

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.09.007  
文章编号: 1005-8982 (2022) 09-0041-08

实验研究·论著

## 白藜芦醇对银屑病细胞生长的影响及其作用机制的探讨\*

韩乌日罕<sup>1</sup>, 郭果香<sup>2</sup>, 丽丽<sup>2</sup>, 闫静茹<sup>2</sup>, 张婷<sup>2</sup>, 郝玉琴<sup>3</sup>

(1. 包头市第四医院 皮肤科, 内蒙古 包头 014000; 2. 内蒙古医科大学第三附属医院 皮肤科, 内蒙古 包头 014000; 3. 北京大学第三医院 皮肤科, 北京 100191)

**摘要:** **目的** 探讨白藜芦醇对银屑病细胞生长的影响及其作用机制。**方法** 不同浓度的角质细胞生长因子(KGF) 诱导人永生角质形成细胞(HaCaT), 显微镜观察及四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测HaCaT细胞增殖。选出最佳浓度作用HaCaT细胞复制银屑病模型, 采用不同浓度白藜芦醇作用HaCaT细胞, 计算半抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 根据IC<sub>50</sub>选出后续实验白藜芦醇的浓度; 将银屑病模型细胞分为阴性对照组(30 μg/L生理盐水), 2.5 μmol/L、5.0 μmol/L、7.5 μmol/L白藜芦醇组, 阳性对照组(5.0 μg/mL维A酸)及空白对照组(未加任何药物), MTT法检测各组银屑病模型细胞的增殖, 流式细胞术检测各组银屑病模型细胞的凋亡率, Western blotting检测各组银屑病模型细胞Caspase-3、p-ERK1/2、p-P38蛋白的表达。**结果** 不同KGF浓度组HaCaT细胞0 h、12 h、24 h、48 h的OD值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的OD值有差异( $P < 0.05$ ); ②不同浓度组的OD值有差异( $P < 0.05$ ), 40 ng/mL KGF组的OD值高于其他浓度组; ③不同浓度组OD值的变化趋势有差异( $P < 0.05$ ), 40 ng/mL KGF组的OD值从24 h开始明显高于其他浓度组。0 μmol/L、0.5 μmol/L、1.0 μmol/L、2.0 μmol/L、4.0 μmol/L白藜芦醇作用HaCaT细胞24 h后的OD值比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 白藜芦醇浓度升高OD值降低, 白藜芦醇可抑制HaCaT细胞增殖, IC<sub>50</sub>值约5.3 μmol/L。空白对照组、阴性对照组、2.5 μmol/L白藜芦醇组、5.0 μmol/L白藜芦醇组、7.5 μmol/L白藜芦醇组、阳性对照组银屑病模型细胞24 h、48 h、72 h的OD值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的OD值有差异( $P < 0.05$ ); ②各组OD值有差异( $P < 0.05$ ), ③各组OD值的变化趋势有差异( $P < 0.05$ ), 从48 h开始, 5.0 μmol/L、7.5 μmol/L白藜芦醇对银屑病模型细胞具有一定的抑制增殖作用。空白对照组、阴性对照组、2.5 μmol/L白藜芦醇组、5.0 μmol/L白藜芦醇组、7.5 μmol/L白藜芦醇组、阳性对照组银屑病模型细胞的凋亡率比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 5.0 μmol/L、7.5 μmol/L的白藜芦醇对银屑病模型细胞有促凋亡作用。5.0 μmol/L白藜芦醇组、7.5 μmol/L白藜芦醇组、阳性对照组与阴性对照组和空白对照组比较, Caspase-3蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ ), p-ERK1/2、p-P38蛋白相对表达量降低( $P < 0.05$ )。 **结论** 白藜芦醇可能是通过抑制ERK/MAPK和/或P38/MAPK通路发挥作用进而抑制银屑病细胞增殖并促进其凋亡, 具体作用机制还有待更深入研究。

**关键词:** 银屑病; 白藜芦醇; ERK/MAPK通路; P38/MAPK通路

**中图分类号:** R758.63

**文献标识码:** A

## Effect and mechanism of resveratrol on proliferation of psoriatic cells\*

Wu-ri-han Han<sup>1</sup>, Guo-xiang Guo<sup>2</sup>, Li Li<sup>2</sup>, Jing-ru Yan<sup>2</sup>, Ting Zhang<sup>2</sup>, Yu-qin Hao<sup>3</sup>

(1. Department of Dermatology, Baotou Fourth Hospital, Baotou, Inner Mongolia 014000, China;  
2. Department of Dermatology, The Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Baotou, Inner Mongolia 014000, China; 3. Department of Dermatology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

收稿日期: 2021-11-12

\* 基金项目: 包头市医药卫生基金项目(No. 2017S2001-1-11)

[通信作者] 郝玉琴, E-mail: haoyuqin0472@163.com; Tel: 13664774945

**Abstract: Objective** To investigate the effect of resveratrol on the growth of psoriatic cells and its mechanism. **Methods** Human immortal keratinocytes (HaCaT) cells were induced by different concentrations of keratinocyte growth factor (KGF), and the proliferation of HaCaT cells was detected by microscopic observation and tetramethylazol salt colorimetric (MTT) assay to select the optimal concentration to stimulate HaCaT cells to establish a psoriasis cell model. HaCaT cells were stimulated by different concentrations of resveratrol, the effect of resveratrol on the proliferation of HaCaT cells was detected by MTT assay to calculate the IC50, and the subsequent experimental resveratrol stimulation concentration was selected according to the IC50. The psoriasis cell model was divided into blank, negative, positive and resveratrol low, medium, and high concentration groups, the proliferation of psoriasis cell model- HaCaT cells was detected by MTT assay, the apoptosis of psoriasis cell model- HaCaT cells was detected by flow cytometry, and the expression of caspase-3, P-ERK1/2, and P-p38 protein in HaCaT cells of each group was detected by Western blotting. **Results** The OD values of HaCaT cells at 0 h, 12 h, 24 h, and 48 h in different KGF concentration groups were compared by repeated measurement design analysis of variance, which showed that: (1) The OD values at different time points were different ( $P < 0.05$ ); (2) The OD value of 40 ng/ml KGF group was higher than that of other concentration groups; (3) The change trend of OD value in different concentration groups was different ( $P < 0.05$ ). The OD value of 40 ng/ml KGF group was significantly higher than that of other concentration groups from 24 hours. The OD values of HaCaT cells treated with 0  $\mu\text{mol/L}$ , 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 2.0  $\mu\text{mol/L}$ , 4.0  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol after 24h were statistically significant ( $P < 0.05$ ). After 24 h, 48 h, and 72 h, resveratrol can inhibit the proliferation of HaCaT cells, and the IC50 value is about 5.3  $\mu\text{mol/L}$ . The OD values of blank control group, negative control group, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , 5.0  $\mu\text{mol/L}$ , 7.5  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol group, and positive control group were analysis of variance with repeated measurement design; The results were as follows: (1) The OD values at different time points were different ( $P < 0.05$ ); (2) The OD value of each group was different ( $P < 0.05$ ); (3) The change trend of OD value of each group was different ( $P < 0.05$ ); Starting from 48 hours, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  and 7.5  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol can inhibit the proliferation of psoriatic model cells. There were significant differences in the apoptosis rate of blank control group, negative control group, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , 5.0  $\mu\text{mol/L}$ , 7.5  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol group, and positive control group ( $P < 0.05$ ), which showed 5.0  $\mu\text{mol/L}$  and 7.5  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol promoted the apoptosis of psoriatic model cells. Compared with the negative control group and the blank control group, the relative expression of caspase-3 protein in 5.0  $\mu\text{mol/L}$ , 7.5  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol group, and positive control group increased ( $P < 0.05$ ), and the relative expression of p-ERK1/2 and p-p38 protein decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Resveratrol may inhibit the proliferation and promote the apoptosis of psoriatic cells by inhibiting ERK/MAPK and/or p38/MAPK pathway. The specific mechanism needs to be further studied.

**Keywords:** psoriasis; resveratrol; ERK/MAPK pathway; P38/MAPK pathway

银屑病是被世界卫生组织确定为主要的全球健康问题的少数非传染性疾病之一<sup>[1]</sup>,是一种常见的免疫介导的以角质形成细胞过度增殖和异常分化及炎症细胞浸润为主要特征的慢性炎症性皮肤病,全球发病率为 2% ~ 3%<sup>[2-3]</sup>。其典型临床表现为鳞屑性红斑或斑块,主要累及肘部、膝盖及头皮,亦可广泛分布<sup>[1]</sup>。银屑病病因复杂,机制不明,并且病程迁延不愈,容易反复,治疗困难,常罹患终身<sup>[4]</sup>。随着对银屑病的深入研究,发现丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在银屑病角质形成细胞的增殖过程和炎症反应中均发挥一定的作用<sup>[5-7]</sup>。

白藜芦醇是一种多酚类化合物,存在于多种植物中,具有抗癌、抗菌、抗炎、抗氧化等多种生物学

活性<sup>[8-10]</sup>。其中抗炎和抗肿瘤作用可通过调控 P38/MAPK 通路或细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)/MAPK 通路发挥作用<sup>[11-12]</sup>。有研究<sup>[13-14]</sup>发现白藜芦醇可以降低银屑病皮损的炎症程度,还可导致人永生角质形成细胞(HaCaT)的凋亡。虽然白藜芦醇可通过调控 MAPK 通路抑制细胞异常增殖和炎症反应,并且对银屑病也有抑制作用,但白藜芦醇是否可通过调控 MAPK 通路起到抗银屑病的作用尚未见相关报道。

很多研究<sup>[15-17]</sup>都采用 HaCaT 细胞株作为银屑病的研究模型。本研究采用角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)刺激 HaCaT 细胞过度增殖,模拟银屑病角质形成细胞的过度增殖状态,复制银屑病细胞模型,分别观察不同浓度的白

藜芦醇对 HaCaT 细胞株增殖及凋亡的影响,检测 Caspase-3、p-ERK1/2、p-P38 蛋白表达,探讨白藜芦醇对银屑病细胞生长的影响及其作用机制,为白藜芦醇临床治疗银屑病提供理论和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂与仪器

HaCaT 细胞株(湖南丰晖生物科技有限公司)。KGF (MCE 中国公司),白藜芦醇、顺式视黄酸(维 A 酸)、二甲基亚砷 DMSO (美国 Sigma 公司),DMEM 培养基、胎牛血清[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],胰酶、抗生素(美国 GenView 公司),MTT(上海生物工程有限公司),Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(美国 BioLegend 公司),生理盐水(湖南科伦有限公司),Caspase-3 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);p-ERK1/2 抗体(武汉 Abclonal 公司),p-P38 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒(广州碧云天生物技术有限公司),彩色预染蛋白分子量标准(10~170 kD)[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],PVDF 膜(美国 Merck Millipore 公司)。二氧化碳恒温培养箱、台式高速大容量冷冻离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],倒置显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司],离心机(湖南平凡科技有限公司),超净工作台(华宇净化设备有限公司),酶标仪(北京德泉兴业商贸有限公司),流式细胞仪[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司],电泳仪电源、双垂直电泳仪、转印电泳仪(槽)(北京六一生物科技有限公司),水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

### 1.2 HaCaT 细胞培养及银屑病模型复制

HaCaT 细胞贴壁培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每 1~2 天换液 1 次,细胞单层贴壁生长,待长满瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化成单个细胞,取对数生长期的细胞准备实验。

取对数生长期、生长状态良好的 HaCaT 细胞,以  $10 \times 10^4$  个/孔细胞接种到 6 孔板中,每孔体积 2 500  $\mu$ L。第 2 天,将 6 孔板中细胞培养基更换为含

有不同浓度 KGF (0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL) 的培养基继续培养。在诱导第 3 天时为每组细胞换液,继续添加相应浓度的 KGF。用显微镜观察加药后 0 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 的 HaCaT 细胞形态及增殖情况,并拍照。

### 1.3 MTT 法检测不同浓度 KGF 组 HaCaT 细胞的增殖

取对数生长期、生长状态良好的 HaCaT 细胞,以 7 000 个/孔细胞接种到 96 孔板,每孔体积 100  $\mu$ L。第 2 天,将细胞分成 5 组,每组 3 个复孔,更换含有 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 浓度 KGF 的培养基,继续培养 12 h、24 h、48 h。每孔加 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 4 h,小心吸弃孔内上清液,每孔加 150  $\mu$ L DMSO,振荡 10 min,测定并记录酶联免疫检测仪 490 nm 波长处各孔的光密度(OD)值,以时间为横坐标,OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

### 1.4 MTT 法检测不同浓度白藜芦醇组 HaCaT 细胞的增殖

取对数生长期,生长状态良好的 HaCaT 细胞,以 8 000 个/孔细胞接种到 96 孔板中,每孔体积 100  $\mu$ L。第 2 天,将细胞分成 5 组,每组 3 个复孔,更换含有 0  $\mu$ mol/L、0.5  $\mu$ mol/L、1.0  $\mu$ mol/L、2.0  $\mu$ mol/L、4.0  $\mu$ mol/L 浓度白藜芦醇的培养基,继续培养 24 h,每孔加 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 4 h,小心吸弃孔内上清液,每孔加 150  $\mu$ L DMSO,振荡 10 min,测定并记录酶联免疫检测仪 490 nm 波长处各孔的 OD 值,计算细胞存活率及半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。细胞存活率=(实验组 OD 值/空白对照组 OD 值)  $\times$  100%。

### 1.5 MTT 法检测各组银屑病模型细胞的增殖

取对数生长期、生长状态良好的 HaCaT 细胞,以 8 000 个/孔细胞接种到 96 孔板中,每孔体积 100  $\mu$ L。第 2 天,以 40 ng/mL KGF 处理细胞 24 h。第 3 天,弃原培养基,将细胞分成阴性对照组(30  $\mu$ g/L 生理盐水),2.5  $\mu$ mol/L、5.0  $\mu$ mol/L、7.5  $\mu$ mol/L 白藜芦醇组,阳性对照组(5.0  $\mu$ g/mL 维 A 酸)及空白对照组(未加任何药物)6 组,每组 3 个复孔,更换相应培养基,继续培养 24 h、48 h、72 h,每孔加 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 4 h,小心吸弃孔内上清液,每孔加 150  $\mu$ L

DMSO, 振荡 10 min, 测定并记录酶联免疫检测仪 490 nm 波长处各孔的 OD 值。以时间为横坐标, OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

### 1.6 流式细胞术检测各组银屑病模型细胞的凋亡

取对数生长期、生长状态良好的 HaCaT 细胞, 以  $2.5 \times 10^5$  个/孔细胞接种到 6 孔板中, 每孔体积 2 500  $\mu\text{L}$ 。第 2 天, 以 40 ng/mL 的 KGF 处理细胞 24 h。第 3 天, 弃原培养基, 将细胞分成阴性对照组 (30  $\mu\text{g/L}$  生理盐水), 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、5.0  $\mu\text{mol/L}$ 、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组, 阳性对照组 (5  $\mu\text{g/mL}$  维 A 酸) 及空白对照组 (未加任何药物) 6 组, 每组 3 个复孔, 更换相应培养基, 继续培养 72 h。1 500 r/min 离心 5 min 后收集各组细胞, 用 4 $^{\circ}\text{C}$  预冷 PBS 洗涤 2 次, 调节浓度为  $1 \times 10^7/\text{mL}$ , 用 500  $\mu\text{L}$  结合 1 mL PBS 缓冲液重悬细胞, 取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬浮于 5 mL 流式管中, 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide 混匀, 于室温下避光孵育 15 min。采用流式细胞术检测各组细胞的凋亡。

### 1.7 Western blotting 检测各组银屑病模型细胞 p-ERK1/2、p-P38、Caspase-3 蛋白的相对表达量

取对数生长期、生长状态良好的 HaCaT 细胞, 以  $2.5 \times 10^5$  个/孔细胞接种到 6 孔板中, 每孔体积 2 500  $\mu\text{L}$ 。第 2 天, 以 40 ng/mL 的 KGF 处理细胞 24 h。第 3 天, 弃原培养基, 将细胞分成阴性对照组 (30  $\mu\text{g/L}$  生理盐水), 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、5.0  $\mu\text{mol/L}$ 、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组, 阳性对照组 (5  $\mu\text{g/mL}$  维 A 酸) 及空白对照组 (未加任何药物) 6 组, 每组 3 个复孔, 更换相应培养基, 继续培养 72 h。用细胞裂解液抽提各组细胞总蛋白, 按 BCA 试剂盒说明书操作步骤测定总蛋白含量后分装, 置入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻待用。分别取 50  $\mu\text{g}$  各组蛋白, 煮沸 10 min 变性后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电泳结束后, 通过电转移法将蛋白质从 SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜在含 5% BSA-PBST 中室温轻摇 60 min, 分别加入 Caspase-3 (1:1 000 稀释)、p-ERK1/2 (1:500 稀释)、p-P38 (1:500 稀释) 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日取出 PVDF 膜, PBST 充分漂洗 (6 min  $\times$  5 次), 加入 1:5 000 稀释的过氧化物酶标记的抗兔 IgG, 室温孵育 60 min, PBST 充分漂洗 (6 min  $\times$  5 次) 后, 化学荧光法显色, 利用 Image J 灰度分析软件做半定量分析

测定 Caspase-3、p-ERK1/2、p-P38 蛋白的相对表达量。GAPDH 为内参。

### 1.8 统计学方法

数据分析采用 Graphpad 软件及 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 Tukey's 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KGF 对 HaCaT 细胞生长的影响

倒置显微镜观察结果显示, 12 h、1 d、2 d, KGF 各浓度组分别与 0 ng/mL 组比较, 细胞增殖明显, 细胞数量增多, 密度增大, 细胞呈圆形、长梭形, 较密集分布 (见图 1)。3 d、4 d、5 d、6 d、7 d, KGF 各浓度组分别与 0 ng/mL 组比较, 细胞增殖不明显, 细胞数量增多不显著, 密度小, 呈较分散分布。

### 2.2 不同 KGF 浓度组 HaCaT 细胞的 OD 值比较

不同 KGF 浓度组 HaCaT 细胞 0 h、12 h、24 h、48 h 的 OD 值比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的 OD 值有差异 ( $F = 4\ 733.148$ ,  $P = 0.000$ ); ②不同 KGF 浓度组的 OD 值有差异 ( $F = 64.967$ ,  $P = 0.000$ ), 40 ng/mL KGF 组的 OD 值高于其他浓度组 ( $P < 0.05$ ); ③不同 KGF 浓度组 OD 值的变化趋势有差异 ( $F = 44.627$ ,  $P = 0.000$ ), 40 ng/mL KGF 组的 OD 值从 24 h 开始明显高于其他浓度组 ( $P < 0.05$ ) (见表 1 和图 2)。以上结果表明, 浓度为 40 ng/mL 的 KGF 从 24 h 开始对 HaCaT 细胞有明显的增殖促进作用。本研究采用 40 ng/mL KGF 处理 HaCaT 细胞 24 h 复制银屑病模型。

### 2.3 白藜芦醇对 HaCaT 细胞增殖能力的影响

MTT 法检测结果显示, 0  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1.0  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 、4.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇作用 HaCaT 细胞 24 h 后的 OD 值分别为 (0.82  $\pm$  0.007)、(0.72  $\pm$  0.027)、(0.64  $\pm$  0.002)、(0.61  $\pm$  0.006) 及 (0.52  $\pm$  0.010), 各组比较, 差异有统计学意义 ( $F = 1\ 009.343$ ,  $P = 0.000$ ), 白藜芦醇浓度升高 OD 值降低; 进一步两两比较, 各组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。0  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1.0  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 、4.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇作用 HaCaT 细胞 24 h 后的细胞存活率分别为 (100  $\pm$  0.000) %、(87  $\pm$  0.015) %、

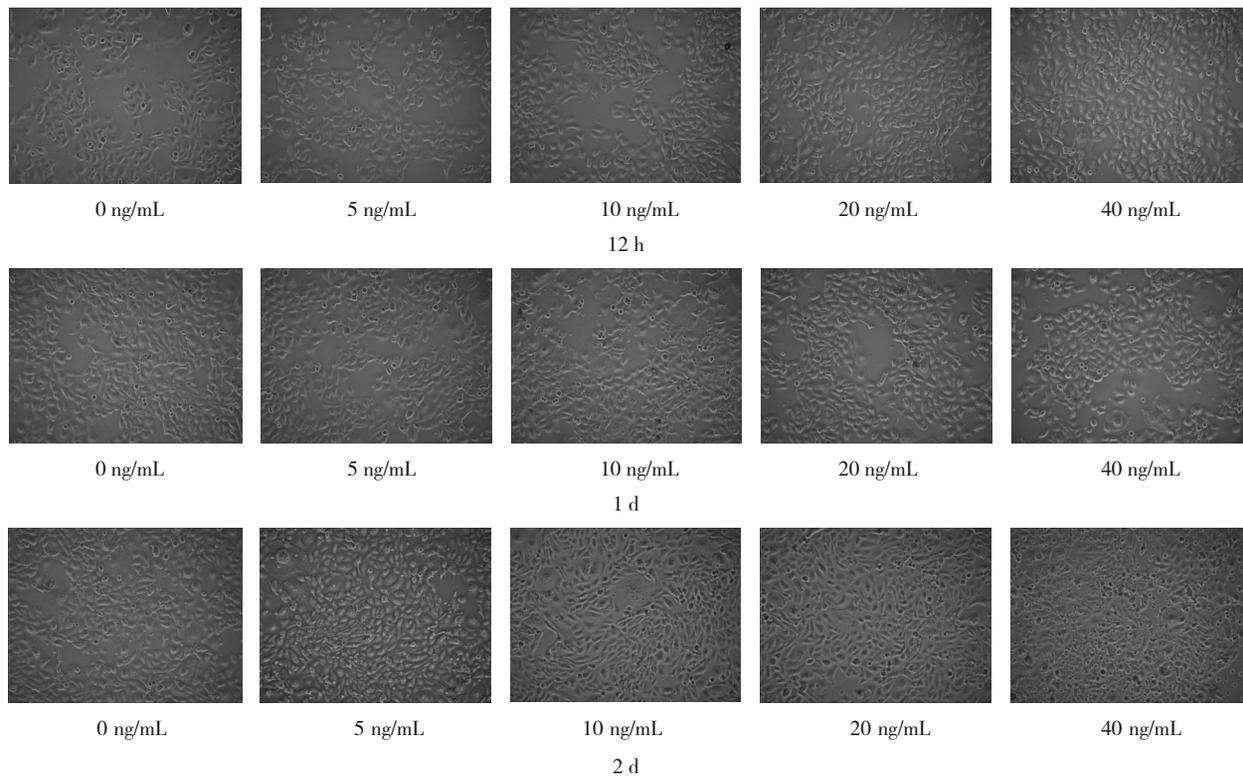


图1 不同浓度KGF组HaCaT细胞的增殖情况 (倒置显微镜×100倍)

表1 不同KGF浓度组HaCaT细胞0 h、12 h、24 h、48 h的OD值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	0 h	12 h	24 h	48 h
0 ng/mL KGF组	0.363 ± 0.011	0.498 ± 0.016	0.567 ± 0.008	0.733 ± 0.011
5 ng/mL KGF组	0.361 ± 0.009	0.505 ± 0.014	0.573 ± 0.012	0.753 ± 0.009
10 ng/mL KGF组	0.362 ± 0.009	0.514 ± 0.012	0.579 ± 0.007	0.754 ± 0.002
20 ng/mL KGF组	0.366 ± 0.011	0.529 ± 0.007	0.584 ± 0.011	0.753 ± 0.008
40 ng/mL KGF组	0.367 ± 0.005	0.530 ± 0.03	0.657 ± 0.018	0.867 ± 0.019

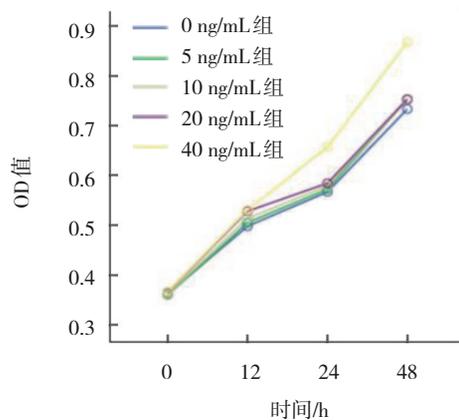


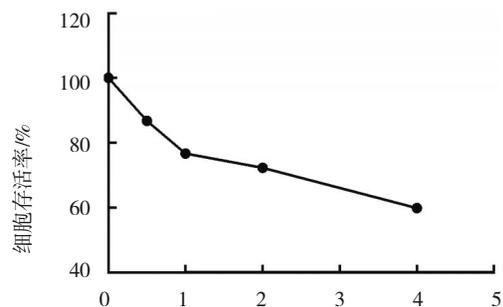
图2 不同KGF浓度组HaCaT细胞0 h、12 h、24 h和48 h的细胞生长曲线

(79 ± 0.006) %、(74 ± 0.011) %、(63 ± 0.016) %，见图3。白藜芦醇的IC50为5.3 μmol/L，故下一步实验的白藜芦醇低浓度为2.5 μmol/L、中浓度为

5.0 μmol/L、高浓度为7.5 μmol/L。

### 2.4 白藜芦醇对银屑病模型细胞增殖能力的影响

空白对照组、阴性对照组、2.5 μmol/L白藜芦醇组、5.0 μmol/L白藜芦醇组、7.5 μmol/L白藜芦醇组、



1: 0 μmol/L白藜芦醇, 2: 0.5 μmol/L白藜芦醇, 3: 1.0 μmol/L白藜芦醇, 4: 2.0 μmol/L白藜芦醇, 5: 4.0 μmol/L白藜芦醇。

图3 不同浓度白藜芦醇作用HaCaT细胞24 h后的细胞存活率

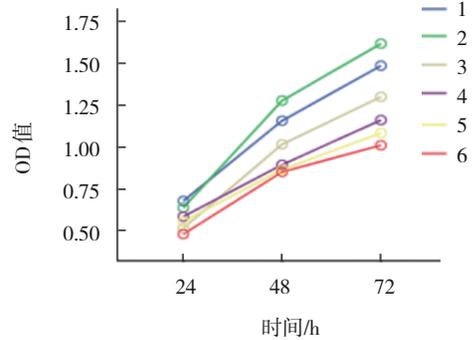
阳性对照组银屑病模型细胞 24 h、48 h、72 h 的 OD 值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的 OD 值有差异 ( $F=690.102, P=0.000$ ); ②各组的 OD 值有差异 ( $F=58.750, P=0.000$ ); ③各

组 OD 值的变化趋势有差异 ( $F=8.474, P=0.000$ ); 进一步两两比较, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组和阳性对照组 48 h 和 72 h 的 OD 值低于阴性对照组 ( $P<0.05$ )。见表 2 和图 4。

表 2 各组银屑病模型细胞 24 h、48 h 和 72 h 的 OD 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.678 ± 0.099	1.157 ± 0.058	1.485 ± 0.061
阴性对照组	0.638 ± 0.039	1.278 ± 0.064	1.616 ± 0.077
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.516 ± 0.011	1.017 ± 0.066	1.299 ± 0.042
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.585 ± 0.028	0.895 ± 0.029 <sup>†</sup>	1.161 ± 0.101 <sup>†</sup>
7.5 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.555 ± 0.028	0.867 ± 0.030 <sup>†</sup>	1.083 ± 0.042 <sup>†</sup>
阳性对照组	0.481 ± 0.012	0.852 ± 0.048 <sup>†</sup>	1.011 ± 0.094 <sup>†</sup>

注: †与阴性对照组比较,  $P<0.05$ 。



1:空白对照组; 2:阴性对照组; 3:2.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组; 4:5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组; 5:7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组; 6:阳性对照组。

图 4 各组银屑病模型细胞 24 h、48 h 和 72 h 的生长曲线

### 2.5 白藜芦醇对银屑病模型细胞凋亡的影响

空白对照组、阴性对照组、2.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、阳性对照组银屑病模型细胞的凋亡率分别为 (4.16 ± 1.47)%、(5.12 ± 1.53)%、(10.58 ± 1.34)%、

(20.17 ± 1.99)%、(29.43 ± 1.10)%、(30.65 ± 1.96)% , 各组比较, 差异有统计学意义 ( $F=109.200, P=0.000$ ), 进一步两两比较, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组和阳性对照组细胞凋亡率高于阴性对照组 ( $P<0.05$ )。见图 5。

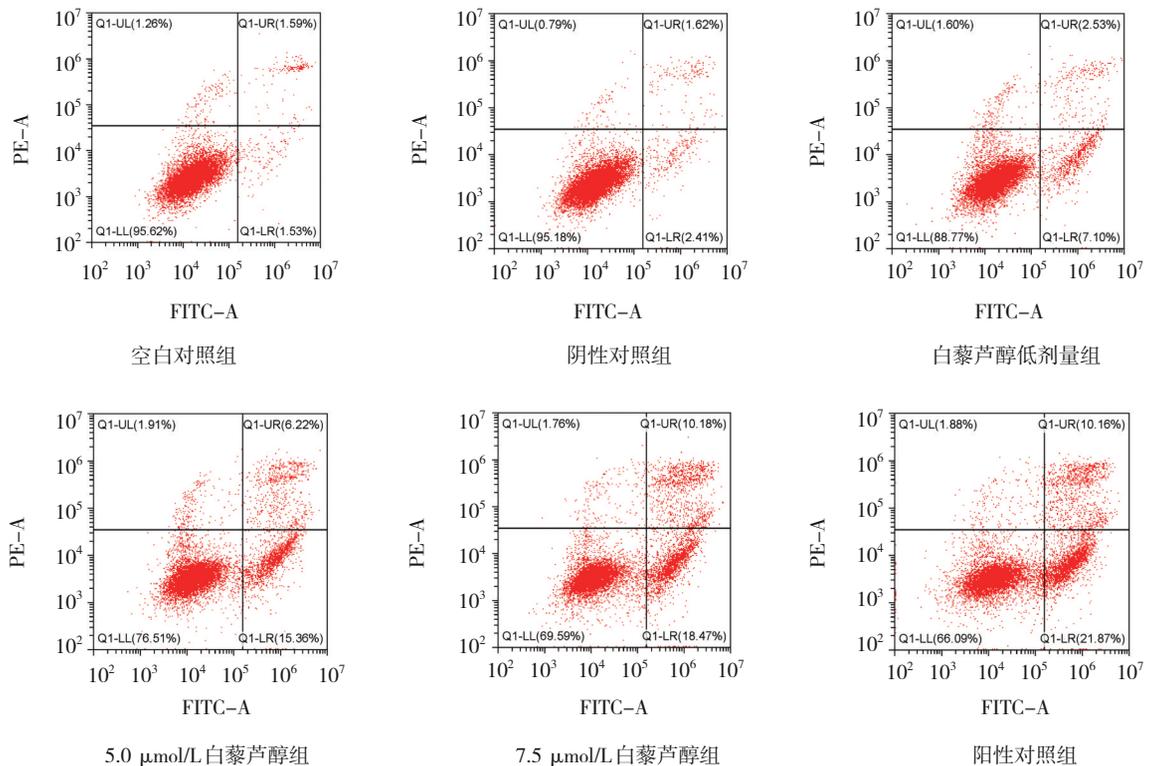
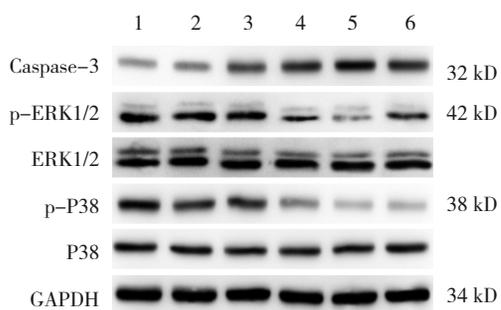


图 5 各组银屑病模型细胞凋亡的流式细胞图

## 2.6 各组银屑病模型细胞 p-ERK1/2、p-P38、Caspase-3蛋白相对表达量的比较

空白对照组、阴性对照组、2.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、阳性对照组银屑病模型细胞 Caspase-3、p-ERK1/2、p-P38 蛋白相对表达量的比较,采用单因素方差分析,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );进一步两两比较,5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组、阳性对照组与阴性对照组和空白对照组比较,Caspase-3 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ ),p-ERK1/2、p-P38 蛋白相对表达量降低( $P < 0.05$ )。见图6和表3。



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 2.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组; 4: 5.0  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组; 5: 7.5  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇组; 6: 阳性对照组。

图6 各组银屑病模型细胞 Caspase-3、p-ERK1/2、p-P38 蛋白表达

表3 各组银屑病模型细胞 Caspase-3、p-ERK1/2、p-P38 蛋白相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Caspase-3	p-ERK1/2	p-P38
空白对照组	0.26 $\pm$ 0.040	0.85 $\pm$ 0.028	0.99 $\pm$ 0.087
阴性对照组	0.31 $\pm$ 0.054	0.81 $\pm$ 0.033	0.78 $\pm$ 0.050
2.5 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.43 $\pm$ 0.125	0.64 $\pm$ 0.042	0.78 $\pm$ 0.062
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.67 $\pm$ 0.043 <sup>①②</sup>	0.43 $\pm$ 0.038 <sup>①②</sup>	0.38 $\pm$ 0.742 <sup>①②</sup>
7.5 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.77 $\pm$ 0.039 <sup>①②</sup>	0.31 $\pm$ 0.054 <sup>①②</sup>	0.17 $\pm$ 0.038 <sup>①②</sup>
阳性对照组	0.70 $\pm$ 0.035 <sup>①②</sup>	0.44 $\pm$ 0.032 <sup>①②</sup>	0.18 $\pm$ 0.050 <sup>①②</sup>
F 值	23.077	64.844	62.954
P 值	0.001	0.000	0.000

注: ①与阴性对照组比较, $P < 0.05$ ; ②与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

MAPK 家族有4个亚家族,包括 ERK、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、P38 和 ERK5,参与细胞的增殖、分化、基因表达和细胞凋亡过程<sup>[18-19]</sup>。其中 ERK1/2 和 P38 在细胞增殖或炎症因子的表达中发挥作用。

ERK1/2 的磷酸化会导致细胞周期蛋白 D1 的转录激活,周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂 P27 的降解以及 P90 核糖体 S6 激酶(P90RSK)的激活,并通过靶向基因表达来促进细胞增殖、存活和转移<sup>[20]</sup>。P38 的激活可降低肿瘤抑制因子 microRNA-200b 的表达,促进乳腺癌细胞的异常增殖<sup>[21]</sup>。可见,MAPK 信号通路的激活参与了肿瘤细胞的异常增殖。

白藜芦醇能够抑制癌细胞的增殖,并诱导各种类型癌细胞的细胞周期停滞和凋亡<sup>[22]</sup>。研究表明,白藜芦醇的抗肿瘤活性可通过调控 P38/MAPK 或 ERK/MAPK 发挥作用。在胰腺癌<sup>[23]</sup>、结肠癌<sup>[24]</sup>、肺癌<sup>[25]</sup>中,白藜芦醇可抑制 P38/MAPK 或 ERK/MAPK 通路抑制肿瘤细胞。在抗炎方面,有研究<sup>[26]</sup>发现,白藜芦醇可通过抑制 MAPK 信号通路中 P38 和 ERK 的磷酸化使促炎细胞因子——肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 (IL-1) 等的表达降低,从而抑制炎症反应。MAPK 通路是白藜芦醇发挥其生物学活性重要的信号传导通路。

目前,HaCaT 细胞是体外建立银屑病模型最常用的细胞,具有传代特征稳定,增殖和分化与角质形成细胞相似的特征。KGF 是促角质形成细胞增殖的最强因子,目前,国内多位学者<sup>[15-17]</sup>都采用 HaCaT 细胞复制银屑病模型,显微镜下细胞数量增多,密度增大,细胞呈圆形、长梭形,细胞增殖明显,此状态模拟银屑病病理生理改变。本研究首先通过不同浓度的 KGF 诱导 HaCaT 细胞,选择最佳刺激浓度及最佳刺激时间,即浓度为 40 ng/mL 的 KGF 刺激 24 h 后,HaCaT 细胞增殖明显,模拟银屑病角质形成细胞异常增殖情况,复制银屑病细胞模型。

半抑制浓度或半抑制率,即 IC<sub>50</sub>,是某种药物诱导细胞凋亡 50% 时的浓度。在进行体外实验设定实验药物浓度时,一般先计算出该药物的 IC<sub>50</sub> 值,后根据 IC<sub>50</sub> 值确定给药浓度,即 IC<sub>50</sub> 值分布在浓度点的中间。本研究先用不同浓度的白藜芦醇刺激 HaCaT 细胞,计算出的 IC<sub>50</sub> 为 5.3  $\mu\text{mol/L}$ ,并根据该结果设定下一步实验的白藜芦醇浓度,即低浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、中浓度为 5.0  $\mu\text{mol/L}$ 、高浓度为 7.5  $\mu\text{mol/L}$ 。然后,分别用 2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、5.0  $\mu\text{mol/L}$ 、7.5  $\mu\text{mol/L}$  的白藜芦醇,以及 5.0  $\mu\text{mol/L}$  维 A 酸干预银屑病模型细胞。MTT 法及流式细胞术检测细胞增殖及凋亡,结果显示,白藜芦醇可抑制 KGF 的促细

胞增殖效应,促进银屑病模型细胞凋亡。Western blotting 结果显示,使用白藜芦醇作用于银屑病模型细胞,其 Caspase-3 蛋白表达升高,而 p-ERK1/2 和 p-P38 蛋白表达降低。由此推测,白藜芦醇可能通过抑制 ERK/MAPK 通路和/或 P38/MAPK 通路发挥作用,抑制银屑病模型细胞的增殖并促进其凋亡。

综上所述,白藜芦醇可抑制银屑病模型细胞的增殖并促进其凋亡,其可能通过抑制 ERK/MAPK 通路和/或 P38/MAPK 通路发挥作用,具体作用机制还有待更深入的研究。

#### 参 考 文 献 :

- [1] BOEHNCKE W H. Systemic inflammation and cardiovascular comorbidity in psoriasis patients: causes and consequences[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 579.
- [2] 刘鑫, 钟小燕, 徐昌静, 等. Risankizumab 治疗中重度斑块状银屑病疗效与安全性的系统评价[J]. *中国新药与临床杂志*, 2020, 39(7): 434-439.
- [3] 赵志豪, 吴育茜. 寻常性银屑病患者外周血及皮损内 microRNA-31 和 microRNA-1266 的表达水平及临床意义[J]. *临床皮肤科杂志*, 2020, 49(7): 414-417.
- [4] RAPALLI V K, SINGHVI G, DUBEY S K, et al. Emerging landscape in psoriasis management: from topical application to targeting biomolecules[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 707-713.
- [5] 曾嘉琪, 孙乐栋. MAPK 信号通路在银屑病发病机制中的研究进展[J]. *心理月刊*, 2019, 14(10): 234-236.
- [6] 姜蔚蔚, 张春雷. 银屑病发病机制相关信号通路研究进展[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2018, 34(6): 378-381.
- [7] CHEN C F, WU N, DUAN Q Q, et al. C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8590.
- [8] 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.
- [9] 易世杰, 黄菊, 陈志伟. 白藜芦醇对鼻咽癌细胞生长凋亡的影响及相关作用机制[J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(12): 1291-1295.
- [10] 宋先兵, 黄焱平, 方安宁, 等. 白藜芦醇对 AA 大鼠关节成纤维样滑膜细胞凋亡诱导作用及可能机制[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 660-665.
- [11] TONG W Z, CHEN X X, SONG X, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced inflammation through suppressing the signaling cascades of TLR4-NF- $\kappa$ B/MAPKs/IRF3[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1824-1834.
- [12] CHOWDHURY P, JAYROE J J, WHITE B E, et al. Effects of a natural polyphenol on nicotine-induced pancreatic cancer cell proliferation[J]. *Tob Induc Dis*, 2018, 16: 50.
- [13] KJÆR T N, THORSEN K, JESSEN N, et al. Resveratrol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126599.
- [14] LEE J H, KIM J S, PARK S Y, et al. Resveratrol induces human keratinocyte damage via the activation of class III histone deacetylase, Sirt1[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 524-529.
- [15] 彭玲玲, 延祝, 夏育民. 银屑病的动物模型与细胞模型研究进展[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2020, 27(3): 204-206.
- [16] 段亚菊, 王文茜, 胡华, 等. IL-33 对人永生角质形成细胞系和模型小鼠银屑病样皮损的影响[J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(1): 67-72.
- [17] 王亚翠, 王文欢, 贾瑞璇, 等. 凉血消风汤对 HaCaT 细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路表达的影响[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2019, 33(2): 211-216.
- [18] ZHAO W H, XIAO S X, LI H J, et al. MAPK phosphatase-1 deficiency exacerbates the severity of imiquimod-induced psoriasiform skin disease[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 569.
- [19] MAVROPOULOS A, RIGOPOULOU E I, LIASKOS C, et al. The role of p38 MAPK in the aetiopathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 569751.
- [20] LIU X J, SI W Z, LIU X H, et al. JMJD6 promotes melanoma carcinogenesis through regulation of the alternative splicing of PAK1, a key MAPK signaling component[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 175.
- [21] XU M, WANG S Y, WANG Y C, et al. Role of p38 $\gamma$  MAPK in regulation of EMT and cancer stem cells[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3605-3617.
- [22] HO Y, LIN Y S, LIU H L, et al. Biological mechanisms by which antiproliferative actions of resveratrol are minimized[J]. *Nutrients*, 2017, 9(10): 1046.
- [23] CAO L, CHEN X, XIAO X, et al. Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(2): 735-743.
- [24] CHEN H, JIN Z L, XU H. MEK/ERK signaling pathway in apoptosis of SW620 cell line and inhibition effect of resveratrol[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(1): 49-53.
- [25] 秦萌萌, 高莹, 李昕玲, 等. 白藜芦醇通过下调 MEK/ERK/c-Jun 信号通路抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肺癌细胞增殖[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(3): 465-469.
- [26] ZHANG X, WANG Y A, XIAO C, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced mice mastitis through attenuating the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Microb Pathog*, 2017, 107: 462-467.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 韩乌日罕, 郭果香, 丽丽, 等. 白藜芦醇对银屑病细胞生长的影响及其作用机制的探讨[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(9): 41-48.

Cite this article as: HAN W R H, GUO G X, LI L, et al. Effect and mechanism of resveratrol on proliferation of psoriatic cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(9): 41-48.