

·基础研究·

## L-茶氨酸局部给药抑制皮肤神经末梢的异常生长缓解小鼠银屑病瘙痒

揭英桃, 林震嘉, 张 珺, 谈 智, 许雅南, 熊 嫒, 唐 源, 周利君

(中山大学中山医学院生理教研室/中山大学疼痛研究中心, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】观察L-茶氨酸是否在咪喹莫特(IMQ)诱导的银屑病小鼠中具有止痒作用并初步探讨机制。【方法】将IMQ软膏局部应用于小鼠背部皮肤建立银屑病模型;L-茶氨酸经口服(10 mg/kg·d)或病损皮肤局部涂抹(50、125、250 mmol/L, 2次/d)进行防治处理。采用抓挠等自发性行为学测试检测治疗效果;并运用免疫荧光染色(IF)、Western Blot(WB)及原代背根神经节(DRG)神经元培养技术探讨相关机制。【结果】口服L-茶氨酸对IMQ诱导的瘙痒无明显作用,但病损皮肤局部应用明显改善银屑病模型小鼠皮肤不舒适感诱发的舔或咬及畏缩等自发性行为,并呈浓度依赖性。IF和WB结果显示,L-茶氨酸不仅能抑制模型小鼠皮肤TNF- $\alpha$ 过表达,还能阻止 $\beta$ 3-tubulin神经纤维的异常生长和瘙痒相关分子瞬态受体电位香草酸1(TRPV1)的上调。体外实验进一步证实L-茶氨酸能浓度依赖性地直接抑制IMQ引起的CGRP<sup>+</sup>、 $\beta$ 3-tubulin<sup>+</sup>神经突起异常生长。【结论】局部应用L-茶氨酸通过抑制皮肤神经纤维的异常生长缓解小鼠银屑病模型的皮肤瘙痒不适感。因此,L-茶氨酸局部给药可成为治疗银屑病慢性瘙痒的一种潜在方法。

**关键词:**银屑病;瘙痒;L-茶氨酸;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;神经末梢异常生长

中图分类号:R758.31

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)02-0161-10

## Topical Application of L-theanine Relieves Mouse Psoriasis Pruritus by Inhibiting Abnormal Growth of Skin Nerve Endings

JIE Ying-tao, LIN Zhen-jia, ZHANG Jun, TAN Zhi, XU Ya-nan, XIONG Ying, TANG Yuan, ZHOU Li-jun

(Department of Physiology, Zhongshan School of Medical, Sun Yat-sen University//Center for Pain Research, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZHOU Li-jun; E-mail: zhoulij3@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate whether L-theanine exerts anti-pruritic effect on mice with imiquimod (IMQ)-induced psoriasis and its related mechanisms.【Methods】We established the psoriasis model by applying the IMQ ointment topically on mice back skin and oral (10 mg/kg·d) or topical pretreatment (50, 125, 250 mmol/L, twice one day) of L-theanine was used as the treatment. Spontaneous behavior, such as scratching, was used to detect the therapeutic effect. Immunofluorescence (IF), Western Blot (WB) and primary dorsal root ganglion (DRG) neuronal culture were used to investigate the mechanisms.【Results】Oral administration of L-theanine had no apparent effect on IMQ-induced pruritus, but topical delivery in the lesional skin significantly improved the spontaneous behavior such as licking or biting and flinching in a dose-dependent manner. IF and WB results showed that L-theanine not only inhibited the overexpression of TNF- $\alpha$  in model mouse skin, but also prevented the abnormal growth of  $\beta$ 3-tubulin<sup>+</sup> nerve fibers and the upregulation of tran-

收稿日期:2020-12-14

基金项目:国家自然科学基金(81771204);广东省自然科学基金(2019A1515011838, 2020A1515010204)

作者简介:揭英桃,硕士研究生,研究方向:瘙痒与疼痛, E-mail: jieyt@mail2.sysu.edu.cn;周利君,通信作者,教授,博士生导师, E-mail: zhoulij3@mail.sysu.edu.cn

sient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), an itch-related molecule. Moreover, the results from the experiments with primary cultured DRG neurons further confirmed that L-theanine directly reduced IMQ-induced abnormal outgrowth of CGRP<sup>+</sup>,  $\beta$ 3-tubulin<sup>+</sup> neurites in a concentration dependent manner. [Conclusions] Topical application of L-theanine can relieve pruritus or discomfort in IMQ-induced psoriasis mouse model by inhibiting abnormal growth of skin nerve fiber endings. Therefore, L-theanine could be a potential treatment for chronic itch in psoriasis.

**Key words:** psoriasis; pruritus; L-theanine; TNF- $\alpha$ ; abnormal growth of nerve endings

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(2): 161-170]

银屑病(俗称牛皮癣),是一种常见的慢性复发性炎症性皮肤病,影响全球约1%~3%的人口<sup>[1]</sup>。约60%~90%银屑病患者常感皮肤不适,如皮肤疼痛和慢性瘙痒<sup>[2]</sup>。其中瘙痒不仅是患者最常见的主观感觉,也是最麻烦的症状之一,与牛皮癣的严重程度密切相关,影响患者的生活质量和睡眠<sup>[3]</sup>。银屑病瘙痒的病理生理机制尚不完全清楚,主要与精神压力及神经源性炎症紧密相关。研究表明表皮感觉瘙痒相关的神经纤维、表皮角质形成细胞及真皮其他细胞释放的神经肽(如降钙素基因相关肽CGRP)、促炎细胞因子(如TNF- $\alpha$ , IL-17)及瘙痒相关因子(如瞬时受体电位通道TRPV1)等均在银屑病伴瘙痒的患者皮肤组织中明显增加,为银屑病瘙痒发生发展的重要因素<sup>[2,4]</sup>。传统止痒疗法(如抗组胺)对银屑病瘙痒治疗有限;临床治疗银屑病的传统药物对瘙痒治疗效果甚微,甚至加重<sup>[5]</sup>;而近年许可的生物制剂治疗,如TNF- $\alpha$ 抑制剂、IL-17抑制剂可快速有效地缓解瘙痒,但价格昂贵<sup>[6-7]</sup>。这使得银屑病瘙痒的治疗仍然具有挑战,因此,需要进一步探讨并研发专门针对银屑病瘙痒等感觉不适的防治策略和药物。L-茶氨酸(L-theanine)是茶叶(特别是绿茶)及部分菌菇所特有的一种非蛋白质游离氨基酸<sup>[8]</sup>。已有不少研究证实L-茶氨酸具有多种生物学活性,如抗氧化、抗炎,能促进睡眠、抗焦虑、抗抑郁、改善认知、情绪和脑损伤等神经保护以及促进术后恢复等作用<sup>[9-10]</sup>。我们前期研究发现局部给药L-茶氨酸可通过抑制内皮细胞中性粒细胞的活化来改善急性皮炎<sup>[11]</sup>。但L-茶氨酸是否具有抑制银屑病瘙痒的作用还没有报道。因此,本研究将初步探讨L-茶氨酸对小鼠银屑病瘙痒的防治效果及其

机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

8~10周龄雌性SPF级C57BL/6J小鼠(18~20g)56只,3~5周龄小鼠25只,购于中山大学实验动物中心(广州)。生产许可证:SCXK(粤)2016-0029;使用许可证:SYXK(粤)2017-0081。动物饲养于安静无噪音、人工昼夜节律环境中,相对湿度为40%~70%,温度为20~26℃。动物分笼饲养,自由饮水、进食,每笼5~6只,并用耳标标识。所有笼具、饲料、饮水、垫料均严格消毒。动物的使用协议和动物处理程序获得了中山大学实验动物管理与使用委员会(IACUC)的批准。

### 1.2 主要试剂

本实验用到的试剂和抗体如下:用作银屑病模型制作的咪喹莫特乳膏(艾达乐,美国3M公司);L-茶氨酸(T9280,索莱宝);细胞培养用的咪喹莫特(1338313,美国药典委员会USP);异氟烷(瑞沃德);rabbit anti- $\beta$ 3-tubulin(D71G9, CST公司);rabbit anti-TRPV1(ab10296, abcam公司);mouse anti- $\beta$ -actin(3700s, CST公司);mouse anti-TNF- $\alpha$ (ab1793 for IF; ab8248 for WB; abcam公司);goat anti-CGRP(ab36001, abcam公司)。免疫荧光实验的二抗:Donkey anti-Mouse Alexa Fluor 555(A31570), Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 647(A31573), Donkey anti-Goat Alexa Fluor 555(A21432), Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488(A21206),均来自Life Technologies公司。免疫印迹实验的二抗:Donkey Anti-Mouse IgG H&L(HRP)(ab6820), Donkey Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(ab6802),均来自abcam公司。

### 1.3 小鼠银屑病模型制作及L-茶氨酸溶液配制与给药

按文献所述,使用咪喹莫特软膏(IMQ)制作小鼠银屑病瘙痒模型<sup>[12-13]</sup>。提前3 d用剃毛刀将小鼠背部毛发剃除,实验开始时(0 d)于每只小鼠背部2.0 cm×3.0 cm皮肤涂抹62.5 mg IMQ,每间隔24 h涂抹1次,连续涂抹至取材当天,共涂抹5次。

L-茶氨酸皮肤局部给药浓度参照我们前期局部给予不同浓度L-茶氨酸缓解急性皮炎的研究<sup>[11]</sup>。首先将L-茶氨酸溶于50%丙酮水溶液,分别配成0、50、125、250 mmol/L的溶液。溶剂对照(Vehi)为单纯的50%丙酮水溶液。L-茶氨酸溶液或溶剂对照组每天2次,第1次是IMQ涂药前30 min皮损局部先给L-茶氨酸溶液100 μL,12 h后再在皮损局部给药1次,连续给药至取材当天。

参考以前小鼠口服L-茶氨酸的研究给药浓度(4~200 mg/kg·d)<sup>[14-15]</sup>,选择中间剂量为每天给药量为10 mg/kg。具体按照小鼠每天饮水量(约6 mL),16.7 mg L-茶氨酸加入500 mL水中配成小鼠饮用水(浓度为3.33%)。

### 1.4 自发性行为学分析

实验前,在异氟烷短暂麻醉下用电动剃毛机将动物背部的毛提前剃除,暴露出背部皮肤,让动物适应无毛状态。再将动物每天放入单独、透明的亚克力测试盒(14 cm×18 cm×12 cm)中2 h用以适应测试的环境(相对湿度为40%~70%,温度为20~26℃),适应时间至少3 d。给药处理4 h后,采用摄像机正对着亚克力测试盒上方拍摄观察小鼠30 min。参照文献<sup>[16]</sup>,小鼠自发性行为学可分为:①后肢抓挠(hind paw scratching):当小鼠后爪伸向给药的背部搔抓至放回地面或者嘴里算1次事件;②舔或咬(biting/licking):当小鼠嘴和鼻子接触到给药的背部直至回头或者执行其他行为算1次事件;③畏缩(flinching):当小鼠旋转或者抖动给药背部算1次事件。3种不同小鼠自发性行为学数据均由两位不清楚实验分组的测试者分开分析后取均值所得。

### 1.5 免疫荧光实验

造模4.5 d后,10%乌拉坦溶液腹腔注射麻醉小鼠后,先后用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)和40 g/L多聚甲醛溶液灌注后取材给药处理的背部皮肤,经过PFA后固定和30%蔗糖脱水沉底后,冰冻切片(16 μm)。加入5%驴血清封闭1 h,吸走封

闭液,加入一抗(TNF-α,β3-tubulin,CGRP,比例为1:500),放入4℃摇床慢摇过夜。吸走一抗,用PBS清洗3次,每次10 min,然后加入二抗摇床孵育1 h,PBS清洗3次,每次10 min。封片,拍摄。

### 1.6 免疫印迹法

取材药物处理的皮肤,液氮低温下研磨提取蛋白后定量并且加入上样缓冲液沸水煮5 min,电泳条件为浓缩胶60 V跑30 min,分离胶120 V跑60 min。使用甲醇活化过的0.22 μm PVDF膜进行转膜,电转条件为300 mA,90 min。转膜期间注意保持转膜装置低温。蛋白膜经5%脱脂牛奶室温封闭1 h后再在4℃环境下与一抗轻摇孵育过夜;然后经二抗抗体孵育1 h后,用超敏ECL(Millipore公司)化学发光液显色。Tanon-5200化学发光成像系统(Tanon科技公司)曝光,再经CCD摄像头拍摄显影条带,ImageJ对图像进行光密度分析。

### 1.7 背根神经节细胞培养

参考本实验室背根神经节(DRG)培养技术<sup>[17]</sup>,二氧化碳麻醉安乐死C57BL/6小鼠(3~5周),取双侧背根神经节解剖转移至DMEM/F12(GIBCO)。剪碎后,加入5 mL胶原酶(3 mg,C9891 sigma)和胰蛋白酶(2 mg,T9201, sigma)混合溶液消化(37℃,约25 min),然后加入相同体积的完全培养基(DMEM/F12+100 mL/L胎牛血清+1%青霉素和链霉素,GIBCO)结束消化,离心,弃上清,重悬后接种在0.01%多聚-L-赖氨酸(PLL,P4832, sigma)包被的48孔板中培养。细胞培养液为:DMEM/F12+100 mL/L胎牛血清+1%青霉素和链霉素+1%谷氨酰胺(200 mmol/L,G7513, sigma)。接种24 h后,加入阿糖胞苷(浓度为5 μmol/L,指培养液终浓度,下面药物相同)。48 h后更换细胞培养液,2 h后加入50或500 μmol/L L-THN和IMQ(0.2 μg/mL)。THN和IMQ每天加1次,共加2 d。培养第4 d后,40 g/L多聚甲醛固定细胞进行免疫荧光染色。

### 1.8 实验分组及设计

1.8.1 观察小鼠自发性行为实验 56只C57BL/6小鼠分为7组,分别为溶剂软膏对照组(Vehi)、250 mmol/L L-茶氨酸局部给药对照组(250 mmol/L T-THN);模型组(Vehi+IMQ)、10 mg/kg·d L-茶氨酸口服治疗组(10 mg/kg O-THN+IMQ)、以及50、125、250 mmol/L L-茶氨酸局部给药治疗组(50、125、250 mmol/L T-THN+IMQ),每组各8只。各

组在每次IMQ给药4 h后进行30 min自发性行为学视频拍照。造模4.5 d取材,一部分动物取材用作免疫荧光实验(IF),一部分动物用作免疫印迹实验(WB)。

1.8.2 背根神经节(DRG)细胞培养实验 25只C57BL/6小鼠(3~5周龄)用于原代DRG神经元培养。细胞实验为5组:对照组(CON)、单纯L-茶氨酸对照(500  $\mu\text{mol/L}$  THN)、模型组(Vehi + IMQ)、50  $\mu\text{mol/L}$  给药组(50  $\mu\text{mol/L}$  THN + IMQ)、500  $\mu\text{mol/L}$  给药组(500  $\mu\text{mol/L}$  THN + IMQ);重复3次。

## 1.9 统计学方法

免疫荧光(IF)和免疫印迹(WB)结果采用image J软件测量荧光灰度值,其中神经纤维的长度通过Neuron J插件测量。所有数据为正态分布的计量结果,以均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示。采用SPSS 20软件进行多组数据比较,图2-4数据符合正态分布且方差齐时one-way ANOVA,事后用Tukey HSD法进行两两比较;若数据符合正态分布但方差不齐时采用Welch's ANOVA,事后用Tamhane's T2进行两两比较。图1行为学结果的统计采用two-way ANOVA,事后采用Least Significance Difference(LSD)法进行两两比较每个时间点的各组数据。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 茶氨酸局部应用缓解咪喹莫特诱导的小鼠银屑病瘙痒自发性行为

我们前期研究发现L-茶氨酸局部应用能明显缓解佛波酯(TPA)诱导的急性皮炎<sup>[11]</sup>,但L-茶氨酸是否具有抗银屑病瘙痒作用还不清楚。以前的研究显示在IMQ诱导小鼠银屑病模型中,可通过观察后爪抓挠(hind paw scratching)<sup>[13]</sup>或咬/舔(biting/licking)、畏缩(flinching)<sup>[16]</sup>等自发性行为次数来体现皮肤瘙痒等感觉不适症状的变化。因此,本研究首先采用这些自发性行为学来观察口服或皮肤局部L-茶氨酸处理对小鼠银屑病瘙痒的防治效果。与2019年Kodji等观察结果一致<sup>[16]</sup>,我们发现IMQ诱导的银屑病模型组中小鼠后爪抓挠没有明显变化,但咬/舔和畏缩两种行为学在IMQ给药第2 d 4 h后明显增加,并时程性递增至4 d 4 h实验结束(图1,红色)。L-茶氨酸口服给药组(10 mg/kg O-

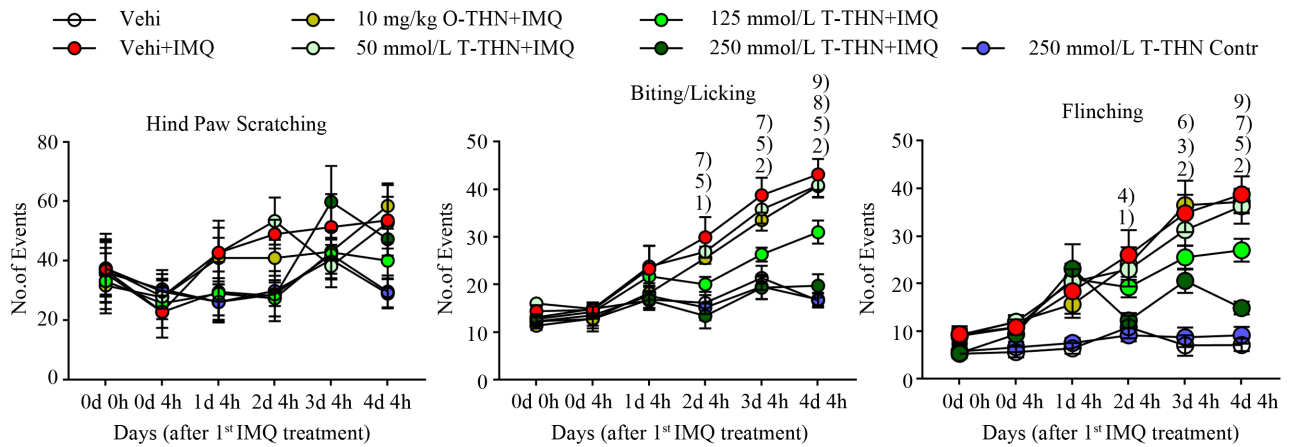
THN + IMQ,黄绿色)不能明显降低IMQ诱导的小鼠自发性行为,表明这个剂量的口服L-茶氨酸对银屑病瘙痒无明显治疗效果。惊奇的是,局部给予L-茶氨酸处理从2 d 4 h起能明显抑制IMQ引起的咬/舔和畏缩两种行为学的增加,并呈现浓度依赖性抑制(50 mmol/L T-THN + IMQ,浅绿色;125 mmol/L T-THN + IMQ,绿色;250 mmol/L T-THN + IMQ,深绿色)。250 mmol/L L-茶氨酸改善IMQ诱导小鼠银屑病瘙痒行为效果最明显(深绿色),但对正常小鼠搔抓行为无影响(250 mmol/L T-THN Contr,蓝色)。这些结果表明L-茶氨酸局部应用具有浓度依赖性抗银屑病瘙痒作用。在后续实验中,我们将选择10 mg/kg口服L-茶氨酸治疗组(O-THN + IMQ)和250 mmol/L L-茶氨酸局部治疗组(T-THN + IMQ)进行机制探讨。

### 2.2 茶氨酸局部应用明显抑制咪喹莫特诱导的TNF- $\alpha$ 表达上调

鉴于致炎细胞因子TNF- $\alpha$ 在银屑病炎症发生发展中的关键地位<sup>[18-20]</sup>,我们接着从是否影响TNF- $\alpha$ 表达来探讨L-茶氨酸抗瘙痒作用是由抗炎作用所致。与临床银屑病皮肤和IMQ诱导小鼠银屑病皮肤中TNF- $\alpha$ 局部高表达一致<sup>[21]</sup>,我们小鼠银屑病模型4.5 d的皮肤TNF- $\alpha$ 表达显著上调:表皮层中也有明显增加,但主要弥漫表达在真皮层(图2A、B)。口服给药L-茶氨酸能轻微抑制真皮层乳头部高表达的TNF- $\alpha$ ,但对表皮层及真皮层结缔组织层的TNF- $\alpha$ 无明显作用。而皮损皮肤局部给予250 mmol/L L-茶氨酸能广泛抑制表皮和真皮层上调的TNF- $\alpha$ (图2A、B)。这一结果也被免疫印迹法(WB)证实(图2C、D):口服L-茶氨酸对IMQ诱导的皮肤TNF- $\alpha$ 三聚体和单体的表达上调无明显影响,但局部应用能显著降低两种形式的TNF- $\alpha$ 表达。这些结果表明L-茶氨酸局部应用能显著抑制IMQ受损皮肤TNF- $\alpha$ 上调,具有局部慢性抗炎作用。

### 2.3 局部应用茶氨酸显著抑制咪喹莫特诱导的神经末梢异常生长

从临床和小鼠银屑病模型获得的证据表明,表皮神经纤维的过度生长是银屑病瘙痒的重要原因之一<sup>[16, 22-23]</sup>,因此,抑制感觉神经以及瞬时受体电位(TRP)通道(TRPV1、TRPA1)—神经肽(CGRP, P物质)通路就能缓解银屑病瘙痒等皮肤不适的自发



0 d 0 h represents the day before drug treatment. Left picture: hind paw scratching; middle picture: biting/licking; right picture: flinching. Vehi: the control mice were only treated with vehicle solution on the back skin twice one day for 4.5 d. Vehi +IMQ: the group was applied with 62.5 mg imiquimod (IMQ) once a day at 30 min after the first vehicle solution treatment for 4.5 d. 250 mmol/L T-THN: the group was topically administrated of 250 mmol/L L-theanine (T-THN) as the control twice one day for 4.5 d. 50/125/250 mmol/L T-THN + IMQ: 100  $\mu$ L 50, 125 or 250 mmol/L L-THN topical administration twice one day and 62.5 mg IMQ once a day at 30 min after the first L-THN for 4.5 d. 10 mg/kg O-THN + IMQ: the group was orally treated with L-THN (O-THN, 10 mg/kg·d) and 62.5 mg IMQ once a day for 4.5 d.  $n = 6 \sim 8$  mice/group. All data were shown by means  $\pm$  SEM, and were analyzed by two-way ANOVA followed by Least Significance Difference (LSD) test for each group. Hind Paw Scratching:  $F = 1.563$ ,  $P = 0.158$  (groups factor); Biting/Licking:  $F = 10.171$ ,  $P < 0.0001$  (groups factor). Flinching:  $F = 17.225$ ,  $P < 0.0001$  (groups factor). <sup>1)</sup> $P < 0.001$ , <sup>2)</sup> $P < 0.0001$  between Vehi + IMQ vs Vehi; <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.001$ , <sup>5)</sup> $P < 0.0001$  between 250 mmol/L T-THN + IMQ vs Vehi + IMQ; <sup>6)</sup> $P < 0.05$ , <sup>7)</sup> $P < 0.01$ , <sup>8)</sup> $P < 0.001$  between 125 mmol/L T-THN + IMQ vs Vehi + IMQ; <sup>9)</sup> $P < 0.01$  between 250 mmol/L T-THN + IMQ vs 125 mmol/L T-THN + IMQ

图1 L-茶氨酸预处理对IMQ诱导小鼠银屑病模型自发性行为时程变化的影响

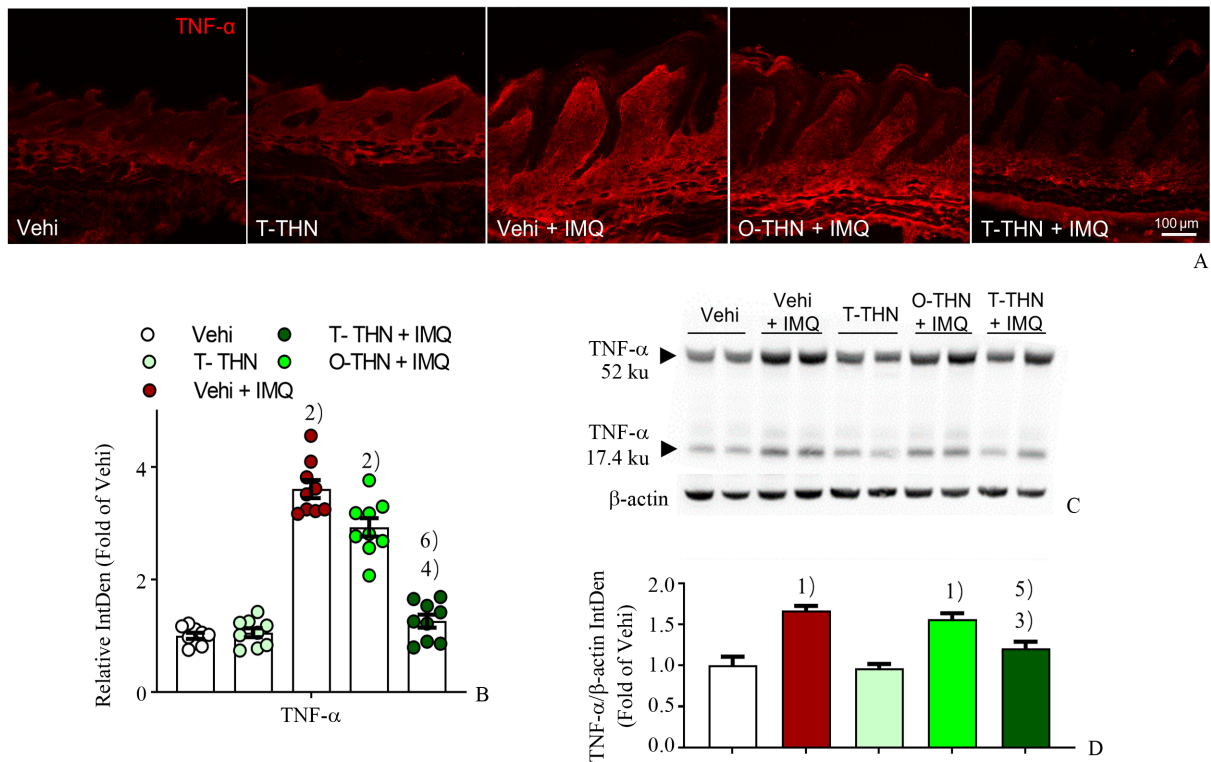
Fig. 1 The time course for the changes in spontaneous behaviors in imiquimod-induced mouse psoriasis model with or without L-theanine pretreatment

性行为<sup>[16]</sup>。我们发现IMQ诱导银屑病模型4.5 d的小鼠皮肤中 $\beta 3$ -tubulin阳性神经纤维长度显著增加,尤其在表皮以及表皮真皮交界处(图3A、B)。皮肤局部单纯给予L-茶氨酸(T-THN)对神经末梢的生长无明显影响。与IMQ组相比,L-茶氨酸口服(O-THN + IMQ)能轻微抑制神经纤维的长度,但局部给药组(T-THN + IMQ)对神经纤维异常生长的抑制效果显著,明显强于口服给药组。不过,其神经纤维长度也并未恢复到对照水平。以上结果表明L-茶氨酸局部应用显著抑制IMQ诱导的神经末梢异常生长,而口服L-茶氨酸有轻度抑制作用。

此外,我们检测皮肤中TRPV1表达来进一步验证L-茶氨酸对瘙痒的调控作用。Western blot结果显示与对照皮肤相比,IMQ模型皮肤中TRPV1表达显著上调,而L-茶氨酸口服(O-THN)或局部给药(T-THN)都能明显抑制TRPV1的上调(图3C、D)。

#### 2.4 茶氨酸抑制咪喹莫特诱导的体外背根神经节神经纤维异常生长

由于L-茶氨酸抑制皮肤TRPV1的上调与改善银屑病瘙痒自发行为学并无相关性,因此,我们采用小鼠原代DRG神经元细胞培养来进一步验证L-茶氨酸对神经纤维异常生长是否具有直接抑制作用。在DRG培养2 d的培养液中加入0.2  $\mu$ g/mL IMQ (Vehi + IMQ)再培养2 d后能明显诱导DRG CGRP阳性(图4A)和 $\beta 3$ -tubulin阳性(图4B)神经纤维的过度生长。单纯500  $\mu$ mol/L L-茶氨酸(500  $\mu$ mol/L THN)对正常神经元纤维的生长没有影响,但与IMQ同时给予的50、500  $\mu$ mol/L L-茶氨酸能明显抑制IMQ引起的CGRP<sup>+</sup> $\beta 3$ -tubulin<sup>+</sup>DRG神经突起的异常生长,并呈现浓度依赖性(图4A~C)。因此,L-茶氨酸可通过抑制外周感觉神经纤维的异常生长缓解银屑病瘙痒。



A, B: representative immunofluorescence images showing the expression of TNF- $\alpha$  (red) in mouse lesional skin at 4.5 days after different treatment and statistical analysis of relative integrated density (relative IntDen) of TNF- $\alpha$  in different groups, as compared with Vehi group. Scale bar = 200  $\mu$ m.  $n = 3$  mice/group, 3 slices/mice. C, D: Western blots show skin TNF- $\alpha$  expression in various groups as indicated ( $n = 4$  in each group). 52 ku or 17.4 ku bands respectively indicate trimer or monomer of TNF- $\alpha$ . Error bars are means  $\pm$  SEM. Welch's ANOVA followed by Tamhane's T2 multiple comparisons test for figure B,  $P < 0.0001$ ; One-way ANOVA followed by Tukey HSD multiple comparisons test for figure D,  $F = 17.619$ ,  $P < 0.0001$ . <sup>1)</sup> $P < 0.001$ , <sup>2)</sup> $P < 0.0001$  vs Vehi; <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.0001$  vs Vehi + IMQ; <sup>5)</sup> $P < 0.05$ , <sup>6)</sup> $P < 0.0001$  vs O-THN + IMQ.

图2 L-茶氨酸局部预处理抑制IMQ诱导的皮肤TNF- $\alpha$ 高表达

Fig. 2 Topical pretreatment of L-theanine inhibits IMQ-induced TNF- $\alpha$  over-expression in the lesional skin

### 3 讨论

银屑病是一种常见的慢性自身炎症性皮肤病,患者常感觉皮肤瘙痒等不适<sup>[2]</sup>。目前,大量药物都针对银屑病的炎症反应,很少有药物专门用于治疗银屑病引发瘙痒等不舒适感觉。

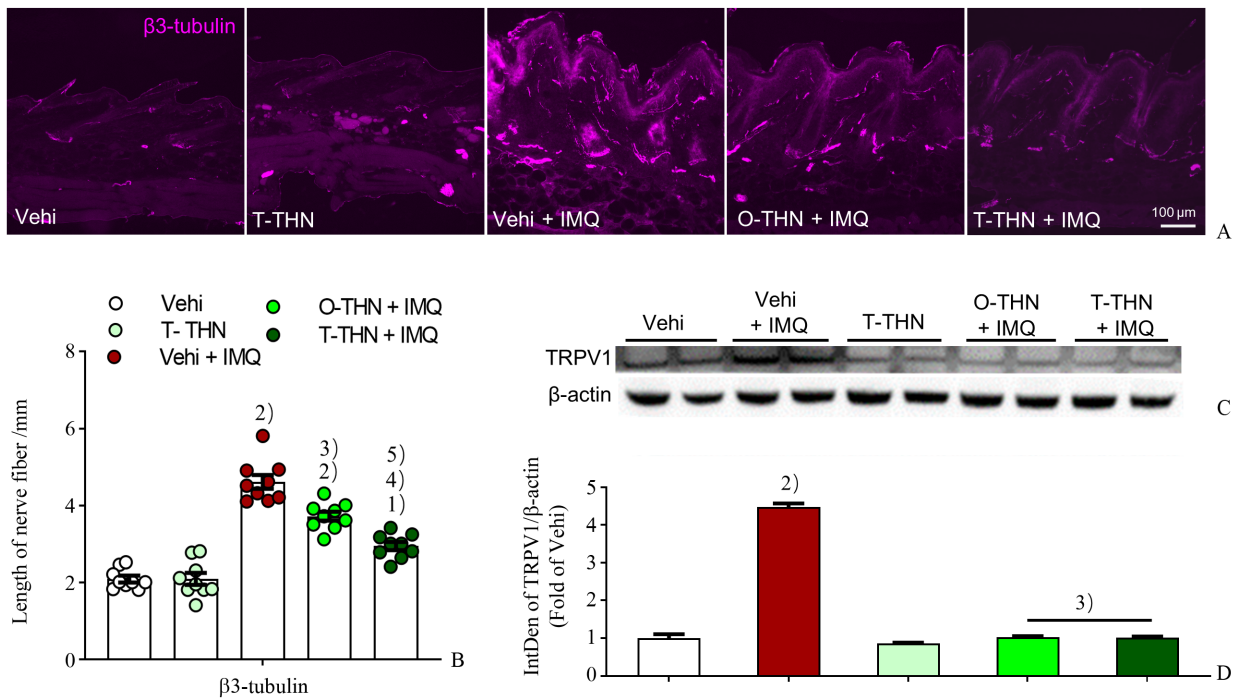
#### 3.1 咪喹莫特诱导瘙痒行为学评判方法的选择

瘙痒是一种主观感觉,动物的瘙痒只能通过观察实验动物自主行为来获得。2016年 Sakai等<sup>[13]</sup>首次在小鼠银屑病模型上报道自发后爪抓挠(hind paw scratching)和触诱发抓挠的痒觉异化(alloknesis)。小鼠背部给予62.5 mg IMQ 1 d后就出现后爪抓挠行为次数明显增多,第2天出现痒觉异化,均可持续至7 d实验结束。2019年 Kodji等<sup>[16]</sup>发现只有部分小鼠背部给予75 mg IMQ第3、4天后出现自发爪抓挠行为增多,而咬/舔和畏缩两种行为却能

稳定在IMQ第2天4 h显著增多,并随着造模时间延长而呈递增趋势。本研究观察IMQ小鼠银屑病模型3种自发性行为变化结果与Kodji等报道基本一致(图1),无明显自发性后爪抓挠瘙痒行为可能是因为IMQ涂抹在背部皮肤,小鼠后爪抓挠不到所致。这与临床银屑病患者瘙痒症状类似:因皮损范围较大,患者并不表现过多的抓挠等瘙痒行为,而感到皮肤疼痛和不适,主诉有烧灼和刺痛感<sup>[2]</sup>。因此,采用咬/舔和畏缩两种自发性行为更适合用来检测小鼠银屑病模型的皮肤不适表现。

#### 3.2 L-茶氨酸抑制银屑病瘙痒的作用机制

银屑病瘙痒发生率较高,但其发病机制尚不完全清楚。已知皮肤局部的炎症反应和传递痒觉的神经通路的异常变化共同介导银屑病瘙痒的发病过程<sup>[2]</sup>。银屑病患者皮肤中各种细胞(如T细胞、角质形成细胞、树突状细胞,肥大细胞、巨噬细胞等)



A, B: Representative images and quantification of immunofluorescence staining showing the expression of  $\beta 3$ -tubulin (magenta, a marker of nerve fiber) in the lesional skin at 4.5 d from different group. Scale bar = 200  $\mu$ m.  $n = 3$  mice/group, 3 slices/mice. C, D: Western blot analysis of TRPV1 expression in mouse skin ( $n = 4$  in each group). Error bars are means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey HSD multiple comparisons test for figure B,  $F = 66.130$ ,  $P < 0.0001$ ; Welch's ANOVA followed by Tamhane's T2 multiple comparisons test for figure D,  $P < 0.0001$ . <sup>1)</sup> $P < 0.001$ , <sup>2)</sup> $P < 0.0001$  vs Vehi; <sup>3)</sup> $P < 0.001$ , <sup>4)</sup> $P < 0.0001$  vs Vehi + IMQ; <sup>5)</sup> $P < 0.01$  vs O-THN + IMQ.

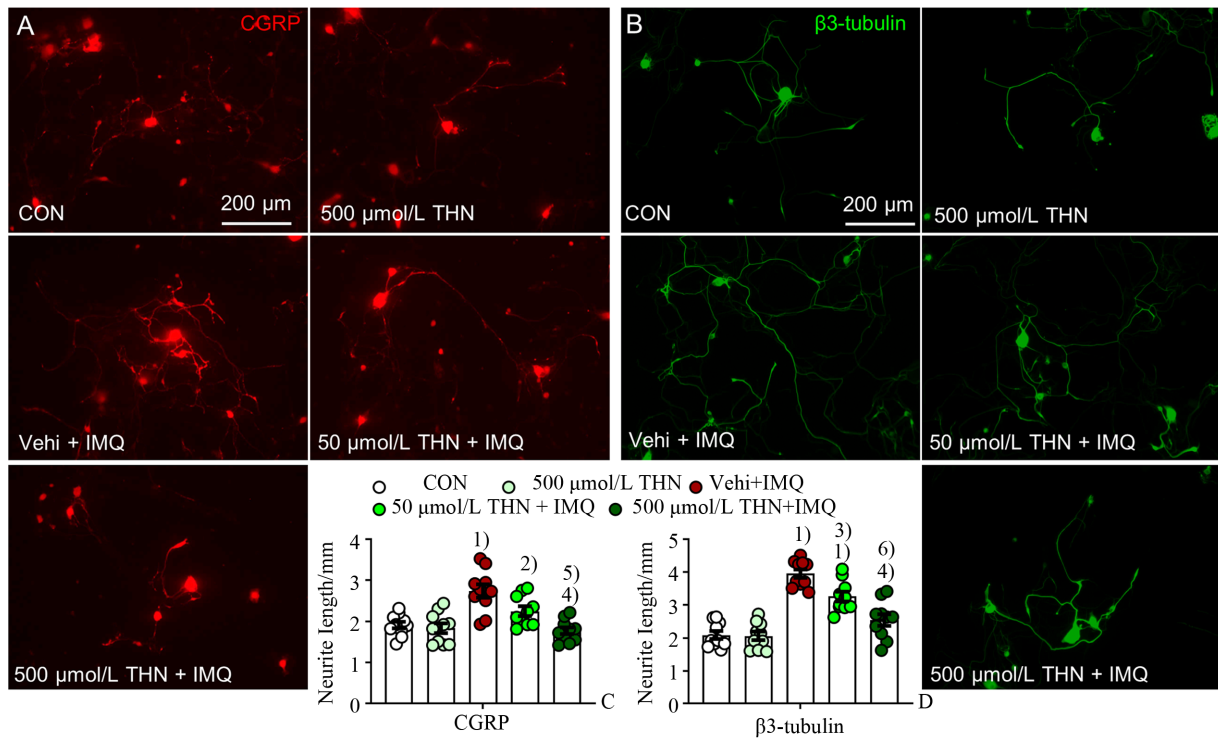
图3 L-茶氨酸对IMQ所致皮肤损伤神经纤维末梢异常生长及TRPV1过表达的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of L-theanine on the abnormal growth of nerve endings and TRPV1 over-expression in the lesional skin induced by IMQ

高表达的促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 触发IL-23/Th17通路在银屑病的发病机制中起着至关重要的作用<sup>[5, 24]</sup>。故此,3种TNF- $\alpha$ 抑制剂英夫利昔单抗、阿达单抗和依那西普已成为临床治疗银屑病炎症及其瘙痒的有效手段<sup>[5]</sup>。此外,瘙痒感觉在受损皮肤产生后需通过痒觉神经通路传递至大脑。临床银屑病瘙痒表皮和真皮乳头处感觉神经纤维增多<sup>[16, 23]</sup>,在受到刺激(内源性或外源性)后神经末梢分泌的各种神经肽(CGRP),直接或间接作用于神经,引起或加重银屑病的瘙痒程度。银屑病瘙痒患者血浆CGRP水平较高,与瘙痒的严重程度相关<sup>[3, 25]</sup>;CGRP受体也在银屑病皮肤中存在,并与瘙痒的严重程度相关<sup>[26]</sup>。基因敲除感觉神经元中的CGRP可改善小鼠的瘙痒<sup>[27]</sup>,表明CGRP可能参与增强瘙痒。临床和小鼠银屑病模型中化学或手术切除小直径的感觉神经/痛觉感受器有利于缓解银屑病患者的感觉不适<sup>[28-29]</sup>。Kodji等<sup>[16]</sup>用化学方法

选择性消耗小直径的痛觉感受器不仅能缓解银屑病样红斑和皮肤炎症,还能改善瘙痒等自发性行为。但通过遗传学和药理学方法阻断TRPV1、TRPA1和神经肽(P物质和CGRP)的共同感觉神经源性机制可抑制瘙痒行为,但不能抑制炎症。这提示TRP-神经肽通路在引起皮肤不适方面的关键作用,而银屑病的持续炎症相对更为复杂。因而,神经末梢的异常生长以及CGRP的表达可用作瘙痒的形态学指标和机制探讨。

与以往研究一致<sup>[16, 23]</sup>,我们的结果不仅显示IMQ诱导的小鼠银屑病模型瘙痒行为增加(图1),而且皮损皮肤中TNF- $\alpha$ 广泛性表达、TRPV1以及神经元特异性标志物 $\beta 3$ -tubulin阳性感觉神经纤维长度都显著增多(图2,3),表明IMQ诱导的小鼠银屑病样瘙痒模型成功,其发病机制与局部炎症和感觉神经纤维密度增加有关。皮肤局部给予L-茶氨酸能浓度依赖性减少IMQ诱导的咬/舔和畏缩两种



A–C: representative images and the statistical analysis showing the changes of CGRP (A, red) and  $\beta$ 3-tubulin (B, green) neurite length in 4 days-cultured DRG after various treatment. Application of IMQ (0.2  $\mu$ g/mL) for 2 d markedly increased CGRP and  $\beta$ 3-tubulin positive neurite length. While the effect of IMQ was inhibited by L-theanine (50, 500  $\mu$ mol/L). Scale bar = 200  $\mu$ m. The DRG neurite length was analyzed using Neuron J (a plugin of Image J) for quantification of total neurite length.  $n = 10$  neurons/group. Error bars are means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey HSD multiple comparisons test. CGRP:  $F = 11.753$ ,  $P < 0.0001$ ;  $\beta$ 3-tubulin:  $F = 32.856$ ,  $P < 0.0001$ . <sup>1)</sup> $P < 0.0001$  vs CON; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , <sup>4)</sup> $P < 0.0001$  vs Vehi + IMQ; <sup>5)</sup> $P < 0.05$ , <sup>6)</sup> $P < 0.01$  vs 50  $\mu$ mol/L THN + IMQ.

图4 L-茶氨酸抑制IMQ诱导的原代DRG神经元轴突的异常生长

Fig. 4 L-theanine suppresses the abnormal neurite outgrowth induced by IMQ in primary cultured DRG neurons

自发性行为,尤以250 mmol/L L-茶氨酸效果最明显(图1)。机制上,我们发现皮肤局部给予L-茶氨酸不仅能显著抑制IMQ引起的TNF- $\alpha$ 表达上调(图2),也能明显阻断感觉神经纤维异常生长(图3)。与L-茶氨酸局部给药相比,口服茶氨酸不能显著抑制银屑病瘙痒行为、局部皮损皮肤TNF- $\alpha$ 的高表达以及神经纤维的异常生长(图1~3)。综合这些结果提示:①皮损局部TNF- $\alpha$ 的高表达和神经纤维的异常生长是银屑病瘙痒的重要原因;②茶氨酸局部给药可通过抑制皮损皮肤TNF- $\alpha$ 表达以及感觉神经纤维异常生长两个方面的机制来缓解银屑病瘙痒;③10 mg/kg·d L-茶氨酸剂量明显达不到受损皮肤局部高浓度状态,因而对银屑病瘙痒无明显效果。这也间接证实L-茶氨酸对银屑病瘙

痒的治疗呈明显剂量依赖性效应。我们采用成年小鼠原代DRG神经元培养进一步证实L-茶氨酸对感觉神经轴突异常生长的浓度依赖性抑制作用(图4)。

L-茶氨酸抑制瘙痒行为现象与皮肤TRPV1蛋白表达并无相关性。这可能与皮损部位表达TRPV1蛋白的细胞很杂所致<sup>[30]</sup>。因此,我们认为皮肤TRPV1表达不适合用作瘙痒的机制探讨。

综上所述,我们率先证明L-茶氨酸不仅能抑制IMQ诱导小鼠银屑病模型炎症因子TNF- $\alpha$ 的表达上调,还能通过抑制C纤维神经末梢异常增长来抑制银屑病瘙痒症状。因此,L-茶氨酸有望成为治疗银屑病瘙痒的潜在小分子药物,具有良好的临床转化前景。L-茶氨酸缓解银屑病炎症和瘙痒的具体机制还有待进一步深入探讨。

## 参考文献

- [1] Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, et al. Psoriasis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16082.
- [2] Komiya E, Tominaga M, Kamata Y, et al. Molecular and cellular mechanisms of itch in psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8406.
- [3] Szepletowski JC, Reich A. Pruritus in psoriasis: an update [J]. *Eur J Pain*, 2016, 20(1): 41–46.
- [4] Taneda K, Tominaga M, Negi O, et al. Evaluation of epidermal nerve density and opioid receptor levels in psoriatic itch [J]. *Br J Dermatol*, 2011, 165 (2) : 277–284.
- [5] Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323(19): 1945–1960.
- [6] Stull C, Grossman S, Yosipovitch G. Current and emerging therapies for itch management in psoriasis [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2016, 17(6): 617–624.
- [7] Yosipovitch G, Soung J, Weiss J, et al. Secukinumab provides rapid relief from itching and pain in patients with moderate-to-severe psoriasis: patient symptom diary data from two phase 3, randomized, Pplacebo-controlled clinical trials [J]. *Acta Derm Venereol*, 2019, 99(9): 820–821.
- [8] Gilbert N. The science of tea’s mood-altering magic [J]. *Nature*, 2019, 566(7742): S8–S9.
- [9] Williams JL, Everett JM, D’cunha NM, et al. The effects of green tea amino acid L-theanine consumption on the ability to manage stress and anxiety levels: a systematic review [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2020, 75(1): 12–23.
- [10] Yoneda Y, Kawada K, Kuramoto N. Selective upregulation by theanine of Slc38a1 expression in neural stem cell for brain wellness [J]. *Molecules*, 2020, 25 (2): 347.
- [11] Zeng WJ, Tan Z, Lai XF, et al. Topical delivery of L-theanine ameliorates TPA-induced acute skin inflammation via downregulating endothelial PECAM-1 and neutrophil infiltration and activation [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 8: 69–79.
- [12] Van Der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis [J]. *J Immunol*, 2009, 182(9): 5836–45.
- [13] Sakai K, Sanders KM, Youssef MR, et al. Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch [J]. *Pain*, 2016, 157(11): 2536–2543.
- [14] Takeshima M, Miyazaki I, Murakami S, et al. L-Theanine protects against excess dopamine-induced neurotoxicity in the presence of astrocytes [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2016, 59(2): 93–99.
- [15] Ben P, Zhang Z, Zhu Y, et al. L-Theanine attenuates cadmium-induced neurotoxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 57: 95–103.
- [16] Kodji X, Arkless KL, Kee Z, et al. Sensory nerves mediate spontaneous behaviors in addition to inflammation in a murine model of psoriasis [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1578–1594.
- [17] Zhou LJ, Peng J, Xu YN, et al. Microglia are indispensable for synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and chronic pain [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(13): 3844–3859 e6.
- [18] Lowes MA, Chamian F, Abello MV, et al. Increase in TNF- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(52): 19057–19062.
- [19] Haider AS, Cohen J, Fei J, et al. Insights into gene modulation by therapeutic TNF and IFN $\gamma$  antibodies: TNF regulates IFN $\gamma$  production by T cells and TNF-regulated genes linked to psoriasis transcriptome [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128 (3): 655–666.
- [20] Prignano F, Choi J, Pieper B, et al. Anti-tumor necrosis factor agents in psoriasis: addressing key challenges using biosimilars [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020: 1–6.
- [21] Miki H, Han KH, Scott D, et al. 4-1BBL regulates the polarization of macrophages, and inhibition of 4-1BBL signaling alleviates imiquimod-induced psoriasis [J]. *J Immunol*, 2020, 204(7): ji1900983.
- [22] Siiskonen H, Harvima I. Mast cells and sensory

- nerves contribute to neurogenic inflammation and pruritus in chronic skin inflammation [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 422.
- [23] Sakai K, Sanders KM, Youssef MR, et al. Role of neurturin in spontaneous itch and increased nonpeptidergic intraepidermal fiber density in a mouse model of psoriasis [J]. *Pain*, 2017, 158(11): 2196–2202.
- [24] Ten Bergen LL, Petrovic A, Krogh Aarebrot A, et al. The TNF/IL-23/IL-17 axis—Head-to-head trials comparing different biologics in psoriasis treatment [J]. *Scand J Immunol*, 2020, 92(4): e12946.
- [25] Szepietowski JC, Reich A, Wisnicka B. Pruritus and psoriasis [J]. *Br J Dermatol*, 2004, 151(6): 1284.
- [26] Chang SE, Han SS, Jung HJ, et al. Neuropeptides and their receptors in psoriatic skin in relation to pruritus [J]. *Br J Dermatol*, 2007, 156(6): 1272–1277.
- [27] McCoy ES, Taylor-Blake B, Street SE, et al. Peptidergic CGRPalpha primary sensory neurons encode heat and itch and tonically suppress sensitivity to cold [J]. *Neuron*, 2013, 78(1): 138–151.
- [28] Ostrowski SM, Belkadi A, Loyd CM, et al. Cutaneous denervation of psoriasiform mouse skin improves acanthosis and inflammation in a sensory neuropeptide-dependent manner [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(7): 1530–1538.
- [29] Onderdijk AJ, Hekking-Weijma IM, Florencia EF, et al. Surgical denervation in the imiquimod-induced psoriasiform mouse model [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1559: 75–81.
- [30] Stander S, Moormann C, Schumacher M, et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures [J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(3): 129–139.

(编辑 孙慧兰)