

IL-10 调控 HaCaT 细胞增殖及分化的分子机制

尹雪莉¹, 贾波², 刘莉³, 李明聪⁴, 张军⁵, 杨振⁵, 白红枚⁵, 胡伟康⁵, 张素梅⁵, 张胜权⁵

摘要 目的 探讨白细胞介素 10 (IL-10) 对皮肤角质形成细胞 (HaCaT) 增殖影响和对氯化钙 (CaCl₂) 诱导的角质形成细胞分化标志物的表达影响及其可能的分子机制。方法 以不同浓度 IL-10 (0、3、10、30 ng/ml) 处理 HaCaT 细胞不同时间 (0、24、48、72 h), MTS 分析细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞周期; IL-10 (终浓度为 10 ng/ml) 预处理 HaCaT 1 h, 加入或不加 CaCl₂ (终浓度为 1.2 mmol/L) 培养 24、48、72 h, Western blot 检测 IL-10 对 HaCaT 分化标志物表达影响; 丝裂原蛋白激活激酶-胞外信号调节激酶 (MAPKs-ERK1/2) 特异性抑制剂 PD98059 及磷脂酰肌醇激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶 (PI3K-AKT) 特异性抑制剂 LY294002 预处理 HaCaT 细胞, 分别提取细胞总 RNA 和蛋白, 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 检测 IL-10 对 HaCaT 细胞分化标志物

(Keratin1、Keratin5、Involucrin) 表达影响。结果 MTS 结果显示, 在 72 h 内, IL-10 (30 ng/ml 和较低浓度) 对 HaCaT 细胞增殖无影响; 流式细胞分析结果提示 IL-10 不影响 HaCaT 细胞周期进程。Western blot 分析显示, IL-10 上调 HaCaT 角质形成细胞角质细胞分化标志物 Involucrin 表达, 而对 Keratin1 及 Keratin5 没有显著的影响。机制研究分析显示, IL-10 能够活化 ERK1/2 和 AKT 增加其磷酸化水平; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示 PD98059 及 LY294002 部分阻断 IL-10 诱导的 Involucrin 的表达。结论 IL-10 在一定浓度范围内不影响 HaCaT 的增殖; IL-10 部分通过 MAPKs-ERK1/2 和 PI3K-AKT 途径上调 HaCaT 分化标志物 Involucrin 表达。

关键词 HaCaT 细胞; 细胞增殖; IL-10; 分化标志物; 信号途径

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0890-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.002

2023-03-06 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2108085MH266); 安徽省高校科学研究项目(编号: 2022AH050737); 安徽医科大学博士科研资助基金(编号: XJ201939)

作者单位: 安徽医科大学¹ 机能实验中心、³ 科研实验中心、⁵ 生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

² 湖北省襄阳市食品药品监督管理局, 襄阳 441000

⁴ 合肥市第二人民医院病理科, 合肥 230011

作者简介: 尹雪莉, 女, 实验师;

张胜权, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangshengquan@ahmu.edu.cn

人白细胞介素(interleukin, IL)-10 属于 II 类 IL-10 家族细胞因子, 细胞因子家族包括 IL-19、IL-20、IL-28A、IL-28B 以及 IL-29 等。IL-10 由 Th2 细胞分泌, 抑制 Th1 细胞分泌细胞因子^[1]。其基因定位于 1 号染色体(1q32.1), 编码 17~20 ku 糖蛋白^[1-2]。IL-10 受体由 α 、 β 两个亚单位组成, 广泛表达于多种组织、细胞, 包括皮肤角质形成细胞^[3]。

carried out to characterize the interaction between PT and SF double layer membranes, and the bone marrow mesenchymal stem cells of human alveolar origins (hABMSCs) adhesion was studied by SEM. CCK-8 assay and live dead staining were used to evaluate the biocompatibility of SF-PT double layer membranes. qRT-PCR, ALP staining and alizarin red stain were carried out to measure the osteogenic differentiation of hABMSCs in different groups. **Results** The SF membranes prepared from SF solution with a degumming time of 30 min has the highest tensile strength, reaching (3.293 ± 0.122 8) MPa. The smooth surface of SF double layer membrane was dense and smooth, while the rough surface was longitudinally ordered loose porous structure. PT was loaded onto the rough surface of the SF double layer membranes by hydrogen bond, hydrophobic interaction and other forces. There was no significant difference in the results of CCK-8 and live dead staining between blank group, SF group and PT-SF group. Compared with blank group and SF group, PT-SF double layer membranes promoted osteogenic differentiation of hABMSCs. **Conclusion** Thus, the PT-SF double layer membranes expressed desired mechanical, biological properties and can promote the osteogenic differentiation of hABMSCs to a certain extent. These results indicate that PT-SF double layer membranes is successfully fabricated, providing a solid foundation for future *in vivo* experiments.

Key words phlorotannins; silk fibroin; composite membrane; directional freezing; osteogenic differentiation

IL-10 通过与其受体激活 JAK-STAT、PI3K、MAPK 等信号途径调节免疫功能,主要表现为抑制 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、IL-23、TNF- α 等炎症因子表达^[4]。研究^[5]表明 IL-10 与许多疾病的发生发展有关,包括银屑病。银屑病是炎症性皮肤病,以皮肤角质形成细胞过度增殖及分化不全为特征,目前认为其发病机制是细胞免疫介导的自身免疫性疾病;免疫细胞及皮肤角质形成细胞分泌的促炎症因子,包括 TNF- α 、IL-17 和 IL-22,促进皮肤角质形成细胞过度增殖及抑制分化。而 IL-10 能抑制这些促炎症因子的分泌,理论上是在潜在的银屑病治疗的靶点^[5]。在银屑病皮损中,IFN- γ 和 TNF- α 呈现高表达,而 Th2 细胞分泌 IL-4 和 IL-10 因子相对表达不足^[6];此外,研究^[7-8]显示,IL-10 启动子区域的多态性与银屑病的发病相关,但 IL-10 在皮肤组织中的作用仍不十分清楚。该研究主要探讨 IL-10 对皮肤角质形成细胞的增殖及分化等影响,初步揭示 IL-10 在银屑病发病中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);0.25% 胰酶、青-链霉素溶液、细胞周期试剂盒(上海碧云天生物技术公司);IL-10(美国 Peprotech 公司);AKT、磷酸化 AKT (pAKT)、细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、磷酸化 ERK1/2 (pERK1/2)(美国 Sant Cruz 公司);PD98059、LY294002(美国 Sigma 公司);TRIzol、SYBR Green 染料、RT-qPCR 扩增试剂盒(日本 TaKaRa 公司);Real-time 引物(上海生工生物工程技术有限公司);MTS 试剂盒(美国 Promega 公司);HaCaT 永生角质细胞为本实验室保存。

1.2 引物 从数据库 National Center for Biotechnology Information (nih.gov) 检索获得相关基因序列,Premier 7.0 设计引物,引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: CCACATCGCTCAGACACCAT R: GGCAACAATATCCACTTTACCAGACT
Keratin1	F: TGTCTGCCCTCCTGGTGGCA R: TGGAGGTATCTACTGTGTCAGC
Involucrin	F: TGCCTCAGCCTTACTGTGAGTCT R: GGGCAGGGGAGAGGGTCACT
Keratin 5	F: AGCTGCTGGAGGGCGAGGAATG R: TCCACTGCTACTCCGGCAAGACC

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将对数期 HaCaT 细胞 0.25% 胰酶消化接种于 6 孔板中,用含 5% 胎牛血清,1% 双抗 DMEM 高糖培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.3.2 MTS 检测细胞增殖 将对数期 HaCaT 细胞 0.25% 胰酶消化计数每孔接种 5 000 个细胞于 96 孔板中,以 0、3、10、30 ng/ml 浓度的 IL-10 处理 HaCaT 细胞,分别在时间点(0、24、48、72 h) 每孔加入 20 μ l MTS,孵育 30 min 后,置于酶标仪中检测 450 nm 处吸光度值。

1.3.3 流式细胞仪分析细胞周期 将对数期 HaCaT 细胞用 0.25% 胰酶消化接种于 6 孔板中,10 ng/ml 的 IL-10 处理 HaCaT 细胞 24、48 h,依据细胞周期试剂盒说明书,分别收集细胞;细胞固定:加入 1 ml 冰浴预冷 70% 乙醇中,轻轻吹打混匀,4 °C 固定 30 min 预冷 PBS 洗 2 次;每管细胞加入 500 μ l 碘化丙啶(PI)染色,常温避光 30 min,流式细胞仪上机检测。

1.3.4 RT-qPCR 检测 K1、K5、Involucrin mRNA 水平表达 HaCaT 细胞接种 12 孔板,次日换液;特异性抑制剂(PD98059 70 μ mol/L LY294002 32 μ mol/L) 培养 1 h,然后加入 IL-10 (10 ng/ml) 培养 1 h,加入 1.2 mmol/L CaCl₂ 继续培养 12 h,TRIzol 提取细胞总 RNA,逆转录后得到 cDNA,以此为模板,按照 TaKaRa 公司的说明书配好反应体系。预变性:95 °C、30 s,循环 1 次;PCR 反应:95 °C、5 s,60 °C、20 s,循环 40 次。数据根据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行统计处理。

1.3.5 Western blot 分析相关蛋白水平 用不同浓度的 IL-10 处理 HaCaT 细胞,提取总蛋白,蛋白定量后,加入蛋白上样缓冲液,100 °C,煮沸 5 min。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白;将蛋白转移至 PVDF 膜;5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜;一抗 pERK1/2(1:500) 和 pAKT(1:500) 及 Actin(1:1 000),4 °C 过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;山羊抗兔二抗(1:10 000) 室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;滤纸吸干,涂 ECL 发光剂,曝光、拍照,Image J 图像软件分析各目的蛋白水平变化。

1.4 统计学处理 所有数据分析均使用 GraphPad Prism 5.0 软件。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。两组之间的直接比较采用 t 检验;多组间的比较用于双向方差分析(ANOVA) 检验。

2 结果

2.1 IL-10 对 HaCaT 细胞增殖的影响 为了探讨 IL-10 是否体外影响 HaCaT 细胞增殖,以图中所示浓度及时间用 IL-10 处理 HaCaT 细胞,结果显示在以 0、3、10、30 ng/ml 的 IL-10 处理的 HaCaT 分别与同时间点(0、24、48、72 h)的对照组(0 ng/ml, IL-10) 相比其细胞增殖未见显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 1。

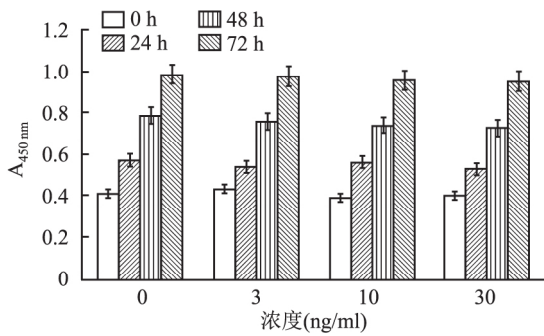


图1 MTS 分析 IL-10 对 HaCaT 细胞增殖调控结果 ($n = 6$)

2.2 IL-10 对 HaCaT 细胞周期的影响 为了进一步验证 IL-10 对 HaCaT 细胞增殖的影响,该实验以

10 ng/ml 的 IL-10 处理 HaCaT 细胞 24、48 h, PI 染色后,流式细胞仪检测 IL-10 对 HaCaT 细胞周期的影响。如图 2 所示,IL-10 处理 HaCaT 细胞 24 和 48 h,与对照组(0 ng/ml) 相比,10 ng/ml IL-10 处理的 HaCaT,其细胞各期(G_1 、S、 G_2) 细胞数量百分比未见显著性差异,提示 IL-10 对 HaCaT 细胞周期无显著性影响。

2.3 IL-10 上调 $CaCl_2$ 诱导的 HaCaT 细胞分化标志物 INV 的表达 为了探究 IL-10 对 HaCaT 细胞分化的影响,加入 IL-10(终浓度 10 ng/ml) 处理 HaCaT 1 h 后,加入或不加 $CaCl_2$,终浓度为 1.2 mmol/L,继续培养 24、48、72 h,Western blot 检测 HaCaT 角质形成细胞的分化标志物(K1 表达于颗粒层; K5 表达于基底层; Involucrin 表达于棘层),IL-10 (10 ng/ml) 能够协同 $CaCl_2$ 诱导的 HaCaT 角质形成细胞分化标志物 Involucrin 的表达,如图 3 所示,单独 IL-10 处理 24 h 内对 Involucrin 没有显著影响,单独 $CaCl_2$ 处理 24 h 上调 Involucrin 的表达,而 IL-10 处理 48 及 72 h,IL-10 可以诱导 Involucrin 表达,且与 $CaCl_2$ 有协同效应。IL-10 单独处理 HaCaT 细胞 24 h,上调 K5 差异有统计学意义($P < 0.05$),但 48、72 h 表达水平略有降低,而对 K1 表现为抑制。

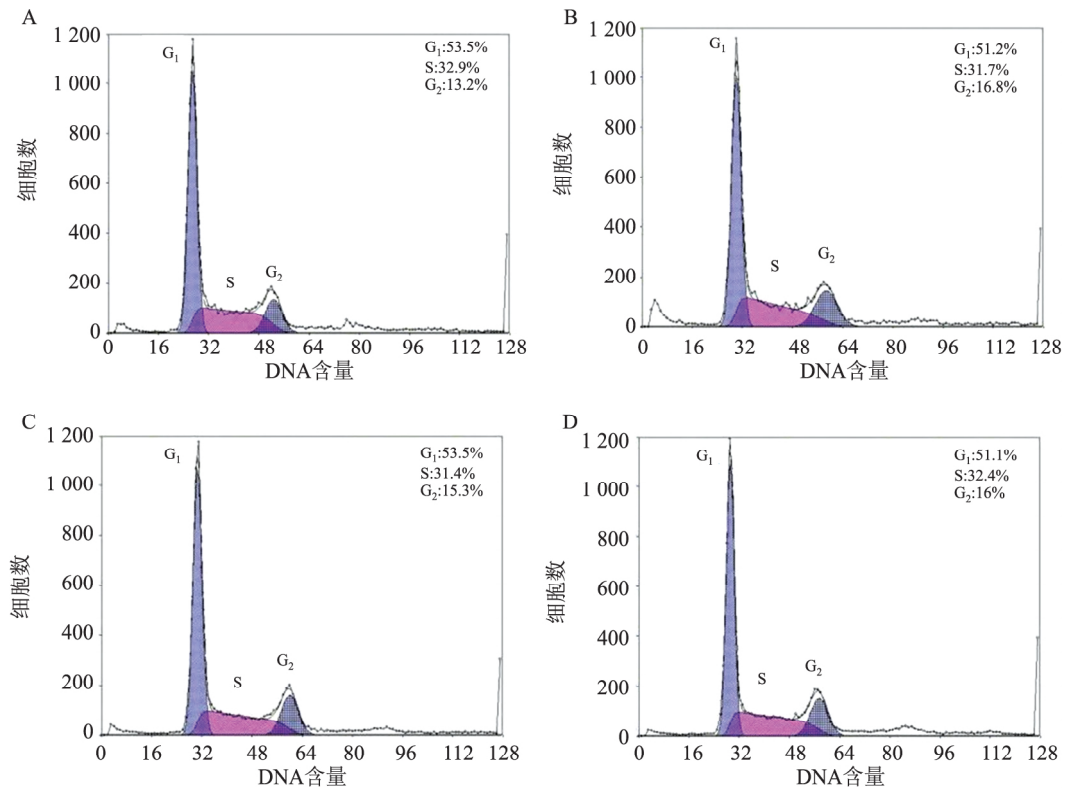


图2 流式细胞术分析 IL-10 对 HaCaT 细胞周期的调控 ($n = 3$)

A: 0 ng/ml IL-10 处理 24 h; B: 0 ng/ml IL-10 处理 48 h; C: 10 ng/ml IL-10 处理 24 h; D: 10 ng/ml IL-10 处理 48 h

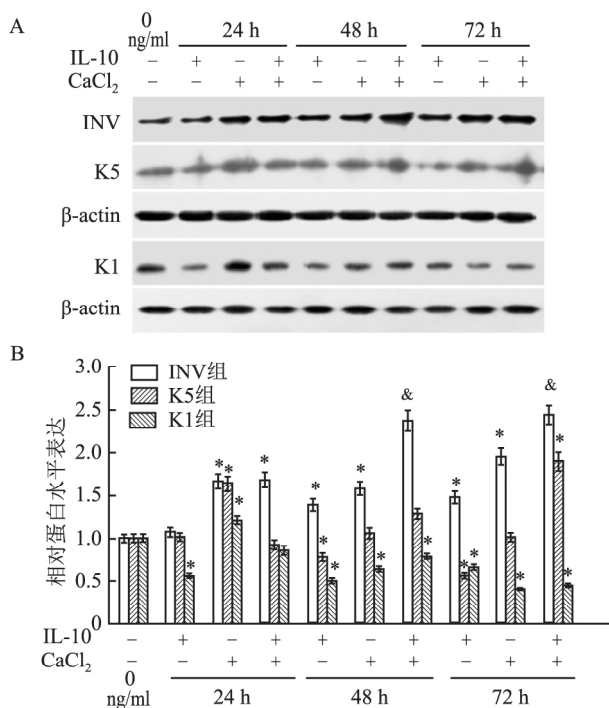


图3 IL-10上调经CaCl₂诱导的

HaCaT角质形成细胞分化标志物(n=3)

A: Western blot 检测 HaCaT 角质形成细胞分化标志物; B: Western blot 检测 HaCaT 角质形成细胞分化标志物结果的灰度分析; 与未处理对照组比较: * P < 0.05; 与 CaCl₂ 处理组比较: & P < 0.05

2.4 IL-10 通过 PI3K-AKT 和 MAPKs-ERK1/2

途径调控 HaCaT 角质形成细胞分化的作用 为了探讨 IL-10 调控 HaCaT 细胞分化标志蛋白分子表达的分子机制, IL-10(10 ng/ml) 刺激 HaCaT 细胞不同时间, Western blot 分析 IL-10 是否激活 PI3K-AKT 和 MAPKs-ERK1/2 途径, 与对照组(相同培养条件未加 IL-10), IL-10 分别在 15 和 30 min 开始显著增加 pAKT 及 pERK1/2 的水平, 分别在 45 和 120 min 达到峰值, 而对总 AKT 及 ERK1/2 没有显著性影响, 提示 IL-10 能够激活 PI3K-AKT 和 MAPKs-ERK1/2。同时特异性抑制剂 PD98059(MAPK 抑制剂) 或 LY294002(AKT 抑制剂) 能够阻断 IL-10 对 PI3K-AKT 和 MAPKs-ERK1/2 途径的激活效应。见图 4。

2.5 特异性抑制剂预处理后 IL-10 对 HaCaT 角质

形成细胞分化的影响 IL-10 能够激活 PI3K-AKT 和 MAPKs-ERK1/2 信号途径, 为了探讨 IL-10 促进 HaCaT 细胞分化蛋白表达是否依赖其激活该 2 条信号途径, 以特异性抑制剂 (PD98059 或 LY294002) IL-10(10 ng/ml) 单独或联合处理 HaCaT 细胞 12 h, RT-qPCR 检测分化标志物的 mRNA 水平相对表达, Western blot 检测分化蛋白标志物表达, 抑制剂及

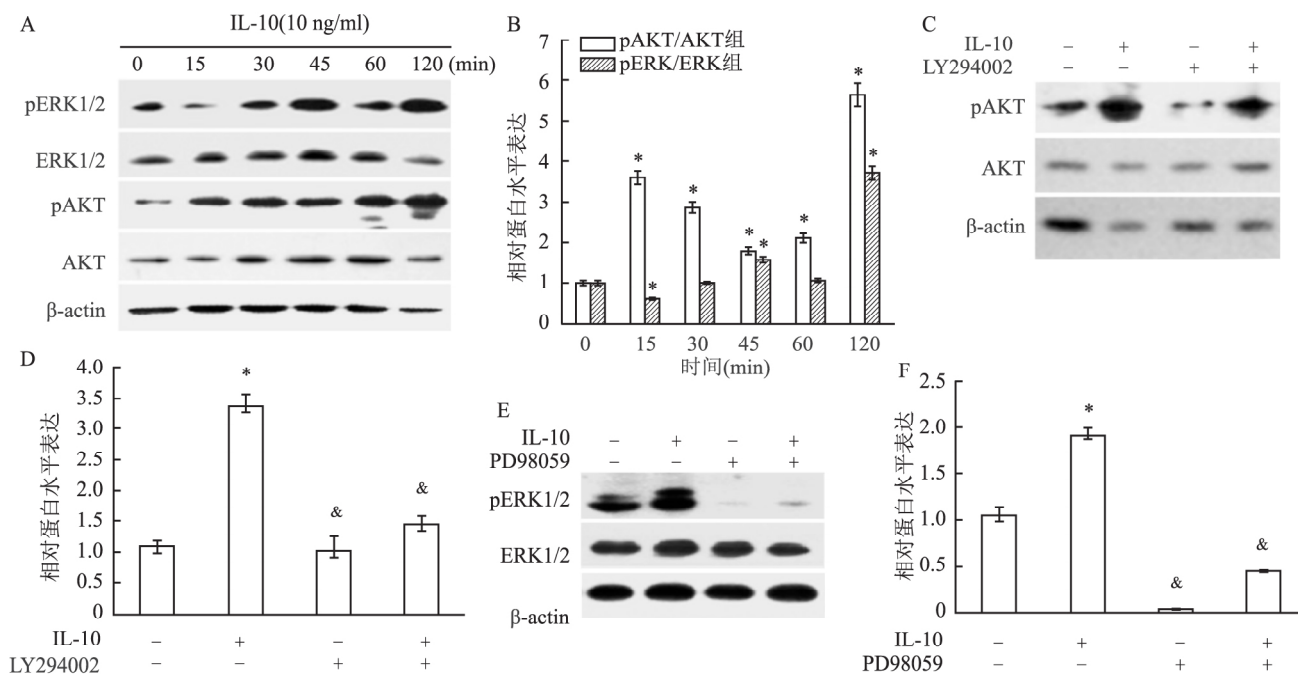


图4 IL-10 诱导 AKT 及 ERK1/2 磷酸化(n=3)

A: Western blot 分析 AKT 及 ERK1/2 磷酸化水平; B: Western blot 检测结果的灰度分析; C、E: Western blot 分析 AKT 及 ERK1/2 磷酸化水平变化; D、F: Western blot 检测结果的灰度分析; 与对照组比较: * P < 0.05; 与 IL-10 处理组比较: & P < 0.05

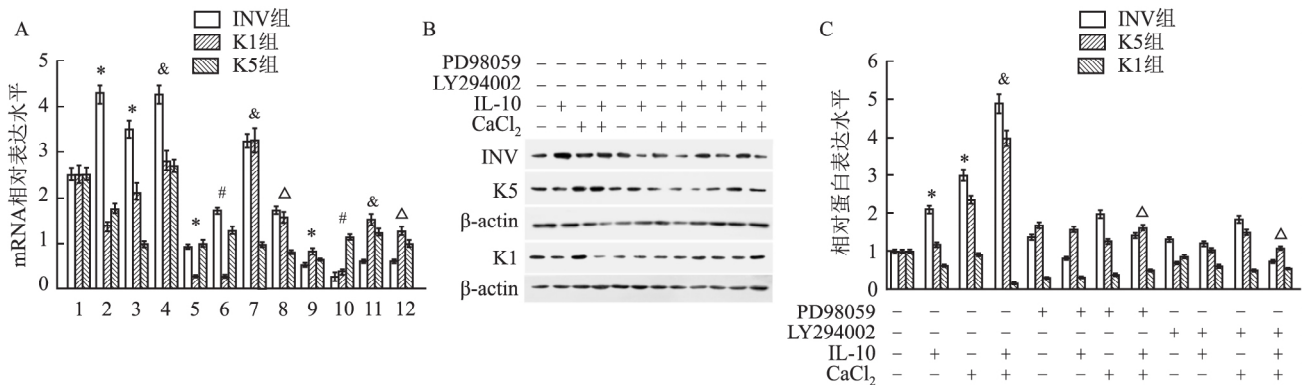


图5 特异性抑制剂检测 IL-10 对 HaCaT 角质形成细胞分化影响 (n = 3)

A: RT-qPCR 检测预处理后 HaCaT 细胞分化标志物的 mRNA 水平相对表达; B: Western blot 检测预处理后 HaCaT 角质形成细胞的分化蛋白相对表达水平; C: Western blot 检测 HaCaT 细胞分化标志物结果的灰度分析; 1: 对照组; 2: IL-10 组; 3: CaCl₂ 组; 4: CaCl₂ + IL-10 组; 5: PD 组; 6: PD + IL-10 组; 7: CaCl₂ + PD 组; 8: CaCl₂ + IL-10 + PD 组; 9: LY 组; 10: IL-10 + LY 组; 11: CaCl₂ + LY 组; 12: CaCl₂ + IL-10 + LY 组; time: IL-10 和 (或) CaCl₂ 作用时间; +: 加入相应刺激物; -: 不加相应刺激物; 与对照组比较: * P < 0.05; 与 CaCl₂ 处理组比较: & P < 0.05; 与 IL-10 处理组比较: # P < 0.05; 与 IL-10 联合 CaCl₂ 处理组比较: △ P < 0.05

IL-10 同样处理 48 h ,分析分化标志物的蛋白水平表达。结果显示 PD98059 能够显著抑制 IL-10 单独或与 CaCl₂ 联合诱导的 Involucrin 及 K1 mRNA 和蛋白质水平表达 ,PD98059 对 CaCl₂ 单独诱导的 Involucrin、K1 及 K5 表达没有显著影响 ,PD98059 单独处理也显著抑制 Involucrin、K1 及 K5 mRNA 及蛋白水平表达; LY294002 则对各组均显著抑制(图 5)。

3 讨论

IL-10 是一种多功能细胞因子 ,调控多种细胞的生物学行为 ,包括免疫及上皮细胞。该研究表明 IL-10 能上调 HaCaT 角质形成细胞分化标志物 Involucrin 表现出与钙离子的协同效应 ,其可能的机制是 IL-10 部分通过 MAPKs-ERK1/2 和 PI3K-AKT 信号途径发挥其上调 CaCl₂ 诱导 HaCaT 角质细胞分化的作用。

IL-10 具有免疫抑制作用的多功能免疫调节因子 ,如抑制树突细胞炎症因子的生成及抗原递呈作用 ,然而 IL-10 表现出促进 CD8⁺ T 细胞的细胞毒性 ,因此 ,IL-10 如何发挥其作用可能与周围的微环境相关^[1-2,5] ,研究^[9]表明 IL-10 受体广泛表达于多种细胞 ,包括皮肤角质形成细胞。银屑病主要以皮肤角质形成细胞过度增殖和分化不全为特征^[10]。本研究显示 IL-10 体外不影响人皮肤角质形成细胞 HaCaT 细胞的增殖 ,但是促进 HaCaT 细胞分化标志物的表达 ,提示其抑制银屑病发病的机制不仅由于其抑制免疫细胞分泌炎症细胞因子 ,可能还直接作用于皮肤角质形成细胞发挥促分化作用。研

究^[11-12]表明 IL-10 在银屑病皮损中低表达 ,临床试验显示银屑病皮损局部注射 IL-10 能够缓解银屑病的症状。因此 ,IL-10 是否通过促进皮肤角质形成细胞分化改善银屑病症状还有待于进一步研究。

该研究表明 IL-10 能够激活 HaCaT 细胞的 PI3K-AKT 及 MAPK 信号途径 ,并且其促进 HaCaT 细胞的分化部分依赖 MAPK 及 PI3K-AKT 途径。研究^[13-14]表明 MAPK-ERK 及 PI3K-AKT 激活能够促进皮肤角质形成细胞的分化 ,这与 IL-10 激活 MAPK-ERK 及 PI3K-AKT 进而促进 HaCaT 分化结果一致。研究^[15-16]表明 ERK 信号途径和 PI3K 信号途径参与了人皮肤角质形成细胞增殖与分化的调节 ,ERK1/2 激活诱导 KCs 细胞分化 ,而 PI3K 激活维持分化 KCs 的存活 ,从而使得皮肤角质形成细胞在增殖与分化之间达到平衡。此外 ,IL-10 还能激活 JAK-STAT 细胞途径^[1-2] ,提示 IL-10 对 HaCaT 细胞增殖及分化的影响机制可能涉及多条信号途径 ,是多条信号途径激活后的综合效应 ,有待进一步研究。

参考文献

[1] Saraiva M ,Vieira P ,O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10 [J]. J Exp Med ,2020 ,217(1) : e20190418.

[2] Batchu R B ,Gruzdyn O V ,Kolli B K ,et al. IL-10 signaling in the tumor microenvironment of ovarian cancer [J]. Adv Exp Med Biol 2021 ,1290: 51 - 65.

[3] Berraondo P ,Sanmamed M F ,Ochoa M C ,et al. Cytokines in cancer immunotherapy [J]. Cancers ,2011 ,3(4) : 3856 - 93.

[4] Hamidullah ,Changkija B ,Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat ,2012 ,133(1) : 11 - 21.

- [5] Wang X, Wong K, Ouyang W, et al. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases [J]. *Review Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(2): a028548.
- [6] Seifert M, Sterry W, Effenberger E, et al. The antipsoriatic activity of IL-10 is rather caused by effects on peripheral blood cells than by a direct effect on human keratinocytes [J]. *Arch Dermatol Res*, 2000, 292(4): 164–72.
- [7] Asadullah K, Eskdale J, Wiese A, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(6): 975–8.
- [8] Isac L, Jiquan S. Interleukin 10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of psoriasis [J]. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 2019, 28(3): 119–23.
- [9] Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 683–765.
- [10] Kamata M, Tada Y. Dendritic cells and macrophages in the pathogenesis of psoriasis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 941071.
- [11] Michelle L Lise, Talita S Baptista, Laura E Petersen, et al. Down-regulation of IL-10 in patients with mild psoriasis and metabolic syndrome [J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2019, 154(3): 372–4.
- [12] Al-Robaee A A, Al-Zolibani A A, Al-Shobili H A, et al. IL-10 implications in psoriasis [J]. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2008, 2(1): 53–8.
- [13] Mercurio L, Albanesi C, Madonna S. Recent updates on the involvement of PI3K/AKT/mTOR molecular cascade in the pathogenesis of hyperproliferative skin disorders [J]. *Front Med*, 2021, 8: 665647.
- [14] Wu Y, Liu L, Bian C, et al. MicroRNA let-7b inhibits keratinocyte differentiation by targeting IL-6 mediated ERK signaling in psoriasis [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 58.
- [15] Teng Y, Fan Y, Ma J, et al. The PI3K/Akt pathway: emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1219.
- [16] Ondet T, Roux P F, Monshouwer M, et al. Unlocking the mechanisms of cutaneous adverse drug reactions: activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway by EGFR inhibitors triggers keratinocyte differentiation and polarization of epidermal immune [J]. *JID Innov* 2021, 1(2): 100009.

The study of molecular mechanism of regulation of IL-10 on proliferation and differentiation of HaCaT cells

Yin Xueli¹, Jia Bo², Liu Li³, Li Mingcong⁴, Zhang Jun⁵, Yang Zhen⁵, Bai Hongmei⁵,
Hu Weikang⁵, Zhang Sumei⁵, Zhang Shengquan⁵

(¹Functional Experiment Center, ³Center for Scientific Research, ⁵Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University Hefei 230032; ²Xiangyang Institute for Food and Drug Control, Xiangyang 441000; ⁴Dept of Pathology, The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011)

Abstract Objective To investigate the effects of interleukin (IL) -10 on the proliferation of HaCaT cells and CaCl₂ induced expression of differentiation markers and its possible molecular mechanisms. **Methods** HaCaT cells were treated with various concentrations of IL-10 (0, 3, 10, 30 ng/ml) for different time (0, 24, 48, 72 h), cell proliferation was measured using MTS, and cell cycle was determined by flow cytometry. HaCaT cells were pretreated with IL-10 (final concentration 10 ng/ml) for 1 h, then incubated with or without CaCl₂ (final concentration 1.2 mmol/L) for 24, 48, 72 h, Western blot was performed to detect the effect of IL-10 on the expression of HaCaT keratinocyte differentiation markers. After pretreatment of HaCaT cells with PD98059, an inhibitor of mitogen-activated kinase-ERK1/2, and LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol kinase-serine/threonine kinase (PI3K-AKT), the total RNA and proteins were extracted separately, real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to examine the influence of IL-10 on the expression of differentiation markers (Keratin1, Keratin5, Involucrin). **Results** MTS results revealed that IL-10 (30 ng/ml and lower doses) did not alter the proliferation of HaCaT cells in 72 h. Flow cytometry analysis demonstrated that IL-10 had no significant influence on cell cycle progression. The results of Western blot showed that IL-10 upregulated the expression of differentiation markers Involucrin, while there was no significant effect on Keratin1 and Keratin5. Mechanism research analysis demonstrated that IL-10 could activate ERK1/2 and AKT, increase their phosphorylation levels; RT-qPCR and Western blot results showed that PD98059 and LY294002 partially blocked IL-10 induced Involucrin expression. **Conclusion** At a particular concentration range, IL-10 has little effect on HaCaT proliferation, but it partially upregulates the expression of differentiation marker Involucrin via the MAPKs-ERK1/2 and PI3K-AKT pathways.

Key words HaCaT cells; cell proliferation; IL-10; differentiation markers; signaling pathways