

## 白藜芦醇抑制角蛋白 17 改善银屑病样皮肤损伤

魏明<sup>1#</sup>, 甘露<sup>2#</sup>, 侯进<sup>1</sup>, 陈丽宏<sup>2</sup>, 刘彦彤<sup>3</sup>

1. 西安医学院药理学教研室, 陕西 西安 710021
2. 陕西省人民医院妇科, 陕西 西安 710068
3. 西安医学院生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710021

**摘要:** 目的 探讨白藜芦醇(Rsv)对咪喹莫特(IMQ)诱导的银屑病样皮肤损伤的改善作用及其作用机制。方法 BALB/c小鼠随机分为4组:对照组、Rsv组、模型(IMQ)组、Rsv治疗(IMQ+Rsv)组,每组6只;涂抹IMQ诱导BALB/c鼠耳部银屑病样皮肤损伤模型,连续8d,同时涂抹20mg Rsv予以治疗;观察红斑及银屑的多少、游标卡尺测量耳厚度;HE染色观察组织改变;实时荧光定量(qRT-PCR)检测组织角蛋白17(K17)、IL-17A、IL-19及IL-23 mRNA表达;Western blotting检测K17蛋白表达。结果 与模型组比较,Rsv治疗组小鼠红斑面积明显减少,表皮鳞屑减少,耳缘厚度显著降低;HE染色结果表明,Rsv治疗组耳缘组织表皮厚度明显减轻,炎细胞浸润减少;与对照组比较,模型组K17、IL-17A、IL-19及IL-23 mRNA水平、K17蛋白表达明显升高,Rsv治疗后K17、IL-17A、IL-19 mRNA水平、K17蛋白表达显著降低。结论 白藜芦醇通过抑制K17及炎症分子表达,改善IMQ诱导的银屑病样皮肤损伤。

**关键词:** 白藜芦醇;咪喹莫特;银屑病;组织角蛋白17;炎症

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)01-0037-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.01.006

## Promotion of resveratrol on psoriasis like skin damage by down-regulating expression of Keratin 17

WEI Ming<sup>1</sup>, GAN Lu<sup>2</sup>, HOU Jin<sup>1</sup>, CHEN Li-hong<sup>2</sup>, LIUYan-tong<sup>3</sup>

1. Department of pharmacology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China
2. Department of Gynecology, Shaanxi Provincial of people' Hospital Xi'an 710068, Cina
3. Department of Biochemistry and molecular biology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

**Abstract: Objective** To observe the therapeutic effect of resveratrol (Rsv) on psoriasis like skin damage induced by imiquimod (IMQ) and study its mechanism. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into four groups: control group, Rsv group, model (IMQ) group and Rsv treatment (IMQ + Rsv) group with six mice in each group. Psoriasis like skin model induced by smearing IMQ in the mice's ear for 8 d, 20 mg Rsv cream were gave at the same time for treatment. Observe erythema and psoriasis degree, and measure ear thickness with vernier caliper. HE staining was used to observe tissue change, real time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect K17, IL-17A, IL-19 and IL-23 mRNA and Western blotting were used to detected K17 protein expression in tissues. **Results** Compared with the model group, mice erythema area and the thickness of epidermal scale decreased significantly in Rsv treatment group; HE staining results showed that, Rsv significantly reduced ear marginal tissue epidermal thickness, and diminished severity of the psoriasis-like skin inflammation. qRT-PCR and Western blotting confirmed a Rsv dependent decrease of in K17, IL-17A and IL-19 in mRNA level and protein levels of K17. **Conclusion** Rsv improves psoriasis like skin damage by down-regulating expression of Keratin17.

**Keywords:** Resveratrol; imiquimod; Psoriasis; K17; inflammation

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目(2016JM8046 2014JQ2-8055 2016JM8047); 陕西省卫计委重点项目(2014A); 西安医学院校级重点建设学科资助项目(2015097)

作者简介: 魏明(1978-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药理学。Tel: 029-86177562; E-mail: weiming@xxy.edu.cn

#为共同第一作者

银屑病是皮肤慢性炎症性自身免疫疾病,其特征为皮肤红斑伴有鳞屑、表皮增厚、免疫损伤浸润表皮和真皮之间导致皮肤损害,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。银屑病的发病机制目前仍不清楚<sup>[2-3]</sup>,但已经明确的是,皮肤损伤由免疫细胞和角蛋白细胞相互作用失调导致。角蛋白 17 (Keratin 17, K17) 是一种细胞支架蛋白,在银屑病皮肤损伤表皮过度表达,但在健康表皮未发现,因此, K17 被视为银屑病标志性分子<sup>[4]</sup>。更为重要的是,在银屑病组织 K17 表达与 Th1 细胞过度活跃之间存在相互联系<sup>[5]</sup>。另也有报道, K17 是唯一异位表达在银屑病皮损表皮的角蛋白,抑制 K17 改善银屑病生物学功能,表明 K17 可以作为治疗银屑病的新靶点<sup>[6]</sup>。

白藜芦醇 (Resveratrol, Rsv) 是一类小分子多酚化合物,近十年来被广泛研究。Rsv 有多种天然植物来源,尤其是桑椹、花生和葡萄,主要作为天然药物及饮食补充引起广泛关注。近些年发现, Rsv 对代谢性、心血管性以及年龄相关的综合征如神经退行性病变和肿瘤具有很强的保护作用,对各种组织和细胞具有很强的抗炎作用<sup>[7-9]</sup>。

银屑病包括多种治疗方法,例如激素或维生素 D 类似物局部治疗、紫外线等日光疗法、甲氨蝶呤和环孢菌素等全身治疗以及抗 TNF- $\alpha$  和抗 IL-12/23 抗体生物治疗。但这些治疗方法副作用严重,因此,研究开发有效且安全的药物是银屑病治疗发展的趋势。文献报道, Rsv 发挥很强的抗炎作用的同时也是 AMPK 激动剂<sup>[8]</sup>,而 AMPK 与 K17 的表达有密切联系<sup>[10]</sup>。本课题应用咪喹莫特 (IMQ) 诱导小鼠银屑病样皮肤损伤,观察 Rsv 通过影响 K17 表达改善小鼠银屑病样皮肤损伤的作用。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 鼠,购自第四军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为 SCXK (陕) 2015-003,饲养于第四军医大学实验动物中心,室温 23 °C,湿度 60%,小鼠均可自由饮水进食。本动物实验获得第四军医大学实验动物中心伦理委员会批准。

### 1.2 药物及主要试剂

5% IMQ 乳膏,英国 3M 医药用品上海公司,批号 H20100157; Rsv 乳膏,由第四军医大学唐都医院药剂科配制,批号为 QA-001-2015,质量分数为 2.35%; SYBR Green Real time PCR Master mix

试剂盒,购自 Toyobo 公司;所有引物均由上海生工生物有限公司合成。

### 1.3 主要仪器

Nanodrop 浓度检测仪 (美国 Thermo 公司);光学显微镜及照相系统 (Olympus 公司);稳压电泳仪 (北京六一仪器厂);Odyssey 红外成像系统 (LI-COR 公司);CFX96 Real-Time PCR 仪 (Bio-Rad 公司);游标卡尺 (日本 Mitutoyo 型号 530)。

## 2 方法

### 2.1 银屑病样皮肤模型的建立及分组给药

BALB/c 小鼠随机分为 4 组:对照组、Rsv 组、模型 (IMQ) 组、Rsv 治疗 (IMQ+Rsv) 组,每组 6 只。其中,模型组和 Rsv 治疗组每天涂抹剂量为 62.5 mg 的 5% IMQ 乳膏于小鼠耳部皮肤,每天 1 次,连续用药 8 d,以小鼠耳部皮肤出现鳞屑及红斑为造模成功。对照组每天给予同等剂量凡士林, Rsv 组和 Rsv 治疗组的 Rsv 给药剂量均为每天 20 mg,剂量依据参考文献设置<sup>[11]</sup>。每天 1 次,造模与治疗同步进行,小鼠外耳均匀涂抹给药,连续给药 8 d。

### 2.2 银屑病面积与严重程度评分

小鼠耳部皮肤按红斑、表皮鳞屑和皮肤浸润增厚程度等特征进行评分。根据皮损处鳞屑、红斑的程度分为:无,0 分;轻度,1 分;中度,2 分;重度,3 分;极重度,4 分。

耳部厚度用游标卡尺精确测量,以 0~4 分评价:0 分,0.30~0.40 mm;1 分,0.40~0.50 mm;2 分,0.50~0.60 mm;3 分,0.60~0.70 mm;4 分,0.70~0.80 mm。以红斑、鳞屑及皮肤增厚程度得分累加得到总分,并拍照记录。

### 2.3 样本采集

实验第 8 天,颈椎脱臼处死小鼠,取耳,准确称取其质量、测量其厚度,部分用于蛋白提取;部分 4% 多聚甲醛固定,HE 染色;部分 Trizol 裂解, -80 °C 冰箱保存。

### 2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

Trizol 法提取各组耳 RNA,反转录后定量备用,取 10  $\mu$ L 体系进行 qRT-PCR,反应体系为:上下游引物各 0.4  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, PCR Mix 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L。扩增条件为:94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 12 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 78.5 °C 读板 1 s, 45 个循环, Primer 5.0 设计引物,引物序列见表 1。

表1 基因及其特异引物

Table 1 Genes and specific primers

基因	引物序列 (5'-3')
β-actin	正向引物 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC
	反向引物 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT
K17	正向引物 TGGTTGCCCTCTTCTACTTTGC
	反向引物 CCAGTGTCCAGCCCATGATG
IL-17A	正向引物 CTTTCTGCTGTCTTGGGTG
	反向引物 GCGAGCAGCCCATCATCT
IL-19	正向引物 TATCCAGGAAGCGGTCTCAT
	反向引物 GGGTTAAAGGGGATGATGCT
IL-23	正向引物 AGCCACAGGAGATAATAC
	反向引物 TCATTTCTGTGGAGAGTCC

### 2.5 Western blotting 检测各组耳 K17 蛋白水平

取每组小鼠新鲜耳部组织，提取蛋白后定量；SDS-PAGE 凝胶电泳，湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜；5% 牛奶封闭 2 h，K17 及 β-actin 一抗 4 °C 孵育过夜；TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，HRP 标记的二抗 37 °C 孵育 1 h；TBST 洗膜 3 次，ECL 发光，曝光后扫描，以 K17 和内参 β-actin 的条带灰度比值表示 K17 蛋白水平，用 Image J 软件对条带灰度值进行分析。

### 2.6 统计学分析

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 GraphPad Prism 7.0 进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 鼠耳厚度及评分

如图 1 所示，随着时间的推移，模型组鼠耳厚

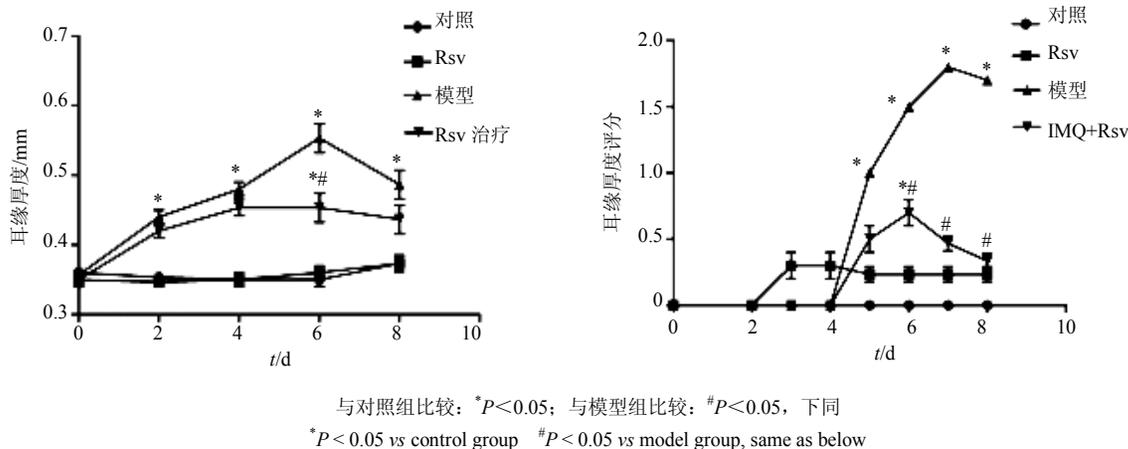


图1 鼠耳厚度及评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Ear thickness and score ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

度较对照组和 Rsv 组显著增加 ( $P < 0.05$ )，第 6 天达到最高；Rsv 治疗组小鼠耳缘厚度与模型组比较降低，第 6 天差异显著 ( $P < 0.05$ )。耳厚度评分与耳厚度测量结果一致。

### 3.2 鼠耳红斑及银屑的评分

如图 2 所示，与对照组比较，Rsv 组在耳缘厚度以及红斑和表皮鳞屑中无显著差异，模型组红斑及银屑面积逐渐增加 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较，Rsv 治疗组红斑面积明显减少，第 4~8 天差异显著 ( $P < 0.05$ )；表皮鳞屑减少，第 6~8 天差异显著 ( $P < 0.05$ )。在耳肥厚程度、红斑及银屑总评分中，与模型组比较，第 6~8 天，Rsv 治疗组评分显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.3 对 IMQ 诱导耳部组织结构的影响

如图 3 所示，与对照组和 Rsv 组比较，IMQ

组耳缘组织的上下表皮增厚，炎细胞浸润；Rsv 治疗组耳缘组织表皮厚度明显减轻，炎细胞浸润减少。

### 3.4 对各组鼠耳 K17、IL-17A、IL-19 及 IL-23 mRNA 表达的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组 K17、IL-17A、IL-19 及 IL-23 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ )；Rsv 治疗后 K17、IL-17A、IL-19 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )，而 IL-23 表达变化不明显。

### 3.5 对小鼠耳部组织 K17 蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组和 Rsv 组比较，模型组 K17 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ )；Rsv 治疗后，K17 蛋白表达较模型组显著下降 ( $P < 0.05$ )。

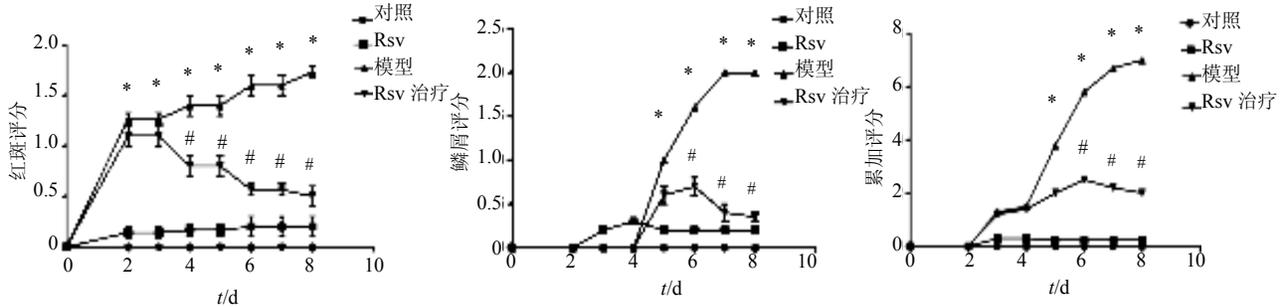


图2 鼠耳红斑及银屑的评分评价 Rsv 对 IMQ 诱导的皮肤损伤改善作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Evaluation of promotion of Rsv on psoriasis like skin damage with mouse ear erythema and psoriasis score ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

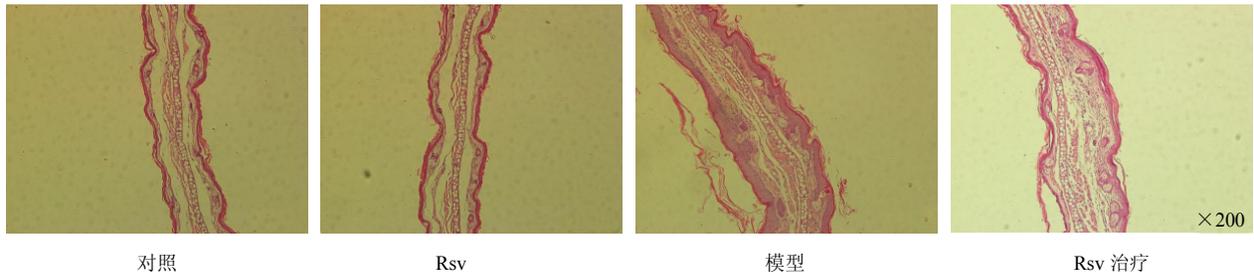


图3 HE 染色观察组织结构

Fig. 3 HE stained of mouse ear

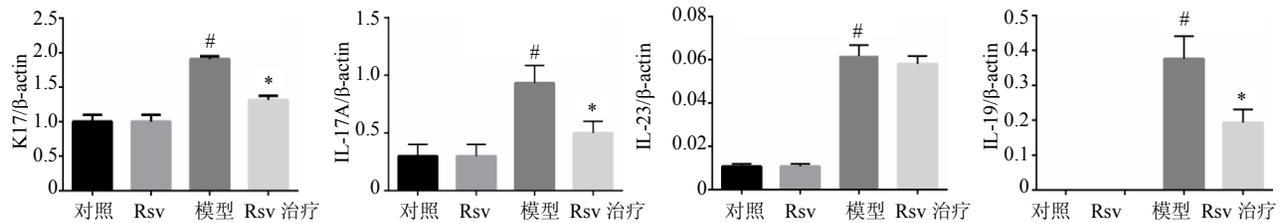
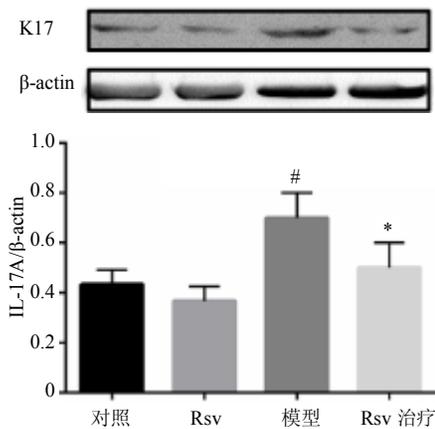


图4 Rsv 对各组耳组织 K17、IL-17A、IL-19 及 IL-23 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of Rsv on expression of K17, IL-17A, IL-19, and IL-23 mRNA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group # $P < 0.05$  vs model group

图5 Rsv 对各组耳组织 K17 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Western blotting were used to detected K17 protein expression in tissues ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

银屑病属于皮肤慢性复发性自身免疫性疾病,影响 2%~3% 的人群,其特征为异常的角质细胞增殖,表现为皮肤鳞屑样及红斑样损伤<sup>[12]</sup>。这些损害显示过多的角质细胞增殖,异常的角质细胞分化,以及出现炎症细胞,包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和树突状细胞。

IMQ 诱导的小鼠模型被广泛用于研究皮肤的银屑病样损伤。IMQ 是 Toll 受体 TLR7 和 TLR8 的配体,当其局部应用就会导致小鼠银屑病样皮肤损伤,具有人类银屑病的一些特点。因此,IMQ 诱导的小鼠皮肤损伤模型是被公认的小鼠银屑病模型<sup>[6]</sup>。

银屑病病变组织中免疫细胞浸润皮肤,释放促炎症细胞因子,其中 K17 在银屑病中发挥重要的作用<sup>[13]</sup>。在活动的银屑病皮肤损害中,角蛋白(K17)是唯一的异位表达在银屑病皮损表皮角蛋白,最近

成为银屑病发病的关键成分<sup>[14]</sup>。直接抑制 K17 和相关炎症介质被证明是有效改善银屑病综合征<sup>[6]</sup>。

文献报道,来源于 TH17、TH22 细胞的 IFN- $\gamma$ 、IL-17A 及 IL-22 在角质形成细胞以剂量相关性方式上调 K17 mRNA 水平及蛋白水平,这些效应被 STAT-1 和 STAT-3 特异抑制剂小干扰 RNA 部分阻断<sup>[15-16]</sup>。在该报道中还提出存在 K17/T 细胞/细胞因子免疫环,其中异位表达 K17 通过激活自身反应性 T 细胞影响银屑病<sup>[6]</sup>。应用反义寡核苷酸和 RNAi 抑制在体 K17 mRNA 和蛋白在银屑病皮肤的表达,在临床和组织学上均发挥对银屑病的改善作用<sup>[6]</sup>。Rsv 是近些年来发现的代谢性、心血管性以及年龄相关性疾病,包括神经退行性病变及癌症等,有非常强的保护作用。Rsv 为 AMPK 激动剂<sup>[8]</sup>,可能通过激活 AMPK 抑制 K17 蛋白表达<sup>[10]</sup>,从而改善银屑病。

最近研究表明,新确认的 T 细胞的亚型 Th17 细胞在银屑病形成中发挥关键作用<sup>[17]</sup>。IL-23 活化 Th17 细胞,并且产生细胞因子 IL-17A。此外, Th17 细胞与其他的 Th 细胞亚型共同产生细胞因子 IL-22 和 IFN- $\gamma$ 。IL-17A 和 IL-22 通过多种途径共同影响角蛋白细胞<sup>[18]</sup>, Th17 细胞产生 IL-17 和 IL-22 作用于 K17 的表达<sup>[17]</sup>。同时,本课题组发现来源于 Th17 和 Th22 细胞的 IL-22 有类似调节 K17 表达的作用。根据本实验结果推测, Rsv 可能通过抑制 IL-19 和 IL-17A 表达减少 K17 mRNA 水平,引起 K17 蛋白水平表达减少,还有待于实验进一步证实。

总之, Rsv 对于 IMQ 诱导的银屑病样皮肤损伤具有一定的改善作用。本研究表明, Rsv 能有效抑制组织 K17 分子表达,其机制可能与作用于 AMPK 和抑制 IL-17A、IL-19 表达相关,但具体的分子机制还有待于进一步研究。

#### 参考文献

[1] Boehncke W H, Schon M P. Psoriasis [J]. Lancet, 2015, 11(386): 983-994.  
[2] Zaba L C, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong N J, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immune-stimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells [J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(1): 79-88.  
[3] Quaglino P, Bergallo M, Ponti R, et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response [J]. Dermatology, 2011, 223 (1): 57-67.

[4] de Jong E M, van Vlijmen I M, van Erp P E, et al. Keratin 17: a useful marker in anti-psoriatic therapies, [J]. Arch Dermatol Res, 1991, 283(7): 480-482.  
[5] Nickoloff B J. Cracking the cytokine code in psoriasis [J]. Nat Med, 2007, 13(3): 242-244.  
[6] Fu M, Wang G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis [J]. J Dermatol Sci, 2012, 12(67): 161-165.  
[7] 李先宽, 李赫宇, 李 帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2568-2578.  
[8] Kulkarni S S, Cantó C. The molecular targets of resveratrol [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(6): 1114-1123.  
[9] 刘 顺, 李赫宇, 赵 玲. 白藜芦醇降尿酸、抗炎作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 304-307.  
[10] Garcin G, Guiraud I, Lacroix M, et al. AMPK/HuR-Driven IL-20 post-transcriptional regulation in psoriatic skin [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(11): 2732-2741.  
[11] Cullberg K B, Olholm J, Paulsen S K, et al. Resveratrol has inhibitory effects on the hypoxia-induced inflammation and angiogenesis in human adipose tissue *in vitro* [J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 49(2): 251-257.  
[12] Flutter B, Nestle F O. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(4): 3138-3146.  
[13] Sun Y, Zhang J, Huo R, et al. Paeoniflorin inhibits skin lesions in imiquimod-induced psoriasis-like mice by down-regulating inflammation, [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(6): 392-399.  
[14] Byamba D, Kim D Y, Kim D S, et al. Skin-penetrating methotrexate alleviates imiquimod-induced psoriasis form dermatitis via decreasing IL-17-producing gamma delta T cells [J]. Exp Dermatol, 2014, 23(7): 492-496.  
[15] Zhang W, Dang E, Shi X, et al. The pro-inflammatory cytokine IL-22 up-regulates keratin 17 expression in keratinocytes via STAT3 and ERK1/2 [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e40797.  
[16] Shi X, Jin L, Dang E, et al. IL-17A up-regulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1- and STAT3-dependent mechanisms [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(7): 2401-2408.  
[17] Rathore J S, Wang Y. Protective role of Th17 cells in pulmonary infection [J]. Vaccine, 2016, 34(13): 1504-1514.  
[18] Loschke F, Seltmann K, Bouameur J E, et al. Regulation of keratin network organization [J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 2(32): 56-64.