

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001912

PGRN 缺陷抑制 IMQ 诱导小鼠皮肤炎症组织的自噬和凋亡

郑 维, 谢巍伟, 胡 勤, 刘 敏, 罗 瑞, 郭风劲

(重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室、发育生物学与模式动物平台, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨颗粒蛋白前体(progranulin, PGRN)缺陷型小鼠与野生(wild type, WT)型小鼠在咪喹莫特(Imiquimod, IMQ)诱导皮肤炎症模型中炎症及自噬的差异性。**方法:**运用 IMQ 涂抹 WT(44 只)和 PGRN^{-/-}(16 只)小鼠背部皮肤构建银屑病样皮肤炎症模型,并通过蛋白质印迹(Western blot)、定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)、苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色等方法检测小鼠组织结构、炎症因子[白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)、环氧合酶 2(cyclo-oxygenase 2, COX2)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)]、凋亡相关蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteine aspartate specific proteinase 3, Caspase 3)]以及自噬相关蛋白[微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、泛素结合蛋白(ubiquitin binding protein, P62)、自噬相关蛋白 5(autophagy related protein 5, ATG5)、自噬相关蛋白 7(autophagy related protein 7, ATG7)、自噬相关蛋白 5 和 12 的复合物(complex of autophagy related protein 5 and 12, ATG5-ATG12)]的变化。**结果:**成功建立了小鼠皮肤炎症模型,在 WT 小鼠模型中观察到上皮组织明显增厚,炎症细胞浸润增多,血管生成增加,炎症因子 IL-6、IL-10、TNF-α、NOS2、COX2 在第 6 天表达最高($P<0.05$),自噬随着时间的增加而增加;此外,第 6 天脾脏比重明显增加($P<0.05$),炎症因子 IL-6、IL-10、TNF-α、NOS2、COX2、IL-1β 表达最高($P<0.05$)。与 WT 模型小鼠相比, PGRN^{-/-}模型小鼠背部皮肤加厚更加明显,炎症因子 IL-6、NOS2 表达更高($P<0.05$),组织自噬与凋亡水平明显降低($P<0.05$)。**结论:**WT 小鼠和 PGRN^{-/-}小鼠都能够第 6 天成功建立小鼠皮肤炎症模型;与 WT 小鼠皮肤炎症模型相比, PGRN^{-/-}小鼠加重了皮肤炎症模型症状,这一过程可能与 PGRN 缺陷阻碍了自噬的产生有关。

【关键词】咪喹莫特;颗粒蛋白前体;自噬;炎症;凋亡**【中图分类号】**R-332**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-06-05

PGRN deficiency inhibits autophagy and apoptosis of skin tissues in mice with IMQ-induced dermatitis

Zheng Wei, Xie Weiwei, Hu Qin, Liu Min, Luo Rui, Guo Fengjin

(Department of Cell Biology and Genetics, Basic Medical Science of Chongqing Medical University, Core Facility of Development Biology)

【Abstract】Objective: To investigate the differences in inflammation and autophagy in imiquimod(IMQ)-induced dermatitis model between progranulin-deficient(PGRN^{-/-}) mice and wild-type(WT) mice. **Methods:** The psoriasis-like dermatitis model was established by smearing the back skin of mice(44 WT mice and 16 PGRN^{-/-} mice) with IMQ. Western blot, quantitative polymerase chain reaction(qPCR), hematoxylin and eosin(HE) staining were used to detect the changes in the tissue structure, inflammatory factors[(interleukin-6, IL-6), (interleukin-10, IL-10), (tumor necrosis factor-α, TNF-α), (nitric oxide synthase 2, NOS2), (cyclo-oxygenase 2, COX2), (interleukin-1β, IL-1β)], apoptosis-related protein(cysteine aspartate specific proteinase 3, Caspase3) and autophagy-related proteins[(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3), (ubiquitin binding protein, P62), (autophagy related protein 5, ATG5), (autophagy related protein 7, ATG7), (complex of autophagy related protein 5 and 12, ATG5-ATG12)] of the mice. **Results:** The mouse model of psoriasis-like dermatitis was successfully established. Significant thickening of epithelial tissues, increased infiltration of inflammatory cells, and more angiogenesis were observed in the WT mouse model, with the highest expression levels of IL-6, IL-10, TNF-α, NOS2, and COX2 observed on the sixth day($P<0.05$), and autophagy increased with time. In addition, the proportion of spleen increased significantly on the sixth day($P<0.05$), and the expression levels of inflammatory factors IL-6, IL-10, TNF-α, NOS2, COX2, and IL-1β were highest($P<0.05$). Compared with the WT mouse model, the PGRN^{-/-} mouse model showed more significant thickening of the back skin, higher expression levels of inflammatory factors IL-6 and NOS2($P<0.05$), and significantly reduced levels of autophagy and apoptosis($P<0.05$). **Conclusion:** The dermatitis model is successfully established

作者介绍: 郑 维, Email: 1053672356@qq.com,

研究方向: 发育遗传学。

通信作者: 郭风劲, Email: guo.fengjin@gmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81672209)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0912.020.html>

(2018-11-06)

Conclusion: The dermatitis model is successfully established

both in the WT mice and the PGRN^{-/-} mice on the sixth day. The symptoms are more severe in the PGRN^{-/-} mouse model than in the WT mouse model, which may be related to PGRN deficiency due to its role in impeding autophagy.

【Key words】imiquimod; progranulin; autophagy; inflammation; apoptosis

银屑病是一种常见的慢性免疫介导性炎症疾病,人群总体流行率为 2%~3%^[1],是由免疫细胞、细胞因子和皮肤细胞不正常的相互作用产生的一种经典的 I 型自身免疫性疾病^[2-4]。临床表现为患者皮肤患处出现红斑、银白色鳞屑、点状出血^[5]。目前的治疗方案主要是缓和剂,包括皮质类固醇药物涂抹、紫外线疗法以及免疫调节疗法^[6]。银屑病的主要组织学特征是表皮增生与失调性角化细胞分化,显著的炎性细胞浸润和血管生成,但其具体机制仍待研究。IMQ 是一种 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 激发先天免疫反应的激动剂,局部应用在老鼠皮肤上会导致皮肤炎症和白细胞大量流入和表皮增生,类似人类银屑病的病变^[7-8],因此 IMQ 诱导的小鼠皮肤炎症模型被用作一种人类银屑病的动物模型^[9]。

PGRN 由基因 GRN 编码,位于染色体 17q21.32,是一个自分泌的多功能新型生长因子,在各种生理功能中起着至关重要的作用^[10]。有研究已经确定 PGRN 为亲和性抗炎蛋白,其能在影响伤口修复、中枢神经系统关节炎、急性缺血-再灌注损伤和银屑病中发挥抗炎作用^[11-15]。因此 PGRN 的抗炎作用也日益引起人们关注。

为了进一步探讨 PGRN 对银屑病的抗炎机制,本研究分别构建 WT 小鼠和 PGRN^{-/-}小鼠的皮肤炎症模型,进而探讨 PGRN^{-/-}小鼠皮肤炎症模型中自噬与炎症的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用 6~8 周龄 C57BL/6 背景的 WT 和 PGRN^{-/-}型小鼠 60 只 (WT:44 只, PGRN^{-/-}:16 只),体质量 18 g 左右,于重庆医科大学动物实验中心 SPF 清洁级动物饲养中心饲养,12 h 昼夜节律,可自由饮水和取食 (试验动物合格证书编号:0005164)。

1.1.2 主要试剂 IMQ (四川明欣药业公司;H20030129);总 RNA 提取试剂盒 (Bio Teke 公司);RT-PCR 试剂盒 (Takara 公司);蛋白裂解液 RIPA (碧云天公司);蛋白 Marker (Thermo fisher 公司);Immobilon®-P Transfer Membrane (Millipore 公司);兔抗 ATG5、LC3 抗体 (NOVUS 公司);兔抗 actin 抗体 (Biodragon 公司);兔抗 Cleaved Caspase-3 抗体 (CST 公司);

鼠抗 P62 抗体 (Proteintech 公司);兔抗 ATG7 抗体 (Affinity 公司);HRP 标记的二抗 (博士德公司);脱脂奶粉 (完达山);ECL 化学发光液 (碧云天);苏木素 (Solarbio);伊红 (Solarbio);Leica 徕卡显微镜 (德国)。

1.2 方法

1.2.1 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症模型 先取 28 只 WT 型小鼠,其背部剃毛后,棉签取 (62.5 mg, 5%) IMQ 药物随机均匀涂抹在小鼠背部^[16],持续涂抹 0 d (7 只)、3 d (7 只)、6 d (7 只) 和 9 d (7 只),其中在涂抹药的过程中可观察到小鼠背部皮肤厚度增加,红斑形成,皮屑加重等各种皮肤炎症状,说明建模成功;之后用乙醚深度麻醉窒息后处死,放入 75% 酒精中 2~3 min,剪取小鼠背部病变组织,分别用于蛋白、RNA 的提取及组织标本蜡块制作,检测小鼠组织结构、炎症以及自噬的变化。选择出最佳造模时间为 6 d,运用相同的方法同时涂抹 WT 和 PGRN^{-/-}小鼠背部皮肤 0 d (WT:8 只, PGRN^{-/-}:8 只) 和 6 d (WT:8 只, PGRN^{-/-}:8 只),之后检测各样本炎症和自噬的变化。实验过程中无小鼠死亡,且实验至少重复 3 次。

1.2.2 qPCR 检测各炎性因子的 mRNA 水平 在盛有液氮的研钵中研磨收集的小鼠皮肤,直到肉眼不可见组织块;加入 1 mL 裂解液裂解 5 min, 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min;之后加入 200 μL 氯仿,震荡 30 s,静置 3 min;之后按说明书提取各组的总 RNA,然后及时逆转录为 cDNA;最后进行 qPCR 反应。其中,IL-6 的上下游引物分别是 5'-CTGCAAGAG-ACTTCCATCCAG-3' 和 5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTT-GG-3';IL-10 的上下游引物分别是 5'-AACATACTGCTAA-CCGACTC-3' 和 5'-TGGCCTTGTAAGACACCTT-3';IL-1β 的上下游引物分别是 5'-CTCGTGCTGTCGACCCAT-3' 和 5'-CAGGCTTGCTGCTCTGCTTGTGA-3';TNF-α 的上下游引物分别是 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAG-3' 和 5'-GGGAGTAG-ACAAGGTACAACCC-3';NOS2 的上下游引物分别是 5'-ACATCGACCCGTCCACAGTAT-3' 和 5'-CAGAGGGGTAG-GCTTGCTC-3';COX2 的上下游引物分别是 5'-TGTGACT-GTACCCGGACTGG-3' 和 5'-TGCACATTGTAAGTAGGTGG-AC-3';内参 GAPDH 的上下游引物分别是 5'-AGGTCGGTG-TGAACGGATTG-3' 和 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。

1.2.3 Western blot 检测各相关蛋白的蛋白水平 在盛有液氮的研钵中研磨收集的小鼠皮肤,直到肉眼不可见组织块;加入 1 mL 蛋白裂解液 RIPA (1:100 比例加入蛋白酶抑制剂);收集组织及裂解液,组织匀浆器匀浆 3 次,每次 20 s,之后 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min;之后按操作提取各组的总蛋白,然后检测相关蛋白的表达情况。

1.2.4 组织处理 分离小鼠的背部皮肤,以 1:10 的比例浸泡于 4% 的多聚甲醛中,固定 1 d;之后洗去多聚甲醛,清洗皮肤后浸泡于 70% 酒精中,进行石蜡包埋、切片。

1.2.5 组织切片 HE 染色 其染色步骤如下:切片置于 65 ℃ 烘箱中烘烤 2 h,之后浸泡于二甲苯(I、II)各 20 min;于 100%、90%、80%、70%乙醇溶液及自来水中各浸泡切片 5 min;苏木精液染色 10 min,自来水冲洗 3 次;1%盐酸乙醇浸泡 2~10 s,自来水冲洗 10~30 s;0.5%伊红染色 1~3 min,自来水冲洗 3 s;80%乙醇浸泡 3 s,95%乙醇浸泡 3 s,无水乙醇浸泡 5 min 脱水处理,二甲苯(I、II)各浸泡 3 min;中性树脂封片。

1.3 统计学分析

运用 GraphPad Prism 5 统计分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间样本比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 分析;两因素影响的样本采用析因设计分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IMQ 诱导银屑病样皮肤炎症的组织结构变化

本研究分别取 WT 小鼠以 0、3、6、9 d 4 个时间点建立 IMQ 模型,之后收取小鼠背部皮肤,经石蜡包埋后组织切片,进行 HE 染色,显微镜下观察,图 1 显示随着时间增加表皮增厚,炎性细胞浸润增多,且在第 6 天最严重。此外,随着时间的增加,腺体和血管生成增加。

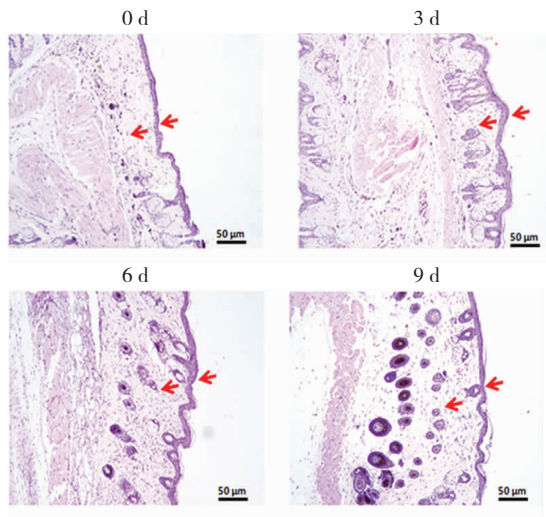
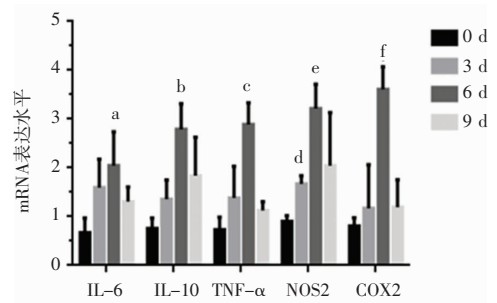


图 1 IMQ 诱导的 WT 小鼠银屑病样皮肤炎症组织 HE 染色

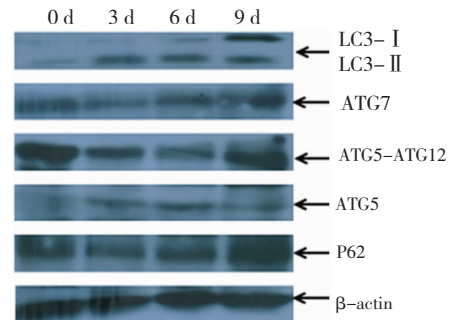
2.2 IMQ 诱导银屑病样皮肤炎症促进了自噬以及炎症因子的表达

本研究将 WT 小鼠不同时间点皮肤炎症模型中的皮肤组织提取 RNA 及蛋白进行 qPCR 和 Western blot 检测分析。表 1 所示为皮肤不同时间点各炎症因子的表达情况;图 2A 显示,随着时间的延长,炎症因子 IL-6($F=3.943, P=0.054$)、IL-10($F=8.008, P=0.009$)、TNF- α ($F=14.980, P=0.001$)、NOS2($F=7.585, P=0.010$)、COX2($F=14.620, P=0.001$)的表达增加,在第 6 天时达到最高,随后降低。而 Western blot 分析可知,自噬相关蛋白 LC3、ATG7、ATG5-ATG12 的表达是逐渐增加的,ATG5 第 9 天表达开始降低(图 2B)。



a: 与 0 d 比较, $P=0.035$; b: 与 0 d 比较, $P=0.003$; c: 与 0 d 比较, $P=0.002$; d: 与 0 d 比较, $P=0.003$; e: 与 0 d 比较, $P=0.001$; f: 与 0 d 比较, $P=0.001$

A. qPCR 检测皮肤炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 、NOS2、COX2 不同时间点的 mRNA 水平($\bar{x} \pm s, n=3$)



B. Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3、ATG7、ATG5-ATG12、ATG5、P62 的蛋白水平

图 2 WT 小鼠皮肤炎症模型中不同时间点炎症因子及自噬的表达情况

表 1 WT 小鼠皮肤不同时间点炎症因子的数值($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IL-6	IL-10	TNF- α	NOS2	COX2
0 d 组	0.670 ± 0.297	0.760 ± 0.215	0.736 ± 0.256	0.900 ± 0.119	0.807 ± 0.170
3 d 组	1.594 ± 0.585	1.357 ± 0.397	1.386 ± 0.646	1.668 ± 0.171 ^d	1.172 ± 0.894
6 d 组	2.044 ± 0.694 ^a	2.788 ± 0.524 ^b	2.891 ± 0.445 ^c	3.216 ± 0.498 ^e	3.608 ± 0.467 ^f
9 d 组	1.306 ± 0.304	1.839 ± 0.789	1.129 ± 0.176	2.048 ± 1.087	1.199 ± 0.559
F 值	3.943	8.008	14.980	7.585	14.620
P 值	0.054	0.009	0.001	0.010	0.001

注: a, 与 0 d 比较, $P=0.035$; b: 与 0 d 比较, $P=0.003$; c: 与 0 d 比较, $P=0.002$; d: 与 0 d 比较, $P=0.003$; e: 与 0 d 比较, $P=0.001$; f: 与 0 d 比较, $P=0.001$

同时本研究发现作为小鼠的免疫器官之一的脾脏也发生了变化。表 2 所示为不同时间点脾脏与小鼠体质量的比值情况,表 3 所示为脾脏不同时间点各炎症因子的表达情况;图 3A 显示脾脏逐渐增大,第 6 天最明显,其与小鼠的比重也增加(图 3B)。将脾脏提取 RNA 进行 qPCR 分析,发现与皮肤结果一样,炎症因子 IL-6 ($F=27.070, P=0.000$)、IL-10 ($F=88.970, P=0.000$)、TNF- α ($F=25.190, P=0.000$)、NOS2 ($F=18.400, P=0.001$)、COX2 ($F=9.227, P=0.006$)、IL-1 β ($F=144.000, P=0.000$) 的 mRNA 表达增加,第 6 天最明显,而且比皮肤更显著(图 3C)。说明在 IMQ 诱导的 WT 小鼠皮肤炎症模型中,炎症因子表达上调,自噬相关蛋白表达增加,自噬激活。

表 2 WT 小鼠皮肤炎症模型中不同时间点脾脏与小鼠体质量的比值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	脾脏重量比值
0 d 组	0.005 $\pm$ 0.000
3 d 组	0.009 $\pm$ 0.000 ^a
6 d 组	0.011 $\pm$ 0.001 ^b
9 d 组	0.006 $\pm$ 0.000 ^c
F 值	35.630
P 值	0.000

注:a,与 0 d 比较, $P=0.002$;b:与 0 d 比较, $P=0.001$;c:与 0 d 比较, $P=0.025$

2.3 WT 小鼠和 PGRN^{-/-}小鼠的皮肤炎症模型组织结构变化

本研究选择模型建立第 6 天为标准,分别建立了 0 d 和 6 d 的 WT 和 PGRN^{-/-}小鼠皮肤炎症模型,其中第 0 天为 Control 组,第 6 天为 IMQ 组。组织切片 HE 染色结果显示,与 WT 组相比,PGRN^{-/-}组表皮厚度,炎症细胞浸润程度、腺体和血管生成都更加严重,说明 PGRN^{-/-}鼠皮肤炎症症状更加严重,PGRN 缺陷将加重 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症的发生和发展。

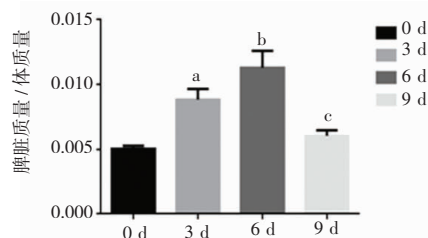
2.4 WT 小鼠和 PGRN^{-/-}小鼠皮肤炎症模型中炎症因子、自噬与凋亡的表达情况

本研究将第 0 和 6 天的皮肤组织进行 qPCR 和 Western blot 分析。表 4 所示为 WT 和 PGRN^{-/-}小鼠皮肤各炎症因子的表达情况;图 5A 显示,与 IMQ 未诱导组相比,第 6 天 WT 和 PGRN^{-/-}小鼠模型组中炎症因子 IL-6 ($F=4.062, P=0.079$)、IL-10 ($F=0.020, P=0.890$)、NOS2 ($F=1.055, P=0.334$)、COX2 ($F=24.770, P=0.001$) 的表达均增加;此外,与 IMQ 诱导的 WT 小鼠皮肤炎症相比,IMQ 诱导的 PGRN^{-/-}鼠中 IL-6 ($F=26.490, P=0.001$)、NOS2 ($F=13.680, P=0.006$) 的表达量增高,IL-10 ($F=$

4.967, $P=0.056$)、COX2 ($F=25.660, P=0.001$) 的表达降低;说明 PGRN 缺陷导致炎症症状的加重。Western blot 结果可知,IMQ 诱导的 WT 小鼠皮肤炎症组与 IMQ 未诱导组相比自噬相关蛋白 LC3 表达增加,凋亡相关蛋白 Caspase3 表达增加;IMQ 诱导的 PGRN^{-/-}鼠皮肤炎症组与 IMQ 未诱导组相比自噬相关蛋白 LC3 和 P62 表达没有很大变化,凋亡相关蛋白 Caspase3 表达减少。提示 WT 小鼠 IMQ 诱导皮肤炎症后,自噬可以增强和激活,凋亡也可以增强;而 PGRN^{-/-}小鼠中,IMQ 诱导皮肤炎症后,自噬不能激活,凋亡有所下降(图 5B)。

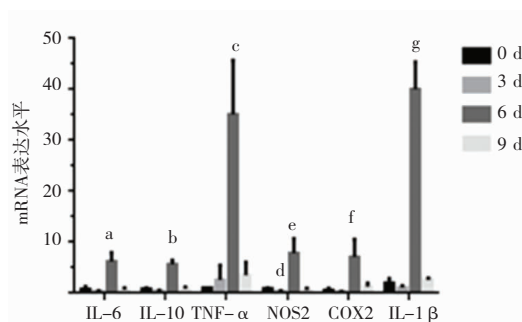


A. 不同时间点脾脏的大小



a:与 0d 比较, $P=0.002$;b:与 0d 比较, $P=0.001$;c:与 0d 比较, $P=0.025$

B. 不同时间点脾脏比重情况分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



a:与 0 d 比较, $P=0.007$;b:与 0 d 比较, $P=0.001$;c:与 0 d 比较, $P=0.005$;d:与 0 d 比较, $P=0.002$;e:与 0 d 比较, $P=0.014$;f:与 0 d 比较, $P=0.035$;g:与 0 d 比较, $P=0.000$

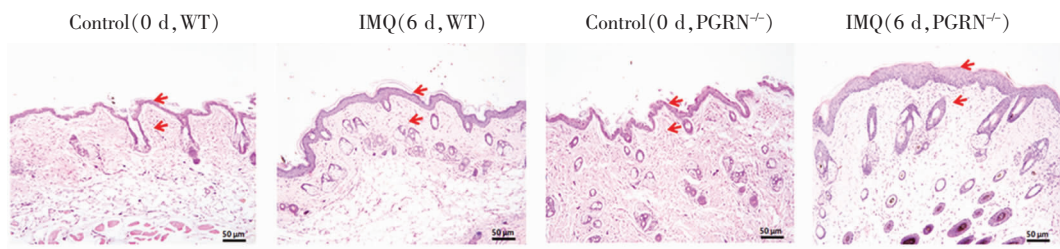
C. qPCR 检测脾脏中炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 、NOS2、COX2、IL-1 β 不同时间点的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

图 3 WT 小鼠皮肤炎症模型中不同时间点脾脏比重及炎症因子的表达情况

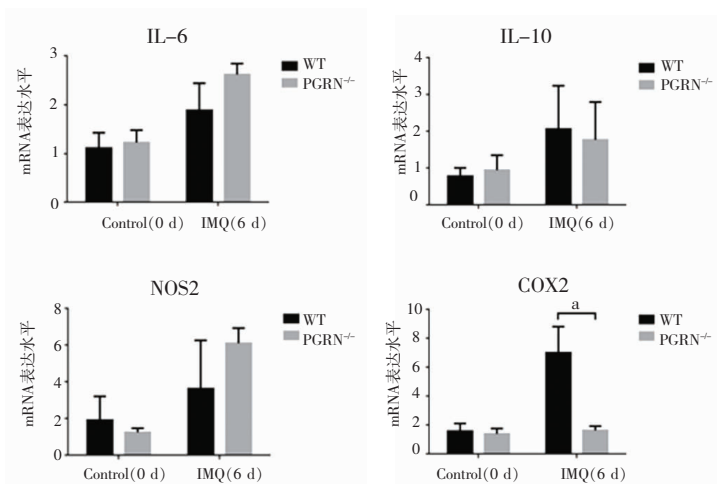
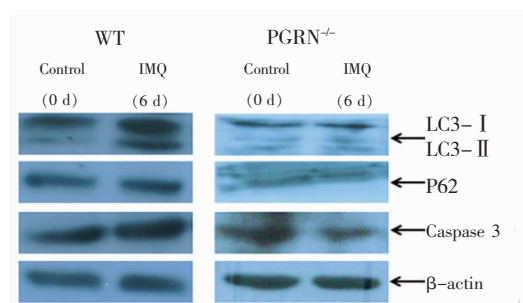
表 3 WT 小鼠脾脏不同时间点炎症因子的数值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IL-6	IL-10	TNF- α	NOS2	COX2	IL-1 β
0 d 组	0.790 $\pm$ 0.559	0.810 $\pm$ 0.211	1.009 $\pm$ 0.023	0.895 $\pm$ 0.108	0.622 $\pm$ 0.330	1.931 $\pm$ 0.966
3 d 组	0.396 $\pm$ 0.040	0.428 $\pm$ 0.150	2.543 $\pm$ 2.874	0.378 $\pm$ 0.072 ^d	0.301 $\pm$ 0.049	1.044 $\pm$ 0.426
6 d 组	6.214 $\pm$ 1.751 ^a	5.648 $\pm$ 0.829 ^b	35.070 $\pm$ 10.640 ^c	7.839 $\pm$ 2.882 ^e	7.055 $\pm$ 3.547 ^f	40.019 $\pm$ 5.397 ^g
9 d 组	0.906 $\pm$ 0.116	0.973 $\pm$ 0.258	3.522 $\pm$ 2.547	0.837 $\pm$ 0.126	1.254 $\pm$ 0.734	2.770 $\pm$ 0.221
F 值	27.070	88.970	25.190	18.400	9.227	144.000
P 值	0.000	0.000	0.000	0.001	0.006	0.000

注:a,与 0 d 比较, $P=0.007$;b:与 0 d 比较, $P=0.001$;c:与 0 d 比较, $P=0.005$;d:与 0 d 比较, $P=0.002$;e:与 0 d 比较, $P=0.014$;f:与 0 d 比较, $P=0.035$;g:与 0 d 比较, $P=0.000$

图 4 第 0 和 6 天 WT 与 PGRN^{-/-} 小鼠银屑病样皮肤炎症组织的 HE 染色表 4 WT 和 PGRN^{-/-} 小鼠皮肤炎症因子的数值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IL-6		IL-10		NOS2		COX2	
	WT	PGRN ^{-/-}	WT	PGRN ^{-/-}	WT	PGRN ^{-/-}	WT	PGRN ^{-/-}
Control (0 d) 组	1.117 ± 0.316	1.229 ± 0.256	0.785 ± 0.227	0.946 ± 0.412	1.922 ± 1.301	1.260 ± 0.225	1.594 ± 0.532	1.407 ± 0.368
IMQ (6 d) 组	1.886 ± 0.559	2.621 ± 0.227	2.066 ± 1.181	1.770 ± 1.031	3.629 ± 2.647	6.113 ± 0.828	7.024 ± 1.802	1.643 ± 0.297 ^a
基因组别 (<i>F/P</i> 值)	26.490/0.001		4.967/0.056		13.680/0.006		25.660/0.001	
模型组别 (<i>F/P</i> 值)	4.062/0.079		0.020/0.890		1.055/0.334		24.770/0.001	
交互作用 (<i>F/P</i> 值)	2.200/0.176		0.235/0.641		3.149/0.114		21.570/0.002	

注:a, 与 IMQ (WT) 比较, $P=0.007$ 注:a, 与 IMQ (WT) 比较, $P=0.007$ A. qPCR 检测 WT 和 PGRN^{-/-} 小鼠皮肤炎症因子 IL-6、IL-10、NOS2、COX2 的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)B. Western blot 检测 WT 和 PGRN^{-/-} 小鼠皮肤中自噬相关蛋白 LC3、P62 和凋亡相关蛋白 Caspase 3 的蛋白水平图 5 第 0 和 6 天 WT 和 PGRN^{-/-} 小鼠炎症因子、自噬及凋亡蛋白的表达情况

3 讨论

PGRN能在表皮中表达,参与皮肤修复和一些皮肤病。研究发现,PGRN作为TNF受体(TNFR)的新配体,通过与TNF- α 竞争结合阻止TNF- α 介导的信号通路,从而起到抗炎的作用;当PGRN缺失时,TNF- α 功能将不再受到抑制,从而发生炎症疾病^[17]。此外,PGRN在自身免疫性疾病如类风湿关节炎进程中也发挥了关键作用,PGRN敲除鼠来源的骨髓巨噬细胞经LPS诱导后会释放更多的炎症因子^[18]。有研究表明银屑病的血清PGRN水平和组织

PGRN表达明显升高^[19-20]。但是,对PGRN在银屑病炎症反应中的确切抗炎机制知之甚少。最近的研究报道发现,自噬在角质层细胞中能够调控负炎症因子的分泌,而且在HaCaT细胞中,过表达PGRN能够促进自噬的表达^[21]。自噬是一种主要的细胞内降解过程,当自噬被激活时,首先形成的自噬泡吞噬受损物质从而将其隔离在双层膜内,并通过与溶酶体的囊泡融合最终被溶酶体酶降解,参与许多不同的细胞内过程,例如病原体清除、抗原呈递、细胞凋亡和炎症^[22]。因此,本实验主要探讨了PGRN对银屑病的抗炎机制是否与自噬存在一定关系。

本研究成功构建了IMQ诱导的WT小鼠皮肤

炎症模型,发现 IMQ 引起的银屑病模型是不稳定的。在这个皮肤炎症模型中,表皮组织随时间增厚,炎症细胞浸润增多,且在第 6 天最严重。此外,自噬相关蛋白的表达逐渐增加,炎症因子的表达水平在第 6 天最高。同时小鼠免疫器官脾脏在第 6 天的比重最大,其炎症因子的表达情况同皮肤组织的趋势一致,在 IMQ 诱导的 WT 小鼠皮肤炎症模型中,炎症因子表达上调,自噬相关蛋白表达增加,自噬激活。本研究采用同样的方法,在 PGRN^{-/-}和 WT 小鼠中成功构建了 IMQ 诱导的银屑病样皮肤炎症模型,结果显示与 WT 小鼠皮肤炎症模型相比,PGRN^{-/-}小鼠皮肤炎症的症状更加严重,PGRN 缺陷将加重 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症的发生和发展。同时,WT 小鼠被 IMQ 诱导皮肤炎症后,自噬和凋亡可以激活和增强;而 PGRN^{-/-}小鼠中,IMQ 诱导皮肤炎症后,自噬不能激活,凋亡有所下降。说明 PGRN 缺陷可能通过调控自噬和凋亡加重皮肤炎症的发生和发展,后续还需要进一步验证。

综上所述,PGRN 缺陷会加重 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症的发生和发展,同时自噬和凋亡都被抑制。研究表明,自噬是细胞内主要的降解通路,当自噬降低或不能激活,细胞凋亡减少时,炎症因子被大量堆积进而引起炎症疾病的发生。因此,怀疑 PGRN 对银屑病的抗炎机制可能与自噬及凋亡过程有关。后续将进一步围绕银屑病样皮肤炎症探讨 PGRN 是否通过调控自噬和凋亡参与炎症反应的各个阶段,为临床研发炎症相关药物提供靶点。

参 考 文 献

- [1] Chen C, Wu N, Duan Q, et al. C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8590.
- [2] Seifarth FG, Lax JE, Harvey J, et al. Topical heat shock protein 70 prevents imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in mice[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2018, 23(5): 1129–1135.
- [3] Sumida H, Yanaqida K, Kita Y, et al. Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis[J]. *J Immunol*, 2014, 192(9): 4361–4369.
- [4] Deng Y, Chang C, Lu Q. The inflammatory response in psoriasis: a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, 50(3): 377–389.
- [5] 王明星, 王 燕, 赵京霞, 等. 银屑病发病机制研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(6): 1334–1338.
- [6] 宋树玲. 银屑病流行病学、发病机制和治疗新进展[J]. *中国实用医药*, 2018, 13(13): 193–195.
- [7] Rather IA, Bajpai VK, Huh YS, et al. Probiotic lactobacillus sakei probio-65 extract ameliorates the severity of imiquimod induced psoriasis-like skin inflammation in a mouse model[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1021.
- [8] Li HJ, Wu NL, Lee GA, et al. The therapeutic potential and molecular mechanism of isoflavone extract against psoriasis[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6335.
- [9] Yasui K, Oketa Y, Higashida K, et al. Increased progranulin in the skin of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study[J]. *J Neurol Sci*, 2011, 309(1–2): 110–114.
- [10] Lang I, Fullsack S, Wujant H. Lack of evidence for a direct interaction of progranulin and tumor necrosis factor receptor-1 and tumor necrosis factor receptor-2 from cellular binding studies[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 793.
- [11] Choi GS, Trinh HKT, Yang EM, et al. Role of clusterin/progranulin in toluene diisocyanate-induced occupational asthma[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(5): 58.
- [12] Cenik B, Sephton CF, Kutluk Cenik B, et al. Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32298–32306.
- [13] Zhao YP, Tian QY, Frenkel S, et al. The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(27): 6412–6421.
- [14] Zhao YP, Tian QY, Liu CJ. Progranulin deficiency exaggerates, whereas progranulin-derived Atsttrin attenuates, severity of dermatitis in mice[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(12): 1805–1810.
- [15] Bossu P, Salani F, Alberici A, et al. Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 65.
- [16] Na Takuathung M, Wongnoppavich A, Panthong A, et al. Antipsoriatic effects of wannachawee recipe on imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in BALB/c mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 7931031.
- [17] Tang W, Lu Y, Tian QY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice[J]. *Science*, 2011, 332(6028): 478–484.
- [18] Yin F, Banerjee R, Thomas B, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(1): 117–128.
- [19] Wu H, Siegel RM. Medicine. Progranulin resolves inflammation[J]. *Science*, 2011, 332(6028): 427–428.
- [20] Huang K, Chen A, Zhang X, et al. Progranulin is preferentially expressed in patients with psoriasis vulgaris and protects mice from psoriasis-like skin inflammation[J]. *Immunology*, 2015, 145(2): 279–287.
- [21] Tian R, Li Y, Yao X, et al. PGRN suppresses inflammation and promotes autophagy in keratinocytes through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1387–1394.
- [22] Amber NH, Dan JL, Thomas RG, et al. Autophagy: regulation and role in development[J]. *Autophagy*, 2013, 9(7): 951–972.

(责任编辑: 冉明会)