

基于痤疮丙酸杆菌诱导的细胞炎症模型 研究温泉水的抗炎作用

邹粤¹, 张莹莹², 杨芬¹, 李红霞³, 张保超¹, 徐义航¹, 王瑞雪¹, 裴晓方¹

1. 四川大学华西公共卫生学院(华西第四医院), 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西口腔医学院;

3. 重庆市大渡口区疾病预防控制中心

摘要:目的 构建痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)诱导的细胞炎症模型研究某温泉水的抗炎作用。方法 使用人永生化角质形成细胞(human immortalized keratinocytes, HaCaT)进行试验。将温泉水与细胞共孵育,用 CCK-8 法检测细胞存活率,筛选温泉水干预时间;将不同浓度 *P. acnes* 与细胞作用不同时间,检测细胞存活率和计算 *P. acnes* 的 50% 抑制浓度(IC_{50}),并检测 IL-6 含量,确定造模条件;温泉水浸泡细胞 0.5 h 后,再加入 *P. acnes* 共培养作为预防干预组,或先将 *P. acnes* 与细胞共培养,再加入温泉水浸泡细胞 0.5 h 作为治疗干预组,以 CCK-8 法、ELISA 和 RT-PCR 分别检测细胞存活率、促炎细胞因子及其基因以及炎症通路相关基因表达的水平。同时设置生理盐水、自来水、纯水组以及模型和空白对照。结果 温泉水和生理盐水作用 0.5 h 时,细胞存活率分别为 92.7% 和 99.09%,将 0.5 h 作为后续实验的干预时间;OD₆₀₀ 值 0.25 的 *P. acnes* 与细胞共孵育 5 h 作为建模条件。预防式干预,仅温泉水组细胞的 IL-1 β 、IL-8 分泌量、IL-6、TNF- α 、IL-8 及 TLR2、NF- κ B 基因的相对表达量均低于模型组($P < 0.05$),且明显低于生理盐水组。治疗式干预,温泉水组细胞的 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-8 含量以及 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、TLR2 和 NF- κ B 基因表达水平均低于模型组,其中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量以及 IL-6、IL-1 β 、IL-8、TLR2、NF- κ B 基因表达水平也比生理盐水组的明显降低($P < 0.05$)。结论 该温泉水可能通过下调 TLR2 和 NF- κ B 炎症信号通路基因,降低促炎细胞因子分泌实现其抗炎作用。

关键词: 温泉水; 痤疮丙酸杆菌; HaCaT; 抗炎作用

中图分类号: R-33 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)22-4191-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202407106

Study on the anti-inflammatory effect of thermal spring water based on a model of *Propionibacterium acnes*-induced cellular inflammation

ZOU Yue*, ZHANG Ying-ying, YANG Fen, LI Hong-xia, ZHANG Bao-chao,

XU Yi-hang, WANG Rui-xue, PEI Xiao-fang

* West China School of Public Health/ West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To construct a *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)-induced cellular inflammation model and to study the anti-inflammatory effect of a thermal water. **Methods** Utilize human immortalized keratinocytes (HaCaT) was used in the experimentation. Co-incubate the cells with thermal spring water and employ the CCK-8 assay to assess cell viability, screening for the optimal intervention time for the thermal spring water. Expose the cells to varying concentrations of *P. acnes* for different times, measure cell viability, calculate the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of *P. acnes*, and determine the model induction conditions by testing IL-6 levels. The cells were soaked in thermal spring water for 0.5 hours, followed by co-culturing with *P. acnes* as the preventive intervention group, or co-culturing with *P. acnes* first and then soaking the cells in hot spring water for 0.5 hours as the therapeutic intervention group. The levels of cell viability, pro-inflammatory cytokines, and gene expression of inflammation pathways were assessed using the CCK-8 assay, ELISA, and RT-PCR, respectively. Concurrently, control groups with saline solution, tap water, and pure water, along with model and blank controls were set up. **Results** After treating the cells with thermal spring water and physiological saline for 0.5 hours, cell viabilities were 92.7% and 99.09%, respectively, which led to the selection of 0.5 hours as the intervention time for subsequent experiments. *P. acnes* at an OD₆₀₀ of 0.25 was co-incubated with the cells for 5 hours to establish the model. In

基金项目: 宜宾市科技计划资助项目(2021ZYSF006)

作者简介: 邹粤(1999—), 女, 硕士在读, 研究方向: 微生物, 公众健康与检验

通信作者: 裴晓方, E-mail: xpxeiscu@163.com

the preventive intervention, the secretion levels of *IL-1 β* and *IL-8*, as well as the relative expression levels of *IL-6*, *TNF- α* , *IL-8*, and the genes *TLR2* and *NF- κ B* in the cells of the thermal spring water group, were all lower than those in the model group ($P < 0.05$), and significantly lower than those in the saline solution group. In the therapeutic intervention, the contents of *IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α* , and *IL-8*, as well as the expression levels of the genes *IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α* , *TLR2*, and *NF- κ B* in the thermal spring water group, were all lower than those in the model group. The contents of *IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α* , and the expression levels of the genes *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-8*, *TLR2*, and *NF- κ B* were also significantly reduced compared to those in the saline solution group ($P < 0.05$). **Conclusion** This thermal water may exert its anti-inflammatory effect by down-regulating the expression of *TLR2* and *NF- κ B* genes in inflammatory signalling pathway and by reducing the secretion of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: Thermal spring water; *Propionibacterium acnes*; HaCaT; Anti-inflammatory effect

温泉水是一种富含矿物质和微量元素的天然矿物水,泡温泉被认为具有促进血液循环和加速新陈代谢,帮助缓解肌肉紧张和关节疼痛,提高睡眠质量、改善皮肤状况,以及对某些疾病具有预防、辅助治疗及康复作用等健康效应。据此,有些学者进行研究,提供了泡温泉在缓解和辅助治疗呼吸道疾病、风湿病、肌肉骨骼疾病、皮肤病等方面的证据^[1],如 Beylot-Barry 等采用随机对照试验,评估温泉疗法对银屑病患者影响,发现温泉疗法组患者的生活质量指数、疼痛和瘙痒症状均明显改善^[2]。

值得注意的是,上述疾病多与炎症密切相关,因此,有学者采用细胞模型对温泉水的抗炎作用进行了初探。如 Zöller 等^[3]采用含 72% 温泉水的溶液配制细胞培养液,培养 HaCaT 细胞,发现其能显著抑制 1% Triton X-100 溶液引起的细胞损伤等。Karagülle 等人^[4]将高糖 Dulbecco's Modified Eagle 液体培养液分别用温泉水稀释(温泉水浓度分别为 10%、25% 及 50%)后培养 HaCaT 细胞,发现在加入 10% 温泉水的培养组中,*TNF- α* 、*IL-1 α* 和 *VEGF* 的基因表达降低,提示温泉水具有抗炎潜力,并且可能与该温泉水富含二氧化硅和硫化氢相关。

尽管上述研究基于细胞实验证明了温泉水具有潜在的抗炎作用,然而,在这些实验中,是将温泉水作为溶剂,配制细胞培养液,或者将温泉水用培养液稀释后与细胞共孵育,作用时间至少 24 h^[3,5-6]、甚至 72 h^[4],而通常温泉浴的时长仅为 0.5 h,且泡温泉时皮肤接触的是温泉水,而非含培养液的温泉水。因此,本研究拟探讨直接使用温泉水处理 HaCaT 细胞后对细胞的影响,并设置纯水、自来水和生理盐水作为对照组,以比较不同水溶液对细胞影响的差异。

此外,本项目组前期在四川宜宾筠连县巡司温泉村进行人群调查,该地温泉富含溴、碘、锶、锂等微量元素^[7],不少村民自报泡温泉后,痤疮有所改善。痤疮是一种常见的慢性炎症性皮肤病,*P. acnes* 是引发痤疮皮损炎症的重要因素^[8],已有学者将 *P. acnes* 与 HaCaT 细胞共培养,建立痤疮的炎症反应模型,研究

植物提取物的抗炎作用^[9-10],因此,本研究将采用该模型探讨温泉水的抗炎作用,而且采取“预防”和“治疗”两种干预模式,即先用水浸泡细胞再建模和建模后再用水浸泡细胞,检测细胞存活率、促炎细胞因子的含量以及炎症信号通路相关基因表达的水平,评估温泉水对痤疮丙酸杆菌诱导炎症反应的“预防”和“治疗”效果。

综上,本研究拟建立 *P. acnes* 诱导的 HaCaT 细胞炎症模型,评估温泉水的抗炎效果,特别是通过设立生理盐水、自来水和纯水对照实验,评估温泉水的抗炎优势,研究结果将为该温泉水健康效应研究积累宝贵资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 项目组成员于 2023 年 3 月在该温泉出水口采用无菌技术采集温泉水样,过滤后常温保存。经测定温泉水 pH 值为 7.69,属弱碱性,富含大量 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 SO_4^{2-} 和 HCO_3^- 等离子,以及人体必需的 Fe、Cu、Zn、Se 和 Si 等微量元素。

P. acnes (ATCC6919) 和 HaCaT 细胞均为本实验室保存;DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);ELISA 试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);FastPure Complex Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit 试剂盒(南京诺维赞生物科技股份有限公司);MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix 以及 $2 \times \text{SG Fast qPCR Master Mix}$ (生工生物工程(上海)股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验用水的前处理 温泉水、纯水、自来水经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后分装,常温储存备用;生理盐水经高压灭菌后分装备用。

1.2.2 细胞培养 HaCaT 于 DMEM 完全培养基(10% 胎牛血清、0.5 ml 100 \times 青链霉素)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养,当细胞融合率达到 80% ~ 90% 时进行相应实验,或使用 0.25% 胰酶消化、传代。

1.2.3 筛选温泉水作用时间 1×10^5 个/ml 的 HaCaT 细胞 100 μ L 分别加于 96 孔板培养, 24 h 后, 将细胞分别暴露于温泉水、生理盐水、自来水、纯水各 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、3 h 后, 每孔分别加入 110 μ L CCK-8 工作液 (CCK-8 试剂: DMEM 培养基 = 1:10), 继续孵育 1 h, 测定各孔 450 nm 处吸光度, 计算细胞存活率 (细胞存活率 = $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$), 选择对细胞存活率无明显影响的最长时间作为后续的干预时间。

1.2.4 建立 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型 以 3×10^5 个/孔的密度接种 HaCaT 细胞于 24 孔培养板, 24 h 后, 弃原培养液, 每孔分别加入 500 μ L OD_{600} 为 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 的 *P. acnes* 菌悬液, 每个浓度设置 4 个复孔, 并设置细胞对照组。分别培养 3、4、5、6、7 h 后, 采用 CCK-8 法评估 *P. acnes* 对 HaCaT 细胞存活率的影响, 计算 *P. acnes* 的 50% 抑制浓度 (Half Maximal Inhibitory Concentration, IC_{50}), 选出细菌的作用时间和浓度, 并基于选出时间, 采用不同浓度菌悬液作用细胞, 收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 法检测 IL-6 含量, 验证建模是否成功。

1.2.5 温泉水对 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型的作用 本研究分别采用“预防”和“治疗”两种干预方式进行实验。均将 HaCaT 细胞以 3×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板培养 24 h 后弃培养液。“预防式”干预每组分别加入 1 ml 相应水溶液, 空白对照组和模型组每孔加入 1 ml DMEM 培养基, 每组设置 4 个复孔; 培养 0.5 h 后, 空白对照组每孔加入 500 μ L DMEM 培养基, 其余各组每孔加入 500 μ L OD_{600} 为 0.25 的 *P. acnes* 菌悬液, 继续培养 5 h。“治疗式”干预中, 除空白对照组外各组每孔均加入 500 μ L OD_{600} 为 0.25 的痤疮丙酸杆菌菌悬液, 培养 5 h 后, 各组分别加入 1 ml 相应水溶液, 但空白对照组和模型组每孔分别加入 1 ml DMEM 培养基后继续培养。

1.2.5.1 检测细胞存活率 两种方式干预后, 采用 CCK-8 法测定并计算细胞存活率。

1.2.5.2 检测促炎细胞因子水平 两种方式干预后, 收集各孔培养液于 2 500 r/min 离心 5 min, 取上清液, 采用 ELISA 法检测 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 含量, 并用 BCA 蛋白定量法对各细胞因子测定结果进行校正。

1.2.5.3 检测促炎细胞因子、炎症通路基因表达水平 两种方式干预后, 收集细胞, 提取其总 RNA 并逆转录合成 cDNA。按照 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s 的条件进行 RT-PCR, 共 40 个循环。以 *GAPDH* 作为内参基因, 待测基因包括 IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B、

TLR2。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量: $\Delta Ct = Ct_{\text{待测基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{处理组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, 各基因引物见表 1。

表 1 扩增引物序列表

Table 1 Amplification Primer Sequence List

基因	序列(5'→3')
<i>GAPDH</i>	Forward: CAT GGG TGT GAA CCA TGA GAA GTA T Reverse: GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA
<i>IL-6</i>	Forward: CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG AC Reverse: CTC TGG CTT GTT CCT CAC TAC TC
<i>IL-8</i>	Forward: CCA CAC TGC GCC AAC A Reverse: GCA TCT TCA CTG ATT CTT GGA T
<i>IL-1β</i>	Forward: CCA TCA GCC AGG ACA GTC AG Reverse: CCA AAT GTG GCC GTG GTT TC
<i>TNF-α</i>	Forward: CAA TGG CGT GGA GCT GAG AGA TAA C Reverse: GAC GGC GAT GCG GCT GAT G
<i>NF-κB</i>	Forward: ATG GTG GTC GGC TTC GCA AAC Reverse: CGC CTC TGT CAT TCG TGC TTC C
<i>TLR2</i>	Forward: CTA CCA GAT GCC TCC CTC TTA CCC Reverse: ACC AGC TTC CAA AGT CTT CAG TGT G

1.6 统计分析 实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis *H* 检验进行多组间比较, Tukey's、SNK 或 Dunnett-*t* 检验进行组间两两比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 实验结果

2.1 不同水溶液对 HaCaT 细胞存活率的影响 如图 1 所示, 在 0.5~3 h 的作用时间内, 自来水和纯水组 HaCaT 细胞的存活率均低于 10%, 而温泉水和生理盐水作用 0.5 h 时, 细胞存活率分别为 92.7% 和 99.09%, 因此, 将选择 0.5 h 作为后续实验中水溶液的干预时间。

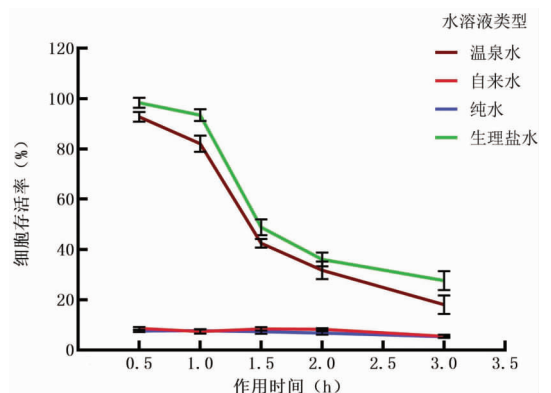
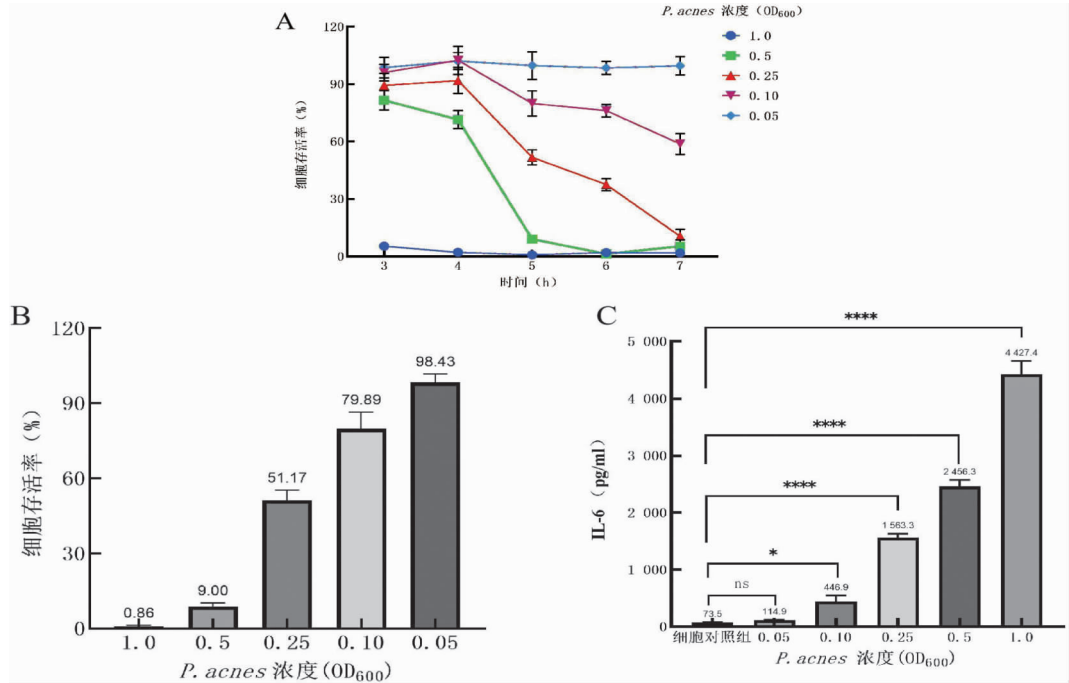


图 1 不同种类水对 HaCaT 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of different types of water on the viability of HaCaT cells

2.2 建立 *P. acnes* 细胞炎症模型的条件 如图 2 - A 所示,不同浓度 *P. acnes* 与 HaCaT 细胞共培养 5 h 后,细胞存活率随菌液浓度增加而降低,且呈剂量 - 反应关系。根据细胞存活率,计算获得 *P. acnes* 对 HaCaT 细胞的 IC_{50} 值为 $OD_{600} = 0.2649$ 。不同浓度 *P. acnes* 作用细胞 5 h 后,促炎细胞因子 IL - 6 分泌量显著增

加($P < 0.05$)。结合 IC_{50} 值及 IL - 6 分泌量,选取对细胞产生一定损伤,但尚未造成细胞完全死亡,且可使 IL - 6 分泌量显著增加的菌悬液浓度和作用时间,即 OD_{600} 为 0.25 的 *P. acnes* 菌悬液与细胞共孵育 5 h 作为建立炎症细胞模型的条件。



注:图 A,不同浓度 *P. acnes* 作用不同时间后 HaCaT 细胞存活率;图 B,不同浓度 *P. acnes* 作用 5 h 后 HaCaT 细胞存活率;图 C,不同浓度 *P. acnes* 作用 HaCaT 细胞后 IL - 6 的分泌量;与对照组相比, * $P < 0.05$, * * * $P < 0.0001$, ns 为差异无统计学意义。

图 2 *P. acnes* 诱导 HaCaT 细胞炎症模型建立
Fig. 2 Modeling of *P. acnes* - induced HaCaT cell inflammation

2.3 不同水溶液对 *P. acnes* 所致细胞炎症的改善作用

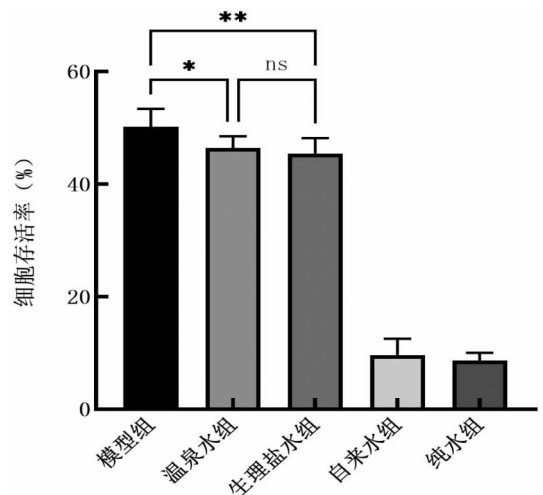
2.3.1 “预防式”干预的作用

(1)对炎症模型细胞存活率的影响

如图 3 所示,模型组、温泉水组以及生理盐水的细胞存活率分别为 50.17%、46.40% 和 45.45%,与模型组相比,温泉水及生理盐水组细胞的存活率均有所下降,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),但两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而自来水和纯水组作用 0.5 h 后,细胞存活率均降低至 10% 以下,因此后续实验不再设置该两组。

(2)“预防式”干预对促炎细胞因子水平以及相关基因表达的影响

如图 4 所示,与模型组相比,温泉水组的 IL - 1 β 、IL - 8 分泌量降低,IL - 6、TNF - α 、IL - 8 及 TLR2、NF - κ B 基因的相对表达量也明显降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),IL - 6、TNF - α 的分泌量以及

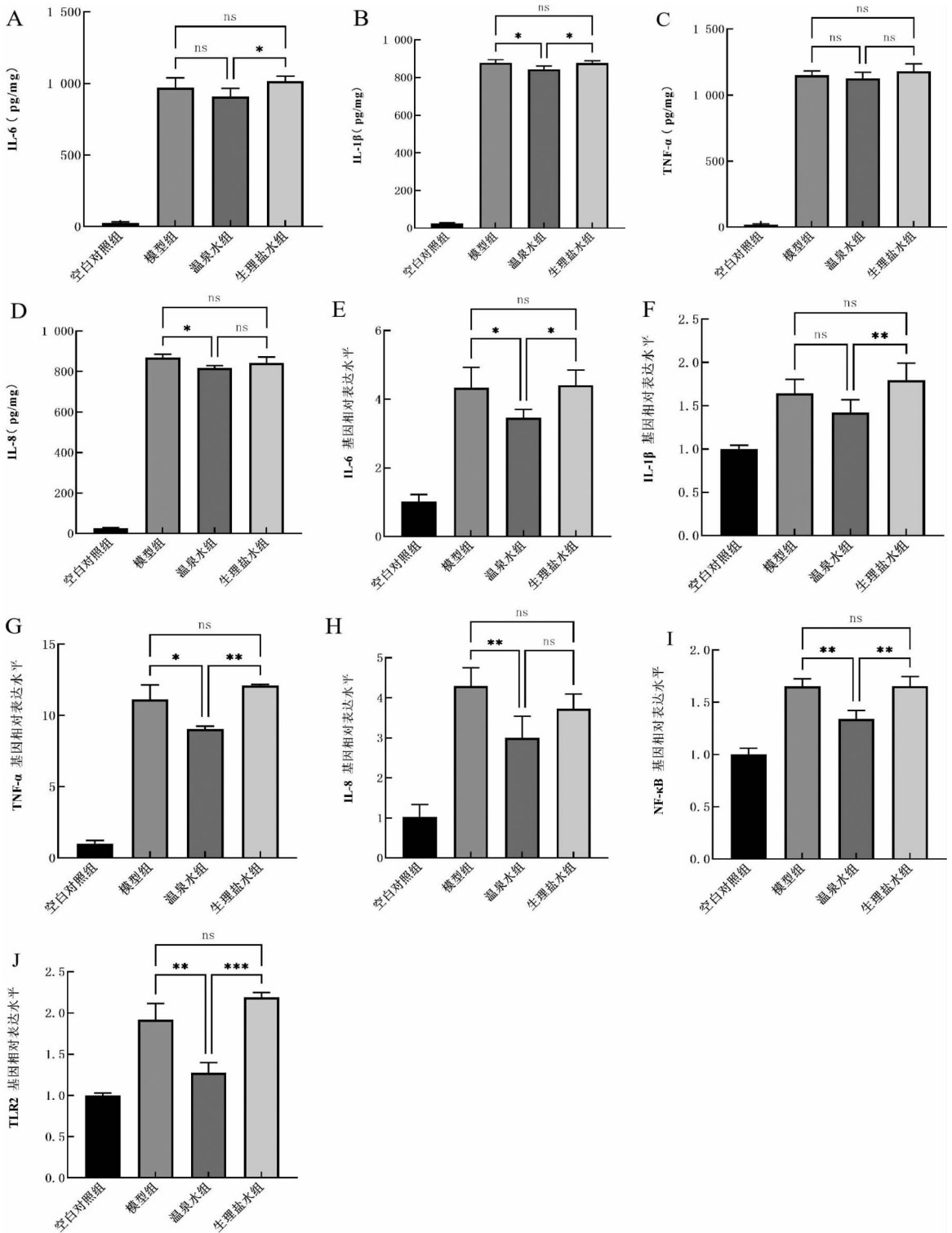


注: * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$, ns 为差异无统计学意义。

图 3 “预防式”干预对炎症模型细胞存活率的影响
Fig. 3 Effect of "prophylactic" interventions on cell survival in models of inflammation

IL-1β 基因的相对表达量也有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而生理盐水组的这些因子及其相关基因表达均无明显降低。进一步与生理盐水组相比,温泉水组 *IL-6*、*IL-1β* 含量,

TNF-α 及 *NF-κB*、*TLR2* 相对表达量均降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果提示,进行预防式干预,温泉水处理 0.5 h 的抗炎作用优于生理盐水。



注:图 A, *IL-6* 分泌量;图 B, *IL-1β* 分泌量;图 C, *TNF-α* 分泌量;图 D, *IL-8* 分泌量;图 E, *IL-6* 基因相对表达量;图 F, *IL-1β* 基因相对表达量;图 G, *TNF-α* 基因相对表达量;图 H, *IL-8* 基因相对表达量;图 I, *NF-κB* 基因相对表达量;图 J, *TLR-2* 基因相对表达量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns 为差异无统计学意义。

图 4 “预防式”干预对促炎细胞因子水平以及相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of "preventive" interventions on pro-inflammatory cytokine levels and related gene expression

2.3.2 “治疗式”干预的作用

(1)“治疗式”干预对炎症模型细胞存活率的影响

如图 5 所示,模型组、温泉水组以及生理盐水组的细胞存活率分别为 48.72%、43.12% 和 43.48%,与模型组相比,温泉水组和生理盐水组细胞存活率均有所下降,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),但温泉水组和生理盐水组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),自来水和纯水组细胞存活率均低于 10%,故后续实验也不再设置该两组。

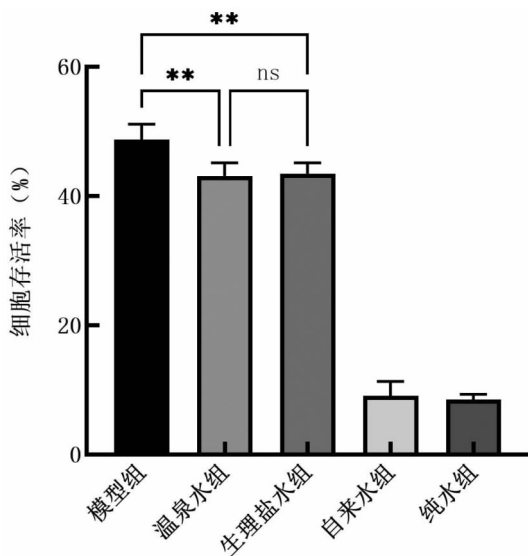


图 5 “治疗式”干预对炎症模型细胞存活率的影响

Fig. 5 Effect of “therapeutic” interventions on cell survival in models of inflammation

(2)“治疗式”干预对促炎细胞因子水平以及相关基因表达的影响

如图 6 所示,与模型组相比,温泉水组的 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-8$ 分泌量降低, $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 基因及 $TLR2$ 、 $NF-\kappa B$ 基因的相对表达量也明显降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$), $IL-8$ 基因的相对表达量也有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而生理盐水组的这些因子及其相关基因表达均无明显降低。进一步与生理盐水组相比,温泉水组 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 含量, $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-8$ 及 $TLR2$ 、 $NF-\kappa B$ 的相对表达量均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。说明温泉水抗炎效果亦优于生理盐水。

3 讨论

尽管已有学者采用细胞模型对温泉水的抗炎作用进行了初探,但在实验中他们所采用的干预方式不

能体现泡温泉的实际情况,一是作用时间长,二是作用过程中均含有细胞培养液中的营养成分,因此,本研究创新性建立了基于 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型研究温泉水抗炎作用的方法,通过与生理盐水、自来水、纯水处理组比较,发现四川省筠连县巡司的温泉水能够明显降低 *P. acnes* 诱导产生的促炎细胞因子的含量以及炎症信号通路相关基因表达的水平,从体外实验证明了该温泉水具有潜在的抗炎作用。需要说明的是,本研究在建模前首先采用纸片法和牛津杯法评估了温泉水对 *P. acnes* 的抑制作用,发现温泉水本身对该菌并无直接的抑菌效果(结果未在正文中呈现),故采用 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型是可行的。

本研究选用的 HaCaT 细胞保留了分化能力^[11]、表达参与病原体识别的 Toll 样受体(Toll-Like Receptor, TLR)^[12]以及在细菌刺激下产生多种细胞因子的能力^[13-14],是皮肤生物学研究中常用的细胞类型之一。该细胞与细菌共培养,会表现出对细菌的识别和反应。有研究发现,*P. acnes* 能产生降解皮肤成分的酶,并刺激角质细胞释放促炎细胞因子,如 $IL-6$ 、 $IL-8$ 、 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$,进而引发剧烈的炎症反应^[15-17],而且通过被皮肤表面的 TLR 受体识别后,激活细胞内 TLRs 和下游信号细胞核因子 $NF-\kappa B$,促进炎症细胞因子等靶基因的显著表达^[18]。因此,基于 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型已被用于研究植物提取物的抗炎作用^[9,19],本研究成功建立了该模型并用于温泉水的抗炎作用研究。

已有温泉水抗炎作用研究中,尽管采用了 HaCaT 细胞,但是温泉水的作用条件是在有细胞培养液存在的情况下,而且作用时间至少 24 h,与人们泡温泉的情形相距甚远,且未采用 *P. acnes* 共培养建立炎症模型。本研究首先通过测定水溶液作用后 HaCaT 细胞的存活率,发现用温泉水和生理盐水浸泡细胞 0.5 h,细胞存活率分别为 92.7% 和 99.09%,因此,选择 0.5 h 作为干预时间,这与人们在实际生活中浸泡温泉的持续时间相一致。进一步通过测定不同浓度 *P. acnes* 与 HaCaT 细胞共培养 5 h 后的细胞存活率及 $IL-6$ 的含量,确定了 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型的建模条件。在此基础上,采用两种干预模式作用于细胞炎症模型,检测发现用纯水和自来水浸泡细胞 0.5 h 后,细胞存活率低于 10%,而温泉水组和生理盐水组的细胞存活率与模型对照组接近,分析由于纯水和自来水浸泡组的低渗透压作用,导致细胞死亡。非常有趣的是,两种干预模式的结果均显示,温泉水组促炎细胞因子的含量以及相关基因表达的水平均低于生理盐水组,说明该温泉水具有潜在的抗炎作用,而且可能具有预防和辅助治疗痤疮的效果,这与本研

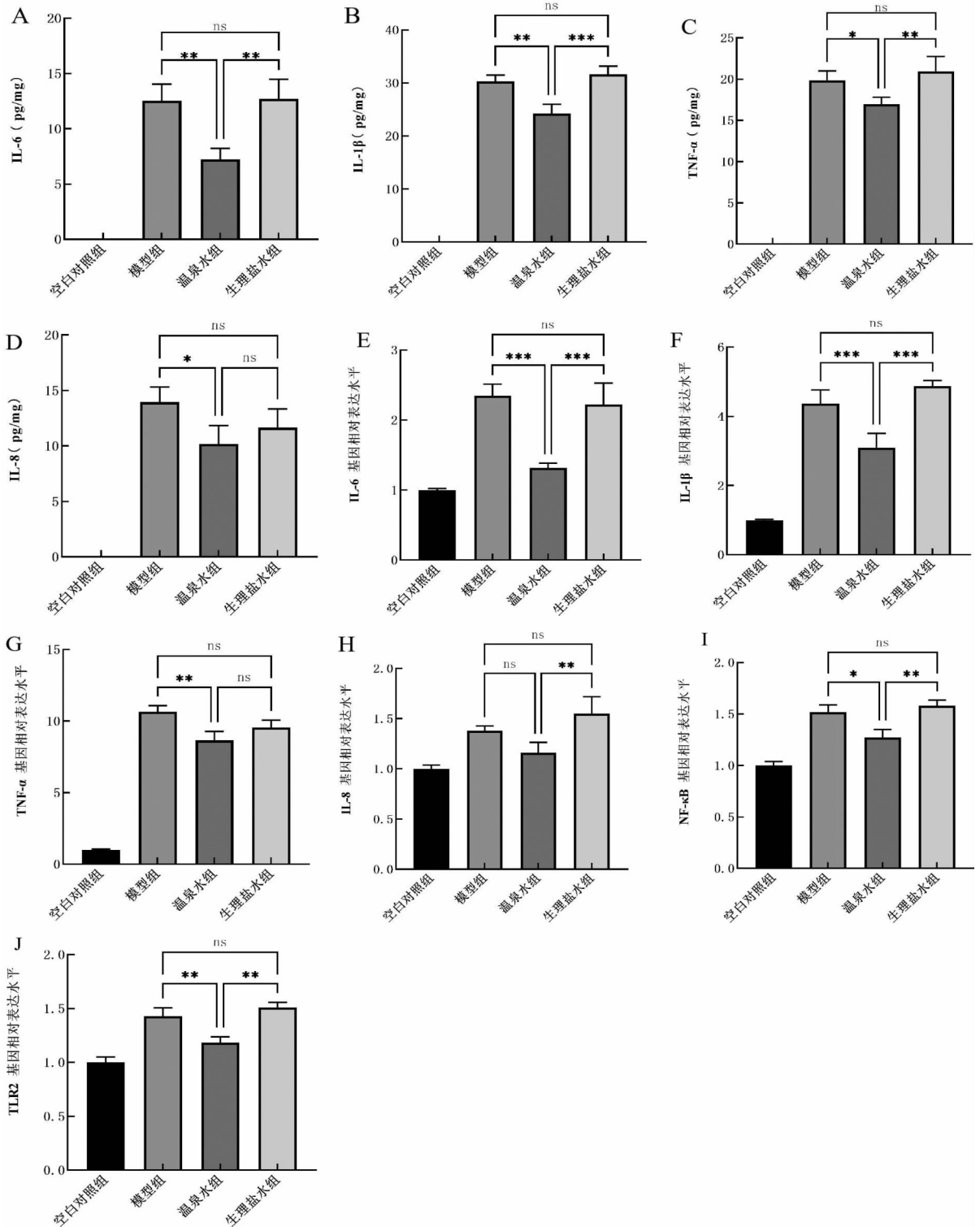


图 A, IL-6 分泌量; 图 B, IL-1β 分泌量; 图 C, TNF-α 分泌量; 图 D, IL-8 分泌量; 图 E, IL-6 基因相对表达量; 图 F, IL-1β 基因相对表达量; 图 G, TNF-α 基因相对表达量; 图 H, IL-8 基因相对表达量; 图 I, NF-κB 基因相对表达量; 图 J, TLR-2 基因相对表达量。

图 6 “治疗式”干预对促炎细胞因子水平以及相关基因表达的影响

Fig. 6 Effects of “therapeutic” interventions on pro-inflammatory cytokine levels and related gene expression

究人群调查中发现的泡该温泉似乎对痤疮有改善作用的结果一致。

筠连巡司温泉, 位于四川省筠连县巡司镇, 富含多种矿物质和微量元素, 水温 51.2℃^[7]。据报道, 长

期浸泡该温泉的居民, 其风心病、风湿性关节炎等慢性疾病及感染性疾病的患病率均较低^[20]。温泉水为何能起到抗炎效果, 可能与其化学成分、热和免疫调节作用有关^[21]。通过水质分析发现, 该温泉属于典

型的 NaCl 型温泉 (Na^+ 为 1 566.67 mg/L, Cl^- 为 2 238.00 mg/L), 但在本研究中, 生理盐水组并未表现出有降低炎性细胞因子的作用, 推测其抗炎作用可能与其富含溴、碘、锶、锂^[7] 以及硫酸盐、碳酸氢盐、硅、硼等成分相关。Karagulle 等人^[4] 的研究发现, 硅、锌^[22]、碳酸氢钠和硼成分也可能是温泉水抑制促炎细胞因子的原因。另有学者将白细胞介素的抑制归因于硒和锶^[23]。而上述成分在该温泉水中的含量不低。

综上, 本研究基于 *P. acnes* 诱导的细胞炎症模型成功建立了体外研究温泉水抗炎作用的方法, 发现四川省筠连县巡司的温泉水具有潜在的抗炎作用, 研究结果对进一步探索该温泉的健康效应、促进该温泉资源的开发具有重要的意义, 同时也创新了该模型用于研究水溶液的体外抗炎作用的干预方式, 具有进一步的应用价值。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Araujo ARTS, Sarraguça MC, Ribeiro MP, et al. Physicochemical fingerprinting of thermal waters of Beira Interior region of Portugal [J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2017, 39(3): 483–496.
- [2] Beylot-Barry M, Mahé E, Rolland C, et al. Evaluation of the benefit of thermal spa therapy in plaque psoriasis: the PSOTHERMES randomized clinical trial [J]. *International Journal of Biometeorology*, 2022, 66(6): 1247–1256.
- [3] Zöllner N, Valesky E, Hofmann M, et al. Impact of different spa waters on inflammation parameters in human keratinocyte HaCaT cells [J]. *Annals of Dermatology*, 2015, 27(6): 709–714.
- [4] Karagülle MZ, Karagülle M, Kılıç S, et al. In vitro evaluation of natural thermal mineral waters in human keratinocyte cells: a preliminary study [J]. *International Journal of Biometeorology*, 2018, 62(9): 1657–1661.
- [5] Duangjit S, Somsuwan B, Inpeng S, et al. The specific properties of Phusang hot spring water: safety and benefits [J]. *Cosmetics*, 2022, 9(5): 89.
- [6] Silva A, Oliveira AS, Vaz CV, et al. Anti-inflammatory potential of Portuguese thermal waters [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 22313.
- [7] 陈茂勋. 四川省筠连温泉岩溶风景名胜区的特点及其与美国温泉国家公园的对比 [J]. *四川地质学报*, 1992, (2): 147–152. Chen MX. Characteristics of the Gyunlian Hot Springs Karst Scenic Area in Sichuan Province and its comparison with the Hot Springs National Park in the United States [J]. *Sichuan Geological Journal*, 1992, (2): 147–152. (In Chinese)
- [8] Wang X, Wu Y, Zhao P, et al. The causal relationship between serum metabolites and acne vulgaris: a Mendelian randomization study [J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 11045.
- [9] Hwang DH, Lee DY, Koh PO, et al. Rosa davurica Pall. Improves *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in Mouse Ear Edema Model and suppresses pro-inflammatory chemokine production via MAPK and NF- κ B pathways in HaCaT cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1717.
- [10] Eom SH, Lee EH, Park K, et al. Eckol from *Eisenia bicyclis* inhibits inflammation through the Akt/NF- κ B signaling in *Propionibacterium acnes*-induced human Keratinocyte HaCaT Cells [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2017, 41(2): e12312.
- [11] Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line [J]. *Journal of Cell Biology*, 1988, 106(3): 761–771.
- [12] Begon E, Michel L, Flageul B, et al. Expression, subcellular localization and cytokine modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin [J]. *European Journal of Dermatology*, 2007, 17(6): 497–506.
- [13] Wang B, Ruiz N, Pentland A, et al. Keratinocyte proinflammatory responses to adherent and nonadherent group A streptococci [J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(6): 2119–2126.
- [14] Ruiz N, Wang B, Pentland A, et al. Streptolysin O and adherence synergistically modulate proinflammatory responses of keratinocytes to group A streptococci [J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 27(2): 337–346.
- [15] Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, et al. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates [J]. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*, 2018, 32 Suppl 2: 5–14.
- [16] Tyner H, Patel R. *Propionibacterium acnes* biofilm – A sanctuary for *Staphylococcus aureus*? [J]. *Anaerobe*, 2016, 40: 63–67.
- [17] Castillo DE, Nanda S, Keri JE. *Propionibacterium* (*Cutibacterium*) *acnes* bacteriophage therapy in Acne: Current evidence and future perspectives [J]. *Dermatology and Therapy*, 2019, 9(1): 19–31.
- [18] Zaenglein AL. Acne vulgaris [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 379(14): 1343–1352.
- [19] 严纯, 王瑶, 何方婷, 等. 花椒精油对痤疮丙酸杆菌所致细胞炎症的抑制作用 [J]. *现代预防医学*, 2019, 46(14): 2617–2621. Yan C, Wang Y, He FT, et al. Inhibitory effect of pepper essential oil on cellular inflammation caused by *Propionibacterium acnes* [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46(14): 2617–2621. (In Chinese)
- [20] 吴全珍, 胡颖嘉, 杨春璇, 等. 筠连犀牛温泉水浴人群健康状况的流行病学调查 [J]. *中国疗养医学*, 1993, (2): 15–19. Wu QZ, Hu YJ, Yan CJ, et al. Epidemiologic survey on the health status of people bathing in the rhinoceros hot spring in Gyunlian [J]. *Chinese Convalescent Medicine*, 1993, (2): 15–19. (In Chinese)
- [21] Eliasse Y, Galliano MF, Redoules D, et al. Effect of thermal spring water on human dendritic cell inflammatory response [J]. *Journal of Inflammation Research*, 2019, 12: 181–194.
- [22] Prasad AS. Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of Zinc in degenerative disorders of aging [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 2014, 28(4): 364–371.
- [23] Chiarini A, Dal Pra I, Pacchiana R, et al. Comano's (Trentino) thermal water interferes with the expression and secretion of vascular endothelial growth factor – A protein isoforms by cultured human psoriatic keratinocytes: a potential mechanism of its anti-psoriatic action [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2006, 18(1): 17–25.