

神经肽Y及其受体在银屑病慢性瘙痒中的表达特征

范立民 刘雪婷 倪曼婷 温玉环 农秀雨 吴瑜丹 陶爱林*

(广州医科大学附属第二医院, 呼吸疾病国家重点实验室变态反应研究室,

广东省过敏反应与免疫重点实验室, 广州 510260)

摘要 该文旨在研究神经递质神经肽Y(NPY)及其受体在银屑病小鼠的背根神经节(DRG)与脊髓中的表达特征。将8周龄的雄性C57BL/6小鼠随机分为咪喹莫特(IMQ)模型组和空白对照组两组。观察小鼠的行为学变化和皮肤炎症, 采用HE染色分析皮肤炎症, 甲苯胺蓝染色分析肥大细胞浸润情况。通过实时荧光定量PCR分析DRG中NPY mRNA的表达变化和皮肤中细胞因子的表达变化, 并通过RNA原位杂交技术分析Npy1r(NPY受体Y1相应的基因)、Npy2r(NPY受体Y2相应的基因)的表达情况。鞘内注射Y1拮抗剂或Y2拮抗剂后观察小鼠的行为学变化。IMQ造模小鼠的抓挠行为极显著增加。与对照组相比, IMQ模型组小鼠皮肤出现明显的银屑病样炎症性皮肤病变, 而肥大细胞数目并无明显变化。在皮肤中, IMQ模型组IL-4与IL-5 mRNA表达水平与对照组相比没有明显改变; TSLP与IL-33表达水平升高。在DRG中, IMQ模型组NPY的mRNA表达水平与对照组相比升高, Npy2r与Nppb在神经元中有明显的共表达。在脊髓中, Npy1r与Grp有部分共表达, Npy1r与Npy2r同时表达在部分神经元中。在鞘内注射Y1拮抗剂或Y2拮抗剂后, IMQ小鼠的抓挠行为显著增加。IMQ可诱使小鼠出现银屑病样皮损并引起瘙痒, NPY在DRG中表达水平升高, 而Npy1r与Npy2r表达在痒觉神经元中, 这表明NPY-Y1/Y2轴影响银屑病模型小鼠的瘙痒症状。

关键词 银屑病; 瘙痒; 咪喹莫特(IMQ); 神经肽Y(NPY); 背根神经节; NPY受体

Expression Characteristics of Neuropeptide Y and Its Receptors in Psoriatic Chronic Pruritus

FAN Limin, LIU Xueting, NI Manting, WEN Yuhuan, NONG Xiuyu, WU Yudan, TAO Ailin*

(Guangdong Province Key Laboratory of Allergy & Clinical Immunology, Allergy Research Branch of the State Key Laboratory of Respiratory Disease, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China)

Abstract This study aims to describe the expression profiles of the neurotransmitter NPY (neuropeptide Y) and its receptors in the DRG (dorsal root ganglion) and spinal cord of a mouse model of psoriasis. Eight-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: the IMQ (imiquimod) modeling group and the blank control group. Behavioral changes and skin inflammation of mice were observed in mice. Skin pathological changes and mast cell infiltration were analyzed using HE staining and toluidine blue staining, respectively. The mRNA expression of NPY in DRG and the cytokine expression in skin were analyzed by real-time quantitative PCR, and the expression of Npy1r (the gene cor-

收稿日期: 2023-12-01 接受日期: 2024-02-27

国家自然科学基金(批准号: 82371797、82171764、81871266)、广州市科学技术局市校(院)联合资助(高水平大学)基础研究项目(批准号: 2024A03J0942)、广东省基础与应用基础研究基金(批准号: 2023A1515012484)、广东省普通高校创新团队项目(批准号: 2021KCXTD046)和广州市科技计划(批准号: 202102010045)资助的课题

*通信作者。Tel: 13711278597, E-mail: taoailin@gzhmu.edu.cn

Received: December 1, 2023 Accepted: February 27, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82371797, 82171764, 81871266), the Basic Research Project Jointly Funded by Guangzhou Municipal University (High-Level University) by Science and Technology Bureau (Grant No.2024A03J0942), the Basic and Applied Basic Research Fund of Guangdong Province (Grant No.2023A1515012484), the Guangdong University Innovation Team Project (Grant No.2021KCXTD046), and the Guangzhou Science and Technology Plan (Grant No.202102010045)

*Corresponding author. Tel: +86-13711278597, E-mail: taoailin@gzhmu.edu.cn

responding to NPY receptor Y1) and *Npy2r* (the gene corresponding to NPY receptor Y2) were analyzed by RNA *in situ* hybridization. Behavioral changes were observed after intrathecal administration of Y1 antagonist or Y2 antagonist. The scratching behavior of IMQ modeled mice was significantly increased. Compared with the control group, the skin of mice in IMQ model group showed obvious psoriasis inflammatory skin lesions, but the number of mast cells did not change significantly. In skin, the mRNA expression levels of *IL-4* and *IL-5* in IMQ group did not change significantly compared with control group, while the expression levels of *TSLP* and *IL-33* were increased. In DRG, the mRNA expression level of *NPY* was elevated in the IMQ modeling group, and *Npy2r* was significantly co-expressed with *Nppb*-positive neurons. In the spinal cord, *Npy1r* was partially co-expressed with *Grp*, and *Npy1r* and *Npy2r* were co-expressed on some neurons. Intrathecal administration of Y1 antagonist or Y2 antagonist significantly increased scratching behavior of IMQ mice. IMQ can induce psoriatic lesions in mice and cause pruritus. *NPY* expression level is increased in DRG, while *Npy1r* and *Npy2r* are expressed in itch neurons. The NPY-Y1/Y2 axis is involved in pruritus in psoriatic model mice.

Keywords psoriasis; itch; IMQ (imiquimod); NPY (neuropeptide Y); DRG (dorsal root ganglion); NPY receptor

银屑病是一种慢性炎症性皮肤病,这种疾病影响着数千万人的生活质量^[1]。银屑病可分为多种类型,通常以红色斑块和银白色鳞屑的形式出现在皮肤上,还可累及头皮、关节等。银屑病患者可出现皮肤瘙痒、皮肤干燥皴裂、抓挠后掉屑等皮炎症状^[2]。

咪喹莫特(imiquimod, IMQ)是一种小分子免疫调节剂,临床上常用来治疗尖锐湿疣。但是持续过量局部使用IMQ,可引起严重的局部皮肤不良反应,如灼烧感、发炎、瘙痒、疼痛、皮疹等。动物实验表明,IMQ应用于小鼠皮肤可以引起表皮增生、树突状细胞激活、免疫细胞浸润和炎症细胞因子分泌^[3],表现出与人类银屑病非常相似的皮炎症状和分子机制。因此,IMQ模型是一种常用于研究银屑病的动物模型。

神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)是一种在神经系统中广泛分布的神经肽,存在于中枢神经系统和外周组织(包括皮肤)中^[4]。它参与多种生理过程,如食欲调控、应激应答、免疫调节等,被认为与瘙痒有关^[5]。一些研究表明,在特应性皮炎患者的皮肤组织中, NPY的表达水平升高^[6]。而瘙痒症状更加严重的银屑病患者与症状较轻的相比,血浆中的NPY水平更低^[7]。在老年的小鼠中,脊髓中的NPY表达下调,会导致机械性瘙痒发生的频率增加。在鞘内注射NPY或者NPY1R激动剂,能抑制老年小鼠的机械性瘙痒^[8]。

越来越多的临床前证据表明,脊髓NPY与慢性疼痛和瘙痒的调节有关。NPY受体Y1(相应的基因为*Npy1r*)和Y2(相应的基因为*Npy2r*)位于包括人类在内的多种物种的脊髓中^[9]。目前在大鼠腰椎脊髓中至少

鉴定到了7个不同的Y1-Ins群体,其中最丰富的被称为1型Y1-Ins^[10];而在脊髓中Y2受体的表达较少,明显少于Y1的表达^[11]。在DRG中,Y2在90%的*Nppb*⁺/*Sst*⁺神经元(与组胺能瘙痒的转导有关)中表达^[12];而Y1主要表达在DRG中降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)阳性小无髓鞘肽能神经元中。虽然Y1和CGRP在DRG体细胞中广泛共定位,但Y1在DRG的传入末端的表达很少。因此,在DRG中NPY主要作用于Y2受体,而不是Y1受体。目前,研究者对NPY在皮肤中的作用知之甚少,Y1、Y2在皮肤中的分布与功能尚未被阐明。在外周血中,淋巴细胞、粒细胞和单核细胞都表达NPY受体,NPY通过作用于NPY受体而对免疫细胞进行多种直接调节^[13],包括通过Y1抑制免疫细胞增殖分化、细胞因子分泌;通过Y1/Y2介导免疫细胞的吞噬作用和迁移^[13]。

然而NPY及其受体在IMQ诱发的慢性瘙痒症中的作用尚不清楚。银屑病、瘙痒和NPY之间的确切关系仍需要进一步的研究来揭示。深入研究NPY及其受体在银屑病中的功能以及在瘙痒机制中的具体作用将有助于改善银屑病的治疗方法。

本研究旨在探究NPY在IMQ构建的银屑病模型小鼠中的作用。在这里,我们通过建立C57BL/6小鼠的IMQ动物模型,通过HE染色和甲苯胺蓝染色分析、实时荧光定量PCR技术、RNA原位杂交分析,以及抓挠行为学观察来探讨NPY对银屑病模型小鼠的作用。本文为进一步深入探究IMQ诱发的慢性瘙痒症的发病机制提供了新的思路,也为治疗慢性瘙痒提供了新的策略。

1 材料与方法

1.1 动物及模型制备

1.1.1 动物 8周龄的SPF级雄性C57BL/6小鼠(动物合格证号: 44822700027105)购自珠海百试通生物科技有限公司。所有动物均用SPF级饲料与蒸馏水,并在正常明暗循环的SPF级场地进行喂养。所有动物实验均在广州医科大学附属第二医院动物委员会批准的规程下进行(批准号: A2022-044)。

1.1.2 银屑病瘙痒模型的构建 用IMQ乳膏建立银屑病小鼠模型。将12只小鼠随机分为模型组和对照组。实验前1天用剃毛器剃光小鼠颈背部毛发,暴露出皮肤,皮肤面积约为2 cm×3 cm。每天在其背部涂抹咪喹莫特乳膏(50 mg/只),给药当天记为第0天,连续2天给药,第2天处死小鼠。Y1/Y2受体拮抗剂鞘内注射实验:将雄性C57BL/6小鼠使用IMQ建立银屑病模型后,鞘内注射Y1/Y2受体拮抗剂。

1.2 小鼠的抓挠行为学

通过观察小鼠的抓挠行为来判定小鼠的瘙痒表型。在造模后,将模型组和对照组的小鼠放入独立的透明观察笼中,一只一笼,在安静的条件下进行录像1 h。以小鼠的后腿抬起抓挠颈背部并放下记为1次抓挠行为,观察小鼠的录像并统计抓挠次数。

Y1受体拮抗剂(BIBO3304)或Y2受体拮抗剂(BIIE0246)购自美国MedChemExpress公司, Y1拮抗剂组鞘内注射2 μg Y1受体拮抗剂(BIBO3304); Y2拮抗剂组鞘内注射5 μg Y2受体拮抗剂(BIIE0246);对照组鞘内注射10 μL生理盐水。15 min后,将小鼠放入独立的透明观察笼中,一只一笼,在安静的条件下进行录像1 h。观察小鼠的录像并统计抓挠次数。

1.3 皮肤病理检测

用生理盐水配制1%的戊巴比妥溶液,并通过腹

腔注射将小鼠麻醉。将造模小鼠和对照小鼠的颈背部皮肤取下,并置于4%的多聚甲醛溶液中,于4℃固定过夜。

95%酒精脱水,二甲苯透明化,最后将皮肤包埋在石蜡中进行切片。对切片进行HE染色和甲苯胺蓝染色,封片后用荧光显微镜进行拍照记录。通过HE染色分析皮肤表皮层增厚情况及炎症细胞浸润情况。用ImageJ分析软件统计皮肤厚度与炎症细胞数。通过甲苯胺蓝染色分析皮肤肥大细胞浸润情况。

1.4 皮肤、背根神经节与脊髓的检测

1.4.1 背根神经节与脊髓取材 将小鼠断头处死后,通过解剖镜对小鼠进行DRG取材,用剪刀去除脊柱两侧的横突与棘突,暴露出脊髓后用剪刀剥离脊髓。DRG位于脊髓两侧,为近透明小球颗粒状,两侧连着细丝,剪去细丝后摘取颈部段两侧的DRG。将取下的DRG和脊髓放置于RNAlater和4%多聚甲醛中进行保存。

1.4.2 实时荧光定量PCR法检测 用Trizol法提取皮肤与背根神经节RNA,根据cDNA试剂盒的说明书将RNA逆转录为cDNA,通过实时荧光定量PCR检测银屑病模型小鼠的背根神经节中NPY mRNA的表达变化,检测银屑病模型小鼠的皮肤中细胞因子的mRNA变化,以*Gapdh*作为实验的内参基因进行归一化。引物序列见表1。逆转录和实时荧光定量PCR试剂盒均购自日本TaKaRa公司。

1.4.3 原位杂交分析脊髓与背根神经节冰冻切片中NPY和受体的表达情况 将脊髓与背根神经节用20%蔗糖溶液脱水处理后,用冷冻包埋剂进行包埋,再用冰冻切片机进行切片。

根据RNAscope荧光多重检测试剂盒v2手册中制造商的说明处理切片并固定冷冻组织。将玻片置于

表1 实时荧光定量PCR的引物序列

Table 1 Primers used for real-time quantitative PCR

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
NPY	TAC TCC GCT CTG CGA CAC TA	GGG CTG GAT CTC TTG CCA TA
<i>Gapdh</i>	CCC AGC AAG GAC ACT GAG CAA	TTA TGG GGG TCT GGG ATG GAA A
<i>IL-4</i>	TGT AGG GCT TCC AAG GTG CT	TGA TGC TCT TTA GGC TTT CCA G
<i>IL-5</i>	GAC AAG CAA TGA GAC GAT GAG	CGT CTC TCC TCG CCA CAC TTC T
<i>IL-33</i>	AGA CCA GGT GCT ACT ACG CT	ACG TCA CCC CTT TGA AGC TC
<i>TSLP</i>	AAG CCA GCT TGT CTC CTG AA	TGT GCC ATT TCC TGA GTA CC

50%乙醇中浸泡5 min, 转移到70%乙醇中浸泡5 min; 将玻片置于100%乙醇中浸泡5 min后, 转移到新的100%乙醇中再次浸泡5 min。将组织切片从100%乙醇中取出, 室温下风干5 min。进行双氧水处理10 min, PBS洗涤3~5次。随后用蛋白酶IV, 于湿盒中室温孵育30 min, PBS洗涤3~5次后, 进行RNAscope检测。滴加探针后, 将切片放在40 °C HybEZ杂交炉中孵育2 h, 用RNAscope清洗缓冲液洗涤2 min后在40 °C杂交炉中用AMP1孵育15 min并洗涤, 相同条件进行AMP2、AMP3的孵育, 并洗涤。后续进行不同通道探针的信号标记, 用DAPI复染后进行封片。

1.5 统计学处理

所有实验数据都用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)的方式呈现。使用两独立样本 *t* 检验比较模型组与对照组的结果。当 *P* 值小于 0.05 时, 我们认为两组之间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IMQ模型小鼠的抓挠行为学观察

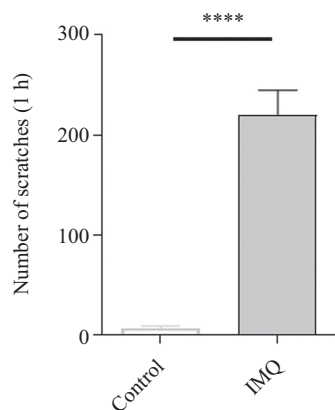
为了反映小鼠的瘙痒程度, 我们使用小鼠后肢的抓挠次数作为判断瘙痒程度的指标。行为学观察结果显示, 在IMQ处理的第2天, IMQ模型组小鼠的抓挠次数极显著高于对照组(图1), IMQ模型组小鼠平均1 h抓挠220.5次($t=21.33, P<0.0001$)。

2.2 局部皮损表现

在使用IMQ进行造模后, IMQ模型组小鼠第二天颈背部皮肤可见干燥、脱屑、结痂等皮损改变, 对照组小鼠皮肤正常未见脱屑红斑等症状, 说明IMQ可以引起银屑病样皮损(图2)。

2.3 皮肤组织病理改变

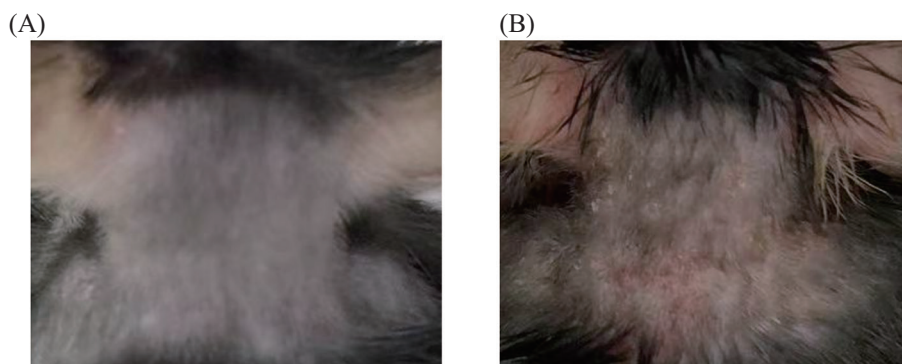
对照组小鼠皮肤组织表皮层(黑色层)较薄, 无明显的炎症细胞浸润(图3A)。模型组小鼠颈背部皮肤可见表皮增厚, 增厚的角质层显示角化不全, 与下面的粉红色真皮层形成起伏边界且伸入真皮, 表



**** $P<0.0001$.

图1 IMQ模型组小鼠的自发性抓挠次数

Fig.1 Spontaneous scratching of mice in IMQ model group



A: 对照组小鼠颈背部皮肤; B: IMQ小鼠的颈背部皮肤。

A: nape and dorsal skin in control mice; B: nape and dorsal skin in IMQ mice.

图2 模型组和对照组小鼠的颈背部皮肤

Fig.2 Photos of nape and dorsal skin of the mice in IMQ and control groups

皮和真皮层浸润细胞数量急剧增加(图3B)。模型组小鼠皮肤的表皮厚度显著高于对照组($t=11.23$, $P<0.0001$), 模型组小鼠皮肤的表皮厚度增加了2.4倍(图4A); 模型组小鼠皮肤的炎症细胞数量显著高于对照组(图4B, $t=2.713$, $P<0.05$)。

2.4 肥大细胞计数

甲苯胺蓝染色结果显示, 模型组小鼠皮肤的肥大细胞数与正常对照组相比无明显变化, 说明肥大细胞不参与IMQ模型组小鼠的皮肤损伤(图5)。

2.5 实时荧光定量PCR分析皮肤组织中IL-4、IL-5、IL-33、TSLP的表达情况

通过实时荧光定量PCR技术测定小鼠皮肤中IL-4、IL-5、IL-33、TSLP的表达变化。与对照组相比, IMQ模型组的IL-4($t=1.825$, $P>0.05$)、IL-5($t=1.3377$, $P>0.05$)表达差异没有统计学意义;

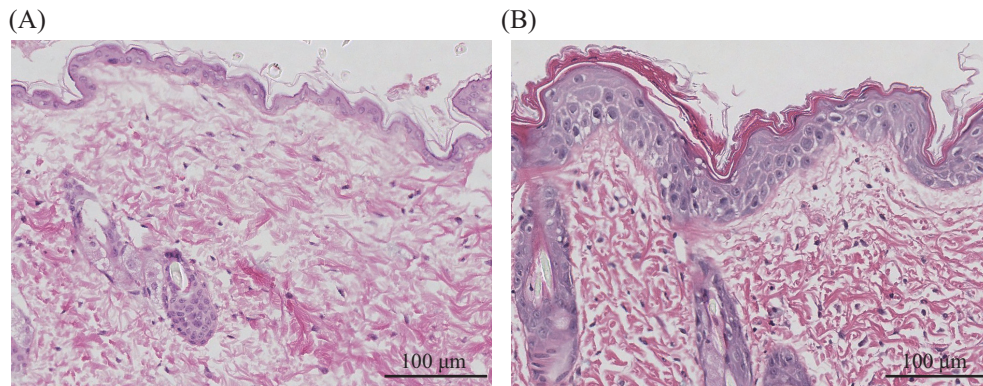
IL-33($t=5.878$, $P<0.001$)、TSLP($t=4.519$, $P<0.01$)表达上调, 差异有统计学意义(图6)。

2.6 定量PCR分析DRG组织中NPY的表达情况

通过实时荧光定量PCR技术测定小鼠DRG中NPY的表达变化。与对照组相比, IMQ模型组的NPY的表达上调, 差异有统计学意义(图7, $t=2.684$, $P<0.05$)。

2.7 RNAscope ISH(in situ hybridization)分析DRG组织中Npy2r的表达情况

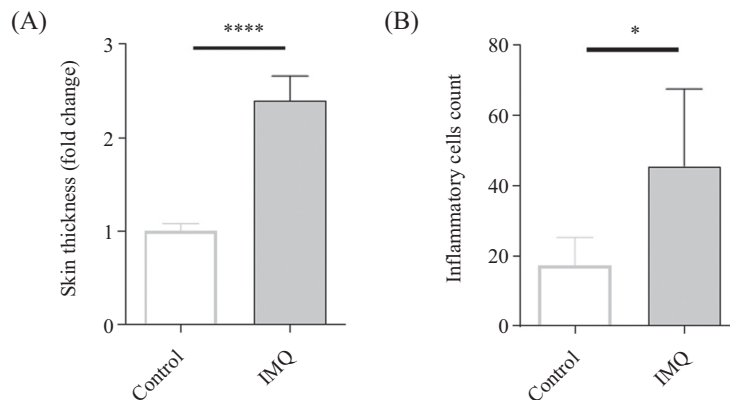
接下来, 使用RNA原位杂交技术RNAscope原位杂交分析了IMQ模型组小鼠DRG中NPY受体与瘙痒相关神经元的共表达情况。结果表明, Npy2r与神经肽利钠多肽b(natriuretic polypeptide b, Nppb)有明显的共表达, 181个Nppb阳性神经元中有174个表达Npy2r(图8)。



A: 对照组; B: IMQ组。
A: control group; B: IMQ group.

图3 模型组小鼠及对照组小鼠颈部及背部皮肤HE染色

Fig.3 HE staining of the neck and dorsal skin of the mice with IMQ and the control mice

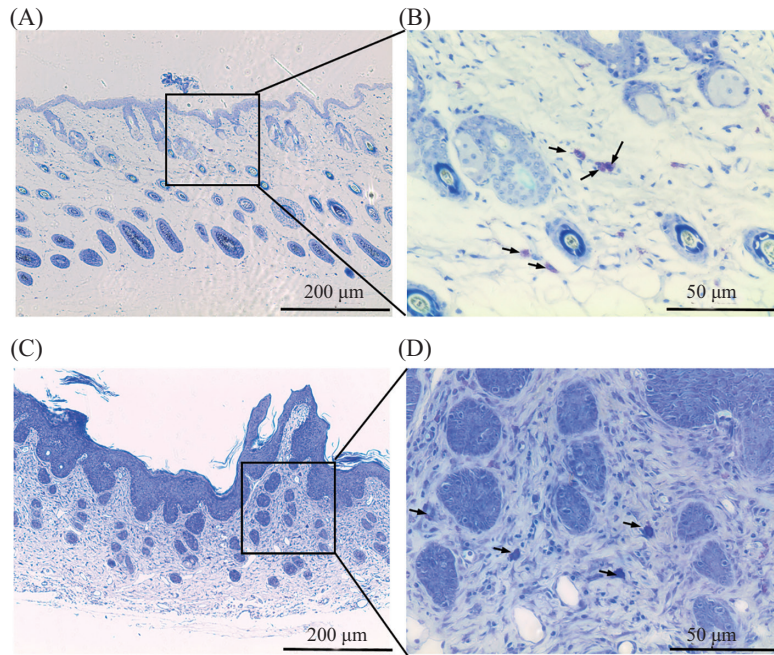


A: 皮肤厚度分析; B: 炎症细胞计数分析。* $P<0.05$, **** $P<0.0001$ 。

A: skin thickness analysis; B: analysis of inflammatory cell count. * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ 。

图4 HE染色的定量分析结果

Fig.4 Quantitative analysis of HE staining

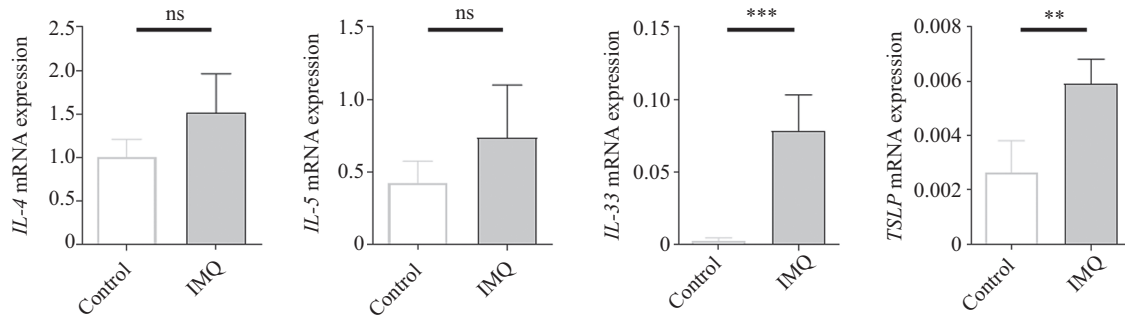


A、B: 对照组; C、D: IMQ组。箭头指示肥大细胞。

A,B: control group; C,D: IMQ group. The arrows indicate mast cells.

图5 模型组和对照组小鼠的甲苯胺蓝染色

Fig.5 Toluidine blue staining of IMQ and control mice

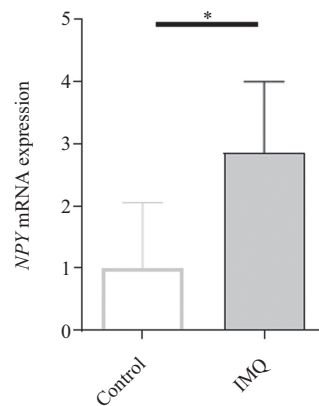


ns: 不显著。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

ns: not significant. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图6 模型组和对照组小鼠皮肤中细胞因子的表达情况

Fig.6 Expression of cytokines in skin of mice in model group and control group



* $P < 0.05$.

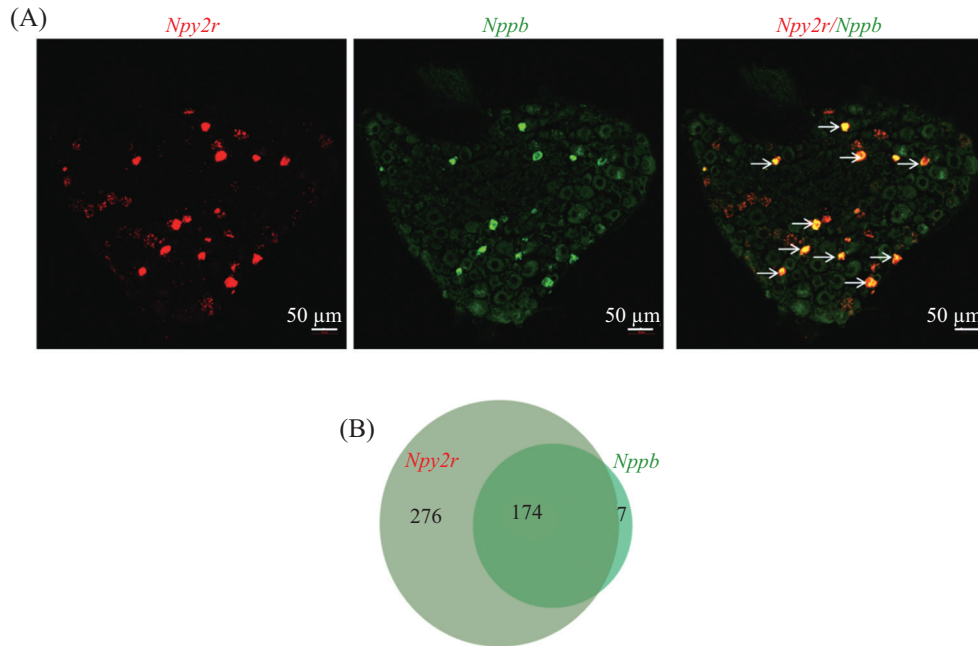
图7 模型组和对照组小鼠背根神经节中NPY的表达水平分析

Fig.7 Analysis of NPY expression level in dorsal root ganglion of mice in model group and control group

2.8 RNAscope ISH分析脊髓组织中*Npy1r*的表达情况

接下来,使用RNAscope ISH分析了IMQ模型组

小鼠脊髓中NPY受体的表达情况。结果表明, *Npy1r*与*Npy2r*在脊髓中同时表达在部分神经元上(图9A)。我们还分析了IMQ模型组小鼠脊髓中*Npy1r*与瘙痒

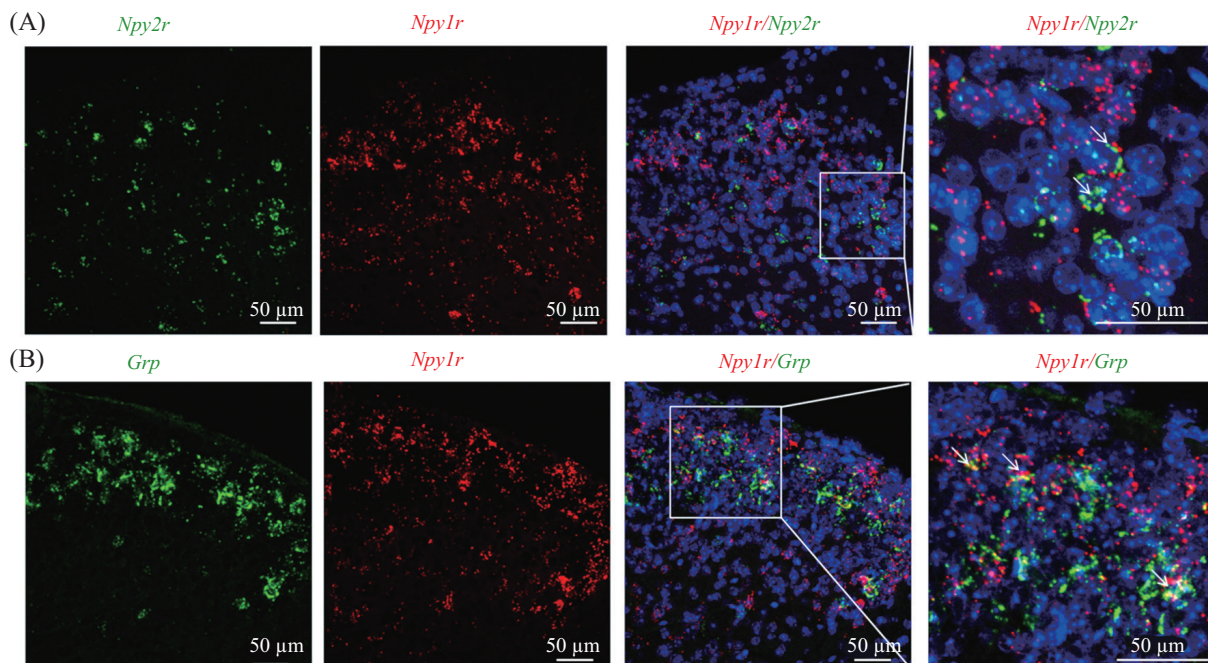


A: *Nppb*阳性神经元中*Npy2r*的表达(箭头指示共表达*Nppb*与*Npy2r*的神经元); B: *Nppb*阳性神经元与*Npy2r*共表达的定量分析。

A: *Npy2r* expression in *Nppb*-positive neurons (the arrows indicate neurons that co-express *Nppb* and *Npy2r*); B: quantification of co-expression of *Nppb*-positive neurons with *Npy2r*.

图8 小鼠背根神经节中*Npy2r*的表达情况

Fig.8 *Npy2r* expression in dorsal root ganglia of mice

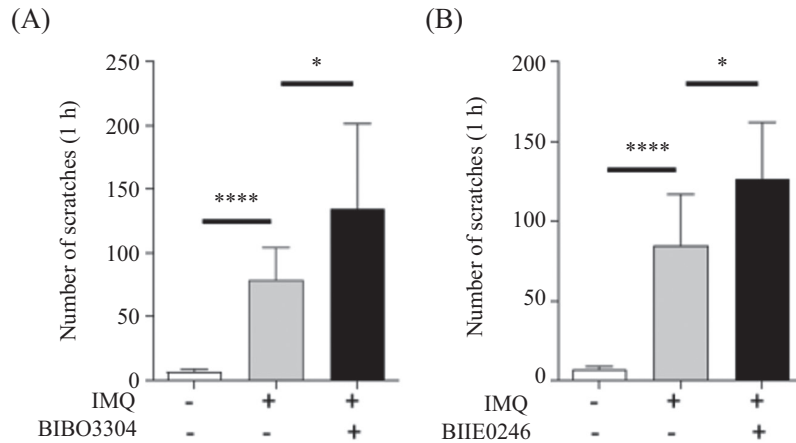


A: 脊髓*Npy1r*和*Npy2r*共表达; B: *Npy1r*和*Grp*在脊髓中的共表达。

A: co-expression of *Npy1r* and *Npy2r* in the spinal cord; B: co-expression of *Npy1r* and *Grp* in the spinal cord.

图9 小鼠的*Npy1r*和*Npy2r*以及*Grp*在脊髓中的表达情况

Fig.9 Expression of *Npy1r* and *Npy2r*, as well as *Grp* in the spinal cord of mice



A: NPY受体Y1拮抗剂对IMQ小鼠抓挠行为的影响; B: NPY受体Y2拮抗剂对IMQ小鼠抓挠行为的影响。* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

A: effect of NPY receptor Y1 antagonist on scratching behavior of IMQ mice; B: effect of NPY receptor Y2 antagonist on scratching behavior of IMQ mice. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

图10 NPY受体拮抗剂对IMQ小鼠抓挠行为的影响

Fig.10 Effects of NPY receptor antagonists on scratching behavior of IMQ mice

相关神经肽胃泌素释放肽 (gastrin-releasing peptide, *Grp*) 的共表达情况。结果表明, *Npy1r* 与 *Grp* 在部分神经元中存在共表达(图9B)。

2.9 Y1和Y2受体拮抗剂对IMQ小鼠抓挠行为的影响

最后, 我们通过鞘内注射 Y1(BIBO3304) 和 Y2(BIIE0246) 受体拮抗剂后, 观察 IMQ 小鼠模型的抓挠行为变化。结果显示鞘内注射 Y1 受体拮抗剂后, 与对照组相比, Y1 拮抗剂组小鼠的抓挠行为明显增多 ($t=2.190$, $P < 0.05$)。鞘内注射 Y2 受体拮抗剂后, 与对照组相比, Y2 拮抗剂组小鼠的抓挠行为明显增多 ($t=2.233$, $P < 0.05$)(图10)。

3 讨论

银屑病是一种常见的自身免疫性皮肤病, 其主要特征是皮肤上出现红色斑块, 通常伴有银白色鳞屑, 全世界约有 1.25 亿银屑病患者^[1]。目前临床上局部治疗仍然是治疗轻度银屑病最常见的手段, 中度至重度银屑病的治疗药物包括抑制 TNF- α 、IL-12、IL-23p40、IL-17 和 IL-23p19 的生物制剂, 以及磷酸二酯酶 4 抑制剂等^[4]。

痒是银屑病患者常见的症状, 尤其是在病情严重时, 瘙痒感觉可能会极大地影响患者生活质量^[15], 因此解决瘙痒对改善银屑病患者的生活质量具有重要意义。利用 IMQ 诱导的小鼠皮炎模型可以有效模拟银屑病样皮损, 本研究采用 IMQ 构建小鼠银屑病

样皮损模型, 发现造模小鼠会出现鳞屑、红斑、皮肤增厚等症状, 同时造模小鼠会出现相当严重的瘙痒表型。

有文献报道化学瘙痒通路从外周传入中枢需要通过 DRG 的中继作用, DRG 中有一群 Nppb 阳性神经元, 外周的化学瘙痒信号可以激活 Nppb 阳性神经元^[16], Nppb 阳性神经元随后激活脊髓中的 Grp 阳性神经元。Grp 进而激活表达胃泌素释放肽受体的中间神经元并将周围瘙痒信息传递到大脑^[9]。在 DRG 中, 我们发现在 IMQ 造模小鼠的 DRG 中有 96% Nppb 阳性神经元表达 *Npy2r*。而在脊髓中, 我们通过 RNAscope ISH 发现 *Npy1r* 与 *Grp* 有部分共表达, 还有部分神经元同时表达 *Npy1r* 与 *Npy2r*。

NPY 是一种神经肽, 已被发现与瘙痒感觉有关。NPY 开始被认为是与机械性瘙痒相关的神经肽, 表达 NPY 的脊柱中间神经元的消融或选择性沉默这群神经元可以增强机械性瘙痒。BOURANE 等^[17] 利用 0.07 g 冯·弗雷细丝刺激小鼠光滑皮肤, 建立了一种新的机械性瘙痒小鼠模型用来模拟昆虫在暴露的皮肤移动时产生的瘙痒感觉。在鞘内注射 Y1 选择性激动剂能减少细丝引起的刮擦行为, 说明 NPY-Y1 轴能抑制机械性瘙痒^[18]。NPY 对化学瘙痒也有抑制作用, MA 等^[19] 与 GAO 等^[20] 发现通过皮内注射组胺或肥大细胞脱颗粒剂 48/80 可引起小鼠产生瘙痒, 在鞘内注射 Y1 选择性激动剂或是 Y2 选择性激动剂, 能减少 48/80 和组胺诱导的刮擦。这说明激活

NPY-Y1/Y2轴也能抑制化学性瘙痒。

在皮肤疾病如银屑病中, NPY的作用可能因不同的生理环境而有所不同。一般来说, NPY通常被认为是一种抑制性的神经递质, 它可以调节神经系统的兴奋性, 对疼痛和瘙痒产生抑制作用^[21]。我们的研究显示, IMQ造模后小鼠瘙痒行为增加, 这种情况可能涉及到多个因素, 包括其他神经递质的作用、炎症反应、免疫系统的参与等。小鼠背根神经节的NPY免疫反应性上调, 可能是一种代偿性抗伤害反应。与这种解释一致的是, 在MRMT-1大鼠骨痛模型中大鼠的伤害感受行为增多, 同时也会出现NPY免疫反应性上调, 鞘内施用NPY可减少大鼠的伤害感受行为。而Y1受体拮抗剂(BIBO3304)和Y2受体拮抗剂(BIIE0246)均减弱了这种作用, 表明两种受体都参与介导NPY的抗伤害作用^[21]。在IMQ诱导的银屑病样皮炎小鼠模型中, 我们的研究发现鞘内注射Y1受体拮抗剂(BIBO3304)或Y2受体拮抗剂(BIIE0246)后, 小鼠的瘙痒行为明显增多。这表明NPY-Y1/Y2轴调节银屑病小鼠模型的瘙痒症状。

此外, 虽然有文献报道银屑病患者血浆中NPY水平降低, 但是这与我们发现的银屑病造模小鼠DRG中NPY表达量增加的结果并不相悖。我们发现的NPY表达上调的部位是在背根神经节, 而NPY几乎在整个中枢神经系统和外周的每个组织中都有表达, 其表达几乎可以被所有类型的免疫细胞诱导, 因此不同部位NPY的水平变化趋势会存在不同。而在外周血中虽然存在NPY, 但是由于血液和脊髓之间存在血脊髓屏障, 血脊髓屏障可防止毒素、血细胞和病原体进入脊髓^[22], 因此血浆中的NPY主要在外周起作用, 参与调节免疫细胞; 而NPY受体表达在背根神经节与脊髓的瘙痒相关神经元中, DRG来源的NPY的可能对瘙痒的调节更加重要^[4]。

JAKOBSSON等^[23]发现Y1激动剂可以通过在背角浅表中共表达Y1、Sst和Grp的中间神经元的超极化来抑制化学瘙痒传递。而NPY可能通过激活Y2阻止表达Nppb的中枢末端释放瘙痒性神经递质, 但这仍然需要具体实验证明。

本研究使用咪喹莫特诱导的银屑病样皮炎小鼠模型, 验证了该模型在研究银屑病瘙痒方面的可靠性。此外, 本研究初步探讨了银屑病引发的瘙痒现象, 我们的实验结果与先前报道关于NPY受体表达方面的研究结果趋势一致, 本研究还证实了抑制

NPY-Y1/Y2轴会加重银屑病小鼠模型的瘙痒症状。

综上, 本研究的结果表明, NPY在IMQ诱导的银屑病瘙痒模型小鼠的DRG中表达上调, *Npy2r*与*Nppb*阳性神经元高度共表达; 脊髓中*Npy1r*与*Grp*有部分共表达; NPY-Y1/Y2轴参与银屑病小鼠模型的瘙痒症状。

参考文献 (References)

- [1] GRIFFITHS C E M, ARMSTRONG A W, GUDJONSSON J E, et al. Psoriasis [J]. *Lancet*, 2021, 397(10281): 1301-15.
- [2] LEE H J, KIM M. Challenges and future trends in the treatment of psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13313.
- [3] ZHU Y, WU Z, YAN W, et al. Allosteric inhibition of SHP2 uncovers aberrant TLR7 trafficking in aggravating psoriasis [J]. *EMBO Mol Med*, 2022, 14(3): e14455.
- [4] ANDERSON Z T, DAWSON A D, SLOMINSKI A T, et al. Current insights into the role of neuropeptide Y in skin physiology and pathology [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 838434.
- [5] OH J, FREEMAN A F, PROGRAM N C S, et al. The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies [J]. *Genome Res*, 2013, 23(12): 2103-14.
- [6] SALOMON J, BARAN E. The role of selected neuropeptides in pathogenesis of atopic dermatitis [J]. *J Eur Acad Dermatol Venerol*, 2008, 22(2): 223-8.
- [7] REICH A, ORDA A, WISNICKA B, et al. Plasma neuropeptides and perception of pruritus in psoriasis [J]. *Acta Derm Venereol*, 2007, 87(4): 299-304.
- [8] CUI H, SU W, CAO Y, et al. Lack of spinal neuropeptide Y is involved in mechanical itch in aged mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 654761.
- [9] NELSON T S, TAYLOR B K. Targeting spinal neuropeptide Y1 receptor-expressing interneurons to alleviate chronic pain and itch [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 196: 101894.
- [10] HÖKFELT T, BRUMOVSKY P, SHI T, et al. NPY and pain as seen from the histochemical side [J]. *Peptides*, 2007, 28(2): 365-72.
- [11] HÄRING M, ZEISEL A, HOCHGERNER H, et al. Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(6): 869-80.
- [12] MA H, GAO T, JAKOBSSON J E T, et al. The neuropeptide Y Y2 receptor is coexpressed with Nppb in primary afferent neurons and Y2 activation reduces histaminergic and IL-31-induced itch [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 372(1): 73-82.
- [13] CHEN W C, LIU Y B, LIU W F, et al. Neuropeptide Y is an immunomodulatory factor: direct and indirect [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 580378.
- [14] ARMSTRONG A W, READ C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323(19): 1945-60.
- [15] WANG W, WANG H, ZHAO Z, et al. Thymol activates TRPM8-mediated Ca²⁺ influx for its antipruritic effects and alleviates inflammatory response in imiquimod-induced mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 407: 115247.
- [16] HUANG J, POLGAR E, SOLINSKI H J, et al. Circuit dissec-

- tion of the role of somatostatin in itch and pain [J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(5): 707-16.
- [17] BOURANE S, DUAN B, KOCH S C, et al. Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons [J]. *Science*, 2015, 350(6260): 550-4.
- [18] ACTON D, REN X, DI COSTANZO S, et al. Spinal neuropeptide Y1 receptor-expressing neurons form an essential excitatory pathway for mechanical itch [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(3): 625-39.e6.
- [19] MA H, GAO T, JAKOBSSON J E T, et al. The neuropeptide Y Y2 receptor is coexpressed with Nppb in primary afferent neurons and Y2 activation reduces histaminergic and IL-31-induced itch [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 372(1): 73-82.
- [20] GAO T, MA H, XU B, et al. The neuropeptide Y system regulates both mechanical and histaminergic itch [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(11): 2405-11.
- [21] DIAZ-DELCASTILLO M, CHRISTIANSEN S H, APPEL C K, et al. Neuropeptide Y is up-regulated and induces antinociception in cancer-induced bone pain [J]. *Neuroscience*, 2018, 384: 111-9.
- [22] JIN L Y, LI J, WANG K F, et al. Blood-spinal cord barrier in spinal cord injury: a review [J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(9): 1203-24.
- [23] JAKOBSSON J E T, MA H, LAGERSTROM M C. Neuropeptide Y in itch regulation [J]. *Neuropeptides*, 2019, 78: 101976.