

# 阿维 A 对寻常型银屑病患者外周血 Th17/Treg 细胞转录因子 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 表达影响的研究

王忠永 邱会芬 蒋延伟

**【摘要】** 目的 探讨阿维 A 治疗银屑病的疗效以及对银屑病患者外周血单一核细胞 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 mRNA 表达的影响,进一步阐明阿维 A 治疗寻常型银屑病的作用机制。**方法** 90 例中、重度寻常型银屑病患者采用口服阿维 A 治疗 8 周,以银屑病皮损面积和严重程度(PASI)评分评价疗效;采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(QRT-PCR)方法,检测正常对照组及寻常型银屑病患者治疗前后外周血单一核细胞中 Th17 和 Treg 细胞的特异性转录因子 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 mRNA 表达水平。**结果** 阿维 A 治疗后 PASI 评分明显下降( $P < 0.01$ );银屑病患者和正常对照组比较,患者外周血 ROR $\gamma$ t mRNA 表达量( $8.72 \pm 1.64$ )显著高于正常对照组( $2.53 \pm 0.71$ )( $P < 0.01$ );Foxp3 mRNA 的表达量( $1.56 \pm 0.92$ )则明显低于正常对照组( $2.98 \pm 1.03$ )( $P < 0.01$ );患者 ROR $\gamma$ t/Foxp3 的比值也明显高于正常对照组。阿维 A 治疗后患者外周血 ROR $\gamma$ t mRNA 的表达量及 ROR $\gamma$ t/Foxp3 的比值较治疗前明显降低( $3.07 \pm 0.95, 1.23 \pm 0.77$ ),而 Foxp3 mRNA 的表达量较治疗前明显升高( $2.72 \pm 0.83$ )( $P < 0.01$ )。**结论** 银屑病的发生及病情严重程度与外周血 ROR $\gamma$ t mRNA 的高表达及 Foxp3 mRNA 的低水平有关;阿维 A 治疗银屑病疗效明显,治疗后外周血 ROR $\gamma$ t mRNA 的水平明显降低, Foxp3 mRNA 的表达量明显升高;阿维 A 可下调外周血 ROR $\gamma$ t mRNA 的表达,提高 Foxp3 mRNA 的表达,这可能是阿维 A 治疗银屑病的机制之一。

**【关键词】** 银屑病; 阿维 A; T 淋巴细胞; Foxp3; ROR $\gamma$ t

**Effect of Acitretin on ROR $\gamma$ t and Foxp3 in peripheral blood of patients with psoriasis vulgaris** WANG Zhong-yong, QIU Hui-fen, JIANG Yan-wei. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China

Corresponding author: WANG Zhong-yong, Email: byzhongyong@sohu.com

**【Abstract】 Objective** To explore the therapeutic effect of acitretin on psoriasis and effect of acitretin on ROR $\gamma$ t and Foxp3 genes of Th17 and Treg cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients, to further clarify the therapeutic mechanisms of acitretin. **Methods** Ninety cases of patients with moderate to severe psoriasis vulgaris were treated with acitretin for 8 weeks. The efficacy of treatment was evaluated by Psoriasis Area and Severity Index (PASI) scores. The mRNA levels of ROR $\gamma$ t and Foxp3 in PBMC were determined by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) in healthy controls and patients with psoriasis before and after treatment with acitretin. **Results** The mean PASI scores were significantly decreased after treatment with acitretin ( $P < 0.01$ ). Compared with healthy volunteers, patient with psoriasis vulgaris showed higher level of ROR $\gamma$ t and lower level of Foxp3 in PBMC ( $P < 0.01$ ). The ratio of ROR $\gamma$ t/Foxp3 in psoriasis group was higher than that in the volunteer group ( $P < 0.01$ ). After treatment with acitretin, level of ROR $\gamma$ t and ratio of ROR $\gamma$ t/Foxp3 were significantly decreased than before ( $P < 0.01$ ), and level of Foxp3 was significantly increased than before ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The pathogenesis and severity of psoriasis vulgaris has a relationship with mRNA expression of ROR $\gamma$ t increasing and Foxp3 descending in peripheral blood. Acitretin was significantly effective in the treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris. Level of ROR $\gamma$ t and ratio of ROR $\gamma$ t/Foxp3 were significantly reduced by acitretin in patients with psoriasis. Acitretin can down-regulate the expression of ROR $\gamma$ t and progress the expression of Foxp3, which may be one of the mechanisms of the acitretin treatment in psoriasis.

**【Key words】** Psoriasis; Acitretin; T-lymphocytes; Foxp3; ROR $\gamma$ t

银屑病是一种多基因遗传背景下由 T 淋巴细胞介导的慢性炎症性皮肤病,其发病机制尚不完全清楚,且无较满意的治疗方法。近年来,国内外报道阿维 A 治疗银屑病有较好的疗效,但其治疗机制尚不清楚。以往关于维 A 酸治疗银屑病的研究多集中在其对表皮细胞增殖、分化、凋亡等方面,而对银屑病发病机制中处于中心环节的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群影响的研究很少。Th17 细胞为一种新型 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群,主要分泌白细胞介素-17(IL-17)等细胞因子而参与炎症反应,在银屑病的发病中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。孤儿核受体(retinoid-related orphan receptor gamma, ROR $\gamma$ t)是控制 Th17 细胞分化的特异性转录因子。调节性 T 细胞(Treg 细胞)与 Th17 细胞来源相同,两者关系密切,Treg 细胞在维持机体免疫耐受状态及内环境的稳定、防止自身免疫性疾病的发生中起着重要作用,叉头翼状螺旋转录因子 3(Foxp3)是调控 Treg 细胞分化的特异性转录因子<sup>[2]</sup>。本研究通过检测银屑病患者经阿维 A 治疗前后外周血 Th17 细胞和 Treg 细胞转录因子的表达水平,探讨转录因子 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 mRNA 与银屑病发病及病情严重程度之间的关系以及阿维 A 治疗银屑病的新机制。

## 对象与方法

1. 研究对象:入选病例为 2011 年 6 月至 2012 年 5 月在本院皮肤科门诊确诊的中、重度寻常型银屑病患者 90 例[银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI)评分 >9 分]<sup>[3]</sup>,其中进行期 45 例、稳定期 45 例;男 52 例、女 38 例,年龄 18~60 岁,平均(27.35 ± 13.58)岁,病程 3 个月至 25 年,平均(5.12 ± 6.31)年;PASI 评分 10~43 分,平均(21.52 ± 8.17)分。所有患者入选时 1 个月内未接受过局部外用药物,3 个月内未系统使用过免疫抑制剂、糖皮质激素和维 A 酸等药物,无高血脂,无肝脏、肾脏及其他系统的严重疾病,非妊娠及哺乳期妇女。对照组为本院体检中心健康体检者 60 例,男 33 例,女 27 例,年龄 20~57 岁,平均(29.35 ± 13.62)岁。两组在性别、年龄上差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。每位患者均签署知情同意书。

2. 治疗方法:患者给予阿维 A 胶囊(重庆华邦制药有限公司生产)口服,10 mg/次,bid。外用凡士林乳剂(本院制剂室生产),bid,疗程为 8 周,治疗开始及治疗后 4 周、8 周时检查血常规、肝功能、血脂,并记录其他不良反应如皮肤黏膜不良反应。治疗前和治疗结束时对所有患者进行 PASI 评分,并抽取外周静脉血。

3. 疗效判定标准:采用 PASI 评分评价疗效:将人体分为头部、躯干、上肢、下肢 4 部分,然后对红斑、浸润、鳞屑的程度和面积进行加权评分<sup>[3]</sup>。对所有患者治疗前、治疗 4 周、治疗 8 周时进行评分。PASI 下降指数 = (治疗前 PASI 评分 - 治疗后 PASI 评分) / 治疗前 PASI 评分 × 100%。痊愈:PASI 评分下降 ≥ 90%;显效:PASI 评分下降 60%~89%;有效:PASI 评分下降 20%~59%;无效:PASI 评分下降 < 20% 或皮损无变化。痊愈加显效例数所占百分比记为有效率。

4. 主要试剂:逆转录试剂盒为日本 Toyobo 公司产品,总 RNA 提取液、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(QRT-PCR)试剂为日本 TaKaRa 公司产品,SYBR green 1 为美国 Invitrogen 公司产品,荧光定量 PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司设计合成。

5. 实验方法:抽取肘静脉血 3 ml,EDTA 抗凝,按照 Ficoll-Hypaque 密度梯度分离法获取外周血单一核细胞(PBMC)。RNAiso plus 提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。QRT-PCR 检测引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物序列及目的基因扩增范围见表 1。以所合成的 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,ddH<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  $^{\circ}$ C 30 s 预变性,95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 20 s PCR 反应 40 个循环。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,SYBR Green 1 法检测荧光。

表 1 QRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列	产物大小(bp)
ROR $\gamma$ t	上游引物:5'-CTGCAAGACTCATCGCCAAAG-3'	101
	下游引物:5'-TTTCCACATGCTGGCTACACA-3'	
Foxp3	上游引物:5'-GGGTAGCCATGGAAACAGCA-3'	106
	下游引物:5'-TCGCATGTTGTGGAAGTGAAGTAG-3'	
$\beta$ 肌动蛋白	上游引物:5'-TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC-3'	102
	下游引物:5'-ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG-3'	

6. 统计学分析:采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,各项数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用  $t$  检验,病情严重程度与 ROR $\gamma$ t、Foxp3 水平间的分析采用 Pearson 相关检验。设定  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 结 果

1. 临床疗效:阿维 A 治疗 4 周后,显效 21 例,有效 62 例,无效 7 例,有效率为 23.33%;治疗 8 周后痊愈 23 例,显效 51 例,有效 13 例,无效 3 例,有效率为 80.22%。治疗前 PASI 评分为  $21.52 \pm 8.17$ ,治疗 4 周及 8 周后分别为  $13.11 \pm 5.26$  和  $4.27 \pm 6.15$ ,与治疗前比较均明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。第 4 周与第 8 周的 PASI 评分比较差异也有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2. 不良反应:治疗中有 17 例出现不良反应,表现为口干 9 例,皮肤干燥和瘙痒 11 例,唇炎 8 例,症状均较轻,经对症处理后明显缓解,未影响继续用药。治疗 8 周发现转氨酶轻度升高 3 例。

3. 试验检测结果:患者治疗前后外周血 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 mRNA 的表达水平见表 2。

表 2 银屑病患者治疗前后 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 mRNA 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	ROR $\gamma$ t	Foxp3	ROR $\gamma$ t/Foxp3
对照组	60	$2.53 \pm 0.71$	$2.98 \pm 1.03$	$0.86 \pm 0.52$
治疗组				
治疗前	90	$8.72 \pm 1.64$	$1.56 \pm 0.92$	$5.09 \pm 2.06$
治疗后	90	$3.07 \pm 0.95$	$2.72 \pm 0.83$	$1.23 \pm 0.77$
$t_1$		17.203	9.176	33.065
$t_2$		15.179	6.641	21.379

注: $t_1$  为治疗组治疗前与对照组比较, $t_2$  为治疗组治疗前、后比较,均  $P < 0.01$

## 讨 论

以往的研究结果发现,银屑病患者存在着 Th1/Th2 细胞比例失衡的情况,Th1 型细胞占优势,而 Th2 型细胞功能降低,故认为银屑病属于 Th1 介导的自身免疫性疾病<sup>[4]</sup>。但这一观点随着 Th17 细胞及 Treg 细胞的发现而受到挑战。研究发现 Th17 细胞分泌的细胞因子 IL-22 在动物身上可直接导致银屑病的发病,同时 Th17 细胞在银屑病发病中的作用被越来越多的实验研究所证实,因此目前认为银屑病的发病机制为 Th1/Th17 模式<sup>[5]</sup>。Th17 细胞是 2003 年发现的一类新型 CD4<sup>+</sup> 细胞亚群,主要通过分泌 IL-17、IL-22、IL-21 等细胞因子而发挥其促炎症作用。ROR $\gamma$ t 是对 Th17 细胞的分化起关键作用的转录激活因子,若抑制 ROR $\gamma$ t 的表达,则抑制未致敏 T 细胞向 Th17 细胞分化。有研究发现在外周血中 ROR $\gamma$ t 指导前炎症 Th17 细胞的分化并调节 IL-17 的产量<sup>[6]</sup>。据此,有理由认为,ROR $\gamma$ t 可作为自身免疫性、炎症性疾病治疗的重要靶点之一。Treg 细胞为最新发现的具有负性调节机体免疫反应的

T 细胞亚群,其免疫调节功能与 Foxp3 的持续表达密切相关。Foxp3 被认为是 Treg 细胞的关键转录因子和特异性标记物,它可通过与染色体结合后,调节多种基因的表达和功能,进而控制 Treg 细胞的发育和功能<sup>[7]</sup>。体外研究发现,转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 可通过诱导 Foxp3 的表达抑制 ROR $\gamma$ t 的功能,促进 Treg 的分化,并且 Foxp3 全长亚型可与 ROR $\gamma$ t 结合从而抑制 ROR $\gamma$ t 的功能<sup>[8]</sup>。在存在促炎症细胞因子的环境中,Foxp3 水平下降而 ROR $\gamma$ t 表达水平升高,最终促进 Th17 细胞的分化。因此,Th17 与 Treg 细胞在功能上互相拮抗,在分化上密切相关。在正常情况下两者保持相对平衡,有利于维持机体的免疫稳定状态。目前 Th17/Treg 细胞失衡与疾病发生发展的关系已成为人们关注的重点。

近年来的研究发现,Th17 细胞和 Treg 细胞在银屑病的发病中均起着重要的作用<sup>[9]</sup>。Kagami 等<sup>[10]</sup>发现银屑病患者外周血 Th17 细胞比例升高。Arican 等<sup>[11]</sup>报道银屑病患者外周血中 IL-17 水平显著高于健康对照者,且患者 IL-17 水平与疾病严重程度相关。Treg 细胞数量的减少及功能改变也与银屑病的发病有关。Sugiyama 等<sup>[12]</sup>研究发现银屑病患者皮损和外周血中 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的数量显著低于正常人,同时还存在着增殖缺陷。有报道银屑病患者不仅 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的数量明显降低,而且 Treg 细胞对效应 T 细胞的抑制能力也明显降低<sup>[13]</sup>。总之,银屑病的发病与 Th17 细胞异常活化和 Treg 细胞的增殖及功能不足有关。因此,Th17 和 Treg 细胞平衡性失调可能是银屑病免疫发病机制中的重要因素之一。

阿维 A (acitretin) 是第二代人工合成的维 A 酸类药物,其活性成分为依曲替酸,为美国 FDA 批准的治疗银屑病的一线药物之一。对中、重度银屑病具有较好的疗效,但其治疗机制尚不清楚。维 A 酸通过其受体 RAR $\alpha$ 、ROR $\alpha$ 、ROR $\gamma$ t、RORC2 发挥生物学效应。在 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> 转化为 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 的体外实验中,含有 IL-2 和 TGF- $\beta$  的培养体系中 Foxp3 的转化率为 15% ~ 50%,加入维 A 酸后转化率可达 90% 或更高<sup>[14]</sup>。由此说明了在 T 细胞转化为 CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 的过程中维 A 酸为共因子。Mucida 等<sup>[15]</sup>发现在含有炎症刺激因子的培养基中,加入 TGF- $\beta$  能诱导出高水平的 ROR $\gamma$ t,然而加入维 A 酸后这种表达明显的减少,说明维 A 酸的作用机制是通过直接减少 ROR $\gamma$ t 的水平。研究表明维 A 酸在体内和体外均可抑制 Th17 细胞的分化增殖,促使 T 细胞转化为 Treg,以调节 Th17 和 Treg 细胞平衡<sup>[16]</sup>。

本试验从转录因子角度探讨 Th17、Treg 细胞及 Th17/Treg 细胞失衡与寻常型银屑病的关系。研究结果显示寻常型银屑病患者外周血中 ROR $\gamma$ t mRNA 表达

显著高于正常对照组,且与疾病严重程度呈正相关;而 Foxp3 mRNA 表达低于正常对照组,且与疾病严重程度呈负相关。这一方面表明 ROR $\gamma$ t 及 Foxp3 mRNA 表达水平与疾病严重程度密切相关;另一方面说明银屑病患者存在着 ROR $\gamma$ t 及 Foxp3 mRNA 表达失衡,而这种失衡表达可能是导致 Th17/Treg 细胞失衡的重要原因。本研究发现,口服阿维 A 治疗 8 周后,有效率为 80.22%;银屑病患者 PASI 评分由治疗前的  $21.52 \pm 8.17$  下降至  $4.27 \pm 6.15$ ,差异有统计学意义。说明阿维 A 治疗银屑病疗效明显。银屑病患者经阿维 A 治疗后 ROR $\gamma$ t 的表达水平明显降低,而 Foxp3 的表达水平明显升高,与治疗前相比均有统计学差异( $P < 0.01$ ),我们的实验结果与以往研究报道基本一致。但阿维 A 对 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群的影响机制是直接作用于各自的特异性转录因子还是通过抑制炎症性树突状细胞因子的产生和成熟或是通过其他途径有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*, 2009, 129: 79-88.
- [2] Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, et al. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and nature regulatory T cells. *Nature*, 2007, 445: 936-940.
- [3] Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology*, 2005, 210: 194-199.
- [4] Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*, 2008, 128: 1207-1211.
- [5] Nogales KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg*, 2010, 29: 3-9.
- [6] Huang Z, Xie H, Wang R, et al. Retinoid-related orphan receptor gamma t is a potential therapeutic target for controlling inflammatory autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11: 737-743.
- [7] Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 2005, 22: 329-341.
- [8] Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma t function. *Nature*, 2008, 453: 236-240.
- [9] Quaglino P, Bergallo M, Ponti R, et al. Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell pattern in psoriatic patients: modulation of cytokines and gene targets induced by etanercept treatment and correlation with clinical response. *Dermatology*, 2011, 223: 57-67.
- [10] Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2010, 130: 1373-1383.
- [11] Arican O, Aral M, Sasmaz S, et al. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*, 2005, 2005: 273-279.
- [12] Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 2005, 174: 164-173.
- [13] Kagen MH, McCormick TS, Cooper KD. Regulatory T cells in psoriasis. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 2006(56): 193-209.
- [14] Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 2004, 21: 527-538.
- [15] Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007, 317: 256-260.
- [16] 张静,李弼民,冷芳,等.维甲酸对 Th17/Treg 平衡的影响及与炎症性肠病的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 12: 3356-3358.

(收稿日期:2012-09-03)

(本文编辑:吴莹)

王忠永,邱会芬,蒋廷伟.阿维 A 对寻常型银屑病患者外周血 Th17/Treg 细胞转录因子 ROR $\gamma$ t 和 Foxp3 表达影响的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(24): 8156-8159.