维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)02-0134-04

凋亡相关蛋白 Fas/FasL 和 BcL-2 在自身免疫性甲状腺病中的表达及意义

刘 纯[1], 张 徽[2], 李圆圆[2]

(1. 重庆医科大学临床学院内分泌科,重庆 400016;2. 重庆医科大学病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨桥本氏甲状腺炎(HT)及弥漫性毒性甲状腺肿(DTG)细胞凋亡相关蛋白 Fas/FasL 和 BcL-2 的表达及意义。方法:采用免疫组化 S-P 法进行检测 结果:HT 及 DTG 滤泡细胞表达 Fas 蛋白,阳性率分别为 40% 和 60%,正常甲状腺组织滤泡细胞则未见表达。HT 及 DTG 分别与正常甲状腺组织相比有显著差异 $P<0.01$。在正常甲状腺组织,HT 及 DTG 中均有滤泡细胞表达 FasL 和 BcL-2,而 FasL 的表达三者相比均无显著差异。BcL-2 的表达在正常甲状腺组织和 DTG 中较强,而在 HT 中的表达较弱,与正常甲状腺组织和 DTG 相比有显著差异 $P<0.01$。结论:结果提示在 HT 中滤泡细胞通过表达 Fas 和 FasL,经过 Fas 与 FasL 的作用导致部分滤泡细胞凋亡,并通过 BcL-2 表达的减弱,降低了抗凋亡的作用。在 DTG 中由于滤泡细胞通过增强 BcL-2 的表达,从而使得 Fas 和 FasL 介导的滤泡细胞凋亡作用减弱。我们认为凋亡相关蛋白的表达在自身免疫性甲状腺病的发生发展中有重要作用。

【关键词】自身免疫性甲状腺病;Fas/FasL;BcL-2;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R581 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-06-17

Expression and significance of apoptosis-related protein Fas/FasL and BcL-2 in autoimmune thyropathy

LIU Chun, et al

(*Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of apoptosis-related protein Fas/FasL and BcL-2 and their significance in Hashimoto's thyroiditis (HT) and diffuse toxic goiter(DTG). *Methods*: Immunohistochemical staining(S-P method) was used to detect expression of apoptosis-related protein in formalin-fixed and paraffin-embeded tissues from 30 cases of HT, 25 cases of DTG, and 22 normal thyroid tissues. *Results*: Fas-positive thyrocytes were observed in HT and DTG, while expression of Fas protein in normal thyroid tissues was negative. The positive rates of Fas expression were 40% and 60% in HT and DTG respectively, compared with the normal thyroid tissues, there was a significant difference ($P<0.01$). FasL-positive thyrocytes and BcL-2-positive thyrocytes were observed in HT, DTG and the normal thyroid tissues, but there was not a significant difference in intensity of FasL-positive staining ($P>0.05$). Expressions of BcL-2 in normal thyroid tissues and DTG were stronger, while no significant correlation was found between them. In HT the staining of follicles for BcL-2 was very weak, and there was significant difference compared with that in the normal thyroid tissues and DTG. *Conclusion*: Our results suggest that the follicular cells in HT undergo apoptosis through expression of Fas/FasL and interaction between them. The down-regulation of BcL-2 expression in thyrocytes can decrease BcL-2-mediated suppression for apoptosis. Overexpression of BcL-2 in DTG could render thyrocytes resistant to Fas/FasL-mediated apoptosis. We conclude that the expression of apoptosis-related protein plays an important role in the pathogenesis of HT and DTG.

【Key words】Autoimmune thyropathy; Fas/FasL; BcL-2; Immunohistochemistry

细胞凋亡在自身免疫性疾病的发生上具有重要意义。研究已证明细胞凋亡的发生与凋亡相关蛋白 Fas/FasL 以及 BcL-2 作用有关。Fas 是肿瘤坏死因子受体家族的细胞表面分子,其配体 FasL 是肿瘤坏死因子家族的三聚体跨膜蛋白,FasL 与其受体

作者介绍:刘 纯(1963-),女,硕士,副教授,主要研究方向:甲状腺疾病

基金项目:重庆医科大学临床学院启动基金资助项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Fas 结合促使携带 Fas 的细胞凋亡[1]。BcL－2 是一种原癌基因，其表达产物膜蛋白具有抗凋亡的作用[2]。本文采用免疫组化方法检测自身免疫性甲状腺病中 Fas/FasL 及 BcL－2 的表达，并以正常甲状腺组织作为对照，以探讨其与自身免疫性甲状腺病病理发生发展中的作用和意义。

1 材料与方法

1.1 组织来源及免疫组化染色

选用重庆医科大学临床学院手术切除经病理诊断证实的 55 例自身免疫性甲状腺病组织，其中桥本氏甲状腺炎(HT)30 例；弥漫性毒性甲状腺肿(DTG)25 例。另外取手术切除甲状腺瘤旁周围正常甲状腺组织 22 例作为实验对照。所有标本均经福尔马林固定，石蜡包埋，5μm 厚连续切片；每例作 HE 染色，并采用 S－P 方法作免疫组化染色。第一抗体 Fas 单克隆抗体，为即用型；FasL 多克隆抗体为浓缩型，工作浓度 1∶100；BcL－2 单克隆抗体为即用型，以上抗体均为美国 Santa 公司产品。SP 试剂盒购于福州迈新生物技术开发公司。在进行免疫组化染色过程中均按产品说明书要求用微波对组织抗原进行修复处理。每种染色均设阳性对照和用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2 免疫组化染色结果判断标准

阳性细胞免疫组化染色强度分 4 级：阴性细胞内无棕褐色沉淀；弱阳性细胞内有浅的棕褐色沉淀；强阳性细胞内有深棕褐色沉淀；中度阳性阳性强度介于弱阳性与强阳性之间。阴性为不表达；弱阳性视为低表达；中度阳性和强阳性视为高表达。

1.3 实验结果统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行 χ^2 检验，$P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 Fas 表达

表 1 HT，DTG 和正常甲状腺 Fas 表达

组别	例数 n	染色结果(例) 阴性	低表达	高表达	阳性率 (%)
正常甲状腺	22	22	0	0	0
桥本氏甲状腺炎	30	18	6	6	40*
弥漫性毒性甲状腺肿	25	10	15	0	60#

三者相比有显著差异 $P<0.01$；*HT 与正常甲状腺相比 $P<0.01$；#DTG 与正常甲状腺相比 $P<0.01$，HT 与 DTG 相比 $P<0.05$。

22 例实验对照组中滤泡细胞均未见 Fas 抗原表达。30 例 HT 中 12 例呈阳性反应，阳性染色均位于细胞浆，其中 6 例呈高表达(图 1)；另 6 例为低表达，在靠近淋巴细胞浸润区的滤泡细胞阳性反应均较强。25 例 DTG 阳性中 15 例呈弱阳性，为低表达(表 1)。

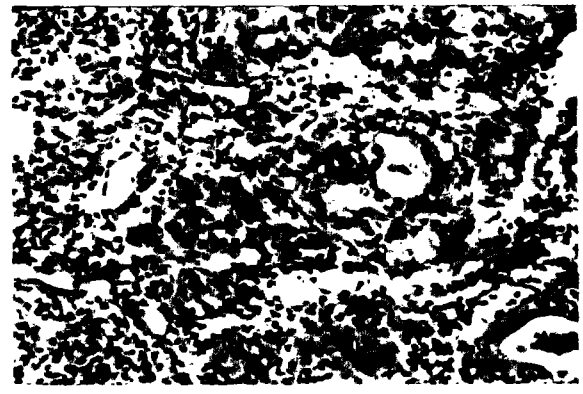


图 1 桥本氏甲状腺炎滤泡细胞 Fas 呈强阳性×200



图 2 弥漫性毒性甲状腺肿 FasL 呈强阳性×200



图 3 弥漫性毒性甲状腺肿 BcL－2 呈强阳性×200

2.2 FasL 表达

正常甲状腺，HT、DTG 均可见滤泡细胞表达 FasL，18 例正常甲状腺组织，25 例 HT，25 例 DTG 为高表达(图 2)，其余均为低表达(表 2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 HT,DTG 和正常甲状腺 FasL 表达

组别	例数 n	染色结果(例)	
		低表达	高表达
正常甲状腺	22	4	18
桥本氏甲状腺炎	30	5	25
弥漫性毒性甲状腺肿	25	0	25

三者相比 $P>0.05$,均无显著差异。

2.3 BcL－2 表达

正常甲状腺组织均可见不同强度的 BcL－2 表达,其中高表达占 86.3%;HT 的阳性率为 86.6%,其中 5 例高表达,21 例为低表达,在靠近淋巴细胞浸润区的滤泡细胞阳性反应减弱或呈阴性。DTG 阳性率为 100%,且均为高表达(图 3)。三者相比有显著差异 $P<0.01$,其中 HT 分别与正常甲状腺及 DTG 相比 $P<0.01$,均有显著差异,而 DTG 与正常甲状腺相比 $P>0.05$,无显著差异(表 3)。

表 3 HT,DTG 和正常甲状腺 BcL－2 表达

组别	例数 n	染色结果(例)		P 值
		低表达	高表达	
正常甲状腺	22	3	19	
桥本氏甲状腺炎	30	21	5	* ≠
弥漫性毒性甲状腺肿	25	0	25	※

*HT 与正常甲状腺相比 $P<0.01$,≠HT 与 DTG 相比 $P<0.01$,※DTG 与正常甲状腺相比 $P>0.05$。

3 讨 论

目前愈来愈多的实验证据提示在许多病理和生理过程中,凋亡是一种主动性细胞自杀过程,是生物体中普遍存在的现象,它与胚胎形成、衰老、损伤细胞的清除,自反应 T 淋巴细胞的清除等有密切关系[3]。凋亡的发生受基因调控,并与 BcL－2 基因表达及 Fas 与 FasL 的相互作用有关[1,2]。凋亡活动异常将导致各种疾病[3]。通过免疫组化对自身免疫性甲状腺疾病检测分析发现在慢性淋巴细胞性甲状腺炎中凋亡的甲状腺滤泡细胞明显增多[4~6],绝大多数凋亡细胞位于浸润淋巴细胞周边受破坏的滤泡区,在完整的滤泡中凋亡细胞数较低[5]。正常甲状腺组织中滤泡细胞凋亡数非常少,甚至缺乏,慢性淋巴细胞性甲状腺炎中凋亡的甲状腺滤泡细胞显著高于正常甲状腺组织,有非常显著的差异 $P<0.01$,对弥漫性毒性甲状腺肿的凋亡研究结果则不同,与正常甲状腺组织类似[5,7]。有关自身免疫性甲状腺炎的破坏机制至今仍然不清,但目前研究结果提示由细胞毒淋巴细胞诱导靶细胞的凋亡为其主要方式,这种免疫反应介导的凋亡,可通过阻断 Fas 途径而阻断细胞毒性作用[8],并认为 Fas 途径在调节免疫反应中具有重要作用,在免疫细胞毒作用中是诱导凋亡的中心[8]。具有抗凋亡作用的 BcL－2 基因,其产物在甲状腺病理中也具有作用,许多研究证明 BcL－2 蛋白在甲状腺中存在,从而推测它与桥本氏甲状腺炎,弥漫性毒性甲状腺肿和甲状腺癌有关[8]。

我们通过免疫组化方法检测 HT、DTG 和正常甲状腺组织中 Fas、FasL 及 BcL－2 的表达,结果显示在正常甲状腺组织中未见滤泡细胞表达 Fas 蛋白与 Glordano 等[1](1997 年)的结果一致。相反在 HT 和 DTG 中可见滤泡细胞表达 Fas,在靠近淋巴细胞浸润区的甲状腺滤泡细胞阳性反应较强,与目前的文献报道一致[1,5,9]。HT Fas 表达阳性率为 40%,DTG 表达的阳性率为 60%,与正常甲状腺组织相比均有显著差异 $P<0.01$。另外正常甲状腺组织、HT 和 DTG 中均有甲状腺滤泡细胞表达 FasL,其表达强度无差异 $P>0.05$,但在 HT 中淋巴细胞浸润区滤泡细胞表达增强。关于 BcL－2 的表达,正常甲状腺组织、HT 和 DTG 中均有甲状腺滤泡细胞表达,25 例 DTG BcL－2 的表达均呈强阳性为高表达,与正常甲状腺组织无显著差异,而 30 例 HT 中有 21 例为低表达,仅 5 例为高表达,与正常甲状腺及 DTG 相比有非常显著差异 $P<0.01$。根据本实验结果分析,我们认为在 HT 中甲状腺滤泡细胞通过表达 Fas 和 FasL,经过其相互作用导致部分滤泡细胞自杀性凋亡[1],而 BcL－2 表达的减弱,降低了抗凋亡的作用,因此 Fas 和 FasL 的表达增强以及 BcL－2 表达的减弱在 HT 的病理发生中起重要作用。在 DTG 中由于滤泡细胞通过增强 BcL－2 的表达,而使滤泡细胞对 Fas 和 FasL 介导的凋亡作用减弱。有关 HT 及 DTG 滤泡细胞 Fas,FasL,BcL－2 表达的调节可能与浸润的淋巴细胞产生的细胞因子有关,但具体调节机制目前仍然不清,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Giordano C, Stassi G, DeMaria R, et al. Potential involement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis[J]. Science, 1997;275(5302):960－963.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[2] Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death[J]. Nature, 1990; 348(6299): 334-336.

[3] Phelp E, Wu P, Bretz J, et al. Thyroid cell apoptosis: A new understanding of thyroid autoimmunity[J]. Endocrinology & Metabolism Clinic of North America, 2000; 29(2): 375-389.

[4] Tanjmoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, et al. Apoptosis in thyroid diseases: A histochemical study[J]. Endocrine Journal, 1995; 42(2): 193-201.

[5] Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, et al. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis[J]. Journal of Pathology, 1997; 182(2): 138-144.

[6] Mitslades N, Poulaki V, Kotoula V, et al. Fas/FasL ligand up-regulation and BcL-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis[J]. Journal of Clinic Endocrinology and Metabolism, 1998; 83(6): 2199-2203.

[7] Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, et al. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease[J]. The Journal of Clinic Endocrinology & Metabolism, 1999; 84(8): 2896-2901.

[8] Patricia L, Arscott and James R, Baker Jr. Apoptosis and thyroiditis[J]. Clinical immunology and immunopathology, 1998; 87(3): 207-217.

[9] J Muller-Hocker. Expression of BcL-2, Bax and Fas in oxyphil cells of Hoshimoto thyroiditris[J]. Virchows Arch, 2000; 436(6): 602-607.

(上接第 123 页)变化相一致。结合国内外文献，我们认为 PKCβ 表达的逐渐增高可能是 DR 发生与发展的重要因素。

本文观察了糖尿病大鼠视网膜血管重建规律，发现周细胞数逐渐减少，残留周细胞影。Lee 等采用 DNA 断端标记技术(TUNEL)观察了糖尿病背景型视网膜病变患者视网膜消化铺片，发现周细胞呈 TUNEL 阳性，认为细胞凋亡是因细胞退化的原因[7]。本文结果进一步显示糖尿病大鼠视网膜血管周细胞消失与 PKCβ、δ 动态变化相一致。有研究表明糖尿病大鼠主动脉 PKCβ、δ 激活，PKCδ 超表达的同时，$PKC\beta_2$ 膜部表达迹上调，此是否提示 PKCδ 是 DR 发展中的主导因素尚不清楚，视网膜血管 PKC 同工酶 β、δ 超表达转基因动物模型可能为阐明 PKCβ、δ 在 DR 中的作用提供有力证据。

综上所述，糖尿病状态下，PKC 同工酶 β、δ 不仅被激活，且表达规律各异，PKC 同工酶 β、δ 在 DR 发生、发展中发挥不同的作用，其具体机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Lorinzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in retina[J]. Diabetologia, 2001; 44(7): 791-796.

[2] Park JY, Takahara N, Gabriele A, et al. Induction of endothelin-1 Expression by glucose. An effect of protein kinase c activity[J]. Diabetes, 2000; 49(1): 1239-1248.

[3] Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, et al. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat to retinal circulation[J]. Am J physiol, 1993; 54(5): E785-E793.

[4] Kowlum RA, Jirousek MR, Stramm L, et al. abnormalities of retinal metabolism indiabetes or experimental galactosemia V Relationship between protein kinae C and ATP ase[J]. Diabetes, 1998; 47(9): 464-469.

[5] Kang NL, Alexander G, Park JK, et al. Differential expression of protein kinase c isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Kidney Int, 1999; 56: 1737-1750.

[6] Ishii H, Jirousek MR, Kaya D, et al. Ameloration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC 13 inhibitor [J]. Science, 1996; 272: 708-731.

[7] Lee W, Liu x, Yanoff M, et al. Cultured retinal capillary Pericyte die by apoptosis after an abrupt fluctation from high glucose levels: a comparative study with endothelial cells [J]. Diabetologia, 1996; 39: 537-541.

[8] Deacon EM, Pongrac ZJ, Griffiths G, et al. Isoenzymes of protein kinase c differential involvement in apoptosis and pathogenesis[J]. J clin Pathol Mol Pathol, 1997; 50: 124-131.