

角质形成细胞凋亡与银屑病病情的关系

陈 静,鲁建云,廖朝晖,左成忻,黄进华*

(中南大学湘雅三医院皮肤性病科,长沙 410013)

[摘要] 目的:探讨角质形成细胞(KC)凋亡与银屑病病情的相关性。方法:比色法检测30例银屑病患者皮损中活性半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(caspase-3)的含量;TUNEL技术检测KC凋亡并计算凋亡指数(AI);采用银屑病皮损面积和严重性指数(PASI)及局部病变的严重程度评分对其中26例寻常型银屑病患者予以病情程度评分。结果:30例银屑病中,脓疱型银屑病AI高于寻常型银屑病($P < 0.05$);26例寻常型银屑病患者中,进行期患者AI、活性caspase-3的含量均显著高于静止期和消退期($P < 0.05$);而静止期和消退期患者之间差别无统计学意义($P > 0.05$);PASI评分与AI及活性caspase-3含量之间均无直线相关性($P > 0.05$);银屑病皮损局部病变的严重程度评分与AI、活性caspase-3含量均呈直线正相关($P < 0.05$)。结论:KC凋亡的程度与银屑病的不同亚型、疾病的不同分期有关,与局部病变的严重程度有关,与银屑病病情严重性指数无关。

[关键词] 银屑病; 角质形成细胞; 细胞凋亡; caspase-3

[中图分类号] R758.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)06-0936-04

Apoptosis of psoriatic keratinocytes and the severity of patients' condition

CHEN Jing, LU Jian-yun, LIAO Zhao-hui, ZUO Cheng-xin, HUANG Jin-hua*

(Department of Dermatology, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between the apoptosis of psoriatic keratinocytes (KCs) in the psoriatic lesions and patient's condition. **Methods** Thirty patients with psoriasis were included. Activated caspase-3 was examined by colorimetric method in skin biopsy specimens. The apoptotic KCs were detected with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay in skin biopsy specimens. The severities of 26 patients with psoriasis vulgaris (PV) were assessed using the PASI scoring system and the severities of psoriatic lesions. **Results** Apoptotic indexes (AI) were higher in the pustular psoriatic lesions than those in the vulgaris psoriatic lesions ($P < 0.05$). In 26 patients with PV, AI and activated caspase-3 in the lesions were significantly higher in the progressive stage than those in the static and the regressive stages ($P < 0.05$). There were no correlations between PASI and AI or the expression of activated caspase-3 in PV lesions ($P > 0.05$). The severities of psoriatic lesions were positively correlated to AI or the expression of activated caspase-3 in PV lesions ($P < 0.05$). **Conclusion** The amount of apoptotic KCs may be related to varied types, stages of psoriasis, and severities of psoriatic lesions.

Key words: psoriasis; keratinocytes; apoptosis; caspase-3

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006,31(6):0936-04]

银屑病的发生不仅与角质形成细胞(keratinocyte, KC)的异常增生有关,而且与KC的凋亡有关^[1]。研究表明^[24],凋亡发生是一个复杂的、由半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)家族成员介导的蛋白酶级联反应过程,其中caspase-3是caspases家族中最重要的凋亡执行者之一。我们采用比色法检测30例银屑病患者皮损中活性caspase-3的含量;TdT介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)技术检测银屑病患者皮损中KC凋亡状况并计算凋亡指数(apoptosis index, AI);对其中26例寻常型银屑病患者进行临床病情评分,探讨细胞凋亡与银屑病病情的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本收集 2002年9月至2002年12月期间在湘雅医院、湘雅二医院和湘雅三医院皮肤科门诊或住院的银屑病患者共30例,经临床和病理证实,其中寻常型26例(包括斑块状22例,点滴状4例;进行期12例,静止期9例,消退期5例),泛发性脓疱型4例。男23例,女7例。年龄8~77(37.8±19.15)岁。病程1周~30年。实验前至少1个月内未使用皮质类固醇激素、免疫抑制剂、维A酸类药物,亦未接受其他系统治疗,不伴有肿瘤及其他严重疾患。皮损处行手术取材法,寻常型者取鳞屑性红斑或斑块,脓疱型者取红斑基础上的脓疱。切取约0.7 cm×1.5 cm大小的皮肤全层组织。标本切取后剪成两份,一份常规10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋,室温存放,以备组织病理检查及细胞凋亡检测;另一份尽量剪去皮下组织后放入生理盐水中洗去表面血迹,纱布吸干,立即放入1.5 mL离心管中,经液氮速冻后,置于-70℃冰箱中保存,以备检测活性caspase-3。对照组皮肤20例,取自同期普外及骨科手术切缘,系非皮肤病及肿瘤手术者的正常皮肤。标本处理与试验组相同。

1.2 临床评分 采用银屑病皮损面积和严重性指数(PASI)^[5]对26例银屑病患者就诊时予以病情程度评分。所取皮疹根据各个部位红斑(E)、浸润(I)和脱屑(D)的严重程度进行评分^[6]。

1.3 比色法检测活性caspase-3 活性caspase-3检测试剂盒购自美国RD公司。标本研磨后,充分裂解,取45 μL上清液至空白酶标板,PBS液作空白对照,每孔加入50 μL反应缓冲液及5 μL

DEVD-pNA(活性caspase-3底物)37℃水浴1 h后,在酶标仪上读取 A_{405} 值。通过蛋白定量(考马斯亮兰法),计算单位质量蛋白中的 A_{405} 值,代表该样本的活性caspase-3相对含量^[7]。

1.4 TUNEL技术检测凋亡 原位细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。石蜡包埋组织5 μm连续切片,按试剂盒说明进行。细胞核染为黄色者为凋亡细胞。每张切片选取5个阳性细胞最多的高倍视野(×400),计算1000个KC中阳性细胞所占百分比^[7],为凋亡指数(AI)。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用 t 检验。多样本均数的比较采用方差分析,相关分析采用直线相关分析。分析变量间的依存关系采用直线回归方程。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 银屑病不同临床类型之间细胞凋亡的差别

正常表皮中仅见个别凋亡阳性细胞,实验组中均可见细胞凋亡阳性细胞(图1~3),AI为5.0%~45.0%,活性caspase-3检测结果为0.37~4.14,银屑病组AI值、活性caspase-3检测结果明显高于正常组^[7]。斑块型、点滴型、脓疱型银屑病的AI比较,差异有统计学意义($F = 3.619, P < 0.05$)。其中脓疱型银屑病皮损组织AI显著高于斑块型和点滴型($P < 0.05$),斑块型与点滴型之间AI的差异无统计学意义($P > 0.05$)。三型银屑病皮损组织中活性caspase-3的含量以脓疱型为最多,点滴型最少,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

表1 银屑病不同临床分型之间AI和活性caspase-3表达的比较($\bar{x} \pm s$)

临床分型	n	AI (%)	活性caspase-3
寻常型	斑块型	22	18.73 ± 11.67*
	点滴型	4	13.25 ± 5.91*
脓疱型	4	31.50 ± 3.11	2.40 ± 1.32

与脓疱型比较, * $P < 0.05$

2.2 寻常型银屑病不同分期AI、活性caspase-3表达的差别 26例寻常型银屑病患者中,进行期、静止期、消退期的AI差别有统计学意义($F = 10.921, P < 0.01$)。其中进行期银屑病皮损组织AI高于静止期和消退期($P < 0.05$),而静止期与

消退期之间 AI 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。三期银屑病皮损组织中活性 caspase-3 的表达量比较,差别有统计学意义 ($F = 17.416, P < 0.01$)。其中进行期银屑病皮损组织活性 caspase-3 的表达量显著高于静止期和消退期 ($P < 0.05$),而静止期与消退期之间活性 caspase-3 表达量的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 寻常型银屑病不同临床分期之间 AI、活性 caspase-3 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分期	n	AI (%)	活性 caspase-3
进行期	12	25.58 ± 11.97	2.39 ± 1.00
静止期	9	12.44 ± 3.71*	0.81 ± 0.40**
消退期	5	9.20 ± 2.59*	0.88 ± 0.30**

与进行期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 细胞凋亡与 PASI 评分的关系 26 例寻常型银屑病 PASI 评分为 2.6 ~ 39.2 (11.07 ± 9.58) 分。通过直线相关分析显示,银屑病患者 PASI 临床评分与 AI 及皮损处活性 caspase-3 含量之间均无直线相关关系 (分别 $r = 0.358, P > 0.05$; $r = 0.362, P > 0.05$)。

2.4 细胞凋亡与局部病变严重程度关系

26 例寻常型银屑病所取皮损的局部病变严重程度评分为 2 ~ 10 (5.4 ± 2.3) 分。经直线相关分析证实,局部病变严重程度评分与 AI 及活性 caspase-3 含量呈中度正相关 (分别 $r = 0.419, P < 0.05$; $r = 0.511, P < 0.01$) (图 4 ~ 5)。

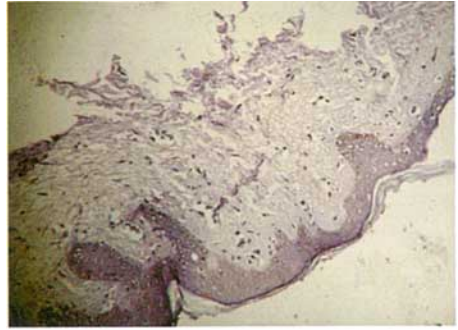


图 1 正常表皮,仅见个别凋亡角质形成细胞(TUNEL 法, ×100)
Fig.1 In normal skin, only a few apoptotic KCs were observed in epidermis (TUNEL × 100)

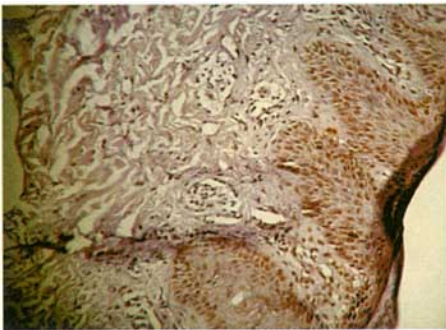


图 2 寻常型银屑病皮损,表皮全层见凋亡的角质形成细胞(TUNEL 法, ×200)
Fig.2 In psoriasis vulgaris, apoptotic KCs can be observed in all layers of epidermis (TUNEL × 200)

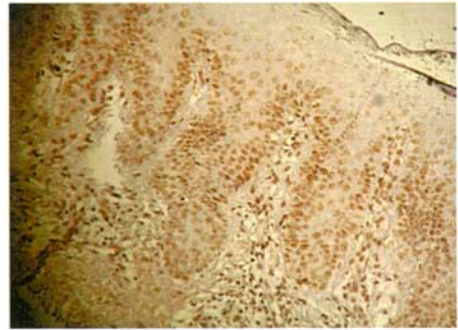


图 3 脓疱型银屑病皮损,可见大量凋亡的角质形成细胞(TUNEL 法, ×200)
Fig.3 In the pustular psoriatic lesions, a great quantity of apoptotic KCs can be observed in epidermis (TUNEL × 200)

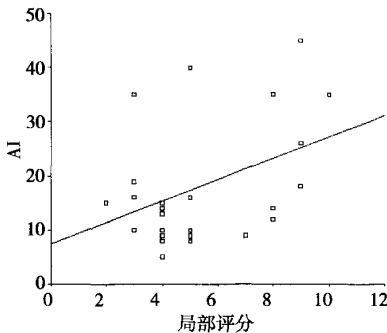


图 4 银屑病皮损 KC 的 AI 与局部病变严重程度评分散点图
Fig.4 Scatterplot of AI and the severities of psoriatic lesions

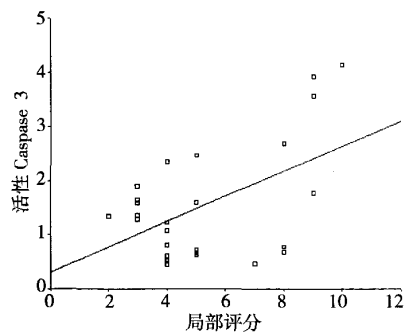


图 5 银屑病皮损活性 caspase-3 与局部病变严重程度评分散点图
Fig.5 Scatterplot of caspase-3 and the severities of psoriatic lesions

3 讨 论

细胞凋亡是生命的基本特征之一,它与细胞增殖共同维持机体正常生长发育和内环境稳定。在正常表皮, KC 增殖速率与凋亡速率相等,以维持表皮细胞的动态平衡。银屑病病理生理的一个重要特点是表皮基底层的 KC 增殖加速。Goldsmith 等^[8]研究发现,蟾蜍表皮脱落的周期很短,在表皮细胞迅速增生的同时,有大量分化细胞进入细胞凋亡状态,形成角质层而脱落,从而使蟾蜍表皮更新处于平衡状态。由此推论,银屑病表皮角化不全和大量的鳞屑脱落现象类似于蟾蜍脱皮表现。研究银屑病皮损部位细胞凋亡相关基因的表达,发现促凋亡基因 *Fas*, *p53*, *C-myc* 等表达增强,而抑制凋亡的基因 *bcl-2* 表达减低^[9-10],说明在银屑病皮损 KC 凋亡增加。本研究采用 TUNEL 法及检测凋亡中的活性 *caspase-3*, 直接和间接证实银屑病皮损处 KC 凋亡明显增多。推测这是细胞增生的同时伴随的一种自我限制和平衡机制。

本研究发现,寻常型银屑病患者 PASI 评分与 KC 的凋亡无明显相关,皮损局部病变严重程度评分与 KC 的凋亡呈正相关。由于 PASI 主要是评价患者全身的病情程度,而皮损局部病变严重程度评分主要评价所取皮损的严重程度,提示 KC 凋亡可能与银屑病表皮局部的病理变化有关,而与全身皮损的泛发程度无关。此外还发现脓疱型银屑病 KC 凋亡高于寻常型银屑病;寻常型银屑病中进行期 KC 凋亡高于静止期和消退期;静止期和消退期患者之间 KC 凋亡无显著差异,提示在疾病的不同类型和不同阶段,可能 *caspase-3* 被激活的量不同, KC 凋亡的水平也不同。这为银屑病的发病机制及治疗研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Bianchi L, Farrace M C, Nini G, et al. Abnormal *bcl-2* and "Tissue" transglutaminase expression in psoriatic skin [J]. *J Invest Dermatol*, 1994, 103 (6): 829-833.
- [2] Gregoli P A. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors [J]. *J Cell Physiol*, 1999, 178 (2): 133-143.
- [3] 曹慧秋. 线粒体促凋亡蛋白 Smac/DIABLO 与肿瘤 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25 (5): 419-422.
- [4] 李翔, 颜亚晖, 冯德云. 大鼠硅肺纤维化中凋亡及信号通路 *caspase-3* 的作用 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2005, 30 (4): 441-443.
- [5] Ashcroft D M, Wanpo L, Williams H C, et al. Clinical measures of disease severity and outcome on psoriasis: acritical appraisal of the quality [J]. *Br J Dermatol*, 1999, 141 (2): 185.
- [6] Smith C H, Jackson K, Chinn S, et al. A double blind, randomized, controlled clinical trial to assess the efficacy of a new coal tar preparation (Exorex) in the treatment of chronic, plaque type psoriasis [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2000, 25 (8): 580-583.
- [7] 陈静, 黄进华, 廖朝晖, 等. 银屑病皮损中活性 *Caspase-3* 的检测及其与角质形成细胞凋亡的关系 [J]. 中华皮肤科杂志, 2005, 38 (3): 176.
- [8] Goldsmith L A. Toads and psoriasis [J]. *Arch Dermatol*, 1986, 122 (8): 939-940.
- [9] Wrone-smith T, Johnson T, Nelson B, et al. Discordant expression of *Bcl-x* and *Bcl-2* by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146 (5): 1079-1088.
- [10] Takahashi H, Manabe A, Ishida-Yamamoto A, et al. Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis [J]. *J Dermatol Sci*, 2002, 28 (3): 187-197.

(本文编辑 彭敏宁)