

掌跖脓疱病患者皮损糖皮质激素受体 α 和 β 表达的研究

杜 明 王丽梅 王久江 党瑞英 王红斌

(河北工程大学附属医院 河北 邯郸 056002)

摘要 目的: 为了解掌跖脓疱病患者皮损中 GR 表达情况, 我们利用免疫组化方法检测患者皮损和正常皮肤标本中 GR- α 和 GR- β 的表达, 从而探讨其表达在发病中的作用。**方法:** 选择 25 例临床诊断为掌跖脓疱病患者皮损, 26 例外科手术切取的健康皮肤作为正常对照。用免疫组化 SP 法(链酶卵白素-过氧化物酶法)检测掌跖脓疱病患者皮损与正常对照组皮肤 GR- α 、GR- β 的表达数量和强度。**结果:** 两组 GR- α 表达无显著差异, 患者组 GR- β 表达阳性率及强度明显高于对照组。**结论:** GR- β 在掌跖脓疱病的发病过程中起重要作用。

关键词: 糖皮质激素受体 α ; 糖皮质激素受体 β ; 掌跖脓疱病

中图分类号: R751 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011) 21-4084-03

The Expression of GR α and GR β in the Lesion of Pustulosis Palmaris et Plantaris

DU Ming, WANG Li-mei, WANG Jiu-jiang, DANG Rui-ying, WANG Hong-bin
(The Affiliated Hospital of Hebei engineering college, Hebei Handan 056002)

ABSTRACT Objective: In order to understand the role and significance of the GR expressions in Pustulosis Palmaris et Plantaris skin lesions, we investigated the expressions of GR α and GR β with immunohistochemistry method on the healthy skin and patients. **Method:** The twenty-five resistant patients with Pustulosis Palmaris et Plantaris were enrolled into this study. The twenty-six healthy adult's skin was treated as controls, which were taken from skin of head by operation. Immunohistochemistry SP method (streptavidin-peroxidase technique) was used to detect the intensity and quantity of the GR expression in the patients group and normal control group. **Results:** The expression of GR- α showed no obvious difference between the two groups. Whereas the positive rate and intensity of GR- β was higher in patients group than control group. **Conclusions:** GR- β plays an important role in the pathologic progress of pustulosis Palmaris et plantaris.

Key words: GR(glucocorticoid receptor) - α ; GR- β ; Pustulosis Palmaris et Plantaris

Chinese Library Classification(CLC): R751 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4084-03

掌跖脓疱病(Pustulosis Palmaris et Plantaris)是一种病因未明的慢性复发性皮肤病, 好发于掌跖部位, 典型皮损表现为红斑基础上深在性无菌性小脓疱, 伴角化、脱屑, 该病易复发, 难以彻底治愈。为了解这类患者皮损中糖皮质激素受体 (GR) 的表达, 探讨其在发病机制中的意义, 我们利用免疫组化方法检测患者及正常皮肤标本皮损中 GR- α 和 GR- β 在表皮各层细胞中的表达。

1 材料与方法

1.1 临床资料

经临床及病理诊断为掌跖脓疱病^[1]的患者 25 例。男 18 例, 女 7 例, 年龄最大 40 岁, 最小 23 岁, 平均年龄 34.33 ± 11.06 岁。正常对照组中, 男 19 例, 女 7 例, 年龄最大 42 岁, 最小 22 岁, 平均年龄 35.25 ± 12.65 岁。

1.2 正常对照组入选标准

所有正常皮肤均为患者在局部麻醉下经由外科手术切取的多余皮肤, 染色组织切片镜下观察无病理变化, 并且年龄、性

别与实验组相匹配。

1.3 标本取材
所有皮损组织均为 2007 年 6 月 -2010 年 6 月本院确诊的存档蜡块。

1.4 所需仪器及药品
石蜡切片机: 德国 LEICA RM2135; 光学显微镜、显微摄像系统: 日本 OLYMPUS;
冰冻切片机: 德国 LEICA; 荧光显微镜: 日本 OLYMPUS;
电热恒温培养箱: 上海国光医化仪器厂。

主要实验试剂 (天津宇基生物技术有限公司): 鼠抗人 GR- α 单克隆抗体; 鼠抗人 GR- β 单克隆抗体; SP 免疫组化系列工作液试剂盒; DAB 显色液;

1.5 实验方法
1.5.1 免疫组化染色 SP 法, 具体步骤如下 1) 石蜡标本常规 $4\mu\text{m}$ 连续切片, 平铺于涂有 APES 的载玻片上, 放于 60°C 烤箱 4 小时。2) 浸入二甲苯 I、II 脱蜡各 10 分钟。3) 100% 、 90% 、 70% 梯度酒精各 5 分钟, 自来水冲洗, 蒸馏水 3 分钟。4) $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 中室温孵育 15~20 分钟, 以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水 3 分钟 $\times$ 3 次, 0.01M PBS 5 分钟。5) 抗原修复: GR- α 、GR- β 采用枸橼酸盐缓冲液, MMP-2 采用 $\text{pH}=8$ 的

作者简介: 杜明, 男, 44 岁, 医学博士, 皮肤科副主任, 主要从事皮肤科诊疗工作
(收稿日期: 2011-02-28 接受日期: 2011-03-30)

EDTA 修复液,水浴加热法进行抗原修复。从室温缓慢加热到 92℃~98℃后计时 20 分钟,室温冷却 30 分钟,放入 PBS 内 10 分钟。6) 吸去余液,擦净玻片。滴加 5% 正常山羊血清封闭,37℃湿盒内孵育 40 分钟。7) 倾去血清,滴加一抗 (均为工作液),4℃过夜。8) 0.01M PBS 冲洗,5 分钟× 3 次。9) 滴加第二代生物素标记的二抗工作液,37℃湿盒内孵育 25 分钟。10) 0.01M PBS 冲洗,5 分钟× 3 次。11) 滴加第二代辣根酶标记链酶卵白素工作液,37℃湿盒内孵育 25 分钟。12) 0.01M PBS 冲洗,5 分钟× 3 次。13) DAB 液显色。14) 苏木素轻度复染,常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。显微镜下观察。实验设有阳性对照,作为质量控制标准;同时设正常皮肤组织为正常对照组。

1.5.2 免疫组化法检测 GR-α、GR-β 结果的判定 1) 表皮各层细胞 GR-α、GR-β 阳性细胞数量比例检测方法:GR-α、GR-β 阳性表达为胞浆和胞核成较均匀的棕黄色染色,以 "+" 表示。阴性结果为不着色,以 "-" 表示^[2]。低倍镜下在皮损处选择阳性细胞最密集背景最清晰的 5 个区域,每个区域在高倍镜下计算每 100 个细胞中阳性细胞数比例,最后计算 5 个区域中阳性细胞比例的平均值作为该标本 GR-α、GR-β 阳性细胞的数量比例。2) 表皮各层细胞 GR-α、GR-β 表达强度的评定办法:根据表皮细胞中阳性呈色细胞数量比例和染色强度半定量表示如下:(1) 细胞呈浅棕色为 1 分,细胞呈棕色为 2 分,细胞呈棕褐色为 3 分;(2) 呈色细胞数量比例≤ 10% 为 1 分,呈色细胞数量比例 10~50% 为 2 分,呈色细胞数量比例≥ 50% 为 3

分。(3) 以上两项相加等于 2~3 分为弱阳性(+),大于 3 分小于等于 4 分为阳性(++),大于 4 分为强阳性(+++)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.5 进行 One-Way ANOVA LSD 计量资料分析和 Fisher 精确概率法计数资料分析。以 P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 性别和年龄分布

患者组,男 18 例,女 7 例,年龄最大 40 岁,最小 23 岁,平均年龄 34.33± 11.06 岁。正常对照组中,男 19 例,女 7 例,年龄最大 42 岁,最小 22 岁,平均年龄 35.25± 12.65 岁。治疗抵抗组、正常对照组之间比较年龄差异无显著性(P>0.05)。

2.2 GR 表达部位

患者组、正常对照组的表皮各层中 GR 阳性细胞分布基本相同。

2.3 GR 在表皮中表达强度

患者组、正常对照组的表皮各层细胞中 GR-β 表达强度不相同。详见表 1。

2.4 GR 在表皮中表达数量

治疗抵抗组、正常对照组的表皮各层细胞中 GR-β 表达数量不相同。详见表 2。

3 讨论

Table1 Expression of GR-α and GR-β in the lesion with different response ($\bar{x} \pm s$, score)

Group	GR-α	GR-β
P	3.82± 1.36	5.71± 1.08
Normal	3.92± 1.27	3.53± 0.67 [#]

Note: Compare with GCR, #P<0.05

One-Way Analysis of Variance

Table 2 Expression of GR-α and GR-β in the lesion with proportion(%)

Group	Expression of GR-α	Expression of GR-β
P	28.20± 1.36	39.06± 1.56
Normal	25.22± 1.43	21.33± 1.46 [#]

Note: Compare with GCR, #P<0.01

Fisher Analysis of Enumeration data

P: 患者组; Normal: 正常对照组

掌跖脓疱病是发生在掌跖部位的慢性复发性皮肤病,目前该病因尚不明确。发病与精神、神经、免疫、内分泌等多系统功能失调有关。Camp 关于 " 脓疱型银屑病 " 最新分类中,把掌跖脓疱病归属于局限性脓疱型银屑病^[2]。好发年龄在 30~60 岁,女性多于男性。临床上以红斑基础上反复发生深在无菌性小脓疱,伴有角化、脱屑、中度或严重瘙痒为特征。国内外研究表明银屑病属于心身疾病范畴^[3-4],精神紧张等应激状态常诱发或加重银屑病患者病情。已经证实应激时人体内糖皮质激素受体 (GR) 数量减少^[5,6],使体内的糖皮质激素 (GC) 不能有效的发

挥其抗炎作用^[4,5],从而诱发或加重某些炎症性疾病。但目前尚未有关于糖皮质激素受体亚型表达的研究。

糖皮质激素 (GC) 是由肾上腺皮质束状分泌的类固醇类内分泌激素,有重要的生理学作用。GC 可以通过与糖皮质激素受体 (GR) 高亲和力的结合及产生促进抗炎性多肽而有抗炎作用。超生理剂量的 GC 有免疫抑制作用,其免疫抑制作用主要是通过抑制 T 淋巴细胞的激活和淋巴因子的产生介导^[7]。临床已广泛用于自身免疫性疾病的治疗。现已证实,GC 在体内主要与其受体 (GR) 特异性结合才能发挥作用。GR 属于核受体超家族的一个亚家族,所有有核细胞表达相当数量的 GR,所以 GC

在代谢、分化及发育等方面表现出广泛的生物学作用。

在本试验中患者组、正常对照组的表皮细胞中均有 GR 阳性表达细胞。GR- α 在表皮表达较为广泛,本实验中 GR- α 患者组与正常对照组之间无差异 ($P>0.05$)。GR- β 在患者组与正常对照组中的表达强度及数量均具有显著意义 ($P<0.05$),提示 GR 两种亚型之间表达比例的失衡也可能是导致 GC 不能有效发挥其作用,反馈性引起下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 分泌。同时,应激也可引起下丘脑 CRH mRNA 的表达增强^[6],国外学者证实 CRH 可以刺激肥大细胞脱颗粒,刺激白细胞产生 IL-1, IL-2, 刺激淋巴细胞增生,增加 IL-2 受体在淋巴细胞的表达,促进炎症反应^[8,9]。这样,在患者体内一方面是 CRH 促进炎症反应^[12,13],一方面是 GC 不能有效发挥其抗炎作用^[10,11],从而诱发或加重免疫性炎症反应的发生,掌跖脓疱病的病理过程可能与 GR 两种亚型之间表达比例的失衡相关。

参考文献 (References)

- [1] 靳培英. 皮肤病药物治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004,173-174
Jin Peiying. Pharmacotherapy of dermatosis [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004.173-174
- [2] 郑捷, 潘萌, 李卫平, 康向东, 薛峰. 重组寻常性天疱疮抗原 EC1-2 和 EC3-4 表位的临床应用 [A]. 2002 中国中西医结合皮肤性病学学术会议论文汇编[C]. 2002 年
Zheng Jie, Pan Meng, Li Weiping, Kang Xiangdong, Xue Feng. Clinical Application of Recombination of Pemphigus Vulgaris Antigen Epitope EC1-2 and Epitope 3-4 [A]. 2002 Traditional Chinese Medicine-Western Medicine Integrating Institute Dermatology & Venereal Disease Conference Proceeding [C]. 2002
- [3] 王刚, 高天文, 刘玉峰. 脓疱性银屑病分类进展[J]. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(3): 184-185
Wang Gang, Gao Tianwen, Liu Yufeng. Progress of Classification of Pustular Psoriasis [J]. Chinese Journal of Dermatology, 2004, 37(3): 184-185
- [4] Ginsberg ZH. Psychophysiological aspects of psoriasis [J]. Dermatol Clin, 1995; 13(5): 793-803
- [5] Yang XQ, Peng DH, Xu CS, Xu LM, Li YL. Analysis of character and emotion of psoriatic patient [J]. Zhonghua Pifuke Za-zhi (Chin J Dermatol), 1991; 24(1): 33-34
- [6] Xu RB. Changes of GR after stress and shock and the receptor mechanism of treating shock with high dose of GC [J]. Jichu Yixue Yu Linchuang (Basi Med Sci Clin), 1998; 18(1): 5-10
- [7] Han LF, Xiao HS, Chen JZ. The expression of c-fos and CRF mRNA in hypothalamus of rats after infrasound exposure [J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 1999; 20(1): 1-3
- [8] Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of CRH in vivo [J]. Science, 1991; 254(5): 421-423
- [9] 杜明. 大疱性类天疱疮皮损糖皮质激素受体 α 和 β 表达的研究 [D]. 河北医科大学; 2006, 22(10): 886-888
Du Ming. A study on expression of Glucocorticoid receptor- and Glucocorticoid receptor- β in bullous pemphigoid skin lesion [D]. Hebei Medical University, 2006, 22(10): 886-888
- [10] 刘宇健, 宋亮年, 李保春, 卢建. 激素抵抗型肾病综合征患者外周血白细胞中糖皮质激素受体 β mRNA 的表达 [J]. 中华内科杂志, 2001, 40(11): 725-728
Liu Yujian, Song Liangnian, Li Baochun, Lu Jian. The expression of Glucocorticoid Receptor- β mRNA in peripheral blood white blood cell of steroid-resistant nephrotic syndrome patients [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2001, 40(11): 725-728
- [11] 赵辨. 临床皮肤病学 (第 3 版) [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 784
Zhao Bian. clinical dermatology (third edition) [M]. Nanjing: Jiangsu science and technology press, 2001: 784
- [12] Neeck G, Kluter A, Dotzlaw H, et al. Involvement of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 966: 491-495
- [13] Bumstein KI, Cidlowski JA. The down side of glucocorticoid receptor regulation [J]. Mol Cell Endocrinol, 1992, 83(1): 1-8
- [14] Spuls PI, Brakman M, Westerhof W, et al. Treatment of generalized bullous pemphigoid with topical corticosteroids [J]. Acta Derm Venereol, 1995, 75 (1): 89
- [15] Eggert M, Kluter A, Rusch D, et al. Expression analysis of the glucocorticoid receptor and the nuclear factor-KB subunit P50 in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. J Rheumatol, 2002, 29(12): 2500-2506