

银屑病诱发药物对 HaCaT角质形成细胞的影响

岑建萍, 朱可建*, 金 纳, 林爱华, 程 浩

(浙江大学 医学院 附属邵逸夫医院 皮肤科, 浙江 杭州 310016)

摘要: 为了探讨锂盐、普萘洛尔和氯喹是否通过影响银屑病的细胞因子网络从而诱发或加重银屑病, 以不同浓度的碳酸锂、盐酸普萘洛尔或二磷酸氯喹处理 HaCaT角质形成细胞后加以 TNF- α 刺激, 应用人类细胞因子抗体分析膜技术测定细胞培养液中多种细胞因子和生长因子的分泌情况; 采用实时定量 PCR法检测 IL-8和 IL-6 mRNA的表达。人类细胞因子抗体分析膜技术结果显示, 碳酸锂明显促进 IL-6和 TNF- α 的产生; 盐酸普萘洛尔明显促进 IL-6等多种细胞因子和生长因子的产生; 二磷酸氯喹也明显促进 IL-6的产生。实时定量 PCR结果表明, TNF- α 能刺激 HaCaT角质形成细胞呈剂量依赖性增加 IL-8和 IL-6 mRNA的表达 ($P < 0.01$); 并对 IL-8的调节作用更强 ($P < 0.01$); $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸普萘洛尔能显著上调 IL-6 mRNA的表达 ($P < 0.05$)。碳酸锂、盐酸普萘洛尔和二磷酸氯喹对 HaCaT角质形成细胞表达以及产生某些细胞因子和生长因子具有调节功能。

关键词: 银屑病; 人角质形成细胞株 HaCaT细胞; IL-8; IL-6

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)10 - 1041 - 04

Effects of drugs known to trigger psoriasis on HaCaT keratinocytes

CEN Jian-ping, ZHU Ke-jian*, JIN Na, LIN Ai-hua, CHENG Hao

(Department of Dermatology, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract: To investigate whether lithium carbonate, propranolol or chloroquine aggravate psoriasis through influencing cytokines of the psoriatic cytokine network, HaCaT keratinocytes were stimulated with TNF- α after treatment with these drugs. Protein secretion of a set of multiple different cytokines and growth factors in culture supernatants were measured by using a cytokine antibody array technology. Expression of IL-8 and IL-6 mRNA was determined by real-time PCR. In culture supernatants of TNF- α -stimulated HaCaT cells, production of IL-6 and TNF- α could be enhanced by lithium carbonate; production of IL-6 and a panel of cytokines and growth factors could be enhanced by propranolol hydrochloride; and IL-6 was up-regulated by chloroquine diphosphate as well. Real-time PCR analysis showed a significantly dose-dependent increase of IL-8 and IL-6 mRNA expression in HaCaT cells stimulated with TNF- α as compared to cells without TNF- α -stimulation, the mRNA expression of IL-8 was higher than that of IL-6 with the same concentration of TNF- α ($P < 0.01$). Compared with HaCaT cells cultured with medium alone, propranolol hydrochloride at the concentration of $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ could stimulate HaCaT cells to express higher level of IL-6 mRNA ($P < 0.05$). The drugs investigated show a modulatory effect on certain cytokines and growth factors which are able to modulate inflammatory type of immune reaction present in psoriatic lesions.

Key words: psoriasis; human HaCaT keratinocyte; IL-8; IL-6

银屑病是一种常见的慢性炎症性皮肤病,迄今

对其病因及发病机制尚未完全明了。许多因素,如感染、创伤和精神压力等可以诱发或加重银屑病。另外,一些药物,如锂剂、 β 受体阻滞剂普萘洛尔、抗疟药物氯喹等,在治疗相应疾病时可导致银屑病的发生或加重^[1,2]。

收稿日期: 2007-02-26.

* 通讯作者 Tel: 86 - 571 - 86006041, Fax: 86 - 571 - 86044817,

E-mail: zhukejian@mail.hz.zj.cn

本研究的部分工作在德国基尔大学皮肤病医院完成。

表皮角质形成细胞增生,角质层中性粒细胞浸润形成的微脓疡,以及真皮浅层致密单个核细胞浸润是银屑病特征性病理表现。既往研究发现,银屑病的皮损和全身系统过度表达一些炎症前细胞因子特别是 IL-6、IL-8、TNF- α ^[3,4]等,以及角质形成细胞和炎症细胞表达的上述细胞因子的改变,在加重银屑病皮损的免疫反应中发挥重要作用^[5]。本实验旨在细胞因子水平研究药物诱发或加重银屑病的作

材料和方法

HaCaT细胞的培养 HaCaT角质形成细胞由德国海德堡癌症研究中心 Fusenig教授提供。采用含 100 u·mL⁻¹青霉素、100 u·mL⁻¹链霉素、不含血清的 Quantum 263培养基(购于德国 PAA公司),在 37 °C、5% CO₂及饱和湿度条件下培养于 6孔板达 80%的融合率。

人类细胞因子抗体分析膜技术 实验组用碳酸锂、盐酸普萘洛尔或二磷酸氯喹(终浓度 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹)处理 HaCaT角质形成细胞 24 h后再加入 TNF- α (终质量浓度 10 ng·mL⁻¹)刺激 24 h。对照组为 HaCaT角质形成细胞仅用培养液培养 24 h后,再加入 TNF- α 刺激 24 h。最后收集细胞培养液并贮存于 -70 °C。

应用人类细胞因子抗体分析膜系列 V(购于美国 Ray Bio公司)检测细胞培养上清液中的多种细胞因子。方法简述如下:把标记有多种细胞因子抗体的分析膜用阻断缓冲液孵育 30 min后,在细胞培养上清液中(室温)孵育 2 h;用清洗缓冲液洗膜后继续在生物素标记的抗体中(室温)孵育 2 h;用辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(室温)孵育 2 h;再用检测缓冲液作用 2 min,数码相机下成像;最后用 AIDA图像分析软件系统(美国 Ray Bio公司提供)分析并比较图像中各黑点的强度(代表不同细胞因子水平)。

实时定量 PCR HaCaT角质形成细胞用碳酸锂(终浓度 1 × 10⁻⁵ ~ 1 × 10⁻⁸ mol·L⁻¹)或盐酸普萘洛尔(终浓度 1 × 10⁻⁵ ~ 1 × 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹)处理 24 h后,加入 TNF- α (10 ng·mL⁻¹)刺激 3 h。以仅用 TNF- α 刺激 3 h的细胞作为刺激对照。未加任何处理的细胞作为空白对照。最后收集细胞以实时定量 PCR法检测 IL-8 mRNA的表达。

碳酸锂、盐酸普萘洛尔或二磷酸氯喹(终浓度分别为 1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁸及 1 × 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹)处

理 HaCaT角质形成细胞 1 h,未加任何处理的细胞作为对照。收集细胞以实时定量 PCR法检测 IL-6 mRNA的表达。

TNF- α (终质量浓度分别为 10及 20 ng·mL⁻¹)刺激 HaCaT角质形成细胞 30 min,未加任何处理的细胞作为对照。收集细胞以实时定量 PCR法检测 IL-6和 IL-8 mRNA的表达。

收获细胞后以 Trizol法提取细胞总 RNA,紫外分光光度仪定量后取 1 μ g进行逆转录反应。逆转录反应参数为 70 °C 10 min,42 °C 1 h,95 °C 5 min。取逆转录产物 1 μ L进行实时定量 PCR扩增。扩增体系为去离子水 5.8 μ L、MgCl₂ 1.2 μ L、酶 1 μ L、上下游引物各 0.5 μ L,置于实时荧光定量 PCR仪(Roche Diagnostics公司)。反应参数:95 °C 10 min变性后,IL-8为 95 °C 10 s,66 °C 5 s,72 °C 15 s;IL-6为 95 °C 10 s,67 °C 5 s,72 °C 15 s;GAPDH为 95 °C 10 s,69 °C 5 s,72 °C 15 s;共 45循环。以管家基因 GAPDH作为内对照。PCR引物(购于德国 Sigma公司)序列分别为 IL-8:上游 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGC-3',下游 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTC-3';IL-6:上游 5'-AGGAGCCCAGCTATGAATCCTTC-3',下游 5'-TGGAATCTTCTCTCTGGGGTACTG-3';GAPDH:上游 5'-CCAGCCGAGCACATCGCTC-3',下游 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 4软件对组间差异性进行 *t*检验。

结果

1 人类细胞因子抗体分析膜技术检测药物对 HaCaT细胞表达细胞因子的影响

应用人类细胞因子抗体分析膜系列 V可从 HaCaT细胞培养上清液中检测到 79种不同的细胞因子。由图 1可见,经 TNF- α 刺激 24 h的 HaCaT角质形成细胞(图 1B)合成的 IL-6和 IL-8比未经任何处理的对照组细胞(图 1A)明显增加。

表 1显示,与仅以 TNF- α 刺激 24 h的对照组细胞相比,经碳酸锂处理的 HaCaT角质形成细胞合成的 TNF- α 和 IL-6明显增加,其中 TNF- α 增加 51%,IL-6增加 87%。盐酸普萘洛尔处理的 HaCaT角质形成细胞合成 IL-6、78氨基酸上皮细胞来源的中性粒细胞活化剂(ENA-78)以及肺部和活化控制趋化因子(PARC)明显增加。其中 IL-6增加 80%,ENA-78增加 64%,PARC增加 37%。但是中性粒细胞活

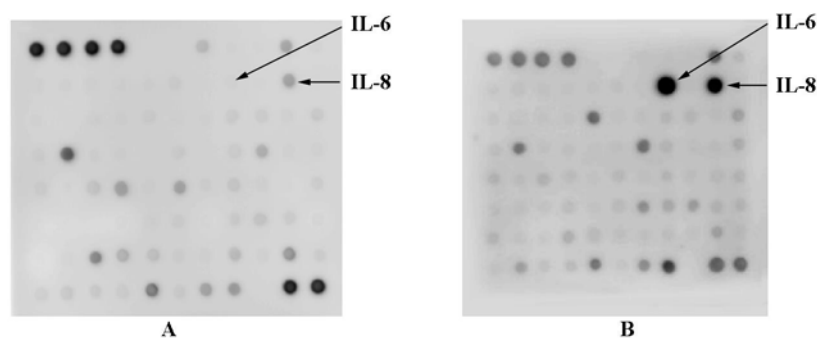


Figure 1 Digital images of RayBio human cytokine antibody array V. Subconfluent cultured HaCaT cells were stimulated with TNF- α ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 24 hours. Cells without any treatment were served as control. RayBio human cytokine antibody array V was used to detect the multiple cytokines in the culture supernatants. Finally, membranes were placed in a CCD-camera; a digital image was taken and stored as a readable format. Intensities of the spots were analyzed by AIDA-image analysis software. The different intensities of the spots represent the different levels of cytokine expression. A: HaCaT cells without any treatment; B: HaCaT cells stimulated with TNF- α for 24 h

化肽-2 (NAP-2) 和转化生长因子 β_2 (TGF- β_2) 的表达明显下降 (分别下降 38% 和 8%)。二磷酸氯喹使 HaCaT 角质形成细胞合成 IL-6 (36%) 明显增加, 而 TGF- β_2 (53%) 明显下降。

Table 1 Effects of lithium carbonate, propranolol hydrochloride, or chloroquine diphosphate on cytokine expression by TNF- α -stimulated HaCaT cells

Drug	Cytokine up-regulated	Cytokine down-regulated
Lithium carbonate	IL-6 (87%); TNF- α (51%)	
Propranolol hydrochloride	IL-6 (80%); ENA-78 (64%) PARC (37%)	NAP-2 (38%); TGF- β_2 (8%)
Chloroquine diphosphate	IL-6 (36%)	TGF- β_2 (53%)

Cytokine production in supernatants of HaCaT cells was measured by a cytokine antibody array technique. The number in parenthesis indicates the percentage of difference as compared with HaCaT cells without treatment with drugs ($n=3$)

2 实时定量 PCR 检测药物对 HaCaT 细胞表达 IL-8 和 IL-6 mRNA 的影响

2.1 药物处理后 IL-8 mRNA 的表达 与未经 TNF- α 刺激的空白对照组细胞相比, 经 TNF- α 刺激 3 h 后的 HaCaT 角质形成细胞表达的 IL-8 mRNA 显著上调 (分别为 1.42 ± 0.47 和 5.73 ± 1.55 , $n=6$, $P < 0.05$)。但碳酸锂或盐酸普萘洛尔不能进一步调节 HaCaT 角质形成细胞中 TNF- α 诱导的 IL-8 mRNA 的高表达 ($P > 0.05$)。

2.2 药物处理后 IL-6 mRNA 的表达 与未经药物处理的对照组细胞相比, HaCaT 角质形成细胞经

不同浓度药物处理 1 h 后, 盐酸普萘洛尔在 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度时能显著上调 IL-6 mRNA 的表达 (分别为 1.02 ± 0.05 和 1.35 ± 0.34 , $n=6$, $P < 0.05$)。碳酸锂、其他浓度的盐酸普萘洛尔或二磷酸氯喹对 IL-6 mRNA 的表达均无显著调节作用 ($P > 0.05$)。

2.3 TNF- α 刺激后 IL-8 和 IL-6 mRNA 的表达 HaCaT 角质形成细胞经 TNF- α (终质量浓度 10 或 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激 30 min 后, IL-6 和 IL-8 mRNA 的表达量显著上调 ($P < 0.01$)。 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TNF- α 比 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TNF- α 具有更强的调节作用 ($P < 0.01$)。相同浓度的 TNF- α 刺激 HaCaT 角质形成细胞后表达 IL-8 mRNA 的水平显著高于 IL-6 ($P < 0.01$), 见表 2。

Table 2 Quantitative IL-6 and IL-8 mRNA expression in HaCaT cells stimulated with different concentrations of TNF- α as measured by real-time PCR

TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-6 / GAPDH	IL-8 / GAPDH
0 (control)	1.04 ± 0.20	1.10 ± 0.28
10	$1.78 \pm 0.52^*$	$2.75 \pm 0.80^*$
20	$2.63 \pm 0.57^{**\Delta\Delta}$	$5.28 \pm 0.91^{**\Delta\Delta}$

$n=6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs TNF- α ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) group

讨论

银屑病是一种常见的免疫介导的皮肤病, 一些炎症前细胞因子特别是 IL-6、IL-8 和 TNF- α 在银屑病皮损中过度表达^[3,4]。TNF- α 具有许多免疫功能, 包括刺激 T 淋巴细胞、单核吞噬细胞以及角质

形成细胞等合成 IL-1、IL-6 和 IL-8, 这些细胞因子可以导致银屑病的病理改变。抗 TNF- α 单克隆抗体 (infliximab, adalimumab) 以及 TNF- α 融合蛋白 (etanercept) [6] 治疗银屑病的高效性也可以反证 TNF- α 在银屑病发病中的重要作用。

IL-8 和 IL-6 具有多种免疫学活性并参与一些与银屑病病理生理相关的免疫过程, 如 T 淋巴细胞和中性粒细胞的活化及趋化, 角质形成细胞的过度增殖以及血管增生等 [7]。有学者认为 TNF- α 可导致银屑病皮损中 IL-8 和 IL-6 的水平增高 [7]。

锂剂、 β 肾上腺素能受体阻滞剂和抗疟药物等在临床应用过程中可诱发或加重银屑病。一项临床研究显示, 588 名银屑病患者中有 26 名 (4.4%) 患者正接受 β 肾上腺素能受体阻滞剂的治疗, 治疗过程中有 72.4% 的患者银屑病加重 [8]。锂剂用来治疗抑郁症和其他精神类疾病。约一半接受锂剂治疗的银屑病患者出现皮损加重 [9]。另有文献 [2] 报道, 银屑病患者在接受抗疟治疗后约有 18% 的患者出现病情加重。但是关于这些药物诱发或加重银屑病的机制尚不完全清楚。

为了在细胞因子水平揭示上述药物诱发或加重银屑病的机制, 作者首先尝试应用人类细胞因子抗体分析膜技术测定经不同药物处理后的 HaCaT 角质形成细胞培养上清液中多种细胞因子和生长因子的分泌情况。结果发现, 与未加药物处理的 HaCaT 角质形成细胞相比, 碳酸锂、盐酸普萘洛尔和二磷酸氯喹均能显著上调 HaCaT 角质形成细胞表达 IL-6。其中碳酸锂对 IL-6 的上调作用最强, 增加 87%; 盐酸普萘洛尔次之, 上调 80%; 二磷酸氯喹作用最弱, 仅增加 36%。这似乎与其诱发或加重银屑病的强度相吻合; 碳酸锂被认为是诱导银屑病作用最强的药物, 盐酸普萘洛尔次之, 二磷酸氯喹作用最弱。

作者还发现碳酸锂对 TNF- α 的表达亦有上调作用。与对照组相比, 经碳酸锂处理后的 HaCaT 角质形成细胞表达 TNF- α 可增加 51%。TNF- α 可刺激许多炎症性细胞因子如 IL-6 和 IL-8 的表达 [7,10,11], 而 IL-6 和 IL-8 在加重银屑病炎症反应中起着重要作用。

盐酸普萘洛尔能上调 IL-6、ENA-78 和 PARC 的表达, 这些细胞因子具有促进炎症反应中急性期蛋白的合成, 中性粒细胞的趋化, 以及毛细血管的增生等功能。因此推测这可能是普萘洛尔诱发或加重银屑病的病理机制。

在上述细胞因子中, IL-8 和 IL-6 在银屑病的致

病中发挥最为重要的作用 [4,8]。为了更深入地研究不同浓度的药物对 HaCaT 角质形成细胞表达 IL-8 和 IL-6 的调节作用, 作者采用实时定量 PCR 法发现, TNF- α 能刺激 HaCaT 角质形成细胞呈剂量依赖性高表达 IL-8 和 IL-6 mRNA, 而且在相同浓度 TNF- α 刺激下 IL-8 mRNA 的表达量明显高于 IL-6 mRNA, 这与既往的一些研究结果相吻合 [7,11]。作者还发现, 盐酸普萘洛尔可能在一定的浓度时能使 HaCaT 角质形成细胞表达更多的 IL-6 mRNA。

本研究表明, 碳酸锂、盐酸普萘洛尔和二磷酸氯喹可能以不同的方式影响一些细胞因子的产生和表达, 而这些细胞因子和生长因子可能在银屑病皮损的炎症性免疫反应过程中发挥重要的调节作用。

References

- [1] Tsankov N, Angelova I, Kazandjieva J. Drug-induced psoriasis. Recognition and management [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2000, 1: 159 - 165.
- [2] Wolf R, Ruocco V. Triggered psoriasis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1999, 455: 221 - 225.
- [3] Ockenfels HM, Wagner SN, Keim-Maas C, et al. Lithium and psoriasis: cytokine modulation of cultured lymphocytes and psoriatic keratinocytes by lithium [J]. *Arch Dermatol Res*, 1996, 8: 173 - 178.
- [4] Asadullah K, Docke WD, Volk HD, et al. The pathophysiological role of cytokines in psoriasis [J]. *Drugs Today (Barc)*, 1999, 5: 913 - 924.
- [5] Kapp A. The role of cytokines in the psoriatic inflammation [J]. *J Dermatol Sci*, 1993, 5: 133 - 142.
- [6] Weinberg JM, Bottino CJ, Lindholm J, et al. Biologic therapy for psoriasis: an update on the tumor necrosis factor inhibitors infliximab, etanercept, and adalimumab, and the T-cell-targeted therapies efalizumab and alefacept [J]. *J Drugs Dermatol*, 2005, 4: 544 - 555.
- [7] Wilmer JL, Luster MI. Chemical induction of interleukin-8 a pro-inflammatory chemokine, in human epidermal keratinocyte cultures and its relation to cytogenetic toxicity [J]. *Cell Biol Toxicol*, 1995, 11: 37 - 50.
- [8] Gold MH, Holy AK, Roenigk HH Jr. Beta-blocking drugs and psoriasis. A review of cutaneous side effects and retrospective analysis of their effects on psoriasis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1988, 19: 837 - 841.
- [9] Yeung CK, Chan HH. Cutaneous adverse effects of lithium: epidemiology and management [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2004, 5: 3 - 8.
- [10] Hou Q, Li LC, Guo Y, et al. Inhibitory effects of isorhapotigenin on IL-8 production and mRNA expression induced with TNF α in normal human synovial cells [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2001, 36: 407 - 410.
- [11] Duan H, Koga T, Kohda F, et al. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis [J]. *J Dermatol Sci*, 2001, 26: 119 - 124.