临床研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1888-03

慢性荨麻疹患者外周血 eotaxin、mcp-1 的表达及意义

袁群霞,李 惠,单 葵
(重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究嗜酸性粒细胞趋化因子(Eosinophil chemoattractant chemokine,eotaxin),单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1,mcp-1)在慢性荨麻疹患者外周血的表达及其意义。方法:逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase reaction,RT-PCR)、酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)分别检测 58 例慢性荨麻疹患者和 39 例正常对照者外周血单个核细胞 eotaxin、mcp-1 的 mRNA 和血清蛋白的表达水平。结果:①慢性荨麻疹患者外周血单个核细胞eotaxin、mcp-1 的 mRNA 的相对表达量分别为 0.664 9±0.106 7、0.499 4±0.060 8,正常对照分别为 0.424 8±0.081 8、0.289 7±0.049 6,患者组血清蛋白表达分别为(450.48±222.44) pg/ml、(103.35±46.53) pg/ml,正常对照分别为(277.76±89.49) pg/ml 和(53.35±34.91) pg/ml,两者 mRNA 和蛋白表达组间比较均有统计学意义,P 均 <0.001。②慢性荨麻疹患者外周血 eotaxin 蛋白表达与病程长短、症状评分呈正相关,P 均 <0.01。结论:慢性荨麻疹患者外周血 eotaxin、mcp-1 表达的上调及 Th 免疫失衡可能与其发病有关。

【关键词】荨麻疹;嗜酸性粒细胞;嗜碱性粒细胞;Eotaxin;Mcp-1
【中国图书分类法分类号】R75 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-09-26

The expression and significance of eotaxin and mcp-1 in peripheral blood from patients with chronic urticaria

YUAN Qun-xia, et al
(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mRNA and protein expression and significance of eosinophil chemoattractant chemokine (eotaxin) and monocyte chemoattractant protein-1 (mcp-1) in peripheral blood of patients with chronic urticaria. *Methods*: Reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to analyzed the mRNA and protein expression respectively in peripheral blood from 58 patients with chronic urticaria and 39 healthy controls. *Results*: ①The mRNA expression of eotaxin and mcp-1 were 0.664 9±0.106 7, 0.499 4±0.060 8 respectively in patients with chronic urticaria, 0.424 8±0.081 8、0.289 7±0.049 6 in healthy controls. The protein expression of eotaxin and mcp-1 in serum were (450.48±222.44) pg/ml, (103.35±46.53) pg/ml in the patients, (277.76±89.49) pg/ml and (53.35±34.91) pg/ml in the controls. Both the mRNA and protein expression of eotaxin and mcp-1 in peripheral blood in the patients was significantly higher than those in the controls (P<0.001). ②There was a positive correlation (P<0.01) between the expression of eotaxin and the course、severity of the desease. *Conclusion*: The results suggest that the up-regulation of the eotaxin and mcp-1 might play a certain role in the pathogenesis of chronic urticaria.

【Key words】Urticaria; Eosinophil; Basophil; Eotaxin; Mcp-1

荨麻疹是由皮肤、黏膜小血管反应性扩张和通透性增加而产生的一种局限性水肿反应,主要表现为红斑及风团。慢性荨麻疹是指荨麻疹每天或几乎每天发作,持续 6 周或以上,其病因复杂,除了有组胺介导的速发相反应外,还存在着以嗜酸性粒细胞浸润为特征的迟发相反应。迟发相反应的始动细胞是肥大细胞,Th2 细胞则起调控作用。嗜酸性粒细胞趋化因子(Eosinophil chemoattractant chemokine,eotaxin)不仅可以吸引嗜酸性粒细胞,且同时对嗜碱性粒细胞,Th2细胞等多种炎症细胞均有调控作用。CC 型趋化因子(CC-chemo kine)又叫 β 趋化因子,其特点是氨基末端有两个相邻的半胱氨酸残基。单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1,mcp-1)和 eotaxin 同属于 CC 型趋化因子,其在 Th2 免疫介导的疾病常有高表达。本实验采用 RT-PCR 法和 ELISA 法检测慢性荨疹患者外周血 eotaxin、mcp-1 的表达,以此探讨慢性荨麻疹的可能发病机制。

作者介绍:袁群霞(1985-),女,硕士,
研究方向:皮肤变态反应。
通讯作者:单 葵,女,副教授,E-mail:tracysk@21.cn.com。

1 对 象

1.1 对象

58 例慢性荨麻疹患者均来自我院皮肤科门诊，符合慢性荨麻疹的诊断标准，且入选时均有慢性荨麻疹的症状和体征。入选标准：1 月内未使用过糖皮质激素及免疫抑制剂，1 周内未使用过抗组胺药物，非妊娠或哺乳患者，年龄 16~60 岁，平均（30.27 ± 11.03）岁，病程 2 月到 31 年，平均（37.45 ± 32.14）月。无严重心、肝、肾等器官病变及其他系统性疾病。正常对照 39 例，均为健康自愿者，年龄，性别组成与患者组无统计学差异。

1.2 临床评价

根据患者的自觉瘙痒程度和风团的数量、大小进行临床评价。评分标准：（1）瘙痒：无痒感记为 0 分；轻度瘙痒，不烦躁记为 1 分；中度瘙痒，不影响日常生活和睡眠记为 2 分；重度瘙痒，影响日常生活和睡眠记为 3 分。（2）风团数量：无风团记为 0 分；1~20 个/24 h，记为 1 分；20~50 个/24 h，记为 2 分；大于 50 个/24 h 或者大块融合性的风团记为 3 分。

2 方 法

2.1 标本的处理和保存

取患者和正常对照者肘静脉血各 10 ml，采血前征得所有患者和自愿者同意，其中 6 ml 用 EDTAK2 抗凝，采用 Ficoll-Hypaque 法分离 PBMC，PBS 洗 2 次，-70℃保存，用于总 RNA 的提取。4 ml 静脉血室温静置 2 h，2 000 r/min 离心 5 min，吸取上清液，-70℃保存，用于 ELISA 检测。

2.2 总 RNA 的提取、cDNA 合成与 PCR 扩增

取分离好的 PBMC，加入 1 ml Trizol 试剂，按 RNA 提取试剂盒说明书操作，提取总 RNA，溶于 DEPC，-70℃保存备用。采用逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA，-20℃保存。采用 PCR 扩增试剂盒在 Minicycle 型 PCR 扩增仪上扩增（所有试剂盒与相关试剂均购自上海活乐生物科技公司）。引物序列：EOTAXIN：（上游）5'-CTCTCCGTAGCAACCCTTTG-3'（下游）5'-TATCCTTGGCCAGTTTGGTC-3'。扩增条件：95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 60 s，共 30 个循环，扩增产物 137 bp。mcp-1：（上游）5'-GCCTCCAGCATGAAAGTCTC-3'（下游）5'-GGTACCACGTCTGCTTGGAT-3'。扩增条件：95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 60 s，共 30 个循环，扩增产物 165 bp。内参 GAPDH：引物序列：（上游）5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'，（下游）5'-GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT-3'，条件：95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 60 s，共 30 个循环，产物大小 457 bp。末轮循环均为72℃ 延伸 10 min，4℃保存。

2.3 图像分析和数据处理

取 10 μl 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳，电压 100 V。电泳后拍照，采用 Quantity One 凝胶定量分析软件测定各条带的吸光度值，以 EOTAXIN/GAPDH、MCP-1/GAPDH 的比值，半定量其 mRNA 的表达水平。

2.4 ELISA 检测

采用双抗体夹心法检测血清 eotaxin、mcp-1 浓度，ELISA 试剂盒购自上海活乐生物科技公司，按照说明书操作，步骤如下：将已做相应稀释的样本与标准品加至已包被的酶标板孔内（样本与标准品均设复孔），37℃水浴箱内温育 30 min，PBS 洗板 5 次，加入酶标试剂，温育 30 min，PBS 洗板 5 次，加显色液 AB，37℃避光显色 20 min，加终止液，450 nm、620 nm 双波长读取吸光值。

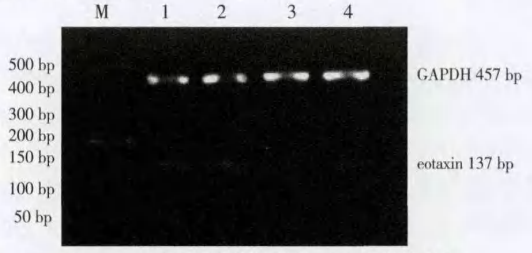
2.5 统计学分析

统计学分析采用 SPSS11.0 统计分析软件包进行数据分析计算。所有数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用 t 检验，显著性检验水平为 0.05。

3 结 果

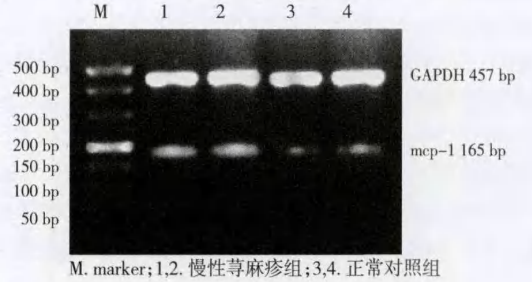
3.1 慢性荨麻疹患者和正常对照外周血单个核细胞 eotaxin、mcp-1 表达的比较

慢性荨麻疹和正常对照者 eotaxin、mcp-1 mRNA 的差异表达分别见图 1、图 2。平均表达量见表 1。从图 1、图 2、表 1 可以看出慢性荨麻疹患者外周血 eotaxin、mcp-1 的 mRNA 及血清蛋白表达量较正常对照均有显著增高，P 均 <0.001，差异有统计学意义。



M. marker；1，2. 慢性荨麻疹组；3，4. 正常对照组

图 1 慢性荨麻疹与正常对照外周血单个核细胞 eotaxin mRNA 表达的比较



M. marker；1,2. 慢性荨麻疹组；3,4. 正常对照组

图 2 慢性荨麻疹与正常对照外周血单个核细胞 mcp-1 mRNA 表达的比较

3.2 慢性荨麻疹患者血清 eotaxin、mcp-1 与病程、症状积分的相关性

血清 eotaxin、mcp-1 浓度与病程、症状积分的相关性分

表 1 慢性荨麻疹与正常对照外周血 eotaxin、mcp-1 的 mRNA 与蛋白表达水平

组别	mRNA		蛋白(pg/ml)	
	eotaxin	mcp-1	eotaxin	mcp-1
患者组	0.664 9 ± 0.106 7	0.499 4 ± 0.060 8	450.48 ± 222.44	103.35 ± 46.53
对照组	0.424 8 ± 0.081 8	0.289 7 ± 0.049 6	277.76 ± 89.49	53.35 ± 34.91
t	6.188	6.544	4.659	4.122
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:表中 mRNA 数值为 eotaxin、mcp-1 条带灰度值 GAPDH 条带灰度值的比值

析采用 Spearman 秩相关分析。Eotaxin 浓度与病程、症状积分均呈正相关,r 值分别为 0.546、0.459,P 均 <0.01。mcp-1 浓度与病程、症状积分无明显相关性,r 值分别为 0.274,0.204,P 均 >0.05。

4 讨 论

Eotaxin 是 CC 型趋化因子家簇的成员,由成纤维细胞、皮肤的微血管内皮细胞、Th 细胞、嗜酸性粒细胞等分泌。Eotaxin 是嗜酸性粒细胞强有力的趋化因子,其特异性的受体为 CC 趋化因子受体 3(CC-chemokine receptor3,CCR3)。CCR3 在嗜酸性粒细胞,嗜碱性粒细胞,Th2 细胞上均有表达。嗜酸性粒细胞在 eotaxin 的作用下可以快速释放大量 IL-4[1]。嗜碱性粒细胞不仅可以分泌 IL-4,同时它在免疫调节和 IgE 介导的慢性 I 型过敏反应中也发挥重要作用[2-4]。Mcp-1 是单核细胞主要的趋化蛋白之一, 同时其可以通过 CC 趋化因子受体 2(CC-chemo- kine receptor2,CCR2)影响 T 细胞免疫。

本实验首次同时从 mRNA 和蛋白水平测定慢性荨麻疹患者外周血中 eotaxin 与 mcp-1 的表达,实验结果显示两者的 mRNA 和蛋白水平的表达均有增高,且 eotaxin 蛋白表达水平和慢性荨麻疹的病程、症状评分呈正相关,实验结果与其他相似研究一致[5,6]。提示 eotaxin 的异常表达可能和慢性荨麻疹病情的迁延以及临床症状的轻重有关。Eotaxin 表达的上调,引起嗜酸性粒细胞释放 IL-4,同时影响嗜碱性粒细胞的的免疫调节功能,促进其释放 IL-4 等 Th2 类细胞因子,引起 Th1/Th2 免疫的失衡,Th2 免疫的优势应答。Eotaxin 通过 Th2 细胞则可进一步促进这种免疫失衡状态,同时影响 Th2 细胞对 I 型变态反应迟发相的调控作用。mcp-1 可以促进 Th2 细胞分泌 IL-4, 已有实验证明其在 Th2 免疫介导的疾病如哮喘中呈高表达,动物实验证明中和 mcp-1,可以取得疾病的缓解[7]。而慢性荨麻疹患者 IL-4 的表达增高,Th2 免疫优势应答,已经得到多个实验的验证[8,9]。因此慢性荨麻疹患者外周血 eotaxin、mcp-1 的异常表达可能和其 Th 免疫的失衡以及其发病有关。尽管针对 eotaxin、mcp-1 等细胞因子的靶向治疗,尚需更进一步的研究,但其提示临床对于慢性荨麻疹患者的治疗,除了抗组胺外,调节其 Th1/Th2 免疫的平衡也不可忽视。

参 考 文 献

[1] Bandeira-Melo C,Sugiyama K,Woods L J,et al.Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils[J]. J Immunol,2001,166(8):4813-4817.

[2] Obata K,Mukai K,Tsujimura Y,et al.Basophils are essential initia tors of a novel type of chronic allergic inflammaion[J]. Blood,2007,110(3):913-920.

[3] Keunhee O h,Tao Shen,Graham Le Gros,et al. Induction of Th2 type immunity in a mouse system reveals a novel immunoregulatory role of basophils[J].Blood,2007,109(7):2921-2927.

[4] Mukai K,Matsuoka K, Taya C,et al. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation indepen dently of T cells and mast cells[J]. Immunity,2005,23(2):191-202.

[5] 唐 慧,徐金华,郑志忠.慢性荨麻疹患者外周血单一核细胞 CC 型趋化因子的表达[J].中华皮肤科杂志,2006,39(2):74-76.

[6] 史立宏,李晓民,李金勇,等.慢性荨麻疹患者血浆 RANTES、嗜酸性粒细胞趋化因子、TNF-α 与白三烯 B4 水平的测定[J].中华皮肤科杂志,2009,42(8):553-535.

[7] Long Gu, Susan Tseng, Renée M,et al. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1[J].Nature,2002,23:407-411.

[8] Ferrer M,Luquin E,Sanchez IbarrolaA,et al.Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria[J].Int Arch Allergy Immunol, 2002, 129(3):254-260.

[9] Ying S,Kikuchi Y,Meng Q,et al.TH1/TH2 cytokines and inflamm ation cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria:comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction[J].J Allergy Clin Immunol,2002, 109(4):694-700.

(责任编辑:关蕴良)