

Effect and Mechanism of Huaierqinggao on TNF- α /IFN- γ Induced HaCaT Atopic Dermatitis Cell Model

Qizhen Guan Xinsuo Duan

Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

Abstract

Objective: This study aims to explore the effects of Huaierqinggao on the atopic dermatitis model induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) in HaCaT cells and its mechanism of action. **Methods:** By treating normal HaCaT cells with different concentrations of Huaierqinggao, the effect of the extract on the survival rate of HaCaT cells was measured using the CCK-8 method and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of Huaierqinggao on HaCaT cells was calculated. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of related skin structural proteins filaggrin (FLG), loricrin (LOR) mRNA in HaCaT cells after induction by TNF- α /IFN- γ . **Conclusion:** Huaierqinggao may alleviate the degree of inflammation by promoting the recovery of skin barrier function.

Keywords

atopic dermatitis; huaierqinggao; skin barrier

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

关淇真 段昕所

承德医学院附属医院, 中国, 河北 承德 067000

摘要

目的: 本研究旨在探讨槐耳清膏对肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 和干扰素 γ (Interferon- γ , IFN- γ) 诱导的HaCaT细胞特应性皮炎模型的影响及其作用机制。**方法:** 通过CCK-8法测不同浓度槐耳清膏对HaCaT生存率的影响并计算槐耳清膏对HaCaT细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀)。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细胞中相关皮肤结构蛋白丝聚蛋白 (Filaggrin, FLG)、兜甲蛋白 (Loricrin, LOR) mRNA的表达。**结论:** 槐耳清膏可能通过促进皮肤屏障功能的恢复, 从而缓解炎症程度。

关键词

特应性皮炎; 槐耳清膏; 皮肤屏障

1 引言

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD), 亦称为“异位性皮炎”或“遗传过敏性皮炎”, 是一种与遗传过敏体质相关的慢性炎症性皮肤病。其临床表现主要为皮肤瘙痒、多形性皮损、红斑和丘疹。特应性皮炎的发病机制相当复杂, 涉及皮肤屏障功能障碍和免疫系统紊乱。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, 但这些糖皮质激素的外用可能导致局部皮肤萎缩, 并可能增加感染致病微生物的风险。

【基金项目】 河北省科技厅项目《代谢组学筛选差异代谢物对发疹型药疹鉴别诊断研究》(项目编号: 21377714D)。

【作者简介】 关淇真 (1998-), 女, 中国广东江门人, 在读硕士, 从事皮肤病与性病学研究。

槐耳是一种在我国民间广泛应用的重要药用真菌, 槐耳清膏是槐耳的粗提物, 其主要活性成分是槐耳多糖蛋白, 是一种具有高度活性的生物反应调节剂^[1]。槐耳在临床上应用广泛, 主要用于肿瘤相关疾病的治疗^[2]。游佳^[3]等研究证明, 槐耳可以通过纠正失衡的 Th1/Th2 细胞因子网络, 逆转 Th1/Th2 细胞的异常漂移治疗非小细胞肺癌。刘丽媛^[4]等证明了槐杞黄颗粒可以有效缓解特应性皮炎的程度, 但其在皮肤炎症方面的作用机制尚不明确。故而本文通过 TNF- α /IFN- γ 诱导人永生角质形成 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介质表达的影响, 为槐耳在临床上的应用提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 材料

槐耳清膏受赠于启东盖天利公司; 人永生角质形成细胞株 HaCat (购自上海中乔新舟生物科技有限公司);

Cell Counting Kit-8 细胞增殖毒性检测试剂盒（东仁），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）。

2.2 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）。

2.3 方法

2.3.1 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。

2.3.2 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。

2.3.3 CCK8 法测细胞活力

将对数期生长的 HaCat 细胞用胰酶消化离心，将细胞悬液稀释至 1×10^4 cell/mL，接种于 96 孔板中，容量为 100 μ L，在 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中孵育，24h 后细胞生长至占孔 70%~80% 面积，将其分为正常对照组（不加药物干预）、不同浓度槐耳清膏组，浓度分别为 2mg/mL、

4mg/mL、6mg/mL、8mg/mL、10mg/mL，并设置无细胞的空白组，每组设置 3 个复孔。继续于 37℃、5%CO₂ 条件下培养 24h 后，弃上清，加入含 10 μ L CCK8 的 DMEM 溶液 100 μ L，按照说明书要求继续孵育 1.5h。酶标仪于 450nm 处测各孔光密度（optical density, OD）值，并根据光密度值计算细胞存活率，细胞存活率 = (实验组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值) / (正常对照组平均 OD 值 - 空白组平均 OD 值) \times 100%。并根据细胞存活率测定槐耳清膏对 HaCat 的半数抑制浓度（IC₅₀）。

2.3.4 RT-qPCR 检测槐耳清膏对造模后 HaCat 细胞中皮肤结构蛋白 mRNA 的表达

将 HaCat 细胞悬液稀释 1.5×10^5 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 L 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。每个样品做 3 个复孔，反应结束后确认扩增曲线及溶解曲线，取 Ct 值的平均值，再用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达量。

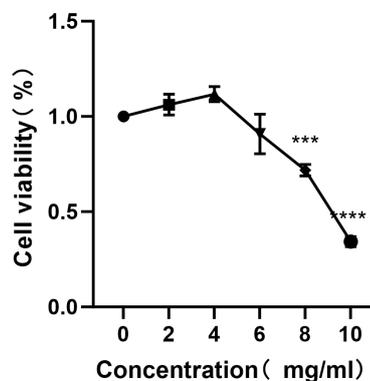
表 1 引物序列

基因名称	正向引物序列 (5' → 3')	反向引物序列 (5' → 3')
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG
FLG	GCTGAAGGAACTTCTGGAAAAGG	GTTGTGGTCTATATCCAAGTGATC
LOR	GGAGTTGGAGGTGTTTTCCA	ACTGGGGTTGGAGGTAGTT

3 结果

3.1 槐耳清膏对 HaCat 细胞生长的影响

用不同浓度（0mg/mL、2mg/mL、4mg/mL、6mg/mL、8mg/mL、10mg/mL）槐耳清膏处理 HaCat 细胞 24h 后，CCK8 检测结果显示，与空白对照组相比，浓度为 2mg/mL、4mg/mL 的槐耳清膏处理 HaCat 细胞 24h 后，HaCat 细胞增殖的存活率有上升趋势，存活率分别为 106.25% 与 111.72%；而浓度为 6mg/mL、8mg/mL、10mg/mL 槐耳清膏处理 HaCat 细胞 24h 增殖的存活率逐步下降且呈浓度依赖。根据所得的浓度 - 抑制率曲线，用 Prism 软件拟合计算各浓度槐耳清膏 24h 对 HaCat 的 IC₅₀ 为 9.63mg/ml，根据该 IC₅₀ 值，将后续实验的槐耳清膏浓度梯度设置为 1mg/mL、2mg/mL、4mg/mL，作用时间为 24h。

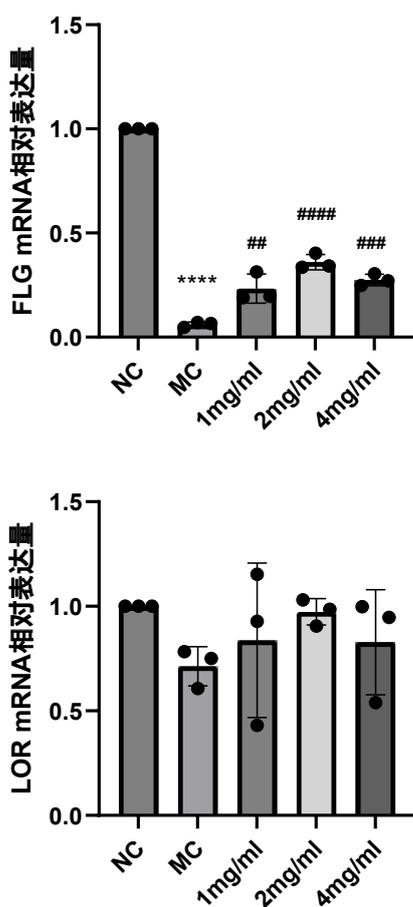


注：与空白对照组比较，***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

图 1 槐耳清膏对 HaCat 细胞 24h 存活率的影响

3.2 槐耳清膏促进编码皮肤屏障相关基因的表达

从图2可见,与正常对照组细胞相比,经TNF- α 和IFN- γ 诱导后的HaCat细胞在mRNA水平上表达的FLG显著下降,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FLG上调,且具有统计学意义($P < 0.05$)。而LOR的mRNA表达水平经TNF- α 和IFN- γ 诱导后有下降趋势,用槐耳清膏处理后有上升趋势,但均无统计学意义。



注:与NC组比较,****: $P < 0.0001$ 。与MC组比较,##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$; ####: $P < 0.0001$ 。

图2 槐耳清膏促进编码皮肤屏障相关基因FLG与LOR的表达

3.3 统计分析

所有实验均重复3次以上,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。

4 讨论

特应性皮炎的发病机制复杂,尽管尚无明确结论,但学界普遍认为其与皮肤屏障功能异常及Th2型免疫反应过

度活跃密切相关。研究发现,编码关键表皮蛋白丝聚蛋白(FLG)的基因突变是特应性皮炎的一个显著且广泛复制的风险因素^[5]。有研究表明,携带FLG基因突变的患者相比未携带者,湿疹和哮喘的发病风险更高^[6]。携带FLG基因突变的患者发病年龄较早,疾病持续至成年期的可能性更大,且更容易出现手掌过度角化、手背皲裂性皮炎,并伴有更高的血清IgE水平^[7]。编码FLG的基因位于染色体1q21的表皮分化复合体内,由三个外显子组成,其初产物前丝聚蛋白是一种不溶于水的多聚蛋白,构成颗粒层透明角质颗粒的主要成分。前丝聚蛋白通过去磷酸化形成FLG,并与角蛋白中间丝相互作用,使其聚集和压缩,最终导致颗粒细胞坍塌成扁平细胞^[8]。同时,在转谷氨酰胺酶(transglutaminase, TG)的催化作用下,前丝聚蛋白与内披蛋白、兜甲蛋白、毛透明蛋白(THH)及一类富含脯氨酸的小蛋白(SPR)广泛连接,形成了不溶性的角质化包膜(cornified envelope, CE),CE的形成是角质形成细胞终末分化的重要标志之一^[9]。FLG在分解过程中进一步脱氨基,转化为吸湿性氨基酸,其终末产物如乳酸、吡咯酮羧酸、尿刊酸、鸟氨酸和瓜氨酸等是天然保湿因子的主要来源^[10]。FLG的缺乏会导致经皮水分散失增加,临床表现为皮肤干燥和鱼鳞状皮肤。

此外,FLG在水解过程中产生的特定氨基酸能够进一步转化为有机酸UCA and PCA。这两种有机酸有助于维持角质层SC的酸性环境,降低细菌粘附蛋白的表达,从而减少金黄色葡萄球菌的定植^[11]。相反,FLG的缺失会导致皮肤屏障功能受损,使得病原体更容易穿透表皮层,并被免疫细胞如树突状细胞、朗格汉斯细胞、巨噬细胞等捕获。

本研究采用了IFN- γ 和TNF- α 来刺激人角质形成细胞,这是一种广泛应用于特应性皮炎研究的体外模型。本研究通过使用不同浓度的槐耳清膏处理HaCat细胞,结果显示皮肤屏障蛋白FLG的表达得到了恢复,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提升丝聚蛋白和外皮蛋白的表达,修复受损的皮肤屏障,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] 庄毅.抗癌新药槐耳冲剂的研究[J].中国药学杂志,1998(5):19-21.
- [2] 李立新,叶胜龙,王艳红,等.槐耳浸膏的实验研究及临床应用进展[J].中国肿瘤,2007(2):110-113.
- [3] 游佳,胡成平,顾其华,等. EGCG和金克槐耳对非小细胞肺癌患者Th1/Th2细胞的免疫调节作用[J].中国肺癌杂志,2009,12(6):543-548.
- [4] 刘丽媛.槐杞黄颗粒治疗特应性皮炎的临床疗效及对血清Th1/Th2细胞因子的影响[D].承德:承德医学院,2022.
- [5] Ke GM, Lutter R, Jakzic S, et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1

- cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(4): 1031-9.e1.
- [6] Marenholz I, Nickel R, Rüschemdorf F, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(4): 866-71.
- [7] Armengot-Carbo M, Hernández-Martín Á, Torrelo A, et al. The role of filaggrin in the skin barrier and disease development[J]. *Actas Dermosifiliogr*, 2015, 106(2): 86-95.
- [8] 程芳,郭勇.皮肤屏障相关基因突变与特异性疾病关系的研究进展[J].*中国皮肤性病学杂志*,2014,28(9):959-962.
- [9] 廖倩,于春水,汪瀚文.皮肤屏障中分化蛋白的研究进展[J].*实用皮肤病学杂志*,2017,10(6):354-356.
- [10] Osawa R, Akiyama M, Shimizu H, et al. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders[J]. *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 2011, 60(1):1-9.
- [11] Armengot-Carbo M, Hernández-Martín Á, Torrelo A, et al. The role of filaggrin in the skin barrier and disease development[J]. *Actas Dermosifiliogr*, 2015,106(2):86-95.