基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1014-05

CD4、CD8 和 γ 受体在色素性紫癜性皮肤病 T 细胞中的表达

刘 婷[1],李 惠[1],周维康[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016;2. 重庆市第三人民医院,重庆 400014)

【摘 要】目的:根据 T 细胞表面抗原 CD4、CD8 和受体 γ 的表达分析色素性紫癜性皮肤病(Pigmented purpuric dermatoses,PPD)和蕈样肉芽肿(Mycosis fungoides,MF)的关系,探讨前者能否被视为一种皮肤淋巴样疾病(Cutaneous lymphoid dyscrasia,CLD)。方法:免疫组化技术检测 23 例确诊 PPD 患者皮损表皮和真皮 T 淋巴细胞表面抗原 CD4、CD8 的表达情况,PCR 测定 T 细胞受体 γ(T cell receptor γ,TCR γ)单克隆基因重排。设立 20 例 MF 皮损、20 例正常人皮肤组织为对照。结果:23 例 PPD 中的 15 例有淋巴细胞向表皮的明显迁移,其中的 5 例和 20 例 MF 皮损可见淋巴细胞亲表皮现象,正常组未见此现象;18 例 PPD、20 例 MF 和 6 例正常皮肤免疫染色以 $CD4^+T$ 为主;PPD 和 MF 两组在真皮中的 $CD4^+T$ 数分别为 38.2 ± 30.6 和 68.8 ± 47.6($P<0.017$),$CD4^+/CD8^+$ 值分别为 1.7 ± 1.1 和 2.6 ± 0.8 ($P<0.05$),PPD 组数值小于 MF 组,有显著差异;其余表皮和真皮中两组间的 $CD4^+T$、$CD8^+T$ 计数和 $CD4^+/CD8^+$ 值均较接近。TCR γ 的 PCR 扩增结果显示 23 例 PPD 中 10 例阳性,20 例 MF 中 16 例阳性,正常组无 1 例阳性。其中 7 例阳性 PPD 标本见淋巴细胞向表皮的明显迁移(包括 3 例有亲表皮现象的 PPD),8 例以 $CD4^+T$ 细胞为主,9 例表现为除双小腿以外的其它部位也存在皮疹。结论:PPD 在 T 细胞表面抗原和受体的表达上有部分类似蕈样肉芽肿的特征,可能系一种皮肤淋巴样疾病。对于皮损分布广泛,治疗效果欠佳,免疫表型和分子学特征类似蕈样肉芽肿的病例在诊疗上应尤为重视,加强随访。

【关键词】色素性紫癜性皮肤病;蕈样肉芽肿;CD4;CD8;TCR-γ

【中国图书分类法分类号】R75 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-05

作者介绍:刘 婷(1982-),女,硕士,

研究方向:皮肤免疫与变态反应性疾病。

通讯作者:李 惠,女,教授,E-mail:lihui131128@vip.163.com。

这可能与此基因型的改变所致 chymase mRNA 表达增高或蛋白活性增强有关。总之,chymase 致糖尿病肾脏病变及机体上调 chymase 表达的具体机制都还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Durvasula R V,Shankland S J.Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2008,294(4):830-839.

[2] Ritz E.Chymase:a potential culprit in diabetic nephropathy[J]? Am J Soc Nephrol, 2003,14(7):1952-1954.

[3] Saini K S,Thompson C,Winterford C M,et al.Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a routine pancreatic beta cell line[J]. Biochem Mol Biol Int,1996,39(6):1229-1236.

[4] Chen LY,Li P,He Q,et al.Transgenic study of the function of chymase in heart remodeling[J]. J Hypertens,2002, 20(10):1943-1944.

[5] Huang XR, Chen WY, Truong LD,et al. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease [J]. Am J Soc Nephrol, 2003, 14(7):1738-1747.

[6] Rangan GK, Harris DC. A blast from the mast[J]? Kindney Int, 2003,64:1134-1135.

[7] Yao L, Takai S,Nagai Y,et al. *Contribution of chymase to the activation of the transforming growth factor-beta/smad 2 pathway and renal injury in dahl salt-sensitive hypertensive rats*[J]. Hypertension, 2004, 44(4): 551.

[8] Katada J, Muramatsu M, Hayashi I,et al. Significance of vascular endothelial cell growth factor up-regulation mediated via a chymase-angiotensin-dependent pathyway during angiogenesis in hamster sponge granulomas[J]. J Pharmacol Exp Ther ,2002,302(3):949-956.

[9] Doggrell SA, Wanstall JC. Vascular chymase:pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition[J]. Cardiovasc Res,2004,61(4):653-662.

[10] Prasad P,Tiwari A K,Kumar K M,et al. Chronic renal insufficiency among Asian Indians with type 2 diabetes: I. Role of RAAS gene polymorphisms[J]. BMC Med Genet,2006,7:42.

(责任编辑:关蕴良)

Expression of CD4, CD8 and receptor γ of T cell in pigmented purpuric dermatoses

LIU Ting, et al

(*Department of Dermoto-venereology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To analyze the relationship between PPD and MF on the basis of the surface antigen CD4, CD8 and receptor γ of T cell, so as to provide if PPD can represent a cutaneous lymphoid dyscrasia. *Methods*: The expression of CD4 and CD8 was measured by immunohistochemical technique in specimens obrained from lesional skin of 23 cases of PPD, 20 cases of MF and skin of 20 cases of normal persons. The TCR-gamma gene rearrangement was detected with PCR. *Results*: 15 cases of PPD have obvious migrations of lymphocytes to the epidermis. Their 5 cases and 20 cases of MF show T cell epidermotopism; 18 cases of PPD, 20 cases of MF and 6 cases of normal persons show a dominance of $CD4^+$. In the dermis, the numbers of $CD4^+$ between PPD and MF are 38.2 ± 30.6 and 68.8 ± 47.6 ($P<0.017$), and the ratios of $CD4^+/CD8^+$ are 1.7 ± 1.1 and 2.6 ± 0.8 ($P<0.05$). Both have significant differences. The remains are no obvious differences. TCR-gamma gene rearrangement was found in 10 cases of PPD and 16 cases of MF. 7 cases of PPD can be seen obvious migrations of lymphocytes to the epidermis (including 3 cases characterized by epidermotopism), 8 cases show a dominance of $CD4^+$ and 9 cases have atypicalerythfra. *Conclusions*: PPD have similar feature like mycosis fungoides, so it may be one kind of cutaneous lymphoid dyscrasia. We should pay attention to follow the patients with widespread erythra, bad curative effect and similar Immunophenotyping and molecular feature of mycosis fungoides.

【Key words】Pigmented purpuric dermatoses; Mycosis fungoides; CD4; CD8; TCR-γ

色素性紫癜性皮肤病(Pigmented purpuric dermatoses, PPD)是一组好发于下肢,以紫癜样皮疹和含铁血黄素沉着为主要表现的慢性毛细血管炎性皮肤病,病因尚不清楚。该病主要有 4 种临床类型,即进行性色素性紫癜皮肤病、色素性紫癜性苔藓样皮炎、毛细血管扩张性环状紫癜和瘙痒性紫癜。依据典型的临床和病理表现确诊不难,但治疗效果常不令人满意。近年来在探讨其发病机制的同时,国外出现 PPD 向蕈样肉芽肿(Mycosis fungoides, MF)进展的临床病例报道[1-4],更有学者指出 PPD 应被归为一种已包括慢性苔藓样糠疹、大斑块类银屑病、非典型淋巴细胞样小叶性脂膜炎等在内的介于皮肤炎性状态和恶性肿瘤之间的疾病阶段,即皮肤淋巴样疾病(Cutaneous lymphoid dyscrasia, CLD)[1,2,5,6]。为探讨 PPD 与 MF 的关系,我们对 23 例经临床和病理确诊的 PPD 患者皮损组织进行了 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞染色和 T 细胞受体 γ(T cell receptor γ, TCRγ)基因的单克隆重排测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 用于切片染色和 PCR 实验的23 例 PPD、20 例 MF 和 20 例正常皮肤组织为重庆医科大学附属第一医院皮肤科和第三军医大学西南医院皮肤科 2000~2008 年收集的确诊病例石蜡标本。同时取 2008 年我院新确诊的 2 例 PPD 新鲜皮损作电镜图像分析。

1.1.2 临床资料 23 例 PPD 患者中男 16 例,女 7 例,平均年龄 40.6(17~70)岁,病程 2 月 ~11 年,平均 1.5 年;其中进行性色素性紫癜性皮病 4 例(2 男 2 女),毛细血管扩张性环状紫癜 3 例(3 女),色素性紫癜性苔藓样皮病 16 例(14 男 2 女);皮损仅分布于双小腿 11 例,分布于小腿以外的其它不典型部位如躯干、上肢或泛发全身的共 12 例。新收 2 例 PPD 标本均为男性,病程分别为 3 月和 6 月,皮疹分布全身,临床表现为色素性紫癜性苔藓样皮病。20 例 MF 患者中男 14 例,女 6 例,平均年龄 61.3(40~79)岁,病程 3 月 ~36 年,平均 10.1 年;红斑期 2 例、斑块期 16 例、肿瘤期 2 例。

1.2 试剂

CD4、CD8 单克隆抗体、二步法免疫组化检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 石蜡切片 DNA 分离试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司;PCR 反应试剂盒购自宝生物工程有限公司;PCR 检测 TCR γ 单克隆基因重排所需引物;内参上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCA C-3',下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';V_{1-8}5'-CCA GGAGGGGAAGGCCCCACAG-3'[7],J_{1-2} 5'-CCTGTGACAA CA AGTGTTGT-3'[8],引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 HE 染色 对所有标本进行常规 HE 染色,光学显微镜下观察皮损特征。

1.3.2 免疫组化染色 石蜡标本 5μm 厚度切片,常规脱蜡、水化,抗原热修复,加一抗 4℃过夜,PBS 冲洗后分步滴加试

剂盒内试剂，孵育，滴加 DAB 溶液，在显微镜下观察显色，至染色效果满意后自来水充分冲洗，复染、脱水、透明、中性树胶封片。同时以 MF 组和正常皮肤组作为对照。计数：每张切片随机选取 10 个高倍视野（×400）计算阳性细胞个数，两人在镜下重复计数 3 次取平均值，该值则为对应标本的细胞阳性染色数。

1.3.3　PCR 反应　①5 μm 石蜡标本切片 10~15 张放入 EP 管内，采用石蜡切片 DNA 分离试剂盒提取 DNA。②取 50 μl 反应体系，DNA 聚合酶 0.25 μl，10 × PCR buffer 5 μl，$MgCl_2$ 4 μl，dNTP 混合液 4 μl，模板 DNA 2 ng，上下游引物各 1 μl，灭菌蒸馏水加至 50 μl。③PCR 反应程序：95℃ 2 min，70℃ 1 min，72℃ 30 s，变性 94℃ 30 s，退火 60℃ 30 s，延伸 72℃ 30 s，共 35 个循环，终延伸 72℃ 10 min，产物 4℃保存备用，取 10 μl 进行琼脂糖电泳观察。预计内参引物大小 400 bp，目的引物大小 230~245 bp。

1.3.4　电镜　取 2 例 PPD 新鲜皮损戊二醛固定，梯度脱水、浸透、包埋、切片，电子染色，镜下观察淋巴细胞胞核形态。

1.3.5　统计分析　运用 SAS8.2 软件。非正态分布的三组间细胞染色数目比较用 K-W 检验，检验水准的调整采用 Bonferroni 法（调整后 P=0.017）；PCR 阳性条带率比较用 χ^2 检验（P=0.05）。

2　结　果

2.1　病理染色及电镜图像分析

23 例 PPD 均可见真皮毛细血管内皮细胞肿胀，管周有红细胞外渗和小淋巴细胞浸润；真皮上部以小淋巴细胞浸润为主，其中 15 例可见淋巴细胞明显向表皮迁移，5 例形成明显的亲表皮现象，即

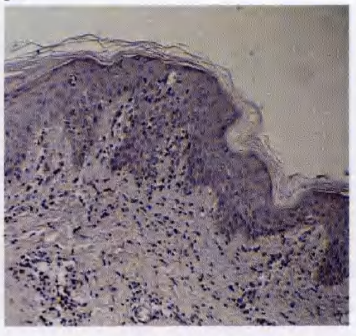


图 1　5 例 PPD 皮损病理变化示淋巴细胞亲表皮性（HE，×200）

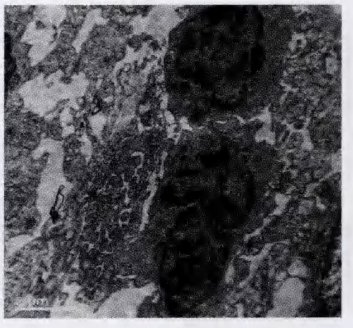


图 2　电镜图像示 PPD 皮损表皮淋巴细胞核不规则改变，近似脑回状（×8 000）

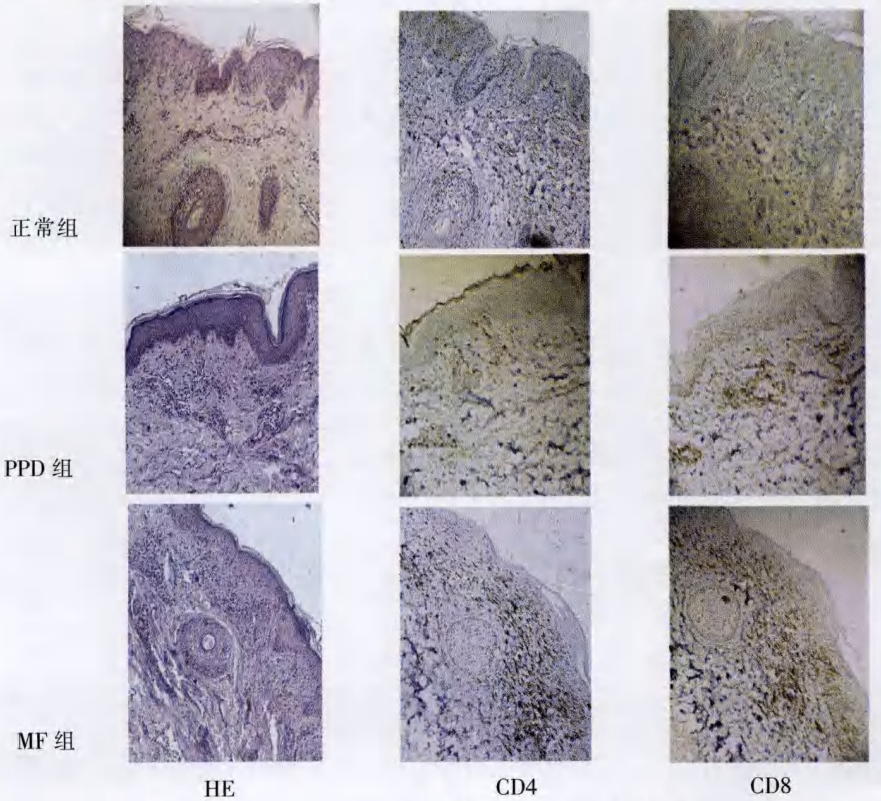


图 3　HE 和免疫组化染色结果（×200）

表 1 3 组间 $CD4^+T$、$CD8^+T$ 细胞染色数目比较($M\pm Q^*$)

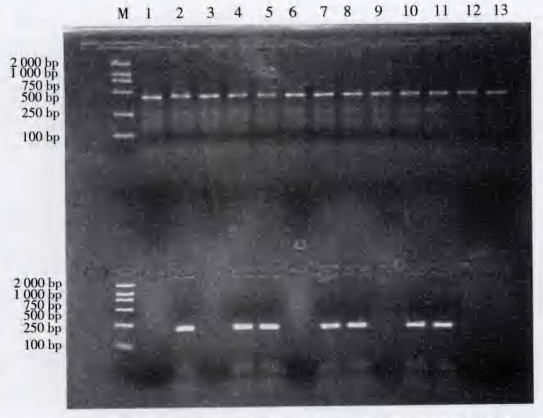
组别	例数	表皮		真皮	
		$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+$	$CD8^+$
正常组	20	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 1.8	0.0 ± 0.0
PPD 组	23	2.0 ± 9.5	1.0 ± 2.2	38.2 ± 30.6	25 ± 54.8
MF 组	20	9.2 ± 14.3	2.6 ± 6.7	68.8 ± 47.6	31.7 ± 24.0

注:* 中位数 ± 四分位间距;α=0.05,P<0.017;3 组间、正常组和 PPD 组间、正常组和 MF 组间均为 P<0.000 1;PPD 组和 MF 组间 P>0.017

表 2 PPD 组和 MF 组 $CD4^+/CD8^+$比较($M\pm Q^*$)

组别	表皮		真皮	
	例数	$CD4^+/CD8^+$	例数	$CD4^+/CD8^+$
PPD 组	18	2.1 ± 3.9	22	1.7 ± 1.1
MF 组	18	2.9 ± 3.0	20	2.6 ± 0.8

注:* 中位数 ± 四分位间距;α=0.05,P<0.05;表皮中 P>0.05,真皮中 P<0.05



1. 正常皮肤;2. MF 皮损;3~13. 部分 PPD 皮损的表达

图 4 PCR 产物电泳图

淋巴细胞单个或灶性侵入表皮,与周围角质形成细胞之间有透明间隔或晕(图 1);油镜下可见小部分淋巴细胞核呈不规则改变,2 例 PPD 新鲜皮损的电镜图像较好地展示了这一现象(图 2);正常组标本淋巴细胞总体数量较少,未发现淋巴细胞亲表皮现象和明显的胞核不规则改变。MF 组淋巴细胞数量多,20 例标本均见程度不一的淋巴细胞亲表皮现象,油镜下可见以异型核淋巴细胞浸润为主,斑块期和肿瘤期标本核深染与核扭曲更明显。

2.2 免疫组化染色

23 例 PPD 中 18 例以 $CD4^+$ T 细胞为主,余 5 例以 $CD8^+$ T 细胞为主;20 例 MF 均以 $CD4^+$ T 细胞为主;20 例正常标本中 6 例以 $CD4^+$ T 细胞为主,3 例以 $CD8^+$ T 细胞为主,余 11 例呈 $CD4^+T$、$CD8^+T$ 阴性染色 (图 3)。统计学分析显示 PPD、MF 和正常人 3 组的 $CD4^+T$、$CD8^+T$ 数在表皮和真皮中差异均有统计学意义(P<0.017),即 PPD 组计数介于正常组和MF 组之间。PPD 和 MF 两组间比较, 表皮中 $CD4^+T$、$CD8^+T$ 数差异无统计学意义(P>0.017),$CD4^+/CD8^+$比值差异无统计学意义 (P>0.05); 真皮中两组的 $CD8^+T$ 数差异无统计学意义(P>0.017),但 $CD4^+T$ 数有显著性差异(P<0.017),且 $CD4^+/CD8^+$比值有显著性差异(P<0.05)(表 1、2)。

2.3 PCR 产物电泳

23 例 PPD 中 10 例 TCR γ 扩增阳性(43.5%),20 例 MF16 例阳性(80%),正常组无 1 例阳性扩增,比较 3 组间的阳性率差异有统计学意义(P>0.05)(图 4),PPD 组阳性率介于正常组和 MF 组之间。在 10 例阳性扩增的 PPD 标本中男 8 例,女 2 例,平均年龄 49(20~70)岁,6 人大于 50 岁;病程 2 月~5 年,平均 1.6 年,6 人大于 1 年;其中的 7 例在病理表现上有淋巴细胞明显向表皮迁移,包括 3 例亲表皮现象标本;8 例以 $CD4^+$ T 细胞为主,2 例以 $CD8^+$ T 细胞为主;10 例中的 6 例同时有淋巴细胞明显向表皮迁移和以 $CD4^+$ T 细胞为主,包括 3 例扩增阳性的亲表皮现象标本在内;9 例表现为除双小腿以外,其它部位也出现皮疹, 仅 1 例患者的皮疹局限于双小腿。13 例扩增阴性的 PPD 标本中 2 例可见淋巴细胞亲表皮现象,3 例以 $CD8^+T$ 细胞为主,其中仅 3 例出现双小腿以外部位的皮疹。

3 讨 论

目前 PPD 的病因尚不清楚,而且有持续消长变化的特点,疗效不甚理想。MF 是原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤(Primary cutaneous T cell lymphoma,PCTCL)中最常见的类型。典型的临床经过有红斑期、斑块期和肿瘤期。早期皮损缺乏特异性,不易及时作出诊

断。研究表明 PPD 与 MF 有着一定的联系。一方面，MF 除典型表现外可有少数特殊的临床变异，如包括色素性紫癜样皮疹、肉芽肿性皮疹、大疱性皮疹等疾病在内的一系列不典型表现[9]；另一方面，虽然认为 PPD 属良性过程，但仍有少数最终发展为 MF，即 MF 可在早期的较长时间内表现为慢性皮炎。近年有文献指出 PPD 应被归为 CLD，后者是伴随持续的淋巴细胞克隆的原发性慢性皮肤病的统称，形态学上与皮肤淋巴瘤相似，是皮肤炎性状态和恶性肿瘤之间的疾病阶段。Magro CM 等[10]对 43 例 PPD 患者皮损的组织形态、免疫表型和分子学特点进行了研究，结论支持 PPD 为一种 CLD，并按照分子学特征将 PPD 分为单克隆和多克隆两大类，建议对单克隆患者按照类似于早期 MF 的方案进行治疗。

我们的研究从皮损组织的病理、免疫组化和分子学特征出发，找寻 PPD 与 MF 的联系。在组织形态学方面，所有的 PPD 标本除自身典型病理特征外均表现为小淋巴细胞浸润为主，65%的标本可见淋巴细胞向表皮的明显迁移，5 例有亲表皮现象，形态学上与 MF 的早期表现有一定的类似，但数量较少。高倍视野下所见和 2 例新鲜皮损的电镜图象反映了部分淋巴细胞核的不规则改变，但典型的脑回状细胞并未找到。免疫组化发现 78%的 PPD 标本以 $CD4^+$T 细胞为主，真皮中 PPD 和 MF 两组间仅 $CD8^+$数无显著差异，在表皮中，PPD 和 MF 的 $CD4^+$ T、$CD8^+$ T 和 $CD4^+/CD8^+$值均比较接近，其中 70%的 MF 和 43%的 PPD$CD4^+/CD8^+$值大于 2。Nuckols 等[11]曾提出 MF 表皮中的 $CD4^+/CD8^+$值如大于或等于 2，则更支持诊断，因此设想可进一步将表皮中的 $CD4^+$、$CD8^+$和 $CD4^+/CD8^+$比值作为判断 PPD 具有恶变倾向的参考依据。国外 Wood 等[12]学者发现 PCTCL 是单克隆淋巴细胞增殖性疾病，在 MF 的早期就有 TCR 基因克隆重排。而且国内学者也进行了相关方面的研究[13]。我们的 PCR 结果显示 43.5%的 PPD 标本 TCRγ 单克隆重排阳性，阳性率介于正常人和 MF 之间。与扩增阴性的标本相比，扩增阳性的 PPD 标本年龄偏大，病程常超过 1 年，以 $CD4^+$T 细胞浸润为主，组织学异常更明显，皮损分布也更为广泛。虽然 PPD 与 MF 存在上述的相似，但由于研究数量的局限性、缺乏长期随访和进一步深入的研究，所以难以说明 PPD 向 MF 发展的确切趋势。

我们的研究认为暂可初步将 PPD 归为皮肤淋巴样疾病，但这不表示 PPD 向 MF 发展的必然趋势，而是对于临床上皮疹分布广泛、治疗疗效差且瘙痒严重、反复不愈的患者建议行进一步的组织形态学和分子学检查，以警惕和排除早期 MF 表现的可能。由于 PPD 标本单克隆重排阳性和阴性组间存在临床和病理特征的交叉，所以尚不可能完全依据分子学研究对 PPD 分类进而拟定不同的治疗方案。因此在丰富现有治疗手段、提高疗效的同时，对已确诊的 PPD 患者应注期的追踪和随访，掌握疾病的演变过程，及时作出诊疗的调整。

参 考 文 献

[1] Barnhill R L, Braverman I M.Progression of pigmented purpura-like eruptions to mycosis fungoides: report of three cases[J]. J Am Acad Dermatol, 1988, 19(1): 25-31.

[2] Toro J R, Sander C A, Leboit P E.Presistent pigmented purpuric dermatitis and mycosis fungoides: simulant, precursor, or both? A study by light microscopy and molecular methods[J]. Am J Dermatopathol, 1997, 19(2): 108-118.

[3] Hanna S, Walsh N, D'Intino Y, et al.Mycosis fungoides presenting as pigmented purpuric dermatitis[J]. Pediatr Dermatol, 2006, 23(4): 350-354.

[4] Viseux V, Schoenlaub P, Cnudde F, et al. Pigmented purpuric dermatitis preceding the diagnosis of mycosis fungoides by 24 years[J]. Dermatology, 2003, 207(3): 331-332.

[5] Ugajin T, Satoh T, Yokozeki H, et al.Mycosis fungoides presenting as pigmented purpuric eruption[J].Eur J Dermatol, 2005, 15(6): 489-491.

[6] Plaza J A, Morrison C, Maqro C M.Assessment of TCR-beta clonality in a diverse group of cutaneous T-cell infiltrates[J]. J Cutan Pathol, 2008, 35(4): 358-365.

[7] Alkan S, Cosar E, Ergin M, et al.Detection of T-cell receptor-gamma gene rearrangement in lymphoproliferative disorders by temperature gradient gel electrophoresis[J]. Arch Pathol Lab med, 2001, 125(2): 202-207.

[8] Signoretti S, Murphy M, Cangi M G, et al.Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangement in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive single-strand conformational polymorphism analysis[J]. Am J Pathol, 1999, 154(1): 67-75.

[9] 陈艺明，吴文育.持续性色素性紫癜性皮炎样蕈样肉芽肿 1 例[J].临床皮肤科杂志，2005，34(4)：236-237.

[10] Magro C M, Schaefer J T, Crowson A N, et al.Pigmented purpuric dermatosis: classification by phenotypic and molecular profiles[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(2): 218-229.

[11] Nuckols J D, Christopher R S, Marcelo G H, et al.Quantitation of intraepidermal T cell subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue helps in the diagnosis of mycosis fungoides[J]. J Cutan Pathol, 1999, 26(4): 169-175.

[12] Wood G S.Analysis of clonality in cutaneous T cell lymphoma and associated disease[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 941: 26-30.

[13] 宋丽新，赵玉铭，李 波，等.蕈样肉芽肿 T 细胞抗原受体 γ 基因重排的研究[J].中华皮肤科杂志，2002，35(1)：55.

（责任编辑：冉明会）