

·论 著·

痤疮患者中Toll样受体的表达及其与IL-8和IL-12水平的相关性

房晶晶,陈辉,吴海娟,谢梅珍

惠州市皮肤病医院,广东 惠州 516001

摘要:目的 探讨Toll样受体2(TLR2)在痤疮发病中的作用及其可能的机制。方法 收集I~IV级不同严重程度痤疮患者各35例,应用流式细胞术检测其外周血CD14⁺单核细胞(PBM)TLR2的表达,同时采用双抗体酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清IL-8、IL-12水平。另取35例正常人作为对照组。结果 各组痤疮患者外周血单核细胞表面TLR2的表达均显著高于正常人对照组($P<0.01$),各组患者血清中IL-8和IL-12的水平也显著高于正常人对照组($P<0.01$)。各组患者TLR2的表达与IL-8呈正相关(r 分别为0.452、0.583、0.735、0.648, $P<0.05$),与IL-12水平亦呈正相关(r 分别为0.365、0.493、0.526、0.461, $P<0.05$)。痤疮严重程度与TLR2的表达呈正相关($r=0.325$, $P<0.05$),与IL-8水平呈正相关($r=0.426$, $P<0.05$),与IL-12水平也呈正相关性($r=0.627$, $P<0.05$)。结论 TLR2的表达水平和炎症因子的分泌与痤疮严重程度相关,TLR2的表达在痤疮的发生和发展中起重要作用。

关键词:痤疮;Toll样受体;白细胞介素8;白细胞介素12

中图分类号:R758.73⁺3 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2014)5-590-03

Expression of TLR2 in peripheral blood mononuclear cells and correlation with IL-8 and IL-12 levels in acne patients with different severity

FANG Jing-jing, CHEN Hui, WU Hai-juan, et al.

Huizhou Municipal Dermatology Hospital, Huizhou 516001, Guangdong, P. R. China

Abstract:Objective To explore the role and possible mechanism of Toll like receptor 2(TLR2)in the pathogenesis of acne. **Methods** Flow cytometry was performed to detect the expression of TLR2 on peripheral blood CD14⁺ monocytes in 35 normal controls and four groups of acne patients including 35 cases in each group, according to the severity, levels of IL-8 and IL-12 in sera were also measured by double antibody sandwich ELISA. **Results** A significant increase was observed in the expression of TLR2 in peripheral blood CD14⁺ monocytes and the level of IL-8 and IL-12 in serum of each patient group compared with the normal controls ($P<0.01$). The expression of TLR2 was positively correlated with the level of IL-8 ($r=0.452$, 0.583 , 0.735 , 0.648 , $P<0.05$) and IL-12 ($r=0.365$, 0.493 , 0.526 , 0.461 , $P<0.05$) in the four patient groups. The severity degree of acne was positively correlated with the expression of TLR2 ($r=0.325$, $P<0.05$), the level of IL-8 ($r=0.426$, $P<0.05$) and IL-12 ($r=0.627$, $P<0.05$). **Conclusions** The expression of TLR2 and the secretion of IL-8 and IL-12 is related to the severity of acne and the expression of TLR2 plays a critical role in the occurrence and development of acne.

Key words: Acne; Toll-like receptors; Interleukin-8; Interleukin-12

痤疮是一种常见的累及毛囊皮脂腺的损容性皮肤病,其发病机制主要包括以下四个方面:毛囊漏斗部上皮细胞异常的角化过度、皮脂腺分泌过度、丙酸杆菌定植和机体的炎症反应。临床症状表现为面、胸、背部的粉刺、炎性丘疹、脓疱和严重的炎症性囊肿。但是引起痤疮粉刺形成和继发性炎症发展的具体机制仍然有待确定。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是存在于哺乳类动物细胞表面、负责信号传导的跨膜受体,通过特异地识别病原微生物进化中保守的抗原分子,即病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),从而有效地诱发起机体免疫应答反应,是联系天然免疫与获得性免疫的重要分子^[1]。近年来的研究发现痤疮丙酸杆菌通过TLR活化,从而释放细胞因子引起炎症^[2]。我们通过分析不同严重程度痤疮患者外周血单核细胞(Periph-

eral blood mononuclear cells, PBM)表面TLR2表达水平与血清IL-8、IL-12浓度相关性,探讨痤疮免疫状态及与疾病严重程度的关系。

1 资料和方法

1.1 病例资料、试剂和设备

1.1.1 病例 选择2010年5月~2012年5月在惠州市皮肤医院门诊就诊治疗的痤疮患者140例,年龄20~30岁,平均年龄24岁,男女不限,病程3个月~12年。按严重程度分为I~IV组,每组35例,诊断符合《中国临床皮肤病学》^[3]的诊断标准,且严重程度符合国际改良分级法中I~IV级痤疮。具有下列任一条件者不纳入研究范围:1)自身免疫性疾病患者;2)近2个月内系统及局部使用维A酸类、糖皮质激素等药物者;3)药物性、职业性及经期前痤疮者;4)合并其它病毒、细菌等感染或其它重大疾病。另取本院正常

体检者35例作为正常对照组,具有下列条件之一者不列入研究范围:1)自身免疫性疾病患者;2)合并其它病毒、细菌等感染或其它重大疾病。本实验经本院伦理委员会审核通过,研究对象均签署知情同意书。痤疮患者组与正常对照组之间在性别、年龄等方面差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.1.2 主要试剂和设备 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD14抗体,藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗人TLR2抗体及其同型对照鼠抗人IgG抗体,1×红细胞裂解液,均购自美国eBioscience公司;FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司;IL-8的ELISA试剂盒、IL-12的ELISA试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 研究对象均于早晨空腹时采肘静脉血5mL,其中3mL全血置于肝素抗凝管中,4℃冰箱保存,待流式细胞仪检测;另2mL置于消毒的试管中,低温离心15 min(2 500 r/min),吸取上清液,置-20℃冰箱保存待检。

1.2.2 外周血CD14⁺单核细胞TLR2表达检测 在3支样品测定管中分别加入相应抗体CD14-FITC, IgG1-FITC/IgG2a-PE, CD14-FITC/TLR2-FITC 20μL;在每管中加入抗凝血100μL,振荡混匀,室温避光孵育20min;加入2mL的溶血素,振荡混匀,室温避光5min后以1 000r/min离心5min;弃上清,加入PBS 2mL, 1 000r/min离心5min;弃上清,加入PBS 300μL混匀。应用BD FACSCalibur流式细胞分析仪上机检测;同时设不加标记抗体的阴性对照管。上机前以标准荧光微球调整仪器的变异系数并稳定在2%以内。上机后收集10 000个细胞/管,荧光强度以对数放大,光散射数据存软盘。测试结束后用CellQuest软件检测,以CD14及TLR2抗体染色双阳性细胞百分率记录TLR2的表达率。

1.2.3 血清IL-8及IL-12的检测 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.3 统计学分析 实验测定的计量资料数值用($\bar{x} \pm s$)表示。数据用SPSS13.0统计软件包进行分析,组间均数比较采用 t 检验,方差不齐,选用近似 t 检验结果。等级相关采用Spearman分析,用直线相关分析法处理指标间的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血CD14⁺单核细胞TLR2的表达 四组不同严重程度痤疮患者TLR2表达均高于正常对照组($P_{均}<0.01$)。痤疮严重程度与TLR2的表达呈正相关性($r=0.325, P<0.05$),结果见表1。

表1 I ~ IV级痤疮患者与对照组CD14⁺单核细胞TLR2表达的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of TLR2 on PBM between I ~ IV groups of acne patients and normal control ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 Group | 例数 No. cases | TLR2 (%) | t 值 t value |
|--------------------|--------------|--------------|-----------------|
| 痤疮组 Acne patients | | | |
| I级 | 35 | 40.57±5.81 | 6.721 |
| II级 | 35 | 62.38±8.91 | 8.935 |
| III级 | 35 | 83.52±11.93 | 11.472 |
| IV级 | 35 | 102.72±14.67 | 13.583 |
| 对照组 Normal control | 35 | 26.38±6.39 | |

2.2 血清IL-8及IL-12水平检测 I ~ IV级不同严重程度痤疮患者血清IL-8及IL-12水平均显著高于对照组(P 均 <0.01)。痤疮严重程度与IL-8水平呈正相关性($r=0.426, P<0.05$),与IL-12水平也呈正相关性($r=0.627, P<0.05$),见表2。

表2 I ~ IV级痤疮患者与对照组血清IL-8、IL-12水平的比较(ng/L)

Table 2 Comparison of serum level of IL-8, IL-12 between I ~ IV groups of acne patients and normal control (ng/L)

| 组别 Group | 例数 No. cases | IL-8 | t 值 t value | IL-12 | t 值 t value |
|--------------------|--------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| 痤疮组 Acne patients | | | | | |
| I级 | 35 | 28.73±6.32 | 5.925 | 39.35±6.96 | 5.369 |
| II级 | 35 | 43.74±7.63 | 9.284 | 56.64±8.27 | 8.927 |
| III级 | 35 | 58.59±9.28 | 12.375 | 64.85±9.45 | 11.673 |
| IV级 | 35 | 72.37±11.32 | 16.934 | 89.36±10.91 | 13.961 |
| 对照组 Normal control | 35 | 14.38±3.29 | | 24.72±5.62 | |

2.3 血清IL-8及IL-12水平与TLR2表达的相关性分析 I ~ IV级痤疮患者TLR2水平与IL-8水平呈正相关, r 分别为0.452、0.583、0.735、0.648; I ~ IV级痤疮患者TLR2水平与IL-12水平亦呈正相关, P 分别为0.365、0.493、0.526、0.461($P<0.05$)。

3 讨论

痤疮的发病机制是多方面的,包括了激素水平、微生物及机体免疫反应的相互作用。其中丙酸痤疮杆菌参与了粉刺的诱导形成及痤疮炎症阶段,但其引起炎症的分子机制仍然不明确。TLR最初发现于果蝇胚胎,是一类重要的分子识别受体,其中TLR2是表达部位最多且识别病原体种类最多的蛋白。TLR2主要分布在包括巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞等宿主防御相关细胞,与获得性免疫和天然免疫密切相关。近年来的研究提示痤疮丙酸杆菌通过TLR2依赖