

• 研究论文 •

羧胺三唑通过下调细胞因子和抗菌肽 S100A7 的表达改善实验性银屑病

刘婧雯, 杨 梅, 朱 蕾*

(中国医学科学院基础医学研究所、北京协和医学院基础学院, 北京 100005)

摘要: 应用咪喹莫特 (imiquimod, IMQ) 诱导的银屑病小鼠模型以及五联因子 (a mixture of five proinflammatory cytokines, M5) 诱导的银屑病角质形成细胞模型, 评价羧胺三唑 (carboxyamidotriazole, CAI) 对银屑病的治疗效果和可能机制。银屑病皮损面积和疾病严重程度 (psoriasis area and severity index, PASI) 评分评估小鼠皮损严重程度, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色观察皮肤病理学变化, 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测皮肤中细胞因子水平, 转录组测序分析差异表达基因, 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测 mRNA 表达。动物实验经中国医学科学院基础医学研究所实验动物管理与伦理委员批准 (批准号: ACUC-A02-2022-115)。结果显示, 与 IMQ 组相比, CAI 显著改善小鼠银屑病样皮损, 降低 PASI 评分, 减轻皮损病理变化和评分, 减少皮损处促炎细胞因子水平, 转录组分析结果显示 CAI 可能通过调节角质形成细胞及其介导的表皮角化而发挥作用, qPCR 验证发现 CAI 能够下调差异表达基因 *S100a7*; 进一步使用 M5 刺激 HaCaT 细胞构建银屑病角质形成细胞模型, CAI 能够抑制 M5 诱导的 *S100a7* 以及细胞因子的 mRNA 水平。综上, CAI 可能对银屑病具有良好治疗作用, 其作用机制与调节角质形成细胞功能以及减少细胞因子和 *S100a7* 表达有关。

关键词: 羧胺三唑; 银屑病; 咪喹莫特; HaCaT 细胞; 细胞因子; S100A7

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-3085-09

Carboxyamidotriazole ameliorates experimental psoriasis via downregulating the expressions of cytokines and antimicrobial peptide S100A7

LIU Jing-wen, YANG Mei, ZHU Lei*

(Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: This study aimed to investigate the therapeutic effect and possible mechanism of carboxyamidotriazole (CAI) on imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like mice model and M5 (IL-1 α , IL-17A, IL-22, TNF- α and oncostatin M)-induced keratinocytes model of psoriasis. The severity of psoriasis-like skin lesion in mice was evaluated by psoriasis area and severity index (PASI) score. The histopathological changes of skin were examined by hematoxylin-eosin staining and Baker score was calculated. The levels of pro-inflammatory cytokines in skin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Transcriptome sequencing technique was used to analyze differentially expressed genes (DEGs) and real-time quantitative PCR (qPCR) was used to detect mRNA expressions. The animal experiments conducted in this study were approved by the Institutional Animal Care Use & Welfare Committee of Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Science (grant No. ACUC-A02-2022-115). The results showed that CAI significantly improved the severity of psoriasis-like lesion,

收稿日期: 2024-06-20; 修回日期: 2024-08-01.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-005); 中央高水平医院临床科研业务费 (2022-PUMCH-C-025).

*通讯作者 Tel: 86-10-69156402, E-mail: leizhu2004@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0583

reduced PASI score, attenuated pathological changes, decreased Baker score and inhibited the levels of IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23 and TNF- α in skin of IMQ-induced mice. Transcriptome sequencing analysis revealed that regulating keratinocytes and their mediated keratinization might be involved in the mechanism of CAI. Further qPCR study validated that CAI down-regulated the mRNA expression of DEG *S100a7*. Moreover, the keratinocyte model of psoriasis was established by stimulating HaCaT cells by M5. It was shown that CAI decreased the mRNA expression levels of *S100a7*, *Il1 β* , *Il6*, *Il17*, *Il23* and *Ccl20*, which were up-regulated by M5 stimulation. In conclusion, CAI might have a good therapeutic efficacy on psoriasis, and its mechanism was related to regulate the function of keratinocytes and downregulate cytokines and *S100a7*.

Key words: carboxyamidotriazole; psoriasis; imiquimod; HaCaT cell; cytokine; S100A7

银屑病是一种由免疫介导的慢性、炎症性和系统性疾病,全球患病率约2%~3%,且逐年上升^[1]。其典型临床表现为鳞屑性红斑或丘疹,并可合并多种共病,包括心血管疾病、代谢性疾病、肝肾疾病和心理疾病等,严重影响患者的身心健康^[2,3]。银屑病发病机制复杂,至今尚未完全阐明。近年来,大量文献^[4-6]表明,免疫细胞异常活化导致的细胞因子紊乱以及角质形成细胞(keratinocyte, KCs)功能障碍是银屑病发病的重要机制,其中IL-23/辅助性T细胞17(T helper 17, Th17)通路过度活化处于核心地位,并成为重要的药物靶点。一般认为,诱发因素刺激KCs产生的抗菌肽能够与自身DNA或RNA结合形成复合物,激活树突状细胞(dendritic cells, DCs)使其释放IL-23,诱导Th17细胞活化并产生IL-17和IL-22,进一步刺激KCs过度增殖以及分泌更多的抗菌肽、IL-23和其他细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等)和趋化因子,形成持续放大的炎症环境,加剧银屑病慢性炎症病变过程^[7-9]。

银屑病易反复发作,现有治疗主要包括外用药物、物理治疗、传统药物和生物制剂^[10]。但这些治疗方法未能达到治愈银屑病的目的,且存在用药安全问题:外用药物疗效有限,且会引起皮肤萎缩和局部刺激;物理疗法大大增加患者皮肤癌的患病率;甲氨蝶呤、环孢素等传统药物可引起包括骨髓抑制、肝肾损伤、胃肠道反应等不良反应;IL-17抑制剂、IL-23抑制剂及TNF- α 抑制剂等生物制剂虽然表现出更好疗效,但仍不能达到治愈,且价格较高,需注射给药,并有引起感染和诱发肿瘤的风险^[10]。因此,开发安全、有效的新型药物对银屑病的临床治疗具有重要意义。

羧胺三唑(carboxyamidotriazole, CAI)是本课题组长期研究的小分子化合物。前期研究表明,CAI不仅具有非细胞毒类抗肿瘤作用,还在多种急、慢性炎症模型中表现出显著的抗炎作用,且其抗炎机制与下调细胞因子和炎症介质有关^[11-15]。在角叉菜胶诱导的大鼠急性关节炎模型^[16]和大鼠佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)模型^[11,15]中,CAI能明显减轻大鼠关节肿

胀和炎症,并降低炎症组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂和NO等水平;在2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的大鼠结肠炎模型中^[12],CAI通过下调多种细胞因子水平,抑制肠黏膜的炎症反应,保护和维持肠道的完整性。尤其在国内外已完成的多项以肿瘤为适应症的I、II、III期临床试验中,CAI显示出较低的毒副作用,患者耐受性好^[17-21]。鉴于细胞因子介导的炎症免疫反应在银屑病发病中的重要作用,本研究拟采用咪喹莫特(imiquimod, IMQ)诱导的银屑病小鼠模型^[22]以及五联因子(a mixture of five proinflammatory cytokines, M5,含IL-1 α 、IL-17A、IL-22、TNF- α 和抑癌蛋白M)诱导的银屑病HaCaT KCs模型^[23-25],评价CAI对银屑病的治疗效果。

材料与amp;方法

实验动物 BALB/c小鼠,雌性,7周龄,10~22 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号SCXK(京)2024-0003。所有实验均在中国医学科学院基础医学研究所SPF级动物实验中心进行,温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度(50 \pm 10)%、12 h光照/黑暗交替,小鼠自由饮水、饮食。动物实验方案遵循中国医学科学院基础医学研究所实验动物管理与伦理委员会规定且通过批准(ACUC-A02-2022-115)。

实验材料 羧胺三唑由中国医学科学院药物研究所合成,含量>99.9%,动物实验中用PEG 400配置成所需浓度,细胞实验中用DMSO配置成40 mmol \cdot L⁻¹贮存液,保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中,临用前用MEM培养基稀释至所需浓度。HaCaT细胞(中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心);IMQ(四川明欣药业有限公司,每克乳膏含50 mg IMQ,批号:40210902);司库奇尤单抗(interleukin-17 antibody, IL-17 Ab,诺华制药有限公司,批号:SCEW3);IL-1 α (货号:200-01A)、IL-17A(货号:200-17)、IL-22(货号:200-22)、TNF- α (货号:300-01A)和抑癌蛋白M(货号:300-100)均购自美国PeproTech公司;小鼠IL-1 β (货号:432615)、IL-6

(货号: 431304)、TNF- α (货号: 430915) ELISA 试剂盒均购自美国 BioLegend 公司; 小鼠 IL-17A ELISA 试剂盒 (深圳达科为生物技术股份有限公司, 货号: 1211702); 小鼠 IL-23 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号: E-MSEL-M0037); RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (货号: DP431) 和 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂盒 (货号: DP424) 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (货号: R223-01) 和 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (货号: Q712-02) 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

仪器 EVOS 多功能细胞观测显微镜、NanoDrop one 超微量分光光度计、325 型 Finesse 旋转石蜡切片片机、Series II 型细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); MiniAmp™ Thermal Cycler PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); TSJ-SD 脱水机、BMJ 型包埋机 (常州市中威电子仪器有限公司); Synergy H1 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

银屑病小鼠模型建立及给药 BALB/c 小鼠适应性饲养 1 周后, 背部 2 cm×3 cm 范围脱毛。随机分为正常组 (control)、IMQ 组、CAI (1.25、2.5 和 5 mg·kg⁻¹) 组及阳性药 IL-17 Ab 组 (40 mg·kg⁻¹)。除 control 组外的小鼠背部皮肤涂抹 62.5 mg IMQ 乳膏, 每日 1 次, 连续 6 天, 诱导银屑病样皮损。从造模第 1 天开始, IMQ 组灌胃给予 CAI 的溶剂 PEG 400, CAI 组灌胃给予不同浓度 CAI, 每日 1 次, 连续 6 天。IL-17 Ab 组小鼠在造模当日皮下注射给药。

小鼠背部皮肤观察和 PASI 评分^[26] 每日同一时间段观察小鼠背部皮损处情况并用数码相机拍照记录。采用银屑病皮损面积和疾病严重程度 (psoriasis area and severity index, PASI) 评分标准, 对皮损处红斑、鳞屑和增厚给予 0~4 的积分, 将 3 项积分相加得到总分。PASI 评分标准: 无, 0 分; 轻度, 1 分; 中度, 2 分; 重度, 3 分; 极重度, 4 分。

组织病理学检查 第 7 天处死小鼠, 取背部皮肤, 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 对切片进行 Baker 评分^[26]。每个皮肤组织制作两张 HE 切片, 每张切片选取 5 个视野, 具体评分标准: 角质层中出现 Munro 微脓肿 2.0 分, 角化过度 0.5 分, 角化不全 1.0 分; 表皮层中颗粒层变薄或消失 1.0 分, 棘层增厚 1.0 分, 皮突延长根据轻、中、重度分别计 0.5、1.0、1.5 分; 真皮层中乳突上顶 0.5 分, 毛细血管扩张 0.5 分, 炎细胞浸润根据轻、中、重度分别计 0.5、1.0、1.5 分。

皮肤组织中细胞因子含量测定 采用 ELISA 法

检测皮肤组织匀浆中 IL-1 β 、IL-6、IL-17A、IL-23 和 TNF- α 的含量。

转录组测序 委托北京诺禾致源科技股份有限公司对小鼠皮肤组织进行转录组测序。采用 DESeq2 软件对基因表达进行差异分析, 筛选 $|\log_2(\text{fold change})| > 1.5$ 和 $P < 0.05$ 的基因作为差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 使用 DAVID 网站 (<https://david.ncifcrf.gov>) 进行 GO 及 KEGG 富集分析。

M5 诱导的银屑病 HaCaT 细胞模型^[23] 及给药 取培养至对数生长期的 HaCaT 细胞接种于 6 孔板, 使用 M5 (IL-1 α 、IL-17A、IL-22、TNF- α 和抑癌蛋白 M, 各因子终浓度均为 10 ng·mL⁻¹) 刺激细胞并同时用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAI 处理, 37 °C、5% CO₂ 孵育相应时间后, 收集细胞, 进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)。

qPCR 实验 提取皮肤组织和 HaCaT 细胞总 RNA, 测定总 RNA 浓度, 逆转录合成 cDNA。随后进行实时定量 PCR 反应, 根据测得的 C_T 值, 以 β -actin 为内参基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_T$} 法计算目标基因的相对表达量, 引物序列见表 1。

Table 1 The primer sequences of qPCR. IL: Interleukin

Gene		Primer sequence (5' - 3')
<i>h-Il6</i>	Forward	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG
<i>h-Il6</i>	Reverse	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
<i>h-Il1β</i>	Forward	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA
<i>h-Il1β</i>	Reverse	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
<i>h-Il17</i>	Forward	TCCCACGAAATCCAGGATGC
<i>h-Il17</i>	Reverse	GGATGTTTCAGGTTGACCATCAC
<i>h-Il23</i>	Forward	CTCAGGGACAACAGTCAGTTC
<i>h-Il23</i>	Reverse	ACAGGGTATCAGGGAGCA
<i>h-S100a7</i>	Forward	CCTTAGTGCCTGTGACAA
<i>h-S100a7</i>	Reverse	CTGCTGTGGTAGTCTGT
<i>h-β-actin</i>	Forward	GAGCACAGAGCCTCGCCTTT
<i>h-β-actin</i>	Reverse	TCATCATCCATGGTGAGCTGG
<i>m-S100a7a</i>	Forward	GCACCAAGAGCAACAGACTC
<i>m-S100a7a</i>	Reverse	CACTGGTGTGTCTGGCATGA
<i>m-β-actin</i>	Forward	GTGACGTTGACATCCGTAAGA
<i>m-β-actin</i>	Reverse	GCCGGACTCATCGTACTCC

统计学方法 应用 GraphPad Prism7.0 进行数据分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

结果

1 CAI 对 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮损的影响

如图 1A 所示, control 组小鼠背部皮肤在整个实验期间未见改变; 而 IMQ 组小鼠的背部皮肤在第 3 天开始出现红斑、褶皱, 此后, 红斑颜色加深、皮肤出现鳞屑且增厚, 而 CAI 各剂量组以及 IL-17 Ab 组对 IMQ 诱导

的红斑、鳞屑和增厚等银屑病样皮损症状均具有缓解作用。PASI评分结果显示,IMQ组小鼠的红斑评分从第2天、鳞屑和增厚评分从第4天、总分评分从第3天开始较control组显著增高 ($P < 0.01, P < 0.001$); 而CAI (1.25、2.5和5 mg·kg⁻¹) 及IL-17 Ab组的上述4项

评分均被不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$, 图1B~E)。

2 CAI对IMQ诱导的银屑病小鼠皮肤组织病理学改变的影响

HE染色结果显示(图2A), control组小鼠皮肤结

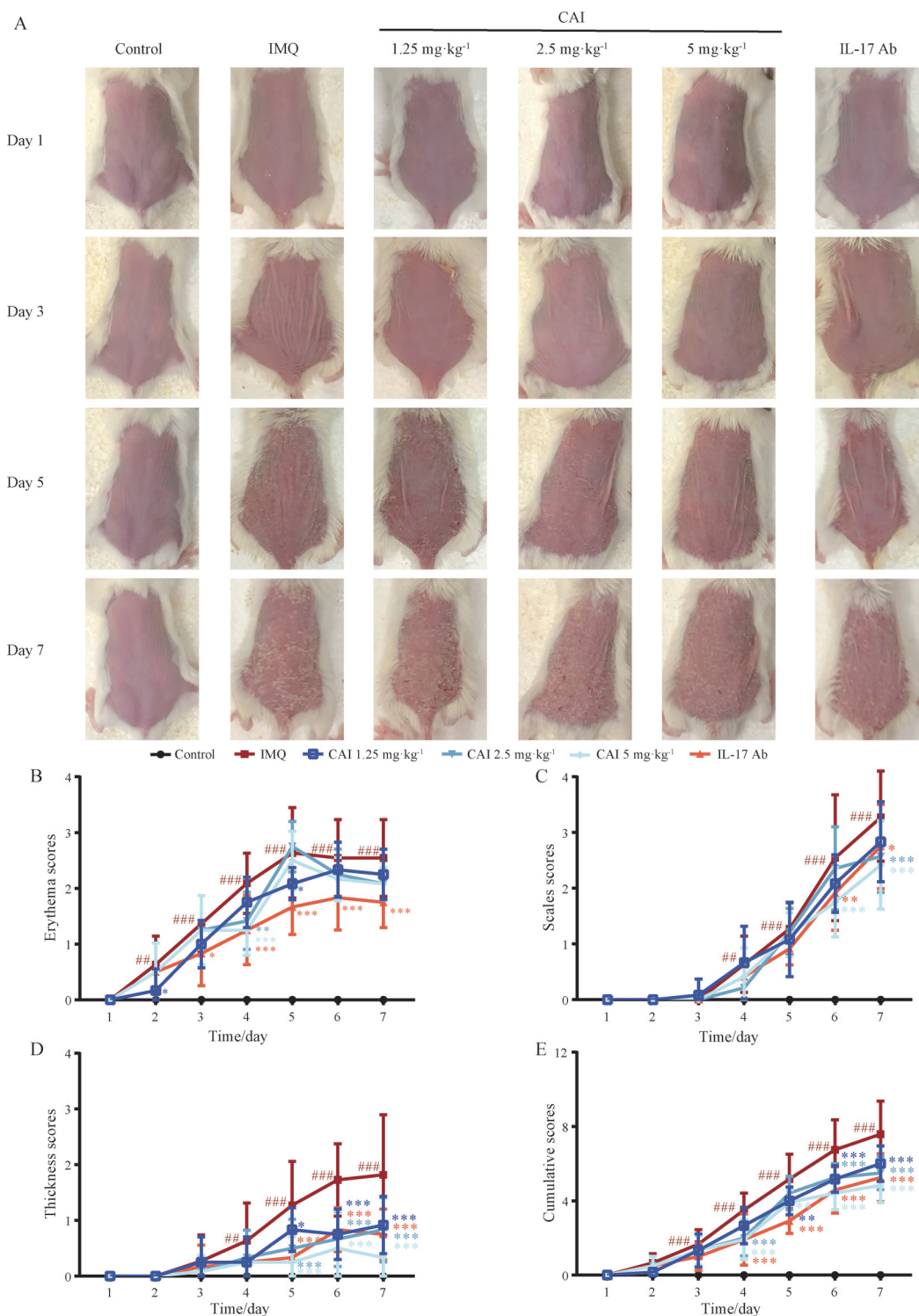


Figure 1 Effects of CAI on skin lesion and PASI scores of mice induced by IMQ. A: Representative images of back skin from each group of mice; B: Erythema score; C: Scales score; D: Thickness score; E: Cumulative score. $n = 12, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IMQ group. IMQ: Imiquimod; CAI: Carboxyamidotriazole; IL-17 Ab: Interleukin-17 antibody

构正常,无炎症细胞浸润及表皮增厚;而IMQ组小鼠表皮明显增厚,可见大量炎症细胞浸润,角化过度,角化不全,角化不全区有Munro微脓肿,棘层增厚并有表皮突向下延伸。CAI(1.25、2.5和5 mg·kg⁻¹)和IL-17 Ab组可不同程度减轻上述病理改变,以CAI 5 mg·kg⁻¹组效果最优,表现为表皮厚度明显变薄,炎症细胞浸润显著减少,棘层增厚及表皮突向下延伸被缓解。通过Baker评分对皮肤病理改变进行量化,结果显示,IMQ组的评分较control组显著升高($P < 0.001$),各给药组

评分明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$,图2B)。

3 CAI对IMQ诱导的银屑病小鼠皮肤细胞因子水平的影响

细胞因子在银屑病发病机制中起重要作用,因此本研究考察了CAI对小鼠皮肤中IMQ诱导的细胞因子水平的影响。如图3所示,与control组相比,IMQ组小鼠皮损处促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-17A、IL-23和TNF- α 水平均显著升高($P < 0.001$)。CAI(1.25、2.5和5 mg·kg⁻¹)显著降低IL-17A和IL-23的水平($P < 0.05$,

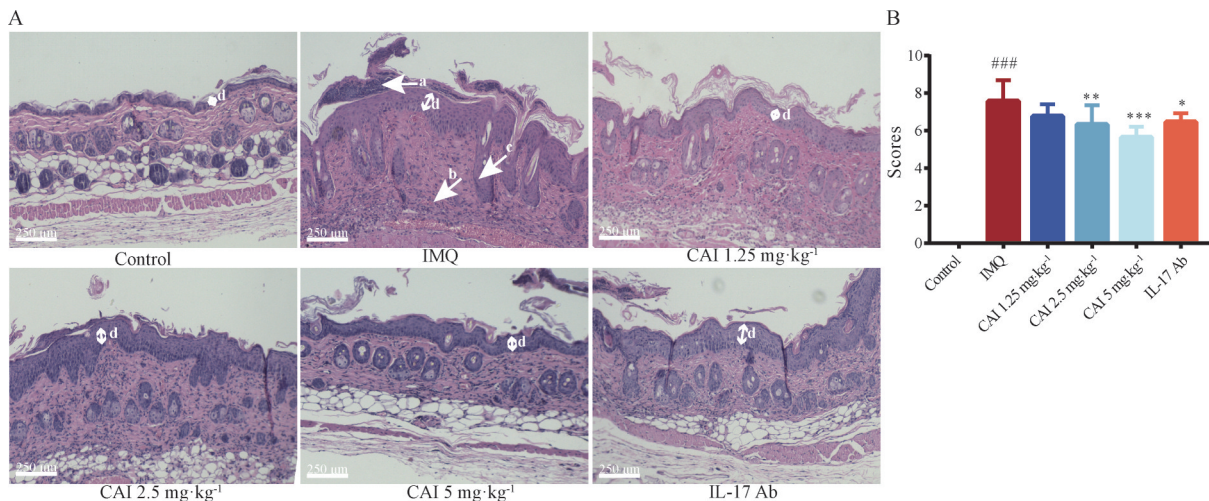


Figure 2 Effects of CAI on histopathological changes of skin in mice induced by IMQ. A: Representative skin HE staining; B: Baker score. Scale bar, 250 μ m; magnification, $\times 400$. a: Munro microabscess; b: Inflammatory cell infiltration; c: Spinous hypertrophic protrusion; d: Epidermal thickening. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs IMQ group

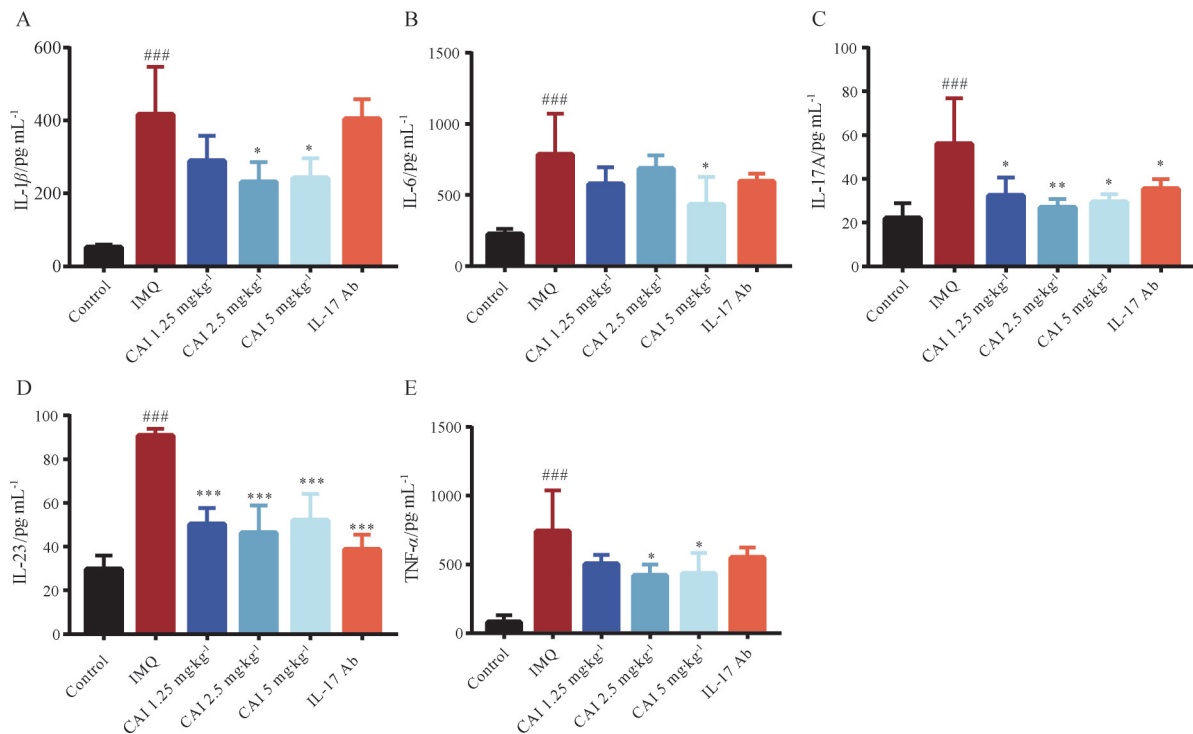


Figure 3 Effects of CAI on the levels of pro-inflammatory cytokines in skin of mice induced by IMQ. A: IL-1 β ; B: IL-6; C: IL-17A; D: IL-23; E: TNF- α . $n = 3-5$, $\bar{x} \pm s$. ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs IMQ group

$P < 0.01$, $P < 0.001$), CAI (2.5 和 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 还能降低 IL-1 β 和 TNF- α 的水平 ($P < 0.05$), 此外, CAI ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 能够降低 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。阳性药 IL-17 Ab 仅对 IL-17A 和 IL-23 水平有抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平无影响。

4 小鼠皮肤转录组学分析

为进一步探究 CAI 治疗银屑病的相关机制, 对 IMQ 组和 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CAI 组小鼠皮肤组织进行转录组测序分析。如图 4 所示, 与 IMQ 组相比, 从 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CAI 组中筛选出 374 个 DEGs, 其中 275 个下调, 99 个上调, 所有 DEGs 的整体分布呈火山图如图 4A, top 20 DEGs 聚类热图见图 4B。将筛选所得的 DEGs 分别从生物学过

程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 三个层面进行 GO 功能富集, 如图 4C 所示, 275 个 DEGs 可显著注释到 25 条途径, 其中 10 条 BP, 主要涉及表皮角化 (keratinization)、角质形成细胞分化 (keratinocyte differentiation) 和表皮发育 (epidermis development) 等; 8 条 CC, 主要涉及在细胞外区域 (extracellular region)、角质化包膜 (cornified envelope) 和细胞外间隙 (extracellular space) 等部位; 7 条 MF, 主要涉及表皮结构成分 (structural constituent of epidermis)、丝氨酸内肽酶活性 (serine-type endopeptidase activity) 和丝氨酸肽酶活性 (serine-type peptidase activity) 等。另

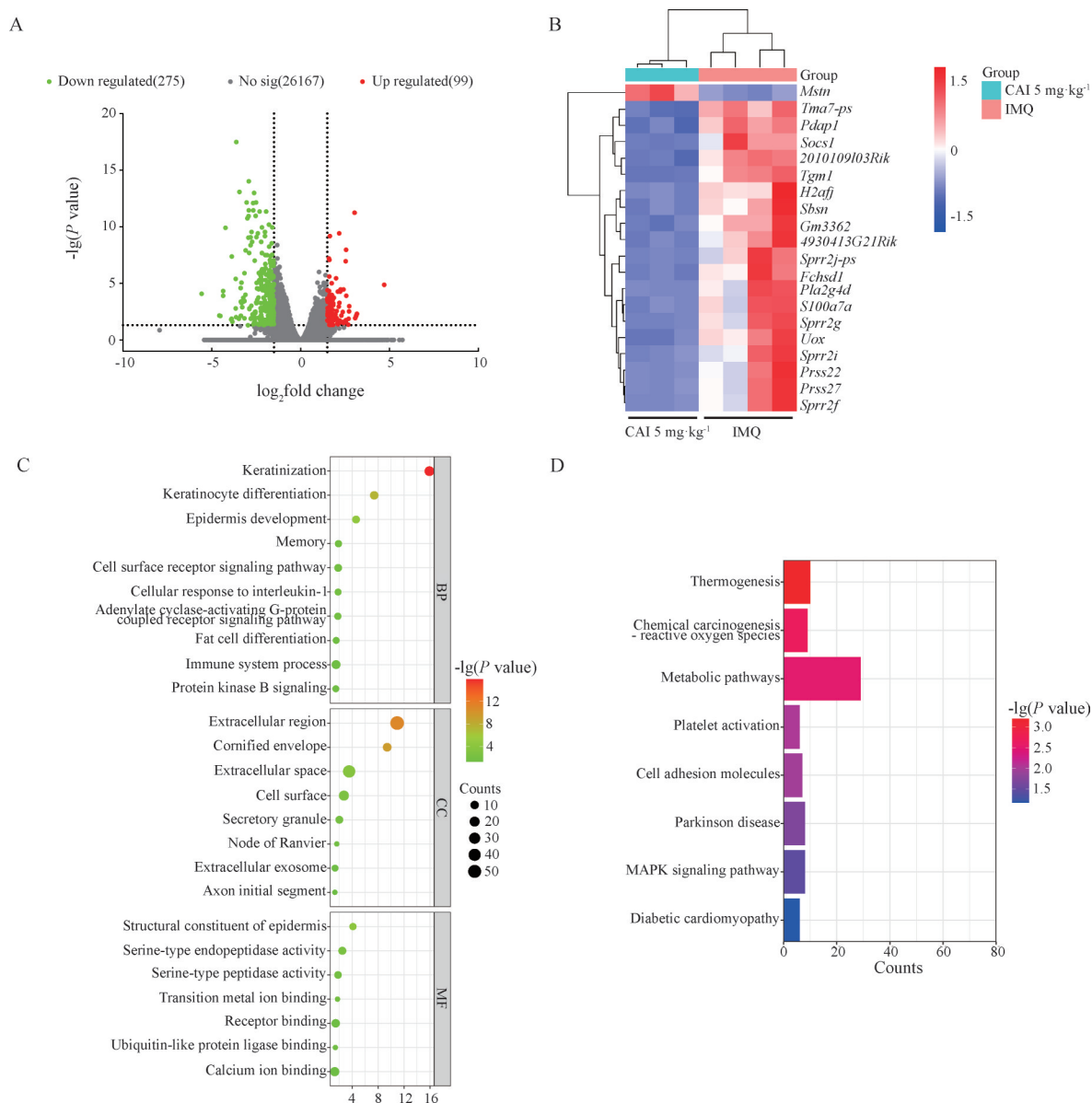


Figure 4 The transcription analysis of CAI $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ group vs IMQ group. A: Volcano map of DEGs; B: Heat map of the top 20 DEGs; C: GO enrichment analysis of DEGs for biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF); D: KEGG enrichment analysis of DEGs. DEGs: Differentially expressed genes

外,采用KEGG通路分析研究DEGs可能参与调控的相关信号通路,如图4D所示,DEGs可显著富集到8条信号通路,包括化学致癌-活性氧(chemical carcinogenesis-reactive oxygen species)、代谢通路(metabolic pathway)和细胞黏附分子(cell adhesion molecules)等。这些结果提示,CAI对银屑病的作用主要涉及KCs及其介导的表皮角化。

5 CAI对IMQ诱导的小鼠模型以及M5诱导的HaCaT细胞模型中S100a7表达的影响

根据转录组学结果,S100a7a是top20 DEGs之一,5 mg·kg⁻¹ CAI组中S100a7a水平较IMQ组显著下调,且该基因编码蛋白抗菌肽S100A7与银屑病发病密切相关^[27-31]。因此,采用qPCR进一步检测S100a7a基因的表达水平。如图5A所示,S100a7a mRNA表达水平与转录组测序数据趋势一致。结合转录组学结果——CAI对KCs具有调节作用,因此采用M5刺激HaCaT细胞构建银屑病KCs模型,进一步验证CAI对S100a7表达的影响。如图5B所示,用M5处理HaCaT细胞1、3、6、12和24 h后,S100a7 mRNA水平随处理时间的延长而逐渐升高($P < 0.01$, $P < 0.001$),而CAI 10 μmol·L⁻¹从3 h起即能显著抑制其表达($P < 0.05$, $P < 0.001$)。

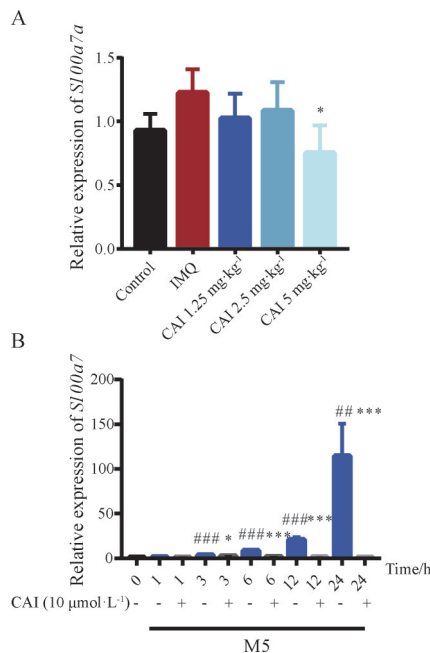


Figure 5 The effects of CAI on S100a7 mRNA level in skin of mice induced by IMQ and in HaCaT cells induced by M5. A: The mRNA level of S100a7a in skin of mice induced by IMQ was determined by qPCR. $n = 4-5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs IMQ group; B: HaCaT cells were incubated by M5 and CAI for 1, 3, 6, 12 and 24 h, and S100a7 mRNA level was measured by qPCR. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs 0 h group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs M5 group

6 CAI对M5诱导的HaCaT细胞模型中细胞因子表达的影响

进一步在M5诱导的银屑病HaCaT细胞模型中检测其他细胞因子的mRNA表达。根据前面的结果,CAI从3 h开始即可降低M5诱导的S100a7 mRNA高表达,因此选择药物孵育时间为3 h。如图6所示,M5刺激HaCaT细胞3 h后,除增加S100a7 mRNA水平以外($P < 0.001$),还诱导IL1β、IL6、IL17、IL23和Ccl20的mRNA的表达水平增高($P < 0.001$)。CAI 10 μmol·L⁻¹对M5诱导的S100a7、IL1β、IL6、IL17、IL23和Ccl20的mRNA表达均有显著抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

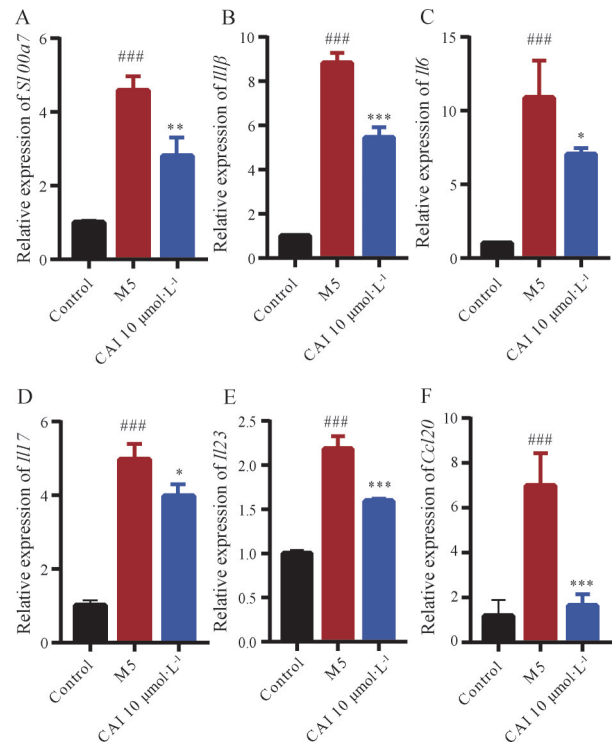


Figure 6 The effects of CAI on the mRNA levels of S100a7 and cytokines in HaCaT cells induced by M5. HaCaT cells were incubated by M5 and CAI for 3 h, and the mRNA levels of S100a7 (A), IL1β (B), IL6 (C), IL17 (D), IL23 (E) and Ccl20 (F) were measured by qPCR. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs M5 group

讨论

IMQ是一种小分子免疫调节剂,涂抹于小鼠背部皮肤后能够激活表皮浆细胞样DCs上的Toll样受体7,诱导免疫炎症细胞浸润及刺激炎症因子产生,导致皮肤出现红斑、增厚和鳞屑等银屑病样改变,其病理表现也与人类银屑病非常相似,因此是一种理想的银屑病小鼠模型,广泛用于银屑病研究以及抗银屑病药物评

价^[22]。本研究使用IMQ成功诱导出小鼠银屑病样皮损,并在此模型上评价CAI的作用。结果表明,CAI对小鼠皮损部位的红斑、增厚和鳞屑具有显著改善作用,降低PASI评分,减轻表皮增厚、角化过度、角化不全、炎性细胞浸润、表皮突向下延伸等皮肤病理变化,病理Baker评分亦显著下调,而且CAI(2.5和5 mg·kg⁻¹)疗效达到阳性药IL-17 Ab的相似水平。以上结果提示,CAI对IMQ诱导的银屑病小鼠具有良好治疗作用。

细胞因子在银屑病的发生、发展过程中发挥重要作用,IL-17/IL-23通路的激活是主要的驱动因素,可以进一步活化DCs、淋巴细胞、巨噬细胞和KCs并释放IL-17、IL-23、IL-22、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等大量细胞因子,在皮损部位形成细胞因子/免疫细胞相互促进的正反馈环路,放大并加剧炎症免疫反应损伤^[32-35]。随着细胞因子在银屑病发病机制中重要作用的揭示,生物制剂应用于银屑病使得治疗效果上了一个新的台阶,但使用针对某一个细胞因子的特异性抗体仍难获得很满意的疗效,拮抗细胞因子网络在治疗中才更具有优势。与此一致的是,本研究观察到,阳性药IL-17 Ab仅对IMQ诱导的IL-17A和IL-23有抑制作用,对IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平无影响。而CAI可明显降低IL-17A、IL-23、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等细胞因子水平。前期研究发现,CAI对炎症组织中NF- κ B和MAPK通路的抑制作用,是其减少细胞因子的重要机制^[11,12,15],CAI是否通过调节这两条信号通路从而减少银屑病小鼠模型中细胞因子的产生仍需进一步探究。

随后采用转录组测序进一步考察CAI对IMQ诱导的银屑病小鼠模型的治疗机制,结果发现CAI的作用主要涉及KCs及其介导的表皮角化。KCs在诱发因素作用下分泌抗菌肽是银屑病发生的始动因素,而皮损处免疫细胞分泌的细胞因子对KCs的刺激导致KCs过度增殖,并进一步产生大量细胞因子和趋化因子,以维持和放大炎症反应。因此,调节KCs功能被认为是银屑病潜在的治疗手段。HaCaT细胞是人永生化KCs,M5刺激的HaCaT细胞被用作银屑病KCs模型^[23-25]。本研究发现,CAI对M5诱导的*Il1 β* 、*Il6*、*Il17*、*Il23*和*Ccl20* mRNA水平均有显著抑制作用。进一步,在转录组学筛选的DEGs中,*S100a7*吸引了本课题组的注意,其编码蛋白S100A7最初从银屑病患者增生的表皮KCs中分离获得,因此又称为银屑病素(psoriasisin)。在银屑病中,S100A7是KCs分泌的重要抗菌肽之一,参与了银屑病的病理机制。因此,本研究在M5刺激剂的HaCaT细胞模型中检测了CAI对*S100a7* mRNA的影响,发现CAI能够显著抑制M5诱导的*S100a7* mRNA表达。这些结果提示,CAI的作用机制可能与

抑制KCs产生细胞因子以及抗菌肽*S100a7*表达有关。

综上所述,CAI可以缓解IMQ诱导的小鼠银屑病损伤,其作用机制可能与调节KCs功能以及减少多种细胞因子和抗菌肽*S100a7*表达有关,这为CAI发展为治疗银屑病的新型药物提供了实验依据,值得进一步深入研究。

作者贡献: 刘婧雯负责实验研究、数据分析和论文撰写;杨梅负责实验研究、数据分析;朱蕾负责课题设计、论文撰写和修订。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Ghoreschi K, Balato A, Enerbäck C, et al. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis [J]. *Lancet*, 2021, 397: 754-766.
- [2] Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, et al. Psoriasis [J]. *Lancet*, 2021, 397: 1301-1315.
- [3] Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323:1945-1960.
- [4] Michio T, Tomotaka M. New treatment addressing the pathogenesis of psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7488.
- [5] Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, et al. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 179.
- [6] Vičić M, Kaštelan M, Brajac I, et al. Current concepts of psoriasis immunopathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11574.
- [7] Liu JW, Zhu L. New advances in the pathogenesis and drug research of psoriasis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2942-2951.
- [8] Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1475.
- [9] Zhou X, Chen Y, Cui L, et al. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 81.
- [10] Committee on Psoriasis, Chinese Society of Dermatology. Guideline for the diagnosis and treatment of psoriasis in China (2023 edition) [J]. *Chin J Dermatol (中华皮肤科杂志)*, 2023, 56: 573-625.
- [11] Zhu L, Li J, Guo L, et al. Activation of NALP1 inflammasomes in rats with adjuvant arthritis; a novel therapeutic target of carboxyamidotriazole in a model of rheumatoid arthritis [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172: 3446-3459.
- [12] Du X, Chen W, Wang Y, et al. Therapeutic efficacy of carboxyamidotriazole on 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis model is associated with the inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- κ B activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 45: 16-25.

- [13] Lu S, Duan M, Guo Z, et al. Carboxyamidotriazole exerts anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages by inhibiting NF- κ B and MAPKs pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20: 1455-1466.
- [14] Duan M, Shen M, Zhou YT, et al. AIM2 and NLRP4-driven inflammasome activation in adult-onset Still's disease and the preliminary therapeutic effect exploration of carboxyamidotriazole [J]. *Clin Rheumatol*, 2023, 42: 1635-1643.
- [15] Zhou Y, Yang XY, Liu JW, et al. Carboxyamidotriazole alleviates pannus formation and cartilage erosion in rats with adjuvant arthritis [J]. *Heliyon*, 2023, 9: e20105.
- [16] Zhu L, Li J, Wu DW, et al. Anti-inflammatory effects of carboxyamidotriazole on carrageenan-induced acute inflammation [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2013, 18: 601-605.
- [17] Si X, Wang J, Cheng Y, et al. A phase III, randomized, double-blind, controlled trial of carboxyamidotriazole plus chemotherapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920965849.
- [18] Hussain MM, Kotz H, Minasian L, et al. Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21: 4356-4363.
- [19] Azad N, Perroy A, Gardner E, et al. A phase I study of paclitaxel and continuous daily CAI in patients with refractory solid tumors [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 1800-1805.
- [20] Omuro A, Beal K, McNeill K, et al. Multicenter phase IB trial of carboxyamidotriazole orotate and temozolomide for recurrent and newly diagnosed glioblastoma and other anaplastic gliomas [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 1702-1709.
- [21] Desai AA, Innocenti F, Janisch L, et al. A phase I trial of pharmacokinetic modulation of carboxyamidotriazole (CAI) with ketoconazole in patients with advanced cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 54: 377-384.
- [22] Chuang SY, Lin CH, Sung CT, et al. Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13: 551-562.
- [23] Zheng H, Gu L, Wang Z, et al. Establishing transcription profile of psoriasiform cutaneous *in vitro* using HaCaT cells stimulated with combination of cytokines [J]. *J Vis Exp*, 2021, (169): e61537.
- [24] Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, et al. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α recapitulates some features of psoriasis [J]. *J Immunol*, 2010, 184: 5263-5270.
- [25] Sarama R, Matharu PK, Abduldaieem Y, et al. *In vitro* disease models for understanding psoriasis and atopic dermatitis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 803218.
- [26] Li Y, Zhang G, Chen M, et al. Rutaecarpine inhibited imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis *via* inhibiting the NF- κ B and TLR7 pathways in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1876-1883.
- [27] Schiopu A, Cotoi OS. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 828354.
- [28] Chessa C, Bodet C, Jousselin C, et al. Antiviral and immunomodulatory properties of antimicrobial peptides produced by human keratinocytes [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1155.
- [29] D'Amico F, Skarmoutsou E, Granata M, et al. S100A7: a rAMPing up AMP molecule in psoriasis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 32: 97-104.
- [30] Hattori F, Kiatsurayanon C, Okumura K, et al. The antimicrobial protein S100A7/psoriasin enhances the expression of keratinocyte differentiation markers and strengthens the skin's tight junction barrier [J]. *Br J Dermatol*, 2014, 171: 742-753.
- [31] Jinquan T, Vorum H, Larsen CG, et al. Psoriasin: a novel chemotactic protein [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 107: 5-10.
- [32] Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 585-600.
- [33] Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131: 677-687.
- [34] Menter A, Krueger GG, Paek SY, et al. Interleukin-17 and interleukin-23: a narrative review of mechanisms of action in psoriasis and associated comorbidities [J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2021, 11: 385-400.
- [35] Guo J, Zhang H, Lin W, et al. Signaling pathways and targeted therapies for psoriasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 437.