

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.006

## CXCL10、CXCR3 及 T 细胞亚群在进展期白癜风患者外周血中的表达及复方中药对其影响\*

邓莉<sup>1,2</sup>, 江雪<sup>1</sup>, 王禹毅<sup>1</sup>, 史丙俊<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 徐伟<sup>1</sup>, 刁庆春<sup>1</sup>, 郑文豪<sup>1△</sup>

(1. 重庆市中医院/重庆市第一人民医院皮肤科 400000; 2. 西南医科大学附属医院皮肤科, 四川泸州 646000)

**[摘要]** **目的** 检测进展期白癜风患者外周血中 T 细胞亚群及趋化因子配体 10(CXCL10)及其受体 3(CXCR3)的表达情况,并探索复方中药对其影响。**方法** 采用流式细胞仪检测治疗前后白癜风患者外周血中 T 细胞亚群的细胞比例,ELISA 法检测治疗前后白癜风患者外周血清中 CXCL10 及 CXCR3 水平。**结果** 服用复方中药 1 个月后,白癜风患者外周血中 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞比例均较治疗前升高( $P<0.05$ )。治疗前外周血清中 CXCL10 水平较健康对照组明显升高( $P<0.01$ ),治疗后较治疗前明显降低( $P<0.05$ )。治疗前外周血清中 CXCR3 水平较健康对照组明显升高( $P<0.01$ ),治疗后仍明显高于健康对照组( $P<0.01$ )。**结论** CXCL10、CXCR3 表达水平及 T 细胞亚群比例异常可能与白癜风的发病相关,本研究所用的复方中药可能通过调节 T 细胞亚群、CXCL10 及 CXCR3 的表达水平发挥其治疗作用。

**[关键词]** 白癜风;中草药;趋化因子 CXCL10;受体, CXCR3; T 淋巴细胞亚群

**[中图分类号]** R751

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)02-0164-03

### Expression of CXCL10, CXCR3 and T cell subsets in peripheral blood and effect of compound Chinese medicine on it in patients with advanced vitiligo\*

DENG Li<sup>1,2</sup>, JIANG Xue<sup>1</sup>, WANG Yuyi<sup>1</sup>, SHI Bingjun<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, XU Wei<sup>1</sup>, DIAO Qingchun<sup>1</sup>, ZHENG Wenhao<sup>1△</sup>

(1. Department of Dermatology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital/The First People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400000, China; 2. Department of Dermatology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the expression levels of peripheral blood CXCL10 and its receptor CXCR3 and T cell subsets in of the patients with advanced vitiligo and the influence of compound Chinese medicine on it. **Methods** Flow cytometry was used to detect the cellular proportions of peripheral blood T cell subsets, ELISA was employed to quantify serum CXCL10 and CXCR3 expression levels before and after treatment. **Results** After 1 month of taking Chinese medicine, the proportions of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells were increased compared before treatment( $P<0.05$ ). The expression level of peripheral serum CXCL10 before treatment was significantly increased compare with the healthy control group( $P<0.01$ ), and the CXCL10 level after treatment was decreased significantly compared with that before treatment( $P<0.05$ ). The expression level of peripheral serum CXCR3 was significantly increased compared with the healthy control group( $P<0.05$ ), while which after treatment was still significantly higher than that in the healthy control group( $P<0.05$ ). **Conclusion** CXCL10, CXCR3 and T cell subsets proportion may be involved in the pathogenesis of vitiligo. The compound Chinese medicine used in this study plays the curative effect possibly by regulating T cell subsets and expression levels of CXCL10 and CXCR3.

**[Key words]** vitiligo; drugs, chinese herbal; chemokine CXCL10; receptors, CXCR3; T-lymphocyte subsets

白癜风是一种获得性皮肤病,以黑素细胞渐进性和选择性破坏为特征<sup>[1]</sup>。有研究认为白癜风是一种器官特异性自身免疫性皮肤病,是由细胞毒性 T 细胞介导对表皮中黑素细胞攻击导致的疾病<sup>[2]</sup>。趋化因子配体 10(CXCL10)是趋化因子(CXC)亚家族成员,通过与趋化因子受体 3(CXCR3)结合参与了多种自身免疫性疾病的发病,如自身免疫性甲状腺疾病、类风湿关节炎、肾炎、皮炎、银屑病、红斑狼疮等。最近也有越来越多的研究显示,白癜风的发病与血清中 CXCL10 的表达水平相关。同时也有研究认为 T 细胞依赖的免疫应答参与白癜风的发病及发展过程,尤其是 CD8<sup>+</sup> T 细胞,被认为可以直

接破坏黑素细胞<sup>[3]</sup>,而辅助性 T 细胞(Th 细胞),大部分为 CD4<sup>+</sup> T 细胞,可以调节或协助免疫反应,促进白癜风皮损的好转<sup>[4]</sup>。本研究所用的复方中药是重庆市中医院自主研发的纯中药制剂,已在临床上广泛使用,临床疗效肯定,但其治疗作用机制仍不明确,因此本研究检测白癜风患者口服该复方中药治疗前后外周血中 CXCL10、CXCR3 及 T 细胞亚群的变化,探讨复方中药对白癜风发病的免疫调控作用及机制。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 1 月至 2016 年 10 月在重庆市中医院皮肤科就诊白癜风患者 28 例,其中男 16 例,女 12 例;

\* 基金项目:国家自然科学基金(81503588);重庆市卫生和计划生育委员会基金项目(ZY20140251);重庆市科技委员会基础与前沿研究计划(cstc2015jcyjA10113)。作者简介:邓莉(1990—),住院医师,硕士,主要从事自身免疫性皮肤病研究。△ 通信作者, E-mail:103884259@qq.com。

年龄 18~60 岁,平均(39.50±12.52)岁;病程 1 个月至 20 年;皮损面积 1%~5%,平均(3.13±0.86)%,均为进展期。上述 28 例患者治疗前后采血,另选 30 例健康体检者作为健康对照组,其中男 14 例,女 16 例;年龄 18~60 岁,平均(33.46±8.62)岁;均无免疫性疾病及系统性疾病史。纳入标准:(1)符合白癜风的诊断标准;根据“白癜风诊疗共识 2014 版”“2012 年白癜风全球问题共识”分类标准,进行诊断及分型;(2)符合进展期;(3)皮损 VIDA 评分: >1~<4 分;(4)近 1 个月未用过抗白癜风药物治疗,未用过免疫调节剂,未用过抗白癜风物理治疗;(5)2 周内无外用皮质类固醇药物史,皮损无明显感染征象。排除标准:(1)近 1 个月使用激素及免疫调节剂、中药制剂、光疗患者;(2)伴有湿疹、特应性皮炎、银屑病等其他皮肤病患者;(3)恶性肿瘤患者,妊娠或哺乳期妇女;(4)合并自身免疫性疾病患者。本研究通过医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

**1.2 实验试剂和仪器** RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone),人淋巴细胞分离液(上海拜力生物科技有限公司),CXCL10 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司),人 CXCR3 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特公司),酶标仪(芬兰产全波长酶标仪 Multiskan Spectrum)。CD3-PE, CD8-APC, CD4-FITC(美国 BD 公司)。流式细胞仪为 BD Accuri C6 小型流式细胞仪。

**1.3 方法**

**1.3.1 用药** 口服该中药复方(主要由黄芪、白术、川芎、合欢皮、蒺藜、钩藤、浮萍、防风、白芷、桑枝、丹参、郁金、补骨脂、鸡血藤、首乌、女贞子、早莲草组成,可酌情加减),每天 1 剂,每次 200 mL,分 3 次服用,疗程 1 个月。观察疗效及不良反应,拍照留存。安全性评价:试验组患者治疗前及治疗 1 月后均查肝肾功、血、尿、大便常规。

**1.3.2 标本收集** 所有受试者均于治疗前后清晨抽取空腹外周静脉血 10 mL 于真空采血管,取 2 mL 3 000 r/min 离心 5 min,分离收集上层血清,-80 °C 保存。另 8 mL 用于分离外周血单个核细胞,数抗,固定后上机检测。

**1.3.3 CXCL10 及 CXCR3 检测方法** 血清 CXCL10 和 CXCR3 水平均采用 ELISA 试剂盒进行测定,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。在酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度(A)值,分析各细胞因子表达水平。样品数抗固定后于 1 周内用流式细胞仪检测。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组内比较采用配对样本 *t* 检验,组间比较采用两独立样本 *t* 检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

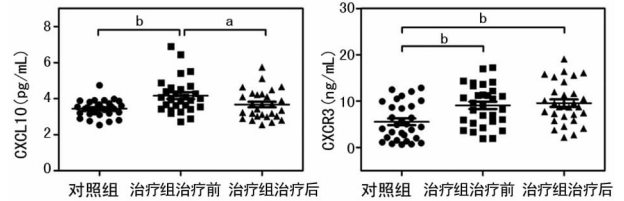
**2.1 外周血清 CXCL10 及 CXCR3 检测结果** 白癜风患者治疗前外周血清中 CXCL10 的表达水平明显较健康对照组高( $P < 0.01$ ),治疗后较治疗前下降( $P < 0.05$ )。白癜风患者治疗前外周血清中 CXCR3 水平较健康对照组明显升高( $P < 0.01$ ),治疗后仍明显高于健康对照组( $P < 0.01$ ),治疗后 CXCR3 水平较治疗前无明显变化( $P > 0.05$ ),见表 1、图 1。

**2.2 复方中药对外周血 T 细胞亚群的影响** 白癜风患者治疗前外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞比例低于健康对照组,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值升高,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );服用复方中药 1 个月后,CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T 细胞比例较治疗前升高( $P < 0.05$ ),CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细

胞比例较治疗前显著升高( $P < 0.01$ ),CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值较用药前下降( $P > 0.05$ ),见表 2、图 2。

**表 1 白癜风患者治疗前、后及健康对照组外周血清 CXCL10 及 CXCR3 表达情况( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	CXCL10(pg/mL)	CXCR3(ng/mL)
治疗组治疗前	28	4.16±0.97	9.14±4.46
治疗组治疗后	28	3.67±0.80	9.15±4.16
对照组	30	3.44±0.45	5.55±4.00

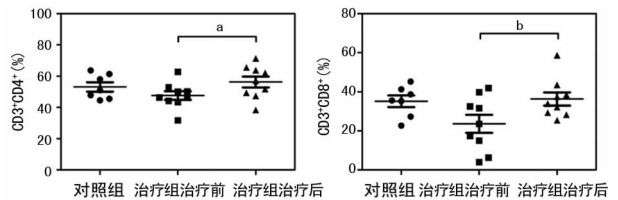


a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$

**图 1 CXCL10、CXCR3 在治疗前、后的白癜风患者及健康对照外周血中的表达**

**表 2 各组患者治疗前后外周血 T 细胞亚群的变化( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /
		CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup>
治疗组治疗前	9	47.59±8.34	23.62±13.87	2.12±1.39
治疗组治疗后	9	56.3±10.45	36.32±10.10	1.60±0.62
对照组	7	53.13±7.85	35.14±7.83	1.28±0.24



a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$

**图 2 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞在治疗前后的白癜风患者及健康对照外周血中的比例**

**2.3 不良反应及安全性评价** 无明显不良反应,治疗前后肝肾功、三大常规检测结果均正常。

**3 讨论**

中医治疗白癜风已有几千年历史,疗效肯定,但辨证分型较为复杂。笔者根据文献总结及历代医家治疗经验,认为白癜风常虚实夹杂为患,白癜风患者素体肝肾亏虚,风邪挟瘀阻络而致病。进展期白癜风皮损逐渐扩大、增多,可伴痒感,这些临床症状与风邪善行而数变的致病特点吻合,因此进展期白癜风“风邪挟瘀”是其主要病理机制,以祛风散邪为主要治法,兼以养血活血、滋补肝肾。本课题组前期已开展了白癜风中药复方对豚鼠白癜风模型的治疗作用研究,实验观察到中药复方对豚鼠白癜风模型有较好的复色作用,能够促进黑色素的增多,说明本方对白癜风治疗有效,但其内在作用机制目前尚不清楚<sup>[5]</sup>。现代中药药理研究认为黄芪、白术、防风具有良好的免疫调节功能,补益药女贞子、早莲草对酪氨酸酶具有较强的

激活作用<sup>[6]</sup>。光敏药物补骨脂、白芷能增强皮肤对紫外光的敏感性,从而加速黑素的生物合成。CXCL10、CXCR3 及 T 细胞亚群均是机体免疫系统的重要组成部分,本研究所用的中药成分大部分具有调节免疫的功能,实验结果也证实了本实验所用的复方中药有调节免疫的作用。同时治疗前后所有患者肝肾功、三大常规结果均正常,说明本研究所用复方中药具有较好的安全性。

CXCL10 是 CXC 亚家族趋化因子,最新的研究显示在 CXC 亚类趋化因子家中,CXCL10 与白癜风关系最为密切。RASHIGHI 等<sup>[7]</sup>研究发现白癜风患者皮损和血清中 CXCL10 升高,并且通过白癜风小鼠模型说明 CXCL10 在白癜风疾病进展和维持中发挥关键作用。WANG 等<sup>[8]</sup>发现非节段型进展期白癜风患者血清中 CXCL10 明显升高,外周血单个核细胞中 CXCR3 mRNA 也明显升高,而白癜风的发病最终阶段是细胞毒性 T 细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)迁移至皮肤,杀伤表皮中的黑素细胞,由此说明 CXCL10/CXCR3 信号轴可能参与将 CD8<sup>+</sup> T 细胞募集至皮肤的过程,并认为血清 CXCL10 可能是一个新的监测疾病活动的生物标记,对白癜风的治疗有一定的指导意义。目前少有 CXCL10/CXCR3 信号轴与白癜风相关性的研究,本实验进行此研究的同时还探讨了复方中药对这一机制的干预作用。结果显示,白癜风患者治疗前血清中 CXCL10 及 CXCR3 水平均明显高于健康对照组,与既往研究结果一致。在使用复方中药治疗 1 个月后 CXCL10 水平明显下降,提示本研究使用的复方中药能通过调控 CXCL10,进而阻断 CXCL10/CXCR3 信号轴,促进白癜风患者皮损的稳定及好转。至于 CXCR3 的表达水平无明显变化,可能由于 CXCR3 主要表达在 Th1 细胞表面,在血清中的分泌表达较少。

CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞为 T 细胞两个主要的亚群,CD4<sup>+</sup> T 细胞活化后主要分化为 Th 细胞,CD8<sup>+</sup> T 细胞活化后主要分化为 CTL。Th 细胞能分泌多种细胞因子,对机体的特异性免疫及非特异性免疫均有重要的调节作用。CTL 可高表达皮肤淋巴细胞相关抗原(CLA),招募 T 细胞向皮肤归巢,导致 CTL 到达皮肤后直接参与黑素细胞特异性的杀伤过程。DWIVEDI 等<sup>[4]</sup>研究显示白癜风患者外周血中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值明显低于健康对照组,说明白癜风的发病可能与免疫调节系统失衡有关。ANTELO 等<sup>[9]</sup>研究显示白癜风患者外周血中 CD8<sup>+</sup> T 细胞明显下降,可能与患者皮损及皮损周围中 CD8<sup>+</sup> T 细胞增加有关。SANDOVAL-CRUZ 等<sup>[10]</sup>研究也发现白癜风患者皮损边缘处皮肤活检 T 细胞比率明显高于非皮损处,且大部分为 CD8<sup>+</sup> T 细胞。本研究结果显示白癜风患者外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞在数量上低于健康对照组,与既往研究结果一致,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),可能与样本量太少有关,适当增加样本量之后可能会有显著差异。治疗后患者外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞数量较治疗前显著增多,并更加接近健康对照组水平,说明本实验所用复方中药对 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞具有一定的调节作用。

综上所述,CXCL10 及 CXCR3 的高表达可以促进白癜风皮损的发生和进展,外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例降低、皮损中

CD8<sup>+</sup> T 细胞比例升高也与白癜风的发病有关。服用复方中药治疗 1 个月后,CXCL10 及 CXCR3 的表达水平显著下降,外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞的细胞比例升高,由此推测本研究所用复方中药可能主要是通过调节机体细胞免疫功能发挥作用。

## 参考文献

- [1] TAÏEB A, PICARDO M, VETF MEMBERS. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(1): 27-35.
- [2] VAN DEN BOORN J G, KONIJNENBERG D, DELLEMIJN T A, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129(9): 2220-2232.
- [3] LANG K S, CAROLI C C, MUHM A, et al. HLA-A2 restricted, melanocyte-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes detected in vitiligo patients are related to disease activity and are predominantly directed against MelanA/MART1[J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(6): 891-897.
- [4] DWIVEDI M, LADDHA N C, ARORA P, et al. Decreased regulatory T-cells and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, 26(4): 586-591.
- [5] 江雪, 钱思宇, 郑文豪. 不同中药复方治疗豚鼠白癜风模型疗效比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(18): 2672-2673, 2676.
- [6] 吴立峰, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 45 味中药乙醇提取物中对酪氨酸酶的激活作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(3): 517-521.
- [7] RASHIGHI M, AGARWAL P, RICHMOND J M, et al. CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(223): 223ra23.
- [8] WANG X X, WANG Q Q, WU J Q, et al. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo[J]. *Br J Dermatol*, 2016, 174(6): 1318-1326.
- [9] ANTELO D P, FILGUEIRA A L, CUNHA J M. Reduction of skin-homing cytotoxic T cells (CD8<sup>+</sup>-CLA<sup>+</sup>) in patients with vitiligo [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2011, 27(1): 40-44.
- [10] SANDOVAL-CRUZ M, GARCÍA-CARRASCO M, SÁNCHEZ-PORRAS R, et al. Immunopathogenesis of vitiligo[J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(12): 762-765.

(收稿日期: 2017-07-18 修回日期: 2017-09-24)