$; $t=6.95, P=0.000$)(图 6A)。同时与模型Ⅰ组相比,模型Ⅱ组明显减轻真皮肥大细胞数目,差异有统计学意义($t=11.66, P=0.000$)(图 6B)。



注:黑色箭头标记的是肥大细胞

A. 经台盼蓝染色后的肥大细胞 (200 ×)



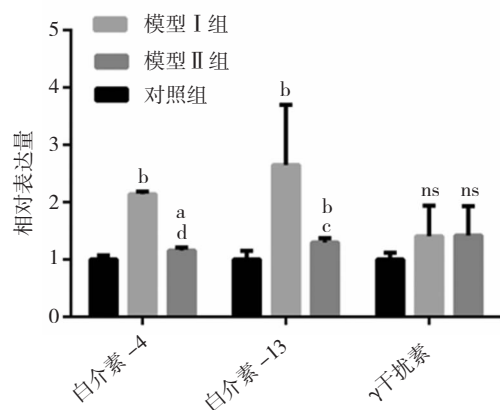
注:a,与对照组对比, $P=0.000$;b:模型Ⅰ组与模型Ⅱ组对比, $P=0.000$

B. 平均肥大细胞数目/视野

图 6 不同组别小鼠对照组与模型组背部皮肤肥大细胞染色

2.2.4 血清总 IgE 的变化 ELISA 检测小鼠血清总 IgE 浓度结果显示,与对照组(1.27 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ 相比,模型Ⅰ组(14.82 ± 0.26) $\mu\text{g/mL}$ 和模型Ⅱ组(8.63 ± 0.28) $\mu\text{g/mL}$ 的血清总 IgE 升高,且差异有统计学意义($t=19.27, P=0.000$; $t=25.07, P=0.000$)。与模型Ⅰ组相比,模型Ⅱ组血清总 IgE 水平降低,且差异有统计学意义($t=16.34, P=0.000$)。

2.2.5 皮肤组织炎症因子变化 qRT-PCR 检测皮肤组织相应炎症因子结果显示,与对照组相比较,模型Ⅰ、Ⅱ组 TH2 细胞因子(白介素-4、白介素-13)相对表达水平升高,差异均有统计学意义。而 TH1 细胞因子(γ 干扰素)相对表达水平差异无统计学意义。与模型Ⅰ组相比较,模型Ⅱ组 TH2 细胞因子(白介素-4、白介素-13)表达上调,且差异有统计学意义(图 7)。



注:与对照组对比,^a $P < 0.01$;^b $P = 0.000$;模型 I 组与模型 II 组对比,^c $P < 0.05$;^d $P = 0.000$;ns:无统计学意义

图 7 qRT-PCR 检测不同组别皮肤组织白介素-4、白介素-13、 γ 干扰素的相对表达

3 讨论

TRPA1 是 TRP 通道锚蛋白亚家族 (TRPA) 的唯一成员,可以被低温环境、酸性环境、过氧化氢等有害化学物质激活,通过介导钙离子内流来发挥生物学作用^[8]。TRPA1 在皮肤感觉神经纤维、角质形成细胞、肥大细胞、内皮细胞等均有表达,与瘙痒、疼痛、炎症反应有着密不可分的关系^[9]。在皮炎中,某些介质如 TSLP、白介素-31、白介素-13 通过激活 TRPA1 信号通路,引起瘙痒的感觉^[10-12]。但是在炎症方面,TRPA1 促进或抑制皮肤炎症。目前研究显示,TRPA1 抑制方酸二丁诱导的过敏性接触性皮炎及咪喹莫特诱导的银屑病样皮炎,发挥炎症保护作用^[13-14]。但是在咪喹酮诱导的过敏性接触性皮炎中促进皮肤炎症^[15]。由此推测,TRPA1 可能参与不同物质诱导的不同类型皮炎,且在不同疾病发病机制中发挥不同的作用。DNCB 作为一种常见半抗原,目前已有超过 130 篇论文描述使用 DNCB 建立 AD 模型。多次反复刺激出现典型的 AD 特征^[16]。研究显示,DNCB 可以激活 HEK 细胞的 TRPA1 通道,是 TRPA1 的一种有效激动剂^[5]。因此本研究探索 TRPA1 是否参与 DNCB 诱导的 AD 模型,并初步研究 TRPA1 在该模型的作用。

由于目前在国内外使用 DNCB 诱导 AD 模型多采用 BALB/c 小鼠,因其对 Th2 反应普遍是高应答,

容易诱导出炎症反应,而 C57BL/6 小鼠是 Th1 反应为主的应答,因此在 C57BL/6 小鼠中诱导 AD 模型较 BALB/c 鼠更加困难^[17],但基因敲除或转基因小鼠大多是在 C57BL/6 遗传背景下建立。本研究在 C57BL/6 小鼠上成功建立 DNCB 诱导的 AD 模型,并且首次发现 TRPA1 在 DNCB 诱导的 AD 模型的皮肤组织中 mRNA 和蛋白表达均升高。通过免疫组化发现,TRPA1 在表皮和真皮的表达均有不同程度增加,提示 TRPA1 可能参与 DNCB 诱导 AD 的发病机制。

为了进一步探索 TRPA1 在 DNCB 诱导 AD 中的作用,拟采用 C57BL/6 遗传背景下的 TRPA1 敲除基因小鼠进行研究。首先在 TRPA1 敲除基因型 (TRPA1^{-/-}) 和野生型 (TRPA1^{+/+}) 小鼠上建立由 DNCB 诱导的 AD 模型。宏观评价发现,与对照组相比,TRPA1^{+/+}、TRPA1^{-/-} 模型组小鼠皮损评分和耳部肥厚程度增加。Shinohara 等^[18]报道 AD 患者皮肤活检结果为表皮肥大、角化过度、细胞内水肿和炎性细胞浸润。组织学分析显示,TRPA1^{+/+}、TRPA1^{-/-} 模型组小鼠出现表皮增厚、棘皮病、炎性细胞浸润均符合典型的 AD 皮损组织学表现。由于肥大细胞在皮肤组织中的浸润是 AD 疾病的重要特征^[19],发现与对照组相比,TRPA1^{+/+}、TRPA1^{-/-} 模型组小鼠皮肤组织中肥大细胞浸润增加,且差异有统计学意义。同时发现 TRPA1^{+/+}、TRPA1^{-/-} 模型组小鼠血清总 IgE 升高,TH2 炎症因子 (白介素-4、白介素-13) 相对表达增加,与既往使用 DNCB 造模文献报道一致^[16,20]。以上结果提示,在 C57BL/6 遗传背景下的 TRPA1 敲除基因和野生型小鼠上成功建立 DNCB 诱导的 AD 模型。与 TRPA1^{+/+} 模型组相比,宏观评价发现,TRPA1^{-/-} 模型组小鼠皮损评分降低、耳部肿胀程度减轻;组织学评价发现,TRPA1^{-/-} 模型组小鼠棘细胞层的肥厚程度及炎性细胞的浸润程度减轻。同时发现血清总 IgE 及 TH2 炎症因子表达均下降。以上结果显示 TRPA1 基因敲除后,抑制了 DNCB 诱导的 AD 炎症反应,进一步证明 TRPA1 在 AD 中起到重要的作用,但具体机制有待进一步研究。

综上所述,本研究在 C57BL/6 小鼠上成功建立 DNCB 诱导的 AD 模型,首次发现 TRPA1 在该模型小鼠皮肤组织中表达上调。然后在 C57BL/6 遗传背景下的 TRPA1 基因敲除小鼠上成功建立 DNCB

诱导的 AD 模型,发现 TRPA1 基因敲除后抑制了 DNCB 诱导的 AD 炎症反应,进一步说明 TRPA1 在 DNCB 诱导的 AD 中可能起到重要的作用,具体机制有待进一步研究。本研究的建模方案为后续使用 C57BL/6J 遗传背景下的基因敲除或转基因模型探讨 AD 的发病机制或药物研发等提供一定的动物建模思路。

参 考 文 献

- [1] Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis[J]. *Lancet*, 2016, 387(10023): 1109–1122.
- [2] Otsuka A, Nomura T, Rerknimitr P, et al. The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis[J]. *Immunol Rev*, 2017, 278(1): 246–262.
- [3] Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, et al. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms[J]. *Nature*, 2015, 520(7548): 511–517.
- [4] Wilson SR, Gerhold KA, Bifolck–Fisher A, et al. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(5): 595–602.
- [5] Saarnilehto M, Chapman H, Savinko T, et al. Contact sensitizer 2, 4-dinitrochlorobenzene is a highly potent human TRPA1 agonist[J]. *Allergy*, 2014, 69(10): 1424–1427.
- [6] Park HJ, Choi WS, Lee WY, et al. A novel mouse model of atopic dermatitis that is T helper 2(Th2)-polarized by an epicutaneous allergen[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 58: 122–130.
- [7] Lee JH, Choi CS, Bae IH, et al. A novel, topical, nonsteroidal, TRPV1 antagonist, PAC-14028 cream improves skin barrier function and exerts anti-inflammatory action through modulating epidermal differentiation markers and suppressing Th2 cytokines in atopic dermatitis[J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 91(2): 184–194.
- [8] Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents[J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1269–1282.
- [9] Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation; pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(9): 644–661.
- [10] Wilson SR, The L, Batia LM, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch[J]. *Cell*, 2013, 155(2): 285–295.
- [11] Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, et al. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch; involvement of TRPV1 and TRPA1[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(2): 448–460.
- [12] Oh MH, Oh SY, Lu J, et al. TRPA1-dependent pruritus in IL-13-induced chronic atopic dermatitis[J]. *J Immunol*, 2013, 191(11): 5371–5382.
- [13] Feng J, Yang P, Mack MR, et al. Sensory TRP channels contribute differentially to skin inflammation and persistent itch[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 980.
- [14] Kemeny A, Kodji X, Horvath S, et al. TRPA1 Acts in a protective manner in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in mice[J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(8): 1774–1784.
- [15] Liu B, Escalera J, Balakrishna S, et al. TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis[J]. *FASEB J*, 2013, 27(9): 3549–3563.
- [16] Kitamura A, Takata R, Aizawa S, et al. A murine model of atopic dermatitis can be generated by painting the dorsal skin with hapten twice 14 days apart[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5988.
- [17] Yatsuzuka R, Inoue T, Jiang S, et al. Development of new atopic dermatitis models characterized by not only itching but also inflammatory skin in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 565(1–3): 225–231.
- [18] Shiohara T, Hayakawa J, Mizukawa Y. Animal models for atopic dermatitis; are they relevant to human disease?[J]. *J Dermatol Sci*, 2004, 36(1): 1–9.
- [19] Yip KH, Kolesnikoff N, Yu C, et al. Mechanisms of vitamin D(3) metabolite repression of IgE-dependent mast cell activation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(5): 1356–1364.
- [20] Jang HY, Koo JH, Lee SM, et al. Atopic dermatitis-like skin lesions are suppressed in fat-1 transgenic mice through the inhibition of inflammasomes[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(6): 73.

(责任编辑:张辉洁)