DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.032
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
692 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0692-03

抗天疱疮抗体阻断棘层松解的实验研究

刁庆春,李 渝,钟白玉,王 鲁 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 研究抗天疱疮抗体对天疱疮抗体致棘层松解的阻断作用,探讨天疱疮治疗的新途径。方法 制备出小鼠抗天疱疮抗体,在体外天疱疮器官培养模型上,采用病理学及直接免疫荧光技术,观察不同浓度及时相抗天疱疮抗体对天疱疮抗体致棘层松解的阻断效果。结果 抗天疱疮抗体在体外与天疱疮抗体结合后,能有效地减少天疱疮抗体与角质形成细胞的结合,小剂量时能减轻天疱疮抗体致棘层松解的程度,大剂量时则能基本阻断棘层松解的发生。结论 抗天疱疮抗体与天疱疮抗体结合后能有效地减轻或阻断棘层松解的发生。

关键词:天疱疮;抗体;棘层松解
中图法分类号:R392.11;R753.202 文献标识码:A

Experimental study on the block of acantholysis by anti-pemphigus antibody *in vitro*

DIAO Qing-chun, LI Yu, ZHONG Bai-yu, WANG Lu (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the blocking effect of anti-pemphigus antibodies on acantholysis for finding a new way to treat pemphigus. **Methods** Mouse anti-PAb antibody was prepared and added into the organ culture model *in vitro*. The blocking effect of anti-PAb antibod against acantholysis in different concentrations and times was observed by routine pathological and direct immunofluoresence. **Results** After binding with pemphigus antibody, the anti-PAb antibody could reduce the binding of PAb to keratinocyte. The antibody could decrease the degree of acantholysis in low concentration and could almost block the occrurence of acantholysis in high concentration. **Conclusion** The anti-PAb antibodies can reduce or block the acantholysis effectively.

Key words: pemphigus; antibody; acantholysis

天疱疮是由于患者血清中存在的自身抗体与表皮细胞间相应抗原结合,导致棘层细胞松解(Acantholysis)致病[1]。关于天疱疮抗体(Pemphigus antibodies, PAb)致棘层松解作用的实验研究已有较多报道,但尚未见抗PAb抗体对PAb致棘层松解阻断作用方面的研究,我们初步制备了抗PAb的多克隆抗体,在体外天疱疮器官培养模型上观察了其对PAb致棘层松解的阻断作用,为天疱疮的发病机制及治疗新途径的探讨提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 天疱疮病人血清 取自1例经临床、病理和免疫病理确诊为活动期的泛发性寻常型天疱疮患者。经血浆置换疗法得到该病人的血浆,冻存备用。

1.1.2 培养基 DMEM为美国GIBCO公司产品,小牛血清购自华西医科大学,按常规配制。

1.1.3 兔抗人IgG荧光抗体 武汉生物制品研究所。

1.2 方法

1.2.1 提取、纯化PAb 用硫酸铵盐析法和DEAE-32纤维素(Whatman产品)层析法纯化PAb,再分别用IIF和紫外分光光度计检测PAb滴度及浓度。按上述方法采正常人血清提取IgG作阴性对照。

1.2.2 抗PAb抗体的制备 首次免疫用天疱疮抗体10 μg与福氏完全佐剂0.1 ml(含卡介苗0.1 mg)混合乳化后皮下多点及腹腔内注射BALB/c小鼠,加强免疫为每2周1次,共3次,每次为天疱疮抗体5 μg加福氏不完全佐剂0.1 ml腹腔内注射,末次加强免疫后1周取血,收集血清冻存并测抗体效价。对照抗血清用正常人IgG免疫BALB/c小鼠,方法同前。

1.2.3 抗PAb抗体纯化 硫酸铵盐析法及DEAE-32纤维素层析法纯化抗PAb抗体及对照组抗体,测抗体效价,紫外分光光度计测蛋白浓度。

1.2.4 体外PAb和抗PAb抗体中和试验 将浓度为0.5、1、2、4 mg/ml的抗PAb抗体分别加入1 mg/ml PAb中,室温反应2 h后,用IIF检测PAb滴度,同时用PAb进行倍比稀释作阳性对照。

1.2.5 建立天疱疮器官模型(改良Schiltz方法)[2] 取环切后的正常包皮,无菌条件下D-Hanks液冲洗,切除皮下组织并尽量剪除部分真皮组织,余下的表皮制成4 mm×4 mm大小皮片,置于拭镜纸上,在24孔培养板中培养,每孔加2 ml细胞培养液。在不同时相加入不同浓度的PAb建立天疱疮器官模型。阴性对照采用抗正常人IgG的小鼠抗体。

1.2.6 天疱疮器官培养模型上抗PAb抗体对PAb致棘层松解的阻断试验 PAb为1 mg/ml,抗PAb抗体为0.5 mg/ml和4 mg/ml,分为6个时相:PAb和抗PAb抗体反应2 h后加入模型中、PAb和抗PAb抗体同时加入模型中、PAb分别作用表皮0.5、2、12、18 h后再加入抗PAb抗体。均培养24、48、72 h后进行组织病理学检查。

结果判定标准:①组织病理结果:-:组织病理无变化;+:轻微裂隙;2+:轻度棘层松解;3+:典型棘层松解,表皮内

作者简介:刁庆春(1963-),男,安徽省含山县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事皮肤病理方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68754491

收稿日期:2000-11-20;修回日期:2001-04-05

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

水疱形成; 4+: 典型棘层松解, 表皮内水疱形成, 部分或全部表皮脱失。②DIF、IIF 结果: −: 无荧光; ±: 部分细胞膜见微弱荧光; +: 细胞膜见弱荧光; 2+: 细胞膜可见明亮的荧光; 3+: 细胞膜上可见耀眼的荧光。

2　结果

2.1　天疱疮抗体纯化

经临床血浆交换出的血浆, 以正常人包皮做底物进行 IIF 测定, 其滴度为 1∶640, 显示表皮棘层细胞间线状、均一的亮绿色荧光图形, 角质层不染色。抗体纯化后紫外分光光度计测其蛋白浓度为 11.98 mg/ml, 调整蛋白浓度为 1 mg/ml, IIF 检测 PAb 滴度为 1∶640。

2.2　抗天疱疮抗体的制备

用纯化的天疱疮抗体 PAb 制备并纯化抗 PAb 抗体, 紫外分光光度计测蛋白浓度为 3.521 26 mg/ml, 浓缩后调整蛋白浓度为 10 mg/ml, 并用生理盐水透析平衡。抗正常人 IgG 抗体的制备同上。

2.3　抗天疱疮抗体中和试验

PAb 和抗 PAb 抗体的体外中和试验的 IIF 观察结果见表 1, 阴性对照用正常人 IgG 制备的抗体。

表 1　1 mg/ml PAb 和抗 PAb 抗体体外中和试验的 IIF 检测结果

Tab 1　Anti-PAb Antibody IIF results of 1 mg/ml PAb neutralizaed by *in vitro*

PAb	Anti-PAb Antibody				Negative Control
1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	1 mg/ml
Original solution	2+	2+	+	−	4+
1∶10	+	+	−	−	4+
1∶20	+	−	−	−	3+
1∶40	−	−	−	−	3+

随着抗 PAb 抗体浓度的增大, PAb 作用表皮的荧光强度逐渐减弱。阴性对照抗正常人 IgG 抗体对天疱疮抗体的 IIF 结果无影响。

2.4　抗 PAb 抗体对天疱疮器官培养模型棘层松解的阻断试验

在−2 h 时相(即加入天疱疮抗体制造天疱疮器官模型前 2 h 加入抗 PAb 抗体), 小剂量抗 PAb 抗体组(0.5 mg/ml)能使培养表皮棘层松解程度明显减轻, 见图 1, 大剂量抗 PAb 抗体(4 mg/ml)组能基本阻断棘层松解的发生, 见图 2; 在 0~18 h 时相(即加入天疱疮抗体同时至 18 h 后加入抗 PAb 抗体), 大小剂量组对棘层松解程度明显无影响, 见图 3, 见表 2、3。

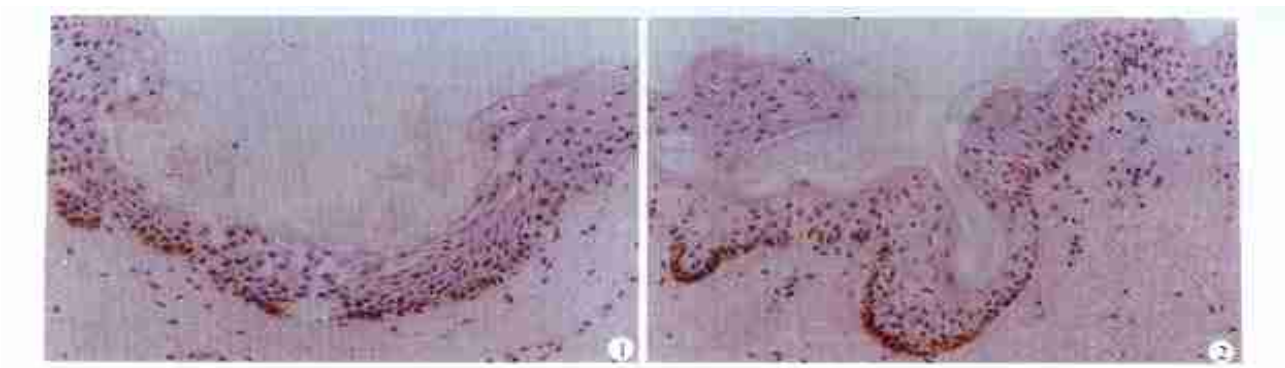


图 1　加入 **PAb** 前 **2 h** 加入 **0.5 mg/ml** 抗 **PAb** 抗体, 培养 **48 h**, 可见轻度棘层松解　(HE× 200)

Fig 1　Slight acantholysis　0.5 mg/ml Anti-PAb antibody was added in the culture medium 2 h and before adding PAb co-cultured for 48 h　(HE× 200)

图 2　加入 **PAb** 前 **2 h** 加入 **4 mg/ml** 抗 **PAb** 抗体, 培养 **48 h**, 无棘层松解　(HE× 200)

Fig 2　No acantholysis　4 mg/ml Anti-PAb antibody was added in the culture medium 2 h before adding PAb and co-cultured for 48 h　(HE× 200)

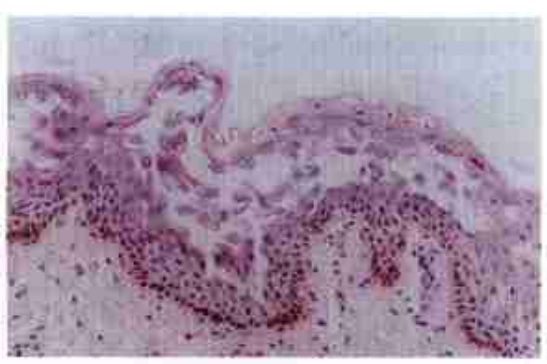


图 3　**PAb** 与 **0.5 mg/ml** 抗 **PAb** 抗体同时加入培养基, 培养 **48 h**, 可见明显棘层松解　(HE× 200)

Fig 3　Marked acantholysis　PAb and 0.5 mg/ml Anti-PAb antibody were added in the culture medium and were co-cultured for 48 h　(HE× 200)

表 2　0.5 mg/ml 抗 PAb 抗体阻断 1 mg/ml PAb 致棘层松解的组织病理观察结果

Tab 2　Histopathological results of 0.5 mg/ml Anti-PAb antibody blocking acantholysis caused by 1 mg/ml PAb

Culture time after addition of PAb	Time of PAb addition					
	−2 h	0 h	0.5 h	2 h	12 h	18 h
24 h	−	−	−	−	+	+
48 h	+	3+	3+	2+	4+	3+
72 h	+	4+	4+	4+	4+	4+

阴性对照: 各时相点加入的相同浓度抗正常人 IgG 抗体对天疱疮棘层松解作用无影响。

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

表3 4 mg/ml 抗 PAb 抗体阻断 1 mg/ml PAb 致棘层松解的组织病理观察结果

Tab 3 Histopathological results of 4 mg/ml Anti-PAb antibody blocking acantholysis caused by 1 mg/ml PAb

Culture time after addition of PAb	Time of PAb addition					
	−2 h	0 h	0.5 h	2 h	12 h	18 h
24 h	−	−	−	−	+	+
48 h	−	4+	3+	3+	3+	3+
72 h	−	4+	4+	4+	4+	4+

3 讨论

天疱疮是一个典型的抗体介导的自身免疫性疾病，临床表现为水疱、大疱。天疱疮抗体是直接引起表皮棘层松解从而出现水疱、大疱的直接原因。天疱疮抗体致病过程相对单一，其致病过程不需要补体成分参与，这就为在抗体三级水平上研究和探讨天疱疮抗体的免疫调控并用于临床提供了可能性。张春明等[3]曾进行了天疱疮抗独特型单克隆抗体的研究，制备了一株抗 PAb 单克隆抗体 PI1，通过免疫荧光竞争抑制试验和 ELISA 中和试验证明该抗体能干扰 PAb 与抗原的结合，进一步发现该单抗为抗 PAb IgG4 的单克隆抗体[4]。有研究表明天疱疮抗体 IgG4 亚类可能是天疱疮的致病性抗体[5,6]，李渝等[7]进一步研究证实 PAb 的所有 IgG 亚类都有致病性，但 IgG4 与抗原亲和力较强。我们设想通过制备抗 PAb 抗体，阻断 PAb 与天疱疮抗原结合，消除天疱疮致病的关键因素，为将抗 PAb 抗体用于临床治疗提供一定实验依据，为此我们进行了抗 PAb 抗体与 PAb 作用的体外中和试验及在器官培养模型上的阻断试验。

将抗 PAb 抗体分为小剂量组(0.5 mg/ml)及大剂量组(4 mg/ml)，与 PAb 体外中和试验的 IIF 检测结果显示：小剂量组抗 PAb 抗体能中和部分 PAb，使后者在 IIF 检测中荧光强度减弱，但并不能完全阻断 PAb 与细胞表面抗原的结合；大剂量组按 PAb 抗体与 PAb 反应后，IIF 检测 PAb 不能致表皮细胞间出现荧光染色，提示该剂量组的抗 PAb 能完全阻断 PAb 与表皮细胞的结合。

进一步用同样浓度的抗 PAb 抗体对 PAb 致培养表皮棘层松解作用进行阻断试验：①PAb 与抗 PAb 抗体预先孵育 2 h 后再加入培养液中，当抗 PAb 抗体为 4 mg/ml 时，培养表皮 48 h 时未未出现棘层松解，72 h 时有轻度棘层松解，提示大剂量的抗 PAb 抗体中和有效中和及阻断 PAb 所致棘层松解；当抗 PAb 抗体为 0.5 mg/ml 时，48 h 即可观察到棘层松解，但程度较轻，72 h 观察到有明显棘层松解。②PAb 与抗 PAb 抗体未预先孵育，并同时加入培养液中，两个剂量组的抗 PAb 抗体均不能阻断 PAb 致培养表皮棘层松解的发生，且棘层松解程度与 1 mg/ml PAb 致培养表皮病理改变程度比较，无明显减轻。③将 PAb 预先作用表皮 0.5～18 h 后再加入抗 PAb 抗体，结果基本同②。由于天疱疮抗体与抗原能很快结合但棘层松解发生的一般在 24 h 以后发生，因此在 PAb 预先作用于表皮后再加入抗 PAb 抗体就不能阻断棘层松解的发生，抗 PAb 抗体阻断棘层松解作用的有效发挥要在 PAb 与天疱疮抗原结合之前。

天疱疮的病情严重程度与患者血中 PAb 水平的高低呈正相关[8]，如能有效降低天疱疮病人血中 PAb 水平就可达到有效治疗的目的。从我们的观察结果看出，抗 PAb 抗体在器官培养模型上虽然不能直接阻断 PAb 致培养表皮发生棘层松解，但可中和 PAb，从而有效地阻断进一步的棘层松解作用的发生，这为今后的天疱疮治疗及调节提供了一个新的途径。天疱疮是一个慢性病程的疾病，从粘膜出现病损到皮肤出现病变常需数月或更长时间的病程演变过程，最初许多寻常型天疱疮(PV)患者血中只出现抗与粘膜组织有较强亲和力的抗原决定簇抗体，使患者出现粘膜病变，随后免疫反应才扩散到其它的抗原决定簇[9]，使粘膜型 PV 发展为泛发性 PV，才出现皮肤病变。因此可以设想在病情较轻，如病变仅处于粘膜病变时，即用抗粘膜特异性抗原表位的抗体来中和相应 PAb，使病变不发展为泛发性 PV。这方面的研究还有待于进一步探讨。

参考文献：

[1] Stanley J R. Pemphigus and pemphigoid as paradigms of organ-specific, autoantibody-mediated disease[J]. J Clin Invest, 1989, 83(5): 1 443－1 448.

[2] Schiltz J R, Michel B. Production of acantholysis on normal human skin *in vitro* by the IgG fraction from pemphigus serum[J]. J Invest Dermatol, 1976, 67(2): 254－260.

[3] 张春明, 刁庆春, 叶庆俏. 天疱疮抗独特型单克隆抗体的研制和鉴定[J]. 中华皮肤科杂志, 1996, 29(4): 229－231.

[4] 杨卫兵, 刁庆春, 叶庆俏. 天疱疮抗体的纯化与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(2): 134－136.

[5] Tremeau M C, Oksman F, Bazex J. Immunoglobulin G subclass distribution of anti-intercellular substance antibodies in pemphigus[J]. Ann Dermatol Venerol, 1995, 122(6－7): 409－411.

[6] Emery D J, Diaz L A, Fairley J A, *et al*. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1[J]. J Invest Dermatol, 1995, 104(3): 323－328.

[7] 李 渝, 刁庆春, 王 鲁, 等. 天疱疮抗体亚类在天疱疮发病中的作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33(4): 219－221.

[8] 刁庆春, 刘荣卿, 唐书谦. 天疱疮、类天疱疮自身抗体检测的临床意义[J]. 中华皮肤科杂志, 1988, 21(5): 283－285.

[9] Ding X, Valeria Aoki, Jose M, *et al*. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles[J]. J Invest Dermatol, 1997, 109(4): 592－596.

(编辑 薛国文)

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