

白介素-18 及 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体 在痤疮发病中的作用研究*

李晓娟, 林新瑜[△], 沈 柱, 邓 秋, 刘 颖, 程 石, 刘 伟

四川省医学科学院·四川省人民医院 皮肤病性病研究所(成都 610072)

【摘要】 目的 探讨白介素-18(IL-18)及 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体在痤疮炎性发病机制中的作用。**方法** 以痤疮丙酸杆菌悬液[感染复数(MOI)=0、10、20、30]刺激人角质形成细胞(NHEK) 12 h、24 h、36 h, ELISA 法检测 NHEK 中 IL-18 蛋白的表达量, real-time PCR 检测 NHEK 中 IL-18 mRNA 的表达。将 NHEK 细胞分为 3 组:特异性 NLRP3 小干扰 RNA(siRNA)转染 NHEK 36 h 后,以 MOI=30 的痤疮丙酸杆菌悬液刺激 NHEK 36 h(siRNA 组);不转染、不以菌液刺激的 NHEK 为空白对照组;不转染、只以 MOI=30 的痤疮丙酸杆菌悬液刺激 36 h 的 NHEK 为阳性对照组。ELISA 法和 real time-PCR 法检测 3 组 NHEK 中 IL-18 蛋白和基因的表达量, Western blot 法检测 NLRP3 炎性小体的表达情况。**结果** NHEK 经痤疮丙酸杆菌悬液刺激后 IL-18 蛋白和基因的表达量增加,具有时间相关性和剂量相关性(r 均 >0.75 , $P<0.05$),以菌悬液 MOI=30、刺激 36 h 最为明显。siRNA 组 IL-18 蛋白和基因表达量、NLRP3 炎性小体的表达量较阳性对照组降低,但高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 痤疮丙酸杆菌刺激 NHEK 分泌 IL-18 可能需要 NLRP3 炎性小体的参与。

【关键词】 痤疮丙酸杆菌 IL-18 NLRP3 炎性小体

IL-18 and NLRP3 in the Process of Acne vulgaris LI Xiao-juan, LIN Xin-yu[△], SHEN Zhu, DENG Qiu, LIU Ying, CHENG Shi, LIU Wei. Department of Dermatology and Venereology, Sichuan Academy of Medical Sciences&Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

[△] Corresponding author, E-mail: linxinyu8989@163.com

【Abstract】 Objective To determine the role of interleukin-18 (IL-18) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor containing pyrin domain 3 (NLRP3) in acne vulgaris. **Methods** We used *propionibacterium acnes* (*P. acnes*) suspensions [multiplicity of infection (MOI)=0, 10, 20, 30] to stimulate normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) for 12, 24, and 36 h, respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the protein level of IL-18. Real-time quantitative PCR (real-time PCR) was adopted to detect the mRNA of IL-18. The NHEKs were divided into three groups: ① siRNA group: NHEKs were pretreated with siRNA for 36 h, followed by 36 h exposure to MOI=30 of *P. acnes* suspensions; ② blank control group: NHEKs free from siRNA transfection and *P. acnes* suspensions; ③ positive control group: NHEKs free from siRNA transfection were exposed to *P. acnes* suspensions (MOI=30). The expression of NLRP3 was detected by Western blot. **Results** The expressions of protein and mRNA of IL-18 increased with exposure to *P. acnes* suspensions in a dose responsive way ($r>0.75$, $P<0.05$), with the peak effects showing for MOI=30 at 36 h. The expression of IL-18 decreased in the siRNA group compared with the positive control, but was still higher than that of the blank group ($P<0.05$). **Conclusion** *P. acnes* stimulates NHEK cells to secrete IL-18. The process possibly requires the involvement of NLRP3.

【Key words】 *P. acnes* IL-18 NLRP3

痤疮为一种多因性疾病,而痤疮丙酸杆菌的感染及炎症反应为其重要发病机制,有研究发现痤疮丙酸杆菌首选定植于富含脂质的毛囊皮脂腺单位,随后可刺激细胞释放炎症因子诱发痤疮的炎症病变^[1-2]。MIN 等学者^[3]发现痤疮丙酸杆菌可诱导

人单核细胞分泌部分细胞因子从而加重痤疮的炎症反应,而 NOD 样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor containing pyrin domain 3, NLRP3) 炎性小体参与这一过程。白介素-18(interleukin, IL-18) 是近年新发现的由角质形成细胞等产生的一种有效前炎症细胞因子,IL-18 的分化成熟是机体发生免疫反应的先决条件,在感染性疾病、慢性炎症反应等疾病中均发挥重要作用^[4]。SALAMON 等学者^[5]发现在酒糟鼻

* 2015 年四川省医学科学院·四川省人民医院博士基金(No. 2015BS03)资助

[△] 通信作者, E-mail: linxinyu8989@163.com

患者中血清 IL-18 明显高于正常人,这说明 IL-18 参与了酒糟鼻的发生发展。

目前关于痤疮患者发病过程中是否有 IL-18 的参与,尚无相关研究,本研究对痤疮丙酸杆菌是否能诱导角质形成细胞分泌 IL-18,以及 NLRP3 炎性小体在其中的作用进行探讨,拓展对痤疮的炎性发病机制进一步的认识。

1 材料与方法

1.1 材料

痤疮丙酸杆菌标准菌株 ATCC 11827(广东省微生物研究所菌种保藏中心),高糖-DMEM 培养液(Hyclone 公司),胎牛血清(Cellmax 公司),人 IL-18 ELISA 试剂盒(贝赛维斯公司),NLRP3 siRNA(吉玛基因公司)。

正常人皮肤来源于 2017 年间在我院行激光包皮环切术的患者,所有患者经过本院伦理会批准[伦审(研)2017 第 147 号]并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 正常人角质形成细胞(normal human epidermal keratinocyte, NHEK)的培养 取正常人皮肤,使用酶分离法分离出表皮,使用胰蛋白酶消化表皮,随后过滤、离心、计数,制备成 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ NHEK 悬液。

1.2.2 痤疮丙酸杆菌悬液的制备 痤疮丙酸杆菌标准菌株按照说明书活化细菌。接种于布氏血琼脂培养平板(重庆庆通医疗器械公司)后立即放入厌氧产气袋中,置于 37°C 、体积分数为 $5\% \text{CO}_2$ 恒温培养箱中孵育 48 h。取出厌氧培养 48 h 的布氏血琼脂培养平板,挑取部分菌落进行革兰染色镜检、全自动微生物分析系统确定为痤疮丙酸杆菌。挑取痤疮丙酸杆菌菌落制备成 0.5 麦氏单位(mcfarland, MCF)的菌悬液,配置好后 10 min 内使用。

1.2.3 痤疮丙酸杆菌浓度和时间对 NHEK 中 IL-18 表达影响的检测 将 NHEK 培养至对数生长期,胰蛋白酶消化、以痤疮丙酸杆菌悬液[感染复数(MOI)=0、10、20、30]刺激 NHEK 12 h、24 h、36 h,ELISA 法检测 NHEK 中 IL-18 蛋白的表达量,按照试剂盒说明书对所提取的细胞上清液进行测定。real-time PCR 检测 NHEK 中 IL-18 mRNA 的表达。

1.2.4 NLRP3 沉默对 NHEK 中 IL-18 和 NLRP3 炎性小体表达影响的检测

1.2.4.1 NLRP3 小干扰 RNA(siRNA)转染

NLRP3 siRNA 序列由吉玛基因公司合成。将 Lipofectamine 3000(LP 3000)及 siRNA 置于室温融化,按照 LP 3000 说明书将 siRNA、LP3000 使用 Opi-MEM 培养基进行稀释,轻轻吹打混匀后与 NHEK 细胞进行混合培养。转染后根据细胞生长状态来决定是否更换培养基,如细胞生长状态不好,则在转染后 6 h 更换培养基,若状态良好,则可继续培养。36 h 时在蛋白水平得到结果,根据试剂厂家使用说明,用 Western blot 分析灰度值,在蛋白表达水平评价目的基因转染效率。转染效率高于 50% 则可用于下一步实验。

1.2.4.2 分组 痤疮丙酸杆菌悬液的浓度和刺激时间根据 1.2.3 的结果选定为 MOI=30 和 36 h。将 NHEK 细胞分为 3 组:特异性 NLRP3 siRNA 转染 NHEK 36 h 后,以 MOI=30 的痤疮丙酸杆菌悬液刺激 NHEK36 h(siRNA 组),并设不转染、不以菌液刺激的 NHEK 为空白对照组,不转染、只以 MOI=30 的痤疮丙酸杆菌悬液刺激 36 h 的 NHEK 为阳性对照组。

刺激 36 h 后,ELISA 法和 real time-PCR 法检测 3 组 NHEK 中 IL-18 蛋白和基因的表达量,Western blot 法检测 NLRP3 炎性小体的表达情况。

1.2.4.3 ELISA 法检测 3 组 NHEK 中 IL-18 的表达 提取细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒上的说明书测定 IL-18 的表达。

1.2.4.4 real-time PCR 检测 3 组 NHEK 中 IL-18 mRNA 的表达 抽提 RNA,去除基因组 DNA,按照试剂盒进行配置反应液后置于 PCR 仪,在 42°C 情况下反应 2 min。随后取 $2 \mu\text{g}$ RNA 逆转为 cDNA;实时 PCR 扩增, 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 20 s, 72°C 延伸 15 s,共 40 个循环。每次反应均做 3 复孔,结果取平均值。IL-18 引物序列, F: $5' \text{-AAAGATAGCCAGCCTAGAGG TATG-3'}$, R: $5' \text{-TTATCATGTCCTGGGACACT TCTC-3'}$,产物长度为 24 mer,扩增产物大小为 176 bp;内参 β -actin 引物序列, F: $5' \text{-CACCCAG CACAATGAAGATCAAGAT-3'}$, R: $5' \text{-CCAGTT TTTAAATCCTGAGTCAAGC-3'}$,扩增产物长度为 317 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因表达水平。实验至少重复 3 次。

1.2.4.5 Western blot 法检测 NHEK 中 NLRP3 炎性小体蛋白含量的变化 含有 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethane-sulfonyl fluoride, PMSF)的细胞裂解液裂解细胞,随后以 4°C $13 \times 10^4 \text{ r/min}$

离心 5 min, 超声机粉碎细胞, 100 ℃ 水浴锅中煮 5 min 后可提取出细胞总蛋白; 使用 BCA 法测得蛋白浓度。

按照说明书配置 120 g/L 分离胶和 50 g/L 浓缩胶以后对蛋白进行电泳、转膜、封闭、采用兔来源 IL-18 抗体孵育、曝光后使用 Quantity one 系统采集灰度值, 以 IL-18 灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值, 对目的蛋白表达进行半定量分析。

1.2.5 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NHEK 培养结果

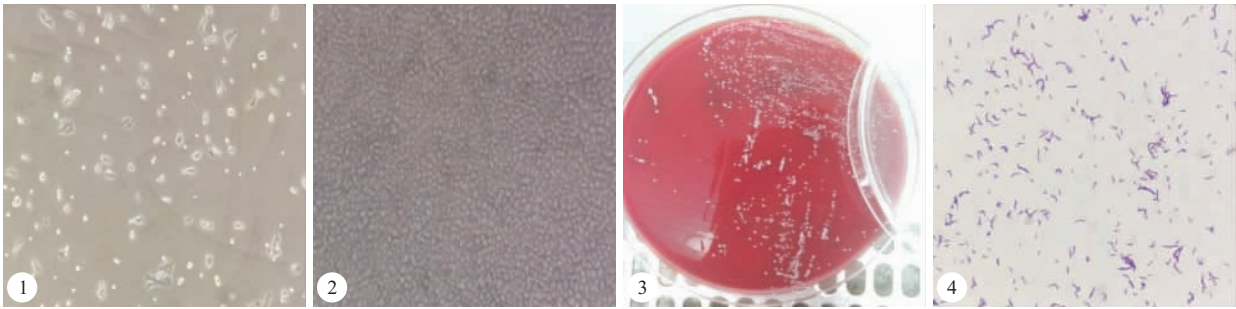


图 1 培养 24 h 后的 NHEK。×100 图 2 培养 7 d 后的 NHEK。×100 图 3 培养 48 h 后血平板上细菌 图 4 显微镜下细菌形态。革兰染色 ×400

Fig 1 NHEKs after 24 h of culture. ×100 Fig 2 NHEKs after 7 d of culture. ×100 Fig 3 Bacteria on the blood plate were cultured for 48 h Fig 4 Bacteria form shown under microscope. Gram's staining ×400

达随痤疮丙酸杆菌悬液浓度升高而升高($r=0.992$, $P<0.05$); 相同的菌悬液浓度下, NHEK 中 IL-18 的蛋白表达随刺激时间的延长而升高($r=0.989$, $P<0.01$) (图 5)。痤疮丙酸杆菌悬液刺激后, NHEK 中 IL-18 基因的变化也有相同趋势, 具有剂

原代 NHEK 接种 24 h 以后开始缓慢生长, 部分呈团状贴壁 (图 1), 第 5~7 d 时, 细胞汇合率达 60%, 细胞呈圆形、类圆形, 细胞核呈椭圆形, 未查见异常核分裂相, 细胞排列紧密呈铺石路样生长 (图 2)。

2.2 痤疮丙酸杆菌的培养结果

痤疮丙酸杆菌标准株厌氧培养 48 h 后血平板上可见密集分布的形态大致一致的灰白色细小菌落 (图 3), 可闻及恶臭味。革兰染色呈紫色, 镜下可见细菌呈棒形、直或微弯状, 排列呈 V、X、Y 及栏栅状, 无荚膜, 无鞭毛, 为革兰阳性杆菌 (图 4)。

2.3 不同浓度痤疮丙酸杆菌悬液刺激不同时间后 NHEK 中 IL-18 蛋白和基因的表达

相同的刺激时间下, NHEK 中 IL-18 的蛋白表

量依赖性 ($r=0.784$, $P<0.01$) 和时间依赖性 ($r=0.793$, $P<0.01$)。

2.4 NLRP3 siRNA 转染对 NHEK 中 IL-18 表达的影响

siRNA 组 IL-18 蛋白以及 IL-18 mRNA 表达

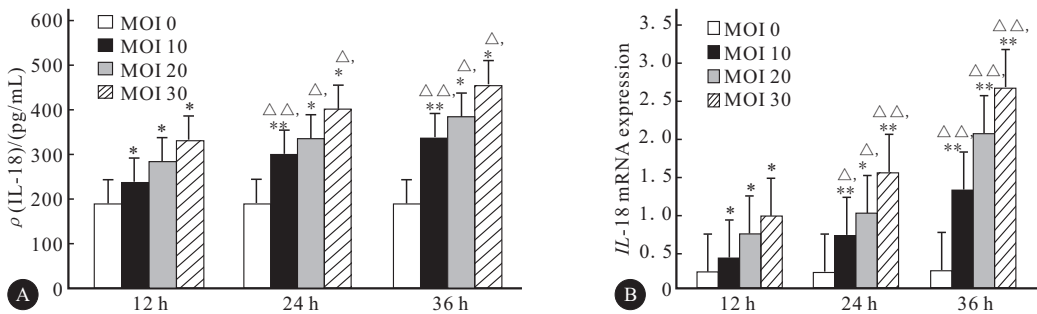


图 5 痤疮丙酸杆菌悬液于刺激 NHEK 后 IL-18 蛋白(A)和基因(B)的表达变化

Fig 5 The protein (A) and gene (B) expressions of IL-18 in NHEKs stimulated by *P. ances* suspension

$\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, vs. former time point in the same MOI group; * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, vs. former MOI group at the same time point

量较阳性对照组下降,差异有统计学意义($P<0.05$),但仍高于空白对照组($P<0.05$)(图 6)。

2.5 NLRP3 siRNA 转染对 NHEK 中 NLRP3 炎性小体蛋白含量的影响

阳性对照组 NHEK 的 NLRP3 炎性小体蛋白表达高于空白对照组($P<0.01$); siRNA 组 NHEK 的 NLRP3 炎性小体表达较阳性对照组下降($P<0.01$),但仍然高于空白对照组($P<0.05$),见图 7。

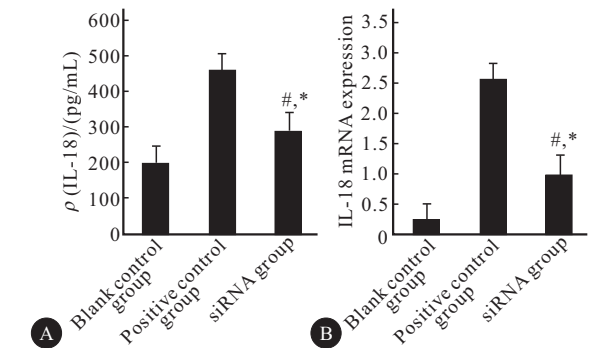


图 6 NLRP3 siRNA 转染前后 IL-18 蛋白(A)和基因(B)的表达水平

Fig 6 The protein (A) and gene (B) expressions of IL-18 in NHEKs transfected NLRP3 siRNA

* $P<0.05$, vs. blank control group; # $P<0.05$, vs. positive control group

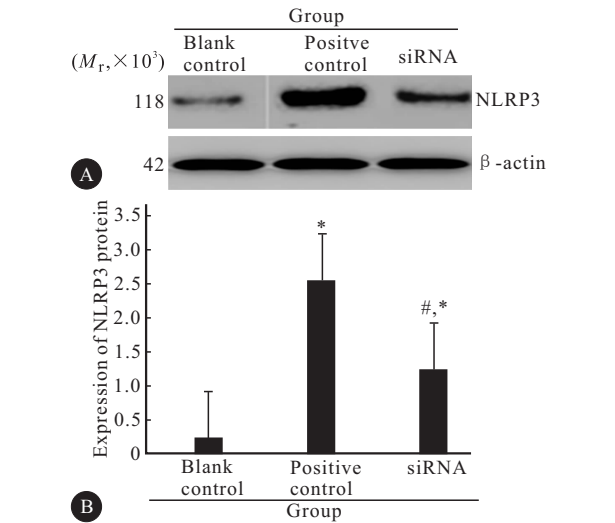


图 7 MOI 30 痤疮丙酸杆菌悬液刺激 NHEK 后 NLRP3 的蛋白表达

Fig 7 The protein level of NLRP3 in NHEKs stimulated by MOI 30 *P. ances* suspension

* $P<0.05$, vs. blank control group; # $P<0.05$, vs. positive control group

3 讨论

痤疮丙酸杆菌为痤疮的重要发病因素之一,针对痤疮丙酸杆菌的治疗目前主要采用抗生素治疗,

随着抗生素的广泛使用,耐药性日趋严重,而有研究发现痤疮丙酸杆菌诱导的痤疮患者分泌 IL 是痤疮发生发展的重要机制^[5]。但是具体哪些炎性因子参与痤疮的炎性反应,现研究尚欠清晰。我们课题组前期^[6]对痤疮患者血液中的细胞因子进行了研究,发现痤疮患者血清中 IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-8 和 IL-6 的水平均高于正常对照组。BEROLIA 等^[7]发现痤疮丙酸杆菌可诱导人中性粒细胞分泌 IL-18 等炎性细胞因子,ASKARI 等^[4]学者发现痤疮患者的血清中的 IL-18 明显升高。AN 等^[8]学者在其动物实验中发现蜂毒可以抑制 IL-18、TNF- α 等炎性因子的释放,从而减轻由痤疮丙酸杆菌引发的炎性反应。这说明将痤疮丙酸杆菌引发痤疮炎性反应的机制阐明清楚,可以寻求出新的治疗靶点。

角质形成细胞是毛囊皮脂腺单位中的主要组成细胞之一,是由痤疮丙酸杆菌诱导的免疫反应的重要反应细胞。WATSON 等^[9]学者发现,在 NHEK 单独培养的情况下,使用中波紫外线去刺激 NHEK, TNF- α 的分泌量与中波紫外线的照射量成正相关关系,在 NHEK 和单核细胞/巨噬细胞共培养的情况下, TNF- α 的增长量与 NHEK 的单独培养下 TNF- α 的增长量并无明显差异,由此看出 NHEK 是形成痤疮炎性反应的主要细胞。

尽管痤疮丙酸杆菌是一种细胞外病原菌,但有学者发现吞噬细胞可以吞噬杆菌属从而诱发机体的慢性炎性反应^[10]。同时有研究发现类似痤疮丙酸杆菌的脓肿分枝杆菌等胞外病原菌以及类似单核细胞增多性李斯特菌等胞内细菌都可以诱导 NLRP3 炎性小体的活化^[11]。本研究表明由痤疮丙酸杆菌诱导的 NHEK 分泌 IL-18 的免疫反应中,NLRP3 炎性小体有重要作用,采用特异性 siRNA 可以直接阻滞 NLRP3 炎性小体的表达, IL-18 的表达出现同步下调的现象,这说明,痤疮丙酸杆菌诱导的 NHEK 分泌 IL-18 的免疫反应可能需要 NLRP3 炎性小体的参与,这与我们已知的皮肤病病原致病机制是一致的。

通过我们的研究可以发现,痤疮丙酸杆菌可以有效刺激 NHEK 合成 NLRP3 炎性小体,以及随后 IL-18 的分泌。这个发现提示我们对于由痤疮丙酸杆菌引起的炎症性皮肤病可以通过选择性的阻滞炎性小体的合成来达到治疗的目的。已有部分研究者发现对于由耐药性痤疮丙酸杆菌导致的痤疮炎性反应,可以通过免疫性治疗来缓解痤疮症状^[12]。我

们的研究着力于痤疮丙酸杆菌致病的免疫性机制,这可为痤疮的非抗生素治疗,甚至是靶向性治疗提供了新思路以及理论依据。但我们此次研究只是从细胞分子水平上进行了研究,缺乏动物及人体相关的研究,在后续研究中应完善相关内容。

参 考 文 献

- [1] LEEMING JP, HOLLAND KT, CUNCLIFFE WJ. The microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions. *Br J Dermatol*, 1988, 118(2): 203-208.
- [2] VOWELS BR, YANG S, LEYDEN JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acn. *Infect Immun*, 1995, 63(8): 3158-3165.
- [3] MIN Q, ASLAN P, MYUNGHW K, *et al.* *Propionibacterium acnes* induces IL-1 β secretion via the NLRP3 inflammasome in human monocytes. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(2): 381-388.
- [4] ASKARI N, GHAZANFARI T, YARAE R, *et al.* Association between acne and serum pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-12) in mustard gas-exposed patients: sardasht-iran cohort study. *Arch Iran Med*, 2017, 20(2): 86-94.
- [5] SALAMON M, SYSAJEDRZEJOWSKA A, LUKAMOWICE J, *et al.* Concentration of selected cytokines in serum of patients with acne rosacea. *Przegl Lek*, 2008, 65(9): 371-374.
- [6] 林新瑜, 罗旭松, 董 巍, 等. 痤疮患者血清白介素-1 α 、白介素-6、白介素-8 和 α -肿瘤坏死因子水平的检测分析. *临床皮肤科杂志*, 2003, 32(6): 335-336.
- [7] BEROLIA S, EVASA R, FREDRIK E, *et al.* *Propionibacterium acnes* activates caspase-1 in human neutrophils. *APMIS*, 2013, 121(7): 652-663.
- [8] AN HJ, LEE WR, KIM KH, *et al.* Inhibitory effects of bee venom on *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory skin disease in an animal model. *Int J Mol Med*, 2014, 34(5): 1341-1348.
- [9] WATSON MK, DAPUL GL. Modulation of cytokine and nitric oxide production by keratinocytes, epithelial cells, and mononuclear phagocytes in a co-culture model of inflammatory acne. *J Drugs Dermatol*, 2012, 11(7): 834-836.
- [10] LIU PT, PHAN J, TANG D, *et al.* CD209 (+) macrophages mediate host defense against *Propionibacterium acnes*. *J Immunol*, 2008, 180(7): 4919-4923.
- [11] KIM S, BAUERNFEIND F, ABLASSER A, *et al.* *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol*, 2010, 40(6): 1545-1551.
- [12] LIU PF, HSIEH YD, LIN YC, *et al.* *Propionibacterium acnes* in the pathogenesis and immunotherapy of acne vulgaris. *Current Drug Metabolism*, 2015, 16(4): 245-254.

(2018-08-17 收稿, 2018-12-14 修回)

编辑 吕 熙