

槐耳清膏对 TNF- α /IFN- γ 诱导的 HaCaT 特应性皮炎细胞模型的抗炎机制研究

关淇真 段昕所*

承德医学院附属医院

DOI:10.12238/bmtr.v7i3.14482

[摘要] 目的: 本研究旨在探讨槐耳清膏对TNF- α /IFN- γ 诱导的HaCaT细胞特应性皮炎模型的抗炎机制。方法: 采用实时荧光定量聚合酶链式反应检测TNF- α /IFN- γ 诱导后HaCaT细胞中趋化因子TARC、MDC的mRNA的表达。结论: 槐耳清膏可通过抑制趋化因子TARC和MDC的生成,进而缓解特应性皮炎的炎症反应。

[关键词] 特应性皮炎; 槐耳清膏; 趋化因子

中图分类号: R758.3+2 **文献标识码:** A

Research on the Anti-inflammatory Mechanism of Huaier Qinggao for the TNF- α /IFN- γ -Induced HaCaT Atopic Dermatitis Cell Model

Qizhen Guan Xinsuo Duan*

Affiliated Hospital of Chengde Medical University

[Abstract] Objective: This study aims to explore the anti-inflammatory mechanisms of Huaier Qinggao on an atopic dermatitis model in HaCaT cells, induced by Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ . Methods: Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was employed to detect the expression of relevant inflammatory factors TARC and MDC mRNA in HaCaT cells following TNF- α /IFN- γ induction. Conclusion: Huaier Qinggao may alleviate the degree of inflammation by inhibiting the production of chemokines TARC and MDC.

[Key words] Atopic dermatitis; Huaier Qinggao; chemokines

引言

特应性皮炎, 亦称作遗传过敏性皮炎或异位性皮炎, 是一种慢性的、全身性的炎症性皮肤病。其发病机制涉及遗传、环境、免疫等多个方面的因素, 这些因素之间可能存在相互作用, 导致炎症的加剧, 并可能加速疾病的发展, 进而发展出现为过敏性鼻炎、哮喘, 这一过程被称为特应性进程 (Atopic Dermatitis March)。特应性皮炎的临床特征主要表现为反复发作的顽固性干燥瘙痒, 以及局限性的红斑和丘疹。目前, 治疗特应性皮炎主要依赖于局部应用糖皮质激素和抗组胺药物。

槐耳是一种具有悠久药用史的真菌, 随着现代医学研究的深入, 槐耳的抗肿瘤及免疫调节作用逐渐成为研究热点。槐耳清膏是中药槐耳菌质发酵后的热水提取产物, 主要活性成分是多糖蛋白 (PS-T), 是一种效果良好的生物反应调节剂, 在免疫调节、抗肿瘤、抗病毒等方面广泛发挥其药理作用^[1,2]。槐耳在免疫调节方面展现出优秀的结果, 王丽娟^[3]等发现, 槐耳可抑制NLRP3

炎症小体的激活, 从而调节溃疡性结肠炎的进展。孙雯^[4]等指出, 槐耳能够显著减少哮喘患者气道黏膜及肺泡灌洗液中炎症细胞如嗜酸粒细胞、淋巴细胞等的浸润程度, 其免疫调节效果与吸入型糖皮质激素相当, 且在联合应用时, 可进一步提升治疗哮喘的临床疗效。故而本文通过TNF- α 和IFN- γ 共同诱导人永生化角质形成HaCaT细胞建立特应性皮炎细胞模型, 研讨槐耳清膏对该细胞模型的相关炎症因子表达的影响, 为槐耳在临床上的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

槐耳清膏受赠于启东盖天利公司; 人永生化角质形成细胞株HaCaT (购自上海中乔新舟生物科技有限公司); DMEM高糖培养基 (Vivacell), 胎牛血清FBS (Vivacell), 青霉素/链霉素溶液 (Vivacell), 胰酶 (Vivacell); TRIzol (ThermoFisher); FastKing cDNA第一链合成试剂盒 (去基因组) (天根生物); 上下游引物

(上海生工)；ChamQ SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞)；重组人肿瘤坏死因子 α (Solarbio)；干扰素- γ (MCE)。

1.2 主要仪器

全波长酶标仪(Thermo Fisher)；NanoDrop One分光光度计(Thermo Scientific)；Cobas[®]z480全自动荧光定量PCR分析仪(Roche)

1.3 方法

1.3.1 主要试剂配制

槐耳清膏溶于高糖DMEM培养基中，配制成100mg/ml溶液，经0.22 μ m滤膜过滤除菌待用，分装至1.5ml EP管中并储存于-20℃，用时提前放4℃融化。

1.3.2 HaCat细胞培养

将HaCat细胞在37℃、5%CO₂条件下，用含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素溶液DMEM(高糖型)中培养。取对数生长期细胞用于后续试验。

1.3.3 RT-qPCR检测槐耳清膏对造模后HaCat细胞中相关炎症因子mRNA的表达

此前我们的实验已证明槐耳清膏对HaCaT细胞IC₅₀值为9.63mg/ml，且在1mg/ml、2mg/ml及4mg/ml浓度条件下，对HaCaT细胞的存活率未产生显著影响，故本次实验继续选择用浓度为1mg/ml、2mg/ml及4mg/ml的槐耳清膏^[5]。将HaCat细胞悬液稀释1.5×10⁶ cell/ml后接种于6孔板中，待细胞贴壁并生长至70~80%密度，将细胞分为5组，分别为NC组(空白对照组)，MC组(炎症模型组)(10ng/ml TNF- α +10ng/ml IFN- γ)，槐耳清膏低浓度组(10ng/ml TNF- α +10ng/ml IFN- γ +1mg/ml槐耳清膏)、槐耳清膏中浓度组(10ng/ml TNF- α +10ng/ml IFN- γ +2mg/ml槐耳清膏)、槐耳清膏高浓度组(10ng/ml TNF- α +10ng/ml IFN- γ +4mg/ml槐耳清膏)，干预24h后，弃上清用PBS润洗2遍，Trizol法提取细胞总RNA，测定浓度后参照说明书进行反转录，然后进行qPCR，引物序列见表1。qPCR方法如下：以1 μ cDNA为模板，GAPDH为内参，反应条件为：变性95℃、3min；变性95℃、5s，退火延伸60℃、30s，40个循环。每个样品3个复孔，取Ct值的平均值，用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算并进行比较。

表1 引物序列

基因名称	正向引物序列(5' → 3')	反向引物序列(5' → 3')
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCGTTTCTCAG
TARC	TCTCTGCGACATCATACGCA	CTGGAGCATCTCAGATGCTCT
MDC	TATCGAACTCTGCTGATAGCC	TTTGACTCTCCAGTGTGCTATTTC

2 结果

2.1 槐耳清膏对TNF- α /IFN- γ 诱导的HaCaT细胞TARC、MDC mRNA的影响

与空白对照组细胞相比，经TNF- α 和IFN- γ 诱导后的HaCaT细胞在mRNA水平上表达的TARC、MDC显著上调(P<0.005)(见图

1)，而与经TNF- α 和IFN- γ 诱导后的HaCaT细胞相比，经低中高浓度槐耳清膏处理后的HaCaT细胞在mRNA水平上表达的TARC、MDC显著下调且具有统计意义(P<0.005)(见图1)。

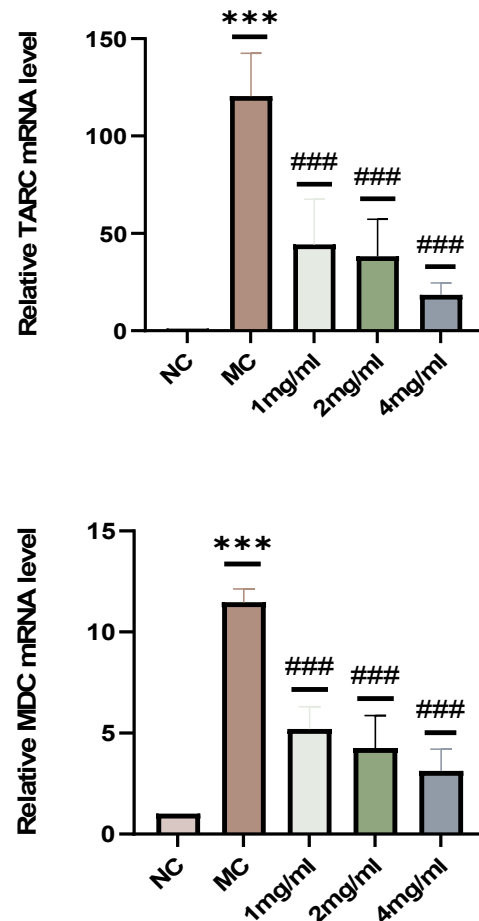


图1 槐耳清膏抑制HaCat细胞中TARC、MDC的表达

注：与NC组对比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001；与MC组对比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

2.2 统计分析

所有实验均重复3次，结果用($\bar{x} \pm S$)表示，采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析。多组均数比较采用单因素方差分析，P<0.05被认为差异具有统计学意义。

3 讨论

特应性皮炎发病机制复杂，普遍认为其与皮肤屏障功能的异常以及Th2型免疫反应的过度活跃存在密切关联。我们先前的实验研究已验证，槐耳清膏能够通过促进丝聚蛋白(filaggrin, FLG)的表达，修复受损的皮肤屏障，进而缓解特应性皮炎的发生与发展^[5]。基于此，本次实验研究将重点聚焦于探讨槐耳清膏的抗炎作用机制。

趋化因子是一类特殊的细胞因子，其主要功能是引导特定类型的白细胞迁移到特定的炎症部位，对免疫和炎症反应至关重要。根据其保守的半胱氨酸残基的不同位置，趋化因子被划分

为CC、C、CXC、CX3C等亚群。TARC和MDC属于CC家族成员,而CCR4是TARC和MDC的特异性受体,它主要在Th2淋巴细胞上表达^[6]。研究显示,TARC和MDC的水平与特应性皮炎患者的病情严重程度呈正相关。随着治疗效果的提升,TARC和MDC的表达水平亦会相应减少,这表明它们可作为评估特应性皮炎风险的生物标志物^[7]。TARC和MDC能够选择性地调节Th2淋巴细胞向炎症区域的移动,导致病患处Th2细胞浸润。因此Th2趋化因子特别是TARC和MDC,在Th2主导的炎症性皮肤病如特应性皮炎的发展中被视为关键介质。

本研究采用了TNF- α 和IFN- γ 来刺激HaCaT细胞,这是一种广泛应用于特应性皮炎研究的体外模型,众多实验已经证实TNF- α 与IFN- γ 联合应用可诱导HaCaT细胞呈现类似AD病理进程的关键分子的特征,如在屏障受损功能方面FLG的低表达,在免疫调控方面可上调IL-1 β 、IL-6等Th2炎症因子及趋化因子,且HaCaT细胞作为人永生化角质形成细胞,其分化特性与人原代角质形成细胞高度一致,故本研究通过TNF- α /IFN- γ 诱导的HaCaT细胞AD模型^[8-10]。本次实验中,观察到TNF- α 和IFN- γ 刺激角质形成细胞后趋化因子TARC、MDC的表达水平显著提高,与其余学者结果一致,表明细胞模型构建成功。随后,使用不同浓度的槐耳清膏进行干预,结果显示TNF- α /IFN- γ 诱导的HaCaT细胞TARC、MDC的表达受到显著抑制,且呈现出一定的浓度依赖性。

综合上述分析,本研究揭示了槐耳可能通过抑制趋化因子TARC、MDC的表达,从而发挥抗炎作用,本研究为槐耳在治疗特应性皮炎方面的应用提供了科学依据。

[参考文献]

- [1]张书琳.槐耳及其复方制剂槐杞黄颗粒的研究进展[J].医学综述,2015,21(1):114-6.
- [2]庄毅.抗癌新药槐耳冲剂的研究[J].中国药理学杂志,1998,(5):273.
- [3]WANG L,YU Z,WEI C,et al.Huai'er aqueous extract protects against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J].Oncotarget,2017,8(20):32937-45.
- [4]孙雯,俞建,时毓民,等.中药槐耳调节哮喘缓解期儿童外周血单个核细胞Th1/Th2平衡的基因及蛋白水平研究[J].中华

中医药杂志,2009,24(7):915-7.

[5]关淇真,段昕所.槐耳清膏对TNF- α /IFN- γ 诱导的HaCaT特应性皮炎细胞模型的保护作用及机制研究[J].亚洲临床医学杂志,2024,7(12).

[6]FUJISAWA T,FUJISAWA R,KATO Y,et al.Presence of high contents of thymus and activation-regulated chemokine in platelets and elevated plasma levels of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine in patients with atopic dermatitis [J].The Journal of allergy and clinical immunology,2002,110(1):139-46.

[7]RENERT-YUVAL Y,THYSSEN J P,BISSONNETTE R,et al.Biomarkers in atopic dermatitis—a review on behalf of the International Eczema Council[J].The Journal of allergy and clinical immunology,2021,147(4):1174-90.e1.

[8]LEE K S,CHUN S Y,LEE M G,et al.The prevention of TNF- α /IFN- γ mixture-induced inflammation in human keratinocyte and atopic dermatitis-like skin lesions in Nc/Nga mice by mineral-balanced deep sea water[J].Biomedicine & pharmacotherapy=Biomedecine & pharmacotherapie,2018,97:1331-40.

[9]PARK J H,AHN E K,KO H J,et al.Korean red ginseng water extract alleviates atopic dermatitis-like inflammatory responses by negative regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in vivo[J].Biomedicine & pharmacotherapy=Biomedecine & pharmacotherapie,2019,117:109066.

[10]LEE J O,JANG Y,PARK A Y,et al.Human Placenta Extract (HPH) Suppresses Inflammatory Responses in TNF- α /IFN- γ -Stimulated HaCaT Cells and a DNCB Atopic Dermatitis (AD)-Like Mouse Model[J].Journal of microbiology and biotechnology,2024,34(10):1969-80.

作者简介:

关淇真(1998--),女,汉族,广东江门人,在读硕士,研究方向:皮肤病与性病学。

*通讯作者:

段昕所(1964--),男,汉族,河北石家庄人,硕士,主任医师,研究方向:皮肤病与性病学。