

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.12.021

文章编号: 1005-8982 (2018) 12-0113-05

奥洛他定联合卡介菌多糖核酸对慢性荨麻疹患者的免疫应答机制探讨

罗文峰¹, 程喜平², 王继辉³, 许德清⁴

(1. 广东省佛山市中医院 皮肤科, 广东 佛山 528000; 2. 广州医科大学第一附属医院 皮肤科, 广东 广州 510120; 3. 广东省佛山市第一人民医院皮肤科, 广东 佛山 528000; 4. 广东省中山大学孙逸仙纪念医院 皮肤科, 广东 广州 510120)

摘要: 目的 研究奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗前后慢性荨麻疹患者 Toll 样受体 2 (TLR2) 表达量的变化及其与免疫球蛋白 E (IgE)、补体 C3、补体 C4、细胞因子含量的相关性。**方法** 选取 2016 年 1 月 - 2016 年 11 月在佛山市中医院接受奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗的慢性荨麻疹患者作为研究对象。治疗前和治疗后 2、4 及 6 周时, 采集外周血并测定 TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 的表达量, 采集血清并测定 IgE、C3、C4、Th1、Th2 细胞因子的含量。**结果** 治疗后 2、4 及 6 周时, 外周血单个核细胞中 TLR2 的 mRNA 含量均低于治疗前, TLR4、TLR7 及 TLR9 的 mRNA 含量与治疗前比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 血清中 IgE、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 10 (IL-10) 的含量均低于治疗前, C3、C4、IFN- γ 、白细胞介素 2 (IL-2) 的含量高于治疗前; 外周血中 TLR2 的表达量与血清中 IgE、IL-4、IL-10 的含量呈正相关, 与 C3、C4、IFN- γ 、IL-2 的含量呈负相关。**结论** 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗可能通过 TLR2 通路调节慢性荨麻疹患者体内的免疫应答。

关键词: 慢性荨麻疹; 奥洛他定; 卡介菌多糖核酸; Toll 样受体; 免疫应答

中图分类号: R758.24

文献标识码: A

Mechanism of Olopatadine combined with BCG polysaccharide nucleic acid on immune response in patients with chronic urticaria through TLR2 pathway

Wen-feng Luo¹, Xi-ping Cheng², Ji-hui Wang³, De-qing Xu⁴

(1. Department of Dermatology, Foshan Hospital of TCM, Guangdong, Foshan 528000, China; 2. Department of Dermatology, the First Clinical College of Guangzhou Medical University, Guangdong, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Dermatology, the First People's Hospital of Foshan, 528000, China; 4. Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To study TLR2 expression in patients with chronic urticaria pre- and post-treatment of olopatadine combined with BCG polysaccharide nucleic acid and its correlation with IgE, C3, C4 and cytokine levels. **Methods** Patients with chronic urticaria who received olopatadine combined with BCG polysaccharide nucleic acid treatment in our hospital from January 2016 to November 2016 were selected as the research subjects; pre- and 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks post- treatment, peripheral blood was collected to determine expression levels of TLR2, TLR4, TLR7 and TLR9, and serum was collected to determine levels of IgE, C3, C4 and Th1 and

Th2 cytokines. **Results** About 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks post-treatment, TLR2 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells were lower than those pre-treatment while TLR4, TLR7 and TLR9 mRNA levels were not significantly different from those pre-treatment, and serum IgE, IL-4 and IL-10 levels were lower than those pre-treatment while C3, C4, IFN- γ and IL-2 levels were higher than those pre-treatment; TLR2 expression in peripheral blood was positively correlated with serum IgE, IL-4 and IL-10 levels, and negatively correlated with C3, C4, IFN- γ and IL-2 levels. **Conclusion** Treatment of Olopatadine combined with BCG polysaccharide nucleic acid can regulate the immune response in patients with chronic urticaria through TLR2 pathway.

Keywords: chronic urticaria; olopatadine; bcg polysaccharide nucleic acid; toll-like receptor; immune response

慢性荨麻疹是以风团和瘙痒为主要临床症状的自身免疫性皮肤病, 病机及发病机制尚未完全明确。免疫球蛋白 E (immunoglobulins-E, IgE) 介导的 I 型变态反应以及 Th1/Th2 免疫应答紊乱被认为与慢性荨麻疹的发病密切相关^[1-2]。盐酸非索非那是具有抗组胺活性的新型药物, 能够拮抗组胺所介导的炎症反应以及免疫应答紊乱; 卡介菌多糖核酸是一类非特异性免疫调节剂, 具有抑制肥大细胞脱颗粒、与 IgE 抗体竞争性结合抗原的作用。已有研究报道, 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸在慢性荨麻疹的治疗中展现出积极价值, 但是关于该治疗方案发挥治疗作用的分子机制并不明确^[3]。Toll 样受体 (toll like receptor, TLR) 是体内重要的模式识别受体, 参与免疫应答以及炎症反应的调控。TLRs 家族中的 TLR2 被证实与慢性荨麻疹的发生有关^[4-5]。在下列研究中, 本研究分析奥洛他定联合卡介菌多糖核酸是否通过 TLR2 通路调节慢性荨麻疹患者的免疫应答。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 1 月-2016 年 11 月在佛山市中医院皮肤科确诊为慢性荨麻疹的 78 例患者作为研究对象。其中, 男性 31 例, 女性 47 例; 年龄 15 ~ 52 岁。所有患者均符合慢性荨麻疹的诊断标准, 近 1 个月未使用过糖皮质激素和免疫制剂, 排除合并其他自身免疫相关性疾病、肝肾功能障碍或感染性疾病及对抗组胺药物过敏。收住院告知研究事项, 取得患者知情同意后给予奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗。

1.2 治疗方法

患者入组后给予奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗, 方法如下: 奥洛他定 5 mg、口服、2 次/d; 卡介菌多糖核酸注射液 0.7 mg、肌内注射、3 次/周。治疗 4 周后根据疗效酌情减量或停药。

1.3 外周血 TLRs 表达量的检测

治疗前和治疗后 2、4 及 6 周时, 采集患者的外周血, 加入淋巴细胞分离液后离心, 吸取中间悬浮的外周血单个核细胞, PBS 洗涤、离心 2 遍后加入 Trizol 裂解液并分离细胞中的总 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行实时荧光定量聚合酶链反应扩增, 扩增的目的基因包括 TLR2、TLR4、TLR7、TLR9, 内参基因为 GAPDH, 根据扩增曲线计算 TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 的 mRNA 含量。

1.4 血清指标的检测

治疗前和治疗后 2、4 及 6 周时, 采集两组患者的外周血, 室温静置 20 min 后离心, 分离血清后采用酶联免疫吸附试剂盒测定 IgE、补体 C3、C4、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)、白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 的含量。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验; 相关分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后外周血中 TLRs 的表达量

治疗前和治疗后 2、4 及 6 周时, 外周血单个核细胞中 TLR2 mRNA 的含量随治疗时间趋势递减, 各时间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); TLR4、TLR7 及 TLR9 的 mRNA 含量在治疗过程中无变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 治疗前后血清中 IgE、C3、C4 含量比较

治疗前和治疗后 2、4 及 6 周时, 血清中 IgE 的含量随治疗时间趋势递减, 各时间比较差异均有统计

学意义 ($P < 0.05$); C3、C4 的含量随治疗时间趋势递增, 各时间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 治疗前后血清中 Th1、Th2 细胞因子含量比较

治疗前和治疗后 2、4 及 6 周时, 血清中 IFN- γ 、IL-2 的含量随治疗时间趋势递增, 各时间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-4、IL-10 的含量随

治疗时间趋势递减, 各时间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 相关性分析结果

外周血单个核细胞中 TLR2 的 mRNA 表达量与血清中 IgE、IL-4、IL-10 的含量呈正相关, 与血清中 C3、C4、IFN- γ 、IL-2 的含量呈负相关。见表 4。

表 1 治疗前后外周血中 TLRs mRNA 表达量比较 ($n=78, \bar{x} \pm s$)

治疗时间	TLR2	TLR4	TLR7	TLR9
治疗前	1.08 ± 0.15	1.03 ± 0.13	1.06 ± 0.11	1.03 ± 0.15
治疗后 2 周	0.77 ± 0.06 ¹⁾	1.06 ± 0.12	1.02 ± 0.14	0.96 ± 0.11
治疗后 4 周	0.52 ± 0.07 ²⁾	0.98 ± 0.11	0.97 ± 0.12	1.01 ± 0.13
治疗后 6 周	0.34 ± 0.04 ³⁾	1.05 ± 0.14	0.98 ± 0.09	1.05 ± 0.12
F 值	14.822	0.251	0.226	0.184
P 值	0.000	0.184	0.174	0.232

注: 1) 与治疗前比较, $P < 0.05$; 2) 与治疗 2 周比较, $P < 0.05$; 3) 与治疗 4 周比较, $P < 0.05$

表 2 治疗前后血清中 IgE、C3、C4 含量的比较 ($n=78, \text{g/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	IgE	C3	C4
治疗前	126.69 ± 17.85	0.92 ± 0.11	0.32 ± 0.06
治疗后 2 周	56.52 ± 7.52 ¹⁾	1.07 ± 0.12 ¹⁾	0.41 ± 0.06 ¹⁾
治疗后 4 周	33.15 ± 3.64 ²⁾	1.23 ± 0.15 ¹⁾	0.47 ± 0.07 ¹⁾
治疗后 6 周	27.65 ± 3.61 ³⁾	1.42 ± 0.16 ¹⁾²⁾³⁾	0.52 ± 0.07 ¹⁾²⁾
F 值	22.812	8.582	7.962
P 值	0.000	0.001	0.003

注: 1) 与治疗前比较, $P < 0.05$; 2) 与治疗 2 周比较, $P < 0.05$; 3) 与治疗 4 周比较, $P < 0.05$

表 3 治疗前后血清中 Th1、Th2 细胞因子含量的比较 ($n=78, \text{ng/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
治疗前	11.32 ± 1.52	25.58 ± 3.36	7.64 ± 0.93	10.36 ± 1.42
治疗后 2 周	16.67 ± 2.03 ¹⁾	32.71 ± 4.46	4.58 ± 0.65	7.32 ± 0.92
治疗后 4 周	22.26 ± 3.14 ²⁾	39.42 ± 5.12	3.32 ± 0.46	5.57 ± 0.71
治疗后 6 周	32.18 ± 4.85 ³⁾	52.42 ± 6.58	2.71 ± 0.32	4.21 ± 0.56
F 值	18.382	12.283	22.182	11.028
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与治疗前比较, $P < 0.05$; 2) 与治疗 2 周比较, $P < 0.05$; 3) 与治疗 4 周比较, $P < 0.05$

表 4 TLR2 mRNA 表达量与血清指标的相关性分析

参数	IgE	C3	C4	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
相关系数 r	0.652	-0.712	-0.762	-0.685	-0.591	0.742	0.691
P 值	0.002	0	0	0.008	0.002	0.003	0.009

3 讨论

慢性荨麻疹的发生与 B 淋巴细胞产生的 IgE 以及 CD4⁺T 细胞中 Th2 亚群产生的细胞因子 IL-4、IL-10 有关。IgE 能够介导 I 型变态反应, 而 IL-4 和 IL-10 等细胞因子对 IgE 的产生具有正反馈效应。已有研究报道, 慢性荨麻疹患者体内 IgE、IL-4、IL-10 的产生增多, 会造成补体 C3 和 C4 的不断消耗、抑制 Th1 亚群的分化成熟及细胞因子的分泌^[6-7]。奥洛他定联合卡介菌多糖核酸是目前临床上治疗慢性荨麻疹的常用方案, 前者是一类抗组胺药物, 能抑制组胺所介导的炎症反应, 抑制多种细胞因子的分泌和释放^[8]; 后者是一类非特异性免疫调节剂, 能够稳定肥大细胞、与 IgE 竞争性结合肥大细胞上的抗原并抑制肥大细胞脱颗粒过程, 同时也能调节 T 淋巴细胞亚群的平衡、纠正 Th1/Th2 的失衡状态^[9]。国内安国芝^[3]的研究证实, 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗慢性荨麻疹能够取得确切疗效。

在慢性荨麻疹的病情发展变化过程中, TLRs 家族中的 TLR2、TLR4、TLR7、TLR9 均被证实与患者体内免疫应答和炎症反应的紊乱有关, 是造成慢性荨麻疹发生以及病情发展的关键分子^[4-5]。本研究发现, 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗能够以时间依赖性的方式降低外周血单个核细胞中 TLR2 的 mRNA 含量, 但是不会影响 TLR4、TLR7、TLR9 的 mRNA 含量。这说明奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗慢性荨麻疹可能主要通过 TLR2 发挥作用。

IgE 是介导慢性荨麻疹患者体内 I 型变态反应的重要抗体, 与肥大细胞表面 Fc ϵ RI 结合后能够造成肥大细胞脱颗粒, 进而分泌组胺等介质并引起荨麻疹的临床症状^[10-11]。在 IgE 介导 I 型变态反应的过程中, 补体 C3 和 C4 也发挥重要的协同作用并且会被不断消耗^[12]。相关临床研究显示, 慢性荨麻疹患者体内 IgE 的含量升高, 而 C3 和 C4 的含量降低^[13]。本研究结果显示, 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗能够以时间依赖性的方式降低血清中 IgE 的含量且与外周血中 TLR2 的 mRNA 表达量呈正相关, 以时间依赖性的方式增加 C3 和 C4 的含量且与外周血中 TLR2 的 mRNA 表达量呈负相关。这就说明奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗可能通过抑制 TLR2 的表达来减少 IgE 的分泌以及 C3 和 C4 的消耗。

在 IgE 介导 I 型变态反应的过程中, Th1 和 Th2 细胞对体液免疫应答过程以及自身抗体的分泌均具有

调节作用。Th2 细胞所分泌产生的 IL-4、IL-10 能够介导体液免疫应答, 对 B 细胞的分化成熟以及 IgE 的分泌具有促进作用; Th1 细胞所分泌的 IFN- γ 、IL-2 能够介导细胞免疫, 对 Th2 细胞的功能具有抑制作用。相关研究报道, 慢性荨麻疹患者体内 Th1 细胞的功能处于抑制状态、Th2 细胞的功能则增强。本研究结果显示, 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗能够以时间依赖性的方式增加血清中 IFN- γ 、IL-2 的含量且与外周血中 TLR2 的 mRNA 表达量呈负相关, 以时间依赖性的方式降低 IL-4、IL-10 的含量且与外周血中 TLR2 的 mRNA 表达量呈正相关。表明奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗可能通过抑制 TLR2 的表达来调节 Th1/Th2 免疫应答的平衡, 抑制 Th2 免疫应答、增强 Th1 免疫应答。

综上所述, 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸治疗可通过 TLR2 通路调节慢性荨麻疹患者体内的 IgE 所介导的 I 型免疫应答, 同时也调节 Th1/Th2 的免疫平衡。

参 考 文 献:

- [1] KOLKHIR P, POGORELOV D, OLISOVA O, et al. Comorbidity and pathogenic links of chronic spontaneous urticaria and systemic lupus erythematosus-a systematic review[J]. Clin Exp Allergy, 2016, 46(2): 275-287.
- [2] FERRER M. Immunological events in chronic spontaneous urticaria[J]. Clin Transl Allergy, 2015, 25(5): 30.
- [3] 安国芝, 何泽生, 孟昭影, 等. 奥洛他定联合卡介菌多糖核酸对 CIU 患者血清总 IgE 及 Th1/Th2 的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(6): 575-578.
- [4] 刘军连, 徐冰心, 王晓菲, 等. 自身免疫性慢性荨麻疹患者外周血单个核细胞 TLR2 的表达及意义[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2015, 29(7): 681-684.
- [5] 王晓菲, 刘军连, 宋淑军, 等. 慢性荨麻疹患者外周血单个核细胞 Toll 样受体和 DC-SIGN 的检测和分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(7): 736-739.
- [6] KOLKHIR P, BALAKIRSKI G, MERK H F, et al. Chronic spontaneous urticaria and internal parasites-a systematic review[J]. Allergy, 2016, 71(3): 308-322.
- [7] VESTERGAARD C, DELEURAN M. Chronic spontaneous urticaria: latest developments in aetiology, diagnosis and therapy[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2015, 6(6): 304-313.
- [8] TANIZAKI H, YAMAMOTO Y, NAKAMIZO S, et al. Comparison of the efficacy of olopatadine and fexofenadine in chronic idiopathic urticaria patients: a crossover study[J]. Pharmacology, 2015, 95(1/2): 32-35.
- [9] LIU W, WANG H, YU J, et al. Structure, chain conformation, and immunomodulatory activity of the polysaccharide purified from Bacillus Calmette Guerin formulation[J]. Carbohydr Polym, 2016, 5(150): 149-158.

- [10] SHIN Y S, SUH D H, YANG E M, et al. Serum specific IgE to thyroid peroxidase activates basophils in aspirin intolerant urticaria[J]. *J Korean Med Sci*, 2015, 30(6): 705-709.
- [11] STERBA P M, HAMILTON R G, SAINI S S. Suppression of basophil Fc RI activation by serum from active chronic idiopathic/spontaneous urticaria (CIU/CSU) subjects[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(5): 1454-1456.
- [12] GUO A, ZHU W, ZHANG C, et al. Association of FCER1A genetic polymorphisms with risk for chronic spontaneous urticaria and efficacy of nonsedating H1-antihistamines in Chinese patients[J]. *Arch Dermatol Res*, 2015, 307(2): 183-190.
- [13] AUYEUNG P, MITTAG D, HODGKIN P D, et al. Autoreactive T cells in chronic spontaneous urticaria target the IgE Fc receptor 1 α subunit[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(3): 761-768.

(唐勇 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管, 中南大学、中南大学湘雅医院主办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨, 密切关注世界医学发展的新趋势, 积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果, 及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平, 成为国内外医学学术交流的重要园地, 已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如: 中文核心期刊(中文核心期刊要目总览 2008、2011 和 2014 版)、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊(CSTPCD)、俄罗斯文摘(AJ)、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果, 以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊, 国际标准开本(A4), 全刊为彩色印刷, 无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸(880×1 230 mm), 封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸(635×965 mm)印刷, 每个月 10、20、30 日出版。定价 25 元/册, 全年 900 元。公开发行, 国内统一刊号: CN 43-1225/R; 国际标准刊号: ISSN 1005-8982; 国内邮发代号: 42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅, 漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部, 邮编: 410008

电话: 0731-84327938; 传真: 0731-89753837; E-mail: journal@zgxdyx.com

唯一官网网址: www.zgxdyx.com

《中国现代医学杂志》编辑部