

【引文格式】 梁丽娜, 骆青燕, 王欢, 等. 间充质干细胞通过抑制 TYK2 磷酸化缓解小鼠银屑病样皮炎的皮损病变[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2022, 29(3): 191-196. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8468.2022.03.001.

## 论著 · 基础研究

# 间充质干细胞通过抑制 TYK2 磷酸化缓解小鼠银屑病样皮炎的皮损病变

梁丽娜, 骆青燕, 王欢, 吉苏云

南方医科大学皮肤病医院, 广东 广州 510091

【摘要】 目的 探究间充质干细胞(MSCs)对咪喹莫特乳膏诱导的银屑病样皮炎小鼠皮损的 TYK2 磷酸化的影响。方法 建立咪喹莫特乳膏(IMQ)诱导银屑病样皮炎小鼠模型, 将小鼠随机分为空白组、IMQ 组及 IMQ + MSC 组, 通过 HE 染色、免疫荧光及 Western blot 等技术, 比较 MSCs 处理前后的银屑病样皮炎小鼠的皮损严重程度、表皮厚度、炎症细胞浸润程度及 TYK2 磷酸化水平的改变。结果 与空白组小鼠相比, IMQ 组小鼠出现红斑、鳞屑及 PASI 评分升高, HE 染色可见角化不全、Munro 微脓肿、棘层肥厚, 免疫荧光结果显示真皮内可见大量 CD4<sup>+</sup>T 细胞、树突状细胞浸润; 而 IMQ + MSC 组红斑、鳞屑均比 IMQ 组减轻, PASI 评分下降, 真皮内的 CD4<sup>+</sup>T 细胞、树突状细胞浸润比 IMQ 组明显减少。此外, IMQ 组的 TYK2 磷酸化水平比空白组升高, 差异有统计学意义 ( $1.233 \pm 0.163$  比  $0.634 \pm 0.117$ ,  $P < 0.05$ ), IMQ + MSC 组的 TYK2 磷酸化水平则比 IMQ 组下降 ( $0.501 \pm 0.074$  比  $1.233 \pm 0.163$ ,  $P < 0.05$ )。结论 MSCs 可通过抑制 TYK2 磷酸化缓解银屑病样皮炎小鼠的皮损严重程度。

【关键词】 间充质干细胞; 银屑病; 小鼠模型; TYK2

## Mesenchymal stem cells alleviate psoriasis-like dermatitis in mice by inhibiting TYK2 phosphorylation

LIANG Lina, LUO Qingyan, WANG Huan, JI Suyun

Dermatology Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510091, China

Corresponding author: JI Suyun, E-mail: gddhjisuyun@smu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) on TYK2 phosphorylation in psoriasis-like dermatitis induced by imiquimod cream in mice. **Methods** The mouse model of psoriasis-like dermatitis was induced by imiquimod cream (IMQ). The mice were randomly divided into blank group, IMQ group and IMQ + MSC group. The changes in skin lesion severity, epidermal thickness, inflammatory cell infiltration and TYK2 phosphorylation level were compared among the groups by HE staining, immunofluorescence and Western blotting. **Results** Compared with the blank group, the mice in IMQ group showed erythema, scales and increased PASI score. HE staining showed parakeratosis, Munro's microabscesses and acanthosis. Immunofluorescence showed infiltration of a large number of CD4<sup>+</sup>T cells and dendritic cells in the dermis. In comparison to IMQ alone, treatment with MSCs lowered the severities of both erythema and scales, and decreased PASI score and dermal infiltration of CD4<sup>+</sup>T cells and dendritic cells. In addition, the levels of TYK2 phosphorylation in IMQ group were significantly higher than that in

blank group ( $1.233 \pm 0.163$  vs  $0.634 \pm 0.117$ ,  $P < 0.05$ ), while the levels of TYK2 phosphorylation in IMQ + MSC group were lower than that in IMQ group ( $0.501 \pm 0.074$  vs  $1.233 \pm 0.163$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** MSCs can alleviate the severity of psoriasis-like dermatitis in mice by inhibiting TYK2 phosphorylation.

[**Keywords**] mesenchymal stem cells; psoriasis; mouse model; TYK2

银屑病 (psoriasis) 的发病与遗传背景、环境诱因、免疫应答异常等因素有关<sup>[1]</sup>, 其中 IL-23/Th17 轴被认为在银屑病的发生发展中有着重要作用<sup>[2]</sup>。Janus 激酶信号转导和转录激活因子 (JAK-STAT) 途径是一种重要的细胞因子信号转导途径<sup>[3]</sup>。TYK2 作为 JAK 家族成员之一, 介导 IL-23 诱导 Th17 细胞的增殖、活化, 促使 IL-17、IL-22、IL-23 等细胞因子表达增加, 与银屑病的发病机制有关<sup>[1]</sup>。既往研究报道 TYK2 抑制剂可显著抑制银屑病样皮炎小鼠的皮肤炎症和细胞因子的产生<sup>[4]</sup>, 目前 II 期临床研究结果也显示口服选择性 TYK2 抑制剂对中重度银屑病有着良好的治疗效果<sup>[5]</sup>。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种免疫原性低、自我更新能力强、免疫调节特性强的成体多能祖细胞, 因具有调节 B、T 细胞增殖、抑制树突状细胞成熟、抑制中性粒细胞动员等免疫调节功能, 被认为是治疗克罗恩病、系统性红斑狼疮等多种自身免疫或炎症性疾病的一种治疗方式<sup>[6-8]</sup>。有报道 2 例寻常型银屑病患者在接受 MSCs 治疗后疗效明显, 且观察 4~5 年均无复发<sup>[9]</sup>。但目前 MSCs 治疗银屑病的详细机制尚未清楚, 对 TYK2 的作用亦不清楚。因此, 本研究探讨 MSCs 对银屑病样皮炎小鼠 TYK2 的磷酸化影响, 为 MSCs 治疗银屑病的机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞

MSCs 来源于中山大学附属第三医院刘秋莉老师赠予的人脐血来源的第 4 代 MSCs。BALB/C 雌性小鼠, 共 9 只, 6~8 周龄, 购于广东省医学实验动物中心。研究经本院伦理委员会审批通过。

### 1.2 方法

1.2.1 MSCs 培养 在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 标准细胞培养箱中, 用 10% FBS (Gibco)、1% 双抗 (Gibco) 的低糖 DMEM 培养基 (Gibco) 中培养 MSCs, 取第

5~8 代的 MSCs 用于动物实验。

1.2.2 小鼠建模 随机分为 3 组: 空白组、咪喹莫特组 (IMQ 组) 及治疗组 (IMQ + MSC 组), 每组 3 只。剃掉小鼠背部毛发, 连续 6 d 在每只小鼠的背部均匀涂抹 62.5 mg 咪喹莫特乳膏。第 6 天, 涂抹咪喹莫特乳膏后, 空白组不予任何处理, IMQ 组经尾静脉注射 100 μL 的无菌 PBS 溶液, IMQ + MSC 组经尾静脉注射同体积的  $1 \times 10^6$  的 MSC 悬浮液。48 h 后, 予颈椎脱臼法分别将各组小鼠处死, 取背部皮肤组织备用。

1.2.3 PASI 评分 采用 PASI 评分动态评估各组皮损的严重程度, 红斑、鳞屑和皮损厚度评分为 0~4 分 (0 分: 无; 1 分: 轻度; 2 分: 中度; 3 分: 显著; 4 分: 非常显著)。红斑 + 鳞屑 + 皮损厚度的总分为最后评分。

1.2.4 HE 染色 取合适大小的近后正中线的背部皮肤组织于 4% 的多聚醛溶液中室温固定 24~48 h 后脱水、石蜡包埋, 制成 3 μm 厚的切片行苏木素和伊红染色。

1.2.5 免疫荧光染色检测皮肤组织中 CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD11c<sup>+</sup> 树突状细胞 取各组小鼠的病理切片行脱蜡、修复、封闭后, 用大鼠抗鼠 CD4<sup>+</sup> 抗体 (Biolegend, 1:500 稀释)、大鼠抗鼠 CD11c 抗体 (Biolegend, 1:500 稀释) 4 ℃ 孵育过夜, PBS 泡洗后予相应二抗 37 ℃ 孵育 1 h, 再次 PBS 泡洗后予 DAPI 荧光封片剂封存, 共聚焦显微镜下观察图像并保存。

1.2.6 Western blot 测定皮肤组织中 TYK2 及其磷酸化 液氮研磨各组小鼠的皮肤组织, 通过裂解、离心获取样品上清液。根据 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测定蛋白提取液的浓度。等量蛋白质 (约 50 μg) 上样、电泳、转膜, 5% 的 BSA 封闭 1 h 后兔抗 TYK2 磷酸化抗体 (Abmart, 1:500 稀释) 4 ℃ 过夜, TBST 洗涤后室温孵育相应二抗 1 h。将兔抗 TYK2 磷酸化抗体剥脱后, 用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 兔抗 TYK2 抗体 (Abmart, 1:1 000 稀

释)4 ℃ 过夜,TBST 洗涤后室温孵育相应二抗 1 h。均以 GAPDH(锐抗,1 : 5 000 稀释)作为内源性对照,用 ECL 试剂在多功能凝胶成像仪中检测目的条带。利用 ImageJ 软件对图像进行分析。

1.3 统计学处理

使用 Graphpad Prism 软件进行数据分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间均采用 *t* 检验进行数据分析,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 减轻银屑病样皮炎小鼠皮损严重程度  
在第 6 天,与空白组相比,IMQ 组及 IMQ + MSC 组均出现明显的红斑、鳞屑,PASI 评分明显升高;在第 8 天,与 IMQ 组比较,IMQ + MSC 组小鼠的红斑、鳞屑减轻,PASI 评分下降(图 1A ~ 1E)。表明 MSCs 减轻了银屑病样皮炎小鼠皮损的严重程度。

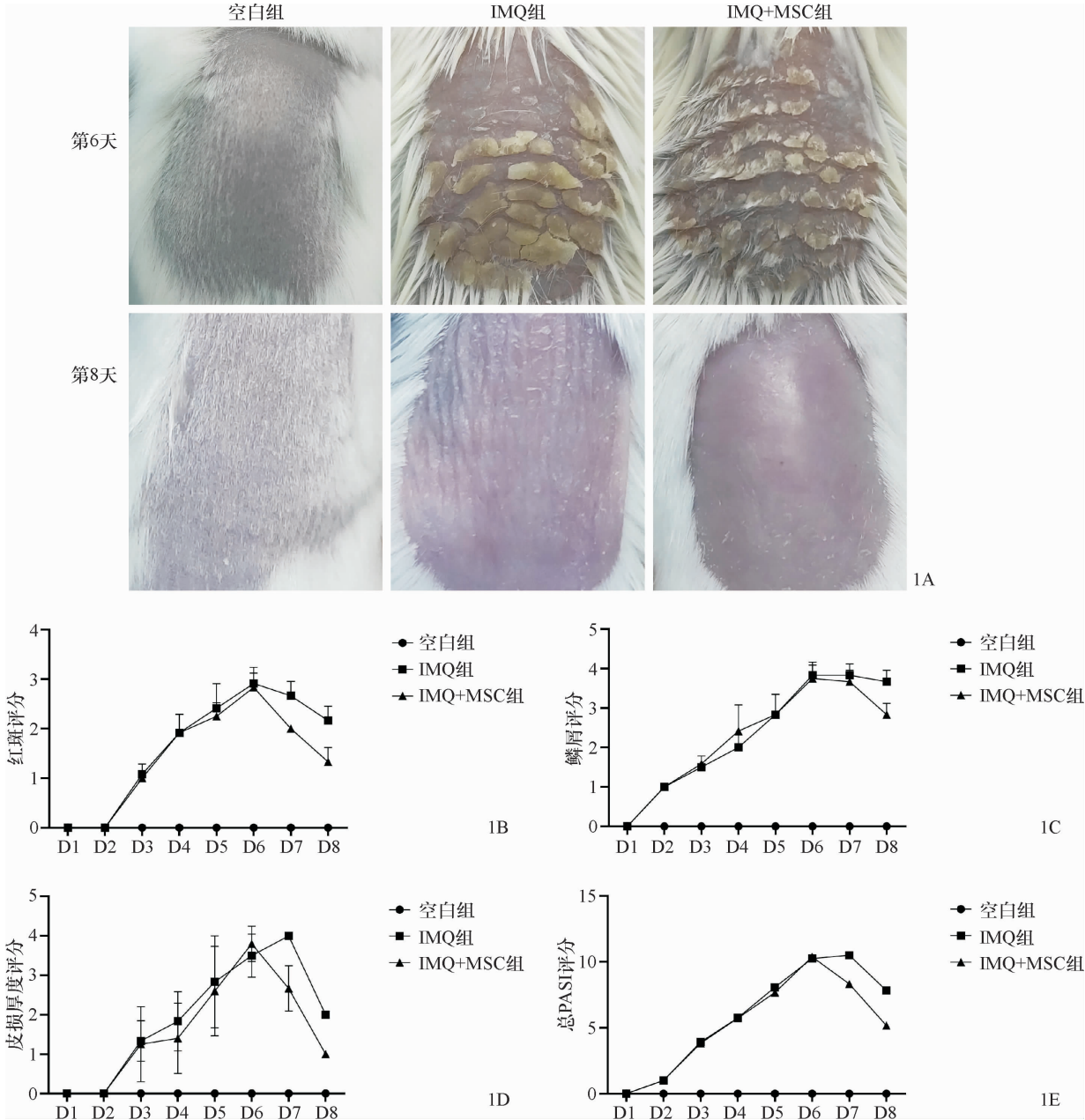


图 1 各组小鼠外观(1A)及红斑(1B)、鳞屑(1C)、皮损厚度(1D)评分、总 PASI 评分(1E)

Figure 1 Clinical pictures(1A) and erythema score(1B), scale score(1C), skin thickness score(1D), total PASI score(1E) in each group.

2.2 MSCs 减轻银屑病样皮炎小鼠的组织病理改变

建模第 6 天,咪喹莫特乳膏诱导 IMQ 组及 IMQ + MSC 组小鼠的 HE 染色可见角化不全、Munro 微脓肿、表皮增厚;而在 MSCs 治疗 2 d 后,与 IMQ 组相比,IMQ + MSC 组未见明显角化不全、Munro 微脓肿,表皮厚度明显变薄(图 2A、2B)。

建模第 8 天,在 IMQ 组的皮损中可见大量 CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD11<sup>+</sup>树突状细胞浸润,而 IMQ + MSC 组中 CD4<sup>+</sup>T 细胞及 CD11<sup>+</sup>树突状细胞明显减少(图 3)。证明 MSCs 可减轻银屑病样皮炎小鼠的组织病理改变及减少 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD11<sup>+</sup>树突状细胞的浸润。

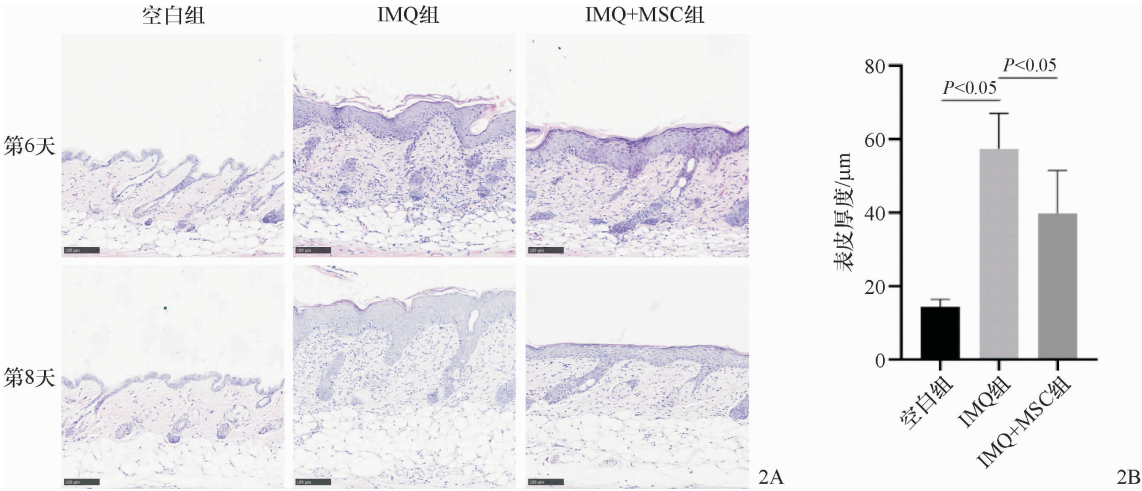


图 2 各组银屑病样皮炎小鼠皮肤组织病理学(2A,HE,200 ×)及第 8 天表皮厚度(2B)统计

Figure 2 Histopathology (HE staining,200 ×) of lesions of psoriasis-like mice(2A) and epidermal thickness in each group(2B).

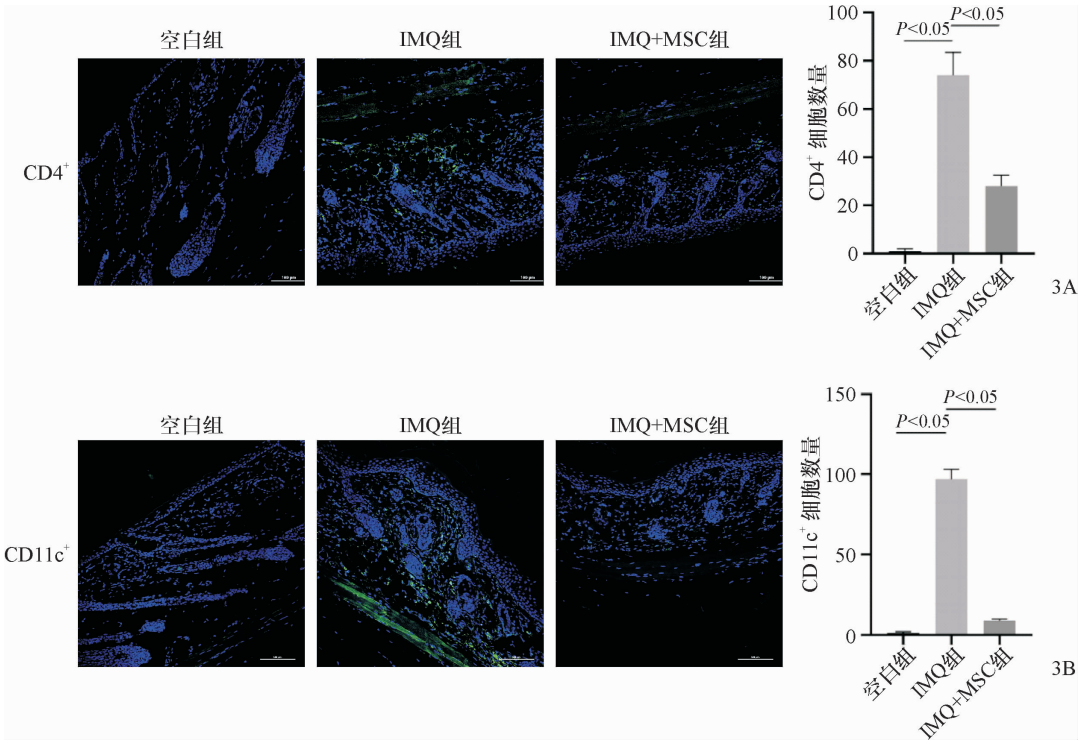


图 3 免疫荧光检测第 8 天各组小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD11c<sup>+</sup> 树突状细胞(200 ×)

Figure 3 Immunofluorescence results of CD4<sup>+</sup> T cells and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells in each group(200 ×).

2.3 MSCs 抑制银屑病样皮炎小鼠 TYK2 的磷酸化

Western blot 比较各组的 TYK2 及其磷酸化水平(图 4),结果显示各组的总 TYK2 表达水平未见差异,但 IMQ 组 TYK2 磷酸化水平升高

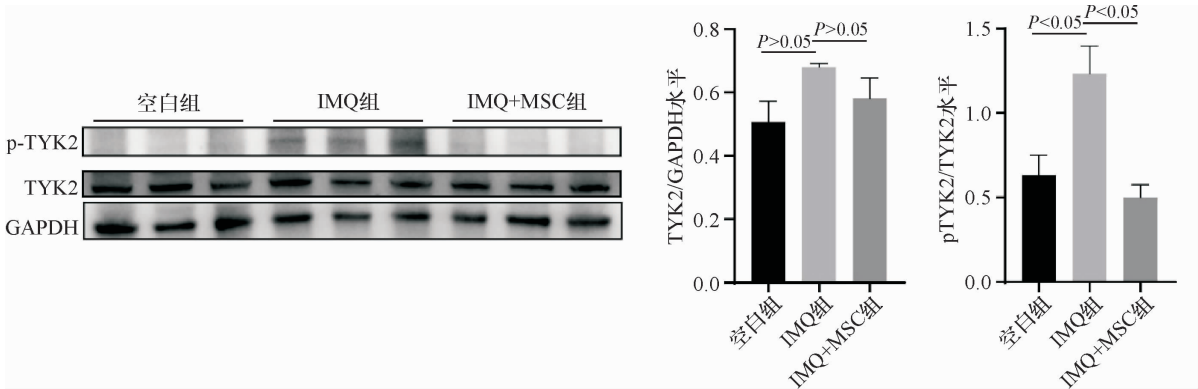


图 4 Western blot 分析各组小鼠的 TYK2 及其磷酸化水平

Figure 4 The levels of TYK2 and pTYK2/TYK2 of each group analyzed by Western blotting.

3 讨论

本研究探讨 MSCs 对银屑病样皮炎小鼠 TYK2 磷酸化的影响,结果显示 MSCs 的治疗可减轻咪喹莫特乳膏诱导的银屑病样皮炎小鼠红斑、鳞屑及 PASI 评分,并改善病变皮损的表皮厚度、炎症细胞浸润。此外,通过 Western blot 检测各组皮损的 TYK2 及其磷酸化水平,证明 MSCs 抑制了银屑病样皮炎小鼠 TYK2 的磷酸化水平,表明 MSCs 可通过抑制 TYK2 磷酸化减轻银屑病样皮炎小鼠皮损的严重程度。

银屑病的临床表现以局限或广泛分布的鳞屑性红色斑块为主,也可伴有系统疾病,皮损组织病理特征为角化过度、角化不全、Munro 微脓肿、棘层肥厚及中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞等炎症细胞浸润<sup>[10-11]</sup>。咪喹莫特乳膏作为一种 Toll 样受体 7/8 配体和强效免疫激活剂,反复涂抹可诱导并加重炎症性皮损,被广泛用于银屑病皮肤炎症模型<sup>[12]</sup>。本研究结果与既往研究<sup>[8]</sup>一致,咪喹莫特乳膏诱导小鼠出现银屑病样的红斑、鳞屑,组织病理也表现出银屑病的特征,包括角化过度、角化不全、Munro 微脓肿和真皮炎症细胞浸润等;MSCs 的治疗可明显缓解银屑病样皮炎小鼠的红斑、鳞屑、皮损厚度等临床表现,减轻表皮厚度、CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD11c<sup>+</sup>树突状细胞的浸润,验

( $1.233 \pm 0.163$  比  $0.634 \pm 0.117$ ,  $P < 0.05$ ),IMQ + MSC 组在治疗后比 IMQ 组下降( $0.501 \pm 0.074$  比  $1.233 \pm 0.163$ ,  $P < 0.05$ ),证明 MSCs 抑制了银屑病样皮炎小鼠 TYK2 的磷酸化。

证了 MSC 具有强大的抗炎、免疫调节功能,对银屑病样皮炎小鼠有着良好的疗效。

TYK2 作为 JAK 家族的成员之一,参与不同细胞因子如 IL-12、IL-23 启动的细胞内信号传递<sup>[13]</sup>,并在银屑病中参与了 Th17 细胞的增殖、活化<sup>[1]</sup>。在一项全基因组关联研究中,TYK2 被确定为银屑病易感位点<sup>[14]</sup>。TYK2 抑制剂显著减轻银屑病样皮炎小鼠皮损的严重程度及减少炎症因子产生<sup>[1, 4]</sup>。TYK2 被认为是银屑病的治疗靶标之一<sup>[15]</sup>。目前已完成的 II 期临床研究表明口服选择性 TYK2 抑制剂对中重度银屑病有着良好的临床疗效<sup>[1, 13]</sup>。本研究结果显示 MSCs 的治疗抑制了银屑病样皮炎小鼠 TYK2 的磷酸化,证明 MSCs 一定程度上是通过抑制 TYK2 的磷酸化减轻银屑病样皮炎小鼠的严重程度。

综上所述,MSCs 可通过抑制 TYK2 磷酸化缓解银屑病样皮炎小鼠的红斑、鳞屑、皮损厚度及相关炎症细胞浸润。

[参考文献]

[1] GHORESCHI K, BALATO A, ENERBÄCK C, et al. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis[J]. Lancet, 2021, 397(10275):754 - 766.

[2] BUNTE K, BEIKLER T. Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-me-

- diated inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14):3394.
- [3] XIN P, XU X, DENG C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80:106210.
- [4] ISHIZAKI M, MUROMOTO R, AKIMOTO T, et al. Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation [J]. *Int Immunol*, 2014, 26(5):257–267.
- [5] BALOGH E A, BASHYAM A M, GHAMRAWI R I, et al. Emerging systemic drugs in the treatment of plaque psoriasis [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2020, 25(2):89–100.
- [6] SINGER N G, CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:457–478.
- [7] OWCZARCZYK-SACZONEK A, KRAJEWSKA-WŁODARCZYK M, KRUSZEWSKA A, et al. Stem cells as potential candidates for psoriasis cell-replacement therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2182.
- [8] CHEN M, PENG J, XIE Q, et al. Mesenchymal stem cells alleviate moderate-to-severe psoriasis by reducing the production of type I interferon (IFN-I) by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) [J]. *Stem Cells Int*, 2019; 6961052. doi:10.1155/2019/6961052.
- [9] CHEN H, NIU J W, NING H M, et al. Treatment of psoriasis with mesenchymal stem cells [J]. *Am J Med*, 2016, 129(3):e13–e14.
- [10] RENDON A, SCHAKEL K. Psoriasis pathogenesis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6):1475.
- [11] GRIFFITHS C E M, ARMSTRONG A W, GUDJONSSON J E, et al. Psoriasis [J]. *Lancet*, 2021, 397(10281):1301–1315.
- [12] VAN DER FITS L, MOURITS S, VOERMAN J S A, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis [J]. *J Immunol*, 2009, 182(9):5836–5845.
- [13] NOGUEIRA M, PUIG L, TORRES T. JAK inhibitors for treatment of psoriasis; focus on selective TYK2 inhibitors [J]. *Drugs*, 2020, 80(4):341–352.
- [14] STRANGE A, CAPON F, SPENCER C C A, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1 [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(11):985–990.
- [15] GONCIARZ M, PAWLAK-BUŚ K, LESZCZYŃSKI P, et al. TYK2 as a therapeutic target in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Immunotherapy*, 2021, 13(13):1135–1150.

[ 收稿日期 ] 2022-03-21

[ 修回日期 ] 2022-05-20



全文下载



微信公众号