

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.025.html>

◇临床医学研究◇

Th1/Th2 趋化因子及其受体在大疱性类天疱疮皮损中的表达

王东霞, 叶珊珊, 李莹洁, 王再兴

摘要 目的 探讨 Th1 趋化因子 MIG/CXCL9、I-TAC/CXCL11 与其受体 CXCR3, Th2 趋化因子 TARC/CCL17、MDC/CCL22 及其受体 CCR4 在大疱性类天疱疮(BP)患者发病中的作用。方法 应用免疫组化及光密度(OD)技术检测趋化因子 CXCL9、CXCL11、CCL17、CCL22 及受体 CXCR3、CCR4 在 50 例 BP 患者皮损及 30 例正常皮肤中的表达。结果 50 例 BP 患者皮损中 4 种趋化因子及其受体阳性表达的 OD 值均高于正常皮肤。其中, BP 皮损和对照组 Th1 趋化因子 CXCL9、CXCL11 及其受体 CXCR3 表达的 OD 值分别为 (0.55 ± 0.09) vs (0.26 ± 0.08) 、 (0.38 ± 0.06) vs (0.18 ± 0.04) 和 (0.37 ± 0.04) vs (0.22 ± 0.02) , Th2 趋化因子 CCL17、CCL22 及其受体 CCR4 表达的 OD 值分别为 (0.42 ± 0.10) vs (0.25 ± 0.12) 、 (0.35 ± 0.04) vs (0.21 ± 0.03) 和 (0.42 ± 0.05) vs (0.24 ± 0.07) , 且表达差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 Th1 趋化因子 CXCL9、CXCL11 和 Th2 趋化因子 CCL17、CCL22 及其受体 CXCR3、CCR4 可能与 BP 的发病相关, 对探讨 BP 发病机制有一定的价值。

关键词 大疱性类天疱疮; CXCL9; CXCL11; CCL17; CCL22; CXCR3; CCR4

中图分类号 R 751

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0947-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.025

大疱性类天疱疮(bullous pemphigoid, BP)是发生于老年人的自身免疫性大疱性皮肤病,发病机制尚不完全明确。近年来,趋化因子及其受体在自身免疫性疾病发病中的作用是国内外学者研究的热点。研究^[1-3]证实,趋化因子参与天疱疮、系统性硬化症和银屑病等自身免疫性疾病发病过程。该研究应用免疫组化方法观察 BP 患者皮损中 Th1/Th2 趋化因子及其受体的表达,探讨其与 BP 发病机制是否相关,以对 BP 的发病机制有更深入的了解。

2018-03-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271747)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院皮肤科, 安徽医科大学皮肤病研究所, 合肥 230022

作者简介: 王东霞, 女, 硕士研究生;

王再兴, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wzx2370@163.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 50 例 BP 患者来自 2016 年 1 月~2016 年 12 月在安徽医科大学第一附属医院皮肤科门诊就诊和住院治疗患者, 所有病例经临床表现、组织病理、免疫荧光等检查明确诊断为 BP, 其中女 28 例, 男 22 例, 年龄 21~92(69.56 ± 15.82) 岁。30 例对照组系我院皮肤科手术切除的健康人皮肤, 女 20 例, 男 10 例, 年龄 8~73(33.33 ± 15.20) 岁。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 CXCL9 多抗、兔抗人 CXCL11 多抗、兔抗人 CCL17 单克隆抗体、兔抗人 CCL22 多抗、小鼠抗人 CXCR3 单克隆抗体、兔抗人 CCR4 多抗, 购自美国 Abcam 公司; 二抗试剂盒(PV-6000)、DAB 试剂盒, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 实验方法 免疫组化 SP 法染色, 按 SP 试剂盒说明操作。显微镜观察所有染色切片趋化因子及其受体的表达, 以细胞和细胞间质呈现黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。每张切片随机选取 5 个完整而不重复的显微镜下视野, 应用 JEOR801D 图像分析软件测定每个视野下 4 种趋化因子及受体表达的光密度(OD)值, 最后取其平均值进行统计学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 趋化因子及受体阳性表达的 OD 值数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种趋化因子及其受体的表达部位 对照组中 4 种趋化因子及其受体只在表皮基底细胞层中少量表达, 细胞膜和细胞间质可见棕黄色颗粒; BP 患者皮损中 4 种趋化因子及其受体主要表达于表皮基底细胞层和中上部棘细胞层细胞质和细胞膜, 尤其是淋巴细胞浸润部位, 在乳头层血管内皮细胞、水疱的疱顶及水疱间质均有表达。见图 1。

2.2 4 种趋化因子及其受体在 BP 患者及健康对照

皮肤中的表达数量 BP 皮损中 4 种趋化因子及其受体阳性表达的 OD 值均高于对照组。其中, BP 皮损中 Th1 趋化因子 CXCL9、CXCL11 及其受体 CXCR3 表达的 OD 值分别为 (0.55 ± 0.09) 、 (0.38 ± 0.06) 和 (0.37 ± 0.04) , Th2 趋化因子 CCL17、CCL22 及其受体 CCR4 表达的 OD 值分别为 (0.42 ± 0.10) 、 (0.35 ± 0.04) 和 (0.42 ± 0.05) 。对照组中 CXCL9、CXCL11 及其受体 CXCR3 表达的 OD 值分别为 (0.26 ± 0.08) 、 (0.18 ± 0.04) 和 (0.22 ± 0.02) , CCL17、CCL22 及其受体 CCR4 表达的 OD 值分别为 (0.25 ± 0.12) 、 (0.21 ± 0.03) 和 (0.24 ± 0.07) 。4 种趋化因子及其受体在 BP 皮损和对照组皮肤中的表达差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 见表 1。

3 讨论

CD4⁺ T 细胞在适应性免疫反应过程中起关键作用, 这些细胞需精确和协调地迁移至炎症部位才能适当发挥效应功能。细胞归巢由细胞膜上趋化因子受体的动态表达来控制, 不同 CD4⁺ T 细胞子集根据其表达趋化因子受体不同, 与特定趋化因子结合发生定向迁移^[4]。Th1 细胞表达的典型趋化因子受体是 CXCR3, CXCR3 轴是典型的炎症轴, CXCR3 在原始 T 细胞上不存在, 而配体仅在细胞暴露于炎性刺激时诱导产生。CXCL11 是最有效的配体, 其次是 CXCL10 和 CXCL9^[5]。CXCR3 对于 Th1 细胞的募集是至关重要的, 在缺乏 CXCR3 的情况下, 感染、自身免疫性疾病和许多癌症中的 Th1 细胞迁移受到

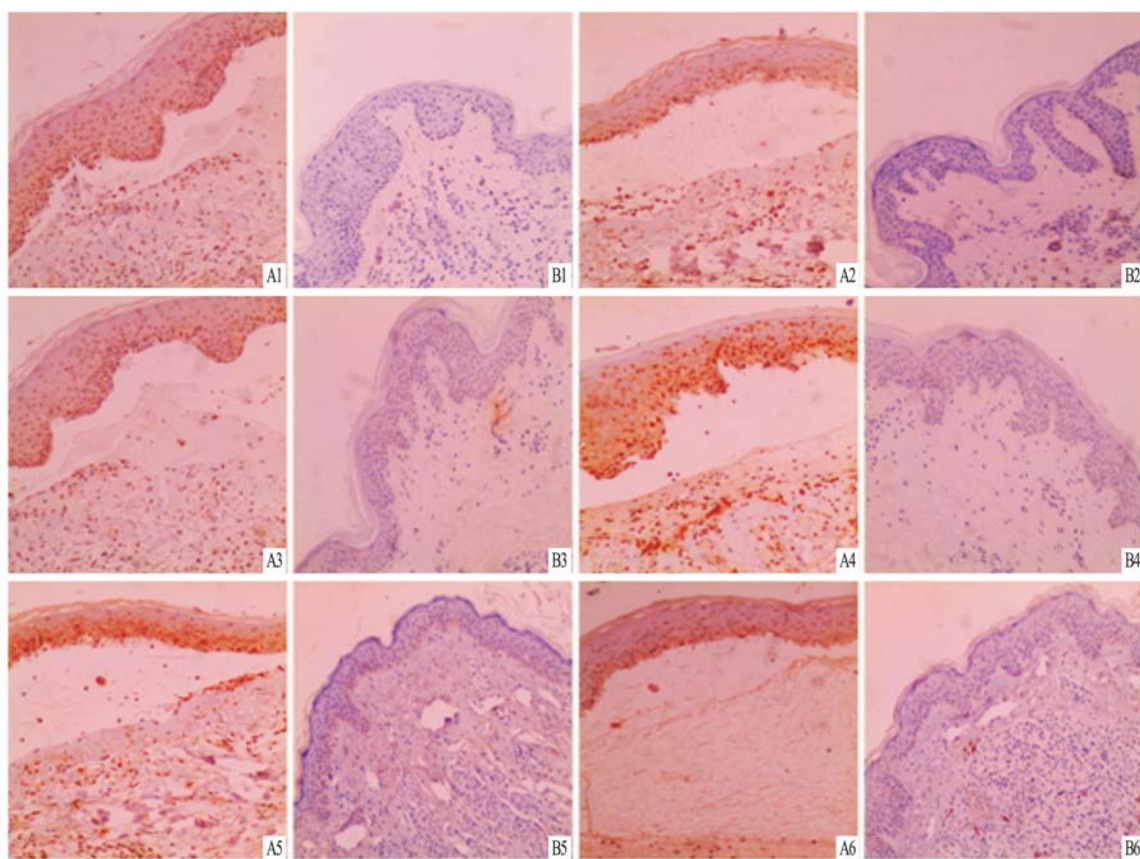


图 1 BP 患者皮损和对照组皮肤中 4 种趋化因子及其受体免疫组化结果 SP × 200

A: BP 组; B: 对照组; 1: CXCL9; 2: CXCL11; 3: CCL17; 4: CCL22; 5: CXCR3; 6: CCR4

表 1 BP 皮损和对照组皮肤中 4 种趋化因子及其受体的表达($\bar{x} \pm s$)

项目	MIG		I-TAC		CXCR3		TARC		MDC		CCR4	
	BP 组	对照组	BP 组	对照组	BP 组	对照组	BP 组	对照组	BP 组	对照组	BP 组	对照组
OD 值	0.55 ± 0.09	0.26 ± 0.08	0.38 ± 0.06	0.18 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.42 ± 0.10	0.25 ± 0.12	0.35 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.24 ± 0.07
t 值	13.64		19.4		21.05		6.62		16.43		11.99	
P 值	<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01	

抑制^[6]。Th2 细胞优势表达 CCR4, 特异性配体是 CCL17 和 CCL22^[7]。特应性皮炎模型中, CCR4 缺陷的 Th2 细胞不能迁移至炎症部位, 这对引发皮肤炎症是必不可少的^[8]。

BP180 胞外跨膜结构域-非胶原 16A 结构域 (NC16A) 是自身抗体作用的主要靶点, BP180 NC16A 特异性自身抗体主要是 IgE 和 IgG, 抗体血清水平与疾病活动性相关^[9]。多数 BP 患者体内具有自身反应性 T 细胞, 主要与细胞膜上 BP180NC16A 位点结合, 这些 T 淋巴细胞属于 CD4⁺ T 细胞, 可以生成 Th1/Th2 混合细胞因子^[10]。研究^[11]认为, Th1 和 Th2 细胞因子的血清水平升高与 BP 患者的疾病活动相关。Th1 细胞因子 (如 IFN- γ) 能够诱导 IgG1 和 IgG2 的分泌, 而 Th2 细胞因子 (如 IL-4, IL-5 和 IL-13) 可以调节 IgG4 和 IgE 的分泌, BP 患者血清中同种型抗 BP180 和抗 BP230 抗体 IgG1、IgG4 和 IgE 的检测表明, 自身反应性 Th1 和 Th2 细胞参与了对 BP 靶抗原反应的调节。

Kakinuma et al^[12] 通过检测 20 例 BP 患者血清和疱液中 CCL17 水平及 4 例 BP 患者皮肤组织中 CCL17 表达水平, 发现 BP 患者血清、疱液和皮损中 CCL17 水平升高, 且血清 CCL17 水平与嗜酸性粒细胞水平及疾病活动性呈正相关, 治疗后水平下降。Echigo et al^[13] 通过检测 27 例 BP 患者血清中 CXCL9 和 CCL17、CCL22 的水平, 发现它们的血清水平均升高, 随着病情缓解其水平下降。国内耿士玲等^[14] 应用免疫组化方法检测 30 例 BP 患者皮损中 Th1 趋化因子 CXCL9、CXCL10、CXCL11 和 Th2 型趋化因子 CCL22 及其受体 CXCR3、CCR4 的表达, 结果显示 BP 皮损中 4 种趋化因子及其受体的表达均高于对照组皮肤。本研究使用免疫组化方法, 并首次应用光密度 (OD) 技术检测 50 例 BP 患者和 30 例对照组 Th1 趋化因子 CXCL9、CXCL11 和 Th2 趋化因子 CCL17、CCL22 及受体 CXCR3、CCR4 的表达情况。研究结果显示, BP 患者和对照组中 4 种趋化因子及其受体仅表达于表皮层, 细胞膜和细胞间质可见棕黄色颗粒; BP 患者皮损中 4 种趋化因子及其受体主要表达于表皮基底细胞层和中上部棘细胞层, 尤其是淋巴细胞浸润部位, 在乳头层血管内皮细胞、水疱的疱顶及水疱间质均有表达。对照组皮肤中只在表皮基底细胞层表达。BP 患者皮损中 4 种趋化因子及其受体阳性表达的 OD 值均高于对照组。证实 BP 患者皮损中 Th1 和 Th2 趋化因子表达

水平均升高, 提示其在 BP 患者体内 Th1 和 Th2 细胞募集过程中起重要作用, 从而参与 BP 发病过程。

本研究结果表明趋化因子可能参与了 BP 发病过程, 其与细胞因子及炎症细胞相关作用机制还需进一步探索。

参考文献

- [1] Timoteo R P, da Silva M V, Miguel C B, et al. Th1/Th17-related cytokines and chemokines and their implications in the pathogenesis of pemphigus vulgaris [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 7151285.
- [2] Hoffmann-Vold A M, Tennoe A H, Gaen T, et al. High level of chemokine ccl18 is associated with pulmonary function deterioration, lung fibrosis progression, and reduced survival in systemic sclerosis [J]. *Chest* 2016, 150(2): 299–306.
- [3] Mabuchi T, Chang T W, Quinter S, et al. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis [J]. *J Dermatol Sci* 2012 65(1): 4–11.
- [4] Nibbs R J, Graham G J. Immune regulation by atypical chemokine receptors [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(11): 815–29.
- [5] Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, et al. CXCR3 ligands in disease and therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015 26(3): 311–27.
- [6] Groom J R, Luster A D. CXCR3 in T cell function [J]. *Exp Cell Res* 2011 317(5): 620–31.
- [7] Sallusto F. Heterogeneity of human CD4⁺ T cells against microbes [J]. *Annu Rev Immunol* 2016 34: 317–34.
- [8] Oyoshi M K, Elkhail A, Scott J E, et al. Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin [J]. *J Clin Invest* 2011, 121(6): 2210–20.
- [9] Kalowska M, Ciepiela O, Kowalewski C, et al. Enzyme-linked immunoassay index for anti-NC16a IgG and IgE auto-antibodies correlates with severity and activity of bullous pemphigoid [J]. *Acta Derm Venereol* 2016 96: 191–6.
- [10] Pickford W J, Gudi V, Haggart A M, et al. T cell participation in autoreactivity to NC16a epitopes in bullous pemphigoid [J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180(2): 189–200.
- [11] Kasperkiewicz M, Zillikens D. The pathophysiology of bullous pemphigoid [J]. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007, 33(1–2): 67–77.
- [12] Kakinuma T, Wakugawa M, Nakamura K, et al. High level of thymus and activation-regulated chemokine in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid [J]. *Br J Dermatol* 2003, 148(2): 203–10.
- [13] Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, et al. Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases [J]. *Arch Dermatol Res*, 2006 298(1): 38–45.
- [14] 耿士玲, 单士军, 吴剑, 等. 大疱性类天疱疮皮损中 Th1/Th2 趋化因子及其受体的表达 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(3): 270–2.

Expression of Th1/Th2 chemokines and their receptors in bullous pemphigoid lesions

Wang Dongxia, Ye Shanshan, Li Yingjie et al

(Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Anhui Medical University Institute of Dermatology, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the role of Th1 chemokines MIG/CXCL9, I-TAC/CXCL11 and Th2 chemokines TARC/CCL17, MDC/CCL22 and their receptors CXCR3, CCR4 in the pathogenesis of bullous pemphigoid (BP). **Methods** The expression of CXCL9, CXCL11, CCL17, CCL22 and CXCR3 and CCR4 in 50 cases of BP lesions and 30 cases of normal skin were detected by immuno-histochemistry and optical density (OD). **Results** The expression of four chemokines and their receptors positive values in 50 patients with BP were significantly higher than those in normal skin. The expression of CXCL9, CXCL11 and CXCR3 in the BP lesion and normal skin were (0.55 ± 0.09) vs (0.26 ± 0.08), (0.38 ± 0.06) vs (0.18 ± 0.04) and (0.37 ± 0.04) vs (0.22 ± 0.02) respectively, and the expression of Th2 chemokine CCL17, CCL22 and its receptor CCR4 were (0.42 ± 0.10) vs (0.25 ± 0.12), (0.35 ± 0.04) vs (0.21 ± 0.03) and (0.42 ± 0.05) vs (0.24 ± 0.07), and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Th1 chemokines CXCL9, CXCL11 and Th2 chemokines CCL17, CCL22 and their receptors CXCR3, CCR4 may be associated with the pathogenesis of BP, and have a certain value in understanding the pathogenesis of BP.

Key words bullous pemphigoid; CXCL9; CXCL11; CCL17; CCL22; CXCR3; CCR4

(上接第 937 页)

Study on the folic acid reference standard and its correlation with dietary patterns in newly-married women in Hefei

Xie Qianru^{1,2}, Cai Heng², Guo Feng², et al

(¹Dept of Maternal and Child Health Care, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, ²Dept of Maternal Health Care, Hefei Maternal and Child Health Care and Family Planning Service Centre, Hefei 230001)

Abstract Objective To establish folic acid reference standards, and to explore the relationship between folic acid and dietary patterns among newly-married women in Hefei. **Methods** This study selected 2 500 newly married women aging from 20 to 35 years. Blood samples of the participant were collected for serum folic acid testing. In addition, participants have been investigation by questionnaire, and have physical examination. **Results** In this study, the results indicated that the values of serum folic acid revealed positive skew distribution. The level of serum folic acid lower than the P_{50} (11.63 nmol/L) had been defined as low folic acid level in our study. Newly-married women with higher monthly income and BMI had lower level of serum folic acid, and the different level of serum folic acid were varies from different areas ($P < 0.05$). "Newly-married Women's Dietary Pattern Questionnaire" with 15 items (including traditional pattern, animal protein pattern, nutrition pattern, and beverage pattern 4 dimensions) had good reliability and validity. The low-level of nutrition pattern was the risk factor, while the low-level and high-level beverage pattern were protective factors of lower serum folic acid among newly-married women ($P < 0.05$). **Conclusion** The low-level of serum folic acid has been defined that the level of serum folic acid among newly-married women is lower than 11.63 nmol/L in Hefei area. The dietary patterns of newly-married women have a relationship with the serum folic acid level.

Key words folic acid; reference standard; dietary pattern; newly-married