

银屑病血清与 M5 因子对角质形成细胞炎症和增殖影响的比较研究

王泽洪¹, 李俊琴², 邹 朋¹, 李新华²

摘要 目的 探讨银屑病血清与五联因子(M5)对角质形成细胞炎症和增殖影响的差异性。方法 分别用健康人、银屑病患者血清和 M5 因子对人类永生角质形成细胞(Human immortalized keratinocyte cell line, HaCaT)进行培养,通过 CCK-8 监测细胞的增殖情况,并采用 RT-qPCR 检测各组 HaCaT 细胞中炎症因子白介素 1 β /8/21/23(IL-1 β /8/21/23)与增殖标志物角质蛋白 6/16(K6/K16)和细胞相关抗原 67(Ki67)的 mRNA 表达水平。结果 健康人、银屑病血清和 M5 因子均能有效促进 HaCaT 细胞的生长,且银屑病血清和 M5 因子对细胞生长的促进作用强于健康人血清。与 M5 因子相似,银屑病患者血清显著促进细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-8、IL-23 和增殖标志物 K6、Ki67 的表达;与 M5 因子不同的是,银屑病患者血清对炎症因子 IL-21 的促进作用增强,而对增殖标志物 K16 的促进作用减弱。结论 银屑病患者血清微环境对角质形成细胞增殖和炎症反应的促进作用高于健康人,且与 M5 因子相似,可以用于构建银屑病角质形成细胞模型。

关键词 银屑病;角质形成细胞;炎症;增殖

中图分类号 R 758.63

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1488-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.009

2023-08-09 接收

基金项目:山西省重点医学攻关专项(编号:2020XM20)

作者单位:¹山西医科大学基础医学院微生物与免疫学教研室,晋中 030619

²山西医科大学附属太原中心医院皮肤科,太原 030009

作者简介:王泽洪,男,硕士研究生;

李新华,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: tylixinhua@sina.com

银屑病是一种免疫介导的炎症性皮肤病,其典型的症状是红斑、瘙痒和鳞屑,严重影响着患者的身心健康^[1]。普遍认为角质形成细胞的过度增殖和炎症反应是银屑病发病的关键机制^[2]。研究表明,与健康人相比,银屑病患者血清中存在多种细胞因子,可调节细胞的生长和分化,并引导免疫反应和炎症^[3-4]。故笔者认为银屑病患者血清微环境是角质形成细胞发生增殖和炎症反应的诱因。

由于技术的限制目前尚无法获得足量的银屑病角质形成细胞,因此国内外学者多采用五联因子(a mixture of five proinflammatory cytokines, M5)刺激 HaCaT 细胞构建银屑病角质形成细胞模型,以开展银屑病角质形成细胞的体外研究^[5]。但是由于 M5 因子购置困难、效期较短,且价格昂贵,限制了实际应用。因此,通过比较银屑病患者血清和 M5 造模对 HaCaT 细胞增殖和炎症反应的影响,旨在比较银屑病血清与 M5 因子对 HaCaT 细胞的异同,并进一步探讨血清微环境在银屑病发病中的机制。

1 材料与方法

1.1 临床标本 选取太原市中心医院皮肤科门诊经确诊为中度寻常型银屑病的患者(排除了其他自身免疫性疾病及慢性炎症性疾病,且一个月内未使用过免疫抑制剂、糖皮质激素、生物制剂等)外周血标本 12 例作为实验组,同时选取本院体检部健康人外周血标本 12 例作为对照组。

1.2 细胞来源与试剂 人类永生角质形成细胞

five-year survival AUC predicted by the model was 0.823 in the training set, 0.722 in the validation set, and 0.759 in the overall TCGA colon cancer patient population. Patients with low risk scores had lower half inhibitory concentration (IC_{50}) of cisplatin and higher sensitivity ($P < 0.0001$). The expression of prognostic protective factors in colon cancer tissues was significantly lower than that in adjacent colon cancer tissues. **Conclusion** A prognostic risk model composed of 8 lncRNAs associated with genomic instability was constructed and verified. In addition, the model can also predict cisplatin drug sensitivity. A histogram was constructed combining the tumor stage and the prognosis model. The predictive ability of this graph for five-year survival of colon cancer patients is better than that of traditional histopathological features and prognostic models constructed by predecessors.

Key words colon cancer; bioinformatics; tumor prognosis; genomic instability; long non-coding RNAs

株 HaCaT 细胞(武汉普诺赛生命有限公司), IL-1A、IL17A、IL22、TNF- α 因子和抑癌蛋白 M(美国 Corning 公司), DMEM 培养基(美国 HyClone 公司), 胎牛血清(美国 HyClone 公司), 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司), Trizol(美国 Invitrogen 公司), CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(武汉 Boster 公司), TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II(日本 TaKaRa 公司), PrimeScript[™] RT Master Mix(日本 TaKaRa 公司)等。

1.3 主要仪器 倒置显微镜(日本 Olympus 公司), 二氧化碳培养箱(Sheldon Manufacturing Inc), 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), 12 孔细胞培养板(美国 Corning 公司), Countess 自动细胞计数仪(美国 Invitrogen 公司), DN9602 酶标仪(北京普朗新技术有限公司)等。

1.4 实验方法

1.4.1 标本处理 所有受试者均空腹采集静脉血液 5 ml, 并置于添加了促凝剂的采血管中, 4 000 r/min 离心 5 min 后吸取血清, -80 °C 保存。

1.4.2 HaCaT 细胞铺板 完全培养基(含 1% 青-链霉素双抗、10% 胎牛血清的 DMEM)培养细胞, 放入二氧化碳培养箱中, 待细胞融合度达 90% 后, 弃培养基, 加入胰蛋白酶消化细胞, 以新鲜培养基终止消化后, 于 1 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清后加入完全培养基重悬细胞。将细胞浓度调整为 2×10^5 /ml, 以 100 μ l/孔的细胞量加入 96 孔板和以 1 ml/孔的细胞量加入 12 孔后, 置于二氧化碳培养箱中。

1.4.3 血清、M5 因子处理 HaCaT 细胞 待细胞融合度达到 50% 左右后, 进行血清饥饿 24 h, 更换培养基为 10% 含健康人、银屑病患者血清和 10 ng/ml M5 因子的 DMEM 培养基, 继续培养。

1.4.4 CCK-8 检测细胞生长状态 设置血清对照(不含细胞)空白孔, 于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液。摇匀后, 放回培养箱继续孵育 1 h。取出 96 孔板, 于 450 nm 波长下测定吸光度。

1.4.5 RT-qPCR 检测 HaCaT 细胞中的细胞因子 收集 12 孔细胞培养板中的细胞, 提取总 RNA。按照试剂说明书反转录后, 进行 qPCR 反应。qPCR 反应体系为 20 μ l, 含 10 μ l TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II、2 μ l cDNA、6.8 μ l DEPC 水、0.4 μ l ROX 液及上下引物各 0.4 μ l, 反应条件为: 95 °C、10 min、95 °C、30 s、60 °C、30 s、72 °C、30 s, 共 40 个循环; 95 °C、15 s、60 °C、1 min、95 °C、30 s, 分析融解

曲线。引物序列见表 1。每个样本设 3 个复孔, 以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量。

表 1 相关基因的引物序列(5'-3')

引物名称	引物序列(5'-3')
IL-1 β	F: ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA R: GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA
IL-8	F: GGCACAACTTTCAGAGACAG R: ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG
IL-21	F: TCCAGTCTGGCAACATGGAGA R: GCGATCTTGACCTTGGGAGC
IL-23	F: CAGCAGCAACAGCAGCATTAC R: GGCACAACTTTCAGAGACAG
K6	F: CTGGAGGCATCCAAGAGGTC R: GCAGGGTCCACTTTGTTTCCA
K16	F: TATTCTTCCCAGGAGTCTTC R: TGTGGTAGAGGCAGCTCAGT
Ki67	F: CTTTGGGTGCCACTTGACG R: GTCGACCCCGCTCCTTTT
β -actin	F: CTACAATGAGCTGCGTGTGGC R: CAGGTCCAGACGCAGGATGGC

1.5 统计学处理 应用 SPSS 26.0 软件分析, 所有实验结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较符合正态分布的采用两独立样本 t 检验, 不满足正态分布的采用两独立样本 Wilcoxon 秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察 镜下观察到 M5 因子、健康人和银屑病患者血清均能有效促进 HaCaT 细胞的生长。从细胞形态看, 加入人血清后, 细胞呈连片生长。而从细胞生长密度来看, 银屑病患者血清和 M5 因子对细胞生长的促进作用强于健康人血清(图 1)。

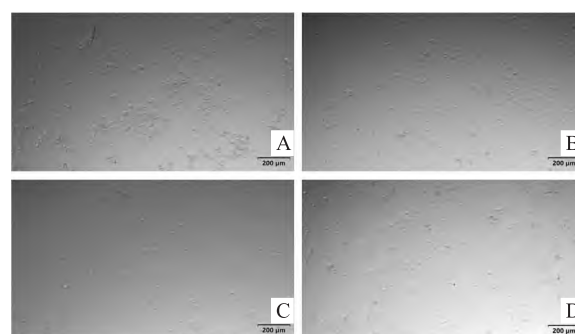


图 1 M5 因子、健康人和银屑病患者血清处理 HaCaT 后的形态 $\times 40$

A: 对照组; B: M5 组; C: 健康人血清组; D: 银屑病患者血清组

2.2 CCK-8 监测不同培养条件下 HaCaT 细胞的增殖情况 表 2 和图 2 所示, 银屑病患者血清和 M5

因子均能有效促进 HaCaT 细胞的生长。与正常人相比,银屑病患者血清条件下的细胞增殖在 48 h 可见明显差异且差异具有统计学意义($P < 0.01$)。同样,加入 M5 因子后细胞增殖比对照组快,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 CCK-8 监测血清和 M5 因子培养条件下

HaCaT 细胞的增殖($\bar{x} \pm s$)			
组别	OD(450nm)	Z 值	P 值
对照	0.52 ± 0.22	-2.772	0.006
实验	0.80 ± 0.33		
未处理	0.66 ± 0.13	-2.571	0.01
M5 组	0.97 ± 0.42		

2.3 血清与 M5 因子对 HaCaT 细胞 IL-1 β 、IL-8、IL-21 和 IL-23 mRNA 表达水平的影响 血清培养 HaCaT 细胞后 RT-qPCR 检测结果见表 3,与健康人相比,银屑病患者血清条件下,HaCaT 细胞 IL-1 β 、IL-8、IL-21 和 IL-23 mRNA 表达水平均升高且差异均具有统计学意义,分别为对照组的 3.39 倍、1.95 倍、2.68 倍、2.37 倍(图 3)。

M5 培养 HaCaT 细胞后 RT-qPCR 检测结果见表 4。与未处理组相比,实验组 HaCaT 细胞中 IL-1 β 、IL-8、IL-21、IL-23 mRNA 表达水平与未处理组相比,分别为对照组的 2.14 倍、1.70 倍、1.55 倍、1.28 倍(图 3),其中以 IL-1 β 、IL-8、IL-23 mRNA 表达水平差异具有统计学意义。

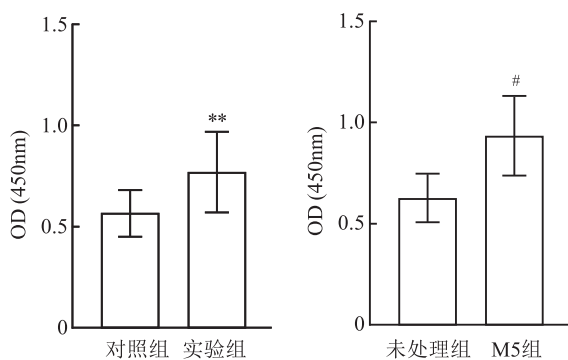


图 2 CCK8 监测血清与 M5 因子培养条件下 HaCaT 细胞的增殖情况

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与未处理组比较: # $P < 0.05$

2.4 血清与 M5 因子对 HaCaT 细胞 K6、K16 和 Ki67 mRNA 表达水平的影响 血清培养 HaCaT 细胞后 RT-qPCR 检测结果见表 5 和图 4,增殖指标 K16 mRNA 水平比对照组高 1.14 倍,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 K6、Ki67 mRNA 表达水平均升

高,分别为对照组的 1.45 倍、1.93 倍,差异均具有统计学意义。

表 3 血清培养 HaCaT 细胞炎症因子 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

靶基因	ΔCt 值		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	t 值	P 值
	实验组	对照组			
IL-1 β	3.58 ± 0.74	5.16 ± 0.28	3.39	4.38	0.002
IL-8	2.66 ± 0.69	3.44 ± 0.38	1.95	2.42	0.013
IL-21	19.08 ± 0.98	20.22 ± 1.58	2.68	2.24	0.038
IL-23	8.77 ± 0.77	9.80 ± 0.27	2.37	2.90	0.001

表 4 M5 培养 HaCaT 细胞炎症因子 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

靶基因	ΔCt 值		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	t 值	P 值
	M5 组	未处理组			
IL-1 β	5.79 ± 0.06	6.89 ± 0.19	2.14	16.34	<0.001
IL-8	4.76 ± 0.14	5.52 ± 0.11	1.70	8.86	<0.001
IL-21	17.66 ± 1.08	17.93 ± 1.05	1.55	0.54	0.635
IL-23	9.7 ± 0.10	10.05 ± 0.19	1.28	3.76	0.004

M5 培养 HaCaT 细胞后 RT-qPCR 检测结果见表 6 和图 4,增殖指标 K6、K16 和 Ki67 mRNA 表达水平与未处理组相比,分别为对照组的 1.18 倍、1.68 倍、1.38 倍且差异均具有统计学意义。

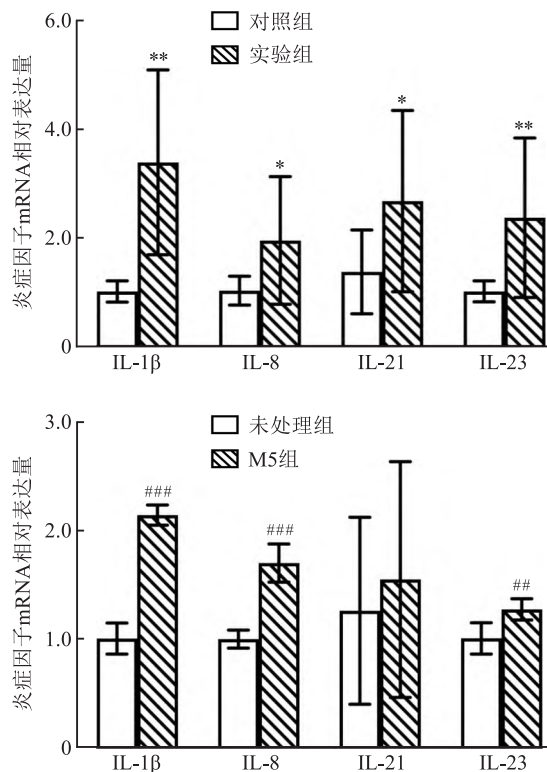


图 3 血清与 M5 因子培养 HaCaT 细胞后炎症因子 mRNA 表达水平

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与未处理组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

表5 血清培养 HaCaT 细胞增殖指标 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

靶基因	ΔCt 值		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	t 值	P 值
	实验组	对照组			
K6	4.12 ± 0.32	4.62 ± 0.54	1.45	2.33	0.032
K16	10.46 ± 0.51	10.56 ± 0.57	1.14	3.00	0.762
Ki67	5.26 ± 0.36	6.16 ± 0.86	1.93	3.96	0.041

表6 M5 培养 HaCaT 细胞增殖指标 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

靶基因	ΔCt 值		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	t 值	P 值
	M5 组	未处理组			
K6	8.25 ± 0.14	8.48 ± 0.17	1.18	2.36	0.040
K16	9.05 ± 0.07	9.80 ± 0.07	1.68	15.89	<0.001
Ki67	5.83 ± 0.10	6.29 ± 0.29	1.38	3.51	0.006

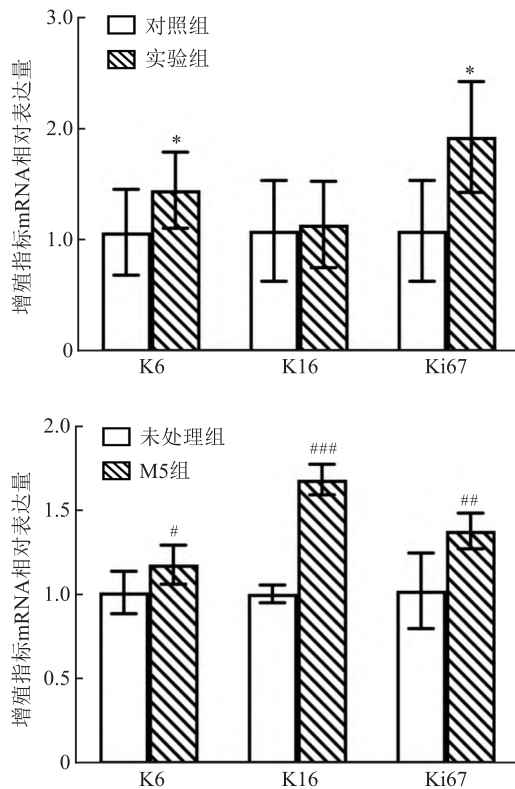


图4 血清与 M5 因子培养 HaCaT 细胞后增殖指标 mRNA 相对表达水平

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与未处理组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3 讨论

银屑病是一种免疫介导的炎症性皮肤病,影响着世界近 4% 人口的生活质量^[6]。其病因和发病机制仍不清楚,目前认为细胞因子信号传导、角质形成细胞异常分化和逃避凋亡导致的慢性免疫反应,在介导异常角质形成细胞过度增殖中起关键作用^[7]。研究发现,与健康人相比,银屑病患者血清中促炎因子(IL-1 β 、IL-8、IL-23 等)表达水平明显升高^[3, 4, 8]。

促炎因子多由活化的角质形成细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞释放,介导先天免疫和适应性免疫,参与慢性促炎性疾病的发生^[9]。实验中发现,与健康人相比,HaCaT 细胞在银屑病患者血清环境中,细胞多种促炎因子(IL-1 β 、IL-8、IL-21 和 IL-23) mRNA 表达水平升高,其中 IL-1 β 的表达水平较健康人高出 3.39 倍。而在 M5 因子刺激 HaCaT 细胞炎症反应中可以看出, M5 因子虽然对细胞也具有促炎作用,但对炎症因子 IL-21 的促进作用弱于银屑病患者血清。原因可能在于银屑病患者血清源于患者自身,其血清中的刺激因子比 M5 种类多、作用强,血清造模获得的细胞炎症更能贴近患者银屑病角质形成细胞。

角蛋白(KRT)是角质形成细胞中主要的结构中间丝蛋白, K6、K16 在银屑病病变表皮中的过度表达,促进角质形成细胞的增殖和炎症反应,有助于角质形成细胞响应表皮屏障破坏而过度增殖和先天免疫的激活^[10-11]。而 Ki67 作为细胞增殖的成熟标志物,存在于银屑病中,并且与银屑病的临床严重程度相关^[12]。结合本研究中健康人、银屑病患者血清和 M5 因子对 HaCaT 细胞增殖的影响,从镜下观察到三者均能有效促进 HaCaT 细胞的生长,但从细胞生长密度看,银屑病患者血清和 M5 因子对细胞生长促进作用强于健康人血清。此外,还发现银屑病患者血清培养下的 HaCaT 细胞生长呈连片状,说明血清的刺激作用更强,可能更具有构建银屑病样角质形成细胞模型的能力。通过 CCK-8 法监测 HaCaT 细胞 48h 后的生长情况,结果观察到银屑病患者血清和 M5 因子均能有效促进细胞生长。说明银屑病患者血清和 M5 因子同样具有提高 HaCaT 细胞生长的能力。在 RT-qPCR 检测中,与健康人相比,银屑病患者血清组中 K16 的 mRNA 表达无明显差异,而与 M5 因子相似的是银屑病患者血清显著促进细胞中 K6、Ki67 的 mRNA 表达。综上所述,银屑病患者血清对角质形成细胞增殖和炎症反应的促进作用高于健康人,且与 M5 因子相似,可以用于构建银屑病角质形成细胞模型。

参考文献

- [1] Qiu F, Xi L, Chen S, et al. Celastrol niosome hydrogel has anti-inflammatory effect on skin keratinocytes and circulation without systemic drug exposure in psoriasis mice[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 6171-82.
- [2] Gao J, Chen F, Fang H, et al. Daphnetin inhibits proliferation and inflammatory response in human HaCaT keratinocytes and a-

- meliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion in mice [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 48.
- [3] Arican O, Aral M, Sasmaz S, et al. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity[J]. *Mediators Inflamm*, 2005, 2005(5): 273-9.
- [4] Cardoso P R, Lima E V, Lima M M, et al. Clinical and cytokine profile evaluation in Northeast Brazilian psoriasis plaque-type patients[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2016, 27(1): 1-5.
- [5] Ding Z, Liu J, Qian H, et al. Cinnamaldehyde inhibits psoriasis-like inflammation by suppressing proliferation and inflammatory response of keratinocytes *via* inhibition of NF- κ B and JNK signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 638.
- [6] Jiang B W, Zhang W J, Wang Y, et al. Convallatoxin induces HaCaT cell necroptosis and ameliorates skin lesions in psoriasis-like mouse models [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109615.
- [7] Thatikonda S, Pooladanda V, Sigalapalli D K, et al. Piperlongumine regulates epigenetic modulation and alleviates psoriasis-like skin inflammation *via* inhibition of hyperproliferation and inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 21.
- [8] He Z, Jin L, Liu Z F, et al. Elevated serum levels of interleukin 21 are associated with disease severity in patients with psoriasis [J]. *Br J Dermatol*, 2012, 167(1): 191-3.
- [9] Conti P, Pregliasco F E, Bellomo R G, et al. Mast cell cytokines IL-1, IL-33, and IL-36 mediate skin inflammation in psoriasis: a novel therapeutic approach with the anti-inflammatory cytokines IL-37, IL-38, and IL-1Ra [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8076.
- [10] Zhang X, Yin M, Zhang L J. Keratin 6, 16 and 17-critical barrier alarmin molecules in skin wounds and psoriasis[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 807.
- [11] Qiao P, Zhi D, Yu C, et al. Activation of the C3a anaphylatoxin receptor inhibits keratinocyte proliferation by regulating keratin 6, keratin 16, and keratin 17 in psoriasis[J]. *FASEB J*, 2022, 36(5): e22322.
- [12] Ramezani M, Shamshiri A, Zavattaro E, et al. Immunohistochemical expression of P53, Ki-67, and CD34 in psoriasis and psoriasisiform dermatitis[J]. *Biomedicine (Taipei)*, 2019, 9(4): 26.

A comparative study of the effects of psoriasis serum and M5 factors on keratinocyte inflammation and proliferation

Wang Zehong¹, Li Junqin², Zou Peng¹, Li Xinhua²

(¹*Dept of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Jinzhong 030619;* ²*Dept of Dermatology, Shanxi Key Laboratory of Stem Cell for Immunological Dermatitis, Taiyuan Central Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030009*)

Abstract Objective To explore the differences in the effects of psoriatic serum and a mixture of five proinflammatory cytokines on keratinocyte inflammation and proliferation. **Methods** The human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT cells) was used to cultivate with serum of healthy human serum, psoriasis patients and M5 factors, and the cell proliferation was monitored by CCK-8. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of inflammatory factors interleukin 1 β /8/21/23 (IL-1 β /8/21/23), proliferation markers keratin 6/16 (K6/K16) and nucleus related antigen 67 (Ki67) in HaCaT cells in each group. **Results** Healthy human serum, psoriasis serum and M5 factors could effectively promote the growth of HaCaT cells, and psoriasis serum and M5 factors could promote cell growth more than healthy human serum. Similar to M5 factors, serum from patients with psoriasis significantly promoted the mRNA levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-8, IL-23 and proliferation markers K6 and Ki67 in cells. Different from M5 factors, the serum of psoriasis patients had enhanced the mRNA level of inflammatory factor IL-21, but weakened the promotion of proliferation marker K16. **Conclusion** The serum microenvironment of patients with psoriasis can promote the proliferation and inflammatory response of keratinocytes higher than that of healthy people, and is similar to M5 factors, which can be used to build a keratinocyte model of psoriasis.

Key words psoriasis; keratinocytes; inflammation; proliferation