

基于皮肤 TRP 通道探讨三伏贴穴位经皮给药渗透机制的研究

赖蓉蓉, 翟苑好, 林媛媛, 曾瑶, 伍艳, 徐月红

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)



徐月红

教授, 博士生导师, 中山大学药学院教学实验中心主任。主要从事经皮肤 / 黏膜给药系统设计与渗透机理的研究。研究方向包括: 基于皮肤渗透和免疫探究三伏贴经皮给药的穴位增强效应机制; 皮肤外用制剂的处方设计和评价; 皮肤外用制剂国内外法规比较等。担任世界中医药联合会经皮给药专业委员会常务理事、广东省药品注册审评专家、广东省药学会药物制剂委员会候任主任委员, 广东省中药学会经皮给药专委会副主委等。主持国家自然科学基金和省自然科学基金约 10 项, 主持企业委托课题约 30 项, 协助企业获生产和临床批件 7 项; 发表论文约 50 篇。授权专利 5 项。

摘要:目的 研究三伏贴中有效成分芥子碱硫氰酸盐 (Sinapine thiocyanate, SPT) 和延胡索乙素 (Tetrahydropalmatine, THP) 对瞬时感受器电位离子通道 (Transient receptor potential ion channels, TRP) 的影响, 以及激活 TRP 通道后对三伏贴透皮行为的影响, 以探究三伏贴经穴位渗透的机制。方法 通过背根神经节细胞 Ca^{2+} 内流实验考察三伏贴有效成分对 TRP 通道的激活作用。通过 Western blot 和免疫荧光法比较肺俞穴与非穴位皮肤中 TRPV1 和 TRPA1 表达的差异以及给药后 TRPA1 表达的变化, 并且通过在体滞留和激光共聚焦 3D 扫描, 研究激活 TRP 通道对三伏贴穴位透皮行为的影响。结果 三伏贴中有效成分 SPT 可以促进 TRP 通道介导的 Ca^{2+} 内流。大鼠肺俞穴皮肤 TRPV1、TRPA1 的表达量显著高于非穴位皮肤 ($P < 0.05$), 三伏贴持续作用后肺俞穴和非穴位皮肤 TRPA1 的表达量下降。皮肤 TRPV1 和 TRPA1 被激活后, 经肺俞穴皮肤渗透的 SPT 和 THP 的皮肤滞留量均显著提高 ($P < 0.05$), 但对非穴位皮肤的滞留没有明显影响。结论 三伏贴中有效成分 SPT 对 TRP 通道具有激活作用, 且肺俞穴皮肤 TRPV1、TRPA1 表达量显著高于非穴位。穴位高表达 TRPV1、TRPA1 及三伏贴对 TRP 通道的激活作用为三伏贴穴位敷贴促透的机理之一。

关键词: 三伏贴; 芥子碱硫氰酸盐; 延胡索乙素; TRPV1; TRPA1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2022)11-1035-08

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.1035

引文格式: 赖蓉蓉, 翟苑好, 林媛媛, 等. 基于皮肤 TRP 通道探讨三伏贴穴位经皮给药渗透机制的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(11): 1035-1042.

Study on Enhanced Permeation Mechanism of Sanfu Patch at Acupoints Based on Skin TRP Channels

LAI Rong-rong, ZHAI Yuan-hao, LIN Yuan-yuan, ZENG Yao, WU Yan, XU Yue-hong

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To clarify the mechanism of per-acupoint penetration of Sanfu patch, study the effects of the active ingredients of Sanfu patch including sinapine thiocyanate (SPT) and tetrahydropalmatine (THP) on TRP channels, and further evaluate the influence of activating TRP channels on the transdermal behavior of Sanfu patch. **METHODS** The activation of TRP channels in dorsal root neurons (DRG) by the active ingredients of Sanfu patch was investigated by calcium-imaging experiments. The expressions of TRPV1 and TRPA1 in the skin of Feishu (FS) acupoints and non-Feishu (NFS) acupoints were detected by Western blot and immunofluorescence, and the changes of TRPA1 expression after administration with Sanfu patch were also measured by immunofluorescence.

收稿日期: 2022-04-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973491, 81473358); 广东省基础与应用基础研究基金 (2019A1515011161); 广东省中医药局科研项目 (20211080)

第一作者: 赖蓉蓉, 女, 硕士研究生, E-mail: lairr@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 徐月红, 女, 教授, 主要从事皮肤/黏膜给药系统设计与渗透机理的研究, E-mail: lssxyh@mail.sysu.edu.cn

cence. The effect of activating TRP channels by Sanfu patch on acupoint transdermal behavior was studied using *in vivo* transdermal and confocal laser 3D scanning. **RESULTS** The active ingredient SPT in Sanfu patch could promote the influx of Ca^{2+} mediated by TRP channels. The expression levels of TRPV1 and TRPA1 channels in the skin of FS acupoints were significantly higher than those of NFS acupoints skin ($P < 0.05$), and TRPA1 channels decreased after sustained treatment with Sanfu patch. After the activation of TRPV1 and TRPA1 channels in the skin, the retention of SPT and THP in the skin of FS acupoints significantly increased ($P < 0.05$), but there was no significant effect on NFS acupoints skin. **CONCLUSION** The active ingredient SPT in Sanfu patch has an agonistic effect on TRP channels, and the expression of TRPV1 and TRPA1 channels in FS acupoint skin is higher than those in NFS acupoint. The higher expressions of TRPV1 and TRPA1 channels and their activation by Sanfu patch are one of the mechanisms of its penetration-promoting through acupoint administration.

KEYWORDS: Sanfu patch; sinapine thiocyanate; tetrahydropalmatine; TRPV1; TRPA1

三伏贴(Sanfu patch)为一种传统的中医外治疗法,是取《素问·四气调神大论篇》中“春夏养阳,秋冬养阴”的原理^[1-2],于三伏阳气旺盛之际,将阳性、热性的药物敷贴于肺俞(Feishu acupoint,FS)、膏肓、膻中、天突、定喘等穴位之上^[3-4],使其通过经络循行和气血输送到达病灶部位,达到调节阴阳平衡,祛除外邪的目的。目前,三伏贴多以清代名医张璐冷哮方(白芥子、延胡索、甘遂和细辛)为基础^[3,5],结合不同疾病的临床特点和四时变化加减,主要用于支气管哮喘、变应性鼻炎等呼吸系统疾病的治疗^[6]。现代药效学研究表明:三伏贴可以通过调节 IL-4、IL-5、IL- γ 和 IL-2 等细胞因子调节 Th1/Th2 免疫平衡,达到防治哮喘的目的^[7]。三伏贴经穴位给药防治呼吸系统疾病具有广泛的临床基础和确切的疗效,但作为经皮给药系统,其经穴位促渗,内病外治的机理尚待探明。

瞬时感受器电位离子通道(Transient receptor potential ion channels,TRP)是广泛分布于感觉神经细胞、肥大细胞、角质形成细胞上的非选择性阳离子通道,主要介导单价或者二价阳离子,如 Ca^{2+} 、 K^+ 等内流进入细胞,以响应各种化学刺激和物理刺激。TRP 通道根据主要氨基酸结构的不同可以分为 7 个亚家族:TRPA、TRPC、TRPM、TRPML、TRPP、TRPV 和 TRPN^[8-9]。其中瞬时受体电位香草酸亚型 1 [Transient receptor potential vanilloid 1,TRPV1,又称为辣椒素(Capsaicin,CAP)受体]和瞬时受体电位锚蛋白 1(Transient receptor potential ankyrin 1,TRPA1)是 TRP 通道家族中研究较多的 2 种通道蛋白,不仅参与温度、pH、机械等物理刺激和化学刺激的调节,而且与瘙痒、疼痛、神经源性炎症等疾病的发生有密切关系^[10-12]。2021 年,诺贝尔生理或医学奖授给发现温度和触觉感受器的美国科学家 David 教授和 Ardem 教授,其中 David 教授首次揭示了 TRPV1 可以介导 CAP 引起的灼热、疼痛等感觉的功能并解析了 TRPV1 通道蛋白的冷冻电镜结

构^[13]。研究发现 TRP 通道中 TRPV1 及 TRPA1 均表达于表皮角质细胞,与表皮屏障功能密切相关^[11,14]。同时,TRPV1 及 TRPA1 也均表达于皮肤感觉神经,介导皮肤对温度和化学感知和调节,参与痛痒觉发生以及皮肤神经源炎症发生,这一点可能与三伏贴作用于皮肤后产生温感、烧灼或辛辣感及瘙痒相关。因此,我们推测三伏贴有可能通过激活穴位皮肤 TRPV1 和 TRPA1 通道而发挥经皮促渗和增效的作用。

本研究首先考察三伏贴有效成分芥子碱硫氰酸盐(Sinapine thiocyanate,SPT)和延胡索乙素(Tetrahydropalmatine,THP)对 TRP 通道的激活作用。以肺俞穴为代表性穴位,比较肺俞穴和非穴位(Non-acupoint,NFS)皮肤 TRP 通道表达的差异,并比较 TRP 通道激动剂激活 TRP 通道后三伏贴在体经皮渗透有效成分 SPT 和 THP 在穴位与非穴位皮肤滞留的差异,进一步验证 TRP 通道对三伏贴经皮渗透的影响。本研究为三伏贴经穴位皮肤促渗增效机制研究提供新的切入点。

1 材料

DZTW 型电子调温电热套(上海邦西仪器科技有限公司),Sartorius BT 25S 十万分之一天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),FV3000 激光扫描超高分辨率显微镜(日本奥林巴斯公司),电泳仪(北京六一仪器厂),5200 化学发光成像仪(上海天能公司),LC-2030 岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

白芥子、延胡索、细辛药材购自广州市诚济药业有限公司;SPT 对照品(批号:111702-200501)、THP 对照品(批号:111726-201011)购自中国药品生物制品检定所;鼠源神经生长因子(NGF)、CAP 购自美国 Sigma 公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA、青霉素-链霉素、胎牛血清(FBS)、II 型胶原酶购自美国 Gibco 公司;DMEM/F12 培养基购自美国 Thermo 公司;4%多聚甲醛(批号:CR2101179)、HRP 标记山羊抗

兔 IgG 购自武汉塞维尔公司;TRPA1 抗体购自美国 Novusbio 公司;TRPV1 抗体、Alexa Flour 594 标记山羊抗兔 IgG 购自英国 Abcam 公司;即用型山羊血清购自武汉博士德公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:122120210323)、RIPA 裂解液(批号:11252021020)购自碧云天;ECL 化学发光显色试剂盒(批号:S0023721)购自 Yeasen 公司;异硫氰酸丙烯酯(Allyl isothiocyanate, AITC), 甲醇、乙腈(色谱纯)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

Wistar 乳鼠(1~3 d)、SPF 级 SD 大鼠,雌性,体重 180~220 g,购于中山大学(大学城)实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK(粤)2016-0029。动物实验方案通过中山大学实验动物伦理委员会审查,实验动物伦理批号:SYSU-IACUC-2019-B235。

2 方法

2.1 三伏贴的制备

在本课题组前期的研究中,甘遂在三伏贴用药时易引起皮肤破溃,但是预防哮喘发作的作用较弱,因此本研究对三伏贴进行加减后去掉甘遂^[15]。粉碎白芥子、延胡索后按质量比 1:1 配伍,加入 10 倍量 80%乙醇回流提取 2 h,重复 3 次,合并提取液,过滤,滤液用旋转蒸发仪浓缩,得到相对密度为 1.1~1.3 g·mL⁻¹ 的浸膏。

用水蒸气提取法提取细辛挥发油。粉碎细辛后(细辛粒径为 50~80 目)加入适量水,120 °C 加热回流 6 h,收集挥发油,挥发油的得率为 0.64%。

每 20 g 浸膏中加入 1 mL 挥发油混合均匀,制备成三伏贴。三伏贴中有效成分 SPT 的含量为(27.30 ± 0.81) mg·g⁻¹, THP 的含量为(2.87 ± 0.18) mg·g⁻¹。含 20 μmol·L⁻¹ CAP 和 0.5 μmol·L⁻¹ AITC 浸膏的制备:将对应量 CAP 和 AITC 与三伏贴浸膏均匀混合后制得。

SPT 的高效液相色谱测定方法如下^[16]: 色谱柱:Kromsil 100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相:乙腈-0.08 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(10:90, v/v); 流速:1 mL·min⁻¹; 柱温:30 °C; 进样量:20 μL; 检测波长:326 nm。

THP 的高效液相色谱测定方法如下^[16]: 色谱柱:Kromsil 100-5-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(三乙胺调 pH 至 6.0)(55:45, v/v); 流速:1 mL·min⁻¹; 柱温:30 °C; 进样量:20 μL; 检测波长:280 nm。

2.2 三伏贴中有效成分对 TRP 通道的作用

2.2.1 原代背根神经元(Dorsal root ganglion, DRG) 细胞提取和培养 取出乳鼠脊柱分离脊神经节,用 0.1% II 型胶原酶和 0.25%胰蛋白酶消化,加入血清终止消化,离心弃上清,加入含有 50 ng·mL⁻¹ 鼠源 NGF、10%FBS、1%青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,接种培养皿内,移入 37 °C、5%CO₂ 的培养箱。

2.2.2 Ca²⁺内流试验 将 DRG 细胞以 2×10⁴ mL⁻¹ 的密度接种于多聚赖氨酸包被的 Confocal 皿中,待细胞贴壁后,用台氏液清洗 2 次。各组细胞加 200 μL 钙离子荧光探针 Fluo-4, AM(1:1 000),避光孵育 30 min 后,用台氏液清洗 2 次,再加入 400 μL 台氏液,培养箱孵育 15 min,于激光共聚焦扫描显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM)下进行 Ca²⁺内流实验,激发波长 488 nm,发射波长 516 nm。在预设时间点分别向培养皿中加入终浓度为 20 μmol·L⁻¹ CAP、100 μmol·L⁻¹ SPT 和 100 μmol·L⁻¹ THP 溶液,对细胞进行动态观察,细胞内 Ca²⁺浓度变化(Δ[Ca²⁺]_i)以荧光强度值的百分比值来表示,根据公式 $\Delta[Ca^{2+}]_i = (F - F_0) / F_0 \times 100\% = \Delta F / F_0 \times 100\%$ 计算,式中 F 为给药后的荧光强度峰值, F_0 为给药前的荧光强度基础值^[17]。

2.3 肺俞穴与非穴位皮肤 TRP 通道表达差异

2.3.1 Western blot 检测 TRP 通道表达差异 大鼠肺俞穴位于第三胸椎下旁开 0.75 mm,以肺俞穴穴位点为中心,选取 1 cm² 的皮肤为肺俞穴皮肤^[18],非穴位的皮肤为距离肺俞穴 5 cm 下 1 cm² 的背部皮肤。取 3 只 SD 大鼠脱颈处死后,立即分离所需皮肤并除去皮下脂肪。研碎皮肤,用 RIPA 裂解液提取皮肤总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,放入稀释的 TRPA1 或 TRPV1 一抗中(1:1 000),4 °C 摇床孵育过夜。加入稀释的二抗(1:3 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜后用 ECL 化学发光显色试剂盒显影,用化学发光成像仪进行拍照,用 Image J 进行灰度分析

2.3.2 免疫荧光考察 TRP 通道表达差异 另取 3 只 SD 大鼠,根据“2.3.1”中方法获取肺俞穴与非穴位皮肤,用 4%多聚甲醛 4 °C 固定 4 h 后,在 30%蔗糖中下沉过夜,OCT 包埋,制作冰冻切片,于 -80 °C 保存。切片放至室温后,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,用 4%多聚甲醛室温固定 20 min,用即用型山羊血清封闭 2 h,滴加一抗(Anti-TRPV1 抗体 1:500,

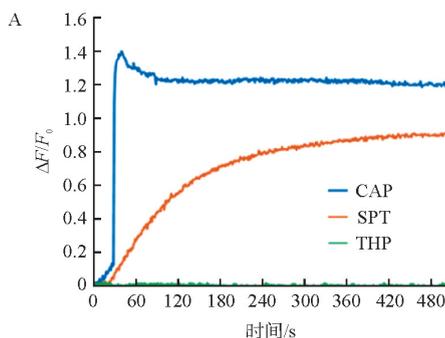
Anti-TRPA1 抗体 1:100), 于湿盒中 4 ℃ 过夜。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加二抗 (Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 1:200, Alexa Fluor 594 山羊抗兔 IgG H&L 1:200), 室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 用甘油封片。于 CLSM 下观察: Alexa Fluor 488 激发波长 488 nm, 发射波长 516 nm; Alexa Fluor 594 激发波长 590 nm, 发射波长 617 nm。

2.4 三伏贴对 TRPA1 通道的作用

将 15 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 根据“2.3.1”中方法确定肺俞穴和非穴位位置, 分别于第 0、1、2、3、7 天给药, 给药面积为 1 cm², 给药量为 0.21 g·cm⁻²。每次给药 6 h 后, 将大鼠脱颈处死并立即分离所需皮肤, 根据“2.3.2”中方法进行免疫荧光实验。

2.5 激动 TRP 通道对三伏贴穴位敷贴透皮行为的影响

2.5.1 在体透皮实验 将 10 只 SD 大鼠随机分为 CAP (TRPV1 激动剂) 组和 AITC (TRPA1 激动剂) 组, 麻醉后将背部脱毛。其中, CAP 组在左侧肺俞穴与非穴位皮肤分别给予含 20 μmol·L⁻¹ CAP 的三伏贴, AITC 组分别给予含 0.5 μmol·L⁻¹ AITC 的三伏贴, 在所有组别右侧的肺俞穴与非穴位皮肤给予不含 CAP 和 AITC 的三伏贴作为对照, 给药面积为 1 cm², 三伏贴给药量为 0.21 g·cm⁻²。给药 6 h 后, 将大鼠脱颈处死, 擦除皮肤表面药物, 剪下给药部位并剪碎, 加入 500 μL 甲醇, 超声 30 min 后, 离心取上清液, 过 0.22 μm 滤膜后用于 HPLC 测定, 计算经皮渗透后 SPT 的皮肤滞留量。



注: A. 分别给予 20 μmol·L⁻¹ CAP、100 μmol·L⁻¹ SPT 和 100 μmol·L⁻¹ THP 后 DRG 细胞内 Ca²⁺ 浓度变化 (ΔF/F₀);

B. 分别给予 20 μmol·L⁻¹ CAP 和 100 μmol·L⁻¹ SPT 前后 DRG 细胞的 CLSM 图像, 标尺 = 20 μm

图 1 20 μmol·L⁻¹ CAP、100 μmol·L⁻¹ SPT 和 100 μmol·L⁻¹ THP 对 DRG 细胞内 Ca²⁺ 浓度的影响

Fig. 1 Effects of 20 μmol·L⁻¹ CAP, 100 μmol·L⁻¹ SPT and 100 μmol·L⁻¹ THP on Ca²⁺ uptaked into DRG cells

3.2 肺俞穴和非穴位皮肤 TRP 通道的表达

2.5.2 激光共聚焦 3D 扫描 THP 具有自发荧光, 其在皮肤的渗透和滞留可通过 CLSM 可视化研究。给药方案与“2.5.1”项下一致。将皮肤角质层面朝盖玻片铺平, 盖上盖玻片, 进行 CLSM 观察。

THP 的激发波长为 488 nm, 发射波长为 520 nm。选择 3D 扫描模式拍摄, Image J 进行荧光半定量, 并用 Imaris 对所得荧光扫描图片进行 3D 重构。

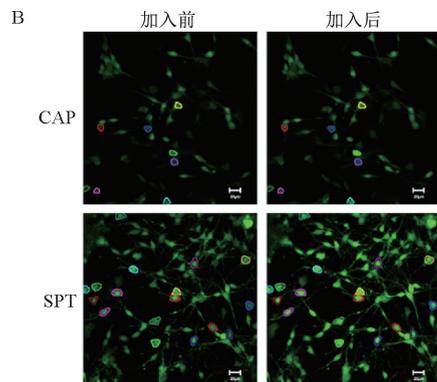
2.6 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间数据差异的显著性用 *t* 检验 (*Student's t test*) 或单因素方差分析 (*One-way ANOVA*) 进行检验, 其中 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

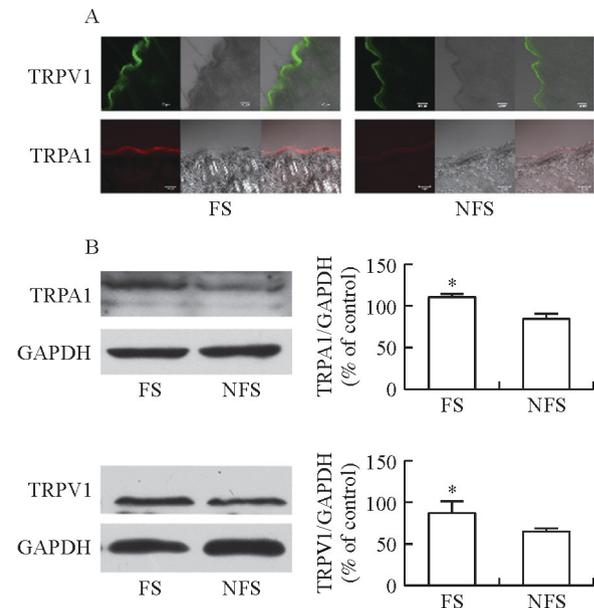
3.1 CLSM 考察三伏贴有效成分对 TRP 通道的作用

TRP 通道属于非选择性阳离子通道, 在 DRG 中高表达, 可以通过 DRG 细胞内 Ca²⁺ 离子浓度的变化判断受试物对 TRP 通道的作用, CAP 是激动 TRPV1 的阳性对照药。如图 1 所示, 分别考察了 20 μmol·L⁻¹ CAP、100 μmol·L⁻¹ SPT 和 100 μmol·L⁻¹ THP 对 DRG 细胞 Ca²⁺ 浓度的影响, 其中 Fluo-4 为 Ca²⁺ 荧光探针, 其荧光强度的变化可以显示 Ca²⁺ 离子浓度水平。从图 1A 中可以看出, CAP 和 SPT 的加入都可以引起 DRG 细胞 Ca²⁺ 离子的内流, 对 TRP 通道均有激活作用, 而 THP 的加入没有引起 DRG 细胞 Ca²⁺ 离子浓度的变化, 对 TRP 通道没有激活作用。



研究表明, TRP 通道在感觉神经元细胞、肥大

细胞和角质形成细胞中均有分布,与皮肤屏障功能有密切的关系^[14,19-21]。如图 2A 所示,通过对大鼠肺俞穴和非穴位皮肤进行冷冻切片和免疫荧光标记可视化 TRPV1 和 TRPA1 在皮肤组织的分布,结果发现,TRPV1 和 TRPA1 主要分布在表皮组织中,而且肺俞穴皮肤的荧光强度明显强于非穴位皮肤,说明肺俞穴皮肤 TRPV1 和 TRPA1 的表达高于非穴位皮肤。相似的结果也体现在 Western blot 实验(图 2B)中,且该结果具有统计学差异($P < 0.05$),进一步证实肺俞穴皮肤 TRPV1 和 TRPA1 的表达高于非穴位皮肤。



注:A. CLSM 观察肺俞穴和非穴位皮肤 TRPV1 和 TRPA1 的表达,标尺 = 100 μm ; B. 皮肤中 TRPA1、TRPV1 蛋白表达量的 Western blot 结果图和灰度分析;FS. 肺俞穴组;NFS. 非穴位组;与非穴位组比较, * $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 3$ 。

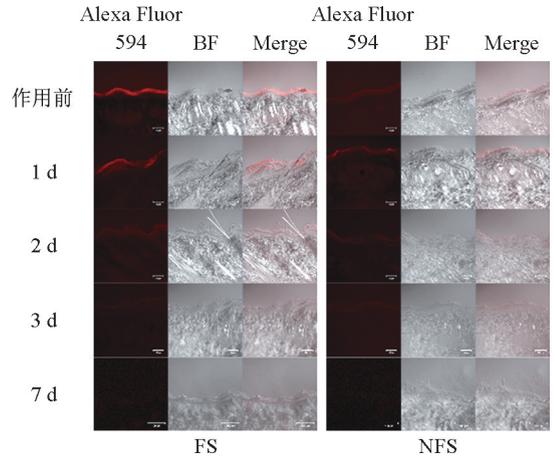
图 2 肺俞穴和非穴位皮肤 TRPV1 和 TRPA1 表达的差异
Fig. 2 Differences of TRPV1 and TRPA1 expression between Feishu acupoint and non-acupoint skin

3.3 三伏贴对肺俞穴和非穴位皮肤 TRPA1 表达的影响

采用 CLSM 和免疫荧光标记分别考察三伏贴作用前和作用 1、2、3、7 d 后对肺俞穴和非穴位皮肤 TRPA1 表达量的影响。从图 3 可以观察到随着三伏贴作用时间的延长,肺俞穴和非穴位皮肤中 TRPA1 的含量逐渐下降,直至第 3 天几乎观察不到 TRPA1 的荧光标记,说明三伏贴持续给药后能够降低肺俞穴和非穴位皮肤中 TRPA1 表达,三伏贴的持续给药可能会导致皮肤中 TRPA1 的耗竭,出现 TRP 脱敏现象,但这个现象的机制有待进一步研究。

3.4 激活 TRP 通道对三伏贴敷贴透皮行为的影响

为了进一步阐明三伏贴经穴位促渗的机理,本实验利用 TRPV1 的特异性激动剂 CAP 以及 TRPA1 的特异性激动剂 AITC^[13,22],观察这些激动剂激活 TRPV1 和 TRPA1 通道后对三伏贴敷贴透皮行为的影响。



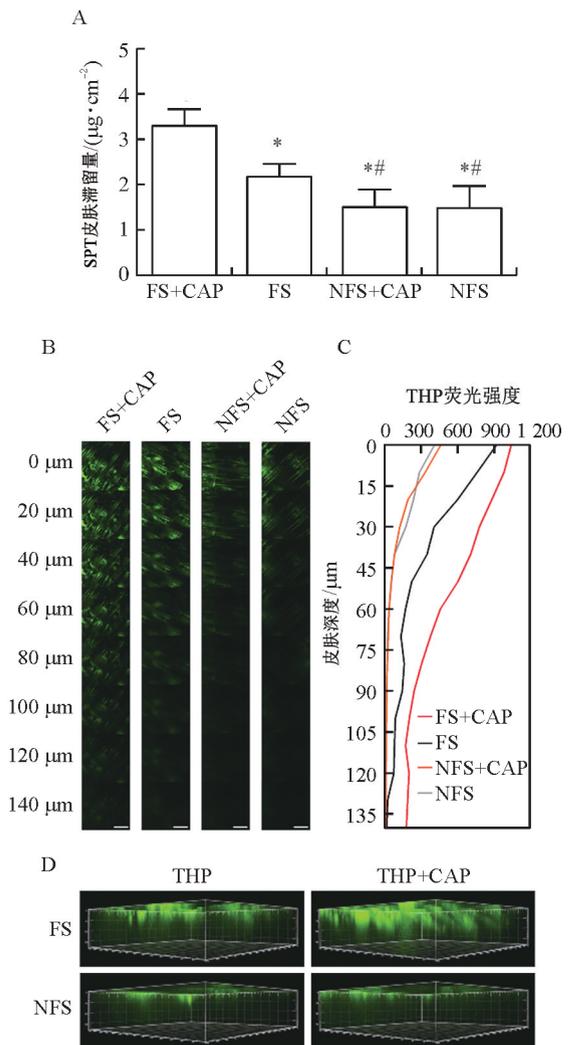
注:FS. 肺俞穴组;NFS. 非穴位组

图 3 皮肤 TRPA1 免疫荧光成像图(标尺 = 100 μm)

Fig. 3 Immuno-fluorescence imaging of TRPA1 in skin (scale bar = 100 μm)

3.4.1 激活 TRPV1 对三伏贴敷贴渗透行为的影响

首先通过在体滞留实验研究激活 TRPV1 对三伏贴经皮渗透行为的影响,以三伏贴中有效成分 SPT 为指标,对三伏贴在体滞留行为进行量化。从图 4A 可以看出,当 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CAP 与三伏贴同时作用于肺俞穴皮肤后,SPT 在体滞留量可以达到 $(3.30 \pm 0.36) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,而单独三伏贴给药组的滞留量仅有 $(2.17 \pm 0.27) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,显著低于 CAP+三伏贴联合给药组($P < 0.05$)。然而,因为非穴位中 TRPV1 表达显著低于穴位皮肤,CAP 与三伏贴联合给药与否对 SPT 在非穴位皮肤的滞留量无显著影响($P > 0.05$),说明 CAP 通过激活穴位皮肤的 TRPV1 通道促进三伏贴中有效成分的经穴位渗透。激光共聚焦结果与在体滞留实验类似,由于 THP 本身具有自发绿色荧光,因此以 THP 为指标对三伏贴在体滞留行为进行可视化比较。从图 4B~D 可以看出:在 CAP 和三伏贴联合给药之后,穴位皮肤部位绿色荧光显著高于非穴位皮肤,且可以达到 100 μm 深处,而单独三伏贴给药组药物到达的深度为 60 μm 。此外,CAP 对于非穴位皮肤的渗透行为无显著影响。



注: A. CAP 与三伏贴同时作用于大鼠皮肤 6 h 后 SPT 在体皮肤滞留量; B. CAP 与三伏贴同时作用于肺俞穴和非穴位皮肤后皮肤不同深度的 CLSM 图像; C. 大鼠不同皮肤深度的荧光半定量图; D. 荧光三维重构图, 标尺=200 μm; FS+CAP. CAP 和三伏贴联合给予大鼠肺俞穴皮肤组; FS. 仅给予三伏贴于大鼠肺俞穴皮肤组; NFS+CAP. CAP 和三伏贴联合给予大鼠非穴位皮肤组; NFS. 仅给予三伏贴于大鼠非穴位皮肤组; 与 FS+CAP 组比较, * $P<0.05$; 与 FS 组比较, # $P<0.05$ 。 $\bar{x}\pm s, n=5$ 。

图 4 激活 TRPV1 对三伏贴敷贴透皮行为的影响

Fig. 4 Effects of activating TRPV1 on the transdermal behavior of Sanfu patch

产生这种现象的原因可能是: ①肺俞穴皮肤 TRPV1 的表达量显著高于非穴位皮肤; ②激活 TRPV1 对肺俞穴皮肤屏障功能的影响更强, 从而能促进三伏贴的经穴位渗透。

3.4.2 激活 TRPA1 对三伏贴经皮渗透行为的影响

通过在体滞留实验对 TRPA1 激活后三伏贴中有效成分 SPT 的透皮行为进行量化。从图 5A 中可以看出, 当 TRPA1 通道特异性激动剂 AITC 与三伏贴共同作用 6 h 后, SPT 在肺俞穴皮肤中的滞留量

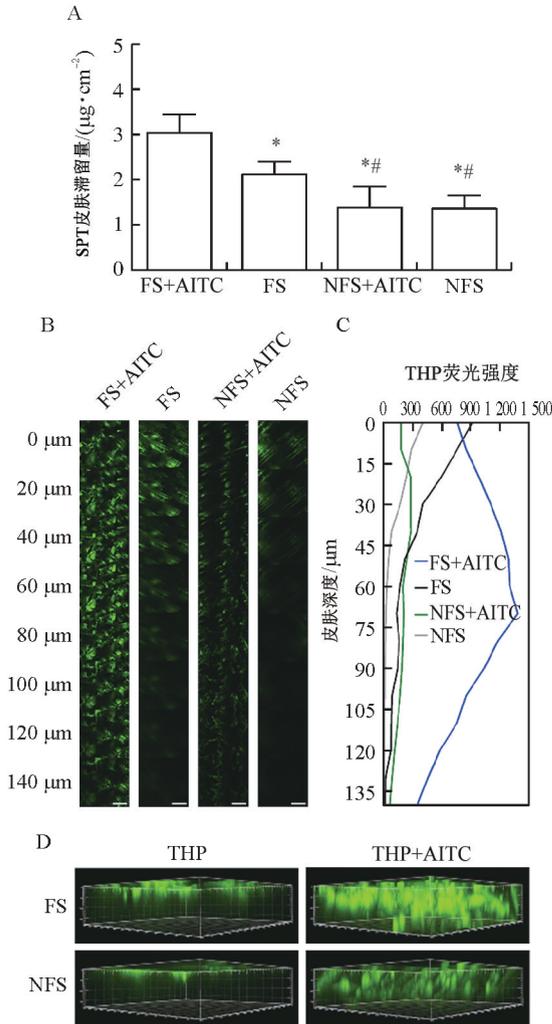
[$(3.05\pm 0.40)\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$] 显著高于三伏贴单独给药组 [$(2.11\pm 0.30)\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$] ($P<0.05$), 但是 AITC 对 SPT 在非穴位皮肤中的滞留量没有显著影响 ($P>0.05$)。对于激光共聚焦结果, 如图 5B~D 所示: 当 $0.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AITC 与三伏贴同时作用于肺俞穴皮肤时, 与单独三伏贴组相比, THP 在肺俞穴皮肤的绿色荧光更强, 且能达皮肤更深处 ($140\mu\text{m}$)。而当 AITC 与三伏贴同时作用于非穴位皮肤, THP 在非穴位皮肤的绿色荧光强度仅略微增强。

4 讨论

本课题组前期的研究已经证明: 三伏贴经肺俞穴皮肤的透过量、稳态渗透速率以及皮肤滞留量均显著高于非穴位皮肤, 并比较了穴位和非穴位皮肤在物理渗透屏障上的区别, 包括皮肤电阻和角质层厚度^[23-24]。为进一步研究三伏贴经穴位促渗以及内病外治的机制, 本研究从穴位与非穴位皮肤的神经屏障进行研究。通过研究三伏贴中有效成分对 TRP 通道的激动作用以及肺俞穴和非穴位皮肤 TRP 通道表达量的差异, 阐明了三伏贴经穴位促渗与 TRP 通道相关。通过在体滞留实验和激光共聚焦可视化进一步对这个结论进行了验证。本研究还探讨了三伏贴给药后对大鼠肺俞穴和非穴位皮肤 TRPA1 通道表达量的影响, 有助于解释三伏贴内病外治, 产生“经脉-脏腑”相关效应的机制^[25]。

有研究表明, 芥子油中的异硫氰酸酯化合物可以激活 TRPA1 通道^[22]。而实验结果显示三伏贴中的有效成分 SPT 对 TRP 通道的 TRPV1 也具有激活的作用, 而且肺俞穴 TRPV1 和 TRPA1 的表达量明显高于非穴位皮肤, 证实三伏贴中 SPT 对 TRP 通道的激活作用是三伏贴在肺俞穴的经皮渗透和滞留量高于非穴位皮肤的原因之一。另外, 实验结果显示三伏贴的持续给药可以引起穴位和非穴位皮肤中 TRPA1 表达量下降。这可能是由于三伏贴作用于穴位皮肤后, 通过持续激动 TRPA1 通道, 导致穴位皮肤 TRPA1 通道蛋白耗竭从而脱敏^[26-29]。同时, 激活 TRP 通道并脱敏最终导致表达 TRP 的感觉神经脱敏或去功能化是 TRP 激动剂临床发挥作用的机理之一, 如 CAP 临床的止痛止痒作用^[30-31]。TRPA1 除了在皮肤中有表达, 在肺组织也有表达, 而且激动 TRPA1 可以引起类似支气管收缩、黏液分泌、气道炎症、刺激和咳嗽等哮喘反应^[32-34], 因此推测 TRPA1 通道可能是肺俞穴与肺产生“经脉-脏腑相关”效应的机理之一, 三伏贴持续激动皮肤上的 TR-

PA1 通道致其耗竭脱敏,可能会进一步导致呼吸道中迷走神经和感觉神经纤维上的 TRPA1 通道蛋白脱敏或表达下调,从而发挥在哮喘缓解期预防及治疗哮喘的作用。我们将进一步对此皮肤-肺脏的级联调控进行研究,期望能进一步基于 TRP 通道阐明三伏贴内病外治,通过“经络-脏腑”相关效应防治哮喘的机制。



注:A. AITC 与三伏贴同时作用于大鼠皮肤 6 h 后 SPT 在体皮肤滞留量; B. AITC 与三伏贴同时作用于肺俞穴和非穴位皮肤后皮肤不同深度的 CLSM 图像;C. 大鼠不同皮肤深度的荧光半定量图;D. 荧光三维重构图, 标尺=200 μm;FS+AITC. AITC 和三伏贴联合给予大鼠肺俞穴皮肤组; FS. 仅给予三伏贴于大鼠肺俞穴皮肤组;NFS+AITC. AITC 和三伏贴联合给予大鼠非穴位皮肤组;NFS. 仅给予三伏贴于大鼠非穴位皮肤组; 与 FS+AITC 组比较,**P*<0.05;与 FS 组比较,***P*<0.05。 $\bar{x}\pm s, n=5$ 。

图 5 激活 TRPA1 对三伏贴敷贴透皮行为的影响

Fig. 5 Effects of activating TRPA1 on the transdermal behavior of Sanfu patch

参考文献:

[1] 张斯杰, 欧江琴. 三伏贴的治未病理理论基础及运用[J]. 中国中

医基础医学杂志, 2019, 25(4): 519-521.

ZHANG SJ, OU JQ. Theoretical basis and application of dog day paste under preventive treatment of disease in TCM[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2019, 25(4): 519-521.

[2] 张玉修, 黄慧, 万全增. 中医体质理论在三伏贴疗法中的应用[J]. 光明中医, 2020, 35(15): 2299-2301.

ZHANG YX, HUANG H, WAN QZ. The application of the theory of constitution of traditional Chinese medicine in sanfu plaster therapy[J]. Guangming J Chin Med, 2020, 35(15): 2299-2301.

[3] 苏奔, 陆明, 张倩璐, 等. 三伏贴作用机制及应用探讨[J]. 江苏中医药, 2019, 51(9): 51-52.

SU B, LU M, ZHANG QL, et al. Discussion on action mechanism and application of Sanfutie[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2019, 51(9): 51-52.

[4] 赵霞, 秦艳虹, 吴建新, 等. 三伏贴干预儿童哮喘专家共识[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(4): 303-307.

ZHAO X, QIN YH, WU JX, et al. Expert consensus on San-fu herbal patch intervention for pediatric asthma[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2022, 38(4): 303-307.

[5] 李官红, 郑芳华, 泽仁拥西, 等. 穴位贴敷治疗慢性阻塞性肺疾病的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(34): 145-148.

LI GH, ZHENG FH, ZE RYX, et al. A review on treating chronic obstructive pulmonary disease by acupoint application[J]. Clin J Chin Med, 2020, 12(34): 145-148.

[6] 张瑜, 王春南. 冬病夏治的中医机理及临床研究进展[J]. 光明中医, 2021, 36(12): 2086-2089.

ZHANG Y, WANG CN. Progress on the clinical research and traditional Chinese medicine mechanism of treating winter disease in summer[J]. Guangming J Chin Med, 2021, 36(12): 2086-2089.

[7] 蔡琪, 孙钢. “三伏贴”防治支气管哮喘及对神经免疫相关细胞因子的影响[J]. 福建中医药, 2019, 50(1): 8-10.

CAI Q, SUN G. "Sanfutie" for prevention and treatment of bronchial asthma and its effect on neuroimmune related cytokines[J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2019, 50(1): 8-10.

[8] PALAZZO E, ROSSI F, DE NOVELLIS V, et al. Endogenous modulators of TRP channels[J]. Curr Top Med Chem, 2013, 13(3): 398-407.

[9] ZENG C, TIAN FF, XIAO B. TRPC channels: Prominent candidates of underlying mechanism in neuropsychiatric diseases[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 631-647.

[10] ZHANG XL, HU MQ, YANG YX, et al. Organellar TRP channels[J]. Nat Struct Mol Biol, 2018, 25(11): 1009-1018.

[11] CATERINA MJ, PANG ZX. TRP channels in skin biology and pathophysiology[J]. Pharmaceuticals, 2016, 9(4): 77.

[12] TOTH BI, OLAH A, SZOLLOSI AG, et al. TRP channels in the skin[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(10): 2568-2581.

[13] JORDT SE, JULIUS D. Molecular basis for species-specific sensitivity to hot chili peppers[J]. Cell, 2002, 108(3): 421-430.

[14] DENDA M, SOKABE T, FUKUMI-TOMINAGA T, et al. Effects

- of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(3): 654-659.
- [15] 王茵萍,徐月红,陈宝,等.“白芥子涂法”复方及单味药抗豚鼠哮喘效应的比较[J]. *江苏医药*, 2011, 37(14): 1643-1645, 1608.
- WANG YP, XU YH, CHEN B, et al. A comparison of anti-asthmatic effects of Baijiezi tufa from compound Chinese traditional medicine and single Chinese herb on guinea pigs[J]. *Jiangsu Med J*, 2011, 37(14): 1643-1645, 1608.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- National Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: I* [S]. Beijing: China medical science press, 2020.
- [17] PAVLENKO D, FUNAHASHI H, SAKAI K, et al. IL-23 modulates histamine-evoked itch and responses of pruriceptors in mice [J]. *Exp Dermatol*, 2020, 29(12): 1209-1215.
- [18] 郭义. 实验针灸学[M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- GUO Y. *Experimental Acupuncture* [M]. 4th ed. Beijing: China press of traditional Chinese medicine, 2016.
- [19] BONCHAK JG, SWERLICK RA. Emerging therapies for atopic dermatitis: TRPV₁ antagonists[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2018, 78(S1): S63-S66.
- [20] 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.
- [21] YUN JW, SEO JA, JEONG YS, et al. TRPV₁ antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery[J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 62(1): 8-15.
- [22] JORDT SE, BAUTISTA DM, CHUANG HH, et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1[J]. *Nature*, 2004, 427(6971): 260-265.
- [23] 郭秀彩,刘霞,徐月红. 白芥子涂方穴位与非穴位给药皮肤渗透特性的比较研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(7): 1034-1038.
- GUO XC, LIU X, XU YH. Tetrahydropalmatine's permeative properties of acupoint and non-acupoint transdermal administration of Baijiezi Tufang *in vitro* and *in vivo* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2012, 37(7): 1034-1038.
- [24] 刘霞,郭秀彩,林媛媛,等. 穴位与非穴位皮肤生物物理学性质影响芥子碱渗透特性研究[J]. *中草药*, 2013, 44(9): 1111-1116.
- LIU X, GUO XC, LIN YY, et al. Effects of dermal biophysical characteristics of acupoint and non-acupoint on permeability of sinapine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2013, 44(9): 1111-1116.
- [25] 王倩,包永欣.“经脉-脏腑相关”理论还原与重构[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(11): 2715-2718.
- WANG Q, BAO YX. "Meridian-viscera related" theory reduction and reconstruction[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2018, 29(11): 2715-2718.
- [26] CZIKORA A, RUTKAI I, PASZTOR ET, et al. Different desensitization patterns for sensory and vascular TRPV₁ populations in the rat: Expression, localization and functional consequences [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e78184.
- [27] AKOPIAN AN, RUPAREL NB, JESKE NA, et al. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV₁-directed internalization[J]. *J Physiol*, 2007, 583(Pt 1): 175-193.
- [28] AKOPIAN AN, RUPAREL NB, PATWARDHAN A, et al. Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(5): 1064-1075.
- [29] BECKEL JM, DE GROAT WC. The effect of the electrophilic fatty acid nitro-oleic acid on TRP channel function in sensory neurons [J]. *Nitric Oxide*, 2018, 78: 154-160.
- [30] TREAT A, HENRI V, LIU JK, et al. Novel TRPV₁ modulators with reduced pungency induce analgesic effects in mice[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(3): 2929-2946.
- [31] DUPOIRON D, JUBIER-HAMON S, SEEGER V, et al. Peripheral neuropathic pain following breast cancer: Effectiveness and tolerability of high-concentration capsaicin patch[J]. *J Pain Res*, 2022, 15: 241-255.
- [32] AUDRIT KJ, DELVENTHAL L, AYDIN Ö, et al. The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3): 571-590.
- [33] WORTLEY MA, BIRRELL MA, BELVISI MG. Drugs affecting TRP channels [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 237: 213-241.
- [34] GRACE MS, BAXTER M, DUBUIS E, et al. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: Role in airway disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(10): 2593-2607.

(编辑:杨巍敏)