

【基础研究】

银屑病角质形成细胞核因子 κ B 抑制剂 α 的表达研究

夏 萍, 周小勇*

(武汉市第一医院皮肤科, 湖北武汉 430000)

摘要: 目的 研究银屑病角质形成细胞核因子 κ B 抑制剂 α (nuclear factor- κ B inhibitor α , NFKBIA) 的表达。方法 收集 36 例银屑病患者皮损组织及 30 例正常切色素痣者的痣旁正常组织, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应法 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测组织中白介素 (interleukin, IL)-17 和 NFKBIA 的表达。同时, 培养正常人原代角质形成细胞, 以 100 ng/ml IL-17 干预 24 h, qRT-PCR 法检测细胞 CC 趋化因子配体 20 (C-C motif chemokine ligand 20, CCL20)、IL-8、 β -防御素 1 (β -defensin 1, HBD1)、S100 钙结合蛋白 A7 (S100 calcium binding protein A7, S100A7) 的表达。分别以 100、200 及 300 ng/ml 浓度的 IL-17 干预原代角质形成细胞 24 h, qRT-PCR 法检测细胞 NFKBIA 的表达。100 ng/ml IL-17 干预原代角质形成细胞 0、10、20、30 及 60 min, 免疫印迹法 (immunoblot, western-blot) 检测细胞 NFKBIA 蛋白的表达。结果 在银屑病皮损组织中, IL-17 表达高于正常组织 ($P < 0.01$), 而 NFKBIA 表达低于正常组织 ($P < 0.05$)。IL-17 干预原代角质形成细胞 24 h 后 CCL20、IL-8、HBD1、S100A7 等炎症因子表达明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。不同浓度 IL-17 干预原代角质形成细胞 24 h 后, NFKBIA 信使 RNA 表达无显著性差异 ($P > 0.05$), NFKBIA 的表达与 IL-17 浓度无明显梯度关系。100 ng/ml IL-17 干预原代角质形成细胞 30 及 60 min 时 NFKBIA 蛋白表达下降。结论 NFKBIA 在银屑病角质形成细胞中表达降低, 可能与 IL-17 促进银屑病角质形成细胞炎症有关。

关键词: 核因子 κ B 抑制剂 α ; 银屑病; 白介素 17

中图分类号: R758.63; R-33 文献标志码: A 文章编号: 1672-9188(2019)11-0771-05

DOI: 10.13683/j.wph.2019.11.005

The expression research of nuclear factor- κ B inhibitor α in the keratinocytes of psoriasis

XIA Ping, ZHOU Xiao-yong*

(Department of Dermatology, Wuhan No.1 hospital, Wuhan 430000, Hubei Province, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of nuclear factor- κ B inhibitor α (NFKBIA) in the keratinocytes of psoriasis. **Methods** The expressions of interleukin 17 (IL-17) and NFKBIA in 36 cases of psoriasis samples and 30 cases of normal samples closes to the nevi were detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expressions of C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20), IL-8, β -defensin 1 (HBD1) and S100 calcium binding protein A7 (S100A7) in the primary keratinocytes culture by the treatment with 100 ng/ml IL-17 for 24 h were detected by qRT-PCR. The expression of NFKBIA in the primary keratinocytes culture by the treatment with different concentrations of IL-17 for 24 h were detected by qRT-PCR. The expression of NFKBIA protein in the primary keratinocytes by the treatment with 100 ng/ml IL-17 for 0, 10, 20, 30 and 60 min were detected by immunoblot (western blot). **Results** The expression of IL-17 was increased ($P < 0.01$), while the expression of NFKBIA was decreased ($P < 0.05$) in psoriasis samples. The expressions of CCL20, IL-8, HBD1 and S100A7 in the primary keratinocytes were significantly higher than the blank controls after

收稿日期: 2019-06-27; 修回日期: 2019-11-12

作者简介: 夏萍, 主治医师, 研究方向: 银屑病。

通讯作者: 周小勇, 主任医师, 科副主任, 研究方向: 银屑病、荨麻疹。

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2018YFC1705304)

the treatment with 100 ng/ml IL-17 for 24 h ($P < 0.01$). There was no significant difference in NFKBIA mRNA expression after treatment with different concentrations of IL-17 for 24 h ($P > 0.05$), which was no related with the concentration of IL-17. But the expression of NFKBIA protein was obviously decreased in the keratinocytes treated by 100 ng/ml IL-17 at the time of 30 and 60 min. **Conclusion** The expression of NFKBIA was decreased in psoriasis keratinocytes, which may be related with the inflammation production of keratinocytes treated by IL-17.

Key words: nuclear factor- κ B inhibitor α ; psoriasis; interleukin 17

银屑病是在易感基因的基础上,由外界因素诱发的一种持续性、炎症失衡性疾病。而银屑病炎症持续的原因之一可能是角质形成细胞在白介素(interleukin, IL)-17刺激下能分泌更多炎症因子,形成炎症正向反馈^[1]。目前IL-17信号通路下游存在核因子 κ B通路(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶通路(mitogen-activated protein kinases, MAPK)及CCAAT增强子结合蛋白通路(CCAAT enhancer binding proteins, C/EBP)等3条亚通路,核因子 κ B抑制剂 α (nuclear factor- κ B inhibitor α , NFKBIA)是避免NF- κ B激活的重要抑制剂。目前有多项全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)研究显示银屑病患者NFKBIA基因存在多态性,是银屑病的重要易感基因之一^[2-3],提示银屑病患者中NFKBIA基因的表达和功能可能受基因修饰的影响而存在异常。因此本研究分别检测患者皮损组织及体外培养的原代银屑病角质形成细胞中NFKBIA的表达,探讨其表达在IL-17刺激下可能的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年1月至2017年6月就诊于武汉市第一医院皮肤科门诊的寻常型银屑病患者作为银屑病组,所有患者均经临床和病理活检确诊为斑块型银屑病,同时符合纳入标准:①年龄18~65岁;②活检前1月内未系统使用药物,2周内未外用皮质类固醇软膏、维甲酸软膏、维生素D3衍生物、钙调神经酶抑制剂及光疗的患者;③患者一般情况良好,

常规检查未发现其他器质性病变,不伴有其他类型皮肤病。同时选取健康色素痣切除者为对照组。其中银屑病组36例,年龄42~60岁;对照组30例,年龄33~63岁。比较两组年龄、性别,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。两组患者术前均签署知情同意书,本研究符合医学伦理学要求。

表1 一般资料比较

Table 1 Comparison of baseline characteristic between two groups

项目	银屑病组(n=36)	对照组(n=30)	P值
年龄/岁	40.37 \pm 5.82	38.85 \pm 6.46	$P > 0.05$
性别(男/女)	26/10	22/8	$P > 0.05$
病程/年	12.51 \pm 7.73	-	

样本量的确定依据:课题组前期已收集9例患者皮损组织及9例健康对照的皮肤组织进行转录组测序技术分析后得到差异基因表达谱,NFKBIA为筛选出的差异倍数较大一个兴趣基因。本次研究为临床上收集30例患者及正常对照进行实时荧光定量聚合酶链式反应法(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证。

样本量估算依据:根据课题组前期已收集9例患者皮损及9例健康对照的皮肤组织进行转录组测序技术分析后得到差异基因表达谱,银屑病NFKBIA相对表达量为(0.69 \pm 0.23),健康对照NFKBIA相对表达量为(1.02 \pm 0.34),取 $\alpha = 0.05$ 水平,检验效能为0.8,双侧检验,采用两个样本均数比较样本含量估算公式,具体如下。

$$n_A = k n_B \text{ and } n_B = \left(1 + \frac{1}{k}\right) \left(\frac{Z_1 - \alpha/2 + Z_1 - \beta}{\mu_A - \mu_B}\right)^2$$

式中 n_A 为银屑病组样本量, n_B 为对照组样本量, κ 为 1, σ 为合并标准差, α 为一类错误, β 为二类错误, 得样本含量每组为 13 例, 两组共 26 例。

1.2 试剂与仪器

人原代角质形成细胞购自中国科学院上海生命科学研究院; 胎牛血清 (批号: SH30071.03)、培养基 DMEM (批号: SH30021.01) 均购自美国 Hyclone 公司; Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (批号: 9767)、TaKaRa 反转录试剂盒 (批号: RR037A) 及 TaKaRa 荧光定量试剂盒 (批号: DRR820A) 均购自日本 TaKaRa 公司; 引物序列由北京六合华大基因科技有限公司合成; 蛋白质免疫印迹主要试剂: 小鼠抗人 NFKBIA 单克隆抗体 (批号: 4814T) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 浓度按照说明书稀释。

NanoDrop 微量核酸测定仪购自上海创萌生物科技有限公司; 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司。

1.3 样本处理

切取银屑病组患者皮损组织以及对照组的痣旁正常组织, 液氮保存, 组织匀浆后提取 RNA 用于检测组织中 IL-17 和 NFKBIA 的表达。

人原代角质形成细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C、5% 二氧化碳饱和湿度的细胞培养箱中培养, 每隔 2 ~ 3 d 换液一次; 0.25% 胰蛋白酶消化后传代。将角质形成细胞以 4×10^4 个 / 孔接种于 24 孔板, 常规培养至细胞融合度约 70%。

1.4 体外细胞试验

1.4.1 CC 趋化因子配体 20 (C-C motif chemokine ligand 20, CCL20)、IL-8、 β -防御素 1 (β -defensin 1, HBD1)、S100 钙结合蛋白 A7 (S100 calcium binding protein A7, S100A7) 测定

将培养后的人原代角质形成细胞分为空白对照组和 IL-17 干预组, 其中 IL-17 干预组给予 100 ng/ml 的 IL-17 进行干预, 24 h 后裂解细胞提取 RNA 用于检测细胞中 CCL20、IL-8、HBD1 及 S100A7 的表达。

1.4.2 NFKBIA 测定

将培养后的人原代角质形成细胞分为空白对照组和不同浓度 IL-17 干预组, 其中 IL-17 干预组在细胞培养液中加入 IL-17 并调整终浓度分别为 100、200 及 300 ng/ml, 继续培养 24 h 后提取 RNA 用于检测细胞中 NFKBIA 的表达。

将终浓度为 100 ng/ml 的 IL-17 处理 0、10、20、30 及 60 min 组, 试验结束后蛋白裂解液提取蛋白用于检测不同时间点 NFKBIA 蛋白的表达。

1.5 qRT-PCR

采用 Trizol 法提取总 RNA, NanoDrop 微量核酸测定仪检测 RNA 纯度和浓度。使用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录成互补 DNA, 按照荧光定量试剂盒使用说明配制反应体系, 以 18S 为内参, 进行扩增, 每个样品重复 3 次, 得到每个样品的 CT 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行结果分析。荧光定量引物及序列见表 2。

表 2 qRT-PCR 引物及序列

Table 2 The primers and sequences for qRT-PCR

引物名称	序列 (5'-3')
IL-17 上游	ACCCCTCGGAAGTTGTAC
IL-17 下游	CAGTCACCAGCACCTTC
NFKBIA 上游	CATTGACATCAGCACCAAG
NFKBIA 下游	TCCTGAAGGCTACCAACTACA
18S 上游	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S 下游	GCTGGAATTACCGCGGCT
CCL20 上游	AGCAGCAAGCAACTACGACT
CCL20 下游	TCTTAGGCTGAGGAGGTTCA
IL-8 上游	AGCCCTTCCTGATTTCTGCAGCTC
IL-8 下游	CTCAGCCCTCTTCAAAAACCTCTCC
HBD1 上游	ATTCCTGATGCCTCTTCC
HBD1 下游	GTGCCAATTGTGTTATACCTTC
S100A7 上游	GGTGGGAGAAGACATTTATTGTTTC
S100A7 下游	TCTGAGTTTCTGTCCTTGCTG

1.6 统计学处理

应用 SPSS22.0 软件进行统计分析。实验数据为定量变量, 如符合正态分布用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组数据采用独立样本 t 检验, 多组数据之间比较采用

单因素方差分析; 如不符合正态分布, 采用中位数 (四分位间距) 表示, 两组数据采用独立样本秩和检验, 多组数据之间比较采用多个独立样本的非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者切除组织中 IL-17 和 NFKBIA 表达

结果显示, 与对照组相比, 银屑病组中 IL-17 表达升高、NFKBIA 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 详见表 3。

表 3 两组患者 IL-17 和 NFKBIA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of the expression of IL-17 and nfkbia between two groups ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 ($n=30$)	银屑病组 ($n=36$)	P 值
IL-17	0.13 ± 0.01	0.87 ± 0.02	$P < 0.01$
NFKBIA	0.41 ± 0.02	0.32 ± 0.03	$P < 0.05$

2.2 体外细胞试验

2.2.1 细胞中 CCL20、HBD1、IL-8 和 S100A7 的表达

结果显示, 100 ng/ml 的 IL-17 干预角质形成细胞 24 h 后, CCL20、HBD1、IL-8 和 S100A7 的表达均明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 详见表 4。

2.2.2 不同浓度 IL-17 干预原代角质形成细胞 24h 后 NFKBIA 的表达

结果显示, 不同浓度的 IL-17 干预角质形成细胞 24 h 后, NFKBIA 的表达两两比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 详见表 5。

表 4 IL-17 干预后 CCL20、HBD1、IL-8 及 S100A7 的表达

Table 4 The expression of CCL20, HBD1, IL-8 and S100A7 by the treatment with IL-17

角质形成细胞	空白对照组	IL-17干预组	P 值
CCL20	0.05 ± 0.01	0.26 ± 0.04	$P < 0.01$
HBD1	0.01 ± 0.00	0.18 ± 0.02	$P < 0.01$
IL-8	0.24 ± 0.08	4.05 ± 0.66	$P < 0.01$
S100A7	0.01 ± 0.00	0.24 ± 0.07	$P < 0.01$

表 5 角质形成细胞在不同浓度 IL-17 干预下 NFKBIA 的表达变化

Table 5 The expression of NFKBIA after the treatment with different concentration of IL-17

角质形成细胞	空白对照组	IL-17/ng·ml ⁻¹			P 值
		100	200	300	
NFKBIA	0.32 ± 0.05	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.03	0.54 ± 0.17	$P > 0.05$

2.2.3 100 ng/ml IL-17 干预原代角质形成细胞不同时间点 NFKBIA 蛋白表达

结果显示, 100 ng/ml 的 IL-17 干预角质形成细胞, NFKBIA 的蛋白表达在干预后 30 及 60 min 时降低, 详见图 1

3 讨论

银屑病皮损中存在持久炎症, 而角质形成细胞在疾病的启动和维持中均可能发挥着重要的作用。受到诱发因素刺激后, 角质形成细胞启动天然免疫, 招募树突状细胞及 T 细胞等免疫细胞聚集, 产生以 IL-17 和 IL-23/ 辅助性 T 淋巴细胞 17 为主的免疫反应^[1]。但是随着诱发因素的消退, 这种免疫反

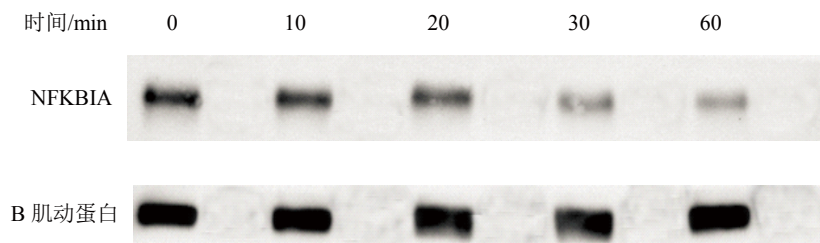


图 1 IL-17 干预后角质形成细胞中 NFKBIA 蛋白表达

Figure 1 The expression of NFKBIA in human keratinocytes with the treatment of IL-17

应并不能自然中止消失。角质形成细胞在疾病的维持中可能也发挥着主动作用。通过高通量转录组数据分析得知 IL-17 可改变角质形成细胞的许多生物学特性, 受 IL-17 刺激的角质形成细胞可主动分泌 CCL-20、HBD1、IL-8、S100 为主的趋化因子、细胞因子和抗菌肽等, 进一步吸引免疫细胞的趋化和活化, 放大和维持炎症效应^[4-5], 但这种现象机制尚不清楚。

作为 IL-17 通路下游的主要亚通路 NF- κ B 信号通路持续活化可能是炎症持续的原因之一。而抑制 NF- κ B 信号通路活化的抑制剂家族包含 NFKBIA、核因子 κ B 抑制剂 β 和核因子 κ B 抑制剂 ζ , 其中 NFKBIA 是最重要也是研究最多的一个。细胞静息状态下, *NFKBIA* 基因编码的蛋白在细胞质中与 NF- κ B 复合体结合, 掩盖其核定位信号, 受多种因素的刺激后, NFKBIA 磷酸化发生降解, 从而暴露 NF- κ B 复合体上的核定位信号, NF- κ B 复合体迅速进入细胞核发生转位, 与调控基因启动子上的位点结合, 启动相关基因的转录。

本研究的结果首先证实了银屑病患者皮损中 IL-17 表达的确是升高的, 而 NFKBIA 表达却降低了。在肿瘤研究中, *NFKBIA* 被认为是一种抑癌基因, 在多种肿瘤中表达也是降低的。Bredel 等^[6]发现恶性胶质瘤组织中存在 *NFKBIA* 表达降低或缺失; 通过对临床数据的进一步分析发现 *NFKBIA* 的低表达是胶质瘤预后差及肿瘤复发的一个危险因素。已发生转移的肾透明细胞癌组织中 *NFKBIA* 阳性表达率约较未转移的癌组织低 4 倍^[7]。而有 15.8% 的肺腺癌组织 *NFKBIA* 表达阴性, 其原因可能是 *NFKBIA* 启动子区域中 CpG 甲基化导致该基因不表达^[8]。本研究推断银屑病患者皮损中的 NFKBIA 的表达可能也受到基因修饰的影响而降低。

体外培养的角质形成细胞在 IL-17 的刺激下, 其下游炎症因子 CCL20、HBD1、IL-8 及 S100A7 的表达也显著增加, 这与高通量组学的结果一致^[4-5], 提示角质形成细胞在 IL-17 刺激下能分泌更多的炎症因

子, 损伤组织的同时, 可进一步招募更多的炎症细胞, 形成炎症扩大效应, 造成炎症持续。那么角质形成细胞在 IL-17 刺激下, 其 NFKBIA 的表达可能发生了变化。

因此, 本研究在体外实验中, 首先检测了原代角质形成细胞在不同浓度 IL-17 干预下的 NFKBIA 的表达变化, 发现在 IL-17 干预 24 h 时 NFKBIA 的表达与正常无明显改变, 与 IL-17 的干预浓度无明显相关。由于 NF- κ B 信号通路变化发生迅速, 本研究使用 100 ng/ml 的 IL-17 干预细胞, 收集细胞早期的 NFKBIA 蛋白, 发现 NFKBIA 蛋白在 30 及 60 min 时出现表达下降, 提示体外角质形成细胞在 IL-17 的干预下 NFKBIA 的表达变化发生较早, NFKBIA 可能迅速发生了磷酸化降解而表达降低。有研究提示在肺腺癌组织中, 过表达的表皮生长因子可磷酸化 NFKBIA 而导致其降解^[8]; 体外培养的人永生化角质形成细胞在肿瘤坏死因子 α 的刺激下 NFKBIA 的表达也发生降低^[9]。

4 结论

银屑病患者组织中 NFKBIA 的表达降低, 可能与 IL-17 促进银屑病角质形成细胞炎症有关。NFKBIA 可能成为银屑病靶向治疗的新的目标基因。

参考文献:

- [1] Kim J, Krueger JG. The immunopathogenesis of psoriasis[J]. *Dermatol Clin*, 2015, 33(1): 13-23.
- [2] Zhang GL, Zou YF, Feng XL, *et al*. Association of the *NFKBIA* gene polymorphisms with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis[J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(1):11-18.
- [3] Zuo X, Sun L, Yin X, *et al*. Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6793-6793.
- [4] Krueger JG, Brunner PM. Interleukin-17 alters the biology of many cell types involved in the genesis of psoriasis, systemic inflammation and associated comorbidities[J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(2): 115-123.

(下转第 794 页)