

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)22-2065-03

银屑病患者淋巴细胞与中性粒细胞中趋化因子受体 CXCR3 mRNA 的表达

杨桂兰¹ 陈志强² 郑家润² 李新宇² 陈 沅² 徐兰芳² 高纪伟² 唐美育²(¹ 兰州军区兰州总医院皮肤科,甘肃 兰州 730050, ² 中国医学科学院,中国协和医科大学皮肤病研究所,江苏 南京 210042)

Expression of CXCR3 mRNA in peripheral blood lymphocytes and neutrophils in patients with psoriasis

YANG Gui-Lan¹, CHEN Zhi-Qiang², ZHENG Jia-Run², LI Xin-Yu², CHEN Yun², XU Lan-Fang², GAO Ji-Wei², TANG Mei-Yu²¹ Department of Dermatology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China, ² Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expression of chemokine receptor CXCR3 mRNA in peripheral blood lymphocytes and neutrophils in patients with progressive plaque psoriasis and its correlation with Psoriasis Area and Severity Index (PASI). **METHODS:** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to semi-quantitatively analyze CXCR3 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes and neutrophils from 33 psoriatic cases, 16 cases with about 70% remission of the 33 patients after treatment and 30 healthy controls. The correlation between CXCR3 mRNA expression and PASI was evaluated. **RESULTS:** CXCR3 mRNA level in lymphocytes from psoriatic patients was 1.12 ± 0.81 , markedly higher than that in normal controls (0.28 ± 0.28 , $P < 0.01$) and treated patients (0.57 ± 0.61 , $P < 0.05$). Furthermore, a positive correlation was noticed between CXCR3 mRNA expression and PASI ($r = 0.516$, $P < 0.05$). However, there was no statistic significance in CXCR3 mRNA level in neutrophils among pretreated psoriatic patients (1.72 ± 1.68), normal controls (1.27 ± 1.17 , $P > 0.05$) and treated patients (1.27 ± 1.01 , $P > 0.05$). **CONCLUSION:** The increased expression of CXCR3 in lymphocytes may be associated with migration and aggregation of lymphocytes in psoriatic lesion,

suggesting that this chemokine receptor be involved in the pathogenesis of progressive plaque psoriasis.

【Keywords】 psoriasis; lymphocytes; receptor CXCR3, chemokines, CXC

【摘要】目的:了解银屑病患者外周血淋巴细胞与中性粒细胞中CXC型趋化因子受体CXCR3 mRNA的表达水平及其与银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI)之间的关系。方法:应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测进行期斑块型银屑病患者33例及其中16例患者治疗后外周血淋巴细胞及中性粒细胞中CXCR3 mRNA的表达水平,设30例健康人作为正常对照,并将检测结果与PASI进行了相关性分析。结果:斑块型银屑病患者外周血淋巴细胞中CXCR3 mRNA表达水平为 1.12 ± 0.81 ,明显高于健康对照组(0.28 ± 0.28 , $P < 0.01$)与治疗后患者(0.57 ± 0.61 , $P < 0.05$),并与PASI之间呈明显正相关($r = 0.516$, $P < 0.05$),而中性粒细胞中CXCR3 mRNA表达水平为 1.72 ± 1.68 ,与健康对照组(1.27 ± 1.17)及同一组患者治疗后(1.27 ± 1.01)相比均无明显差异($P > 0.05$)。结论: CXCR3可能主要通过活化与趋化外周血淋巴细胞而参与了银屑病的发病机制。

【关键词】 银屑病 淋巴细胞 受体 CXCR3 趋化因子 CXC

【中图分类号】 R758.63 **【文献标识码】** A

0 引言

银屑病的病理特征之一为表皮和真皮中白细胞浸润,其中主要为中性粒细胞及淋巴细胞。趋化因子是主要使细胞发生趋化作用的细胞因子,分为CXC, CC, XC及CX3C四型。趋化因子通过与其特异性受体结合发挥作用,相应的趋化因子受体也分为CXC, CC, XC及CX3C四型。大量研究结果显示趋化因子及其受体系统参与了炎症的发病机制,尤其与炎症细胞向皮损局部的移行关系密切。银屑病患者外周血中性粒细胞中趋化因子受体CXCR1与CXCR2 mRNA的表达增高,可能参与了中性粒细胞的活化及其向皮损部位的趋化^[1]。CXCR3为CXC型趋化因子干扰素诱导的单核因子(Mig)及干扰素诱导蛋白10(IP-10)的特异性受体,有报道Mig mRNA在银屑病皮损部位真皮上部高表达^[2]。目前对银屑病患者外

收稿日期 2006-04-13; 接受日期 2006-06-27

基金项目:卫生部科技专项基金(981041)

通讯作者 陈志强. Tel: (0931)3272006 Email: johnzqchen@hotmail.com

作者简介 杨桂兰. 博士,副主任医师. Tel: (0931)3272006 Email: drgly2006@126.com

周血淋巴细胞与中性粒细胞中 CXCR3 的表达情况仍不明确。

1 材料和方法

1.1 材料 明确诊断的中、重度进行期斑块状银屑病患者 33 例 均为 2002-03/2002-12 在中国医学科学院皮肤病医院就诊的门诊或住院患者 其中男 19 例 女 14 例 年龄 18 ~ 65 岁 病程 4 mo ~ 40 a. 用银屑病皮损面积和严重程度指数 (psoriasis area and severity index, PASI) 来评估患者的疾病严重程度. 入选标准: 年龄在 18 周岁以上 临床诊断明确 PASI 评分在 8.4 以上 近 3 mo 内未用过维甲酸制剂、皮质类固醇激素及免疫抑制剂 1 mo 内未用过治疗银屑病的内服及外用药物 无其他系统性疾病或皮肤疾病 女性患者排除怀孕、哺乳及月经期. 健康对照 30 例 均来自中国医学科学院皮肤病研究所研究生、体检职工及皮肤外科整形美容的患者 男 17 例 女 13 例 年龄 18 ~ 50 岁 (经统计学处理 年龄、性别与银屑病患者组无统计学差异). 对符合上述入选标准的患者详细记录病史资料 进行血常规检查 征得患者本人同意后自肘静脉取血 8mL 加入肝素抗凝管备分离 标本收集完毕后根据患者病情给予相应的抗银屑病药物治疗^[1]至皮损消退 70% 以上时再次进行血常规检查 取疗后血 并再次记录患者的 PASI 评分 共收集到治疗后患者 16 例 (男 9 例 女 7 例 年龄 22 ~ 58 岁).

Hema 480 基因扩增仪 (珠海黑马医学仪器有限公司), TFX-20M 紫外检测仪 (Vilber Lourmat 法国), CS-9000 双波长飞点薄层扫描仪 (日本岛津), TRIzol (GIBICO/BRL), SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). 特异性引物 CXCR3 5'-TCCTTGAGGTGAGTGACCACAAA-3', 5'-CTCGT-CGTGGTGGCCGACAG-3' 扩增片段为 584 bp; β -肌动蛋白 5'-CAACTCCATCATGAAGTGGAAC-3', 5'-CCACACGGAGTACTTGCGCGCCTC-3' 扩增片段为 180 bp. 由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法 用 RT-PCR 方法检测淋巴细胞与中性粒细胞中 CXCR3 的基因表达水平. 用 60 g/L 葡聚糖溶液沉降红细胞 淋巴细胞分层液分离淋巴细胞与中性粒细胞 显微镜下计数 2×10^6 个细胞. 总 RNA 提取试剂 TRIzol™ 提取淋巴细胞与中性粒细胞总 RNA. 紫外分光法检测 RNA 纯度 TBE/琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性. 严格按照 Invitrogen 的试剂盒说明书进行操作反转录合成 cDNA. 以 cDNA 为模板建立

PCR 反应体系: 反应总体积为 25 μ L, 反应程序为: 94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 首次循环 94℃ 预变性 5 min, 共进行 35 个循环 最后 72℃ 延伸 7 min. 以 β 肌动蛋白作为内参照进行半定量, CXCR3 与 β 肌动蛋白同管扩增. PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 以每厘米胶长 5 V 的电压进行电泳 50 min 后在紫外检测仪上观察结果并进行近距离摄影 用薄层扫描仪扫描胶片 基因表达水平以内参照 β 肌动蛋白基因为基准校正后获得.

统计学处理: 采用 SPSS10.0 软件处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 治疗前后数据用配对资料 t 检验分析 基因表达量用 One-Way ANOVA (单因素方差分析) 方法 两两比较用最小显著差数法 (Least-significant difference) 检验. 相关性分析采用 Pearson 线性相关. $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

治疗前患者的 PASI 评分为 8.4 ~ 47.2 (27.3 \pm 8.8). 所收集到的治疗后患者的 PASI 评分为 1.2 ~ 15.3 (5.0 \pm 3.9) 经统计学分析 比相应患者治疗前的 PASI 评分 (10.8 ~ 47.2, 25.6 \pm 10.8) 下降 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$).

进行期斑块状银屑病患者淋巴细胞及中性粒细胞中 CXCR3 mRNA 的平均表达水平见表 1 及图 1. 银屑病患者治疗前外周血淋巴细胞中 CXCR3 mRNA 表达水平明显高于健康对照组 ($P < 0.01$) 及 16 例治疗后患者 ($P < 0.05$) 并与 PASI 之间呈明显正相关 ($r = 0.516, P < 0.05$) 而 16 例治疗后患者与健康对照组相比无统计学差异 ($P > 0.05$) 银屑病患者外周血中性粒细胞中 CXCR3 mRNA 表达水平与健康人对照组及 16 例治疗后患者相比均无明显统计学差异 ($P > 0.05$).

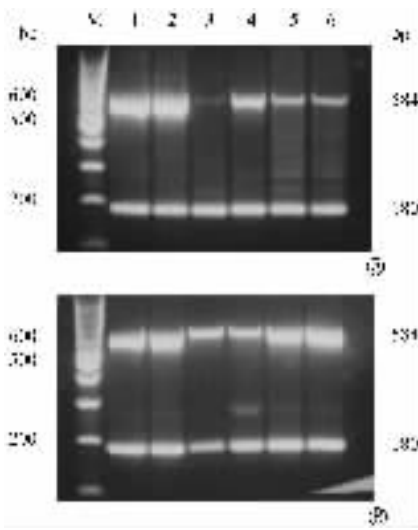
表 1 外周血淋巴细胞及中性粒细胞中 CXCR3 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 淋巴细胞 | 中性粒细胞 |
|------|----|-------------------------------|-----------------|
| 健康对照 | 30 | 0.28 \pm 0.28 | 1.27 \pm 1.17 |
| 银屑病 | | | |
| 治疗前 | 33 | 1.12 \pm 0.81 ^{ab} | 1.72 \pm 1.68 |
| 治疗后 | 16 | 0.57 \pm 0.61 | 1.27 \pm 1.01 |

^a $P < 0.05$ vs 治疗后, ^b $P < 0.01$ vs 健康对照.

3 讨论

银屑病是一种在多基因遗传背景下、受多种内外环境因素刺激和诱导的自身免疫性慢性炎症性皮肤



A: 淋巴细胞; B: 中性粒细胞. M: 100 bp marker; 1~2: 银屑病患者的治疗前; 3~4: 健康对照; 5~6: 银屑病患者治疗后. 180 bp: 内参照 β -肌动蛋白; 584 bp: CXCR3.

图1 淋巴细胞与中性粒细胞中 CXCR3 mRNA 的电泳图

病. 免疫异常在银屑病的发病机制中起到核心作用, 参与银屑病皮损部位免疫反应的细胞主要涉及淋巴细胞、角质形成细胞、抗原提呈细胞等, 而细胞因子是各种免疫细胞之间相互作用的枢纽^[3-4].

现认为银屑病是一种 T 细胞介导的自身免疫性疾病. 在体外, 银屑病患者外周血单个核细胞具有促进自身角质形成细胞生长的作用^[5], 提示银屑病皮肤的病理变化也与淋巴细胞的过度活化有关. 细菌超抗原介导的银屑病发病机制与 T 淋巴细胞活化有关, 有研究^[6]显示极微量的链球菌 M6 蛋白可引起点滴状银屑病患者外周血单一核细胞明显增殖, 导致 Th1 型细胞因子 IFN- γ 明显增加. T 细胞介导的免疫异常在银屑病的发病机制中起到核心作用, T 细胞不只局限于真皮, 而且进入表皮诸层, 参与银屑病发病的 T 细胞主要为活化的 I 型 T 细胞, 表皮主要为 Tc1 细胞, 真皮主要为 Th1 细胞. 细胞因子是细胞之间相互作用的主要介质, 在银屑病皮损部位, T 细胞、抗原提呈细胞、角质形成细胞等通过细胞因子、趋化因子发生相互作用, 而且其间的关系变得复杂而紊乱^[7]. 随着研究的深入, 人们发现由抗原提呈细胞与自然杀伤细胞介导的天然免疫及由 T 细胞介导的获得性免疫在银屑病患者中发生紊乱, 二者相互作用, 导致细胞因子、趋化因子及生长因子产生, 进而导致皮损部位炎症细胞浸润及炎症网络的逐级放大, 最终导致银屑病特有的浸润性鳞屑性红斑发生^[8].

趋化因子及其受体系统在炎症细胞自毛细血管向皮损部位的迁移过程中起到至关重要的作用.

Goebeler 等^[2]的研究结果显示趋化因子 Mig mRNA 在银屑病皮损部位真皮上部高表达并在真皮乳头顶端呈簇集分布, 与 T 细胞及巨噬细胞在银屑病皮损乳头顶部的浸润模式相一致, 由于 Mig 具有活化及趋化 T 细胞的能力, 推测真皮乳头顶端是 T 细胞外渗继而移入表皮的首选部位, 由于某一时段中只有部分皮损部位的真皮乳头表达 Mig, 提示 T 细胞的外渗和迁移受时间的限制并呈周期性. Mig 的特异性受体为 CXCR3, CXCR3 主要表达于 Th1 细胞亚群, 这与银屑病皮损部位浸润的主要 T 细胞亚群相一致. 有报道 CXCR3 在银屑病皮损部位皮肤中升高, 主要表达于真皮 CD3 + 淋巴细胞^[9].

我们的研究表明趋化因子受体 CXCR3 在银屑病外周血淋巴细胞中的表达增高并与 PASI 呈正相关, 并且随着病情的好转而下降, 结合文献报道, 推测 CXCR3 可能通过与其特异性配体 Mig 结合, 参与了淋巴细胞向皮损部位的移行及皮损炎症状态的维持, 其机制可能涉及包括参与细胞信号转导途径在内的多环节调节, 使细胞之间及细胞与细胞外基质之间的结构发生改变而更加符合炎症细胞迁移的需要, 从而在银屑病的发病机制中起着重要作用.

【参考文献】

- [1] 杨桂兰, 陈志强, 郑家润, 等. 银屑病患者中性粒细胞中 CXC 型趋化因子受体 CXCR1, CXCR2 mRNA 的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(9): 516-518.
- [2] Goebeler M, Toksoy A, Spandau U, et al. The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions[J]. J Pathol, 1998, 184(1): 89-95.
- [3] Roussaki-Schulze AV, Kouskoukis C, Petinaki E, et al. Evaluation of cytokine serum levels in patients with plaque-type psoriasis[J]. Int J Clin Pharmacol Res, 2005, 25(4): 169-173.
- [4] Boniface K, Lecron JC, Bernard FX, et al. Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: A putative role in the pathogenesis of psoriasis[J]. Eur Cytokine Netw, 2005, 16(4): 309-319.
- [5] 王刚, 刘玉峰. 银屑病患者外周血单个核细胞对自身角质形成细胞的促生长作用[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(24): 2297-2299.
- [6] 刘雯, 赵广, 刘玉峰. 银屑病患者外周血单一核细胞对链球菌 M6 蛋白的反应[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(13): 1213-1215.
- [7] Bos WE, Thio HB, Neumann HA, et al. The pathogenesis of inflammatory dermatoses, especially psoriasis[J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2006, 150(4): 179-183.
- [8] Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis[J]. J Am Acad Dermatol, 2006, 54(3 Suppl 2): S67-80.
- [9] Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, et al. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin α Ebta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris[J]. Lab Invest, 2001, 81(3): 335-347.