

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001802

Periostin/TSLP 在慢性瘙痒患者皮肤组织中的表达研究

柯美玲¹, 余维华¹, 蔡涛², 茹丽艳¹, 付雪³, 王峡³

(1. 重庆医科大学神经科学中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400016;

3. 重庆医科大学附属第一医院老年病科, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过分析慢性瘙痒患者皮损区病理变化,研究骨膜蛋白(peripostin)和胸腺基质淋巴蛋白(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)在慢性瘙痒中的作用。**方法:**收集 2014 年 12 月至 2016 年 12 月 42 例皮肤瘙痒超过 6 周的患者皮损组织和 23 例正常人的皮肤标本。用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色检测患者皮肤组织病理结构的变化。用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色检测皮肤组织中 periostin 和 TSLP 的表达。比较 2 组间表皮增厚程度以及 periostin、TSLP 蛋白表达水平的差异。**结果:**HE 染色结果显示,与对照组相比,患者皮损处表皮明显增厚 $[(477.70 \pm 14.89) \mu\text{m} \text{ vs. } (94.28 \pm 6.58) \mu\text{m}, t=40.800, P=0.000]$,角质层角化不全伴角化过度,同时真皮内可见炎症细胞浸润。IHC 染色显示,与对照组相比,慢性瘙痒组 periostin $[(7.33 \pm 3.20) \text{ vs. } (0.65 \pm 0.65), t=13.060, P=0.000]$ 和 TSLP $[(8.48 \pm 2.60) \text{ vs. } (0.61 \pm 0.66), t=18.580, P=0.000]$ 的表达量均明显增高。Periostin 在皮损组织中主要表达于真皮层、毛囊外和皮脂腺外,而 TSLP 主要表达于表皮层、毛囊内部和皮脂腺内部。**结论:**Periostin/TSLP 介导的 II 型辅助性 T 细胞(T help cell 2, Th2)型免疫应答参与慢性瘙痒的发生发展过程。

【关键词】银屑病;慢性瘙痒;骨膜蛋白;胸腺基质淋巴蛋白**【中图分类号】**R758.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-03

Expressions of periostin and TSLP in the skin of patients with chronic pruritus

Ke Meiling¹, Yu Weihua¹, Cai Tao², Ru Liyan¹, Fu Xue³, Wang Xia³

(1. Centre of Neuroscience, Chongqing Medical University;

2. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

3. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the roles of periostin and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in chronic pruritus by analyzing the pathological changes of the skin lesions. **Methods:** Samples of skin lesions from 42 patients with skin pruritus over 6 weeks and samples of normal skin from 23 general persons were collected from December 2014 to December 2016. The histopathological changes of the samples were detected by the hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expressions of periostin and TSLP in skin tissues by the immunohistochemistry (IHC). Then the thickness of epidermis and the expressions of periostin and TSLP were compared between the two groups. **Results:** HE staining showed that the epidermis in patients thickened significantly compared with that in the control $[(477.70 \pm 14.89) \mu\text{m} \text{ vs. } (94.28 \pm 6.58) \mu\text{m}, t=40.800, P=0.000]$. In skin lesion samples, parakeratosis and hyperkeratosis were observed in the stratum corneum, and the infiltration of the inflammatory cells was observed in the dermis. IHC staining showed that the expressions of periostin and TSLP in chronic pruritus group were significantly higher than those in the control group respectively $[(7.33 \pm 3.20) \text{ vs. } (0.65 \pm 0.65), t=13.060, P=0.000]$ and $[(8.48 \pm 2.60) \text{ vs. } (0.61 \pm 0.66), t=18.580, P=0.000]$. Specifically, periostin was mainly expressed in the dermis, outside of the hair follicles and sebaceous glands, while TSLP was mainly expressed in the epidermis, inside of the hair follicles and sebaceous glands. **Conclusion:** Periostin/TSLP-mediated T help cell 2 (Th2) type immune response is involved in the pathogenesis and development of chronic pruritus.

【Key words】 psoriasis; chronic pruritus; periostin; thymic stromal lymphopoietin

作者介绍: 柯美玲, Email: 1142465192@qq.com,

研究方向: 慢性瘙痒的发病机制。

通信作者: 余维华, Email: 359127112@qq.com。

基金项目: 重庆市研究生科研创新资助项目(编号: CYS16119)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180703.1914.008.html>

(2018-07-04)

瘙痒是一种能引起抓挠欲望的不愉快的皮肤感觉^[1]。依据时间可分为急性瘙痒和慢性瘙痒,慢性瘙痒定义为持续 6 周以上的瘙痒^[2]。慢性瘙痒症是 1 种常见的皮肤疾病综合征,可见于银屑病、特应性皮炎等^[3]皮肤原发性疾病。德国 1 项 4 500 人的横断面研究显示,慢性瘙痒症患病率为 13.5%,12 个月患病率为 16.4%,而终生患病率高达 22.0%^[4]。瘙痒因其反复发作、病程长的特点,严重影响患者的工作和日常生活^[5],目前临床上缺乏能够完全治愈或者有效控制慢性瘙痒疾病的药物^[6],因此期望通过研究慢性瘙痒患者皮肤组织蛋白的异常表达,为慢性瘙痒的治疗提供新的理论基础。据报道,免疫 T 细胞通过调控神经炎症反应,参与瘙痒的病理发展^[7]。研究证实,Ⅱ型辅助性 T 细胞(T help cell 2,Th2)型占优势的 Th1/Th2 免疫失衡是特应性皮炎、支气管哮喘等反应性疾病的一个重要机制^[8-9]。因此,免疫机制尤其是 Th2 免疫应答可能与慢性瘙痒的发生有关。研究发现,骨膜蛋白(periostin)作为 1 种分泌蛋白可以刺激皮肤角质细胞产生胸腺基质淋巴蛋白(thymic stromal lymphopoietin,TSLP)启动 Th2 免疫应答^[10]。因此,periostin 和 TSLP 在 Th2 免疫反应中发挥重要作用。本实验研究 periostin/TSLP 介导的 Th2 免疫应答在慢性瘙痒中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验标本

收集 2014 年 12 月至 2016 年 12 月于重庆医科大学附属第一医院皮肤科门诊诊治的、病程超过 6 周、炎症性皮肤病引起的慢性瘙痒患者 42 例(男性 29 例,女性 13 例);年龄(43.88 ± 17.59)岁;瘙痒部位如图 1 所示。经病理诊断证实,银屑病患者 14 例,慢性皮炎患者 24 例,亚急性皮炎患者 4 例。同时收集 23 例对照样本(男性 15 例,女性 8 例);年龄

(48.57 ± 17.27)岁。取得的皮肤组织标本浸泡于 4%多聚甲醛溶液进行固定,常规脱水后经石蜡包埋、切片、捞片、贴片、烘干后,制作成厚度为 10 μm 的石蜡切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining,HE)染色和免疫组化(immunohistochemistry,IHC)染色。本研究符合作者所在单位人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准,且取得患者知情同意。

1.2 HE 染色法检测皮肤组织结构的变化

石蜡切片经常规脱蜡、水化后,用枸橼酸盐缓冲液在 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中进行抗原修复 30 min,自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)漂洗 5 min $\times$ 3 次。3%双氧水去过氧化物酶 10 min,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。进行 HE 染色:苏木精滴染 10 min,自来水冲洗 1 min;1%盐酸酒精分化 10 s,自来水冲洗 1 min;饱和碳酸锂复蓝 1 min,自来水冲洗 1 min;伊红染色 1 min,自来水冲洗 1 min。最后经梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片后镜下观察。

1.3 IHC 染色法检测 periostin 和 TSLP 的表达

IHC 实验中,组织切片处理步骤均同前。一抗分别为兔抗 periostin 抗体(ab152099,Abcam,1:100)和兔抗 TSLP 抗体(ab188766,Abcam,1:100),对照组用 PBS,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。第 2 天于 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 40 min,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,所用试剂均来源于 IHC 两步法试剂盒(SV0002,Boster),最后用 3,3'-四盐酸二氨基联苯胺镜下显色,常规苏木素复染后脱水、透明、封片。结果评估采用组织学评分法^[11],评分指标为阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱。以出现黄色颗粒状沉积为阳性。A.先按阳性细胞百分比评分:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞总数 1%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,76%~100%为 4 分;B.再按细胞着色强度分为:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。A、B 两项相乘即为其免疫组化评分,得分越高,阳性表达程度越强。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对各组数据进行统计分析。数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间计量资料比较采用两独立样本 t 检验;多组间计量资料比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。



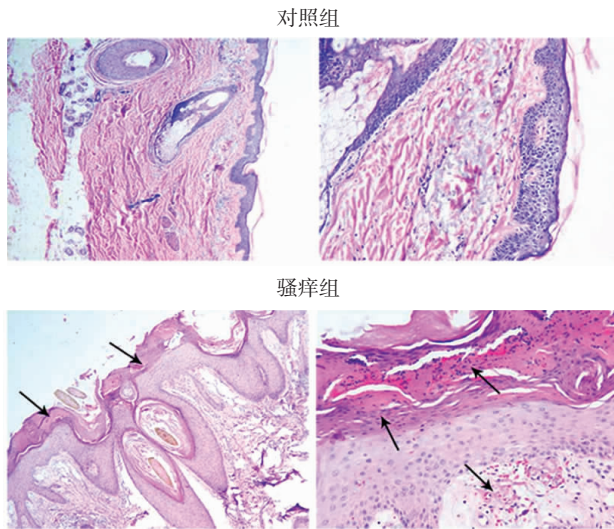
黑色箭头表示患病部位

图 1 患者皮损部位

2 结果

2.1 皮损区病理结构的变化

HE 染色可见患者皮损处表皮增厚(图 2),与对照组相比其表皮增厚程度[477.70 ± 14.89 μm vs. (94.28 ± 6.58) μm , $t=40.80$, $P=0.000$],有统计学意义(图 3)。同时患者皮肤角质层内出现带核的角质细胞(黑色箭头),证实有角化不全伴角化过度的现象,并可见在真皮部分有炎性细胞浸润(黑色箭头)。



黑色箭头表示患者皮损处表皮增厚,角化不全伴角化过度,真核细胞浸润

图 2 患者皮损处病理结构变化

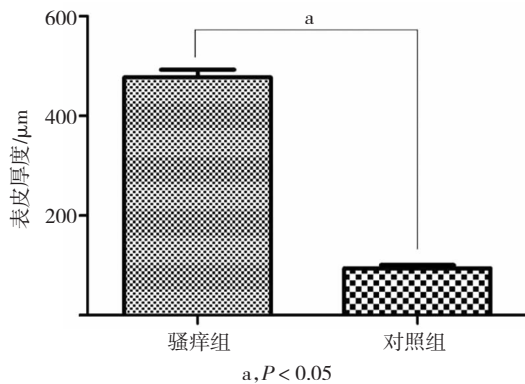


图 3 瘙痒组和对照组表皮厚度比较

2.2 TSLP 主要表达在表皮层、毛囊内部、腺体内部

IHC 法检测 TSLP 的表达,从整体水平上看,其在瘙痒组(图 4)和对照组(图 5)中的表达水平有统计学差异[(8.48 ± 2.60) vs. (0.61 ± 0.66) , $t=18.58$, $P=0.000$],见表 1。具体而言,银屑病、慢性皮炎和亚急性皮炎 3 种皮肤病中 TSLP 的蛋白表达均明显高于对照组($F=43.73$, $P=0.000$),见表 2。TSLP 主要在患者皮肤组织的表皮层、毛囊和腺体内部表达。

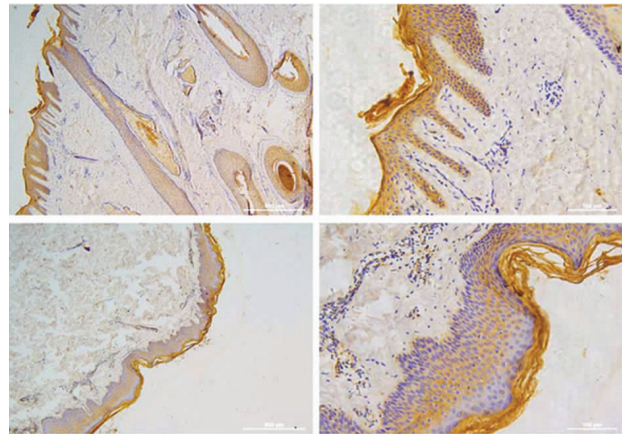


图 4 患者皮损处 TSLP 的表达

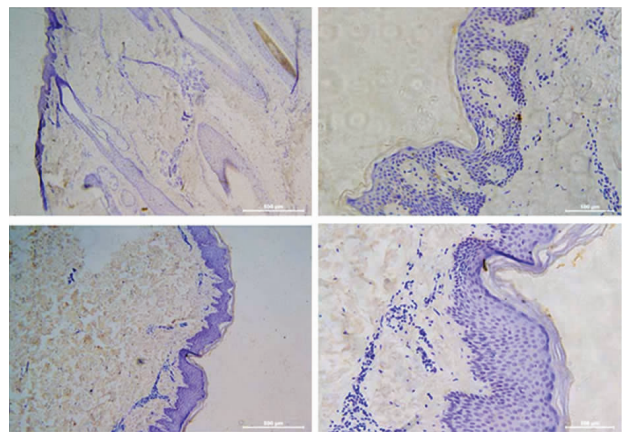


图 5 对照组 periostin、TSLP 无表达

表 1 瘙痒组与对照组 periostin 和 TSLP 的免疫组化评分比较

组别	Periostin	TSLP
瘙痒组 (n=42)	7.33 ± 3.20	8.48 ± 2.60
对照组 (n=23)	0.65 ± 0.65	0.61 ± 0.66
t 值	13.060	18.580
P 值	0.000	0.000

表 2 不同类型皮肤病 periostin 和 TSLP 免疫组化评分比较

组别	Periostin	TSLP
对照组 (n=23)	0.65 ± 0.65	0.61 ± 0.66
银屑病组 (n=14)	9.27 ± 3.20^a	9.29 ± 3.10^a
慢性皮炎组 (n=24)	6.25 ± 2.89^a	8.04 ± 2.44^a
亚急性皮炎组 (n=4)	7.00 ± 2.00^a	8.25 ± 0.50^a
F 值	69.800	43.730
P 值	0.000	0.000

注:a,同一蛋白上与对照组比较, $P < 0.05$

2.3 Periostin 主要表达在真皮层、毛囊和腺体外周

IHC 方法同样检测了 periostin 的表达,其表达部位与 TSLP 不同(图 6)。它主要表达在皮肤组织真表皮交界处的真皮部位、毛囊和腺体外周。从总体水平上看,瘙痒组 periostin

蛋白表达水平与对照组相比差异有统计学意义 $[(7.33 \pm 3.20)$ vs. (0.65 ± 0.65) , $t=13.06$, $P=0.000$],见表 1。具体而言,银屑病、慢性皮炎和亚急性皮炎 3 种皮肤病中 periostin 的蛋白表达水平均明显高于对照组 ($F=69.80$, $P=0.000$),见表 2。

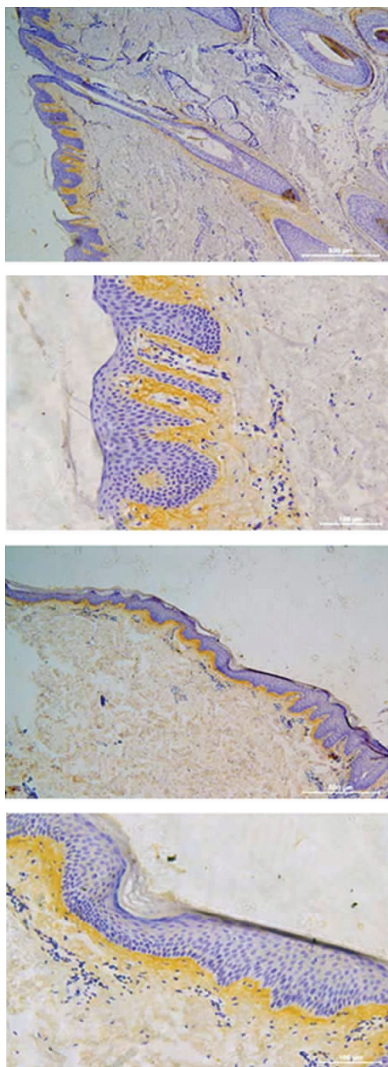


图 6 患者皮损处 periostin 的表达

3 讨论

银屑病、慢性皮炎和亚急性皮炎等炎症性皮肤病常伴随慢性瘙痒^[12]。慢性瘙痒病程长且治疗不彻底,使得患者生活质量严重受损。研究表明,炎症性皮肤病引起的慢性瘙痒与皮肤屏障受损和免疫异常调节有关^[13]。因此,深入研究免疫机制在慢性瘙痒中的作用,可对慢性瘙痒发病机制的阐明及药物研发提供实验基础。

TSLP 是启动 Th2 型免疫应答的重要信号分

子,它对 T 细胞的成熟和活化至关重要。体外研究显示,TSLP 能够活化诱导 CD11c⁺树突状细胞分泌 2 种促进 Th2 细胞聚集的化学因子:T 细胞趋化因子和巨噬细胞源性趋化因子,同时还可启动 CD4⁺前体细胞向 Th2 转化^[14]。炎症性皮肤病的发病机制与 TSLP 介导的 Th2 型免疫反应有关。研究发现,TSLP 在银屑病^[15]和特应性皮炎^[16]患者皮肤中的表达增加,且其在特应性皮炎的启动、维持^[17]和进展^[18-19]中发挥重要作用。同时在动物研究中发现,过表达 TSLP 的转基因鼠皮肤表现出特应性皮炎样的皮损特征^[17,20]。这些结果表明 TSLP 是启动炎症性皮肤病的重要上游因子^[21]。另外,TSLP 可以通过直接刺激皮肤感觉神经纤维形成瘙痒感觉^[22]。本研究表明 TSLP 对 Th2 型免疫应答及瘙痒的产生至关重要。我们的研究也发现 TSLP 在炎症性皮肤病引起的慢性瘙痒患者皮损区表达增加。

骨膜蛋白(periostin)是成束蛋白家族的一种细胞外基质蛋白,分子质量为 93 kD,其基因位于人的第 13 号染色体^[23]。Periostin 作为一种新型介质,在骨骼、心脏、气管等组织器官发育或修复重构过程和过敏性炎症中起重要作用^[24-25]。皮肤真皮层的成纤维细胞合成并分泌的 periostin 能够刺激皮肤角质细胞分泌 TSLP^[10,26],从而启动 Th2 免疫应答,产生 Th2 效应因子如白细胞介素-4、白细胞介素-13 等^[27]。故推测 periostin 可能作为 TSLP 的上游蛋白在慢性瘙痒中发挥重要作用。

本研究收集银屑病、慢性皮炎和亚急性皮炎患者的皮损组织,通过 HE 染色分析瘙痒组和正常组表皮病理结构的变化,瘙痒组皮肤表皮层有角化不全伴角化过度的现象,真皮层内可见炎性细胞浸润,表明慢性瘙痒患者皮损处皮肤的屏障保护功能受到破坏。IHC 染色发现 TSLP 在慢性瘙痒患者皮损区表达增加,这一结果与 Jariwala 等^[16]发现的 TSLP 在特应性皮炎中的表达趋势相同。且 TSLP 的表达部位主要位于表皮层、毛囊内部和皮脂腺内部,证实 TSLP 作为免疫反应的起始信号分子在慢性瘙痒的发生发展过程中发挥重要作用。同时,本实验创新性地将 TSLP 的上游因子 periostin 加入到研究中,发现 periostin 与 TSLP 的表达部位不同,periostin 主要表达在真皮层、毛囊外侧和腺体外侧。较 TSLP 而言,periostin 的表达更靠近皮肤内侧。表达部位的不

同提示 periostin 作为 TSLP 的上游因子参与慢性瘙痒的发生过程。对 periostin 进一步的研究可能会有更多新的启示。

综上所述,periostin/TSLP 介导的 Th2 免疫应答在慢性瘙痒的发生发展中起重要作用。本研究对慢性瘙痒免疫机制的进一步阐明提供了重要基础,也为慢性瘙痒疾病的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, et al. The neurobiology of itch[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(7):535-547.
- [2] Ständer S, Weisshaar E, Mettang T, et al. Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch[J]. *Acta Derm Venereol*, 2007, 87(4):291-294.
- [3] Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, et al. Itch: scratching more than the surface[J]. *QJM*, 2003, 96(1):7-26.
- [4] Mattered U, Apfelbacher CJ, Loerbroks A, et al. Prevalence, correlates and characteristics of chronic pruritus: a population-based cross-sectional study[J]. *Acta Derm Venereol*, 2011, 91(6):674-679.
- [5] Shaw FM, Luk KMH, Chen KH, et al. Racial disparities in the impact of chronic pruritus: a cross-sectional study on quality of life and resource utilization in United States veterans[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 77(1):63-69.
- [6] Weisshaar E, Szepietowski JC, Darsow U, et al. European guideline on chronic pruritus[J]. *Acta Derm Venereol*, 2012, 92(5):563-581.
- [7] Ong PY, Leung DY. Immune dysregulation in atopic dermatitis[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2006, 6(5):384-389.
- [8] Harrington LE, Hatton RD, Magan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11):1123-1132.
- [9] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6):652-657.
- [10] Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, et al. Periostin contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes[J]. *Allergol Int*, 2012, 61(4):563-572.
- [11] 刘清华, 谢寿城, 黄艳芳. 子宫内膜癌中雌激素受体的表达及免疫组化评分与临床病理参数的关系[J]. *中国临床研究*, 2016, 29(7):924-927.
- [12] Steinhoff M, Cevikbas F, Yeh I, et al. Evaluation and management of a patient with chronic pruritus[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(4):1015-1016.
- [13] Sobel A. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction[J]. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(8):301-305.
- [14] Sojmelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(7):673-680.
- [15] Mizuno K, Morizane S, Takiguchi T, et al. Dexamethasone but not tacrolimus suppresses TNF- α -induced thymic stromal lymphopoietin expression in lesional keratinocytes of atopic dermatitis model[J]. *J Dermatol Sci*, 2015, 80(1):45-53.
- [16] Jariwala SP, Abrams E, Benson A, et al. The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis[J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(11):1515-1520.
- [17] Ziegler SF, Roan F, Bell BD, et al. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP)[J]. *Adv Pharmacol*, 2013, 66:129-155.
- [18] He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1183(1):13-24.
- [19] Locksley RM. Asthma and allergic inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6):777-783.
- [20] Li M, Messaddeq N, Teletin M, et al. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(41):14795-14800.
- [21] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(2):269-273.
- [22] Wilson SR, Thé L, Batia LM, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch[J]. *Cell*, 2013, 155(2):285-295.
- [23] Ruan K, Bao S, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(14):2219-2230.
- [24] Romanos GE, Asnani KP, Hingorani D, et al. PERIOSTIN: role in formation and maintenance of dental tissues[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(1):1-5.
- [25] Arima K, Ohta S, Takagi A, et al. Periostin contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis common to atopic dermatitis[J]. *Allergol Int*, 2015, 64(1):41-48.
- [26] Hamilton DW. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease[J]. *J Cell Commun Signal*, 2008, 2(1-2):9-17.
- [27] Asadullah K, Döcke WD, Haussler A, et al. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA[J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 107(6):833-837.

(责任编辑:方 济)