

# 阿维 A 对寻常型银屑病患者趋化因子 RANTES 和 MCP-1 的影响

李健华 张玉杰

**【摘要】** 目的 观察阿维 A 对寻常型银屑病患者血清中和外周血单一核细胞(PBMC)内 RANTES 和 MCP-1 表达水平的影响。方法 分离并提取 30 例健康对照者及 48 例阿维 A 治疗前、后银屑病患者血清及 PBMC,血清采用 ELISA 检测其中 RANTES 和 MCP-1 的分泌水平,PBMC 接受实时荧光定量 PCR 法检测细胞内 RANTES 和 MCP-1 的 mRNA 的水平,并进行临床 PASI 评分。结果 经 ELISA 检测发现,寻常型银屑病患者血清中 RANTES 和 MCP-1 水平明显高于健康对照组( $P < 0.01$ ),应用阿维 A 治疗后,两因子水平均显著降低( $P < 0.01$ );QRT-PCR 检测发现,患者 PBMC 中 RANTES 和 MCP-1 的 mRNA 相对表达量均明显高于健康对照组( $P < 0.01$ );治疗后 PBMC 中 RANTES 和 MCP-1 均显著降低( $P < 0.01$ )。治疗后患者 PASI 评分明显下降,且治疗前后银屑病患者 PASI 评分差值与血清 RANTES 和 MCP-1 水平差值均呈正相关性( $r_1 = 0.469, P < 0.01$ ;  $r_2 = 0.431, P < 0.01$ ),与 PBMC 中 RANTES mRNA 表达量差值呈正相关( $r = 0.484, P < 0.01$ )。结论 阿维 A 对寻常型银屑病的疗效显著,降低 CC 型趋化因子 RANTES 和 MCP-1 的水平可能是阿维 A 治疗银屑病的机制之一。

**【关键词】** 阿维 A; 银屑病; 趋化因子 CCL5; 趋化因子 CCL2

**Effect of acitretin on RANTES and MCP-1 in patients with psoriasis vulgaris** Li Jian-hua, ZHANG Yu-jie.

Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China

Corresponding author: ZHANG Yu-jie, Email: byfyzyj@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of acitretin on expression of CC chemotactic factor, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and regulated upon activation normal T cell expressed and secreted protein (RANTES), in the peripheral blood and PBMCs of patients with psoriasis vulgaris. **Methods** Sera and PBMCs were obtained from the venous blood sample of 48 patients with psoriasis vulgaris (before and after treatment of acitretin respectively) and 30 normal human controls. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine the RANTES and MCP-1 protein level in the sera, and meanwhile the mRNA expression of RANTES and MCP-1 in PBMCs was detected by quantitative real-time RT-PCR method. The clinical outcome was scored carefully by PASI index. **Results** The serum protein level and the mRNA expression in PBMCs of RANTES and MCP-1 were significantly higher in patients with psoriasis vulgaris than those in normal group ( $P < 0.01$ ), and was significant decreased after treatment of acitretin ( $P < 0.01$ ). PASI Score was decreased after therapy of acitretin in patients with psoriasis ( $P < 0.01$ ). The D-value of PASI score had positive correlation with the D-value of RANTES and MCP-1 in the sera (before and after treatment of acitretin respectively) ( $r_1 = 0.469, P < 0.01$ ;  $r_2 = 0.431, P < 0.01$ ), so was D-value of the mRNA expression of RANTES in PBMCs ( $r = 0.484, P < 0.01$ ). **Conclusions** Acitretin shows great clinical effect on psoriasis vulgaris, its treatment mechanism may be associated with down-regulation the expression of RANTES and MCP-1.

**【Key words】** Acitretin; Psoriasis; Chemokine CCL5; Chemokine CCL2

银屑病是一种 T 淋巴细胞介导的慢性炎症性皮肤病,其皮损表现特殊,且尚无根治该病的方法而严重影响患者生活质量。其发病机制复杂,多认为是遗传、免疫及环境因素共同作用的结果,免疫机制中涉及诸多

细胞因子<sup>[1]</sup>,近年来发现 CC 型趋化因子<sup>[2]</sup>在银屑病发病中起着重要作用。阿维 A 是治疗银屑病的常用口服药物之一,可以通过抑制银屑病患者皮损部位角质形成细胞的异常增殖和分化缓解银屑病症状,其临床治疗效果已得到专家学者的肯定。为了研究阿维 A 对寻常型银屑病患者血清中及单一核细胞内 CC 型趋化因子的影响,我们分别采用 ELISA 法和 QRT-PCR 法,检

测阿维 A 治疗前后寻常型银屑病患者血清及外周血单一核细胞(PBMC)中正常 T 细胞表达和分泌活化调节蛋白(RANTES)及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的水平,以探讨阿维 A 是否通过调控患者外周血 CC 型趋化因子达到治疗银屑病的目的。

## 资料与方法

### 一、临床资料

1. 入选标准:年龄在 18 周岁以上,临床诊断明确, PASI 评分  $\geq 10.0$  分。排除标准:近 3 个月内接受过维 A 酸类药物、糖皮质激素及免疫抑制剂及光化学疗法,采集标本前 1 个月内曾患其他系统性疾病及感染性疾病。

2. 一般资料:随机选取 2010 年 11 月至 2011 年 5 月在滨州医学院附属医院皮肤科诊断明确的寻常型银屑病患者 48 例为治疗组,其中进行期 30 例,男 16 例,女 14 例,年龄 19 ~ 51 岁,平均 34.4 岁;静止期 18 例,男 9 例,女 9 例,年龄 27 ~ 60 岁,平均 40.1 岁;病程 20 d 至 18 年,平均 2.52 年。另设正常对照组 30 例,男 15 例,女 15 例。年龄 20 ~ 55 岁,平均 35.84 岁。两组在性别、年龄等方面无统计学差异,具有可比性,见表 1。

表 1 实验组及健康对照组一般情况( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	年龄(岁)	病程(年)
对照组	30	35.83 $\pm$ 8.48	-
实验组	48	36.58 $\pm$ 9.59	2.52 $\pm$ 4.14
<i>t</i> 值		0.351	4.217
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05

### 二、试剂与器材

人 RANTES 和 MCP-1 ELISA 试剂盒(由上海鑫乐生物制剂有限公司提供),使用 Dynatech MR 5000 型全自动酶标读数仪测定。总 RNA 提取液 RNAiso<sup>TM</sup> plus, 逆转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit, SYBR green 荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR@Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (均由大连 TaKaRa Biotechnology 公司提供),淋巴细胞分离液、使用 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪测定。引物序列及目的基因扩增范围由 PUBMED 系统中人的 Primer-BLAST 引物程序设计,由大连 TaKaRa 生物公司合成。

### 三、治疗方法

治疗组均接受阿维 A 胶囊(商品名方希,重庆华邦制药)规范口服治疗,阿维 A 初始剂量成人平均为 20 ~ 40 mg/d(0.75 ~ 1.00 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>),起效后调

整至维持量,平均维持量 10 ~ 30 mg/d,疗程 4 ~ 8 周。同时皮损局部外用曲安奈德软膏或 3% 水杨酸软膏对症处理,2 次/d。正常对照组的 30 例健康查体者未给予任何治疗。

### 四、标本收集及处理

1. 提取血清:治疗患者均分别在治疗前、治疗后晨取肘静脉血 2 ml,对照组清晨空腹取静脉血 2 ml;血液标本经 4000 r/min 离心 5 min,分离血清至 1 ml EP 管中, -80 °C 冻存。

2. 提取 PBMC:患者均分别在治疗前、治疗后晨取肘静脉 2 ml 血液,对照组清晨空腹取静脉血 2 ml;标本缓慢移入等量淋巴细胞分离液中,经 2500 r/min 离心 15 min,移液器吸取中间白色浑浊层,即 PBMC,置 1 ml EP 管中,置于 -80 °C 保存。

### 五、实验技术

1. ELISA 法检测血清中 RANTES 和 MCP-1 水平:采用 ELISA 试剂盒检测该因子水平,严格按试剂盒操作说明书操作。建立标准曲线,酶标仪测定 450 nm 处 A 值,根据标准曲线读取样品中 RANTES 和 MCP-1 浓度。

2. 荧光实时定量 PCR 法检测 PBMC 中 RANTES 和 MCP-1 基因水平:严格按照及 SYBR green 荧光定量 PCR 两步法试剂盒说明书操作,采用实时定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,得到每个标本不同指标的 Ct 值,根据公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算出所测基因相对表达量。

具体步骤:RNAiso plus 提取总 RNA,按 TaKaRa 反转录试剂盒说明书合成 cDNA。引物序列及目的基因合成的 cDNA 进行扩增;反应体系:SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ l;上下游引物各 0.5  $\mu$ l;ROX Reference Dye II 0.5  $\mu$ l; cDNA 模板 2.0  $\mu$ l; dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 9.0  $\mu$ l;反应条件:两步法 PCR 扩增标准程序:95 °C 30 s 预变性,95 °C 5 s,60 °C 20 s PCR 反应 40 个循环。检测目的基因的表达:应用 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪,采用相对定量法检测目的基因 mRNA 的表达水平,SG(SYBR Green 1)法检测荧光。

RANTES 和 MCP-1 及内参的引物序列如下: RANTES-F: AGCATCGTCACCTGGGGCCT; RANTES-R: GGGGCACCTCAGCAGCGTTT; MCP-1-F: GCTACTC-CACCTCTGCGCG; MCP-1-R: CAGCTGCCGTGTGA-AGCCCA;  $\beta$ -肌动蛋白-R: ATTGCCGACAGGATG-CAGAA;  $\beta$ -肌动蛋白-F: GCTGATCCACATCTGCTG-GA。

### 六、疗效观察及判定标准

根据银屑病皮损面积及严重度指数(PASI)评分,按患者症状和体征(红斑、浸润、鳞屑)进行评分,病情

严重程度以无、轻度、中度、重度、极重度分别计0~4分。依卫生部推荐临床疗效评分标准进行评估:临床治愈为PASI评分下降 $\geq 95\%$ ;显效为PASI评分下降 $\geq 60\%$ ;好转为PASI评分下降 $\geq 20\%$ ;PASI评分下降 $< 20\%$ 为无效。有效率以痊愈加显效计算。PASI评分下降指数( $\%$ ) = (治疗前PASI评分 - 治疗后PASI评分) / 治疗前PASI评分  $\times 100\%$ 。

### 七、统计学分析

所有数据应用SPSS 19.0统计软件进行处理。治疗组与对照组试验数据分析均采用 $t$ 检验,试验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;阿维A治疗前后银屑病组比较使用重复测量资料单因素的方差分析,并采用相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P > 0.05$ 为差异无统计学意义。

## 结 果

1. 临床疗效:治愈16例(33.33%),显效24例(50.00%),好转6例(12.50%),无效2例(4.17%),有效率为83.33%。治疗前患者PASI评分 $15.84 \pm 4.07$ ,治疗后PASI评分 $3.81 \pm 3.10$ ,两者差异具有统计学意义( $t = 16.28, P < 0.01$ )。

2. 检测结果:治疗前后银屑病患者用分别用ELISA法检测血清中和RT-PCR法检测PBMC中RANTES和MCP-1水平见表2。48例银屑病患者治疗前血清RANTES和MCP-1浓度及PBMC中RANTES和MCP-1的mRNA的相对表达量均较正常对照组高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。治疗前组血清及PBMC中RANTES水平比治疗后组高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );治疗后血清及PBMC中MCP-1水平明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

3. 相关性分析:治疗前后银屑病患者PASI评分差值与血清RANTES和MCP-1水平差值均呈正相关( $r_1 = 0.469, P < 0.01; r_2 = 0.431, P < 0.01$ )。与PBMC中RANTES mRNA表达量差值呈正相关( $r = 0.484, P < 0.01$ ),与MCP-1 mRNA表达量差值无相关性( $r =$

$0.141, P > 0.05$ )。

## 讨 论

银屑病是一种多环境因素刺激诱导的免疫异常性炎症性增生性皮肤病,其病理过程十分复杂,其病理改变主要表现为角化过度、棘层肥厚和早期以中性粒细胞浸润为主,后期以淋巴细胞浸润为主。近年来许多研究表明多种细胞因子,如水平内脂素和高迁移率蛋白-1<sup>[3]</sup>等因子参与银屑病的发病过程,其中趋化因子家族CC型趋化因子CCL2/CCL5/CCL17/CCL20等诸多因子起到重要作用,针对此类因子及其受体的深入研究对银屑病的治疗具有重要意义。阿维A为第二代单芳香族维A酸类药物,其活性成分为依曲替酸,在皮肤科临床治疗中逐渐被重视,对脓疱型银屑病、红皮病型银屑病和中重度寻常型银屑病均有较好疗效<sup>[4]</sup>。以往关于维A酸治疗银屑病作用的研究主要集中在维A酸对表皮细胞增殖、分化、凋亡的影响方面,也有实验证实阿维A疗效与血清中多种细胞因子具有相关性<sup>[5]</sup>,而其是否影响银屑病发病机制中处于重要地位的CC型趋化因子尚未见系统报道。

RANTES属于CC型趋化性细胞因子(CCL5),人体多数组织在炎症因子IL-1 $\beta$ 或TNF- $\alpha$ 的刺激下可释放RANTES,其受体表达于单核系细胞表面,研究表明银屑病皮损的表皮及真皮CCL5受体表达增多<sup>[6]</sup>。RANTES可使T细胞、单核细胞、NK细胞及嗜碱粒细胞等多种白细胞发生趋化游走,亦可趋化嗜酸粒细胞并刺激其脱颗粒和呼吸爆发;通过激活T细胞可产生包括T细胞的增殖或凋亡,对T细胞共刺激分子和细胞因子受体选择性表达诱导,促IL-2、IFN- $\gamma$ 和MIP-1 $\beta$ 等炎症细胞因子释放<sup>[7]</sup>,以及增加其与IL-1 $\alpha$ 刺激内皮细胞的黏附能力等多种效应,从而介导炎症细胞在炎症部位聚集、活化以及组织损伤。应用ELISA及荧光定量RT-PCR技术,我们发现银屑病患者血清及PBMC中均高表达RANTES,而经阿维A治疗后两者的水平降低,其结果与杨闰平等<sup>[8]</sup>研究发现银屑病患者皮

表2 银屑病患者血清及PBMC中RANTES和MCP-1水平检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	RANTES		MCP-1	
		ELISA 结果 (pg/ml)	QRT-PCR 结果	ELISA 结果 (pg/ml)	QRT-PCR 结果
对照组	30	20.86 $\pm$ 6.45	1.37 $\pm$ 0.26	138.09 $\pm$ 24.68	5.31 $\pm$ 0.55
治疗前组	48	71.08 $\pm$ 8.34	3.67 $\pm$ 0.37	317.92 $\pm$ 36.02	9.54 $\pm$ 0.58
治疗后组	48	26.92 $\pm$ 6.16	1.74 $\pm$ 0.28	153.39 $\pm$ 16.82	5.88 $\pm$ 0.45
$P_1$ 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
$P_2$ 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
$t_1$ 值		28.118	29.51	24.015	31.88

注: $P_1$ 为对照组与治疗前组相比较,采用两个独立样本的 $t$ 检验; $P_2$ 为治疗前与治疗组相比较,采用重复测量资料单个因素的方差分析

损区血管内皮细胞表达 RANTES 明显升高具有一致性。我们推测阿维 A 治疗银屑病的效果可能与降低 RANTES 的水平有关,阿维 A 可能通过降低 RANTES 水平,调节银屑病发病过程中的自身免疫紊乱和炎症过程而起作用。

MCP-1/CCL2 是  $\beta$  趋化因子 CC 家族的另一个重要成员,对单核细胞和 T 淋巴细胞具有显著趋化作用,在炎症反应性疾病中发挥着重要作用,CCL 的基因型呈多态性,有研究发现 AG/GC/AG + GC 型具有患银屑病的高风险性<sup>[9]</sup>。在银屑病患者皮损角质形成细胞中 MCP-1 水平较高,在患者单核细胞中也发现其受体 CCR2, Vestergaard 等<sup>[10]</sup>的研究显示 90% 银屑病患者外周血中高表达 CCR2。本实验观察了寻常性银屑病患者阿维 A 治疗前后的病情变化,同时检测血清中和 PBMC 中 MCP-1 水平的变化。而且随着患者病情的好转 (PASI 降低),血清中 MCP-1 浓度及 PBMC 中 MCP-1 基因水平均明显下降,提示阿维 A 的治疗效果和细胞因子 MCP-1 的变化有一定的相关性。阿维 A 可能通过减少 MCP-1 的分泌水平,减少其与 CCR2 的结合,朗格汉斯细胞 (LCs) 及 T 细胞等炎性细胞向表皮内聚集<sup>[11]</sup>,纠正银屑病启动时发生的一系列异常免疫反应,从而阻断了银屑病病理生理变化的恶性循环。但治疗前后 PBMC 中 MCP-1 的 mRNA 表达量差值与 PASI 差值无明显相关性,因此亦不能排除单核细胞中 MCP-1 水平的变化可能是银屑病的伴随现象或是受疾病的分期影响,有待于进一步研究。

我们的研究从蛋白水平和基因水平上分别观测了阿维 A 治疗前后寻常性银屑病患者血清和 PBMC 中 RANTES 和 MCP-1 水平的变化,发现阿维 A 治疗寻常性银型银屑病疗效确切(在仅用阿维 A 和水杨酸软膏/扶严宁软膏的情况下,2 个月内有效率为 83.33%),而且观测到银屑病患者 RANTES 及 MCP-1 水平较正常人明显增高,随治疗进程两种因子水平减低;本研究还通过相关性分析对阿维 A 治疗银屑病的临床疗效做进一步评估,发现治疗前后银屑病患者 PASI 评分差值与患者血清及 PBMC 中的 RANTES 水平变化呈正相关,与

血清中 MCP-1 表达水平亦呈正相关。由此推断,阿维 A 治疗银屑病的效果可能与降低患者体内 RANTES 和 MCP-1 水平有关,而 RANTES 可能作为辅助判断阿维 A 治疗银屑病效果的指标之一。

## 参 考 文 献

- [1] 张艳丽,贾红捷,何炎玲,等. 趋化因子在银屑病发病机制中的作用. 首都医科大学学报,2010,31:673-677.
- [2] 史玉玲,徐晓光,毕新岭,等. 白介素 22 及其相关因子在银屑病患者血清及外周血单一核细胞中的表达. 中华皮肤科杂志,2011,44:238-240.
- [3] 严伟强,黄友敏,严旭,等. 寻常性银屑病患者血清内脂素和高迁移率蛋白-1 的含量变化 [J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:2587-2590.
- [4] McClure SL, Valentine J, Gordon KB. Comparative tolerability of systemic treatments for plaque-type psoriasis. Drug Saf, 2002, 25: 913-927.
- [5] Parkhouse D. Cutaneous myiasis due to the Tumbu fly during Operation Keeling. J R Army Med Corps, 2004, 150:24-26.
- [6] de Groot M, Teunissen MB, Ortonne JP, et al. Expression of the chemokine receptor CCR5 in psoriasis and results of a randomized placebo controlled trial with a CCR5 inhibitor. Arch Dermatol Res, 2007, 299:305-313.
- [7] Vielhauer V, Berning E, Eis V, et al. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. Kidney Int, 2004, 66:2264-2278.
- [8] 杨闰平,刘元林. 银屑病患者血管内皮细胞培养上清液中 Cath-D 和 RANTES 的检测. 中国皮肤性病学杂志,2010,24:899-900.
- [9] Wang L, Yang L, Gao L, et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with psoriasis. Int J Immunogenet, 2008, 35:45-49.
- [10] Vestergaard C, Just H, Baumgartner Nielsen J, et al. Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. Acta Derm Venereol, 2004, 84: 353-358.
- [11] Yu Y, Tang L, Wang J, et al. Psoriatic lesional keratinocytes promote the maturation of human monocyte-derived Langerhans cells. Dermatology, 2002, 204:94-99.

(收稿日期:2011-10-27)

(本文编辑:吴莹)