

寻常型银屑病患者外周血单个核细胞中 S100B 的表达水平及意义

姚婉玉,唐秀生

(右江民族医学院附属医院皮肤科,广西 百色 533000 E-mail:157559833@qq.com)

摘要:目的 探讨 S100B 在寻常型银屑病患者外周血单个核细胞(PBMC)中的表达水平及意义。方法 选取 2016 年 3 月—2017 年 10 月来我院诊治的 35 例寻常型银屑病患者(银屑病组)及 17 例正常对照(正常对照组)为研究对象,采用实时定量 PCR 检测两组外周血单个核细胞中 S100B 以及 STAT3 的 mRNA 表达,同时采用流式细胞仪检测两组 PBMC 中 S100B 蛋白表达水平,并采用皮尔逊相关系数分析 S100B 和银屑病皮损面积和严重指数评分(PASI)的相关性。结果 银屑病组 PBMC 中 S100B mRNA 的相对表达量为(0.057±0.004),正常对照组为(0.043±0.003),两组比较差异有统计学意义($t = 14.322, P < 0.001$)。银屑病组 PBMC 中 STAT3 mRNA 的相对表达量为(0.758±0.067),正常对照组为(0.418±0.035),两组比较差异有统计学意义($t = 23.954, P < 0.05$)。皮尔逊相关系数分析显示 S100B 和 PASI 具有明显相关性。银屑病组 PBMC 中 S100B 蛋白表达水平较正常对照组明显增高。结论 寻常型银屑病外周血单个核细胞 S100B 和 STAT3 表达异常升高,S100B 可能通过调控 STAT3 参与了寻常型银屑病的发生发展。

关键词: 银屑病;S100B;STAT3;mRNA

中图分类号: R758.63

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)01-0041-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.01.011

Expression and significance of S100B in peripheral blood mono-nuclear cells from patients with psoriasis vulgaris

Yao Wanyu, Tang Xiusheng

(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and significance of S100B in peripheral blood mono-nuclear cells (PBMC) from patients with psoriasis vulgaris. **Methods** Thirty-five patients with psoriasis vulgaris (psoriasis group) cared at our hospital from March 2016 to October 2017 and 17 normal controls (normal control group) were recruited in this research. A real-time PCR was used to detect the expressions of S100B mRNA and STAT3 mRNA in the peripheral blood mono-nuclear cells from both of the psoriasis group and the normal control group, meanwhile the S100B protein expression in PBMC of the two groups were detected by flow cytometry. Pearson correlation coefficient was applied to analyze correlation between S100B and psoriasis area and severity index (PASI). **Results** The relative expression of S100B mRNA in PBMC of the psoriasis group was (0.057±0.004), and it was (0.043±0.003) in the normal control group, comparison between the two groups showed that there was statistical difference ($t = 14.322, P < 0.001$). The relative expression of STAT3 mRNA in PBMC of the psoriasis group was (0.758±0.067), and it was (0.418±0.035) in the normal control group, comparison between the two groups showed that there was statistical difference ($t = 23.954, P < 0.05$). Pearson correlation coefficient analysis results showed that S100B had obvious association with PASI. The S100B protein expression in PBMC of the psoriasis group was significantly higher than that of the normal control group. **Conclusion** The expressions of S100B and STAT3 in PBMC from patients with psoriasis vulgaris are abnormally elevated. S100B may be involved in the genesis and development of psoriasis vulgaris by regulating STAT3.

Key words: psoriasis; S100B; STA3; mRNA

银屑病是一种多基因遗传背景下的慢性复发性皮肤疾病,同时也是一个以 T 细胞介导为主的自身免疫性疾病^[1]。银屑病以表皮过度增殖和真皮慢性炎症为特征,尽管对其病理学的理解上取得了较大进展,但其

确切的发病机制尚不清楚。

S100 家族是一个低分子量蛋白质,主要存在于星形胶质细胞及中枢神经系统的少突胶质细胞群^[2]。它们仅在脊椎动物中发现,至少有 25 名 S100 家族成员

在人类中得到证实^[3]。S100B蛋白通常存在于表皮的朗格汉斯氏细胞和黑素细胞以及真皮层的施旺细胞、感觉小体和汗腺。另一方面,该蛋白也会异常表达于黑素细胞病变中,例如表现为痣和黑素瘤转移^[4]。一般来说,它一般表达在树突状细胞和神经源性细胞。也有报告指出在胃肠癌、神经系统疾病、脑血管或心血管缺血性疾病中发现循环 S100B 的表达水平增加^[5]。另据报道,S100B 在银屑病皮损中的表达也明显增高^[6]。

最近,多项研究已经证明信号转导和转录激活因子(Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT)3 已成为银屑病和银屑病样炎性疾病发病机制中的关键参与者^[7]。实际上,在涉及银屑病起始和维持的几乎所有细胞类型中已经报道了 STAT3 超活化^[8],并且该因子介导涉及疾病发病机制的大多数细胞因子的信号,包括 IL23/IL17/IL22^[7,9],这与 STAT3 在 Th17 淋巴细胞以及 Th17 细胞因子 IL-6, IL-23 和 IL-22 中发挥的突出作用是一致的^[10]。我们猜测,STAT3 在银屑病中发挥如此重要的作用,除了通过与上述细胞因子的相互调节促进,是否存在其他调节作用方式?

在本研究中,我们对 35 例寻常型银屑病患者外周血单个核细胞(PBMC)中 S100B 的蛋白与 mRNA 表达水平和 STAT3 的 mRNA 表达水平进行研究,探讨 S100B 在寻常型银屑病发病中的可能作用及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2016 年 3 月—2017 年 10 月来我院诊治的 35 例寻常型银屑病患者,均符合寻常型银屑病的诊断标准^[11]。其中男 22 例,女 13 例,年龄 14~69 岁,平均(35.28±3.17)岁;病程 3 个月~8 年;35 例中 24 例为首发患者,未曾接受过任何治疗,所有患者近 3 个月内未系统服用糖皮质激素、免疫抑制剂等。根据银屑病皮损面积和严重指数评分(psoriasis area and severity index, PASI)对所收集的银屑病患者进行评分。为保证 PASI 评分的一致性和客观性,所有患者的 PASI 评分均由同一实验者完成。正常对照组:正常健康人 17 例,其中男 9 例,女 8 例,年龄 18~53 岁,平均(34.75±2.55)岁,均无免疫系统疾病及相关家族史,应激状态(如哺乳、妊娠及长期服用避孕药等)不予以入组。两组间年龄、性别上差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。本实验经我院伦理委员会批准,入选患者均已签署知情同意书。正常对照组以及银屑病患者组在入组当天采集静脉血 4 ml,肝素抗凝。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	n	男女性别比(%)	年龄(岁)
银屑病患者组	35	169.23	35.28±3.17
正常对照组	17	112.50	34.75±2.55
t/χ^2		0.467	0.589
P		>0.05	>0.05

1.2 实验试剂与材料 淋巴细胞分离液(GE 公司),磷酸盐缓冲液(PBS,索莱宝科技有限公司),FACS Calibur 流式细胞仪(BD),S100B 流式抗体(Invitrogen 公司),CD8 流式抗体(biolegend 公司),Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor[®] 488 二抗(Invitrogen 公司),Pharmingen 固定/破膜试剂盒(BD)。Trizol 购自 Amnion 公司,逆转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒和 SYBR[®]Premix Ex TaqTM(TliRNaseHPlus)(日本 Takara 公司),S100B 和 GAPDH 的引物均购自博尚生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PBMC 的分离 选取纳入研究对象外周静脉血 4 ml,加入 PBS 4 ml,稀释混匀。采用 Ficoll 密度梯度离心法,用淋巴细胞分离液分离 PBMC,得到 PBMC 后将细胞分成两等份。一份加入 1 ml Trizol,吹打均匀,样本于-80℃冰箱冻存。另一份移至流式管中。

1.3.2 实时定量 PCR 检测 S100B mRNA 表达水平

1.3.2.1 总 RNA 的抽提 注意在无酶条件下抽提总 RNA。用氯仿除去蛋白,乙醇沉淀 RNA,加入 DEPC 水,紫外分光光度法检测 RNA 浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$),计算 A260/A280 比值。每份样品取 1 μg RNA 用于后续实验。

1.3.2.2 逆转录反应和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 将 RNA 从冰箱取出,应用逆转录试剂盒按操作说明书进行逆转录。然后依照 SYBR[®]Premix Ex Taq[™](日本 Takara 公司)试剂说明书进行实验操作。设计 Real-time PCR 目的及内参 GAPDH 上下游引物。

1.3.3 流式细胞仪检测 实时定量 PCR 检测银屑病患者与正常对照组 PBMC 中 S100B 蛋白表达水平调整细胞数为每管 5×10^5 ,标记流式管,同型对照管加 IgG1-APC 5 μl ,检测管加 CD8-APC 5 μl 单抗,4℃避光标记 30 min。每管加入磷酸盐缓冲液 1 ml,离心洗涤 1 次后,使用破膜试剂盒固定破膜。然后同型对照管加 IgG1-FITC、检测管加 S100B 抗体各 1 μl ,室温避光孵育 1 h。PBS 洗涤后,再加入相应二抗孵育 1 h, PBS 再次洗涤重悬细胞,等待上机测定。最后采用流式细胞仪检测不同组别外周血中 S100B 表达情况,同

时采用 Flowjo 软件对所得数据进行分析处理。

1.4 统计学方法 用 SPSS 17.0 for windows 统计软件分析数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较均采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。采用皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient)分析其相关性, $P < 0.05$ 即认为具有相关性。

2 结果

2.1 外周血 PBMC 中 S100B 的转录水平及相关性分析 银屑病患者组外周血中 S100B mRNA 的相对表达值为 (0.057 ± 0.004),正常对照组为 (0.043 ± 0.003),两组比较差异有统计学意义 ($t=14.322, P < 0.001$),见图 1A。其中,通过相关性分析可知 S100B

的表达与 PASI 相关 ($R^2=0.1253, P=0.0369$),见图 1B。银屑病患者组外周血中 STAT3 mRNA 的相对表达值为 (0.758 ± 0.067),正常对照组为 (0.418 ± 0.035),两组比较差异有统计学意义 ($t=23.954, P < 0.05$),见图 1C。

2.2 外周血 PBMC 中 S100B 蛋白的表达情况 通过流式分析,我们首先圈选出淋巴细胞,再圈选出 CD8 细胞(见图 2A,图 2B),最后在圈选出来的 CD8 细胞中比较 S100B 蛋白的表达。正常对照组外周血 PBMC 中 S100B 蛋白的表达显著低于银屑病患者组(见图 2C,图 2D)。具体统计学分析结果(见图 2E)。

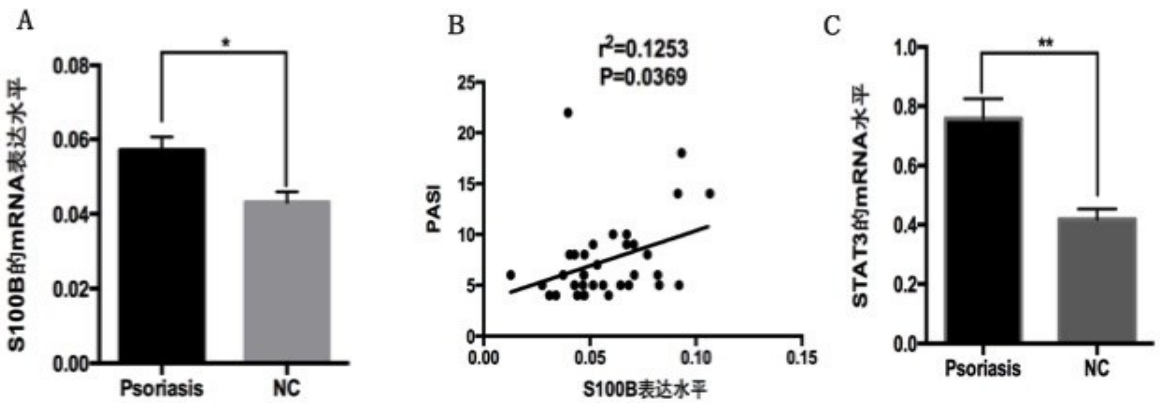


图1 外周血 PBMC 中 S100B 的转录水平及相关性分析

注:A:S100B在银屑病和正常对照外周血单核细胞中的 mRNA 的表达情况;B:S100B和 PASI 的相关性分析;C:STAT3在银屑病和正常对照外周血单核细胞中的 mRNA 的表达情况

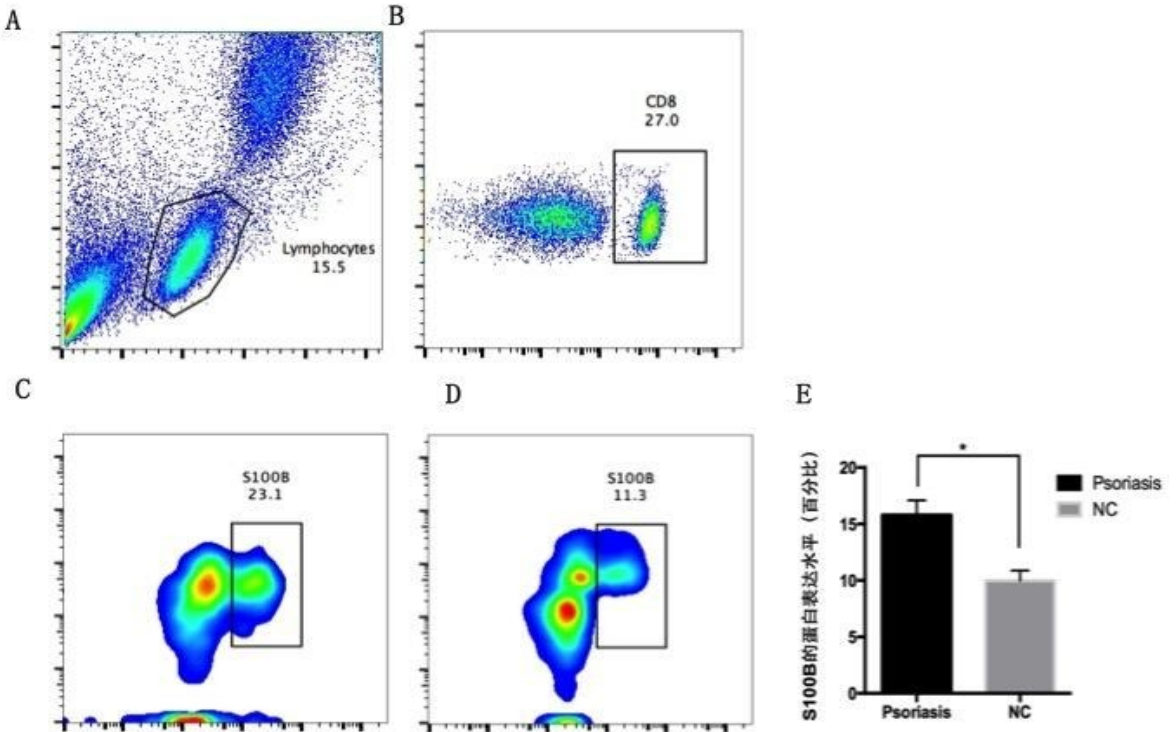


图2 外周血 PBMC 中 S100B 蛋白的表达情况

注:A和B:显示流式分析方式,先圈选淋巴细胞,再圈选出 CD8 细胞;C和D:S100B在银屑病(图 2C)和正常对照(图 2D)外周血单核细胞中的表达情况;E:流式数据的统计学分析结果

3 讨论

Salem SAM 等^[6]报道,在银屑病患者皮损中,通过免疫组化证明 S100B 的表达较正常人明显增高。也有报道指出^[12],银屑病和 S100B 可能有着潜在的关联,特别是血清中的 S100B 可能与一些皮肤细胞有关,比如单核细胞/巨噬细胞,淋巴细胞和嗜中性粒细胞密切相关。因此本研究通过实时定量反转录 PCR 和流式细胞仪的方法对寻常型银屑病患者外周血中 PBMC 的 S100B 的 mRNA 和蛋白表达水平进行检测,与对照组相比,寻常型银屑病患者外周血中 PBMC 的 S100B 的表达水平明显增强。我们的研究与上述的研究结论较为一致,而且说明 S100B 可能在银屑病的发生发展中起着重要的作用。据文献报道,在神经胶质瘤条件培养基下培养的间充质干细胞加入 RAGE 阻滞剂 FPS-ZM1,从而阻断 S100B-RAGE 相互作用,减弱 S100B 诱导的 Akt1, STAT3 激活,抑制了其细胞增殖,迁移和侵袭行为^[13]。而在恶性黑色素瘤中,S100B 可通过 P90 核糖体 S6 激酶(RSK)及其磷酸化、转录因子 CREB 的活化对 IL-6/STAT3 信号通路产生影响,进而影响恶性黑色素瘤的发生、发展^[14]。同样,我们发现在银屑病患者外周血中 S100B 以及 STAT3 的表达都显著增高,而越来越多的研究证明,STAT3 在银屑病的发生发展中起着关键的作用^[7,15-17]。而我们证明在银屑病中 S100B 的增高,调控其下游基因 STAT3 表达增高。据报道 STAT3 已经涉及银屑病发病机制的大多数细胞因子的调控,包括 IL-23/IL-17/IL-22 轴^[18]。所以,我们推测,S100B 可能通过调控 STAT3,继而影响 IL-23/IL-17/IL-22 的表达,在银屑病的发生发展中起着重要的作用。

另外,关于 S100B 如何在银屑病中行使具体功能的,目前考虑可能还和压力有关。目前有数个关于银屑病、S100B 和应激状态相关的研究已经被报道^[19]。一方面,应激作为银屑病发病机制中的一个重要促发因素已经得到了很好的研究^[20]。另一方面,当大鼠处于应激状态时,血浆中 S100B 的表达会升高。据悉 S100B 有营养神经和保护神经作用,其在应激状态下体内的释放可能归因于中枢神经系统的生理作用^[19]。应激对 S100B 的作用可能是通过应激诱导促肾上腺皮质激素(ACTH)水平升高或改变脑组织内细胞外 5-羟色胺(5-HT)的表达水平^[21-23]。还有一个关于 S100B-银屑病的可能机制是 TNF- α 。TNF- α 是一种在银屑病中上调的重要细胞因子^[20]。有报道,血清 S100B 可能是诱导循环单核细胞炎症基因表达所必需的。它也

可能涉及巨噬细胞中晚期糖基化终产物(RAGE)的受体,从而刺激局部炎症反应和释放 TNF- α ^[24]。总之,这些都是 S100B-银屑病轴的可能机制,也是我们今后的研究重点。

参考文献:

- [1] Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells[J]. *Nature Immunology*, 2009, 10(8): 864-871.
- [2] Hattinger E, Zwicker S, Ruzicka T, et al. Opposing functions of psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in epithelial carcinogenesis[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2013, 13(4): 588-594.
- [3] Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family[J]. *Biochemical Journal*, 2006, 396(2): 201-214.
- [4] Böni R, Burg G, Doguoglu A, et al. Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions[J]. *Br J Dermatol*, 1997, 137(1): 39-43.
- [5] Undén J, Christensson B, Bellner J, et al. Serum S100B levels in patients with cerebral and extracerebral infectious disease[J]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2004, 36(1): 10.
- [6] Salem SAM, El-Khateeb EA, Harvy M, et al. Study of serum levels and skin expression of S100B protein in psoriasis[J]. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 2017, 92(3): 323-328.
- [7] Calautti E, Avalle L, Poli V. Psoriasis: A STAT3-Centric View[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): E171.
- [8] Deenick EK, Avery DT, Chan A, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(12): 2739-2753.
- [9] Wan CK, Andraski AB, Spolski R, et al. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4⁺ T cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(30): 9394-9399.
- [10] Camporeale A, Poli V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2012, 17: 2306-2326.
- [11] 张学军. 皮肤性病学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 141-144.

- [12] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2009, 1793(6):1008-1022.
- [13] Tan B, Shen L, Yang K, et al. C6 glioma-conditioned medium induces malignant transformation of mesenchymal stem cells: Possible role of S100B/RAGE pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1):78-85.
- [14] Alasady MJ, Adipietro KA, Pierce AD, et al. Abstract 315: S100B regulates IL-6 signaling via the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) in malignant melanoma[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(13 Supplement):315.
- [15] 席建元, 温柔, 陈偶英, 等. 基于 STAT3/Survivin 信号通路探讨银屑平丸对寻常型银屑病的干预作用[J]. *中医药导报*, 2016, 22(11):20-23.
- [16] 陈曦, 李玲玲, 张淘田, 等. 寻常型银屑病患者皮损中 IL-22 与 IL-22R1、STAT3、c-myc 的 mRNA 表达及关系研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(8):529-531, 555.
- [17] 王慧琴, 唐红, 吴晶, 等. Sox 2 和 STAT3 在寻常型银屑病患者皮损中的表达及意义[J]. *职业与健康*, 2017, 33(1):41-43, 47.
- [18] Tokura Y, Mori T, Hino R. Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases[J]. *Journal of Uoeh*, 2010, 32(4):317-328.
- [19] Scaccianoce S, Del Bianco P, Pannitteri G. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein[J]. *Brain Research*, 2004, 1004(1-2):208-211.
- [20] Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2002, 46(1):1-23.
- [21] Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology[J]. *Brain Research*, 1990, 528(1):155-158.
- [22] Carrasco GA, van de kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 463(1-3):235-272.
- [23] Stroth N, Svenningsson P. S100B interacts with the serotonin 5-HT₇ receptor to regulate a depressive-like behavior[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(12):2372-2380.
- [24] Khan MI, Su YK, Zou J, et al. S100B as an antagonist to block the interaction between S100A1 and the RAGE V domain[J]. *PLOS One*, 2018, 13(2):e0190545.

收稿日期:2018-01-01

(上接第 40 页)

- [6] 方东行, 何立群, 郑贤国. 中医药治疗慢性间质性肾炎研究概况[J]. *中医学报*, 2015, 30(9):1357-1359.
- [7] 郭正勇, 许洪涛, 朱微. 不同剂量氯沙坦对糖尿病肾病患者尿 TGF-1 及 8-OHdG 的影响[J]. *安徽医学*, 2016, 37(5):509-512.
- [8] 赵元明, 李新建, 马生聘, 等. 联合检测尿中 NGAL、mAlb、 α 1-MG 在糖尿病肾病中的早期诊断价值[J]. *中华全科医学*, 2015, 13(10):1678-1680.
- [9] 王依屹, 张珏, 鲁传翠, 等. 血清 NGAL、CysC 和尿 NAG 联合检测在糖尿病肾病诊断中的临床意义[J]. *检验医学*, 2015, 30(11):1096-1099.
- [10] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(10):2534-2543.
- [11] Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects the severity of renal impairment in subjects affected by chronic kidney disease[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(4):255-258.
- [12] 刘渊彬, 关彤, 张明英, 等. 基于尿液生物学标记物评价昆母汤联合激素治疗狼疮性肾炎疗效研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(2):212-215.
- [13] Jadot I, Colombaro V, Martin B, et al. Restored nitric oxide bioavailability reduces the severity of acute-to-chronic transition in a mouse model of aristolochic acid nephropathy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8):e0183604.
- [14] Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, et al. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Chronic Interstitial Nephritis*[J]. *Am J Kidney Dis*, 2016, 5(2):287-298.
- [15] Orantes-Navarro CM, Herrera-Valdés R, Almaguer-López M, et al. Toward a Comprehensive Hypothesis of Chronic Interstitial Nephritis in Agricultural Communities[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2017, 24(2):101-106.

收稿日期:2017-11-08;修回日期:2017-12-19