DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.021
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)04-0335-03

论著

CTLA4Ig抑制银屑病外周血单个核细胞增殖的体外研究

阎 衡,宋志强,向明明,叶庆俏,郝 飞 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究CTLA4Ig在银屑病外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)增殖中的作用。方法 PBMC标本取自33例寻常型银屑病患者和20名健康献血者,利用植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)、脂多糖(lipopolyaccharide, LPS)、金葡菌肠毒素B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)刺激增殖,在加入或未加入CTLA4Ig情况下,观察细胞形态并检测^{3}H-TdR掺入量。结果 显示CTLA4Ig对PHA、LPS有抑制作用,并呈剂量依赖关系;而CTLA4Ig浓度只有高于5μg/ml时,对SEB才有抑制作用,且可完全抑制。结论 CTLA4Ig对PHA、LPS、SEB刺激下的银屑病PBMC增殖反应有明显的抑制作用,但反应模式不一致。

关键词:CTLA4Ig;银屑病;外周血单个核细胞;细胞增殖;金葡萄肠毒素B
中图法分类号:R329.28;R392.12;R758.63 文献标识码:A

In vitro study of psoriatic PBMC proliferation inhibited by CTLA4Ig

YAN Heng, SONG Zhi-qiang, XIANG Ming-ming, YE Qing-yi, HAO Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the roles of CTLA4Ig in the proliferation of psoriatic peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Methods PBMC samples were taken from 33 patients with psoriasis vulgaris and 20 healthy blood donors. Proliferation of PBMC was induced by phytohemagglutinin (PHA), lipopolysaccharide (LPS), and staphylococcal enterotoxin B (SEB) with or without CTLA4Ig. The morphological changes of cells were observed, and ^{3}H-TdR incorporation rate was measured. Results CTLA4Ig could inhibit PHA- and LPS-induced psoriatic PBMC proliferation in a dose-dependent manner. SEB-induced psoriatic PBMC proliferation could be completely inhibited only when the dose of CTLA4Ig reached to the level higher than 5 μg/ml. Conclusion CTLA4Ig can effectively inhibit psoriatic PBMC proliferation induced by PHA, LPS, and SEB with different reaction patterns.

Key words: CTLA4Ig; psoriasis; peripheral blood mononuclear cell; proliferation; staphylococcal enterotoxin B

目前,许多学者认为银屑病具有自身免疫性疾病的特征,其发病早期表现为外周血T细胞过度活化。T细胞激活需要两个信号,第一信号是T细胞受体(T cell receptor, TCR)同抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)上的抗原多肽MHC分子复合物结合;第二信号是T细胞表面分子CD28/细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocytic associated antigen 4, CTLA4, CD152)与APC表面B7分子相互作用产生的共刺激信号,为抗原非特异性的[1]。其中,CTLA4对T细胞激活有较强的抑制作用[2]。1991年由Linsley等[3]采用基因重组的方法构建了CTLA4Ig,它包括人CTLA4膜外部分和人IgG1FC段,是一种可溶性的嵌合蛋白。CTLA4Ig与B7的亲和力显著高于CD28,可以封闭APC上的B7,阻断共刺激通路,抑制T细胞的激活。外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)主要包括T细胞和B细胞,B细胞的激活亦有赖于T细胞的激活,通过PBMC增殖反应可间接反应T细胞活化状态。本试验通过植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、金葡萄肠素B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)3种物质在体外诱导银屑病患者PBMC增殖,并分别加入CTLA4Ig,研究CTLA4Ig在此过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例

寻常型银屑病患者33例(进行期21例,静止期12例),均来自本科门诊和病房,并经临床和组织病理确诊。其中男性23例,女性10例,年龄12~66岁,平均35岁,病程1~25年。病例要求:①1个月内无任何发热史;②3个月内未接受任何系统治疗,如皮质类固醇激素、维甲酸类和免疫抑制剂等;③3个月内

作者简介:阎 衡(1974-),女,天津市人,硕士,主治医师,主要从事自身免疫性疾病的临床和实验方面的研究。电话:(023)68754493

收稿日期:2002-09-19;修回日期:2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

无大面积外用强效皮质类固醇激素类药物。正常对照组 20 例，选自本院健康献血者，男性 13 例，女性 7 例，年龄 23～40 岁，平均 28 岁，无银屑病家族史。

1.2 刺激条件

设进行期银屑病组、静止期银屑病组和正常对照组。空腹静脉采血，肝素抗凝，采用密度梯度离心法分离 PBMC，以完全培养基（含 5% FCS）悬浮，配成 1×10^6 细胞/ml，加入 96 孔板（200μl/孔），再分别加入终浓度为 10 μg/ml PHA（Sigma 公司）、10 μg/ml LPS（Sigma 公司）和 1 μg/ml SEB（军科院微生物流行病研究所制备）；另将进行期组 PBMC 悬液在 PHA、LPS 和 SEB 刺激的同时，加入终浓度为 0～10 μg/ml CTLA4Ig（第三军医大学全军烧伤研究所免疫室制备），均设空白对照组，于 37 ℃，5% CO_2 的饱和湿度条件下培养 72 h。

1.3 观察镜下形态

每隔 24 h 记录细胞镜下形态。

1.4 ^{3}H-TdR 掺入试验

培养结束前 24 h 加入 ^{3}H-TdR（3.7×10^4 Bq），培养结束后测量放射性（cpm），计算刺激指数 SI（SI＝刺激孔 cpm/对照孔 cpm）。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 SEB、LPS、PHA 刺激银屑病 PBMC 的增殖反应

2.1.1 镜下形态观察　光镜下，PHA 及 SEB 刺激组，24 h 细胞即大量增殖，细胞增大，母细胞化现象明显，细胞数量明显增多，并形成许多细胞集落；72 h 细胞增殖达高峰。LPS 刺激作用相对较弱，形成较小的集落，但仍可见明显的细胞分裂及母细胞化现象。相同刺激条件下，3 组间镜下形态并无明显差异。

2.1.2 ^{3}H-TdR 掺入试验　与正常对照组及静止期银屑病组相比，进行期 PBMC 仍具有显著的自发增殖活性；PBMC 对 SEB、PHA 均有明显的增殖反应，其中进行期和静止期对 SEB 反应明显高于对照组；3 组间对 PHA 反应无显著性差异；LPS 刺激 PBMC 只发生轻度增殖反应，且 3 组间无显著性差异，见表 1。

表 1 PHA、LPS、SEB 诱导银屑病 PBMC 增殖（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Psoriatic PBMC proliferation induced by PHA, LPS, and SEB（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	cpm	SI		
			PHA	LPS	SEB
Control	20	1 666.55±559.97	41.62±8.54	6.64±1.25	36.17±5.40
Psoriasis vulgaris	33	2 395.88±723.65 *	38.48±7.27	7.16±1.26	43.13±6.48 *
Active stage	21	2 684.62±615.37 *	37.65±7.40	7.10±1.29	42.63±7.07 *
Static stage	12	1 890.58±630.25 #	39.94±7.11	7.25±1.26	43.99±5.50 *

*：$P<0.01$，*vs* control；#：$P<0.01$，*vs* active stage

2.2 CTLA4Ig 在进行期银屑病 PBMC 增殖反应中的作用

2.2.1 镜下形态观察　光镜下，PHA、LPS 刺激组中随 CTLA4Ig 浓度增高，进行期银屑病 PBMC 增殖数量逐渐减少，细胞集落逐渐变小；而 SEB 组中 CTLA4Ig 浓度低于 5 μg/ml 时，细胞集落及母细胞化现象无明显差别，高于此浓度，增殖可被完全抑制。

2.2.2 ^{3}H-TdR 掺入试验　PHA、LPS 与 CTLA4Ig 共同作用于进行期银屑病 PBMC 时，随 CTLA4Ig 浓度的增加，SI 逐渐降低；当 CTLA4Ig 终浓度高于 10 μg/ml 时，SI 低于空白水平。SEB 与 CTLA4Ig 共同刺激下，CTLA4Ig 终浓度高于 5 μg/ml 时，SI 低于空白水平；低于此浓度则全无作用，见表 2。

表 2 CTLA4Ig 与刺激因子作用下进行期银屑病 PBMC 增殖反应（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Active psoriatic PBMC proliferation induced by stimulating factors and CTLA4Ig（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	SI with different concentrations of CTLA4Ig (μg/ml)				
		0	1.25	2.5	5	10
PHA	21	37.65±7.40	19.03±5.72 *	8.10±2.61 *	0.80±0.64 *	0.38±0.27 *
LPS	21	7.10±1.29	3.28±1.05 *	1.39±0.37 *	0.61±0.27 *	0.20±0.09 *
SEB	21	42.63±7.07	47.71±6.38	42.97±6.70	0.83±0.54 *	0.43±0.23 *

*：$P<0.01$，*vs* group without CTLA4Ig

3 讨论

银屑病的病因与发病机制尚未完全明确，但免疫功能异常是一个重要因素。临床上经常见到产生超抗原性毒素的金黄色葡萄球菌、链球菌的咽部或皮肤感染会诱发银屑病发病或加重病情，因此超抗原在银屑病发病中所起的作用成为近年来关注的焦点。SEB 被证实可体外选择性刺激银屑病患者体内特定 V_βT 细胞[4]。Yamamoto 等[5]应用 SEB 反复注射免疫缺陷鼠皮下，可以诱导其产生银屑病样损害。我们证实 SEB 可以在体外诱导银屑病患者 PBMC 明显增殖。

本实验中 SEB 刺激下进行期和静止期银屑病组 PBMC 增殖明显强于正常对照组，而 PHA 不具有选择 TCR 可变成分的特性，故其刺激银屑病组与正常人间无明显差异，这与国外许多学者的研究结果相符[6]。LPS 作为 B 细胞丝裂原，其作用则明显弱于 PHA、SEB。

T 细胞克隆增殖需要细胞因子（IL-2 等）的维持。共刺激信号中 CD28 与 B7 结合后，单独作用就可使 IL-2 的产生增加几十倍；而阻断其它共刺激信号，并不能阻止 T 细胞的激活，故而共刺激信号中，CD28/CTLA4 起着关键作用。对自身免疫性疾病以及移植排斥反应，纠正其免疫过激状态是治疗的关键[7]。在发现 CTLA4 具有负性免疫调节作用之后，于 1991 年合成了

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CTLA4Ig, 这种可溶性蛋白与 B7 的结合力比 CD28Ig 与 B7 的结合力强 20 倍, 故可采用 CTLA4Ig 竞争结合 B7 分子, 阻断共刺激信号通路[8]。

本研究结果提示共刺激通路在 T 细胞激活中是必需的, CTLA4Ig 可以封闭共刺激通路, 抑制进行期银屑病 PBMC 增殖。PHA、LPS 刺激下, CTLA4Ig 浓度越高, 抑制作用越强, 且可以完全抑制。在 SEB 刺激下, CTLA4Ig 必须达到一定浓度才起完全抑制作用, 无梯度变化, 故对 SEB 抑制作用中, CTLA4Ig 浓度的选择是关键, 这可能与 SEB 超抗原特性有关。不单是对进行期银屑病 PBMC 的增殖有抑制作用, 现已有许多报道利用 CTLA4Ig 治疗自身免疫性疾病, 如系统性红斑狼疮[9]、重症肌无力等; 以及移植排斥反应, 如异种胰岛移植、皮肤移植等, 都有一定的效果。CTLA4Ig 通过阻断共刺激通路, 绕过了特异性抗原, 对不同疾病中始发的 T 细胞激活均应有抑制作用, 故而其治疗作用可能具有普遍性, 在临床上有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Slavik J M, Hutchcroft J E, Bierer B E. CD28/CTLA4 and CD80/CD86 families: signaling and function[J]. Immunol Res, 1999, 19(1): 1—24.

[2] Taylor P A, Lees C J, Fournier S, *et al*. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA4 ligation *via* R-T interactions [J]. J Immunol, 2004, 172(1): 34—39.

[3] Kita Y, Ii X K, Nogimura H, *et al*. Prolonged graft survival induced by CTLA4Ig gene transfection in rat lung allografting[J]. Transplantation Proceedings, 2003, 35(1): 456—457.

[4] Choi Y W, Herman A, DiGiusto D, *et al*. Residues of the variable region of the T-cell-receptor beta-chain that interact with S. aureus toxin superantigens[J]. Nature, 1990, 346(6283): 471—473.

[5] Yamamoto T, Matsuuchi M, Katayama I, *et al*. Repeated subcutaneous injection of staphylococcal enterotoxin B stimulated lymphocytes retains epidermal thickness of psoriatic skin graft onto severe combined immunodeficient mice[J]. J Dermatol Sci, 1998, 17(1): 8—14.

[6] Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Peripheral blood mononuclear cell proliferative response against staphylococcal superantigens in patients with psoriasis arthropathy[J]. Eur J Dermatol, 1999, 9(1): 17—21.

[7] Lee R S, Rusche J R, Maloney M E, *et al*. CTLA4Ig-induced linked regulation of allogeneic T cell responses [J]. Transplantation Proceedings, 2001, 33(1): 88—89.

[8] 杨世昕, 吴　军, 卞修武, 等. CTLA4Ig 基因表达对鼠皮肤移植免疫抑制作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 759—761.

[9] Zandman G G, Shoenfeld Y. Novel approaches to therapy for systemic lupus erythematosus[J]. Eur J Inter Med, 2000, 11(3): 130—134.

(编辑　郭建秀)

(上接 331 页)

表 **1**　银质针灸治疗 **89** 例软组织损害性下腰痛的疗效

疾病分类	例数	显效	有效	无效	有效率(%)
(A) 急性损伤演变	38	17	10	11	71.05 **
(B) 慢性过劳损伤	34	16	6	12	64.70 *
(C) 肌纤维织炎	17	3	2	12	29.41
总数	89	36	18	35	66.67

显效: 无痛, 无板机点与肌僵、肌痉挛; 有效: 痛减, 体征部分改善; 无效: 痛与体征无改善; *: $P<0.05$, *vs* (C) ($\chi^2=4.34$), **: $P<0.01$, *vs* (C) ($\chi^2=6.75$)

3　讨论

软组织损害的患者在下腰部, 甚至臀、腿部易有顽固性疼痛。文献[3,4]报道, 上述病理包括局部无菌性炎症, 微循环淤阻、疤痕、肌腱张力增加等。目前的诸多保守疗法可能暂时缓解疼痛。软组织损害性腰腿痛是数 10 年前, 中国上海 1 名骨科医生首先提出。他认为软组织损害性无菌性炎症是产生颈、肩、背和腿痛的重要原因。因此, 他发展了一套软组织松解外科手术[2]。随后, 银质针灸用于代替外科手术。银质针灸疗法实际是银针和灸法的结合。灸的温度在尾部、皮肤外体部、针尖部分别为 100°、55°、40°。银质针灸较一般针刺有以下优点: ①针体长, 是以达深部病损。②粗的针体可预防断针或滞针。③银质针体可塑性好, 可潜行分离病变。④银质导热性好, 传导灸热效果好。⑤治疗基于因病理解剖定位而非经络。过去, 超过 10 000 例患者接受银质针灸。有效率达 90%。该治疗方法在中国已有很多医院应用, 其效应包括针刺和灸热作用。阻断软组织损害的病理变化, 改善局部循环, 软组织重新正常修复, 这些可能是银质针灸是代替手术抑痛的主要机制。

根报道, 银质针灸疗法对腰突症患者的腰部与臀部肉软组织长期处于痉挛缺血, 收缩无力状态, 也具有明显的松解作用, 从而使血供得到改善, 最终达到消炎止痛恢复肌肉和神经机能之目的。当然, 如传统针灸, 银质针灸也能刺激中枢神经系统分泌吗啡类, 5-HT 等物质, 抑制 P 物质等, 发挥抑痛效能[3,5]。

肌纤维组织炎可能有更复杂的病理改变所以银质针灸对此疗效不好。

关键词: 银质针灸; 软组织损害; 疼痛

中图法分类号: R246　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 宣蛰人. 软组织外科构成, 现状与展望[A]. 见: 宣蛰人 主编. 软组织外科理论与实践[M]. 北京: 人民军医出版社, 1994. 1.

[2] 毕　胜, 王福根. 人体软组织疼痛点的病理学进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 1998, 6(40): 12.

[3] 吴　峻, 沈蓉蓉. 火针治疗慢性软组织损伤的实验研究[J]. 中国针灸, 2002, 1(3): 32.

[4] 归良桢, 王炳森. 椎管内软组织损害的组织病理学观察[J]. 中华病理学杂志, 1984, 1: 30.

[5] 王福根, 江红平, 王素平. 银质针治疗腰突症的临床肌电图观察[J]. 中国疼痛医学杂志, 1999, 5(6): 197.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net