

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.11.002

网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220429.1450.016.html(2022-05-05)

清除 CCL20 对小鼠银屑病免疫微环境调控的影响研究^{*}彭诗亚¹, 杨 娟², 吴 倩¹, 诸 蓉¹, 王儒鹏^{1△}

(1. 陆军军医大学第二附属医院皮肤风湿免疫科, 重庆 400037; 2. 槐荫人民医院皮肤科, 济南 250021)

[摘要] **目的** 探讨清除 CC 趋化因子配体 20(CCL20)后小鼠银屑病样皮炎发病过程中免疫微环境的改变。**方法** 将 12 只雌性 C57BL/6 小鼠背部皮肤脱毛后分为实验组和对照组,各 6 只。使用咪喹莫特(IMQ)构建小鼠银屑病皮肤炎症模型,其中实验组小鼠注射 CCL20 抗体,对照组小鼠注射同等体积磷酸盐缓冲液(PBS),观察两组小鼠银屑病样皮损面积与严重程度指数(PASI)评分变化,并于造模第 7 天处死小鼠取材,通过苏木素-伊红(HE)染色、免疫组织化学染色及流式细胞学检测分析造模区域免疫微环境发生的变化。**结果** 相较于对照组,实验组小鼠红斑及鳞屑 PASI 评分明显降低。HE 染色结果显示,相较于对照组,实验组小鼠表皮厚度明显减小,皮下炎性细胞(以淋巴细胞为主)浸润明显减少,新生毛细血管减少($P<0.05$)。流式细胞学检测结果显示,相较于对照组,实验组小鼠表皮 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞(主要为 $V\gamma 4^+$ T 淋巴细胞)百分比、白细胞介素(IL)-17A⁺ T 淋巴细胞百分比明显降低($P<0.05$)。免疫组织化学结果显示,相较于对照组,实验组小鼠造模区皮肤炎症因子 IL-17A、 γ 干扰素(IFN- γ)、CXCL8 及 IL-23 表达水平均明显降低($P<0.05$)。**结论** 清除小鼠体内 CCL20 可改善银屑病样皮炎免疫微环境,减轻银屑病样皮炎对皮肤造成的破坏。

[关键词] 银屑病;咪喹莫特;免疫微环境;CC 趋化因子配体 20;小鼠**[中图分类号]** R758.63**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)11-1807-06Study on the effect of CCL20 clearance on the regulation of immune microenvironment of psoriasis in mice^{*}PENG Shiya¹, YANG Juan², WU Qian¹, ZHU Rong¹, WANG Rupeng^{1△}

(1. Department of Dermatology and Rheumatology Immunology, The Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Dermatology, The People's Hospital of Huaiyin, Jinan, Shandong 250021, China)

[Abstract] **Objective** To identify the alteration of immune microenvironment in the process of psoriasis after clearing Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20) in mice. **Methods** A total of 12 female C57BL/6 mice were divided into the experiment group and the control group, with six mice in each group. The psoriasis-like skin inflammation model of mice in each group was induced by using imiquimod (IMQ). The mice in the experiment group were injected intraperitoneally with anti-CCL20 antibody, and the mice in the control group were injected with the same volume of phosphate buffered saline (PBS) solution. Changes in the psoriasis area and severity index (PASI) score of mice in the two groups were measured. All mice were sacrificed on the 7th day after modeling, and the skin tissues of modeling area were obtained for experiments. The changes of immune microenvironment in the modeling area were analyzed by using hematoxylin-eosin (HE) staining, immunohistochemical staining and flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the PASI scores of erythema and scaly of mice in the experiment group were significantly decreased; the HE staining results showed that the thickness of the epidermis, subcutaneous inflammatory cells (mainly lymphocytes) infiltration, and the neovascularization were decreased of mice in the experiment group ($P<0.05$). The results of flow

^{*} 基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2018JCYJAX0222)。 作者简介:彭诗亚(1991—),住院医师,在读硕士研究生,主要从事银屑病[△] 通信作者, E-mail: wrp71@163.com。

cytometry showed that compared with the control group, the percentage of $\gamma\delta$ T lymphocytes (mainly $V\gamma 4^+$ T lymphocytes) and the percentage of $IL-17A^+$ T lymphocytes in the epidermis of mice in the experiment group decreased significantly ($P < 0.05$). The results of immunohistochemistry showed that compared with the control group, the expression levels of skin inflammatory factors, including interleukin (IL)-17A, interferon γ (IFN- γ), CXCL8 and IL-23 of mice in the experiment group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The clearance of CCL20 in mice could improve the immune microenvironment of psoriasis and reduce the damage of skin barrier caused by psoriasis-like skin inflammation.

[Key words] psoriasis; imiquimod; immune microenvironment; Chemokine (C-C motif) ligand 20; mice

银屑病是一种常见的自身免疫性炎症性皮肤病,世界范围内发病率在 0.5%~3.0%,具有病程长、易反复发作等特点^[1]。临床表现主要以红斑、鳞屑等破坏皮肤屏障的症状为主^[2-3]。银屑病的发病因素复杂^[4],发病初期树突状细胞被外界各种因素激活后,诱导皮肤内 T 淋巴细胞活化,分泌白细胞介素(IL)-17A、IL-22 等促炎因子^[5],促进角质形成细胞分泌趋化因子^[6],形成正向炎症环路加重银屑病。其中,CC 趋化因子配体 20 (CCL20) 起到尤为关键的作用^[7]。CCL20 是银屑病发病过程中角质形成细胞分泌的一种趋化因子,其产生与机械搔抓刺激有关。CC 趋化因子受体 6 (CCR6) 为 CCL20 的特异性趋化因子受体,主要表达于产生 IL-17 的 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞亚群、树突状细胞等^[8-9]。因此,CCL20 是维持银屑病炎症中正反馈环的关键分子^[10]。目前,已发现 P38/细胞外信号调节激酶/c-Jun 氨基末端激酶(P38/ERK/JNK) 信号通路与 CCL20 的生成有关^[11]。近年来,上皮免疫微环境(epithelial immune microenvironment, EI-ME) 在银屑病被作为一个单独的概念提出^[12]。CCL20 对于免疫微环境的调控及对皮肤屏障的保护作用尚未有相关研究报道。因此,本研究利用咪喹莫特(imiquimod, IMQ) 构建小鼠银屑病皮肤炎症模型,并注射 CCL20 中和抗体清除小鼠体内 CCL20,观察清除 CCL20 后小鼠银屑病发生过程中免疫微环境的改变,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康雌性 C57BL/6 小鼠,由陆军军医大学实验动物中心提供。所有小鼠在 22~24 °C、50% 湿度环境下独立饲养,且所有小鼠可自由获得饮水及食物。

1.1.2 主要仪器与试剂

戊巴比妥溶液(美国 Sigma 公司),IMQ 乳膏(美国 3M 公司),鼠抗 CCL20/巨噬细胞炎性蛋白-3 α (MIP-3 α) 抗体(美国 R&D 公司),苏木素-伊红(HE)

染液(上海碧云天生物技术有限公司),免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),全玻片扫描显微镜(日本 Olympus 公司),免疫组织化学抗体:兔抗小鼠 IL-17A 抗体、兔抗小鼠 IL-23 抗体、兔抗小鼠 γ 干扰素(IFN- γ) 抗体(美国 Abcam 公司);CXCL8(美国 Bioworld 公司),Attune 流式细胞检测仪(美国 Applied Biosystems 公司),流式细胞抗体:异硫氰酸荧光素(FITC) 抗鼠 CD3 抗体、PerCP/cy-nine5.5 抗鼠 $V\gamma 2$ 抗体、BV421 抗鼠 IL-17A 抗体、藻红蛋白(PE) 抗鼠 TCR γ/δ 抗体、Cell Activation Cocktail(美国 Biolegend 公司)、Fixation & Permeabilization(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠银屑病皮肤炎症模型建立及 CCL20 清除

将 12 只小鼠分为实验组和对照组,每组 6 只。建模参照文献[13];所有小鼠使用 1% 戊巴比妥溶液麻醉,并对背部皮肤脱毛(面积 2.5 cm $\times$ 3.0 cm);脱毛后 1~6 d,每只小鼠涂抹 IMQ 乳膏 62.5 mg/d;脱毛后 1~3 d,其中实验组小鼠腹腔注射总体积 200 μ L 含 20 μ g CCL20 抗体的磷酸盐缓冲液(PBS),对照组小鼠腹腔注射等体积 PBS。每天对小鼠背部造模区域拍照并行银屑病皮损面积与严重程度指数(psoriasis area and severity index, PASI) 评分,造模后 7 d 处死小鼠取材进行下一步实验。

1.2.2 小鼠 PASI 评分及组织学分析

小鼠皮肤红斑及鳞屑严重程度评分标准如下:0 分,无;1 分,轻度;2 分,中度;3 分,严重;4 分,非常严重^[14]。取材后的皮肤组织放入 4% 多聚甲醛溶液脱水固定,石蜡包埋,制作成 5 μ m 厚石蜡切片。对每组小鼠石蜡切片进行 HE 染色,随后在光学显微镜下观察切片并进行炎症细胞浸润计数。使用 Image-pro Plus6.0 软件计算造模区域皮肤表皮厚度。

1.2.3 免疫组织化学(IHC) 染色

按照 1.2.2 中所述步骤制作小鼠皮肤组织石蜡

切片,使用二甲苯及梯度浓度乙醇对切片进行脱蜡及水化,随后将切片放入枸橼酸钠溶液中加热 15 min 进行抗原修复。修复抗原后冷却至室温,使用 3% 过氧化氢(H_2O_2)溶液阻断内源性过氧化物酶,再使用 10% 山羊血清进行抗原封闭。分别滴加兔抗小鼠 IL-17A、IL-23、IFN- γ 、CXCL8 抗体(1 : 500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,第 2 天使用山羊抗兔二抗室温孵育 30 min。使用二氨基联苯胺进行抗体染色,并使用苏木素进行细胞核染色。在光学显微镜下观察组织切片并拍照,使用 Image-pro Plus6.0 软件计算分析。

1.2.4 真/表皮细胞的分离及流式细胞检测

使用 GNK 消化液 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化背部取材皮肤,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。第 2 天用镊子分离真皮及表皮,并将其分别放置于烧杯中,剪碎组织。表皮组织加入适量胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 15 min,其后终止消化,并使用 70 μm 筛网过滤收集细胞。此外,按 2 mL DMEM 培养基、含 1 mL 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基、1 mL 2% IV 型胶原酶、1 mL PBS 及 10 U DNaseI 比例配置真皮细胞消化液,其后于水平摇床上消化细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。终止消化后,如前收集真皮细胞。使用细胞活化剂 Cocktail 孵育 4 h,表面标记染色完成后使用 Fixation & Permeabilization 混合液使细胞固定、打孔,其后细胞内抗体染色。染色后的细胞用流式细胞仪检测,并用 Flowjo 软件分析结果。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计分析,正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CCL20 清除后改善小鼠银屑病模型皮损症状

实验组小鼠造模区域皮肤红斑、鳞屑症状较对照组小鼠均有所减轻,见图 1。实验组小鼠银屑病模型红斑、鳞屑 PASI 评分均明显低于对照组,与大体照片结果一致,见图 2。

2.2 CCL20 清除后可减轻小鼠银屑病样炎症典型病理特征

HE 染色结果表明,相较于对照组,实验组小鼠表皮厚度明显减小,角质形成细胞异常增生情况明显缓解,角化程度减轻,细胞核质比接近正常角质形成细胞,见图 3A、B。相较于对照组,实验组小鼠表皮厚度减小[(38.80 $\pm$ 7.48) μm vs. (71.37 $\pm$ 12.23) μm],皮下炎症细胞(以淋巴细胞为主)浸润减少[(311.30 $\pm$ 47.29)/0.3 mm^2 vs. (508.90 $\pm$ 98.71)/0.3 mm^2],皮下新生毛细血管数减少[(11.08 $\pm$ 2.39)/0.3 mm^2

vs. (21.00 $\pm$ 3.07)/0.3 mm^2],差异均有统计学意义($P<0.001$),充血程度得到缓解,见图 3C~E。

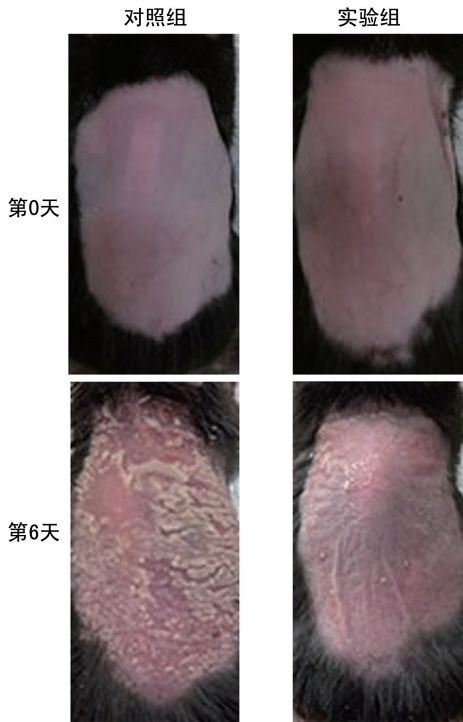
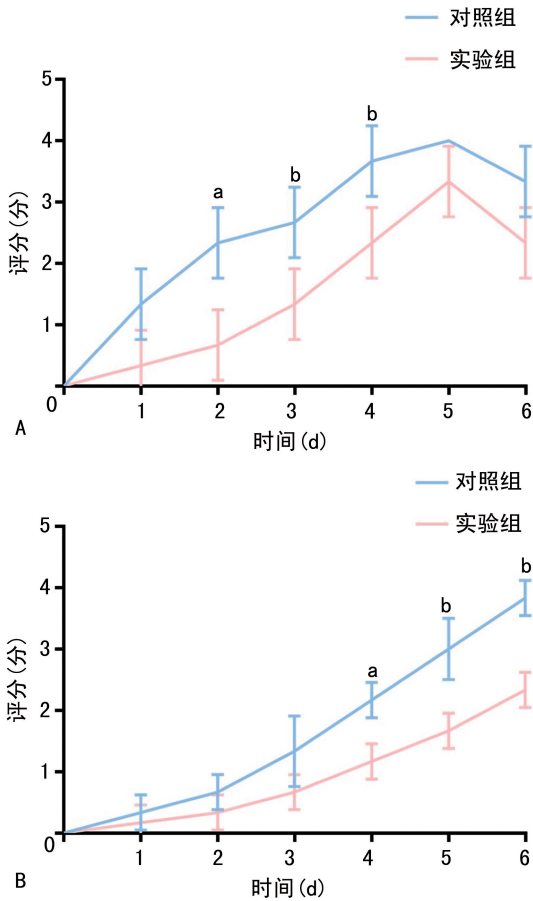
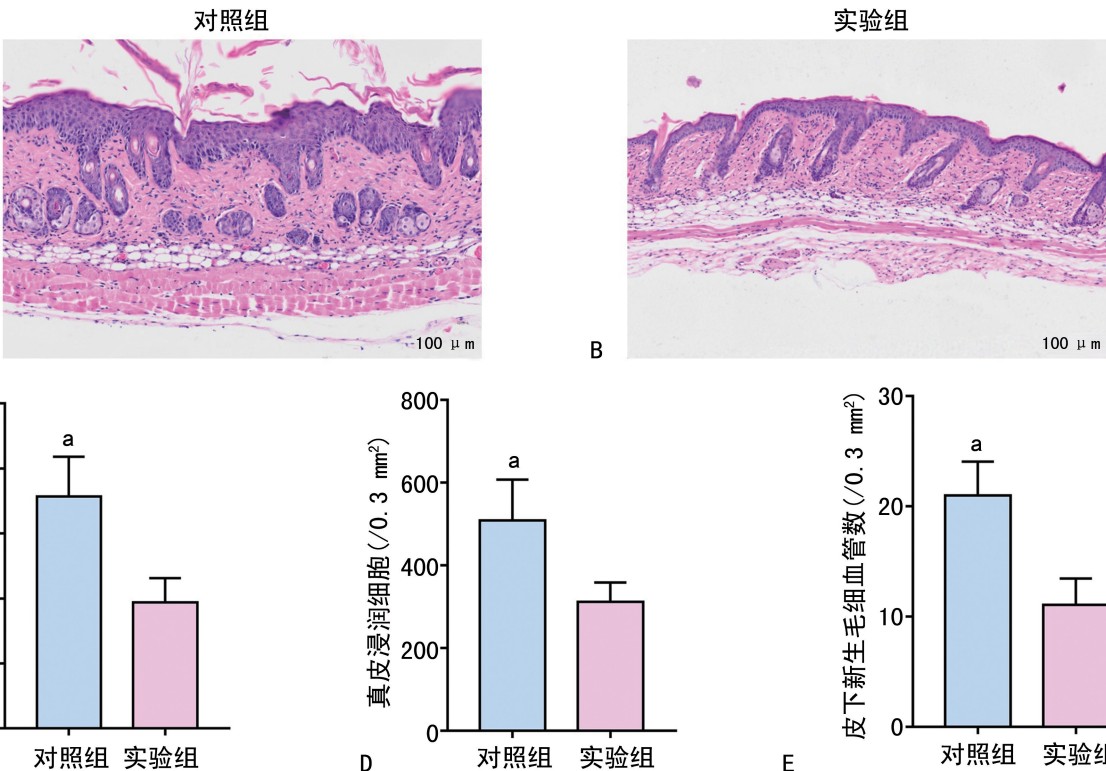


图 1 两组小鼠造模区域大体照片对比



A: 红斑 PASI 评分; B: 鳞屑 PASI 评分; ^a: $P<0.01$, ^b: $P<0.05$, 与实验组比较。

图 2 两组小鼠红斑、鳞屑 PASI 评分



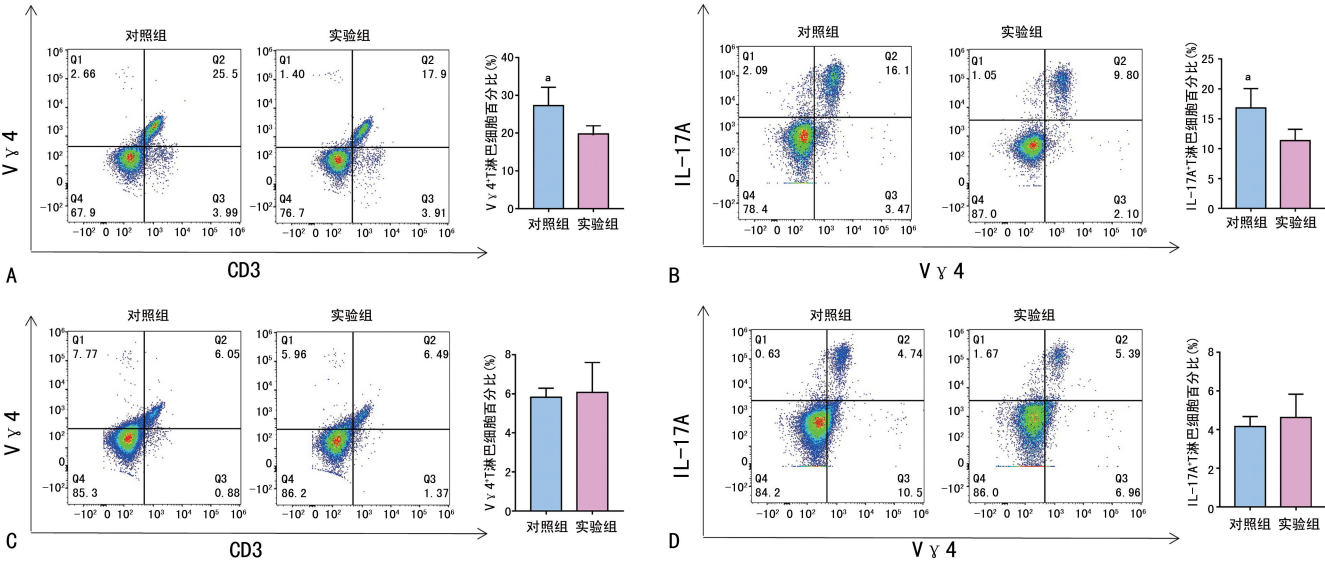
A、B:小鼠皮肤组织石蜡切片 HE 染色(×200);C:两组小鼠表皮厚度统计柱状图;D:两组小鼠真皮浸润细胞数量统计柱状图;E:两组小鼠新生毛细血管数统计柱状图;^a: $P<0.001$,与实验组比较。

图 3 两组小鼠皮肤组织 HE 染色结果

2.3 CCL20 清除后可减少表皮 $\gamma\delta$ T 细胞趋化和相关炎症因子的表达

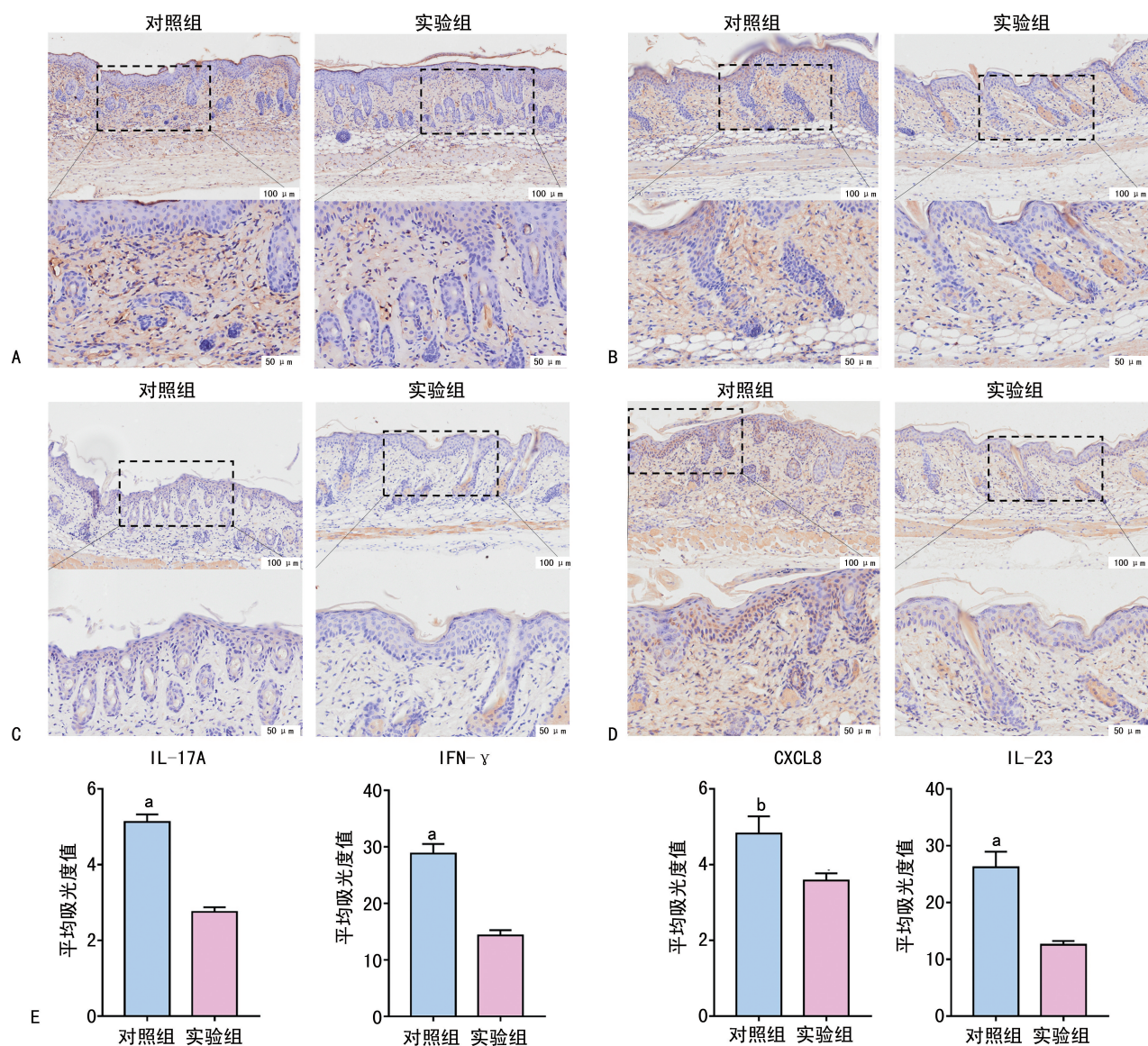
流式细胞学检测显示,相较于对照组,实验组小鼠表皮 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞(主要为 $V\gamma 4^+$ T 淋巴细胞)百分比、IL-17A⁺ T 淋巴细胞百分比明显降低($P<$

0.05),而两组小鼠真皮的上述细胞百分比无明显差异($P>0.05$),见图 4。免疫组织化学结果表明,相较于对照组,实验组小鼠造模区皮肤炎症因子 IL-17A、IFN- γ 、CXCL8 及 IL-23 表达水平均降低($P<0.05$),见图 5。



A、B:两组小鼠表皮 T 淋巴细胞浸润情况;C、D:两组小鼠真皮 T 淋巴细胞浸润情况;^a: $P<0.05$,与实验组比较。

图 4 流式细胞检测两组小鼠皮肤 T 淋巴细胞浸润情况



A: IL-17A; B: IFN-γ; C: CXCL8; D: IL-23; E: 两组小鼠造模区皮肤炎症因子表达水平统计柱状图; ^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与实验组比较。

图 5 两组小鼠造模区皮肤炎症因子 IHC 染色及表达水平比较

3 讨 论

银屑病是一种常见的慢性炎症性皮肤病,发病因素复杂,主要表现为红斑、鳞屑性斑块等,同时影响患者局部上皮免疫微环境^[15]。而 CCL20 作为银屑病发病过程中的关键趋化因子,可以与表面表达 CCR6 的淋巴细胞相结合,使淋巴细胞在皮肤局部聚集,扩大炎症反应,加重银屑病病情^[16]。本研究结果发现,在实验组小鼠体内使用 CCL20 抗体后,小鼠的银屑病症状相较于对照组明显减轻,PASI 评分降低,表明在银屑病模型中清除 CCL20 可以明显改善银屑病样皮炎症状,起到保护皮肤屏障的作用。

本研究组织病理学染色结果表明,CCL20 清除后,实验组小鼠表皮层细胞增殖数量及异常增殖减少,而表皮细胞过度增殖及异常增殖是银屑病特征性的病理改变^[17];此外,染色结果显示淋巴细胞浸润及皮下新生血管数量明显减少,淋巴细胞浸润反映了皮肤局部的炎症改变,而新生周围毛细血管是皮肤免疫

微环境的重要组成部分。这一结果从组织学上表明了清除 CCL20 可以改善小鼠银屑病模型的病理变化,达到缓解或治疗银屑病样皮炎的效果。

本研究流式细胞学结果显示,清除 CCL20 后,实验组小鼠表皮内 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞(主要为 $V\gamma 4^+$ T 淋巴细胞)浸润明显减少,且 $IL-17A^+$ T 淋巴细胞百分比也相应降低。 $V\gamma 4^+$ T 淋巴细胞是维持银屑病病程正反馈环的关键细胞之一,其分泌的相关炎症因子 IL-17A、IFN- γ 等可以作用于角质形成细胞^[18-19],促进角质形成细胞增殖并表达更多炎症因子及趋化因子,不断放大银屑病病程^[20-21]。免疫组织化学染色结果也表明,CCL20 清除后,实验组小鼠相关炎症因子 IL-17A、IFN- γ 、CXCL8 及 IL-23 在局部的表达明显受到抑制。CCL20 清除后可以阻断银屑病病程中的正反馈环,明显抑制炎症反应,阻止其对皮肤及局部免疫微环境的破坏。

综上所述,清除银屑病发病过程中的 CCL20,可

以通过抑制关键细胞 $V\gamma 4^+$ T 淋巴细胞的趋化打破银屑病发病过程中的正反馈环,抑制银屑病病程中的炎症反应。此外,清除 CCL20 后,表皮角质形成细胞的异常增殖被抑制且异常增殖减少,皮下新生毛细血管数量减少。炎症细胞、炎症因子、角质形成细胞及新生周围毛细血管均为银屑病局部表皮微环境的重要组成部分,因此,清除 CCL20 后可明显改善银屑病皮肤局部表皮免疫微环境,保护银屑病病程中的皮肤屏障,改善相关症状。因此,清除 CCL20 可考虑作为缓解或治疗银屑病的方式之一,有待更进一步的研究。

参考文献

- [1] HAWKES J E, CHAN T C, KRUEGER J G. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(3): 645-653.
- [2] ARMSTRONG A W, READ C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323(19): 1945-1960.
- [3] 宋建坤, 蒯仂, 罗楹, 等. 银屑病合并代谢紊乱的相关机制研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(14): 2753-2758.
- [4] 王超颖. 银屑病发病机制研究新进展[J/CD]. *世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊)*, 2019, 19(60): 28-31.
- [5] 王宇, 杨斌. 银屑病与特应性皮炎的 T 细胞免疫失衡机制研究进展[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2021, 28(3): 232-236.
- [6] RUSSELL S E, STEFANSKA A M, KUBICA M, et al. Toll IL-1R8/single Ig IL-1-related receptor regulates psoriasiform inflammation through direct inhibition of innate IL-17A expression by $\gamma\delta$ T cells[J]. *J Immunol*, 2013, 191(6): 3337-3346.
- [7] GETSCHMAN A E, IMAI Y, LARSEN O, et al. Protein engineering of the chemokine CCL20 prevents psoriasiform dermatitis in an IL-23-dependent murine model[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(47): 12460-12465.
- [8] MABUCHI T, SINGH T P, TAKEKOSHI T, et al. CCR6 is required for epidermal trafficking of $\gamma\delta$ -T cells in an IL-23-induced model of psoriasiform dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(1): 164-171.
- [9] SHIN J W, KWON M A, HWANG J, et al. Keratinocyte transglutaminase 2 promotes CCR6 $^+$ $\gamma\delta$ T-cell recruitment by upregulating CCL20 in psoriatic inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 301.
- [10] FURUE K, ITO T, TSUJI G, et al. The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis[J]. *Scand J Immunol*, 2020, 91(3): e12846.
- [11] FURUE K, ITO T, TANAKA Y, et al. The EGFR-ERK/JNK-CCL20 pathway in scratched keratinocytes may underpin koebnerization in psoriasis patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 434.
- [12] DAINICHI T, KITOH A, OTSUKA A, et al. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(12): 1286-1298.
- [13] ZHU R, CAI X, ZHOU C, et al. Dermal $V\gamma 4^+$ T cells enhance the IMQ-induced psoriasis-like skin inflammation in re-challenged mice[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5347-5360.
- [14] ONDERDIJK A J, HEKKING-WEIJMA I M, FLORENCIA E F, et al. Surgical denervation in the imiquimod-induced psoriasiform mouse model[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1559: 75-81.
- [15] 程龙龙, 姜述堃, 杜阳, 等. 银屑病的发病机制及其研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(2): 227-232.
- [16] FURUE K, ITO T, TANAKA Y, et al. Cytokine/chemokine profile of in vitro scratched keratinocyte model: Implications of significant up-regulation of CCL20, CXCL8 and IL36G in Koebner phenomenon [J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 94(1): 244-251.
- [17] 孙冷冰, 龚坚, 刘巧. 银屑病角质形成细胞增殖机制的研究进展[J]. *天津医药*, 2021, 49(5): 545-549.
- [18] HARPER E G, GUO C, RIZZO H, et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis[J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(9): 2175-2183.
- [19] 李欣, 刘拥军, 刘广洋. IL-17 信号通路及其在银屑病中的作用[J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(6): 546-552.
- [20] SHIBATA S, TADA Y, HAU C S, et al. Adiponectin regulates psoriasiform skin inflammation by suppressing IL-17 production from $\gamma\delta$ -T cells[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7687.
- [21] HOMEY B, DIEU-NOSJEAN M C, WIESEN-BORN A, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CCR6 chemokine receptor 6 in psoriasis[J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6621-6632.