

# 应用免疫组化方法检测天疱疮患者 皮肤组织热休克蛋白 70 的临床研究<sup>\*</sup>

黄芳<sup>1a</sup>, 靳耀峰<sup>1b</sup>, 卢杰<sup>1a</sup>, 李思鹏<sup>1a</sup>, 张婷<sup>1a</sup>, 冯义国<sup>1c</sup>, 陈静宏<sup>2</sup>, 耿燕<sup>1a</sup>

(1. 西安交通大学第二附属医院 a. 检验科; b. 病理科; c. 皮肤科, 西安 710004; 2. 西安交通大学环境与疾病相关教育部重点实验室暨卫生部微量元素与地方病重点实验室, 西安 710048)

**摘要:**目的 通过对天疱疮患者皮肤组织热休克蛋白 70(HSP70)蛋白表达水平的测定,探讨 HSP70 在皮肤组织表达与天疱疮发病的关系,为进一步阐明天疱疮的发病机制提供新的理论依据。**方法** 采用免疫组化方法测定 62 例天疱疮患者皮肤组织 HSP70,以正常皮肤组织作为对照进行 HSP70 测定。**结果** 天疱疮患者水泡部位 HSP70 表达阳性细胞数 > 75%,相比正常皮肤 HSP70 的表达差异有统计学意义( $Z=5.42, P<0.01$ ),天疱疮患者炎症部位 HSP70 表达阳性细胞数 > 50%,相比正常皮肤 HSP70 的表达差异有统计学意义( $Z=4.73, P<0.01$ )。**结论** 天疱疮患者水泡部位以及水泡附近炎症细胞 HSP70 的异常增高表达,为 HSP70 参与天疱疮疾病的发生和发展提供了直接的证据。

**关键词:**天疱疮;热休克蛋白 70;发病机制

中图分类号:R758.66;R446.8 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)03-082-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.022

## Clinical Study on Heat Shock Protein 70 in Skin Tissue of Patients with Pemphigus by Immunohistochemistry

HUANG Fang<sup>1a</sup>, JIN Yao-feng<sup>1b</sup>, LU Jie<sup>1a</sup>, LI Si-peng<sup>1a</sup>, ZHANG Ting<sup>1a</sup>, FENG Yi-guo<sup>1c</sup>,

CHEN Jing-hong<sup>2</sup>, GENG Yan<sup>1a</sup> (1a. Department of Clinical Laboratory;

1b. Department of Clinical Pathology; 1c. Department of Dermatology,

the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

2. Institute of Endemic Diseases, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Ministry of Education, Key Laboratory of Environment and Gene Related Diseases, Xi'an 710048, China)

**Abstract:** Objective This study was performed to investigate the levels of HSP70 in tissue in pemphigus as a possible new theoretical basis for further elucidate the pathogenesis of pemphigus. **Methods** The expression of HSP70 in 62 patients with pemphigus was determined by immunohistochemistry, and the normal skin was taken as control. **Results** The results showed that the positive cells of HSP70 > 75% in the blisters of pemphigus vulgaris and the positive cells of HSP70 > 50% in the inflammatory cells near the blisters, and the expression of HSP70 was significantly higher than that in normal skin, which was statistically significant ( $Z=5.42, 4.73, P<0.01$ ). **Conclusion** The abnormal expression of HSP70 in inflammatory cells and psoriasis of pemphigus patients showed that HSP70 is involved in the pemphigus.

**Keywords:** pemphigus; heat shock protein 70; pathogenesis

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是机体细胞在受到各种物理的、化学的刺激后高效表达的一组蛋白质多肽,1962年 Ritossa 首先在果蝇幼虫的动物实验中发现<sup>[1]</sup>, HSP 的功能包括“分子伴侣”、参与抗原提呈加工、协同免疫及自身免疫<sup>[2,3]</sup>,可能与自身免疫病有关<sup>[4]</sup>。其中 HSP70 的生物学作用尤其重要<sup>[5]</sup>。

作为自身免疫性疾病中的一种,天疱疮是一种慢性、复发性、严重的表皮内棘刺松解性大疱性皮

肤病。天疱疮主要分四型:寻常型天疱疮、增殖型天疱疮、落叶型天疱疮、红斑型天疱疮。寻常型(pemphigus vulgaris, PV)和落叶型(pemphigus foliaceus, PF)是最常见的根本侵害类型。此研究将应用免疫组化方法检测天疱疮患者水泡及周围炎症部位 HSP70,探讨 HSP70 在天疱疮发病中的临床意义。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集西安交通大学第二附属医院

<sup>\*</sup> 基金项目:陕西省卫生厅科研基金(2012D67)。

作者简介:黄芳(1968—),女,硕士,副主任技师,研究方向:自身免疫病的检测, Tel:029-87679344, E-mail:huangfang135720@163.com。

通讯作者:陈静宏, E-mail: jixiang46@163.com。

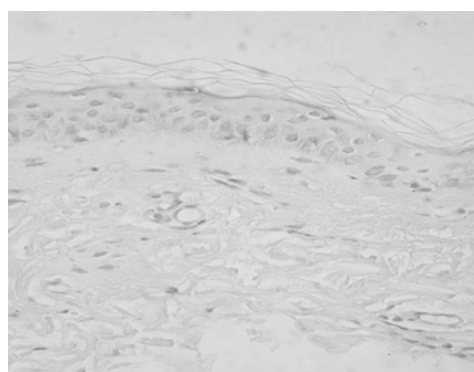
耿燕, E-mail: wsw87679358@163.com。

皮肤科 2011 年 1 月~2013 年 9 月具有完整信息天疱疮患者病理标本共 62 例。包括 24 例落叶型天疱疮(PF)、34 例寻常型天疱疮(PV)以及增殖型和红斑型各 2 例,去掉增殖型和红斑型天疱疮,主要对 24 例落叶型天疱疮(PF)和 34 例寻常型天疱疮(PV)进行研究。

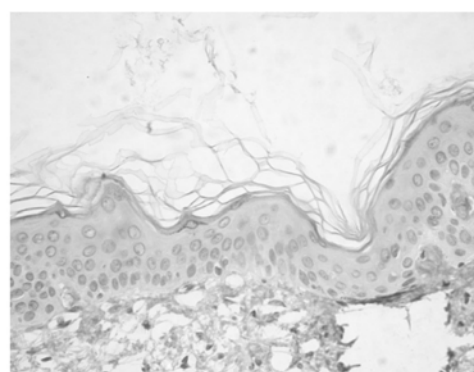
62 例天疱疮患者中男性 35 例,女性 27 例,寻常型天疱疮(PV)男女构成比 18:16,落叶型天疱疮(PF)男女构成比 13:11。62 例患者中发病年龄 17~88 岁,平均年龄 52.5 岁。病程 2 月~11 年,平均 17.8 个月。同时以 20 例健康皮肤作为对照,对照组年龄 17~68 岁,平均年龄 51.2 岁,男性 12 例,女性 8 例。天疱疮患者与健康对照在年龄、性别方面进行统计学检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**1.2 仪器和试剂** 分别取天疱疮患者病变皮肤组织 62 例和外科手术患者正常皮肤组织 20 例,用冰冷的生理盐水洗去组织上附着的血液和其他粘连组织,处理完后,将皮肤组织于 4ml/dl 多聚甲醛中固定,时间 12~36 h,视组织块的大小而定。固定好后,进行脱水透明制成蜡块备用。

**1.3 方法** 将收集的天疱疮标本脱水后,进行石蜡包埋,制成切片。一张切片进行 HSP70 的测定,一抗 HSP70 免疫组化试剂盒购自 epitomics 公司(美国),二抗试剂盒和 DAB 显色剂购自中山生物(北京)。严格按照试剂说明进行免疫组化操作。每份标本同时做 1 张 HE 染色。染色封片后,在光学显微镜下观察各组相同部位组织的变化情况,并拍摄照片。



A



B

图 1 正常人皮肤 HE(A)和 HSP70(B)染色

**2.2 天疱疮水泡部位皮肤 HSP70 表达水平** 天疱疮患者 HSP70 阳性产物主要分布于天疱疮皮肤细胞核内,可发现天疱疮水泡部位皮肤角质形成细胞,包括基底层细胞、棘细胞层细胞和颗粒层, HSP70 表达阳性细胞数  $> 75\%$ ,显著高于正常皮

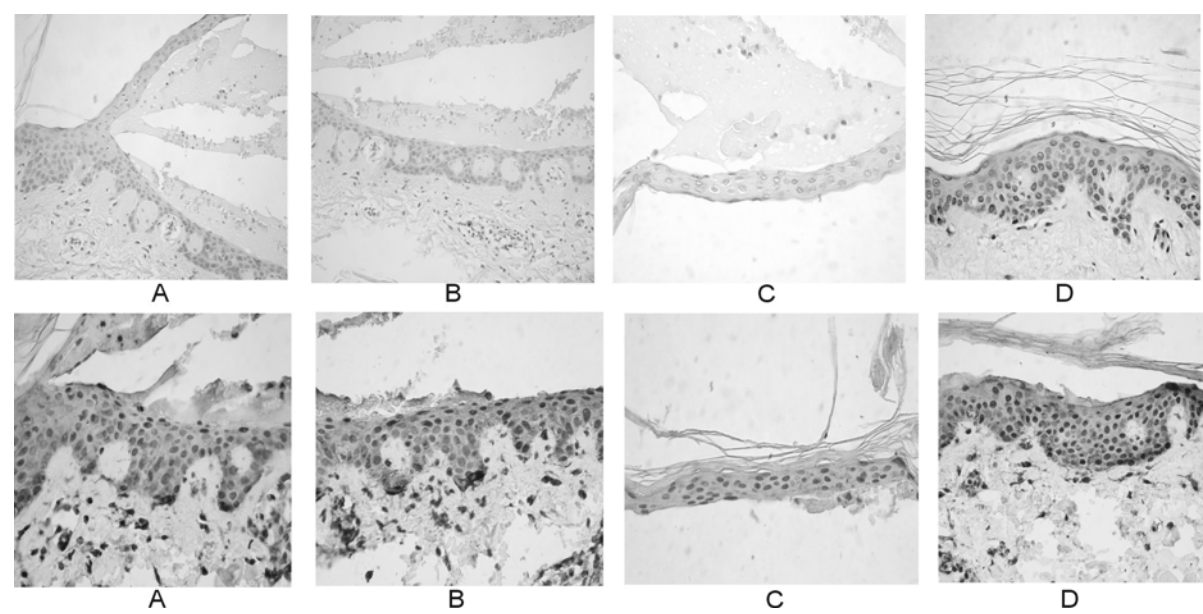
免疫组织化学结果评定:光镜下观察,天疱疮标本细胞核着黄色或棕黄色为阳性细胞;无着色为阴性细胞。根据 Volm 等<sup>[6]</sup>评判标准:①选染色均匀的病变区域,在 200 倍视野下计数阳性细胞占视野细胞总数的百分数,共计数 5 个视野,取平均值。以着色阳性细胞占视野细胞总数的百分数分 0~4 级,0 级: $< 5\%$ ;1 级: $5\% \sim 25\%$ ;2 级: $26\% \sim 50\%$ ;3 级: $51\% \sim 75\%$ ;4 级: $76\% \sim 100\%$ 。②按着色强度分为 0~3 级,0 级:无着色;1 级:浅黄色;2 级:深黄色;3 级:棕黄色。按①②值之两组计分相加所得总分分为 4 级,0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(±),4~5 分为阳性(+),6~7 分为强阳性(++)。

**1.4 统计学分析** 数据分析应用 SPSS 18.0 统计软件。由于本实验数据为非正态分布,天疱疮表达数据的比较采用 Mann-Whitney 秩和检验(正态近似法)。

## 2 结果

**2.1 正常人皮肤 HSP70 表达水平** 人皮肤组织制成切片后,进行 HE 染色和 HSP70 免疫组化染色,光镜下  $20 \times 10$  倍观察、照相。结果见图 1。HE 染色正常皮肤由表皮和真皮组成,表皮中角质形成细胞根据不同的发展阶段分为基底层、棘细胞层、颗粒层和角质层,细胞形态由基底层的圆柱状向表层分化为棘细胞层的多角形,逐渐变为角质层扁平细胞,内含嗜碱性颗粒,真皮由致密的纤维、基质和各型细胞组成。正常皮肤少有 HSP70 棕黄色颗粒出现,主要分布在表皮基底层细胞的细胞质内。

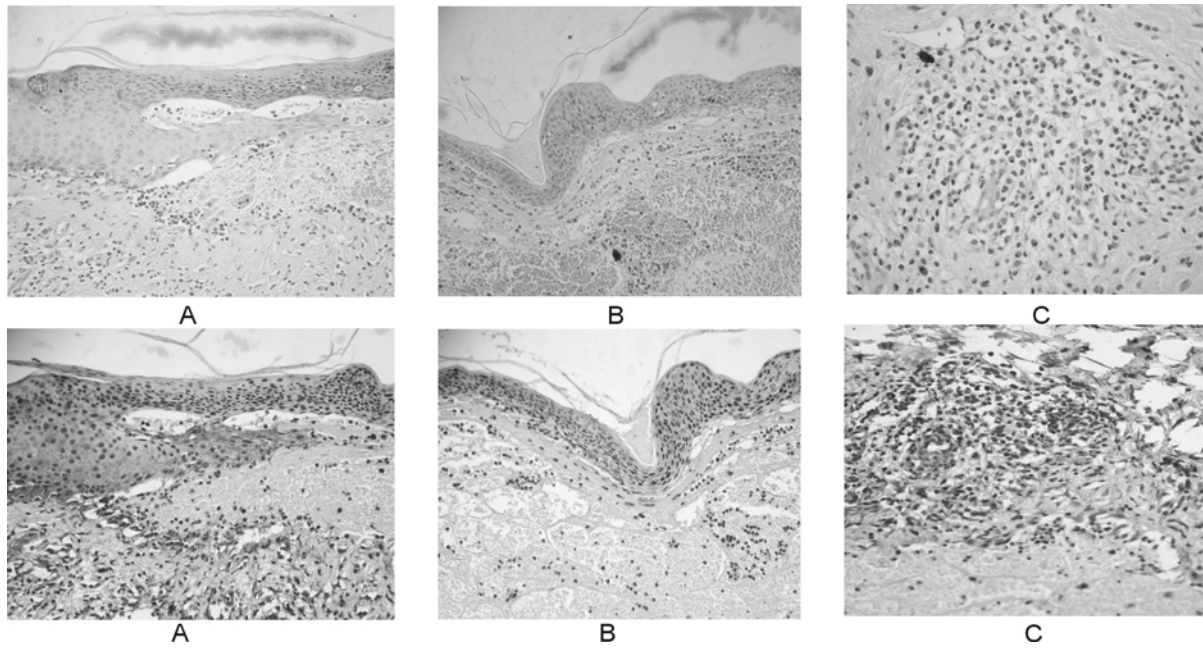
肤 HSP70 的表达。不仅如此,水泡临近区域皮肤虽然未见液体渗出,水泡形成,但其各层角质形成细胞 HSP70 表达  $> 50\%$  均显著高于正常皮肤 HSP70。见图 2。



A:水泡形成交接区皮肤组织;B:水泡底部皮肤组织;C:水泡顶部皮肤组织;D:水泡顶部皮肤组织。

图 2 天疱疮水泡部位及皮肤表皮细胞 HE(上)和 HSP70 染色(下)

2.3 天疱疮水泡附近炎细胞 HSP70 表达水平 包括淋巴细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞,这些炎  
在水泡内及其真皮内可见大量炎细胞渗出和浸润, 细胞核有大量棕黄色颗粒出现>50%。见图 3。



A:水泡形成交接区皮肤组织和渗出的炎细胞;B: 渗出液内的炎细胞;C:真皮内浸润的炎细胞。

图 3 天疱疮皮肤炎细胞 HE(上)和 HSP70 染色(下)

2.4 三组 HSP70 在天疱疮上皮的表达 统计结  
果表明,天疱疮水泡部位 HSP70 含量与正常皮肤  
HSP70 相比差异有统计学意义( $Z=5.42, P<$   
 $0.01$ ),天疱疮炎性细胞 HSP70 含量与正常皮肤  
HSP70 相比差异有统计学意义( $Z=4.73, P<$   
 $0.01$ ),见表 1。

表 1	三组 HSP70 在天疱疮上皮的表达 (n)		
HSP70	天疱疮水泡部位	天疱疮炎性细胞	正常皮肤
—	7	3	16
±	7	4	2
+	28	13	1
++	20	8	1
合计	62	28	20

3 讨论 HSP70在天疱疮水泡部位局部的表达,据文献来看尚未有报道。因此,应用免疫组化方法检测天疱疮患者皮肤组织 HSP70 的临床研究,有助于进一步了解天疱疮的致病原因,从而有助于天疱疮疾病的诊断、治疗及预后。

自身免疫病的发病机理尚未清楚,据文献报道,在类风湿性关节炎<sup>[7]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[4]</sup>、系统性硬化症<sup>[4]</sup>、胰岛素依赖性糖尿病<sup>[8]</sup>、自身免疫性内耳病<sup>[9]</sup>等自身免疫性疾病中,都可以在患者血清中检测出高水平的 HSP70 自身抗体。既往研究发现,天疱疮皮损处表皮和真皮中 T 细胞、单核-巨噬细胞浸润显著多于周围皮肤,而且活化 T 细胞增多,显示天疱疮发病中同时存在体液免疫和细胞免疫紊乱。已有文献独家报道<sup>[10]</sup>在天疱疮患者外周血及单个核细胞均可检测到高水平的 HSP70 及其抗体,那么在天疱疮水泡部位是否也有 HSP70 高表达是此文的研究重点。

该研究发现在天疱疮患者水泡部位及其邻近皮肤角质形成细胞,包括基底细胞、棘细胞和颗粒细胞,均可检测到高水平的 HSP70 在细胞核的表达,同时病变皮肤渗出的炎细胞以及真皮内浸润的炎细胞也有高水平的 HSP70 表达。而正常皮肤少有棕黄色颗粒出现,且主要分布在细胞质,细胞核表达很少。该研究结果为 HSP70 参与天疱疮疾病的发生和发展提供了直接的证据。由此可推测内源性或者外源性诱因,刺激皮肤角质形成细胞处于应激状态,使 HSP70 大量产生,并移入表皮角质形成细胞细胞核内,和单个核细胞高表达的 HSP 蛋白一起,释放到细胞外,向天然免疫系统的细胞,尤其是抗原递呈细胞发出警告信号,使其释放各种细胞因子;同时细胞外 HSP70 可以与抗原肽结合,递呈抗原,激活 T 细胞,进一步促进释放细胞因子,进而活化 B 细胞,产生自身抗体,即 HSP70 抗体,该抗体和皮肤表皮角质形成细胞内 HSP70 结合,启动病变皮肤组织发生免疫应答,病变皮肤渗出的炎细胞以及真皮内浸润的炎细胞也有高水平的 HSP70 的表达,进一步刺激各种细胞因子如 IL-1 和 TNF- $\alpha$  的产生,大量的炎症细胞浸润和激活,会释放蛋白水解酶,引起真表皮连接部位的重要蛋白结构受损,最终导致表皮下水疱的发生,加重了皮肤渗出和糜烂、水疱和大疱形成,引起天疱疮的发生和加重。

该研究进一步证实在天疱疮患者皮肤角质形成细胞高表达 HSP70,已知天疱疮患者外周血及单个核细胞均可检测到高水平的 HSP70 及其抗体<sup>[10]</sup>,从而证实 HSP70 全程参与了天疱疮疾病的发生。可能的病因是感染等诱因引起天疱疮外用

血单个核细胞和皮肤角质形成细胞合成 HSP70 增加,引起天疱疮患者外周血血清 HSP70 含量升高。因为机体内源性 HSP70 和病原体 HSP70 有高度同源性,因而产生出针对 HSP70 的抗体即抗 HSP70 抗体,发生抗原抗体超敏反应的同时导致机体产生自身免疫反应,从而使皮肤角质细胞特别是棘细胞成为免疫应答对象,引起天疱疮的病变。

#### 参考文献:

- [1] Ritossa FA. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila[J]. *Experientia*, 1962, 18(12): 571-573.
  - [2] Carsillo T, Carsillo M, Traylor Z, et al. Major histocompatibility complex haplotype determines HSP 70-dependent protection against measles virus neurovirulence[J]. *J Virol*, 2009, 83(11): 5544-5555.
  - [3] Kim MY, Ma Y, Zhang Y, et al. HSP 70-dependent antiviral immunity against cytopathic neuronal infection by vesicular stomatitis virus[J]. *J Virol*, 2013, 87(19): 10668-10678.
  - [4] Misunová M, Svitáková T, Pleštilová L, et al. Molecular markers of systemic autoimmune disorders: the expression of MHC-located HSP70 genes is significantly associated with autoimmunity development[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2017, 35(1): 33-42.
  - [5] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol from nascent chain to folded protein[J]. *Science*, 2002, 295(5561): 1852-1858.
  - [6] Volm M, Koomagi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 1997, 74(1): 64-68.
  - [7] Goeb V, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, et al. Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(2): R38.
  - [8] Berka N, Bland GN, Erabhauel H, et al. Heat-shock protein gene is not associated with type-1 diabetes in African Americans[J]. *J Natl Med Assoc*, 2007, 99(7): 715-717.
  - [9] El-Kabarity RH (Rania Hamdy El-Kabarity), El-Kabarity RH (Rasha Hamdy El-Kabarity). diagnostic value of serum anti-heat shock protein 70 (anti-HSP70) in cases of autoimmune inner ear disease[J]. *International Advanced Otolaryngology*, 2011, 7(1): 55-61.
  - [10] 黄芳,魏雅凤,纪耀峰,等. 热休克蛋白 70 在天疱疮中的意义[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2015, 8(29): 790-793.
- Huang F, Wei YF, Ji YF, et al. The clinical significance of heat shock protein 70 in pemphigus[J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2015, 8(29): 790-793.

收稿日期: 2017-02-23

修回日期: 2017-03-11