维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)04-0509-04

双重酶标法检测溃疡性结肠炎凋亡上皮细胞 Fas 的表达

严 瑾[1],朱玉娟[2],黄丽彬[1]

(1.四川大学华西医院消化科,成都 610041;2.成都 363 医院,成都 610041)

【摘 要】目的:探讨 Fas/FasL 介导的结肠上皮细胞凋亡在溃疡性结肠炎(UC)发病机制中的作用。方法:明确诊断的 35 例 UC 病人和 15 例对照人群的活检标本分别进行 Fas、FasL 的免疫组化染色,采用 M30 Cytodeath 特异性地检测结肠上皮细胞早期凋亡;对 Fas 及 M30 的表达进行相关性分析。观察连续切片和双重酶标染色中 Fas 和 M30 的共表达关系。结果:UC 组上皮细胞表达 Fas、FasL 及 M30 的水平均比对照组明显增高($P<0.01$);Fas 与 M30 的表达有相关性($P<0.05$);通过连续切片分别染色 Fas 与 M30,以及双重酶标法同时染色 Fas 与 M30,发现 UC 病变肠道凋亡的上皮细胞均为 Fas 表达阳性的细胞。结论:Fas/FasL 介导的结肠上皮细胞过度凋亡可能是 UC 上皮层破坏的机制之一。

【关键词】溃疡性结肠炎;双标染色;Fas;凋亡

【中国图书分类法分类号】R446.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-03-07

Detection of Fas on colonic apoptosis epithelium in ulcerative colitis by double staining immunohistochemistry

YAN Jin, et al

(*Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the role of Fas/FasL-mediated colonic epithelial apoptosis in the pathogenesis of ulcerative colitis (UC). *Methods*: Expression of Fas, FasL and M30(a new epithelium apoptosis marker) antigen on colonic mucosa of 35 patients with UC and 15 control populations were detected by IHC. Each marker was analyzed by image analysis system. Co-expression of Fas and M30 was observed through serial sections and double staining IHC. *Results*: The expression of Fas, FasL as well as M30 in UC increased considerably compared with controls ($P<0.01$). There was correlation between expressions of Fas and M30 in UC. Fas and M30 antigen coexpression was found in sequence slices and double staining IHC slices. *Conclusion*: Fas/FasL-mediated colonic epithelial apoptosis may be one of major causes which lead to damage of the epithelial barrier.

【Key words】Ulcerative colitis; Double staining IHC; Fas; Apoptosis

目前业已证实溃疡性结肠炎(UC)上皮层存在上皮细胞的过度凋亡[1~7]。而诱导病变上皮细胞凋亡的机制却各说不一:有人认为可能通过 Fas/FasL 途径[2,3];有人认为与穿孔素和颗粒酶系统的作用有关[4];有人认为可能是由 TNF-α、NO[6]等介质诱导,或 Bcl-2/Bax 表达失衡所致[7]。本实验通过病理连续切片染色及双重酶标记法,同时检测 Fas 和 M30 抗原在溃疡性结肠炎上皮细胞的表达,探讨 Fas/FasL 介导的结肠上皮细胞凋亡在 UC 发病机制中作用。

作者介绍:严 瑾(1971-),女,讲师,博士,

主要研究方向:胃肠道免疫性及炎症性疾病。

基金项目:四川省科技厅重点科技项目(02sy029-112)。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 UC 组纳入标准 根据"2000 年成都全国炎症性肠病学术研讨会"制订的《溃疡性结肠炎诊断标准》[8]。选择在我院消化内科门诊和住院部明确诊断的 UC 病人 35 例,年龄为 11~65 岁,平均 39.8 岁;病程 1 月~26 年,平均 47 个月。详细问诊、查体,记录生化指标、内镜表现,排除标准:1.诊断不明确的各种结肠炎;2.患有其他严重心、肝、肺、肾疾病者。

1.1.2 对照组纳入标准 1.因健康体检例行肠镜检查者;2.肠镜检查诊断为单发性结肠息肉并除外其他疾病者。总共 15 例,年龄为 30~63 岁,平均 44.7 岁。

1.2 组织学标本

UC 病人选择病变最显著的肠段;对照组病人选择距单

维普资讯 http://www.cqvip.com

发性结肠息肉 5cm 远端的肠段或直肠，各取活检 3 块。标本作组织学检查以明确诊断及组织学分级，分级标准按 Trulove—Richards 分级法[9]。以病变最严重处的分级为代表。

1.3 免疫组化 SP 法检测结肠粘膜 Fas、FasL 以及 M30 的表达

1.3.1 常规免疫组化 SP 法。高压锅法进行抗原修复(M30 采用高 pH 值抗原修复液修复)。一抗 Fas(1∶100)、FasL(1∶80)为 Santa Cruz 公司产品，由北京中山生物制剂有限公司分装；M30 CytoDeath(1∶20，0.1% tween20 PBS 稀释)购自 Boehringer Mannheim 公司。已知结肠癌组织切片作阳性对照，PBS 代替一抗作空白对照，用 DAB 显色。

1.3.2 第一部分 M30 的染色同前(DAB 显色呈棕色)，用含 0.1% tween20 PBS 充分洗涤 20min，滴加双染增强剂 50ul/片孵育 30min 后再同上充分洗涤。血清封闭后滴加第二种一抗(Fas 1∶100)37℃ 孵育 3h(最后采用 NBT/BCIP 显色呈紫色)

1.4 统计学方法

采用四川大学图形图像研究所研制的图像分析仪进行定量分析，每个样品检测有代表性的 5 个高倍视野，计算阳性细胞面积与细胞总面积的比值(×100)，5 个视野的均数即代表该样品的阳性细胞百分率。由 SPSS 软件包进行统计。每组资料采用均数±标准差代表其总体分布。Mann—Whitney U 秩和检验比较正常组和 UC 组两组差异的显著性。spearman 秩和相关检验进行指标之间相关性的统计。双侧检验，$\alpha=0.05$。

连续切片和双重酶标染色由两位病理科教授共同阅片分析。

2 结 果

2.1 原始资料分析

UC 组与对照组患者的年龄、性别比较，差异没有显著性($P>0.05$)。35 例 UC 标本的组织学分级见表 1。

表 1 35 例 UC 标本的组织学分级

	例数	1 级	2 级	3 级
组织学分级	35	3(8.6%)	4(11.4%)	28(80.0%)

2.2 Fas 与 FasL 的表达

无论是正常还是 UC 的病变结肠，其肠腔表面的上皮细胞均有 Fas 表达，且呈连续性分布。而在 UC 病变部位，Fas 可表达于整个结肠隐窝两侧的上皮细胞，甚至达隐窝底部；在活动性 UC，固有层内表达 Fas 的炎性细胞明显增多(图 1)。

在正常结肠中，FasL 的表达仅限于固有层内散在分布的少许单核细胞，且与上皮细胞无明显关系。在 UC 结肠粘膜，固有层内表达 FasL 的细胞数量明显增加，包括浆细胞、淋巴细胞及单核细胞，且紧靠上皮层。

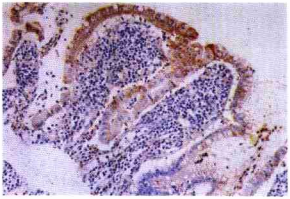


图 1 UC 结肠上皮 Fas 强表达，呈连续性，表达范围可深达隐窝底部。{SP 法×176}

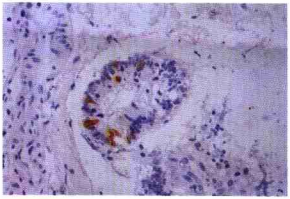


图 2 活动性 UC 结肠上皮，可见数个 M30 阳性凋亡细胞聚集出现，呈灶性分布{免疫组化 SP×400}

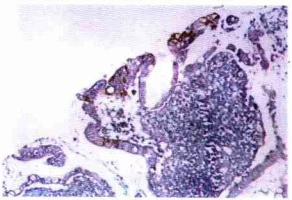


图 3 M30 与 Fas 双标染色：M30 阳性的单个凋亡上皮细胞棕色)位于呈连续性分布的 Fas+上皮细胞层内(紫蓝色)。固有层内可见数个 Fas+淋巴细胞。{双染×704}

正常结肠粘膜 Fas 表达平均为 11.6%±3.1%，UC 结肠粘膜 Fas 的表达平均为 27.1%±2.9%，差异

维普资讯 http://www.cqvip.com

有显著性($P=0.001$)。正常结肠粘膜 FasL 表达平均为 5.3% ±2.4%;UC 结肠粘膜 FasL 表达平均为 16.5% ±3.2%;差异有显著性($P=0.006$)。

2.3 结肠上皮细胞凋亡

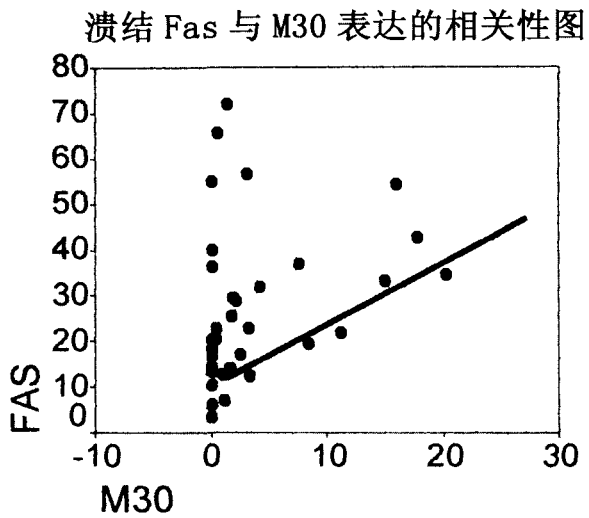


图 4 UC 病变上皮细胞 Fas 和 M30 表达的相关性图($r=0.40$, $P<0.05$)

M30 阳性细胞百分率称为凋亡指数。M30 阳性的早期凋亡上皮细胞有着特征性的细胞浆形态改变:胞浆不规则,形成细长的尾状,胞浆内可见棕黄色粗大染色颗粒。在正常结肠,偶见单个的 M30 阳性凋亡细胞出现在肠腔表面上皮层;而在活动性 UC 结肠上皮,可见数个 M30 阳性凋亡细胞聚集出现,呈灶性分布(图 2);不仅位于肠腔表面,而是整个结肠隐窝的上皮细胞,甚至内陷闭锁的腺腔上皮也可见到成组的凋亡细胞。正常结肠粘膜凋亡指数平均为 0.3% ±0.1%,溃疡性结肠炎凋亡指数平均为 3.5% ±0.95%,两者相比,差异有显著性($P=0.006$)。

2.4 Fas 与 M30 相关性分析

2.4.1 从连续切片看,表达 M30 阳性凋亡的上皮细胞处于 Fas 染色阳性的上皮层。

2.4.2 从双重酶标的图片看,表达 M30 阳性的凋亡上皮细胞单个或呈灶性散在地分布于连续表达 Fas 的上皮层细胞中(图 3)。

2.4.3 UC 结肠粘膜 Fas 的表达与上皮细胞凋亡指数具有相关性($r=0.40$, $P<0.05$),见图 4;而在正常对照组两者则不具有相关性($P=0.897$)。

3 讨 论

近年来消化界一直在致力于探讨 UC 上皮层破坏的机制。通过实验观察[10],结合国内外文献复习,对于活动性 UC 上皮层的损害与上皮细胞过度凋亡的关系已有了比较肯定的看法,但对于具体的凋亡途径还不明确。目前检测凋亡有很多方法[1,2]:DNA 琼脂糖电泳、TUNEL 法、免疫组织化学染色、电镜等均证明在 UC 病变部位上皮细胞凋亡率明显增加。由于本实验的标本来源主要是通过结肠镜取活检,标本量小,因此只能局限于病理学原位检测凋亡的方法。本实验选择 M30 Cytodeath 单抗检测凋亡的原因主要基于以下几点:1. M30 Cytodeath 的作用原理是识别在凋亡过程中被 caspases 裂解的细胞角蛋白 18(CK18),因此可特异性地检测上皮细胞的凋亡。而其他的凋亡检测方法却只能同时检测上皮细胞以及粘膜层其他炎性细胞和淋巴细胞的凋亡,与我们实验的要求不符。2. caspases 裂解 CK18 发生在细胞凋亡过程的早期,此时除了细胞胞浆形态发生变化外,尚未出现 DNA 的断裂和细胞膜不对称性的破坏,因此 M30 与 TUNEL 法及 annexin V 相比,可检测到更早期的凋亡细胞,符合想同时检测 Fas 膜受体表达的要求。但当细胞核完全裂解,TUNEL 法仍为阳性的凋亡细胞,M30 检测却已是阴性了[13]。因此我们发现 M30 检测出的凋亡细胞相对于 TUNEL 法的要少。另外 M30 单抗检测的凋亡细胞形态特殊,易于辨认;M30 检测可用于石蜡包埋标本也是其优点。

本实验用双重酶标法同时检测 Fas 和 M30 的表达,以显示 UC 病变部位上皮细胞的广泛凋亡与 Fas/FasL 的关系。从图 2、3 可以看出,M30 抗原主要是胞浆染色,而 Fas 抗原在胞浆和胞膜均有表达。因此在染色的时候如何区分两种抗原的表达,是我们考虑的重点,也是本实验的难点。我们选择了两种不同的染色系统分别进行染色,M30 选用辣根过氧化物酶(DAB)系统,染色阳性结果呈棕黄色;Fas 选用碱性磷酸酶(NBT/BCIP)显色呈紫色。M30 阳性的凋亡细胞还具有比较典型的胞浆形态学表现,因此较好地区分了这两种抗原。

实验发现,Fas 广泛表达于 UC 上皮细胞胞浆和固有层炎性细胞胞膜,表达程度与对照组相比,差异有显著性($P=0.001$)。分布范围也更广泛,不仅位于肠腔表面,而且深入隐窝中下部及基底部的上皮层呈连续性表达,与 M30 阳性细胞在 UC 的表达部位相一致。UC 结肠粘膜固有层表达 FasL 的细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞数量与对照组相比明显增加,且紧靠上皮细胞。与文献的结果符合[12]。Jorn Strater[2]在体外实验中,以抗-Fas 抗体(其作用类似于 FasL)作用于分离的 UC 结肠上皮细胞,可诱导大量凋亡,因而证实表达 Fas 的 UC 结肠上皮细胞对 FasL 的致凋亡作用是敏感的。

本实验染色切片由两位病理学家单独阅片,均发现连续切片中 M30 阳性凋亡细胞与表达 Fas 的上皮细胞在同一部位。从双标染色可更清楚地看见具有特殊形态的 M30 凋亡细胞,或单个或成簇地出现在连续表达的呈蓝紫色的 Fas 阳性上皮上。不仅在肠腔表面,甚至内陷闭锁的腺腔上皮中的凋亡细胞也是与 Fas 抗原共表达。在连续表达 Fas 的上皮层细胞中,M30 阳性的细胞仅单个或成簇地出现在其中,这说明上皮细胞 Fas 的表达早于凋亡过程中 caspase 对细胞角蛋白 18 的裂解,而且持续的时间更长[8]。统计学分析也发现,UC 结肠粘膜 Fas 的表达与上皮细胞凋亡指数(M30 阳性率)有着确切的相关性($r=0.40$, $P=0.016$)。从表 2 的散点图也可以看出,Fas 和 M30 的表达呈明显的正相关。但由于肠道活检标本较小,石蜡包埋时不能确切地判断标本方向性,因此部分横切或斜切的片子上无法准确检测到肠腔表面上皮的细胞凋亡。将近 1/4 的 UC 标本 M30 表达完全阴性,影响了对相关系数的计算,这是我们今后的实验中应该汲取的教训。尽管如此,我们仍得出了有统计学意义的结论。

本实验还发现 UC 病变粘膜固有层内有大量淋巴细胞表达 Fas 和 FasL,因此淋巴细胞的凋亡在 UC 中的作用,值得我们进一步研究。

综上所述,在 UC 病理过程中部分上皮细胞通过凋亡导致结肠上皮层的缺失脱落,Fas/FasL 致凋亡系统可能在其中起到了一定的作用。

参 考 文 献

[1] Michiko J, Takehiko K, Kazuya M, et al. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis[J]. J Pathol, 1996; 180(2): 152-159.

[2] Strater J, Wellisch I, Riedl S, et al. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis[J]. Gastroenterology, 1997; 113(1): 160-167.

[3] Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, et al. Upregulation of Fas-FasL(CD95/CD95L)-mediated epithelial apoptosis[J]. A putative role in pouchitis? J Surg Res, 2001; 98(1): 27-32.

[4] Lowin B, Hahne M, Mattmann C, et al. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways [J]. Nature, 1994; 370(6491): 650-652.

[5] Michael J. Pinkoski, Nathalie M. et al. Tumor Necrosis Factor alfa up-regulates non-lymphoid Fas-ligand following superantigen-induced peripheral lymphocyte activation. Biol Chem, 2002, 277(44): 42380-42385.

[6] Mesmer UK, Reed JC, Brune B. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis[J]. J Biol Chem 1996; 271(33): 20192-20197.

[7] M Iimura, T Nakamura, S Shinozaki, et al. Bax is down-regulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis[J]. Gut 2000; 47(2): 228-235.

[8] 中华医学会消化病分会. 对炎性肠病诊断治疗规范的建议[J]. 中华消化杂志, 2001; 6(1): 56-59.

[9] Truelove SC, Richards W, CD. Biopsy studies in ulcerative colitis[J]. Br Med J, 1956; 2: 1315-1322.

[10] 严 瑾, 欧阳钦, 陈代云, 等. 溃疡性结肠炎中 Fas/FasL 介导的结肠上皮细胞凋亡[J]. 中华消化杂志, 2001; 21(7): 397-399.

[11] V. Strugala, P. J. Hainsworth, M. K. Bennett, et al. Thickness and continuity of the human colonic mucus layer is decreased in active UC but normal in quiescent UC[J]. Gut, 2001; 48(Suppl I): A82-A90 (March)312.

[12] Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, et al. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis[J]. Gut, 1998; 43(1): 48-55.

[13] Mathie PGL, Wexdy K, Viveka B, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis[J]. J Pathol, 1999; 187(4): 567-572.