

自身免疫性慢性荨麻疹患者外周血单个核细胞 TLR7 的表达和意义

刘军连¹, 徐冰心², 王晓菲², 杜海平¹, 刘建军¹, 刘志国², 司少艳^{2*}

1 解放军第 306 医院皮肤科 (北京 100101); 2 解放军第 306 医院特种医学实验研究中心

摘要:目的 检测自身免疫性慢性荨麻疹 (AIU) 患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 Toll 样受体 7 (TLR7) mRNA 与蛋白的表达, 探讨 AIU 的发病机制。

方法 采集 AIU 患者 30 例与正常对照组 30 例外周血, 淋巴细胞分离液分离 PBMCs, 提取 RNA, 采用实时荧光定量逆转录 PCR 检测 TLR7 mRNA 表达; 采用免疫荧光染色、流式细胞仪检测 PBMCs 中 TLR7 蛋白的表达。 **结果** 与正常对照组相比, AIU 患者 PBMCs 中 TLR7 mRNA 的表达无差异 ($p>0.05$); 蛋白表达增强, 差异有统计学意义 ($p<0.05$)。 **结论** AIU 患者 PBMCs 中 TLR7 蛋白表达增强, TLR7 可能在 AIU 的发病中起作用。

关键词:慢性荨麻疹; Toll 样受体 7; 自身免疫性慢性荨麻疹; 表达

The Expression and Significance of TLR7 in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Autoimmune Chronic Urticaria

LIU Jun-lian, XU Bing-xin, WANG Xiao-fei

Department of Dermatology, 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

中图分类号: R758.24; R593.11; R446.61

文献标识码: A

基金: 国家自然科学基金 (30872284、81071402)

作者简介: 刘军连 (1968-), 男, 山东成武县人, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 皮肤免疫学和性病。

通讯作者: 司少艳

收稿日期: 2014-06-23

Abstract:Objective To investigate the expression of TLR7 mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with autoimmune chronic urticaria (AIU) and to explore the immunology mechanism of AIU. **Methods** PBMCs from 30 patients with AIU and 30 normal controls were separated by Ficoll-Hypaque Solution. The expression of TLR7 mRNA and protein were detected respectively by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and by flow-cytometric analysis. **Results** The results showed that, as compared to normal controls, the expression of TLR7 protein in PBMCs of patients with AIU significantly increased ($P < 0.05$), but there was no difference ($P > 0.05$) in the expression of TLR7 mRNA. **Conclusions** The expression of TLR7 increases in patients with AIU, and the findings suggest that TLR7 may play roles in the pathogenesis of AIU.

Key words:Chronic urticaria; Toll-like receptor 7; Autoimmune chronic urticaria; Expression

自身免疫性慢性荨麻疹 (autoimmune chronic urticaria, AIU) 是慢性荨麻疹的一种特殊类型, 占慢性荨麻疹患者的 30%~50%, 临床表现较其他慢性荨麻疹更为迁延、顽固, 治疗效果差^[1, 2]。AIU 发病是由于自身抗体诱发肥大细胞

和嗜碱性粒细胞活化释放组胺而引发 I 型变态反应，发病以自身免疫机制为基础^[2]。目前研究发现，AIU 的发病除了自身抗体介导的 I 型变态反应外，在机体的早期致敏及炎症的发生发展中有固有免疫系统的参与^[3, 4]。

固有免疫保护宿主免受病原体的侵害，通过表达在固有免疫细胞膜上和膜内的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)，识别病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)，激活下游信号通路，诱发固有免疫反应，调节获得性免疫反应，在机体的过敏、抗病原体感染、慢性炎症的发生发展中发挥作用^[5]。目前研究最为广泛的 PRR 是 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 家族，其中 TLR7 是研究的热点。现已证实，TLR7 在多种过敏性和自身免疫性疾病的发病中起作用^[5]。为探讨 TLR7 在 AIU 发病中的作用，本研究检测了 AIU 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中 TLR7 mRNA 和蛋白水平的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 来自2013年1月~12月北京解放军第306医院皮肤科门诊诊断为AIU患者30例，其中男14例，女16例，年龄21~53岁，平均(30±9.4)岁；诊断符合欧洲过敏与临床免疫学会 (EAACI) 制定的诊断标准^[6]。入选标准：① 皮肤粘膜表面复发性风团，持续时间不超过24 h；② 每周发作不少于2次；③ 病程超过6周；④ 排除了食物、药物等过敏原，无感染病灶；⑤ 排除了寒冷性荨麻疹、胆碱能性荨麻疹和人工荨麻疹等物理性荨麻疹及荨麻疹性血管炎；⑥ 1周内未使用抗组胺药物、皮质类固醇激素及免疫抑制剂；⑦ 自体血清皮肤试验阳性或强阳性。正常对照组来自门诊健康志愿者30例，其中男19例，女11例，

年龄23~46岁，平均（29.1±5.28）岁，入选标准：① 无荨麻疹、哮喘等过敏性疾病病史；② 无过敏性疾病家族史；③ 无器质性疾患；④ 自体血清皮肤试验阴性。两组在性别、年龄等方面无显著性差异，具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准，所有受试者签署知情同意书。

1.1.2 引物 根据 GenBank 中人的 TLR7、 β -actin cDNA 核苷酸序列，应用 Primers5 引物设计软件设计引物。TLR7 cDNA 序列的正向引物 F：5'-CCCCATTTCTTGTGCGCCG -3'，反向引物 R：5'- ACCATCTTGGGGGCACATGCT -3'，扩增片段 132bp； β -actin cDNA 序列的正向引物 F：5'-GGCTGCTTCCAGCTCCTCCC -3'，反向引物 R：5'- AAGAGTGCCTCAGGGCAGCG -3'，扩增片段 99bp。

1.1.3 主要试剂 人淋巴细胞分离液（天津灏洋生物制品科技有限责任公司），Trizol Reagent（美国Invitrogen公司），cDNA反转录试剂盒（日本TaKaRa生物工程公司），荧光定量PCR试剂盒（美国Promega公司），荧光标记的抗人APC-CD14抗体（美国eBioscience公司），荧光标记的抗人TLR7抗体（美国abcam公司）。

1.2 方法

1.2.1 血清及PBMCs标本的制备 所有患者清晨空腹常规静脉抽血，一份抽取外周血2 mL放入无菌含肝素试管中，制备血清，即刻行自体血清皮肤试验；一份抽取外周血10 mL放入无菌EDTA抗凝试管中，Ficoll密度梯度离心分离PBMCs，用于TLR7 mRNA和蛋白的检测。

1.2.2 自体血清皮肤试验 参考文献^[7]进行。具体步骤：取上述血清50 μ L，用皮试针头注入该被抽血者的前臂屈侧真皮内。同时，用等量生理盐水注入对

侧真皮内，作为对照。30 min后观察结果。结果判定标准：血清侧风团直径小于对侧5 mm，或者潮红、红斑小于对侧10 mm为阴性。风团直径大于对侧5 mm，或者潮红、红斑大于对侧10 mm为阳性；风团直径大于对侧10 mm，或者潮红、红斑大于对侧15 mm为强阳性。

1.2.3 PBMCs中TLR7 mRNA的表达 采用Trizol提取AIU组与正常对照组PBMCs的总RNA，测定其浓度。按照cDNA反转录试剂盒对总RNA进行逆转录，反应合成cDNA。然后按荧光定量PCR试剂盒说明书进行PCR扩增。以cDNA为模板，PCR反应体系中加入SYBR® Green染料以及不同引物，进行实时荧光定量PCR反应，PCR扩增条件：95℃预变性5 min，进行40个循环，包括95℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，72℃充分延伸5 min。每个样本设立2个平行孔，取平均Ct值，结果按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算倍数。并对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，观察所扩增条带的特异性。

1.2.4 PBMCs 中 TLR7 蛋白的表达 PBS 重悬分离的细胞，调整 PBMCs 浓度为 $(0.5\sim1)\times10^7/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液，加入 APC-CD14，室温避光 20 min，PBS 洗涤 1 次，加入破膜剂，室温避光 20 min。PBS 洗涤 2 次，加入 FITC-TLR7，室温避光 30 min。缓冲液与 PBS 分别洗涤 1 次，多聚甲醛固定，4℃ 避光待测。采用 FACS Calibur 型流式细胞仪，检测分析结果，用平均荧光强度表示 TLR7 蛋白的表达水平。

1.2.5 统计分析 用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析，实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用两独立样本 t 检验， $p<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBMCs 中 TLR7 mRNA 的表达 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果显示，所扩增产物与预期大小一致的唯一一条带，表明所扩增产物的特异性（图 1）。采用实

时荧光定量逆转录 PCR 测得 AIU 患者 PBMCs 中 TLR7 mRNA 的表达水平低于正常对照组，分别为 0.038 ± 0.027 和 0.045 ± 0.033 ，但两组间差异无统计学意义（ $t=0.899$ ， $p>0.05$ ，图 2）。

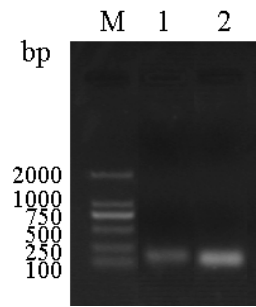


图 1 荧光定量 PCR 产物凝胶电泳图

M: DL2000 DNA marker; 1: TLR7; 2: β -actin

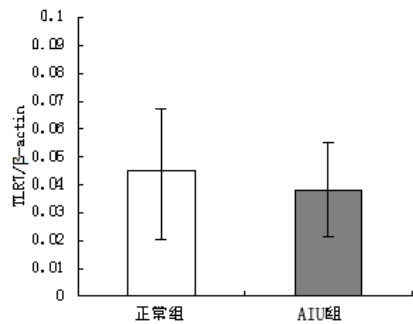


图 2 正常组与 AIU 组 PBMCs 中 TLR7 mRNA 的表达

2.2 PBMCs 中 TLR7 蛋白的表达 AIU 患者 PBMCs 中 TLR7 蛋白的表达水平高于正常对照组，分别为 21.92 ± 4.97 和 15.24 ± 4.02 ，具有统计学意义（ $t=5.724$ ， $p<0.05$ ，图 3）。图 4 示 CD14⁺单核细胞中 TLR7 阳性细胞的平均荧光强度。

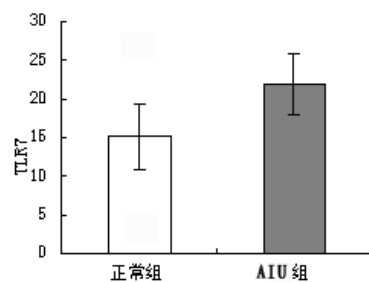


图3 正常组与AIU组PBMCs中TLR7蛋白的表达

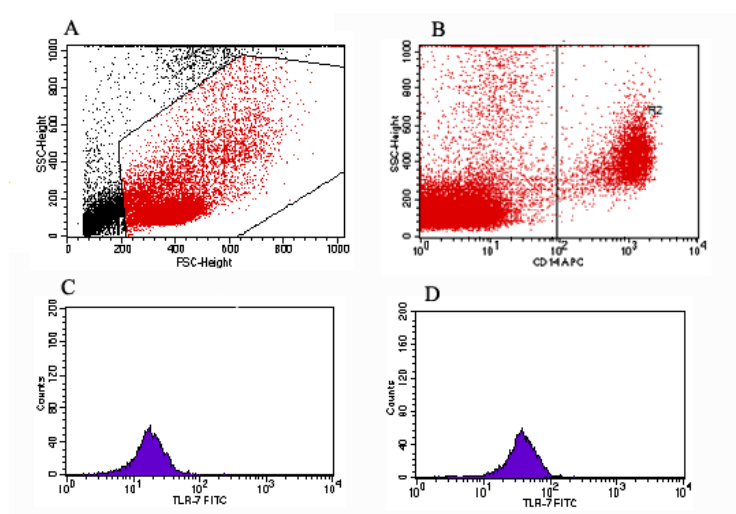


图4 CD14⁺单核细胞中TLR7 阳性细胞百分率

- A: 圈定PBMCs进行分析; B: PBMCs中以CD14⁺ 细胞设门进行分析;
C: 正常组CD14⁺TLR7⁺ 细胞; D: AIU组CD14⁺TLR7⁺ 细胞;

3 讨论

研究表明, AIU 患者血清中存在抗高亲和力 IgE 受体 (Fc ϵ RI) 抗体或抗 IgE 抗体, 这些抗体是引起 AIU 的自身抗体。抗 Fc ϵ RI 抗体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 Fc 受体结合, 或抗 IgE 抗体与已经结合在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 IgE 结合, 可产生类似抗原与 IgE 结合同样的受体交联效应, 通过酪氨酸激酶和家族蛋白酪氨酸激酶胞内信号转导途径激活肥大细胞和嗜碱性

粒细胞，引起肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒释放组胺和白三烯等炎症介质，造成血管扩张，管壁通透性增加，液体渗出，真皮水肿^[1, 2]。

TLRs 在 AIU 发病中的作用还不清楚，相关研究报道较少。Futata 等^[8]研究发现，慢性荨麻疹患者外周血分离出的 PBMCs 经 TLR9 配体诱导 8 h，RT-PCR 检测 TLR9 mRNA 表达显著降低，IFN- α 分泌减少，提示慢性荨麻疹患者存在 TLR9 信号通路的缺损。最新研究发现，Fc ϵ RI 以三聚体 $\alpha 2 \gamma$ 形式表达于外周血单核细胞、皮肤表皮朗格汉斯细胞、树突状细胞表面^[9]。TLR9 配体通过抑制树突状细胞表面 Fc ϵ RI 表达，抑制 IgE 与 Fc ϵ RI 结合，刺激树突状细胞分泌大量 IFN- α 与 IFN- β ^[9]。单核细胞表面的 Fc ϵ RI 与 IgE 结合后，抑制 TLR2 与配体识别结合和刺激单核细胞分泌细胞因子，表皮朗格汉斯细胞表面的 TLR2 与金黄色葡萄球菌的成分识别结合后，下调 Fc ϵ RI 的表达^[10]。以上研究结果提示：TLR2 与 TLR9 可能通过调节 Fc ϵ RI 的表达在以抗 Fc ϵ RI 抗体介导的过敏性和自身免疫性疾病中发挥作用。

TLR7 与 TLR9 均表达于肥大细胞和嗜碱性粒细胞等多种固有免疫细胞的胞浆内，可以识别自身和外来的核酸，介导固有免疫细胞与初始 T 细胞聚集，调节获得性免疫反应，在多种过敏性和自身免疫性疾病的发生发展中起重要作用^[5, 11]。本研究结果显示：与正常对照组相比，AIU 患者 PBMCs 中 TLR7 mRNA 的表达无差异 ($p>0.05$)；蛋白表达增强，差异有统计学意义 ($p>0.05$)。结果提示：TLR7 可能在 AIU 的发病中起作用。但 TLR7 是否与 TLR9 一样，通过调节 Fc ϵ RI 的表达在 AIU 的发病中发挥作用，有待于进一步研究。结果也表明，AIU 患者 TLR7 蛋白升高主要发生在翻译水平，而不是转录水平。

综上所述，AIU 患者 PBMCs 中 TLR7 的表达增强，TLR7 可能在 AIU 的发病中

起作用，同类研究尚未见报道。本研究为探讨 TLR7 在 AIU 发病机制中的作用提供了实验依据，为进一步 AIU 的治疗奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘冰. 慢性荨麻疹患者影响其生活质量的相关因素分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(4):503-504.
- [2] Saini SS. Chronic spontaneous urticaria: etiology and pathogenesis[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2014, 34(1):33-52.
- [3] Azor MH, Dos Santos JC, Futata EA, et al. Statin effects on regulatory and proinflammatory factors in chronic idiopathic urticaria[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 166(2):291-298.
- [4] 宋志强, 钟华, 郝飞. 自身免疫性慢性荨麻疹的诊治[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6(2):88-91.
- [5] Khan KN, Kitajima M, Fujishita A, et al. Toll-like receptor system and endometriosis[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2013, 39(8):1281-1292.
- [6] Zuberbier T, Asero R, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO guideline: definition, classification and diagnosis of urticaria[J]. Allergy, 2009, 64(10):1417-1426.
- [7] 何晓蕾, 雷铁池, 刘小明, 等. 自体血清皮肤试验对诊断慢性荨麻疹的临床意义[J]. 中华皮肤科杂志, 2012, 45(1):6-8.
- [8] Futata E, Azor M, Dos Santos J, et al. Impaired IFN- α secretion by plasmacytoid dendritic cells induced by TLR9 activation in chronic

- idiopathic urticaria[J]. Br J Dermatol, 2011, 164(6):1271-1279.
- [9] Novak N, Bieber T. Fc ϵ RI-Toll-like receptor interaction in atopic dermatitis[J]. Curr Probl Dermatol, 2011, 41(1):47-53.
- [10] Koch S, Leib N, Bedorf J, et al. TLR2 down-regulates Fc ϵ RI and its transcription factor PU.1 in human Langerhans cells[J]. Allergy, 2013, 68(5):621-628.
- [11] Terhorst D, Kalali BN, Ollert MR, et al. The Role of Toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases[J]. Am J Clin Dermatol, 2010, 11(1):1-10.