

· 论 著 ·

以 CD203c 分子为标记判断慢性荨麻疹血清对嗜碱粒细胞的活化*

孙仁山¹, 隋建峰², 李 凤¹, 唐书谦¹, 吴先林¹, 杨 涛¹, 赵莉蓉¹,
伍津津¹, 李文维¹, 雷 霞¹, 冉新泽³, 郑晓莉¹, 杨桂红¹, 周金铃¹(第三军医大学: 1. 大坪医院野战外科研究所皮肤科, 重庆 400042; 2. 基础部医学试验中心 400038;
3. 预防医学院复合伤研究所, 重庆 400038)

摘要:目的 观察慢性荨麻疹血清对嗜碱粒细胞 CD203c 表达的影响, 以建立流式细胞术检测慢性荨麻疹血清中自身抗体的方法。方法 以 CRTH2-FITC、CD203c PE 和 CD3Per-CP 3 种抗体标记白细胞, 建立嗜碱粒细胞活化试验, 用流式细胞仪测定细胞活化及荧光强度。结果 自身血清皮肤试验 (ASST) 阳性组 CD203c 阳性细胞的百分率为 91.24 ± 6.22 , 与 ASST 阴性组 (3.33 ± 1.24) 及健康对照组 (3.05 ± 1.07) 比较具有明显差异 ($P < 0.01$); ASST 阴性组与健康对照组比较无显著差异。ASST 阳性组 CD203c 平均荧光强度 (MFI) 为 58.2 ± 12.55 , 显著高于 ASST 阴性组 (3.70 ± 1.32 , $P < 0.01$) 和健康对照组 (3.20 ± 1.29 , $P < 0.01$), ASST 阴性组与健康对照组的 MFI 比较无显著差异。结论 用 CRTH2-FITC、CD203c-PE 和 CD3Per-CP 3 种抗体, 可以观察嗜碱粒细胞表面的 CD203c 表达程度, 以判断荨麻疹血清对嗜碱粒细胞的活化。

关键词:慢性荨麻疹; 自身抗体; 流式细胞术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.020

中图分类号: R758.24; R331.142

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3200-02

Evaluation of basophil activations induced by chronic urticaria sera taking CD203c as a marker*

SUN Ren-shan¹, SUI Jian-feng², LI Feng¹, et al.

(1. Department of Dermatology, Research Institute of Surgery, Daping Hospital; 2. Medical Testing Center of Basic Department; 3. Combined Injury Institute of Preventive Medical College, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of chronic urticaria sera on CD203c expressions on basophils so as to construct ways to detect autoantibodies in chronic urticaria sera by flow cytometry. **Methods** Using CRTH2-FITC、CD203c-PE and CD3Per-CP fluorescent monoclonal antibodies, basophil activation test were constructed to assay cell activations and fluorescent intensities. **Results** Incubation of donor basophils with sera from patients with chronic urticaria and positive autologous serum skin test (ASST) demonstrated significant increasing positive basophil percent, 91.24 ± 6.22 vs 3.33 ± 1.24 , $P < 0.01$; and upregulation of CD203c expression, the mean fluorescent intensities (MFI) 58.2 ± 12.55 vs 3.70 ± 1.32 , $P < 0.01$. There are no statistically differences between the ASST negative group and the health group. **Conclusion** The CD203c expressing on basophils can effectively be observed by CRTH2-FITC、CD203c-PE and CD3Per-CP fluorescent monoclonal antibodies and making gates three times on flow cytometry, so that basophil activations by chronic urticaria sera can be evaluated.

Key words: chronic urticaria; autoantibodies; flow cytometry

大部分慢性荨麻疹患者找不到明确的过敏原及病因。部分患者血清存在组胺释放活性, 这种组胺释放活性是由自身抗体所致, 大部分为抗高亲和力 IgE 受体 (FcεR1) 自身抗体, 少部分为抗 IgE 或其他抗体^[1-9]。自身血清皮肤试验 (autologous serum skin test, ASST)、嗜碱粒细胞组胺释放试验和嗜碱粒细胞活化试验 (Basophil activation test, BAT) 可以对上述的自身抗体进行检测。嗜碱粒细胞活化后, CD63 分子表达增强, 并从细胞内转移至细胞表面, 很多文献以 CD63 分子的表达为 BAT 检测指标, 但 CD63 除在肥大细胞和嗜碱粒细胞表达外, 在血小板及单核细胞等均可表达^[10]。CD203c 分子特异性地表达在肥大细胞和嗜碱粒细胞表面, 本研究探讨以 CD203c 分子为 BAT 的观察指标, 判断慢性荨麻疹外周血清对嗜碱粒细胞的活化情况, 并以求判断慢性荨麻疹的自身免疫性质。

1 资料与方法

1.1 病例与分组 按文献[11-12]选择本科室(2010年1月至2010年6月)来就诊的慢性荨麻疹患者, 随机选取 ASST 阳性

患者血清 26 例(A组)、ASST 阴性患者血清 24 例(B组)和健康对照血清 20 例(C组)。

1.2 试剂与仪器 抗人 CD203c-PE、CRTH2-FITC 及 CD3Per-CP 为美国 eBioscience 公司产品, 其他试剂均为进口或国产分析纯, 流式细胞仪为美国 BD 公司产品, 激光共聚焦显微镜为德国 LEICA 公司产品; 光学显微镜为日本 Nikon 产品。

1.3 实验方法

1.3.1 标本处理及嗜碱粒细胞悬液制备 从 1 个健康自愿者肘静脉采血 30 mL, 肝素抗凝备用。每批标本均设阴性和阳性对照, 在阳性对照管中加入经磷酸盐缓冲液 (PBS) 1:10 稀释的 0.4 mmol FMLP 100 μL, 阴性对照管中以 PBS 100 μL 替代 FMLP, 在检测管中加入 100 μL 待检测血清, 各管中加入肝素抗凝全血 100 μL, 37 °C 水浴 15 min, 随后用含依地酸 (EDTA, 0.02 mol/L) 的 PBS 2 mL 终止反应, 离心弃上清液, 加入 CRTH2-FITC/CD203c-PE/CD3Per-CP 预混合的单克隆抗体

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972647); 第三军医大学科研基金资助项目 (2008XG179)。

15 μ L,置室温 10 min 后用溶血素处理 10 min,以溶解红细胞,继用含 0.1%牛人血清蛋白的 PBS 2 mL 洗涤 2 次,加 PBS 700 μ L 重悬待用。

1.3.2 检测分析 每次检测前均用 Flow Check 荧光微球 Beckman Coulter 校准仪器,标本上机后,先以前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)参数大致观察细胞形态。然后在 CD3 和 SSC 双参数点图上选取排除了 CD3 阳性的有核细胞,排除细胞碎片和杂质。在 CD203c 和 CRTH-2 双参数点图上选取有核细胞中 CD203c 阳性的细胞。将纯的嗜碱粒细胞用 CD203c 参数图进行分析,以未激活阴性为对照,观察 CD203c 抗原表达上调比例和幅度。以 CD203c 表达上调细胞数的比例达到 10%作为嗜碱粒细胞脱颗粒试验阳性的判断标准。染色细胞样品在流式细胞仪上用 Cellquest 软件进行检测,经 Cellquest 或 WinMDI2.8 软件分析,获取直方图,以平均免疫荧光强度(MFI)表示表达强度。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 Anova 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果 见表 1。

表 1 慢性荨麻疹患者血细胞 CD203c 表达结果($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | CD203c 表达百分率(%) | CD203c 表达强度(MFI) |
|-----|----|-------------------|-------------------|
| A 组 | 26 | 91.24 \pm 6.22* | 58.2 \pm 12.55* |
| B 组 | 24 | 3.33 \pm 1.24 | 3.70 \pm 1.32 |
| C 组 | 20 | 3.05 \pm 1.07 | 3.20 \pm 1.29 |

*: $P < 0.01$,与 B、C 组比较。

3 讨 论

慢性特发性荨麻疹患者血清中能发现功能性抗 Fc ϵ RI 或抗 IgE 自身抗体,这些患者 HLA-DR 等位基因频次增多,这种现象是自身免疫性疾病的特征。有研究表明,在具有自身抗体的慢性荨麻疹组,有充分的证据证明它们具有致病性,自身抗体的血浆水平与疾病活动性有密切的联系;清除自身抗体可以缓解症状。对该抗体进行部分纯化,可以在 IgG1 和 IgG3 的成分中发现抗体。另外一个自身免疫现象也出现在该组中,包括出现抗甲状腺抗体、呈斑点图案的抗核抗体等,但没有发现系统性红斑狼疮^[1-13]。定义自身免疫性疾病的标准除上述情况外,还要求在实验动物身上能够复制疾病,尽管目前还没有用抗 Fc ϵ RI 自身抗体来进行动物试验,但检测出慢性荨麻疹外周血中的自身抗体,可以避免过多的过敏原检测费用,并为医师使用免疫调节剂治疗该类疾病提供依据。

抗 Fc ϵ RI 自身抗体主要有自身血清皮肤试验、嗜碱粒细胞组胺释放试验、免疫印迹方法和基于重组蛋白 sFc ϵ RI α 的 ELISA 试验等检测方法。本课题组应用这几种检测方法并对其进行了系统比较研究,认为免疫印迹方法稳定性好,实验结果可靠;嗜碱粒细胞组胺释放试验可以检测出功能性的抗 Fc ϵ RI 自身抗体,但操作步骤繁琐;ASST 方法虽较简单,但无菌要求严格,测试前需要患者停用抗组胺药物^[11-14-15]。通过比较发现,3 种方法可相互借鉴和弥补,供临床诊断自身免疫性荨麻疹时使用。

嗜碱粒细胞组胺释放试验要求纯化嗜碱粒细胞,BAT 使用全血标本,通过流式细胞仪测定表面分子的变化判断靶细胞

的活化,因此试验周期短。由于嗜碱粒细胞活化后,针对 CD63 分子变化检测的信号敏感性强,大多数文献采用 CD63 分子判断嗜碱粒细胞的活化,在本研究中使用了特异性强的 CD203c 分子,通过 3 次设门,排除淋巴细胞、单核细胞、嗜酸粒细胞等,检测荨麻疹血清对嗜碱粒细胞的活化信号。本实验结果证明,使用的 3 种抗体标记白细胞,3 次设门可以有效判断嗜碱粒细胞的活化情况。本实验中有 2 例 ASST 阳性血清呈现阴性反应,可能为凝血因子导致的 ASST 阳性反应,而非抗 Fc ϵ RI 抗体所致。由于荧光标记抗体的价格因素可能会限制该方法的临床应用。

参考文献:

[1] Philpott H, Kette F, Hissaria P, et al. Smith W. Chronic urticaria: the autoimmune paradigm[J]. Intern Med J, 2008,38(11):852.

[2] 孙仁山,刘荣卿.自身免疫性慢性荨麻疹的检测方法及治疗进展[J].临床皮肤科杂志,2000,29(3):187.

[3] 朱清,徐怡波,谢忠诚.慢性荨麻疹的病因机制及治疗进展[J].检验医学与临床,2009,6(4):284.

[4] 朱清,谢忠诚,鲁静.中药口服联合盐酸司他斯汀片治疗慢性荨麻疹 89 例疗效观察[J].检验医学与临床,2009,6(4):301.

[5] 袁皓琛,刘燕茹,王琴.慢性荨麻疹患者血清过敏原特异性 IgE 抗体检测分析[J].海南医学,2003,14(3):60.

[6] 许海卫.左西替利嗪治疗慢性荨麻疹 38 例疗效观察[J].海南医学,2008,19(7):33.

[7] 叶辉胜,蔡洁莹,高金莲.咪唑斯汀(皿治林)治疗 45 例慢性荨麻疹临床观察[J].海南医学,2008,19(9):57.

[8] 曹广金,吴春兰.江西地区慢性荨麻疹皮内试验变应原检测及分析[J].海南医学,2007,18(1):134.

[9] 祝林,龙力,段永建.依巴斯汀治疗慢性荨麻疹临床疗效观察[J].海南医学,2008,19(9):3.

[10] Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy[J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(6):921.

[11] 孙仁山,刘荣卿,叶庆侗,等.慢性特发性荨麻疹患者血清组胺释放活性的检测[J].第三军医大学学报,2000,22(4):349.

[12] 刘荣卿,孙仁山.嗜碱粒细胞组胺释放试验检测抗高亲和力 IgE 抗体及其受体[J].重庆医学,2001,30(1):27.

[13] 孙仁山,刘荣卿.慢性荨麻疹的某些致病因子研究[J].重庆医学,2000,29(5):468.

[14] Sun RS, Chen XH, Sui JF, et al. Detecting anti-Fc ϵ RI autoantibodies in patients with asthma by flow cytometry[J]. J Int Med Res, 2008,36(6):1214.

[15] 孙仁山,刘荣卿,胡川闽,等.高亲和力 IgE 受体 α 链蛋白及其自身抗体在慢性荨麻疹患者中的表达[J].中华皮肤科杂志,2001,34(6):444.