

虫草素抑制 TNF- α 诱导的人角质形成细胞系 HaCaT 增殖

梁辉勇^{1,2}, 韦秋慧², 丁亚¹, 彭小青¹, 姚静³, 苏齐鉴^{1,4*}

1. 广西中医药大学 研究生院, 广西 南宁 530200; 2. 前海人寿广西医院 皮肤科, 广西 南宁 530200;
3. 广西中医药大学附属瑞康医院 中西医结合转化医学中心, 广西 南宁 530011;
4. 钦州市第一人民医院 科技科, 广西 钦州 535099

摘要:目的 探讨虫草素对肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导人角质形成细胞系 HaCaT 增殖、凋亡和炎症反应的影响。方法 将 HaCaT 细胞分为对照组 (control)、模型组 (model) 及低、中、高浓度虫草素干预组 (25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L), 先用 40 μ g/L TNF- α 对模型组、虫草素干预组诱导 24 h, 制作银屑病 (PS) 样细胞模型; 之后虫草素干预组加入相应浓度的虫草素, 继续培养 24 h; 用 CCK-8 法检测细胞增殖, 用流式细胞仪检测细胞凋亡, 用 RT-qPCR 检测炎症细胞因子白介素 (IL)-8、IL-1 β mRNA 相对表达量。结果 虫草素干预 24 h 后细胞增殖率下降 ($P<0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), IL-8 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平下降 ($P<0.05$)。结论 虫草素可抑制 TNF- α 诱导的人角质形成细胞系增殖、炎症反应并促进细胞凋亡。

关键词: 人角质形成细胞; 虫草素; 银屑病; 细胞增殖; 炎症反应

中图分类号: R758.63; R275 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.09.1390

Cordycepin inhibits proliferation of human keratinocyte cell line HaCaT induced by TNF- α

LIANG Huiyong^{1,2}, WEI Qiuhui², DING Ya¹, PENG Xiaoqing¹, YAO Jing³, SU Qijian^{1,4*}

1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Department of Dermatology, Foresea Life Insurance Guangxi Hospital, Nanning 530200; 3. Centre for Translational Medical Research in Integrative Chinese & Western Medicine, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011;
4. Department of Science and Technology, the First People's Hospital of Qinzhou, Qinzhou 535099, China

Abstract: Objective To study the effect of cordycepin on proliferation, apoptosis and inflammatory reaction of human keratinocyte cell line HaCaT induced by TNF- α . **Methods** HaCaT cells were divided into control group, model group and intervention groups including low, middle, high dose (cordycepin 25 μ mol/L, 50 μ mol/L and 100 μ mol/L, respectively). HaCaT cells were incubated with by 40 μ g/L TNF- α in model group and cordycepin intervention group for 24 hours. Then, the cordycepin intervention groups were incubated with corresponding cordycepin for 24 hours. Cell proliferation was detected by CCK-8 method. Apoptosis was detected by flow cytometry. And mRNA expression of interleukin (IL)-8, IL-1 β was detected by RT-qPCR. **Results** After 24 hours of cordycepin incubation, cell proliferation rate decreased ($P<0.05$), cell apoptosis rate increased ($P<0.05$)

收稿日期: 2022-10-20 修回日期: 2023-02-27

基金项目: 广西中医药大学广西一流学科建设开放课题 (2019XK158)

* 通信作者 (corresponding author): agansue@163.com

and mRNA expression of IL-8 and IL-1β decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Cordycepin can inhibit TNF-α-induced proliferation and inflammatory reaction of HaCaT cells and promote apoptosis of these cells.

Key words: human keratinocyte; cordycepin; psoriasis; cell proliferation; inflammation

银屑病 (psoriasis, PS) 是易复发的慢性炎性皮肤病, 中国发病率约 0.125%~0.5%, 银屑病皮损的两大特征是炎性细胞浸润和表皮增殖失控, 炎症反应导致皮肤瘙痒、红肿、鳞屑性斑块甚至系统性的损害, 严重影响患者的身心健康; 银屑病发病机制复杂, 重要致病因素有遗传、环境、免疫等^[1]。银屑病治疗以药物为主, 目前不能根治, 病情易反复, 寻找新的药物、方法仍然是研究的重要方向。虫草素 (cordycepin), 又称“3'-脱氧腺苷”, 是蛹虫草、冬虫夏草等植物中的活性成份, 有抗炎、抗菌、抗肿瘤、调节免疫等作用^[2-4]; 这些作用与银屑病致病因素相对应^[1,4], 推测虫草素可能对银屑病有治疗作用。以下以细胞模型作为研究对象, 以体外实验的方式, 初步探讨虫草素对银屑病的潜在治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

TNF-α (色谱纯, ≥98%, Pepro Tech 公司); 虫草素 (色谱纯, ≥98%) 和总 RNA 提取试剂盒 (北京 Solarbio 公司); 细胞增殖检测试剂盒 (Cell Counting kit-8, CCK-8, 北京 Biosharp 公司); 细胞凋亡试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); 反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific 公司); 实时荧光定量试剂盒 (ROX 公司); 人角质形成细胞系 HaCaT (广州赛库生物有限公司); 完全培养基 (含 88% 低糖培养基、10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 青-链霉素)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理: 将细胞分为对照组 (control)、模型组 (model) 及低浓度 (cordycepin 25 μmol/L)、中浓度 (cordycepin 50 μmol/L)、高浓度 (cordycepin 100 μmol/L) 虫草素干预组, 对照组用完全培养基, 模型组、虫草素干预组在完全培养基中加入 TNF-α (终浓度 40 μg/L) 培养 24 h, 之后低、中、高浓度虫草素组加入相应浓度虫草素, 使虫草素终浓度分别为 25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L。各组继续培养 24 h。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖: 按试剂盒说明书操作, 细胞增殖率 (%) = (A 实验 - A 空白) / (A 对照 - A 空白) × 100%。

1.2.3 流式细胞仪检测凋亡: 按试剂盒说明书操作。

1.2.4 RT-qPCR 检测细胞 IL-8、IL-1β mRNA 相对表达量: RNA 提取、RNA 反转录、qPCR 均按相应试剂盒说明书操作。以 GAPDH 作为内参, 引物序列: IL-8, 上游引物 5'-CAATCCTAGTTTGATACTCCC-3', 下游引物 5'-AATTACTAATATTGACTGTGGAG-3'; IL-1β, 上游引物 5'-AGCTACGAATCTCCGACCAC-3', 下游引物 5'-CGTTATCCCATGTGTCCAAGAA-3'; GAPDH, 上游引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。ΔCt = 目的基因 Ct - 内参基因 Ct, ΔΔCt = 实验组 ΔCt - 对照组 ΔCt 平均值, 基因相对表达量 = 2^{-ΔΔCt}。

1.3 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 当数据符合正态分布时, 组间比较采用 One-way Anova 单因素方差分析; 数据不符合正态分布时, 组间比较采用秩和检验。两变量相关性用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测结果

虫草素呈浓度依赖性抑制 HaCaT 细胞的增殖, ($r = -0.999$, $P < 0.01$) (表 1)。

表 1 细胞增殖率
Table 1 Cell proliferation rate ($\bar{x} \pm s$, %, $n = 5$)

group	cell proliferation rate
control	100 ± 0.00
model	132.73 ± 30.82 *
cordycepin / (μmol/L)	
25	125.77 ± 11.60 #
50	99.97 ± 16.79 #
100	18.72 ± 5.73 #

* $P < 0.05$ compared with control; # $P < 0.05$ compared with model.

2.2 细胞凋亡检测结果

虫草素可促进模型细胞的凋亡,增加早期凋亡及晚期凋亡的比例(图1)。

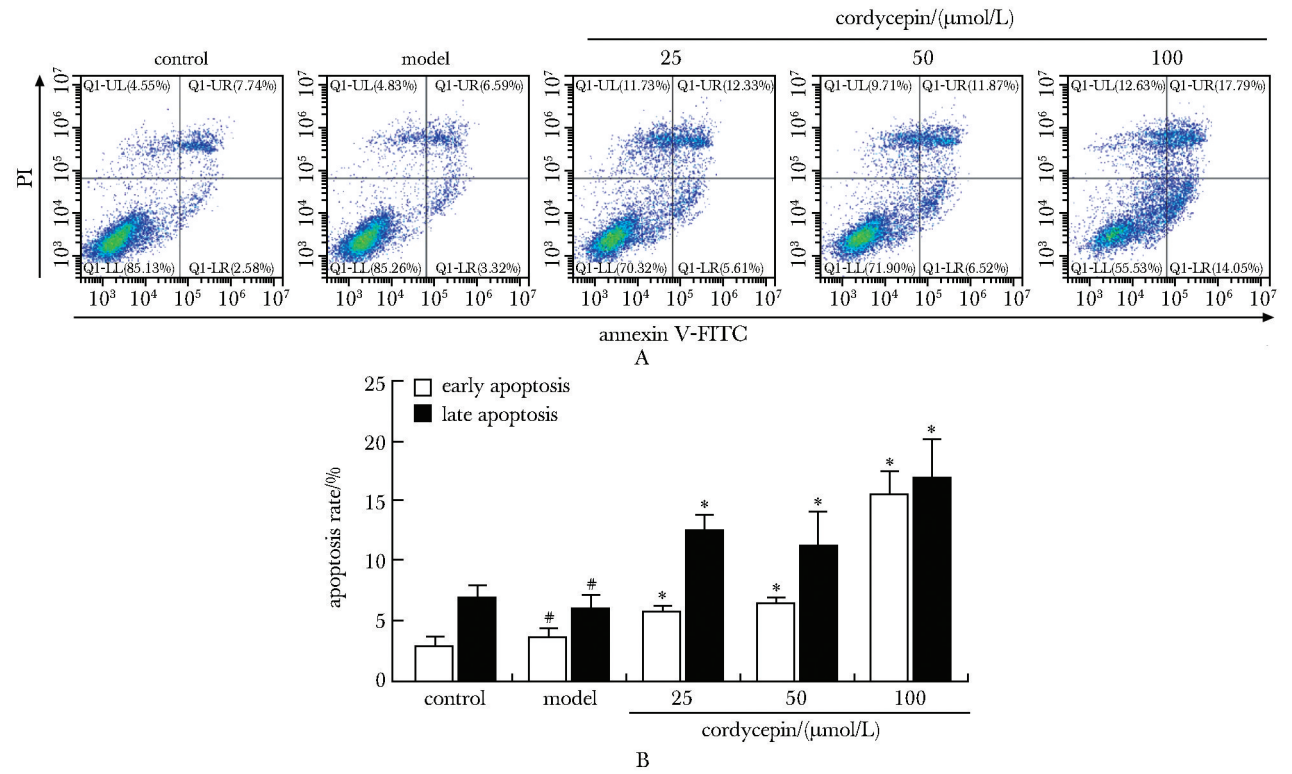
2.3 RT-qPCR 结果

TNF-α 可使模型细胞 IL-8、IL-1β mRNA 相对表达量升高,而虫草素可使它们下调(表2)。

3 讨论

银屑病发病机制复杂,免疫因素及其引起的炎

性反应最终导致表皮过度增殖,形成银屑病皮损。促炎细胞因子 TNF-α 在银屑病发病机制中起重要作用^[5]。皮损表皮浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC)活化,活化的 pDC 产生 TNF-α、干扰素(interferon, IFN) α 等炎症因子; TNF-α、IFN-α 刺激常规树突状细胞(conventional dendritic cells, cDC)的 Toll 样受体、C 型凝集素受体,使 cDC 分泌 IL-23、IL-12 等;IL-23 刺激辅助性 T 细胞 17(helper T cell 17, Th17),使 Th17 细胞分泌



A. flow cytometry to detect cell apoptosis; B. statistics of apoptosis rate; #P>0.05 compared with control; *P<0.05 compared with model.

图1 细胞凋亡率
Fig 1 Cells apoptosis rate

表2 mRNA 相对表达量		
Table 2 Relative mRNA expression($\bar{x}\pm s$, $n=3$)		
group	IL-8	IL-1β
control	1.30±1.20	1.09±0.51
model	1460.28±626.33*	748.58±72.57*
cordycepin/(μmol/L)		
25	256.83±56.45#	698.39±89.01#
50	170.29±32.52#	207.45±60.16#
100	34.70±23.42#	79.33±11.31#

*P<0.05 compared with control; #P<0.05 compared with model.

IL-17、IL-22 等;IL-17 进一步刺激表皮细胞增殖并分泌 IL-8 等趋化因子,趋化因子使炎症细胞向表皮聚集,聚集的炎症细胞又分泌多种炎症因子,形成连锁反应,导致或加重病变^[6-7]。IL-1 主要来源于表皮角质形成细胞,损伤刺激使表皮释放 IL-1,IL-1 反过来促进角质形成细胞及 T 细胞等产生炎症反应;在银屑病皮损中,IL-1β 升高并激活真皮中的 Th17 等细胞分泌 IL-17,是银屑病病变细胞过度增生及炎症反应的重要因素^[8]。

HaCaT 细胞在 TNF- α 的诱导下,出现增殖失调及炎性反应,具有类似银屑病病变细胞过度增生及炎性反应的特性,因而常用来构建银屑病细胞模型^[9-10]。本研究利用 HaCaT 细胞模型,观察虫草素抑制 TNF- α 诱导的细胞异常增殖和炎性反应的作用,结果显示,虫草素能抑制 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞增殖,促进细胞凋亡,并下调炎性因子 IL-8、IL-1 β 的 mRNA 表达水平,提示虫草素对银屑病可能有治疗作用。

虫草素是一种腺苷类似物。内源性腺苷遍布于人体细胞,影响各种细胞、组织、器官的生理机能^[11]。腺苷可促进病变细胞的凋亡,如白血病细胞、黑色素

瘤细胞、星形细胞瘤细胞等^[12]。与腺苷类似,虫草素可抑制病变细胞增殖、迁移、侵袭、促进病变细胞凋亡^[13]。此外,虫草素可抗炎、调节免疫;如在特应性皮炎的小鼠中,虫草素降低胸腺基质淋巴细胞生成素、IL-4、IL-6、TNF- α 水平,抑制趋化因子 17 及皮损中 caspase-1 的表达和活性^[2];在小鼠炎性模型中,虫草素调节相关受体,抑制 T 细胞的过度活化^[14];在脂多糖致小鼠肾小管上皮损伤中,虫草素显著降低细胞内活性氧水平,抑制炎性反应^[15]。虫草素的这些作用,可能解释了它能抑制模型细胞增殖和炎性反应的原因。今后应进一步开展动物实验和临床研究,以验证虫草素对于银屑病的治疗效果。

参考文献:

- [1] 中华医学会皮肤性病学分会银屑病专业委员会.中国银屑病诊疗指南(2018 完整版)[J].中华皮肤科杂志, 2019,52:667-710.
- [2] Han NR, Moon PD, Kim HM, *et al.* Cordycepin ameliorates skin inflammation in a DNFB-challenged murine model of atopic dermatitis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40: 401-407.
- [3] 罗骏,王聪懿,吴庆琛.虫草素增强顺铂诱导的食管癌细胞系 Eca109 凋亡[J].基础医学与临床,2015,35: 1520-1525.
- [4] 周艳丽,许剑怡,王宏娟,等.虫草素的药理作用及应用前景[J].中国医药导报,2020,17:39-42.
- [5] 安然,邓云华.肿瘤坏死因子 α 抑制剂的皮肤不良反应及治疗进展[J].中国皮肤性病学杂志,2020,34: 1078-1082.
- [6] Bugaut H, Aractingi S. Major role of the IL17/23 axis in psoriasis supports the development of new targeted therapies[J]. Front Immunol, 2021, 12: 621956. doi: 10.3389/fimmu. 2021. 621956.
- [7] 赵京霞,王燕,底婷婷,等.IL-23/IL-17 轴在银屑病免疫发病机制中的作用[J].基础医学与临床,2012,32: 453-456.
- [8] Cai Y, Xue F, Quan C, *et al.* A critical role of the IL-1 β -IL-1R signaling pathway in skin inflammation and psoriasis pathogenesis[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139: 146-156.
- [9] 陈健勤,邹玲,王莎莉,等.银屑 I 号含药血清对银屑病样细胞模型的增殖、凋亡相关蛋白及基因的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2021,35:444-448.
- [10] 黄涛,周炳杰,耿骥,等.积雪草酸对 TNF- α 诱导的 HaCaT 细胞增殖的抑制作用[J].国际药学研究杂志, 2018,45:525-530.
- [11] Sheth S, Brito R, Mukherjee D, *et al.* Adenosine receptors: expression, function and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15: 2024-2052.
- [12] Kazemi MH, Raoofi MS, Hojjat-farsangi M, *et al.* Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer[J]. J Cell Physiol, 2018, 233: 2032-2057.
- [13] 蔡曦,尚超,孟丽荣.虫草素抗肿瘤药理作用及其机制的研究进展[J].药物评价研究,2021,44:1548-1554.
- [14] Wang X, Xi D, Mo J, *et al.* Cordycepin exhibits a suppressive effect on T cells through inhibiting TCR signaling cascade in CFA-induced inflammation mice model[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2020, 42: 119-127.
- [15] 杨永丽,项辉,肖志英.虫草素对脂多糖诱导大鼠肾小管上皮细胞损伤的保护作用[J].中华危重病急救医学,2021,33:203-206.