

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000511

IL-31和他克莫司对 HacaT 细胞 NT4 表达的影响

李晓静,王 华

(重庆医科大学附属儿童医院皮肤科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘要】目的:探讨白介素-31(interleukin-31, IL-31)、他克莫司对角质形成细胞神经生长因子-4(neurotrophin-4, NT4)表达的影响。**方法:**培养人角质形成细胞株(HacaT 细胞),采用不同浓度他克莫司作用 24 h,噻唑蓝比色法(MTT 法)检测细胞增殖活性。IL-31、他克莫司单独或共同作用于 HacaT 细胞 24 h 后,采用 real-time PCR 法检测 NT4 mRNA 表达,酶联免疫吸附法(ELISA)分别检测 12、24 h 各组细胞上清液中 NT4 含量。**结果:**低浓度他克莫司(10、100)ng/ml 对细胞活性无明显影响($P>0.05$),高浓度(1 000 ng/ml)时细胞活性受到抑制($P=0.002$)。IL-31 作用 HacaT 细胞后,其 NT4mRNA 表达和上清中 NT4 含量均增加($P<0.05$);100 ng/ml 他克莫司作用 24 h 后他克莫司组和联合作用组细胞 NT4 mRNA 表达量和细胞上清中 NT4 含量均分别低于对照组和 IL-31 组($P<0.05$)。**结论:**IL-31 可促进角质形成细胞 NT4 表达,他克莫司可能通过降低角质形成细胞 NT4 表达水平而发挥其抗瘙痒作用。

【关键词】白介素-31;他克莫司;神经生长因子-4;特应性皮炎**【中图分类号】**R758.23**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-06-05

Effects of IL-31 or tacrolimus on expression of NT4 in human HacaT cells

Li Xiaojing, Wang Hua

(Department of Dermatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of interleukin-31 (IL-31) or tacrolimus on expression of neurotrophin-4 (NT4) in human HacaT cells. **Methods:** Human keratinocyte cell line (HacaT cells) was cultured and treated with different concentrations of tacrolimus and cell proliferation was determined by the MTT assay. Cultured HacaT cells were treated with IL-31 alone or in combination with tacrolimus for 24 h. Real-time PCR was used to detect the mRNA of NT4. Levels of NT4 in the culture supernatant were measured with ELISA. **Results:** Tacrolimus with low concentration (10, 100) ng/ml had mild effect on cell proliferation ($P>0.05$), while that with high concentration (1 000 ng/ml) inhibited cell proliferation ($P=0.002$). Levels of NT4 in the culture supernatant and NT4 mRNA expression were significantly increased in the presence of IL-31. Levels of NT4 in the culture supernatant and NT4mRNA expression were significantly decreased with IL-31 and 100 ng/ml tacrolimus acting alone or in combination for 24 h. **Conclusion:** The expression of NT4 of keratinocyte is up-regulated by IL-31. Tacrolimus might achieve its anti-pruritus effect in atopic dermatitis by decreasing the NT4 expression of keratinocytes.

【Key words】interleukin-31; tacrolimus; neurotrophin-4; atopic dermatitis

瘙痒是特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)最主要的症状,其发生机制复杂,与皮肤感觉神经、组胺、免疫细胞及其细胞因子、神经肽、神经生长因子等相

关^[1]。研究发现白介素-31(interleukin-31, IL-31)、神经生长因子-4(neurotrophin-4, NT4)是与阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)严重程度及瘙痒相关的重要因素,在本课题前期研究中也得到证实^[2]。IL-31 在 AD 中可活化炎症细胞产生细胞因子,同时还可能与神经纤维上 IL-31 受体结合参与瘙痒^[3]。最近 Hawro 等^[4]发现 IL-31 并非直接引起瘙痒,仅作为一种促痒因子。NT4 由角质形成细胞产生,可促进神经纤维延伸,同时它能激活巨噬细胞、肥大细

作者介绍:李晓静, Email: 568877937@qq.com,
研究方向:特应性皮炎。

通信作者:王 华, Email: huawang63@hotmail.com。

基金项目:2010 年中华医学会皮肤病分会—安斯泰来皮肤病学研究
基金资助项目。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150309.0027.008.html>
(2015-03-09)

胞参与皮肤炎症,且在 AD 瘙痒性皮肤病中 NT4 表达明显增加^[5,9]。他克莫司(又名 Fk-506)是一种新型钙调磷酸酶抑制剂,在治疗特应性皮炎中显示出较强的抗炎、抗瘙痒作用。目前他克莫司抗 AD 瘙痒机制尚不完全清楚,可能通过抑制 T 细胞产生瘙痒相关细胞因子、调节瞬时受体电位辣椒素亚型-1 通道和抑制 P 物质产生发挥作用^[6-8]。他克莫司外用于 AD,能使神经纤维数量减少、神经纤维变细,原因可能是他克莫司影响神经营养因子的产生或受体表达有关^[8],但其能否对 NT4 起作用,目前尚无相关报道。本文以 HacaT 细胞为对象,观察 IL-31 和他克莫司对 NT4 的影响,探讨 IL-31 与 NT4 之间的关系和他克莫司作用后可能的调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HacaT 细胞株购自广州吉尼欧生物科技有限公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司,他克莫司、噻唑蓝购自美国 Sigma 公司,重组人 IL-31 购自美国 Peprotech 公司,TRIzol、CDNA 第一链逆转录试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。SYBR Green 购自 TaKaRa 公司,ELISA 试剂盒购自美国 Cusabio 公司,PCR 引物由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HacaT 细胞培养及实验分组 HacaT 细胞用含 10%胎牛血清 1640 培养基在 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养,细胞融合成 80%~90%时传代,调整细胞密度为 2×10^5 个/ml 接种于 25 ml 培养瓶,待 HacaT 细胞融合至 60%~70%时,参照文献^[3],以不同浓度(0、50、100) ng/ml IL-31 对 HacaT 细胞进行干预,37℃孵箱中继续培养 24 h。用 RT-PCR 法检测到 50 ng/ml IL-31 能引起 NT4 表达增高。根据 MTT 试验,确定 100 ng/ml 他克莫司对 HacaT 细胞增殖活性无影响。为了探讨他克莫司对 NT4 表达的影响,对细胞无血清培养 12 h 后,分组如下:①对照组(培养基);②50 ng/ml IL-31 组;③50 ng/ml IL-31、100 ng/ml 他克莫司联合作用组;④100 ng/ml 他克莫司组,孵箱内孵育 24 h。

1.2.2 MTT 法细胞活性检测 取对数生长期细胞以 3 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,待细胞融合至 60%~70%开始干预。对照组为正常培养基+DMSO(浓度小于 0.1%)、他克莫司组(10、100、1 000 ng/ml),共同孵育 20 h 后每孔加入 MTT 20 μ l,37℃孵箱中继续孵育 4 h,吸弃上清后加入 DMSO 150 μ l,摇床上震荡混匀 10 min,于酶标仪 550 nm 读取吸光度(absorbance, A)值,每组设 4 个复孔,PBS 孔调零,实验至少重复 3 次。细胞成活率=(A_{他克莫司组}-A_{空白对照组})/(A_{对照组}-A_{空白对照组}) $\times$ 100%。

1.2.3 Real-time PCR 法检测细胞 NT4mRNA 表达 各组细胞按 TRIzol 试剂说明书提取细胞总 RNA,紫外分光光度计及电泳测定 RNA 纯度和浓度。合格的 RNA 按逆转录说明书予 2 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA 保存于 -20℃冰箱备用。NT4 引物设计为 F:5'-GCTGATAACGCTGAGGAAGGT-3',R:5'-CGCACATAGGACTGCTTGG-3',产物 107 bp。以 GAPDH 做内参,引物设计为 F:5'-ATCAAGAAGGT GGTGAAGCAGGC-3',R:5'-TC AAAGGTGGAGAGTGGGTGTC-3',产物 116 bp。PCR 反应体系共 10 μ l,反应条件:95℃预变性 5 s,95℃变性 30 s,60℃退火 40 s,共 39 个循环。结果采用 2^{- $\Delta\Delta$} 法进行相对基因表达分析。

1.2.4 ELISA 法测定细胞上清中 NT4 含量 HacaT 细胞分组干预后,分别于 12、24 h 后提取细胞上清,离心后冻存于 -70℃冰箱保存。按照说明书操作方法,每个样本设 1 个复孔,在 450 nm 波长下用酶标仪测 A 值,按标准品浓度梯度及相关 A 值绘制标准曲线计算得到各组细胞上清 NT4 含量。

1.3 统计学分析

实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件分析。计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 他克莫司对 HacaT 细胞增殖的影响

不同浓度他克莫司对细胞活性影响有差异见表 1(F 值=6.269, $P=0.017$)。较低浓度他克莫司(10、100 ng/ml)对 HacaT 增殖无明显影响($P>0.05$);当浓度达到 1 000 ng/ml 时细胞活性受到影响,与对照组相比差异有统计学意义($P=0.002$)。因此选择他克莫司 100 ng/ml 浓度用于后续实验。

表 1 不同浓度他克莫司对 HacaT 细胞增殖的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of different concentrations of tacrolimus on HacaT cell proliferation ($n=3, \bar{x} \pm s$)

他克莫司浓度	A _{550nm}	与对照组相比 P 值	细胞活性率(%)	与对照组相比 P 值
10 ng/ml	0.813 3 $\pm$ 0.005 3	0.184	99.278 $\pm$ 0.893	0.329
100 ng/ml	0.810 0 $\pm$ 0.003 8	0.053	98.886 $\pm$ 1.224	0.147
1 000 ng/ml	0.795 5 $\pm$ 0.001 3	0.000	97.109 $\pm$ 0.774	0.003
对照组	0.819 2 $\pm$ 0.007 4	—	100.000 $\pm$ 0.000	—
F 值	12.413	—	6.269	—
P 值	0.002	—	0.017	—

2.2 IL-31 对 HacaT 细胞 NT4 mRNA 表达的影响

用不同浓度(0、50、100) ng/ml IL-31 作用于 HacaT 细胞 24 h。50 ng/ml IL-31 组 NT4 mRNA 表达量高于对照组(1.126 ± 0.188 vs. 1.000 ± 0.000 , $P=0.002$), 100 ng/ml IL-31 组 NT4 mRNA 表达量明显高于与对照组(1.381 ± 0.637 vs. 1.000 ± 0.000 , $P=0.000$)。用不同浓度 50 ng/ml、100 ng/ml IL-31 作用于 HacaT 细胞 24 h, 差异均有统计学意义($n=4$, $F=103.236$, $P=0.000$)。

2.3 IL-31 和他克莫司单独或联合作用对 NT4 mRNA 表达的影响

各组 HacaT 细胞作用 24 h 后, NT4 mRNA 相对表达量均有差异($F=51.109$, $P=0.000$)见表 2。IL-31 组 NT4 mRNA 表达高于对照组($P=0.036$), IL-31 组细胞 NT4 mRNA 表达量是联合作用组的 1.84 倍($P=0.001$), 对照组 NT4 mRNA 表达量是他克莫司组的 1.62 倍($P=0.042$), 而他克莫司组与联合作用的 NT4 表达差异不明显($P=0.655$)。

表 2 IL-31、他克莫司单独或联合作用 HacaT 细胞 24 h 细胞 NT4 mRNA 表达量和细胞上清 NT4 含量 (pg/ml) ($n=4$)

Tab.2 Level of NT4 in the culture supernatant and NT4 mRNA expression with IL-31 and tacrolimus acting alone or in combination for 24 h (pg/ml) ($n=4$)

分组	NT4 mRNA 表达量 (24 h)	细胞上清 NT4 含量 (pg/ml)	
		12 h	24 h
对照组	1.00 ± 0.00	1023.80 ± 61.79	1237.66 ± 67.06
IL-31 组	1.35 ± 0.10	1172.40 ± 73.75	1324.48 ± 28.42
IL-31+FK-506 组	0.74 ± 0.09	1063.10 ± 32.45	1163.84 ± 64.19
Fk506 组	0.62 ± 0.12	1000.10 ± 153.78	1043.25 ± 46.54
F 值	51.109	2.739	19.582
P 值	0.000	0.090	0.000

2.4 各组细胞上清 NT4 含量

各组细胞上清 NT4 含量如表 2 所示。无任何干预条件下 HacaT 细胞可以分泌一定量的 NT4。12 h 时各组结果经统计分析结果 $F=2.739$, $P=0.09$, 提示各组细胞上清 NT4 含量无差异。作用 24 h 后, IL-31 组细胞上清 NT4 含量与对照组相比明显升高($P=0.042$), 联合作用组 NT4 含量明显低于 IL-31 组($P=0.001$), 他克莫司组 NT4 含量明显低于正常组($P=0.000$)。作用 24 h 后, 差异均有统计学意义($F=19.582$, $P=0.000$)。

3 讨 论

瘙痒是 AD 的重要特征。搔抓行为不仅损伤皮肤屏障、增加微生物定植, 而且还直接启动损伤机制, 导致炎性细胞因子的释放。更有学者认为瘙痒是判断 AD 严重程度比炎症更重要的指标。已有大量研究证实 IL-31、NT4 与 AD 瘙痒相关^[2,4,9]。Krimm 等^[9]研究发现过度表达 NT4 小鼠的皮肤有髓神经纤

维数量增加, NT4 受体酪氨酸激酶受体 B (TrkB) 在人触觉小体、突触均有表达^[10], 在本课题前期实验中也发现神经纤维上 TrkB 受体呈阳性表达, 同时过度表达 NT4 小鼠三叉神经节和背根神经节的 TrkB 受体明显增加^[9], 以上提示 NT4 可能通过与神经纤维、突触上 TrkB 受体结合参与瘙痒。IL-31 是活化的 Th2 来源的细胞因子, 需要与其受体 IL-31RA 和抑瘤素 M 偶联形成功能受体复合物结合才能发挥作用^[11]。本实验中无任何干预条件下 HacaT 细胞能分泌一定量的 NT4, 同时 IL-31 作用 HacaT 细胞后, 细胞 NT4 mRNA 表达和上清 NT4 含量均增加。提示 IL-31 可能与 HacaT 细胞上 IL-31 受体功能复合物结合影响 HacaT 细胞功能, 促进 NT4 表达, IL-31 可能通过 NT4 途径参与瘙痒。

他克莫司是一种新型的免疫抑制剂, 在本实验中显示较高浓度的他克莫司对 HacaT 细胞增殖有一定抑制作用。100 ng/ml 他克莫司作用 12 h 时, 各组 NT4 含量无差异; 作用 24 h 后, 联合作用组和他克莫司组 HacaT 细胞 NT4 mRNA 的表达和细胞上清 NT4 含量均分别低于 IL-31 组和对照组。这与 Pereira 等^[6]用他克莫司干预体外共培养培养角质形成细胞和神经元细胞观察到的结果类似。本实验中利用外源性 IL-31 作用于 HacaT 细胞, 他克莫司能起到拮抗 IL-31 促进 NT4 表达的作用, 但是否通过影响 HacaT 细胞 IL-31 受体表达或受体复合物的功能抑制 NT4 分泌, 目前尚不清楚, 有待进一步证实。本实验中他克莫司可能降低无任何干预条件下的角质形成细胞 NT4 的表达和分泌, 因此推断他克莫司可能直接作用于 HacaT 细胞发挥抑制分泌作用降低 NT4 含量。NT4 作为连接皮肤神经-免疫系统中的桥梁, 参与 AD 炎症和瘙痒, 他克莫司可能通过减少角质形成细胞 NT4 表达而发挥其抗瘙痒作用。

参 考 文 献

- [1] Buddenkotte J, Steinhoff M. Athophysiology and therapy of pruritus in allergic and atopic diseases[J]. Allergy, 2010, 65(7): 805-821.
- [2] 向娟, 王华, 肖异珠, 等. IL-31 在特应性皮炎中的表达及与瘙痒关系的机制研究[J]. 现代免疫学, 2008, 28(6): 487-490.
- [3] Kasraie S, Niebuhr M, Baumert K, et al. Functional effects of Interleukin 31 in human primary keratinocytes[J]. Allergy, 2011, 66(7): 845-852.
- [4] Hawro T, Saluja R, Weller K, et al. Interleukin 31 does not induce immediate itch in atopic dermatitis patients and healthy controls after skin challenge[J]. Allergy, 2014, 69(1): 113-117.